

## VLIV MANGANATÝCH, KOBALTNATÝCH A NIKELNATÝCH IONTŮ NA RŮST A PRODUKCI KUMARINŮ V SUSPENZNÍ KULTUŘE *ANGELICA ARCHANGELICA* L.

SIATKA T., KAŠPAROVÁ M., SKLENÁŘOVÁ H.<sup>1</sup>, SOLICH P.<sup>1</sup>

Katedra farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

<sup>1</sup>Katedra analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

### SOUHRN

#### Vliv manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.

Rostlinná buňka reaguje na zvýšenou koncentraci kovů v prostředí různými mechanismy. Patří mezi ně zvýšení tvorby proteinů tepelného šoku, metalothioneinů, fytochelatinů, aminokyselin (cysteinu, histidinu), organických kyselin (citronové, jablečné) nebo sekundárních metabolitů. Poslední mechanismus je zkoumán pro možnost využití v explantátových kulturách ke stimulaci sekundárního metabolismu, který je zdrojem farmaceuticky významných látek. V práci byly testovány manganaté (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 mM/l média), kobaltnaté a nikelnaté ionty (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 a 500  $\mu$ M/l média) jako potenciální elicitory produkce kumarinů. Současně byla sledována toxicita těchto kovů pro kulturu hodnocením vlivu na růst (charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace). Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle. Bylo zjištěno, že růst kultur není ovlivněn manganem v koncentracích 0 až 2 mM, poté mírně klesá, při koncentraci 50 mM je o 20 % nižší při kultivaci ve tmě a o 30 % při kultivaci na světle ve srovnání s kontrolou. Kobalt v koncentracích 0 až 50  $\mu$ M neovlivňuje významně růst kultury, vyšší koncentrace snižují nárůst biomasy, výrazněji při kultivaci na světle (při 500  $\mu$ M Co o 60 %, ve tmě jen o 30 % ve srovnání s kontrolami). Nikl v koncentracích 0,1 až 200  $\mu$ M neovlivňuje růst, v koncentraci 500  $\mu$ M jej snižuje přibližně o 30 % ve srovnání s kontrolou při kultivaci na světle i ve tmě. Produkce kumarinů nebyla žádným kovem stimulována v porovnání s kontrolními kulturami. Pouze odstranění manganu z média v kultuře kultivované ve tmě zvýšilo produkci asi o 15 % oproti kontrole.

**Klíčová slova:** *Angelica archangelica* L. – suspenzní kultura – růst – produkce kumarinů – mangan – kobalt – nikl – sekvenční injekční analýza

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 47–51

### SUMMARY

#### Effect of Manganese (II), Cobalt (II), and Nickel (II) Ions on the Growth and Production of Coumarins in the Suspension Culture of *Angelica archangelica* L.

The plant cell reacts to an increased concentration of metals in the environment by various mechanisms. They include an increase in the formation of heat-shock proteins, metallothioneins, phytochelatin, amino acids (cysteine, histidine), organic acids (citric, malic), or secondary metabolites. The latter mechanism is being investigated for its possible use in explant cultures for the stimulation of secondary metabolism, which is the source of substances of pharmaceutical importance. The study tested manganese (II) (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, and 50 mM in the medium), cobalt (II), and nickel (II) ions (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, and 500  $\mu$ M in the medium) as potential elicitors of coumarin production. At the same time, toxicity of these metals for the culture was examined by evaluating their effect on growth (characterized by fresh and dry weight of biomass at the end of a two-week cultivation). Cultures were cultivated in the dark and in the light. It has been found that the growth of cultures is not influenced by manganese in concentrations ranging from 0 to 2 mM, then it slightly decreases, at a concentration of 50 mM it is lower by 20 % when cultivated in the dark and by 30 % when cultivated in the light in comparison with the control. Cobalt in concentrations of 0 to 50  $\mu$ M does not significantly influence the growth of the culture, higher concentrations decrease the biomass yields, more markedly when cultivated in the light (at 500  $\mu$ M Co by 60 %, in the dark only by 30 % in comparison with the controls). Nickel in concentrations of 0.1 to 200  $\mu$ M does not influence growth, and in a concentration of 500  $\mu$ M decreases it by approximately 30 % in comparison with the control both in the light and dark. Production of coumarins was not stimulated by any metal in comparison with the control cultures, only the remo-

val of manganese from the medium in the culture cultivated in the dark increased production by about 15 % versus the control.

**Key words:** *Angelica archangelica* L. – suspension culture – growth – coumarins – manganese – cobalt – nickel – sequential injection analysis

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 47–51

Má

## Úvod

Rostlinné tkáňové kultury představují slibný zdroj pro získávání látek přírodního původu. Jednou z hlavních příčin, která zatím až na několik výjimek neumožňuje komerční využití, je nízká produkce většiny sekundárních metabolitů rostlinnými buňkami v podmínkách *in vitro*<sup>1,2</sup>. Jsou zkoumány různé metody a postupy, jak tuto produkci zvýšit. Patří mezi ně i elicitace, jež je založena na faktu, že akumulace mnoha sekundárních látek v rostlinách je součástí jejich obranné reakce vůči působení patogenů nebo vlivů prostředí<sup>3</sup>. Faktory vyvolávající obranné reakce se obecně označují jako elicitory nebo stresory. Lze je rozdělit na biotické (např. viry, bakterie, houby) a abiotické, které mohou být fyzikální (např. záření, horko, chlad) nebo chemické (např. těžké kovy, ozon)<sup>1,4</sup>. Mechanizmy účinku biotických a abiotických elictorů jsou odlišné a nejsou zcela známy. Stejně tak mnohdy chybí detailní znalost biosyntetických drah sekundárního metabolismu. Vliv elictoru na rostlinnou tkáňovou kulturu nelze tedy jednoduše předpovědět a musí být empiricky zkoušen<sup>2</sup>.

V této práci je sledováno působení manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů jako potenciálních elictorů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

a na světlo (světelná perioda 16 hod světlo/8 hod tma). Pasážována byla ve čtrnáctidenním intervalu.

Účinek kovových iontů byl sledován po přepasáží na MS média s různým obsahem příslušného iontu; u manganatých iontů to byly koncentrace 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 mmol/l média, u kobaltnatých a nikelnatých iontů byly testovány koncentrace 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 a 500 μmol/l média. Po čtrnáctidenní kultivaci byly buňky odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a zváženy pro zjištění čerstvé hmotnosti, poté byly usušeny a zváženy pro určení suché hmotnosti. Čerstvá a suchá hmotnost sloužily k hodnocení růstu kultur. V usušených buňkách a v médiu byl stanoven obsah kumarinů. Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí t-testu pro minimálně 3 členy souboru a hladinu významnosti  $p=0,05$ .

## Stanovení kumarinů

Obsah kumarinů byl stanovován fluorimetricky technikou sekvenční injekční analýzy<sup>6,7</sup>. Podmínky stanovení byly následující: nosný proud–voda, průtoková rychlost 3 ml/min, mísící cívka 1,5 ml, dávkovaný objem vzorku 40 μl, dávkovaný objem fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066 mol/l a pH 6 100 μl, excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 390 nm. Jako standard byl použit skopoletin. Obsah kumarinů v buňkách byl vyjadřován v mg skopoletinu na g sušiny, v médiu v mg skopoletinu na litr média.

## POKUSNÁ ČÁST

### Chemikálie

Chlorid thiaminia *puriss.*, chlorid pyridoxinia *puriss.* Koch-Light Laboratories, Colnbrook; skopoletin č. Fluka, Buchs; myoinositol, kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová Sigma, St. Louis; 6-benzylaminopurin reinst Serva, Heidelberg; glycin č., dihydrogenfosforečnan draselný *p.a.*, hydrogenfosforečnan sodný *p.a.*, kyselina nikotinová č., chlorid kobaltnatý *p.a.*, chlorid nikelnatý *p.a.*, síran manganatý *p.a.*, methanol *p.a.*, sacharosa *p.a.* Lachema, Brno.

### Přístroje

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno; roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha; analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen; laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava; laboratorní třepačka, IKA, Staufen; pístová pumpa, Alitea Instruments, Seattle; osmicečný selekční ventil, Vici Valco Instruments, Brockville; spektrofluorimetr FS 970, Spectra-Physics, Darmstadt.

### Suspenzní kultura anděliky lékařské

K pokusům byla použita devítiletá suspenzní kultura *Angelica archangelica* L., která byla kultivována na roleru v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga<sup>5</sup> (MS) s přidavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové a 0,4 mg/l 6-benzylaminopurinu ve tmě

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Možnost využití solí kovů ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách skýtá ve srovnání s biotickými elicitory několik výhod: jsou snadno dostupné, relativně levné, mají definované složení, snadněji se s nimi pracuje.

Mangan patří mezi esenciální stopové prvky pro rostliny<sup>8</sup>, je mimo jiné koenzymem nebo aktivátorem mnoha dehydrogenas, hydroxylas, dekarboxylas a dalších enzymů<sup>4,9</sup>. Rovněž nikl se řadí k esenciálním mikroelementům<sup>11</sup>. Je nezbytnou součástí ureázy, která je nutná pro hydrolýzu močoviny vznikající při metabolismu aminokyselin a nukleotidů; nedostatečná aktivita enzymu vede k akumulaci močoviny v rostlinných tkáních a následně ke vzniku nekrotických lézí na listech<sup>11,12</sup>. O dalších účincích niklu, jež nemohou být ve vztahu k tomu, že je strukturální komponentou ureázy, je známo jen velmi málo<sup>4,10</sup>. Bylo například pozorováno, že nikl zvyšuje účinnost somatické embryogeneze v kalusové kultuře *Setaria italica*<sup>13</sup>. Kobalt je jako součást vitamínu B<sub>12</sub> esenciálním prvkem pro člověka, živočichy a prokaryoty, v rostlinách se tento vitamin nevyskytuje a není známa ani jiná biologická funkce pro kobalt ve vyšších rostlinách<sup>14</sup>, je nezbytný pouze pro bobovité rostliny se

Tab. 1. Vliv manganatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

| Koncentrace<br>Mn <sup>2+</sup><br>(μmol/l) | kultivace ve tmě        |                        |                           |                  | kultivace za světla     |                        |                           |                  |
|---------------------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|
|                                             | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  |
|                                             | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) |
| 0,0                                         | 5,96±0,42               | 354±6                  | 1,15±0,04                 | 2,90±0,05        | 5,13±0,06               | 333±6                  | 1,05±0,02                 | 1,85±0,05        |
| 0,1                                         | 6,27±0,07               | 367±3                  | 0,99±0,07                 | 2,47±0,07        | 5,50±0,07               | 347±2                  | 0,94±0,02                 | 1,93±0,01        |
| 0,2                                         | 6,21±0,17               | 372±5                  | 0,93±0,02                 | 2,35±0,08        | 5,20±0,18               | 348±4                  | 0,86±0,01                 | 1,67±0,09        |
| 0,5                                         | 5,96±0,20               | 364±5                  | 0,85±0,06                 | 2,03±0,08        | 5,27±0,16               | 348±4                  | 0,81±0,01                 | 1,28±0,07        |
| 1,0                                         | 6,02±0,14               | 362±1                  | 0,78±0,02                 | 1,94±0,02        | 5,45±0,07               | 326±11                 | 0,78±0,01                 | 1,24±0,11        |
| 2,0                                         | 5,85±0,12               | 360±8                  | 0,68±0,02                 | 1,52±0,06        | 5,37±0,14               | 337±6                  | 0,72±0,02                 | 0,87±0,03        |
| 5,0                                         | 5,67±0,08               | 360±9                  | 0,63±0,10                 | 1,11±0,04        | 5,08±0,10               | 296±5                  | 0,62±0,01                 | 0,43±0,05        |
| 10,0                                        | 5,26±0,26               | 341±11                 | 0,58±0,01                 | 0,96±0,04        | 4,75±0,22               | 288±4                  | 0,63±0,01                 | 0,41±0,01        |
| 20,0                                        | 5,05±0,11               | 332±5                  | 0,49±0,02                 | 1,07±0,03        | 4,09±0,15               | 262±3                  | 0,58±0,01                 | 0,52±0,04        |
| 50,0                                        | 4,82±0,03               | 315±3                  | 0,44±0,01                 | 1,34±0,10        | 3,60±0,24               | 254±8                  | 0,59±0,01                 | 0,74±0,04        |

Tab. 2 Vliv kobaltnatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

| Koncentrace<br>Co <sup>2+</sup><br>(μmol/l) | kultivace ve tmě        |                        |                           |                  | kultivace za světla     |                        |                           |                  |
|---------------------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|
|                                             | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  |
|                                             | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) |
| 0,0                                         | 6,43±0,13               | 384±6                  | 0,85±0,05                 | 2,03±0,09        | 5,89±0,10               | 350±1                  | 0,88±0,01                 | 1,66±0,05        |
| 0,1                                         | 6,43±0,21               | 380±3                  | 0,94±0,06                 | 1,98±0,17        | 5,96±0,20               | 353±10                 | 0,87±0,04                 | 1,67±0,14        |
| 0,5                                         | 6,64±0,10               | 385±3                  | 0,91±0,08                 | 2,12±0,04        | 5,90±0,22               | 348±10                 | 0,87±0,08                 | 1,53±0,05        |
| 1,0                                         | 6,17±0,35               | 384±4                  | 0,92±0,02                 | 1,84±0,30        | 5,89±0,02               | 343±6                  | 0,89±0,02                 | 1,46±0,04        |
| 5,0                                         | 6,24±0,42               | 380±2                  | 0,90±0,04                 | 2,10±0,12        | 5,70±0,23               | 332±6                  | 0,83±0,02                 | 1,15±0,12        |
| 10,0                                        | 6,58±0,13               | 386±5                  | 0,93±0,04                 | 2,00±0,03        | 5,51±0,08               | 321±8                  | 0,81±0,01                 | 1,09±0,07        |
| 50,0                                        | 6,48±0,20               | 380±3                  | 0,76±0,04                 | 1,49±0,03        | 5,69±0,15               | 305±5                  | 0,77±0,04                 | 0,08±0,01        |
| 100,0                                       | 6,54±0,50               | 358±24                 | 0,74±0,05                 | 0,98±0,03        | 5,27±0,10               | 287±3                  | 0,82±0,01                 | 0,09±0,02        |
| 200,0                                       | 6,22±0,38               | 356±27                 | 0,50±0,10                 | 0,67±0,07        | 4,44±0,19               | 243±9                  | 0,57±0,03                 | 0,78±0,06        |
| 500,0                                       | 4,64±0,31               | 352±11                 | 0,56±0,02                 | 2,43±0,14        | 2,12±0,41               | 146±13                 | 0,35±0,03                 | 1,93±0,10        |

symbiotickými bakteriemi fixujícími atmosférický dusík v kořenových hlízkách<sup>15)</sup>. Mangan, nikl i kobalt mohou ve vyšších množstvích působit na rostliny toxicky<sup>15–17)</sup>, přičemž citlivost rostlin k nim se může lišit mezi druhy, případně i uvnitř téhož druhu<sup>4, 18)</sup>. Byly popsány odrůdy čiroku<sup>19)</sup> nebo tritikále<sup>20)</sup> odolné vůči zvýšené koncentraci manganu. Existují rostlinné druhy, které endemicky rostou na půdách s vysokým obsahem příslušného kovu a dokonce jej bez poškození hromadí ve svém organismu, často v množstvích vyšších než 1000 μg na g sušiny; označují se jako hyperakumulátory, např. *Crotalaria cobalticola*<sup>14)</sup> nebo *Nyssa sylvatica*<sup>15)</sup> hromadí kobalt, *Alyssum lesbiacum*, *Thlaspi goesingense*<sup>14)</sup>, *Alyssum murale*<sup>21)</sup> akumulují nikl.

Manganaté, kobaltnaté a nikelnaté ionty byly testovány v širokém rozmezí koncentrací jako potenciální elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské. Současně byla sledována i jejich případná toxicita pro kulturu, a to hodnocením vlivu na růst, který byl charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace. Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle, protože světelné podmínky mohou výrazně ovlivnit růst rostlinných kultur i tvorbu sekundárních metabolitů<sup>22–24)</sup>.

Vliv manganatých iontů je shrnut v tabulce 1. Manganaté ionty jsou obvyklou součástí média podle Murashi-

geho a Skooga (MS médium) v koncentraci 0,1 mM. Růst kultury anděliky lékařské není v rozmezí koncentrací 0 až 2 mM výrazně ovlivněn, poté s rostoucí koncentrací mírně klesá, při nejvyšší použité koncentraci 50 mM je přibližně o 20 % nižší při kultivaci ve tmě a o 30 % při kultivaci na světle ve srovnání s kontrolou. Produkce kumarinů se v kultuře kultivované ve tmě zvýšila při odstranění síranu manganatého asi o 15 % oproti kontrole, pak se zvyšující se koncentraci manganatých iontů obsah kumarinů postupně klesá, při koncentraci 20 a 50 mM byl zaznamenán mírný vzestup kumarinů v médiu, jenž zřejmě souvisí s osmotickým stresem vyvolaným relativně vysokými koncentracemi Mn<sup>2+</sup>. Při kultivaci za světla byly nalezeny obdobné změny produkce kumarinů s tím rozdílem, že množství kumarinů v buňkách při kultivaci v nepřítomnosti manganatých iontů se nezvýšilo ve srovnání s kontrolní kulturou ve standardním MS médiu. Rozdílné působení zvýšených koncentrací manganatých iontů (1 a 10 mM) na růst kultury a produkci kardenolidů v závislosti na světelných podmínkách bylo pozorováno v buněčné kultuře *Digitalis lanata*<sup>25)</sup>. Růst kultury byl snížen při kultivaci na světle, ve tmě nebyl ovlivněn. Tvorba kardenolidů byla stimulována ve tmě, nikoliv při kultivaci na světle. V prýtové kultuře *Digitalis obscura* nepůsobilo zvýšení koncentrace manganatých iontů pozitivně na růst ani na produkci karde-

Tab. 3 Vliv nikelnatých iontů na růst suspenzní kultury anděliky lékařské a produkci kumarinů

| Koncentrace<br>Ni <sup>2+</sup><br>(μmol/l) | kultivace ve tmě        |                        |                           |                  | kultivace za světla     |                        |                           |                  |
|---------------------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|
|                                             | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  | růst kultury            |                        | obsah kumarinů            |                  |
|                                             | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) | čerstvá<br>hmotnost (g) | suchá<br>hmotnost (mg) | buňky<br>(mg/g<br>sušiny) | médium<br>(mg/l) |
| 0,0                                         | 6,53±0,22               | 414±4                  | 0,55±0,01                 | 2,22±0,25        | 6,22±0,21               | 382±11                 | 0,71±0,04                 | 3,12±0,20        |
| 0,1                                         | 6,11±0,25               | 376±20                 | 0,56±0,03                 | 1,94±0,22        | 6,28±0,13               | 372±7                  | 0,64±0,02                 | 2,85±0,10        |
| 0,5                                         | 6,70±0,05               | 407±3                  | 0,48±0,01                 | 1,90±0,07        | 6,16±0,22               | 392±1                  | 0,66±0,03                 | 2,84±0,04        |
| 1,0                                         | 6,48±0,21               | 411±3                  | 0,47±0,02                 | 1,99±0,17        | 6,47±0,36               | 387±5                  | 0,70±0,04                 | 3,10±0,38        |
| 5,0                                         | 6,60±0,02               | 406±7                  | 0,50±0,01                 | 1,97±0,14        | 5,92±0,12               | 402±14                 | 0,56±0,03                 | 3,01±0,08        |
| 10,0                                        | 6,49±0,21               | 407±4                  | 0,47±0,01                 | 1,84±0,12        | 5,65±0,29               | 406±10                 | 0,53±0,03                 | 2,81±0,17        |
| 50,0                                        | 6,74±0,09               | 408±2                  | 0,53±0,01                 | 1,88±0,09        | 5,76±0,26               | 398±9                  | 0,52±0,01                 | 2,40±0,10        |
| 100,0                                       | 6,84±0,09               | 413±5                  | 0,47±0,01                 | 1,44±0,09        | 5,55±0,09               | 413±13                 | 0,43±0,03                 | 2,18±0,11        |
| 200,0                                       | 6,69±0,06               | 424±9                  | 0,44±0,02                 | 1,25±0,10        | 5,94±0,11               | 415±12                 | 0,46±0,02                 | 1,87±0,02        |
| 500,0                                       | 4,87±0,30               | 270±13                 | 0,30±0,02                 | 1,15±0,06        | 4,02±0,36               | 300±24                 | 0,40±0,02                 | 1,80±0,07        |

nolidů, koncentrace 10 mM byla pro kulturu již toxic-  
ká<sup>26)</sup>. Snížení koncentrace síranu manganatého v médiu  
stimulovalo růst suspenzní kultury *Saponaria officinalis*  
i produkci saponinů<sup>27)</sup>. Změny koncentrace mangana-  
tých iontů v médiu neměly vliv na růst transformované  
kořenové kultury *Stizolobium hassjoo* ani na obsah  
L-DOPA, jíž tato kultura produkuje<sup>28)</sup>. Odstranění man-  
ganatých iontů z média vedlo ke zvýšené akumulaci pro-  
tilátek v transgeně tabákové suspenzní kultuře<sup>29)</sup>.

Výsledky působení kobaltnatých iontů na kulturu andě-  
liky lékařské jsou uvedeny v tabulce 2. Kobaltnaté ionty  
jsou v koncentraci 0,1 μM normální součástí MS média.  
Jejich odstranění z média stejně jako zvýšení koncentrace  
až do 50 μM nevedlo k výrazné změně růstu kultury na  
světle ani ve tmě. Při vyšších koncentracích došlo k pokle-  
su nárůstu biomasy, který je výraznější při kultivaci na  
světle (při 500 μM Co<sup>2+</sup> o 60 %, ve tmě jen o 30 %  
ve srovnání s kontrolami). Koncentrace 1000 μM již byla  
letální (data neuvedena). Změny koncentrace kobaltna-  
tých iontů v rozsahu 0 až 10 μM při kultivaci ve tmě  
neměly vliv na tvorbu kumarinů, pak obsah kumarinů  
v buňkách i v médiu klesá; při koncentraci 500 μM výraz-  
ně vrostlo množství kumarinů v médiu, což je patrně  
vyvoláno poškozením buněk suspenzní kultury. Při kultiva-  
ci na světle je obsah kumarinů v buňkách ve srovnání  
s kontrolou beze změny až do koncentrace 100 μM Co<sup>2+</sup>,  
pak dochází k jeho poklesu. Obsah kumarinů v médiu kle-  
sá již od koncentrace 0,5 μM Co<sup>2+</sup> k minimu při 50  
a 100 μM. Při koncentraci 500 μM došlo k prudkému zvý-  
šení obsahu kumarinů v médiu, které koresponduje se sní-  
žením obsahu v buňkách a inhibicí růstu, a je tedy nejspíš  
důsledkem toxického působení kobaltnatých iontů na sus-  
penzní kulturu *Angelica archangelica*. Vliv kobaltnatých  
iontů byl sledován v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*<sup>30)</sup>.  
Chlorid kobaltnatý neovlivnil, podobně jako v suspenzní  
kultuře *Angelica archangelica*, až do koncentrace 100 μM  
růst kultury, avšak produkce paklitaxelu byla stimulována.  
Pozitivní účinek zvýšené koncentrace chloridu kobaltnaté-  
ho (2 μM) na tvorbu saponinů bez negativního ovlivnění  
růstu byl pozorován v kalusové kultuře *Agave amaniensis*<sup>31)</sup>.  
Odstranění kobaltnatých iontů z média vedlo ke  
zvýšení produkce betakyanů v suspenzní kultuře *Beta vul-  
garis*<sup>32)</sup>. Ovlivnění růstu kobaltnatými ionty bylo zkou-

máno u suspenzních kultur *Rauwolfia serpentina*, *Silene  
cucubalus* a *Crotalaria cobalticola*<sup>14)</sup>. U prvních dvou  
kultur byl efekt rostoucí koncentrace kobaltu v médiu  
obdobný jako v kultuře *Angelica archangelica*, zatímco  
kultura *Crotalaria cobalticola* dobře rostla i při desetiná-  
sobku koncentrace toxické pro předchozí kultury. *Crota-  
laria cobalticola* patří, jak bylo zmíněno výše, k rostlin-  
ným hyperakumulátorům kobaltu.

Účinek nikelnatých iontů v suspenzní kultuře anděliky  
lékařské shrnuje tabulka 3. Nikelnaté ionty nejsou na roz-  
díl od manganatých a kobaltnatých iontů součástí MS  
média. Jejich přidavek do média v koncentraci 0,1 až  
200 μM neovlivnil ve srovnání s kontrolou růst kultury  
ani při kultivaci na světle ani ve tmě, koncentrace 500 μM  
jej snížila přibližně o 30 %. Koncentrace 1000 μM kultu-  
ru zahubila (data neuvedena). Produkce kumarinů nebyla  
v porovnání s kontrolní kulturou zvýšena, při vyšších kon-  
centracích nikelnatých iontů (od koncentrace 100 μM při  
kultivaci ve tmě a 10 μM při kultivaci na světle) dochází  
k jejímu snížení. Toxicita nikelnatých iontů byla studová-  
na v suspenzní kultuře *Dianthus caryophyllus*; růst kultu-  
ry nebyl ovlivněn do koncentrace 10 μM Ni<sup>2+</sup>, vyšší kon-  
centrace jej snížily<sup>33)</sup>. Naproti tomu kultura *Angelica  
archangelica* toleruje nikelnaté ionty bez inhibice růstu až  
do koncentrace 200 μM. Někteří autoři doporučují přida-  
vek nikelnatých iontů ke standardnímu MS médiu za úče-  
lem aktivace ureázy, aby se zabránilo akumulaci močovi-  
ny v rostlinných tkáních, a tím jejich poškození při  
kultivaci na MS médiu<sup>12)</sup>. Na základě pozorování v kul-  
tuře *Angelica archangelica* se obohacení MS média nik-  
lem nezdá nezbytné, neboť jeho přidavek v různých kon-  
centracích nezvýšil ani růst kultury ani obsah kumarinů.  
V suspenzní kultuře *Taxus chinensis* nepůsobil chlorid  
nikelnatý v koncentracích 10 až 100 μM negativně na růst,  
v koncentraci 50 μM stimuloval produkci paklitaxelu  
v porovnání s kontrolní kulturou, nižší i vyšší koncentrace  
nikelnatých iontů tvorbu paklitaxelu neovlivnily<sup>30)</sup>.

Vysvětlení výše uvedených faktů a pozorování není jed-  
noduché. Bylo popsáno několik různých mechanismů,  
jimiž reaguje rostlinná buňka na zvýšenou koncentraci ion-  
tů kovů ve svém prostředí. Dochází ke vzrůstu aktivity  
antioxidačních enzymů<sup>34)</sup>, k vyšší tvorbě proteinů tepel-  
ného šoku, metalothioneinů<sup>35)</sup>, fytochelatinů<sup>36)</sup>, amino-

kyselin (např. cysteinu<sup>14</sup>), histidinu<sup>37</sup>), organických kyselin (např. kyseliny citronové, kyseliny jablečné)<sup>38</sup>), sekundárních metabolitů<sup>39</sup>). Posledně jmenovanému mechanismu je věnována výzkumná pozornost kvůli možnosti jeho využití v podmínkách *in vitro* pro stimulaci sekundárního metabolismu, jež je zdrojem mnoha farmaceuticky významných látek. Jednotlivé mechanismy včetně zvýšení produkce sekundárních metabolitů se ovšem v rostlinách a rostlinných explantátových kulturách uskutečňují rozdílnou měrou v závislosti na rostlinném druhu a druhu kovu – může se jich uplatnit několik najednou, přičemž mohou, každý s jinou intenzitou, probíhat paralelně nebo na sebe vzájemně navazovat; některé mohou být naopak vyjádřeny jen velmi slabě nebo vůbec ne.

Závěrem lze konstatovat, že na základě dosažených výsledků se manganaté, kobaltnaté a nikelnaté ionty nejeví jako vhodné elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře GA Univerzity Karlovy (grant č. 155/2002/B-BIO/FaF) a výzkumného záměru č. CEZ: J13/98:111600003.

## LITERATURA

1. Wu, J., Lin, L.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002; 59, 51.
2. Bhagwath, S. G., Hjortso, M. A.: J. Biotechnol., 2000; 80, 159.
3. Radman, R. et al.: Biotechnol. Appl. Biochem., 2003; 37, 91.
4. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin. Praha, Academia, 1998.
5. Murashige, T., Skoog, F.: Physiol. Plant., 1962; 15, 473.
6. Siatka, T., Solich, P., Kotyk, R.: Pharmazie, 1998; 53, 273.
7. Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.: Chem. Listy, 1999; 93, 354.
8. Welch, R. M.: Crit. Rev. Plant Sci., 1995; 14, 49.
9. Mori, T., Sakurai, M., Sakuta, M.: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2000; 62, 135.
10. Gerendas, J. et al.: J. Plant Nutr. Soil Sci., 1999; 162, 241.
11. Gerendas, J. et al.: Plant Soil, 1998; 203, 127.
12. Witte, C.-P. et al.: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2002; 68, 103.
13. Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P.: Euphytica, 1998; 101, 319.
14. Oven, M. et al.: Phytochemistry, 2002; 60, 467.
15. Chatterjee, J., Chatterjee, C.: Plant Sci., 2003; 164, 793.
16. Nogueira, M. A., Cardoso, E. J. B. N., Hampp, R.: Plant Soil, 2002; 246, 1.
17. Yang, X. et al.: J. Plant Nutr., 1996; 19, 73.
18. Pollard, A. J. et al.: Crit. Rev. Plant Sci., 2002; 21, 539.
19. Mgema, W. G., Clark, R. B.: J. Plant Nutr., 1995; 18, 983.
20. Zhang, X. G., Jessop, R. S., Ellison, F.: Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1999; 30, 2399.
21. Abou Auda, M. M. et al.: J. Plant Physiol., 2002; 159, 1087.
22. Mukherjee, S., Ghosh, B., Jha, S.: J. Biotechnol., 2000; 76, 73.
23. Szakiel, A. et al.: Plant Physiol. Biochem., 2003; 41, 271.
24. Chattopadhyay, S. et al.: J. Biosci. Bioeng., 2002; 93, 215.
25. Ohlsson, A. B., Berglund, T.: J. Plant Physiol., 1989; 135, 505.
26. Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P.: Phytochemistry, 1997; 45, 81.
27. Fulcheri, C., Morard, P., Henry, M.: J. Agric. Food Chem., 1998; 46, 2055.
28. Sung, L.-S., Huang, S.-Y.: Biotechnol. Prog., 2002; 16, 1135.
29. Tsoi, B. M. Y., Doran, P. M.: Biotechnol. Appl. Biochem., 2002; 35, 171.
30. Zhang, C.-H., Wu, J.-Y.: Enzyme Microb. Technol., 2003; 32, 71.
31. Sri Andrijany, V., Indrayanto, G., Adi Soehono, L.: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1999; 55, 103.
32. Akita, T., Hina, Y., Nishi, T.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002; 66, 902.
33. Gabrielli, R., Gori, P., Aniello, S.: Plant Sci., 1995; 104, 225.
34. Tewari, R. K. et al.: Plant Sci., 2002; 162, 381.
35. Hall, J. L.: J. Exp. Bot., 2002; 53, 1.
36. Cobbett, C. S.: Curr. Opin. Plant Biol., 2000; 3, 211.
37. Krämer, U. et al.: Nature, 1996; 379, 635.
38. McGrath, S. P., Zhao, F.-J.: Curr. Opin. Biotechnol., 2003; 14, 277.
39. Zheng, Z., Wu, M.: Plant Sci., 2004; 166, 507.

Došlo 2. 2. 2004.

Přijato ke zveřejnění 2. 3. 2004.

PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
e-mail: siatka@faf.cuni.cz

## NOVÉ KNIHY

Fricke, U., Klaus, W.: **Neue Arzneimittel, Band 14, Fakten und Bewertung von 1999 bis 2002 zugelassenen Arzneimittel.** Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2004, 760 s., 70 obr., 73 tab., cena 76 euro.

Nejnovější svazek známé řady „Neue Arzneimittel“ tvoří monografie 51 léčiv, které v letech 1999 až 2002 byly uvedeny na trh v SRN a EU a v řadě případů jsou již k dispozici i u nás. Jak tomu bylo poprvé u předcházejícího svazku, léčiva rozdělená do skupin podle ATC vždy uvádí shrnující obecný úvod. Již letný pohled na toto třídění jasně naznačuje trend výzkumu a vývoje léčiv poslední doby. Ukazuje, že co do počtu do terapie zavedených nových léčiv stojí v popředí dvě skupiny. První jsou léčiva zažívачího traktu a metabolismu ve zvýšené míře zastoupena antidiabetiky, druhou cytostatika a imunomodulancia. Několika léčivými jsou zastoupena

i antitrombika, antiinfektiva typu antibiotik a antivirotik a psychofarmaka. Standardně sestavené monografie obsahuje všechny základní informace, které lékař potřebuje pro preskripci a lékárník v expedici. Jsou to údaje o farmakologii a farmakokinetice, o mechanismu účinku a o indikacích, kontraindikacích i vedlejších projevech. Není možno tu informovat o všech léčivech a je možno jen upozornit na ty z nich, které podle autorů představují pokrok v terapii. Jsou jimi např. z antidiabetik glitazony (rosiglitazon a pioglitazon) a repaglinid, z enzymů agalsidasy pro terapii Fabryho syndromu, ze syntetických steroidů typu 19-nortestosteronu abortivum mifepriston, z antiinfektiv syntetické antibiotikum linezolid a antivirotikum fomivirsin, z cytostatik vedle monoklonálních protilátek (rituximab, trastuzumab a alemtuzumab) i syntetický retinoid bexaroten a antileukemikum imatinib, nebo v terapii revmatické artritidy používaná antispresiva (infleximab, etanercept, leflunomid).

A. Borovanský