

## VLIV ULTRAZVUKU NA PRODUKCI FLAVONOIDŮ KULTUROU *ONONIS ARVENSIS* L. *IN VITRO*

TÚMOVÁ L., SKRBAKOVÁ E., DUŠEK J.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie

### SOUHRN

#### Vliv ultrazvuku na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*

Byl testován vliv ultrazvuku o hustotě výkonu 0,1 W/cm<sup>3</sup> (stálá frekvence 35 kHz) na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. Použití tohoto abiotického elicitoru se osvědčilo pro zvýšení produkce sekundárních látek (flavonoidů) v kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro*. Maximální produkce flavonoidů nastala po působení ultrazvuku 1 min a okamžitým odběru kultury – nárůst o 677 % oproti kontrole (bez působení ultrazvuku).

**Klíčová slova:** *Ononis arvensis* L. – suspenzní kultura – flavonoid – ultrazvuk

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 40–43

### SUMMARY

#### Effect of Ultrasound on the Production of Flavonoids by the Culture of *Ononis arvensis* L. *in vitro*

The paper tested the effect of ultrasound of output density of 0.1 W/cm<sup>3</sup> (stable frequency, 35 kHz) on the production of flavonoids in the suspension culture of *Ononis arvensis* L. The use of this abiotic elicitor was proved good to increase the production of secondary substances (flavonoids) in the culture of *Ononis arvensis* L. *in vitro*. The maximal production of flavonoids began after a 1 min action of ultrasound and immediate withdrawal of the culture – an increase by 677 % in comparison with the control (without the action of ultrasound).

**Key words:** *Ononis arvensis* L. – suspension culture – flavonoids – ultrasound

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 40–43

Má

Problematika zvýšení produkce terapeuticky významných sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* je jednou z intenzivně sledovaných oblastí farmaceutické biotechnologie. Zejména metoda elicitace těchto kultur, která využívá obranných reakcí rostlin, se jeví jako velice nadějnou. Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor, nalézt jeho vhodnou koncentraci a optimální dobu působení, a pro každou tkáňovou kulturu.

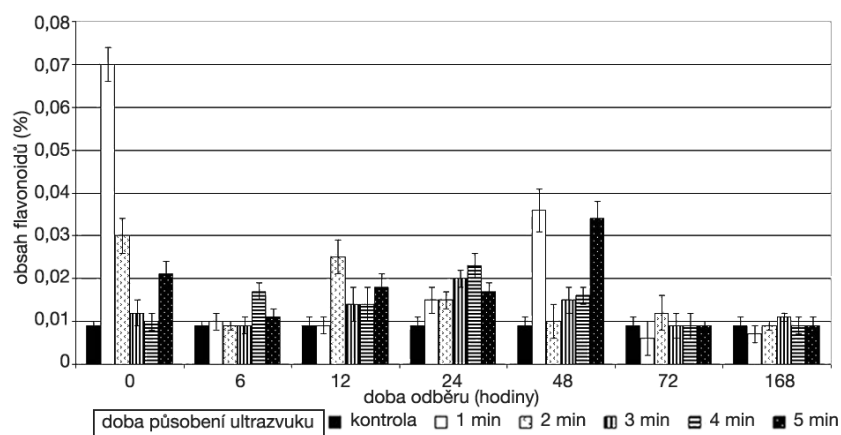
Aplikované elicitory jsou charakteru biotického či abiotického. Použití abiotických elicitorů je výhodnější pro jejich snadnější dostupnost a často i nižší cenu.

V některých případech však nemohou dokonale nahradit biotické elicitory. Například pro zvýšení hladiny peroxidasy v transformované kořenové kultuře *Armoracia lapathifolia* byly použity jako abiotické eli-

citory AgNO<sub>3</sub> a CuSO<sub>4</sub> a z biotických elicitorů extrakty z hub *Verticillium sp.*, *Monodictis cataneae* a *Aspergillus niger*. Stoprocentní nárůst peroxidasové aktivity byl dosažen však pouze po elicitaci extraktem z *Verticillium sp.*<sup>1)</sup>

Experimentální práce s abiotickými elicitory, zejména se solmi těžkých kovů, UV zářením a herbicidy, ukázaly, že s jejich použitím lze dosáhnout zvýšené produkce některých sekundárních metabolitů<sup>2,3)</sup>.

Poměrně častou skupinou používaných elicitorů jsou soli těžkých kovů. Těžké kovy mohou indukovat oxidativní stres s nadprodukcí aktivních forem kyslíku, které rychle reagují s DNA, lipidy a proteiny způsobujícími buněčné poškození. Aktivní formy kyslíku mají snahu se transformovat na více stabilní chemické formy jako peroxid vodíku, který stimuluje obranný systém rostlin<sup>4)</sup>.



Obr. 1. Porovnání obsahu flavonoidů po elicitaci ultrazvukem v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na době odběru

Produkce tropanových alkaloidů u *Brugmansia candida* byla ovlivněna působením některých biotických a abiotických elicitorů. Dusičnan stříbrný významně zvyšoval uvolňování skopolaminu a akumulaci skopolaminu a hyoscyaminu, za tento účinek je pravděpodobně zodpovědný inhibiční efekt  $\text{AgNO}_3$  na ethylen.  $\text{CaCl}_2$  neměl žádný efekt na uvolňování nebo akumulaci alkaloidů,  $\text{CdCl}_2$  pozitivně ovlivňoval uvolňování alkaloidů<sup>5)</sup>.

Ultrazvuk jako fyzikální elicitor může ve vhodné intenzitě stimulovat biologické pochody a způsobit dokonce výrazné zvýšení produkce sekundárních metabolitů v buněčných kulturách, jak bylo prokázáno například v rostlinách *Panax ginseng* a *Lithospermum erythrorhizon*<sup>6-8)</sup>.

Použití ultrazvuku o vysoké energii se jeví jako destruktivní na biologické materiály, neboť dochází k rozrušení buněčných membrán a deaktivaci biologických molekul, jako jsou enzymy a DNA. Naproti tomu ultrazvuk o nízké energii působí na zvýšení membránové propustnosti, což vede ke zvýšené absorpci cizích látek a uvolňování vnitrobuněčných produktů vytvořených buňkami<sup>7)</sup>. Biologický efekt ultrazvuku na růst buněk a produkci sekundárních metabolitů souvisí s celkovou energií ultrazvuku (jeho výkonem a dobou působení) a jeho termálními a non-termálními mechanismy<sup>7)</sup>. Termální mechanismy jsou spojeny s významným teplotním růstem objektů, na které působí ultrazvuk z důvodu absorpce a zeslabení akustické energie. Non-termální mechanismy jsou hlavní příčinou vlivu ultrazvuku na biosyntézu a biopřeměnu v buněčných suspenzích za kontrolované teploty a dělí se na mechanické a chemické vlivy, které především souvisí s akustickou kavitací. Kavitace může být přechodná, způsobená plyny; nebo stabilní, daná přítomností bublin (dutin), které způsobují akustické mikroproudění<sup>7,9)</sup>.

Bylo prokázáno, že ultrazvuk může působit jako silný abiotický elicitor v indukci obranných reakcí rostliny a stimulaci sekundárních metabolitů v kultuře<sup>6)</sup>.

Suspenzní kultura rostliny *Panax ginseng* byla vystavena působení ultrazvuku o nízké energii. Důvo-

dem byla indukce obranných reakcí a produkce sekundárních metabolitů. Buňky žensenu byly vystaveny ultrazvuku o hustotě výkonu  $\leq 0,1 \text{ W/cm}^3$  při fixní frekvenci 38,5 kHz po dobu 30 s až 6 min. Byly přítomny dva případy časných obranných reakcí, a to přechodný zvýšený tok  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a výstup  $\text{K}^+$  z buňky za současného přítoku  $\text{H}^+$  dovnitř a dále tvorba aktivních kyslíkových radikálů detekovaných 2 min po expozici. K významnému zvýšení celkového obsahu saponinů došlo 9. den po elicitaci ultrazvukem ( $61,4 \text{ mW/cm}^3$ , fixní frekvence 38,5 kHz, doba působení 2 min) o 45 % oproti kontrole a 15. den po elicitaci o 80 % oproti kontrole<sup>6)</sup>.

Vlivem působení ultrazvuku 4 min (hustota výkonu  $82 \text{ mW/cm}^3$ , fixní frekvence 38,5 kHz) došlo ke zvýšení celkového obsahu saponinů v buňkách *Panax ginseng in vitro* o 75 %<sup>7)</sup>.

Ultrazvuk o nízké energii ( $\leq 113,9 \text{ mW/cm}^3$ ) stimuloval i biosyntézu shikoninu v buňkách suspenzní kultury *Lithospermum erythrorhizon*. Výtěžek shikoninu se zvýšil až o 60–70 %, a to v důsledku zvýšení aktivity dvou klíčových enzymů syntézy shikoninu. Množství shikoninu vylučované z buněk se zvýšilo z 20 % na 65–70 % díky zvýšení propustnosti buněčné membrány<sup>8)</sup>.

Jako velice výhodná se jevila kombinace elicitace pomocí ultrazvuku či chemického elicitoru metyljasmonátu s *in situ* rozpouštědlovou extrakcí na produkci taxolu v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*. Bylo dosaženo zvýšení produkce taxolu na 33–35 mg/l, což je přibližně 17násobné zvětšení produkce oproti kontrole – 1,9 mg/l<sup>10)</sup>.

Naproti tomu se ultrazvuk neosvědčil jako vhodný elicitor při působení na suspenzní kulturu *Glycyrrhiza glabra* L. Byla sledována produkce saponinů glycyrrhizinu a glycyrrhetinu. V průběhu experimentu nebyl v kulturách ani v médiu detekován žádný ze sledovaných sekundárních metabolitů<sup>11)</sup>.

Mezi hlavní výhody elicitace ultrazvukem patří, že obranné mechanismy jsou aktivovány velice rychle a vlastní reakci lze již detekovat pouhé sekundy po expozici ultrazvukem<sup>6)</sup>.

## POKUSNÁ ČÁST

### Chemikálie

Methenamin, čistý; aceton, čistý; kyselina chlorovodíková, čistá; síran sodný bezvodý, čistý; chlorid hlinitý, čistý; kyselina octová ledová, čistá; methanol, p.a., ethyl ester kyseliny octové, čistý.

### Biologický materiál

Pro pokusy byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Ononis arvensis* L. ve 49.–54. pasáži.

### Kultivace tkáňové kultury

Pro kultivaci kalusové i suspenzní kultury bylo použito médium (MS) podle Murashigeho a Skooga<sup>12)</sup> s obsahem kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové v koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup>. Kultivace kalusové kultury probíhala v 100 ml Erlenmayerových baňkách za teploty 25 °C a osvětlení s 16hodinovou světelnou periodou.

Kalusová kultura byla 30. den po subkultivaci převedena mechanickým rozdrobněním na kulturu suspenzní, byla provedena elicitace ultrazvukem o hustotě výkonu 0,1 W/cm<sup>3</sup> (stálá frekvence 35 kHz) a následná kultivace kultury probíhala za teploty 25 °C a osvětlení s 16hodinovou světelnou periodou na laboratorní třepačce (120 ot/min).

Suspenzní kultury byly vystaveny působení ultrazvuku po dobu 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min. Experimentální vzorky byly odebrány ihned po expozici ultrazvuku a následně po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Kontrolní vzorky (bez působení ultrazvuku) byly odebrány ihned a dále po 12 a 48 hodinách. V rámci každého časového intervalu včetně kontrol bylo k odběru použito vždy po pěti baňkách.

Suspenzní kultury byly přefiltrovány přes filtrační papír a zachycené buněčné shluky se sušily při pokojové teplotě; cca 0,600 g zachycených buněčných shluků bylo po přefiltrování a usušení upráškováno a použito ke stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2002<sup>13)</sup>.

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení, ze kterých byly vypočítány obsahy flavonoidů a konečný výsledek byl získán jako aritmetický průměr těchto tří hodnot a byl vztažen na vysušenou drogu.

## DISKUZE A ZÁVĚR

Při hodnocení produkce flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro* po elicitaci ultrazvukem po dobu 1 min, lze vysledovat, že ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů oproti kontrole docházelo při okamžitém odběru a odběru po 48 hodinách (obr. 1). Naproti tomu došlo při odběru po 72 a 168 hodinách k poklesu obsahu flavonoidů o 33 % a 22 % oproti kontrole, což je jediné snížení, které bylo v průběhu všech testovaných elicitací zaznamenáno (obr. 1).

Po elicitaci ultrazvukem po dobu 2 min (obr. 1) došlo téměř ve všech časových intervalech ke zvýšení

obsahu flavonoidů oproti kontrolám (bez elicitace), ale statistické významnosti bylo dosaženo při okamžitém odběru po působení ultrazvuku a po 12 a 24 hodinách.

Z výsledků získaných při elicitaci ultrazvukem po dobu 3 min a 4 min (obr. 1) vyplývá, že obsah flavonoidů pozvolna rostl s dobou odběru a svého maxima dosáhl při odběru po 24 hodinách. Při tomto odběru nastal nárůst v obsahu o 122 % po 3minutovém působení ultrazvuku a o 155 % při 4minutovém působení oproti kontrole. Po odečtu obsahu flavonoidů bylo zaznamenáno další statisticky významné zvýšení jejich produkce při odběru po 6 a 48 hodinách při 4 min působení elicitoru (obr. 1).

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů oproti kontrole došlo při odběru ihned, po 12, 24 a 48 hodinách po 5 min působení ultrazvuku (obr. 1).

Z výsledků této práce je zřejmé, že doba odběru po 72 a 168 hodinách elicitace nevedla při žádné sledované elicitaci k pozitivnímu ovlivnění produkce (obr. 1). Při působení ultrazvuku 1 min a době odběru ihned byla zaznamenána největší změna obsahu flavonoidů v kultuře nárůst o 677 % (obr. 1). Doba odběru ihned po působení ultrazvuku se i u ostatních elicitací jevila jako výhodná, což může být odůvodněno tím, že obranné mechanismy jsou po působení ultrazvuku aktivovány velice rychle i pouhé sekundy po expozici<sup>6)</sup>.

Při elicitaci ultrazvukem u suspenzní kultury *Ononis arvensis* L. měla nejvyšší odezvu v produkci flavonoidů elicitace ultrazvukem po dobu 1 min, kdy při okamžitém odběru byl zvýšen obsah flavonoidů o 677 % a při odběru po 48 hodinách o 300 % oproti kontrole (obr. 1). Jako velice výhodná se jevila i elicitace ultrazvukem po dobu 5 min, kde byl nárůst v obsahu flavonoidů zvýšen o 278 % při době odběru po 48 hodinách (obr. 1).

Pokusy s abiotickým elicitorom ultrazvukem prokázaly, že volba tohoto elicitoru byla správná. Důvodem k tomuto tvrzení jsou vzrůstající hodnoty obsahu flavonoidů, které byly dosaženy po elicitaci.

Pro srovnání lze uvést výsledky některých pokusů s ultrazvukem prováděných na jiných rostlinných kulturách.

Ultrazvuk se neosvědčil jako vhodný elicitor při působení na suspenzní kulturu *Glycyrrhiza glabra* L., kde byla sledována produkce saponinů. V průběhu experimentu nebyl v kulturách ani v médiu detekován žádný ze sledovaných metabolitů<sup>11)</sup>.

Naopak u suspenzní kultury *Panax ginseng* se působení ultrazvuku (hustota výkonu 61,4 mW/cm<sup>3</sup>, fixní frekvence 38,5 kHz) projevilo signifikantním zvýšením celkového obsahu saponinů. Devátý den po elicitaci 2 min byl zaznamenán nárůst o 45 % a patnáctý den o 80 % oproti kontrole<sup>6)</sup>.

Při dalším pokusu se suspenzní kulturou *Panax ginseng* se působení ultrazvuku (hustota výkonu 82 mW/cm<sup>3</sup>, fixní frekvence 38,5 kHz) projevilo pozitivním efektem na produkci sledovaných metabolitů při všech expozičních úrovních a testovaných časech. Celkový obsah saponinů v buňkách se zvýšil o 50–70 % oproti kontrolám<sup>7)</sup>.

Z uvedeného vyplývá, že elicitace ultrazvukem nemusí vždy pozitivně ovlivňovat tvorbu žádaných sekundárních metabolitů, neboť jak již bylo uvedeno, pro každou buněčnou kulturu a danou produkovanou látku je nutno najít vhodný elicitor a stanovit optimální dobu jeho působení.

Práce byla vypracována za finanční podpory výzkumného záměru MS M0021620822.

## LITERATURA

1. **Flocco, C. G., Alvarez, M. A., Giuliatti, A. M.:** Biotechnol. and Appl. Biochem., 1998; 28, 33.
2. **Tůmová, L., Blažková, R.:** Čes. slov. Farm., 2002; 51, 44.
3. **Tůmová, L. et al.:** Čes. slov. Farm., 2003; 52, 189.
4. **Zacchini, M. et al.:** Plant Physiol. Biochem., 2003; 41,

- 49.
5. **Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., Giuliatti, M.:** Enzyme Microb. Technol., 2000; 26, 252.
6. **Wu, J., Lin, L.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002; 59, 51.
7. **Lin, L. et al.:** Ultrasound Med. Biol., 2001; 27, 1147.
8. **Lin, L., Wu, J.:** Biotechnol. Bioeng., 2002; 78, 81.
9. **Sinisterra, J. V.:** Ultrasonics, 1992; 30, 180.
10. **Wu, J., Lin, L.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003; 62, 151.
11. **Řimáková, J.:** Dizertační práce, 2005, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové.
12. **Murashige, T., Skoog, F.:** J. Plant Physiol., 1962; 15, 473.
13. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002. Praha, Grada Publishing. 2002; s. 3655.

Došlo 27. 9. 2005.

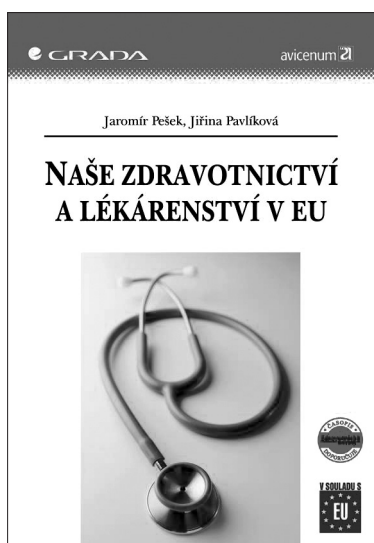
Přijato ke zveřejnění 31. 10. 2005.

doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Katedra farmakognozie FaF

Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

e-mai: tumova@faf.cuni.cz



## NAŠE ZDRAVOTNICTVÍ A LÉKÁRENSTVÍ V EU

Jaromír Pešek, Jiřina Pavlíková

Příručka je určena pro subjekty působící v oblasti zdravotnictví v období po vstupu ČR do EU. Najdete zde základní informace o EU, přehled vybraných právních předpisů, informace výrobcům, dovozcům, distributorům, a prodejcům zdravotnických prostředků.

Vydala Grada Publishing v roce 2005. ISBN 80-247-1392-6, kat. číslo 3000, A5, brož. vazba, 152 stran, cena 195 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz