

VLIV SÍRANU VANADYLU (VOSO_4) NA PRODUKCI FLAVONOIDŮ KULTUROU *ONONIS ARVENSIS* L. IN VITRO

TŮMOVÁ L., SKÁLOVÁ R., DUŠEK J.

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

SOUHRN

Vliv síranu vanadylu (VOSO_4) na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. in vitro

Byl testován vliv síranu vanadylu (VOSO_4) na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. (*Fabaceae*). Tato látka se osvědčila jako abiotický elicitor pro zvýšení produkce sekundárních látek (flavonoidů) v kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů nastalo v kalusové kultuře po 24 hodinové elicitaci VOSO_4 v koncentraci $1,227 \cdot 10^{-4}$ mol/l, a to o 313 % oproti kontrole a v suspenzní kultuře u koncentrace $1,227 \cdot 10^{-6}$ mol/l po 48hodinovém působení elicitoru o 485 % ve srovnání s kontrolou.

Klíčová slova: *Ononis arvensis* L. – kalusová a suspenzní kultura – flavonoidy – síran vanadylu

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 151–154

SUMMARY

Effect of Vanadyl (IV) Sulfate (VOSO_4) on the Production of Flavonoids by the Culture *Ononis arvensis* L. in vitro

The study tested the effect of vanadyl (IV) sulfate (VOSO_4) on the production of flavonoids in the callus and suspension culture of *Ononis arvensis* L. (*Fabaceae*). This substance proved to be a good abiotic elicitor for an increase in the production of secondary substances (flavonoids) in the culture of *Ononis arvensis* L. in vitro. The maximal increase in the formation of flavonoids took place in the callus culture after 24-hour elicitation with VOSO_4 in a concentration of $1.227 \cdot 10^{-4}$ mol/l by 313 % in comparison with the control and in the suspension culture in a concentration of $1.227 \cdot 10^{-6}$ mol/l after 48-hour action of the elicitor by 485 % in comparison with the control.

Key words: *Ononis arvensis* – callus and suspension culture – flavonoids – vanadyl (IV) sulfate

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 151–154

Má

Úvod

Jednou z metod, které lze využít ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách, je metoda elicitace, při které jsou využívány obranné reakce rostlin v podmínkách in vitro. Předpokladem úspěchu této metody je použití vhodného elicitoru o určité koncentraci a optimální délka jeho působení a také druh použité kultury. Aplikované elicitory bývají většinou biotického či abiotického charakteru.

U kalusové a suspenzní kultury *Ononis arvensis* L. byla v předchozích pokusech testována celá řada abiotických elicitorů za účelem zvýšení produkce flavonoidů, a to buď ve formě solí těžkých kovů, CuSO_4 , $\text{Mn}(\text{SO}_4)$, HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 , či bylo využito účinků UV záření. Po působení těchto abiotických elicitorů byla pro-

kázána zvýšená tvorba flavonoidů jak v kalusové, tak i v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L.^{1–4)}

Metody elicitace byly zkoumány také z pohledu zefektivnění výtěžku thiarubinu A, sekundárního metabolitu a zároveň potenciálního léčiva, produkovaného kořenovým vlášením kultury *Ambrosia artemisiifolia* L. Abiotická elicitace byla provedena s použitím roztoku síranu vanadylu. Mezi určující faktory patřilo stáří kultury, hodnota koncentrace použitého elicitoru a doba, po kterou byla kultura působení elicitoru vystavena. Po 16denní kultivaci byl přidán k rostlině *Ambrosia artemisiifolia* L. jako elicitor roztok síranu vanadylu o koncentraci 50 mg/l. Po 72hodinové elicitaci došlo k osminásobnému zvýšení obsahu thiarubinu A (což odpovídalo 569 µg/l)⁵⁾.

Cílem další studie se stal mechanismus buněčné odpovědi v rámci suspenzní kultury jaterníku po elicitaci abiotickým elicitem vanadičnanem sodným. Ukázalo se, že rychlost produkce 1,4-dimethylazulenu, jednoho z podstatných sesquiterpenoidů obsažených v buňkách jaterníku, byla po působení vanadičnanu sodného více než dvojnásobná. Tento nárůst byl iniciován rovněž zdvojenou aktivitou 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reduktázy (jedná se o enzym integrovaný do isoprenoidní biosyntézy). Dále vzrostla aktivita superoxiddismutázy, askorbátperoxidázy a glutathionreduktázy; a to 1,5–2x v poměru s kontrolním vzorkem jaterníku, který vanadičnanem ošetřen nebyl. Intracelulární hodnoty glutathionu po přidání elicitoru vzrostly 10x oproti kontrole. Podobné vlastnosti jako vanadičnan projevil i peroxid vodíku. Po přidavku této látky do kultury došlo ke zvýšení produkce 1,4-dimethylazulenu, jehož koncentrace dosáhla stejné hodnoty jako po aplikaci vanadičnanu sodného.

Závěrem je tedy poznatek, že užití elicitorů způsobuje vznik aktivních forem kyslíku, které tvoří jeden z článků biosyntetické cesty vedoucí k tvorbě 1,4-dimethylazulenu ⁶⁾.

Ortovanadičnan sodný je tedy používán jako abiotický elicitor k navození biosyntézy alkaloidů. Odpověď zkoumané buněčné kultury na tento abiotický faktor je však velmi podobná reakci zjištěné po elicitaci činitelem biotickým (konkrétně uhlovodíkovou frakcí z kvasnicového extraktu). Ošetření ortovanadičnanem sodným vedlo k alkalizaci růstového média, 20násobné indukci klíčového enzymu tyrosindekarboxylasy a zvýšení tvorby alkaloidů (až 40 mg/l). Rozdíl můžeme ale zjistit v množství alkaloidů produkovaných do rostoucího média. Zatímco buňky napuštěné kvasnicovým elicitem vylučují přes 50 % z celkového množství těchto látek, u buněk vystavených působení ortovanadičnanu sodného je tento podíl mnohem menší, tvoří asi jen 10 % produkovaných alkaloidů ⁷⁾.

Několik studií také ukázalo, že síran vanadytu pozitivně ovlivňuje glukosový metabolismus. Sloučeniny vanadu mohou suplovat účinky inzulínu jako alternativní cesta léčby. Studovány byly konkrétně vlastnosti tří organických sloučenin vanadu: vanadyl acetylacetonátu (VAc), vanadyl 3-ethylacetylacetonátu (Vet) a bis(malto)oxovanadia (VM). Pokusy se prováděly na diabetických potkanech a vedle účinků již zmiňovaných sloučenin se sledovalo také působení jednoduché anorganické soli síranu vanadytu (SV).

Po orálním užití sloučenin obsahujících vanad byl po tři měsíce indukován rychlejší a výraznější pokles glykémie nežli u síranu vanadytu. Stejný poměr pak platí i pro získané hodnoty glukosurie a tolerance na glukózu.

Aktivita i kvalita mRNA klíčových glykolytických enzymů (konkrétně glukokinasy a L-pyruvát kinasy), jejichž činnost je v diabetických játrech značně limitována, byla díky působení vanadu opět obnovena. Organické formy sloučenin vanadu (zejména VAc) zde prokázaly výrazně vyšší účinnost než jednoduchá anorganická sůl SV.

Během testů se však nepotvrdil vztah mezi plazmatickými a tkáňovými hodnotami vanadu a získanými parametry glukosové homeostázy a jaterního glukosového metabolismu. Také není zaznamenána výraznější míra

toxicity komplexů vanadu na funkci jater nebo ledvin testovaných potkanů. Asi v 50 % případů se sice vyskytla chronická diarea, jednalo se ale o následky užívání síranu vanadytu, u organických sloučenin se nic podobného neobjevilo.

Ze závěrů studie vyplývá, že organické sloučeniny vanadu, hlavně pak vanadyl acetylacetonát, účinně korigují hyperglykémii a narušují hepatickou glykolýzu u diabetických potkanů; a to všechno výrazně efektivněji a šetrněji nežli síran vanadytu ⁸⁾.

VOSO₄ se často využívá ke zvýšení efektivity tréninku u vrcholových atletů. S tím souvisí i značný zájem o míru spolehlivosti této látky, neboť stále panují domněnky o negativním vlivu vanadičnatých sloučenin na lidský organizmus; nejvíce pak v této souvislosti bývá zmiňována anémie nebo poškození leukocytárního systému.

V uvedeném výzkumu byl síran vanadytu podáván v množství 0,5 mg/kg/den po dobu 12 týdnů skupině tvrdě trénujících sportovců. Byly sledovány jeho účinky na krev (na červené a bílé krvinky a krevní destičky), dále na viskozitu krve a její biochemii (zejména na lipidy a koeficienty jaterní a ledvinové funkce). Hodnocení krevní viskozity proběhlo po 0; 2; 4; 8 a 12 týdnech, hematologické faktory a biochemie byla změřena před započítím a na konci výzkumu. Jednalo se o dvojité zaslepenou studii, kromě testovaných sportovců vystavených účinkům VOSO₄ došlo k vyčlenění i tzv. placebo skupiny. U sledovaných skupin i u sportovců užívajících pouze placebo vzrostl hematokrit i hodnota viskozity, nebyl však prokázán žádný signifikantní léčebný účinek. Podobně tomu bylo i u hematologických a biologických faktorů, ani zde získaná data nepotvrdila přímý vliv VOSO₄ na organizmus testovaných osob. Závěry této studie tedy vyvracejí tezi o nepříznivém vlivu perorálně užívaného síranu vanadytu na lidskou krev ⁹⁾.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie

Aceton, čistý; destilovaná voda; ethylester kyseliny octové, čistý; chlorid hlinitý, p.a.; kyselina chlorovodíková, čistá; kyselina octová ledová, čistá; methenamin, čistý; bezvodý síran sodný, čistý; síran vanadytu, p.a.; methanol p.a.

Biologický materiál

Tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Ononis arvensis* L. ve 37.–49. pasáži.

Kultivace tkáňové kultury

Pro kultivaci kalusové i suspenzní kultury bylo použito medium dle Murashigeho a Skooga (MS) ¹⁰⁾ s obsahem kyseliny α -naftyloctové v koncentraci 10 mg.l⁻¹ jako růstový regulátor. Kultivace probíhala u kalusových kultur na papírových knotech v Erlenmayerových baňkách po dobu 4 týdnů při laboratorní teplotě a denního světelného režimu.

Suspenzní kultura získaná mechanickým rozmělněním kalusu byla kultivována 2 týdny na roleru (8 otáček za minutu) za stejné teploty a intenzity osvětlení jako kultura kalusová.

Jako elicitor byl použit síran vanadylu (VOSO_4) v koncentracích:

$$c_1 = 1000 \text{ mg/l } (6,136 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$c_2 = 20 \text{ mg/l } (1,227 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$c_3 = 0,2 \text{ mg/l } (1,227 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l})$$

K elicitaci bylo vždy použito 35 baněk pro každou koncentraci elicitoru (c_1 , c_2 , c_3). Do 25 baněk byl přidán 1 ml roztoku elicitoru dané koncentrace a 10 baněk bylo použito jako kontrola bez přidaného elicitoru.

Kalusy byly odebrány po 12; 24; 48; 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Kontrolní kalusy se odebíraly po 24 a 168 hodinách. V rámci každého časového intervalu působení elicitoru včetně kontrol bylo k odběru použito 5 baněk. Stejný postup byl použit za identických podmínek i u suspenzních kultur.

Kalusy byly po vyjmutí z baněk usušeny na filtračním papíru za laboratorní teploty. Suspenzní kultury byly přefiltrovány přes filtrační papír a zachycené shluky usušeny při laboratorní teplotě. Takto se postupovalo u všech koncentrací elicitoru.

Stanovení obsahu flavonoidů ¹¹⁾

Ke stanovení obsahu flavonoidů byla využita metoda uvedená v ČL 97. Získané množství (g) kalusu bylo upráškováno, smícháno ve 100 ml baňce s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vařeno pod zpětným chladičem 30 minut. Po zchlazení se roztok zfiltraval přes chomáček vaty. Droga i chomáček vaty se vařily ještě dvakrát s 20 ml *acetonu R* pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Po ochlazení se roztok zfiltraval vždy přes nový chomáček vaty. Spojené acetonové roztoky se zfiltrovaly přes filtrační papír do odměrné baňky na 100 ml a byly doplněny *acetonem R* předem použitým k promytí baňky a filtru. 20,0 ml tohoto roztoku se převedlo do dělicí nálevky, přidalo se 20 ml *vody R* a protřepávalo se nejprve 15 ml a poté 3x 10 ml *ethylacetátu R*. Spojené ethylacetátové vrstvy se pak ještě protřepávaly 2x s 50 ml *vody R* a zfiltrovaly se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředily se *ethylacetátem R* na 50,0 ml. Tímto postupem byl připraven základní roztok.

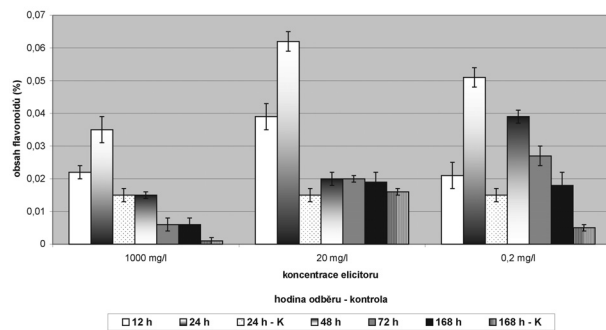
Zkoušený roztok byl připraven smícháním 10,0 ml základního roztoku s 1 ml *chloridu hlinitého RSI* a zředěním roztokem *kyseliny octové ledové R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok byl připraven zředěním 10,0 ml základního roztoku *kyselinou octovou ledovou R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 minutách byla naměřena absorbance zkoušeného roztoku při maximu 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah flavonoidů v procentech se vypočítal podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$



Obr. 1. Obsah flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis L.* po elicitaci roztokem síranu vanadylu

kde A je absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm, m je navážka drogy v gramech.

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení. Ze zjištěných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr.

DISKUZE A ZÁVĚR

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou tkáňovou kulturu. Jedná se například o typ, koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly testovány tři koncentrace vodného roztoku síranu vanadylu. Sledované doby působení elicitoru vycházely z poznatků již dříve provedených pokusů ¹⁻⁴⁾ a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních látek v průběhu několika hodin až několika dní.

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů došlo po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci c_1 po 12; 24; 72 a 168 hodinách; v koncentraci c_2 po 12; 24 a 72 hodinách; v koncentraci c_3 po 24; 48; 72 a 168 hodinách (obr. 1).

Všechny tři koncentrace elicitoru způsobily maximální produkci flavonoidů po 24 hodinách elicitace (obr. 1).

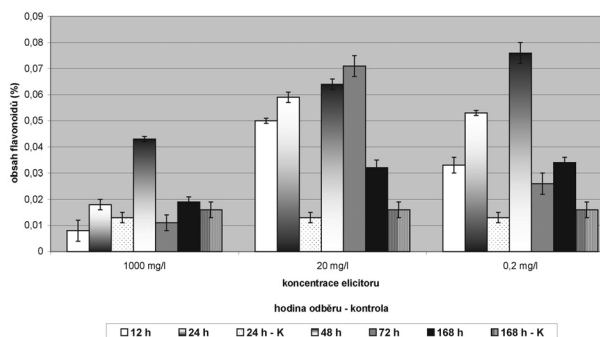
V porovnání s kontrolou byl u koncentrace c_1 obsah flavonoidů po 48 hodinách stejný a po 72 hodinách poklesl o 60 %. U koncentrací c_2 a c_3 byly všechny naměřené hodnoty obsahu flavonoidů vyšší než u kontrolních vzorků.

Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů nastal po elicitaci roztokem elicitoru o koncentraci c_2 po 24 hodinách, a sice o 313 % ve srovnání s kontrolou (obr. 1).

U suspenzní kultury po elicitaci roztokem elicitoru byl obsah flavonoidů statisticky významně zvýšen u koncentrace c_1 po 48 hodinách a u koncentrací c_2 a c_3 při všech odběrech (obr. 2).

U koncentrací c_1 a c_3 byly nejvyšší hodnoty obsahu flavonoidů naměřeny po 48 hodinách elicitace. Zvýšení obsahu flavonoidů bylo pozorováno o 231 % u koncentrace c_1 a o 485 % u koncentrace c_3 v porovnání s kontrolou. U koncentrace c_2 byla produkce flavonoidů nejvyšší po 72 hodinách. Zde nárůst činil 446 % oproti kontrole (obr. 2).

Obsah flavonoidů byl u koncentrací c_1 a c_3 nejvyšší po 48 hodinách elicitace. Po 72 hodinách byl zaznamenán prudký pokles a po 168 hodinách nepatrný nárůst tvorby



Obr. 2. Obsah flavonoidů (%) v suspenzní kultuře *Ononis arvensis L.* po elicitaci roztokem síranu vanadylu

flavonoidů. U koncentrace c_2 probíhal nárůst až do 72 hodin a potom následoval prudký pokles (obr. 2).

U koncentrace c_1 byly naměřené hodnoty obsahu flavonoidů v porovnání s kontrolou po 12 hodinách o 38 % a po 72 hodinách o 15 % nižší, u dalších dvou koncentrací byly získané hodnoty vždy vyšší než u kontroly. Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů nastal po elicitaci roztokem elicitoru o koncentraci c_3 po 48 hodinách, a to o 485 % ve srovnání s kontrolou (obr. 2).

Pokud porovnáváme produkci flavonoidů u kalusových a suspenzních kultur, můžeme konstatovat, že větší tvorba flavonoidů byla pozorována u suspenzních kultur. Nejvyšší obsah flavonoidů byl naměřen u koncentrace c_3 po 48 hodinách, kde nárůst činil 485 % ve srovnání s kontrolou. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že je buňka kultury v kontaktu s elicitem celým svým povrchem.

Pro srovnání lze uvést studii zabývající se získáváním thiarubinu A z rostliny *Ambrosia artemisiifolia* L. Po 72hodinové elicitaci roztokem síranu vanadylu došlo k osminásobnému zvýšení obsahu thiarubinu A (což odpovídalo 569 $\mu\text{g/l}$)⁵⁾.

Také například u kultury jaterníku se zjistilo, že rychlost produkce 1,4-dimethylazulenu byla po působení vanadičnanu sodného více než dvojnásobná. Dále vzrostla aktivita superoxiddismutasy, askorbátperoxidasy a glutathionreduktasy; a to 1,5–2x v poměru s kontrolním vzorkem jaterníku, který vanadičnanem ošetřen nebyl⁶⁾.

Práce byla vypracována za finanční podpory výzkumného záměru MS M0021620822, Výzkum nových lékových struktur.

LITERATURA

1. **Tůmová, L., Rusková, R.:** Čes. slov. Farm., 1998; 47, 261.
2. **Tůmová, L., Blažková, R.:** Čes. slov. Farm., 2002, 51, 44.
3. **Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.:** Herba Polonica, 1998; 44, 27.
4. **Tůmová L., Psotová, R.:** Herba Polonica, 1998; 44, 261.
5. **Bhagwath, S. G., Hjortso, M. A.:** J. Biotechnol., 2000; 80, 159.
6. **Nakagawara, S., Nakamura, N., Sumitani, K. et al.:** Plant Cell Physiol., 1993; 34, 421.
7. **Villegas, M., Sommarin, M., Brodelius, P. E.:** Plant Physiol. Biochem., 2000; 38, 233.
8. **Reul, B. A., Amin, S. S., Buchet, J. P. et al.:** Brit. J. Clin. Pharmacol., 1999; 126, 467.
9. **Fawcett, J. P., Farquhar, S. J., Thou, T., Shand, B. I.:** Instit. Pharmacol. Toxicol., 1997; 80, 202.
10. **Murashige, T., Skoog, F.:** J. Plant Physiol., 1962; 15, 473.
11. **Kolektiv autorů:** Český lékopis 2002. Praha, Grada Publishing, 2002; s. 3665.

Došlo 3. 11. 2004.

Přijato ke zveřejnění 22. 11. 2004.

doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: tumova@faf.cuni.cz

NOVÉ KNIHY

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: **Farmakologie a toxikologie.** Překlad z německého originálu Pharmakologie und Toxikologie (15., zcela přepracovaného vydání Georg Thieme Verlag, vydaného v roce 2003), Grada Publishing, a. s., Praha, 2004, 728 s. ISBN 80-247-0836-1.

V novém přepracovaném vydání autoři knihy, oproti vydání minulému (1999), doplňují nová fakta a předkládají rovněž i nový pohled na danou vědní oblast. Učebnice je didakticky jasně členěným dílem, které zaujme čtenáře svojí přehledností a výbornou grafickou úpravou. V jednotlivých kapitolách se rozděluje jejich obsah do tzv. „stavebních kamenů“, kterými jsou v každé části kapitoly: přehled nejdůležitějších informací, hlavní text s barevnými značkami vyznačujícími mechanismus účinku, farmakokinetiku, použití a nežádoucí účinky. Text obsahující terapeutická hlediska je navíc označen svislou postranní čarou. Údaje, které poskytují zajímavé dodatkové informace a mají vztah k léčebné praxi, jsou umístěny v tzv. boxech – rámečcích číslovaných podle příslušnosti k jednotlivým kapitolám. Kromě strukturních chemických vzorců jednotlivých léčiv a látek je v každé kapitole názorné barevné schéma mechanismu účinku nebo děje, který je farmakologicky vyvoláván.

Stejně jako předcházející vydání obsahuje tato kniha úvodní poznámky k použité terminologii, k cílům knihy, k výběru faktů a k didaktické koncepci. Učebnice obsahuje 23 částí, za kterými následuje popis základních chemických struktur, historický přehled objevů

z oblasti farmakologie, seznam použité literatury k jednotlivým částem, seznam zkratk a podrobný rejstřík.

Za úvodní částí obecné farmakologie obsahující definice, mechanismy účinků, receptory, vztahy struktury a účinků, se popisuje teorie farmakokinetiky včetně farmakokinetických modelů, biologické dostupnosti a bioekvivalence. Kapitulu zakončuje problematika zavádění nových léčiv, jejich předklinického výzkumu i klinického hodnocení včetně otázek nežádoucích a vedlejších účinků léčiv. Zařazena je zde i placebová terapie, homeopatické přípravky a fytotherapie.

V oblasti speciální farmakologie je rozsah všech částí (vegetativní nervový systém, jiné transmittory a mediátory, hladké svaly, srdce, krev, ledviny, elektrolyty, trávicí ústrojí, motorický systém, nociceptivní systém, antiuratika, látky ovlivňující mozek, žlázy s vnitřní sekrecí, léčby vitamíny, antiinfektiva, cytostatika, ovlivňování imunitního systému, dermatologika, dezinficiencia a antiseptika, insekticidy) je vyvážený a prostý zbytečných podrobností.

Nejedná se však o pouhý výčet látek a popis jejich účinků a indikací, ale koncepce učebnice je zaměřena prakticky pro klinickou a zdravotnickou praxi. Rozsáhlejší část je věnována toxikologii a otravám různými látkami.

Stejně jako pro předcházející vydání vybralo nakladatelství Grada Publishing, a.s. pro tento překlad prof. M. Wenkeho a prof. E. Mühlbachovou a zpracovalo knihu způsobem, který mimořádnou názorností psaných textů i grafických schémat a vzorců poskytne studentům farmakologie učebnici, která nepochybně vyvolá jejich zájem o hlubší studium farmakologie a její aplikaci v další praxi lékařů, farmaceutů a odborníků pracujících s léčivem.

P. Komárek