

Biologiczne metody pozyskiwania związków leczniczych w botanice

Biological methods of obtaining medical compounds in botany

Streszczenie

Wyspecjalizowane szlaki metaboliczne zachodzące w roślinach powodują powstawanie metabolitów wtórnych. Wiele spośród nich posiada duże znaczenie dla zdrowia człowieka. Zasoby naturalne roślin są ograniczone, a skomplikowana struktura fitofarmaceutyków często uniemożliwia ich otrzymanie na drodze syntez chemicznych. Zastosowanie kultur komórek roślinnych, biotransformacji, elicytacji, immobilizacji, kultur korzeni włośnikowatych, roślin transgenicznych czy technologii inżynierii metabolicznej pozwala pozyskiwać aktywne związki z roślin i zwiększać wydajność ich otrzymywania. Wykorzystanie osiągnięć biotechnologii i biologii molekularnej otwiera ciągle nowe perspektywy w dziedzinie ochrony zdrowia.

Słowa kluczowe:

Metabolity wtórne, kultury komórek roślinnych, elicytacja, immobilizacja, biotransformacja, korzenie włośnikowate, inżynieria metaboliczna, rośliny transgeniczne

Abstract

Specialized metabolic pathways carried out by plants cause the formation of secondary metabolites. Many of them are very important for human health. Natural resources of plants are limited and because of its complicated phyto-complex structure it is difficult to obtain them by chemical synthesis. The application of plant cell cultures, biotransformation, elicitation, immobilization, hairy roots cultures, transgenic plants, metabolic engineering or technology allows for the acquisition of the active compounds from plants and increases the efficiency of their production. The use of biotechnology and molecular biology opens new perspectives in the field of health care.

Key words:

Secondary metabolites, plant cell culture, eliciting, immobilization, biotransformation, hairy roots cultures, metabolic engineering, transgenic plants

Zatwierdzono do publikacji: czerwiec 2013 r.

W komórkach roślin zachodzą procesy metabolizmu pierwotnego, prowadzące do powstania białek, lipidów, sacharydów, DNA i RNA, niezbędnych roślinom do podstawowych procesów życiowych. Metabolity wtórne wykorzystywane są przez człowieka jako związki lecznicze, barwniki, dodatki do żywności, przyprawy, aromaty oraz biopestycydy. Literatura dostarcza wielu rodzajów klasyfikacji metabolitów wtórnych uwzględniając ich skład, rozpuszczalność lub szlak biochemiczny, w którym powstają.

Liczba metabolitów pochodzenia roślinnego stosowanych w farmakologii jest duża. Są to m.in.: ajmalicyna, artemisyina, ajmalina, berberyna, chinina, digoksyna,

diosgenina, kamptotecyna, kapsaicyna, kastanospermina, kodeina, kolchicyna, elipitycyna, emetyna, forskolina, ginsenozydy, morfina, podofilotoksyna, rezerpina, sangwinaryna, szikonina, paklitaksel, winkrystyna, winblastyna. Metabolity wtórne produkowane są przez rośliny w niewielkich ilościach (mniej niż 1 proc. suchej masy). Ich otrzymywanie z surowców naturalnych – to żmudne i kosztowne procesy, które rzutują na poziom cen uzyskiwanych produktów leczniczych.

Natomiast otrzymanie tożsamyh związków w drodze syntezy chemicznej jest często nie tylko nieoptymalne, ale wręcz niemożliwe. Produkty wieloetapowych przemian odbiegają swoimi właściwościami od



Aleksandra Kubala
studentka V roku

Wydział Farmaceutyczny
z Oddz. Medycyny Lab. WUM

tych, które naturalnie występują w roślinach. Przyczyna tkwi prawdopodobnie w budowie tych związków. Są to złożone, często wielopierścieniowe pochodne z licznymi centrami chiralnymi, których odtworzenie na drodze syntezy chemicznej jest niemożliwe. Dlatego też dla wielu związków stosowanych w lecznictwie jedynym źródłem pozostają rośliny. Z drugiej strony naturalne zasoby roślinne są ograniczone i często niedostępne dla człowieka. Zasadne jest zatem prowadzenie badań nad metodami otrzymywania związków leczniczych z surowców roślinnych i ich udoskonalanie.

Biotechnologia

Biologiczne metody pozyskiwania związków leczniczych są związane z ingerencją w metabolizm wtórny roślin. W tym celu botanika farmaceutyczna wykorzystuje techniki biotechnologii. Według Unii Europejskiej i Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. *Organization for Economic Co-Operation and Development*) biotechnologia roślin zaliczana jest do biotechnologii rolniczej. Metody biotechnolo-

giczne pozwalają na otrzymywanie cennych dla farmakologii związków. Służą ku temu hodowle *in vitro* roślin leczniczych, kultury komórkowe, tkankowe i hodowle organów roślinnych, powstałe w procesie transformacji korzenie włośnikowate lub rośliny genetycznie modyfikowane, inżynieria metaboliczna i genomika funkcjonalna.

Jedną z alternatywnych metod pozyskiwania związków leczniczych, pozwalającą na pominięcie takich ograniczeń jak np. bariery geograficzne czy zmienność pór roku są kultury komórek roślinnych. Komórki roślinne są totipotentne – mają zdolność do odtworzenia poszczególnych organów lub całej rośliny z jej fragmentów. Posiadają cały zestaw genów, potrzebny do przeprowadzania procesów metabolizmu pierwotnego i wtórnego. Na skalę produkcyjną po raz pierwszy tę metodę opisano w latach 50. XX w., wykorzystując kultury *Atropa belladonna* do otrzymania atropiny. Dziś na skalę przemysłową wykorzystuje się kultury komórkowe *Lithospermum erythrorhizon* do otrzymywania szikoniny, *Coptis japonica* do produkcji berberyny, *Papaver somniferum* dla uzyskania sangwinaryny, a *Coleus blumei* jako źródło kwasu rozmarynowego. Wadami tej strategii otrzymywania metabolitów wtórnych są: niska wydajność, brak stabilności genetycznej poszczególnych linii komórkowych oraz ich powolny wzrost. Próbuje się je ograniczyć przez optymalizację warunków hodowli. Ważny jest wybór rośliny, następnie eksplantatu, na którym inicjuje się wzrost tkanki kalusowej. Linie komórkowe otrzymane z kalusa poddawane są selekcji, prowadzącej do otrzymania klonów o najwyższej zdolności do wytwarzania pożądanego związku. Wzrost wydajności metody próbuje się uzyskać przez: dobór odpowiedniej pożywki i jej pH, dodatek regulatorów wzrostu w odpowiednich kombinacjach i stężeniach, właściwą temperaturę, zapewnienie dopływu tlenu. Wpływ na metabolizm wtórny poprzez dodanie prekursorów wzrostu, elicytorów, cząsteczek sygnałowych oraz immobilizacja komórek może także wpłynąć na zwiększenie wydajności produkcji związków leczniczych.

Elicytory

Elicytory są czynnikami stresowymi wywołującymi wytwarzanie związków obron-

nych, a co za tym idzie pobudzenie szlaków metabolizmu wtórnego. Można wyróżnić elicytory biotyczne i abiotyczne, endo- i egzogenne. Elicytory biotyczne mogą pochodzić z roślin (endogenne) lub z patogenów (egzogenne). Wyróżniamy wśród nich m.in. składniki budulcowe ścian komórkowych grzybów, glonów, mikroorganizmy, związki o budowie białek, steroli i węglowodanów mające wpływ na działanie enzymów i kanałów jonowych. Wśród elicytorów abiotycznych można wyróżnić czynniki fizyczne jak: uszkodzenia mechaniczne, promieniowanie UV, wysokie zasolenie, stres wodny, susza, ozon, zbyt niska/wysoka osmolarność oraz chemiczne, do których zaliczamy pestycydy czy związki nieorganiczne. Elicytorami są także cząsteczki sygnałowe, wytwarzane przez rośliny, biorące udział w przekazywaniu sygnałów, do których należą m.in.: tlenek azotu, kwas jasmonowy czy salicylowy.

Mechanizm działania elicytorów nie jest całkowicie poznany. Przyjmuje się, że pod ich wpływem następuje aktywacja szlaków metabolizmu wtórnego prowadząca do powstania związków warunkujących przetrwanie rośliny w warunkach stresowych. Na skuteczność procesu ma wpływ nie tylko wybór właściwego elicytora, jego stężenie, faza rozwoju w której zostanie dodany, ale także warunki hodowli, gatunek rośliny, rodzaj kultury, wybrana linia komórkowa. Wymienione czynniki wpływają na rodzaj i ilość wytwarzanych metabolitów wtórnych, żywotność hodowli i ilość uwalnianych do podłoża związków.

Biotransformacja

Biotransformacja umożliwia otrzymywanie różnorodnych związków chemicznych, wykorzystując jako katalizatory: enzymy, komórki lub organy. Enzymy biorące udział w biosyntezie metabolitów wtórnych wykazują niepełną specyficzność substratową, stąd substratami do biokonwersji mogą być zarówno naturalne prekursorzy szlaków, jak i ksenobiotyki, które są zbliżone strukturalnie do naturalnych prekursorów. Proces biotransformacji nie jest źródłem energii, ani metabolitów pośrednich do dalszych przemian, wymaga udziału jednego lub kilku enzymów. Charakteryzuje się dużą wydajnością przemiany substratu w produkt oraz wysoką czystością otrzyma-

nych produktów. Tą drogą mogą być przeprowadzone następujące typy reakcji: utlenianie, redukcja, hydroksylacja, metylacja, acetylacja, izomeryzacja, glikozylacja, estryfikacja. Proces biotransformacji można przeprowadzać w hodowlach zawieszinowych, komórkach, izolowanych enzymach, często wykorzystując proces immobilizacji.

Immobilizacja to technika unieruchamiania, w której zdolne do katalizy komórki lub enzymy umieszcza się na nośniku celem ograniczenia ich swobodnego ruchu, przy jednoczesnym zapewnieniu dostępu do składników odżywczych i odpływu produktów przemiany materii. Nośnik tworzony jest z substancji żelujących (żele alginianowe, karaginanowe) lub z pianek poliuretanowych. W przypadku, gdy substrat i produkt transportowane są przez błonę komórkową, aktywnie namnażające się komórki z hodowli zawieszinowej immobilizuje się na kuleczkach żelu. Inkubacja na odpowiednim podłożu pozwala na dalsze namnażanie komórek i podniesienie aktywności biotransformacji. Immobilizacja nie zawsze jest efektywna. Przyspieszenie jednych przemian enzymatycznych może hamująco wpłynąć na inne.

Genetyczna transformacja roślin

Korzenie transformowane charakteryzują się stałym poziomem wytwarzania metabolitów wtórnych, szybkim tempem przyrostu biomasy oraz stabilnością genetyczną. Korzenie transformowane, zwane także włośnikowatymi, powstają w procesie transformacji. Wektorem plazmidu są bakterie *Agrobacterium rhizogenes*. Zakażenie rośliny prowadzi do trwałego wbudowania fragmentu DNA z plazmidu Ri (*root inducing plasmid*) do genomu komórki roślinnej. Na przebieg i wydajność transformacji mają wpływ następujące czynniki: szczep bakteryjny i stopień jego wirulencji, czas trwania zakażenia, zastosowanie innych substancji chemicznych oraz warunki fizyczne. W kulturach korzeni transformowanych znaleziono ważne dla lecznictwa związki: alkaloidy tropanowe (skopolaminę i hioscyjaminę), alkaloidy indolowe, chinolinowe (chininę), glikozydy kardenolidowe, poliacyleny, tiofeny, ginsenozy-

dy, antrachinony, naftochinony i paklitaksel.

Obecnie prowadzi się badania nad wykorzystaniem roślin transgenicznych do produkcji szczepionek, rekombinowanych białek, enzymów, interleukin. Rośliny transgeniczne otrzymuje się przez transformację za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*. Transformacja roślin użytkowych może wywołać wiele efektów jak np. wzrost odporności roślin na niekorzystne warunki środowiska, otrzymywanie nowych odmian roślin, pobudzenie wytwarzania określonych związków. Badania nad otrzymywaniem szczepionek z transgenicznych roślin zapoczątkował w Polsce w latach 90. XX w. prof. Andrzej Płucienniczak.

Zaletami szczepionek roślinnych jest ich doustna aplikacja, mniejsze ryzyko odczynów alergicznych, efekt całkowitej immunizacji ogólnoustrojowej, a także odpowiedź śluzówkowa obejmująca wszystkie błony śluzowe organizmu.

Wykorzystanie inżynierii metabolicznej w botanice farmaceutycznej wymaga dokładnej wiedzy na temat przebiegu całego szlaku biosyntezy danego związku, łącznie z mechanizmami, które go regulują. Zakończone sukcesem było np. wprowadzenie do kultur *Atropa belladonna* genu kodującego 6β – hydroksylazę hioscyjaminową – co powodowało wzrost syntezy skopolaminy z hioscyjminy.

Zastanawiające jest, czy zbyt wysoki poziom wtórnych metabolitów otrzymanych metodą inżynierii metabolicznej nie stanie się czynnikiem ograniczającym proces, ponieważ są to związki toksyczne dla roślin, gromadzone wewnątrzkomórkowo.

Podsumowanie

Związki lecznicze pochodzenia naturalnego otrzymywane są głównie z materiału roślinnego. Wymaga to użycia dużych ilości surowców i jest powodem zmniejszenia zasobów roślinnych. Wykorzystanie kultur prowadzonych w warunkach *in vitro* wydaje się być słuszną alternatywą. Jednak kultury roślinne nie zawsze zachowują cały potencjał możliwości roślin hodowanych w warunkach naturalnych. Dlatego nie wszystkie procesy właściwe dla danej rośliny są możliwe do przeprowadzenia podczas jej hodowli w warunkach *in vitro*. Ponadto mechanizmy powstawania określonych związków nie są dokładnie zbadane. Poznanie szlaków biochemicznych oraz mechanizmów je regulujących warunkuje opracowywanie skutecznych i wydajnych metod otrzymywania związków przydatnych w lecznictwie.

Adres do korespondencji:
e-mail:aleksandra.kubala@gmail.com

Piśmiennictwo:

- Shilpa K., Varun K., Lakshmi B.S. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences* 2010, 5 (3): 222-247
- Oksman-Caldentey K-M., Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *TRENDS in plant science* 2004 Vol.9 No.9
- Pietrosiuk A., Furmanowa M. *Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka. Biotechnologia* 2006, 4, (75) 116–123
- Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002, 20, 101-153
- Sharma M., Sharma A., Kumar A., Kumar Basu S. Enhancement of secondary metaboli-

tes in cultured plant cells through stress stimulus. *American Journal of Plant Physiology* 2011, 6 (2): 50-71

Giri A., Dhingra V., Giri C.C., Singh A., Ward O. P., Lakshmi Narasu M. Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology advances* 2001: 19: 175-199

Szpitler A., Królicka A. Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia* 2005, 4 (71) 82-108

Aijaz A., Jain S., Hariharan A.G. Effect of elicitation on the production of phyto-constituents through plant tissue culture technique – A review. *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research* 2011, 1 (2): 84-90

Namdeo A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews* 2007, Vol 1, Issue 1

Vijaya Sree N., Udayasri P., V.V. Aswani kumar Y., Ravi Babu B., Phani kumar Y., Vijay Varma M. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. *Journal of Natural Products*, 2010: Vol. 3: 112-123

Olszowska O. Korzenie transformowane roślin leczniczych. *Biotechnologia* 1992, 4 (19): 21-26

Ma J. K-C., Barros E., Bock R., Christou P., Dale P.J., Dix P.J., Fischer R., Irwin J., Mahoney R., Pezzotti M., Schillberg S., Sparrow P., Stoger E., Twyman R. M. Molecular farming for new drugs and vaccines Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep.* 2005; 6 (7): 593-599

Warzecha H., Mason H.S. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants *J. Plant Physiol.* 2003: 160. 755-764

Sugiyama A., Linley P.J., Sasaki K., Kumano T., Yamamoto H., Shitan N., Ohara K., Takanashi K., Harada E., Hasegawa H., Terakawa T., Kuzuyama T., Yazaki K. Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases *Metabolic Engineering* 2011, 13, 629-637

Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace powinny być zaopatrzone w streszczenie (od 300 do 400 znaków) i słowa kluczowe (od 4 do 9) w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 15 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Praca (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinna być przesłana w formie elektronicznej (na adres gfarm@kwadryga.pl), opatrzona następującymi danymi: nazwisko i imię autora, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu, e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda na opublikowanie pracy (w wersji elektronicznej i drukowanej) oraz deklaracja dotycząca oryginalności artykułu
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów i zwalniane do druku po decyzji Redaktor Naczelnej
- Redakcja zastrzega sobie prawo do adiustacji i skracania nadesłanych tekstów, wprowadzania skrótów, niezbędnych poprawek stylistycznych i skrótów, wyboru materiału ikonograficznego lub niepublikowania nadesłanych materiałów
- © „Gazeta Farmaceutyczna”