



Metabolity wtórne korzeni włosnikowatych *Tanacetum parthenium*

Anna Stojakowska, Wanda Kisiel

Zakład Fitochemii, Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk, Kraków

Secondary metabolites from hairy roots of *Tanacetum parthenium*

Summary

Feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip.) is an ornamental and medicinal plant. Its preparations are mainly used for migraine prophylaxis. Complex mixture of *T. parthenium* secondary metabolites contains among others, sesquiterpene lactones and spiroketalenoether diacetylenes. From the roots of the plant transformed with *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 four diacetylenes and two coumarins were isolated, including the sesquiterpene coumarin ether 9-epipectachol B, a new natural product. The influence of exogenously applied salicylate and methyl jasmonate on diacetylene accumulation pattern was studied. Both signal molecules induced significant changes in the diacetylene accumulation suggesting that the compounds are involved in the plant defence.

Key words:

Tanacetum parthenium, Asteraceae, hairy roots, diacetylenes, coumarins.

Adres do korespondencji

Wanda Kisiel,
Zakład Fitochemii,
Instytut Farmakologii,
Polska Akademia Nauk,
ul. Smętna 12,
31-343 Kraków;
e-mail:
kisielw@if-pan.krakow.pl

biotechnologia

3 (62) 87-94 2003

1. *Tanacetum parthenium* jako roślina ozdobna i lecznicza

Złocień maruna (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip., syn. *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh.) jest mrozoodporną byliną z plemienia Anthemideae, rodziny Asteraceae. Pochodzi z Bałkanów, Azji Mniejszej i Kaukazu, skąd rozprzestrzeniła się w całej Europie. Maruna jest znaną rośliną ozdobną, a jej odmiany hodowlane różnią się głównie formą koszyczków kwiatowych oraz kształtem i kolorem liści. Szczególnie ozdobne są odmiany

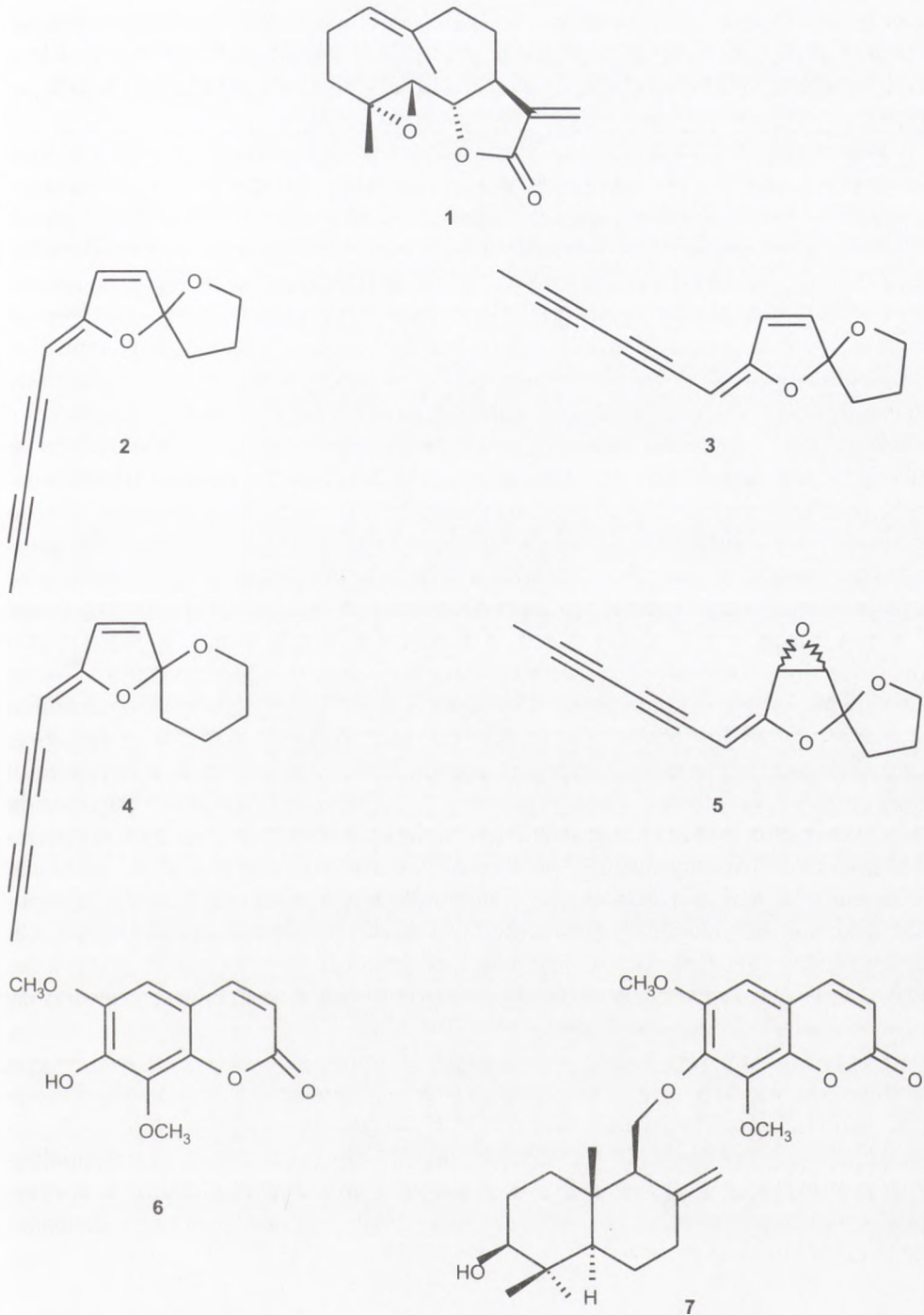
o kwiatostanach przypominających miniaturowe chryzantemy oraz odmiany ze złocistozielonymi liśćmi. Uprawiana jest jak roślina jednoroczna. Nadaje się na kwiat cięty, zachowując długo świeżość w wazonie, jeśli nie przeszkadza silny, aromatyczny zapach składników olejku eterycznego.

W Polsce lecznicze właściwości maruny nie były znane, ale w innych krajach Europy już w czasach Dioskorydesa stosowano liście lub napary z ziela jako środek przeciwbólowy oraz do obniżania temperatury w stanach gorączkowych i stąd zapewne wywodzi się angielska nazwa rośliny *feverfew*. Nazywano też marunę zielem dla kobiet, bo leczyła choroby dróg rodnych, regulowała menstruację, była pomocna przy groźbie poronienia i kłopotach w połogu. Ponadto miała być skutecznym środkiem przeciw melancholii, uczuciu smutku i niechęci do kontaktów z otoczeniem. W XVIII w. uważano marunę w Wielkiej Brytanii za najlepszy ze wszystkich środków przeciw migrenie. Pod koniec lat 70. XX w., właśnie w Wielkiej Brytanii, środki masowego przekazu zwróciły uwagę na powszechne i niekontrolowane stosowanie liści złoczenia maruny w artretyzmie i łuszczycy, a zwłaszcza w migrenie, w przypadkach, gdy leczenie konwencjonalne okazało się nieskuteczne (1,2). Do przeprowadzenia pierwszych badań klinicznych w City of London Migraine Clinic zaproszono pacjentów od dawna stosujących liście maruny przeciw migrenie. Wyniki tych badań były obiecujące, bo sproszkowane liście podawane w kapsułkach przez 6 miesięcy, w eksperymencie podwójnej ślepej próby, rzeczywiście zapobiegały atakom migreny i łagodziły ich przebieg (3). Od tego czasu liczba prac naukowych na temat złoczenia maruny, z których tylko część została zacytowana, rośnie z każdym rokiem. Opisują one nie tylko wyniki kolejnych badań klinicznych (4), ale także wyniki badań, które mają na celu identyfikację składników czynnych rośliny oraz określenie ich mechanizmu działania. Rośnie także liczba preparatów produkowanych na bazie maruny, z których część podlega ochronie patentowej, ze wskazaniem do stosowania głównie w profilaktyce migreny.

2. Związki biologicznie czynne *Tanacetum parthenium*

Z kompleksowej mieszaniny metabolitów wtórnych występujących w nadziemnych częściach *T. parthenium* wyodrębniono szereg mono- i seskwiterpenoidów, diacetyleny z grupy eterów spiroketalenolowych oraz związki flawonoidowe. Ponad połowę wyodrębnionych składników stanowią laktony seskwiterpenowe (około 30), wśród których dominującym związkiem jest germakranolid partenolid (1) (rys.). Monoterpenoidy, kamfora i alkohol chryzantenylowy, także partenolid i diacetyleny, zdeponowane we włoskach wydzielniczych, są zapewne charakterystycznymi składnikami olejku eterycznego. Z korzeni rośliny wyodrębniono tylko dwa nielaktonowe seskwiterpenoidy oraz związki acetylenowe, w tym 3 jako główny składnik (0,2% suchej masy) (2,5-7).

Biosynteza metabolitów wtórnych roślin zależy m.in. od genotypu rośliny, pochodzenia geograficznego i stadium wegetacji. Zawartości partenolidu w liściach



Rys. Wzory chemiczne partenolidu (1), diacetylenów (2 – 5) oraz kumaryn (6, 7) występujących w korzeniach włośnikowatych *Tanacetum parthenium*.

złocienia maruny wahają się od 0,3 do 0,7% suchej masy, ale w niektórych populacjach tej rośliny mogą sięgać 1,7% (8). Znane są także populacje *T. parthenium*, w których związek ten nie występuje. Najwięcej partenolidu zawierają liście w okresie poprzedzającym wytwarzanie łodyg oraz koszyczki kwiatowe (9).

Współcześnie złocien maruna jest często nazywany aspiryną XVIII w., bo składniki rośliny, podobnie jak aspiryna, wykazują działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne, hamując biosyntezę prostaglandyn i agregację płytek krwi. Niewątpliwie w przeciwzapalnym działaniu rośliny partycypuje partenolid. Jednakże mechanizm działania tego związku jest odmienny od aspiryny, bo nie polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenazy. Wykazano, że partenolid hamuje rozwój i progresję procesu zapalnego, indukowanego przez cytokiny typu IL-1 i IL-6 (10), poprzez m.in. hamowanie aktywacji NFκB, jądrowego czynnika transkrypcji, który jest centralnym regulatorem odpowiedzi immunologicznej u człowieka (11-12). Partenolid hamuje również zwiększone w stanach zapalnych uwalnianie tlenu azotu, który uszkadza tkanki (13). To działanie dotyczy także komórek ośrodkowego układu nerwowego i może mieć znaczenie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (14). Przeciwmigrenowe działanie partenolidu i wyciągów z rośliny kojarzone jest z hamowaniem uwalniania serotoniny (5-HT) z leukocytów i płytek krwi, także ze wspomnianym hamowaniem uwalniania tlenu azotu. Zarówno serotonina, jak i tlenek azotu odgrywają ważną rolę w patofizjologii migreny. Ostatnio wykazano jednak, że nie zidentyfikowane składniki wyciągu z rośliny są silnymi antagonistami receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_{2B}, a działanie partenolidu w tym względzie jest stosunkowo słabe (15). Badania mechanizmu farmakologicznego działania partenolidu są opisane w wielu pracach naukowych, a związek ten jest uważany za główny składnik czynny *T. parthenium*. Zawartość partenolidu w preparatach z maruny nie powinna być mniejsza niż 0,2%. Rola innych niż partenolid metabolitów wtórnych *T. parthenium* nie została jeszcze dobrze poznana. Wiadomo, że w przeciwzapalnym działaniu rośliny uczestniczą również flawonoidy; trzy spośród badanych związków hamują aktywność cyklooksygenazy i 5-lipoksygenazy (6). Zaskakujące jest również stwierdzenie obecności melatoniny w liściach *T. parthenium*, gdy wiadomo, że chronicznym atakom migreny towarzyszy niski poziom tego związku (16).

Odkrycie hamującego wpływu niektórych laktonów seskwiterpenowych, w tym partenolidu, na aktywację NFκB w stężeniach mikromolarnych oraz badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością tych związków mogą przyczynić się do powstania nowej generacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Warto podkreślić, że do najbardziej aktywnych związków w tej grupie należą laktony seskwiterpenowe występujące w *Arnica montana*, dobrze znanej roślinie leczniczej o działaniu przeciwzapalnym (12).

3. Metabolity wtórne korzeni włośnikowatych *Tanacetum parthenium*

W naszym laboratorium, hodowlę transformowanych korzeni *T. parthenium* uzyskano infekując aseptyczne siewki *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402. Otrzymano dwanaście klonów korzeni, syntetyzujących opiny charakterystyczne dla użytego szczepu *Agrobacterium* i dobrze rosnących na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu. W ciągu czterech tygodni hodowli korzenie te wykazywały 10-40-krotny przyrost masy. Wszystkie klony korzeni poddano ilościowej analizie chemicznej na zawartość partenolidu, metodą RP-HPLC, ale tylko jeden z nich zawierał niewielką ilość poszukiwanego związku (poniżej 0,01% suchej masy). Porównywalnie niskie zawartości partenolidu oznaczono w korzeniach roślin *T. parthenium* pochodzących z hodowli *in vitro* i uprawy szklarniowej (17,18).

Warto wspomnieć, że do tej pory jedynym rodzajem kultur *in vitro* zdolnych do biosyntezy partenolidu są hodowle pędów lub roślin *T. parthenium* (17,18). Pomimo wielu prób, prowadzonych w innych laboratoriach, nie udało się uzyskać niezróżnicowanych hodowli (kalus, zawiesina) produkujących partenolid (19,20), jakkolwiek stwierdzono w takich hodowlach obecność cyklicznych seskwiterpenów, germakrenu D i β -elemenu (produkt przekształcenia germakrenu A) (19). Dominującymi metabolitami wtórnymi niezróżnicowanych hodowli *T. parthenium* były powstające w jednym szlaku biosyntezy pochodne aldehydu koniferylowego i kumaryny (izofraksydyna i skopoletyna) (7,20).

Wszystkie wspomniane klony transformowanych korzeni *T. parthenium*, zostały poddane jakościowej analizie chemicznej metodą RP-HPLC/DAD. W badanych próbkach stwierdzono obecność kilku związków z dwóch różnych grup chemicznych, na co wskazywały ich widma UV, o powtarzalnych (dla każdej z próbek) czasach retencji. Pięć głównych składników wyciągu heksanowo-acetonowego z badanych korzeni wyodrębniono metodą semipreparatywnej RP-HPLC i poddano analizie spektralnej (^1H NMR, EIMS), która doprowadziła do identyfikacji trzech diacetylenów z grupy eterów spiroketalenolowych (2-4) oraz kumaryny izofraksydyny (6) (rys.), na podstawie porównania z danymi piśmiennictwa (21,22). Diacetyleny 2-4 wyodrębniono wcześniej z korzeni i/lub części nadziemnych *T. parthenium* (5). Izofraksydynę, główny metabolit tkanki kalusowej złocienia maruny, wykryto w ilościach śladowych w korzeniach rośliny macierzystej metodą HPLC (7). Piąty z wyizolowanych związków, 9-epipektachol B (7), który jest eterem seskwiterpenowym izofraksydyny, nie był wcześniej znany z występowania w naturze. Jego struktura została określona metodami spektralnymi, z zastosowaniem ^1H - ^1H COSY 2D NMR (22). Obecność 9-epipektacholu B w korzeniach rośliny macierzystej została potwierdzona metodą HPLC/DAD. Chociaż związki o podobnej strukturze były już izolowane z roślin plemienia Anthemideae, nie było doniesień dotyczących ich obecności w *T. parthenium*.

Wspomniano, że nie stwierdzono różnic jakościowych, w odniesieniu do wymienionych związków, we wszystkich analizowanych próbkach. Występowały jednak znaczące różnice ilościowe. Całkowita zawartość diacetylenów wynosiła 0,1-0,5%

suchej masy korzeni, w zależności od badanego klonu. W niektórych klonach (m.in. M2) dominował trzynastowęglowy związek 2 (izomer *trans*), pozostałe zawierały głównie czternastowęglowy związek 4 (izomer *trans*). Transformowane korzenie *T. parthenium* zachowywały relacje ilościowe pomiędzy diacetylenami, charakterystyczne dla korzeni rośliny macierzystej danego klonu. W toku dalszych prac, z korzeni klonu M2 wyodrębniono i zidentyfikowano kolejny znany diacetylen, związek 5 (izomer *cis*), wcześniej nie izolowany z *T. parthenium* (23).

Niektóre etery spiroketaloenolowe roślin z rodziny Asteraceae są fitoaleksynami (24) i antyfidantami (25,26). Ponieważ zarówno C₁₃-diacetylen 3, jak i C₁₄-diacetylen 4 hamują żerowanie larw niektórych owadów, można przypuszczać, że związki te biorą udział w reakcjach obronnych roślin. Kwasy salicylowy i jasmonowy oraz ich estry metylowe są uważane za endogenne prekursory uczestniczące w indukcji odpowiedzi obronnej roślin. Różne patogeny i różni roślinożercy mogą aktywować bądź jasmonianową, bądź salicylanową ścieżkę generowania odpowiedzi obronnej (27,28). Jednoczesna aktywacja obydwu ścieżek zwiększa indukowaną odporność u *Arabidopsis thaliana* (29). Obok genów wybiórczo aktywowanych lub ulegających represji za pomocą jasmonianu lub salicylanu, istnieją geny podlegające aktywacji bądź represji przez oba wymienione prekursory (30).

Dodanie jasmonianu metylu (MJ, 300 μM/l) lub kwasu salicylowego (SA, 300 μM/l) do pożywki hodowlanej nie wpływało na akumulację kumaryn, ale wywoływało zmiany w spektrum diacetylenów, syntetyzowanych przez transformowane korzenie *T. parthenium*. Zmiany te analizowano w korzeniach dwóch klonów M2 i I2, reprezentujących dwa podstawowe profile biosyntetyczne, z dominacją odpowiednio związków 2 i 4. W obu typach korzeni MJ powodował wzrost akumulacji wszystkich monitorowanych diacetylenów. Ich zawartość osiągała maksimum 72-96 godzin po dodaniu MJ do pożywki. Niezależnie od badanego klonu, akumulacja C₁₄-diacetylenu 4 była najmniej nasiloną (maksimum 140% wartości kontrolnej). W największym stopniu MJ wpływał na zawartość izomeru *cis* C₁₃-diacetylenu 3 (195-340% wartości kontrolnej). Kwas salicylowy, dodany do pożywki, selektywnie stymulował biosyntezę epoksy-C₁₃-diacetylenu 5, w korzeniach klonu M2, już w 24 godziny po rozpoczęciu eksperymentu. Zawartość tego związku osiągała maksimum (200% wartości kontrolnej) po 72 godzinach od dodania SA. Akumulacja wszystkich pozostałych diacetylenów ulegała przejściowemu obniżeniu w drugiej i trzeciej dobie trwania doświadczenia i powracała do wartości kontrolnej po 96 godzinach. Jednoczesne traktowanie hodowli transformowanych korzeni *T. parthenium*, klonu M2, równomolową ilością MJ i SA wywoływało wybiórczą akumulację epoksy-C₁₃-diacetylenu 5 (570% wartości kontrolnej). Zawartość pozostałych diacetylenów nie ulegała zmianie w porównaniu z kontrolą. Jasmonian hamuje zatem indukowany salicylanem spadek zawartości konstytucyjnych diacetylenów, a kwas salicylowy ogranicza spektrum związków, których akumulację indukuje jasmonian. Wyniki przeprowadzonych przez nas eksperymentów wskazują na udział diacetylenów w odpowiedzi

obronnej roślin z gatunku *T. parthenium*. Sugerują także szczególną aktywność biologiczną epoksy-C₁₃-diacetylenu 5.

We wstępie zaznaczono, że partenolid nie jest jedynym związkiem odpowiedzialnym za aktywność farmakologiczną *T. parthenium* (15,31). W tym kontekście spazmolityczna (32) oraz hamująca degranulację komórek tłuszczowych (33), syntezę tlenu azotu (34) i powstawanie jonów nadtlennokowych (35), w stymulowanych czynnikami prozapalnymi (LPS, TPA) komórkach, aktywność diacetylenów zasługuje na uwagę. W prowadzonych w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biotechnologii UJ wstępnych badaniach aktywności przeciwzapalnej jednego z diacetylenów z transformowanych korzeni *T. parthenium* wykazano, że związek ten hamuje indukowaną za pomocą IL-1 aktywację NFκB w komórkach glejaka (36).

Literatura

1. Berry M. I., (1984), *Pharm. J.*, 232, 611-614.
2. Knight D. W., (1995), *Nat. Prod. Rep.*, 12, 271-276.
3. Johnson E. S., Kadam N. P., Hylands D. N., Hylands P. J., (1985), *Br. Med. J.*, 291, 569-573.
4. Vogler B. K., Pittler M. H., Ernst E., (1998), *Cephalalgia*, 18, 704-708.
5. Bohlmann F., Zdero Ch., (1982), *Phytochemistry*, 21, 2543-2549.
6. Williams Ch. A., Harborne J. B., Geiger H., Houlst J. R. S., (1999), *Phytochemistry*, 51, 417-423.
7. Banthorpe D. V., Brown G. D., (1989), *Phytochemistry*, 28, 3003-3007.
8. Cutlan A. R., Bonilla L. E., Simon J. E., Erwin J. E., (2000), *Planta Med.*, 66, 612-617.
9. Hendriks H., Anderson-Wildeboer Y., Engels G., Bos R., Woerdenbag H. J., (1997), *Planta Med.*, 63, 356-359.
10. Sobota R., Szwed M., Kasza A., Bugno M., Kordula T., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 329-333.
11. Kwok B. H. B., Koh B., Ndubuisi M. I., Elofsson M., Crews C. M., (2001), *Chem. Biol.*, 8, 759-766.
12. Rüngeler P., Castro V., Mora G., Gören N., Vichnewski W., Pahl H. L., Merfort I., Schmidt T. J., (1999), *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 2343-2352.
13. Fukuda K., Hibiya Y., Mutoh M., Ohno Y., Yamashita K., Akao S., Fujiwara H., (2000), *Biochem. Pharmacol.*, 60, 595-600.
14. Fiebich B. L., Lieb K., Engels S., Heinrich M., (2002), *J. Neuroimmunol.*, 132, 18-24.
15. Mitra S., Datta A., Singh S. K., Singh A., (2000), *Acta Pharmacol. Sin.*, 21, 1106-1114.
16. Murch S. J., Simmons C. B., Saxena P. K., (1997), *Lancet*, 350, 1598-1599.
17. Brown A. M. G., Lowe K. C., Davey M. R., Power J. B., (1996), *Plant Sci.*, 116, 223-232.
18. Stojakowska A., Kisiel W., (1997), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 47, 159-162.
19. Banthorpe D. V., Brown G. D., (1993), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 24, *Medicinal and Aromatic Plants V*, Ed. Bajaj Y. P. S., 361-372, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
20. Sy L.-K., Brown G. D., (1999), *Phytochemistry*, 50, 781-785.
21. Stojakowska A., Kisiel W., (1997), *Pol. J. Chem.*, 71, 509-512.
22. Kisiel W., Stojakowska A., (1997), *Phytochemistry*, 46, 515-516.
23. Stojakowska A., Malarz J., Kisiel W., (2002), *Plant Sci.*, 163, 1147-1152.
24. Marshall P. S., Harborne J. B., King G. S., (1987), *Phytochemistry*, 26, 2493-2494.
25. Tada M., Chiba K., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1367-1369.
26. Wichlacz M., (1996), *Badania fitochemiczne i biologiczne Cladanthus arabicus (L.) Cass. i Heteranthemis viscidhirta Schott.*, 67-83, praca doktorska, Akademia Medyczna, Poznań.

27. Thomma B. P. H. J., Eggermont K., Penninckx I. A. M. A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15107-15111.
28. Ozawa R., Arimura G., Takabayashi J., Shimoda T., Nishioka T., (2000), *Plant Cell Physiol.*, 41, 391-398.
29. van Wees S. C. M., de Swart E. A. M., van Pelt J. A., van Loon L. C., Pieterse C. M. J., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8711-8716.
30. Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., Manners J. M., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11655-11660.
31. Sumner H., Salan U., Knight D. W., Houlst J. R. S., (1992), *Biochem. Pharmacol.*, 43, 2313-2320.
32. von Breinlich J., Scharnagel K., (1968), *Arzneim.-Forsch.*, 18, 429-431.
33. Miller T., Wittstock U., Lindequist U., Teuscher E., (1996), *Planta Med.*, 62, 60-61.
34. Yoshikawa M., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Matsuda H., (2000), *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 651-656.
35. Nakamura Y., Ohto Y., Murakami A., Jiwajinda S., Ohigashi H., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5031-5036.
36. Stalińska K., Michalska K., Stojakowska A., Kisiel W., Guzdek A., (2002), *4th Parnas Conference 'Molecular Mechanisms of Cell Activation: Biological Signals and Their Target Enzymes'*, Wrocław, Programme & Abstracts, 77.