

ZWIĄZKI BIOLOGICZNIE CZYNNNE POCHODZENIA NATURALNEGO

WYKŁAD DLA SPECJALIZACJI:
BIOTECHNOLOGIA LEKÓW

DR INŻ. TOMASZ LASKOWSKI

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOCHEMII

WYDZIAŁ CHEMICZNY POLITECHNIKI GDAŃSKIEJ

CZĘŚĆ V:
FITONCYDY

RANGA ZWIĄZKÓW NATURALNYCH

Pod względem rangi, związki naturalne można podzielić na trzy grupy:

RANGA ZWIĄZKÓW NATURALNYCH		
BIOMAKROMOLEKUŁY	METABOLITY PIERWOTNE	METABOLITY WTÓRNE
RNA (mRNA, tRNA, etc.)	aminokwasy i peptydy	fenole i polifenole
DNA	cukry	flawonoidy
białka strukturalne	lipidy	terpeny i terpenoidy
enzymy	nukleotydy	alkaloidy
rybozymy	...oraz wiele ich pochodnych	pochodne poliketydów
...i inne (?)		steroidy
		...oraz niezliczone ilości ich pochodnych

FITONCYDY

„Wieśniacy czosnek w wielkiej obfitości pojegli, a ku większej pewności wieńce sobie czosnkowe na szyjach pozawieszali. Niektórzy, osobliwie niewiasty, całe główki czosnku pozatykali sobie, gdzie jeno mogli. Całe sioło czosnkiem śmierdziało horrendum, dumali tedy kmiecie, że w bezpieczeńci są i że nic im upir uczynić nie zdoła. Wielkie było zasię ich zdumienie, gdy upir, o północku nadleciawszy, nie zląkł się zgoła, jeno śmiać się ją, zębami od uciechy zgrzytać a szydzić. "Dobrze to, wołał, żeście się przyprawili, wnet was zreć będę, a przyprawione mięsiwo więcej mi do smaku. Posólcie się jeszcze a popieprzcie, a i o musztardzie nie zapominajcie.”

Silvester Bugiardo

*Liber Tenebrarum, czyli Xięga Przypadków Strasznych lecz Prawdziwych,
nigdy Nauką nie Explikowanych*

W najprostszym ujęciu, fitoncydy są **substancjami wytwarzanymi przez rośliny wyższe**, które wywierają **silny wpływ bakteriobójczy i bakteriostatyczny**. Posiadają również **właściwości fungistatyczne i grzybobójcze**, niektóre **hamują mnożenie się wirusów** lub **uszkadzają ich strukturę**.

Termin fitoncyd oznacza dosłownie „**wytopiony przez roślinę**”.

FITONCYDY – GDZIE ICH SZUKAĆ?

- czosnek, cebula, dziki por
- czarna porzeczka
- jałowiec
- brzoza, olcha, buk
- psianki, papryka, pomidor (nieodjrzałe owoce)
- tarnina, bez czarny
- szalwia
- anyż
- paprocie
- w wielu innych roślinach...



To potężny czynnik zmieniający skład mikroflory w atmosferze i glebie – np. I ha jałowca wytwarza w ciągu doby 3 kg lotnych fitoncydów, która to ilość jest w stanie wyjałowić obszar dużego miasta.

SKUPMY SIĘ NA RODZAJU **ALLIUM**

Rodzaj **Allium** obejmuje dobrze znane gatunki roślin: czosnek (*Allium sativum* L.), cebulę (*Allium cepa* L.), a także por (*Allium porrum* L.) i wiele innych.

Przedstawiciele rodzaju **Allium** to **najlepiej poznane** i **najbardziej spektakularne** przykłady roślin wyższych produkujących substancje o działaniu **antybiotycznym**. Prym wśród nich wiedzie **czosnek**.



Co trzy czosnki, to nie jeden.



Obrady Czosnkowej Komisji Europejskiej.
Przewodniczący z przodu, drugi od prawej.



Czosnek z młodymi.

CZOSNEK OD ZAWSZE UCHODZIŁ ZA ROŚLINĄ MAGICZNĄ

- O czosnku jako środku wzmacniającym organizm wspomina już pismo klinowe Babilonu. Stosowali go także Sumerowie. Znany był również w dawnych Indiach i Chinach.
- W starożytnym Egipcie czosnek był przedmiotem kultu religijnego oraz środkiem dezynfekującym.
- Pitagoras zalecał czosnek jako lekarstwo na wszystko.
- Od czasów Karola Wielkiego czosnek był uprawiany w przyklasztornych ogrodach, co stanowi dowód szacunku, jakim był otoczony.
- W 1655 roku londyński College zalecał stosowanie czosnku jako leku na dżumę („ocet czterech złodziei”).



Czosnek (litografia; Salem, 1692).

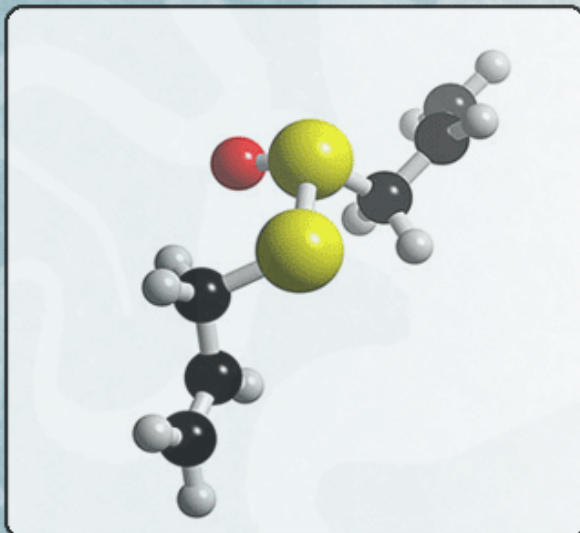
AKTYWNOŚĆ CZOSNKU

Jednostki Specjalne Allium Sativum

LEGITYMACJA
CZŁONKOWSKA



ALLIUM SATIVUM SPECIAL FORCES



GODNOŚĆ:

**ESTER S-ALLILOWY KWASU
2-PROPENOSULFINOTIOWEGO**

PSEUDONIM OPERACYJNY:

ALLICYNA

IMIONA RODZICÓW:

ALLIINA, ENZYM ALLINAZA

PEŁNIONA FUNKCJA:

**NIEPRZYJACIEL
MIKROORGANIZMÓW**

WYDANO ZA ZGODĄ:

RBS

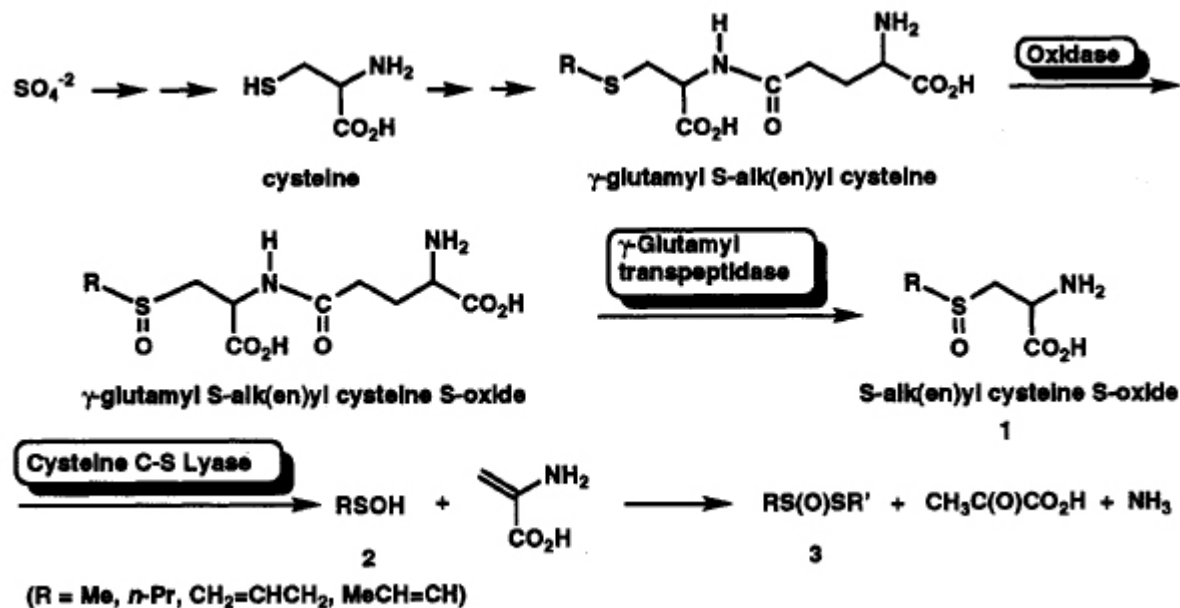
ROŚLINNE BATALIONY SZTURMOWE

LEGITYMACJA NR
73F/225

ASSF

IN ENZYMES WE TRUST

CHEMIA ALLICYNY

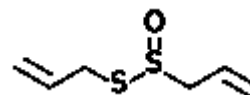


Oznaczenia:

1 – aminokwas niebiałkowy z charakterystycznym łańcuchem bocznym R-S(O)-CH₂-;
2 – kwas sulfenowy;
3 – tiosulfinat.

Jeżeli R jest ugrupowaniem allilowym, tj. CH₂=CH-CH₂-, to:

1 – **alliina**;
 Liaza wiązania C-S – **allinaza**;
2 – kwas 2-propenosulfenowy;
3 – **allicyna** o strukturze:



CHEMIA ALLICYNY

Prekursorów aminokwasowych do produkcji tiosulfinatów jest przynajmniej kilka – różnią się one grupą R w łańcuchu bocznym aminokwasu. Owocuje to sporą ilością kombinacji, jakie możemy uzyskać dla wzoru ogólnego $R_1-SO-S-R_2$.

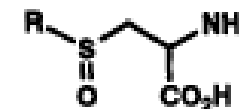


Table 4. Thiosulfinate Contents and Inhibition Halos Generated by Chromatographic Fractions of AGE

compd ^a	fraction I (ppm)	fraction II (ppm)	fraction III (ppm)	fraction IV (ppm)
di-Al (allicin)	30	47	0	0
di-Me	0	0	13	0
AlMe + MeAl	92	24	14	0
Pr-Me + Me-Pr	0	0	0	3
Me-1-Pr + 1-Pr-Me	125	0	50	43
inhibition halo (mm)	24	35	0	0

^a Compound: $R_1-SO-S-R_2$ ($R_1, R_2 = Al$, allyl group; Me, methyl; Pr, propenyl).

Badania wpływu acetonowych ekstraktów czosnkowych na bakterie *Helicobacter pylori* (in vitro) pokazały dwa istotne fakty:

1. rozwój bakterii został zahamowany;
2. bakterie zostały zabite tylko przez te frakcje ekstraktu czosnkowego, w których znajdowała się allicyna.

ALLICYN A ANTYBIOTYKI

Table 2: Resistant percent to different antibiotics of 20 strains of *Acinetobacter* isolated from burn infections in a six months period (April-September 2006) from Tehran's hospitals

Antibiotic	Resistance (%)
Piperacillin (Pc)	90
Gentamicin (G)	70
Ofloxacin (Of)	95
Ciprofloxacin (Cf)	95
Cephalotin (Ch)	60
Ticarcillin (Ti)	95
Kanamycin (K)	95
Imipenem (I)	15
Amikacin (Ak)	50
Co-Trimoxazole (Co)	80
Ceftizoxime (Ce)	75
Ceftazolin (Cz)	100
Carbenicillin (Cb)	95

Acinetobacter – bakterie gram-ujemne często odpowiedzialne za zakażenia szpitalne: zapalenia płuc, dróg moczowych, opon mózgowych, etc.

ALLICYNA A ANTIBIOTYKI

Table 3: Seven different Antibiotypes were recognized in 20 isolated strains. As Shown, 45% of strains belong to Antibiotype 1 (only sensitive to Imipenem)

Antibiotypes	Percent
PIP ^R G ^R OF ^R CF ^R CF ^R CH ^R TI ^R K ^R I ^S AK ^R CO ^R CK ^R CZ ^R CB ^R	45
PIP ^R G ^R OF ^R CF ^R CF ^R CH ^R TI ^R K ^R I ^S AK ^S CO ^R CK ^R CZ ^R CB ^R	15
PIP ^R G ^R OF ^R CF ^R CF ^S CH ^R TI ^R K ^R I ^R AK ^S CO ^R CK ^R CZ ^R CB ^R	10
PIP ^R G ^R OF ^R CF ^R CF ^R CH ^R TI ^S K ^R I ^S AK ^R CO ^R CK ^R CZ ^R CB ^R	5
PIP ^R G ^S OF ^R CI ^R CF ^S CH ^R TI ^R K ^R I ^S AK ^S CO ^R CK ^S CZ ^R CB ^R	5
PIP ^R G ^S OF ^R CI ^R CF ^S CH ^R TI ^R K ^R I ^S AK ^S CO ^S CK ^S CZ ^R CB ^R	15
PIP ^S G ^S OF ^S CI ^S CF ^S CH ^R TI ^R K ^S I ^S AK ^S CO ^S CK ^S CZ ^R CB ^R	5
Total	100

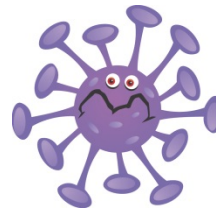
Table 4: The average MBCs of garlic extract and Allicin content for each antibiotic

Antibiotype	Average MBCs of garlic extract (mg mL ⁻¹)	Allicin content (µg mL ⁻¹)
1	1.90	3.24
2	6.25	10.62
3	2.34	3.98
4	12.50	21.25
5	3.12	5.31
6	2.60	4.42
7	1.56	2.65

MBC: Minimum Bacteriocidal Concentration.

SPEKTRUM DZIAŁANIA ALLICYNY

- *Aerobacter*
- *Aeromonas*
- *Acinetobacter*
- *Bacillus*
- *Citrella*
- *Citrobacter*
- *Clostridium (kilka minut)*
- *Corynebacterium (kilka minut)*
- *Enterobacter*
- *Escherichia*
- *Helicobacter (Helicobacter pylori)*
- *Klebsiella*
- *Lactobacillus*
- *Leuconostoc*
- *Micrococcus*
- *Mycobacterium (Mycobacterium tuberculosis – 3-5 minut)*
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Pseudomonas*
- *Salmonella (kilka minut)*
- *Serratia*
- *Shigella*
- *Staphylococcus (kilka minut)*
- *Streptococcus*
- *Vibrio (Vibrio cholerae – 10 minut)*



CZYŻBY CUDOWNY LEK?

Jak działa allicyna? Jakim cudem tak wiele bakterii jest bezbronnych w kontakcie z tym związkiem?

Zaproponowany mechanizm to niszczenie grup $-SH$ w białkach niezbędnych do proliferacji bakterii.

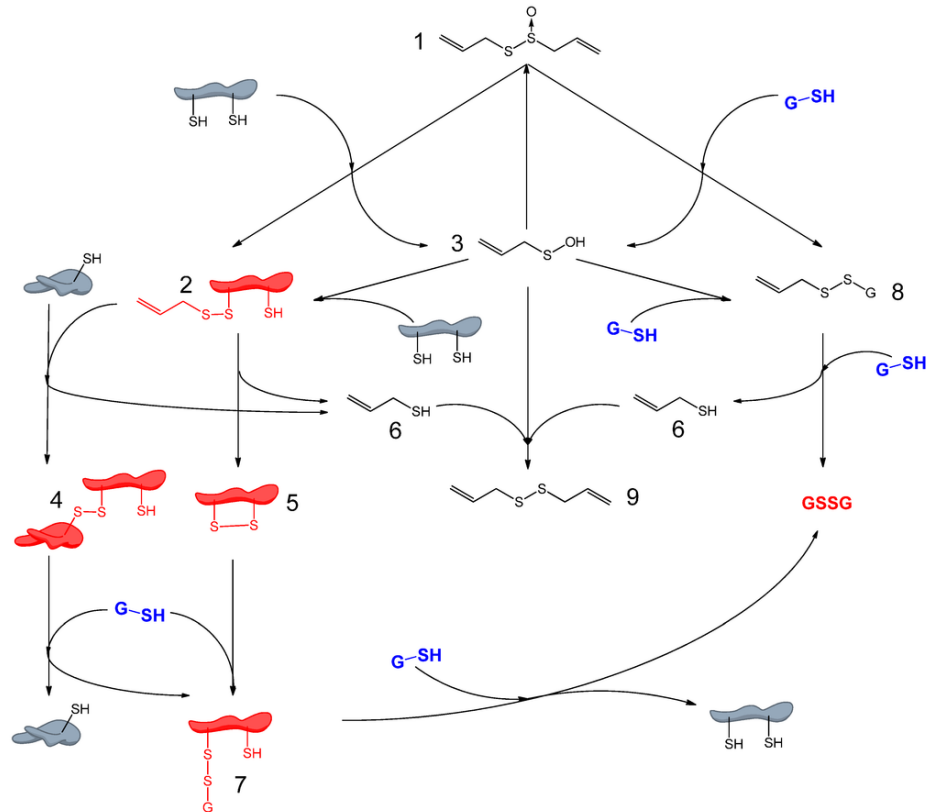
W grę wchodzi również interakcja ze ścianami komórkowymi bakterii, co do tego istnieją jednak wątpliwości.

Czy można zatem jeść czosnek bez ograniczeń?

Badania pokazują, iż allicyna jest w stanie utlenić żelazo zawarte w hemie. Żeby jednak osiągnąć taki efekt, należy zjeść 25 000 razy większą dawkę od standardowej ilości allicyny, jaką wytwarza ząbek czosnku, co odpowiada zjedzeniu **75 kg czosnku w ciągu minuty. OSTROŻNIE!!!**

Jedzenie zbyt wielkich ilości czosnku jest uciążliwe dla wątroby z uwagi na mnogość związków siarki, jakie zawiera czosnek. Również nerki nie są zachwycone takim obrotem sprawy.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ALLICYNY



Scheme 3. Overview of redox chemistry of allicin and cellular thiols: Allicin (1) is able to react with cellular thiols like glutathione (GSH) and cysteine-containing proteins. Reaction with proteins leads to S-allyl-mercapto-proteins (2) and allyl sulfenic acid (3). S-allyl-mercapto-proteins are able to react with other proteins by formation of disulfide bond-stabilised complexes (4) or to form intramolecular disulfide bonds (5). Both reactions lead to elimination of allyl mercaptan (6). Protein disulfide bonds can be reduced by cellular GSH which leads to S-glutathionyl-mercapto-proteins (7). To remove the glutathionyl residues from the proteins another GSH is needed. Allicin also reacts with GSH. This reaction leads to S-allyl-mercapto-glutathione (8) and allyl sulfenic acid (3). S-allyl-mercapto-glutathione can undergo a thiol/disulfide exchange reaction with another GSH to form GSSG and allyl mercaptan (6). Allyl sulfenic acid (3), produced in direct reactions of allicin and thiols is able to react with proteins to form S-allyl-mercapto-proteins (2), with GSH to form S-allyl-mercapto-glutathione (8), with allyl mercaptan (6) to DADS (9) or with another allyl sulfenic acid (3) to form allicin again.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ALLICYNY

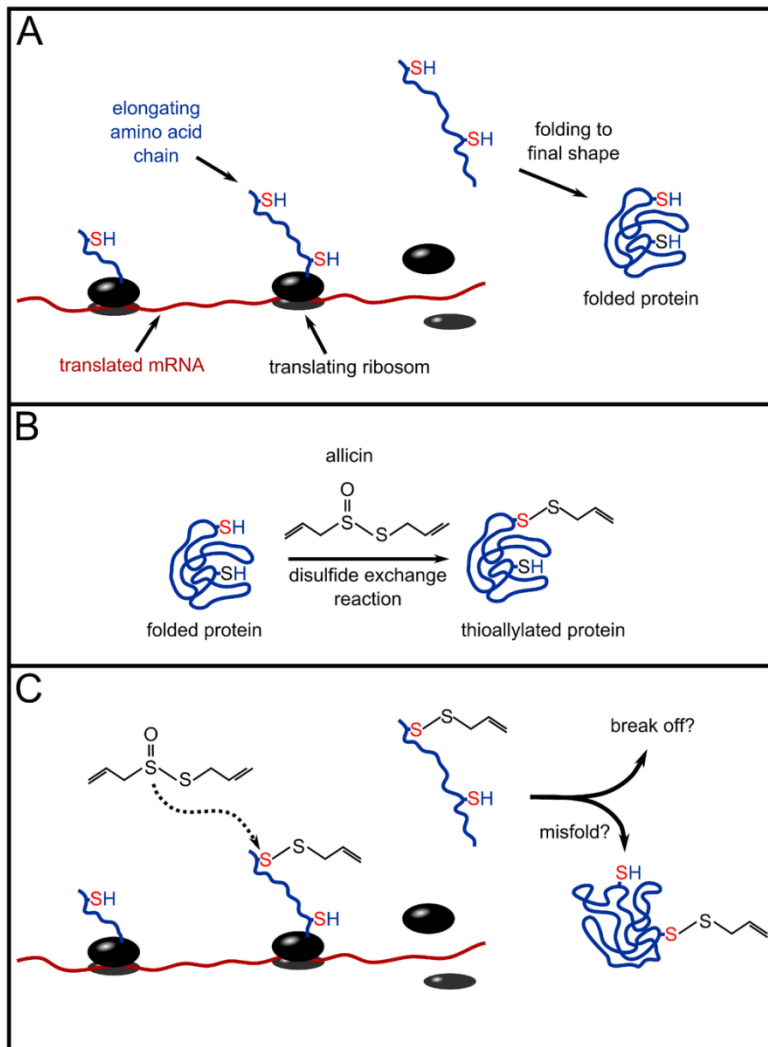
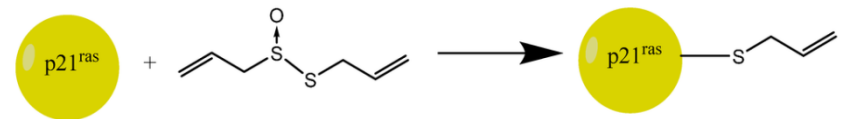
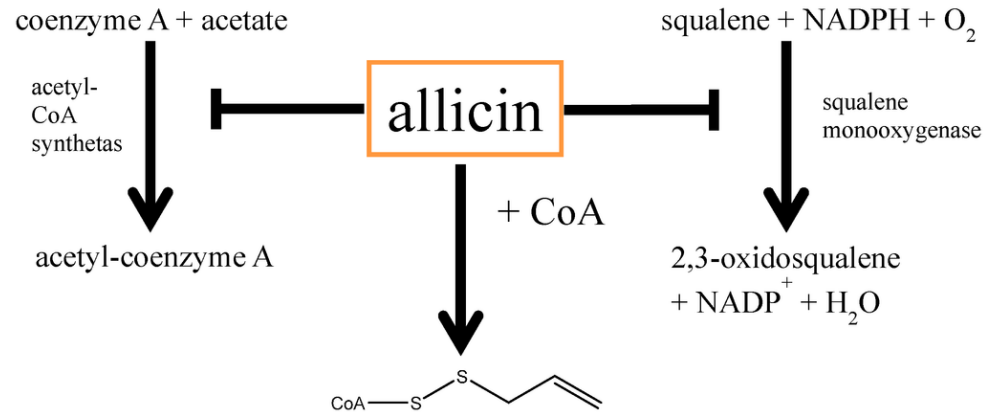


Figure 2. Possible influence of allicin on proteins and protein synthesis. **(A)** protein synthesis in unstressed conditions. After translation the protein is folded into its final structure. **(B)** The cysteine residue that is accessible for attack (indicated in red) reacts with allicin via a disulfide exchange-reaction. The cysteine residue that is sterically blocked (indicated in blue) does not react with allicin. **(C)** According to Cavallito's hypothesis, allicin may attack cysteine residues on elongating amino acid chains while the protein is still being synthesized and is not fully developed. In this early stage, cysteine residues that are normally blocked for reactions with allicin (compare B) are now potential targets. Possible results may be an abortion of translation or misfolded proteins with reduced or no function.



Scheme 5. Allicin stimulates lymphocytes by affecting p21^{ras} : Thioallylation that means the binding of an allyl sulfenic acid to the thiol of cysteine¹¹⁸ leads to an activation of p21^{ras} and subsequently to stimulation of ERK1/2 phosphorylation. These processes are crucial for the activation of lymphocytes.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ALLICYNY



Scheme 4. Impact of allicin on cholesterol-metabolism. Although allicin is chemically an oxidant, it acts in lower doses as *antioxidant* at the physiological level. Allicin was shown to inhibit two important enzymes of the cholesterol-biosynthesis pathway. On the one hand, Gupta and Porter showed that allicin inhibits the squalene-monoxygenase while Focke and coworkers demonstrated an inhibition of acetyl-CoA synthetase, a very early (and thus unspecific) step in cholesterol-biosynthesis. According to its chemistry, one can assume a direct reaction of allicin with the thiol-group of coenzyme A.

CZYŻBY CUDOWNY LEK?

Dlaczego zatem nie zamknąć allicyny w formie tabletki i nie podawać tak, jak podaje się antybiotyki?

Początkowo badania nad allicyną prowadzono wysoce niefrasobliwie.

W chwili obecnej – próbuje się, a jakże. **Nie jest to jednak łatwe z uwagi na kilka czynników:**

1. ekstrakty z czosnku zawierają mnóstwo związków, które są do allicyny podobne, lecz nie wykazują działania antybiotycznego;
2. allicyna stanowi ok. 50% wszystkich tiosulfinatów ekstrahowanych z czosnku, ale wydajność bezwzględna ekstrakcji jest żenująco niska;
3. rozdzielenie mieszaniny tiosulfinatów w skali większej niż laboratoryjna to ogromne wyzwanie;
4. allicyna jest związkiem wysoce niestabilnym w praktycznie każdym medium (50% strat w wodzie w ciągu 4 dni, w krwi rozpada się praktycznie natychmiast);
5. na jej stabilność wpływa jednocześnie rodzaj rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji oraz temperatura, w której przechowujemy ekstrakt;
6. w zależności od użytego do ekstrakcji rozpuszczalnika inna jest kinetyka (!) rozpadu allicyny – inna rzędowość reakcji rozpadu;
7. inne, które podamy za chwilę.

CZYŻBY CUDOWNY LEK?

Table 1. Typical Thiosulfinate Analysis of EGE and AGE Used in the Kinetic Study of Allicin Decomposition

compd ^a	di-Al (allicin) (g/L)	di-Me (g/L)	AlMe + MeAl (g/L)	PrMe + MePr (g/L)	Me-1-Pr + 1-Pr-Me (g/L)
EGE ^b	14.65	5.14	3.16	11.08	0.33
AGE ^b	25.74	5.26	4.12	12.15	0.15

^a Compound: $R_1-SO-S-R_2$ ($R_1, R_2 = Al$, allyl group; Me, methyl; Pr, propenyl). ^b EGE and AGE, ethanolic garlic extract and acetonc garlic extract; see experimental procedure.

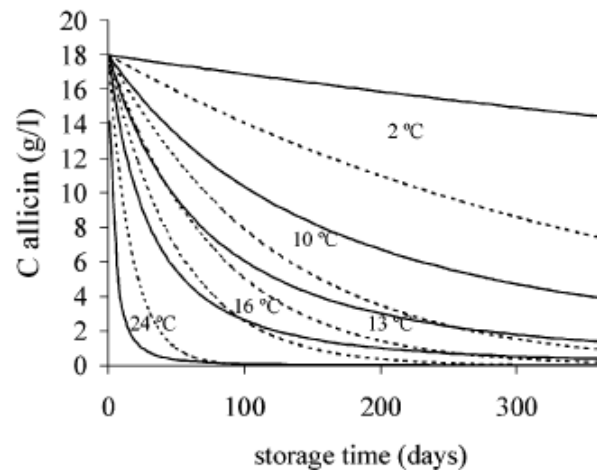


Figure 5. Effect of temperature on the stability of allicin in EGE (dashed lines) and AGE (solid lines).

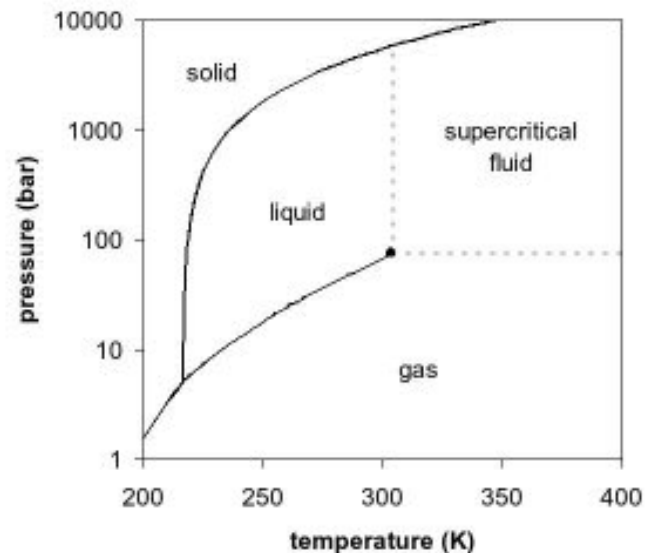
IZOLACJA

ŚWIATEŁKO W TUNELU: WYDOBYWANIE TIOSULFINATÓW Z CZOSNKU METODĄ EKSTRAKCYI CIECZĄ W STANIE NADKRYTYCZNYM (SF – SUPERCRITICAL FLUID).

Stan nadkrytyczny to stan danej substancji, w którym zanika granica między cieczą a gazem – dane medium posiada **właściwości obydwu stanów skupienia**.

Arcyciekawym faktem jest możliwość znacznej modyfikacji parametrów „cieczy”, takich jak **polarność, gęstość, lepkość** poprzez modyfikację ciśnienia i temperatury układu.

Podstawowym medium stosowanym do ekstrakcji tego typu jest CO_2 w temperaturze powyżej 304 K i pod ciśnieniem $>7,38$ MPa.



CZYŻBY CUDOWNY LEK?

Dlaczego zatem nie zamknąć allicyny w formie tabletki i nie podawać tak, jak podaje się antybiotyki?

Początkowo badania nad allicyną prowadzono wysoce niefrasobliwie.

Jak zmusić allicynę, aby dotarła do miejsca przeznaczenia w aktywnej formie?

Badania pokazują, iż metabolity allicyny, które pojawiają się we krwi w chwili jej rozpadu, są również niesamowicie aktywne – do zabicia drobnoustroju potrzebujemy jednak allicyny w formie pierwotnej. (Czy na pewno?)

Pojawił się pomysł produkcji allicyny już w organizmie człowieka – preparaty zawierające **alliinę** oraz **allinazę**, zamknięte w kapsułce chroniącej enzym przed niskim pH w żołądku. Pomysł wcielono w życie, trwają prace nad jego udoskonalaniem.

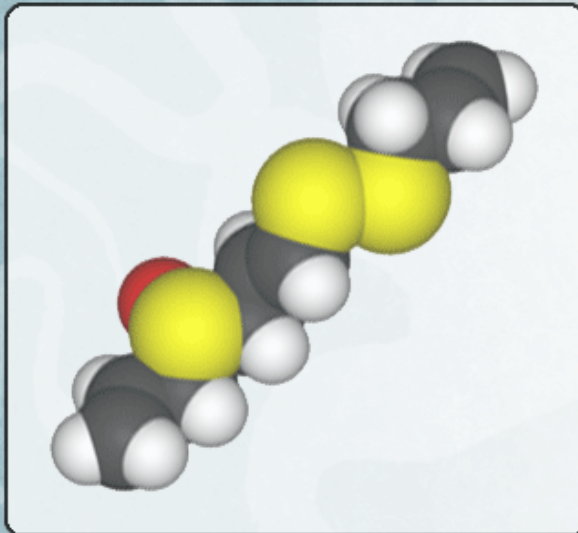
Nadal jednak pozostaje problem osiągnięcia takiego stężenia aktywnej allicyny w organizmie, aby działała jak najlepszy antybiotyk na świecie.

Trwają badania nad modyfikacją chemiczną allicyny w celu poprawy jej stabilności oraz wpływem tej modyfikacji na aktywność antybiotyczną związku.

DRUGI AGENT SPECJALNY

Jednostki Specjalne Allium Sativum

LEGITYMACJA
CZŁONKOWSKA



ALLIUM SATIVUM SPECIAL FORCES

GODNOŚĆ:

**4,5,9-TRITIAKODEKA-
1,6,11-TRIEN-9-TLENEK**

PSEUDONIM OPERACYJNY:

AJOEN

IMIONA RODZICÓW:

ALLICYNA, KWAS SULFENOWY

PEŁNIONA FUNKCJA:

ZŁOTA RĄCZKA

WYDANO ZA ZGODĄ:

RBS

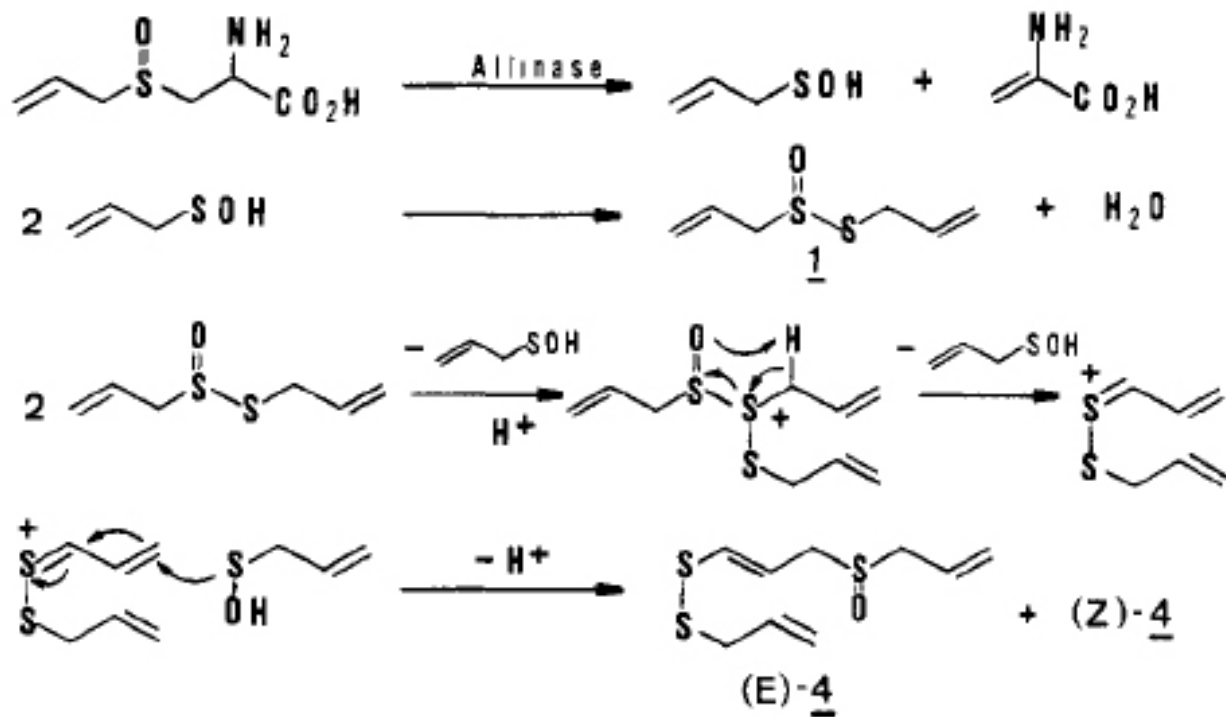
ROŚLINNE BATALiony SZTURMOWE

LEGITYMACJA NR
75F/228

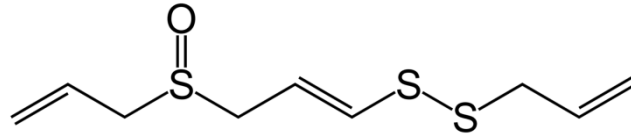
ASSF

IN ENZYMES WE TRUST

CHEMIA AJOENU



SPEKTRUM DZIAŁANIA AJOENU



Daje się zaobserwować następującą zależność: **im więcej atomów siarki w cząsteczce tiosulfonatu, tym bardziej jest morderczy dla mikroorganizmów.**

Synteza ajoenu w laboratorium jest niezwykle prosta... o ile dysponujemy odpowiednią ilością czystej allicyny.

Ajoen posiada właściwości podobne do allicyny (bakteriostataczne, bakteriobójcze), ale prócz tego uważa się, iż:

- obniża poziom cholesterolu we krwi;
- zwiększa strawność oraz przyswajalność tłuszczów przez organizm (oddziaływanie na układ trawienny);
- obniża krzepliwość krwi – działanie przeciwmiażdżycowe (hamuje agregację płytek krwi wywołaną wszystkimi znanymi induktorami!);
- właściwości przeciwrakowe – indukuje apoptozę i zatrzymuje proliferację komórek nowotworowych.

CO JESZCZE POTRAFIĄ FITONCYDY?

Nie tylko ekstrakty z czosnku działają pozytywnie na człowieka.

Najnowsze badania dotyczące innych fitoncydów sugerują wyjaśnienie mechanizmu ich wpływu na człowieka – oprócz aktywności antybiotycznej, **wyciągi roślinne pobudzają aktywność ludzkich komórek NK** (ang. natural killers).

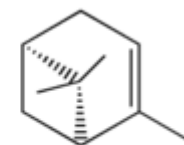
Zbyt **wysokie stężenie** określonych fitoncydów potrafi **zabić** komórki NK.

Przykłady:

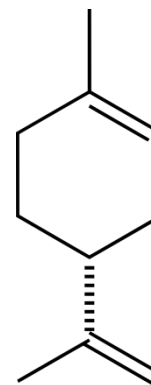
- α -pinen (drzewa iglaste);
- 1,8-cineol (eukaliptus);
- D-(+)-limonen;
- olejek z cyprysa hinoki;
- inne.



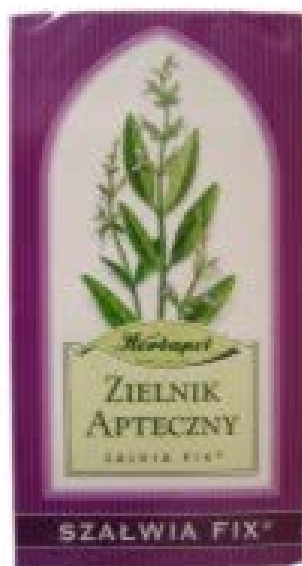
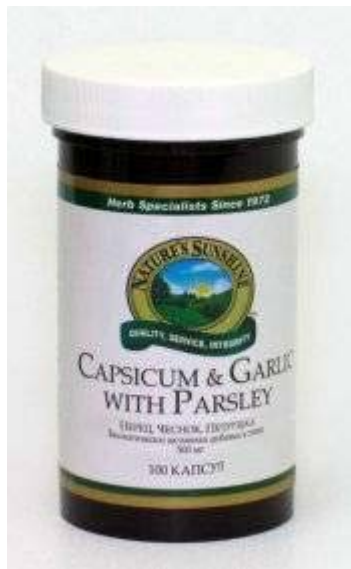
(-)- α -Pinene



(+)- α -Pinene

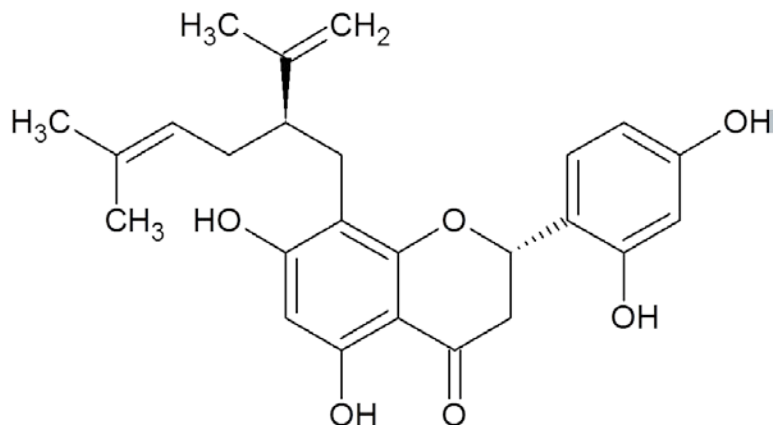


PRZYKŁADY PREPARATÓW DOSTĘPNYCH NA RYNKU



INNE PRZYKŁADY FITONCYDÓW

SOFORAFLAWANON G

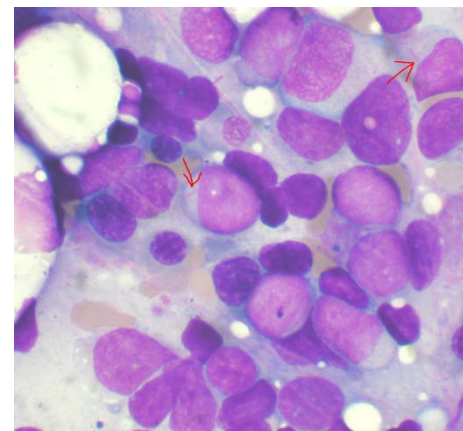


Soforaflawanon G – lotny fitoncyd, uwalniany do gleby, wody oraz atmosfery. Produkowany przez rośliny z rodzaju *Sophora*. Znajduje się w spektrum zainteresowania przemysłu farmaceutycznego, ponieważ nie tylko wykazuje działanie przeciwbakteryjne sam w sobie, ale również działanie synergistyczne względem stosowanych antybiotyków.

Zastosowania:

- **MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)**
- **VRE (Vanomycin-resistant *Enterococcus*)**
- zapalenia skóry;
- skóra atopowa;
- malaria;
- białaczka szpikowa (!).

Efekty synergistyczne: wanomycyna, minocyklina, rifampicyna.



INNE PRZYKŁADY FITONCYDÓW

IMBIR, MARCHEW, KURKUMA

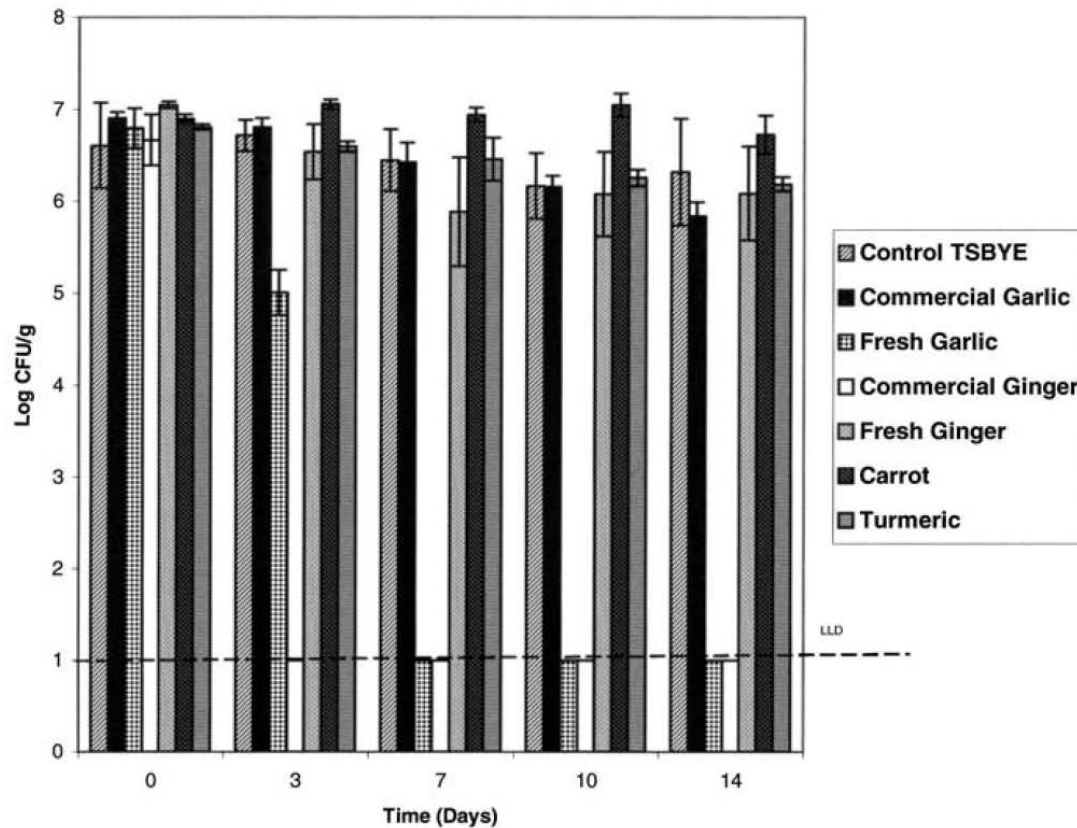


FIG. 1. Survival of *E. coli* O157:H7 in commercial garlic and ginger pastes, fresh garlic, ginger and carrot pastes, and turmeric paste stored at 4°C for 2 weeks. Values plotted at each sampling time point are an average of three replicates. Error bars represent standard deviation from the mean.

INNE PRZYKŁADY FITONCYDÓW

IMBIR, MARCHEW, KURKUMA

FIG. 2. Survival of *E. coli* O157:H7 in commercial garlic and ginger pastes, fresh garlic, ginger and carrot pastes, and turmeric paste stored at 8°C for 2 weeks. Values plotted at each sampling time point are an average of three replicates. Error bars represent standard deviation from the mean.

