

Związki naturalne w farmacji i medycynie. Kwas salicylowy i fenolokwasy

Natural products in pharmacy and medicine. Salicylic acid and related phenolic acids

Grzegorz Gryniewicz¹, Jacek Hennig²

¹ Instytut Farmaceutyczny w Warszawie ² Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Streszczenie

Kwas salicylowy (KS) jest najprostszym przedstawicielem grupy metabolitów wtórnych roślin wyższych, zwanych fenolokwasami, które odgrywają ważne role biologiczne zarówno w fizjologii roślin, jak i w ochronie zdrowia ludzkiego. W artykule przedstawiono krótki rys historyczny badań i zastosowań KS, pozyskiwanego ze źródeł naturalnych i przemysłowych, oraz wiadomości dotyczące występowania jego analogów strukturalnych w roślinach. Opisano rolę KS jako fitohormonu i induktora odpowiedzi na stres u roślin oraz jako inhibitora wytwarzania mediatorów stanu zapalnego u ludzi.

Abstract

Salicylic acid (SA) is the simplest example of molecule belonging to the group of plant secondary metabolites, classified as phenolic acids. These compounds are of considerable importance not only for well being of the host organisms but also have advantageous influence on human physiology. Short account of natural and synthetic SA studies, as well as its structural analogs, is presented. The role of SA in plant local and systemic pathogen resistance phenomena is described, and its significance for anti-inflammatory therapies in humans are discussed.

SŁOWA KLUCZOWE:

■ KWAS SALICYLOWY ■ FENOLOKWASY ■ SALICYLANY
■ METABOLITY WTÓRNE

KEY WORDS:

■ SALICYLIC ACIDS ■ PHENOLIC ACIDS ■ SALICYLATES
■ SECONDARY METABOLITES

Wstęp

Nawet najdawniejsze przekazy medyczne wyróżniały w naturalnym otoczeniu człowieka materiały i substancje różnego pochodzenia: mineralne, roślinne i zwierzęce, charakteryzujące się radykalnym działaniem biologicznym na organizm ludzki. Szczególnie bogatym źródłem takich materiałów, stopniowo kategoryzowanych pod względem użyteczności w tradycyjnych, tzn. poprzedzających epokę doświadczalnych nauk przyrodniczych, praktykach przywracania zdrowia są rośliny, ich części oraz preparaty z nich wytworzone. Etnofarmakologia przekazuje nam bogate zasoby zgromadzonej przez wieki

wiedzy o truciznach oraz lekach pochodzenia roślinnego, która ma znaczenie nie tylko dla współczesnej praktyki medycznej, ale także dla nowoczesnej nauki o żywności i żywieniu, a także dla racjonalizacji wzrastających tendencji do samoleczenia przy użyciu coraz większej liczby agresywnie reklamowanych „naturalnych” dodatków do żywności^{1,2,3}.

Świat roślin jest źródłem (jak twierdzą zwolennicy diety wegetariańskiej, zupełnie wystarczającym) podstawowych składników odżywczych: węglowodanów, tłuszczów i białek, wytwarzanych w ramach podstawowego (pierwotnego) metabolizmu, czyli zespołu przemian biochemicznych charakteryzujących

poszczególne typy komórek. Jednak większość roślin ma uwarunkowaną genetycznie zdolność do wytwarzania także innych związków organicznych, określanych jako metabolity wtórne, których obecność w ich organizmie nie jest bezwzględnie konieczna, przypuszcza się jednak, że zapewniają one gospodarzowi jakieś korzyści w konkretnych sytuacjach środowiskowych^{4,5,6}. Składniki takie często określa się również zbiorowo jako związki naturalne i nazwę tą będziemy w dalszej części stosowali wymiennie z określeniem „metabolity wtórne”. Fitochemia i farmakognozja, w wersji tradycyjnej zajmują się takimi właśnie składnikami roślin, identyfikując je pod względem fizykochemicznym, strukturalnym i farmakologicznym oraz badając ich zawartość w zależności od gatunku rośliny i czynników środowiskowych, a także określając ich przydatność w roli składników preparatów farmaceutycznych.

Leki roślinne

Do podstawowych grup metabolitów wtórnych roślin należą według kryteriów strukturalnych m.in.: alkaloidy, sterole, karotenoidy, terpenoidy, flawonoidy, saponiny i taniny, równie często wyróżnia się kategorie funkcjonalno-użytkowe, takie jak: witaminy, barwniki, antybiotyki. Jeszcze inny podział, podkreślający czynnik biogenezy, wyróżnia: acetogeniny, pochodne aminokwasów, izoprenoidy etc. Współczesne przyrodznawstwo kwalifikuje pojawienie się metabolitów wtórnych roślin jako czynnik adaptacyjny o charakterze sygnału chemicznego przeznaczonego do komunikacji międzygatunkowej, utrwalony w procesie ewolucji. Molekularny przekaz informacji może mieć różny charakter – rośliny produkują zarówno specyficzne gatunkowo atraktanty (feromony) owadów pełniących rolę w cyklu rozwojowym gospodarza, jak i deterenty zapobiegające atakom różnych roślinożerców.

Z antropocentrycznego punktu widzenia niezwykle ważne było odkrycie, że nietypowe dla pierwotnego metabolizmu (a więc charakterystyczne dla poszczególnych rodzajów i gatunków) składniki roślin mogą wykazywać silne i selektywne działanie biologiczne na organizm ludzki (oraz zwierząt hodowlanych lub doświadczalnych), które można wykorzystać do celów medycznych. Leki roślinne stanowiły podstawę tradycyjnej medycyny ludowej, ale w miarę rozwoju naukowych podstaw farmakologii stały się także jedną z głównych inspiracji dla rozwoju współ-

czesnej farmacji. Silne związki pomiędzy wiedzą wynikającą z rozwoju biologii roślin i praktyką medyczną postaramy się zilustrować na podstawie najprostszej strukturalnie kategorii metabolitów wtórnych – fenolokwasów, których badania doprowadziły do pierwszych syntetycznych leków, odgrywających ważną rolę także we współczesnej medycynie.

Salicylany

Kora wierzby (*Salix*) stanowi jeden z najstarszych preparatów stosowanych w tradycyjnej medycynie. Jest środkiem przeciwgorączkowym i przeciwbólowym wzmiankowanym w papiirusie Ebersa, pismach Hipokratesa i Claudiusa Galenusa. Tradycja ta jest zresztą kontynuowana przez współczesną fitofarmację, która oferuje preparaty o takich samych wskazaniach, standaryzowane na zawartość składnika głównego, zgodnie z aktualnymi wymaganiami odnośnie jakości leków roślinnych. Już w 1828 roku J.A. Buchner wydzielił z tego surowca materiał nazwany salicyną, który H. Leroux otrzymał w stanie krystalicznym, a wkrótce potem R. Piria wykazał, że związek ten ma budowę glikozydową. Dziś wiemy, dzięki pracom Marcellego Nenckiego z 1870 roku, że salicyna, która jest β -D-glukozydem alkoholu 2-hydroksybenzoesowego (saligeniny) ulega *in vivo* dwuetapowej transformacji polegającej na deglikozytacji i utlenieniu aglikonu, stanowi więc wydajny prekursor kwasu salicylowego (KS; kwas 2-hydroksybenzoesowy). Pierwsze podania salicyny pacjentom z gorączką reumatyczną, datowane na 1874 rok przeprowadzono w Szkocji (Thomas MacLagan) i Niemczech (Carl Buss) z dobrym skutkiem terapeutycznym. Dalsze eksperymenty tego rodzaju nie miały jednak przyszłości ze względu na rozpowszechniającą się wiedzę, że właściwym związkiem aktywnym jest kwas salicylowy, a także ze względu na szybko wzrastającą dostępność tego kwasu ze źródeł syntetycznych. Strukturę KS oznaczył Hermann Kolbe i w 1859 roku opracował metodę jego syntezy chemicznej z fenolu, która wkrótce została zaadaptowana na skalę przemysłową. Pierwsze zastosowania nowego wyrobu rodzącego się przemysłu syntezy chemicznej nie były spektakularne – KS, którego pierwsza wytwórnia ruszyła w Dreźnie w 1874 roku, używano początkowo jako środka antyseptycznego i konserwującego żywność. Pierwsza publikacja medyczna dotycząca zastosowania KS w doległościach reumatycznych pochodzi z 1876 roku (Lancet).

Mimo wykazanej skuteczności KS, na przeszkodzie rozpowszechnienia nowego leku stały początkowo żrące właściwości substancji aktywnej i trudne do zaakceptowania cechy organoleptyczne jej soli z metalami alkalicznymi^{7,8,9}.

Kontynuacja zainteresowania naturalnymi źródłami salicylanów doprowadziła do odkrycia w innych roślinach (np. topola, brzoza) analogów salicyny, glikozydów: salikortyny, tremulacyny i fragiliny oraz bogatego źródła olejku salicylowego (salicylanu metylu, substancji aktywnej przeciwreumatycznych maści i kremów), jakim są rośliny jagodowe rodzaju *Gaultheria (wintergreen)*. Preparaty o nazwie generycznej *oil of wintergreen* (przeznaczone wyłącznie do użytku zewnętrznego) zawierają do 98% salicylanu metylu. Związek ten można oczywiście obecnie łatwo otrzymywać na dużą skalę metodą syntezy chemicznej.

Pierwszym celowo zaprojektowanym lekiem syntetycznym z grupy pochodnych KS był salol (1883) – salicylan fenylu, a jego autorem – Marceli Nencki, w owym czasie prowadzący badania na uniwersytecie berneńskim w Szwajcarii. Związek ten zyskał duże uznanie jako dobrze tolerowany antyseptyk do stosowania wewnętrznego oraz skuteczny środek antyreumatyczny i przeciwgorączkowy zastępujący źle tolerowany KS. Nencki, patron warszawskiego Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, odniósł w ciągu swego krótkiego życia (15.01.1847–14.10.1901) tak ogromne sukcesy na polu badań przyrodniczych, które dzisiaj określilibyśmy mianem medycyny doświadczalnej, chemii fizjologicznej i biochemii, że na tym tle jego pionierska rola w rozwoju początków farmacji i nowych leków syntetycznych została prawie zupełnie zapomniana. Niesłusznie, bo formalnie był chemikiem i w początkowym okresie swej kariery zawodowej współpracownikiem słynnego Adolfa von Baeyera (nagroda Nobla w 1905 roku) w Berlińskiej Akademii Przemysłowej, a opracowane już samodzielnie w Bernie syntezy hydroksyacetononów stanowią jego oryginalny wkład w syntezę związków aromatycznych.

Obecnie hasło „salicylany” kojarzy nam się natychmiast z aspiryną – kwasem acetylosalicylowym (KAS) – lekiem o niezrównanej popularności, wokół którego nawarstwiło się również wiele mitów. Np. aspiryna uchodzi w powszechnym mniemaniu za najstarszy, prototypowy lek syntetyczny, podczas gdy w rzeczywistości jej pojawienie się na rynku

w 1899 roku poprzedziło uruchomienie w niemieckich fabrykach chemicznych produkcji takich leków syntetycznych, jak: kairyna (1882), salol (1883), antypiryna (1889), antyfebryna (1886), piramidon (1896), ortokaina (1896), eukaina (1896) i nirwanina (1898). Także historia odkrycia kwasu acetylosalicylowego i wdrożenia jego produkcji w firmie Bayer jest znacznie bardziej skomplikowana niż głosi popularna anegdota o chemiku (Felix Hoffmann) pragnącym przynieść ulgę cierpiącemu na reumatyzm ojcu i modyfikującym w tym celu strukturę KS. Chemikiem, który prowadził w firmie Bayer badania nad estryfikacją fenoli był Artur Eichengrün i to on polecił Hoffmannowi wytworzyć przeznaczoną do badań biologicznych porcję KAS (którego pierwszą syntezę przeprowadził w 1853 roku Charles Frederic Gerhardt we Francji; eksperyment ten powtórzył kilkanaście lat później w Niemczech Carl Johann Kraut). Otrzymany przez Hoffmanna związek został jednak pierwotnie zdyskwalifikowany jako kandydat na lek przez Heinricha Dresera, który był farmakologiem firmy i dopiero interwencja Eichengrüna, stopniowa weryfikacja wyników oraz jego starania o przeprowadzenie niezależnych badań klinicznych w Halle i Berlinie dowiodły wyższości KAS nad innymi salicylanami i przekonały zarząd Bayera o potrzebie uruchomienia produkcji leku pod zastrzeżoną nazwą Aspirin^{®7,8}. Dopiero po niemal stu latach powszechnego stosowania KAS jako leku przeciwbólowego, przeciwzapalnego, przeciwgorączkowego i przeciwreumatycznego wyjaśniono, na czym polega efekt fizjologiczny i molekularny mechanizm działania tego związku chemicznego. Obecnie wiemy, że KAS jest nieodwracalnym inhibitorem cyklooksygenazy, jednego z kluczowych enzymów w zachodzącej *in vivo* chemicznej kaskadzie utleniania lipidów, przekształcającej kwas arachidonowy w mediatory stanu zapalnego: tromboksany i prostaglandyny¹⁰.

We współczesnej medycynie, we wskazaniach: przeciwbólowych/przeciwzapalnych/antytrombinyowych koegzystują zgodnie preparaty roślinne (kora wierzby), nowe sole KS (salicylan choliny) i inne jego pochodne (salicylamid i etoksylsalicylamid oraz KAS), z czego sama tylko aspiryna jest wytwarzana na skalę megatonową (ok. 9 tys. ton w latach 2005–2008).

Najprostszy fenolokwas – KS – związek naturalny, odkryty jednak pierwotnie w roślinach w swojej postaci prekursorowej (salicyna), stał się dzięki gwał-

townemu rozwojowi syntezy chemicznej w końcu XIX wieku bezpośrednim prekursorem grupy ważnych dla terapii analogów strukturalnych (salicylan) oraz inspiracją dla następnych generacji terapeutów – niesteroidowych leków przeciwzapalnych i koksycybów. Jak już wyjaśniliśmy, kwas salicylowy należy do kategorii kwasów hydroksybenzoesowych, czyli pochodnych prostych fenoli zawierających w cząsteczce grupę karboksylową bezpośrednio związaną z pierścieniem aromatycznym, w sumie złożonych z siedmiu atomów węgla w podstawowym szkielecie (większa liczba atomów węgla w składzie cząsteczki może wynikać z częściowej lub całkowitej metylacji grup hydroksylowych w polifenolowych pochodnych kwasu benzoowego). Do tej grupy oprócz KS należą kwasy: 4-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, waniliowy, gentyzynowy, syringowy i galusowy (kwas 3-,4-,5-trihydroksybenzoesowy). Ten ostatni jest szczególnie ważny dla fizjologii roślin, jako składnik substancji wielkocząsteczkowych: lignin, garbników i tanin. Wielofunkcyjna i reaktywna cząsteczka kwasu galusowego jest zdolna zarówno do polikondensacji z wytworzeniem wiązań estrowych, jak i do wolnorodnikowej polimeryzacji z wytworzeniem nowych wiązań pomiędzy atomami węgla. Poliestry i estry glikozydów kwasu galusowego określamy mianem tanin rozpuszczalnych, a wielkocząsteczkowe agregaty zawierające wiązania bifenylove nazywamy taninami nierozpuszczalnymi. Dwie inne, ważne grupy kwasów fenolowych mają budowę C6 – C2 (ośmiowęglowe kwasy fenylooctowe) oraz C6 – C3 (dziewięciowęglowe kwasy fenylopropanowe i pochodne kwasu cynamonowego). Do pierwszej należą kwasy: hydroksyfenylooctowe i hydroksyglikosalowe, a do drugiej – kwasy o nazwach zwyczajowych: kwasy hydroksyfenylomlekowe, kwas kumarowy, dihydrokumarowy, kawowy, ferulowy i synapinowy. Wydaje się, że wymienione fenolokwasy o niskim ciężarze cząsteczkowym spełniają w roślinach różne funkcje fizjologiczne. Na przykład, mogą być wykorzystywane bezpośrednio jako cząsteczki sygnalizacyjne w warunkach stresu lub w oddziaływaniach allelopatycznych, służą jako materiały wyjściowe do syntezy bardziej skomplikowanych, ale wciąż niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, takich jak kumaryny, ligniny, irydoidy i flawonoidy, mogą wreszcie występować w roli surowców do produkcji polimerycznych materiałów ochronnych lub konstrukcyjnych, takich jak

taniny lub ligniny. O tym, że są to cząsteczki bardzo ważne dla przetrwania gatunków świadczą różnorodne szlaki biogenetyczne, które prowadzą do ich wytworzenia w różnych organizmach, a więc fakt że w procesie ewolucji wynalazek ten miał miejsce kilkakrotnie. Poznano następujące drogi biosyntezy kwasów fenolowych: deaminowanie aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny), poliketydową, szlak kwasu choryzmowego i szlak kwasu szikimowego. W przypadku kwasu salicylowego możliwa jest także modyfikacja biosyntezy polegająca na bezpośredniej hydroksylacji kwasu benzoowego^{11,12,13}.

Fenolokwasy

Współczesne metody analityczne, zwłaszcza metody chromatograficzne stosujące tak precyzyjne narzędzie, jak spektrometria mas do detekcji i identyfikacji badanych substancji, zapewniły ogromny postęp techniczny w akademickich badaniach fitochemicznych, których wyniki są już dziś powszechnie akceptowane w kontroli jakości leków ziołowych, żywności oraz produktów pochodnych: żywności funkcjonalnej i suplementów diety¹⁴. Składniki fenolowe roślin zawsze stanowiły przedmiot szczególnego zainteresowania badaczy, jako związki o szczególnej reaktywności, chemicznej i enzymatycznej, polegającej m.in. na efektywnej neutralizacji reaktywnych form tlenu, uznanych za czynniki szkodliwe dla normalnej fizjologii komórki. W wielu opracowaniach na temat fitochemii i biologii roślin, wyróżnia się kategorię grupową: polifenole, zawierającą różne pod względem biogenetycznym, strukturalnym i funkcjonalnym klasy związków organicznych, dla zaznaczenia takich cech wspólnych, jak zdolność do ochrony komórek gospodarza przed nadmiernymi dawkami promieniowania, wolnymi rodnikami i stresem oksydacyjnym oraz innymi niekorzystnymi bodźcami środowiskowymi. Polifenole, jako związki wielofunkcyjne i reaktywne, mają tendencję do stopniowego zwiększania ciężaru cząsteczkowego na drodze reakcji kondensacji, z wytworzeniem nowych wiązań kowalencyjnych C-O, C-C i C-N. Proces ten można łatwo wyjaśnić na przykładzie kwasów fenolowych (i hydroksykwasów niearomatycznych), które często wykazują tendencję do międzycząsteczkowej estryfikacji, tworząc heterodimery oraz wyższe oligomery, dla których przyjęto nazwę grupową: depsydy. Do tej kategorii należą tak powszechnie spotykane składniki roślin wyższych, jak kwas

elagowy, kwas rozmarynowy, izomeryczne kwasy kawowochinowe określane zbiorową nazwą kwasy chlorogenowe, estry kwasów hydroksycynamonowych z kwasem winowym (kwas chikorowy) oraz liczne mieszane estry kwasu galusowego, prekursorzy rozpuszczalnych tanin. Kwasy fenolowe (oraz inne związki polifenolowe) stanowią znaczący pod względem farmakologicznym i fizjologicznym, niezwykły składnik diety człowieka, gdyż występują powszechnie w owocach i warzywach, a także napojach, w kawie, herbacie, sokach owocowych, winach i innych przetworach pochodzenia roślinnego. W wyniku spożycia produktów roślinnych bogatych w fenolokwasy i produkty ich przemian metabolicznych, stężenia poszczególnych składników mogą osiągać w płynach ustrojowych, szczególnie w osoczu, poziomy w zakresie mikromolarnym, co – jak się obecnie sądzi – ma ograniczony wpływ na zwiększenie globalnej puli antyoksydantów, ale jest wystarczające do zaobserwowania efektów wynikających z oddziaływań na takie cele molekularne, jak oksygenazy cyklu przemian kwasu arachidonowego, czynniki wzrostu, kinazy białkowe ważnych szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej etc. Nasza wiedza o roli biologicznej poszczególnych fenolokwasów i o ich wzajemnych interakcjach *in vivo* jest jeszcze dość skromna, choć wystarczająca, by przyznać im szczególną rolę jako składnikom ludzkiego pożywienia^{11,12,13}. Wyjątkową rolę kwasu salicylowego można zrekapitulować następująco:

KS jest fitohormonem, a także prototypowym lekiem przeciwzapalnym w medycynie ludzkiej i weterynarii. Syntetyzowany w komórkach roślin, reguluje w nich wiele ważnych procesów, począwszy od kiełkowania nasion przez różnicowanie systemu korzeniowego do regulacji procesu kwitnienia. Jednym z najintensywniej badanych procesów, w którym uczestniczy KS jest indukcja procesów obronnych roślin przy infekcjach mikroorganizmów patogenych^{15,16}.

Funkcje kwasu salicylowego

Istnieje wiele dowodów wskazujących na udział KS w procesie odpowiedzi obronnej roślin. Historycznie, pierwszą przesłankę stanowiła obserwacja, że podanie roślinom tytoniu kwasu acetylosalicylowego bądź kwasu salicylowego indukuje odporność na infekcję wirusa mozaikowatości tytoniu (*Tobacco Mosaic Virus* – TMV), co manifestuje się aktywacją genów

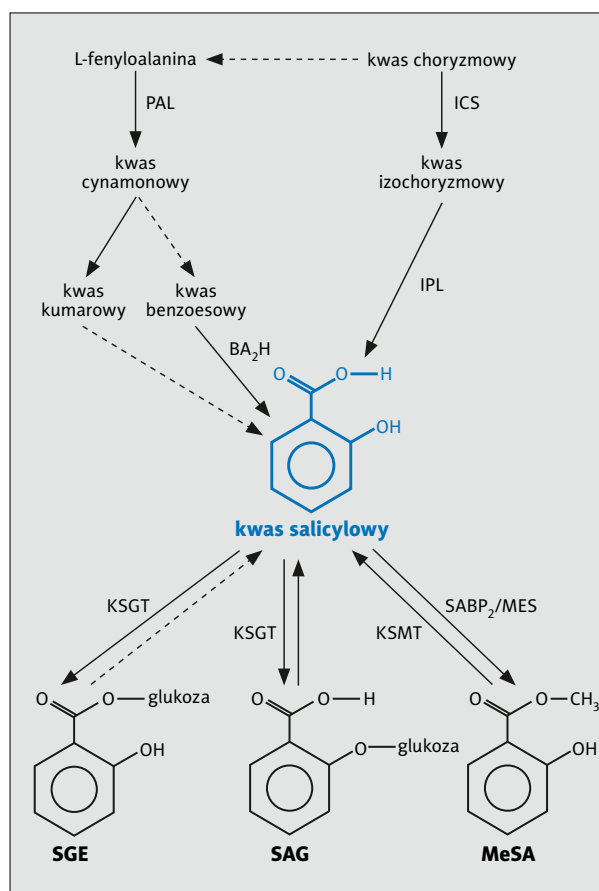
kodujących białka obronne (*Pathogenesis Related* – PR). Proces ten okazał się w znacznym stopniu zależny od temperatury otoczenia. Kiedy rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum*) po infekcji wirusem TMV inkubowane były w stałej, wysokiej temperaturze (>30°C), nie reagowały na infekcję obroną. To znaczy nie tworzyły nekroz lokalnych (rodzaj programowanej śmierci komórkowej) mających zminimalizować rozprzestrzenianie się patogenu. Rośliny te nie produkowały też białek PR, a wirus mógł rozprzestrzenić się bez ograniczeń w całej roślinie. Okazało się, że również synteza KS w tej temperaturze była zablokowana. Przeniesienie roślin do niższej temperatury (22°C) przywracało zarówno syntezę KS, jak również inicjowało odpowiedź obronną (nekrotyzacja tkanki, synteza białek obronnych). Ponadto w innych doświadczeniach pokazano, że hybrydy międzygatunkowe tytoniu (*Nicotiana glutinosa* i *Nicotiana debneyi*) akumulują duże ilości KS, czemu towarzyszy stała synteza białek PR. Po infekcji wirusem TMV rośliny te wytwarzały nekrozy kilkakrotnie mniejsze w porównaniu do innych odmian tytoniu, co wskazuje, że lokalizacja infekcji była w nich wyjątkowo szybka i skuteczna. W wielu gatunkach roślin, w tym w tytoniu, ogórku, ziemniaku i *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity – modelowa roślina najczęściej stosowana w eksperymentach laboratoryjnych), podczas odpowiedzi na atak mikroorganizmów chorobotwórczych wewnątrzkomórkowy poziom KS wzrasta wielokrotnie, zarówno w liściach infekowanych, jak i w liściach odległych od miejsca infekcji. Okazało się, że synteza KS zawsze poprzedza indukcję białek obronnych z rodziny PR. Zewnętrzne podanie KS indukuje w tytoniu czy u *Arabidopsis* te same geny i z podobną kinetyką, jak podczas odpowiedzi na infekcję mikroorganizmów chorobotwórczych. Na tej podstawie oparto przypuszczenie, że istnieje kaskada zdarzeń z udziałem KS rozpoczynająca się rozpoznaniem czynnika wywołującego infekcję, wiodąca poprzez aktywację szeregu genów, a kończąca się podjęciem odpowiedniej strategii obrony¹⁷.

Bezpośrednie dowody na funkcję KS pochodzą z badań przeprowadzonych z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie (transgenicznych) roślin zawierających bakteryjny gen NahG pochodzący z bakterii *Pseudomonas putida*. Produkt genu NahG katalizuje rozkład kwasu salicylowego do katecholu. Tym samym po zakażeniu patogenem rośliny z ak-

tywnym genem NahG zdolne były do akumulowania tylko niewielkich ilości KS, a w konsekwencji wykazywały ostrzejsze symptomy chorobowe (np. liczniejsze i większe nekrozy), w porównaniu z roślinami niemodyfikowanymi¹⁸.

Szczegółowa analiza metabolizmu związków fenolowych syntetyzowanych w zainfekowanych roślinach wykazała, że pierwotnymi prekursorami kwasu salicylowego są L-fenylalanina lub kwas choryzmowy. Związki te podlegają enzymatycznemu przekształceniu do kwasu *trans*-cynamonowego na skutek działania enzymu amoniako-liazy L-fenylalaniny (PAL) lub do kwasu iso-choryzmowego, produktu syntazy iso-choryzmatów (ICS). Produkt reakcji katalizowanej przez PAL pełni nie tylko funkcję potencjalnego prekursora KS, ale jest jednym z najważniejszych ogniw szlaku biosyntezy fitoaleksyn, związków o charakterze bakterio- i grzybobójczym oraz lignin, a więc kluczowych elementów reakcji obronnych komórek roślinnych. Bezpośrednimi prekursorami KS (**Rycina 1.**) są kwas benzoesowy, podlegający hydroksylacji w pozycji 2 – z udziałem enzymu hydroksylazy kwasu benzoesowego lub kwas iso-choryzmowy przekształcany do KS przez pirogroniano-liazę isochoryzmatów (IPL). Stwierdzono, że zarówno geny kodujące PAL, jak i ICS, IPL oraz hydroksylaza kwasu benzoesowego podlegają indukcji na poziomie transkrypcji, po infekcji roślin¹⁹.

Analiza KS gromadzącego się w zakażonej tkance wykazała, że powstający wolny kwas przekształcany jest na drodze enzymatycznej do β -glukozydu (SAG) lub estru (SGE). Tworzenie koniugatów z cukrem jest powszechną u roślin formą magazynowania dużych ilości toksycznych bądź wysoce reaktywnych związków. Hydroliza wiązania β -glukozydowego, a więc reakcja odwrotna, umożliwia w razie potrzeby szybką mobilizację „uwięzionego” dotychczas aktywnego związku. Procesy odwracalnej dezaktywacji związków biologicznie czynnych, poprzez tworzenie koniugatów z glukozą, znane są również w metabolizmie innych związków roślinnych, takich jak auksyny i cytokininy czy kwas giberelinowy. Wyniki ostatnich lat dostarczyły informacji o syntezie w komórkach roślin estru metylowego kwasu salicylowego (MeSA). Dzięki swym właściwościom ten lotny związek może pełnić rolę mobilnego sygnału informującego całą roślinę, a także rośliny sąsiadujące o procesie infekcji i konieczności włączenia mechanizmów obronnych²⁰.



RYC. 1. Schemat szlaków biosyntezy i metabolizmu kwasu salicylowego w roślinach.

PAL – amonioko-liaza L-fenylalaniny; **ICS** – syntaza iso-choryzmatów; **IPL** – pirogroniano-liaza iso-choryzmatów; **BA₂H** – hydroksylaza kwasu benzoesowego; **KSGT** – glukozo-transferaza kwasu salicylowego; **KSMT** – metyltransferaza kwasu salicylowego, **SABP₂/MES** – Białko-2 wiążące kwas salicylowy/metylesteraza kwasu salicylowego; **SGE** – ester glukozowy kwasu salicylowego; **SAG** – glukozyd kwasu salicylowego; **MeSA** – ester metylowy kwasu salicylowego.

Linie ciągłe (—>) oznaczają reakcje katalizowane przez scharakteryzowane enzymy indukowane w odpowiedzi na infekcję, linie przerywane (- - ->) hipotetyczne drogi przekształcania związków fenolowych.

Do niedawna uważano, że KS oznaczany analitycznie w materiale biologicznym pochodzenia ludzkiego musi być wynikiem przyjmowania leków syntetycznych, takich jak aspiryna, lub preparatów roślinnych zawierających salicynę albo jej analogi. Wielokrotnie stwierdzano jednak obecność KS w płynach ustrojowych osób nie przyjmujących salicylanów i obecnie zdolność wytwarzania tego związku u ludzi *in vivo* uznaje się za dowiedzioną^{21,22}.

Przyczyną nie są jednak w tym wypadku enzymy szlaków biogenetycznych funkcjonujących w roślinach, a cytochromowe oksydazy związków aromatycznych, czyli typowe enzymy pierwszej fazy metabolizmu ksenobiotyków zawierających pierścienie fenylowe. Bezpośrednim prekursorem wytwarzanego w organizmie ludzkim KS jest kwas benzoesowy, obecny w niewielkich ilościach w roślinach, a także używany dość powszechnie jako wytwór przemysłu chemicznego w celu konserwacji produktów żywnościowych.

Powołując się na bardzo wysoką czułość metod współczesnej analityki fitochemicznej i klinicznej, prowokujemy zapewne pytanie, czy dla takiej cząsteczki, jak KS, która może być zarówno wytworem przemysłowej syntezy farmaceutycznej, jak i metabolizmu wtórnego roślin, jest możliwe określenie rzeczywistego pochodzenia analizowanej próbki substancji. Otóż badania chemiczne umożliwiają takie rozróżnienie! Podstawą oceny jest określenie składu izotopowego atomów węgla – związki naturalne, powstałe „współcześnie” mają takie proporcje naturalnych izotopów ^{12}C , ^{13}C i ^{14}C , jak dwutlenek węgla obecny w atmosferze, podczas gdy cząsteczki otrzymane metodą syntezy chemicznej z surowców petrochemicznych odzwierciedlają proporcje izotopów charakterystyczne dla atmosfery odległych okresów geologicznych, w których ówczesnie wytwarzana biomasa podlegała stopniowej transformacji w węgiel kamienny i ropę naftową. Różnice takie są do uchwycenia metodami spektrometrii masowej wysokiej rozdzielczości. Dotychczas jednak w obszarze farmakologii, biochemii i fizjologii nie było powodu do wykonywania takich badań ze względu na tradycyjnie wysokie dawki terapeutyczne KAS z łatwością oznaczane spektrofotometrycznie. Odkrycie endogennego KS u ludzi może ten stan rzeczy radykalnie zmienić, jeśli zdecydujemy się na śledzenie losów metabolicznych związków z puli salicylanów na poziomie dawek miligramowych. ■

Piśmiennictwo

- Crozier A, Clifford NM, Ashihara H. Eds. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet, Blackwell Publishing, Oxford, 2006
- Grabley S, Thiericke R. The impact of natural products on drug discovery, W: Drug discovery from nature (Grabley S, Thiericke R, Eds.); Springer Verlag, Berlin 2000;3-37.
- Olędzka R. Nutraceutyki, żywność funkcjonalna – rola i bezpieczeństwo stosowania, *Bromat Chem Toksykol* 2007;15:1-8.
- Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy, XVth Edition, W.B. Saunders, Edinburgh 2002;214-225.
- Cseke LJ, Lu CR, Kornfeld A i wsp. How and why these compounds are synthesized by plants. W: Natural Products from plants red. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman P B i wsp. CRC Taylor & Francis. Boca Raton. FL 2006
- Reuben S, Cseke LJ, Bhinu VS i wsp. Molecular Biology of Plant Natural Products, W: Natural Products; Drug Discovery and Therapeutic Medicine. red. Zhang L, Demain AL, eds.; The Humana Press, Totowa, NJ, 2005;165-202.
- Drews J. In quest of tomorrow's medicines, Springer Verlag, New York, 1999;43-46.
- Sneader W. Drug discovery, a history, J. Wiley & Sons, Chichester, 2005;359-361.
- Thun MJ. Beyond willow bark: aspirin in the prevention of chronic disease, *Epidemiology*, 2000;11:371-374.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs, *Nat New Biol* 1971;231:232-235.
- Shaidi F, Nacz M. Phenolics in food and nutraceuticals, sources, applications and health effects. CRC Press, Boca Raton, FL, 2004
- Cheynier V. Polyphenols in food are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(suppl):223-229.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat Prod Rep*. 2009;26:1001-1043.
- Nacz M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 2006;41:1523-1542.
- Chaturvedi R, Shah J. Salicylic acid in plant disease resistance; W:Salicylic acid, a plant hormone red. Hayat S, Ahmad A. ed. Springer, Dordrecht 2007;335-370.
- Ansari MS, Misra N. Miraculous role of salicylic acid in plant and animal system, *Am J Plant Physiol*. 2007;2:51-58.
- Kachroo P, Chandra-Shekar AC, Klessig DF. Plant signal transduction and defense against viral pathogens. *Adv Virus Res* 2006;66:161-191.
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T i wsp. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* 1995;29: 959-968.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 2009;47:177-206.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 2007;318(5847):106-113.
- Paterson JR, Lawrence JR. Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer, *Q J Med* 2001;94:445-448.
- Paterson JR, Baxter G, Dreyer JS. Salicylic acid sans aspirin in animals and man: persistence in fasting and biosynthesis from benzoic acid. *J Agric Food Chem* 2008; 56:11648-11652.

prof. dr hab. n. med. Grzegorz Grynkiewicz

Institut Farmaceutyczny

01-793 Warszawa, ul. Rydygiera 8

✉ g.grynkiewicz@ifarm.waw.pl