Budowa, właściwości lecznicze i biosynteza diterpenoidów kjatanowych

Wojciech Krzyczkowski, Eliza Malinowska, Franciszek Herold

Katedra i Zakład Technologii Środków Leczniczych,
Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna, Warszawa

The structure, medicinal properties and biosynthesis of cyathane diterpenoids

Summary

This paper describes an unusual type of diterpenoids, called cyathins, and presents their structure, biosynthesis and biological activities. These secondary metabolites have been isolated during the last 35 years from mycelia, culture broths and fruiting bodies of several species of mushrooms such as *Cyathus helenae*, *C. striatus*, *Hericium erinaceum* and *Sarcodon scabrosus*. Cyathane diterpenoids are known to have a potent stimulating effect on Nerve Growth Factor synthesis and can became potential therapeutic agents for the treatment of neurodegenerative disorders, for instance Alzheimer's disease. Cyathins also possess anti-imflammatory and antimicrobial activity.

Key words:
cyathins, erinacines, scabronines, glaucpines, cyrneines, Nerve Growth Factor, neurite outgrowth, *Cyathus* sp., *Hericium* sp., *Sarcodon* sp., biosynthesis.

Adres do korespondencji

Wojciech Krzyczkowski,
Katedra i Zakład
Technologii Środków
Leczniczych,
Wydział Farmaceutyczny,
Akademia Medyczna,
ul. Banacha 1,
02-097 Warszawa;
e-mail:
wojciech.krzyczkowski@
am.edu.pl

biotechnologia
1 (80) 146–167 2008

1. Wstęp

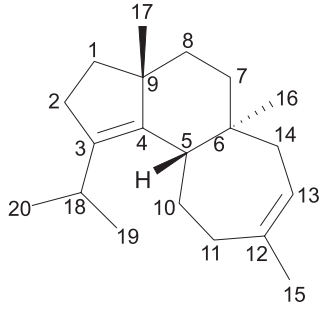
Diterpenoidy kjatanowe* reprezentują niezwykle interesującą grupę związków wyizolowanych po raz pierwszy w 1971 r. z hodowli mycelialnej grzyba *Cyathus helenae*. Od tamtego czasu pojawiły się publikacje dotyczące izolacji wielu innych kjatanów z różnych gatunków grzybów z rodzaju *Cyathus*, a także z gatun-

* łac. słowo *cyathus* (kubek) zostało przejęte z języka greckiego (κύα), zatem za poprawne spolszczenie uważamy formę „kjatyna, kjatus, kjatanowe", a nie spotykane „cjatyna" lub „cyjatyna".

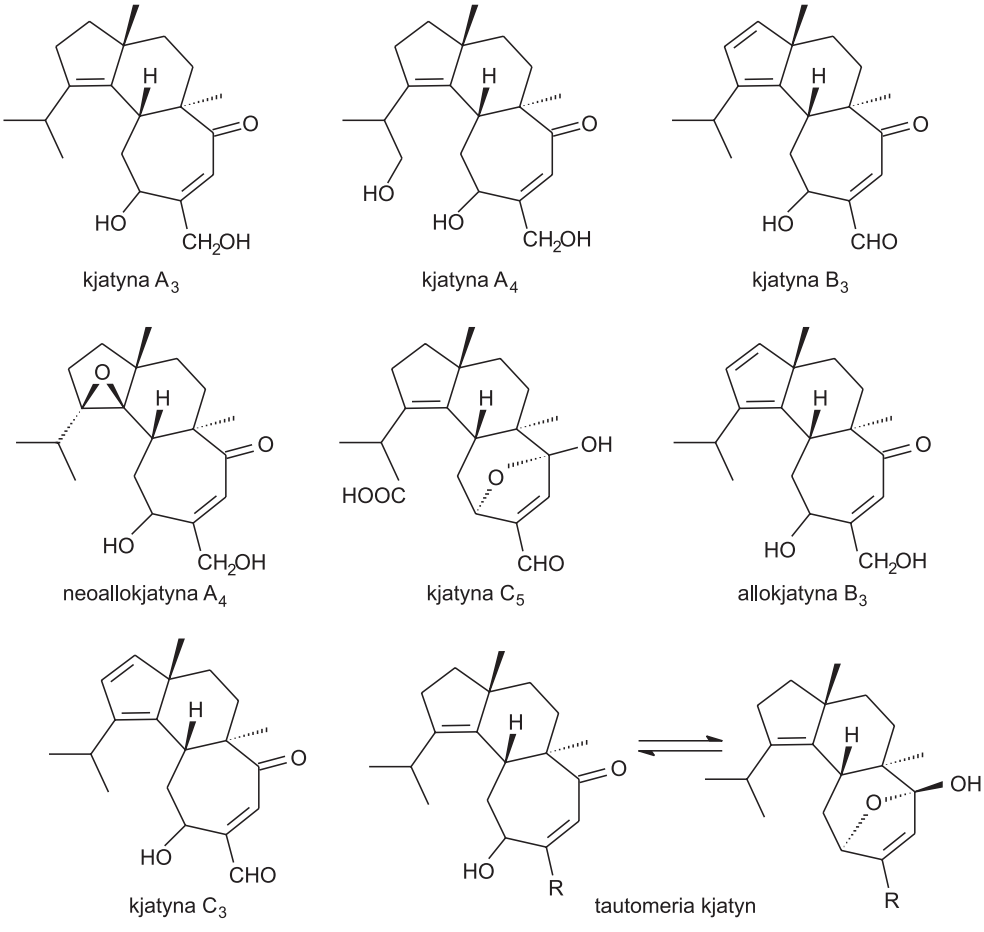
ków takich jak *Hericium erinaceum* i *Sarcodon scabrosus*. Szereg diterpenoidów typu kjatanu wykazuje działanie przeciwbakteryjne lub przeciwzapalne, jednak najbardziej intrygującą i unikatową właściwością tych związków jest ich zdolność do pobudzania syntezy czynnika wzrostu nerwów (NGF). Ten ostatni rodzaj aktywności otwiera nowe możliwości w leczeniu chorób degeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimera. Synteza chemiczna diterpenoidów typu kjatanu okazała się niezwykle złożona, a zarazem mało opłacalna. Prowadzenie hodowli grzybów w warunkach laboratoryjnych, przy optymalnym doborze i kontroli warunków biosyntezy daje szansę pozyskiwania metabolitów wtórnych, w tym diterpenoidów, w sposób powtarzalny i z dobrą wydajnością.

2. Otrzymywanie i budowa diterpenoidów kjatanowych

W 1965 r. kanadyjski mykolog Harold Johnston Brodie odkrył w Górach Skalistych nowy gatunek grzyba z rodzaju *Cyathus* (kubek, ang. *bird's nest fungus*) i nazwał go *Cyathus helenae* (na cześć swojej żony Heleny) (1,2). Badania nad metabolitami wydzielanymi przez grzybnię *C. helenae* w hodowli głębinowej zaowocowały izolacją mieszaniny związków o działaniu antybiotycznym, nazwanej „kjatyną" (ang. „cyathin"). W toku prac nad oczyszczaniem składników tej mieszaniny stwierdzono, że zawiera ona nowy rodzaj diterpenoidów – określany jako typ kjatanu – o cząsteczkach charakteryzujących się obecnością trzech pierścieni: pięcio-, sześcio- i siedmioczłonowego (rys. 1). Wyizolowane związki nazwano w kolejności wzrastania liczby atomów tlenu i wodoru kjatynami (ang. *cyathins*): A_3, A_4, B_3, B_4, C_3, C_5, a ich izomery allokjatynami B_3 i A_4. Neoallokjatyna A_4, diterpenoid otrzymany kilka lat później z *C. helenae*, była początkowo uważana za zanieczyszczenie towarzyszące kjatynie A_3 i dopiero kiedy wyizolowano ją w formie acetonidu, została zaklasyfikowana do grupy kjatyn (rys. 2) (3-7).



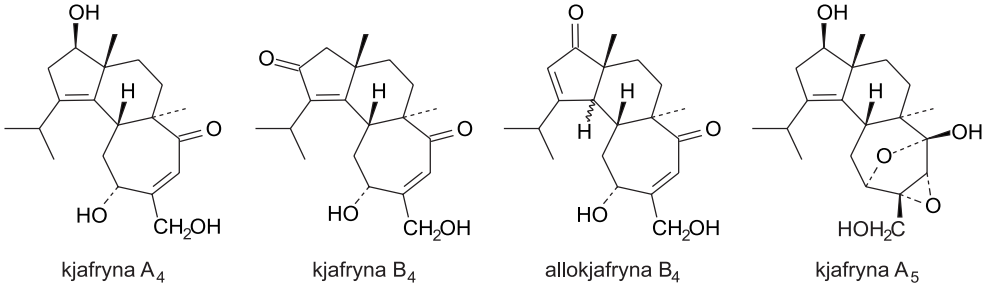
Rys. 1. Szkielet diterpenu typu kjatanu.



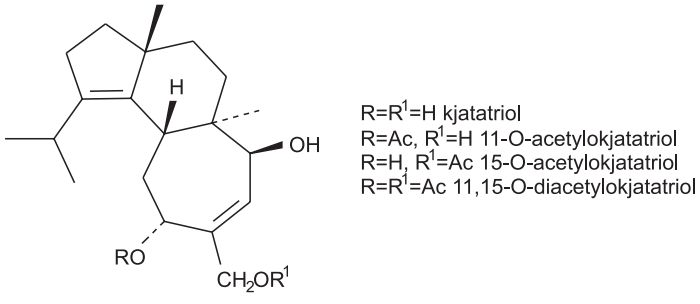
Rys. 2. Budowa kjatyn wyizolowanych z *Cyathus helenae*.

Zachęceni swoim sukcesem kanadyjscy naukowcy rozpoczęli badania nad izolacją metabolitów wtórnych z innych gatunków grzybów z rodzaju *Cyathus*. *Cyathus africanus* został odkryty na górze Kilimandżaro na wysokości ok. 2400 m n.p.m., gdzie kolonizował martwe gałęzie drzew. Hodowla głębinowa tego gatunku pozwoliła uzyskać cztery nowe diterpenoidy kjatanowe – kjafryny (ang. *cyafrins*) A_4, B_4, A_5, allokjafrynę B_4 oraz dwa diterpenoidy wcześniej wyizolowane z *Cyathus helenae* – kjatynę A_3 i allokjatynę B_3 (rys. 3) (8).

Z hodowli głębinowej *Cyathus earlei* Lloyd, który jest tropikalnym lub subtropikalnym gatunkiem grzyba występującym na Kubie, Puerto Rico, w Meksyku i na Hawajach wyizolowano kjatatriol, 11,15-O,O-diacetylokjatatriol, 15-O-acetylokjatatriol, 11-O-acetylokjatatriol, allokjatynę B_2 oraz kjatynę B_2 (rys. 4) (9).

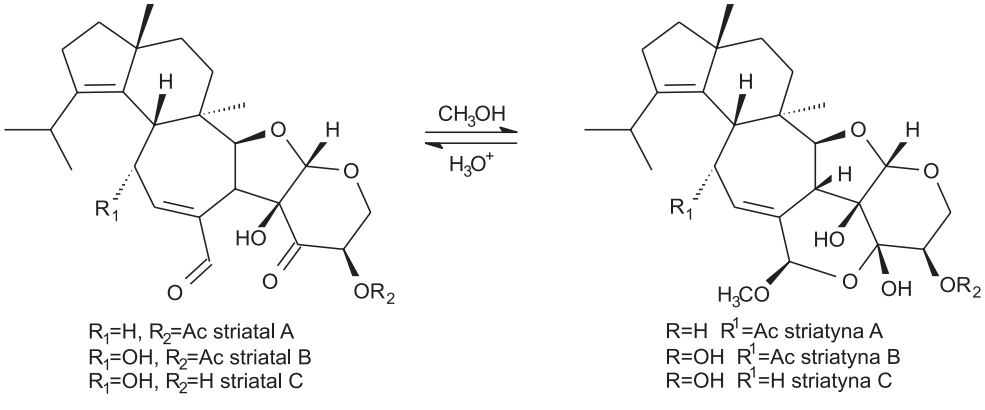


Rys. 3. Budowa kjafryn wyizolowanych z *Cyathus africanus*.

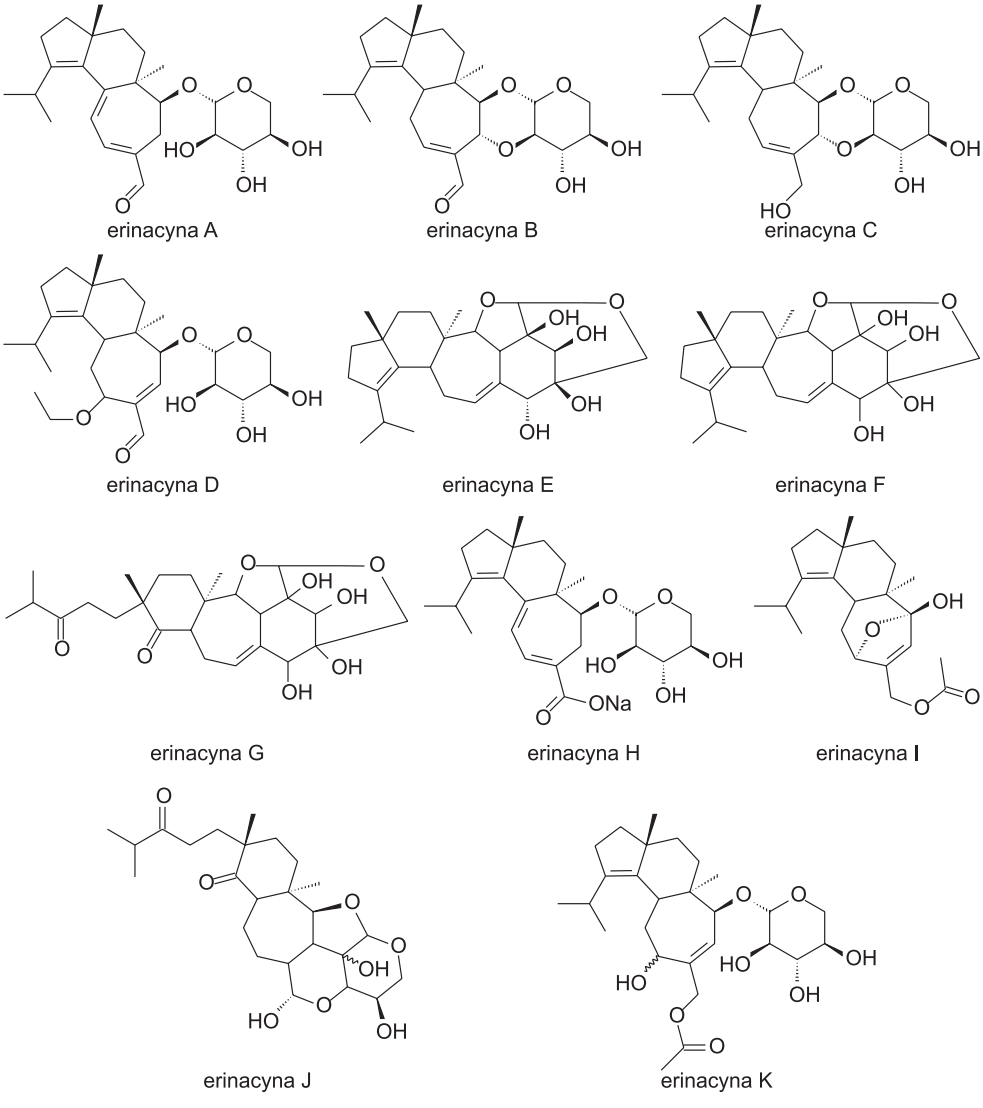


Rys. 4. Budowa diterpenoidów wyizolowanych z *Cyathus earlei*.

Hodowlą głębinową grzybni *Cyathus striatus* (kubka prążkowanego) zapoczątkowano biosyntezę nowych diterpenoidów kjatanowych, nazwanych striatynami. W badaniach Anke i wsp. wykazano, że wyizolowane przez nich striatyny A, B i C są artefaktami powstającymi z naturalnie występujących w grzybni striatali podczas ekstrakcji metanolem (rys. 5) (10-12).



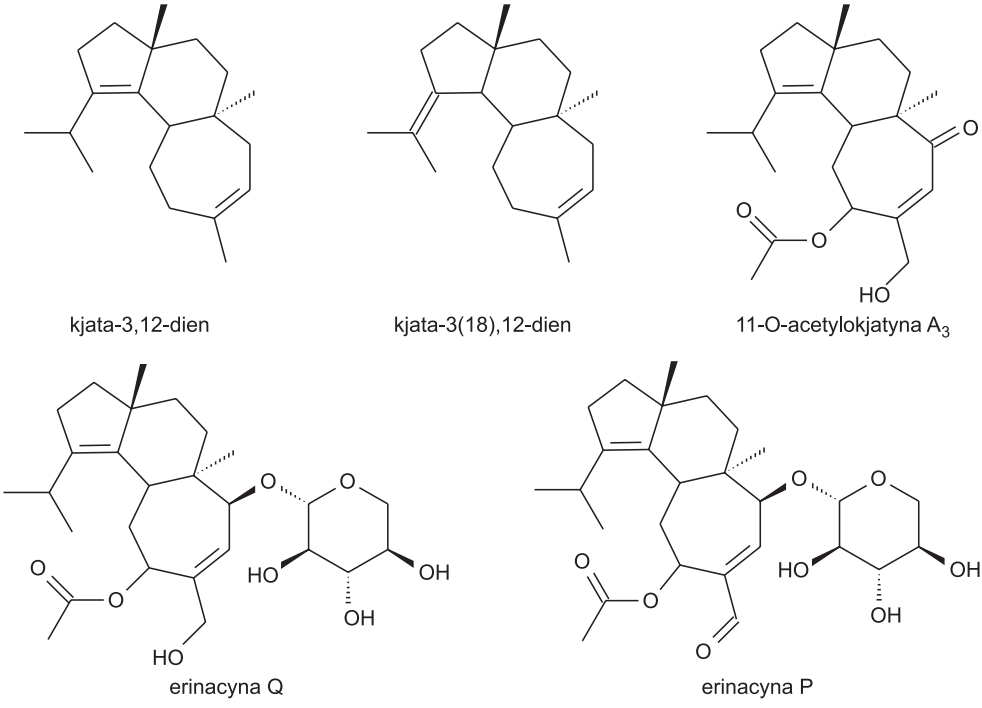
Rys. 5. Budowa striatyn i striatali wyizolowanych z *Cyathus striatus*.



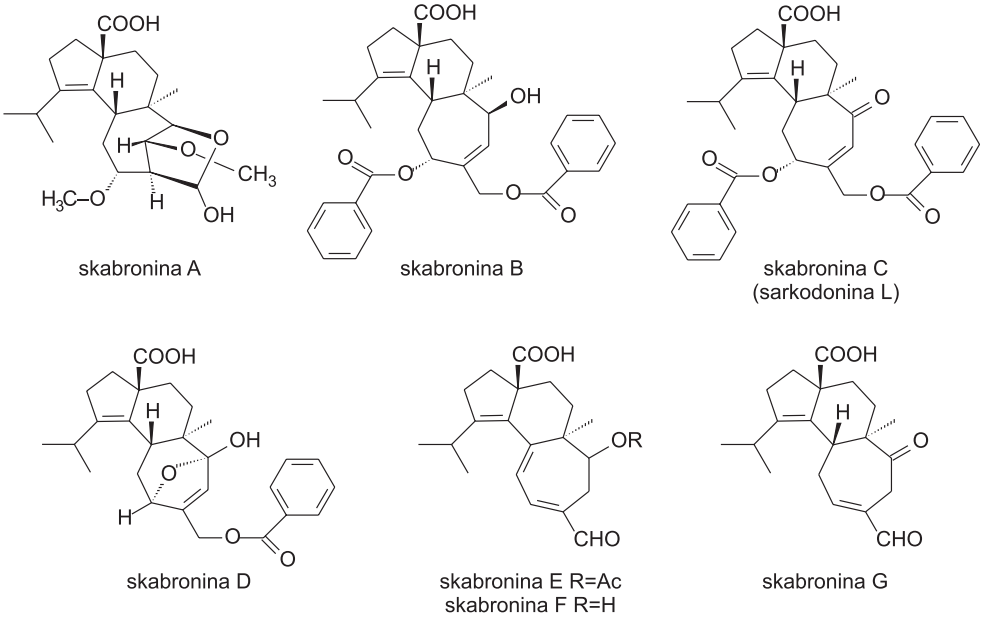
Rys. 6. Budowa erinacyn A-K wyizolowanych z *Hericium erinaceum*.

Erinacyny (ang. *erinacines*), otrzymywane z owocników i grzybni soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceum*) zaliczane są do tzw. ksylozydów kjatanowych ze względu na przyłączoną do ich aglikonu cząsteczkę ksylozy. Dotychczas wyizolowano trzynaście erinacyn oraz kilka ich prekursorów o budowie kjatanowej (rys. 6,7) (13-21).

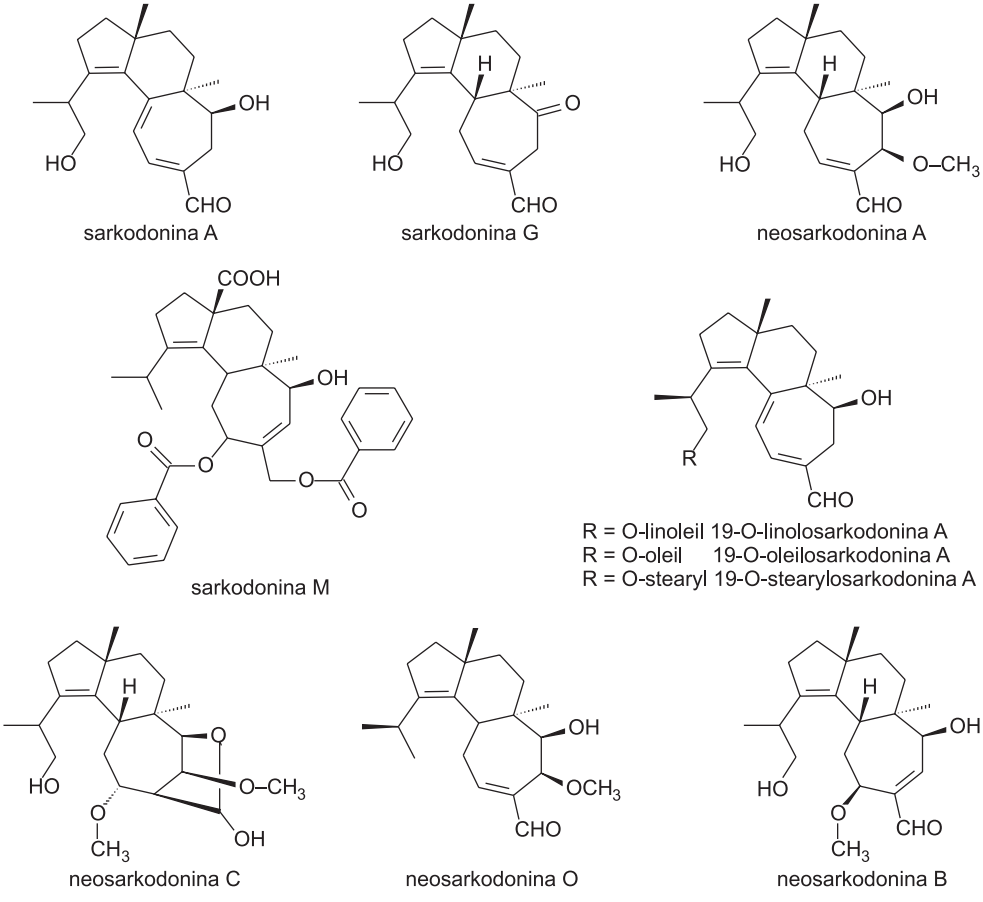
Sarcodon scabrosus (Fr.) Krast. (sarniak gorzki), grzyb z rodziny *Bankeraceae* (kolcownicowate), rośnie w lasach iglastych i liściastych w Europie i Japonii. Jest niejadalny z powodu bardzo gorzkiego smaku pochodzącego od zawartych w nim terpenoidów. Z jego owocników wyizolowano dotychczas skabroniny A-F (rys. 8), sarko-



Rys. 7. Budowa erinacyn P i Q oraz ich prekursorów wyizolowanych z *Hericium erinaceum*.



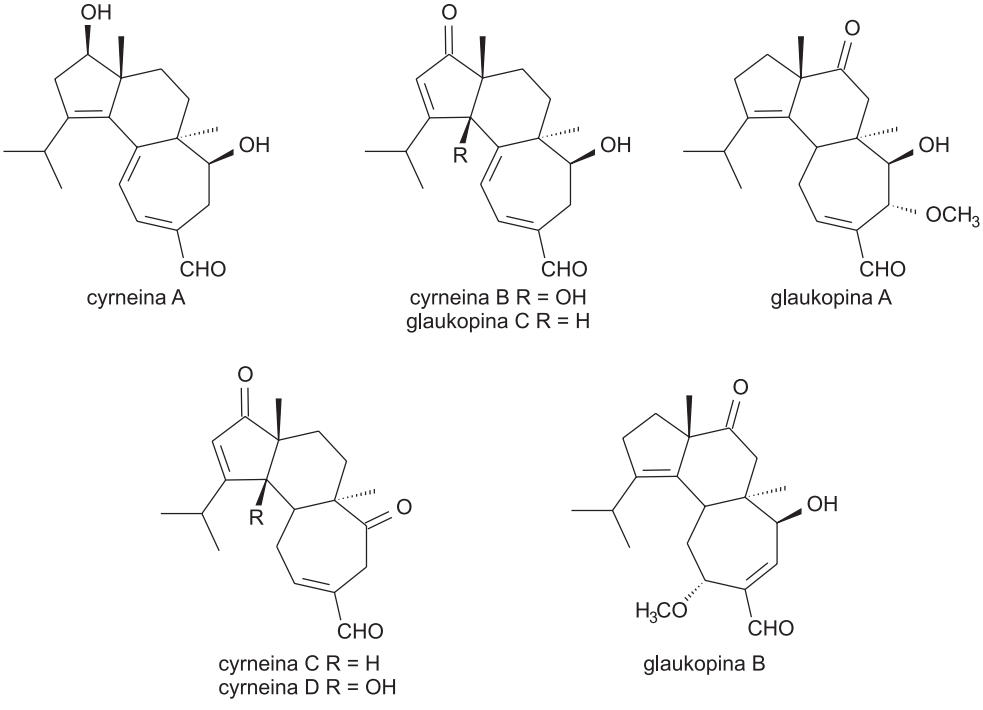
Rys. 8. Budowa skabronin wyizolowanych z *Sarcodon scabrosus*.



Rys. 9. Budowa sarkodonin wyizolowanych z *Sarcodon scabrosus*.

doniny A i G, sarkodoniny L i M, neosarkodoninę A, B i C, neosarkodoninę O, 19-O-linolo-, 19-O-oleilo- oraz 19-O-stearylosarkodoninę A (rys. 9) (22-28).

Również inne gatunki grzybów z rodziny *Sarcodon* zawierają diterpenoidy typu kjatanu. Owocniki grzyba *Sarcodon glaucopus* (sarniak sinostopy) zawierają glaukopiny A, B i C, a owocniki *Sarcodon cyrneus* – cyrneiny A-D oraz glaukopinę C (rys. 10) (29-31).



Rys. 10. Budowa diterpenoidów wyizolowanych z *Sarcodon cyrneus* i *S. glaucopus*.

3. Działanie biologiczne diterpenoidów kjatanowych

3.1. Działanie stymulujące syntezę czynnika wzrostu nerwów

Choroby układu nerwowego należą do schorzeń o ciężkim przebiegu i przeważnie mają charakter progresywny (funkcje umysłowe słabną wraz z postępem czasu) i nieodwracalny. Mała zdolność tkanki nerwowej do regeneracji czyni te choroby trudnymi do leczenia, a często wręcz nieuleczalnymi. Prawidłowy rozwój i zachowanie funkcji życiowych neuronów wymaga obecności tzw. czynników neurotroficznych wydzielanych przez komórki glejowe. Czynniki neurotroficzne, takie jak czynnik wzrostu nerwów (NGF), mózgowy czynnik wzrostu nerwów (BDNF), neurotropina-3 (NT-3), glejowy czynnik wzrostu nerwów (GDNF), oraz interleukina 6 (IL-6) działają w różny sposób poprzez promowanie przeżycia neuronów i zapobieganie apoptozie neuronów zarówno centralnego, jak i obwodowego układu nerwowego. Duża masa cząsteczkowa i niska lipofilowość tych białek nie pozwalająca na przekroczenie bariery krew-mózg uniemożliwia ich bezpośrednie zastosowanie w lecznictwie. Niskocząsteczkowe stymulatory syntezy NGF zdolne do ominięcia tej przeszkody mogą stać się potencjalnymi lekami. Do substancji o potwierdzonej aktyw-

ności stymulującej syntezę NGF należą m.in. katecholaminy, aktywne metabolity witaminy D, adenozyna, 1,4-benzochinony, hericenony oraz diterpenoidy kjatanowe – erinacyny i skabroniny (26,32).

Pierwszymi wyizolowanymi z grzybów związkami diterpenowymi o szkielecie kjatanu, wykazującymi działanie neurotropowe były erinacyny A-H otrzymane z hodowli mycelialnej grzyba *Hericium erinaceum* (tab. 1). Większość badań nad erinacynami była dotychczas prowadzona w warunkach *in vitro*. Istnieją tylko nieliczne doniesienia naukowe, w których opisano prace eksperymentalne w warunkach *in vivo*. Jednym z nich jest publikacja Shimbo i wsp., dotycząca wpływu erinacyny A na produkcję NGF i katecholamin (DOPAC, HVA i NA) w różnych regionach mózgu szczurów. Na podstawie analizy neurochemicznej ustalono, że erinacyna A zwiększa zawartość katecholamin i NGF w miejscu sinawym i hipokampie. Autorzy zaproponowali dwa możliwe mechanizmy działania erinacyny A. Pierwszy z nich przewiduje stymulujący wpływ tego diterpenoidu na produkcję noradrenaliny (NA), co powoduje zwiększenie sekrecji NGF w miejscu sinawym (LC, łac. *locus coeruleus*) i hipokampie. Erinacyna A może zatem działać na poziomie zależności neurotransmiter-neurotropina, w szczególności zaś wykazuje wpływ na interakcje zachodzące w warunkach prawidłowych w niektórych obszarach mózgu, a przebiegające w sposób patologiczny w chorobie Alzheimera. Drugi mechanizm sugeruje, że erinacyna A zwiększa ilość neurotropiny-3 i NA w miejscu sinawym. Neurotropina-3 indukuje powstawanie nowych receptorów enzymu kinazy tyrozynowej C rozpoznających inne czynniki neurotroficzne, takie jak NGF, powodując ich równoczesną aktywację (33).

Tabela 1

Aktywność stymulująca syntezę czynnika wzrostu nerwów (NGF) charakterystyczna dla niektórych diterpenoidów kjatanowych

Badany składnik	Dawka stymulująca	Ilość wydzielonego NGF [pg/ml]	Linia komórek testowych	Literatura
1	2	3	4	5
erinacyna A erinacyna B erinacyna C epinefryna (próba odniesienia)	1,0 μmol/ml 1,0 μmol/ml 1,0 μmol/ml 1,0 μmol/ml	250,1 ± 36,2 129,7 ± 6,5 299,1 ± 59,6 69,2 ± 17,2	szczurze komórki astrogleju	(13)
erinacyna D epinefryna (próba odniesienia)	1,67 μmol/ml 1,0 μmol/ml	141,5±18,2 69,2 ± 17,2	szczurze komórki astrogleju	(14)
erinacyna E erinacyna F epinefryna (próba odniesienia)	5,0 μmol/ml 5,0 μmol/ml 1,0 μmol/ml	105 ± 5,2 175 ± 52 70,2 ± 5,4	szczurze komórki astrogleju	(15)
erinacyna H (próba odniesienia)	33,3 μmol/ml –	31,5 ± 1,7 6,3	szczurze komórki astrogleju	(16)

1	2	3	4	5
skabronina A (próba odniesienia)	100 μmol/ml –	746 147	ludzkie komórki astrocytoma 1321N1	(23)
skabronina B skabronina B skabronina C skabronina E skabronina F epinefryna (próba odniesienia)	33,3 μg/ml 100 μg/ml 100 μg/ml 33,3 μg/ml 100 μg/ml 3,7 μg/ml	31,2 ± 7,1 31,1 12,3 ± 6,5 21,4 ± 5,5 4,75 ± 0,48 52,3 ± 7,0	szczurze komórki astrogleju	(25)
skabronina A skabronina G (próba odniesienia)	100 μmol/ml 100 μmol/ml –	265 200 98	ludzkie komórki astrocytoma 1321N1	(26)

Podstawowym modelem linii komórkowych stosowanych w neurobiologii do oceny różnicowania się neuronów w warunkach *in vitro* są komórki nerwowe PC12 wywodzące się z guza chromochłonnego nadnerczy szczurów. W odpowiedzi na NGF komórki te ulegają proliferacji i rozwijają się w charakterystyczne neurony współczulne. Z kolei ludzkie komórki gwiaździaka (1321N1) stanowią podstawową linię nowotworowych komórek glejowych używanych w badaniach receptorowych.

Silnym stymulatorem syntezy NGF w komórkach 1321N1 okazała się skabronina A wyizolowana z owocników grzyba *Sarcodon scabrosus*. Ohta zaobserwował, że substancja ta powoduje zwiększenie ilości mRNA czynnika wzrostu nerwów, a tym samym nasilenie jego ekspresji (23).

Podobną zależność wykazał Obara w badaniach nad skabroninami A i G przeprowadzonymi zarówno na komórkach PC12 jak i 1321N1. Obie skabroniny zwiększały ilość wydzielonego NGF w komórkach 1321N1 w sposób zależny od dawki. W komórkach inkubowanych w obecności skabroniny A i G ilość mRNA czynnika wzrostu nerwów kilkakrotnie zwiększyła się w porównaniu z jego zawartością w kontrolnej populacji komórek. Autorzy wykazali, że komórki gwiaździaka inkubowane z badanymi diterpenoidami wydzielają nieznany czynnik neurotroficzny, powodujący różnicowanie się komórek PC12, jednak same skabroniny nie stymulują syntezy NGF w komórkach PC12. Zarówno skabronina A, jak i G nie wykazały cytotoksyczności w stosunku do komórek 1321N1 (26).

Ostatnio odkrytym źródłem diterpenoidów kjatanowych są dwa gatunki grzybów z rodzaju *Sarcodon* (sarniak) – *Sarcodon cyrneus* i *S. glaucopus.* Należy podkreślić, że cyrneiny A (1-hydroksyallokjatyna B_2) i B pochodzące z *S. cyrneus* nie tylko stymulują rozwój nowych aksonów w komórkach PC12, ale również powodują ich wydłużanie. W badaniach Marcotullio nad mechanizmem działania diterpenoidów z *Sarcodon cyrneus* wykazał, że cyrneina A zwiększa aktywację czynników transkrypcyjnych aktywatora białka-1 (AP-1) i jądrowego czynnika κB. Jednocześnie udowodniono, że cyrneina A posiada zdolność indukowania rozwoju neurytów w mechani-

zmie zależnym od Rac-1 – małej GTP-azy z rodziny Rho, regulującej dynamikę aktyn. Obecność cyrneiny A w hodowli komórkowej prowadziła do translokacji aktyny, a następnie do akumulacji aktyny-F (fibrylarnej) w zakończeniach neurytów (30,34).

Inne diterpenoidy wyizolowane z *Sarcodon cyrneus* – cyrneina C, D i glaukopina C – nie wpływały znacząco na rozwój neurytów w komórkach PC12, zwiększały jednak ekspresję genu NGF w komórkach 1321N1. Najsilniejszym stymulatorem czynnika wzrostu nerwów okazała się cyrneina B, najsłabszym natomiast cyrneina D (31).

Analizując wpływ budowy cząsteczki erinacyny, skabroniny, czy cyrneiny na ich aktywność neuroprotekcyjną Marcotullio i wsp. założyli, że obecność układu dwóch wiązań podwójnych w pierścieniu sześcioczłonowym i związanych z nim grup hydroksylowej i aldehydowej w cząsteczce może być istotna zarówno dla aktywności w stosunku do komórek 1321N1, jak i PC12. Obecność grupy hydroksylowej przy atomie węgla C4 w cząsteczkach poszczególnych diterpenoidów kjatanowych bezpośrednio odpowiada za rozwój neurytów w komórkach PC12. Ekspresja genu NGF zależy natomiast od obecności grupy karboksymetylowej przy atomie węgla C9 i jakiekolwiek podstawniki w pierścieniu 5-członowym (np. grupy alkoholowe lub ketonowe) zlokalizowane poza podwójnym wiązaniem C3-C4 mogą przyczyniać się do obniżenia aktywności stymulującej syntezę NGF (31).

3.2. Działanie antybiotyczne

Podstawowym problemem związanym ze stosowaniem antybiotykoterapii jest rozwój oporności bakterii chorobotwórczych oraz wzrost zjadliwości szczepów wchodzących w skład prawidłowej mikroflory organizmu. Zjawisko to wymusza ciągłe poszukiwanie nowych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, do których zalicza się również diterpenoidy kjatanowe. Działanie przeciwbakteryjne niektórych diterpenoidów kjatanowych z uwzględnieniem stref zahamowania w metodzie krążkowej oraz minimalnego stężenia hamującego (MIC) w metodzie seryjnych rozcieńczeń zaprezentowano w tabeli 2.

Kawagishi dokonał porównania aktywności erinacyn A, C, J i K oraz diterpenoidu CJ-14,258 przeciwko metycylinoopornemu szczepowi *Staphylococcus aureus* (MRSA). Działania przeciwdrobnoustrojowego nie wykazała jedynie erinacyna J, której cząsteczka charakteryzuje się odmienną budową w stosunku do innych badanych związków. Należy zatem przypuszczać, że trójpierścieniowy szkielet aglikonu jest niezbędny do aktywności przeciwko MRSA (por. rys. 4) (17).

Tabela 2

Aktywność antybiotyczna diterpenoidów kjatanowych

Badany składnik	Drobnoustrój testowy (strefa zahamowania w mm)	MIC (nmol/ml)	Ilość na dysk	Literatura
1	2	3	4	5
mieszanina 7 składników („cyathin"): aldehyd 2,4,5-trihydroksy-benzoesowy, kjatyna A_3, kjatyna A_4, allokjatyna A_4, kjatyna B_3, kjatyna B_4, kjatyna C_5	*Mycobacterium rhodoerinchii* (25), *Streptomyces griseus* (19), *Aerobacter aerogenes* (2), *Agrobacterium tumefaciens* (31), *Bacillus pumilis* (5), *B. subtilis* (14), *Escherichia coli* (2), *Lactobacillus casei* (10), *Micrococcus aurantiacus* (14), *M. candidus* (15), *M. conglomeratus* (13), *M. cyaneus* (12), *M. denitrificans* (12), *M. flavus* (12), *M. freudenerichii* (9), *M. luteus* (11), *M. roseus* (14), *M. varians* (12), *Pediococcus cerevisiae* (7), *Proteus mirabilis* (3), *Pseudomonas denitrificans* (14), *Serratia* sp. (5), *Streptococcus faecalis* (8), *Clostridium welchii* (++), *Corynebacterium diphteriae* (++), *Diplococcus pneumoniae* (+), *Haemophilus parainfluenzae* (+), *Neisseria meningitidis* (+), *Pneumococcus multocida* (+++), *Proteus* sp. (-), *Pseudomonas* sp. (-), *Salmonella enteritidis* (-), *S. thompsoni* (-), *Shigella sonnei* (-), *Staphylococcus aureus* (penicylino-oporny) (+++), *Streptococcus* sp. (-), *S. pyogenes* (+), *Aspergillus amstelodami* (3), *A. leporis* (++), *A. nidulans* (+), *A. niger* (3), *Candida krusei* (+), *Chaetomium* sp. (16), *Dipdascus* sp. (2), *Fusarium solani* (8), *Gliocladium aureus* (7), *Mucor genevensis* (+), *Penicillium claviforme* (++), *P. commune* (++), *P. digitatum* (7), *P. ducklauxii* (+++), *P. expansum* (+), *P. lilacianum* (4), *P. notatum* (6), *P. raistrickii* (+), *P. restrictum* (5), *P. roqueforti* (-), *Phoma* sp. (7), *Rhizopus* sp. (+), *Schizosaccharomyces octosporus* (2), *Rhodotorula* sp. (+), *Torulopsis* sp. (+), *Trichoderma* (7), *T. lignorum* (6), *Ustilago hordet* (+), *Zygosaccharomyces daperi* (+), *Arthroderma uncinatum* (+), *Microsporum canis* (9), *M. cookii* (5), *Trichophyton mentagrophytes* (4), *T. rubrum* (7), *T. terrestre* (9)	n.d.	480 μg	(3)
kjatatriol, 11,15-O,O-diacetylokjatatriol, 15-O-acetylokjatatriol, 11-O-acetylokjatatriol, allokjatyna B_2, kjatyna B_2	umiarkowana aktywność przeciwko *S. aureus*	b.d.	b.d.	(9)
allokjatyna B_2	*B. subtilis* (7, n.b., n.b.) *S. aureus* (9,5, 7,5, n.b.)	b.d.	35 μl r-ru 1%, 0,2%, 0,05%	(24)
sarkodonina L	*B. subtilis* (9,5, 7,5, 7), *S. aureus* (18, 12, 7,5)			

1	2	3	4	5
sarkodonina M	*B. subtilis* (14, 11, 8), *S. aureus* (22, 15, 9)			
sarkodonina G	*B. subtilis* (6,5, n.b., n.b.), *S. aureus* (7,5, 6,5, n.b.)			
sarkodonina A	*B. subtilis* (6,5, n.b., n.b.), *S. aureus* (7, n.b., n.b.)			
herikal (erinacyna P)	*Absidia glauca* (+) (12), *A. glauca* (–) (20), *Alternaria porri* (28), *Aspergillus ochraceus* (15), *Mucor miehei* (31), *Neurospora crassa* (17), *Penicillium notatum* (15), *S. cerevisiae* (12)	n.d.	100 μg	(12)
herikal (erinacyna P)	*E. coli* *Arthrobacter citreus* *Bacillus brevis* *B. subtilis* *Corynebacterium insidiosum* *Sarcina lutea* *Streptomyces spec.*	>200 20-40 4-10 10-20 20-40 20-40 40-100	n.d.	(12)
erinacyna A	*Bacillus subtilis* (3)	n.d.	b.d.	(38)
erinacyna B	*B. subtilis* (10), *Saccharomyces cerevisiae* (2), *Aspergillus niger* (4)			
erinacyna C	*Bacillus subtilis* (3)			
erinacyna A	MRSA	500	n.d.	(17)
erinacyna C		62,5		
erinacyna K		62,5		
CJ-14,258		500		

(–) – brak hamowania
(+) – strefa zahamowania trudna do określenia
(++), (+++) – relatywna wielkość strefy zahamowania
n.b. – nie badano
n.d. – nie dotyczy
b.d. – brak danych

Tabela 3

Aktywność antybiotyczna striatyn

Drobnoustrój testowy	**Wartość MIC (μg/ml) w metodzie seryjnych rozcieńczeń**		
	Striatyna A	**Striatyna B**	**Striatyna C**
1	2	3	4
Arthrobacter citreus	2~5	5~10	2~5
Bacillus brevis	6	6	6
Bacillus subtilis	0,2~2	2~20	0,2~2
Escherichia coli K12	>20	>20	>20
Leuconostoc mesenteroides	10~15	15~20	15~20
Mycobacterium phlei	2~20	2~20	2~20
Nocardia brasiliensis	2~20	2~20	2~20

1	2	3	4
Proteus vulgaris	0,2~2	0,2~2	0,2~2
Pseudomonas fluorescens	>20	>20	>20
Sarcina lutea	10~15	10~15	10~15
Staphylococcus aureus	2~5	5~10	2~5
Streptomyces viridochromogenes	2~20	2~20	2~20
Saccharomyces cerevisiae	>20	>20	>20
Rhodotorula rubra	>20	>20	>20
	Strefa zahamowania (mm), ilość testowanej substancji 20 i 100 μg na krążek (odpowiednio)		
Clostridium pasteurianum	12; n.b.	9; n.b.	10; n.b.
Aspergillus panamensis	14; 17	n.b.; 14	10; 22
Penicillium notatum	13; 16	14; 21	17; 24
Fusarium cubense	10; 20	8; 12	7; 12

n.b. – nie badano

3.3. Działanie przeciwzapalne

Test hamowania miejscowego stanu zapalnego ucha u myszy, wywołanego toksycznym estrem forbolu (TPA) jest jedną z metod poszukiwania nowych substancji o działaniu przeciwzapalnym. W badaniach Hiroty i Kamo opartych na tej metodzie ujawniono, że diterpenoidy kjatanowe wyizolowane z owocników grzyba *Sarcodon scabrosus* działają silnie przeciwzapalnie. Podobne działanie wykazują związki pozyskiwane z *S. glaucopus* (tab. 4) (27-29).

Tabela 4

Działałanie przeciwzapalne diterpenoidów kjatanowych

Badany składnik	Dawka (μg lub μmol)	Efekt hamujący [%]	Literatura
sarkodonina A	200* (0,63)**	75 ± 0,74	(27)
sarkodonina G	200 (0,63)	84 ± 0,58	
neosarkodonina A	200 (0,57)	49 ± 1,06	
neosarkodonina B	200 (0,57)	64 ± 0,55	
neosarkodonina C	200 (0,53)	87 ± 0,56	
neosarkodonina O	(0,63)	36	(28)
19-O-linolosarkodonina A	(0,63)	61	
19-O-oleilosarkodonina A	(0,63)	46	
19-O-stearylosarkodonina A	(0,63)	72	
indometacyna (próba odniesienia)	200 (0,56)	16 ± 0,77	(27)
kwas glicyryzynowy (próba odniesienia)	200 (0,42)	24 ± 1,18	
glaukopina A	1 μmol/cm²	62	(29)
glaukopina B	1 μmol/cm²	55	
indometacyna (próba odniesienia)	0,3 μmol/cm²	61	

* stężenie podane w μg

** stężenie podane w μmol

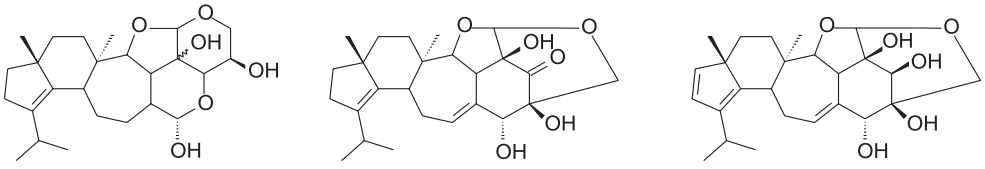
3.4. Działanie przeciwbólowe

Podstawową metodą zwalczania bólu, zwłaszcza bólu głębokiego jest stosowanie narkotycznych leków przeciwbólowych (opioidów), których głównym przedstawicielem jest morfina. Substancje te działają agonistycznie (pobudzająco) w stosunku do receptorów opioidowych zlokalizowanych w obrębie centralnego i obwodowego układu nerwowego. Punktem uchwytu wszystkich opioidowych środków przeciwbólowych stosowanych obecnie w lecznictwie jest receptor opioidowy μ, którego połączenie z agonistą wywołuje w organizmie szereg działań niepożądanych, takich jak tolerancja, zależność lub depresja oddechowa. W ostatnich latach stwierdzono, że receptory opioidowe κ występują w zakończeniach obwodowych głównych neuronów dośrodkowych, a ich aktywacja zmniejsza hiperalgezję u szczurów. Na podstawie tych obserwacji sugeruje się, że agoniści receptora κ mogą wykazywać aktywność antynocyceptywną (przeciwbólową). Substancje te działają również neuroprotekcyjnie w stanie hipoksji i niedokrwienia mózgu, dlatego pomimo działań niepożądanych związanych z pobudzaniem receptora κ stały się celem badań w ostatnich latach.

Erinacyna E wyizolowana początkowo z *Hericium erinaceum* produkowana jest także przez grzybnię *H. ramosum*. Saito i wsp. stwierdzili, że oprócz działania pobudzającego syntezę NGF związek ten wykazuje również aktywność stymulującą receptor opioidowy κ. W celu uzyskania nowych związków o działaniu agonistycznym w stosunku do tego receptora, autorzy przeprowadzili hodowlę *H. ramosum* na 104 różnych pożywkach oraz biotransformację erinacyny E. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskali trzy nowe analogi erinacyny E, z których dwa – CJ-14,258 i CJ-15,544 wyizolowali z *H. ramosum*, a jeden – CP-412,065 uzyskali w wyniku biotransformacji erinacyny E przy użyciu *Caldariomyces fumago* (rys. 11).

Badanie wiązania receptora opioidowego κ przez uzyskane diterpenoidy kjatanowe przeprowadzono z zastosowaniem znakowanych izotopowo ligandów na frakcji receptorów uzyskanej z opon mózgowych świnek morskich. Stwierdzono, że erinacyna E i jej trzy analogi wykazują działanie agonistyczne, wiążąc się z receptorami opioidowymi κ. Nalokson, który jest nieselektywnym antagonistą receptora opioidowego hamował wiązanie się badanych składników z receptorami opioidowymi. Wykazano, że spośród badanych diterpenoidów erinacyna E jest najsilniejszym, a zarazem selektywnym inhibitorem wiązania znakowanego liganda z receptorem κ.

W badaniu kurczliwości króliczych nasieniowodów stwierdzono, że erinacyna E tłumi zależnie od dawki skurcz nasieniowodu wywołany stymulacją elektryczną. Norbinaltorphimina, znany selektywny antagonista receptora κ, odwracała tłumienie powodowane przez erinacynę E, co wskazywało, że erinacyna E jest selektywnym agonistą receptora κ. Po usunięciu wszystkich składników z powierzchni króliczego nasieniowodu jego napięcie wracało do początkowej wartości, co oznacza, że erinacyna E nie wykazuje znaczącej toksyczności w stosunku do tkanki (35).



Rys. 11. Budowa analogów erinacyny E.

4. Warunki hodowli i podłoża stosowane w hodowli grzybów syntetyzujących diterpenoidy kjatanowe

Prowadzenie hodowli grzybni w celu uzyskania metabolitów wtórnych wymaga stosowania odpowiedniego doboru składu pożywki i warunków bioprocesu. Próby określenia optymalnych parametrów biosyntezy diterpenoidów kjatanowych podjęli się jedynie Johri i Brodie, których materiałem badawczym była grzybnia *Cyathus helenae*. Badając dynamikę produkcji metabolitów wtórnych *C. helenae* autorzy ci zanotowali pięciokrotny przyrost produkcji kjatyn w hodowli statycznej w stosunku do ich stężenia w hodowli wstrząsanej.

W przypadku pozyskiwania produktów wtórnego metabolizmu istotną rolę odgrywa odpowiednio długi czas prowadzenia hodowli. Kjatyny osiągały najwyższe stężenia w hodowli statycznej i wstrząsanej odpowiednio w 30. i 25. dniu hodowli.

Wykazano, że najlepszym źródłem węgla do produkcji kjatyn jest skrobia. Dobrym źródłem węgla okazała się również glukoza, której wyższe stężenie w podłożu powodowało 2,5-krotne zwiększenie produkcji diterpenoidów, nie wpływało jednak istotnie na wzrost grzybni.

Azotan i siarczan amonu okazały się słabymi źródłami azotu do produkcji diterpenoidów w przeciwieństwie do azotanów sodu i wapnia. Azotan potasu spowodował zahamowanie produkcji kjatyn bez wpływu na wzrost biomasy. Dodatek do podłoża peptonu, wyciągu drożdżowego lub namoku kukurydzianego nie wpłynął na zwiększenie produkcji kjatyn.

Obecność w hodowli statycznej soli cynku w stężeniu 0,25 ppm zwiększała produkcję kjatyn o 60%, jednak dalsza suplementacja tym metalem spowodowała zmniejszenie produkcji metabolitów wtórnych. Jony miedzi i żelaza działały hamująco, podczas gdy jony manganu nie miały wpływu na przyrost ilości kjatyn. Spośród testowanych siedmiu witamin jedynie ryboflawina spowodowała zwiększenie biosyntezy diterpenoidów. Najlepszy odczyn pH podłoża dla produkcji kjatyn mieścił się w zakresie 4,5-5,5 (tab. 5) (36).

Tabela 5

Podłoża stosowane w hodowli głębinowej grzybów produkujących diterpenoidy kjatanowe

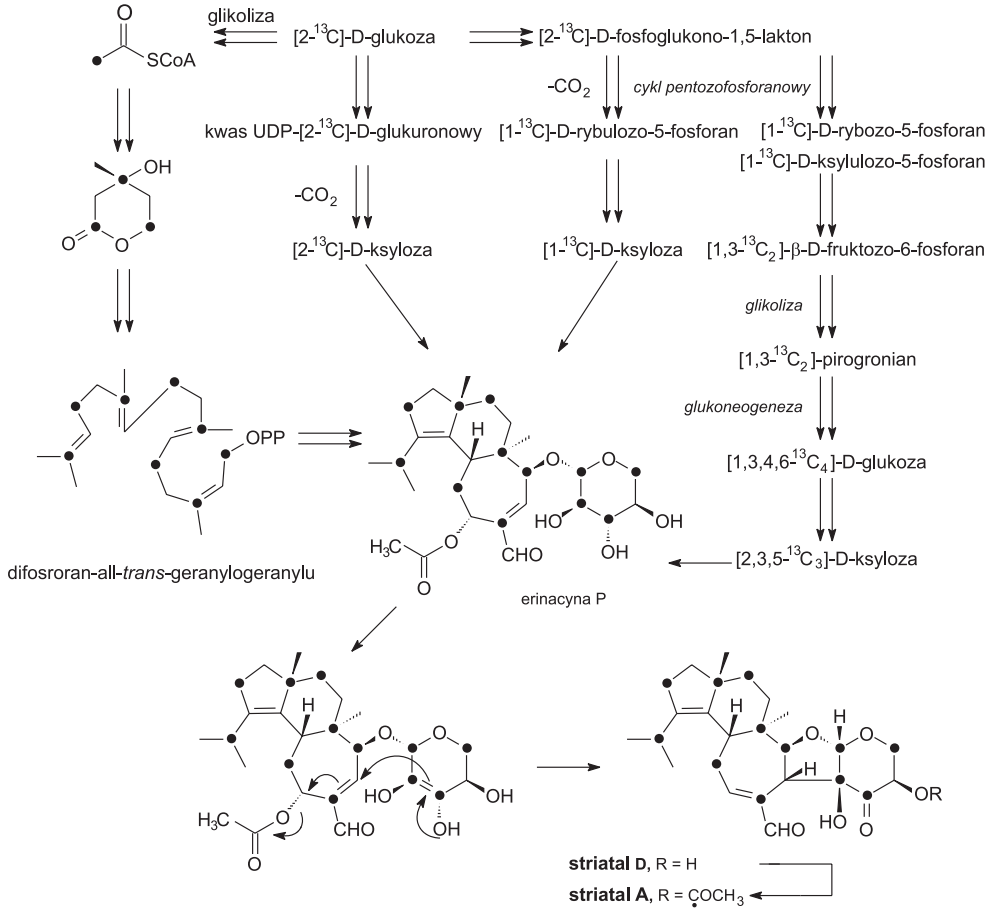
Gatunek grzyba	Skład pożywki [g/l]	Wyizolowany produkt wtórnego metabolizmu	Temp. hodowli [°C]	Czas hodowli [dni]	Literatura
1	2	3	4	5	6
Cyathus helenae	glukoza 30,0; asparagina 1,5; KH_2PO_4 1,0; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$ 250 μg; tiaminy HCl 150 μg	kjatyna A_3, kjatyna A_4, allokjatyna A_4, kjatyna B_3, kjatyna B_4, kjatyna C_5	22-25	22-25	(3)
C. helenae	jw.	allokjatyna B_3	22-25	22-25	(4)
C. helenae	jw.	allokjatyna B_3, kjatyna A_3, neoallokjatyna A_4, kjatyna A_4, kjatyna C_5	22-25	22-25	(7)
C. africanus	jw.	kjatyna A_3, allokjatyna B_3, kjafryna A_4, kjafryna B_4, allokjafryna B_4, kjafryna A_5	b.d.	b.d.	(8)
C. earlei	jw.	kjatatriol, 11,15-O,O-diacetylokjatatriol, 15-O-acetylokjatatriol, 11-O-acetylokjatatriol, allokjatyna B_2, kjatyna B_2	pokojowa	65	(9)
Cyathus striatus	ekstrakt drożdżowy 4,0; glukoza 4,0; ekstrakt słodowy 10,0	striatyna A, striatyna B, striatyna C	22	6-8	(10)
C. striatus	jw.	striatal A	25	10	(12)
Hericium ramosum	maltoza 20,0; glukoza 10,0; pepton 2,0; ekstrakt drożdżowy 0,2; KH_2PO_4 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0; $FeCl_3$ 0,01; $ZnSO_4$ 0,001; $CaCl_2$ 0,068; witaminy [μg/ml]: tiaminy HCl 50; biotyna 1; kwas foliowy 100; mio-inozytol 50	herikal (erinacyna P)	23	b.d.	(12)
H. abietes	jw.	herikal (erinacyna P)	22	b.d.	(12)
H. erinaceum	b.d.	erinacyny A-C	30	28	(13)
H. erinaceum	b.d.	erinacyny D-G	b.d.	b.d.	(15,16)

1	2	3	4	5	6
H. ramosum	glukoza 20,0; ekstrakt słodowy 20,0; wyciąg drożdżowy 1,8; maltoza 2,4; otręby pszenne 20,0; pH 5,4-5,6	erinacyna E	28	14	(35)
H. ramosum	glukoza 10,0; glicerol 30,0; pepton 5,0; NaCl 2,0; agar 1,0; otręby pszenne 20,0; pH 7	CJ-14,258	28	14	(35)
H. ramosum	jw.	CJ-15,544	jw.	jw.	(35)
H. erinaceum	b.d.	erinacyna I, erinacyna H	30	28	(16)
H. erinaceum	glukoza 50,0; pepton 5,0; Pharmamedia 10,0; NaCl 5,0	erinacyny A-C, erinacyna P	25	18	(18)
H. erinaceum	b.d.	kjata-3,12-dien, kjata-3(18),12-dien	b.d.	b.d.	(19)
H. erinaceum	glukoza 50,0; pepton 5,0; Pharmamedia 10,0; NaCl 5,0	erinacyny A-C, erinacyna P, erinacyna Q	25	20	(20)
H. erinaceum	jw.	erinakol (kjata-3,12-dien--14β-ol), 11-O-acetylokjatyna A_3	25	15	(21)
H. erinaceum	jw.	11-O-acetylokjatatriol i 15-O-acetylokjatatriol	b.d.	11	(21)
H. erinaceum	glukoza 40,0; polipepton 3,0; ekstrakt drożdżowy 3,0; KH_2PO_4 0,5; Na_2HPO_4 0,5; pH 5,5	erinacyna J, erinacyna K, CJ-14,258	25	30	(17)

5. Biosynteza diterpenoidów kjatanowych

Znajomość dróg biosyntezy metabolitów wtórnych jest istotnym czynnikiem optymalizacji procesu biosyntezy, ma także znaczenie w procesach biotransformacji przeprowadzanych przez mikroorganizmy. Zastosowanie izotopów radioaktywnych pozwala nie tylko na wyjaśnienie niektórych etapów biosyntezy, ale również na otrzymanie radioaktywnych metabolitów, które następnie mogą być użyte w badaniach farmakologicznych i metabolicznych.

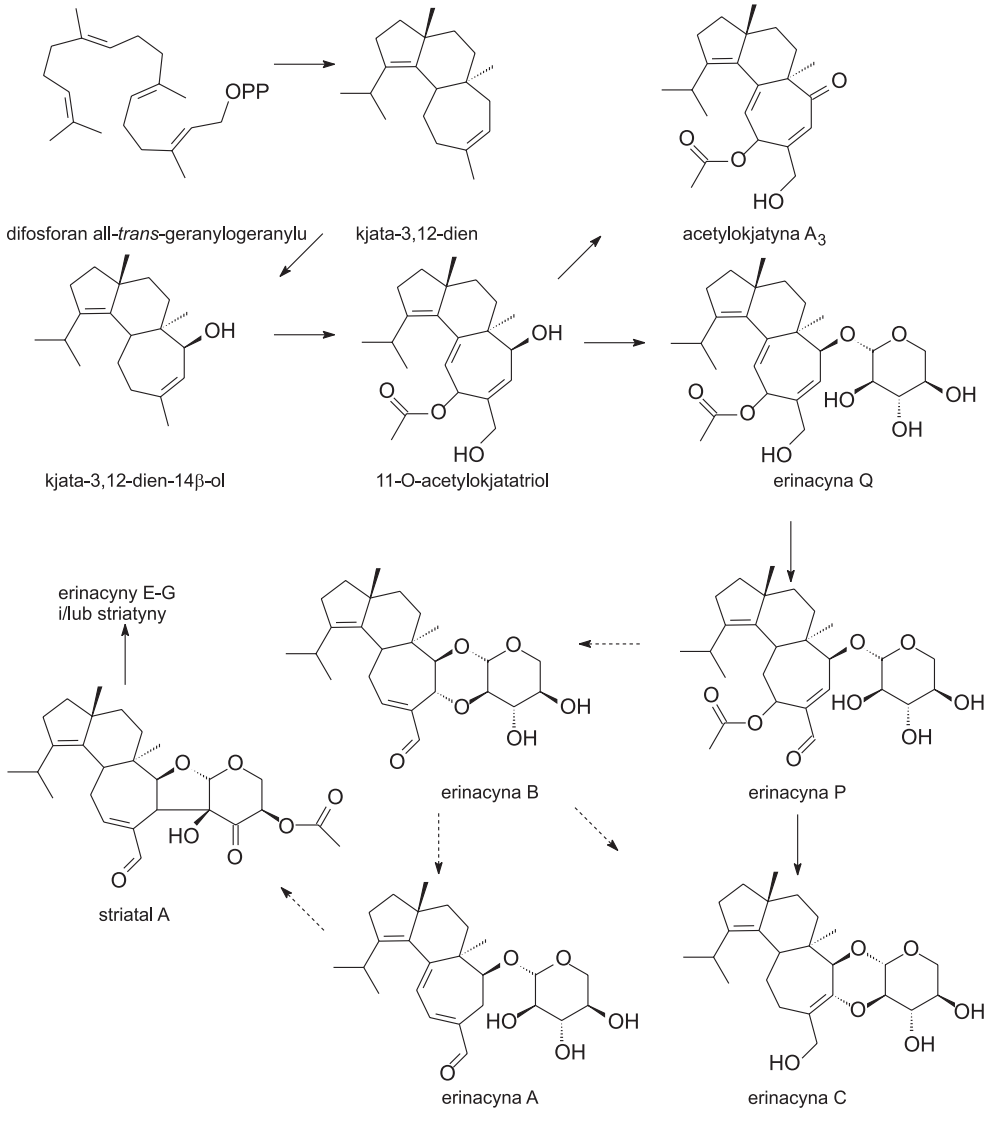
Anke i wsp. w eksperymencie polegającym na hodowli grzybni *Cyathus striatus* z dodatkiem znakowanej [1-^{13}C]- oraz [2-^{13}C]-D-glukozy badali biosyntezę układu kjatanowego. Autorzy stwierdzili, że znakowana glukoza przekształcana jest do [1-^{13}C]- oraz [2-^{13}C]-octanu, który następnie tworzy układ diterpenowy poprzez



Rys. 12. Schemat biosyntezy diterpenoidów kjatanowych wg Anke (12).

[2,4,6-$^{13}C_3$]- lub [1,3,5-$^{13}C_3$]-mewalonian. Dystrybucja znakowanych atomów węgla w szkielecie kjatanowym nastąpiła zgodnie z mechanizmem biosyntezy postulowanym przez Ayera. Autorzy stwierdzili również, że herikal (erinacyna P) pełni podstawową rolę w biosyntezie układu striatalu (rys. 12) (12,37).

Kenmoku i wsp. w serii eksperymentów przeprowadzonych w latach 2000-2004 nad powstawaniem erinacyn w grzybni *Hericium erinaceum* wykazali, że erinacyna Q stanowi bezpośredni substrat do biosyntezy erinacyny P. Z kolei erinacyna P jest macierzystym prekursorem innych ważnych erinacyn oraz striatyn. Kenmoku wyizolował także kjata-3,12-dien, macierzysty diterpen – którego istnienie postulował Ayer – i potwierdził jego enzymatyczne powstawanie w grzybni z all-*trans*-geranylogeranylu. Udowodniono również, że 15-O-acetylokjatatriol wyizolowany wcześniej z *Cyathus earlei* jest artefaktem powstającym podczas przygotowania wyciągu metanolowego (rys. 13) (18-21).



Rys. 13. Schemat biosyntezy erinacyn.

6. Podsumowanie

Praca ta stanowi przegląd budowy, biosyntezy oraz właściwości pozyskiwanych z grzybów diterpenoidów kjatanowych, cieszących się w ostatnich latach znacznym zainteresowaniem z uwagi na unikatowe właściwości neurotropowe. Niska skuteczność leczenia chorób neurodegeneracyjnych i ich zapobiegania stawia nowe wyzwania dla wielu gałęzi nauk przyrodniczych, w tym biotechnologii. Możliwość przenie-

sienia komórek dziko żyjących grzybów do sztucznie stworzonego środowiska laboratoryjnego daje szansę poznania podstawowych szlaków metabolizmu diterpenoidów kjatanowych. Optymalizacja warunków hodowli pozwala oddziaływać na przebieg biosyntezy w sposób umożliwiający pozyskiwanie znacznych ilości biomasy o wymaganym składzie. Pełne poznanie diterpenoidów kjatanowych, zanim trafią one do lecznictwa, wymaga jednak dalszych badań zarówno na poziomie biosyntezy tych związków, jak i ich działania farmakologicznego.

Stosowane skróty: AP-1 – aktywator białka-1 (ang. *activator protein 1*), b.d. – brak danych, BDNF – mózgowy czynnik wzrostu nerwów (ang. *brain derived neurotrophic factor*), DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (ang. *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*), GDNF – glejowy czynnik wzrostu nerwów (ang. *glial cell line derived neurotrophic factor*), HVA – kwas homowanilinowy (ang. *homovanilic acid*), IL-6 – interleukina 6, LC – miejsce sinawe (łac. *locus coeruleus*), MIC – minimalne stężenie hamujące (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*), mRNA – matrycowy/informacyjny RNA (ang. *messengerRNA*), MRSA – szczep gronkowca złocistego oporny na metycylinę (ang. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), n.b. – nie badano, n.d. – nie dotyczy, NT-3 – neurotropina-3, NGF – czynnik wzrostu nerwów (ang. *Nerve Growth Factor*), ppm – jednostka stężenia wynosząca $10^{-4\%}$ (ang. *parts per million*), TPA – 12-O-tetradekanoilo-13-acetylo-forbol (ang. *tetradecanoylphorbol acetate*).

Literatura

1. Ayer W. A., Browne L. M., (1981), Tetrahedron, 37, 2199-2248.
2. Savile D. B. O., (1989), Mycologia, 81, 6, 832-836.
3. Allbutt A. D., Ayer W. A., Brodie H. J., Johri B. N., Taube H., (1971), Can. J. Microbiol., 17, 1401--1407.
4. Ayer W. A., Taube H., (1972), Tetrahedron Lett., 19, 1917-1920.
5. Ayer W. A., Taube H., (1973), Can. J. Chem., 51, 3842.
6. Ayer W. A., Carstens L. L., (1973), Can. J. Chem., 51, 3157.
7. Ayer W. A., Browne L. M., Mercer J. R., Taylor D., Ward D., (1978), Can. J. Chem., 56, 717-721.
8. Ayer W. A., Yoshida T., van Schie D. M. J, (1978), Can. J. Chem., 56, 2113-2120.
9. Ayer W. A., Lee S. P., (1979), Can. J. Chem., 57, 3332-3337.
10. Anke T., Oberwinkler F., Steglich W., Hoefle G., (1977), J. Antibiot., 30, 3, 221-225.
11. Hecht H. J., Hoefle G., Steglich W., Anke T., Oberwinkler F., (1978), J. C. S. Chem. Comm., 665-666.
12. Anke T., Rabe U., Schu P., Eizenhoefer T., Scharge M., Steglich W., (2002), Z. Naturforsch., 57c, 263-271.
13. Kawagishi H., Shimada A., Shirai R., Okamoto K., Ojima F., Sakamoto H., (1994), Tetrahedron Lett., 35, 10, 1569-1572.
14. Kawagishi H., Shimada A., Shizuki K., Mori H., Okamoto K., Sakamoto H., (1996), Heterocycl. Commun., 2, 1, 51-54.
15. Kawagishi H., Shimada A., Hosokawa S., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., (1996), Tetrahedron Lett., 37, 41, 7399-7402.
16. Lee E.W., Shizuki K., Hosokawa S., Suzuki M., Sudanuma H., Inakuma T., (2000), Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 11, 2402-2405.
17. Kawagishi H., Masui A., Tukuyama S., Nakamura T., (2006), Tetrahedron, 62, 8463-8466.
18. Kenmoku H., Sassa T., Kato N., (2000), Tetrahedron Lett., 41, 4389-4393.

19. Kenmoku H., Kato N., Shimada N., Omoto M., Mori A., Mitsuhashi W., (2001), Tetrahedron Lett., 42, 7439-7442.
20. Kenmoku H., Shimai T., Toyomasu T., Kato N., Sassa T., (2002), Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 3, 571-575.
21. Kenmoku H., Tanaka K., Okada K., Kato N., Sassa T., (2004), Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 8, 1786-1789.
22. Shibata H., Tokunaga T., Karasawa D., Hirota A., Nakayama M., Nozaki H., (1989), Agric. Biol. Chem., 53, 12, 3373-3375.
23. Ohta T., Kita T., Kobayashi N., Obara Y., Nakahata N., Ohizumi Y., (1998), Tetrahedron Lett., 39, 6229-6232.
24. Shibata H., Irie A., Morita Y., (1998), Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 12, 2450-2452.
25. Kita T., Takaya Y., Oshima Y., Ohta T., Aizawa K., Hirano T., (1998), Tetrahedron, 54, 11877-11886.
26. Obara Y., Nakahata N., Kita T., Takaya Y., Kobayashi H., Hosoi S., (1999), Eur. J. Pharmacol., 370, 79-84.
27. Hirota M., Morimura K., Shibata H., (2002), Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 1, 179-184.
28. Kamo T., Imura Y., Hagio T., Makabe H., Shibata H., Hirota M., (2004), Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 6, 1362-1365.
29. Curini M., Maltese F., Marcotullio M. C., Menghini L., Pagiotti R., Rosati O., (2005), Planta Med., 71, 194-196.
30. Marcotullio M. C., Pagiotti R., Maltese F., Obara Y., Hoshino T., Nakahata N., (2006), Planta Med., 72, 819-823.
31. Marcotullio M. C., Pagiotti R., Maltese F., Mwankie G. N. O., Hoshino T., Obara Y., (2007), Bioorg. Med. Chem., 15, 2878-2882.
32. Obara Y., Kobayashi H., Ohta T., Ohizumi Y., Nakahata N., (2001), Mol. Pharmacol., 59, 1287-1297.
33. Shimbo M., Kawagishi H., Yokogoshi H., (2005), Nutr. Res., 25, 617-623.
34. Obara Y., Hoshino T., Marcotullio M. C., Pagiotti R., Nakahata N., (2007), Life Sci., 80, 1669-1677.
35. Saito T., Aoki F., Hirai H., Inagaki T., Matsunaga Y., Sakakibara T., (1998), J. Antibiot., 51, 11, 983-990.
36. Johri B. N., Brodie H. J., (1971), Can. J. Microbiol., 17, 1243-1245.
37. Ayer W. A., Lee S. P., Nakashima T. T., (1979), Can. J. Chem., 57, 3338-3343.
38. Kawagishi H., Ojima F., Okamoto K, Sakamoto H., Ishiguro Y., (1996), United States Patent 5,565,436.