

# Biljni sekundarni metaboliti kao model za razvoj lijekova

---

**Kufrin, Vida**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:782817>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**BILJNI SEKUNDARNI METABOLITI KAO MODEL ZA RAZVOJ LIJEKOVA**  
**PLANT SECONDARY METABOLITES AS A MODEL FOR DRUG DEVELOPMENT**

**SEMINARSKI RAD**

Vida Kufrin

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Šola

Zagreb, 2018.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI KORIŠTENI KAO LIJEKOVI U IZVORNOM OBLIKU 2	
2.1. GALANTAMIN .....	3
2.2. VINBLASTIN I VINKRISTIN .....	4
2.3. KININ.....	5
3. SEMI-SINTETSKI LIJEKOVI RAZVIJENI IZ BILJNIH SEKUNDARNIH METABOLITA .....	6
3.1. PAKLITAKSEL.....	7
3.2. NITIZINON.....	8
3.3. OSELTAMIVIR FOSFAT .....	11
4. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI KAO FARMAKOLOŠKI I BIOKEMIJSKI ALATI .....	12
4.1. GENISTEIN .....	13
4.2. KVERCETIN .....	14
4.3. FORSKOLIN.....	17
5. ZAKLJUČAK .....	18
6. LITERATURA .....	19
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY .....	23

## 1. UVOD

Sekundarni (specijalizirani) biljni metaboliti su tvari koje biljke sintetiziraju sekundarnim reakcijama iz primarnih metabolita. Sekundarni metaboliti nisu esencijalni za život same biljke jer ne sudjeluju u njenom rastu i razvoju, ali sudjeluju u interakcijama biljke i okoliša te mogu imati ekološku ulogu, kao što je zaštita od kukaca i privlačenje istih.

S obzirom na biosintetske puteve kojima nastaju, sekundarne metabolite možemo razvrstati u tri skupine: terpene, fenolne spojeve i alkaloide. Terpeni su lipidne molekule čiji su prekursori izopentenil-difosfat ili dimetil-alil-difosfat koji nastaju u dva biosintetska puta: u citosolu mevalonatnim putem (prekursor je acetil-CoA) te metil-eritriol-fosfatnim putem u plastidima (prekursori su piruvat ili gliceraldehid-3-fosfat). Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu, a nastaju uglavnom u putu šikimata pretvorbom jednostavnih ugljikohidrata u aromatske aminokiseline koje se dalje derivatiziraju do fenolnih spojeva. Alkaloidi nastaju iz aromatskih te nekih alifatskih aminokiselina, a sadrže jedan ili više atoma dušika kao dio heterocikličkog prstena (Pevalek-Kozlina, 2003).

Čovjek biljne sekundarne metabolite koristi kao polimere, boje, ljepila, mirise te lijekove. Najraniji zapis o korištenju biljaka u medicinske svrhe bio je 2 600 godina prije Krista u Mezopotamiji gdje su ljudi kašalj liječili uljem običnog čempresa (*Cupressus sempervirens*). Farmaceutska industrija bazirana je na znanstveno utemeljenoj upotrebi biljaka i njihovih ekstrakata. Sekundarni metaboliti izolirani iz biljaka danas se mogu direktno koristiti kao lijekovi, mogu se koristiti kao prototip za sintezu novih - sintetskih lijekova, te se koriste kao farmakološki i biokemijski alati za otkrivanje molekularnih mehanizama nekih bolesti. Istraživanja biljnih sekundarnih metabolita trenutno su intenzivna zbog pretpostavke da je do danas u farmakološke svrhe testirano svega 10% od ukupnog broja identificiranih biljnih sekundarnih metabolita (Dias i sur., 2012).

## 2. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI KORIŠTENI KAO LIJEKOVI U IZVORNOM OBLIKU

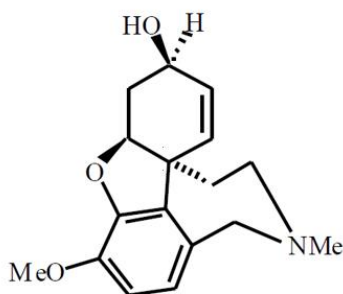
Usprkos napretku kemijske i farmaceutske industrije u sintezi novih lijekova, medicinski važne biljke i dalje imaju nezamjenjivu ulogu u zdravstvenoj zaštiti zato što određeni spojevi iz biljaka mogu biti izolirani i pročišćeni na jednostavan način te se direktno mogu koristiti za razvoj lijekova. Lijekovi proizvedeni bez konverzije sekundarnih biljnih metabolita upotrebljavaju se za liječenje različitih medicinskih stanja.

U liječenju kardiovaskularnih bolesti važan je kinidin, izoliran iz biljaka roda *Cinchona*, koji se koristi kao antiaritmik jer produljuje trajanje akcijskog potencijala djelujući na ionske kanale u srcu (Inama i sur., 2010). Na središnji živčani sustav djeluju nikotin iz vrste *Nicotiana tabacum* koji djeluje na nikotinske acetilkolin receptore, morfin i kodein izolirani iz opijuma maka (*Papaver somniferum*) koji se koriste kao analgetici, te galantamin iz vrste *Galanthus woronowii* koji djeluje na nikotinske acetilkolin receptore te se koristi u liječenju Alzheimerove bolesti. U liječenju tumora dojke i jajnika važan je paklitaksel iz vrste *Taxus brevifolia*, dok se vinblastin i vinkristin iz vrste *Catharanthus roseus* upotrebljavaju u liječenju raznih oblika leukemije. Kao antiparazitici, posebno u liječenju malarije, koriste se kinin iz vrste *Cinchona sp.* i artemizinin izoliran iz slatkog pelina (*Artemisia annua*) (Pan i sur., 2009).

## 2.1. GALANTAMIN

Galantamin (Slika 1) je alkaloid prvi puta izoliran iz voronove visibabe (*Galanthus woronowii*, porodica Amaryllidaceae) u ranim 50-im godinama prošlog stoljeća kada se koristio za liječenje glavobolja i poliomijelitisa, a testiran je i za upotrebe u anesteziologiji. Kasnije je izoliran i iz drugih vrsta ove porodice. Danas se koristi u liječenju ranih faza Alzheimerove bolesti koja je kronična i neurodegenerativna. Korištenjem galantamina usporava se progresija bolesti – smanjuje se razgradnja acetilkolina čime se kompenzira nedostatak istog zbog odumiranja živčanih stanica koje ga proizvode. Galantamin je selektivan, reverzibilan i kompetitivan inhibitor acetilkolinesteraze, enzima koji razgrađuje acetilkolin na acetat i kolin (Marco i Carreiras, 2006). Također, galantamin je pozitivan alosterički modulator nikotinskih acetilkolin receptora čime se omogućava povećano otpuštanje acetilkolina iz presinaptičke pukotine (Nikiforuk i sur., 2015).

Istraživanje provedeno na 75 ljudi koji pate od Alzheimerove bolesti u ranoj fazi, uz terapiju u trajanju od 36 mjeseci sa povećanjem doze galantamina, pokazalo je da su se ponašanje i pamćenje poboljšali tijekom prvih 12 mjeseci terapije. Nakon 36 mjeseci primijećeno je pogoršanje pamćenja, međutim i dalje na boljoj razini u usporedbi s pacijentima koji nisu primali terapiju (Richarz i sur., 2014).



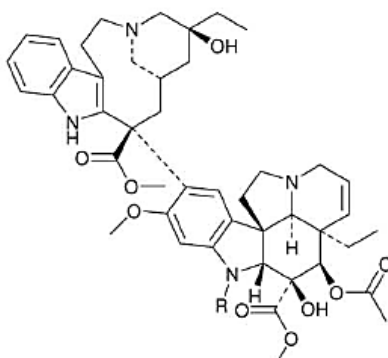
**Slika 1.** Strukturna formula galantamina.

(Izvor: Marco i Carreiras, 2006)

## 2.2. VINBLASTIN I VINKRISTIN

Potruga za antitumorskim supstancama iz biljaka počela je 1950-ih otkrićem vinka alkaloida – vinblastina (VLB) i vinkristina (VCR). VLB i VCR (Slika 2) su strukturno slične molekule - dimeri indol-dihidroindola. Ovi spojevi izolirani su iz vinke (*Catharanthus roseus* ili *Vinca rosea*) (Pan i sur., 2009). Prije 1950-ih korišteni su za liječenje dijabetesa, a istraživanjem na štakorima pokazano je da VLB i VCR smanjuju broj leukocita i reduciraju aktivnost koštane srži (Cragg i Newman, 2005). Danas su u upotrebi semi-sintetski analozi ovih spojeva – vinorelbin i vindezin koji se u kombinaciji s nekim drugim kemoterapeutcima koriste u liječenju različitih tipova leukemije, limfoma, raka testisa u uznapredovalom stanju i raka dojke (Pan i sur., 2009). Potreba za sintetskim i semi-sintetskim analogima proizlazi iz činjenice da je potrebno 500 kilograma osušenih listova vinke kako bi se izoliralo 1 gram VLB (Van Der Heijden i sur., 2004). Budući da je vinka izvorno endemska biljka s Madagaskara, danas se proučava biosinteza njenih alkaloida u staničnoj kulturi. Istražuje se genom vinke na razini transkriptoma kako bi se sintetiziralo analoge VLB i VCR što sličnije izvornom obliku (Dugé de Bernonville i sur., 2015).

Mehanizam djelovanja VLB i VCR zasniva se na inhibiciji mitoze tumorskih stanica u metafazi putem vezanja na mikrotubule (Pan i sur., 2009). Kako bi mikrotubuli bili stabilni i kako bi se diobeno vreteno pravilno formiralo potrebne su i longitudinalne i lateralne interakcije između susjednih molekula tubulina. Kristalografijom X-zraka pokazano je da se pri nižim koncentracijama VLB veže na rubove mikrotubula čime se narušavaju longitudinalne interakcije tubulina te se molekula izvija zbog nepovoljne steričke konformacije. Pri višim koncentracijama VLB narušavaju se i longitudinalne i lateralne interakcije između molekula tubulina što dovodi do depolimerizacije mikrotubula. Točan molekularni mehanizam djelovanja još nije u potpunosti objašnjen (Gigant i sur., 2005).



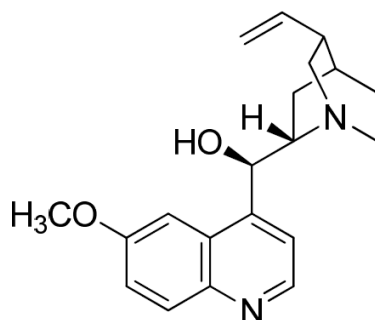
**Slika 2.** Strukturna formula vinblastina ( $R = CH_3$ ) i vinkristina ( $R = CHO$ ).  
(Izvor: Cragg i Newman, 2005)

### 2.3. KININ

Kinin (Slika 3) je alkaloid izoliran iz kore biljnih vrsta roda *Cinchona*. Kinin je prvi spoj koji je pokazao djelotvornost kod liječenja malarije izazvane parazitom *Plasmodium falciparum*. Malarija se kininom liječi od 17. stoljeća, međutim molekularni mehanizam djelovanja kinina i dalje je nepoznat. Pretpostavlja se da kinin inhibira hem-polimerazu domaćina (Pan i sur., 2009).

Početakom 20. stoljeća kinin je zamijenjen sintetskim analogom klorokinom, no zbog postepenog stvaranja rezistencije ponovno se počinje koristiti kinin, pogotovo za kasnije faze bolesti jer se rezistencija na kinin razvija puno sporije. Terapija samo kininom danas se ne preporuča jer izaziva niz nuspojava kao što su poremećaji vida, sluha i glavobolje te u težim slučajevima gubitak vida, sluha, povraćanje, astmu i poremećaje u radu jetre (Achan i sur., 2011). Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2010., za liječenje ranijih stadija malarije koristi se kombinacija kinina i antibiotika - tetraciklina ili doksiciklina ili klindamicina, no u Zapadnoj Africi, gdje je malarija najveći problem, kinin se i dalje ne koristi u propisanim kombinacijama (Achan i sur., 2011).

Danas se kinin koristi i za sprječavanje grčenja mišića. Studija na ljudima iz 2011. pokazala je da dnevna uporaba 200-500 mg kinina ili kinina u kombinaciji s nekim drugim tvarima kao što su teofilin i vitamin E reducira broj i intenzitet svih tipova grčeva (El-Tawil, 2011).



**Slika 3.** Strukturna formula kinina.  
(Izvor: Dias i sur., 2012)



### 3. SEMI-SINTETSKI LIJEKOV I RAZVIJENI IZ BILJNIH SEKUNDARNIH METABOLITA

Korištenje semi-sintetskih spojeva dobivenih iz sekundarnih biljnih metabolita u farmaceutskoj industriji počelo je krajem 19. stoljeća. Najpoznatiji primjer semi-sintetskog lijeka je aspirin dobiven iz acetilsalicilne kiseline. Potreba za sintetskom optimizacijom sekundarnih biljnih metabolita javila se zbog želje za poboljšanjem terapijskog djelovanja te eliminacijom nuspojava koje korištenje određenog lijeka izaziva. Također, cilj je povećati dostupnost određenog spoja, što može biti problem ako je spoj izoliran iz biljaka koje nisu široko rasprostranjene te ako iz biljke možemo izolirati željeni spoj u nedovoljnim koncentracijama. Semi-sintetski lijekovi na bazi sekundarnih biljnih metabolita imaju široku primjenu u svim aspektima zdravstva.

U liječenju tumora, pogotovo limfoma i leukemije, koristi se podofilotoksin izoliran iz smole vrste *Podophyllum peltatum* te vrste *Podophyllum hexandrum*. Zbog njegove toksičnosti razvijeni su spojevi poboljšanih farmakoloških karakteristika: etopozid i tenipozid. Mehanizam njihovog djelovanja temelji se na inhibiciji topoizomeraze II koja sudjeluje u replikaciji molekule DNA. Uz podofilotoksin u liječenju tumora efikasan je i paklitaksel koji se dobiva iz spoja 10-deacetylbatatina III izoliranog iz tise (*Taxus baccata*). Za razliku od podofilotoksina, paklitaksel inhibira mitozu tumorskih stanica djelujući na formiranje diobenog vretena. Za liječenje malarije razvijeni su lijekovi na bazi artemizinina izoliranog iz slatkog pelina (*Artemisia annua*) – artezunat i dihidroartemizinin jer su topivi u vodi i metabolički stabilniji od artemizinina. Nitizinon, dobiven iz leptospermona ekstrahiranog iz vrste *Callistemon citrinus*, koristi se u liječenju nasljedne bolesti tirozinemije tipa I jer inhibira važan enzim u katabolizmu tirozina - 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenazu. Oseltamivir fosfat, dobiven iz šikiminske kiseline, je inhibitor neuraminidaze te se koristi u liječenju i prevenciji gripe (Pan i sur., 2009).

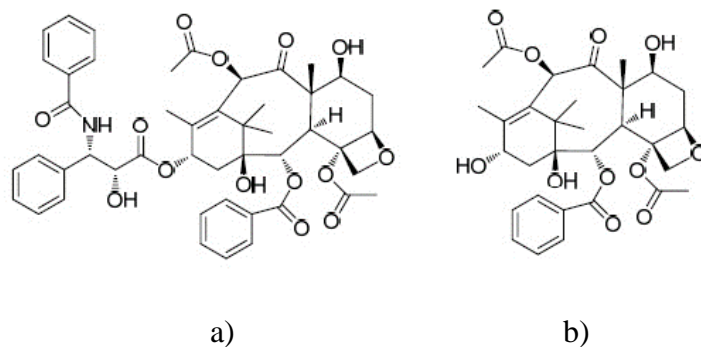
### 3.1. PAKLITAKSEL

Paklitaksel (Slika 4a) je diterpenski spoj antitumorskog djelovanja izoliran iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*). Koristi se u liječenju tumora kao sastavni dio kemoterapije. Budući da je pacifička tisa sporo rastuća biljka te je iz nje moguće ekstrahirati male količine paklitaksela koje ne mogu zadovoljiti potrebe tržišta, javila se potreba za sintetskom proizvodnjom paklitaksela. Prekursor u laboratorijskoj sintezi paklitaksela je 10-deacetil bakatin III (Slika 4b), spoj koji nije citotoksičan, a ekstrahiran je iz listova obične tise (*Taxus baccata*) u puno većim koncentracijama u usporedbi s prinosima paklitaksela ekstrahiranog iz pacifičke tise (Pan i sur., 2009).

Mehanizam djelovanja paklitaksela temelji se na inhibiciji mitoze tumorskih stanica djelovanjem na stabilizaciju mikrotubula. Nekovalentno se veže na molekule  $\beta$ -tubulina na jedno od tri specifična vezna mjesta kao što je Arg<sup>282</sup>. Takvim vezanjem paklitaksel jača lateralne veze među susjednim protofilamentima te stabilizacijom mikrotubula inhibira formiranje diobenog vretena u metafazi mitoze (Yang i Horwitz, 2017).

Budući da je paklitaksel hidrofoban, slabo je topiv u vodi te se mora otapati u etanolu što doprinosi većoj toksičnosti lijeka. Također, primijećeno je stvaranje rezistencije na djelovanje paklitaksela kod većeg broja pacijenata. Zbog tih razloga razvijaju se drugi lijekovi istog djelovanja. Jedan od njih je docetaksel koji se također dobiva iz 10-deacetilbakatina III. Docetaksel ima isti mehanizam djelovanja na mitozu tumorskih stanica, ali je manje hidrofoban i u istim koncentracijama djeluje na veći broj stanica (Seca i Pinto, 2018).

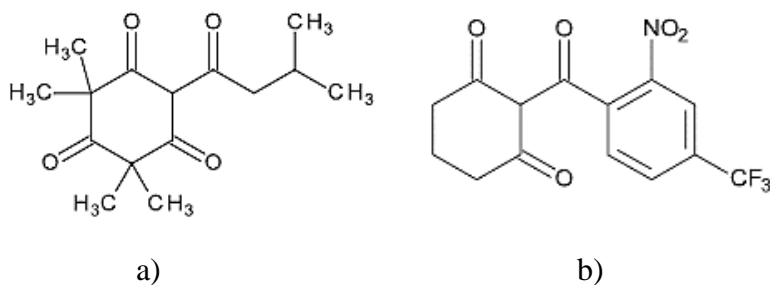
U liječenju tumora paklitaksel i docetaksel pokazali su najveću učinkovitost kod tumora jajnika, dojke i pluća, a danas se istražuje njihov potencijal u liječenju bolesti kao što su multipla skleroza, reumatoidni artritis te psorijaza (Cragg i Newman, 2005).



**Slika 4.** Strukturne formule paklitaksela (a) i 10-deacetilbakatina III (b).  
(Izvor: Dias i sur., 2012)

### 3.2. NITIZINON

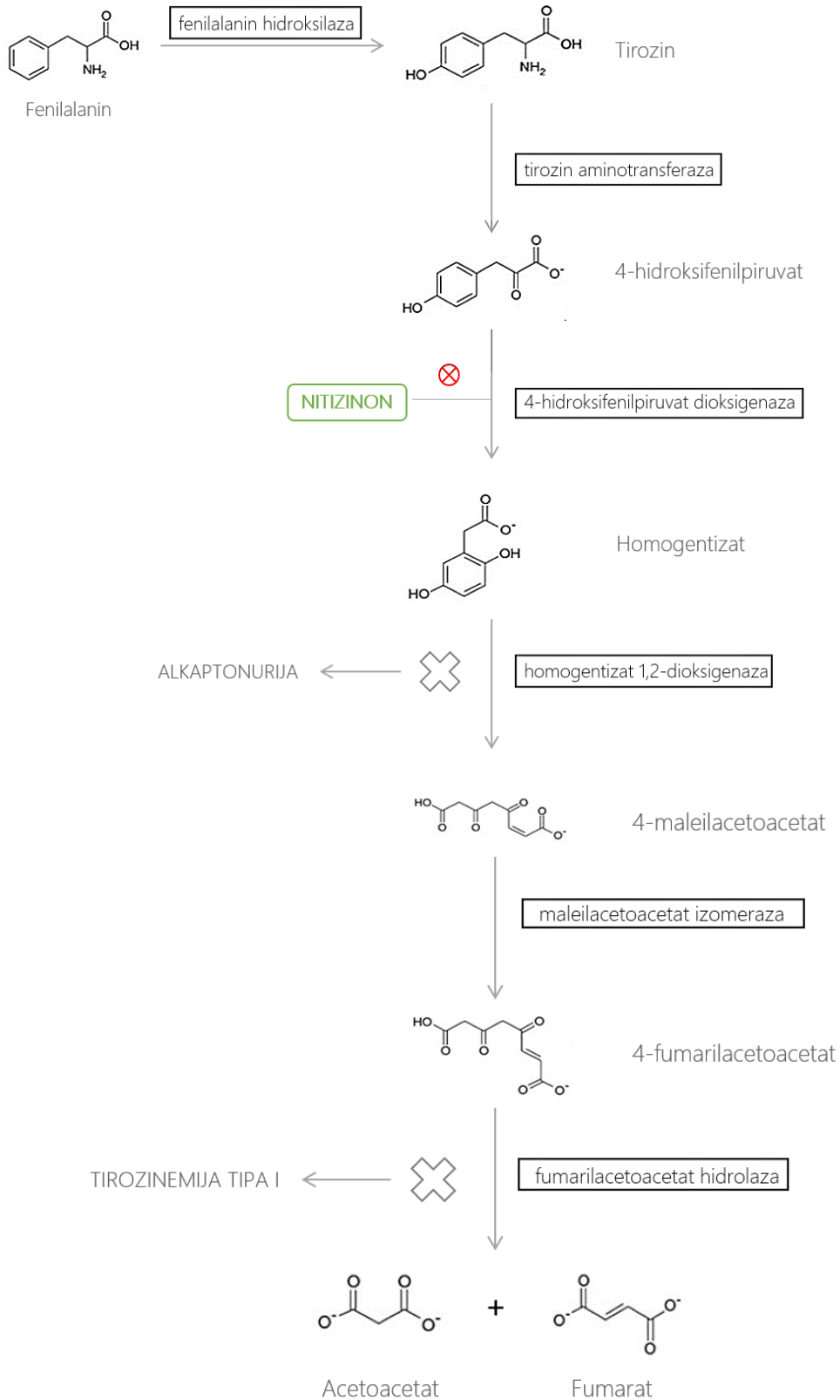
Nitizinon (Slika 5a) je derivat terpena leptospermona (Slika 5b), herbicida iz biljke četkovac (*Callistemon citrinus*). Ovi spojevi inhibiraju enzim 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenazu (HPPD) koji kod biljaka sudjeluje u sintezi plastokinona, dok kod sisavaca inhibicija HPPD djeluje na metabolički put tirozina. Nitizinon se prodaje pod marketinškim imenom Orfadin (Lock, 2017).



**Slika 5.** Strukturne formule leptospermona (a) i nitizinona (b).  
(Izvor: Lock, 2017)

Toksikološka studija iz 1996. pokazala je da štakori izloženi određenim dozama nitizinona imaju povećanu koncentraciju tirozina u krvi te izlučuju povećane količine 4-hidroksifenilpiruvata (HPP) u urinu zbog čega su istraživanja usmjerena prema metabolizmu tirozina (Lock i sur., 1996). Nitizinon djeluje na katabolizam tirozina (Slika 6) kao kompetitivni inhibitor enzima HPPD. Ovaj enzim katalizira oksidativnu dekarboksilaciju HPP u spoj homogentizat koji se u sljedećim koracima prevodi do konačnih produkata katabolizma tirozina – fumarata i acetoacetata (Lock, 2017).

Nitizinon je prvi odobreni lijek za nasljednu bolest tirozinemiju tipa I, rijetku metaboličku bolest uzrokovanu niskom razinom fumarilacetoacetat hidrolaze (FAH), enzima uključenog u zadnji korak razgradnje tirozina – razgrađuje 4-fumarilacetocetat na fumaril i acetoacetat. Ako enzim FAH nije funkcionalan dolazi do akutnog zatajenja jetre i bubrega kod novorođenčadi zbog nakupljanja toksičnih međuprodukata katabolizma tirozina (Pan i sur., 2009). Korištenje nitizinona zaustavlja katabolizam tirozina te onemogućava nakupljanje toksičnih tirozinskih produkata 4-maleilacetoacetata i 4-fumarilacetoacetata (Olsson i sur., 2015). Kombinirana terapija nitizinona i prilagođene prehrane rezultira znatnim produljenjem životnog vijeka, koji bez terapije iznosi maksimalno 10 godina (Das, 2017).



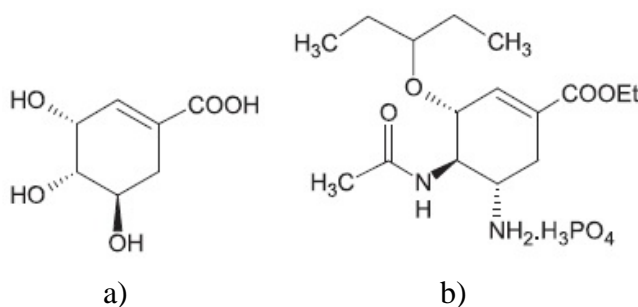
**Slika 6.** Prikaz kataboličke razgradnje tirozina s naznačenim mjestom djelovanja nitiziona te označenim enzimima čiji nedostatak dovodi do alkaptonurije i tirozinemije tipa 1. (Prilagođeno na temelju: Olsson i sur., 2015)

Nitizinon se koristi za liječenje još jedne bolesti izazvane poremećenim katabolizmom tirozina - alkaptonurije. Alkaptonurija je recesivni autosomalni metabolički poremećaj, a javlja se zbog nedostatka enzima homogentizat 1,2-dioksigenaze kojim se iz homogentizata (HGA) stvara 4-maleilacetoacetat. Iako su glomerularna filtracija i tubularna sekrecija pojačane, u tijelu se nakuplja HGA koji se tijekom vremena oksidira u pigmentirani polimer nalik melaninu. Taj pigment skladišti se u vezivnom tkivu, posebice u hrskavičnom tkivu, u procesu okronoze. Nitizinon učinkovito smanjuje koncentraciju HGA i smanjuje stopu okronoze (Olsson i sur., 2015).

### 3.3. OSELTAMIVIR FOSFAT

Osetamivir fosfat (Slika 7b) je inhibitor neuraminidaze, a koristi se za liječenje i prevenciju virusa gripe A i B. Prodaje se pod nazivom Tamiflu. Sinteza ide preko šikiminske kiseline (Slika 7a) koja je intermedijer za sintezu mnogih aromatskih spojeva kod bakterija i biljaka. Prvi puta je izolirana 1885. iz japanskog zvjezdastog anisa (*Illicium anisatum*), a rod *Liquidambar* bogat je šikiminskom kiselinom (Pan i sur., 2009).

Mehanizam djelovanja osetamivir fosfata je selektivna inhibicija neuraminidaze, enzima nužnog za replikaciju virusa. Osetamivir fosfat u tijelu posredstvom jetrenih esteraza prelazi u aktivni spoj – osetamivir karboksilat koji je iznimno učinkovit u inhibiciji replikacije virusa. Budući da je mjesto djelovanja osetamivir fosfata kod svih podtipova neuraminidaze visoko konzervirano, inhibicija replikacije je učinkovita kod svih do sada testiranih virusa (Davies, 2010).



**Slika 7.** Strukturne formule šikiminske kiseline (a) i osetamivir fosfata (b).  
(Izvor: Ghosh i sur., 2012)

Budući da je osetamivir fosfat djelotvoran i kod liječenja pandemije ptičje gripe, teži se proizvodnji veće količine lijeka za masovno tržište (Pan i sur., 2009). Kako bi se premostio nedostatak šikiminske kiseline u prirodi, može ju se proizvoditi genetičkim inženjerstvom u modificiranim sojevima bakterije *Escherichia coli* s promijenjenim metabolizmom. To se može postići na jedan od sljedećih načina: inaktivacijom gena za enzim šikimat kinazu ili prekomjernom ekspresijom ključnih gena u biosintezi šikiminske kiseline koji su organizirani u operone na plazmidu te su pod kontrolom inducibilnih promotora (Martínez i sur., 2015).

Danas je moguća sinteza osetamivir fosfata neovisna o šikiminskoj kiselinu. Jedan od mogućih načina je sinteza iz 1,3-butadiena i akrilne kiseline. Ova reakcija je jednostavna i financijski isplativa, a uspješnost je 30% (Yeung i sur., 2006).

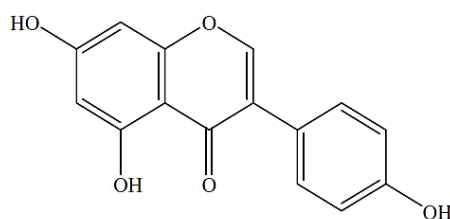
#### 4. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI KAO FARMAKOLOŠKI I BIOKEMIJSKI ALATI

Sekundarni biljni metaboliti mogu se koristiti kao biokemijski alati istraživanjem njihovog utjecaja na različite receptore, enzime i stanične procese. Takvim istraživanjima mogu se okarakterizirati receptori i enzimatski procesi važni kod nekih bolesti *in vitro* ili *in vivo* praćenjem utjecaja određenih spojeva biljnog porijekla na aktivnost željenog receptora/enzima.

Genistein je izoflavonski spoj izoliran iz soje (*Glycine max*). Djeluje kao inhibitor tirozin kinaze te se koristi u istraživanjima interakcije tirozin kinaze i odgovarajućih proteinskih kanala. Kvercetin je također fenolni spoj, flavonol, a ekstrahiran je iz širokog spektra biljnih vrsta. Budući da se veže na velik broj različitih signalnih molekula, koristi se kao osjetljiv i selektivan alat u spektroskopskim metodama praćenja unutarstaničnih procesa. Istraživanja regulacije cikličkog adenzin monofosfata, važnog aktera u mnogim signalnim putevima, provode se praćenjem djelovanja forskolina. Forskolin je diterpenski spoj izoliran iz korijena vrste *Coleus forskohlii*. U istraživanju tumorigeneze mogu se koristiti već spomenuti spojevi - vinblastin, vinkristin, paklitaksel i podofilotoksin koji djeluju na mikrotubule. Kapsaicin, alkaloid izoliran iz čili papričice (*Capsicum sp.*), koristi se u istraživanjima kojima se proučava osjećaj boli povezan s toplinom (Pan i sur., 2009). Kapsaicin djeluje na ionske TRP kanale (eng. *transient receptor potential channels*) – proteinske kanale u membrani koji moduliraju osjećaj toplo/hladno. Također, pomoću kapsaicina je okarakteriziran prvi nocireceptor – TRPV1. Klonirani TRPV1 receptor reagira na izloženost kapsaicinu jednako kao i na izloženost visokoj temperaturi. Budući da je TRPV1 eksprimiran kod svih senzornih neurona, danas se istražuje potencijal tog receptora kao mete za lijekove protiv bolova (Jara-Oseguera i sur., 2008).

## 4.1. GENISTEIN

Genistein (Slika 8) je difenolni spoj izoliran iz soje (*Glycine max*), a po kemijskoj strukturi spada u skupinu izoflavonoida. Strukturom podsjeća na ženski spolni hormon estrogen, pa ga svrstavamo i u fitoestrogenske spojeve. Fitoestrogenski spojevi mogu djelovati kao antagonisti i agonisti estrogena moduliranjem estrogenskih receptora. Genistein je korišten u mnogim istraživanjima koja se bave antioksidacijskim potencijalom, staničnom imunosti, tumorskim bolestima i oštećenjem molekule DNA. Interagira s mnogim molekulama važnim za metaboličke reakcije i put prijenosa signala (Ganai i Farooqi, 2015).



**Slika 8.** Strukturna formula genisteina.  
(Izvor: Russo i sur., 2016)

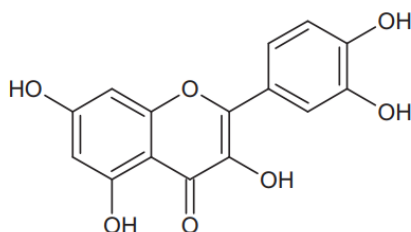
U nižim koncentracijama genistein inhibira tirozin kinaze i DNA topoizomerazu II. Posljedica inhibicije je smanjena aktivnost stanične imunosti. Smatra se da genistein smanjuje broj karakterističnih CD4<sup>+</sup> (eng. *cluster of differentiation 4*) membranskih molekula na pomoćničkim T-limfocitima i CD8<sup>+</sup> (eng. *cluster of differentiation 8*) membranskih molekula na površini citotoksičnih T-limfocita. Istraživanja su pokazala da je aktivnost T-limfocita, ali i imunoglobulina, kod djece čija je prehrana temeljena na sojinom mlijeku znatno manja nego što bi trebala biti (Ganai i Farooqi, 2015).

Mnoga istraživanja dokazuju povezanost prehrane bogate genisteinom i prevencije tumora. Kod raka debelog crijeva genistein djeluje na stanice utišavajući aktivnost gena za PI3K/Akt signalni put koji ima kritičnu ulogu u regulaciji širenja raka debelog crijeva. Kod raka pluća genistein djeluje na određene stanične linije in vitro poticanjem apoptoze tumorskih stanica te induciranjem prelaska stanica u G<sub>0</sub> fazu staničnog ciklusa tj. fazu metaboličkog mirovanja. *In vitro* istraživanja provode se i na stanicama raka dojke gdje se ispituje kakav utjecaj genistein ima na gene BRCA1 i BRCA2 (Spagnuolo i sur., 2015).



## 4.2. KVERCETIN

Kvercetin (Slika 9) je jedan od najzastupljenijih flavonoida u prirodi, a s obzirom na kemijsku strukturu pripada skupini flavonola (Pan i sur., 2009). Potiče veliki broj različitih staničnih reakcija preko interakcije s mnogim signalnim molekulama kao što su proteinske kinaze i kalmodulin. Poznat je po antioksidativnom potencijalu i protuupalnom djelovanju, a koristi se i u spektroskopskim metodama praćenja unutarstaničnih procesa te istraživanjima funkcije određenih receptora. Također, koristi se u istraživanju tumora zbog utjecaja na aktivnost tumor supresorskog proteina p53 (Pan i sur., 2009).



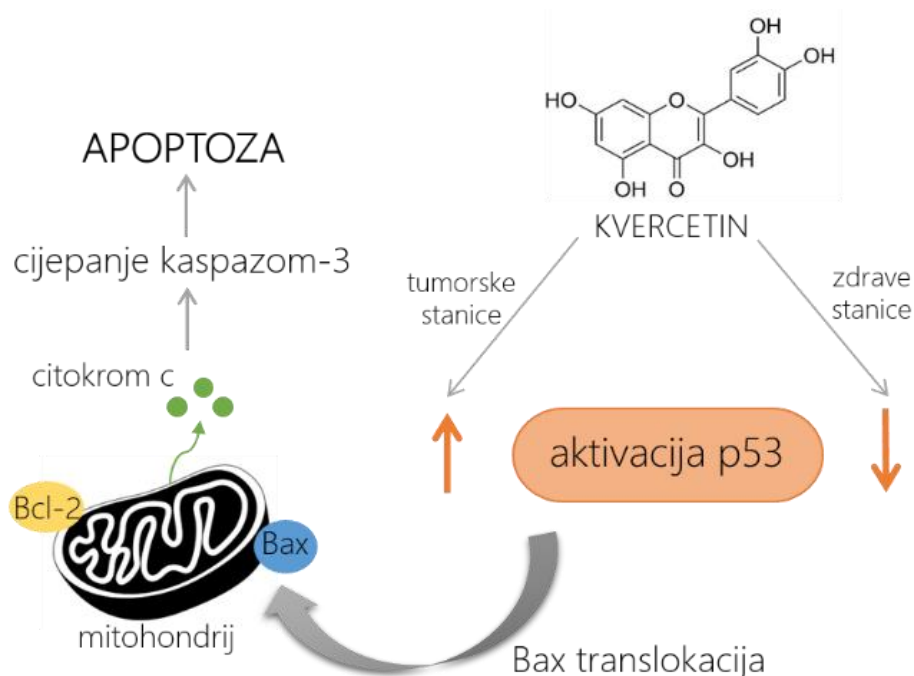
**Slika 9.** Strukturna formula kvercetina.  
(Izvor: Roubalová i sur., 2015)

Kvercetin ima antioksidativno djelovanje – brani stanice od reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koji uzrokuju oksidacijski stres, veže slobodne radikale i prijelazne ione metala (Pan i sur., 2009). Antioksidativni potencijal kvercetina ovisi o njegovoj koncentraciji – u nižim koncentracijama (1  $\mu\text{M}$ ) djeluje kao antioksidans, a pri višim koncentracijama (100  $\mu\text{M}$ ) ponaša se kao oksidans te uzrokuje oštećenja molekule DNA što dovodi do aktivacije p53 proteina te potencijalne apoptoze. Zbog antioksidativnog djelovanja kvercetin se smatra dobrim lijekom protiv upala. Budući da po strukturi spada u grupu fitoestrogenskih spojeva te da je antagonist estrogena, jedan je od alata za proučavanje estrogenskih receptora. Kvercetin djeluje i na inhibiciju sinteze proteinskih šaperona, kao što su tzv. “*heat-shock*“ proteini (Hsp) Hsp70 i Hsp90, onemogućavanjem transkripcije šaperona s odgovarajućeg promotora (Miles i sur., 2014).

Kvercetin se može vezati na unutarstanične molekule kao što su nukleinske kiseline i proteini. Vezanjem kvercetina mijenja se valna duljina pri kojoj ovi spojevi pokazuju maksimalnu apsorbanciju i/ili fluorescenciju. Ako kvercetin formira kovalentne komplekse s nukleinskim kiselinama spektroskopska detekcija će biti pri valnoj duljini 395 nm, a ako formira komplekse s proteinima detekcija će biti pri valnoj duljini od 500-540 nm (Nifli i sur., 2007). Ovo svojstvo omogućava korištenje kvercetina kao vrijednog, osjetljivog i selektivnog

spektroskopskog alata. Spektroskopija se u ovom slučaju može koristiti za praćenje stvaranja kompleksa koji sadrže kvercetin u stanicama, što dovodi do razjašnjavanja strukture određenog spoja (Pan i sur., 2009).

Kvercetin se koristi u istraživanju tumora jer u visokim koncentracijama (100  $\mu\text{M}$ ) djeluje kao oksidans te uzrokuje dvolančane lomove molekule DNA. Dvolančani lomovi DNA signal su stanici da aktivira protein p53 i inducira apoptozu tumorske stanice. U normalnim staničnim uvjetima p53 nije aktivan jer je u kompleksu s regulatorom - proteinom MDM2 (eng. *mouse double minute 2 homolog*) te se kompleks ubikvitinira. Protein p53 se aktivira autofosforilacijom te ne stvara kompleks s MDM2, a zaustavlja stanični ciklus u  $G_1$  fazi aktivacijom proteina p21 koji inhibira sustav ciklin/ciklin-ovisna kinaza (ciklin D/CDK4). Ako popravak lomova zahtjeva preveliki utrošak energije, stanica ide u induciranu apoptozu mitohondrijskim apoptotičnim putem (Slika 10). Brojna istraživanja pokazuju da kvercetin inhibira apoptozu u normalnim, zdravim stanicama povećavajući unutarstanične koncentracije antioksidansa što dovodi do nemogućnosti ROS-ova da aktiviraju p53-inducirani put apoptoze. Ako p53 nije aktivan, čemu uzrok može biti točkasta mutacija ili delecija dijela gena, ne događa se zastavljanje staničnog ciklusa te stanica replicira oštećenu DNA što može dovesti do nastanka tumorskih stanica (Miles i sur., 2014).



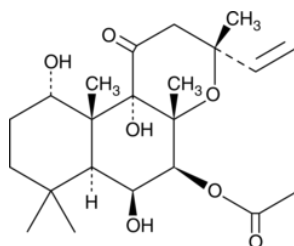
**Slika 10.** Shematski prikaz djelovanja kvercetina na aktivnost proteina p53 u tumorskim i zdravim stanicama. Proapoptotički protein Bax (eng. *Bcl-2-associated X protein*) inhibira antiapoptotičku Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) skupinu proteina.

(Prilagođeno na temelju: Miles i sur., 2014)

Mehanizam djelovanja visokih koncentracija (100  $\mu$ M) kvercetina (Slika 10) zasniva se na aktivaciji p53 u tumorskim stanicama zbog velikog broja lomova u molekuli DNA. Ako su lomovi nepopravljivi, stanica ulazi u mitohondrijski induciranu apoptozu. Bax (eng. *Bcl-2-associated X protein*), proapoptotički protein, translociran je iz citosola, gdje se nalazi u monomernom obliku, u mitohondrij gdje prolazi konformacijske promjene i stvara oligomere. Oligomeri utječu na antiapoptotičke proteine iz Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) skupine, koji u normalnim uvjetima inhibiraju otpuštanje citokroma c. Zbog inhibicije Bcl-2 proteina, dolazi do otpuštanja citokroma c koji aktivira cisteinske proteaze - kaspaze, s naglaskom na kaspazu 3 koja dovodi do razgradnje staničnih komponenti tj. apoptoze stanice (Wang i Youle, 2009).

### 4.3. FORSKOLIN

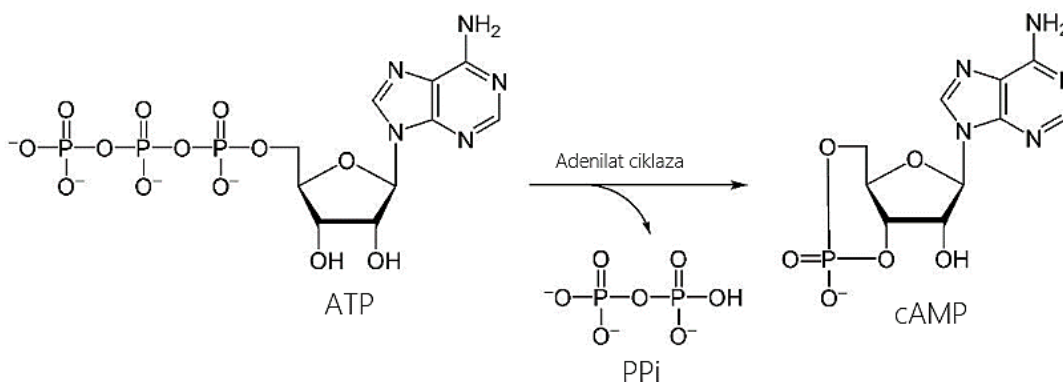
Forskolin (Slika 11), poznat i kao koleonol, je diterpenski spoj izoliran iz korijena biljne vrste *Coleus forskohlii* koja se u Indiji koristi za liječenje kardiovaskularnih bolesti i astme. Forskolin je učinkovit i reverzibilan aktivator transmembranskog proteina adenilat ciklaze (Pan i sur., 2009). Forskolin vezanjem direktno utječe na katalitičku podjedinicu adenilat ciklaze te pokazuje određenu aktivnost u svim eukariotskim stanicama osim spermija (Wagh i sur., 2012).



**Slika 11.** Strukturna formula forskolina.

(Izvor: <https://www.caymanchem.com/product/11018>)

Adenilat ciklaza je enzim koji katalizira reakciju nastajanja sekundarnog glasnika cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) iz adenozin trifosfata (ATP) uz oslobađanje pirofosfata (PPi) (Slika 12) te se zato koristi kao farmakološki alat za istraživanje katalitičkog mehanizma i regulacije cAMP kod raznih fizioloških stanja (Alasbahi i Melzig, 2012).



**Slika 12.** Prikaz reakcije nastajanja cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) katalizirane enzimom adenilat ciklaza.

(Prilagođeno na temelju: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-lyase/>)

Inhibicija/aktivacija cAMP-a posredovana forskolinom primjenjuje se u istraživanjima staničnih procesa ovisnih o cAMP, uključujući autoimune bolesti štitnjače, akutnu malariju te prijenos signala kod depresije. Također, forskolin se koristi kao lijek za glaukom (Alasbahi i Melzig, 2012). Glaukom je progresivna degenerativna bolest koja može dovesti do sljepoće. Očni tlak je kod ove bolesti povišen iznad 22 mmHg, a forskolin ga smanjuje djelujući, preko cAMP-a, na unos očne vodice (Wagh i sur., 2012).

## 5. ZAKLJUČAK

Zbog širokog spektra djelovanja, kao što su inhibicija/aktivacija određenih enzima važnih za određene stanične procese te interakcije s mnogim signalnim molekulama, sekundarni biljni metaboliti i dalje imaju nezamjenjivu ulogu u farmaceutskoj industriji. Sekundarni biljni metaboliti služe za liječenje mnogih medicinskih stanja, kao što su tumori, neurodegenerativne bolesti, parazitske bolesti i metaboličke bolesti (Tablica 1).

**Tablica 1.** Sumarni prikaz spojeva i pripadajućih karakteristika opisanih u radu.

<b>SPOJ</b>	<b>BILJNA VRSTA IZ KOJE JE IZOLIRAN</b>	<b>KLINIČKA UPORABA</b>	<b>MEHANIZAM DJELOVANJA</b>
Galantamin	<i>Galanthus woronowii</i>	Liječenje Alzheimerove bolesti	Inhibicija acetilkolinesteraze i modulacija nikotinskih receptora
Vinblastin i vinkristin	<i>Catharanthus roseus</i>	Liječenje leukemije, raka dojke i raka testisa	Inhibicija mitoze tumorskih stanica vezanjem na mikrotubule
Kinin	<i>Cinchona sp.</i>	Liječenje malarije	Nepoznat (pretpostavlja se da inhibira hem-polimerazu domaćina)
Paklitaksel	<i>Taxus brevifolia</i>	Liječenje raka jajnika, dojke i pluća	Inhibicija mitoze tumorskih stanica stabilizacijom mikrotubula
Nitizinon	<i>Callistemon citrinus</i>	Liječenje tirozinemije tipa I i alkaptonurije	Inhibicija 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaze
Oseltamivir fosfat	<i>Illicium anisatum</i>	Liječenje i prevencija gripe	Inhibicija neuraminidaze
Genistein	<i>Glycine max</i>	Prevencija tumora	Inhibicija tirozin kinaze i DNA topoizomeraze II
Kvercetin	<i>Quercus sp.</i>	Istraživanje tumora i uloge proteina p53	Interakcija s mnogim signalnim molekulama te utjecaj na aktivnost proteina p53
Forskolin	<i>Coleus forskohlii</i>	Liječenje glaukoma	Aktivator adenilat ciklaze

## 6. LITERATURA

- Achan, J., Talisuna, A., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J., Baliraine, F., Rosenthal, P., D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10, 144-156.
- Alasbahi, RH., Melzig, M. (2012). Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Die Pharmazie*, 67, 5-13.
- Cragg, G., Newman, D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72-79.
- Das, A. (2017). Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1). *The Application of Clinical Genetics*, 10, 43-48.
- Davies, B. (2010). Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 5-10.
- Dias, D., Urban, S., Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2, 303-336.
- Dugé de Bernonville, T., Clastre, M., Besseau, S., Oudin, A., Burlat, V., Glévarec, G., Lanoue, A., Papon, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Courdavault, V. (2015). Phytochemical genomics of the Madagascar periwinkle: Unravelling the last twists of the alkaloid engine. *Phytochemistry*, 113, 9-23.
- El-Tawil, S. (2011). Quinine for muscle cramps. *Journal of Evidence-Based Medicine*, 4, 56-58.
- Ganai, A., Farooqi, H. (2015). Bioactivity of genistein: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 76, 30-38.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R., Roussi, F., Steinmetz, M., Curmi, P., Sobel, A., Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 435, 519-522.

- Ghosh, S., Chisti, Y., Banerjee, U. (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*, 30, 1425-1431.
- Inama, G., Durin, O., Pedrinazzi, C., Berisso, M., Furlanello, F. (2010). 'Orphan drugs' in cardiology: nadolol and quinidine. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 11, 143-144.
- Jara-Oseguera, A., Simon, S., Rosenbaum, T. (2008). TRPV1: on the road to pain relief. *Current Molecular Pharmacology*, 1, 255-269.
- Lock, EA. (2017) From weed killer to wonder drug. U: Tanguay R. *Advances In Experimental Medicine and Biology - Hereditary Tyrosinemia*. Springer International Publishing, 175-185.
- Lock, EA., Gaskin, P., Ellis, MK., Provan, WM., Robinson, M., Smith, LL., Prisbylla, MP., Mutter, LC. (1996). Tissue distribution of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl) cyclohexane-1-3-dione (NTBC): effect on enzymes involved in tyrosine catabolism and relevance to ocular toxicity in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141, 439-447.
- Marco, L., Carreiras, M. (2006). Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimers disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 1, 105-111.
- Martínez, J., Bolívar, F., Escalante, A. (2015). Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 1-16.
- Miles, S., McFarland, M., Niles, R. (2014). Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutrition Reviews*, 72, 720-734.
- Nifli, A., Theodoropoulos, P., Munier, S., Castagnino, C., Roussakis, E., Katerinopoulos, H., Vercauteren, J., Castanas, E. (2007). Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2873-2878.

- Nikiforuk, A., Kos, T., Potasiewicz, A., Popik, P. (2015). Positive allosteric modulation of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors enhances recognition memory and cognitive flexibility in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 25, 1300-1313.
- Olsson, B., Cox, TF., Psarelli, EE., Szamosi, J., Hughes, AT., Milan, AM., Hall, AK., Rovinsky, J., Ranganath, LR. (2015). Relationship between serum concentrations of nitisinone and its effect on homogentisic acid and tyrosine in patients with alkaptonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*, 24, 21-27.
- Pan, L., Carcache de Blanco, EJ., Kinghorn, AD. (2009). Plant-derived natural products as leads for drug discovery. U: Lanzotti, V., Osbourn, A. *Plant-Derived Natural Products*. Springer Science + Bussines Media. New York, 547-567.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003). *Fiziologija bilja*. Profil International. Zagreb, 168-171.
- Richarz, U., Gaudig, M., Rettig, K., Schauble, B. (2014). Galantamine treatment in outpatients with mild Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 129, 382-392.
- Roubalová, L., Purchartová, K., Papoušková, B., Vacek, J., Křen, V., Ulrichová, J., Vrba, J. (2015). Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids in vitro: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 5402-5409.
- Russo, M., Russo, GL., Daglia, M., Kasi, PD., Ravi, S., Nabavi, SF., Nabavi SM. (2016). Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects. *Food Chemistry*, 196, 589-600.
- Spagnuolo, C., Russo, G., Orhan, I., Habtemariam, S., Daglia, M., Sureda, A., Nabavi, S., Devi, K., Loizzo, M., Tundis, R. and Nabavi, S. (2015). Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Advances in Nutrition*, 6, 408-419.
- Seca, A., Pinto, D. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 263-285.



Van Der Heijden, R., Jacobs, DI., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R. (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medical Chemistry*, 11, 607-628.

Wagh, V., Patil, P., Surana, S. and Wagh, K. (2012). Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule. *Journal of Postgraduate Medicine*, 58, 199-202.

Wang, C., Youle, R. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43, 95-118.

Yang, C., Horwitz, S. (2017). Taxol®: the first microtubule stabilizing agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1733-1744.

Yeung, Hong, S., Corey, E. (2006). A short enantioselective pathway for the synthesis of the anti-influenza neuramidase inhibitor oseltamivir from 1,3-butadiene and acrylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 6310-6311.

<https://www.caymanchem.com/product/11018> (preuzeto dana 11.6.2018.)

<https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-lyase/> (preuzeto dana 13.6.2018)

## 7. SAŽETAK

Biljni sekundarni metaboliti su spojevi koji nisu nužni za rast i razvoj biljaka, ali im omogućavaju prilagodbu i preživljavanje u okolišu. Strukturna kompleksnost i raznolikost sekundarnih metabolita osigurala im je važnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Ovi spojevi koriste se u liječenju različitih medicinskih stanja kao što su tumori, neurodegenerativne bolesti, parazitske bolesti s naglaskom na malariju, metabolički poremećaji te glaukom. Biljni sekundarni metaboliti mogu biti izravno korišteni kao lijekovi za kliničku upotrebu, kao npr. galantamin, vinblastin i kinin. Sintetska optimizacija često je potrebna kako bi se povećala dostupnost samog spoja, u tom slučaju koriste se kao prototip za sintezu velikog broja strukturnih analoga koji mogu biti korišteni u razvoju lijekova. Dobri primjeri ovakve uporabe su paklitaksel, nitizinin i oseltamivir fosfat. Također, mogu biti korišteni i kao farmakološki i biokemijski alati u istraživanju mehanizama koji dovode do bolesti. Neki od spojeva korišteni u tu svrhu su genistein, kvercetin i forskolin.

## 8. SUMMARY

Plant secondary metabolites are compounds not essential for plant growth and development, but are useful for adjustment and survival of plants in environment. Secondary metabolites structural complexity and diversity has ensured them an important role in pharmaceutical industry. Plant secondary metabolites are used for treatment of various medical conditions such as cancer, neurodegenerative diseases, parasitic diseases with emphasis on malaria, metabolic disorders and glaucoma. These compounds can be used directly as drugs in clinical use, like galantamine, vinblastine and quinine. Synthetic optimization is often required to increase bioavailability, in that case plant secondary metabolites serve as prototypes for the synthesis of high number of structural analogs that can be used in drug development. Good examples for such use are paclitaxel, nitisinone and oseltamivir phosphate. Further, plant secondary metabolites can also serve as pharmacological and biochemical probes to help explain the mechanisms underlying human diseases. Some of the compounds used for this purpose are genistein, quercetin and forskolin.