

Received: 2014.04.07  
Accepted: 2014.11.20  
Published: 2015.05.04

## Terapeutyczny potencjał metabolitów wtórnych produkowanych w kulturach korzeni włosnikowatych\*

### Therapeutic potential of secondary metabolites produced in the hairy roots cultures

Tomasz Kowalczyk<sup>1</sup>, Marta Łucka<sup>1a</sup>, Janusz Szemraj<sup>2</sup>, Tomasz Sakowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roslin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytet Medyczny, Łódź

<sup>a</sup> student

#### Streszczenie

Rośliny zawsze stanowiły dla człowieka źródło wielu cennych substancji. Coraz większe zaawansowanie metod współczesnej biotechnologii w powiązaniu z technikami inżynierii genetycznej sprawiają, że systematycznie poszerza się zarówno zakres, jak i wydajność pozyskiwanych związków, a także liczba wykorzystywanych gatunków. Dzięki temu nie słabnie zainteresowanie możliwościami biotechnologicznej produkcji wielu z nich, ze szczególnym uwzględnieniem tych o znaczeniu farmakologicznym oraz praktycznego ich stosowania w terapii schorzeń o podłożu nowotworowym, wirusowym i innych. Wiele z takich związków reprezentuje zróżnicowaną grupę metabolitów wtórnych. Jednym z efektywnych sposobów pozyskiwania takich substancji jest wykorzystywanie do tego celu kultur korzeni włosnikowatych. Zalety takich systemów sprawiają, że od lat są atrakcyjną metodą pozyskiwania ważnych substancji roślinnych i stanowią alternatywę wobec innych strategii, w tym kultur zawiesin komórkowych czy kosztownych syntez chemicznych.

Słowa kluczowe:

korzenie włosnikowate • metabolity wtórne • terpenoidy • alkaloidy

#### Summary

Plants have always been a source of many valuable substances for humans. Growing advancement of methods of modern biotechnology, combined with genetic engineering techniques, gradually increase the variety of compounds obtained, the number of plant species used and the production efficiency. Consequently, there is an undebatable interest in biotechnological production of such compounds, especially those pharmacologically active, that can be used in treatment of neoplastic, viral, and many other types of diseases. Most of these compounds represent a diverse group of secondary metabolites. One of the effective ways of obtaining such molecules is the utilization of hairy roots cultures. The advantages of such systems make them an attractive method of obtaining important plant-derived compounds, creating an interesting alternative to other methods, including the cell suspension cultures or expensive chemical syntheses.

Key words:

hairy roots • secondary metabolites • terpenoids • alkaloids

\*Praca finansowana z grantu nr 2013/09/B/NZ7/01019.

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1151285>

**Word count:** 5416

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 126

**Adres autora:** dr hab., prof nadzw. Tomasz Sakowicz, Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: tomesakowicz@wp.pl

## WPROWADZENIE

Aktualne statystyki FAO (Food and Agriculture Organization) wskazują, że ponad 50 000 gatunków roślin wykorzystywanych jest do celów leczniczych [<http://www.fao.org>]. Na długiej liście pozyskiwanych substancji pochodzenia roślinnego można znaleźć związki o niezwykle szerokim zakresie działania, w tym o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwbólowych, przeciwzapalnych, antycholinergicznym, a także leki: przeciwwirusowe, kardiologiczne, przeciwcukrzycowe, regulujące ciśnienie krwi czy przeciwmalaryczne [12,24,75]. Ponad 25% nowych leków zatwierdzonych w ciągu ostatnich 30 lat powstało na bazie cząsteczek pochodzenia roślinnego, a roczna ich sprzedaż przekracza dziesiątki mld dolarów [27]. Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), dla około 80% populacji świata (głównie krajów mniej rozwiniętych), podstawowe potrzeby zdrowotne są zaspokajane dzięki medycynie opartej o rośliny lecznicze [32]. Przykładem związków zatwierdzonych przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) i skierowanych do stosowania klinicznego są m.in.: winblastyna, winkrystyna, topotekan, etopozyd.

W wielu przypadkach, możliwości skutecznego pozyskania tych cennych związków bywają ograniczone. Rośliny, w których one występują nie należą zwykle do gatunków uprawnych, są zbierane w środowisku naturalnym, a intensywność tych zbiorów doprowadza do sytuacji, w której licznym z nich zagraża wyginiecie (na liście takiej znajduje się ponad 10 tys. roślin leczniczych) [32,107]. Ponadto, związki takie są wydzielane przez rośliny w niewielkich ilościach, w określonych stadiach rozwojowych, często przez gatunki zasiedlające obszary o niestabilnych warunkach środowiskowych czy charakteryzujące się powolnym wzrostem. Wiele z nich są jednocześnie trudne do syntezy chemicznej, często bowiem mają kilka centrów chiralnych, co podnosi koszty ich komercyjnej produkcji [126]. Wymienione czynniki leżą u podstaw inicjowania różnorodnych poszukiwań zmierzających do zaspokojenia rosnącego zapotrzebowania rynku farmaceutycznego na tego rodzaju związki.

Substancjami pochodzenia roślinnego, które budzą ogromne zainteresowanie jest złożona pula metabolitów wtórnych (MW), związków organicznych, swoistych dla

danego gatunku/organu. Powstają na bazie substratów metabolizmu podstawowego i nie są bezpośrednio niezbędne do wzrostu i rozwoju roślin. Pełnią funkcje istotne dla przetrwania roślin w niekorzystnych warunkach środowiska. Metabolity wtórne mogą stanowić obronę przed patogenami, roślinożercami, zasoleniem gleby czy promieniowaniem, wabią też owady. Niekiedy mogą odgrywać pewną rolę w metabolizmie podstawowym [110]. W poznanych dotąd gatunkach roślin pulę MW szacuje się na 200-300 tys., a właściwości wielu sprawiają, że są cennym produktem w biotechnologii. Zakres ich pozyskiwania, z pierwotnego wykorzystania do tego celu upraw polowych, wyraźnie przesunął się w kierunku różnorodnych metod hodowli. W sytuacji wysokich kosztów chemicznej syntezy są opracowywane i doskonalone metody kultur roślinnych, tj. systemów niezależnych od zmian środowiskowych, stwarzających warunki do optymalizacji produkcji pożądaných substancji [104]. To na nich spoczywa dziś główny ciężar wytwarzania związków pochodzenia roślinnego, które docelowo mogą się okazać ważne dla współczesnej medycyny, przemysłu farmaceutycznego, spożywczego i kosmetycznego.

W pracy przedstawiono aktualne wiadomości dotyczące terapeutycznego potencjału wybranych, roślinnych metabolitów wtórnych wytwarzanych z wykorzystaniem kultur korzeni włośnikowatych. W zdecydowanej większości przykładów stosowany w pracy termin „produkcja” używany był w kontekście udanych prób ekspresji danego związku uzyskanych w warunkach prac naukowo-badawczych. Nie jest on oczywiście tożsamy z pojęciem produkcji podejmowanej na skalę przemysłową przez wyspecjalizowane firmy w celach komercyjnych. Konsekwencją powyższej sytuacji jest to, że wiele z opisanych związków trudno uznawać za leki w rozumieniu formalnym, są to raczej substancje, które mogą takimi się okazać po przejściu wysoce specjalistycznych testów. W pewnych sytuacjach można też mówić o identyfikacji substancji aktywnej będącej np. składnikiem ekstraktu uzyskanego z danej rośliny.

## Znaczenie kultur korzeni włośnikowatych

W ostatnich latach powstało wiele wartościowych opracowań dotyczących kultur korzeni włośnikowatych (hairy root cultures, HR cultures), jednej ze sposobów hodowli



organów roślinnych [19,69,115]. Liczne zalety tych systemów sprawiają, że stanowią atrakcyjną alternatywę wobec klasycznych technologii czy nawet kultur zawieszin komórkowych. W przypadku tych ostatnich, takie ich cechy jak: powolny wzrost komórek, niska rentowność, słaba stabilność genetyczna oraz spadek akumulacji metabolitów w miarę starzenia się linii komórkowych wymusił zasadność poszukiwań nowych, bardziej skutecznych metod pozyskiwania pożądaných produktów.

Kultury korzeni włośnikowatych (HR), oprócz innych zalet, wyróżniają się zróżnicowaną budową komórkową i strukturalną integracją tkanek, co odgrywa główną rolę w prawidłowym przebiegu procesów metabolicznych, stąd są chętnie wykorzystywane do kontrolowanej produkcji metabolitów wtórnych o dużym znaczeniu. Przykładem potwierdzającym może być działalność szwajcarskiej firmy ROOTec (www.rootec.com), oferującej bogatą kolekcję linii korzeni włośnikowatych uzyskanych z wielu gatunków roślin, umożliwiających pozyskiwanie cennych metabolitów wtórnych w dużej skali. Rośliny przeznaczone do omawianych celów są poddawane transformacji genetycznej z udziałem szczepów *Agrobacterium rhizogenes*, bakterii glebowych, których plazmid Ri zapewnia przeniesienie i integrację z genomem rośliny fragmentu T-DNA wraz z zawartymi na nim genami. Jednocześnie, dochodzi do generowania korzeni włośnikowatych [13]. Kultury HR wykorzystuje się nie tylko w produkcji metabolitów wtórnych, ale również wytwarzania w nich licznych białek rekombinowanych (antygeny, przeciwciała, cytokiny, hormony, enzymy) [22,49,51,63,102, patent WO 2011138233 A1].

Z oczywistych powodów, szczególnie zainteresowanie badaczy budzi możliwość wykorzystania systemów HR do pozyskiwania związków o cechach umożliwiających ich przyszłe stosowanie w lecznictwie. Kultury te wyróżniają możliwość wytworzenia dużej biomasy w stosunkowo krótkim czasie, stabilność genetyczna, zdolność do nieograniczonego wzrostu bez konieczności stosowania dodatkowych hormonów, brak geotropizmu czy relatywna łatwość zmiany skali produkcji, co dodatkowo podnosi ich wartość, jako potencjalnych „producentów” pożądaných związków [50]. Ponadto, hodowle HR są zdolne do gromadzenia metabolitów wtórnych zazwyczaj występujących tylko w nadziemnych częściach roślin. Walorem opisywanego systemu jest też to, że transformowane korzenie są zdolne do regeneracji, a następnie szybkiego wzrostu całych roślin wytwarzających metabolity niewystępujące w roślinie macierzystej [112]. Tym samym system może być wykorzystywany zarówno do podnoszenia produkcji związków endogennych, jak i takich, które w danym gatunku nie są syntetyzowane w warunkach naturalnych [112].

Kultury HR są też wykorzystywane do identyfikacji związków pośrednich w szlakach metabolicznych czy wskazania podstawowych enzymów uczestniczących w biosyntezie MW [28]. Obiektem transformacji genetycznej są geny kodujące enzymy związane z wybranymi etapami

konkretnych szlaków metabolicznych, doprowadzając do podwyższonej syntezy pożądaných produktów. Podobny efekt można uzyskiwać też przez wzmózoną produkcję prekursorów istotnych metabolitów, ponieważ ich niski poziom bywa jednym z istotnych czynników ograniczających ilość wytwarzanego produktu.

Selekcja klonów może doprowadzić do identyfikacji transformantów, w których poziom wybranych metabolitów znacząco przewyższa ich stężenia w roślinach kontrolnych (niepoddanych transformacji), a przykłady takie dotyczą zarówno licznych gatunków roślin, jak i związków w nich syntetyzowanych [89].

Wymienione zalety kultur korzeni włośnikowatych sprawiają, że od kilku dekad są chętnie stosowane do uzyskiwania cennych metabolitów, a znaczący postęp w pełniejszym wykorzystaniu ich potencjału dokonał się w latach 90 ub.w. Sytuacja taka wynikała m.in. z lepszego poznania molekularnych mechanizmów transferu T-DNA do roślin i związanych z tym możliwościami wprowadzania do tych organizmów nowych genów. Wiązało się to również ze zdobyciem pełniejszej wiedzy na temat przebiegu i regulacji wybranych szlaków metabolicznych [108].

### Kontrola regulacji przemian metabolicznych

Obecnie zaawansowane badania metabolomów roślinnych w połączeniu z analizami ich transkryptomów, proteomów i genomów umożliwiają poznanie całościowego obrazu złożonych oddziaływań komórkowych [7]. W tym kontekście istotna staje się dostępność do stale poszerzającej się puli nowych narzędzi i technik molekularnych. Wśród nich wyróżnić można choćby ilościowe profilowanie transkryptomu, co m.in. ułatwia identyfikację genów związanych z wtórnym metabolizmem [74]. Skuteczność tego typu metod ogranicza jednak to, że większość interesujących szlaków to procesy wieloetapowe, tym samym wskazanie genów kodujących główne enzymy przemian nie zawsze bywa łatwe. Wiedza na temat przebiegu konkretnego etapu biosyntezy, umożliwia klonowanie właściwych genów i pozwala na ich modyfikację [83].

Wydaje się, że większość skutecznych badań nad podniesieniem wydajności pozyskiwania metabolitów ma bezpośredni związek z modyfikacjami jednego, dwóch genów istotnych w regulacji szlaku syntezy. Jednocześnie nie jest możliwe dokładne przewidywanie kompleksowych skutków nadekspresji genów w danej przemianie [68].

Przykładem prób zakończonych skutecznym wprowadzeniem i ekspresją kilku genów zwiększających syntezę ważnych związków są kultury HR kapusty pekińskiej. Do jej genomu wprowadzono trzy geny *Arabidopsis thaliana* (CYP79B2, CYP79B1, CYP79B3) i mimo że żaden z nich działając osobno nie zwiększał poziomu akumulacji glikozynolanów indolowych, to zsynchronizowana ekspresja dwóch dowolnych wywoływała wzrost poziomu tych związków w korzeniach [120]. Niekiedy może wystąpić zjawiska kosupresji genów prowadzący spadek produkcji

metabolitów docelowych [78]. W większości szlaków syntezy metabolitów zmiany wprowadzone w pojedynczych etapach ograniczających wydajność reakcji okazują się mało skuteczne, a niekiedy nadekspresja jednego genu/enzymu zaburza przebieg całego procesu i może dochodzić do jego tłumienia. Wydaje się więc, że strategię powinny obejmować jednoczesną indukcję i nadekspresję genów zaangażowanych w regulację wielu etapów biosyntezy [124]. Przytoczone sytuacje to jedynie przykłady, potwierdzające skalę złożoności problemu. Finalny wynik jest pochodną synchronizacji wielu zdarzeń związanych z regulacją przemian, na które dodatkowy wpływ mają takie parametry jak: stadia rozwojowe komórek, warunki środowiska czy interakcje z równoległe biegnącymi szlakami metabolicznymi [68,81].

Georgiev i wsp. opisują potencjał katarantusa różowego (*Catharanthus roseus*), gatunku wykorzystywanego m.in. do pozyskiwania alkaloidów indolowych (winblastyny i winkrystyny), ważnych cytostatyków przeciwnowotworowych [23]. Podstawą do modyfikacji szlaków, w których powstają była identyfikacja dwóch genów, których enzymy ograniczają tempo syntezy alkaloidów: dekarboksylazy tryptofanu (TDC) i syntazy stryktozydyny (STR). Podniesienie ekspresji kodujących je genów, oprócz dostępności właściwej puli prekursorów, doprowadziło do podniesienia poziomu syntezy wspomnianych związków. Skoordynowana nadekspresja genów syntazy ksylulozo-5-fosforanowej i hydrolazy geraniolu doprowadziła do znaczącego wzrostu produkcji ajmalicyny, lochnerycyny i tabersoniny, bezpośredniego prekursora w produkcji winblastyny i winkrystyny. [78]. W tym samym gatunku zwiększono również różnorodność wytwarzanych metabolitów wtórnych przez transfer bakteryjnych genów halogenaz PyrH and RebH do genomu roślinnego [90].

Wspomniano już, że w systemach kultur HR stosowano zarówno zabiegi stymulacji genów endogennych, jak i transferu genów obcego pochodzenia. Przykładami tej drugiej sytuacji może być przeniesienie genu N-metylotransferazy putrescynowej z tytoniu i jego wymuszona nadekspresja w *Datura metel* L. i *Hyoscyamus muticus* L. (enzym katalizuje pierwszy etap w szlaku syntezy alkaloidów tropanowych [71]). Jednocześnie uzyskano stymulację wzrostu korzeni transgenicznych. Natomiast w korzeniach włóknikowych *C. roseus* transformowanych genem reduktazy HMG CoA chomika uzyskano wyższy niż w roślinach kontrolnych poziom produkcji ajmalicyny, katarantyny oraz kampesterolu [6]. Podobnie transfer genu izomerazy chalkonowej z *Saussurea medusa* do genomu leczniczej *Saussurea involucre* 12-krotnie zwiększył stężenie apigeniny w kulturach HR, związku wykorzystywanego w terapii przeciwnowotworowej [59].

Wiedza na temat danego szlaku pozwala również eksponować jego alternatywne wersje, a niektóre mogą umożliwić bardziej wydajną syntezę produktu finalnego. Taka sytuacja występuje w szlaku syntezy terpenoidów, które przeważnie powstają z mawalonianu, ale znana jest też alternatywna wersja ich syntezy przez deoksyksylozę [61].

W podobnych sytuacjach, wykorzystując mechanizmy procesu RNAi, doprowadzać można do celowego blokowania szlaku mniej wydajnego [12].

Obiecującym narzędziem inżynierii metabolicznej mogą być też czynniki transkrypcyjne, białka związane do swoich sekwencji regionów promotora docelowych genów i wpływające na poziom syntezy mRNA [12]. Produkcja metabolitów wtórnych podlega bowiem ścisłej regulacji dzięki skoordynowanej kontroli genów biosyntezy przez te czynniki. Wydaje się, że stosowanie tych czynników transkrypcyjnych może być sposobem uniknięcia czasochłonnych badań nad poszczególnymi etapami szlaków syntezy. Mogą zwiększać poziom enzymów bez konieczności wywoływania nadekspresji poszczególnych genów przemiany [17].

## Elicytory

Wspomniane podejścia eksperymentalne, oparte na technikach inżynierii genetycznej należą do nowszych nurtów badań. Pozostają w bezpośrednim związku z inżynierią metaboliczną, która umożliwiła wykorzystanie kultur HR do tworzenia *de novo* szlaków metabolicznych i obejmuje trzy główne nurty działań: nadprodukcję pożądanego związku, ograniczanie produkcji związków niepożądanych oraz wytwarzania nowych substancji.

Sposobów wcześniej wykorzystywanych do zwiększania wydajności produkcji metabolitów w roślinach było wiele, od wyboru linii wytwarzających możliwie duże pule pożądanego produktu i optymalizacji warunków hodowli dla wyselekcjonowanych linii, po prace nad zmianą ploidalności genomów [54]. Liczne prace dotyczą też powszechnego stosowania elicytorów [79]. Potencjał elicytorów abiotycznych i biotycznych w indukcji i wzmacnianiu wytwarzania metabolitów wtórnych w różnych układach hodowlanych jest dobrze znany [75]. Elicytory mogą być wytwarzane na zasadzie reakcji obronnej roślin i mogą indukować m.in. ekspresję genów związanych ze szlakami syntezy i akumulacji MW [25]. Kilka strategii biotechnologicznych opartych zostało właśnie o wykorzystanie elicytorów w celu zwiększenia produkcji pożądanego związku [5]. Przykładem elicytora skutecznie stosowanego w roślinnych kulturach *in vitro* jest m.in. jasmonian metylu, związek zwiększający syntezę i akumulację licznych metabolitów w kulturach HR: artemizyniny w *Artemisia annua* [82], cytostatyku taksanu w *Taxus x media* var. *Hicksii* [106], glicyryzyny w *Glycyrrhiza inflata* [116] czy andrografolidu w *Andrographis paniculata* [102]. Obecność jasmonianu podnosiła aktywność genów ostatnich etapów szlaku syntezy taksanu [106]. Elicytory doprowadzają do wzrostu wytwarzania MW za pomocą jednego lub kilku mechanizmów m.in. przez modulowanie szlaków syntezy, akumulacji związków czy ograniczenie tempa ich degradacji [88,105].

Coraz pełniejsza wiedza na temat molekularnych mechanizmów wpływu elicytorów na metabolizm MW może się znacząco przyczynić do przełamania ograniczeń w ich



produkcji na dużą skalę [99]. Wyniki badań wykazują, że nie zawsze jednoczesna obecność więcej niż jednego elicytora przynosi pozytywne rezultaty, niekiedy obserwowano też wzrost produkcji MW podając je w różnym okresie prowadzenia hodowli [98].

Skutki traktowania kultur HR różnymi elicytorami mogą być łączone z analizą mikromacierzy transkryptomów. Pozwala wskazać zróżnicowanie wzorów ekspresji genów związanych z syntezą MW oraz genów odpowiedzi na stres w badanym systemie, tym samym ułatwia identyfikację właściwych genów i ewentualne opracowywanie narzędzi do projektowania nowych strategii zwiększających ich aktywność [122].

### Korzenie włośnikowate źródłem pozyskiwania terpenoidów i alkaloidów o znaczeniu medycznym

Metabolity wtórne stanowią liczną i niejednorodną chemicznie grupę związków. Te z nich (pochodzenia roślinnego), które najpowszechniej są stosowane jako substancje czynne farmakologicznie reprezentują zwykle jedną z kilku rodzin: terpenoidów, alkaloidów, antrachinonów, poliketydów, fenylopropanoidów bądź flawonoidów. Poniżej zaprezentowano przykłady wybranych związków o właściwościach terapeutycznych uzyskiwanych w systemach kultur HR, należących do terpenoidów i alkaloidów, dwóch najbogatszych klas metabolitów wtórnych. Szczególną uwagę poświęcono związkowi, które ze względu na znaczący potencjał swoich aktywności farmakologicznych znalazły najszersze zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń.

**Terpenoidy** (inaczej izoprenoidy) to naturalne węglowodory, należące do metabolitów wtórnych, wydzielane głównie przez rośliny, stanowią jedną z ważnych biologicznie podklas lipidów prenylowych. Jako najbogatsza, najbardziej zróżnicowana strukturalnie grupa metabolitów wtórnych biorą udział m.in. w interakcji roślina-patogen/szkodnik [65], roślina-roślina [8], uczestniczą też w regulacji wzrostu i rozwoju. Biosynteza terpenów w roślinie odbywa się w tkankach wegetatywnych, kwiatach i niekiedy w korzeniach [15]. Stosowany w literaturze podział terpenoidów oparty jest na liczbie pięciowęglowych jednostek izoprenu, stanowiącego podstawę ich struktury.

Znanych jest ponad 55 tys. terpenoidów, wśród nich: substancje smakowe, zapachowe, dodatki do żywności o charakterze witamin i te wykorzystywane do celów leczniczych [3]. U Eukaryota syntetyzowane są na drodze szlaku mewalonowego, u bakterii, glonów i roślin wyższych powstawać mogą też w szlaku fosforanu deoksyksylulozy (DXP). Koncentrując się na związkach tej grupy o właściwościach terapeutycznych, zaprezentowano przykłady pozyskiwania wybranych terpenoidów z wykorzystaniem do tego celu kultur HR.

**Artemizyna** to seskwiterpen laktonowy (3 jednostki izoprenowe), powszechnie stosowany w leczeniu malarii [1]. Mannan i wsp. wykazali możliwość podwyższenia jej za-

wartości, uzyskiwanej z korzeni włośnikowatych bylicy (*Artemisia* sp.) [66]. Związek ten, wraz z analogami, hamuje tworzenie hemozoiny, zapobiega też degradacji hemoglobiny. Oprócz działania przeciwmalarycznego wskazano również jego antynowotworową aktywność [14]. Mechanizm działania artemizyny w komórkach zarodźca, wywołującego malarię, jak i w komórkach nowotworowych nie został w pełni poznany, niemniej jej skuteczność w leczeniu wymienionych chorób uzasadnia celowość prac nad opracowaniem efektywnych sposobów pozyskiwania tego związku. Wspomniani autorzy uzyskali korzenie włośnikowate na siewkach bylicy (*Artemisia dubia* oraz *Artemisia indica*), doprowadzając w nich do podwyższenia stężenia artemizyny. Kultury HR bylicy rocznej (*A. annua* L.), mogą być również źródłem nowo opisanego przez Zhai i wsp. [121] seskwiterpenu AMDT, którego aktywność cytotoksyczną wykazano w stosunku do wielu linii komórkowych nowotworów ludzkich. Szczególnie spektakularny wynik uzyskano wobec komórek raka płuca linii 95-D, gdzie dochodziło do indukcji szlaku apoptozy zależnego od kaskady kaspaz [121]. Rezultaty dotychczasowych badań pozwalają zakwalifikować AMDT jako nowy, skuteczny chemioterapeutyk.

Escyna bywa stosowana w: schorzeniach żył, obrzęków pooperacyjnych czy odczynach zapalnych. To naturalna mieszanina saponin triterpenowych, występujących w owocach kasztanowca (*Aesculus hippocastanum* L.). Čalić-Dragosavac i wsp. wskazali, że korzenie włośnikowate, powstałe po inokulacji androgenicznych zarodków kasztanowca zawieszoną *A. rhizogenes*, mogą stanowić alternatywne źródło pozyskiwania escyny [10].

Gatunkiem, którego prozdrowotne właściwością sprawiają, że od wieków wyciągi z niego są stosowane w medycynie naturalnej, jest żeń-szeń (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Stanowi bogate źródło ginsenozydów, tj. triterpenowych saponin, obecnych głównie w korzeniu. Zidentyfikowano już ponad 100 typów ginsenozydów o różnorodnych właściwościach, od antynowotworowych, przez przeciwcukrzycowe [16] aż po immunostymulujące [73].

**Protopanaksadiol i protopanaksatriol** to przykład saponin wykazujących właściwości antyoksydacyjne, antynowotworowe, przeciwcukrzycowe, zmniejszają też podatność kości na złamania [100]. Zmiany w strukturze kości, są związane z aktywnością wyspecjalizowanych komórek (osteoblastów i osteoklastów), zachodzą przez całe życie. Z wiekiem (szczególnie w okresie postmenopauzalnym), procesy związane z resorpcją kości przeważają nad procesami prowadzącymi do ich formowania. Osteoporozę cechuje ubytek masy kostnej oraz wzrost kruchości szkieletu, zwiększające prawdopodobieństwo złamań kości kończyn czy kręgosłupa [62]. Molekularny mechanizm aktywności saponin triterpenoidowych nie został w pełni poznany, istnieją jednak dane wskazujące na ich zdolności do spowalniania rozwoju choroby przez hamowanie wytwarzania czynnika jądrowego  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), stymulacji m.in. fosfatazy alkalicznej (ALP), kolagenu typu I (Col-I), czynnika transkrypcyjnego RUNX2 oraz zwiększenia

cyrkulacji krwi. Kim i wsp. prowadząc badania z wykorzystaniem kultur HR żeń-szenia (*P. ginseng* C.A. Meyer) wykazali stymulujący wpływ jasmonianu metylu na proces biosyntezy ginsenozydów typu protopanaxadiolu, uzyskując prawie 10-krotny wzrost biosyntezy ginsenozydów grupy Rb i niemal 4-krotny wzrost ginsenozydów grupy Rg, co uznano za obiecujący rezultat w kontekście możliwości pozyskiwania tych wartościowych substancji [46].

**Gossypol** izolowany z nasion bawełny (*Gossypium* sp.), to kolejny z terpenoidów, wykorzystywany w lecznictwie, o czym decydują jego właściwości przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, nicieniobójcze i co szczególnie cenne, działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne wobec licznych postaci ludzkich nowotworów (m.in. raka stercza) [125]. Gossypol wykazuje szeroki zakres aktywności: blokuje przebieg cyklu komórkowego na poziomie faz G1/G0, ogranicza aktywność enzymów jądrowych: polimerazy DNA  $\alpha$  i topoizomerazy II, hamuje syntezę DNA, redukuje aktywność białkowej kinazy C, wpływa na białka regulujące cykl komórkowy (Rb, cyklina D-1), obniża metabolizm komórkowy, blokuje też angiogenezę. Frankfater i wsp. opisali wytwarzanie 6-metoksygossypolu oraz 6,6'-dimetoksygossypolu w kulturach HR bawełny (*Gossypium barbadense* L.), stosując jako elicytor jasmonian metylu, uzyskali 8-krotne zwiększenie stężenia gossypolu (w tym jego zmetylowanej postaci) [21].

Inne przykłady pozyskiwania związków terpenoidowych z kultur korzeni włośnikowatych przedstawili Kuźma i wsp. [53]. Autorzy omawiają antybakteryjną aktywność 7-(2-oksoheksylo)-taksodionu, pochodnej taksodionu pochodzącej z n-heksanowego ekstraktu korzeni włośnikowatych szafwii austriackiej (*Salvia austriaca* Jacq.). Patogeny zdolne do tworzenia biofilmu są odpowiedzialne za wiele trudnych do leczenia zakażeń ze względu na dużą lekooporność, dlatego bardzo istotne stają się badania nad nowymi substancjami, mogącymi mieć zastosowanie w terapii zakażeń. Wskazana przez autorów nowa pochodna taksodionu wykazuje minimalne stężenie hamujące (MIC) dla opornych na metycylinę szczepów gronkowca (MRSA) na poziomie 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oraz enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) w stężeniu 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Wyniki badań pozwalają uznać 7-(2-oksoheksylo)-taksodionu za skuteczny diterpenoid, o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwbiofilmowych [53].

Ionkova i wsp. wskazali korzenie włośnikowate traganka błoniastego (*Astragalus membranaceus*), jako alternatywne źródło pozyskiwania astragalozydów (saponin trójterpenowych) [36]. Wyodrębnienie odpowiedniego klonu korzeni, indukowanych *A. rhizogenes* (szczep LBA 9402), pozwoliło na uzyskanie tych związków w bioreaktorze na poziomie 1,64, 1,12 i 1,08% odpowiednio dla astragalozydu I, II i III. W świetle prezentowanych danych jest to najwyższy poziom uzyskany w warunkach *in vitro*. Wymienione związki wykazują wszechstronne działanie na ludzki organizm. Przykładem może być astragalozyd IV, który skutecznie chroni mięsień sercowy przed uszkodzeniami powodowanymi niedotlenieniem czy wzmoc-

oną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej. Wykazuje też działanie fotoprotekcyjne, przeciwko fotostarzeniu fibroblastów, indukowane ultrafioletem A, indukując jednocześnie proliferację fibroblastów i hamując degradację kolagenu. Pozytywny wpływ astragalozydu IV wykazano również w uszkodzeniach niedokrwienno-reperfuzyjnych u szczurów po transplantacji wątroby. Wykazano również udział tego związku w zwiększaniu poziomu ekspresji receptora glukokortykoidowego i inhibicji aktywności transkrypcyjnej jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B. Aktywność opisywanej saponiny trójterpenowej udowodniono również w układzie nerwowym, gdzie łagodzi spadek stężenia dopaminy, co w przyszłości może być wykorzystywane w terapii choroby Parkinsona [86].

Korzenie włośnikowate dzwonkowca (*Codonopsis lanceolata*) to inne wartościowe źródło saponin triterpenoidowych [45]. Ekstrakt z korzenia tej rośliny od dawna był stosowany jako lek podawany w stanach zapalnych oskrzeli czy kaszlu [35]. Kim i wsp. opisali uzyskiwanie kultur HR dzwonkowca, powstałych w wyniku transformacji z użyciem szczepu R1000 *A. rhizogenes* [45]. Analizy zawartości triterpenoidów wykazały ich podwyższony poziom w porównaniu do korzeni nietransformowanych. Jeden z triterpenoidów - lancemazyd A wykazywał właściwości przeciwwapalne oraz przeciwnowotworowe, co potwierdza zasadność prac nad opracowaniem efektywnych sposobów pozyskiwania takich związków w opisany sposób.

**Alkaloidy** są drugą z licznych i zróżnicowanych grup metabolitów wtórnych [93]. Wiele z nich wykazuje właściwości toksyczne, stanowiąc element systemu obrony roślin przed atakiem patogenów i roślinożerców. Związki należące do tej grupy pełnią też funkcję alternatywnego magazynu azotu oraz chronią przed negatywnymi skutkami nadmiernej promieniowania UV [85]. Różnorodność chemiczna alkaloidów sprawia, że w literaturze spotkać można różne kryteria ich klasyfikacji. Jeden z podziałów wyróżnia alkaloidy właściwe, zawierające atom azotu w pierścieniu heterocyklicznym oraz protoalkaloidy (alkaloidy nieheterocykliczne), w strukturze których azot występuje w łańcuchu bocznym. Autorem bardziej szczegółowego podziału alkaloidów heterocyklicznych jest Evans, który wyróżnia alkaloidy: pirolowe i piroldynowe, irolizydynowe, pirydynowe i piperidynowe, tropanowe, chinolinowe, izochinolinowe, aporfinowe, chinolizydynowe, indolowe, indolizydynowe, imidazolowe, purynowe, steroidowe oraz terpenowe [20]. Wiele z wymienionych alkaloidów może wykazywać znaczący wpływ na organizm człowieka [29]. Poniżej omówiono wybrane przykłady alkaloidów o zastosowaniu medycznym, pozyskiwanych z kultur korzeni włośnikowatych.

**Alkaloidy indolowe.** Wspomniane już wcześniej winblastyna i winkrystyna to związki izolowane z *Catharanthus roseus*. Są terapeutykami wspomagającymi w terapii nowotworów układu krwiotwórczego (np. białaczki lub chłoniaka) czy guzów litych (pęcherza oraz sutka). Winblastyna znalazła zastosowanie w leczeniu ziarnicy złośliwej oraz chłoniaków niezłośliwych, zaś winkrystyna dodatkowo jest wykorzystywana w zwalczaniu ostrej białaczki u dzie-



ci, mięsaków oraz raka piersi [85]. Głównym problemem w wydajnym pozyskiwaniu wymienionych związków jest ich niski poziom syntezy *in planta*. Alternatywa w postaci syntezy chemicznej jest skomplikowana i kosztochłonna. Biorąc powyższe pod uwagę, ważnym stają się badania nad zwiększeniem wytwarzania alkaloidów, wśród których wiele może stanowić cenne związki terapeutyczne. Jedną z strategii ich otrzymywania polega na wykorzystaniu kultur HR i modulacji wybranego etapu szlaku ich syntezy. Wang i wsp. zastosowali takie podejście wobec wspomnianego *C. roseus*, do którego wprowadzono geny G10H i ORCA3 [114]. Pierwszy z wymienionych jest odpowiedzialny za syntezę monooksygenazy cytochromu P450, enzym odpowiedzialny za hydrolizę geraniolu do 10-hydroksygeraniolu, jednego z pierwszych substratów szlaku syntezy alkaloidów indolowych. Gen ORCA3 koduje czynnik transkrypcyjny, który wzmacnia ekspresję genów zaangażowanych w szlaki syntezy metabolitów oraz zwiększa poziom ekspresji alkaloidów indolowych. Otrzymano 6,5 razy wyższe stężenie katarantyny w stosunku do prób kontrolnych [114]. Również Tang i wsp. opisują pozytywne rezultaty zarówno w syntezie katarantyny, jak i windoliny w kulturach HR tego gatunku [109]. W wyniku transformacji genetycznej osiągnięto nadekspresję samego czynnika ORCA3, a jej konsekwencją była korzystna zmiana stężenia katarantyny i windoliny, odpowiednio: 2,49 i 4,2 razy, co uznano za pochodną aktywacji enzymów zaangażowanych w szlak syntezy windoliny [109]. Inny sposób podnoszenia poziomu alkaloidów indolowych w kulturach korzeni włośnikowatych polega na stosowaniu odpowiednich elicytorów. Wzrost akumulacji ajmalicyny i katarantyny uzyskano po zastosowaniu wymienianego wcześniej jasmonianu metylu, a dodanie etylenu było korzystne jedynie w przypadku katarantyny [111]. Do opisywanej grupy alkaloidów należy też ajmalicyna stosowana jako lek antyarytmiczny w terapii chorób układu krążenia [20].

Alkaloidy tropanowe reprezentują hioscyjamina (izomer atropiny) i skopolamina, najczęściej wytwarzane alkaloidy w kulturach korzeni HR, a jednocześnie bodaj najważniejsze z tej grupy pod względem potencjału terapeutycznego. Oba wykazują właściwości antycholinergiczne i z powodzeniem mogą być stosowane, jako środki przeciwskurczowe [39,85]. Skopolamina działa także uspokajająco na centralny układ nerwowy i działa amnestycznie. Skopolamina parasympatykolytyczna znalazła zastosowanie w zmniejszeniu aktywności przywspółczulnego układu nerwowego (oddziałuje na oko, przewod pokarmowy, gruczoły ślinowe, serce, oskrzela). Ma to duże znaczenie w premedykacji, przed aplikacją znieczulenia. Ze względu na specyficzne właściwości wykorzystuje się ją także w terapii chorób serca i przewodu pokarmowego. Ponadto, skopolamina niweluje skutki choroby lokomocyjnej ze względu na działanie przeciwwymiotne [87]. Obecnie związki te pozyskuje się dzięki wykorzystaniu roślin z rodziny *Solanaceae*, w tym *Hyoscyamus niger*, *Scopolia tangutica*, *Atropa belladonna*, *Anisodus tanguticus* oraz niektórych przedstawicieli rodzaju *Datura* [11, patent CN 101230349 A]. Skopolamina z bardzo dobrą wydajnością jest izolowana z kultur HR *H. Niger* [126]. Uzyskano to m.in. przez wspomnianą już nadekspresję ge-

nów kodujących N-metylotransferazę putrescyny (*pmt*) oraz 6- $\beta$ -hydroksylazę hioscyjaminy (*h6h*). Najbardziej efektywna linia komórkowa wytwarzała 9-krotnie więcej skopolaminy niż typ dziki, a 2-krotnie więcej niż rośliny transformowane tylko jednym z genów – *h6h*. Wymienione enzymy biorą udział w szlaku syntezy skopolaminy, gdzie 6- $\beta$ -hydroksylaza hioscyjaminy katalizuje reakcję tworzenia skopolaminy z hioscyjaminy [123]. Dwa inne geny - *Pmt* i *h6h*, wprowadzone do genomów *Scopolia parviflora* i *A. belladonna* zwiększały w ich tkankach akumulację hioscyjaminy i skopolaminy. W pierwszym z wymienionych gatunków akumulacja hioscyjaminy wzrosła 1,5, a skopolaminy 3 razy, w drugim odpowiednio 24- i 4-krotnie w stosunku do roślin kontrolnych niepoddanych transformacji [40,118]. Alkaloidy tropanowe skutecznie otrzymywano w kulturach korzeni transformowanych *A. belladonna* w bioreaktorach już w końcu XX w. [56]. Później, dokonano tego z wykorzystaniem kultur korzeni HR *H. niger* oraz *Atropa belladonna* [patent CN 1884545 B]. Istotną rolę w uzyskaniu zadowalającego poziomu syntezy hioscyjaminy i skopolaminy, odgrywa typ bioreaktora stosowany do prowadzenia hodowli, a obecność w niej jasmonianu metylu zwiększyła produkcję skopolaminy aż o 146%. Skuteczna okazała się też permeabilizacja z użyciem DMSO. Wykorzystane w czasie badań bioreaktory mogą osiągać pojemność nawet do 10 000 l, co okazuje się przydatne w produkcji alkaloidów na dużą skalę [39]. Do produkcji skopolaminy i hioscyjaminy w bioreaktorach wykorzystuje się też kultury *Brugmansia candida* [11] oraz *Hyoscyamus muticus* [patent WO 1999002720 A1].

Alkaloidy terpenowe z atomem azotu zlokalizowanym poza układem cyklicznym są reprezentowane przez paklitaksel, alkaloid terpenowy będący substancją czynną leku Taxol, skutecznego w terapii nowotworów sutka, pęcherza moczowego, szyjki macicy, czerniaka oraz mięsaka Kaposiego związanego z chorobą AIDS. Alkaloid ten wyizolowano z kory cisza zachodniego *Taxus brevifolia*, gatunku rzadkiego o wyjątkowo powolnym wzroście. Zawartość paklitakselu szacuje się na 0,01% suchej masy naturalnego surowca [106]. Ze względu na oczywiste ograniczenia, źródłem tego cennego alkaloidu są obecnie kultury tkankowe *Taxus sp.* [patent WO 1993023555 A1]. Związek można otrzymywać również w kulturach korzeni włośnikowatych *Taxus x media var. Hicksii* [106]. Dodatek fenyloalaniny, prekursora jego syntezy oraz jasmonianu metylu pozwolił na aż 120-krotne zwiększenie akumulacji paklitakselu w porównaniu do kultur, gdzie takich dodatków nie stosowano [106]. Jeszcze lepszą wydajność otrzymano wykorzystując *Taxus cuspidata* po uzupełnieniu podłoża hodowlanego w kulturze jasmonianem metylu [44]. Przeciwnowotworowa aktywność opisywanego związku polega na hamowaniu proliferacji komórek przez jego wiązanie z powierzchnią mikrotubul wrzeciona podziałowego (z podjednostką  $\beta$  heterodimeru tubuliny). Oprócz utrudniania rozdziału wrzeciona, wpływa on również na hamowanie depolimeryzacji tubuliny, prowadząc do gromadzenia pęczków mikrotubul i w konsekwencji, zahamowanie ich reorganizacji.

Alkaloidy izochinolinowe, reprezentowane są przez najpowszechniejsze wśród nich morfinę i kodeinę działające prze-

ciwólowo, przeciwbiegunkowo, a także tubokurarynę, stosowaną w chirurgii jako środek zwiotczający mięśnie szkieletowe (w postaci rozpuszczalnego chlorku D-tubokuraryny) [76]. Związki te występują w *Papaver somniferum*, roślinie leczniczej najwcześniej wykorzystywanej przez człowieka w celach leczniczych [31]. W 2000 r. pojawiły się pierwsze doniesienia dotyczące skutecznej transformacji *P. somniferum* oraz *Eschscholzia californica*. Transformowane kultury korzeni włośnikowatych wytwarzały te same alkaloidy na identycznym poziomie, co rośliny niepoddane transformacji, niemniej ich wzrost był znacznie szybszy, co może się okazać istotne w badaniach mechanizmów szlaków biosyntezy tych ważnych pod względem medycznym związków [76]. *Papaver bracteatum* to gatunek alternatywnie wykorzystywany w pozyskiwaniu alkaloidów benzyloizochinolinowych. W jej kulturach HR gdzie indukowano nadekspresję genu 7-o-acetylotransferazy salutaridynolu znacząco podniesiono poziom akumulacji tebainy, kodeiny i morfiny [94].

### Inne metabolity wtórne o znaczeniu medycznym produkowane w systemach HR

Spośród niewymienionych metabolitów wtórnych szczególne nadzieje wiąże się z tymi, które najprawdopodobniej będą mogły być wykorzystane w różnych postaciach terapii przeciwnowotworowych. Niżej omówiono kilka z nich.

*Witanoloid A* (pochodzący z *Withania somnifera*) – związek wykazujący aktywność przeciwnowotworową w raku płuc, sutka oraz wątroby. Wpływa ochronnie na tkanki neuronalne przez stymulację aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej, wykazuje działanie przeciwłkowe i antydepresyjne, wpływa na podniesienie aktywności makrofagów otrzewnowych oraz zdolność regeneracji oraz naprawy połączeń synaptycznych. Wykazano również przeciwiwrotniakową aktywność witanoloidu A wobec szczepów *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *P. berghei* i *Leishmania mexicana* wywołujących chorobę Chagasa [2,72,101].

*Sylimaryna* (zawarta w *Silybum marianum*) – działa przeciwapalnie, rozkurczowo, detoksykująco, żółciotwórczo i żółciopędnie, stabilizuje strukturę błon komórkowych oraz obniża stężenie cholesterolu we krwi [4]. Wykazano również, że związek ten hamuje wytrącanie się blaszek miażdżycowych i chroni wątrobę przed szkodliwym działaniem trucizn, m.in. mikotoksyn muchomor sromotnikowego [92]. *Sylimaryna* hamuje również podziały komórek nowotworowych, zapobiega marskości wątroby i zapobiega wytrącaniu się złogów oraz kamieni żółciowych [42,43,84].

*Antrachinon* (zawarty w *Rubia akane*) – ma właściwości przeciwnowotworowe i wspomaga terapię antynowotworową [70]. Pochodna antrachinonu – emodyna, w połączeniu z odpowiednimi chemioterapeutykami jest stosowana w nowotworach spowodowanych przez onkogen p185, powiązany z aktywnością kinazy tyrozynowej HER2 [33]. Związek ten uwalnia komórki rakowe na działanie leków, intensywny proces nowotworzenia w guzie prowadzi bowiem do leko-

oporności. Ważny jest również to, iż emodyna wzmacnia działanie antyneoplastyczne tych chemioterapeutyków. Związek wykazuje również aktywność immunosupresyjną [38,58,64,77].

*Glicyryzyna* (zawarta w *Glycyrrhiza gabra*) – wykazuje silne właściwości wiązania wody w skórze, działanie antyalergiczne, immunostymulujące, przeciwojotokowe, wykrztuśne, przeciwwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, moczopędne i przeciwbrzękowe [96]. Badania wykazały, że związek ten ma również właściwości przeciwnowotworowe – inhibuje proliferację i migrację komórek stymulowanych przez białko HMGB1 [103]. HMGB1 odgrywa rolę jako potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej. Wzrost stężenia białka HMGB1 w komórkach nowotworowych, jak i w krwiobiegu obserwuje się u osób chorych na różnego rodzaju nowotwory. Białko to stymuluje wiele innych białek biorących udział w proliferacji komórek nowotworowych. Zahamowanie jego uwalniania, czy inhibicja jego aktywności w komórkach podczas terapii przeciwnowotworowej, wydaje się obiecującym podejściem terapeutycznym. Poznano wiele inhibitorów białka HMGB1, które mogą być użyte w terapii przeciwnowotworowej [67,103].

*Rutyna* (zawarta w *Fagopyrum esculentum*) – związek z grupy flawonoidów, tradycyjnie używany jako środek przeciwgrzybiczny, przeciwbakteryjny, przeciwalergiczny, ale także w leczeniu wielu chorób przewlekłych jak rak, cukrzyca, nadciśnienie i hipercholesterolemia [34]. Zapobiega również powstawaniu wysoce reaktywnych wolnych rodników (właściwości antyoksydacyjne) oraz spowalnia utlenianie witaminy C, przedłużając jej działanie [30]. Wykazano również, że związek ten zmniejsza cytotoksyczność utlenionego cholesterolu i działa przeciwwzapalne [57,95].

*Azjatykozyd* (zawarty w *Centella asiatica*) – to triterpen stosowany w dermatologii, dzięki zdolności do indukcji tworzenia kolagenu oraz angiogenezy [26]. Ponadto znalazł zastosowanie jako środek poprawiający elastyczność skóry, działając przeciwmarszczkowo. Wykazuje również aktywność antibakteryjną, przeciwwzapalną i przeciwbrzękową [9,47,91].

*Deoursyna* (*dekursyna*) (z *Angelica gigas*) – wykazuje właściwości przeciwnowotworowe. W przypadku raka stercza – indukuje apoptozę komórek nowotworowych m.in. przez znaczący wzrost aktywności kompleksu Cip1/p21 w fazie G1 cyklu komórkowego [119]. Związek indukuje też apoptozę ludzkich komórek szpiczaka mnogiego za pośrednictwem skoordynowanej supresji szlaku sygnałowego kinazy mTOR/S6K1 i STAT3 [37]. Aktywność przeciwnowotworowa deoursyny przejawia się przez indukcję apoptozy i inhibicji angiogenezy również w odniesieniu do komórek rakowych gruczołu krokowego, pęcherza moczowego, raku jelita grubego i białaczki [48]. W medycynie ludowej, paraleki zawierające ten związek są stosowane w zapobieganiu i leczeniu chorób krwi, w tym niedokrwistości oraz jako środek tonizujący [37,52,117].

*Plumbagina* (zawarta w *Plumbago zeylanica*) – podobnie jak wyżej wymienione związki także plumbagina wykazuje





właściwości przeciwnowotworowe. Wykazano, że indukuje apoptozę komórek raka piersi spowodowanego nadekspresją onkogenu Her2 [41]. Ponadto, w przypadku raka płuc – indukuje apoptozę i autofagię przez inhibicję szlaku PI3K/Akt/mTOR, gdzie główną rolę odgrywają dwie kinazy serynowo-treoninowe: kinaza białkowa B (PKB, zwana również Akt) oraz jej substrat mTOR [60]. Przekaz sygnału drogą PI3K/Akt/mTOR jest dodatkowo uzależniony od aktywności fosfatazy PIP3 – PTEN, a w wielu zaawansowanych nowotworach (m.in. glejaku, czerniaku oraz raku żołądka, jajników, nerek, piersi i płuc) jest obserwowana mutacja powodująca jego wyciszenie, skutkująca wzrostem aktywności Akt oraz mTOR [80]. Badania prowadzone na plumbaginie wykazały, że działa przeciwmalarycznie i immunosupresyjnie [41,55,60,113].

*Dopamina* (zawarta w *Portulaca oleracea*) – stosowana jest jako lek w zapobieganiu ostrej niewydolności nerek (zwiększa perfuzję nerkową), podwyższa ciśnienie tętnicze i działa dodatnio na siłę skurczu mięśnia sercowego [18]. Ponadto jest stosowana we wstrząsie septycznym, kardiogenym, pourazowym, po operacjach kardiologicznych oraz w zaostrzeniu przewlekłej niewydolności krążenia [81].

Obiecujące rezultaty podobnych eksperymentów przełożyły się też na znaczną aktywność patentową zespołów, które zajmują się omawianą problematyką. Przedmiotem patentów są właśnie możliwości wykorzystania kultur korzeni włośnikowych do wytwarzania i pozyskiwania z nich substancji o właściwościach leczniczych. I tak np. patent nr US 7666677 B2 dotyczy strategii produkcji stilbenoidów (m.in. resweratrolu), patent nr US 2010048494 A1, opisuje możliwość pozyskiwania glikozydów flawonowych, czy patent nr EP1649743 B1, który opisuje procedurę pozyskiwania szikoniny. Przytoczone wyżej przykłady wskazują dodatkowo korzenie włośnikowate z różnych gatunków roślin, jako ważne źródło izolacji cennych metabolitów wtórnych.

## PODSUMOWANIE

Duży potencjał kultur korzeni włośnikowatych (HR), jako stabilnego i bogatego źródła biologicznie aktywnych substancji chemicznych wzbudza duże zainteresowanie społeczności naukowej i wynika z wielu pozytywnych doświadczeń uzyskanych w laboratoriach badawczych. Szczególnie ważne wydaje się wykorzystanie potencjału omawianych kultur w pozyskiwaniu substancji o właściwościach terapeutycznych,

do których należą również wybrane metabolity wtórne. Prowadzone od lat badania zmierzają w kierunku opracowania metod optymalnej eksploatacji tych systemów, co mogłyby stworzyć szersze perspektywy pozyskiwania na skalę produkcyjną wielu cennych związków, w tym metabolitów wtórnych. Wzbogacanie wiedzy na temat szlaków metabolicznych roślin oraz mechanizmów ich regulacji może się stać ważnym narzędziem pozwalającym, w większym stopniu, wykorzystać potencjał kultur HR w biosyntezie znanych biofarmaceutyków i projektowaniu nowych sposobów biosyntezy związków o działaniu farmakologicznym.

Zdecydowana większość przytoczonych przykładów wykorzystania kultur HR do wytwarzania metabolitów wtórnych o potwierdzonym potencjale terapeutycznym dotyczy prac prowadzonych na poziomie naukowo-badawczym. Wyniki te w stosunkowo niewielkim stopniu znajdują odbicie w produkcji omawianych związków podejmowanej przez firmy biotechnologiczne.

Możliwe, że niedawne wprowadzenie w życie Protokołu z Nagoi (październik 2014), dotyczącego dostępu do zasobów genetycznych oraz uczciwego i sprawiedliwego podziału korzyści wynikających z ich wykorzystania, przyczyni się do zmiany sytuacji. Wymieniony dokument ma na celu normalizację sytuacji prawnej i w swoim założeniu ma zapewnić większą przejrzystość dla dawców oraz użytkowników zasobów genetycznych (w tym substancji bioaktywnych, ekstraktów roślinnych). Ma zastosowanie do zasobów genetycznych, zarówno organizmów dziko występujących, jak i tych użytkowanych w gospodarce, a także tradycyjnej wiedzy związanej z tymi zasobami. Protokół nie narusza jednocześnie praw i obowiązków wynikających z innych porozumień międzynarodowych, jak choćby gatunków roślin uprawnych objętych treściami Międzynarodowego Traktatu o Zasobach Genetycznych Roślin dla Wyżywienia i Rolnictwa.

Polskie prawodawstwo znajduje się na etapie opracowania krajowych regulacji wdrażających Protokół i Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) NR 511/2014 z dnia 16 kwietnia 2014 r. w tym zakresie. Postanowienia wymienionego dokumentu mogą mieć wpływ na wybór dalszych kierunków rozwoju nie tylko przemysłu farmaceutycznego, ale również aktywności wybranych sektorów przemysłu kosmetycznego czy spożywczego.

## PIŚMIENNICTWO

[1] Aditya N.P., Vathsala P.G., Vieira V., Murthy R.S., Souto E.B.: Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2013; 201-202: 1-17

[2] Agata K., Kusiak J., Stępień B., Bergier K., Kuźniak E.: Bioaktywne metabolity wtórne roślin z rodzaju *Physalis*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 665-673

[3] Aharoni A., Jongsma M.A., Kim T.Y., Ri M.B., Giri A.P., Verstappen F.W., Schwab W., Bouwmeester H.J.: Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.*, 2006; 5: 49-58

[4] Alkuraishy H.M., Alwindy S.: Beneficial effects of silymarin on lipid profile in hyperlipidemic patients: placebo controlled clinical trial. *WebmedCentral Pharmacology*, 2012; 3: WMC002966

[5] Angelova Z., Georgiev S., Ross W.: Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotech. Equip.*, 2006; 20: 72-83

[6] Ayora-Talavera T., Chappell J., Lozoya-Gloria E., Loyola-Vargas V.M.: Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002; 97: 135-145

- [7] Bhalla R., Narasimhan K., Swarup S.: Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep.*, 2005; 24: 562-571
- [8] Blande J.D., Li T., Holopainen J.K.: Air pollution impedes plant-to-plant communication, but what is the signal? *Plant Signal. Behav.*, 2011; 6: 1016-1018
- [9] Bylka W., Znajdek-Awiżeń P., Studzińska-Sroka E., Dańczak-Pazdrowska A., Brzezińska M.: *Centella asiatica* in dermatology: an overview. *Phytother. Res.*, 2014; 28: 1117-1124
- [10] Calić-Dragosavac D., Zdravković-Korać S., Savikin-Fodulović K., Radojević L., Vinterhalter B.: Determination of escin content in androgenic embryos and hairy root culture of *Aesculus hippocastanum*. *Pharm. Biol.*, 2010; 48: 563-567
- [11] Cardillo A. B., Otalvaro A.A., Busto V.D., Rodriguez Talou J., Velasquez L.M., Giulietti A.M.: Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by *Brugmansia candida* hairy root cultures in bioreactors. *Process Biochem.*, 2010; 45: 1577-1581
- [12] Chandra S., Chandra R.: Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem. Rev.*, 2011; 10: 371-395
- [13] Chandra S., Chandra R., Sharma H.P., Jha S.: *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation of *Spilanthes paniculata* (DC.) Jansen. *Int. J. Plant Sci.*, 2008; 3: 471-476
- [14] Chaturvedi D., Goswami A., Saikia P.P., Barua N.C., Rao P.G.: Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem. Soc. Rev.*, 2010; 39: 435-454
- [15] Cheng A.X., Lou Y.G., Mao Y.B., Lu S., Wang L.J., Chen X.Y.: Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.*, 2007; 49: 179-186
- [16] Choi K.T.: Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2008; 29: 1109-1118
- [17] Dare A.P., Schaffer R.J., Lin-Wang K., Allan A.C., Hellens R.P.: Identification of a cis-regulatory element by transient analysis of co-ordinately regulated genes. *Plant Methods*, 2008; 4: 17-27
- [18] Drozak J., Bryła J.: Dopamine: not just a neurotransmitter. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 405-420
- [19] Eibl R., Eibl D.: Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem. Rev.*, 2008; 7: 593-598
- [20] Evans W.C.: Alkaloids. W: *Pharmacognosy*, red.: Evans W.C., Trease G.E. Saunders Ltd, Philadelphia 2009, 353-415
- [21] Frankfater C.R., Dowd M.K., Triplett B.A.: Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2009; 98: 341-349
- [22] Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N., Raskin I.: Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep.*, 2003; 21: 1188-1193
- [23] Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Muller J., Xu J.: Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.*, 2012; 30, 528-537
- [24] Georgiev M.I., Ludwig-Muller J., Bley T.: Hairy root culture: copying nature in new bioprocesses. W: *Medicinal Plant Biotechnology*, red.: Arora R., CAB International, 2010, 156-175
- [25] Goel M.K., Mehrotra S., Kukreja A.K.: Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011; 165: 1342-1355
- [26] Gohil K.J., Patel J.A., Gajjar A.K.: Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2010; 72: 546-556
- [27] Gomez-Galera S., Pelacho A.M., Gene A., Capell T., Christou P.: The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep.*, 2007; 26: 1689-1715
- [28] Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P.: Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006; 9: 341-346
- [29] Guirimand G., Courdavault V., St-Pierre B., Burlat V.: Biosynthesis and regulation of alkaloids. W: *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, red.: Pua E.C., Davey M.R. Springer, Berlin Heidelberg 2010, 139-160
- [30] Guo R., Wei P., Liu W.: Combined antioxidant effects of rutin and vitamin C in Triton X-100 micelles. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007; 43: 1580-1586
- [31] Hagel J.M., Macleod B.P., Facchini P.J.: Opium poppy. W: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops VI*, red.: Pua E.C., Davey M.R. Springer, Berlin Heidelberg 2007, 169-187
- [32] Hendrawati O., Woerdenbag H.J., Hille J., Kayser O.: Metabolic engineering strategies for the optimization of medicinal and aromatic plants: realities and expectations. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen*, 2010; 15: 111-126
- [33] Hsu S.C., Chung J.G.: Anticancer potential of emodin. *BioMedicine*, 2012; 2: 108-116
- [34] Hunyadi A., Martins A., Hsieh T.J., Seres A., Zupko I.: Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. *PLoS One*, 2012; 7: e50619
- [35] Hyam S.R., Jang S.E., Jeong J.J., Joh E.H., Han M.J., Kim D.H.: Echinocystic acid, a metabolite of lancemaside A, inhibits TNBS-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.*, 2013; 15: 433-441
- [36] Ionkova I., Momekov G., Proksch P.: Effects of cycloartane saponins from hairy roots of *Astragalus membranaceus* Bge., on human tumor cell targets. *Fitoterapia*, 2010; 81: 447-451
- [37] Jang J., Jeong S.J., Kwon H.Y., Jung J.H., Sohn E.J., Lee H.J., Kim J.H., Kim S.H., Kim J.H., Kim S.H.: Decursin and doxorubicin are in synergy for the induction of apoptosis via STAT3 and/or mTOR pathways in human multiple myeloma cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013; 2013: 1-13
- [38] Jelassi B., Anachelin M., Chamouton J., Cayuela M.L., Clarysse L., Li J., Goré J., Jiang L.H., Roger S.: Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*, 2013; 34: 1487-1496
- [39] Jeremicz Z., Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., Królicka A., Sowiński P.: Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnol. Lett.*, 2014; 36: 843-853
- [40] Kang Y.M., Park D.J., Min J.Y., Song H.J., Jeong M.J., Kim Y.D., Kang S.M., Karigar C.S., Choi M.S.: Enhanced production of tropane alkaloids in transgenic *Scopolia parviflora* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyl transferase (PMT) and hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase (H6H). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 2011; 47: 516-524
- [41] Kawiak A., Zawacka-Pankau J., Lojkowska E.: Plumbagin induces apoptosis in Her2-overexpressing breast cancer cells through the mitochondrial-mediated pathway. *J. Nat. Prod.*, 2012; 75: 747-751
- [42] Khalili M., Hasanloo T., Kazemi Tabar S.K., Rahnama H.: Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. *Cell Biol. Int.*, 2009; 33: 988-994
- [43] Khalili M., Hasanloo T., Tabar S.K.: Ag<sup>+</sup> enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *POJ*, 2010; 3: 109-114
- [44] Kim J.A., Baek K.H., Son Y.M., Son S.H., Shin H.: Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 2009; 52: 144-150



- [45] Kim J.A., Kim Y.S., Choi Y.E.: Triterpenoid production and phenotypic changes in hairy roots of *Codonopsis lanceolata* and the plants regenerated from them. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2011; 5: 255-263
- [46] Kim O.T., Bang K.H., Kim Y.C., Hyun D.Y., Kim M.Y., Cha S.W.: Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2009; 98: 25-33
- [47] Kim O.T., Bang K.H., Shin Y.S., Lee M.J., Jung S.J., Hyun D.Y., Kim Y.C., Senong N.S., Cha S.W., Hwang B.: Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Rep.*, 2007; 26: 1914-1919
- [48] Kim W.J., Lee S.J., Choi Y.D., Moon S.K.: Decursin inhibits growth of human bladder and colon cancer cells via apoptosis, G1-phase cell cycle arrest and extracellular signal-regulated kinase activation. *Int. J. Mol. Med.*, 2010; 25: 635-641
- [49] Ko S., Liu J.R., Yamakawa T., Matsumoto Y.: Expression of the protective antigen (SpaA) in transgenic hairy roots of tobacco. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2006; 24: 251a-251g
- [50] Kolewe M.E., Gaurav V., Roberts S.C.: Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharm.*, 2008; 5: 243-256
- [51] Komarnytsky S., Borisjuk N., Yakoby N., Garvey A., Raskin I.: Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiol.*, 2006; 141: 1185-1193
- [52] Kumar N., Chornokur G.: Molecular targeted therapies using botanicals for prostate cancer chemoprevention. *Transl. Med.*, 2012; Suppl. 2: 005
- [53] Kuźma L., Wysokińska H., Różalski M., Budzyńska A., Więckowska-Szakiel M., Sadowska B., Paszkiewicz M., Kisiel W., Różalska B.: Antimicrobial and anti-biofilm properties of new taxodione derivative from hairy roots of *Salvia austriaca*. *Phytomedicine*, 2012; 19: 1285-1287
- [54] Lavania U.: Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Gene Res.*, 2005; 3: 170-177
- [55] Lee J.H., Yeon J.H., Kim H., Roh W., Chae J., Park H.O., Kim D.M.: The natural anticancer agent plumbagin induces potent cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells by inhibiting a PI-5 kinase for ROS generation. *PLoS One*, 2012; 7: e45023
- [56] Lee K.T., Suzuki T., Yamakawa T., Kodama T., Igarashi Y., Shimomura K.: Production of tropane alkaloids by transformed root cultures of *Atropa belladonna* in stirred bioreactors with a stainless steel net. *Plant Cell Rep.*, 1999; 18: 567-571
- [57] Lee S.Y., Cho S.J., Park M.H., Kim Y.K., Choi J.E., Park S.U.: Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2007; 37: 239-246
- [58] Lee Y.R., Yu D.S., Liang Y.C., Huang K.F., Chou S.J., Chen T.C., Lee C.C., Chen C.L., Chiou S.H., Huang H.S.: New approaches of PARP-1 inhibitors in human lung cancer cells and cancer stem-like cells by some selected anthraquinone-derived small molecules. *PLoS One*, 2013; 8: e56284
- [59] Li F.X., Jin Z.P., Zhao D.X., Cheng L.Q., Fu C.X., Ma F.: Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involu-crata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry*, 2006; 67: 553-560
- [60] Li Y.C., He S.M., He Z.X., Li M., Yang Y., Pang J.X., Zhang X., Chow K., Zhou Q., Duan W., Zhou Z.W., Yang T., Huang G.H., Liu A., Qiu J.X., Liu J.P., Zhou S.F.: Plumbagin induces apoptotic and autophagic cell death through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.*, 2014; 344: 239-259
- [61] Lichtenthaler H.K.: The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999; 50: 47-65
- [62] Lim L.S., Hoeksema L.J., Sherin K., ACPM Prevention Practice Committee: Screening for osteoporosis in the adult U.S. population: ACPM position statement on preventive practice. *Am. J. Prev. Med.*, 2009; 36: 366-375
- [63] Liu J., Dolan M.C., Reidy M., Cramer C.L.: Expression of bioactive single-chain murine IL-12 in transgenic plants. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2008; 28: 381-392
- [64] Liu Y.X., Shen N.Y., Liu C., Lv Y.: Immunosuppressive effects of emodin: an in vivo and in vitro study. *Transplant Proc.*, 2009; 41: 1837-1839
- [65] Luan J.B., Yao D.M., Zhang T., Walling L.L., Yang M., Wang Y.J., Liu S.S.: Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecol. Lett.*, 2013; 16: 390-398
- [66] Mannan A., Shaheen N., Arshad W., Qureshi R.A., Zia M., Mirza B.: Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica*. *Afr. J. Biotechnol.*, 2008; 7: 3288-3292
- [67] Mehrotra S., Kukreja A.K., Khanuja S.P.S., Mishra B.N.: Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.*, 2008; 11: 717-728
- [68] Mehrotra S., Rahman L.U., Kukreja A.K.: An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2010; 56: 161-172
- [69] Mishra B.N., Ranjan R.: Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2008; 49: 1-10
- [70] Moon M.K., Han Y.M., Lee Y.J., Lee L.H., Yang J.H., Kwon B.M., Kim D.K.: Inhibitory activities of anthraquinones from *Rubia akane* on phosphatase regenerating liver-3. *Arch. Pharm. Res.*, 2010; 33: 1747-1751
- [71] Moyano E., Jauhikainen K., Tammela P., Palazón J., Cusidó R.M., Piñol M.T., Teeri T.H., Oksman-Caldentey K.M.: Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J. Exp. Bot.*, 2003; 54: 203-211
- [72] Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Hahn E.J., Paek K.Y.: Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. *J. Integr. Plant Biol.*, 2008; 50: 975-981
- [73] Oh C.H., Kang P.S., Kim J.W., Kwon J., Oh S.H.: Water extracts of cultured mountain ginseng stimulate immune cells and inhibit cancer cell proliferation. *Food Sci. Biotechnol.*, 2006; 15: 369-373
- [74] Oksman-Caldentey K.M., Saito K.: Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005; 16: 174-179
- [75] Ono N., Tian L.: The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Sci.*, 2011; 180: 439-446
- [76] Park S.U., Facchini P.J.: *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *J. Exp. Bot.*, 2000; 51: 1005-1016
- [77] Park S.U., Lee S.Y.: Anthraquinone production by hairy root culture of *Rubia akane* Nakai: influence of media and auxin treatment. *Sci. Res. Essays*, 2009; 4: 690-693
- [78] Peebles C.A., Hong S.B., Gibson S.I., Shanks J.V., San K.Y.: Effects of terpenoid precursor feeding on *C. roseus* hairy roots over-expressing the alpha or the alpha and beta subunits of anthranilate synthase. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006; 93: 534-540
- [79] Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L.: Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010; 698: 167-184
- [80] Polivka J., Janku F.: Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol. Ther.*, 2014; 142: 164-175

- [81] Pollier J., Moses T., Goossens A.: Combinatorial biosynthesis in plants: a (p)review on its potential and future exploitation. *Nat. Prod. Rep.*, 2011; 28: 1897-1916
- [82] Putalun W., Luealon W., De-Eknamkul W., Tanaka H., Shoyama Y.: Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol. Lett.*, 2007; 29: 1143-1146
- [83] Rahman L.U., Kitamura Y., Yamaguchi J., Mukai M., Akiyama K., Yamamoto H., Muranaka T., Ikenaga T.: Exogenous plant *H6H* but not bacterial *HCHL* gene is expressed in *Duboisia leichhardtii* hairy roots and affects tropane alkaloid production. *Enzyme Microb. Technol.*, 2006; 39: 1183-1189
- [84] Rahnama H., Hasanloo T., Shams M.R., Sepehrifar R.: Silymarin production in hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Iranian J. *Biotechnol.*, 2008; 6: 113-118
- [85] Ramawat K.G., Mérillon J.M.: *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer, Berlin Heidelberg 2013
- [86] Ren S., Zhang H., Mu Y., Sun M., Liu P.: Pharmacological effects of astragaloside IV: a literature review. *J. Tradit. Chin. Med.*, 2013; 33: 413-416
- [87] Renner U.D., Oertel R., Kirch W.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. *Ther. Drug Monit.*, 2005; 27: 655-665
- [88] Rhee H.S., Cho H.W., Son S.Y., Yoon S.Y., Park J.M.: Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2010; 101: 295-302
- [89] Rudrappa T., Neelwarne B., Kumar V., Lakshmanan V.S., Aswathanarayana R.G.: Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Elect. J. Biotechnol.*, 2005; 8: 185-197
- [90] Runguphan W., Qu X., O'Connor S.E.: Integrating carbon-hydrogen bond formation into medicinal plant metabolism. *Nature*, 2010; 468: 461-464
- [91] Ruslan K., Selfitri A.D., Bulan S.A., Rukayadi Y., Elfahmi: Effect of *Agrobacterium rhizogenes* and elicitation on the asiaticoside production in cell cultures of *Centella asiatica*. *Pharmacogn. Mag.*, 2012; 8: 111-115
- [92] Saller R., Brignoli R., Melzer J., Meier R.: An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch. Komplementärmed.*, 2008; 15: 9-20
- [93] Sevón N., Oksman-Caldentey K.M.: *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med.*, 2002; 68: 859-868
- [94] Sharafi A., Sohi H.H., Mousavi A., Azadi P., Dehsara B., Khalifani B.H.: Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013; 29: 2125-2131
- [95] Sharma S., Ali A., Ali J., Sahni J.K., Baboota S.: Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2013; 22: 1063-1079
- [96] Sharma V., Agrawal R.C.: Glycyrrhiza glabra - a plant for the future. *Mintage J. Pharmaceutic. Med. Sci.*, 2013; 2: 15-20
- [97] Sharmila R., Subburathinam K.M.: Effect of signal compounds on andrographolide in the hairy root cultures of *Andrographis paniculata*. *IJPSR*, 2013, 4: 1773-1776
- [98] Shi M., Kwok K.W., Wu J.Y.: Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2007; 46: 191-196
- [99] Shilpa K., Varun K., Lakshmi B.S.: An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant Sci.*, 2010; 5: 222-247
- [100] Siddiqi M.H., Siddiqi M.Z., Ahn S., Kang S., Kim Y.J., Sathishkumar N., Yang D.U., Yang D.C.: Ginseng saponins and the treatment of osteoporosis: mini literature review. *J. Ginseng Res.*, 2013; 37: 261-268
- [101] Sivanandhan G., Rajesh M., Arun M., Jeyaraj M., Dev G.K., Manickavasagam M., Selvaraj N., Ganapathi A.: Optimization of carbon source for hairy root growth and withaferin A and withanone production in *Withania somnifera*. *Nat. Prod. Commun.*, 2012; 7: 1271-1272
- [102] Skarjinskaia M., Karl J., Araujo A., Ruby K., Rabindran S., Streatfield S.J., Yusibov V.: Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008; 100: 814-819
- [103] Smolarczyk R., Cichoń T., Matuszczak S., Mitrus I., Lesiak M., Kobusińska M., Kamysz W., Jarosz M., Sieroń A., Szala S.: The role of glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2012; 60: 391-399
- [104] Srivastava S., Srivastava A.K.: Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007; 27: 29-43
- [105] Staniszevska I., Krolicka A., Malinski E., Lojkowska E., Szafranek J.: Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme Microb. Technol.* 2003; 33: 565-568
- [106] Syklovska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A., Furmanowa M.: Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*. *J. Plant Physiol.*, 2009; 166: 1950-1954
- [107] Tabata H.: Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* Species. *Curr. Drug Targets*, 2006; 7: 453-461
- [108] Talano M.A., Oller A.L., González P.S., Agostini E.: Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Pat. Biotechnol.*, 2012; 6: 115-133
- [109] Tang K.X., Liu D.H., Wang Y.L., Cui L.J., Ren W.W., Sun X.F.: Overexpression of transcriptional factor *ORCA3* increases the accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2011; 58: 415-422
- [110] Taylor L.P., Grotewold E.: Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005; 8: 317-323
- [111] Vázquez-Flota F., Hernández-Domínguez E., de Lourdes Miranda-Ham M., Monforte-González M.: A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. *Biotechnol. Lett.*, 2009; 31: 591-595
- [112] Veerasham C.: *Medicinal Plant Biotechnology*. CBS Pub., 2004; New Delhi, 377-419
- [113] Verma P.C., Singh D., Rahman L., Gupta M.M., Banerjee S.: In vitro studies in *Plumbago zeylanica*: rapid micropropagation and establishment of higher plumbagin yielding hairy root cultures. *Plant Physiol. J.*, 2002; 159: 547-552
- [114] Wang C.T., Liu H., Gao X.S., Zhang H.X.: Overexpression of *G10H* and *ORCA3* in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production. *Plant Cell Rep.*, 2010; 29: 887-894
- [115] Wasilewska A., Królicka A.: Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia*, 2005; 4: 173-188
- [116] Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Putalun W.: Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures. *Z. Naturforsch. C*, 2011; 66: 423-428
- [117] Xu H., Kim Y.K., Suh S.Y., Udin M.R., Lee S.Y., Park S.U.: Deourisin production from hairy root culture of *Angelica gigas*. *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.*, 2008; 51: 349-351
- [118] Yang C., Chen M., Zeng L., Zhang L., Liu X., Lan X., Tang K., Liao Z.: Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Plant Omics J.*, 2011; 4: 29-33



- [119] Yim D., Singh R.P., Agarwal C., Lee S., Chi H., Agarwal R.: A novel anticancer agent, decursin, induces G<sub>1</sub> arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1035-1044
- [120] Zang Y.X., Kim D.H., Park B.S., Hong, S.B.: Metabolic engineering of indole glucosinolates in Chinese cabbage hairy roots expressing *Arabidopsis* CYP79B2, CYP79B3, and CYP83B1. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2009; 14: 467-473
- [121] Zhai D.D., Supaibulwatana K., Zhong J.J.: Inhibition of tumor cell proliferation and induction of apoptosis in human lung carcinoma 95-D cells by a new sesquiterpene from hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Phytomedicine*, 2010; 17: 856-861
- [122] Zhang H.C., Liu J.M., Lu H.Y., Gao S.L.: Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Rep.*, 2009; 28: 1205-1213
- [123] Zhang L., Ding R., Chai Y., Bonfill M., Moyano E., Oksman-Caldentey K.M., Xu T., Pi Y., Wang Z., Zhang H., Kai G., Liao Z., Sun X., Tang K.: Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6786-6791
- [124] Zhang L., Kai G.Y., Lu B.B., Zhang H.M., Tang K.X., Jiang J.H., Chen W.S.: Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants. *J. Integr. Plant Biol.*, 2005; 47: 136-143
- [125] Zhou M., Zhang C., Wu Y., Tang Y.: Metabolic engineering of gossypol in cotton. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013; 97: 6159-6165
- [126] Zhou M.L., Zhu X.M., Shao J.R., Tang Y.X., Wu Y.M.: Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011; 90: 1229-1239

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.