

# Rostliny in vitro — továrny na léčiva?

Pavel Klouček, Přemysl Landa, Tomáš Vaněk

„Kdysi vše zelené, co z půdy vyrazilo,  
výtečnou bylinou pro naše otce bylo.“  
(R. Kipling)

## Sekundární metabolity

Většina uhlíku je v rostlinách vázána v produktech primárního metabolismu, jako jsou sacharidy, bílkoviny, tuky atd. Kromě těch však rostliny vytvářejí ještě další sloučeniny — sekundární metabolity. Jejich chemická rozmanitost je ohromující a my z nich dosud známe pouze nepatrné procento. Do dnešní doby byla z tohoto hlediska chemicky prozkoumána asi 4 % rostlinných druhů a z nich izolováno více než 100 000 látek, přičemž každý rok přibývá asi 4 000 dalších. Pro rostliny jsou tyto látky důležité zejména při adaptaci na podmínky vnějšího prostředí. Díky vlastnostem sekundárních metabolitů byly určité rostliny pro lidstvo odedávna zdrojem léčiv, aromatických látek, ochucovadel, barviv a mnoha dalších produktů, pro něž člověk nacházel a stále nachází nová uplatnění.

## Hledání nových cest

Už v raných dobách rozkvětu farmaceutického průmyslu si velké společnosti najímaly špičkové etnobotaniky a farmakogony (hledáče nových léčivých látek), kteří se na svých dobrodružných expedicích do všech koutů světa snažili pro dobro lidstva (a své firmy) nalézt nové účinné látky a zejména jejich zdroje. Za doby koloniálních mocností (a i poté) se některé produkty rostlinného původu stávaly důležitým těžátkem na míse vah ekonomického

(obchod s kořením) i vojenského soupeření. Během druhé světové války, kdy japonské a německé armády měly pod kontrolou 90 % světových zásob chininu a všechny významné oblasti jeho produkce, onemocnělo malárií přes 600 000 amerických vojáků. Syntetická příprava chininu byla složitá a pro výrobu ve velkém příliš nákladná. Nastupující syntetická léčiva, i když nakonec zachránila situaci, měla v té době proti chininu řadu nevýhod. Tento příklad nastiňuje důležitost objevování, poznávání a získávání nových zdrojů léčiv a dalších látek pocházejících z říše rostlin.

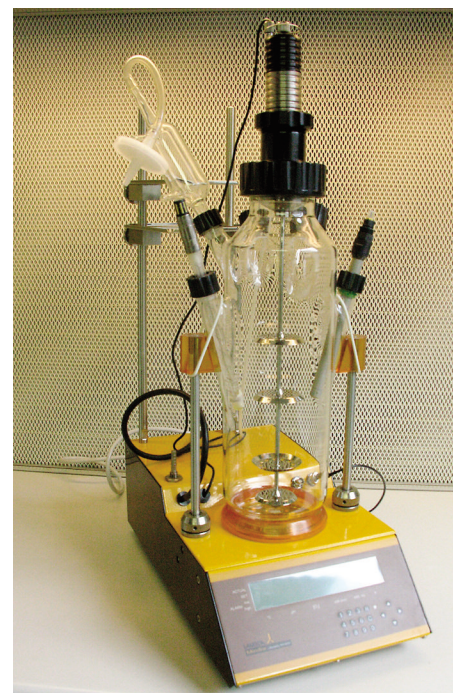
Jeden z nejčastějších modelů používaných při pátrání po nových látkách a jejich zdrojích vypadá ve zkratce asi takto: Vše začíná shromažďováním a studiem informací o rostlinách používaných v různých tradičních systémech — tedy etnobotanickým průzkumem. U perspektivních rostlin s požadovaným účinkem následuje ověření jejich možného využití, izolace a identifikace aktivních látek. Pokud látka projde sítím celé řady testů (od předběžných screeningových až po klinické studie), následuje další krok, a tím je zajištění produkce takového množství látky, které by za racionálních ekonomických podmínek pokrývalo poptávku. V případě, že daná rostlina vytváří kýženou látku v dostatečném množství a zároveň lze zajistit obnovitelný zdroj rostlinného materiálu, většinou již nic nebrání na cestě k využití této látky. Jestliže ale není možno z nějakého důvodu splnit některou z těchto podmínek, celý výzkum

se musí vrátit o několik kroků zpět a snažit se nalézt alternativní cesty.

K těm patří např. hledání jiného druhu produkujícího stejnou látku, chemická syntéza a v poslední době také čím dál častěji snaha o produkci látek *in vitro*, tzn. za řízených podmínek v laboratorním prostředí pomocí buněčných a orgánových kultur. Ty jsou již delší dobu považovány za velmi nadějnou metodu produkce sekundárních metabolitů. Původně tomu tak ovšem nebylo. Nejprve převažoval názor, že strukturně nediferencované buňky, jako kalusové nebo suspenzní kultury, nejsou schopny produkovat žádné sekundární metabolity. Koncem 50. let minulého století se začaly ve vědeckém tisku množit zprávy, které tuto teorii popíraly. V následujících letech bylo u několika kultur dosaženo poměrně vysokých výnosů určitých látek, což vzbudilo velké očekávání, které se však nakonec tak úplně nenaplnilo. V té době se také se střídavými výsledky uskutečnilo mnoho zajímavých průkopnických pokusů o komerční využití těchto metod. Japonská firma Japan Tobacco Inc. dokonce zkoušela pěstovat buňky tabáku jako surovinu pro výrobu cigaret.

Jedna z nejvyšších produkcí byla zaznamenána u suspenzní kultury kamejky rudo-kořenné (*Lithospermum erythrorhizon*), kde antimikrobiální látka shikonin tvořila 12,4 % sušiny, což je přibližně 10× více, než obsahují intaktní rostliny. Tento případ je však bohužel spíše výjimka potvrzující pravidlo. Hlavní překážkou komerčního využití je totiž ve většině případů nízká produkce žádané látky a s tím spojená finanční nerentabilita. Uvádí se, že cena za 1 kg produktu musí dosahovat alespoň 1 000 USD,

*Vlevo kořenová kultura ženšenu (*Panax ginseng*). Z několika desítek gramů kořenů pěstovaných in vitro bylo za dva měsíce získáno stejné množství účinných látek, jaké nabrodí jedna rostlina za 8 let* ♦ *Experimentální bioreaktor (*Lambda Laboratory Instruments*, objem 4,5 l) na pracovišti Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR slouží ke kultivaci buněčných a orgánových kultur za řízených podmínek (pH, teplota, provzdušnění) v kultivačním médiu, vpravo*



Tab. Vybrané rostlinné produkty používané ve farmacii a jejich orientační ceny

Látka	Účinek	Rostlinný druh	Cena (USD za kg)
Chinin	antimalarický	<i>Cinchona ledgeriana</i>	500
Berberin	střevní choroby	<i>Coptis japonica</i>	3 250
Shikonin	antibakteriální	<i>Litbospermum erythrorhizon</i>	4 500
Ajmalicin	antihypertenzivum	<i>Catbarantus roseus</i>	37 000
Elipticin	protirakovinný	<i>Orcrosia elliptica</i>	240 000
Morfin	sedativum	<i>Papaver somniferum</i>	340 000
Kamptotecin	protirakovinný	<i>Camptolbeca acuminata</i>	432 000
Paclitaxel	protirakovinný	<i>Taxus brevifolia</i>	600 000
Vinblastin	protirakovinný	<i>Catbarantus roseus</i>	1 000 000
Vinkristin	protirakovinný	<i>Catbarantus roseus</i>	2 000 000

aby se produkce *in vitro* vyplatila. Tuto hranici některé látky přesahují i o několik řádů (viz tab.). Příkladem může být alkaloid vinkristin, izolovaný z druhu katarant růžový (*Catbarantus roseus*, dříve *Vinca rosea*), používaný při léčbě leukémie a dalších forem rakoviny, jehož cena je asi 2 000 000 USD/kg. Díky vysoké poptávce po těchto látkách se do popředí zájmu biotechnologů dostávají vybrané perspektivní druhy rostlin. Pro průmyslové využití připadají v úvahu dva typy kultur: suspenzní a orgánové.

### Suspenzní kultury

Jsou inspirovány mikrobiálními kulturami využívanými pro produkci klasických antibiotik a mají s nimi i hodně společného. V ideálním případě by mělo jít o jednotlivé buňky nebo malé shluky, strukturně nediferencované, volně se vznášející v živném médiu. Toho lze dosáhnout vhodným složením média a kombinací fytohormonů. Složení pěstebního média závisí na druhu rostliny. Obecně platí, že makroelementy (N, P, K, Ca, Mg a S) jsou v 1 l média přítomny v milimolárních koncentracích, za-

*Ženšen (Panax ginseng) je jednou z nejintenzivněji zkoumaných rostlin. Jeho kořeny představují cennou surovinu pro kosmetický, farmaceutický a potravinářský průmysl. Jihokorejská společnost CBN Biotech je zatím pravděpodobně jediná na světě, která kořeny ženšenu komerčně produkuje pomocí nejmodernějších technologií v bioreaktorech*

tímco mikroelementy (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo a Co) pouze v mikromolárních. Nezbytnou součástí je zdroj uhlíku (většinou ve formě sacharózy), protože buněčné kultury většinou nefotosyntetizují. Další složky ovlivňující kvalitu média jsou vitaminy a aminokyseliny. Koncentrace a poměr mezi fytohormony auxiny a cytokininy má výrazný vliv na procesy v buňce a hraje v médiu velmi významnou roli. Důležité je také pH média, často se pohybuje okolo 5,7.

Rostlinné suspenzní kultury však mají proti mikrobiálním buňkám určité nevýhody. Generační doba rostlinných buněk se na rozdíl od mikrobiálních neměří na minuty či hodiny, ale na dny — jeden kultivační cyklus trvá průměrně dva až tři týdny. Jsou také mnohem náchylnější na mechanické poškození, což činí problémy při velkoobjemové kultivaci. Pokud se však podaří nalézt vhodný a technicky uskutečnitelný systém pro kultivaci ve velkoobjemových fermentorech a je splněna nezbytná podmínka ekonomické rentability, může se takový případ zařadit mezi ty, které se uplatní v průmyslovém využití. Těch však dosud mnoho není.

Jedním z prvních a neúspěšnějších je již zmíněná produkce shikoninu suspenzní kulturou kamejky rudokořenné (výťažnost látky 4g/l média), kterou zahájila v 70. letech japonská společnost Mitsui Petrochemical Industry. Ta se pokoušela i o produkci berberinu (alkaloid s antimikrobiální aktivitou) suspenzní kulturou *Coptis japonica* (3,5 g/l média). Jiná japonská firma, Nitto Denko, produkovala biomasu ženše-

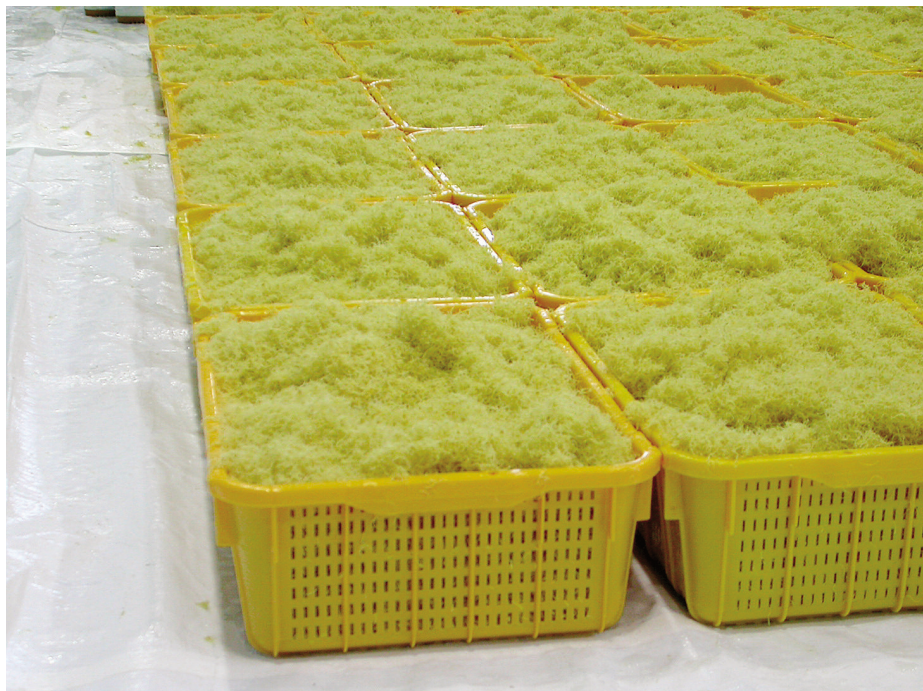
nu ve fermentorech o objemu 20 m<sup>3</sup> jako surovinu pro výrobu potravních doplňků. Dalšími pokusy byly produkce antioxidantních látek ubichinon-10 (koenzym Q10) a kyseliny rozmarýnové. Všechny látky vznikaly v letech 1976–1986.

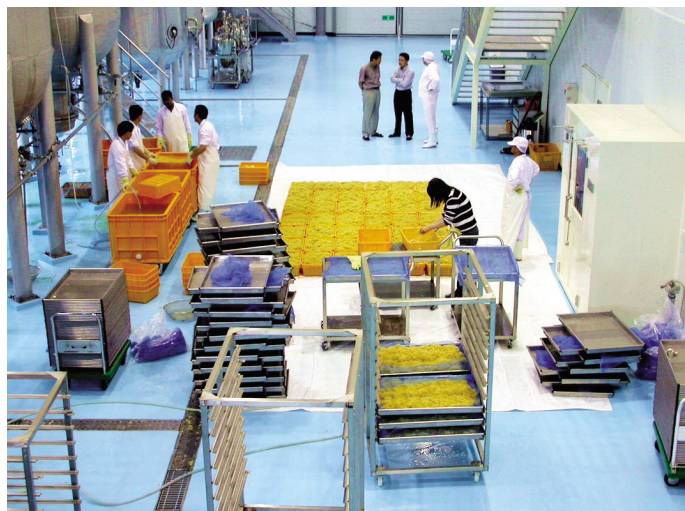
V současnosti se pro komerční produkci využívají pouze suspenzní kultury výše zmínované kamejky rudokořenné a některých druhů tisů (*Taxus* spp.) pro výrobu protirakovinné látky taxol. Proč, když existuje celá řada prací informujících o produkci cenných látek v podmínkách *in vitro*? Odpovědi musíme hledat přímo v rostlinách. Syntéza rostlinných sekundárních metabolitů je totiž oproti živočišným nebo mikrobiálním komplexnější a zajištění vhodných podmínek pro produkci tudíž komplikovanější. S tím souvisí ekonomická náročnost výroby. Pořizovací i provozní náklady reaktorů pro kultivaci rostlinných buněk nebo orgánů jsou velmi vysoké.

### Orgánové kultury

U orgánových kultur se využívá faktu, že strukturně diferencované rostlinné buňky mají větší schopnost syntézy sekundárních metabolitů než buňky nediferencované. Jde tedy o kultivaci celých rostlin nebo jejich částí. Z orgánových kultur se dostává největší pozornosti kulturám kořenovým, a to hlavně transformovaným (tzv. hairy roots). Bakterie *Agrobacterium rhizogenes*, původce choroby zvané hairy-root disease, způsobuje u citlivých druhů dvouděložných rostlin nekontrolovatelný růst kořenů. Mechanismus je velmi podobný jako u známějšího druhu *A. tumefaciens*. Oba druhy bakterií způsobují vývoj abnormálního typu pletiva pomocí začlenění části genomu do hostitelské DNA. V podmínkách *in vitro* lze tyto transformované kořeny poměrně snadno odvodit a samostatně kultivovat. Vyznačují se rychlým růstem, bohatým větvením a intenzivní tvorbou kořenových vlásků. Jejich výhodou je genetická stabilita (na rozdíl od suspenzních kultur) a vysoká biosyntetická kapacita, ve které mnohdy předčí mateřskou rostlinu. Kořenová kultura blínu bezbranného (*Hyoscyamus muticus*) vykazovala několikrát vyšší produkci hyoscyaminu (alkaloid používaný při poruchách trávicího traktu) než kořeny normálních rostlin, a to stabilně více než 15 let. Objevují se ale i problémy, zejména při kultivaci ve velkých fermentorech. Kořenové kultury sice netrpí mechanickým stresem, ale jejich nárůst je nerovnoměrný, čímž se komplikuje provzdušnění a dodávka živin.

A jak je to s využitím orgánových kultur pro získávání farmaceutik? Jejich studium trvá kratší dobu než studium buněčných kultur a dosud je znám pouze jeden případ komerční produkce. Jihokorejská společnost CBN Biotech od r. 2001 produkuje kořinky ženšenu jako surovinu pro kosmetický a potravinářský průmysl. Kořenové kultury ženšenu jsou jedním z nejintenzivněji zkoumaných případů. Na pracovišti Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB) AV ČR v Praze bylo z několika desítek gramů kořenů pěstovaných *in vitro* za dva měsíce získáno stejné množství ginsenosidů, jaké nahromadí jedna rostlina za 8 let. V takovýchto případech, kdy nárůst biomasy přirozenou cestou trvá relativně dlouhou dobu, mohou být kořenové kultury vynikající alternativou.





## Kudy dál?

Zůstane většina výzkumných prací jen na papíře, nebo nabere produkce sekundárních metabolitů *in vitro* druhý dech? Nové typy bioreaktorů s jednoduchou konstrukcí usnadňující udržení sterilního prostředí mohou být jednou z cest. Někteří vědci směřují vývoj poněkud odlišným směrem, než se dosud ubíral. Vychází ze skutečnosti, že je lepší pěstovat celé fotosyntetizující rostliny, které nevyžadují přítomnost cukrů v médiu, a to se pak stává méně příznivé pro napadení nežádoucími mikroorganismy. Výsledek — nižší nároky na sterilitu a tím i nižší cena. Tento způsob blízký se aeroponii nebo hydroponii stále dovoluje využití elicítace (zvyšování produkce pomocí stresových faktorů), dodávání prekursorů, průběžného odebírání produktu

*Komerční bioreaktory jihokorejské společnosti CBN Biotech, největší o objemu 10 000 l, vlevo. Nejdůležitější podmínkou úspěšné kultivace je udržení sterilního prostředí v bioreaktoru*  
 ♦ *Sklizeň kořínků ženšenu (Panax ginseng) z komerčních bioreaktorů CBN Biotech, upravo. Tyto kořínky obsahují stejné účinné látky jako kořeny klasicky pěstovaných rostlin. Snímky T. Vaňka*

z média a dalších metod zvyšování produkce.

Kromě těchto způsobů existuje ještě jeden směr, do něhož se vkládají nemalé naděje — metabolické inženýrství. Tato technologie využívá genových manipulací pro upravení buněčné aktivity související s enzymatickými, transportními a regulačními funkcemi.

Snad si říkáte: „Proč zavírat rostliny do nějakých nádob a tam je všemožně týrat,

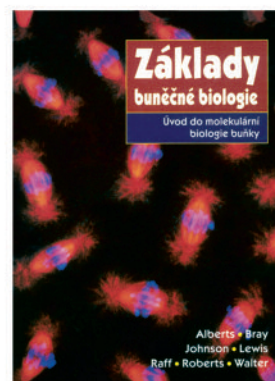
když můžeme klasickým způsobem na poli jednoduše vypěstovat, co potřebujeme?“ Ve většině případů máte pravdu, ale v budoucnosti by se nám takové poznatky mohly hodit. Až se vydáme na cesty vesmírem, bude bioreaktor spíše ve výhodě před záhonem.

Ale vraťme se na Zemi a do přítomnosti. I v současnosti existují případy, ve kterých se využití rostlinných biotechnologií jeví jako výhodnější alternativa. Nemusí jít jen o rostliny pomalu rostoucí nebo ohrožené nadměrným sběrem či devastací jejich přirozených stanovišť. Zneužití rostlinných omamných látek, proměnlivá politická situace v dodávající zemi nebo nevyzpytatelnost přírody jsou další faktory mluvící ve prospěch kultur *in vitro*. Je ale možné, že si za několik let koupíte bylinný preparát, na němž bude napsáno: „Vyrobeno z uměle pěstovaných rostlin.“

**ALBERTS a kol.:**

# Základy buněčné biologie

**PO ÚPLNÉM ROZEBRÁNÍ PŘEDCHOZÍHO VYDÁNÍ  
VYCHÁZÍ ZNOVU**



## Ať už věříte na zázraky

či nikoli, první pozorný pohled na libovolný živý organismus vás přesvědčí o tom, že se před vámi právě nachází malý zázrak. Velká část všech živých tvorů, kteří kolem nás chodí, létají, plavou nebo třeba kvetou, se skládá z obrovského množství buněk, z nichž každá v sobě ukrývá celou řadu chemických a fyzikálních reakcí. Bruce Alberts a jeho kolegové dosáhli po letech praxe ve vysvětlování podivuhodných dějů, na nichž je založen život, skutečného mistrovství a pro nás je velkým potěšením představit vám jejich knihu v českém jazyce.

Doporučená cena včetně DPH:

**1499 Kč**

**LZE OBJEDNAT a OD 15. ŘÍJNA ZAKOUPIT**

**Palác knih LUXOR**

Václavské náměstí 41, 110 00 Praha 1

**ZDRAVOTNICKÁ LITERATURA WIMMER**

Lipová 6, 120 00 Praha 2

**Malé Centrum (PřF MU), Kotlářská 2, 611 37 Brno**

**Knihkupectví Beseda, Na Sadech 18, 370 01 České Budějovice**

**Malé Centrum**

(FCHPT STU), Radlinského 9, Bratislava

(FEI STU), Ilkovičova 3, Bratislava

**Objednat lze na adrese:**

Malé centrum, P.O.Box 71/15, 810 05 Bratislava 15

**Knihu lze objednat i na adrese nakladatelství**

Espero Publishing, s.r.o., Libušská 319, 142 00 Praha 4

objednavky@espero.cz, www.espero.cz