

METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE UND ZELL- UND ORGANTYPISCHE KULTUREN IN DER EINSCHÄTZUNG VON PHARMAKOLOGISCHEN MERKMALEN VON STANDARDISIERTEN FRAKTIONEN DER BIENENPRODUKTE

R. STOJKO¹, Zofia DZIERŻEWICZ³, A. STOJKO², Agata PYTEL¹

¹Department of Pathology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLEN
e-mail: rstojko@slam.katowice.pl

²Department of Sanitation, Bioanalysis & Environment Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLEN

³Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLEN

Einleitung

Die Evolution der Arzneimittel wurde durch die Entwicklung der grundlegenden Wissenschaften wie auch der Medizin und der Technologie bestimmt. Diese Gebiete des menschlichen Verstandes erlaubten und ermöglichten die notwendige pharmakodynamische Erforschung, die für die pharmakologische Einschätzung und Standardisierung der aktiven Substanzen der synthetischen Arzneimittel notwendig waren. Die parallele Entwicklung von Biotechnologie, Pharmakologie und Phytochemie führte zu beachtlichen Fortschritten auf dem Gebiete der Entdeckungsmethoden, der Isolierung und Untersuchung einiger Substanzen, wie Glykoside, Alkaloide und Flavonoide. Diese Entdeckungen gingen Hand in Hand mit immer eingehenderen pharmakodynamischen Untersuchungen, die die biologische Zugänglichkeit des Arzneimittels charakterisierten und seine pharmakologischen und toxikologischen Merkmale bestimmten. Die Entwicklung der grundlegenden Wissenschaften, vor allem der Molekularbiologie und der Genetik, trug zum Kennenlernen der verschiedenen Mechanismen bei, die die pharmakodynamischen und –kynetischen Prozesse begleiten. Ihre Entdeckung hing von Art und Form des Arzneimittels und seiner Konditionierung im Organismus ab, da diese eigentlich das Ergebnis der Interaktion zahlreicher genetischer und nicht genetischer Faktoren sind. Die pharmakogenetischen Produkte lieferten uns eine Reihe von Fällen, in denen die genetischen und Umweltfaktoren koexistierten und zusammenarbeiteten.

Neueste Untersuchungen ergaben, daß jede Menschenrasse auf die aktiven Substanzen der Arzneimittel auf ihre eigene Art reagiert. Die größten Differenzen kommen vor allem bei der kaukasischen und asiatischen Rasse vor. Außerdem ist bekannt, daß kranke Menschen der gleichen Rasse abhängig von Alter, Geschlecht, allgemeinem Gesundheitszustand und schon eingenommenen Arzneimitteln auf ein Arzneimittel auf unterschiedliche Weise reagieren. Es gibt Beweise dafür, daß die Gene die Wirksamkeit und die Wirkung verschiedener pharmakologischer Behandlungsmethoden beeinflussen können. Das ist eine Folge der Tatsache, daß gerade die Gene für die Synthese der Enzyme verantwortlich sind, die an den chemischen Reaktionen in unserem Körper teilnehmen, einschließlich Ziel und Dauer der chemischen Verwandlungen, die die vorgeschriebenen Arzneimittel hervorrufen. Diese Feststellungen sind teilweise Ergebnisse der Beobachtungen von Tuberkulosekranken, die mit Isoniasid behandelt wurden. Im Falle einiger Patienten verblieb das unmetabolisierte Arzneimittel längere Zeit im Blut. Diese Patienten litten an neurologischen Störungen, was bei den anderen nicht festgestellt wurde. Die mit diesen Patienten, die auf die Behandlung unterschiedlich reagierten, unternommenen Studien ergaben zwei Arten von angeborenem Isoniasid-Stoffwechsel: langsamer und schneller Stoffwechsel.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Genarten entdeckt, deren Proteinprodukte an chemischen Umwandlungsprozessen teilnehmen, wie z.B. die Enzyme. Wird die Krankheit von einem einzigen Gen verursacht, haben die Ärzte überhaupt keinen Zweifel über Art und Dosierung eines Arzneimittels. Der Kartographieprozeß des Polymorphismus des einzigen Nukleotids (PEN), das im ganzen Genom vorkommt, ist kontinuierlich. Eine einzige Nukleotidveränderung der Sequenz der Genen, die die Proteine verschlüsseln, die die Arzneimittel transportieren und metabolisieren, liegt der Pharmakogenomie zugrunde. Wenn mehr als ein einziges Gen eine bedeutende Rolle bei gewissen Krankheiten spielt, ist die Wahl der korrekten Therapie nicht all zu leicht. Leider bilden die Krankheiten, die von mehreren Genen verursacht werden, die zahlreichste Gruppe im Falle aller Krankheiten. Gegenwärtig werden die sogenannten „heißen Punkte“ gesucht, d.h. die DNS-Fragmente, die gerade wegen ihrer Unterschiedlichkeit bei verschiedenen Menschen die Verantwortung für die unterschiedliche Reaktion eines Organismus auf ein gewisses Arzneimittel tragen. Die Pharmakogenomie, ein neues Gebiet der Biomedizin, wird wahrscheinlich jeden Patienten aufgrund seines PEN-Satzes oder der „heißen Punkte“ seiner DNS-Moleküle einzeln behandeln.

Die Pharmakogenomie ist ein Gebiet, das die „Zielbehandlung“ beantworten und Bestandteil der künftigen Revolution in der Medizin sein wird, argumentiert Francis Collins, Präsident des Nationalen Amerikanischen Instituts für Erforschungen des Humanen Genoms (American National Human Genome Research Institute), in einer Fachzeitschrift. Dieser neue Zweig der Medizin wird uns nicht nur Zeit und Geld ersparen, die sehr oft bei einer unwirksamen Behandlung verlorengehen, sondern auch die Nebenwirkungen

der Arzneimittel stark herabsetzen. Die Pharmakoepidemiologie-Daten bewiesen eindeutig die unerwünschten Wirkungen zahlreicher patentierter Arzneimittel. Aus Berichten aus den USA ist es ersichtlich, daß in diesem Lande von vier Personen eine an den Nebenfolgen von Arzneimitteln stirbt. Unklare Daten stammen z.B. aus Frankreich. Gemäß derer ist in Frankreich jedes vierte im Handel befindliche Arzneimittel entweder nicht wirksam oder sogar gefährlich für Gesundheit oder Leben. Es ist möglich, daß die Pharmakologie vielleicht die Erfindung neuer Arzneimittel bestimmen wird. Bei der Bildung eines neuen Arzneimittels muß die 3D-Struktur der Proteine, Enzyme, Nukleinsäuren und der Rezeptoren von der Zelloberfläche bekannt sein. Die großen Pharmaziegesellschaften sammeln schon jetzt Proben von humanem DNS und hoffen auf diese Weise ein Profil zu erhalten, das ihnen die Klassifizierung der Patienten und deren nachträgliche Zuteilung in verschiedene Arzneimittelkategorien ermöglicht, die ihnen helfen oder sie beeinflussen werden. Die Bildung eines neuen Arzneimittels ist ein langandauernder Prozeß, der mit Laboruntersuchungen und klinischen Untersuchungen beginnt und die Wirksamkeit und die Harmlosigkeit des Arzneimittels als potentielle Behandlungsmethode einer gewissen Krankheit bestimmen soll. Vor dem Testen des Arzneimittels mit Menschen müssen Tier- und Zellkulturentests auf seine Sicherheit erfolgen. Einige klinische Studien ergaben die positive Rolle, die die von den Bienen gesammelten, veränderten oder hergestellten Produkte in der Behandlung gewisser Krankheiten spielen.

Der konstante Fortschritt der biomedizinischen Untersuchungen, eine Folge der schnellen Entwicklung der Molekularbiologie, ermöglichte neue Versuche, sodaß Kenntnisse über die Mechanismen erhalten wurden, anhand derer die verschiedenen chemischen direkt aus der Natur stammenden Stoffe den menschlichen Organismus als solche oder als ein komplexes System beeinflussen. Dieses ist der Fall der Insektengemeinschaften und das hervorragendste Beispiel ist das Bienenvolk.

Die Propolis ist eines der pharmakologischen Produkte, die von der Apitherapie verwendet werden, natürlich außer dem Bienenhonig. Die antibakteriellen Eigenschaften dieses biogenen Produkts sind seit sehr langer Zeit bekannt. Heutzutage wird angenommen, daß die bakteriziden Eigenschaften der Propolis die Folge der synergischen Wirkung von Flavonoiden, aromatischen Säuren und Sesquiterpene ist. Klinische Studien ergaben ihre Nebenwirkungen bei der Behandlung jedwelcher Art von Brand- oder Liegewunden, Krampfadergeschwüren und Ausschlägen. Die spektakulären Ergebnisse in der Behandlung zahlreicher Krankheiten mit diesem Produkt zeigten, daß die Propolis außer den bakteriziden Eigenschaften auch bei der Regenerierung von zerstörtem Gewebe mithilft. Die Studien mit einem Zellenmodell bewiesen, daß der standardisierte Propolisextrakt die Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten steigert. Die Molekularstudien ergaben auch, daß die Propolis für die gesteigerte Transkriptionsaktivität der Genen, die an dem Prozeß der Angiogenesis teilnehmen, verantwortlich ist^[1]. Die Gegenüberstellung der klinischen und der grundlegenden Studien ermöglichten die Klärung der Aktivität auf Zell- und Molekularniveau. Die Kenntnis der Zell- und Molekularmechanismen der aktiven Bienenproduktefraktionen auf dem Gebiete des physiologischen und pathologischen Systems wird manches noch nicht Bekanntes lösen und dazu beitragen, daß die Bienenprodukte nicht nur in der Vorbeugung sondern auch in der Behandlung von Krankheiten Verwendung finden werden.

Eine Reihe von Tatsachen spricht dafür, daß die Fettsäuren mit kurzer Kette (FSKK), die im Dickdarm des Menschen hergestellt werden, zahlreiche bedeutende physiologische Funktionen erfüllen. Es wird angenommen, daß eine Störung ihres Stoffwechsels zu den Ursachen von Infektionskrankheiten des Dickdarms zählen könnte. Von energetischem Standpunkt ist die Butirsäure für die Schleimmembran die bedeutendste Fettsäure. Es wurde bewiesen, daß eine Verminderung ihrer Konzentration im Enddarmlumen, Folge eines niedrigeren Zuflusses von leicht gärendem Substrat, eine Atrophie der Schleimmembran dieses partikulären Teils des Verdauungstraktes verursacht. Eine Zugabe von Butirat regeneriert die Schleimmembran, was durch ein intensiveres Wachsen des Epitheliums und der Vertiefung der Darmfalten bewiesen wird^[2]. Es wird vermutet, daß das Butirat ein bedeutender Schutzfaktor gegen Dickdarmkrebs sein könnte, da die *in-vitro*-Untersuchungen seinen disziplinierenden Einfluß auf die Krebszellen ergaben^[3]. Momentan werden die natürlichen Quellen gesucht. Wir schenken unsere Aufmerksamkeit dem Bienenbrot, da die neueste Literatur^[4, 5] anführt, daß 14% seines Gehalts aus organischen Säuren besteht. Im Rahmen unseres Biochemie-Instituts (Abteilung molekuläre Biologie, Biochemie und Biopharmazie, Schlessische Medizin-Universität) stellten wir eine quantitative Bestimmungsmethode der FSCK aus dem Bienenbrot auf^[4,5]. Im analysierten Bienenbrot trafen wir verschiedene FSCK an, einschließlich Butirsäure. Außerdem stellten wir fest, daß das Trocknen des Bienenbrots sich auf seinen FSCK-Gehalt negativ auswirkte.

Es scheint, daß ein bedeutender Schritt im Studium der Bienenprodukte dann erfolgen wird, wenn es möglich sein wird, die primären Kulturen und auch die verschiedenen Arten von Zelllinien eines humanen Organismus bei der Analyse des Einflusses, den Roh- und Standardprodukte auf die morphologischen und biochemischen Parameter der gebrauchten Kulturzellen ausüben, verwenden zu können. Es ist zweifellos eine gute Alternative zum Tierstudium, das nicht immer die Prozesse enthüllt, die in humanen Organen und Geweben stattfinden.

In den letzten 20 Jahren wurden neue *in-vitro*-Kulturtechniken von humanen Zellen und Geweben aufgestellt. Die mögliche Erhaltung einer Kulturmasse aus einem reduzierten Fragment, die Fortschritte in der Entdeckung der Biologie zahlreicher Zellarten und die mögliche Veränderung ihrer Wirkungen in den Kulturen führten zu einem gesteigerten Interesse für die praktische Verwendung dieser Ergebnisse nicht nur

in der Biologie sondern auch in der Medizin. Es wurde beobachtet, daß die Zellen, die aus einer gesunden Bindehaut stammen, viel leichter gezogen werden können. Neue Wachstumsmethoden der Zellen wurden erarbeitet, deren Grundlage Epithelzellen sind, wie z.B. die Keranozyten der Haut, die Epithelien der Harnwege, der Prostata, der Mundhöhle, der Scheide und der Augenhornhaut. Die Epidermis ist ein besonders gutes Gewebe für Kulturen, da über 90% ihres Bestandes einer einzigen Zellenkategorie angehören – den Keranozyten. Unter normalen Bedingungen sind die Keranozyten in den Kulturen stabil und verlieren ihre Vermehrungs- und Differenzierungskapazität nicht. Der Hauptgrund der mißlungenen Hauttransplantate ist das Nichtanhaften an der Wunde, z.B. bei Brandwunden infolge einer unentsprechenden Haut. Dieses Problem wurde durch das Erfinden eines Äquivalenten der natürlichen Haut (ÄNH) gelöst. Es wurde festgestellt, daß die aus Kulturen erhaltene humane Haut von Morphologie- und Gefäßstandpunkt sehr viele Ähnlichkeiten mit der natürlichen Haut aufweist. Deshalb eignet sie sich für verschiedene Tests, die bis heutzutage nur mit Tieren erfolgten. Die Versuchsdaten bewiesen, daß das Aussetzen von 2 cm² ÄNH an chemische Faktoren, die Haut- oder Hornhautreizungen verursachen, die gleichen biologischen Reaktionen hervorrufen wie bei der natürlichen Haut und daß entzündungsfördernde Mediatoren beseitigt werden, wie Prostaglandin E₂, Prostazyklin, Interleukin^[6, 7]. Wird ÄNH verwendet, können feste Stoffe, unlösliche Stoffe, Flüssigkeiten, Emulsionen und Creme getestet werden, die lokal aufgetragen der Luft ausgesetzt sind. Außerdem können Anhaftungsmechanismen untersucht werden, die die Haut infizieren können, wie auch die Wirkungen von Arzneimitteln auf diese Mikroorganismen. Mit ÄNH können auch neue Arzneimittel getestet werden, die z.B. pharmakologisch aktive Bienenprodukte enthalten.

Heutzutage können unter Laborbedingungen auch andere Zellmodelle rekonstruiert werden, die die gleichen Merkmale aufweisen, wie die der spezifischen Zellen des Organs, von dem sie stammen. Auf diese Weise können die Venen und die kleinen Leberlappen gebildet werden. Die organotypischen Kulturen eignen sich in großem Maße für das Studium der Mechanismen einiger Nektar- oder Honigtauprodukte, die den menschlichen Organismus positiv beeinflussen.

Zahlreiche Forscher und Ärzte sind der Meinung, daß die Immuntherapie, also diejenige die Immunmodulatoren für ein verstärktes natürliches Abwehrsystem des Organismus verwendet, immer mehr an Bedeutung gewinnen wird. Der gegenwärtige positive Einfluß der Bienenprodukte auf das Immunsystem wird nicht mehr unter Zweifel gestellt. Es ist seit langem bekannt, daß die Propolis die Immunität des Organismus steigert und daß das Apitoxin das Immunsystem in großem Maße stimuliert. Durch die Verwendung des Phytohämagglutinins als mitogener Faktor kann die Zahl der Lymphozyten gesteigert werden. Dazu dienen zwei verschiedene Methoden: die Makrokultur und die Mikromethode. Die Makrokultur braucht 5 bis 10 ml Blut und die Kultivierung von Lymphozyten, die entweder durch Schleuderung oder Sedimentierung isoliert werden. Die Mikromethode besteht in der Kultivierung einer kleinen Zellenmenge in 0,3 bis 0,5 ml Blut. Eine eingehende Analyse der Errungenschaften der biomedizinischen Wissenschaften ergab, daß die humane Transkription unbedingt gekannt werden muß. Deswegen ist die Kenntnis der von mRNA auf sDNA überschriebenen Sequenzen und die Gründung von cADN-Datenkarteien notwendig. Diese sichern die wirksame Klonierung einer Genregion und nicht aller sie umringenden Genomsequenzen.

Die klassischen aber auch die moderneren Methoden der Molekularbiologie ermöglichen die Feststellung von Differenzen im Ausdruck der Genome auf Transkriptionsniveau. Die Gene der verschiedenen Ausdrücke wurden bis vor kurzem nur mithilfe der Differential- oder Substrathybridisierung und durch die Trennung ihrer Proteinprodukte identifiziert. Seitdem reiche Datenbasen der Nukleinsäuren und der Proteinsequenzen verwendet werden können, überstieg die Zahl der Gene, deren Ausdruck wir verfolgen können, die Kapazität der traditionellen Analysen.

Eine der modernen unterschiedlichen Analysemethoden des Genausdrucks ist der DNS-Mikroprozessor, der auf der Hybridisierungstechnik beruht. Die Technologie bezieht sich auf das Festmachen auf einem Substrat eines festen Trägers einer großen Anzahl von einsträngigen Oligonuklein- oder ADN-Partikeln^[8,9]. Diese Partikel spielen die Rolle von Molekularproben, obwohl sie keine Marker enthalten. Die Desoxy- und Ribonukleinsäuren sind diejenigen, die mit ihnen hybridisieren und danach analysiert und markiert werden. Das DNS-Mikrosystem erlaubt die Untersuchung der DNS-, der Proteinbindungen oder anderer Verbindungen. Dank empfindlicher Methoden, wie die Fluoreszenzentdeckung, konnte ein jeder Bestandteil des untersuchten Gemisches genau identifiziert und seine Bindung quantitativ bestimmt werden. Die erhaltenen Daten wurden eingesammelt und mit einem fortgeschrittenen Software verarbeitet. Anhand dieser Strategie können Tausende Gene analysiert und ihre Ausdrücke im Rahmen des gleichen Versuchs in einer überraschend kurzen Zeit bestimmt werden. Die DNS-Mikronetze sind immer populärer in der Untersuchung individueller Empfindlichkeiten auf Arzneimittel, der Optimierung ihrer Wirksamkeit und in der Suche nach neuen Arzneimitteln. Leider sind diese Mikronetze aber noch sehr teuer.

Die Studien über die Interaktionen verschiedener Substanzen und über ihre natürliche Zusammensetzung wie auch über die Regelung der Genaktivität in einer Zelle sind zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten der DNS-Mikroprozessoren. Seitdem bewiesen wurde, daß einige schon seit längerer Zeit benutzte Bienenprodukte im Rahmen der Chemiotherapie synergische Wirkungen haben, könnte ihre Verwendung zur Verabreichung von kleineren Dosen einiger Arzneimittel führen und ihr Tätigkeitsspektrum erweitern.

L I T E R A T U R

- Pytel A. (2001) Leczenie ran oparzeniowych Propolem-O, Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny.
- Dzierżewicz Z. et al. (1999) The role of butyric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenter. Pol.*, 6, 153-159.
- Dzierżewicz Z. et al. (2002) Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochem. Pol.*, 49, 211-220.
- Chodurek E. et al. (2002) Pyrolytic methylation in GC-MS analysis of short-chain fatty acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* (in Druck)
- Gryczka-Suchy R. (2002) Profile krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pierzgach pszczelich. Praca magisterska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny.
- Marewicz E. (1994) Skin cultures for transplantology and biotechnology. *Post. Biol. Kom.*, 21, (supl.3), 73-87.
- Drukała J. (2001) Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post. biol. kom.* 28,(supl.16) 97-110.
- Mirowski M., Bartkowiak J. (2000) DNA microarrays in biomedical studies. *Post. biochem.*, 46, 272-281.
- Linkiewicz A., Filipecki M. (2001) From differential gene expression to cDNA clone - a review of methods for identification of genes with variable level of transcription. *Post. biochem.*, 47, 253-263.