

**Mirosława Furmanowa**

Katedra i Zakład Biologii  
i Botaniki Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna  
Warszawa

## **Znaczenie biotechnologii roślinnej w wytwarzaniu cytostatyków**

### **1. Wstęp**

Poszukiwanie związków naturalnych działających przeciwnowotworowo jest stale aktualnym i ważnym problemem podejmowanym przez wiele ośrodków naukowych. Najbardziej rozległe i systematyczne badania prowadzi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej Narodowy Instytut Przeciwnowotworowy (National Cancer Institute), w którym rozpoczęto prace w 1956 r. (1). Z setek tysięcy zbadanych gatunków roślinnych zaledwie 4,3% roślin wykazywało aktywność przeciwnowotworową. Z tego głównie winkrystyna i winblastyna, uzyskiwane z *Catharanthus roseus* i dostępne na rynku od lat sześćdziesiątych, są szeroko stosowane w leczeniu nowotworów.

Izolowanie odpowiedniej ilości substancji czynnych napotyka stale na duże trudności. Dzieje się tak dlatego, że ich zawartość jest na ogół niska, wzrost roślin często bardzo wolny i wymaga nieraz specjalnych warunków uprawy, wskaźniki mnożenia małe, a zasięg występowania ograniczony do pewnych tylko stref klimatycznych.

W poszukiwaniu nowych źródeł materiału roślinnego zwrócono uwagę na metodę kultur tkankowych i komórkowych *in vitro*. Obserwowany w ostatnich latach rozwój i współdziałanie w dyscyplinach biologicznych, chemicznych i technologicznych inspirowało rozwój badań w zakresie biotechnologii związków pochodzenia naturalnego. Kilkanaście lat intensywnej pracy przyniosło ciekawe rezultaty. Wprawdzie, w zakresie biosyntezy *in vitro* wtórnych metabolitów działających przeciwnowotworowo nie uzyskano takich sukcesów jak w przypadku szikoniny otrzymywanej już w Japonii na skalę przemysłową metodą biotechnologiczną, to jednak lista gatunków wprowadzonych do hodowli *in vitro* i wytwarzających w niej związki działające cytostatycznie stale się powiększa (tab.).

Substancje aktywne należą do różnych grup chemicznych, najliczniej reprezentowane są alkaloidy występujące w: *Camptotheca acuminata*, *Catharanthus roseus*, *Cephalotaxus harringtonia*, *Cephalotaxus fortunei*, *Ochrosia elliptica*.

W większości wypadków związki przeciwnowotworowe tworzą się w ilości mniejszej niż występują w roślinie pochodzącej z gruntu, dlatego też w ostatnich latach opracowywane są różne metody zmierzające do zwiększenia ich wydajności. Obejmują one: ulepszanie warunków hodowli (temperatury, oświetlenia, napowietrzania, doboru wartości pH), modyfikacje składu pożywki (odpowiednio dobrane sole, regulatory wzrostu, prekursorzy, elicytory), czynniki działające mutagenicznie, a także właściwy dobór okazu roślinnego, eksplantatu oraz selekcję w hodowli *in vitro* wysoko wydajnych linii, hodowle komórek imobilizowanych, kokultywację i biotransformację. Prowadzone są również hodowle dwufazowe. Pierwsza faza polega na uzyskaniu możliwie wysokiego wskaźnika wzrostu tkanki, a druga ma na celu zwiększenie biosyntezy produktu. Węgiel Anona (11) biotechnologiczna produkcja jest opłacalna z ekonomicznego punktu widzenia, jeżeli koszt otrzymanego końcowego związku nie jest wyższy od 1000 USD za kilogram. Dotychczas wymagania takie spełniać mogą jedynie niektóre barwniki, substancje zapachowe i lecznicze.

Tabela

Rośliny wytwarzające w hodowli *in vitro* związki działające przeciwnowotworowo

Gatunek	Rodzina	Związek	Zawartość w roślinie % s.m.	Zawartość w komórkach <i>in vitro</i> % s.m.	Literatura
<i>Brucea antidysenterica</i>	Simaroubaceae	bruceantyna	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-5}$	(2)
<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae	kamptotecyna	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$	(3)
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	winblastyna winkrystyna	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$	(4)
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Cephalotaxaceae	harringtonina homoharringtonina	$1,8 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-8}$	(5)
<i>Ochrosia elliptica</i>	Apocynaceae	eliptycyna	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4}$	(6)
<i>Podophyllum peltatum</i>	Berberidaceae	podofylotoksyna	$6,4 \times 10^{-1}$	$7,1 \times 10^{-1}$	(7)
<i>Putterlickia verrucosa</i>	Celastraceae	majtansyna	$2,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$	(8)
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxaceae	taksol	$1,0 \times 10^{-2}$	+	(9)
<i>Taxus media</i>	Taxaceae	taksol	+	+	(10)
<i>Taxus baccata</i>	Taxaceae	taksol	+	+	(10)
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Celastraceae	tryptolid tryptidolid	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	(8,12)

Stosowane metody podwyższenia zawartości poszukiwanych produktów biologicznie czynnych dały już pierwsze rezultaty. Przykładem może być zwiększona wydajność tryptidolidu, którego w hodowli *in vitro* *Tripterygium wilfordii* otrzymano do  $100,6 \mu\text{g/g}$  suchej masy komórek, a więc 10 x więcej aniżeli jego zawartość w roślinie gruntowej (8) lub nawet 36 x więcej co było wynikiem pracy Kutney'a i in. (12). Aby przyspieszyć proces biosyntezy wtórnych metabolitów *in vitro* czynione są próby wprowadzenia do bakterii lub komórek grzybów genów roślinnych, które kodują powstawanie enzymów katalizujących biosyntezę aktywnych związków. Proces biotechnologiczny byłby wtedy skrócony do 24–48 godzin, zamiast 6–8 tygodni, jak to ma miejsce podczas hodowli komórek roślinnych. W tym przypadku w przyszłości duże znaczenie będzie miała inżynieria genetyczna.

Doświadczalne systemy nowotworowe, stosowane obecnie przez National Cancer Institute do oceny cytotoksyczności czystych związków lub oczyszczonych wyciągów roślinnych, omówili Misawa i Nakanishi (13) oraz Sadowska (14).

## 2. Cytostatyki tworzące się w hodowli komórkowej *in vitro*

### Bruceantyna

Bruceantyna, należąca do kwasjonoidów, wyizolowana była z afrykańskiej rośliny *Brucea antidysenterica* (15). Kulturę tkankową tego gatunku zapoczątkował Misawa i in. (2) używając do badań pożywkę Murshige'a i Skooga (MS) zawierającą 1 mg/l kinetyny (K) i 5 mg/l kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Alkoholowy wyciąg z kalusa zawierał  $0,6 \mu\text{g}$  bruceantyny w jednym gramie kalusa, co stanowiło około 1/400 zawartości w roślinie gruntowej. Właściwości bruceantyny zależą od jej struktury, a w szczególności od liczby wiązań nienasyconych w pierścieniu A. Chociaż związek ten wykazywał wysoką cytotoksyczność w kilku doświadczalnych systemach nowotworowych, to jednak w drugiej fazie badań klinicznych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych przez NCI stwierdzono zbyt małą aktywność by prace te dalej rozwijać.

## Eliptycyna

Eliptycyna należy do alkaloidów indolowych. Izolowana była z *Ochrosia elliptica* przez Goodwina i in. (16). Okazy tego gatunku to krzewy lub małe drzewa rosnące w Afryce, Azji i Australii. Eliptycyna i jej pochodne mają silne działanie cytostaticzne określane w kilku systemach nowotworowych. We Francji dostępny jest na rynku lek *Celiptium*: N-metylo-9-hydroksyoctan eliptycyny stosowany przeciwko nowotworowi piersi.

Procesem wytwarzania eliptycyny w hodowli *in vitro* zajmowali się Kouadio i in. (6), a następnie Chénieux i in. (17). Kalus indukowali z siewek na pożywce B5 – Gamborga i in. (18) z kinetyną, 2,4-D, mlekiem kokosowym i sacharozą. Te same regulatory wzrostu stosowano do hodowli zawiesinowej. Najwyższą zawartość eliptycyny stwierdzono w tkankach wyrosłych na pożywce B5 z kinetyną, 2,4-D i kwasem naftylooctowym (NAA). Prowadzone są badania mające na celu opracowanie procesu biotransformacji eliptycyny do jej pochodnych. Dotychczas Kouadio i in. (19) przedstawił biotransformację eliptycyny do 5-formyloeliptycyny przy użyciu czterech linii *Choisya ternata* (*Rutaceae*). Proces ten zachodził tylko w hodowli na stałej pożywce, a nie w zawieszynie. Do biotransformacji używane są również inne gatunki, stwarzające możliwość otrzymania dimetylokarbazolu – prekursora używanego do syntezy eliptycyny. Biotransformacja tego związku przy użyciu mikroorganizmów (bakterii, drożdży i innych grzybów) była badana przez Chiena i Rosazza (20).

## Haringtonina

Haringtonina, razem z homoharingtoniną i izoharingtoniną, była izolowana z gatunku *Cephalotaxus harringtonia* przez Powella i in. (5). Alkaloidy te są estrami nieaktywnej cefalotaksyny i stanowią około 30% sumy wszystkich alkaloidów występujących w tym gatunku (21). Ich chemiczna synteza, ze względu na niską wydajność, okazała się nieopłacalna.

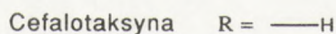
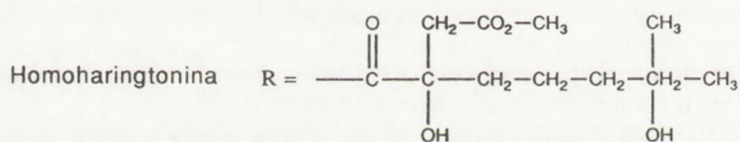
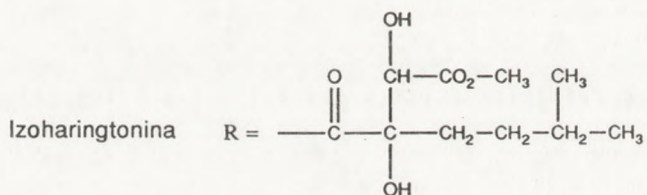
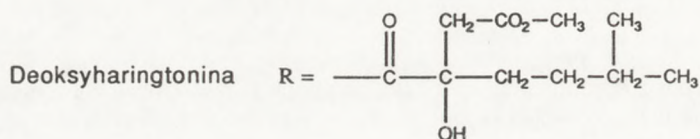
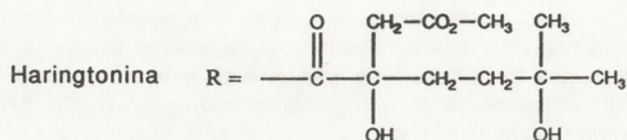
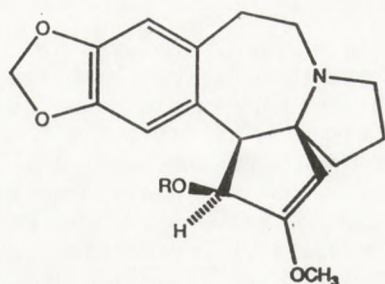
Gatunki z rodzaju *Cephalotaxus* – głowocisu są zimozielonymi, iglastymi drzewami lub krzewami, rosną w Chinach i Japonii, charakteryzują się bardzo wolnym przyrostem rocznym.

Hodowlę tkankową *Cephalotaxus harringtonia* rozpoczął Delfel i Rothfus (22). Kilkunastoletnie badania autorów zostały zakończone sukcesem (21,2) Zarówno cefalotaksynę jak i jej estry (rys. 1) otrzymano metodą *in vitro*. Ponadto znaleziono w pożywce nowy alkaloid homodeoksyharingtoninę – nie zidentyfikowaną dotychczas w okazach tego gatunku rosnących w gruncie. Równie ważne było spostrzeżenie, że wszystkie alkaloidy przechodziły do pożywki. Najlepsza do indukcji kalusa *C. harringtonia* była pożywka MS, zawierająca 1 mg/l K i 3,0 mg/l NAA. Kinetyna hamowała wzrost komórek w zawieszynie. Brak regulatorów wzrostu wywoływał organogenezę. W otrzymanych *in vitro* roślinkach zawartość cefalotaksyny i jej estrów była 60-krotnie wyższa niż w komórkach hodowli zawiesinowej (23).

W późniejszych latach stwierdzono, że wprowadzenie do hodowli czynników stresujących, elicitorów może zwiększyć wydajność wtórnych metabolitów. Dodanie do hodowli zawiesinowej *Cephalotaxus harringtonia* autoklawowanych konidiów fitopatogenicznego grzyba *Verticillium dahliae* wzmagало gwałtownie biosyntezę alkaloidów, głównie homoharingtoniny, która jest równie wartościowym związkiem o działaniu przeciwnowotworowym jak winblastyna i wimkrystyna (24,25). Stosowanie obecnie czynników patogennych jest często polecane do zwiększenia wydajności wtórnych metabolitów tkanek i komórek roślinnych w kulturze *in vitro*. Na zorganizowanej w 1991 r. Międzynarodowej Konferencji Tradycyjnej Medycyny Chińskiej prezentowano wytworzone w Chinach leki w formie iniekcji zawierające haringtoninę i homoharingtoninę.

## Kamptotecyna

Kamptotecyna jest alkaloidem izochinolinowym; wyizolowana była po raz pierwszy przez Walla i in. (26) z *Camptotheca acuminata*, drzewa występującego w północnych Chinach. Alkaloid ten jest aktywnym cytostatykiem badanym w kilku systemach nowotworowych, wykazuje



Rys. 1. Cefalotaksyna i jej estry.

jednak wysoką toksyczość. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i Chinach związki te są już w stadium badań klinicznych, są bowiem czynione próby zmniejszenia ich toksyczości.

Hodowla kalusa *Camptotheca acuminata* zapoczątkowana została przez Sakato i Misawę (3) z fragmentów pędów hodowanych na pożywce MS z 0,2 mg/l 2,4-D i 1,0 mg/l kinetyny.

Wzrost tkanki pobudzały gibereliny i niektóre aminokwasy dodane do pożywki. Warunki hodowli i izolację kamptotecyny opisał Misawa i in. (2). Podobne badania prowadzone są w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AM w Warszawie.

### Majtansyna

Majtansyna należy do ansamakrolidów tworzących się często w metabolizmie mikroorganizmów. Występowanie tego związku w roślinach wyższych stwierdził pierwszy Kupchan i in. (27) izolując majtansynę z *Maytenus buchananii*, *Maytenus serrata* i *Putterlickia verrucosa*. Te i inne gatunki z tych samych rodzajów badane były w hodowli *in vitro*, jednak bez zadowalających wyników. Jedynie Misawa i in. (2) stosując różne stężenia auksyn (NAA, 2,4-D i IAA), kinetyny i odpowiednie połączenia  $KNO_3$  i  $NH_4NO_3$  opracował modyfikację pożywki MS, na której rósł kalus *Putterlickia verrucosa* wytwarzający majtansynę. Jej zawartość była jednak bardzo niska.

Gatunki z rodzaju *Maytenus* badane były w hodowli *in vitro* w Kanadzie (28) i w Polsce (29,30,31). Autorzy nie stwierdzili jednak występowania majtansyny ani w kalusie, ani w zawieszynie, mimo że znaleziono inne związki działające cytostatycznie.

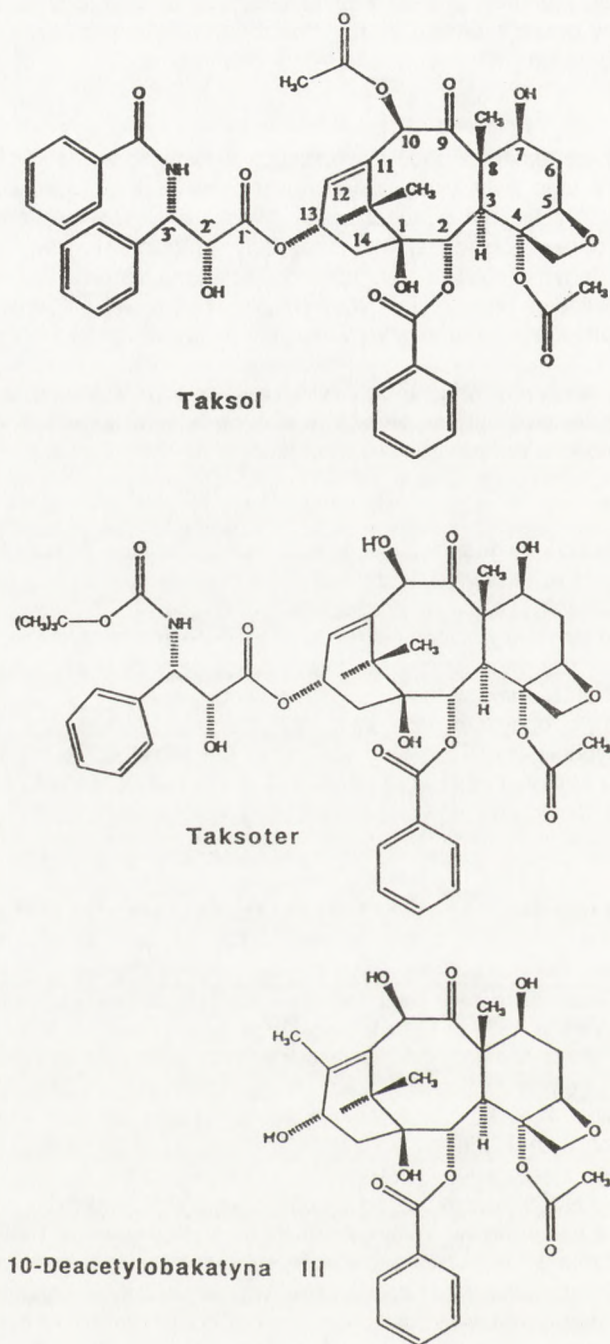
### Podofilotoksyna

Podofilotoksyna należy do lignanów. Jest składnikiem podofiliny – mieszaniny żywic (*Resina Podophylli*) występującej w kłęczach i korzeniach *Podophyllum peltatum* L. (biedrzyga tarczowata, stopkowiec tarczowaty), gatunku pochodzącego z Ameryki Północnej. Podofilotoksyna mimo silnego działania cytotoksycznego nie może być stosowana w czystej postaci ze względu na dużą toksyczność. Otrzymano jednak na drodze półsyntezy dwie pochodne tego związku, są to: VP-16 i VM-26 stosowane w terapii przeciwnowotworowej.

Kultura tkankowa *Podophyllum peltatum* została zapoczątkowana przez Kadkade (32,7), badał on wpływ różnych auksyn i kinetyny na wzrost tkanki kalusowej i wytwarzanie w niej podofilotoksyny. Autor dokonał ciekawej obserwacji, a mianowicie, że wzrostowi tkanki kalusowej (do 8 tygodnia) towarzyszył również wzrost podofilotoksyny.

### Taksol

W ostatnich latach największe zainteresowanie w świecie, zwłaszcza w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i we Francji budzi diterpen taksol, związek izolowany z kory niezwykle wolno rosnących cisów: *Taxus brevifolia*, *Taxus media*, *Taxus wallichiana*. W Polsce występuje tylko jeden gatunek *Taxus baccata* – cis pospolity – objęty całkowitą ochroną. Taksol został wykryty przez Wall i Wani w 1970 r. (33), a jego strukturę określono w 1971 r. (34). Badania kliniczne finansowane przez National Cancer Institute (NCI), Bethesda wykazały, że taksol jest bardzo obiecującym lekiem w zwalczaniu nowotworu jajników, piersi i płuc. Do badań klinicznych prowadzonych w USA taksol uzyskiwany był z kory *Taxus brevifolia* – drzew rosnących na terenach zachodnich Stanów Zjednoczonych i Kanady. Ilość otrzymanego tą drogą związku jest niewielka i wymaga zniszczenia wielu okazów; izolacja taksolu jest trudna i droga, a wydajność niska. Badania NCI wykazały, że do wyleczenia jednego pacjenta potrzebna jest ilość związku wyizolowana z trzech drzew. W świetle dużego zapotrzebowania na taksol (50 000 do 60 000 pacjentów rocznie w USA) NCI badania taksolu uznał za priorytetowe we wszystkich możliwych kierunkach działania. Za dodatkowe, ważne strategie postępowania uznano: całkowitą i częściową jego syntezę (z dostępnych prekursorów taksolu), ekstrakcję z igieł, kory i korzeni różnych gatunków cisa, zakładanie hodowli w gruncie, identyfikację analogów taksolu oraz biosyntezę tych związków w hodowlach tkankowych *in vitro*. Przewidywane jest również wykorzystanie inżynierii genetycznej pozwalającej na przeniesienie genów odpowiadających za biosyntezę taksolu do szybko rosnących roślin.



Rys. 2. Taksol i taksoter, związki działające przeciwnowotworowo oraz ich prekursor nieaktywna 10-deacetylobakatyna III.

Analogiem taksolu jest taksoter otrzymywany we Francji przez firmę farmaceutyczną Rhône-Poulenc Rorer przez częściową syntezę z prekursora taksolu 10-deacetylobakatyiny III, która może być izolowana w dostatecznej ilości z igieł *Taxus baccata* rosnącego w Europie. Taksoter jest lepiej rozpuszczalny w wodzie od taksolu, a także jest dobra jego biodostępność. Z przeprowadzonych licznych badań wynika, że aktywność biologiczna taksolu i taksoteru zależy od łańcucha bocznego (pierścienia oksetanu) podstawionego przy C<sub>13</sub> głównego pierścienia (rys. 2), 10-deacetylobakatyina nie posiadająca tego pierścienia jest nieaktywna (35). Duże nadzieje związane są również z badaniami analogów taksolu, które mogą odznaczać się lepszą rozpuszczalnością, nie tracąc jednocześnie właściwości biologicznych. Ostatnie osiągnięcia w tym zakresie przedstawił Samaranyake i in. (36), Chabner (37) i Edgington (38).

Do otrzymania taksolu wykorzystano również metody biotechnologiczne, zostały one opracowane w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i opatentowane w 1991 r. (9). Przez selekcję różnych linii komórkowych doprowadzono do wytwarzania taksolu i związków takso-  
lopodobnych w bioreaktorach z zawieszoną komórkową *Taxus brevifolia*. W Stanach Zjednoczonych przewiduje się, że w ciągu dwóch lat, taksol do celów handlowych będzie uzyskiwany z kultur tkankowych *in vitro*. Firmy amerykańskie są również zainteresowane produkcją w kulturach komórkowych i tkankowych prekursorów taksolu wykorzystywanych do jego syntezy. Planowane jest otrzymywanie metodą biotechnologiczną bakatyiny III. Całkowita synteza taksolu, związku o złożonej budowie, wymagająca 25 przekształceń jest przewidywana nie wcześniej jak za 5 do 7 lat. NCI widzi rozwiązanie tego problemu przez hodowlę *in vitro*, dającą możliwość otrzymania nie tylko taksolu, ale również jego pochodnych, które powinny być dalej wykorzystane do półsyntezy związków aktywnych. Skróciłoby to znacznie liczbę przekształceń i szybciej doprowadziłoby do końcowego efektu.

Hodowle tkankowe i komórkowe kilku gatunków cisa, innych od tych jakie badane są w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, prowadzone są również w Polsce (10). Wstępne badania fitochemiczne wykonane metodami chromatograficznymi (TLC i HPLC) i biologiczne wskazują na wysoką aktywność frakcji, które mogą zawierać taksol i jego pochodne. Zidentyfikowanie tych związków, a zwłaszcza aktywnych: taksolu i cefalomanniny (39) związane jest z otrzymaniem większej ilości biomasy. Drugim nurtem prac Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AM w Warszawie jest, zgodnie z założeniami NCI, opracowanie biotechnologii mikrorozmnażania niektórych gatunków cisów, co pozwoliłoby w przyszłości na zakładanie w Polsce szkółek, z wyselekcjonowanymi okazami o odpowiedniej zawartości poszukiwanych związków.

Metody mikrorozmnażania roślin leczniczych przedstawiłam w oddzielnym opracowaniu (40). Wstępne badania biologiczne wyciągów z kalusa cisa, wykonane w Polsce metodą oznaczania przyrostu białka komórek linii KB wykazały aktywność w zakresie dawek 1–10 µg/ml, ED<sub>50</sub> wynosi 4,4 µg/ml (10). W badaniach biologicznych przewidziane jest również określenie wpływu antymitotycznego taksolu, gdyż różni się on od działania dimerycznych alkaloidów *Catharanthus roseus* (41).

### Trypdolid i tryptolid

Trypdolid i tryptolid należą do diterpenów. Po raz pierwszy były izolowane z *Tripterygium wilfordii* Hook, rosnącego głównie w Chinach i Japonii (42). W gatunku tym występuje kilka grup związków, z których przeciwnowotworowe działanie wykazują diterpeny trójepoksydowe.

Badania biotechnologiczne *Tripterygium wilfordii* przyniosły interesujące rezultaty. Misawa i in. (2) ustalił, że pożywka MS z 3% sacharozy, 1 mg/l K i 1 mg/l NAA była właściwa do wzrostu kalusa, jednak dodanie 4-chloro-2-difenylomocznika, mającego aktywność zbliżoną do cytokinin, podwyższa w dawce 0,1 mg/l, biosyntezę trypdolidu o prawie 100% (8). Innym ważnym czynnikiem było utrzymanie właściwego pH=6. Także dodanie 100 µg/ml farnezołu do pożywki płynnej zwiększało wytwarzanie trypdolidu (43). *Tripterygium wilfordii* okazał się

wdzięcznym obiektem badań. Doprowadzono bowiem (tab.) do około 10-krotnie większej zawartości diterpenów trójepoksydowych w tkance kalusowej. Dalsze prace Kutney'a i in. (12) pozwoliły na selekcję wysokoproduktywnej linii TPR 4a hodowanej na pożywce uzupełnionej 2 mg/l IAA i 100,0 ml/l mleka kokosowego, zawierającej 36 x więcej tryptolidu niż uzyskiwano go z rośliny gruntowej. Skuteczne działanie mleka kokosowego na rozwój kalusa *T. wilfordii* stwierdzili również Furmanowa i in. (44). Autorzy zaobserwowali, że na pożywce MS z kinetyną, NAA i mlekiem kokosowym wskaźnik wzrostu kalusa wzrósł do 1386%. Tkanka ta pochodziła z 40 pasażu, zawierała tryptolid, tryptolid i celastrol. Frakcja z tymi związkami była aktywna w systemie nowotworowym KB, hamowała przyrost białka, ED<sub>50</sub> wynosiło 10 µg/l. Badania Roberta (45) pozwoliły na optymalizację warunków biosyntezy tryptolidu i tryptolidu w hodowli zawieszinowej, a także innych związków, m.in. tingenonu po raz pierwszy zidentyfikowanych w kulturze tkankowej *Tripterygium wilfordii*.

### Winblastyna i winkrystyna

Winblastyna i winkrystyna są dimerycznymi alkaloidami indolowymi, izolowanymi z *Catharanthus roseus* (L) G. Don – barwinka różowego. Obydwa te związki są już uznanymi i szeroko stosowanymi, w odpowiedniej formie, lekami przeciwnowotworowymi (46). Szersze zastosowanie kliniczne ma winkrystyna, która jest jednym z najczęściej stosowanych leków przy ostrej leukemii i stałych nowotworach u dzieci (13). Winblastyna ma podobne działanie, jest także polecana w leczeniu choroby Hodgkina (ziarnicy złośliwej). Związki te należą do najdroższych leków pochodzenia naturalnego, ponieważ są otrzymywane z roślin, w których ich zawartość jest bardzo niska.

*Catharanthus roseus* pochodzi z Madagaskaru, rośnie w klimacie ciepłym. Prace nad warunkami jego uprawy w Polsce, prowadziła Sadowska (14). Gatunek ten zawiera ok. 100 alkaloidów mono- i dimerycznych; niektóre z nich mają cenne właściwości lecznicze.

Od ponad 10 lat trwają badania dotyczące ustalenia optymalnych warunków biosyntezy winblastyny i winkrystyny w hodowli *in vitro*. Pierwsze badania nie doprowadziły jednak do biosyntezy dimerycznych alkaloidów *in vitro*. Dopiero wprowadzenie pewnych zmian w składzie pożywek i metodach hodowli dało pozytywne wyniki. Zwrócono również uwagę na katarantynę i windolinę – alkaloidy monomeryczne, służące do otrzymywania bezpośredniego prekursora winblastyny. Przekonano się, że przyspieszyć i zwiększyć biosyntezę alkaloidów monomerycznych: ajmalicyny i katarantyny może stres fizjologiczny wywołany dodaniem do pożywki ekstraktu z grzybów patogennych. Zawartość katarantyny i serpentyny podwyższa stres osmotyczny spowodowany dodaniem mannitolu. Na biosyntezę winkrystyny i winkaleukoblastyny korzystnie wpływa indukcja chloroplastów, w których zachodzi biosynteza alkaloidów oraz użycie właściwych regulatorów wzrostu, zwłaszcza benzyloaminopuryny – BAP (47).

Do najbardziej obiecujących należy metoda opracowana przez zespół Kutney'a (12), który do określonych etapów biosyntezy wtórnych metabolitów w zawieszinie komórkowej *Catharanthus roseus* wykorzystał enzymy izolowane z hodowli zawieszinowych tego samego gatunku. W ten sposób doprowadził do połączenia dwóch monomerycznych alkaloidów katarantyny z windoliną i utworzenia 3',4'- anhydrowinblastyny, z której w wyniku biotransformacji otrzymał winblastynę. Podobne prace prowadzone były w innych ośrodkach naukowych (48). Tą samą drogą uzyskano leurozynę i katarinę.

Doskonaląc metodę sprzęgania katarantyny z windoliną zwrócić należy uwagę na zawartość katarantyny w hodowli *in vitro*, gdyż alkaloidu tego w dojrzałej roślinie jest mniej niż windoliny. Według Smitha i in. (48) katarantynę z większą wydajnością uzyskać można w hodowli zawieszinowej. Badania Furmanowej i in. (49) wykazały, że katarantyna, która jest zawarta w młodych roślinach rozmnażanych *in vitro* nie jest wykrywalna (metodą TLC) w tych roślinach już po kilkumiesięcznej wegetacji w gruncie. Katarantyna może być również wykorzystana do otrzymywania navelbiny, jest to nor-5'-anhydrowinblastyna, alkaloid otrzymywany w drodze półsyntezy.



Według Browna i in. (50) winkrystyna, winblastyna, navelbina – alkaloidy których dostarcza *Catharanthus roseus* oraz taxol otrzymywany z gatunków rodzaju *Taxus* należą do najcenniejszych związków chemicznych pochodzenia naturalnego działających przeciwnowotworowo.

Nowym surowcem do otrzymywania alkaloidów *Catharanthus roseus* i innych cytostatyków mogą być w przyszłości korzenie transformowane przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes*. Proces otrzymywania takich organów i ich właściwości opisała Olszowska (51).

W Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Warszawie badane są w hodowli *in vitro* następujące gatunki zawierające wtórne metabolity o działaniu cytostatycznym i przeciwnowotworowym: *Camptotheca acuminata*, *Catharanthus roseus* (49), *Cephalotaxus harringtonia* i *C. fortunei* (52), *Taxus media*, *T. baccata*, *T. cuspidata* (10) i *Triporygium wilfordii* (44).

## Literatura

1. Hartwell J. L., (1976), *Cancer Treat. Rep.*, 60, 1035–1967.
2. Misawa M., Hayashi M., Takayama S., (1983), *Planta Medica*, 49, 115–119.
3. Sakato K., Misawa M., (1974), *Agric. Biol. Chem.*, 38, 491–497.
4. Kutney J. P., (1985), F.E.C.S. Third International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, September 16–21, Sofia, Bulgaria, 1, 168–179.
5. Powell R. G., Weisleder D., Smith C. R. Jr., Wolff I. A., (1969), *Tetrahedron Lett.*, 46, 4081–4084.
6. Kouadio K., Creche J., Chenieux J. C., Rideau M., Viel C., (1985), *J. Plant Physiol.*, 118, 277–283.
7. Kadkade P. G., (1982), *Plant Sci. Lett.*, 25, 107–175.
8. Misawa M., Hayashi M., Takayama S., (1985), in: K. H. Neuman, W. Barz, E. Reinhard, (eds.) *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 235–246.
9. Gibson D. M., Christen A., Bland J., (1991), Patent US, 23.05.1991.
10. Furmanowa M., Rapczewska L., Dymowski W., Radzikowski Cz., Duś D., Kroszczyński W., (1992), XV Naukowy Zjazd Pol. Tow. Farm., Warszawa, październik, streszczenia komunikatów.
11. Anon I., (1984), *Chem. Week.*, 134, 18–19.
12. Kutney J. P., Choi L. S., Duffin R., Hewitt G., Kawamura N., Kurihara T., Salisbury P., Sindelar E., Stuart K. L., Townsley P. M., Chalmers W. T., Webster F., Jacoli G. G., (1983), *Planta Medica*, 48, 158–163.
13. Misawa M., Nakanishi T. M., (1988), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Medicinal and Aromatic Plants I* (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 191–208.
14. Sadowska A., (1991), w: *Rośliny i roślinne substancje przeciwnowotworowe*. PWN, Warszawa, 106–116.
15. Kupchan S. M., Jarvis B. B., Dailey R. G., Jr., Bright W., Bryan R. F., Shizuri Y., (1976), *Am. Chem. Soc.*, 98, 7092–7093.
16. Goodwin S., Smith A. F., Horning E. C., (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1903–1907.
17. Chénieux J. C., Ramavat K. G., Rideau M., (1988), in: (ed. Y. P. S. Bajaj), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Medicinal and Aromatic Plants I*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 448–463.
18. Gamburg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Exp. Cell. Res.*, 50, 151–158.
19. Kouadio K., Rideau M., Ganser C., Chénieux J. C., (1984), *Plant Cell Rep.*, 3, 203–205.
20. Chien N. M., Rosazza J. P., (1979), *Drug Metab. Dispos.*, 7, 211–214.
21. Delfel N. E., (1980), *Planta Med.*, 39, 168–179.
22. Delfel N. E., Rothfus J. A., (1977), *Phytochemistry*, 16, 1595–1598.
23. Misawa M., Hayashi M., Takayama S., (1985), in: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 235–246.
24. Spencer G. F., Plattner R. B., Powell R. G., (1976), *J. Chromatogr.*, 120, 335.
25. Heinsteinst P. F., (1985), *J. of Natural Products*, 48, 1–9.
26. Wall M. E., Wani M. C., Cook C. E., Palmer K. H., McPhail A. T., Sim G. A., (1966), *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 3888–3890.
27. Kupchan S. M., Court W. A., Dailey R. G., Jr., Gilmore C. J., Bryan R. F., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7194–7195.

28. Kutney J. P., Beale M. M., Salisbury P. J., Stuart K. L., Worth B. R., Townsley P. M., Chalmers W. T., Nilsson K., Jacoli G. G., (1981), *Phytochemistry*, 20, 653–657.
29. Dymowski W., Furmanowa M., (1989), *Acta Polon. Pharm.*, 46, 81–89.
30. Dymowski W., Furmanowa M., (1990), *Acta Polon. Pharm.*, 47, 5–6.
31. Dymowski W., Furmanowa M., (1992), *Acta Polon. Pharm.*, (w druku).
32. Kadkade P. G., (1981), *Naturwissenschaften*, 68, 481–482.
33. Wall M. E., Wani M. C., (1970), *Int. Sym. Chem. Nat. Prod.*, 7<sup>th</sup> Riga, Abstr., 614.
34. Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon D., McPhail A. T., (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325–2327.
35. Borman S., (1991), *Chemical and Engineering*, 2, 11–18.
36. Samaranyake G., Magri N. F., Jitrangri Ch., Kingston D. G. I., (1991), *Journal of Organic Chemistry*, 56, 5114–5119.
37. Chabner B. A., (1991), *Biotechnology*, 9, 1012.
38. Edgington S. H., (1991), *Biotechnology*, 9, 933–938.
39. Kingston D. G. I., Samaranyake G., Ivey C. A., (1990), *J. of Natural Products*, 55, 1–12.
40. Furmanowa M., (1992), *Biotechnologia – PI* (w tym numerze).
41. Bruce A., Chabner M. D., (1991), *Principles and Practice of Oncology*, 5, 1–10.
42. Kutney J. P., Beale M. M., Salisbury P. J., Sindeler R. D., Stuart K. L., Worth B. R., Townsley P. M., Chalmers W. T., Donnelly D. J., Nilson K., Jacoli G. G., (1980), *Heterocycles*, 14, 1465–1467.
43. Misawa M., (1985), in: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 31, (ed. A. Friechter), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 59–88.
44. Furmanowa M., Józefowicz J., Gustowski W., Kroszczyński W., Duś D., Radzikowski Cz., (1989), 5<sup>th</sup> Sc. Symp. of Socialist Countries on Biotechnology, Abstracts II: 274–275, Balatonszéplak, Hungary, 4–8 September.
45. Roberts M., (1989), *Isolation of Biologically Active Metabolites and Biotransformation Studies Using Tissue Cultures of Tripterygium wilfordii*, The Univ. of British Columbia, Ph. D. Thesis.
46. Podlewski J. K., Podlewska A., (1986), *Leki współczesnej terapii*, PZWL, Warszawa.
47. Loyola-Vargas V. M., Velasco C., Mendez B. M., Oropeza C., Reyes J., Robert M. L., (1986), VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Minnesota, Minneapolis, USA, 3–8 August, Abstracts 74.
48. Smith J., Smart N. J., Quesnel A. A., Misawa M., Kurz W., (1986), in: VI Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, MN, 256.
49. Furmanowa M., Józefowicz J., Olędzka H., Pietrosiuk A., (1991), VI Konferencja Naukowa: „Roślinne kultury tkankowe w Polsce”, Radzików, streszczenia, 32.
50. Brown T. D., Burriss H. A., Harbin K. A., O'Rourke T. J., Rodriguez G. J., Wall J. G., Weiss G. R., (1991), in: *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, Annual 12 (eds: H. M. Pinedo, D. L. Longo, B. D. Chabner), Elsevier, Science Publishers B. V., 134–135.
51. Olszowska O., (1992), *Biotechnologia – PI* (w tym numerze).
52. Furmanowa M., Beldowska B., Ostrowska E., Gustowski W., Kroszczyński W., Duś D., Radzikowski Cz., (1989), 5<sup>th</sup> Sc. Symp. of Socialist Countries on Biotechnology, Abstracts II, 315–316, Balatonszéplak, Hungary, 4–8 September.

## Production of antitumor compounds by plant biotechnological methods

### Summary

This paper presents the problems associated with the *in vitro* production of antitumor agents by plant tissue culture methods. The most interesting examples of chemical compounds with cytostatic activities found in tissue culture are discussed: bruceantin, camptothecin, ellipticine, harringtonine and homoharringtonine, maytansine, podophyllotoxin, taxol, triptolidide and triptolide, vinblastine and vincristine.

### Adres dla korespondencji:

Mirosława Furmanowa, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02–097 Warszawa.