



Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka

Agnieszka Pietrosiuk, Mirosława Furmanowa

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna, Warszawa

Plant biotechnology in human healthcare

Summary

Biotechnology is one of science, technique and economic areas, which develops quickly and continuously. Important role in pharmaceutical sciences plays plant biotechnology which is advanced technology applying productive potential of alive cells in industrial processes, or serving for improvement of plants using genetic or epigenetic methods. It also gives many possibilities for obtaining new sources of secondary metabolites and opens up new areas in healthcare. Apart from many medicines produced by chemical synthesis, plant-derived natural substances are still of great importance in medicine. Such substances tend to have complicated chemical structures so that their chemical synthesis is uneconomic. Plant biotechnology offers an opportunity to exploit cells, tissues and organs or whole plants by growing them *in vitro* and to genetically manipulate them to obtain desired compounds.

The development of new areas of molecular biology, for example functional genomics, gives a possibility of comprehensive investigations of biological systems. It could contribute to enhancing the production of known and novel secondary metabolites in plant cells.

Moreover, an important branch of studies is the use of genetically modified plants to obtain edible vaccines in plants, antibodies, plant-derived recombinant proteins and biologically active substances.

Key words:

plant biotechnology, secondary metabolites, healthcare.

Adres do korespondencji

Agnieszka Pietrosiuk,
Katedra i Zakład Biologii
i Botaniki Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna,
ul. Banacha 1,
02-097 Warszawa;
e-mail:
ap@farm.amwaw.edu.pl

1. Wstęp

Biotechnologia jest jednym z szybko i ciągle rozwijających się obszarów nauki, techniki i gospodarki. Zgodnie z klasyfikacją przyjętą przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju

(ang. *Organization for Economic Co-Operation and Development*) jak i Unię Europejską można wyróżnić następujące umowne obszary biotechnologii, często oznaczane kolorami: biotechnologię zieloną związaną przede wszystkim z rolnictwem, biotechnologię czerwoną wykorzystywaną w ochronie zdrowia, biotechnologię białą wykorzystującą systemy biologiczne w produkcji przemysłowej i ochronie środowiska oraz biotechnologię niebieską, która zajmuje się biotechnologią alg i innych fotosyntetyzujących form morskich (39,42).

Biotechnologia, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej jest dzisiaj interdyscyplinarną dziedziną wiedzy, o wielkich możliwościach rynkowych. Z tradycyjnej biotechnologii fermentacyjnej, przekształciła się w główną technologię służącą poszukiwaniu nowych środków leczniczych, szczepionek i środków diagnostycznych (20).

2. Znaczenie biotechnologii roślin w ochronie zdrowia człowieka

Biotechnologia roślin zaliczana jest do obszaru biotechnologii zielonej. Realną szansą dla biotechnologii zielonej jest wykorzystanie jej w produktach biotechnologii czerwonej i białej (39).

Biotechnologia roślin jest to zaawansowana technologia wykorzystująca potencjał produkcyjny żywych komórek w procesach przemysłowych bądź służy do ulepszenia roślin przy użyciu metod genetycznych lub epigenetycznych.

Rośliny są źródłem cennych metabolitów wtórnych powstających w komórkach roślinnych na drodze wyspecjalizowanej przemiany materii. Do najważniejszych farmaceutyków pochodzenia roślinnego należą: ajmalicyna, artemisyjna, ajmalina, berberyna, chinina, digoksyna, diosgenina, kamptotecyna, kapsaicyna, kastanospermina, kodeina, kolchicyna, eliptycyna, emetyna, forskolina, ginsenozydy, morfina, podofilotoksyna, rezerpina, sanguinaryna, szikonina, paklitaksel oraz winkrystyna i winblastyna (36). Wiele z tych związków otrzymywanych jest już metodami biotechnologicznymi (1-4,6-8,12,14,31,32,35,36,44,45).

Poza wieloma lekami produkowanymi metodą syntezy chemicznej duże znaczenie w medycynie mają nadal substancje naturalne uzyskiwane z roślin. Często są to fizjologicznie silnie działające połączenia, które z chemicznego punktu widzenia mają tak skomplikowaną strukturę, że ich synteza chemiczna jest nieopłacalna (5). Przykładem jest paklitaksel, który wprawdzie otrzymano, z różną wydajnością, na drodze całkowitej syntezy (17,25). Jednak, na proces syntezy paklitakselu składa się aż 39 etapów, co powoduje, że nie jest on opłacalny ekonomicznie (30).

Biotechnologia roślin daje wiele możliwości otrzymywania źródeł wtórnych metabolitów i substancji naturalnych biologicznie czynnych. Są to: rośliny lecznicze uzyskane w hodowli *in vitro* (z uwzględnieniem gatunków zagrożonych, wysoko wydajnych odmian roślin modyfikowanych pod względem metabolicznym), kultury tkanek i organów roślinnych: hodowla zawieszinowa, pędów, korzeni (z uwzględnie-

niem hodowli na większą skalę), nowe źródła, takie jak algi i inne fotosyntetyzujące formy morskie, korzenie transgeniczne, rośliny genetycznie modyfikowane wytwarzające przeciwciała i szczepionki (13).

Prowadzone są badania dotyczące zastosowania genetycznie modyfikowanych roślin w leczeniu najbardziej wyniszczających chorób, takich jak, cukrzyca, choroby nowotworowe czy wirusowe jak wścieklizna, AIDS.

Powszechnie biotechnologia roślin utożsamiana jest z organizmami genetycznie modyfikowanymi (GMO). Jednakże nie mniej ważną i stosowaną już od ponad pięćdziesięciu lat jest starsza część biotechnologii zwana metodą kultur *in vitro*.

Metody mikrorozmnażania roślin zarówno leczniczych jak i użytkowych mają duże znaczenie praktyczne. Są alternatywną metodą do pozyskiwania roślin z warunków naturalnych i upraw w gruncie, a ponadto posiadają wiele zalet. Są niezależne od pór roku, warunków klimatycznych, pozwalają na zwiększenie współczynnika mnożenia roślin, otrzymanie jednorodnych genotypów, otrzymanie roślin wolnych od wirusów, mnożenie roślin nie wytwarzających nasion, otrzymanie roślin o zmienionej liczbie chromosomów, wyselekcjonowanie roślin o danym fenotypie lub genotypie, ochronę gatunków zagrożonych wyginięciem. W Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Warszawie prowadzone są badania, w których wykorzystywane są techniki biotechnologiczne do mikrorozmnażania, otrzymywania kultur komórkowych, kultur tkankowych, somatycznych nasion oraz organów transgenicznych wielu roślin leczniczych (5,7-9,12-14,17,25,27,28,30-34,40,44-46).

Mnożenie roślin w kulturze *in vitro* może następować bezpośrednio poprzez pąki szczytowe i boczne oraz zarodki, czyli z istniejących merystemów lub pośrednio przy udziale tkanki kalusowej lub powstających bezpośrednio na eksplantatach merystemów przybyszowych. Z praktycznego i farmaceutycznego punktu widzenia, mnożenie roślin z istniejących tkanek merystematycznych nie jest trudne pod względem technicznym, a otrzymane tym sposobem rośliny są identyczne pod względem genetycznym z roślinami, od których pobrano tkanki.

Bardziej wydajną metodą, dającą większy wskaźnik, jest mnożenie przy udziale tkanki kalusowej, lecz w przeciwieństwie do regeneracji roślin z istniejących merystemów istnieje tutaj niebezpieczeństwo zaistnienia zmian somaklonalnych, czyli uzyskania roślin zmienionych genetycznie. Zjawisko zmienności somaklonalnej jest często wykorzystywane przez hodowców do otrzymywania nowych odmian, zwłaszcza roślin ozdobnych.

Rośliny mogą być regenerowane na drodze somatycznej embriogenezy, czyli wskutek podziałów mitotycznych pojedynczych roślinnych komórek somatycznych, które mogą być indukowane do wytworzenia zarodka, a następnie całej rośliny. Somatyczny zarodek jest identyczny jak zarodek powstały z zapłodnienia komórki jajowej. Embrioidy tworzą się zwykle z powierzchniowych komórek tkanki kalusowej lub obwodowych w kulturach zawieszinowych. Istotny wpływ na wytwarzanie się tzw. kalusa embriotwórczego mogą mieć związki azotowe czy też auksyny, np. kwa-

sy: α -naftalenooctowy, 2,4-dichlorofenoksyoctowy, β -naftoksyoctowy czy β -indoli-octowy. Rodzaj użytej auksyny do wytworzenia kalusa embriotwórczego, jej stę-żenie i sposób stymulowania tkanek do tworzenia somatycznych embrioidów jest zależny od badanego gatunku. Somatyczną embriogenezę zaobserwowano u ponad 150. gatunków. Somatyczna embriogeneza jest jedną z najwydajniejszych metod mnożenia roślin *in vitro*, np. metoda rozmnażania *Carum carvi* drogą somatycznej embriogenezy znacznie zwiększa wskaźnik mnożenia, pozwala na otrzymanie 2000 roślin, z 1 g kalusa (14,41).

Opracowano technologię otrzymywania syntetycznych nasion wielu roślin lecz-nicznych. Nasiona, somatyczne zarodki, merystemy pędów lub korzeni, ziarna pyłku mogą być zatapiane w sztucznych otoczkach, np. z alginianu wapnia z dodatkiem substancji odżywczych. Nasiona te z powodzeniem są wykorzystywane do mikroroz-mnażania, dłuższego przechowywania oraz transportu roślin, co ma zastosowanie praktyczne (14,46).

Tkanka kalusowa może wytwarzać wtórne metabolity, jak w przypadku *Arnebia euchroma* lub może być użyta do założenia kultury zawiesinowej (35).

Biotechnologiczna produkcja związków naturalnych w kulturach komórek roś-linnych jest atrakcyjną alternatywą ich pozyskiwania, jakkolwiek produkcja w takiej kulturze jest bardzo niska. Dlatego niezbędne jest zastosowanie okresowych hod-owli dwuetapowych. W pierwszym etapie stosuje się pożywki wzrostowe powo-dujące namnożenie dużej ilości biomasy aż do osiągnięcia fazy stacjonarnej, w dru-gim natomiast płynne podłoża produkcyjne – stymulujące wytwarzanie pożąda-nych związków (33).

W wielu przypadkach można zwiększyć wytwarzanie metabolitów przez zasto-sowanie w hodowli elicytorów, takich jak jasmonian metylu, kwas salicylowy czy sole metali ciężkich lub poprzez biotransformację z tanich prekursorów, np. pro-dukcja salidrozydu i rozawiny w hodowli zawiesinowej *Rhodiola rosea* (10,11). Kla-sycznym przykładem biotransformacji było otrzymanie beta-metylodigoksyny z be-ta-metylodigitoksyny w kulturze komórkowej *Digitalis lanata* (1).

Hodowla zawiesinowa może być prowadzona w kolbach na wytrząsarkach, a tak-że na większą skalę w bioreaktorach. Niektóre wtórne metabolity produkowane są w skali przemysłowej przez roślinne kultury komórkowe. Są to szikonina, purpury-na, berberyna, polisacharydy, winkamina, kwas rozmarynowy, geraniol (4,6).

Kultura zawiesinowa do tej pory odniosła tylko ograniczony sukces komercyjny. Spowodowane jest to tym, że nieznanne są jeszcze wszystkie szlaki biosyntezy meta-bolitów wtórnych w komórkach roślinnych. Rozwój nowych dziedzin biologii mole-kularnej, np. genomiki funkcjonalnej stwarza możliwość szczegółowych badań syste-mów biologicznych, w tym biosyntezy metabolitów wtórnych. Techniki stosowane w genomice funkcjonalnej mogą wpłynąć na zwiększenie produkcji znanych i odkry-cie całkiem nowych metabolitów wtórnych nie spotkanych wcześniej w naturze (26).

Rozwój technik genetycznych stworzył nowe możliwości w zakresie biotechno-logii roślinnej, m. in. poprzez rozwój kultur organów transgenicznych, takich jak

korzenie transformowane lub teratomy pędowe. Technologia transformacji roślin stała się wielofunkcyjnym systemem dla hodowli i ulepszania roślin leczniczych, jak również dla badań funkcji genów w roślinie.

Zdolność do produkcji wtórnych metabolitów związana jest z procesem organogenezy – tkanki zróżnicowane roślin otrzymane w hodowli *in vitro* zawierają większe ilości wtórnych metabolitów niż tkanka niezorganizowana, jaką jest kalus.

W korzeniach wielu gatunków roślin przebiega proces biosyntezy oraz gromadzą się metabolity wtórne. Dlatego też korzenie transformowane są cennym materiałem roślinnym. Korzenie transgeniczne uzyskuje się, m. in. w wyniku transformacji materiału roślinnego przy użyciu bakterii z rodzaju *Agrobacterium* – *A. rhizogenes* jako naturalnego wektora lub przez bezpośrednie wprowadzenie T-DNA z plazmidu Ri *A. rhizogenes* do tkanki roślinnej. W wyniku ekspresji genów znajdujących się w T-DNA zmienia się metabolizm komórki roślinnej w następstwie, czego powstają korzenie. Przyrost biomasy korzeni uzyskanych tą metodą następuje bardzo szybko. Są one również zdolne do syntezy wtórnych metabolitów charakterystycznych dla korzeni rosnących w gruncie. Ponadto hodowla korzeni transformowanych jest ekonomicznie korzystna, gdyż korzenie te nie wymagają regulatorów wzrostu oraz rosną na pożywkach o obniżonej zawartości mikro- i makroelementów. W kulturach korzeni transformowanych znaleziono takie ważne dla lecznictwa związki jak: alkaloidy tropanowe (skopolaminę i hioscyjaminę), alkaloidy indolowe, chinolinowe (chininę), glikozydy kardenolidowe, poliacetyleny i tiofeny, ginsenozydy, antrachinony, naftochinony, paklitaksel. Korzenie transformowane są również zdolne do regeneracji całych roślin i utrzymania ich genetycznej stabilności podczas dalszego pasażowania i regeneracji roślin (7,15,29,31-34,38).

Rośliny transgeniczne można również otrzymać poprzez wprowadzenie do genomu rośliny obcego genu za pomocą zrekombinowanych plazmidów *Agrobacterium tumefaciens* i następującą regenerację całej rośliny z pojedynczej komórki. Wprowadzony gen może zawierać sekwencje DNA warunkujące nowe pożyteczne cechy, takie na przykład, jak odporność na herbicydy, szkodniki, choroby roślin.

Ważnym kierunkiem badawczym jest także wprowadzanie transgenicznych roślin do produkcji szczepionek doustnych i rekombinowanych białek oraz środków i preparatów leczniczych (43).

Podjęcie tych badań było możliwe dzięki opracowaniu efektywnych metod transformacji roślin użytkowych, a także dzięki zidentyfikowaniu wysoce immunogennych epitopów białek wirusowych oraz antygenów mikroorganizmów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt. Białka powstające w komórce roślinnej na matrycy egzogenego DNA mają identyczny skład aminokwasów, ulegają podobnym modyfikacjom i wykazują analogiczne właściwości jak te pojawiające się w procesach patogenezy w organizmie gospodarza (18,19,22).

Szczepionki podjednostkowe zawierają oczyszczone preparaty rozmaitych antygenów lub kombinacje różnych antygenów. Obecnie, otrzymuje się je ze zrekombinowanych wirusów, bakterii lub drożdży. Możliwe jest również wytwarzanie szcze-

pionek podjednostkowych, tzn. zawierających antygeny lub epitopy antygenów mikroorganizmów chorobotwórczych, w roślinach. Podanie roślinnej szczepionki drogą doustną ma duże znaczenie z uwagi na zdolność kompletnej immunizacji ogólnoustrojowej, a także specyficzną odpowiedź śluzówkową obejmującą wszystkie błony śluzowe organizmu. Inną zaletą szczepionek jadalnych jest mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia odczynów alergicznych, które jako skutek śladowych zanieczyszczeń, mogą powstawać po podaniu domięśniowym szczepionek wyprodukowanych w mikroorganizmach lub kulturach komórkowych. Szczepionki takie można produkować lokalnie, w miejscu zapotrzebowania. Roślinne szczepionki jadalne są bezpieczne, ponieważ w roślinie zawarte jest pojedyncze białko lub fragment białka drobnoustroju chorobotwórczego, dla którego szczepionka jest przeznaczona. Duże znaczenie mają również takie zalety jak bezbolesna forma „zaszczepienia” oraz niski koszt produkcji, który jest wielokrotnie niższy niż koszt szczepionek wytwarzanych dotychczasowymi metodami (18,37).

Istnieją dwie metody otrzymywania szczepionek w roślinach. Pierwsza wykorzystuje rośliny transgeniczne; polega ona na stabilnej transformacji, w wyniku której następuje integracja zrekombinowanego DNA z genomem jądrowym lub chloroplastu komórki roślinnej. Druga metoda polega na nadprodukcji w roślinie antygeny, którego sekwencja zostaje wprowadzona w odpowiednie miejsce genomu wirusa roślinnego w taki sposób, że w rekombinowanym wirusie białko antygenowe ekspozowane jest na jego powierzchni. Wirus roślinny namnaża się w zainfekowanej roślinie, w wyniku, czego powstaje również antygen. Do pierwszych szczepionek roślinnych użyto roślin tytoniu, pomidora, ziemniaka, łubinu, sałaty, bananowca. Użytko: transgeniczne rośliny tytoniu, w którym zachodziła ekspresja antygeny powierzchniowego (HBsAg) wirusa zapalenia wątroby typu B, transgeniczne rośliny pomidora, w których obecne było białko powierzchniowe wirusa wścieklizny, transgeniczne bulwy ziemniaka produkujące enterotoksynę *Escherichia coli*, czy też transgeniczne linie kalusa łubinu oraz transgeniczną sałatę, w których zachodziła ekspresja immunogenego białka powierzchniowego HBV. Badania na zwierzętach doświadczalnych, a następnie na ochotnikach, potwierdziły skuteczność zastosowanych transgenicznych tkanek roślinnych do immunizacji na drodze pokarmowej (18,19,21-24).

Obecnie w Instytucie Pasteura w Paryżu, na Uniwersytetach Mediolańskim i na Florydzie prowadzone są badania nad roślinnymi szczepionkami przeciwnowotworowymi. Identyfikowane są specyficzne epitopy charakterystyczne dla ludzkich nowotworów, np. dla czerniaka złośliwego (37).

Udało się również uzyskać ekspresję przeciwciał monoklonalnych – pełnej sekwencji mysich przeciwciał w transgenicznej roślinie (16).

Ważnym kierunkiem rozwoju biotechnologii roślin jest produkowanie w roślinach naturalnych substancji biologicznie czynnych, takich jak: hormony, wybrane składniki krwi, czy immunomodulatory (cytokiny, limfokiny). Przykładem tego kierunku jest ekspresja w roślinach ludzkiego hormonu wzrostu w nasionach *Nicotiana*

tabacum czy też niskocząsteczkowego białka hirudyny w nasionach *Brasica napus*. Hirudyna jest antykoagulantem używanym w przemyśle farmaceutycznym (18).

Dynamiczny rozwój biotechnologii roślin wskazuje na jej ważną rolę w naukach farmaceutycznych, daje wiele możliwości otrzymywania wtórnych metabolitów, służy poszukiwaniu nowych środków leczniczych, szczepionek i substancji naturalnych biologicznie czynnych oraz otwiera nowe obszary w ochronie zdrowia.

Literatura

1. Alfermann A. W., Petersen M., (1995), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 43, 199-205.
2. Chang H., Sim S. J., (1996), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 38, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 233-242.
3. Cusidó M. R., Palazón J., Piñol M. T., Bonfill M., Morales C., (1999), *Planta Med.*, 65, 144-148.
4. DiCosmo F., Misawa M., (1995), *Biotechnol. Adv.*, 13(3), 425-453.
5. Diettrich B., (2003), red. Kayser O., Müller R. H., *Biotechnologia farmaceutyczna*, Warszawa, PZWL, 164-175.
6. Fujita Y., Tabata M., (1987), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 167-185.
7. Furmanowa M., Sykłowska-Baranek K., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 683-686.
8. Furmanowa M., Gajdzis-Kuls D., Ruszkowska J., Czarnocki Z., Obidoska G., Sadowska A., Rani R., Upadhyay S. N., (2001), *Planta Med.*, 67, 146-149.
9. Furmanowa M., Gajdzis-Kuls D., Starościk B., Stefańska J., (1998), *Herba Polonica*, 44(4), 265-269.
10. Furmanowa M., Hartwich M., Alfermann A. W., (2002), *Herba Polonica*, 48(2), 71-75.
11. Furmanowa M., Hartwich M., Alfermann A. W., Koźniewski W., Oklejak M., (1999), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 56(2), 105-110.
12. Furmanowa M., Olędzka H., Józefowicz J., Pietrosiuk A., (1994), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 63(2), 179-184.
13. Furmanowa M., Pietrosiuk A., (2003), *Herba Polonica*, 49 1/2, 62-63.
14. Furmanowa M., Sowińska D., Pietrosiuk A., (1991), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 15, *Medicinal and Aromatic Plants III*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 176-190.
15. Giri A., Lakshmi Narasu M., (2000), *Biotechnol. Adv.*, 18, 1-22.
16. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K., (1989), *Nature*, 342, 76-78.
17. Holton R. A., Kim H. B., Somoza C., Liang F., Biediger R. J., Boatman P. D., Shindo M. S., Mith C. C., Kim S. C., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1599-1600.
18. Kapusta J., (1999), *Biotechnologia*, 3(46), 94-105.
19. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibow V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A. B., (1999), *The FASEB Journal*, 13, 1796-1799.
20. Kayser O., Müller R. H., (2003), red. Kayser O., Müller R. H., *Biotechnologia farmaceutyczna*, Warszawa, PZWL, 3-10.
21. Khalsa G., Mason H. S., Arntzen C. J., (2004), in: Eds. Fischer R., Schillberg S., *Molecular Farming, Plant-made Pharmaceuticals and Technical Proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, 135-158.
22. Legocki A. B., Miedzinska K., Czaplińska M., Plucienniczak A., Wędrychowicz H., (2005), *Vaccine*, 23, 1844-1846.
23. Mason H. S., Man-Kit Lam D., Arntzen C. J., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11745-11749.
24. Mason H. S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C. J., (2002), *Trends Mol. Med.*, 8(7), 324-329.
25. Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J. J., Ueno H., Nantermet P. G., Guy R. K., Clalborne C. F., Renaud J., Couladouros E. A., Paulvannan K., Sorensen E. J., (1994), *Nature*, 367, 630-634.
26. Oksman-Caldentey K-M., Inzé D., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9(9), 432-440.
27. Olszowska O., Furmanowa M., (1990), *Planta Med.*, 56, 637.
28. Olszowska O., Furmanowa M., (1993), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 24, *Medicinal and Aromatic Plants V*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 132-147.

29. Olszowska O., (2000), *Biotechnologia*, 2(49), 54-63.
30. Pezzuto J., (1996), *Nature Biotechnol.*, 14, 1083.
31. Pietrosiuk A., Furmanowa M., (2001), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 70(4), 261-265.
32. Pietrosiuk A., (1997), *Wybrane alkaloidy indolowe w różnych organach i tkankach Catharanthus roseus (L.) G. Don otrzymanych w hodowli in vitro*, praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademii Medycznej w Warszawie.
33. Pietrosiuk A., (2005), *Lithospermum canescens (Michx.) Lehm. alkaloidy pirolizydynowe i pochodne szikoiny, mikrorozmnażanie, korzenie transformowane, właściwości biologiczne*, praca habilitacyjna wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Warszawie.
34. Pietrosiuk A., Sykłowska-Baranek K., Wiedenfeld H., Wolinowska R., Furmanowa M., Jaroszyk E., (2006), *Plant Cell Rep.*, (Epub ahead of print).
35. Pietrosiuk A., Urmantseva V., Furmanowa M., (1999), *Herba Polonica*, 45(4), 354-361.
36. Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A., (2002), *Biotechnol. Adv.*, 20, 101-153.
37. Sala F., Rigano M. M., Barbante A., Basso B., Walmsley A. M., Castiglione S., (2003), *Vaccine*, 21, 803-808.
38. Sevón N., Oksman-Caldentey K-M., (2002), *Planta Med.*, 68, 859-868.
39. Stanowisko prezydium Komitetu Biotechnologii nt. Perspektyw rozwoju biotechnologii w Polsce, (2004), *Biotechnologia*, 2(65).
40. Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Dłuska H., Furmanowa M., (2004), *Herba Polonica*, 50(2), 55-64.
41. Szypuła W., Pietrosiuk A., Suchocki P., Olszowska O., Furmanowa M., Kazimińska O., (2005), *Plant Sci.*, 168 (6), 1443-1452.
42. Twardowski T., (2004), *Eur. Biotechnol. News*, 5(3), 24-28.
43. Twymann R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R., (2003), *Trends Biotechnol.*, 21(12), 570-578.
44. Wiedenfeld H., Furmanowa M., Roeder E., Guzewska J., Gustowski W., (1997), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 49, 213-218.
45. Wysokińska H., Rózga M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 78-83.
46. Zych M., Furmanowa M., Krajewska-Patan A., Łowicka A., Dreger M., Mendlewska S., (2005), *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 47/2, 83-87.