

Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Krzaczek

Tadeusz KRZACZEK, Kazimiera GRZYCKA

Badanie aktywności cytostatycznej frakcji laktonowej *Viscum album* L.

Исследование цитостатической активности лактоновой фракции *Viscum album* L.

Investigations in the Cytostatic Activity of Lacton Fraction of *Viscum album* L.

Lecznicze działanie jemioli, stosowanej od dawna w medycynie ludowej (24), potwierdziły badania wyciągów z materiału świeżego i wysuszonego. Ocenę wartości farmakologicznej preparatów z ziela jemioli przeprowadzili między innymi Samochowiec i wsp. (25) oraz Dębicka i Wrociński (14).

Dalsze badania dotyczyły poszukiwania ciał czynnych zawartych w surowcu i warunkujących jego właściwości farmakologiczne. Z jemioli wydzielono wiele frakcji czynnych (10, 17). Już w r. 1966 Borkowski (8, 9) donosi o znacznej aktywności cytostatycznej i kancerostatycznej frakcji glikopeptydowej. Antymitotyczne i cytostatyczne działanie związków zawartych w wyciągach z jemioli wykazano metodami cytologicznymi (2, 13) oraz mikrobiologicznymi (21, 22).

Badania Akatrinieja (2), prowadzone na wyciągach oczyszczonych na tlenku glinu, nasuwają przypuszczenie o niefenolowym charakterze czynnych cytostatycznie substancji występujących w jemiole. W oparciu o prace Krzaczkę (18—20) oraz Beckera i Exnera (5, 6) przeprowadzono poszukiwanie takich substancji. Według metody Mabry'ego (23) wyizolowano frakcję laktonów, której charakter laktonowy potwierdziły wstępne badania chromatograficzne.

MATERIAŁ I METODY

Izolowanie frakcji laktonowej z ziela jemioli przeprowadzano dwoma sposobami. Za każdym razem użyto 1 kg surowca, który stanowiły ulistnione pędy o grubości do 5 mm (*Stipites visci*) następujących podgatunków:

a) *Viscum album* L. ssp. *album*, pasożytującym na *Malus domestica* Borb.;
b) *Viscum album* L. ssp. *abietis* (Wiesb.) A Bromleit, pasożytującym na *Abies alba* Mill.;

c) *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollm., pasożytującym na *Pinus silvestris* L.

1. Ma bry (23). Rozdrobniony surowiec ekstrahowano na gorąco chloroformem. Ekstrakt odparowano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w równych wagowo częściach: 95% etanolu i 4% wodnego roztworu octanu ołowiu. Wytrącony osad odsączono. Z przesączu w wyparce próżniowej odparowano etanol, a pozostałość wymyło dokładnie chloroformem. Ekstrakt chloroformowy osuszano bezwodnym Na_2SO_4 i jak uprzednio odparowano rozpuszczalnik.

2. Drożdż (15). Rozdrobniony surowiec ekstrahowano na gorąco metanolem, zagęszczano w wyparce próżniowej, rozcieńczano wodą, strącano balasty nasyconym roztworem octanu ołowiu i sączono. Przesącz oczyszczano dodatkowo przez ekstrakcję eterem naftowym, a następnie dokładnie wymywano chloroformem. Dalej postępowano jak uprzednio.

W obu przypadkach otrzymywano żywicową pozostałość z wydajnością 0,37—0,44%, która z mieszaniny acetonu i eteru etylowego dawała na wpeł krystaliczną masę, o zapachu przypominającym kamforę. Otrzymane substancje poddano chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym. G. Merck (cyt. za 7) w układzie rozpuszczalników chloroform—aceton (9:1) i benzen—aceton (9:1). Do wywołania chromatogramów zastosowano 5 odczynników selektywnie barwiących laktony (2):

A) 1% metanolowy roztwór rezorcyny+5% H_3PO_4 (1:1);

B) 2% metanolowy roztwór rezorcyny+2% H_2SO_4 (1:1);

C) 1% metanolowy roztwór fruktozy+2% H_2SO_4 (1:1);

D) 0,05 cz. FeCl_3 +62,5 cz. H_3PO_4 +37,5 cz. H_2SO_4 (85%);

E) 0,5% metanolowy roztwór NaNO_2 +10% H_2SO_4 (1:1).

Spryskane chromatogramy ogrzewano 2—4 min. w temp. 110°C. Wyniki zestawiono w tab. 1.

W celu przebadania aktywności cytostatycznej wyizolowanej z ziela jemioli frakcji laktonowej stosowano następujące stężenia roztworów: 0,2, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01 i 0,005%. Działaniu roztworów poddano korzenie przybyszowe *Allium cepa* L., wyrosłe w kulturze wodnej. Cebule z dobrze wykształconym systemem korzeniowym dzielono podłużnie na połowy i jedną z nich umieszczano w badanym roztworze, drugą zaś, dla kontroli, w wodzie wodociągowej na 24 godz. i kontrolowano przebieg mitozy. Dla stężeń aktywnych przeprowadzano ponadto 24-godziną postinkubację w wodzie.

Wzrost elongacyjny korzeni określano przed badaniami cytologicznymi. Długość korzeni mierzono dwukrotnie — przed nastawieniem doświadczenia oraz po 24 godz. inkubacji.

Do obserwacji cytologicznych przygotowywano preparaty rozgniatane, barwione według Feulgena (cyt. za 11). Dla każdego stężenia frakcji laktonowej oraz dla prób kontrolnych sporządzano po 10 preparatów. W każdej grupie obliczano indeks mitotyczny (IM), wyrażony średnią arytmetyczną ze średnim błędem, oraz wartość stężenia obniżającego mitozy o 50% (IM_{50}) w stosunku do kontroli (12).

Tab. 1. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej frakcji laktonowych izolowanych z:
Results of thin-layer chromatography of lacton fractions isolated from:
Viscum album L. ssp. *album*, ssp. *abietis*, ssp. *austriacum*

Nr plamy	$R_f \times 100$		Kolory plam po spryskaniu odczynnikami				
	CH:A	B:A	A	B	C	D	E
1	9	13	ż	p	ż	ż	ż
2	12	16	-	b	b	l	l
3	15	18	ż	ż	ż	ż	ż
4	19	22	ż	ż	l	l	l
5	25	38	l	-	sz	t	t
6	30	45	-	ż	f	f	fc
7	34	51	-	r	r	b	b
8	41	62	b	b	-	fsz	b
9	50	75	f	p	ż	-	b

Objaśnienia: b — brunatne, f — fioletowe, fc — fioletowoczerwone, fsz — fioletowoszare, l — liliowe, n — niebieskie, p — pomarańczowe, r — różowe, t — turkusowe, sz — szare, ż — żółte.

Explanation: b — brown, f — violet, fc — violet-red, fsz — violet-grey, l — lily, n — blue, p — orange, r — pink, t — turquoise-coloured, sz — grey, ż — yellow.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Chromatografia cienkowarstwowa izolowanych frakcji oraz uzyskane zabarwienia odczynników selektywnie barwiących laktony wskazują na ich laktonowy charakter. Frakcje laktonów nie wykazują zróżnicowania jakościowego zależnego od podgatunków (tab. 1). Występują natomiast wyraźne różnice ilościowe u wykrywalnych chromatograficznie 9 składników.

Aktywność biologiczna wyciągów z zieleń *Viscum album* L. (1—3, 13, 21, 22) była podstawą podjęcia badań dotyczących wpływu laktonów z zieleń *Viscum album* L. na mitozę w korzeniach przybyszowych *Allium cepa* L.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że badane laktony wywołują zaburzenia we wroście liniowym korzeni oraz w przebiegu podziałów mitotycznych.

Korzenie cebuli, inkubowane przez 24 godz., w badanych roztworach laktonów nie zmieniły swojej barwy ani turgoru. Wystąpiło natomiast wyraźne hamowanie wzrostu na długość, tym większe, im wyższe było stężenie roztworu (tab. 2). W korzeniach cebuli, pozostających pod wpływem laktonów z podgatunku *abietis* (0,05 i 0,1%), wystąpiły ponadto tu-

moralne zgrubienia powyżej stożka wzrostu. Również od stężenia uzależnione było działanie mitostatyczne laktonów, które w wyższych stężeniach przejawiało się obniżeniem wartości indeksu mitotycznego oraz zaburzeniami w przebiegu podziałów mitotycznych.

Nieznaczne obniżenie indeksu mitotycznego wywoływały roztwory laktonów 0,005 i 0,01%, ale już roztwory 0,03% ze wszystkich badanych podgatunków jemioli powodowały obniżenie liczby mitoz o ponad 50% w stosunku do kontroli. W obrazach cytologicznych tych grup, obok typowych figur podziałowych, pojawiły się już nieliczne, zmienione figury mitotyczne.

Działanie 24-godzinne roztworów 0,05 i 0,1% powodowało gwałtowny spadek liczby podziałów. W korzeniach poddanych działaniu frakcji laktonowej z ssp. *album* indeks mitotyczny wynosił $1,74 \pm 0,20$ w roztworze 0,05% i $0,55 \pm 0,14$ w roztworze 0,1% przy $7,74 \pm 0,76$ w kontroli. Działanie laktonów z ssp. *abietis* obniżało indeks mitotyczny z $7,20 \pm 1,20$ w kontroli do $1,04 \pm 0,52$ (roztwór 0,05%) i $0,74 \pm 0,52$ (roztwór 0,1%). W korzeniach pod wpływem frakcji laktonowej z ssp. *austriacum* indeks mitotyczny dla roztworu 0,05% równał się zaledwie $0,53 \pm 0,05$ (kontrola $6,84 \pm 0,56$), a w korzeniach z roztworu 0,1% stwierdzono całkowity brak podziałów (tab. 2).

W preparatach korzeni z tych grup doświadczalnych obserwowano również wyraźne zakłócenia w przebiegu podziałów mitotycznych, co przejawiało się w zmienionych obrazach stadiów podziałowych. Zmiany

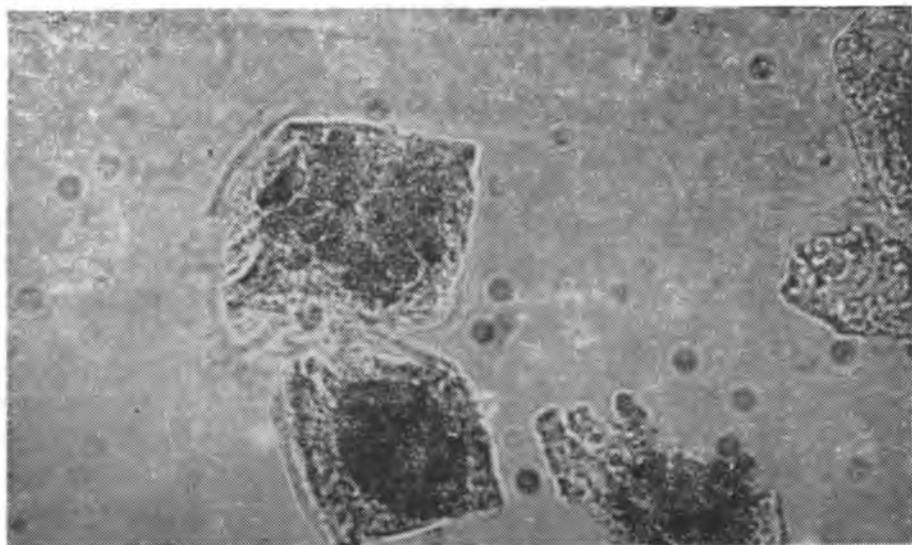
Tab. 2. Wpływ frakcji laktonowych izolowanych z *Viscum album* L. na wzrost korzeni i podziały mitotyczne

The effect of lacton fraction isolated from the herb of *Viscum album* L. of the growth of roots and mitotic divisions

Stężenie laktonu (%)	ssp. album			ssp. abietis			ssp. austriacum		
	przyrost korzeni cm	IM	hamowanie %	przyrost korzeni cm	IM	hamowanie %	przyrost korzeni cm	IM	hamowanie %
0,005	0,6	$7,23 \pm 0,71$	7	0,8	$6,93 \pm 0,52$	4	0,8	$6,15 \pm 0,48$	10
0,01	0,9	$5,85 \pm 0,57$	24	0,7	$6,20 \pm 0,64$	14	0,6	$5,48 \pm 0,63$	20
0,03	0,4	$2,63 \pm 0,12$	66	0,6	$3,33 \pm 0,34$	54	0,5	$3,15 \pm 0,65$	54
0,05	0,3	$1,74 \pm 0,20$	78	0,3	$1,04 \pm 0,52$	86	0,3	$0,53 \pm 0,05$	92
0,1	0,3	$0,55 \pm 0,14$	93	0,3	$0,74 \pm 0,12$	90	0,2	-	-
0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Woda	0,9	$7,74 \pm 0,76$	-	0,8	$7,20 \pm 1,2$	-	0,8	$6,84 \pm 0,56$	-
IM ₅₀	0,0199-0,0230			0,0236-0,0272			0,0178-0,0203		



a

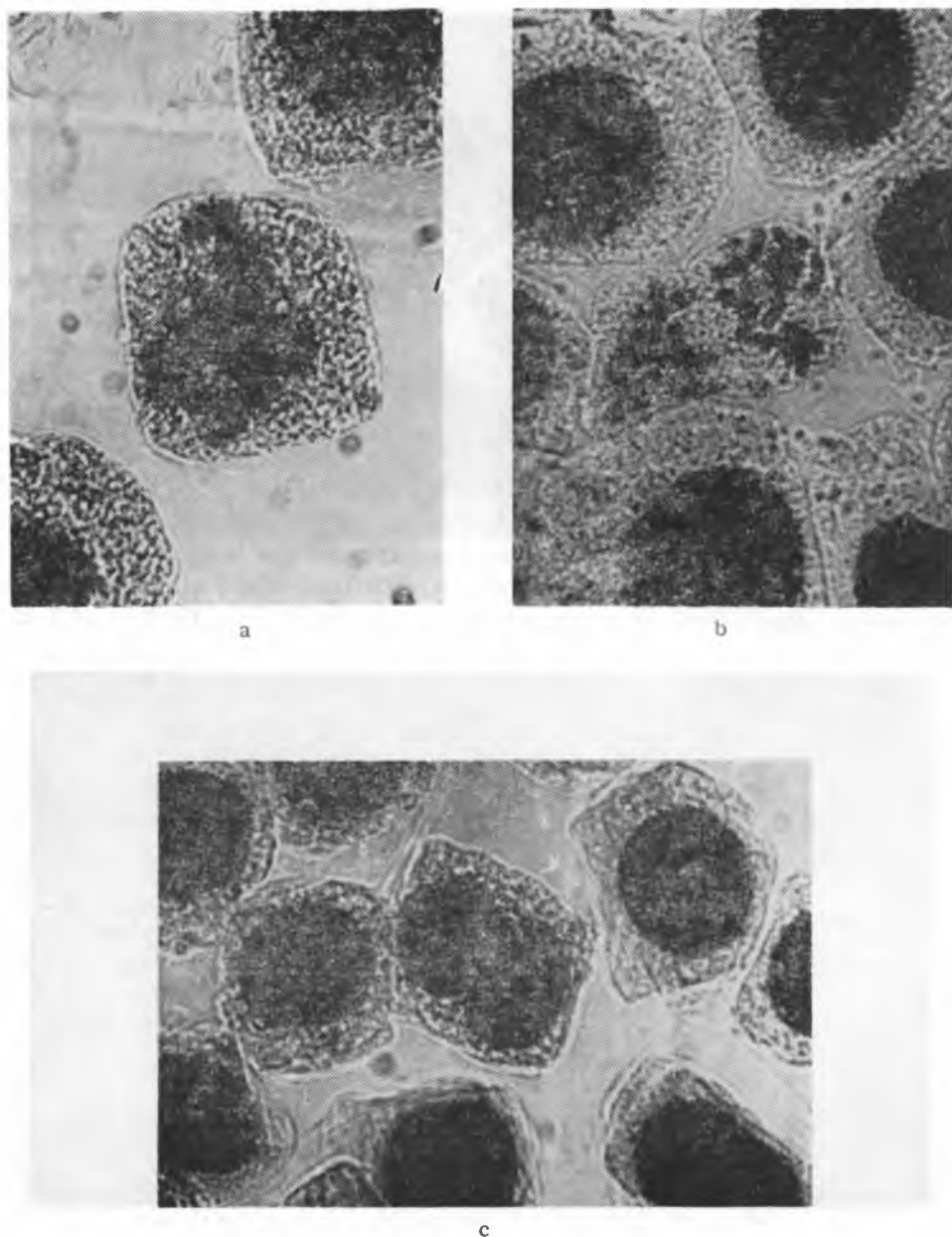


b

Ryc. 1. Zaburzenia mitozy pod wpływem frakcji laktonowych *Viscum album* L. — skrócenie chromosomów: a — w profazie, b — w metafazie

Perturbations in mitosis under the influence of lacton fractions of *Viscum album* L. — shortening of chromosomes: a — in prophase, b — in metaphase

Tadeusz Krzaczek, Kazimiera Grzycka



Ryc. 2. Zaburzenia mitozy pod wpływem frakcji laktonowych *Viscum album* L.:
a i b — pseudoanafazy, c — komórka 2-jądrowa
Perturbations in mitosis under the influence of lacton fractions of *Viscum album*
L.: a and b — pseudoanaphases, c — binuclear cell

te występowały już w profazie, a następnie w metafazie, w których chromosomy były wyraźnie pogrubiałe i skrócone (ryc. 1ab). Zaburzenia w funkcjach wrzeciona kariokinetycznego dawały zmienione obrazy anafazy, wynikające z nieprawidłowego ułożenia chromosomów, zwane pseudoanafazą (ryc. 2ab).

Zastanawiający był fakt, że w roztworze o stężeniu 0,1% obok mitoz zmienionych spotykano również mitozy normalne lub tylko nieznacznie odbiegające swoim wyglądem od prawidłowych, podczas gdy z korzeni poddanych działaniu roztworu 0,05%, a więc roztworu o stężeniu niższym, wszystkie fazy podziałowe były skrajnie zmienione. Podobne zjawisko stwierdzono podczas badania czynnych wyciągów z jemioly pasozytującej na *Acer platanoides* (2).

Począwszy od stężenia 0,05%, w preparatach pojawiały się komórki 2-jądrowe (ryc. 2c), których jądra są połączone ze sobą, dając obraz pseudomitozy. Świadczą one o zakłóceniach w przebiegu cytokinezy, a liczba ich zwiększała się w roztworze 0,1%. Wyraźnie większa liczba komórek 2-jądrowych występowała w preparatach z korzeni poddanych działaniu laktonów ze ssp. *abietis*. O występowaniu komórek 2-jądrowych pod wpływem wyciągów z jemioly donoszą Bukowiecki i Furmana (13) oraz Akatriniej (1—3).

Skrajne działanie wywierał roztwór 0,2%, w którym stwierdzono brak przyrostu korzeni na długość bądź przyrost minimalny (ssp. *album* — tab. 1), a w preparatach cytologicznych — zupełny brak mitoz. W obrazach mikroskopowych widoczne były jedynie komórki 2-jądrowe, o jądrach zbitych, piknotycznych.

W celu sprawdzenia, czy inhibicyjne działanie roztworów 0,05, 0,1 i 0,2% jest trwałe, czy też ustępuje po wyeliminowaniu czynnika hamującego, korzenie poddano 24-godzinnej postinkubacji w wodzie. Okazało się, że korzenie przeniesione do wody z roztworu 0,05% odzyskiwały całkowitą aktywność mitotyczną. Nieznacznie niższy indeks mitotyczny w porównaniu z kontrolą wystąpił w korzeniach z roztworu 0,1%, natomiast wpływ roztworu 0,2% prowadził do zmian trwałych. Postinkubacja tych korzeni w wodzie nie przywracała im aktywności podziałowej.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie aktywności cytostatycznej badanej frakcji laktonowej wszystkich podgatunków *Viscum album* L. Obliczona dla badanych podgatunków wartość IM_{50} daje możliwość określenia stężenia frakcji laktonowej obniżającego mitozy w 50%.

Siła działania laktonów ze ssp. *album* ($IM_{50}=0,0199-0,0230\%$) i *austriacum* ($IM_{50}=0,0178-0,0203\%$) była zbliżona, z nieznaczną przewagą frakcji laktonowej ze ssp. *austriacum*. Roztwór 0,1% tego podgatunku powodował całkowite zahamowanie podziałów, podczas gdy w korzeniach cebuli pozostających w roztworze 0,1% ze ssp. *album* podziały mitotycz-

ne jeszcze zachodziły. Frakcja laktonowa ze ssp. *abietis* wpływała na podziały mitotyczne słabiej ($IM_{50} = 0,0236 - 0,0272\%$), wywoływała ona natomiast powstawanie zgrubień tumoralnych, nie występujących pod wpływem działania laktonów ze ssp. *album* i *austriacum* oraz w większym stopniu prowadziła do powstania komórek 2-jądrowych.

Zróznicowany sposób działania laktonów z badanych podgatunków zależy przypuszczalnie od różnych proporcji ilościowych poszczególnych składników izolowanych frakcji.

W porównaniu z innymi substancjami naturalnymi, jak kwas usniny (16), o wartości IM_{50} , równej 0,00021%, bądź z IM_{50} pipobromanu 0,0107—0,0124% (4), aktywność cytostatyczna badanych frakcji laktonowych ssp. *album*, *abietis* i *austriacum* jest znacznie niższa od kwasu usninowego, ale zbliżona do pipobromanu.

Wnio ski

1. Stwierdzono, że frakcja laktonowa badanych podgatunków *Viscum album* L. hamuje wzrost korzeni oraz podziały mitotyczne w korzeniach *Allium cepa* L. proporcjonalnie do stężenia roztworów.

2. Roztwory o wyższych stężeniach (0,05 i 0,1%) wywołują również zakłócenia w przebiegu cyklu mitotycznego, wynikające z zahamowania funkcji wrzeciona kariokinetycznego. Najwięcej zaburzeń w obrazach figur podziałowych występuje przy stężeniu 0,05%.

3. Badana frakcja laktonowa, szczególnie ze ssp. *abietis* hamuje także proces cytokinezy, co prowadzi do powstawania komórek 2-jądrowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Acatrinei Gh.: Actiunea comparata a substantelor fiziologic active extrase din visc, a ergotaminei tartrice si a polimixinei b, asupra fusului si cromozomilor. An. stiint. Univ. Iasi. **14**, 37, 1968.
2. Akatriniej G.: Izmenienija mehanizma dielenija kletki pod wlijanijem fiziologiczeskich aktiwnych wieszczestw ekstrakta omieli (*Viscum album* L.). Fiziol. rast. **14**, 271, 1967.
3. Akatriniej G.: Bimitoticeskij sinchronizm i asinchronizm pod wlijanijem fiziologiczeskich aktiwnych wieszczestw ekstrakta omieli (*Viscum album* L.). Gienetika **5**, 170, 1969.
4. Andrzejewska-Golec E. i wsp.: Wpływ pipobromanu i innych pochodnych piperazyny na mitozę i kwasy nukleinowe w merystemie korzeniowym pszenicy (*Triticum aestivum* L.). Acta Polon. Pharm. **34**, 531, 1977.
5. Becker H., Exner J.: Flavonoid Aglyka of Mistletoe Grown on Different Host Trees. [w:] Proceedings of the 5-th Hungarian Bioflavonoid Symposium, Mátrafüred, Hungary 1977.

6. Becker H., Exner J.: Isolierung und Strukturaufklärung von 2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalkon-4-glukosid aus *Viscum album* L. Z. Naturforsch. **33c**, 771, 1978.
7. Błoszyk E., Drożdż B.: Sesquiterpene Lactones. Part XXII. Sesquiterpene Lactones in Species of the Genus *Chrysanthemum*. Acta Soc. Bot. Polon. **47** (1—2), 3, 1978.
8. Borkowski B.: Naturalne związki onkostatyczne. Biul. Inst. Leków **3**, 308, 1966.
9. Borkowski B.: Naturalne związki onkostatyczne. Biul. Inst. Leków **4**, 675, 1966.
10. Borkowski B.: Zarys farmakognozji. PWN, Warszawa 1970.
11. Broda B.: Metody histochemii roślinnej. PZWL, Warszawa 1971.
12. Broda B.: Przewodnik do obliczeń statystycznych w biologii. Akad. Med. Łódź 1976.
13. Bukowiecki H., Furmanowa M.: Cytostatyki pochodzenia roślinnego. Farm. Pol. **28**, 585, 1972.
14. Dębicka K., Wrociński T.: Farmakologiczna ocena wartości preparatów z ziela jemioly (*Viscum album* L.), zbieranego w różnych porach roku. Acta Pol. Pharm. **16**, 357, 1959.
15. Drożdż B.: Sesquiterpene Lactanes. Part IV. Isolation of Cynarolide, a New Sesquiterpenic Lactone from the Leaves of *Cynara scolymus* L. Dissert. Pharm. Pharmacol. **20**, 217, 1968.
16. Grzycka K.: Badanie aktywności biologicznej niektórych składników plechy *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. Acta Polon. Pharm. **36**, 481, 1979.
17. Kohlmünzer S.: Farmakognozja. PZWL, Warszawa 1977.
18. Krzaczek T.: Badania farmakobotaniczne podgatunków *Viscum album* L. II. Cukrowce. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **31**, 281, 1976.
19. Krzaczek T.: Badania farmakobotaniczne podgatunków *Viscum album* L. III. Terpeny i sterole. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **32**, 125, 1977.
20. Krzaczek T.: Badania farmakobotaniczne podgatunków *Viscum album* L. IV. Kwasy i aminy. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **32**, 281, 1977.
21. Kubas J.: Investigation on Known or Potential Antitumoral Plants by Means of Microbiological Tests. Part II. Biological Activity of Some Wild Growing Plant Species in *Neurospora crassa* Test. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. **15**, 11, 1972.
22. Kubas J.: Investigations on Known or Potential Antitumoral Plants by Means of the Microbiological Tests. Part IV. Biological Activity of Selected Plant Species in Yeast Test. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. **15**, 101, 1972.
23. Mabry T. J.: Phytochemical Phylogeny, ed. Harborne J.B., Academic Press, London 1970.
24. Nowiński M.: Dzieje upraw i roślin leczniczych. PWRiL, Warszawa 1980.
25. Samochowiec L. i wsp.: Badania nad właściwościami hipotensyjnymi niektórych przetworów galenowych jemioly białej — *Viscum album*, rodz. *Loranthaceae*. Farm. Pol. **11**, 128, 1955.

Otrzymano 2 VII 1983.

РЕЗЮМЕ

Из травы подвидов *Viscum album* L. выделена фракция лактонов. При помощи хроматографического метода доказано отсутствие в составе лактонов качественных различий, зависящих от подвидов. В то же время обнаружены количественные различия отдельных компонентов. Выделенные фракции лактонов тормозят рост корней и митотическое деление в корнях *Allium cepa* L. Кроме того, они вызывают нарушение митотического цикла. Возможно, что небольшие различия, наблюдаемые в цитостатической активности, вытекают из качественных различий в составе изучаемых фракций.

SUMMARY

Lacton fractions were isolated from the herb of subspecies of *Viscum album* L. Chromatographically, no qualitative differentiation, depending on the subspecies was found in the composition of lactons. There are, however, distinct quantitative differences among the particular components. The isolated lacton fractions inhibit the growth of roots and mitotic divisions in the roots of *Allium cepa* L. They also cause perturbations in the course of mitotic cycle. Small differences in the cytostatic activity are probably the result of the stated quantitative differences in the composition of the investigated fractions.