

ISSN 0428-0296

ФАРМАЦИЯ PHARMACIA

Том/Volume LVI

2009

Книжка/Number 1-4

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

Главен редактор: Ст. Николов

Секретар: Ал. Златков

Редакционна колегия:

Зл. Димитрова, Св. Богданова, И. Иванов, Г. Китанов, И. Йонкова, Н. Данчев, Г. Петрова,
Д. Обрешкова, Ст. Титева, И. Костадинова, Ф. Клерфьой, Е. Х. Хансен,
М. Шефер, Р. Грьонинг, Л. Пистели, М. Унзета

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Editor in Chief: St. Nikolov

Assistant Editor: Al. Zlatkov

Editorial Board:

Zl. Dimitrova, Sv. Bogdanova, I. Ivanov, G. Kitanov, I. Jonkova, N. Danchev, G. Petrova, D. Obreshkova,
St. Titeva, I. Kostadinova, F. Clerfeuille, E. H. Hansen, M. Schaefer,
R. Gröning, L. Pistelli, M. Unzeta

Адрес на редакцията

Фармацевтичен факултет
ул. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4

Гл. редактор: ☎ (02) 987 987 4
E-mail: snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board

Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4

Editor in Chief: ☎ (+359 2) 987 987 4
E-mail: snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

Оригинални статии

<i>Ил. Кръстева, М. Йотова, И. Попов, П. Здравева и Ст. Николов.</i> Фитохимично изследване на листа и корени от <i>gypsophila trichotoma wend.</i> чрез газ хроматография/маспектрометрия.....	3
<i>К. Йончева и Х. М. Ираче.</i> Приготвяне на аминок-пегилирани полианхидридни наночастици чрез метод на изместване на разтворителя	7
<i>Р. Николов, Я. Чекаларова, Д. Пехливанова, Л. Танчева, В. В. Петков и К. Якимова.</i> Ефекти на кофеина върху телесната температура на плъхове при норма и депресия	10
<i>В. Цанкова и Д. Стефанова.</i> Протективни ефекти на червеното вино върху микотоксин-индуцираната липидна пероксидация в модел на тъканни срезове от тънко черво на плъх	15
<i>В. Цанкова и Д. Стефанова.</i> Микотоксин повишава освобождаването на ензима алкална фосфатаза в модел на тъканни срезове от тънко черво на плъх	21
<i>М. Мичева, М. Кондева-Бурдина и В. Вичева.</i> Проучване на хепатотоксичността на цитизин (Tabex®) в сравнение с никотин в изолирани хепатоцити от плъх	27
<i>Г. Драганов, Ф. Рибарова и П. Пейков.</i> L-tyrosine съдържащи хранителни добавки – здравни претенции	33
<i>Т. Ангелов, Д. Обрешкова и В. Ташков.</i> Стабилизатори в лекарствата. подбор, употреба и действие	38
<i>И. Йонкова и П. Прохш.</i> От растението до лекарството: противотуморни агенти	45
<i>И. Миладинова и К. Йончева.</i> Полимерните мицели като нови лекарствени системи във фармацевтичната технология	57
<i>Б. Дудева.</i> Потребностите на студентите по фармация да общуват на английски език	62
In memoriam	69
Информационен отдел	71

CONTENTS

Original articles

<i>I. Krasteva, M. Yotova, I. Popov, P. Zdraveva and S. Nikolov.</i> Phytochemical study of leaves and roots of <i>gypsophila trichotoma wend.</i> using gas chromatography – mass spectrometry	3
<i>K. Yoncheva and J. M. Iраche.</i> Preparation of amino-pegylated poly(anhydride) nanoparticles applying solvent displacement method	7
<i>R. Nikolov, Y. Chekalarova, D. Pehlivanova, L. Tancheva, V. V. Petkov and K. Yakimova.</i> Effect of caffeine on body temperature of rats in norm and depression.....	10
<i>V. Tsankova and D. Stefanova.</i> Red wine protects against mycotoxin-induced lipid peroxidation in rat precision-cut intestinal slices.....	15
<i>V. Tsankova and D. Stefanova.</i> Mycotoxin increases alkaline phosphatase release in rat precision-cut intestinal slices	21
<i>M. Micheva, M. Kondeva-Burdina and V. Vicheva.</i> Study on hepatotoxicity of cytosine (Tabex®) compared with nicotine in freshly isolated rat hepatocytes.....	27
<i>G. Draganov, F. Ribarova and P. Peykov.</i> L-tyrosine containing food supplements – health claims	33
<i>T. Angelov, D. Obreshkova and W. Tashkov.</i> Drug preservatives: selection, use and action	38
<i>I. Ionkova and P. Proksch.</i> From planta to pharmaca: anticancer agents.....	45
<i>I. Miladinova and K. Yoncheva.</i> Polymeric micelles as new drug delivery systems in pharmaceutical technology	57
<i>B. Dudeva.</i> On the needs of pharmacy students to communicate in english: a study.....	62
In memoriam	69
Informasion section	74

ФАРМАЦИЯ 1-4/2009

ISSN 0428-0296

УДК 615

Организационен секретар и стилов редактор *Св. Цветанова*
Корекция *Св. Цветанова*
Терминологичен и семантичен контрол *д-р Б. Станчева*
Форматиране *О. Маркова*

Подписана за печат на 01.03.2010 г.
Печатни коли 9.5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски” № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

ОТ РАСТЕНИЕТО ДО ЛЕКАРСТВОТО: ПРОТИВОТУМОРНИ АГЕНТИ

И. Йонкова¹ и П. Прокш²

¹Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

²Университет Дюселдорф, Институт по фармакогнозия и биотехнология, Германия

Резюме. Растенията са един от атрактивните източници на нови противотуморни продукти. Специфичните растителни вторични метаболити дълго са били смятани като основно ограничение за широката употреба на фармацевтични продукти от растителен произход в хуманната медицина. За да се разширят клиничните проучвания, е необходимо да се намери достъпен източник на растителна суровина, продуцираща желаните съединения. Нашата цел е да подчертаем прогреса с прилагането на растителни *in vitro* технологии за продукция на вторични метаболити и да илюстрираме, че тази обещаваща система е допълнително предимство за използването на растителните противотуморни субстанции. Тази статия обобщава резултати относно продукцията на противотуморни продукти чрез *in vitro* култури. Обсъждат се проблеми и начини за преодоляването им чрез биотехнологични подходи с примери от литературата и нашите собствени проучвания.

Ключови думи: растителни противотуморни продукти, фармака, *in vitro* растителни култури, биотехнология

FROM PLANTA TO PHARMACA: ANTICANCER AGENTS

I. Ionkova¹ and P. Proksch²

¹Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia

²Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Uni-Dusseldorf, Germany

Summary. The plants are one of the attractive sources of novel antitumor compounds. The plant-specific secondary products were long considered a major limitation for an extensive use of plant-made pharmaceuticals in human therapy. To extend the research to human clinical studies, we needed to find a reliable supply of plant material produced target compounds. Our goal here is to emphasize all the progress towards humanization of secondary metabolites in plant *in vitro* cultures, and to illustrate that plant typical anticancer compounds progressively emerge as additional advantages for using this promising expression system. This article summarizes the results concerning the production of certain plant anticancer compounds by *in vitro* cultures. The various problems involved and the possible ways to overcome them using biotechnological approaches are discussed on the basis of examples from literature and our own research.

Key words: plant anticancer compounds, pharmaca, *in vitro* plant cultures, biotechnology

Растенията – важен източник на противотуморни съединения

Растенията са един от атрактивните източници на нови противотуморни продукти. Около 60% от противотуморните и антиинфекциозните лекарства са с природен произход. От 252 лекарствени продукта, оценени от СЗО като изключително ценни, 11% се получават единствено от растения (данни 1992). От друга страна – само около 10% от растителните видове са изследвани за тяхната биологична активност.

Седем от противотуморните продукти с най-голяма консумация в световната медицина са от

растителен произход: подофилотоксин [Etoposide (VP-16), Teniposide (VM-26)], паклитаксел (Taxol), доцетаксел (Taxotere), винбластин (Velban), винкристин (Oncovin), топотекан (Nucamtin) и иринотекан (Camptosar) [2]. Те са сред най-мощните средства за борба с туморните заболявания и все още се получават единствено от растителни източници, тъй като химичният синтез на хиралните молекули не е икономически оправдан.

Цената на противотуморните лекарства, получени от растения, все още е значително висока – напр. 1 kg винкристин (Catharanthus алкалоид) струва около USD 20 000, а годишният пазар в

света е над USD 5 милиона. Изолирането на БАВ (биологичноактивни вещества) от растения е трудно поради тяхната изключително ниска концентрация в продуциращите ги растения. Засега липсват достатъчно методи за производство на всички желани растително получени фармацевтични молекули. Някои субстанции могат да бъдат изолирани само от изключително редки растения.

В периода до 1990 г. над 35 000 растения са проверени за противотуморна активност. Значението на природните продукти за откриването на противотуморни агенти и разработване на средства с такава активност следва и от факта, че около 60% от всички лекарства, които в момента са във фаза на клинични проучвания за лечение на туморни заболявания, са природни продукти или съдържат фармакофорни деривати от естествени продукти.

Растенията са бавен продуцент, синтезираните количества на активните съединения са ниски, скоростта на растеж е бавна, а биосинтезът на тези съединения е силно чувствителен към географски и екологични условия. Ето защо тяхната продукция по икономически изгоден начин не е лесна задача. Много от тези растения са трудни за култивиране или са застрашени от изчезване поради прекомерното им събиране. Повечето интересни противотуморни съединения, изоли-

рани от висши растения, притежават много сложна структура, поради което химичният им синтез е често икономически неизгоден [19]. Растителната биотехнология е без съмнение един от подходите за решаване на горепосочения проблем. Ето защо изследователският интерес в тази област нараства многократно през последното десетилетие и много процеси, базирани на растителната биотехнология (*in vitro* растителни култури), ще бъдат приложени за промишлена продукция на противотуморни лекарства [9].

С помощта на модерната биотехнология вече е възможно използването на растителни клетки за продуциране на специфични фармацевтични продукти [1]. Използването на подходяща хранителна среда и фитохормонален режим позволява установяването на *in vitro* култури от почти всеки растителен вид. Като се започне от калусна тъкан, може да се получат суспензионни клетъчни култури, които могат да бъдат култивирани в големи биореактори. Освен това биотехнологичното производство на тези растителни продукти е екологично предпочитано в сравнение с днес прилаганите методи.

Някои от значимите със своята противотуморна продукция растения са показани в табл. 1. Някои важни противотуморни съединения, изолирани от различни части на висшите растения, са изброени в табл. 2.

Таблица 1. Растения, продуциращи противотуморни съединения

Растителен вид	Семейство	Активна съставка (и)
<i>Acer negundo</i>	Aceraceae	Ацер сапонин Р (сапонин)
<i>Acnistus arborescens</i>	Solanaceae	Виталерин А (витанолиди)
<i>Acronychia baueri</i>	Rutaceae	Акроницин (алкалоид)
<i>Allamanda cathartica</i>	Апосинейцеве	Аларнадин (монотерпен)
<i>Astragalus membranaceus</i>	Fabaceae	Астрагалозиди (сапонини)
<i>Astragalus angustifolius</i>	Fabaceae	Астрагалозиди (сапонини)
<i>Astragalus mongholicus</i>	Fabaceae	Астрагалозиди (сапонини)
<i>Baccharis megapotamica</i>	Asteraceae	Бакарин (сесквитерпен)
<i>Baileya multiradiata</i>	Asteraceae	Псевдогванолит (сесквитерпенов лактон)
<i>Bersama abyssinica</i>	Meliantaceae	Хелебригенин ацетат (буфадиенолит)
<i>Bouvardia temifolia</i>	Rubiaceae	Бурвардин (пептид)
<i>Brucea antidysenterica</i>	Simaroubaceae	Броцеанлин (симаруболит)
<i>Caesalpinia gilliesii</i>	Fabaceae	Цезалин
<i>Camptotheca acuminata</i>	Nyssaceae	Камтотечин (пиралохинолил алкалоид)
<i>Catharanthus roseus</i>	Апосинейцеве	Винбластин, Винкрестин (бис-индол алкалоиди)
<i>Cephalis acuminata</i>	Rubiaceae	Еметин (изохинолинов алкалоид)

<i>C. ipeccacuanha</i>	Rubiaceae	Еметин (изохинолинов алкалоид)
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Cephalotaxaceae	Харингтонин (цефалотаксинов алкалоид)
<i>Cocculus Sp.</i>	Menispermaceae	Гокулин, Кокулидин (бисклауринов алкалоид)
<i>Colchicum autumnale</i>	Liliaceae	Колхицин (алкалоид)
<i>C. speciosum</i>	Liliaceae	Колхицин (алкалоид)
<i>Crococsmia crocosmiiflora</i>	Iridaceae	Медикагенна киселина (сапонин)
<i>Crotalaria assamica</i>	Leguminosae	Монокроталин (пиролзидинов алкалоид)
<i>C. spectabilis</i>	Leguminosae	Монокроталин (пиролзидинов алкалоид)
<i>Croton macrostachys</i>	Euphorbiaceae	Кротепоксид
<i>C. tiglium</i>	Euphorbiaceae	Форбол деривати (терпеноид)
<i>Cyclea peltata</i>	Menispermaceae	Тетрандрин (изохинолинов алкалоид)
<i>Daphne mezereum</i>	Thymelaeaceae	Мецереин (дитерпен)
<i>Elephantopus elatus</i>	Asteraceae	Елефантопин (сесквитерпен)
<i>Elephantopus mollis</i>	Asteraceae	Молефантинин (сесквитерпен)
<i>Eupatorium hyssopifolium</i>	Asteraceae	Еупахисопин (сесквитерпен)
<i>Euphorbia escula</i>	Euphorbiaceae	Ингенал дибензоат
<i>Fagara macrophylla</i>	Rutaceae	Нилидин (бензофенантрединов алкалоид)
<i>F. zanthoxyloides</i>	Rutaceae	Фагорин (бензофенантрединов алкалоид)
<i>Gnidia lamprantha</i>	Thymelaeaceae	Гуидин (дитерпен)
<i>Gossypium Sp.</i>	Malvaceae	Госипол (сесквитерпенов димер)
<i>Helenium autumnale</i>	Asteraceae	Хелевалин (сесквитерпен)
<i>Helenium microcephalum</i>	Asteraceae	Микроленин (сесквитерпенов димер)
<i>Heliotropium indicum</i>	Boraginaceae	Индицин-N-оксид (пиролзидинов алкалоид)
<i>Holacantha emoryi</i>	Simaroubaceae	Холакантон (Simaroubalide)
<i>Hymenoclea salsola</i>	Asteraceae	Амброзин (сесквитерпен)
<i>Ipomoea batatas</i>	Convolvulaceae	4-Ипоменал (монотерпен)
<i>Jacaranda caucana</i>	Bignoniaceae	Джакаранон (хинон)
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Euphorbiaceae	Ятрофон (дитерпен)
<i>Juniperus chinensis</i>	Cupressaceae	Подофилотоксин (лигнан)
<i>Liatris chapmanii</i>	Asteraceae	Лиаатрин (сесквитерпен)
<i>Linum album</i>	Linaceae	Подофилотоксин (лигнан)
<i>Linum flavum</i>	Linaceae	5-метоксиподофилотоксин (лигнан)
<i>Linum linearifolium</i>	Linaceae	Подофилотоксин (лигнан)
<i>Linum tauricum</i>	Linaceae	6-метоксиподофилотоксин (лигнан)
<i>Linum serbicum</i>	Linaceae	6-метоксиподофилотоксин (лигнан)
<i>Linum bulgaricum</i>	Linaceae	Подофилотоксин (лигнан)
<i>Linum leonii</i>	Linaceae	Юстицидин Б (лигнан)
<i>Mappia foetida</i>	Olinaceae	Камптотесцин (пиролохинолинов алкалоид)
<i>Mera omganus</i>	Cucurbitaceae	Кукурбитацин Е
<i>Maytenus buehananii</i>	Celastraceae	Майтансин (АНСА макролид)
<i>M. ovatus</i>	Celastraceae	Майтансин (АНСА макролид)
<i>M. serrata</i>	Celastraceae	Майтансин (АНСА макролид)
<i>Montezuma speciasissima</i>	Malvaceae	Госипол (сесквитерпенов димер)

<i>Ochrosia elliptica</i>	Apocynaceae	Елиптицин (пиродокарбозолов алкалоид)
<i>O. maculata</i>	Apocynaceae	9-Метоксиелиптецин (пиродокарбозолов алкалоид)
<i>O. moorei</i>	Apocynaceae	Елиптицин (пиродокарбозолов алкалоид)
<i>Parquetina nigrescens</i>	Asclepiadaceae	Строфантидин (карденолид)
<i>Penstemon deutus</i>	Scrophulariaceae	Пенстимид (монотерпен)
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	Euphorbiaceae	Филатозид
<i>Pierreodendron kerstingii</i>	Sapotaceae	Глаукарбуинон (симаруболид)
<i>Piper futokadzura</i>	Piperaceae	Кротепоксид
<i>Podtcatpus gracilori</i>	Podocarpaceae	Подолид (дилактон)
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podophyllaceae	Подофилотоксин, Пелтатин (лигнан)
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podophyllaceae	Подофилотоксин (лигнан)
<i>Putterlickia verrucosa</i>	Celastraceae	Майтанисин (АНСА макролид)
<i>Simarouba glauca</i>	Simaroubaceae	Глаукарубинон (симаруболид)
<i>Steganotaenia araliaceae</i>	Umbelliferae	Лиаатрин (сесквитерпен)
<i>Stereospermum suaveolens</i>	Bignoniaceae	Лапахол (хинон)
<i>Strophanthus Sp.</i>	Apocynaceae	Строфантидин (карденолид)
<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiaceae	Таксодион (дистерпен)
<i>Taxus baccata</i>	Taxaceae	Паклитаксел (дистерпен)
<i>T. brevifolia</i>	Taxaceae	Паклитаксел (дистерпен)
<i>Thalictrum dasycarpum</i>	Ranunculaceae	Таликарпин (изохинолинов алкалоид)
<i>Thalictrum minus</i>	Ranunculaceae	Таликарпин (изохинолинов алкалоид)
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Celastraceae	Трипдиолид, Триптолид (дистерпен)
<i>Tylophora asthmatica</i>	Asclepiadaceae	Тилофорин
<i>T. cerbiflora</i>	Asclepiadaceae	Тилокребин (фенантроидолизидиново алкалоид)
<i>Vernonia guineensis</i>	Asteraceae	Вемолепин (сесквитерпенов лактон)
<i>Vernonia hymenolepis</i>	Asteraceae	Вемолепин (сесквитерпенов лактон)
<i>Withania somnifera</i>	Solanaceae	Витаферин А, В (витанолиди)
<i>Zaulzainia Sp.</i>	Rubiaceae	Залузоник С (иридоид)
<i>Zanthoxylum Sp.</i>	Rutaceae	Нитидин (бензоенатридин)

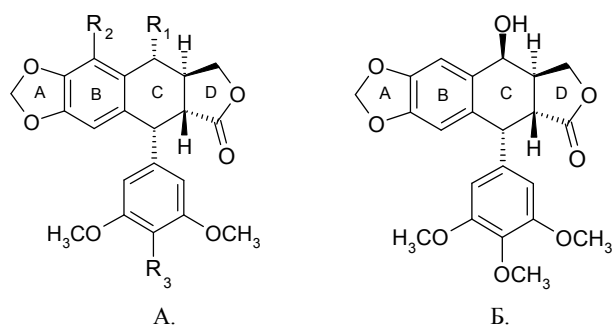
Таблица 2. Концентрация на противотуморни съединения, съдържащи се във висши растения

Противотуморно съединение	Концентрация (% сухо тегло)
Бакарин	2.0×10^{-2}
Бруцеантин	1.0×10^{-2}
Камптотецин	5.0×10^{-3}
Елиптицин	3.2×10^{-5}
Хомохарингтонин	1.8×10^{-5}
Майтансин	2.0×10^{-5}
Подофилотоксин	6.4×10^{-1}
Таксол	5.0×10^{-1}
Трипдиолид	1.0×10^{-3}
Винбластин, Винкрестин	5.0×10^{-3}

През последните години подновеният интерес в изследването на продукти на растителна основа доведе до появата на важни противотуморни вещества. Най-ценни от тях са паклитаксел (таксол) от *Taxus brevifolia* L., подофилотоксин от *Podophyllum peltatum* L. и камптотецин от *Camptotheca acuminata* Decne. Тези вещества обхващат някои от най-интересните нови химиотерапевтични агенти в клиничната практика. Аналозите на подофилотоксин, таксол и камптотехин са съответно онагледени на фиг. 1, фиг. 2 и фиг. 3.

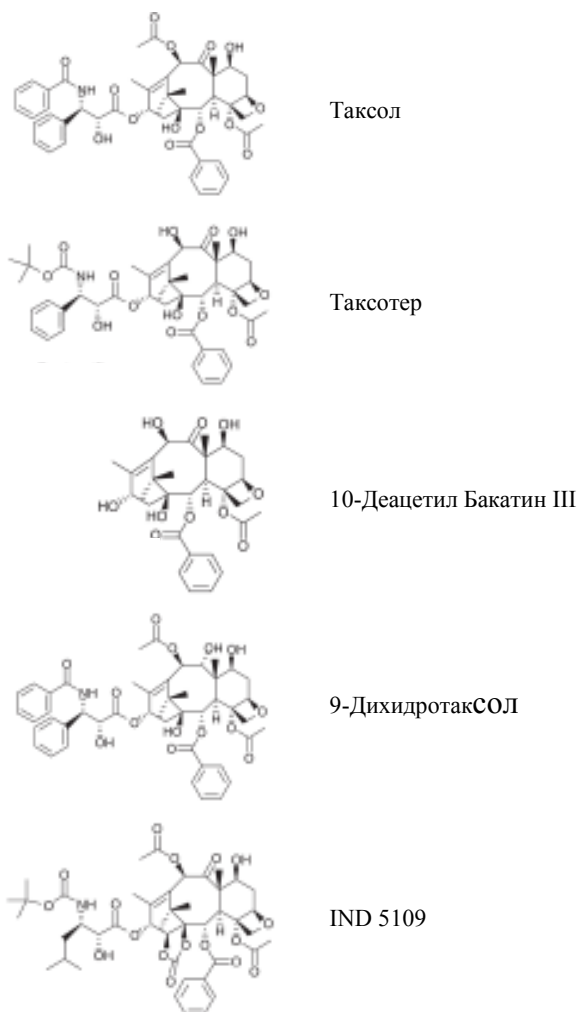
Използването на паклитаксел е разширено, обхващайки голямо разнообразие от различни видове тумори. Taxotere® също се прилага широко. Освен това подофилотоксиновият аналог Teniposide (Vumon®) и водоразтворимият аналог на камп-

тотектин топотекан хидрохлорид (Нусамтин®) са одобрени за хуманна употреба през последните няколко години. Въз основа на този широк спектър от структури и фармакологични активности е ясно, че растенията и растително получените лекарства играят доминираща роля в съвременното лечение на рака [3].

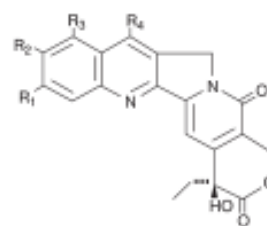


Фиг. 1. Подофилотоксин и неговите аналози

А. Подофилотоксин ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$), деоксиподофилотоксин ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$), β -пелтатин ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OCH}_3$) и Б. епиподофилотоксин



Фиг. 2. Таксол и неговите аналози



R_1	R_2	R_3	R_4	
H	H	H	H	Камптотецин
H	OH	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	Топотекан
H	H	NO_2	H	Рубитекан
H		H	Ethyl	Иринотекан
F	Me			Ексатекан
		H		Луртотекан

Фиг. 3. Камптотецин и неговите аналози

Растителните клетъчни култури – предимство за производство на растителните противотуморни субстанции

Задачата да се произведат обсъжданите съединения икономично – чрез екстракция от интактни растения и да се посрещне нуждата от непрекъснато нарастващото им търсене – е твърде сложна за решаване. Това може да се дължи на твърде ниските концентрации на тези активни съединения в растенията (табл. 3), на бавния темп на естественото развитие на конкретните експлоатирани видове, на други комплексни причини, свързани с натрупването на активните субстанции в растението, а също и на значителната чувствителност на естествените находища към географските и екологичните условия. Други възможни причини са липсата на еднороден и постоянен по качество растителен материал в количества, достатъчни за индустриална продукция, съпроводено с неикономичен химичен синтез за широк спектър от молекули. Биотехнологичните методи дават отлична алтернативна възможност за продукцията на такива съединения.

Ще се спрем по-подробно на производството на подофилотоксин [13]. До момента традиционните източници на подофилотоксин са *Podophyllum peltatum* и *Podophyllum hexandrum*. Като основна търговска суровина през последните десетилетия са се наложили коренищата на *P. hexandrum*, тъй

Таблица 3. Сравнение на добива на противотуморни съединения от клетъчни култури и интактни растения

Противотуморно съединение	Растение	Растение (% сухо тегло)	Култивирани клетки (% сухо тегло)
подофилотоксин	<i>Podophyllum spp.</i>	6.4×10^{-1}	7.1×10^{-1}
таксол	<i>Taxus spp.</i>	5.0×10^{-1}	5.0×10^{-2}
камптотесин	<i>Camptotheca acuminata</i>	5.0×10^{-3}	2.5×10^{-4}

като са по-богати на подофилотоксин от *P. peltatum* [4]. Интензивната експлоатация на този рядък и ендемичен за Хималаите вид – *P. hexandrum*, и трудности за култивирането му са довели до включването му в CITES списъка, който обхваща застрашени от изчезване растителни видове, търговията с които е ограничена и се контролира стриктно от World Conservation Monitoring Centre. Трябва да се отчитат и недостъпността на регионите, където са естествените находища на растението, дългата ювенилна фаза, слабата му способност да образува плодове, дългият период на покълване на семената.

Интензивното и ежегодно нарастващо търсене на субстанцията подофилотоксин и намаляващата популация на *Podophyllum* видове определят търсенето на алтернативни източници на този ценен за фармацията лигнан. Успоредно с това се проучват и перспективни природни молекули с близка структура на подофилотоксина, които могат да послужат за създаването на нови полусинтетични производни с потенциално приложение в противотуморната терапия. Вече излезе и първото съобщение за нерастителен източник на подофилотоксин – микоендофитът *Trametes hirsuta*, който е изолиран от коренищата на *P. hexandrum*. От този гъбичен ендодит са изолирани и доказани лигнаните подофилотоксин, подофилотоксин гликозид и диметилподофилотоксин. Откритието, че микроорганизъм може да синтезира арилтетралинови лигнани, доказва наличието на генетичен трансфер между *Podophyllum spp.* и съответния ендодит, което подпомага симбиозата между двата организма. Генетичният обмен е в основата на приспособяването на *Trametes hirsuta* към цитотоксичните метаболити на *P. hexandrum* по подобие на ендодитите *Taxomyces andreanae* и *Pestalotiopsis microspora* спрямо паклитаксела, продуциран от *Taxus spp.* Продукцията на подофилотоксинови лигнани от *T. hirsuta* създава редица възможности за биотехнологично приложение в бъдеще.

Пълният химичен синтез на подофилотоксин е възможен в наши дни, но наличието на 4 хирални позиции, неподвижен trans- γ -лактонен пръс-

тен и аксиално разположени субституенти затруднява силно органичния синтез и го превръща в икономически нерентабилен [5].

За преодоляване на изброените трудности и в търсене на икономическа ефективност индустрията се е обърнала към растителното клетъчно култивиране – технология, която без съмнение е твърде перспективна [22]. Въпреки това преди прилагането ° е необходимо да се прецени дали цената на продукта и неговото търсене оправдават производството чрез биотехнологични средства. За комерсиализиране трябва да се разгледат икономическите аспекти, както и разработването на съответната биореакторна технология. От нея се очаква да се подобри производителността на клетките, за да се постигне търговски рентабилно производство на тези съединения.

Увеличаване продуктивността на културални противотуморни източници

1. Оптимизиране състава на културалната среда и на условията на култивиране

Чрез оптимизиране на културалната среда и на условията на култивиране е възможно да се увеличи продуктивността на суспензионните култури до 20-30 пъти, в резултат на което ще се получи ефективна система за производство на високи нива на вторични метаболити от растителни клетки. Известни са най-разнообразни подходи за промяна в условията на култивиране: светлина, стрес, киселинност, оптимален хранителен състав, оптимална стратегия за подхранване, температура, газов състав, въглехидратен източник и др. Известни са редица примери, демонстриращи разглеждания подход. Ще се спрем на някои от тях.

Натрупване на подофилотоксин силно се повлиява от светлината, като е известно, че червената светлина стимулира продукцията в клетъчни култури на *P. peltatum* [12]. Осветлението стимулира ендегенната продукция на глюкозид на подофилотоксина до 0.11% (сухо тегло) в култури на *L. flavum*. Тъмно отглеждани суспензионни култури от *P. hexandrum* акумулират 0,1% подофилоток-

син, което е три-четири пъти повече в сравнение със светлинно отглеждани култури [6].

P. hexandrum клетки, нарастващи в колби с разклащане, са чувствителни към хидродинамичния стрес, предизвикан от промени в ротационната скорост на разклащане (при 150 об./min броят на живите клетки *P. hexandrum* намалява до 80%).

Киселинност на средата (pH 6.0) е благоприятна за висока продукция на биомаса и подофилотоксин в клетъчни култури на *P. hexandrum*.

Оптимизирана хранителна среда (pH – 6.0, IAA – 1,25 mg/ml, глюкоза – 72 g/l, ниво на инокулума 8 g/l) за отглеждане на *P. hexandrum* при статистически оптимизирани културални условия води да подобрена продуктивност и растеж – биомаса 20.2 g/l (сухо тегло) и подофилотоксин – 48.8 mg/l.

Добавянето на 50% (V/V) кондиционирана среда на нулев ден води до по-висока средна скорост на растеж в сравнение с контролата при биореакторно култивиране за продуциране на таксуинанин. Добавянето на тази кондиционирана среда предизвиква нарастване на биомасата и на продукта съответно от 43.0 ± 17.6 mg/l и 1.0 ± 0.8 mg/l до 78.9 ± 20.6 mg/l и 4.5 ± 1.2 mg/l.

Температурата също променя клетъчния растеж и продукцията на паклитаксел в суспензионни култури на *T. chinensis* [15]. Клетъчният растеж е оптимален при 24°C, докато синтезът на паклитаксел достига максимум при 29°C.

Най-ефективен газов състав от гледна точка на производство на паклитаксел е 10% (V/V) кислород, 0.5% (V/V) въглероден двуокис и 5 mg/l етилен.

Количеството и видът на въглехидратния източник в клетъчни култури са проучени като фактор за засилен растеж и продуциране на вторични метаболити. Повишени нива на захароза са благоприятни в някои култури. Добавяне на фруктоза също се прилага – стимулира продукцията на таксол в клетъчни култури на *Taxus spp.*

2. Имобилизация

Въпреки че първоначално имобилизацията е била предложена поради предимствата ѝ като повторно използване на скъпа биомаса и полесна преработка, експериментални данни показват, че тя също може да окаже влияние върху клетъчната физиология и производството на вторичните метаболити. Обездвижването на растителните клетки често води до повишаване на метаболитната продукция, което най-вероятно се

дължи на подобряването на клетъчното сцепление и евентуалната агрегация.

Имобилизацията на клетки от *P. hexandrum* с калциев алгинат в комбинация с прекурсорите L-фенилаланин и L-тирозин е експериментирана, но резултатите показват, че не се получава подобрене в натрупването на подофилотоксин, вероятно поради причиняване на стрес.

Паклитаксел в калус на *T. cuspidata* се продуцира след двумесечно култивиране на нива от $0.02 \pm 0.005\%$ (сухо тегло). Суспензионни култури на *T. cuspidata*, създадени от калус култури и впоследствие блокирани върху матрица от стъкло и фибри, т.е. имобилизирани в продължение на шест месеца, продуцират паклитаксел $0.012 \pm 0.007\%$ от сухото тегло.

3. Добавяне на прекурсори

Добавянето на прекурсори към хранителната среда с цел метаболитният път да бъде насочен към засилено производство на желаните продукти представлява интересен подход за използване на потенциала на биосинтетичните ензими в растителни клетъчни култури.

Добавянето на кониферилов алкохол под формата на комплекс с циклодекстрин към клетъчни суспензионни култури от *P. hexandrum* повишава концентрацията на подофилотоксин четирикратно до 0.013% спрямо клетъчната биомаса. Кониферил алкохол, суспендиран самостоятелно в хранителната среда, също засилва продукцията на подофилотоксин, но в по-ниска степен. Кониферин (β -глюкозид на конифериловия алкохол) е по-мощен прекурсор по отношение на добива на противотуморни съединения. Различни фенилпропаноидни прекурсори (фенилаланин, тирозин, канелена киселина, кафеена киселина, кумарова киселина, ферулова киселина, кониферилов алкохол, кониферин и т.н.) са били използвани при клетъчното култивиране за повишаване нивата на подофилотоксин в клетъчни култури на *P. hexandrum*. От тях само кониферин в концентрации 2.1 mM е в състояние значително (12.8 пъти) да увеличи акумулирането на подофилотоксин на десетия ден от култивирането. Прилагане на аминокиселини, L-фенилаланин към клетъчни култури от *Linum flavum* води до 3-5-кратно увеличаване на нивата на 6-метоксиподофилотоксин [23]. Съвместното култивиране на hairy roots на *Linum flavum* заедно със суспензии от *Podophyllum hexandrum* е довело до увеличаване на подофилотоксиновата

концентрация с 240% в разклащащи се колби и със 72% в двоен биореактор в сравнение със суспензии на *P. hexandrum*, култивирани самостоятелно. Кониферин, добавен към hairy roots на *Linum flavum*, действа като прекурсор за производството на подофилотоксин от суспензионни култури на *P. hexandrum*.

Подобрен добив на паклитаксел в калус и суспензионни култури от *T. cuspidata* е наблюдаван след добавяне на фенилаланин и други потенциални паклитаксел-прекурсори от страничните разклонения на биогенетичния път, като например N-бензоилглицин. В суспензионни култури на *T. chinensis* прилагането на комбинацията от първоначално ниска концентрация на захароза (20 g/l) и полупериодичен биореакторен режим подобрява както клетъчния растеж, така и производството на таксани. Постигната е продуктова концентрация 26 mg/l чрез междинно подхранване с 3%, 1% и 2% захароза в дни 0, 7 и 21. Междинно подхранване с 1% и 2% малтоза към култури от *T. chinensis* в дните 7 и 21 повишава продукцията на паклитаксел до 67 mg/l. Комбинацията от захарозно подхранване и контрол на разтворения O_2 могат също да представляват средство за увеличаване продукцията на паклитаксел.

За прекурсори като фенилаланин, бензоена киселина, серин и бензоилглицин е известно, че увеличават натрупването на паклитаксел в калус култури на *T. cuspidata* [7]. Доказано е, че фенилаланин и левцин са най-добрите прекурсори на таксоловата продукция в тихоокеанските видове тис. Подхранване с ацетати също така засилва образуването на таксолоподобни метаболити. Добавянето на прекурсори, като например натриев бензоат, хипуринова киселина, левцин и фенилаланин, към клетъчни култури на *T. wallachiana* значително подобрява продукцията на паклитаксел, бакатин, 10-деацетил бакатин. Прекурсорни проучвания с трептамен и логанин (комбинирано), сенологанин и стриктозидин са извършени в култури на *S. accuminata* [21]. Подхранване със стриктозидин показва, че прекурсорите могат да бъдат лесно биотрансформирани от два ензима (хидроксиллаза и дехидрогеназа) до хидроксистриктозидин и дидехидростриктозидин, но това не води до продуциране на камптотин [20].

4. Елицитори

Елицитирането е индукция на продукцията на вторични метаболити чрез молекули или третирания, известни като "елицитори". Елицитиране-

то се използва, за да се индуцира експресия на гените, често свързани с ензимите, отговорни за синтеза на вторичните метаболити чрез имитиране на патогенна отбрана или отговор при нараняване. Правени са опити за увеличаване натрупването на арилтетралинови лигнани в култури от някои видове *Linum* чрез предизвикване на свръхчувствителен отговор на отбранителна реакция към различни елицитори. Установено е, че фракции от клетъчната стена *Phytophthora megasperma*, метил жасмонат, водороден прекис и салицилова киселина не повлияват в значителна степен натрупването на лигнани в *Linum* ssp. Добавянето на метил жасмонат към клетъчни култури от *Forsythia intermedia* води до трикратно увеличаване на пинорезинол и до седемкратно увеличаване на матаирезинол. Ефектът на добавяне на метил жасмонат към различни клетъчни линии и суспензии от *Linum album* също е проучен – постига се двойно увеличаване на продуктивността – 7.69 ± 1.45 mg/g сухо тегло – подофилотоксин, и 1.11 ± 0.09 mg/g сухо тегло – 6-метоксиподофилотоксин. Ефектът на екстракт от дрожди и абиотични елицитори (Ag_2^+ , Pb_2^+ и Cd_2^+) също е проучен при подофилотоксиновия добив в *Linum album* суспензионни култури. Установено е, че Ag_2^+ 1 mM концентрация води до продукция на 0,24 mg/g сухо тегло.

Установено е, че оксидативен стрес, причинен от третиране с гъбични елицитори, води до клетъчна апоптоза и ниски продукционни нива на паклитаксел. Третирането с метил жасмонат води до по-сериозно повишаване на ефективността на културален добив вместо използването на недефинирани гъбични екстракти. Метил жасмонат повишава нивото на паклитаксел от 28 на 110 mg/l в клетъчни линии на *T. media*, както и от 0,4 на 48 mg/l в *T. bacca* [11]. Значително повишаване на таксоловата продукция чрез многократно използване на метил жасмонат в биореакторно култивирана клетъчна линия на *T. chinensis* също е известно. Абиотични елицитори – особено на някои соли на тежки метали, като например лантан, церий и сребро – са ефективни при индуциране продукцията на паклитаксел в клетъчни култури, което резултира в неколкосткратно увеличаване на продукцията на таксоиди.

Добавянето на клетъчни екстракти и културални филтрати от *Penicillium minioluteum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* и *Gilocladium deliquescens* на десетия ден след прехвърлянето

на клетъчна суспензия на *Taxus spp.* в индукционна хранителна среда подобрява таксоидното производство.

Суспензионни култури от *Taxus* се елицират с клетъчни екстракти и културални филтрати от четири различни гъбички и арахидонова киселина. Чрез едновременното елициране с арахидонова киселина и метил жасмонат се постига преференциалното увеличение на паклитаксел спрямо другите таксани. Установено е, че *Fusarium oxysporum*, селектиран измежду седем вида, е най-ефективният индуктор на таксанова акумулация. Суспензионни култури от *Taxus chinensis* var. *mairei* Y901-L реагират на суров елицитор от гъбички *Fusarium oxysporum* чрез повлияване върху общия фенилпропаноиден път и впитане в таксоловия синтез. Постига се 8-кратно увеличаване на продукцията, като се наблюдава и увеличение на фенолното съдържание в култивационната течност.

Двуфазни култури на клетъчни суспензии са елицирани с метил жасмонат (220 µg/l свежо тегло), както елициторът е в комбинация с мевалонат (0.38 mM) и N-бензоилглицин (0.2 mM) като прекурсори. В суспензионни култури от *Taxus media* се постига по указания начин приблизително десетократно повишаване на таксола (21.12 mg/l) и 20-кратно повишаване на продукцията на baccatin III (56.03 mg/l).

Кобалтов хлорид и сребърен нитрат също са известни като елицитори – самостоятелно или в комбинация, при производството на таксол в суспензионни култури на *Taxus ssp.* Синергично повишаване на таксоловото съдържание се постига чрез смес от амониев цитрат и салицилова киселина. Постигнато е двукратно увеличаване на паклитакселната продукция в сравнение с производство без оптимизация. Комбинирана стратегия за добавяне на различни биотични и абиотични елицитори през различни двуфазни клетъчни суспензии на *T. baccata* са довели до 16-кратно увеличение в производството на таксол (39.5 mg/l) в сравнение с нетретираните култури.

5. Извличане на продукта

Постигане на екскреция от живи клетки или органи в *in vitro* системите е важен момент за индустриалното им приложение. Известни са много примери за различен тип натурални вещества, излъчени от интактни корени или *in vitro* култури в околната среда, като алкалоиди, терпени, антрахинони, опини, флавонови, захари, ами-

нокиселини и др. Много са доказателствата, че реализирането (излъчването) на продукта е обща черта, свързана с живата коренова тъкан, а не само резултат от клетъчен лизис. Ако продуктът бъде отстранен от хранителната среда чрез абсорбция или бъде увеличено разреждането на средата, може да се предизвика увеличаване на тоталната метаболитна продукция. Ако излъчването се дължи на лизис, то тя няма влияние върху тоталната продукция, а само върху разпределението на продукта. Много фактори повлияват екскрецията при кореновите системи: недостиг на кислород, висока температура, увеличаване на калций, намаляване на рН, третиране с елицитори и др. До голяма степен в някои *in vitro* култури излъчването се дължи на обикновена дифузия. Продуктът трябва да предизвиква адекватен мембранен пермеабилитет. Съобщени са редица примери за екскреция както през лаг фазата, така и по време на експоненциалната фаза, когато формирането на продукта е активно. Излъчването през стационарната фаза най-често се дължи на клетъчен лизис. Разработени са много различни подходи и техники за увеличаване на клетъчния пермеабилитет (напр. с Tween 20), но нито един от тях не е постигнал комплексно позитивен резултат. Акумулирането на продукта в клетките, които го синтезират, е ограничаващ фактор и повишаването на неговата концентрация служи като инхибитор на ензимите, включени в собствения му биосинтез.

Стратегии като пермеабилитация, при която се ползват разтворители и се добавят адсорбанти към клетъчни култури, се използват за увеличаване на метаболитната продукция. Предимствата на тези стратегии са:

- а) стимулиране на вторичния метаболитен биосинтез и
- б) лесно разделяне на продуктите.

Ефектите на добавяне на адсорбенти за продукцията на таксол и таксани са изследвани в клетъчни култури на *Taxus cuspidata*. Нейонизираната обменна смола XAD-4 е избрана като подходящ адсорбент, показал максимален адсорбционен капацитет за таксол. Добавянето на XAD смола в културата 16 дни след субкултивирането засилва таксоловия биосинтез с 40-70%.

б. Биотрансформационни подходи

Микробиалните и растителните ензими са в състояние да катализират както региоспецифични, така и стереоспецифични реакции [10]. По

този начин свободно суспендирани и имобилизирани растителни клетки, както и ензимни продукти, могат да бъдат използвани за продукция на фармацевтични продукти или чрез биотрансформация, или в комбинация с химичен синтез.

Микробни подходи

Известни са следните микробни трансформации, свързани с подофилотоксин [14]:

- деоксиподофилотоксин до епиподофилотоксин (предшественик на етопозид) – чрез *Penicillium Spp.*,
- деоксиподофилотоксин до подофилотоксин – чрез *Aspergillus niger spp* [16].

Известна е и биотрансформация на таксол/цефаломанин от *Streptomyces spp.* MA 7065.

Подходи с растителни ензими

Инкубацията на дибензилбутанолиди с екстракти от *C. roseus* предизвиква ензим-катализирано оксидативно куплиране на тези съединения помежду им до пикроподофилотоксинови аналози. Четири циклодекстрина – β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин, диметил- β -циклодекстрин и хидроксипропил- β -циклодекстрин, се ползват за глюкозиране на подофилотоксин. Максимална скорост на биоconversion 0.51 mmol/l/ден се постига с диметил- β -циклодекстрин комплекс в крайна концентрация 1,35 mmol/l в суспензии на *L. flavum*.

Полунепрекъснати процеси за биотрансформация на бутанолид до 4'-диметилепиподофилотоксин в нива от няколко грама в суспензия от *P. peltatum* са известни. Доказано е, че синтетичен дибензилбутанолид се биотрансформира в комплекс от подофилотоксинови аналози в надземни култури на *Halophyllum patavinum*. При ниска концентрация (0.1 mM) дезоксиподофилотоксин се превръща в 6-метилподофилотоксин-7-О-глюкозид, в 6-метилподофилотоксин, в следи от α -пелтаин и в подофилотоксин в суспензии на *L. album*.

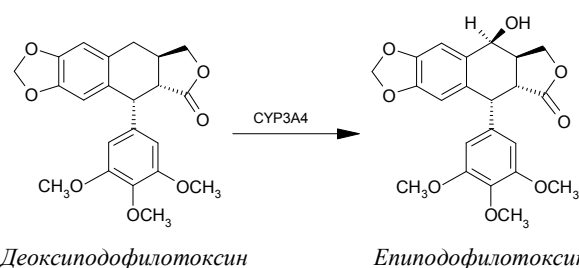
Комбинаторен биосинтез

Комбинаторният биосинтез (КБ) е модерен подход за получаване на ценни за фармацевтичната молекули, който намира все по-широко приложение през последните години. КБ комбинира ензимите и продуктите на различни биологични видове с цел генериране на нови молекули или на вещества, които са трудни за получаване чрез други методи [9].

Методът на комбинаторния биосинтез е приложен и за продукция на епиподофилотоксин. Методът включва хетероложна експресия в *E. coli* на трите най-разпространени чернодробни

CYP450 ензима в човешкия метаболизъм (CYP1A2, CYP2C9 и CYP3A4) и помощния протеин NADPH-450 редуктаза [8].

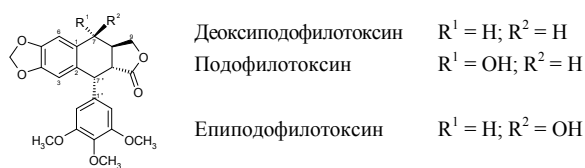
Досегашните проучвания върху алтернативните подходи за добив на подофилотоксин показват, че създадените до момента методи имат колеблив успех. Въпреки че е съобщено превръщането на деоксиподофилотоксин в епиподофилотоксин с помощта на микроорганизми (*Aspergillus niger sp.* и *Penicillium sp.*), се оказва, че този процес е твърде продължителен: 72 h, за разлика от метода, пояснен на фиг. 4 – 95% добив за 2 h.



Фиг. 4. Стереоселективно хидроксилиране на деоксиподофилотоксин в епиподофилотоксин чрез рекомбинантен CYP3A4 в *Escherichia coli*

Степента на биотрансформация чрез генетично модифицираните микроорганизми в предлаганата технология е над 90% за интервал от 2 h при концентрация на субстрата 10 μ M, което е най-високият добив на епиподофилотоксин, известен досега чрез биотрансформация въобще [23]. Интензивният бактериален растеж, високата ензимна експресия, лесната манипулация на бактериалните култури, високият добив на продукта, ниските цени на създаване и поддържане на културите правят гореописаната система перспективна за производство на епиподофилотоксин, който е ценен прекурсор във фармацевтичната индустрия.

Подофилотоксин може да се продуцира и чрез растителни клетъчни култури – суспензионни култури от *Callitris drummondii*, но се получава неговата гликозидна форма (подофилотоксин- β -D-глюкопиранозид) в малки количества (0.1% с.т.) в неоптимизирана система за продукция. Провеждани са и опити за биотрансформация на деоксиподофилотоксин чрез суспензионни култури от *P. hexandrum*, но отново процесът се оказва неефективен поради бавния растеж на културите. Деоксиподофилотоксинът може да се биотрансформира чрез клетъчни култури от *Linum flavum*, но като краен и основен продукт се получава 6-метоксиподофилотоксин гликозид.



Методът може да се използва за ензимното модифициране на лигнани при производството на важни прекурсори във фармацията, чрез което се избягва проблемът със силната токсичност на някои субстрати или продукти върху растителните, гъбичните или бактериалните клетки.

Инкубирането на клетки в *Eucalyptus perriniana* в среда, съдържаща паклитаксел, води до изолиране на три таксоидни деривата, които впоследствие са идентифицирани чрез 1H NMR и маспектрометрия както бакатин III, 10 III-деацетилбакатин, а 2 -бинзоилтаксол.

8. Биореакторен промишлен добив

Периодично и полупериодично култивиране на клетки в *Podophyllum hexandrum* за производството на подофилотоксин се прилага в 3-литрови биореактори с механично разбъркване. Постигнато е 36% увеличение на производителността на подофилотоксин при полупериодично култивиране на клетки на *P. hexandrum* спрямо периодичното култивиране [24]. Непрекъснато култивиране на *P. hexandrum* с клетъчно задържане също е известно и се провежда в биореактор с въртящ се филтър, монтиран върху въртящ се вал. Резултатът е натрупване на 53 g/l биомаса и 48.8 mg/l подофилотоксин, с обемна производителност от 0.8 mg/l/ден. Максималният продукт добив на подофилотоксин – 0,2%, спрямо суха биомаса е постигнат, когато клетки на *Linum album* са култивирани в суспензии в 20-литров биореактор.

Taxus е култивиран успешно за производство на паклитаксел в газово разбъркващ се биореактор [17]. Непрекъснатата производствена система за паклитакселно производство е постигнала около 10 пъти по-висока производителност в сравнение с периодичното биореакторно култивиране. Култивиране при ниска температура не само поддържа продукцията на таксол стабилно висока, но и допълнително я стимулира в сравнение с елицитирани култури. Това води до най-висок добив – 27 mg/l. Клетъчни култури на *T. chinensis*, когато се отглеждат в центробежни биореактори, имат по-кратка lag фаза и показват клетъчна адхезия към реакторната стена в сравнение с конвенционалните клетки при еър-лифт биореакторите [25]. Газово разбъркващи се ко-

лонни и air-lift реактори по-широко се използват за таксоидно производството, отколкото механично разбъркващите се реактори. Суспензионни култури от *Taxus baccata* Var. *fastigiata* и *Taxus wallichiana* са култивирани в 20-литров air-lift биореактор, работещ в периодичен режим [18].

Фармацевтичната компания Phyton въвежда през 2003 г. in vitro широкомащабни производствена на фитопродукти, а през 2005 г. започва биореакторно производство на паклитаксел чрез растителни клетки от видове *Taxus*, откупувайки правата от фармацевтичната компания Bristol-Myers Squibb. Таксани се произвеждат в биореактор чрез използване на суспензии от различни видове *Taxus*. *Taxus* е един от малкото примери за мащабно биотехнологично производство на ценен противотуморен вторичен метаболит от недиференцирани растителни клетки.

Все още няма сведения за производството на камптотексин чрез растителни култури в биореактор, поради което дейността в това направление е важна област на фармацевтичните изследвания.

Проучванията показват, че голяма част от лекарствените продукти, регистрирани и продавани на фармацевтичния пазар, водят началото си от природни съединения. Най-силна е тази тенденция при противотуморните лекарствени продукти, където 62% от всички новорегистрирани препарати са базирани на природни вещества. Разпространено е мнението, че лекарствените продукти от растителен произход са сред най-мощните средства за борба с рака. Продукцията на БАВ от клетъчни култури е незаменима за добиване на редки продукти, които са скъпи и трудни за получаване по други методи – напр. винбластин, винкрестин, паклитаксел (Taxol®), камптотексин, или лигнана подофилотоксин, някои сапонини. Биотехнологичните методи дават отлична алтернативна възможност за продукцията на такива съединения [1] и показват колко обещаващи могат да бъдат комбинацията, единството и многократното преплитане между класическата фармакогнозия и биотехнологията.

Благодарности. Финансова подкрепа от Фонд „Научни изследвания“ на МОН, София (Сабатична година за български учени: Договор Д002-4/2008 – И. Йонкова).

Библиография

1. Йонкова, И. Основи на фармацевтичната растителна биотехнология, (Хр. Христов ред.). С., Ес Принт, 2009, 1-298.

2. Argo, R. R. J. et al. Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. – *Phytochem. Rev.*, **1**, 2002, 27-35.
3. Baloglu, E. et D. G. I. Kingston. The taxane diterpenoids. – *J. Nat. Prod.*, **62**, 1999, 1448-1472.
4. Berlin, J. et al. On the podophyllotoxins of root cultures of *Linum flavum*. – *Planta Med.*, **54**, 1988, 204-206.
5. Baldy, A., V. Bisaria et A. Srivastava. – In: *Medicinal plants biotechnology. From basic research to industrial applications*, (O. Kaiser, Quax, W., eds). Wiley-VCH Verlag, 2007, 117-156.
6. Chattopadhyay, S. et al. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. – *J. Ferment. Bioeng.*, **93**, 2002, 215-220.
7. Chen, T. S. et al. Biotransformation of taxol. – *Tetrahedron Lett.*, **42**, 2001, 3787-3789.
8. Collu, G. 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. – *FEBS Lett.*, **508**, 2001, 215-220.
9. Cragg, G. M. et D. J. Newman. Antineoplastic agents from natural sources: Achievements and future directions. – *Expert Opin. Investig. Drugs*, **9**, 2000, 2783-2797.
10. De Luca, V. Metabolic engineering of crops with the tryptophan decarboxylase of *Catharanthus roseus*. – In: *Verpoorte, R., Alfermann, A.W. (Eds.), Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, 179-194.
11. Dong, H. D. et J. J. Zhong. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. *Biochem. – Eng. J.*, **8**, 2001, 145-150.
12. Emtt, U. et al. The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans. – *J. Appl. Bot.*, **74**, 2000, 145-150.
13. Imbert, T. F. Discovery of podophyllotoxins. – *Biochimie*, **80**, 1998, 207-222.
14. Kayser, O. et W. Quax. *Medicinal plant biotechnology* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007.
15. Luo, J. et G. Y. He. Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. – *Process Biochem.*, **39**, 2004, 1073-1079.
16. Molog, M. G. et al. Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in biosynthesis of cytotoxic lignans. – *Planta*, **214**, 2001, 288-294.
17. Navia-Osorio, A. et al. Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. – *J. Plant Physiol.*, **159**, 2002, 97-102.
18. Pan, Z. W., H. Q. Wang et J. J. Zhong. Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. – *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 2000, 714-723.
19. Pezzuto, J. M., Plant-derived anticancer agents. – *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1997, 121-133.
20. Silvestrine, A. et al. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. – *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 2002, 749-753.
21. Van Hengal, A. J. et al. Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. – *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, **28**, 1992, 11-18.
22. Verpoorte, R., A. Contin et J. Memelink. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. – *Phytochem. Rev.*, **1**, 2002, 13-25.
23. Vasilev, N. et al. Bioconversion of deoxypodophyllotoxin into epipodophyllotoxin in *E. coli* using human cytochrome P450 3A4. – *J. Biotechnology*, **126**, 2006, 383-393.
24. Woerdenbag, H. J. et al. Increased podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* cell suspension cultures after feeding coniferyl alcohol as a betacyclodextrin complex. – *Plant Cell Rep.*, **9**, 1990, 97-100.
25. Zhong, J. J. et al. Effect of mixing time on taxoid production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. – *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 2002, 244-250.

✉ Адрес за кореспонденция:

И. Йонкова
Фармацевтичен факултет
Медицински университет
ул. „Дунав“ № 2
1000 София
България

✉ Address for correspondence:

I. Yonkova
Faculty of Pharmacy
Medical University
2 Dunav Str.
1000 Sofia
Bulgaria
