ارزیابی مقدار تاکسول و ۱۰-دِ استیل باکاتین III در برگ و کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار

حمید احدی[۱]، محمد حسین میرجلیلی[۲]*، محسن فرزانه[۳] و حسن رضادوست[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران (m-mirjalili@sbu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

در این تحقیق، مقدار تاکسول و ۱۰-دِ استیل باکاتین III در برگ‌های گونه سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata*) و گونه اقیانوس آرام (*T. brevifolia*) و توانایی تولید آن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی این دو گونه مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا گردید. القای کالوس با استفاده از ریزنمونه‌های میان‌گره ساقه‌های جوان در محیط کشت جامد صورت گرفت، سپس کشت سوسپانسیون سلولی بر روی همین محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالن استیک اسید و بنزیل‌آمینوپورین به‌ترتیب با مقادیر ۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. ۲۱ روز پس از کشت، وزن تر و خشک سلول محاسبه و مقدار تاکسول و ۱۰-دِ استیل باکاتین III آن‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که برگ‌های گونه های سرخدار بومی ایران و سرخدار اقیانوس آرام به‌ترتیب حاوی ٤٥ و ۲۷ میکروگرم تاکسول و ٤٠ و ٤ میکروگرم ۱۰-دِ استیل باکاتین III در گرم وزن خشک نمونه بودند و کشت سوسپانسیون سلولی آن‌ها نیز به‌ترتیب مقدار ٥٤٠ و ۲۰ میکروگرم در لیتر تاکسول و مقدار ۱ و ۱۱۰ میکروگرم در لیتر از ۱۰-دِ استیل باکاتین III تولید کردند. بنابراین نتایج حاکی از برتری کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار بومی ایران در تولید تاکسول بود که می‌تواند برای بهینه سازی تولید تجاری این ترکیب ضد سرطان در سیستم های بیوراکتور مورد استفاره قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: تاکسان، ضدسرطان، کروماتوگرافی مایع، کشت درون شیشه

مقدمه

تاکسول[۱] به عنوان یکی از ترکیبات طبیعی بسیار کارآمد با سمیت پایین در کنترل و درمان طیف گسترده‌ای از انواع سرطان‌ها معرفی شده است که برای اولین بار از پوست درخت سرخدار اقیانوس آرام جدا گردید (Wani *et al.*, 1971). علی‌رغم این‌که تاکسول موجب تحول بزرگی در زمینه استفاده از ترکیبات طبیعی و تولید داروهای ضدسرطان گردید ولی به علت مقدار کم این ترکیب در ماده گیاهی (۰/۰۵-۰/۰۱ درصد) و پیچیدگی سنتز آن، چندان مورد توجه قرار نگرفت. با گذشت زمان و به دنبال افزایش اهمیت تاکسول به عنوان یک داروی مؤثر علیه انواع سرطان‌ها، توجه بیشتری به سوی تولید این داروی مهم در مقیاس صنعتی معطوف شد. به هر حال، تولید تاکسول از گیاه به عنوان تنها منبع این داروی با ارزش، اقتصادی نیست؛ چرا که جهت استحصال یک کیلوگرم تاکسول از گیاه، نیازمند به قطع شدن ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ درخت سرخدار ۲۰۰ ساله می‌باشد، در نتیجه

1- Taxol (Paclitaxel)

روش‌های جایگزین دیگر مانند واکنش نیمه سنتز از پیش ماده‌هایی نظیر باکاتین III[1] و ۱۰-دِ استیل باکاتین III[2] که به مقدار بیشتری در گیاه وجود دارند و همچنین تولید آن به روش‌های بیوتکنولوژی مدنظر قرار گرفتند (Stierle *et al.*, 1995). سرخدار، درختی از جنس تاکسوس[3]، راسته تاکسالز[4] و خانواده تاکساسه[5] می‌باشد که پراکنش آن مربوط به نواحی معتدل، به‌ویژه در نیمکره شمالی، اروپا، آسیا و آمریکای شمالی می‌باشد (Bedi *et al.*, 1996). از جنس سرخدار هشت گونه گزارش شده است که سرخدار اروپایی یا بومی ایران (*T. baccata* L.) و سرخدار اقیانوس آرام (*T. brevifolia*) از مهم‌ترین گونه‌های این جنس می‌باشند. تاکنون ۷۲ واریته نیز برای سرخدار معرفی شده است که تفاوت عمده آن‌ها بر اساس ارتفاع، رنگ برگ‌ها و مقاومت به سرما می‌باشد (Itokawa and Lee, 2003) تاکسان‌ها[6] مشتقات دی‌ترپنوئیدی[7] (۲۰ کربنی) هستند که تاکنون بیش از ۳۵۰ نوع از آن‌ها در گونه‌های مختلف سرخدار شناسایی شده است که تاکسول، ۱۰-دِ استیل‌باکاتین III، باکاتین III و تاکسینین[8] از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند. داروهای حاصل از سرخدار برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ به صورت تجربی مورد تجویز قرار گرفته و در ادامه توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای درمان سرطان‌های رحم و سینه مورد تأیید قرار گرفت (Bedi *et al.*, 1996). تاکنون اشکال دارویی مختلفی از ترکیب تاکسول فرموله و به بازارهای دارویی عرضه شده است. از اولین روش‌های تولید تاکسول کشت و کار درخت سرخدار می باشد و تلاش‌های زیادی جهت افزایش عملکرد تاکسول صورت گرفته است، ولی مشکل اصلی مقدار کم تاکسول در پوست درخت سرخدار بود که مقدار تاکسول از ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۵ در گونه‌های مختلف سرخدار متغیر است (Schippmann, 2001). به همین دلیل تلاش‌های بسیاری جهت جایگزینی سایر روش‌ها در تولید تاکسول صورت گرفت. در سال ۱۹۹۴، اولین موفقیت در تولید تاکسول به روش سنتز شیمیایی محقق شد (Nicolau *et al.*,1994). ولی پیچیدگی مسیر بیوسنتز تاکسول، عملکرد پایین و قابلیت اجرای محدود سنتز شیمیایی باعث شد تا روش‌های جایگزین برای تأمین این ترکیب مورد توجه قرار گیرد. سیستم‌های نیمه سنتز تاکسول یکی از این روش‌ها می‌باشد که به واسطه پیش ماده‌های باکاتین III و ۱۰-دِ استیل باکاتین III موجود در برگ‌های سرخدار صورت می‌گیرد. طی دو دهه گذشته، از روش‌های زیست‌فناوری به‌ویژه کشت سلولی سرخدار در تولید تاکسول استفاده شده است که به دلیل عدم وابستگی به محیط، از جمله روش‌های تولید پایدار این ترکیب است (Zhong, 2002؛ Tabata, 2004). همچنین در این روش با افزودن انواع انگیزنده[9] و پیش ماده‌ها به محیط کشت، افزایش راندمان تولید تاکسول گزارش شده است (Khosroushahi *et al.*, 2006؛ Onrubia *et al.*, 2013؛ Vongpaseuth and Roberts, 2007). در این تحقیق با توجه به ارزش دارویی تاکسان‌ها به‌ویژه دو ترکیب تاکسول و ۱۰-دِ استیل باکاتین III (به‌عنوان پیش ماده در نیمه‌سنتز تاکسول و تاکسوتر[10]) مقایسه مقدار آن‌ها در برگ و کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار انجام شده است تا گونه مناسب برای بهینه‌سازی شرایط کشت سلولی، در مقیاس صنعتی مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

مواد و حلال‌های شیمیایی

حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد نیاز در تمامی مراحل آزمایش با درجه خلوص HPLC و از شرکت مِرک آلمان تهیه شدند.

1- Baccatin III
2- 10-Deacetyl baccatin III (10-DAB)
3- *Taxus* L.
4- Taxales
5- Taxaceae
6- Taxanes
7- Diterpenoids
8- Taxinine
9- Elicitor
10- Taxotere

مواد گیاهی

ریزنمونه‌های استفاده شده در این تحقیق از سرشاخه‌های سرخدار بومی ایران (کشت شده در دانشگاه شهید بهشتی تهران با ۱۷۸۵ متر ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی N ´۴۸ °۳۵ و E ´۲۳ °۵۱) و سرخدار اقیانوس آرام با نام علمی *T. brevifolia* از پایه کاشته شده در ایران (باغ گیاه‌شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج با ۱۲۳۸ متر ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی N ´۴۸ °۳۵ و E ´۵۹ °۵۰) جمع‌آوری شدند.

ضدعفونی و استقرار ریزنمونه‌ها در شرایط کشت بافت

در این تحقیق، از قطعات ساقه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای این منظور، سرشاخه‌های جوان از هر دو گونه سرخدار به آزمایشگاه کشت بافت منتقل و به مدت یک ساعت زیر آب شیر[1] آزمایشگاه مورد شستشو قرار گرفتند. سپس برگ‌ها حذف و ریزنمونه‌های تهیه شده به‌ترتیب به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (V/V) و ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار داده شده و در پایان سه بار متوالی و به‌ترتیب طی ۱، ۳ و ۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل شستشو شدند. در ادامه تعداد ۱۰ ریزنمونه استریل درون هر شیشه مربایی حاوی محیط کشت و به صورت افقی بر سطح محیط کشت قرار گرفت.

شرایط القاء، رشد و نگهداری کالوس

برای القای کالوس بر روی ریزنمونه‌های هر دو گونه از گزارش قبلی استفاده گردید (Brunakova *et al.*, 2004). برای این منظور ریزنمونه‌ها به قطعات یک سانتیمتری برش داده و به صورت افقی بر روی محیط کشت B_5 حاوی هورمون‌های گیاهی توفوردی[2] (۶ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین[3] (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۱/۵ گرم در لیتر پلی‌وینیل پیرولیدون[4] و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز قرار داده شدند (Gamborg *et al.*, 1968). شیشه‌های کشت جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از القای کالوس بر روی ریزنمونه‌ها و به منظور رشد بیشتر، کالوس‌ها از ریزنمونه‌ها جدا و به محیط رشد کالوس به‌ترتیب حاوی ۳، ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، کینتین و جیبرلیک اسید منتقل شدند. کالوس‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و واکشت آن‌ها هر سه هفته یک‌بار (۲۱ روز) صورت گرفت. پس از پنج‌بار واکشت، کالوس‌های نرم[5] جهت کشت سوسپانسیون سلولی استفاده گردید.

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، مقدار ۲/۵ گرم کالوس نرم از هر دو گونه درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط B5 شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید[6] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین[7] کشت داده شد. برای هر گونه سه تکرار و در هر تکرار پنج واحد آزمایشی (ارلن) در نظر گرفته شد. ارلن‌های کشت بر روی شیکر دورانی[8] با سرعت ۱۰۵ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Palazon *et al.*, 2003). سلول‌ها، ۲۱ روز پس از کشت برای بررسی زنده‌مانی، اندازه‌گیری وزن تر و خشک و مقدار تاکسان‌ها برداشت شدند.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها

برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو[9] استفاده شد (Green, 1990). محلول رنگ‌آمیزی مذکور در ۰/۴ درصد وزنی حجمی تراپان‌بلو در بافر فسفات تهیه و سپس، حجم مساوی از سلول‌ها با محلول رنگ، به مدت ۵ دقیقه تیمار و درون لام شمارش

1- Tap water
2- 2,4-D
3- Kinetine
4- Polyvinylpirrolidone (PVP)
5- Friable
6- Naphtalene acetic acid (NAA)
7- 6-Benzylaminopurine
8- Heidolph Unimax1010
9- Trypan blue

سلول (هموسایتومتر[1]) در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. در سلول‌های آسیب‌دیده و مرده، محلول رنگ‌آمیزی به داخل غشاء نفوذ کرده و آن‌ها را به رنگ آبی در می‌آورد، در حالی‌که سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. هر یک میلی‌متر مربع بایستی تعداد سلولی بین ۳۰ تا ۲۰۰ عدد داشته باشد تا نتیجه‌ای دقیق به‌دست آید. سلول‌های زنده (کاملاً واضح یا کاملاً روشن) و سلول‌های مرده (آبی) در حداقل ۲ سطح ۲ میلی‌متر مربع شمارش شدند. تعداد و درصد سلول‌های زنده و مرده طبق فرمول زیر مشخص شد:

ت×پ× الف = غلظت سلول‌های زنده (هر میلی‌لیتر)

ت×پ× ب = غلظت سلول‌های مرده (هر میلی‌لیتر)

الف، تعداد سلول‌های زنده شمارش شده

ب، تعداد سلول‌های مرده

پ، فاکتور رقت (=۲)

ت، فاکتور تصحیح است که از طرف کارخانه سازنده سلول شمار مشخص شده است (عددی که برای تبدیل ۰/۱ میلی‌متر مکعب به میلی‌لیتر موردنیاز است و معمولاً $۱۰^{۴}$ می‌باشد)

درصد زنده‌مانی سلول‌ها بر طبق فرمول زیر محاسبه شد:

حجم × غلظت سلول‌های زنده = تعداد کل سلول‌های زنده

تعداد سلول‌های مرده × تعداد سلول‌های زنده = تعداد کل سلول‌ها

تعداد کل سلول‌ها/ (۱۰۰× تعداد سلول‌های زنده) = درصد زنده‌مانی سلول‌ها

عصاره‌گیری و استخراج تاکسان‌ها از بافت‌های گیاهی

از برگ‌های خشک شده در شرایط سایه و دمای اتاق و همچنین سلوهای خشک شده در شرایط تحت خلاء و انجمادِ[2] هر دو گونه برای استخراج و اندازه‌گیری تاکسان‌ها استفاده شد. برای این منظور مقدار دو گرم از نمونه‌های پودر شده برگ و سلول هر گونه در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱۶ ساعت درون شیکر تکان داده شد. نمونه‌ها در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک[3] قرار گرفت تا دیواره سلولی کاملاً از هم جدا شود. سپس با استفاده از قیف جداکننده و محلول هگزان مواد قطبی اضافی از محیط حذف شده و با استفاده ار دی‌کلرومتان در سه مرتبه استخراج صورت گرفت تا تاکسان‌ها درون دی‌کلرومتان حل شود. سپس با استفاده از روتاری حلال را جدا کرده و عصاره به دست آمده را در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل کرده و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (اِچ‌پی‌اِل‌سی)[4] تزریق گردید (Ghassempour *et al.*, 2009).

آنالیز و اندازه‌گیری مقدار تاکسان‌ها

جهت اندازه‌گیری مقدار تاکسان‌ها از دستگاه اِچ‌پی‌اِل‌سی مدل کنوئر[5] ساخت کشور آلمان به همراه پمپ کنوئر (کا-۱۰۰۱)، آشکارساز کنوئر (کا -۲۸۰۰)، شیر تزریق مدل ۷۵۲۵ با لوپ ۲۰ میکرولیتر و سیستم پردازش اطلاعات کامپیوتری با نرم‌افزار کرومگیت[6] استفاده گردید. از ستون[7] C18 در ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر استفاده شد. فاز متحرک استونیتریل/ آب اِچ‌پی‌اِل‌سی با نسبت حجمی ۵۵/۴۵، سرعت جریان حلال در ستون یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. استاندارد تاکسول و ۱۰-دِاستیل باکاتین III در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام برای رسم منحنی استاندارد تهیه و درنهایت تاکسان ها در طول موج ۲۳۰ نانومتر نمایان شدند.

محاسبات آماری

پس از ثبت داده‌ها در نرم‌افزار اِکسل، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار سَس (نسخه ۱، ۹) و مقایسه میانگین‌ها به روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام پذیرفت.

1- Haemocytometer
2- Freez dryer
3- Pawer sonic 505
4- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
5- KNAUER
6- Chromgate
7- KNAUER(250*4.6mm)

نتایج و بحث

مقدار تاکسان‌ها در بافت گیاهی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به این تحقیق نشان می‌دهد که گونه‌های مورد مطالعه از نظر مقدار تاکسان‌ها در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند (جدول ۱). به‌طوری‌که نتایج اندازه‌گیری مقدارآن‌ها در برگ‌های گونه‌های مورد مطالعه حاکی از برتری سرخدار بومی ایران نسبت به گونه دیگر بود. این نتایج نشان داد که گونه‌های سرخدار بومی ایران و سرخدار اقیانوس آرام به‌ترتیب حاوی ۴۵ و ۲۷ میکروگرم تاکسول و ۴۰ و ۴ میکروگرم ۱۰-دِ استیل باکاتین III بر گرم وزن خشک نمونه بودند (شکل ۱).

مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج گزارش شده مبتنی بر بررسی تاکسان‌ها در طی ماه‌های مختلف در سرخدار بومی ایران نشان می‌دهد که مقدار تاکسول اندازه گیری شده در نتایج این تحقیق دو برابر افزایش یافته است. که این موضوع می‌تواند به سن درخت نمونه برداری شده مربوط باشد؛ چرا که با افزایش سن درخت مقدار تولید تاکسول نیز افزایش می‌یابد. اما مقدار ۱۰-دِ استیل باکاتین III تقریباً به نصف کاهش یافته بود که این موضوع می‌تواند به تأثیر دمای هوا در طی سال برداشت مرتبط باشد ؛ چرا که نتایج نشان می‌دهد با گرم شدن هوا تبدیل ۱۰-دِ استیل باکاتین III به تاکسول در طی چرخه تولید تاکسان‌ها بیشتر صورت می‌گیرد (Ghassempour *et al.*, 2009). با توجه به بیشتربودن تاکسان‌های موجود در سرخدار بومی ایران، این گونه جهت کشت وسیع به منظور تولید انبوه آن‌ها توصیه می‌گردد. Nemeth-Kiss *et al.* (1995) در تحقیقی بر روی مقدار تاکسول گونه‌های سرخدار موجود در مجارستان نیز نشان دادند که مقدار این ترکیب در گونه *T. baccata* بیشتر از سایر گونه‌ها است. Nemeth-Kiss *et al.* (1995) که به خوبی نتایج تحقیق پیش رو را تأیید می‌کند.

کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار

پس از ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی گونه‌های سرخدار (شکل ۲)، نتایج تجزیه واریانس برای وزن تر و خشک و مقدار تاکسان‌ها در کشت سلول دو گونه سرخدار نشان داد که گونه‌های مورد مطالعه از نظر این صفات در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند (جدول ۲). نتایج نشان داد که سلول‌های سرخدار اقیانوس آرام وزن تر بیشتری (۸۵ گرم در لیتر) در مقایسه با سلول‌های سرخدار بومی ایران (۷۵ گرم در لیتر) در کشت سوسپانسیون سلولی دارند (شکل ۳). این نتایج با اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی سلول‌های سرخدار اقیانوس آرام ۲۱ روز پس از استقرار کشت سوسپانسیون سلولی که برابر با ۸۹ درصد و در سرخدار بومی ایران برابر با ۸۰ درصد بود مطابقت داشت (شکل ۴).

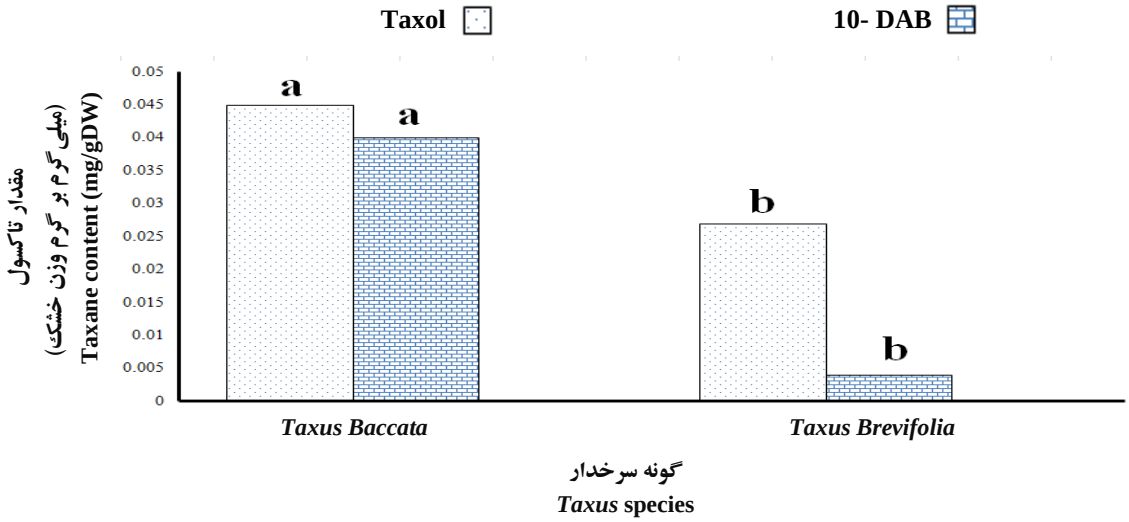
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برای مقدار تاکسان‌ها در برگ دو گونه سرخدار

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) for the amount of taxanes in the leaf of two yew species

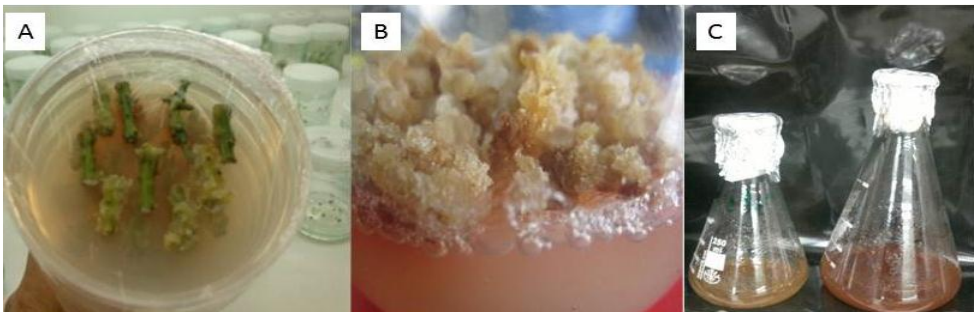
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	
		مقدار تاکسول Taxol amount	مقدار ۱۰- دِاستیل باکاتین 10-DAB III amount
گونه Species	1	0.00048**	0.0019**
خطا Error	4	0.00003	0.0005
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		16.98	33.55

** به‌ترتیب بیان‌کننده اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.

** Significant at 0.01 probability levels.



شکل ۱- مقایسه میانگین مقدار تاکسول و ۱۰-دِ استیل باکاتین III در برگ‌های دو گونه سرخدار
(مطابق با آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند)
Figure 1: Mean comparison of taxol and 10-DAB content in the leaf of two yew species.
(Means with different letters are significantly different at p≤ 0.01 according to the Duncan's Multiple Range Test)



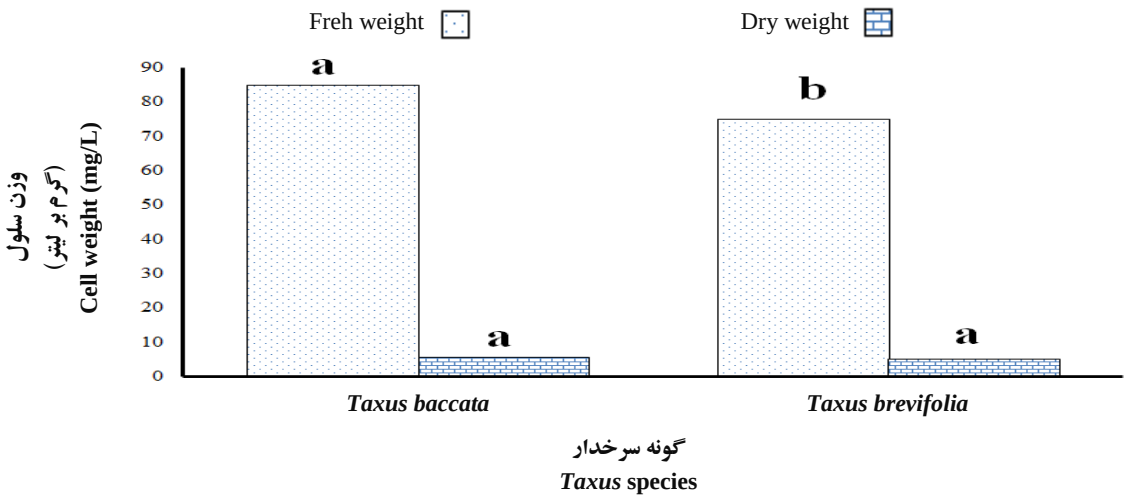
شکل ۲- نمونه‌هایی از مراحل کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار: A: ریزنمونه‌های میان‌گره ساقه‌های جوان بالغ برای القای کالوس، B: کالوس رشد یافته و C: ظروف محتوی کشت های سوسپانسیون سلولی
Figure 2. Samples showing yew cell suspension culture stages: A: Young internode explants for callus induction, B: Grown callus and C: Culture vessels containing *Taxus* cell suspension cultures

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار
Table 2. Analysis of variance (ANOVA) for studied traits in cell suspension culture of two yew species

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
		وزن تر سلول Cell fresh weight	وزن خشک سلول Cell dry weight	مقدار دِاستیل باکاتین 10-DBAIII amount	مقدار تاکسول Taxol amount
گونه Species	1	150**	0.54**	0.4009**	0.017**
خطا Error	4	14.12	0.04	0.005	0.00005
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		4.69	3.77	25.42	12.72

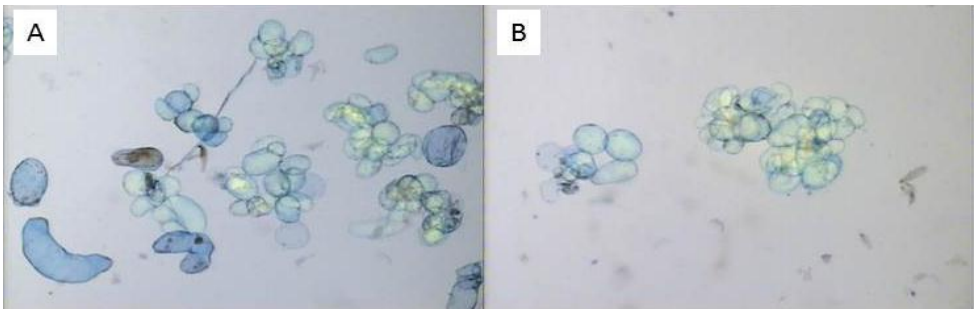
** Significant at 0.01 probability levels.

** به‌ترتیب بیان‌کننده اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن تر و خشک سلول در کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار
(مطابق با آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند)

Figure 3. Mean comparison of fresh and dry weight of cells in cell suspension cultures of two yew species
(Means with different letters are significantly different at p≤ 0.01 according to the Duncan's Multiple Range Test)

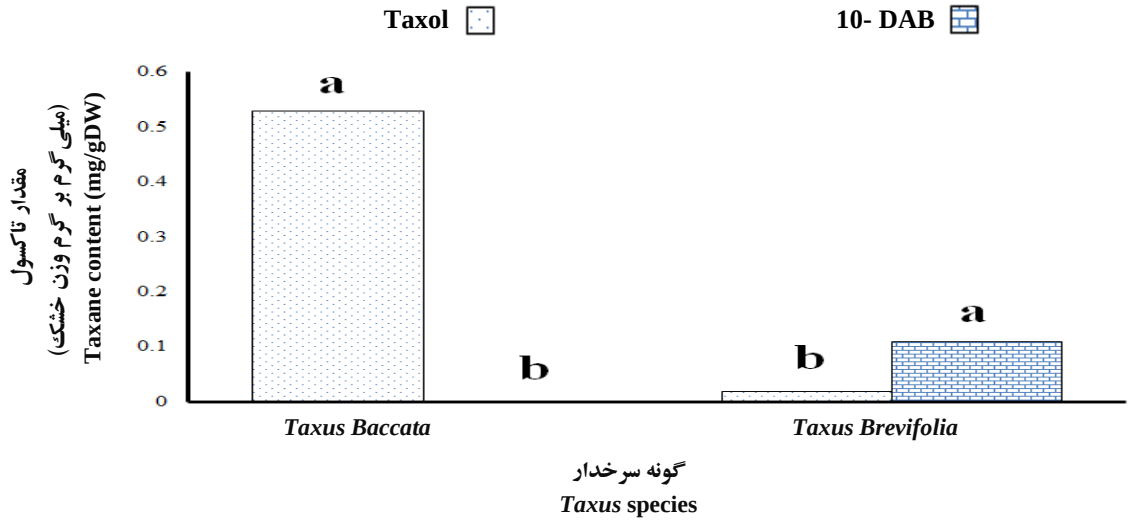


شکل ٤- سلول‌های رنگ‌آمیزی شده دو گونه سرخدار در زیر میکروسکوپ (با بزرگنمایی ۱۰) به منظور بررسی زنده‌مانی. A سرخدار اقیانوس آرام B سرخدار بومی ایران

Figure 4. Stained cells of two yew species under the microscope (10 X) in order to viability estimation, A *T.brevifolia* and B *T.baccata*

مقدار تاکسان‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار

نتایج آنالیز تاکسان‌های کشت سوسپانسیون سلولی نشان داد که مقدار تاکسول، در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار بومی ایران ۲۶ برابر بیشتر از سرخدار اقیانوس آرام بود (شکل ۵) که این نتایج نشان می‌دهد جهت تولید صنعتی تاکسول به روش کشت سوسپانسیون سلولی می‌توان از سرخدار بومی ایران استفاده کرد. اما مقدار ۱۰-دِ استیل باکاتین III در گونه سرخدار اقیانوس آرام بیشتر بود که این نتایج شاهدی بر این مطلب است که این ترکیب از ترکیبات حد واسط سنتز تاکسول می‌باشد؛ چرا که با افزایش درصد زنده‌مانی سلول، مقدار تولید تاکسول کاهش می‌یابد که این مشاهدات با دیگر نتایج به دست آمده در این ضمینه مطابقت داشت (Kevin and Rodney, 2001). همچنین نتایج کشت سوسپانسون سلولی نشان می‌دهد ترکیب ۱۰-دِ استیل باکاتین III از درجه سمیت کمتری برای سلول برخوردار است (Fornale *et al*., 2002). به همین دلیل درصد زنده‌مانی سلول‌های سرخدار اقیانوس آرام بیشتر مشاهده شد.



شکل ۵- مقایسه میانگین مقدار تولیدشده تاکسان‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار
(مطابق با آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند)

Figure 5. Mean comparison the taxans in cell suspension cultures of two yew species
(Means with different letters are significantly different at p≤ 0.01 according to the Duncan's Multiple Range Test)

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که دلیل افزایش مرگ سلول‌ها در مراحل پایانی کشت سوسپانسیون سلولی به دلیل افزایش مقدار تاکسول می‌باشد؛ چرا که مقدار تاکسول با زنده‌مانی سلول رابطه عکس داشته و با افزایش تولید این ترکیب و افزایش سمیت برای سلول‌های سرخدار، باعث کاهش زنده‌مانی و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود نتایج مرتبط در این تحقیق با نتایج گزارش شده مطابقت داشت (Cusido *et al*., 1999؛ Li and Tao, 2009).

نتیجه‌گیری

با توجه به نیاز کشور به داروی ضدسرطان تاکسول و تاکسوتر و محدودیت استفاده از منابع طبیعی و کشت و کار درخت سرخدار باید در مورد تولید از طریق کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار مطالعات گسترده‌ای صورت گیرد. نتایج به دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی دو گونه سرخدار مورد مطالعه که در شرایط کاملاً یکسان کشت شده بودند حاکی از این است که سرخدار بومی ایران پتانسیل بالاتری از لحاظ ژنتیکی برای تولید تاکسول و سرخدار اقیانوس آرام جهت تولید ترکیب ۱۰-دِ استیل باکاتین III در کشت درون شیشه‌ای دارا می‌باشند. همچنین اگر جهت تولید تاکسان‌ها کشت درخت مدنظر باشد سرخدار بومی ایران پتانسیل بالاتری جهت تولید دو ترکیب مورد نظر دارا می‌باشد.

تشکر و قدر دانی

بودجه و امکانات این تحقیق توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی تأمین شده است که بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر خود را ابراز می‌دارند. این مقاله بخشی از پایان‌نامه آقای حمید احدی است.

References

Bedi, Y., Ogra, R., Koul, K., Kaul, B. and Kapil, R. (1996). Yew (*Taxus* spp.) A new look on utilization, cultivation and conservation. Supplement to cultivation and utilization of medicinal plants. Jammu-Tawi: Regional Research Laboratory.

Brunakova, K., Babincova, Z., Takac, M. and Cellarova, E. (2004). Selection of callus

cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. Engineering in Life Sciences. 4(5), 465-469.

Cusido, R.M., Palazon, J., Navia-Osorio, A., Mallol, A., Bonfill, M., Morales, C. and Pinol, M.T. (1999). Production of Taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. Plant Science, 146(2), 101-107.

Fornale, S., Degli Esposti, D., Navia-Osorio, A., Cusidò, R. M., Palazon, J., Pinol, M. T. and Bagni, N. (2002). Taxol transport in *Taxus baccata* cell suspension cultures. Plant Physiology and Biochemistry, 40(1), 81-88.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50(1), 151-158.

Ghassempour, A., Rezadoost, H., Ahmadi, M. and Aboul-Enein, H.Y. (2009). Seasons study of four important taxanes and purification of 10-deacetylbaccatin III from the needles of *Taxus baccata* L. by two-dimensional liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 32(10), 1434-1447.

Green, F. J. (1990). The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators. . USA: Milwaukee, Aldrich Chemical Company Library.

Itokawa, H. and Lee, K. H. (2003) *Taxus*: The genus of *Taxus*. London: Taylor and Francis.

Kevin, W. and Rodney, C. (2001). Taxol biosynthetic genes. Phytochemistry, 58(1), 1-7.

Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. and Omidi, Y. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International, 30(3), 262-269.

Li, Y.C. and Tao, W. Y. (2009). Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. Cell Biology International, 33(1), 106-112.

Nemeth-Kiss, V., Esther, F. and Tibor Cserh, G. (1995). Taxol content of various Taxus species in Hungary. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14(8), 997-1001.

Nicolau, K. C., Yang, Z. and Liu, J. J. (1994). Total synthesis of taxol. Nature Biotechnology, 367(64), 630-634.

Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R. M., Goossens, A. and Palazon, J. (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in Taxus media cell cultures than methyl jasmonate. Plant physiology, 170(2), 211-219.

Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfill, M., Morales, C. and Pinol, M. T. (2003). Inhibition of paclitaxel and baccatinIII accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. Biotechnology, 101(2), 157-163.

Schippmann, U. (2001). Medicinal plants significant trade study. Germany: German Federal Agency for Nature Conservation Bonn.

Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. and Bignami, G. (1995). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. Journal of Natural Products, 58(9), 1315-1324.

Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 87, 1-23.

Vongpaseuth, K. and Roberts, S. C. (2007). Advancements in the understanding of Paclitaxel metabolism in tissue culture. Current Pharmaceutical Biotechnology, 8(4), 219-236.

Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. and McPhail, A. (1971). The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agentfrom *Taxus brevifolia*. American Chemical Society, 93(9), 23-25.

Zhong, J. J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(6), 591-599.

Quantification of Taxol and 10-Deacetyl Baccatin III in the Leaf and Cell Suspension Cultures of Two *Taxus* L. Species

H. Ahadi[1], M.H. Mirjalili[2]*, M. Farzaneh[3] and H. Rezadoost[4]

1- M.Sc. Graduate of Medicinal and Aromatic Plants, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran (m-mirjalili@sbu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran

Received: 29 January, 2017 Accepted: 5 July, 2017

Abstract

Background and Objectives

Taxanes are a family of diterpene alkaloids which is currently known as the most important anticancer compounds to suppress and inhibit cell growth, differentiation and proliferation in indefinitely known cancer cell lines. The most well recognized member of the taxane family is taxol (paclitaxel), a minor cytotoxic component derived originally from yew bark (*Taxus brevifolia*). 10-Deacetylbaccatin III (10-DAB), which is a homolog of taxol, can be extracted at high yields from the needles of *Taxus baccata* and is currently considered the most appropriate precursor for semi-synthesizing taxol and its analogue, taxotere (docetaxel). The natural source of both compounds is the inner bark and needles of several *Taxus* species, especially *T. baccata* and *T. brevifolia*. Plant cell culture is an environmentally sustainable source of taxol and offers several advantages as it is not subjected to weather, season or contamination. The aim of the present study was to evaluate taxol and 10-DAB content of two *Taxus* species and their ability in production of both taxanes through cell culture.

Materials and Methods

The plant materials of *T. baccata* and *T. berevifolia* were collected from Shahid Beheshti University (35° 48' N, 51° 23' E at an altitude of 1785 m) and botanical garden of Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj (35° 48' N, 50° 59' E at an altitude of 1238 m), respectively. Callus culture of both species was initiated from internodal segments on B5 medium supplemented with plant growth reaulators. Cell suspension culture was established on the medium supplemented with 2.0 mg L^{-1} naphtalene acetic acid (NAA) and 0.1 mg L^{-1} benzyl amino purine (BAP). Cell viability was determined by Evan's blue staining test. After 21 days, the amount of taxol and 10-DAB was analysed by HPLC.

Results

The results showed that mother stocks of *T. baccata* and *T. brevifolia* contain 45 and 27 µg/g DW of taxol and 40 and 4 µg/g DW of 10-DAB, respectively. Cell growth was estimated by measuring fresh weight (FW) and dry weight (DW). Results showed that the maximum growth was reached after 21 days of cultivation. Cell cultures of *T. baccata* and *T. brevifolia* produced 540 and 20 µg/l taxol and 1 and 110 µg/l of 10-DAB, respectively. Taxol production in *T. baccata* cell culture was 26-fold higher than in *T. berevifolia* cell culture.

Discussion

As far as our literature survey could ascertain, growth and taxol production in *T. baccata* cell cultures have previously been reported. Although, *T. baccata* cells are more potent for the production of taxol, *T. brevifolia* cell culture can be considered for the production of 10-DAB, a homolog of taxol, as an appropriate precursor for semi-synthesizing taxol and its analogue, taxotere (docetaxel). However, it is essential to study and quantify the effect of selected key medium components on growth as well as product accumulation and strike a balance between the two to enhance the yield and productivity.

Keywords: Anticancer, In vitro culture, Liquid chromatography, Taxane