جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره دوازدهم، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۸۳-۸۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۹/۰۹

بررسی تأثیر نوع محیط‌کشت پایه بر تولید داروی ضد سرطان تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار (*Taxus baccata* L.)

ابوالقاسم عباسی کجانی [۱]، محمدرضا مفید [۲*] و محمود اطرشی [۱]
[۱] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، ایران
[۲] گروه بیوشیمی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

تاکسول یکی از مهم‌ترین داروهای ضد سرطان حال حاضر جهان است که از جنس سرخدار (*Taxus* sp.) به دست می‌آید. امروزه کشت سلولی از مهم‌ترین روش‌های تولید تاکسول در دنیا محسوب می‌شود. در این رابطه، تعیین ترکیب بهینه محیط‌کشت برای دستیابی به بیشینه رشد سلول‌ها و تولید محصول از اهمّیت ویژه‌ای برخوردار است. این تحقیق به منظور بررسی و تعیین بهترین محیط‌کشت پایه برای تولید تاکسول از کشت سلولی سرخدار اجرا شد. بدین منظور از چهار محیط‌کشت پایه شامل WPM، B5، MS و SH که همگی حاوی ترکیب هورمونی یکسان شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین (Kinetin) هستند، استفاده شد و میزان تاکسول تولیدی در طول یک دوره ۲۱ روزه، با استفاده از دستگاه HPLC بررسی گردید. از نظر میزان کل تاکسول تولیدی، اختلاف بارزی بین محیط‌های مختلف مشاهده شد و بیشترین مقدار این ترکیب از محیط پایه WPM به میزان ۱۶/۵۸ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. پس از آن، محیط‌های MS، B5 و SH به ترتیب با میزان تولید ۸/۶۶، ۶/۴۲ و ۵/۸۲ میلی‌گرم در لیتر قرار داشتند. از نظر میزان تاکسول ترشح شده به محیط‌کشت نیز تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های مختلف مشاهده شد و محیط‌های WPM، B5، SH و MS به ترتیب ۷/۶۸، ۴/۲۸، ۳/۵۹ و ۳/۳۱ میلی‌گرم در لیتر تاکسول تولیدی را به محیط‌کشت ترشح کردند که این میزان به ترتیب ۴۶، ۶۷، ۶۲ و ۳۸ درصد از کل تاکسول تولیدی را شامل می‌شود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نوع محیط‌کشت پایه، نه تنها بر میزان تولید این متابولیت مؤثر است، بلکه بر میزان ترشح آن از سلول‌ها نیز تأثیر درخور توجهی دارد.

واژه‌های کلیدی: تاکسول، سرخدار (*Taxus* sp.)، کشت سلولی، محیط‌کشت پایه

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mofid@pharm.mui.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۱۷۹۲۲۵۹۷

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

تاکسول را می‌توان مهم‌ترین داروی ضدسرطان دانست که تاکنون شناسایی شده است (Abbasi Kajani *et al.*, 2010). این ماده یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است که به گروهی از دی‌ترپن‌ها به نام تاکسان تعلق دارد (Frense, 2007). به علت محتوای بسیار پایین تاکسول در بافت‌های گیاهی سرخدار و نیز رشد بسیار کم این گیاه، تأمین نیاز درمانی به این دارو مهم‌ترین مسأله پیش روی دانشمندان است. به نظر می‌رسد که کشت سلولی سرخدار یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای تولید بلند مدت و پایدار تاکسول باشد (Zhong, 2002). رسیدن به سطح تجاری تولید برای هر محصول ثانویه گیاهی، به اقتصاد فرآیند تولید آن بستگی دارد و این به نوبه خود به قابلیت تولید وابسته است. قابلیت تولید بالا منوط به حصول بالاترین قابلیت تولید بیوماس گیاهی و نیز متابولیت هدف است. اولین گام برای رسیدن به این منظور، رشد سلول‌ها در محیطی مناسب است که ضمن تأمین شرایط رشد مطلوب، بالاترین سطح تولید را نیز داشته باشد (Dornenburg and Knorr, 1997). به علت اهمّیت بالای این دارو، تاکنون آزمایش‌های نسبتاً زیادی در زمینه کشت بافت سرخدار انجام شده است. در زمینه منبع ریزنمونه برای تولید کالوس سرخدار، مشخص شده که در بین پوست، شاخه، آریل سبز و قرمز، اجزای دانه، ساقه‌های جوان و برگ‌ها، بهترین منبع ساقه‌ها هستند (Hien *et al.*, 2004; Zhong, 2002). در اکثر گزارش‌ها بهترین محیط پایه برای تکثیر سلول‌ها، محیط B5 ذکر شده است و عموماً از 2,4-D در ترکیب با سایر تنظیم‌کننده‌های رشدی برای القا کالوس استفاده می‌شود (Gibson *et al.*, 1993; Frense, 2007). نکته درخور توجه دیگر، ترکیب بهینه محیط کشت برای بیشینه تولید متابولیت هدف است. به طور معمول، شرایط بهینه برای رشد سلول‌ها با شرایط بهینه برای تولید متابولیت‌ها متفاوت است و نیاز به بررسی دقیق دارد. یکی از عوامل مهم در این رابطه، ترکیب و غلظت عناصر غذایی محیط کشت است که نه تنها می‌تواند بر رشد سلول‌ها اثر گذارد، بلکه بر تولید متابولیت‌های ثانویه نیز می‌تواند مؤثر باشد. در بین گزارش‌های منتشر شده در مورد کشت سلولی سرخدار با توجه به اهمّیت تجاری موضوع، گزارش خاصی در مورد مطالعه و تعیین بهترین محیط کشت پایه به منظور دستیابی به بیشینه میزان محصول دیده نمی‌شود و بیشتر مقایسه ترکیبات دیگر از جمله ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی و الیسیتورها گزارش شده است. در این تحقیق، برخی از مهم‌ترین و متداول‌ترین محیط‌های کشت پایه که در کشت سلولی سرخدار نیز بیشتر استفاده شده‌اند، از نظر میزان تولید تاکسول درون‌سلولی و برون‌سلولی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مرحله آماده‌سازی نمونه و کشت سلول

نمونه‌های گیاهی مورد نیاز در این آزمایش از درختچه موجود در باغ گل‌های اصفهان تهیه گردید. بدین منظور از شاخه‌های جوان و سالم گیاه که فاقد علایم بیماری و کمبود بودند، نمونه‌برداری انجام شد. به منظور سترون‌کردن نمونه‌ها، از روشی که در تحقیقات پیشین تعیین شده بود، استفاده گردید (Abbasi Kajani *et al.*, 2010). بدین منظور ابتدا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ساقه‌های جوان گیاه جداسازی و به خوبی با آب شستشو شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از آن، برای ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵، قرار گرفتند. در نهایت پیش از کشت و در زیر هود لامینار، ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند تا بقایای عوامل ضدعفونی کننده، به طور کامل حذف شوند. ریزنمونه‌های سترون‌شده در زیر هود لامینار به قطعاتی به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند و در محیط‌کشت جامد B5 حاوی ترکیب هورمونی ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-دی‌کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین کشت و برای القای کالوس، در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از القا و رشد اولیه کالوس‌ها در طول ماه اول، نمونه‌ها برای تکمیل دوره رشدی خود و تهیه بافت کالوسی یکنواخت، برای چندین دوره یک‌ماهه دیگر نیز در محیط‌کشت تازه با ترکیبات مشابه قبل، واکشت گردیدند. در نهایت، سلول‌های کالوس یکنواخت انتخاب و در آزمایش‌های بعدی برای تولید تاکسول از کشت سوسپانسیون استفاده شدند. برای تهیه کشت سوسپانسیون، از ۴ محیط‌کشت پایه شامل WPM، B5، MS و SH که همگی حاوی ترکیب هورمونی مشابه مرحله کالوس‌زایی بودند، استفاده شد. بدین منظور، ۲/۰ میلی‌گرم از سلول‌های کالوسی سفید، تُرد و یکنواخت به هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع بود، اضافه شد و محیط‌های کشت مزبور برای یک دوره کشت ۲۱ روزه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد روی شیکر با سرعت ۱۱۰ rpm قرار گرفتند.

استخراج تاکسول از سلول‌ها و محیط‌کشت

پس از پایان دوره کشت، سلول‌ها و محیط‌کشت با استفاده از روش فیلتراسیون و عبور دادن از کاغذ صافی، به طور کامل از یکدیگر جدا شدند و سپس میزان تاکسول موجود در هر بخش (درون‌سلولی و برون‌سلولی) به طور جداگانه تعیین شد. استخراج تاکسول از سلول‌ها و محیط‌کشت با استفاده از روشی که قبلاً توسط Abbasi Kajani و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده بود، انجام شد. برای استخراج محتوای تاکسول موجود در محیط‌های کشت، ابتدا هر محیط‌کشت با حجم برابری از متیلن کلراید مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر تکان داده شد تا فاز آلی و محیط‌کشت به طور کامل از هم تفکیک شوند. سپس فاز آلی (متیلن کلراید) که حاوی تاکسول بود، از محیط‌کشت جدا گردید و در دستگاه تقطیر تحت شرایط خلأ و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده با یک میلی‌لیتر متانول مخلوط گردید و از فیلتر ۰/۲ µm عبور داده شد. سپس نمونه فیلترشده حاصل برای اندازه‌گیری میزان تاکسول با دستگاه HPLC استفاده شد. برای استخراج تاکسول موجود در سلول‌ها، ابتدا کل سلول‌های موجود در هر محیط‌کشت به طور جداگانه درون آون تهویه‌دار در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت به طور کامل خشک و سپس توسط آسیاب، به پودر تبدیل شد. پودر حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط و درون لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک به طور کامل لیز شد. عصاره حاصل در دستگاه تقطیر تحت شرایط خلأ و دمای ۵۰ درجه

سانتیگراد تغلیظ شد و کارامل باقیمانده در یک میلی‌لیتر متانول حل گردید و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ µm، برای اندازه‌گیری میزان تاکسول با دستگاه HPLC استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای تاکسول موجود در نمونه‌ها

برای شناسایی و تعیین میزان تاکسول موجود در هر نمونه از روش HPLC reverse phase (Sykam, Germany) و ستون Kromasil C18, 250 mm×4.6 mm استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌هایی که در مرحله قبل تهیه شده بود، به ستون تزریق شد. فاز متحرک شامل ترکیب متانول و آب به نسبت ۷۰ به ۳۰ بود که با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور می‌کرد. میزان تاکسول هر نمونه، تحت اشعه UV با طول موج ۲۲۷ نانومتر و به کمک استاندارد تاکسول شرکت Calbiochem (San Diego, CA) اندازه‌گیری شد. میزان تاکسول درون‌سلولی و برون‌سلولی بر اساس مساحت پیک جذب UV در طول موج ۲۲۷ نانومتر مشخص شد. میزان کل تاکسول تولیدی از حاصل جمع تاکسول درون‌سلولی و برون‌سلولی محاسبه شد. درصد تاکسول برون‌سلولی نیز از تقسیم میزان تاکسول برون‌سلولی بر میزان کل تاکسول تولیدی بر حسب درصد تعیین گردید.

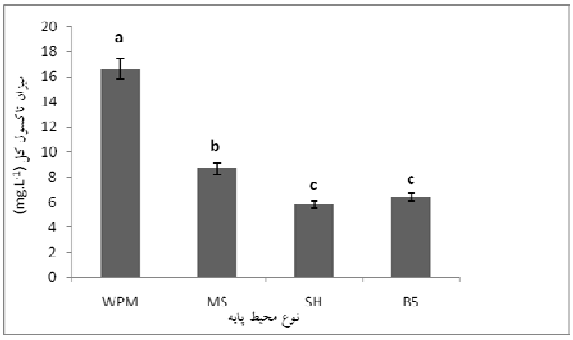
مطالعات آماری

این آزمایش به صورت طرح پایهٔ کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. به منظور بررسی داده‌های اندازه‌گیری شده، تحلیل‌های آماری با کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۶ صورت گرفت و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ صورت گرفت.

نتایج

میزان کل تاکسول تولیدی

نتایج (شکل ۱) نشان داد که بین محیط‌های مختلف از نظر مقدار کل تاکسول تولیدی (درون‌سلولی+ برون‌سلولی) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار از محیط‌کشت حاوی محیط پایه WPM به مقدار ۱۶/۵۸ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که اختلاف زیادی با محیط‌های دیگر دارد و حدود ۲ برابر بیشتر از محیط MS است. بنابراین، نتایج پژوهش حاضر این نظریه را که ترکیب و غلظت عناصر غذایی ماکرو و میکرو بر تولید تاکسول و به عبارتی متابولیت‌های ثانویه مؤثر است به خوبی تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که محیط پایه WPM برای دستیابی به بیشینه تولید تاکسول مناسب‌تر است. پس از محیط‌کشت یاد شده، محیط‌های کشتی که توسط محیط پایه MS تهیه شده بودند با تولید ۸/۶۶ میلی‌گرم تاکسول در لیتر محیط‌کشت، بیشترین مقدار تولید را داشتند و محیط‌کشت‌های حاوی محیط‌های پایه B5 و SH به ترتیب با تولید ۶/۴۲ و ۵/۸۲ میلی‌گرم تاکسول در هر لیتر کشت، کمترین میزان تولید را به خود اختصاص دادند (شکل ۱).



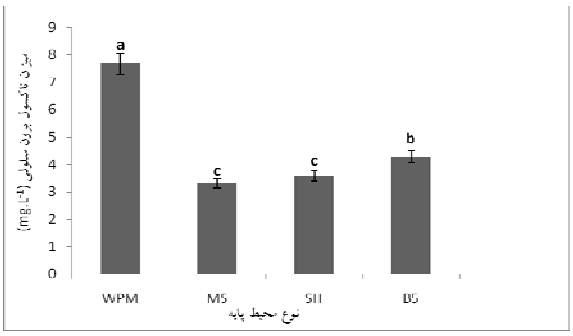
شکل ۱- میزان تاکسول کل تولیدی در محیط‌های پایه مختلف ($mg.L^{-1}$). مقادیر، میانگین ۳ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ است.

میزان تاکسول برون‌سلولی

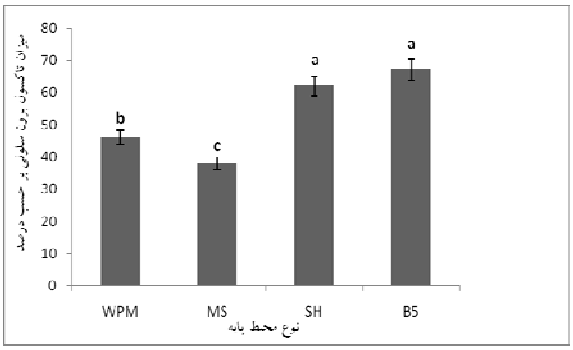
نتایج (شکل‌های ۲ و ۳) نشان می‌دهد که بین محیط‌های پایه مختلف از لحاظ میزان تاکسول برون‌سلولی نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد، بیشترین میزان به محیط‌کشت WPM به مقدار ۷/۶۸ میلی‌گرم در لیتر مربوط بود. با توجه به اینکه این مقدار ۴۶ درصد از کل تولید در این محیط را شامل می‌شود، می‌توان بالا بودن میزان تاکسول برون‌سلولی را به بالا بودن میزان تولید کل در این محیط نسبت داد. محیط B5 هرچند با میزان ۴/۲۸ میلی‌گرم در لیتر تاکسول برون‌سلولی، رتبه دوم را به خود اختصاص داد، ولی این مقدار ۶۷ درصد از کل تولید در این محیط را شامل می‌شود. بنابراین، می‌توان گفت محیط B5 شرایط مناسب‌تری را برای خروج تاکسول از سلول‌ها فراهم کرده است. پس از آن، محیط‌های SH و MS به ترتیب با ۳/۵۹ و ۳/۳۱ میلی‌گرم تاکسول در لیتر محیط‌کشت، کمترین مقادیر تاکسول خارج سلولی را داشتند که این مقادیر به ترتیب ۶۲ و ۳۸ درصد از کل تاکسول تولیدی در محیط‌های یاد شده است. نتایج نشان می‌دهد که هرچند محیط MS میزان تولید کل درخور توجهی دارد، ولی بخش کمی از تاکسول تولیدی (۳۸ درصد) به محیط‌کشت ترشح شده است. بنابراین در کل، این محیط برای کشت پیوسته و استحصال متابولیت هدف از محیط‌کشت، مناسب نیست.

میزان تاکسول درون‌سلولی

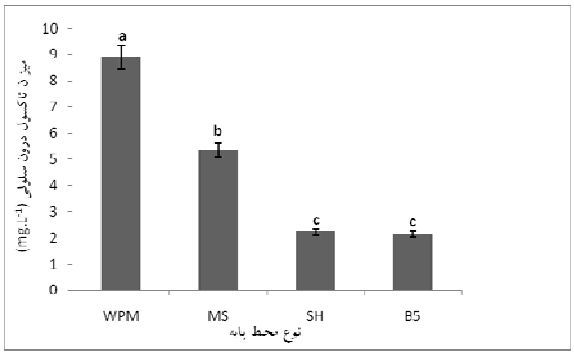
متوسط میزان تاکسول موجود درون سلول‌ها در محیط‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که بین محیط‌های مختلف، از نظر تاکسول درون‌سلولی نیز تفاوت درخور توجهی دیده می‌شود. بیشترین مقدار، به میزان ۸/۹ میلی‌گرم در لیتر، از سلول‌هایی که در محیط WPM رشد کرده بودند، به دست آمد. با توجه به اینکه میزان تولید کل در این محیط بیشتر است، انتظار می‌رود که محتوای تاکسول درون‌سلولی نیز در این محیط بیشتر باشد. این مقدار به طور درخور توجهی (۱/۶۷ برابر) بیشتر از محیط MS است که با ۵/۳۵ میلی‌گرم تاکسول درون‌سلولی در لیتر محیط‌کشت، در رتبه دوم قرار دارد. میزان تاکسول درون سلولی در محیط‌های SH و B5 به ترتیب ۲/۲۳ و ۲/۱۴ میلی‌گرم بر لیتر بود که به مراتب کمتر از دو محیط دیگر است.



شکل ۲- میزان تاکسول برون‌سلولی در محیط‌های پایه مختلف ($mg.L^{-1}$). مقادیر، میانگین ۳ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ است.



شکل ۳- میزان تاکسول برون‌سلولی در محیط‌های پایه مختلف (بر حسب درصد). مقادیر، میانگین ۳ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ است.



شکل ۴- میزان تاکسول درون‌سلولی در محیط‌های پایه مختلف ($mg.L^{-1}$). مقادیر، میانگین ۳ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ است

بحث

میزان کل تاکسول تولیدی

تأثیر عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف بر رشد و نمو سلول‌ها کاملاً واضح و اثبات شده است. بنابراین، می‌توان گفت که این ترکیبات به طور غیر مستقیم و با تأثیر بر قابلیت زیست سلول‌ها می‌توانند بر میزان تولید محصولات متابولیتی سلول مؤثر باشند. از طرف دیگر بسیاری از این عناصر از جمله پتاسیم، کلسیم، منیزیم، و نیز اغلب عناصر کم‌مصرف، در ساخت متابولیت‌ها، اجزای سلول و همچنین، فعالیت آنزیم‌ها دخالت دارند و از این طریق می‌توانند بر تولید و ترشح ترکیبات از سلول تأثیر داشته باشند. ویتامین‌های موجود در محیط‌کشت نیز نه تنها بر رشد و نمو سلول‌ها اثر دارند، بلکه به عنوان کاتالیزور در فرآیندهای متابولیکی به کار می‌روند. با توجه به اینکه سرخدار گیاهی چوبی است، به نظر می‌رسد محیط‌های کشت پایه‌ای مثل محیط WPM که بیشتر اختصاصی درختان چوبی هستند، می‌توانند شرایط مناسب‌تری را برای رشد سلول‌های این گیاهان فراهم کنند. با این حال، تحقیقات بیشتر و جامع‌تر می‌تواند در دستیابی به محیط‌های ویژه و کارآمدتر، مفید باشد. بررسی نوع و غلظت عناصر غذایی در محیط‌های کشت مورد استفاده نشان می‌دهد که محیط WPM نسبت به محیط‌های پایه دیگر حاوی مقادیر بالایی پتاسیم به شکل K_2S0_4 و نیز مقادیر درخور توجه نیترات آمونیوم [$(NH_4)NO_3$] است که شاید به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر مسیر متابولیکی تاکسول و سنتز آن مؤثر باشند. محیط پایه MS نیز به طور مشابه حاوی مقادیر بالایی نیترات آمونیوم است. به هر حال، قضاوت در مورد عوامل مؤثر در میزان تولید بیشتر تاکسول در محیط‌های یاد شده نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. ضمن اینکه بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هر یک از ترکیبات محیط بر تولید تاکسول به طور جداگانه می‌تواند اطلاعات بیشتری را فراهم کند.

میزان تاکسول برون‌سلولی

ترشح مؤثر محصول به محیط‌کشت، یکی از الزامات کشت پیوسته است و در سیستم‌های کشت انبوه و پیوسته برای تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه، استخراج و خالص‌سازی بخش برون‌سلولی محصولات آسان‌تر بوده، نیازمند امکانات و هزینه‌های کمتری است. از آن‌جا که در سیستم‌های کشت پیوسته و به منظور ادامه فرآیند تولید ضروری است که سلول‌ها زنده بمانند، بنابراین خروج بیشتر تاکسول از سلول‌ها در این سیستم‌های کشت، ضمن افزایش راندمان تولید می‌تواند به افزایش ماندگاری سلول‌ها نیز کمک کند. بنابراین، در تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت سلولی سعی می‌شود به روش‌های مختلف میزان خروج محصولات از سلول را افزایش داد. این کار بیشتر به

کمک محرک‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی انجام می‌شود که ضمن نیاز به صرف زمان و هزینه معمولاً آثار زیان‌آوری نیز بر قابلیت حیات سلول‌ها دارد. از این رو، اگر بتوان با تغییر غلظت و نوع ترکیبات غذایی موجود در محیط‌کشت به این هدف نایل شد، می‌توان به سادگی کارایی تولید را افزایش داد. لذا محیط‌کشت مناسب برای تولید متابولیت‌ها محیطی است که ضمن دارا بودن بیشینه تولید، بیشترین میزان ترشح محصولات به محیط را نیز باعث شود. در مورد تولید و ترشح تاکسول از کشت سلولی سرخدار، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. برخی گزارش‌ها به ترشح بیش از ۹۰ درصد از تاکسول تولیدی به محیط‌کشت اشاره کرده (Srinivasan *et al.*, 1995; Hirasuna *et al.*, 1996) و برخی دیگر تاکسول را ماده‌ای درون‌سلولی دانسته‌اند (Wickremesinhe and Arteca, 1994). به طور کلی می‌توان گفت که به غیر از شرایط محیط‌کشت، ژنوتیپ گیاه نیز ممکن است بر میزان ترشح تاکسول به محیط‌کشت اثر داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نوع و غلظت ترکیبات غذایی موجود در محیط‌کشت، نه تنها در میزان تولید، بلکه بر ترشح تاکسول از سلول‌ها نیز اثر قابل ملاحظه‌ای دارد. محیط‌های پایه B5 و SH به ترتیب ۶۷ و ۶۲ درصد از کل تاکسول تولیدی خود را به محیط‌کشت ترشح کردند که تفاوت قابل ملاحظه‌ای با دو محیط دیگر دارد. بررسی ترکیبات محیط‌های کشت نشان می‌دهد که تفاوت بارز محیط‌های B5 و SH با دو محیط دیگر از لحاظ مقدار ویتامین‌های آنها به ویژه تیامین است. تیامین نقشی کلیدی به عنوان کوفاکتور در مسیرهای متابولیکی اصلی گیاه مثل گلیکولیز، مسیر پنتوز فسفات، و چرخه تری کربوکسیلیک اسید ایفا می‌کند. همچنین، مشخص شده است که این ویتامین نقش کوفاکتور را نیز در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان دارد (Goyer, 2010). بنابراین، ممکن است به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر تولید و انتقال تاکسول اثر داشته باشد. به هر حال، به مطالعه بیشتر به خصوص بر مکانیسم دقیق ورود و خروج تاکسول از سلول و نیز تأثیر غلظت عناصر فعال در غشا همچون کلسیم نیاز است تا بتوان اطلاعات دقیق‌تری در این رابطه ارایه کرد.

میزان تاکسول درون‌سلولی

با توجه به اینکه در کشت پیوسته سلول‌ها کمتر برای استخراج محصول متابولیکی استفاده می‌شوند، لذا میزان محصول درون‌سلولی اهمّیت چندانی ندارد، ولی با توجه به اثر منفی تاکسول بر رشد و حیات سلول‌ها (Fornale *et al.*, 2002) بالا بودن میزان تاکسول درون‌سلولی در بلند مدت می‌تواند ضمن اثر بر قابلیت زیست سلول‌ها، در ایجاد اثر بازخورد منفی نیز مؤثر بوده، در نتیجه بر فرآیند تولید آن اثر منفی بگذارد. بنابراین، فراهم کردن شرایطی که باعث کاهش هرچه بیشتر ماندگاری تاکسول در سلول شود می‌تواند بر کارآیی تولید اثر مثبت داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان تاکسول درون‌سلولی تقریباً ارتباط مستقیمی با میزان تولید کل دارد. به طور کلی، با افزایش میزان تولید کل، محتوای تاکسول درون‌سلولی نیز افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد، استفاده از راه‌کارهایی برای تسهیل خروج محصولات از سلول در محیط‌های با میزان تولید بالا، می‌تواند به حصول بیشینه بهره‌وری منتج شود.

جمع‌بندی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع محیط کشت پایه یا به عبارت دیگر نوع و غلظت عناصر غذایی می‌تواند بر میزان تولید تاکسول اثر در خور توجهی داشته باشد. علاوه بر آن، می‌تواند بر میزان ترشح و مبادله محصولات از غشای سلول نیز مؤثر باشد. بنابر نتایج حاصل، بیشترین میزان تولید تاکسول و نیز تاکسول برون‌سلولی از محیط کشت پایه WPM به دست می‌آید و مطالعات بیشتر بر ترکیبات این محیط کشت می‌تواند به افزایش تولید تاکسول و نیز خروج آن از سلول منجر شود.

منابع

Abbasi Kajani, A., Mofid, M. R., Abolfazli, K. and Hosseini Tafreshi, S. A. (2010) Encapsulated activated charcoal as a potent agent for improving taxane synthesis and recovery from cultures. Biotechnology and Applied Biochemistry 56: 71-76.

Abbasi Kejani, A., Hosseini Tafreshi, S. A., Khayyam Nekouei, S. M. and Mofid, M. R. (2010) Efficient isolation of high quality nucleic acids from different tissues of *Taxus baccata* L. Molecular Biology Reports 37(2): 797-800.

Dornenburg, H. and Knorr, D. (1997) Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Food Technology 51: 47-54.

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

Frense, D. (2007) Taxanes: perspectives for biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1233-1240.

Gibson, D. M., Ketchum, R. E. B., Vance, N. C. and Christen, A. A. (1993) Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific Yew). Plant Cell Reports 12: 479-482.

Goyer, A. (2010) Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. Phytochemistry 71: 1615-1624.

Hien, N. T., Khiem, D. V., Vu, N. H., Don, N. T. and Nhut, D. T. (2004) Primary study on the induction and growth of *Taxus wallichiana* Zucc., a valuable medicinal plant in Lam Dong Province. Journal of Agriculture Sciences and Technology 4: 79-85.

Hirasuna, T. J., Pestchanker, L. J., Srinivasan, V. and Shuler, M. L. (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. Plant Cell Tissue Organ Culture 44: 95-102.

Srinivasan, V., Pestchanker, L., Moser, S., Hirasuna, T. J., Taticek, R. A. and Shuler, M. L. (1995) Taxol-production in bioreactors: kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake and taxol production by cell suspension of *Taxus baccata*. Biotechnology Bioengineering 47: 666-676.

Wickremesinhe, E. R. M. and Arteca, R. (1994) *Taxus* cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol. Journal of Plant Physiology 44: 183-188.

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

Investigation of the effects of basal medium type on the production of anti-cancer drug Taxol from cell culture of *Taxus baccata* L.

Abolghasem Abbasi Kajani [1], Mohammad Reza Mofid [2]* and Mahmoud Otroshy [1]

[1] Agricultural Biotechnology Research Institute-Central region of Iran (ABRICI), Isfahan, Iran
[2] Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Taxol is one of the most important anti-cancer drugs and is obtained from yew (*Taxus* sp.). Currently, plant cell culture is counted as one of the most important methods to obtain taxol across the world. In this context, determining optimum composition of the medium to acheive maximum growth and productivity is particularly important. This study was carried out to investigate and determine the best basal medium for production of taxol from *taxus* cell culture. For this purpose, four different basal medium including WPM, B5, MS, and SH containing similar hormonal compounds of 2 mg/l NAA, 0.2 mg/l 2,4-D, and 0.2 mg/l Kinetin were tested and the produced taxol during 21 days period were analyzed by HPLC. Significant difference was observed between different mediums with respect to the total amounts of produced taxol. The maximum yield of taxol (16.58 mg/l) was achieved from WPM medium. Afterward, the highest amounts of taxol were 8.66, 6.42 and 5.82 mg/l that were obtained from MS, B5, and SH mediums respectively. Significant difference also was observed between different mediums with respect to the amounts of produced taxol secreted from the cells into mediums that were 7.68, 4.28, 3.59 and 3.31 mg/l taxol respectively for WPM, B5, SH, and MS mediums. These amounts included 46, 67, 62 respectively and 38% of the total volume of produced taxol in the mediums. According to the results, it could be concluded that the basal medium not only affect the taxol yield but significantly affect on the amounts of taxol secreted from the cells.

Key words: Taxol, Yew (*Taxus* sp.), Cell culture, Basal medium

* Corresponding Author: mofid@pharm.mui.ac.ir