

تغییر ترکیب محیط کشت به عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیکی در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *Linum album* Ky. ex Boiss.

منصور افشار محمدیان^{۱*}، فرشاد تشکری^۲ و مظفر شریفی^۳

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، پست الکترونیک: afshar@guilan.ac.ir

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

۳- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱

چکیده

Linum album Ky. ex Boiss. یکی از گونه‌های انحصاری در ایران است که ترکیب‌های لیگنانی مهمی را از جمله پودوفیلوتوکسین (PTOX) تولید می‌کند. این ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان به نام‌های تینپوساید، اتوبوساید و اتوپوفوز می‌باشد. سنتز شیمیایی این ترکیب‌ها بسیار پیچیده است و از نظر تجاری تولید آن مقرون به‌صرفه نیست. در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین از راهبردهای گوناگونی مانند تغییر رژیم غذایی، بکار بردن الیسیتور، مهندسی ژنتیک و غیره استفاده می‌شود. بهینه‌سازی محیط کشت یکی از راهبردهای مهم در افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی است. با توجه به اهمیت زیاد پودوفیلوتوکسین به عنوان ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان، در این تحقیق تأثیر نسبت‌های مختلف آمونیوم و نیترات در محیط کشت بر رشد سلول‌ها و برخی متابولیت‌های ثانویه از جمله تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیت آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) بررسی شد. میزان رشد سلول‌ها در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم نسبت به تیمارهای دیگر افزایش معنی‌داری داشت. بیشترین میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در نمونه کنترل بدست آمد که کمترین میزان وزن تر را داشت و بیشترین مقدار فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیوم به نیترات مشاهده شد. بیشترین میزان سنتز پودوفیلوتوکسین در نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات ایجاد شد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL به ترتیب در سه نمونه ۲:۱ و ۳:۱ نیترات به آمونیوم و ۳:۱ آمونیوم به نیترات ایجاد شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییر ترکیب محیط کشت یک فاکتور مؤثر در افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های *L. album* بود.

واژه‌های کلیدی: نیتروژن، پودوفیلوتوکسین، *Linum album* Ky. ex Boiss.، کشت سلول، ضدسرطان.

مقدمه

مورفولوژیکی، سیتولوژیکی و ویژگی‌های بیوشیمیایی صورت می‌گیرد. پودوفیلوتوکسین (PTOX) یکی از ترکیب‌های لیگنانی است که اولین بار از *Podophyllum peltatum* در سال ۱۸۸۰ جداسازی شد. دو گونه از جنس *Podophyllum* شامل *P. hexandrum* در هند و نپال و

سرد *Linum* از خانواده Linaceae، دارای ۲۳۰ گونه است که در سراسر جهان و در محدوده وسیع و متنوعی از زیستگاه‌ها وجود دارد (Kartal et al., 2004). طبقه‌بندی بین‌گونه‌ای جنس *Linum* از طریق تفاوت‌های

در این تکنیک است. این تغییرات شامل ایجاد تغییر در منبع کربن (سوکروز)، منبع نیتروژن، فیتوهورمون‌ها (کینتین، نفتالن استیک اسید) و اسیدیته محیط می‌باشند. مثلاً تغییر در منبع نیتروژن، هم می‌تواند شامل تغییر در غلظت نیتروژن کل و هم تغییر در نسبت‌های آمونیوم به نیترات در یک غلظت یکسان باشد. کشت گیاهان در شیشه ممکن است چندین مزیت نسبت به جمع‌آوری و کشت گیاهان در مزرعه داشته باشد. در کشت بافت می‌توان متابولیت‌هایی مانند لیگنان‌ها را مستقل از فاکتورهای مثل آب و هوا و شرایط جغرافیایی تولید نمود (Fuss, 2003). همچنین کشت سلول، سیستم تولیدی مشخص با ذخایر مستمر و کیفیت یکنواخت از محصول را ارائه می‌دهد. به‌علاوه اینکه گیاهان تولید شده در سیستم کشت بافت، عاری از هر گونه آلودگی میکروبی و قارچ هستند (Verpoorte et al., 2002).

با توجه به اهمیت قابل‌توجه تولید پودوفیلوتوکسین به‌عنوان ترکیب پیش‌ساز سه نوع داروی مهم ضدسرطان و در عین حال تحقیقات کمی که متأسفانه در این مورد انجام شده است، هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف منابع نیتروژنی در محیط کشت بر رشد سلول‌ها و برخی متابولیت‌های ثانویه از جمله تولید پودوفیلوتوکسین و فعالیت آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در گیاه *L. album* بود.

مواد و روشها

محیط کشت کالوس

برای انجام آزمایش‌های کشت سلول *L. album* از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با هورمون‌های نفتالین استیک اسید ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر و کینتین ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی

بذرهای *L. album* از منطقه سوهانک (N ۳۵° ۴۸' ۱۹، E ۵۱° ۳۲' ۲۲) تهران جمع‌آوری شد و پس از شستشوی سطحی با آب به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم

P. peltatum در آمریکا منبع تجاری پودوفیلوتوکسین هستند (Stahelin & Wartburg, 1991). تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن گیاهانی که دارای محتوی لیگنانی بالا بوده و نیز از سرعت رشد خوبی برخوردار باشند، انجام شد و نشان داده شد که خانواده Linaceae، به‌خصوص گونه‌های *Linum* متعلق به گروه Syllinum از مقدار قابل‌توجهی پودوفیلوتوکسین برخوردارند و احتمالاً منبع مناسبی برای تولید این ترکیب‌ها می‌باشند (Fuss, 2003). پودوفیلوتوکسین در میان لیگنان‌ها به این علت که خود دارای خاصیت سلول‌کشی و ضدویروسی بسیار بالایی است و در درمان تومورها و زگیل‌های تناسلی به صورت موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد و همین‌طور پیش‌ساز برای تولید سه ماده ضدسرطان مهم به‌نام‌های etoposide، teniposide و etopophose (etoposide phosphate) می‌باشد (Yong et al., 2012; Rojas-Sepúlveda et al., 2009). مورد توجه زیادی قرار گرفته است و به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این لیگنان به علت سمیت سلولی بسیار بالایی که از خود نشان می‌دهد، به‌طور مستقیم و سیستمیک استفاده نمی‌شود، زیرا باعث مرگ ارگانسیم زنده می‌شود، به همین دلیل مشتقات آن تغییر در رژیم غذایی به‌عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیکی در افزایش سنتز پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *L. album* مورد استفاده قرار می‌گیرند که در درمان سرطان‌های ریه، تخمدان و تومورهای مغزی مصرف می‌شوند (Kumar et al., 2011). برخلاف پودوفیلوتوکسین که از طریق اتصال به دایمرهای توبولینی و تشکیل کمپلکس پودوفیلوتوکسین-دایمر توبولین باعث جلوگیری از پلیمریزاسیون دایمرهای آلفا و بتا و تخریب اسکلت سلولی می‌شود، ترکیب‌های ضدسرطانی مشتق از آن با اتصال به آنزیم توپوایزومراز II مانع از باز شدن پیچ DNA و جلوگیری از همانندسازی مولکول DNA می‌شوند (Farkya et al., 2004). مهندسی مسیرهای متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول به‌وسیله تغییر پارامترهای محیط کشت در جهت بهینه‌سازی تولید متابولیت مورد نظر از جمله راهبردهای مهم

همگن‌سازی سلول‌ها

به‌منظور همگن‌سازی، سلول‌های حاصل را به محیط‌های کشت جدید انتقال داده تا پس از ۹ بار واکشت (هر ۱۰ روز یک‌بار)، برای تیمار آماده‌سازی شوند.

تیمار سلول‌ها

با توجه به اینکه در این آزمایش از تیمار تغذیه‌ای نیتروژن استفاده شد، بنابراین در درست کردن محیط کشت از تمامی محلول‌های پایه MS به غیر از پایه ماکرو استفاده شد و عناصر ماکرو NH_4NO_3 و KNO_3 را طبق جدول ۱ به‌صورت جداگانه وزن و از آن برای تهیه محلول کشت استفاده شد. پس از درست کردن محلول‌های تیمار طبق جدول ۱، سلول‌های جمع‌آوری شده از محیط قبلی به این محیط (در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً سترون) واکشت شدند. پس از انجام واکشت، ارن‌ها روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به‌مدت ۱۱ روز تحت تیمار قرار گرفتند. آنگاه سلول‌ها را به‌وسیله دستگاه مکش برداشت کرده و درون تانک نیتروژن مایع ریخته و در نهایت در فریزر با دمای -80°C نگهداری شدند تا برای آنالیز و استخراج نمونه‌ها از آنها استفاده شود.

جدول ۱- محیط‌های کشت MS با نسبت‌های متفاوت از

آمونیم / نیترات

$\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KNO}_3$ (ml)	Nitrogen total concentration	$\text{NH}_4:\text{NO}_3$ ratio
5/5	30/30	1:1
6.7/3.35	40/20	2:1
2.5/7.5	45/15	3:1
3.35/6.7	20/40	1:2
7.5/2.5	15/45	1:3

اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها (FW)

پس از ۱۱ روز تیمار، سلول‌ها را به‌وسیله قیف بوختر، نایلون مش و پمپ خلأ برداشت کرده و هر کدام از نمونه‌ها

۱٪ قرار گرفتند. سپس ۳ بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند و به دنبال آن ۱۰ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳٪ قرار داده شدند. مجدداً ۳ بار با آب سترون شستشو شدند و در مرحله آخر ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند و با آب مقطر سترون آبکشی شدند. بذرها ی سترون به‌مدت یک ساعت در محلول ۰/۵ گرم در لیتر جیبرلین (Hasanloo et al., 2008) قرار گرفتند و بعد در محیط پایه MS فاقد هر گونه هورمون، کشت داده شدند. بذرها مدت دو هفته در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (فتوپریود) قرار گرفتند و گیاهچه‌های حاصل برای تشکیل کالوس استفاده شدند.

تکثیر جوانه و تولید کالوس

به‌منظور تکثیر گیاه، بعد از جوانه‌زنی بذرها در محیط MS، بخش ساقه حاصل از بذرها به‌صورت قطعاتی با اندازه‌های یکسان جدا شدند و مجدداً از سمت قاعده در محیط کشت MS وارد شدند. با رشد قطعات جدید، عمل تکثیر قطعات جداگشت، هر ۴ هفته یکبار انجام شد. قطعات یک سانتی‌متری از اندام هوایی (ساقه همراه با برگ) گیاهچه‌ها به‌طور یکسان تهیه شد و در هر ظرف پتری حاوی محیط کشت جامد تعداد سه قطعه قرار داده شد. جداگشت‌ها به‌مدت چهار هفته در فیتوترون در تاریکی قرار داده شدند تا کالوس تشکیل شود.

منحنی رشد

بدست آوردن منحنی رشد سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا از چگونگی روند رشد و زنده بودن سلول‌های *L. album* در محیط کشت اطلاع دقیقی حاصل شود تا بدانیم در چه زمانی باید این سلول‌ها را تحت تیمار قرار داده و در چه زمانی آنها را از محیط برداشت کنیم. برای بدست آوردن دوره رشد سلول‌های *L. album* به‌ترتیب در روزهای ۲، ۴، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ از دوره رشد سلول، سلول‌ها را به‌وسیله قیف بوختر و دستگاه مکش برداشت کرده و آنها را وزن و بعد منحنی رشد سلول‌ها تعیین شد.

روش استخراج و سنجش فلاونوئیدها

از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی برداشته، سپس ۲۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ به همراه ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار به این عصاره متانولی اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش استخراج و سنجش فلاونول کل

از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی برداشته، ۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ به همراه ۳ میلی‌لیتر محلول سدیم استات ۵٪ به این عصاره متانولی اضافه و جذب نمونه‌ها پس از ۲/۵ ساعت در طول موج ۴۴۵ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر سنجش شد.

روش استخراج پروتئین

۰/۲ گرم از سلول‌های *L. album* در ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH=۸)، دارای ۱۴ میکرولیتر مرکاپتو اتانل کاملاً سائیده شد تا به حالت هموزن درآید. مخلوط همگن حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت به وسیله سمپلر جدا و برای سنجش غلظت پروتئین و نیز فعالیت آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت.

روش سنجش فعالیت آنزیم PAL

به منظور سنجیدن فعالیت آنزیمی از روش Garden و Alfermann (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات استفاده شد. در یک لوله آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۰/۱ مولار در بافر پتاسیم فسفات (pH=۸)، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده و ۶۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات بافر ۰/۱ مولار (pH=۸) اضافه شد و نمونه شاهد تمام ترکیب‌ها بجز پروتئین استخراج شده را شامل می‌شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl (۶M) برای غیرفعال کردن

را قبل از گذاشتن در تانک نیتروژن مایع به سرعت با ترازوی دیجیتال وزن کرده و وزن تر آنها ثبت گردید.

استخراج پودوفیلوتوکسین

استخراج به روش ذکر شده توسط Koulman و Konuklugil (۲۰۰۴) بشرح زیر انجام شد:

۲ گرم از سلول‌های حاصل از هر تکرار در ۴ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ سائیده شد تا به صورت همگن درآید. مخلوط حاصل در فالدون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در حمام فوق صوت (اولتراسونیک) قرار گرفتند. در ادامه ۴ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید، پس از سانتریفیوژ با ۷۵۰۰ دور، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۳ فاز کاملاً از هم جدا شد. فاز زیرین توسط سمپلر برداشته شد و به وسیله هوادهی کاملاً خشک شده و پس از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر متانول، در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. بخش رویی نمونه‌ها برای سنجش پودوفیلوتوکسین توسط دستگاه HPLC (در طول موج ۲۹۰ نانومتر) استفاده شدند.

سنجش فنل کل، فلاونوئید، فلاونول، پروتئین و فعالیت

آنزیم PAL

روش استخراج و سنجش فنل کل

۰/۵ گرم از سلول‌های *L. album* را در ۸ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به خوبی سائیده تا هموزن شود، عصاره متانولی یک ساعت در سونیکاتور سونیکیت شد، نمونه‌ها را در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده (روش استخراج فلاونوئید و فلاونول نیز تا این مرحله یکسان است)، از هر نمونه ۳ میلی‌لیتر برداشته و خشک شد، نمونه‌های خشک شده را در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل کرده، ۲ میلی‌لیتر از معرف فولین دنیس به آن اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کرنات سدیم ۷٪ به آن افزوده شد و بعد از ۱۵ دقیقه به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب نمونه‌ها، در طول موج ۷۰۰ نانومتر سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

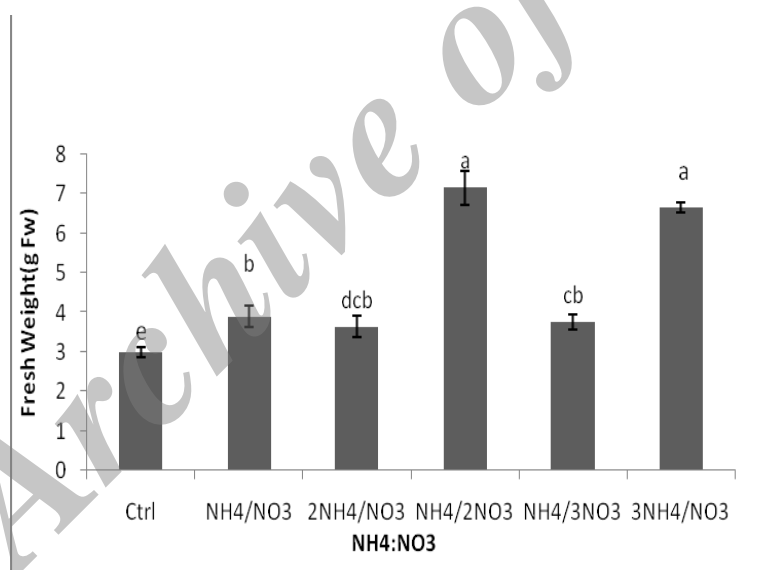
کلیه آزمایش‌ها در طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دانکن برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

اثر نسبت‌های مختلف نیترات/آمونیم بر روی رشد سلولی (وزن تر)

بیشترین وزن تر سلول‌ها، در نسبت‌های ۲:۱ نیترات به آمونیم به میزان ۷/۱۶ گرم و ۳:۱ آمونیم به نیترات به میزان ۶/۷۴ گرم در تاریکی ایجاد شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. کمترین میزان رشد سلول‌ها هم در نمونه کنترل به میزان ۳ گرم مشاهده شد (شکل ۱).

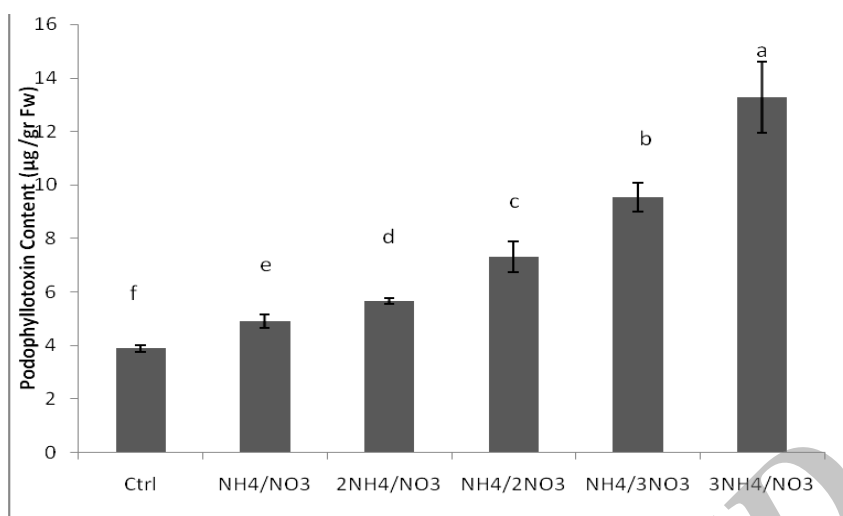
آنزیم به نمونه‌ها اضافه شد. شستشو با ۳ میلی لیتر اتیل استات در ۳ مرحله انجام شد. سپس نمونه‌ها خشک و به رسوب ۱ میلی لیتر از NaOH (۰/۰۵M) اضافه شد و محلول در طول موج ۲۹۰nm با اسپکتروفتومتر قرائت شد. به منظور بدست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی، منحنی استاندارد سینامیک اسید رسم شد. در نمونه‌های مجهول نیز براساس مقادیر جذب حاصل از نمونه‌ها و منحنی استاندارد، مقدار سینامیک اسید تولید شده در مدت یک دقیقه محاسبه شد. از آنجایی که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که در طی یک دقیقه، یک میکرومول محصول را تولید می‌کند، بنابراین فعالیت آنزیم را بر حسب واحد آنزیمی با $\mu\text{mol} / \text{min}$ و فعالیت ویژه آنزیم به صورت mg cinamic acid و فعالیت ویژه آنزیم به صورت $\mu\text{mol cinamic acid}/\text{protein}/\text{min}$ بیان شد.



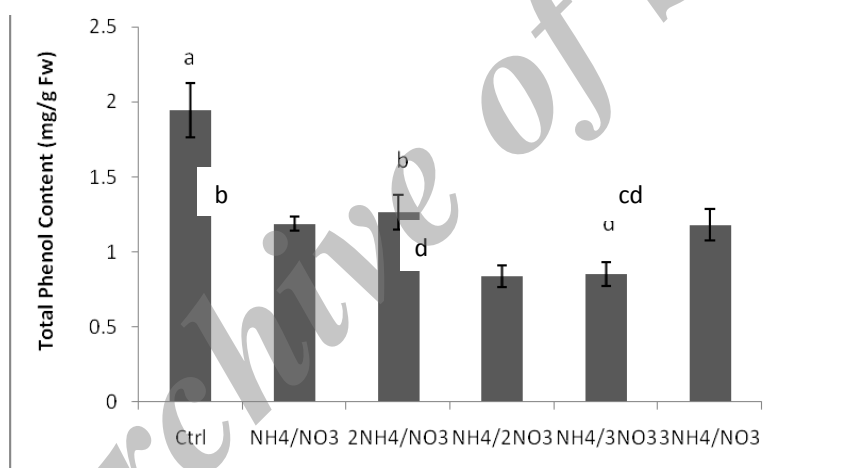
شکل ۱- تغییرات وزن تر سلول‌ها در حضور نسبت‌های مختلف نیترات آمونیم در مدت زمان ۱۱ روز تیمار در تاریکی (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین وزن سلول‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).

با سایر تیمارها داشت. نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیم هم بعد از این تیمار بیشترین میزان (۹/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) را نشان داد. در حالی که میزان یودوفیلوتوکسین در کشت کنترل، ۳/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (شکل ۲).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات/آمونیم بر روی بیوسنتز پودوفیلوتوکسین بیشترین مقدار تولید پودوفیلوتوکسین در کشت *L. album*، در نسبت ۳:۱ آمونیم به نیترات، به میزان ۱۳/۳ میکروگرم بر گرم وزن تر بود و تفاوت معنی‌داری



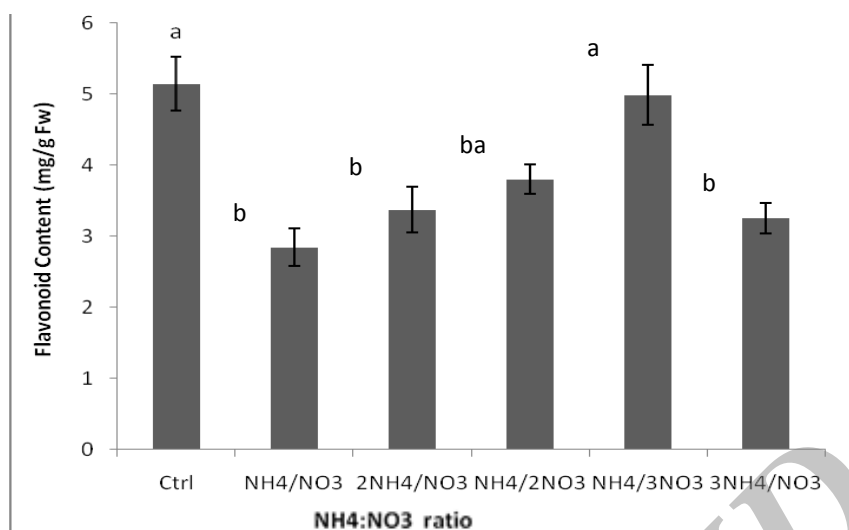
شکل ۲- تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین (میکروگرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).



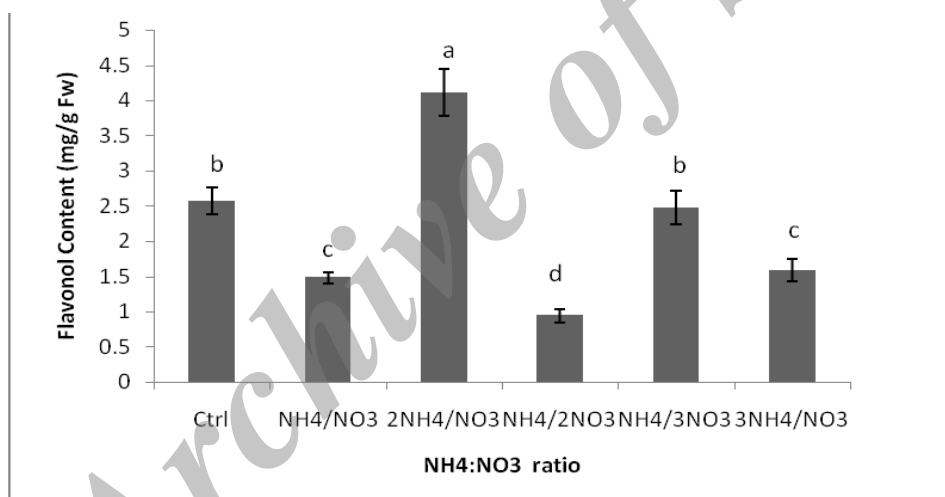
شکل ۳- تغییرات میزان تولید فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فلاونوئیدها بیشترین میزان فلاونوئید در نمونه کنترل به میزان ۵/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیوم به میزان ۴/۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ایجاد شد و با سایر تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۴).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فنل کل بالاترین میزان تولید فنل متعلق به نمونه کنترل به میزان ۱/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. کمترین میزان فنل هم در تیمار شماره ۳ یعنی نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم به میزان ۰/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۴- تغییرات میزان تولید فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).



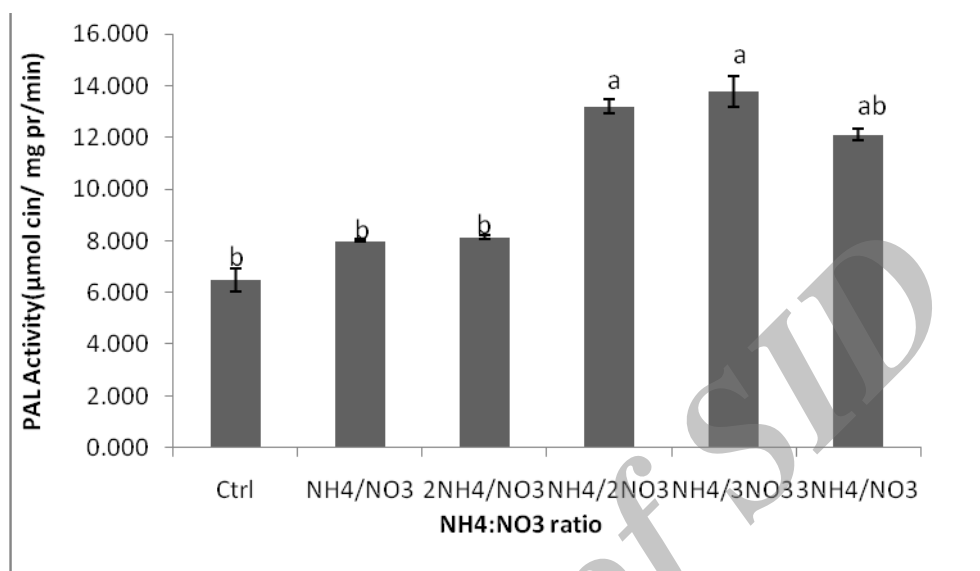
شکل ۵- تغییرات میزان فلاونول (میلی گرم بر گرم وزن تر) تحت تیمارهای نسبت‌های مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album* (پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم روی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) با توجه به نقش کلیدی آنزیم PAL در ابتدای مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و ارتباط مؤثر و مثبت این آنزیم با میزان تولید این ترکیب‌های سلولی، میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های *L. album* مورد

اثر نسبت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر میزان فلاونول کل بیشترین مقدار فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیوم به نیترات به مقدار ۴/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. کمترین میزان فلاونول نیز در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم به مقدار ۰/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر دیده شد (شکل ۵).

فعالیت هم در تیمارهای کنترل (۱:۱) و (۲:۱) مشاهده شد. این تغییرات در فعالیت آنزیم کاملاً با روند تغییرات در میزان تجمع و تولید پودوفیلوتوکسین مطابقت دارد.

سنجش قرار گرفت. تیمارها باعث تغییر در فعالیت آنزیم PAL شدند (شکل ۶). بیشترین میزان فعالیت در سه نمونه (۱:۲)، ۳، (۱:۳) و ۴ و مشاهده شد. کمترین میزان



شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم PAL تحت تیمارهای مختلف آمونیوم به نیترات در کشت *L. album*

(پس از ۱۱ روز) که در تاریکی قرار گرفته‌اند

(حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p \leq 0.05$ است).

پودوفیلوتوکسین محیط MS بود. بیشترین میزان وزن خشک بدست آمده در محیط MS و به میزان ۸/۳ گرم بر لیتر و کمترین میزان وزن خشک در محیط White و به مقدار ۴/۵ گرم بر لیتر گزارش شد.

تغییر در منبع نیتروژن، هم شامل تغییر در غلظت نیتروژن کل و هم شامل تغییر در نسبت‌های نیترات و آمونیوم می‌تواند باشد. البته تغییر در منبع نیتروژن می‌تواند شامل تغییر در نمک‌های نیترات و آمونیوم هم باشد. در تحقیقی اثر تغییر در غلظت نیتروژن کل روی رشد و میزان پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی *Podophyllum hexandrum* بررسی شد. غلظت‌های مختلف به ترتیب ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار از نیتروژن کل بود. در این میان، بیشترین وزن خشک در غلظت ۳۰ میلی مولار و بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در غلظت ۶۰ میلی مولار تولید شد (Chattopadhyay et al., 2003). در پژوهش

بحث

تولید پودوفیلوتوکسین

از آنجایی که متابولیت‌های ثانویه برای هر گونه گیاهی ممکن است مختص آن گیاه باشد، بنابراین راهکارهایی که برای بهینه‌سازی محیط و شرایط کشت برای رشد سلول و افزایش تولید متابولیت ثانویه بکار می‌رود، باید براساس خصوصیات رشد و نمو آن گیاه صورت بگیرد (Esmailzadeh Bahabadi et al., 2011). برای سلول‌های مختلف گیاهی، محیط‌های مناسب گوناگونی برای کشت موجود است، بنابراین هیچ محیط ثابتی برای کشت کلیه سلول‌ها وجود ندارد. از این رو در تحقیقی که به وسیله Chattopadhyay و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد، سلول‌های *Podophyllum hexandrum* در محیط‌های B5، MS، Eriksson، Nitsch، Stree و White کشت شدند و در نهایت بهترین محیط از نظر رشد و مقدار ماده ضدسرطان

سلول‌های گیاه *L. album* تحت تیمار الیسیلیک اسید اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فنل کل در ۲۴ ساعت اولیه بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید دیده شد. در تحقیق حاضر، بیشترین میزان فنل کل در نسبت کنترل (۱/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد و کمترین میزان آن در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم (۰/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. بیشترین مقدار وزن تر و رشد سلولی در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم و کمترین میزان رشد در نسبت کنترل مشاهده شد، بنابراین می‌توان گفت بین رشد و مقدار سنتز و تجمع فنل در سلول رابطه معکوس وجود دارد. این نتیجه، نتایج تحقیق قبلی را تأیید می‌کند. طبق نتایج تحقیق حاضر، میزان استفاده از آمونیوم با میزان تولید و تجمع فنل در سلول ارتباط مستقیمی دارد، به این معنا که هر چه نسبت آمونیوم به نیترات زیادتر شود، به همان اندازه میزان فنل هم افزایش می‌یابد و بعکس.

تولید فلاونوئید

بر اساس تحقیقات پایان‌نامه یوسف‌زادی (۱۳۹۰) بر روی تغییرات میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی گیاه *L. album* تحت تیمار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان فلاونوئید در ۷۲ ساعت بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید در سلول‌ها مشاهده شد. در تحقیق حاضر با توجه به نتایج آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فلاونوئیدها می‌توان به رابطه مستقیم بین استفاده از نیترات و میزان بیوسنتز و تجمع فلاونوئیدها اشاره کرد. به‌نحوی که هر چه نسبت نیترات به آمونیوم بالاتر برود، به همان اندازه میزان فلاونوئیدها در سلول بالا می‌رود و بعکس.

تولید فلاونول

بر اساس نتایج حاصل از تحقیق یوسف‌زادی (۱۳۹۰) بر روی میزان تغییرات فلاونول سلول‌های *L. album* تحت تیمار سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان فلاونول سلول‌ها در ۷۲ ساعت بعد از تیمار توسط غلظت بهینه سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در پژوهش حاضر، بیشترین میزان تولید و

حاضر که از غلظت ۶۰ میلی‌مولار نیتروژن کل در کشت کنترل و تیمار استفاده شده بود، بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین تولید شده در کشت با نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات (۱۳/۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) بود، در حالی که میزان پودوفیلوتوکسین در کشت کنترل، ۳/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر بود.

همچنین تحقیق Chattopadhyay و همکاران (۲۰۰۳)، بر روی رشد سلولی و محتوای پودوفیلوتوکسین نشان داد که در نسبت ۱:۲ آمونیوم به نیترات بیشترین رشد سلولی و محتوای پودوفیلوتوکسین ایجاد می‌شود. کمترین میزان رشد و پودوفیلوتوکسین در نسبت ۱:۰ آمونیوم به نیترات مشاهده شد. در تحقیق حاضر، بیشترین میزان رشد سلولی در نسبت ۱:۲ آمونیوم به نیترات (۷/۱۶ گرم وزن تر) بدست آمد، یعنی زمانی که نیترات دو برابر آمونیوم در دسترس سلول‌ها قرار بگیرد، رشد سلولی به بالاترین مقدار خود می‌رسد. از طرفی کمترین میزان رشد نیز در نمونه کنترل به مقدار ۳ گرم وزن تر بدست آمد. نسبت ۱:۱ آمونیوم/نیترات هم بعد از کنترل کمترین میزان رشد سلولی را دارا بود. بیشترین میزان پودوفیلوتوکسین در نسبت ۳:۱ آمونیوم به نیترات بود. نسبت ۳:۱ نیترات به آمونیوم بعد از نسبت ذکر شده بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین را تولید کرد. از این نتیجه می‌توان به این رابطه رسید که وقتی از تیمار ۳ به ۱ استفاده می‌شود، نسبت ۳ برابر آمونیوم نتیجه بهتری می‌دهد و میزان متابولیت مورد نظر بیشتر است. نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیوم از نسبت ۲:۱ و نسبت ۱:۱ آمونیوم به نیترات و همین‌طور نمونه کنترل بیشتر است. این نتیجه، نتایج تحقیق قبلی را در این مورد تأیید می‌کند.

تولید فنل کل

بر اساس نتایج حاصل از تحقیق Hoagland و Duke (۱۹۷۸)، میزان بیوسنتز و تجمع ترکیب‌های فنلی در سلول‌ها با میزان رشد سلول‌ها نسبت عکس دارد و هر چه میزان این ترکیب‌ها بیشتر باشد، میزان فعالیت آنزیم PAL هم بیشتر خواهد بود. در تحقیقی که توسط یوسف‌زادی (۱۳۹۰) انجام شد، میزان ترکیب‌های فنلی (فنل کل، فلاونوئید و فلاونول)

پس از ۱۲ ساعت میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد، به طوری که شاهد و تیمار تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند. مجدداً فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت افزایش می‌یابد و پس از ۴۸ ساعت فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد و پس از ۷۲ ساعت فعالیت آنزیم مجدداً افزایش می‌یابد (فخاری، ۱۳۸۹). براساس تحقیقی دیگر مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم PAL در ۲۴ ساعت اولیه تیمار توسط سالیسیلیک اسید به بیشترین مقدار خود خواهد رسید، سپس این میزان، بتدریج در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تیمار کاهش خواهد یافت (یوسف‌زادی، ۱۳۹۰). در تحقیق حاضر از روش دوره‌های زمانی مختلف (Time course) برای سنجش متابولیت‌ها یا فعالیت آنزیم استفاده نشد، زیرا هدف بدست آوردن محیط بهینه برای رشد و تولید متابولیت بوده‌است، بنابراین سلول‌ها باید تا موقع برداشت در این محیط رشد داده شوند. از طرفی، تیمار تغذیه‌ای به‌عنوان یک الیسیتور یا استرس ناگهانی برای سلول‌ها محسوب می‌شود و به‌طور ناگهانی رشد یا تولید متابولیت را افزایش یا کاهش نمی‌دهد، به همین دلیل است که سلول‌ها را اصولاً از روز اول کشت، تحت تأثیر الیسیتور قرار نمی‌دهند، ولی در مورد تیمار نیترات/آمونیم، سلول‌ها از روز اول در این محیط قرار دارند و تحت این شرایط تا روز برداشت رشد می‌کنند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم با تیمار تغذیه‌ای نیترات/آمونیم در این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم PAL با میزان سنتز و تجمع پودوفیلوتوکسین رابطه مثبتی دارد. سه نسبت ۲:۱ و ۳:۱ نیترات به آمونیم و ۳:۱ آمونیم به نیترات، بیشترین میزان فعالیت آنزیم را نشان داد. این سه تیمار بیشترین میزان تولید و تجمع پودوفیلوتوکسین را هم نشان دادند. نمونه کنترل و دو تیمار ۱:۱ و ۲:۱ آمونیم به نیترات کمترین میزان فعالیت آنزیم و نیز کمترین میزان تولید پودوفیلوتوکسین را داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل افزایش یا کاهش میزان این متابولیت ثانویه، تغییر در فعالیت و عملکرد آنزیم PAL است. همچنین می‌توان گفت، شاید تغییر نسبت‌های آمونیم و نیترات و همچنین تغییر منبع نیتروژن و استفاده از نمک NH_4Cl به جای NH_4NO_3 باعث تغییراتی در میزان

تجمع فلاونول در نسبت ۲:۱ آمونیم به نیترات (۴/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان آن در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیم (۰/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. همانند فنل کل در اینجا هم کمترین میزان مربوط به نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیم است که بیشترین وزن تر را دارا بود. در بررسی فنل و فلاونوئید، بیشترین میزان این ترکیب‌ها در نمونه کنترل بدست آمد که کمترین وزن تر را دارا بود. در مورد فنل و فلاونول هم کمترین میزان ترکیب‌ها در نسبت ۲:۱ نیترات به آمونیم بدست آمد که دارای بیشترین وزن تر بود. این نتیجه هم نتایج تحقیقات قبلی را در مورد وجود رابطه معکوس بین تجمع ترکیب‌های فنلی و رشد سلولی تأیید می‌کند.

فعالیت آنزیم PAL

آنزیم PAL یکی از مهمترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیب‌های فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر بیوسنتزی این ترکیب‌ها به‌شمار می‌رود (Dixon & Paiva, 1995). یکی از دلایل مهم برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL، نقش این آنزیم و ارتباطی است که این آنزیم با متابولیسم اولیه و ثانویه دارد. آنزیم PAL اسید آمینه آروماتیک فنیل‌آلانین را با حذف گروه آمین به ترانس سینامیک اسید تبدیل کرده و به‌عنوان پلی بین متابولیت‌های اولیه و ثانویه عمل می‌کند (Esmailzadeh Bahabadi et al., 2012). در تحقیق حاضر با توجه به اینکه سلول‌ها تحت تیمار آمونیم/نیترات قرار داشت و گمان می‌رفت که این تیمار در روند سنتز فنیل‌آلانین تغییراتی را بوجود می‌آورد، فعالیت آنزیم کلیدی PAL اندازه‌گیری شد. از طرف دیگر این آنزیم در سنتز ترکیب‌های فنلی از جمله فنیل پروپانوئیدها هم نقش مؤثر و کلیدی ایفا می‌کند. براساس تحقیقی، مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم PAL در ساعت اول پس از تیمار متیل جاسمونات تغییری نداشته است، اما پس از ۶ ساعت فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد.

- anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5): 504-519.
- Fuss, E., 2003. Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. *Phytochemistry Reviews*, 2(3): 307-320.
 - Garden, H. and Alfermann, A.W., 2003. Influence of oxygen supply and medium composition on the production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures in an airlift-bioreactor. *International Meeting Phytochemistry and Biology of Lignans, Bornheim-Walberberg, Germany, Dusseldorf, 6-9 April*: 28.
 - Hasanloo, T., Khavari-Nejad, R.A., Majidi, E. and Shams Ardakani, M.R., 2008. Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybum marianum*. *Pharmaceutical Biology*, 46(12): 876-882.
 - Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. and Alfermann, A.W., 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(3): 441-447.
 - Koulman, A. and Konuklugil, B., 2004. Lignan profile of *Linum meletonis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 91-93.
 - Kumar, A., Kumar, V., Alegria, A.E. and Malhotra, S.V., 2011. Synthetic and application perspectives of azapodophyllotoxins: alternative scaffolds of podophyllotoxin. *Current Medicinal Chemistry*, 18(25): 3853-3870.
 - Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
 - Rojas-Sepúlveda, A.M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M.Y.A., Salas-Vidal, E., Marquina, S., Villarreal, M.L., Puebla, A.M., Delgado, J.I. and Alvarez, L., 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*, 17(8): 9506-9519.
 - Stahelin, H.F. and Wartburg, A.V., 1991. The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide. *Cancer Research*, 51: 5-15.
 - Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13-25.
 - Yong, Y., Shin, S.Y., Lee Y.H. and Lim, Y., 2009. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(15): 4367-4371.
- سنتز آمینواسید آروماتیک فنیل آلانین شده و احتمالاً همین امر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز را دستخوش تغییر کرده است. در نهایت، با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که تغییر ترکیب محیط کشت، یک فاکتور مؤثر در افزایش سنتز متابولیت های ثانویه در سلول های *L. album* است.
- ### منابع مورد استفاده
- فخاری، ص.، ۱۳۸۹. بررسی تغییرات میزان پودوفیلوتوکسین در پاسخ به تنظیم کننده های رشد گیاهی و متیل جاسمونات در کشت کالوس و گیاهچه *Linum album*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
 - یوسف زادی، م.، ۱۳۹۰. بررسی اثر تیروزین، تریپتوفان، نور و سالیسیلیک اسید بر میزان پودوفیلوتوکسین، فعالیت آنزیمی و بیان ژن برخی از آنزیم های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین در گیاه *Linum album*. پایان نامه دکتر، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
 - Chatopadhyay, S., Mehra, R.S., Srivastava, A.K., Bhojwani, S.S. and Bisaria, V.S., 2003. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5): 541-546.
 - Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7): 1085-1097.
 - Duke, S.O. and Hoagland, R.E., 1978. Effects of glyphosate on metabolism phenolic compounds induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark- grown maize roots. *Plant Science Letters*, 11(3-4): 185-190.
 - Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaei, N., Murata, J., Yamagaki, T. and Satake, H., 2011. Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant Biotechnology Report*, 5(4): 367-373.
 - Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Behmaneshb, M., Safaei, N., Murata, J., Arakid, R., Yamagaki, T. and Satake, H., 2012. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology*, 169(5): 487-491.
 - Farkya, S., Bisaria, V.S. and Srivastava, A.K., 2004. Biotechnological aspects of the production of the

Feeding as a biotechnological approach for improvement of podophyllotoxin production in *Linum album* Ky. ex Boiss. cell culture

M. Afshar Mohammadian^{1*}, F. Tashakori² and M. Sharifi³

1*- Corresponding author, Department of Plant Sciences, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

E-mail: afshar@guilan.ac.ir

2- Department of Plant Sciences, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

3- Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: January 2013

Revised: August 2013

Accepted: August 2013

Abstract

Linum album Ky. ex Boiss., one of the endemic species in Iran, produces lignans such as podophyllotoxin (PTOX). This compound is precursor for three important anticancer drugs including etoposide, teniposide and etopophose. Chemical synthesis of these compounds is very complicated and this process is not economical. Improvement of PTOX production is possible by different strategies such as feeding, elicitation, genetic engineering, etc. Medium optimization is one of the strategies for increasing the production of secondary metabolites in cell culture. Regarding the remarkable value of PTOX as a precursor for three important anticancer drugs, in this study, the effect of different ratios of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ in MS medium on cell growth and some of the of secondary metabolites including PTOX biosynthesis and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity were investigated. Results indicated that the cell growth was significantly increased when treated with 2:1 ratio of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. The most phenolic and flavonoid content was obtained in control culture, having minimum biomass production. The 2:1 ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ resulted in highest production of flavonols. The highest production of PTOX was achieved by 3:1 ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Meanwhile, the highest PAL activity was observed in 2:1 and 3:1 ratio of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ and 3:1 ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, respectively. Therefore, it can be concluded that changing nutrient diet is an effective factor increasing the secondary metabolites in *L. album*.

Keywords: Nitrogen, podophyllotoxin, *Linum album* Ky. ex Boiss., cell culture, anticancer.