مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 16، شماره 3 (شماره پیاپی 72)، خرداد 1392، 37-44

تولید داروی ضد سرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از فندق(Corylus avellana)

نوشین رحیمی[1]، سنبل ناظری[2*]، سهیلا میرزایی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

3- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت:91/10/11 تاریخ پذیرش:92/2/4

چکیده

زمینه و هدف: تاکسول یک ترکیب دی‌ترپنوئیدی است که اولین بار از درخت سرخدار و سپس از درختان دیگر مانند فندق جداسازی شد. تحقیقات نشان داده است که برخی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از این گیاهان نیز قادر به تولید تاکسول هستند. ژن *DBAT* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است که تشکیل باکاتین III، یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول را کاتالیز می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه فندق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهدی، قارچ‌های اندوفیت از درختان فندق در منطقه فندق‌لو واقع در استان اردبیل، جداسازی و به روش نوک‌هیف خالص‌سازی شدند. DNA ژنومی قارچ‌های اندوفیت به روش CTAB، استخراج شد. حضور ژن *DBAT* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد آزمایش قرار گرفت. تولید تاکسول در محیط‌های کشت قارچی، به روش کروماتوگرافی لایه نازکّ بررسی گردید.

یافته‌ها: پس از خالص‌سازی، 60 قارچ از اندام‌های مختلف درختان فندق جداسازی گردید. حضور ژن *DBAT* در 12 ایزوله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR به اثبات رسید. بررسی تولید تاکسول در کشت این ایزوله‌ها، نشان داد که 7 ایزوله توانایی تولید تاکسول را در شرایط آزمایشگاهی داشتند.

نتیجه‌گیری: گروهی از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق، رویش یافته در شمال غرب ایران، حاوی ژن *DBAT*، ژن مولد آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی، بودند و از آن میان تعدادی در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید تاکسول بودند.

واژگان کلیدی: اندوفیت‌ها، باکاتین III، تاکسول، فندق، قارچ

***نویسنده مسئول:** همدان، انتهای بلوار آزادگان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی

Email: snblnazeri@yahoo.com

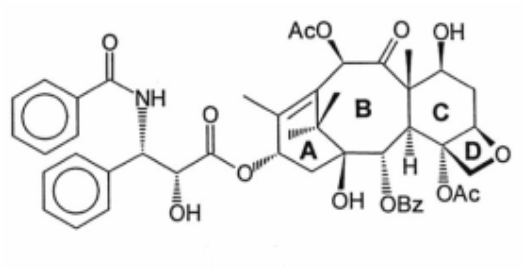
Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ترکیبات طبیعی به خصوص ترکیبات گیاهی، صدها سال است که برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرطان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است(1). امروزه شیمی‌درمانی به عنوان یکی از روش‌های اصلی در درمان سرطان استفاده می‌شود. در این روش انواع داروهای ضد سرطان به تنهایی و یا به صورت ترکیب با عوامل دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند(2). تاکسول یک آلکالوئید گیاهی با ساختار شیمیایی بسیار پیچیده و یکی از موثرترین داروهای ضد سرطان است که امروزه به عنوان یکی از محبوب‌ترین داروها در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد(3). این ترکیب در برابر گستره وسیعی از انواع تومورها از جمله سرطان سینه، رحم، معده و سرطان سر و گردن موثر است. تاکسول هم‌چنین به عنوان یک عامل ضد میکروتوبولی در برابر سارکومای کاپوزیس وابسته به ایدز، فعال شناخته شده است(4). با وجود آن که بسیاری از داروهای ضد سرطان که امروزه در دسترس هستند، از عوارض جانبی بالایی برخوردار بوده و در عین حال در برابر تعداد زیادی از سرطان‌ها موثر نیستند، تاکسول در مقایسه با دیگر ترکیبات مشابه بر روی سلول‌های سرطانی اثر منحصر به فردی دارد. این دارو با اتصال به میکروتوبول‌ها، باعث افزایش تجمع و اتصال توبولین‌ها و به دنبال آن تشکیل میکروتوبول‌های پایدار می‌گردد. بر این اساس تاکسول به عنوان یک داروی آنتی‌میتوتیک، شناخته شده است(5).

این ترکیب آلکالوئیدی دی‌ترپنوئیدی اولین بار در سال 1971 از پوست درخت سرخدار (Taxus brevifolia) جداسازی و استخراج شد و پس از آن در قارچ‌های اندوفیت هم زیست با آن نیز یافت شد (6). دی‌ترپنوییدها ترکیبات طبیعی هستند با اسکلت 20 کربنی که از ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات مشتق می‌شوند و تاکسول یکی از معروف‌ترین و شناخته شده‌ترین اعضای این گروه است (شکل1)(7). مسیر بیوسنتزی این ماده شامل 20 مرحله‌ی آنزیمی است(8)، که از این میان ژن *DBAT*، یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، شناسایی و توالی‌یابی شده است. آنزیم DBAT (-10 deacetylbaccatinIII – 10 – *O* – acetyl transferase) تولید باکاتین III را با استیله کردن گروه هیدروکسیل در موقعیت C10، کاتالیز می‌کند که این ماده یکی از پیش سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است. امروزه تاکسول به صورت تجاری سنتز می‌شود. در صنعت از باکاتین III به عنوان پیش ماده‌ی اصلی در تولید این داروی با ارزش استفاده می‌شود(9).



شکل 1. ترکیب شیمیایی تاکسول

یکی از مشکلات اساسی در تولید تاکسول کند رشد بودن درخت سرخدار است و این که غلظت تاکسول در پوست آن پایین بوده و برای استخراج تاکسول به میزان کافی، گیاه باید به سن صد سالگی برسد(5). از طرف دیگر برای تامین تاکسول مورد نیاز برای هر بیمار سرطانی چندین کیلوگرم از پوست درخت سرخدار مورد نیاز است(10). به علت ارزش اقتصادی بالای تاکسول، کمبود درخت سرخدار، هزینه بالای سنتز آن و به دلیل تقاضای رو به رشد برای این دارو، منابع طبیعی دیگر جهت تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند(3). اولین بار لی و همکاران(11) گزارش کردند که علاوه بر سرخدار، گیاهان دیگر مانند سرو (Taxodium distichum) نیز این ترکیب تولید را می‌کنند. هافمن و همکاران(12) تاکسول و تاکسان‌های مربوط به آن را در شاخه، ساقه و برگ گیاه فندق(Corylus avellana) شناسایی و گزارش کردند. استیرل و همکاران(13)، تولید تاکسول را در محیط کشت قارچ اندوفیت Taxomyces andranae جداسازی شده از

Archive of SID

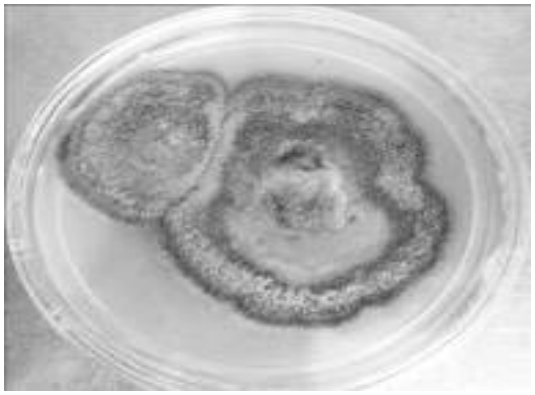
www.SID.ir

گیاه T.breifolia گزارش کردند. اولین بار هافمن در سال 1998 تولید تاکسول را در قارچ‌های هم زیست گیاه فندق را گزارش کرد(12).

از آنجاکه میکروارگانیسم‌ها به عنوان یکی از منابع اصلی تولید تاکسول محسوب می‌شوند و دارای ظرفیت بیولوژیکی بالایی برای تولید این داروی با ارزش ضد سرطان هستند(14)، در این تحقیق، جداسازی قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول از گیاه فندق (Corylus avellana)، فندق رویش یافته درمنطقه‌ی فندقلو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در شهریور ماه 1391، با جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی فندق (Corylus avellana) بومی منطقه‌ی غرب، جنگل فندقلو واقع در استان اردبیل، به روش مورد-شاهدی صورت گرفت و نمونه‌گیری از اندام‌های سالم(ساقه و برگ) و بدون شانه بیماری انجام شد. نمونه گیاهی پس از شستشو با آب جاری(جهت زدودن برخی از آلودگی‌های سطحی)، در زیر هود لامینار، در قطعات 1×1 سانتی‌متر مربع بریده شدند. قطعات فوق با استفاده از الکل 70درصد (3 دقیقه)، به دنبال سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هیپوکلریت‌سدیم 1/5درصد (1 دقیقه) استریل شدند. پوست رویی نمونه‌ها توسط تیغ استریل جدا شده و پوست داخلی بر روی پتری‌های حاوی محیط عمومی قارچ‌ها PDA (Potato Dextrose Agar، شرکت مرک) قرار داده شد. پتری‌های حاوی نمونه گیاهی در شرایط تاریکی و در دمای 1±25 درجه سانتی‌گراد تا زمان رشد قارچ نگهداری شدند(شکل 2). قارچ‌های رشد یافته در سطح نمونه‌ی گیاهی، توسط روش نوک هیف خالص‌سازی شدند(15)، به این صورت که یک هیف منفرد از کلونی قارچی جدا و به روی پتری حاوی PDA و WA (Water Agar) انتقال داده شد. برای اطمینان از خالص‌سازی بیشتر این عمل حداقل سه بار تکرار شد.



شکل2. رشد قارچ در محیط جامد PDA

جهت بررسی حضور ژن DBAT ابتدا از کلونی‌های قارچی سوسپانسیون تهیه شد. برای این منظور قطعات 0/5 × 0/5 سانتی‌متر مربع از کلونی‌های قارچی، داخل ارلن‌های 100 میلی‌لیتری که حاوی 50 میلی‌لیتر محیط PDA بود، قرار داده شدند. ارلن‌های حاوی نمونه بر روی شیکر با 120 دور بر دقیقه و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میسلیوم‌ها توسط کاغذ صافی دو لایه از محیط فیلتر شده و DNA ژنومی آنها به روشCTAB جداسازی شد. در مرحله‌ی بعد حضور ژن DBAT توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی گردید. تکثیر PCR توسط پرایمرهای dbat-F و dbat-R بر اساس توالی حفاظت شده‌ی ژن *DBAT* (GenBank No. EF028093)،

به صورت dbat-F (5-GGGAGGGTGCTCTGTTTG-3) و dbat-R (5-GTTACCTGAACCACCAGAGG-3)، صورت گرفت(16). یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (GeNet Bio)، به مخلوط واکنش(با حجم نهایی 25 میکرولیتر) اضافه گردید. مخلوط PCR به مدت 6 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد و سپس 35 سیکل در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه، 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 50 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 80 ثانیه و در نهایت

Archive of SID

www.SID.ir

72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio Rad)، DNA در ژل آگارز یک درصد ران شده و باندها در زیر نور UV ظاهر گردیدند.

تهیه‌ی محیط عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری از قارچ‌ها از محیط PDB (Potato Dextrose Broth) استفاده شد. نمونه‌ها در ارلن‌های 250 میلی‌لیتر حاوی 150 میلی‌لیتر محیط عصاره‌گیری کشت و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و تخمیری نگهداری شدند(شکل3). پس از 21 روز، میسلیوم‌های قارچ از دو لایه کاغذ صافی عبور داده شدند. به محیط کشت، در حجم برابر، حلال دی‌کلرومتان اضافه گردید. سپس فاز آلی جدا و تحت فشار در محیط تاریکی در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقیمانده در متانول حل شد و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شکل3. رشد قارچ پس از 21 روز در محیط مایع PDB

کروماتوگرافی عصاره‌ها

آنالیز TLC بر روی پلیت‌های 20×20 سانتی‌متر مربع پوشیده از سیلیکاژل با قطر 0/25 میلی‌متر (شرکت مرک) انجام شد. در این آزمایش از پنج حلال کلروفرم، متانول، استونیتریل، اتیل‌استات و ایزوپروپانول استفاده شد(17).

آنالیز TLC بر روی عصاره‌های متانولی قارچ انجام گرفته و از تاکسول محلول در متانول به عنوان استاندارد استفاده گردید. از معرف وانیلین یک درصد برای شناسایی لکه تاکسول استفاده گردید.

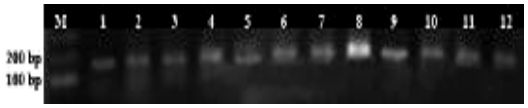
یافته‌ها

از سطوح استریل قطعات شاخه و برگ فندق در محیط PDA، میسلیوم‌های قارچی ظاهر شدند که در دمای 25±1 درجه‌ی سانتی‌گراد به سرعت رشد کردند(شکل4).

شکل4. ظهور میسلیوم از سطح قطعات استریل سرشاخه درخت Corylus avellana در محیط کشت PDA.

در مرحله بعد DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد و خلوص آن توسط اسپکتروفوتومتری تایید گردید، در طول موج 260/280 نانومتر جذب آن نزدیک به 1/8 بود.

حضور ژن DBAT نیز با الکتروفورز DNA ایزوله‌های قارچی گیاه فندق، توسط پرایمرهای ژن *DBAT*، تشکیل یک قطعه 150 جفت بازی را نشان داد. از میان 60 ایزوله‌ی جداسازی شده، حضور این ژن در 12 ایزوله به اثبات رسید(شکل5).



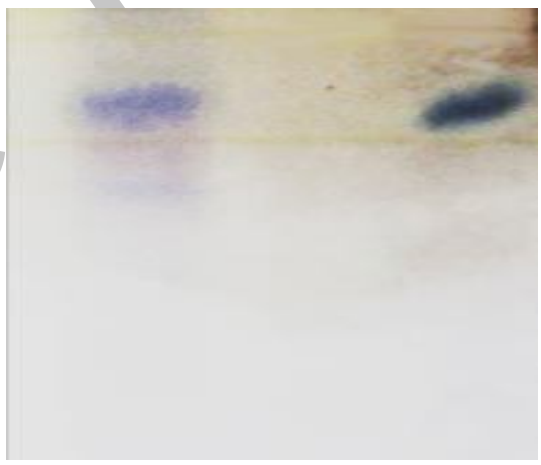
شکل5. حضور قطعات 150 جفت باز ژن *DBAT* در PCR ایزوله‌های قارچی گیاه فندق

Archive of SID

www.SID.ir

از آنجا که حضور این آنزیم در مسیر بیوسنتزی تاکسول ضروری می‌باشد، بنابر این احتمال تولید تاکسول در ایزوله‌هایی که به وسیله PCR ژن DBAT غربال شدند بیشتر بود. به همین علت، با استفاده از روش کروماتوگرافی، تولید تاکسول در محیط کشت این 12 ایزوله بررسی گردید.

در پایان، پس از رنگ آمیزی، تولید تاکسول به صورت لکه‌های آبی رنگ برروی صفحات کرماتوگرافی در عصاره هفت نمونه قارچی مشخص گردید، که پس از 24 ساعت به رنگ خاکستری تیره تغییر رنگ داد. این ترکیب همان ویژگی‌های مشخص کروماتوگرافی تاکسول استاندارد را داشت. در شکل 6 آنالیز TLC بر روی یکی از عصاره قارچی و تاکسول استاندارد نشان داده شده است که لکه تاکسول در نمونه قارچی و استاندارد دارای Rf های مشابه بودند.



شکل6. عصاره متانولی حاصل از قارچ (خط 2) که شامل ترکیبی است که این ترکیب دارای Rf مشابه با محلول متانولی تاکسول استاندارد (خط1) است

بحث

در تحقیق حاضر از میان 60 ایزوله، 12 ایزوله حاوی ژن *DBAT* بودند. روش PCR روشی سریع و اقتصادی برای شناسایی حضور ژن‌ها است(16)، به همین علت در این تحقیق از این روش جهت غربال‌گری اولیه ایزوله‌های مولد تاکسول استفاده گردید. با توجه به این که آنزیم DBAT سنتز یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، باکاتین III، را کاتالیز می‌کند، از ژن DBAT برای غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول استفاده شد. ژانگ و همکاران جهت غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول در ایزوله‌های اندوفیت گونه‌های سرخدار از این ژن به عنوان مارکر مولکولی استفاده کردند. این گروه از میان 90 ایزوله جداسازی شده، حضور ژن *DBAT* را در 15 ایزوله شناسایی کردند، که از میان آنها 3 ایزوله تاکسول تولید کردند(16).

در تحقیق حاضر از میان 12 ایزوله حاوی ژن DBAT، هفت ایزوله در محیط کشت خود تاکسول تولید کردند. روش‌های کروماتوگرافی از روش‌های معمول و قابل اعتماد در شناسایی حضور تاکسول است. اولین بار هافمن با استفاده از این روش تولید تاکسول را در قارچ‌های جدا شده از فندق شناسایی کرد(12). این روش در شناسایی اندوفیت‌های سایر درختان نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ژانگ و همکاران تولید تاکسول در قارچ‌های ایزوله شده از گیاه Taxus را توسط روش‌های کروماتوگرافی به اثبات رساندند(16). چاکراوارتی و همکاران با استفاده از روش کرماتوگرافی لایه نازک حضور تاکسول را در محیط کشت قارچ *Fusarium solani* جدا شده از Taxus celebica نشان دادند(18). گانگادوی و موتوماری نیز از روش کروماتوگرافی برای شناسایی قارچ اندوفیت مولد تاکسول گیاه Terminalia arjuna استفاده کردند(10). عدم تشخیص تاکسول در محیط کشت پنج ایزوله دیگر می‌تواند به این علت باشد که در کشت 5 ایزوله دیگر، میزان تولید تاکسول به اندازه‌ای نبوده است که روش TLC آن را شناسایی کند، یا شرایط مورد آزمایش برای تولید تاکسول مناسب نبوده و یا این که ژن DABT در این ایزوله‌ها در مسیر بیوسنتزی دیگری شرکت داشته و در نتیجه ماده نهایی، ترکیبی غیر از تاکسول بوده است(16).

نتیجه‌گیری

از میان 60 ایزوله قارچی جداسازی شده از گیاه فندق منطقه شمال غربی ایران، 12 ایزوله دارای ژن DBAT

Archive of SID
www.SID.ir

و هفت ایزوله در شرایط آزمایشگاهی مولد تاکسول بودند. به دلیل ارزش بالای دارویی تاکسول و هزینه بالای تهیه آن برای بیماران سرطانی، شناسایی منابع جدید امری ضروری به نظر می‌رسد. نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی باالقوه و بالایی برای تولید ترکیبات دارویی هستند(14). قارچ‌های اندوفیت همزیست فندق با توانایی تولید تاکسول می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب جهت تولید این داروی با ارزش به حساب آیند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه با عنوان "تولید تاکسول و عوامل موثر در تولید آن در قارچ‌های اندوفیت گیاه فندق (*Corylus avellana*)" بوده و با حمایت مالی دانشگاه بو علی سینا انجام شده است.

منابع

1. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh journal of pharmacology. 2006;1(2):35-41.
2. Siegel R, Jemal A. Cancer Facts & Figures. American Cancer Society. 2012; 404: 1-64.
3. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili M, Cusido R, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2009;9(1):109-21.
4. Sinha R, Vidyarthi AS. A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues. 2011; 48: 101-5.
5. Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. Journal of natural products. 1999;62(10):1448-72.
6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. Journal of the American Chemical Society. 1971;93(9):2325-7.
7. Nguyen T. Paclitaxel; The Billion Dollar Natural Product. Chemistry. 2008.
8. Guo B, Kai G, Jin H, Tang K. Taxol synthesis. African Journal of Biotechnology. 2006; 5 (1): 015-20.
9. Walker KD, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(52):53947-54.
10. Gangadevi V, Muthumary J. Taxol production by Pestalotiopsis terminaliae, an endophytic fungus of Terminalia arjuna (arjun tree). Biotechnology and Applied Biochemistry. 2009;52(1):9-15.
11. Li J-y, Strobel G, Sidhu R, Hess W, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, Taxodium distichum. Microbiology. 1996;142(8):2223-6.
12. Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, et al. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using High Performance Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. Spectroscopy-Eugene. 1998;13(6):22-32.
13. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by Taxomyces andreanae, an endophytic fungus of Pacific yew. Science. 1993;260(5105):214-6.
14. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal diversity. 2010;41(1):1-16.
15. Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, Tang K. A new endophytic taxane production fungus from Taxus chinensis. Applied Biochemistry and Microbiology. 2009;45(1):81-6.
16. Zhang P, Zhou P-p, Jiang C, Yu H, Yu L-j. Screening of Taxol-producing fungi based on PCR amplification from Taxus. Biotechnology letters. 2008;30(12):2119-23.
17. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana. Microbiology. 1996;142(2):435-40.
Chakravarthi B, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of

Archive of SID

www.SID.ir

paclitaxel by Fusarium solani isolated from Taxus celebica. Journal of biosciences. 2008;33(2):259-67

Archive of SID

www.SID.ir