القای درون شیشه‌ای پیاز نرگس برای تولید ترکیب ضد آلزایمر گالانتامین

مجید رحیمی خنکداری[۱]، محمد حسین میرجلیلی[*۱]، مهدی مریدی فریمانی[۲]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی و استادیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران ۲- استادیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

[*]نویسنده مسئول: m-mirjalili@sbu.ac.ir

چکیده

گیاه نرگس (*Narcissus tazetta*) گیاهی پیازی (سوخ‌دار) می‌باشد که علاوه بر کاربردهای زینتی، حاوی آلکالوئیدهایی است که اثرات فارماکولوژیکی متعددی برای آنها گزارش شده است. گالانتامین یکی از مهمترین آلکالوئیدهای موجود در این گیاه است که به عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز برای پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر معرفی شده است. در تحقیق حاضر، پیاز نرگس از رویشگاه آن در شهرستان کازرون جمع‌آوری و مقدار گالانتامین آن به روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. همچنین فاکتورهای موثر (نوع محیط کشت، طول دوره نوردهی، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد) بر باززایی انبوه پیاز نرگس در شرایط درون شیشه‌ای به منظور تولید ترکیب گالانتامین مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. بیشترین تعداد تولید برگ (۱۳/۳۳±۰/۳۳) و پیازچه (۳۱±۰/۵۸) در تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و بنزیل آدنین و در روشنایی بدست آمد درحالیکه بیشترین طول برگ (۲/۱۳±۰/۰۹ سانتی‌متر) در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بدست آمد. نتایج همچنین نشان داد که از پیازچه، اندام هوایی و کالوس بدست آمده از پیاز نرگس در سیستم درون شیشه به ترتیب ۰/۰۴، ۰/۰۰ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گالانتامین تولید می‌شود. مقایسه این نتایج با مقدار گالانتامین در پیاز گیاه مادری (۰/۱۲ بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) نشان دادکه اندام‌های به دست آمده از پیاز نرگس در سیستم درون شیشه‌ای در مجموع گالانتامین کمتری تولید می‌کنند. نتایج این تحقیق می‌تواند برای تولید این ترکیب دارویی در سیستم کشت‌های کنترل شده مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آلزایمر، نرگس ، گالانتامین، کشت بافت، کروماتوگرافی مایع

مقدمه

امروزه تهیهٔ برخی از مواد مؤثره فعال موجود در گیاهان که در صنایع دارویی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است، به طور مصنوعی و سنتزی امکان پذیر نبوده و تنها از طریق منابع گیاهی قابل استحصال و بهره‌برداری هستند. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی به ویژه در طی سالهای اخیر به دلیل اثبات اثرات جانبی مخرب و آلودگی‌های زیست محیطی روبه افزایش بوده و از سوی دیگر گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی هستند و بسیاری از کشورها کم یا زیاد از یک چنین منبعی برخوردارند که نوع، تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است .افزایش تجارت جهانی گیاهان دارویی، نسل گونه‌های گیاهی را با خطر انقراض مواجه ساخته است. استفاده مطلوب و منطقی از این منابع که به لحاظ فناوری بسیار کم هزینه‌تر و ساده‌تر از صنایع دارویی شیمیایی است، می‌تواند ضمن تأمین بخشی از نیازهای عمده بهداشتی و درمانی جامعه از خروج ارز جلوگیری نموده و مانع گسترش وابستگی به بیگانگان شود. بنابراین کاربرد روش‌های علمی و صحیح در روش‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت و بهره برداری صنعتی و اقتصادی آن، باعث حفظ این سرمایه های ملی بوده و می‌توان به توسعه پایدار در جامعه نیز دست یافت. گالانتامین، آلکالوئیدی بر پایه دی‌بنزوفوران است که از تعدادی از گیاهان خانواده نرگسیان شامل زنگوله تابستانی، گل‌برفی و نرگس جدا شده است (۲۱).

اثر دارویی این ماده در کنترل فعالیت‌های آنزیم استیل کولین استراز به اثبات رسیده است (۲۵). به علاوه اثرات مثبت این آلکالوئید در درمان بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر نیز گزارش شده است (۱۸). اگرچه سنتز شیمیایی گالانتامین به صورت موفقیت آمیز انجام شده است (Czollner et al., 1998) اما گیاهان منبع اصلی این ماده دارویی با ارزش باقی مانده‌اند. به دلیل افزایش تقاضا برای گالانتامین و محدودیت منابع گیاهی در دسترس، کشت درون شیشه‌ای گونه‌های گیاهی تولید کننده گالانتامین مورد توجه محققین به عنوان رویکرد تناوبی برای تولید پایدار قرار گرفته است (Codina et al., 2002; Pavlov et al., 2007). تاکنون دو گونه گیاهی نرگس و زنگوله تابستانی به منظور تولید درون شیشه‌ای گالانتامین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Pavlov et al., 2007 ؛ Sellés et al., 1997). از آنجایی که کشت‌های خوشه شاخساره توانایی بالایی برای سنتز این ترکیب را دارند، از آنها به عنوان یک مدل سیستمی برای مطالعه بر روی تولید درون شیشه‌ای این ترکیب استفاده می‌شود (Bergoñón et al., 1996 ؛ Berkov et al., 2005؛ Pavlov et al., 2007؛ Sellés et al., 1997؛ Sellés et al., 1999). اخیراً بیوراکتورهای آزمایشگاهی طراحی شده‌اند که عملکرد ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر گالانتامین را نشان داده‌اند (Pavlov et al., 2007) افزایش غلظت ساکارز (Sellés et al., 1997) و افزودن انگیزنده‌های زیستی (Colque et al., 2004)، افزایش ۳۰۰ درصدی میزان گالانتامین در خوشه شاخساره نرگس را منجر شده است (Diop et al., 2006). در تحقیق حاضر، جمعیتی از گیاه نرگس از رویشگاه آن درشهرستان کازرون (استان فارس) جمع‌آوری شده و پس از اندازه‌گیری مقدار گالانتامین بروش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)، فاکتورهای موثر (نوع محیط کشت، طول دوره نوردهی، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد) بر باززایی انبوه پیاز آن در شرایط درون شیشه‌ای به منظور تولید ترکیب گالانتامین مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق علاوه بر حفاظت از ذخایر ژنتیکی گونه های دارویی بومی و با ارزش کشور، راه را برای تولید نیمه صنعتی ترکیب گالانتامین در شرایط کنترل شده فراهم می نماید.

مواد و روش‌ها

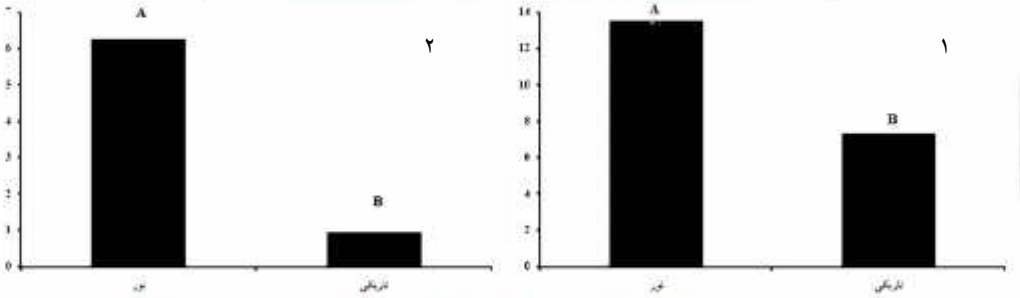
عصاره‌گیری، استخراج و اندازه‌گیری مقدار گالانتامین بر اساس روش‌های گزارش شده انجام گرفت (López et al., 2002; Mustafa et al., 2003; Sellés et al., 1999). برای این منظور، پیازهای جمع‌آوری شده به آزمایشگاه گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی شهید بهشتی منتقل گردید و در شرایط سایه و دمای اتاق به طور کامل خشک شدند. نمونه‌های کشت بافتی شامل پیازچه‌های تولید شده، کالوس و شاخساره‌های تولید شده نرگس نیز به همین ترتیب خشک و در نهایت از همه این نمونه‌ها عصاره‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با استفاده از تیمارهای هورمونی شامل غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین به همراه غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید، هر کدام در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین غلظت‌های متفاوت از اسید جیبرلین در همین سطوح غلظت‌ها، به همراه غلظت‌های مشابه بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید انجام گرفت. ارزیابی پارامترهای مورد نظر پس از چهار هفته انجام گرفت. همچنین در کنار این آزمایش از محیط اِم اِس فاقد تنظیم کننده رشد، به تعداد ۳ تکرار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این آزمایش از لحاظ شرایط نوری نیز در دو تیمار؛ تیمار اول دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تیمار دوم شرایط تاریکی کامل مورد ارزیابی قرار گرفت. فتوپریود به میزان ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم گردید. منبع نور مورد استفاده، لامپ‌های فلوئورسنت با نور سفید بود که شدت نور ۵۰۰۰ لوکس در سطح هر نمونه را تأمین کرد. جهت تأمین تاریکی در همان اتاقک رشد، ریزنمونه‌ها را با چندین لایه روکش پلاستیکی تیره پوشانده تا شرایط تاریکی به طور کامل مهیا شود.

نتایج و بحث

پس از تهیه عصاره همه نمونه‌ها، آنها را در سه تکرار به دستگاه اِچ پی اِل سی برای شناسایی و تعیین مقدار گالانتامین تزریق و برای محاسبه غلظت گالانتامین، میانگین سطح زیر منحنی پیک‌ها را محاسبه نمودیم. پیک حاصل در حدود زمان ۲۱ دقیقه مربوط

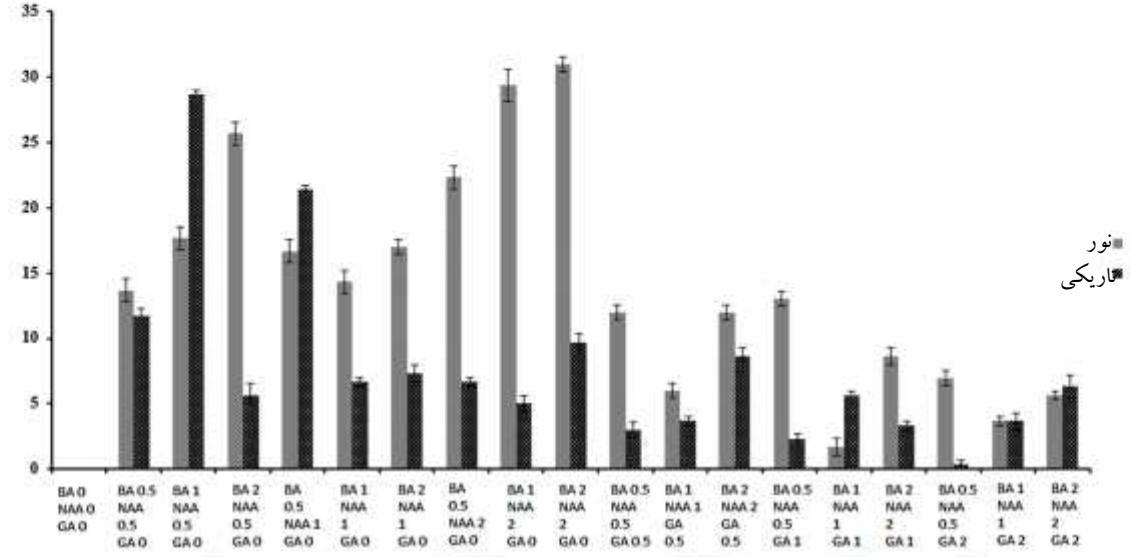
به گالانتامین بود. مقدار گالانتامین در پیاز نرگس‌های جمع آروری شده به میزان ۰/۱۲ بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک گیاهی اندازه گیری شد و در ادامه بر اساس نتایج به دست آمده نشان داده شدکه در پیازچه، اندام هوایی و کالوس بدست آمده از نرگس کازرون در سیستم درون شیشه به ترتیب ۰/۰۴، ۰۰/۰ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گالانتامین تولید می‌شود.

بررسی ترکیبات هورمونی مختلف در تولید پیازچه روشن ساخت که نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشدِ گیاهی بر القای پیازچه و میزان رشد گیاهچه‌ها تأثیرگذار است. در راستای این آزمایش، بررسی عملکرد و تاثیر سه هورمون بنزیل آدنین، نفتالین استیک اسید و همچنین اثر غلظت‌های مختلف جیبرلین همراه با غلظت‌های برابر بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید بر روی باززایی پیازچه، تولید اندام هوایی از ریزنمونه‌های دو فلسی در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و همچنین در شرایط تاریکی کامل انجام گرفت که طی آن مشخص گردید اثر این تیمارهای هورمونی و نوری و همچنین اثر متقابل تیمار هورمونی و نوری بر تمامی موارد اندازه‌گیری شده معنی‌دار می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین تیمار نور و تاریکی، در تعداد پیازچه و اندام هوایی و نسبت هر کدام از این پارامترها و همچنین طول اندام هوایی نشان داد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها تعداد بیشتری پیازچه و اندام هوایی در شرایط نور تولید شدند (شکل ۱). همچنین اثر متقابل نور و تیمارهای هورمونی در رابطه با تعداد پیازچه و اندام هوایی معنی‌دار بود. در این راستا بیشترین تعداد پیازچه (۰/۵۸±۳۱) در تیمار هورمونی ۲ گرم در لیتر از هر دو هورمون بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید و در شرایط روشنایی به دست آمد (نمودار ۱) و بیشترین تعداد اندام هوایی (۰/۳۳±۱۳/۳۳) نیز مربوط به همین تیمار هورمونی و در شرایط روشنایی می‌باشد (نمودار ۲)، اما بیشترین طول اندام هوایی (۰/۰۹±۲/۱۳ سانتی متر) در تیمار هورمونی بنزیل آدنین ۲ و نفتالین استیک اسید ۰/۵ و در نور به دست آمد.

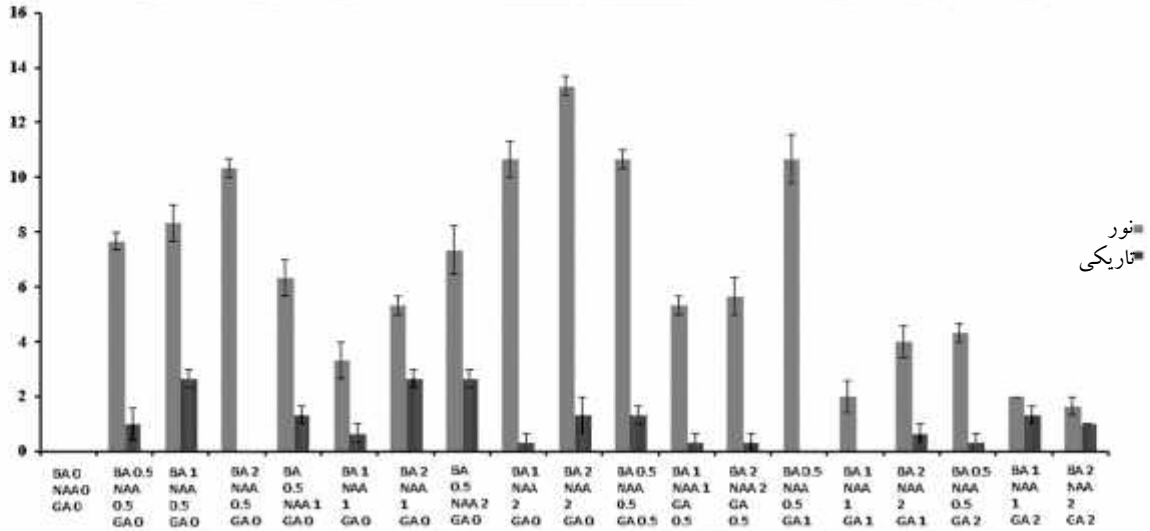


شکل ۱- مقایسه میانگین تعداد پیازچه (۱) و اندام هوایی (۲) تولید شده در سیستم کشت درون شیشه‌ای

شکل ۲- تولید پیازچه در تیمار هورمونی 2 BA و 2 NAA میلی‌گرم بر لیتر



نمودار ۱- تعداد پیازچه‌های تولید شده در تیمارهای مختلف هورمونی و روشنایی در سیستم کشت درون شیشه‌ای



نمودار ۲- میانگین طول اندام هوایی تولید شده در تیمارهای مختلف هورمونی و نوری

منابع

1. Bergoñón, S. Codina, C. Bastida, J. Viladomat, F., Melé, E. 1996. Galanthamine production in "shoot-clump" cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol, 45. pp, 191-199.
2. Berkov, S. Pavlov, A. Ilieva, M. Burrus, M. Popov, S., Stanilova, M. 2005. GC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochemical Analysis*, vol, 16. pp. 98-103.
3. Cherkasov, O. 1997. Plant sources of galanthamine. *Khim-Farm. Zhur*, vol, 11. pp, 84-87.
4. Codina, C. 2002. in: Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles: *Narcissus* and Daffodil, The Genus *Narcissus*, (Hanks G., Ed.). Taylor and Francis, London and New York, 215-241.
5. Colque, R. Viladomat, F. Bastida, J., Codina, C. 2004. Improved Production of Galanthamine and Related Alkaloids by Methyl Jasmonate in *Narcissus confusus* Shoot-Clumps. *planta medica*, vol, 70. pp, 1180-1188.
6. Czollner, L. Frantsits. W. Kuenburg, B. Hedenig, V. Jordis, U., Froehlich, J. 1998. New kilogram-synthesis of the anti-alzheimer drug (−)-galanthamine. *Tetraheron letters*, vol, 39. pp, 2087-2088.

7. Diop, M.F. Ptak, A. Chrétien, F. Henry, M. Chapleur, Y., Laurain-Mattar, D. 2006. Galanthamine content of bulbs and in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L. *Natural Product Communications*, vol, 1. pp, 475-479.
8. López, S. Bastida, J. Viladomat, F., Codina, C. 2002. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus*. *phytochem analysis*, vol, 13. pp, 311-315.
9. Maelicke, A. Samochocki, M. Jostock, R. Fehrenbacher, A. Ludwig, J. Albuquerque, E.X., Zerlin, M. 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimers disease. *Biological Psychiatry*, vol, 49. pp, 279-288.
10. Mustafa, N.R. Rhee, I.K., Verpoorte, R. 2003. Rapid method for determination of galanthamine in Amaryllidaceae plants using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol, 26. pp, 3217-3233.
11. Pavlov, A. Berkov, S. Courot, E. Gocheva, T. Tuneva, D. Pandova, B. Georgiev, V. Yanev, S. Burrus, M., Ilieva, M. 2007. Galanthamine production by *Leucojum aestivum in vitro* systems. *Process Biochemistry*, vol, 42. pp, 734-739.
12. Pavlov, A. Berkov, S. Courot, E. Gocheva, T. Tuneva, D. Pandova, B. Georgiev, V. Yanev, S. Burrus, M., Ilieva, M. 2007. Galanthamine production by *Leucojum aestivum in vitro* systems. *Process Biochemistry*, vol, 42. pp, 734-739.
13. Sellés, M. Bergoñón, S. Viladomat, F. Bastida, J., Codina, C. 1997. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tissue and Organ Cultures*, vol, 49. pp, 129-136.
14. Sellés, M. Viladomat, F. Bastida, J., Codina, C. 1999. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, vol, 18. pp, 646-651.

In vitro bulb Induction in *Narcissus tazetta* for the production of galantamine as an anti-Alzheimer compound

M.R. Khonakdari[1], M.H. Mirjalili[1*], M.M. Farimani[2]

1- Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin, Tehran, Iran. 2- Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin, Tehran, Iran.

*Corresponding author: : m-mirjalili@sbu.ac.ir

Abstract

Narcissus tazetta is a bulbous plant, which in addition of ornamental and landscape applications, contain different active substances such as alkaloids and their various pharmacological effects have been reported. Galantamine (GAL) is the most important alkaloid in the plant which has been introduced as acetylcholinesterase enzyme inhibitor for the prevention and treatment of Alzheimer's. In the present study, *N. tazetta* bulbs were collected from its habitats (Kazeroon, Fars Province) and its GAL content was analyzed by the high performance liquid chromatography (HPLC). The effect of different factors such as medium type, light exposure duration as well as, the type and concentration of plant growth regulators) on in vitro bulblet multiplication and GAL production was studied. The highest number of leaves (13.33 ± 0.33) and bulblets (31 ± 0.58) were obtained on the MS medium containing 2 mg/L NAA and 2 mg/L BAP under lighting, while the maximum leaf length (2.13 ± 0 0.09 cm) was obtained on the medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 2 mg/L BAP. The results were also showed that *in vitro* proliferated bulblets, shoots and calli of the plant produced 0.04, 0.00 and 0.02 mg/g DW, respectively. In comparison with the amount of GAL, our results showed that *in vitro* proliferated materials produced GAL less than the mother plant (0.12 mg/g DW). These findings can be considered for the production of GAL as a valuable medicinal compound through controlled conditions.

Key words: Alzheimer's disease, narcissus, galantamine, tissue culture, liquid chromatography