بهینه سازی شرایط کشت برای بیشینه تولید ترکیب ضد سرطانی کریپتوفایسین از سیانوباکتریوم خاکزی *نوستوک*

بهاره نوروزی، مریم منصف شکری

خلاصه

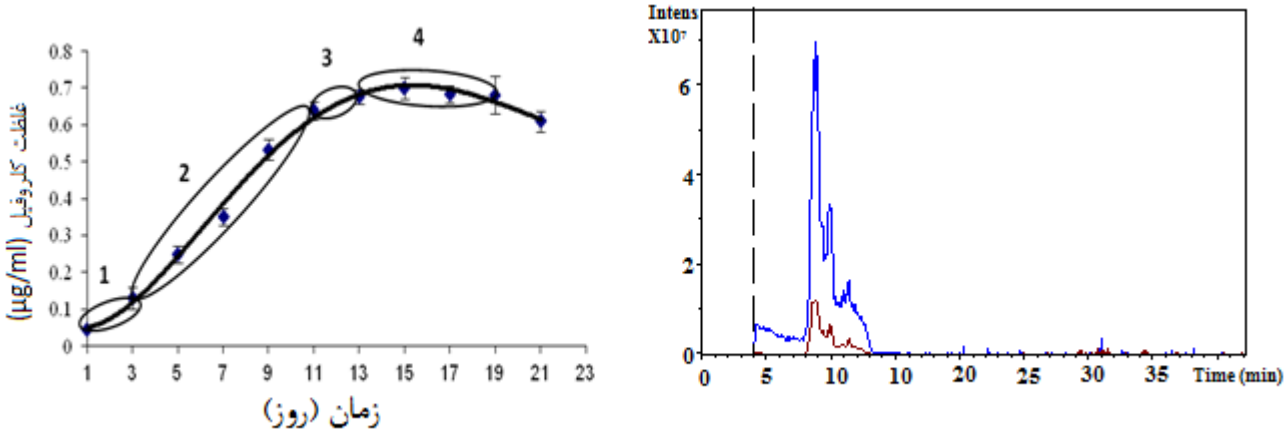
سیانوباکتری‌ها، منابع غنی از داروهای ضد سرطانی هستند. امروزه تحقیق‌های وسیعی برای کشف متابولیت‌های ثانویه با خاصیت ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی و رشد تومورها در حال انجام است. در این میان، کریپتوفایسین‌ها، قدیمی ترین کاندیدای عمده برای تولید داروهای ضد سرطانی جدید هستند، که برای اولین بار از سیانوباکتریوم*نوستوک* استخراج شده است. کاربرد وسیع آنها در بی ثبات کردن توبولین‌ها، حمله به رشته‌های توبولین و اکتین در سلول‌های یوکاریوتیک، فعالیت ضد تکثیر و ضد رشد در شرایط آزمایشگاهی در برابر بسیاری از بیماری‌ها، مثل سرطان خون انسانی، غدد لنفاوی و توموری به اثبات رسیده است. این ترکیب از تکثیر سلول های زیان آور انسانی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می-کند و در محدوده‌ٔ وسیعی از بیماری‌های تومور حیوانی نیز موثر است. متاسفانه، تولید کریپتوفایسین به طور سنتتیک به دلیل ساختمان پیچیده‌ای که دارد، بسیار هزینه بر است. به رغم تولید طیف وسیعي از متابولیت‌هاي ثانویه توسط سیانوباکتریها و قابلیت رشد پذیري بالاي آنها، تاکنون منابع بیوتکنولوژي آنها کمتر مورد بهره برداري قرار گرفته است. لذا در این بررسی کوشیده شده است تا بعد از شناسایی ترکیب ضد سرطانی کریپتوفایسین، بهینه‌سازی محیط کشت برای بیشینه تولید این ترکیب از سیانوباکتریوم*نوستوک* انجام گیرد.

مواد و روش کار

در این مطالعه، جداسازی و شناسایی کریپتوفایسین از سویه خاکزی *Nostoc* sp. KY303912 جمع آوری شده از مجموعه کشت سیانوباکتری های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات Cyanobacteria Culture Collection (CCC) انجام گردید، سویه مورد نظر در محیط کشت BG-11 فاقد منابع نیتروژنه (دیازوتروف) و دارای منابع نیتروژنه (غیر دیازوتروف)، در دمای ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتیگراد و شرایط فتواتوتروفیک، میکسوتروفیک و هتروتروفیک و شدت نوری۱۵۰ و ۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، کشت گردید (شکل یک). بررسی‌های میکروسکوپی، هر دو روز برای بررسی‌های مورفولوژیک ریسه‌ها و به منظور اطمینان از خلوص و اگزنیک بودن سویه مورد مطالعه انجام گردید (شکل یک). به منظور آگاهی از سیکل زندگی سویه مورد مطالعه، غلضت کلروفیل در طول بیست و یک روز سنجیده شد (شکل دو). سپس جداسازی کریپتوفایسین در طول فاز لگاریتمی، با کلرید متیلن انجام گردید. مخلوط حاصله به مدت ۲۴ ساعت بی حرکت ماند، تا جداسازی دو فاز به طور کامل انجام گیرد. سپس فاز آلی حذف و فیلتراسیون انجام گردید.از سولفات منیزیم، برای جداسازی فاز آلی استفاده و سپس رسوب حاصله خشک گردید. سپس نسبت ٤:١ استونیتریل و کلرید متیلن به سلولهای خشک شده اضافه گردید و حلال آلی به دست آمده، تحت فشار و به کمک مکنده، کاملا خشک گردید. برای جداسازی کریپتوفایسین، از کروماتوگرافی فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC) و حلال‌های اتیل استات- ایزوپروپانول و استونیتریل استفاده گردید. علاوه بر آن میزان کریپتوفایسین، در شرایط مختلف رشدی با استفاده از سطح زیر هر منحنی توسط LC-M (کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتری جرمی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

شکل۱: کشت سویه*نوستوک* در شرایط فتواتوتروف و شدت نوری ۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه (تصویر سمت چپ)،فوتومیکروگرافهای سویه *Nostoc* sp. KY303912در شرایط فتواتوتروف (تصویر وسط) و هتروتروف (تصویر سمت راست)(400X)



شکل ۲ :منحني رشد سویه*نوستوک* بر اساس غلظت کلروفیل در طول ۲۱ روز از سیکل زندگی در شرایط فتواتوتروفیک.بارهای عمودی نشان دهنده انحراف از میانگین داده های حاصل از سه تکرار هستند. شکل نشان میدهد که سویه مورد نظر تا روز ۱۳ در فاز لگاریتمی است (شکل سمت چپ). کروماتوگرام حاصل از پیک مرتبط با ترکیب کریپتوفایسین توسط دستگاه LC-MS در شدتهای نوری ۱۵۰ (نمودار با سطح زیر منحنی بیشتر) و ۵۰ (نمودار با سطح زیر منحنی کمتر) میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه. محور X زمان را بر حسب دقیقه و محور Y شدت پیام رسانی یون (Signal intensity)را با استفاده از آشکارسازهای محاسبه کننده شدت برحسب تعداد به ازای ثانیه (cps) نشان می دهد (شکل سمت راست).

بحث و منابع

نتایج حاصل از آنالیزهای HPLC و LC-MS نشان داد که میزان تولید کریپتوفایسین، هیچگونه همبستگی معنی داری با رشد در محیطهای دارای منابع نیتروژنه و فاقد منابع نیتروژنه ندارد، این در حالی است که بیشترین میزان کریپتوفایسین درون سلولی (۳/۲۱ میلی گرم بر لیتر)، در دوشرایط میکسوتروفی و در شدت نوری ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه تولید می‌شود (شکل دو). در سال‌های اخیر تحقیق‌های فراوانی در زمینه جداسازی ترکیب‌های فعال زیستی از سیانوباکتری‌ها انجام شده است. متاسفانه، بیشتر بررسی‌ها در زمینه تاثیر ترکیب‌های فعال زیستی جدا شده، تنها در آزمایش های *in vitro* کارایی دارند، چون این ترکیبات یا خیلی سمی هستند یا در محیط *in vivo* بسرعت غیر فعال می‌شوند، به همین دلیل است که

بیشتر این ترکیبات، کاربرد کمی در پزشکی دارند. اما می‌توانند، راهنمایی برای تولید آنتی بیوتیک‌های سنتتیک جدید با کاربرد در پزشکی باشند. با این حال، اخیرا ترکیب ضد سرطانی کریپتوفایسین از سویه دیگری از *Nostoc* sp. GSV 224 جدا شده است که دارای فعالیت بالایی از سیتوتوکسیکی در برابر سلول‌های توموری انسانی و همین طور طیف وسیعی از تومورهای جامد حساس و مقاوم به دارو در موش و انسان است. به همین دلیل، انجام چنین تحقیقاتی برای اولین بار در کشور که شامل شناسایی، جداسازی و همینطور بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید بیشترین میزان کریپتوفایسیتن از سویه‌های مختلف *نوستوک* است، می‌تواند گامی مهم در پیشرفت صنعت داروسازی در کشور قلمداد گردد.

Chaganty, S., Golakoti, T., Heltzel, C., Moore, R. E and Yoshida, W. Y. 2004.Isolation and Structure Determination of Cryptophycins 38, 326, and 327 from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224. J. NAT. PROD, 67: 1403-1406.

Liang, J., Moore, R. E., Moher, E. D., Munroe, J. E., Al-awar, R. S., Hay, D. A., Varie, D. L., Zhang, T. Y., Aikins, J. A., Martinelli, M. J., Shih, C., Ray, J. E., Gibson, L. L., Vasudevan, V., Polin, L., White, K., Kushner, J., Simpson, C., Pugh, S and Corbett, T. H. 2005. Cryptophycins-309, 249 and other cryptophycin analogs: Preclinical efficacy studies with mouse and human tumors. INVEST NEW DRUG, 23: 213–224.

Liu, L., Jokela, J., Nowruzi, B., Fewer, D., Wahlsten, M., Permi, P and Sivonen, K. Nostoginosins: trypsin inhibitors from *Nostoc* sp. strain FSN. Journal of Natural Products2015; **77**(8): 1784-1790.

Magarvey, N. A., Beck, Z. Q., Golakoti, T., Ding, Y., Huber, U., Hemscheidt, T. K., Abelson, D., Moore, R. E and Sherman, D. H. 2006.Biosynthetic Characterization and Chemoenzymatic Assembly of the Cryptophycins.Potent Anticancer Agents from *Nostoc*Cyanobionts.ACS CHEM BIOL, 12: 766-779.

Prasanna, R., Sood, S., Jaiswal, P., Nayak, S., Gupta, V., Chaudhary, V., Joshi, M and Natarajan, C. 2010.Rediscovering Cyanobacteria as Valuable Sources of Bioactive Compounds (Review).APPL BIOCHEM MICRO, 46: 119-134.

Rastogi, R. P and Sinha, R. P. 2009.Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites.BIOTECHNOL. ADV, 27: 521-539.

Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K and Mohapatra, T. M. 2011. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. J ANTIBIOT (TOKYO),6: 401-412.

Subbaraju, G. V., Golakoti, T., Patterson, G. M. L and Moore, R. E. 1997.Three New Cryptophycins from *Nostoc* sp. GSV 224. J. NAT. PROD, 60: 302-305.

Tidgewell, K., Clark, B. R and Gerwick, W. H. 2009.The natural products chemistry of cyanobacteria. In: Mander LN, Liu HW (eds). Comprehensive Natural Products Chemistry II, Volume 8. London: Pergamon Press.