فهرست مطالب

۱- فصل اول ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۲- فصل دوم ۵

۲-۱- گیاهان دارویی ۶

۲-۱-۱- تعریف گیاهان دارویی ۶

۲-۱-۲- تاریخچه گیاهان دارویی ۶

۲-۲- سرطان ۷

۲-۲-۱- گیاهان دارویی و درمان سرطان‌ها ۸

۲-۳- گیاه پروانش ۱۰

۲-۳-۱- خانواده خرزهره ۱۱

۲-۳-۲- مشخصات گیاه پروانش ۱۲

۲-۳-۳- نیازهای اکولوژیکی ۱۳

۲-۳-۴- روش کاشت ۱۴

۲-۳-۵- خواص دارویی گیاه پروانش ۱۶

۲-۴- انواع متابولیت‌ها در گیاهان ۱۶

۲-۴-۱- متابولیت‌های اولیه ۱۷

۲-۴-۲- متابولیت‌های ثانویه ۱۷

۲-۵- راه‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ۲۰

۲-۵-۱- الیسیتور ۲۰

۲-۵-۲- افزودن پیش‌سازها ۲۱

۲-۵-۳- بهینه‌سازی محیط کشت ۲۱

۲-۵-۴- کشت اندام ۲۱

۲-۵-۵- کشت ریشه موئین ۲۲

۲-۵-۶- مهندسی متابولیک ۲۲

۲-۵-۷- استفاده از بیوراکتورها در تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه ۲۳

۲-۶- آلکالوئیدها ۲۳

۲-۷- مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه ۲۴

۲-۷-۱- مسیر بیوسنتز ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها (TIAs) ۲۵

۲-۷-۲- ژن‌های تنظیم کننده تولید ایندول آلکالوئیدها ۲۷

۲-۸- ساختار و عمل وین‌بلاستین ۲۹

۲-۹- ساختار و عمل وین کریستین ۲۹

۲-۱۰- سوسپانسیون سلولی و متابولیت‌های ثانویه ۳۰

۲-۱۰-۱- انواع کشت‌های سوسپانسیونی ۳۱

۲-۱۱- فناوری نانو ۳۲

۲-۱۱-۱- تاریخچه فناوری نانو ۳۳

۲-۱۱-۲- نانوذرات ۳۴

۲-۱۲- نانوبیوتکنولوژی ۳۵

۲-۱۲-۱- کاربرد بیوتکنولوژی در نانوتکنولوژی و نانوتکنولوژی در بیوتکنولوژی ۳۶

۲-۱۲-۲- کاربرد نانوتکنولوژی در کشاورزی ۳۷

۲-۱۳- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۳۷

۲-۱۳-۱- بررسی تاثیر الیسیتورهای زیستی در کشت سوسپانسیون سلولی پروانش ۳۷

۲-۱۳-۲- بررسی تاثیر الیسیتورهای غیرزیستی در کشت سوسپانسیون سلولی پروانش ۳۸

۲-۱۴- هدف از پژوهش ۴۲

۳- فصل سوم ۴۳

۳-۱- آماده‌سازی مواد گیاهی برای تهیه سوسپانسیون سلولی ۴۴

۳-۱-۱- مواد گیاهی ۴۴

۳-۱-۲- استریل کردن آب و وسایل مورد استفاده ۴۴

۳-۱-۳- ضدعفونی برگ‌ها ۴۵

۳-۱-۴- هورمون‌های مورد استفاده ۴۵

۳-۱-۵- محیط کشت مورد استفاده ۴۵

۳-۱-۶- نحوه کشت ریزنمونه‌ها (القا کالوس) ۴۶

۳-۲- کشت سوسپانسیون سلولی ۴۶

۳-۲-۱- رسم منحنی رشد ۴۶

۳-۳- الیسیتورهای مورد استفاده ۴۶

۳-۳-۱- تهیه استوک نانوذرات روی و کبالت ۴۷

۳-۳-۲- اعمال الیسیتورها ۴۷

۳-۳-۳- تثبیت کردن نمونه‌ها ۴۷

۳-۴- استخراج RNA کل ۴۸

۳-۴-۱- ضدعفونی وسایل و محلول‌های مورد استفاده جهت استخراج RNA کل ۴۸

۳-۴-۲- مواد و محلول‌ها ۴۸

۳-۴-۳- تجهیزات مورد نیاز ۴۸

۳-۴-۴- روش کار ۴۹

۳-۵- تعیین کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی ۴۹

۳-۵-۱- اسپکتروفتومتری RNA کل استخراجی ۵۰

۳-۵-۲- الکتروفورز ژل آگارز ۵۱

۳-۶- هم‌غلظت کردن RNAها ۵۲
۳-۷- حذف آلودگی ژنومی ۵۲
۳-۸- سنتز DNA مکمل (cDNA) ۵۳
۳-۸-۱- مواد و محلول‌ها ۵۳
۳-۸-۲- تجهیزات مورد نیاز ۵۳
۳-۸-۳- روش کار ۵۴
۳-۸-۴- تعیین کمیت و کیفیت cDNA سنتز شده ۵۴
۳-۹- طراحی آغازگر ۵۵
۳-۱۰- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۵۵
۳-۱۰-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی بیان ژن‌ها ۵۵
۳-۱۰-۲- بررسی محصولات واکنش SQ-RT-PCR ۵۷
٤- فصل چهارم ۵۸
۴-۱- ضدعفونی برگ و القای کالوس ۵۹
۴-۲- تهیه سوسپانسیون سلولی ۵۹
۴-۲-۱- منحنی رشد ۶۰
۴-۳- بررسی کیفیت RNA کل استخراج شده ۶۱
۴-۳-۱- حذف آلودگی ژنومی با استفاده از آنزیم DNase I ۶۲
۴-۴- سنتز cDNA ۶۲
۴-۵- بهینه‌سازی دمای اتصال برای ژن ۱۸S rRNA و سایر آغازگرهای اختصاصی ۶۳
۴-۶- بررسی بیان ژن *STR* ۶۴
۴-۶-۱- تجزیه واریانس بیان ژن *STR* ۶۴
۴-۶-۲- مطالعه اثر زمان بر بیان ژن *STR* ۶۴
۴-۶-۳- مطالعه اثر غلظت بر بیان ژن *STR* ۶۶

۴-۶-۴-مطالعه اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و نانواکسید کبالت بر بیان ژن *STR*. ۶۸

۴-۷- بررسی بیان ژن *DAT*..... ۷۲

۴-۷-۱- تجزیه واریانس بیان ژن *DAT*..... ۷۲

۴-۷-۲- مطالعه اثر زمان بر بیان ژن *DAT*..... ۷۳

۴-۷-۳- مطالعه اثر غلظت بر بیان ژن *DAT*..... ۷۵

۴-۷-۴- مطالعه اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و نانواکسید کبالت بر بیان ژن *DAT* ۷۷

۴-۸- بررسی بیان ژن *D4H*..... ۸۱

۴-۸-۱- تجزیه واریانس بیان ژن *D4H*..... ۸۱

۴-۸-۲- مطالعه اثر زمان بر بیان ژن *D4H*..... ۸۲

۴-۸-۳- مطالعه اثر غلظت بر بیان ژن *D4H*..... ۸۴

۴-۸-۴-مطالعه اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و نانواکسید کبالت بر بیان ژن *D4H* ۸۶

۵- فصل پنجم..... ۹۱

۵-۱- کشت سوسپانسیون سلولی پروانش..... ۹۲

۵-۲- بررسی بیان ژن *STR*..... ۹۲

۵-۳- بررسی بیان ژن *DAT*..... ۹۳

۵-۴- بررسی بیان ژن *D4H*..... ۹۴

۵-۵- جمع بندی..... ۹۵

۵-۶- پیشنهادها..... ۹۶

فهرست منابع..... ۹۷

پیوست‌ها..... ۱۰۴

فهرست جدول‌ها

جدول (۲-۱). ضدسرطان‌های گیاهی و ماده‌موثره آن‌ها ۱۰

جدول (۲-۲). مقدار کلی آلکالوئید در اندام‌های مختلف گیاه پروانش ۱۴

جدول (۲-۳). فهرستی از گرانترین داروهای گیاهی ۱۹

جدول (۳-۱). تیمار هورمونی مورد استفاده ۴۵

جدول (۳-۲). الیسیتورهای مورد استفاده ۴۷

جدول (۳-۳). تیمارهای مورد استفاده برای بهینه‌سازی مقدار آنزیم DNase I، زمان و دمای مناسب فعالیت..... ۵۲

جدول (۳-۴). آغازگرهای مورد استفاده ۵۵

جدول (۳-۵). زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف واکنش SQ-RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی هر ژن..... ۵۶

جدول (۳-۶). مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۵۷

جدول (۴-۱). مقایسه میانگین بیان ژن *STR* تحت تیمارهای مختلف نانواکسید کبالت و نانواکسید روی در زمان‌های مختلف ۶۴

جدول (۴-۲). مقایسه میانگین بیان ژن *DAT* تحت تیمارهای مختلف نانواکسید کبالت و نانواکسید روی در زمان‌های مختلف ۷۳

جدول (۴-۳). مقایسه میانگین بیان ژن *D4H* تحت تیمارهای مختلف نانواکسید کبالت و نانواکسید روی در زمان‌های مختلف..... ۸۲

فهرست شکل‌ها

شکل (۲-۱). تنوع گونه‌های گیاه پروانش ۱۵

شکل (۲-۲). سازماندهی بیوسنتز ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها در پروانش ۲۶

شکل (۲-۳). مسیر بیوسنتز وین‌بلاستین و وین کریستین و جایگاه قرارگیری ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق..... ۲۸

شکل (۲-۴). ساختار وین‌بلاستین ۳۰

شکل (۲-۵). ساختار وین کریستین ۳۰

شکل (۳-۱). مواد گیاهی..... ۴۴

شکل (۴-۱). القا کالوس از بافت برگ گیاه پروانش بعد از دو هفته ۵۹

شکل (۴-۲). سوسپانسیون سلولی..... ۶۰

شکل(۴-۳). برخی از RNAهای استخراج شده روی ژل آگارز (۱/۵ درصد) ۶۱

شکل (۴-۴). بررسی صحت سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ۱۸S rRNA ۶۲

شکل (۴-۵). بهینه‌سازی دمای اتصال برای آغازگر ژن ۱۸S rRNA..... ۶۳

شکل (۴-۶). بیان ژن‌های *STR*، *DAT*، *D4H* و ۱۸ S rRNA در گیاه شاهد ۶۹

شکل (۴-۷). بیان ژن‌های *STR*، *DAT* و *D4H* با استفاده از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی در بازه زمانی ۸ ساعت. ۷۰

فهرست نمودارها

نمودار (۴-۱) منحنی رشد بر اساس وزن تر. ۶۰
نمودار (۴-۲) منحنی رشد بر اساس وزن خشک. ۶۱
نمودار (۴-۳). میزان بیان ژن *STR* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید روی. ۶۵
نمودار (۴-۴). میزان بیان ژن *STR* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید کبالت. ۶۶
نمودار (۴-۵). میزان بیان ژن *STR* در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی. ۶۷
نمودار (۴-۶).میزان بیان ژن *STR* در غلظت‌های مختلف نانواکسید کبالت. ۶۸
نمودار (۴-۷). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *STR* در زمان ۸ ساعت پس از اعمال تیمار. .. ۶۹
نمودار (۴-۸). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *STR* در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار.. ۷۰
نمودار (۴-۹). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *STR* در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار..۷۱
نمودار (۴-۱۰). مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن *STR* در تمام زمان‌ها، بعد از اعمال الیسیتورها. ۷۲
نمودار (۴-۱۱). میزان بیان ژن *DAT* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید روی. ۷۴
نمودار (۴-۱۲). میزان بیان ژن *DAT* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید کبالت ۷۵
نمودار (۴-۱۳). میزان بیان ژن *DAT* در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی. ۷۶
نمودار (۴-۱۴). میزان بیان ژن *DAT* در غلظت‌های مختلف نانواکسید کبالت. ۷۷
نمودار (۴-۱۵). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *DAT* در زمان ۸ ساعت پس از اعمال تیمار. ۷۸
نمودار (۴-۱۶). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *DAT* در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار. ۷۹
نمودار (۴-۱۷). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *DAT* در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار. ۸۰
نمودار (۴-۱۸). مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن *DAT* در تمام زمان‌ها، بعد از اعمال الیسیتورها ۸۱
نمودار (۴-۱۹). میزان بیان ژن *D4H* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید روی. ۸۳

نمودار (۴-۲۰). میزان بیان ژن *D4H* در بازه‌های زمانی مختلف بعد از اعمال نانواکسید کبالت. ۸۴

نمودار (۴-۲۱). میزان بیان ژن *D4H* در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی. ۸۵

نمودار (۴-۲۲). میزان بیان ژن *D4H* در غلظت‌های مختلف نانواکسیدکبالت. ۸۶

نمودار (۴-۲۳). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *D4H* در زمان ۸ ساعت پس از اعمال تیمار. ۸۷

نمودار (۴-۲۴). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *D4H* در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار. ۸۸

نمودار (۴-۲۵). تاثیر غلظت‌های مختلف الیسیتورها بر بیان ژن *D4H* در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار. ۸۹

نمودار (۴-۲۶). مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر شدت نسبی باند برای ژن *D4H* در تمام زمان‌ها، بعد از اعمال الیسیتورها. ۹۰

اختصارها

VBL	Vinblastine
VCR	Vincristine
UV	Ultra violet
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
pH	Power of hydrogen
TIA_S	Terpenoid indole alkaloids
MIA_S	Mono terpenoid indole alkaloids
MVA	Mevalonic
MEP	Methylerythriol phosphate
TDC	Triptophan decarboxylase
G10H	Geraniol 10 hydroxylase
IPAP	Internal phloem associated parenchyma
STR	Strictosidine synthase
SGD	Stritosidine β-D glocosidase
D4H	Desacetoxyvindoline 4-hydroxylase
DAT	Deacetylvindoline 4-o- acetyl transferase
2,4-D	2,4-dicholophenoxyacetic acid
BAP	Bansyl amino porine
MJ	Methyl jasmonate
GA_3	Giberlic acid
PCR	Polymerase chain reaction
MS	Murashige and skoog
NAA	Naphthalene acetic acid
IAA	indole-3-acetic acid
KIN	Kinetin
SA	Salicilic acid
IBA	indolebutyric acid
SOD	Superoxide dismutase
APX	Ascorbate peroxidase
CAT	Catalase
AS	Anthranilate synthase

CM	Chorismate mutase
PAL	Phenylalanine ammonia lyase

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

سرطان[1] به عنوان یک بیماری با اساس ژنتیکی یکی از اصلی‌ترین نگرانی‌های جوامع بشری است. سالانه درصد بالایی از مرگ و میر در جوامع مختلف بر اثر سرطان گزارش می‌شود. بعد از بیماری‌های قلبی عروقی دومین عاملی که موجب مرگ و میر انسان‌ها در دنیا می‌شود، سرطان است.

در سرتاسر جهان حدود ۱۰ میلیون نفر هر سال مبتلا به بیماری سرطان تشخیص داده می‌شوند. یعنی هر سال ۱۰ میلیون نفر به بیماران سرطانی اضافه می‌شود. بیش از ۶ میلیون نفر در اثر ابتلا به سرطان جان سپرده و بالغ بر ۲۲ میلیون نفر در جهان از سرطان رنج می برند. سرطان سومین علت مرگ و میر در ایران است که متأسفانه همچنان رو به افزایش می‌باشد و هزینه‌های بسیار زیادی، هم به خانواده‌ها و هم به دولت‌ها تحمیل کرده است.

رویکرد انسان به فرآورده‌های دارویی گیاهان پیشینه عمیقی دارد. در حال حاضر یک چهارم داروهای مورد استفاده در دنیا، منشأ گیاهی دارند و این میزان رو به افزایش است. براساس گزارش بانک جهانی میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ به مرز ۵ تریلیون دلار خواهد رسید.

استفاده از گیاهان در درمان انواع سرطان‌ها دارای تاریخچه طولانی است. بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی که در درمان سرطان استفاده می‌شوند، گزارش شده‌اند. این مسئله که بالغ بر ۶۰٪ عوامل مفید ضد سرطانی رایج از منابع طبیعی مانند گیاهان، موجودات زنده دریایی و میکروارگانیسم‌ها مشتق می‌شوند، بسیار دارای اهمیت است. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰٪ از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی[2] استفاده می‌کنند. بعلاوه برخی از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند. اگرچه تقاضا برای این ترکیبات افزایش یافته است اما برخی از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آن‌ها با مشکلاتی مواجه است. غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن وکشت زراعی این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راهکارهای

1- Cancer
2 - Medicinal plants

فناوری زیستی[1] جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. فناوری زیستی با بهر ه‌گیری از علوم مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و... با استفاده از راهکارهای کشت سلول‌ها، انـدام‌هـا و بافـت‌هـا، مهندسی ژنتیک و نشانگرهای مولکولی قادر است کارآیی گیاهان را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهـت تولیـد دارو افزایش دهد.

ترکیباتی که مسئول خاصیت دارویی هستند، معمولا متابولیت‌های ثانویه[2] هستند. متابولیت‌های ثانویه، مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای هستند که گیاهان در طول حیات خود تولید می‌نمایند؛ ولی در رشد و نمو و فعالیت‌های حیـاتی آنها نقشی ندارند و به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده‌افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی در گیاه تولیـد می‌شوند. براساس برخی از تخمین‌ها حداقل ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانویه از ۵۰۰۰۰ گونه گیاهی شناسایی شـده‌اسـت و هرسال ۴۰۰۰ متابولیت جدید از واریته‌های مختلف گیاهی کشف می‌شود. برخـی از ایـن ترکیبـات ماننـد: دیجـی-توکسین[3]، شیکونین[4]، عطر جاسمین و داروهـای ضدسـرطان ماننـد: ویـن‌بلاسـتین[5]، ویـن‌کریسـتین[6] و تاکسـول[7] از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند و قیمت آن‌ها از چند دلار تا چند هـزار دلار بـه ازای هـر کیلـو تغییـر مـی‌کنـد. تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی مشکل و یا غیرممکن می‌باشـد و از سویی محدودیت‌های مختلف مانع تامین این مواد از طبیعت است. استفاده از راهکارهای فنـاوری زیسـتی از جملـه کشت سوسپانسیون سلولی[8]، کشت اندام[9] (کشت ریشه‌های موئین و ساقه) راه حلی مناسب برای تولید سریع وانبـوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

فناوری زیستی قادر است کارآیی گیاهان دارویی را جهت تولیـد دارو افـزایش دهد.کشـت سـلول، بافـت‌هـا و اندام‌های گیاهی امکان تولید سریع و انبوه ژنوتیپ‌های مطلوب با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیـت یکنواخـت، در زمان کوتاه تر و فضای محدود را فراهم می‌سازد. امروزه تعداد زیادی از گیاهـان دارویـی از طریـق ریزازدیـادی[10] قابل تکثیر می‌باشند. اگرچه تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و اندام در طیـف وسـیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است ولی در حال حاضر این روش فقط برای ترکیبـات بـا ارزش افـزوده بـالا نظیـر

1- Biotechnology
2- Secondary metabolites
3- Digitoxin
4- shikonin
5- Vinblastine
6- Vincristine
7- Taxol
8- Cell suspension culture
9- Organ culture
10- Micropropagation

داروهای ضد سرطان تاکسول، وین‌کریستین و وین‌بلاستین به صورت صنعتی کاربرد دارد. شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و تراریزش ژنتیکی جهت افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه و تولید متابولیت‌های جدید می‌تواند زمینه را برای کاربرد کشت سلولی در سایر گیاهان نیز فراهم نماید.

گیاه پروانش[1] از خانواده آپوسیناسه[2](خرزهره) می‌باشد و به دلیل خواص دارویی شگفت‌انگیز خود، از حدود یک قرن پیش، در طب سنتی کاربرد داشته و پژوهش‌های بسیاری پیرامون آن انجام شده‌است. تاکنون از این گیاه بیش از ۱۲۰ نوع آلکالوئید[3] ایندولی استخراج شده که دو آلکالوئید دایمری وین‌بلاستین و وین‌کریستین دارای خاصیت ضدتومور بوده و در درمان بسیاری از سرطان‌ها به کار می‌رود. این آلکالوئیدها اثر آنتی نئوپلازی[4] (ضد تومور) داشته و در شیمی درمانی برخی سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این دو آلکالوئید از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها موجب توقف تقسیم سلولی در مرحله متافاز میتوز می‌شوند. گیاه پروانش تنها منبع تهیه این آلکالوئیدها است. مقدار بسیار کم این دو آلکالوئید، پیچیدگی و چند مرحله‌ای بودن مسیر سنتز آن‌ها و تقاضای بالا برای این داروها، پژوهشگران را به استفاده از روش‌های مختلف برای افزایش تولید این آلکالوئیدهای حیاتی در گیاه علاقه مند کرده‌است. مهندسی متابولیک سعی دارد با ابزاری چون محرک‌های زیستی[5] و غیرزیستی[6] و شناسایی ژن‌های دخیل در ساخت آنزیم‌های موثر در مسیر تولید آلکالوئیدها، میزان این مواد را افزایش دهد. از آنجا که تکثیر و ریزازدیادی این گیاه درمحیط کشت بافت و متعاقب آن انتقال به شرایط گلخانه به منظور استفاده در فضای سبز و استخراج آلکالوئیدهای دارویی این گیاه با خاصیت ضد سرطانی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، لذا امید است با انجام تحقیقات بنیادی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از این گیاه باارزش در کشور استفاده گردد.

1 - *Catharanthus roseus*
2 - Apocynaceae
3 - Indol alkaloid
4 - Antineoplazy
5 - Biotic elisitors
6 - Abiotic elisitors

فصل دوم

مرور و بررسی منابع

۲-۱- گیاهان دارویی

۲-۱-۱- تعریف گیاهان دارویی

گیاهان دارویی گیاهانی هستند که یک یا چند اندام آن‌ها حاوی موادی هستند که این مواد برای اهداف درمانی و یا به عنوان پیش‌ماده مواد دارویی شیمیایی شبه سنتزی استفاده می‌شوند (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹).

۲-۱-۲- تاریخچه گیاهان دارویی

استفاده از گیاهان جهت درمان بیماری، با تاریخ زندگی بشر همراه بوده است. یعنی از زمانی که انسان از ابتلای به یک بیماری، به جستجوی وسیله‌ای برای بهبود در محیط خود می‌پرداخت جز توسل به گیاهان راه دیگری پیش پای خود نمی‌یافت. مردم دوران‌های ماقبل تاریخ، ضمن جستجوی وسیله‌ای برای درمان بیماری‌ها و یا ضمن استفاده از گیاهان برای تغذیه و غیره، به انواعی برخورد می‌کردند که مصرف آن‌ها آثار درمانی مختلفی داشت و این خود باعث شد که در طی زمانی طولانی، به طور تصادفی گیاهانی با اثر مقوی معده، مخدر، مسهل و غیره کشف شود و از آن‌ها جهت درمان بیماری‌ها استفاده گردد. قدیمی‌ترین کتاب درمانی چین که شامل شرح بیش از یکصد گیاه است به یکی از امپراتوران آن کشور نسبت داده می‌شود که حدود ۲۸۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می‌زیسته است. یونانیان قدیم نیز از گیاهان مفید جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌کردند و حتی از برخی انواع سمی آن‌ها هم اطلاع داشتند. بقراط و ارسطو به نقش گیاهان در طبابت و کاربردآن‌ها واقف بودند. تئوفراست[1] دانشمند یونانی که در سال‌های ۳۷۲ تا ۲۸۷ قبل از میلاد می‌زیسته است، از بنیانگزاران گیاه درمانی به شمار می‌رود. پس از آن دیوسکورید[2] در قرن اول میلادی مجموعه‌ای شامل شرح خواص درمانی ۶۰۰ گیاه دارویی[3] را تهیه کرد که این کتاب بعدها سرآغاز بسیاری از مطالعات علمی در زمینه گیاه درمانی شد. در قرن

1 - Teofrast
2 - Dioskorid
3 - Medicinal plants

هشتم تا دهم میلادی دانشمندان بنام و برجسته ایرانی همچون ابوعلی سینا و محمد ذکریای رازی موجب پیشرفت قابل توجهی در گیاه درمانی شدند. همچنین ابن بیطار خصوصیات بیش از ۱۴۰۰ گیاه دارویی را در کتاب خودش جای داد. گیاه درمانی در کشورهای غربی از اوایل قرون وسطی شروع به پیشرفت کرد و از قرن نوزدهم کوشش همه‌جانبه‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی آغاز شد و تاکنون نیز این تلاش و کوشش ادامه دارد. امروزه در اکثر کشورهای جهان به گیاه درمانی توجه زیادی می‌شود و پژوهشگران متعددی در این زمینه مشغول به فعالیت می‌باشند (جعفرنیا و همکاران، ۱۳۸۵).

۲-۲- سرطان

سرطان به عنوان یک بیماری با اساس ژنتیکی یکی از اصلی‌ترین نگرانی‌های جوامع بشری است. سالانه درصد بالایی از مرگ و میر در جوامع مختلف بر اثر سرطان گزارش می‌شود. در سال ۲۰۰۴ بیش از ۱۵ میلیون نفر از افراد بالای ۱۸ سال در ایالات متحده، به انواعی از سرطان مبتلا بوده‌اند. امروزه درباره منشأ شکل‌گیری سرطان موارد مختلفی مطرح می‌شود که از این میان نقش ناهنجاری‌های کروموزومی در ایجاد و توسعه سرطان غیر قابل انکار است (ملوندی و همکاران، ۱۳۸۶).

سرطان گروهی از بیماری‌هایی است که مشخصه آن رشد غیرطبیعی سلول می‌باشد. بیش از صد نوع مختلف سرطان وجود دارد، که به وسیله نوع سلول‌هایی که مبتلا می‌شوند، طبقه‌بندی می‌شوند.

سرطان اثر و نتیجه نهایی سلول‌هایی است که به طور غیر قابل کنترل رشد کرده و نمی‌میرند. سلول‌های طبیعی در بدن مسیر رشدی، تقسیم و مرگ منظم را دنبال می‌کنند. زمانی که فرآیند مرگ سلول که آپوپتوسیس[1] نامیده می‌شود از مسیر طبیعی خود خارج شود، سرطان تشکیل خواهد شد. برخلاف سلول‌های منظم و طبیعی سلول‌های سرطانی نمی‌میرند و در عوض به رشد و تقسیم خود ادامه می‌دهند که به ایجاد توده سلولی غیرطبیعی که رشد خارج از کنترل دارند، منجر خواهد شد (Kingston, 2007 ;Sharma et al., 2011)

عامل اصلی ابتلا به سرطان، دودهایی مثل سیگار، عدم تعادل در رژیم غذایی، هورمون‌ها و عفونت‌های مزمن

1 - Apoptosis

هستند، که به التهاب‌ها و دردهای مزمن منتهی می‌شوند(Ames et al., 1995). سرطان سینه[1] رایج‌ترین نوع سرطان در خانم‌هاست که در جهان از هر ۳۱ زن یک نفر به آن مبتلا می‌شود (Koduru et al., 2007). سرطان روده بزرگ[2] دومین سرطان رایج در جهان است و سرطان پروستات[3] به کرات در مردها تشخیص داده می‌شود. همچنین سرطان پوست با تشخیص ۱۸۰۰۰۰ مبتلا که ۳۷۰۰۰ نفر در جامعه آمریکا بر اثر ابتلا به این نوع سرطان جان خود را از دست می‌دهند (Landis et al., 1999). بنابراین ترکیبات مشتق شده از گیاهان نقش پراهمیتی را در توسعه تعداد زیادی از عوامل ضدسرطان مفید درمانی ایفا می‌کنند (Kaur et al., 2011).

۲-۲-۱- گیاهان دارویی و درمان سرطان‌ها

استفاده از گیاهان در درمان سرطان‌ها دارای تاریخچه طولانی است؛ به طوری که بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی که در درمان سرطان استفاده می‌شوند، گزارش شده‌اند. این مسئله که بالغ بر ۶۰٪ عوامل مفید ضدسرطانی رایج از منابع طبیعی مانند گیاهان، موجودات زنده دریایی و میکروارگانیسم ها مشتق می‌شوند، بسیار حائز اهمیت است (Cragg and Newman, 2005).

مطابق با آمار منتشر شده از سازمان بهداشت جهانی[4]، ۸۰٪ از مردمانی که در روستاها زندگی می‌کنند به گیاهان دارویی به عنوان سیستم اولیه برای مراقبت از سلامتی خود وابسته‌اند. ضدسرطان‌های درمانی که به صورت مصنوعی[5] ساخته می شوند، به دلیل فاکتور هزینه و قیمت برای مردم عادی قابل استفاده نیستند. گیاهان دارویی نقش حیاتی در پیشگیری و درمان سرطان‌ها دارند و همچنین گیاهان دارویی معمولادر دسترس بوده و اقتصادی هستند. تعداد بسیاری از تحقیقات مربوط به داروها در کشورهایی با تکنولوژی های پیشرفته مانند امریکا، آلمان، فرانسه، ژاپن و چین انجام می شود که به طور قابل چشمگیری کیفیت گیاهان دارویی را که در درمان سرطان ها استفاده می شوند، بهبود بخشیده اند (Larkin, 1983).

بسیاری از گیاهان دارویی به وسیله افزایش عملکرد و دفع مسمومیت[6]، بدن را از ابتلا به سرطان محافظت

1 - Breast cancer
2 - Colon cancer
3 - Prostate cancer
4 - World health organization
5 - Synthetic
6 - Detoxification

می‌کنند. پاسخ‌های بیولوژی مشخص از گیاهان به دست آمده که از رشد سرطان به‌وسیله نوسان فعالیت هورمون‌ها و آنزیم‌های ویژه‌ای ممانعت می‌کند. بسیاری از گیاهان اثرات جانبی، سمی و خطرناک ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و پرتو درمانی را کاهش می‌دهد. دانشمندان در سراسر دنیا بر روی نقش داروهای گیاهی جهت افزایش مصونیت سلول های بدن بر علیه سرطان نظرات مشابهی دارند(Saxe, 1987; Larkin, 1983).

همچنین گیاهان دارویی منابع قابل توجهی در داروهای مصنوعی و گیاهی هستند و شرکت های داروسازی بیشتر از ۲۵۰۰۰ گیاه برای تهیه داروهای ضد سرطان غربال کرده اند (Saxe, 1987) . سرطان محصول اختلال در بدن می باشد، بنابراین گیاهان می توانند این اختلال ها را در بسیاری از سرطان ها اصلاح و کنترل کنند (Sakarkar and Deshmukh, 2011).