

بررسی تولید آرتمیزینین در کالوس و گیاه *Artemisia aucheri* Boiss. در برابر محرک‌های نوری و اشعه UV در محیط آزمایشگاهی

زهره بختیاری^{۱*}، غلامرضا اصغری^۲، شکوفه انتشاری^۳، نگین مهدی‌نژاد^۴، محمدعلی شریعتی^۵

^۱ کارشناس پژوهشی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.

^۴ کارشناس ارشد علوم گیاهی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۵ کارشناس ارشد صنایع غذایی، پژوهشگر دانشگاه اورنل روسیه.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۹

چکیده

آرتمیزینین یکی از داروهای مهم برای درمان مالاریا می‌باشد که سنتز شیمیایی این ماده بسیار پیچیده و پرهزینه است. گیاه *Artemisia aucheri* Boiss. دارای ژن‌های تولیدکننده آرتمیزینین می‌باشد ولی این ژن‌ها غیرفعال می‌باشند. هدف از این پژوهش بررسی احتمال فعال سازی ژن‌های تولیدکننده این ماده با استفاده از اعمال محرک‌های مختلف نوری می‌باشد. لذا برای کشت بافت از محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شد. دانه رست‌ها و کالوس‌ها در شرایط سترون و دمای $25 \pm C$ قرار گرفته و در معرض تیمارهای مختلف نوری و تابش UV-B قرار داده شدند. گروه شاهد نیز در شرایط نوری مشابه نور خورشید قرار گرفتند. کالوس‌ها به مدت ۵ ماه، هر سه هفته یکبار واکشت شدند. برای تعیین وجود آرتمیزینین در عصاره‌های دی‌کلرومتانولی استخراج شده از نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که در دانه رست‌های قرار گرفته در معرض تابش نور با شدت ۳۰۰۰ لوکس، آرتمیزینین تولید شده است. همچنین تولید این ماده در کالوس‌ها و دانه رست‌های قرار گرفته در معرض تابش UV-B نیز مشاهده گردید. با توجه به اینکه در این پژوهش برای اولین بار تولید آرتمیزینین در گیاه *Artemisia aucheri* Boiss. براساس سنجش‌های کیفی TLC گزارش می‌شود، انجام آزمایش‌های دقیق‌تر و بیشتر در این زمینه جهت انجام سنجش‌های کمی ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیزینین، اشعه UV، تیمار نوری، درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*)، محرک‌های نوری.

جغرافیایی آن نیز بیشتر است. این ماده یک سزکوئی-ترین لاکتون بوده که توسط بسیاری از گیاهان جنس *Artemisia* تولید می‌گردد و ساختار آن در سال ۱۹۹۷ مشخص گردیده است. ابتدا نام این ماده را qinghaosu یعنی اسانس qinghao نامیدند، ولی پس از این نام آن به آرتیمیزینین تغییر یافت (Brown, 2010). آرتیمیزینین و مشتقات آن یکی از پرکاربردترین داروهای ضد مالاریا در بازار دارویی جهان می‌باشد که اثردهی سریع، ایمن و مناسب در برابر عوامل ایجاد کننده بیماری دارد (Haynes, 2006). اولین بار آرتیمیزینین، را از گیاه *Artemisia annua* که افسنطین شیرین و یا درمنه خزری نامیده می‌شود، به دست آورده‌اند. پس از کشف آرتیمیزینین به عنوان ماده موثره گیاه برای درمان مالاریا، تلاش‌های زیادی در جهت تولید آن انجام گرفت. سنتز شیمیایی آرتیمیزینین که برای نخستین بار در سال ۱۹۸۰ انجام شد؛ مراحل متعدد و پرهزینه‌ای داشت و بازده تولید آن پایین بود (Covello, 2008). در واقع با وجود این که سنتز شیمیایی این ماده امکان‌پذیر است، ولی به دلیل ساختار پیچیده و عملکرد پایین آن از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد (Lee, 2007). بنابراین استخراج از منابع گیاهی به عنوان تنها روش تولید تجاری دارو باقی مانده است و عملکرد پایین تولید ماده توسط گیاه، محدودیت جدی برای تجاری کردن آن است، به همین دلیل مطالعات زیادی برای حل این مشکل انجام شده که یکی از آنها تحریک متابولیت‌های ثانویه با محرک‌های متفاوت در محیط‌های کشت می‌باشد (Shahbazfar et al., 2012). از طرفی مطالعات متعدد نشان داد که تنها *Artemisia annua* حاوی آرتیمیزینین نیست و با بررسی‌های بعدی وجود ژن تولید کننده آرتیمیزینین در گیاه *Artemisia aucheri* نیز اثبات گردید (Bora and Sharama., 2011). البته این ژن خاموش بوده

درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss.) گیاهی بوته‌ای متعلق به تیره Asteraceae که پراکندگی وسیعی در شمال ایران دارد (Mardani et al., 2015). از نظر خواص درمانی دارای طبیعت گرم و خشک، بادشکن و برطرف کننده گازهای روده است. از طرفی خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضدانگلی نیز دارد. در طب سنتی ایران، خواص قابض، ضد عفونی کننده، ضد میکروب، ضد انگل و ضد سمومیت برای آن شناخته شده است (Watts, 2015). از طرفی درمنه کوهی باعث کاهش میزان قند در ادرار می‌شود، از این رو برای مبتلایان به مرض قند مفید می‌باشد. عصاره این گیاه در جلوگیری از پیشرفت بیماری آترواسکلروز (Jafari Dinani et al., 2009) و از بین بردن میکروارگانسیم تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت موثر است (Ziyae et al., 2006). در حال حاضر ترکیبات جنس درمنه به عنوان داروی ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی‌اکسیدان و سایتوتوکسیک استفاده می‌شوند (Gharehmatrossian, 2012).

بر اساس تحقیقات انجام شده، ۱۷ ترکیب عمده در اسانس گیاه، شناسایی و تعیین شده و حضور ترکیبات سزکوئی‌ترین لاکتون‌ها در اعضاء جنس درمنه اهمیت آن را چند برابر کرده است (Mardani et al., 2015). از جمله این ترکیبات که جایگاه ویژه‌ای در طب دارد، آرتیمیزینین^۲ است (Ho et al., 2014). آرتیمیزینین اولین بار بوسیله چینی‌ها یافت شد. در اواخر دهه ۱۹۶۰ محققین چینی داروی ضد مالاریا را در گیاه *Artemisia annua* L. شناختند و در مطالعات بعدی مشخص گردید که میزان آرتیمیزینین این گیاه از بقیه درمنه‌ها بیشتر بوده و پراکندگی

1. Sesquiterpene Lactones.
2. Artemisinin

وتحقیقات در جهت فعال کردن آن ادامه دارد. در میان بیش از ۳۰ گونه *Artemisia* در ایران گونه *Artemisia aucheri* یا درمنه کوهی، از گونه‌هایی با پراکنش قابل توجه در کشور می‌باشد (Khangholil and Rezaeinodehi, 2008). حضور ژن تولید کننده آرتیمیزین در درمنه کوهی بیانگر احتمال فعال شدن آن در کشت بافت و تولید آرتیمیزین در حضور محرک‌های مختلف یا شرایط خاص است، بنابراین لازم است روش‌های مختلفی را برای رسیدن به این هدف بررسی نمود، لذا مطالعه حاضر در این راستا طراحی گردیده است.

کیفیت یا طول موج نور، یکی از ویژگی‌هایی است که در فرآیند فتوسنتز و فتومورفوژنز گیاه، نقش اساسی دارد. بین خصوصیات مختلف نور (کمیت، کیفیت، تداوم) و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان ارتباط نزدیکی وجود دارد. نور در جوانه زدن بذرها و برخی گیاهان نقش مهمی دارد. تناوب روشنایی و تاریکی نیز بر فرآیندهای مختلف گیاه از جمله تولید متابولیت‌های ثانوی تاثیر می‌گذارد (Mardani et al., 2015). علاوه بر تاثیرات شدت و زمان تابش، طول موج و نوع نوری که دریافت می‌شود، بر گیاه تاثیرات متفاوتی دارد. برای مثال اثر طیف مرئی بر فتوسنتز نسبت به اشعه ایکس و گاما متفاوت است. در واقع اشعه ایکس شکلی از پرتوهای الکترومغناطیس است که انرژی زیادی دارد و هر فوتون آن می‌تواند صدها یا هزاران بار پرانرژی‌تر از فوتون نور مرئی باشد، بنابراین تاثیر زیادی در ایجاد جهش‌ها و تحریک‌های سلولی دارد (Wellmann, 1975). از طرفی شناسایی مسیر بیوسنتز آرتیمیزین و ترکیبات واسطه این مسیر زمینه تولید آرتیمیزین در کشت سلولی را گسترش داده است (Haynes, 2006). ایجاد شرایط مناسب در این کشت‌ها می‌تواند، زمینه تبدیل پیش سازهای طبیعی نظیر آرتیمیزینیک اسید و دی هیدروآرتیمیزینیک

اسید به آرتیمیزین را فراهم کند. اثر عوامل متعدد، از قبیل تنظیم کننده‌های رشد، القاگرها و پیش‌سازها بر میزان آرتیمیزین تولیدی در این کشت‌ها، بررسی شده است (Takatani-Nakase, 2014). همچنین تلاش‌هایی در جهت بهتر کردن شرایط فیزیکی و شیمیایی نظیر نور، دما، pH، غلظت نیترات و قند صورت گرفته است (Li et al., 2005). بررسی نتایج این مطالعات نشان می‌دهد، تولید آرتیمیزین در کشت سلولی گیاه یک جایگزین مناسب برای گیاه کامل است و بازده تولیدی آرتیمیزین را در بسیاری از موارد بالا برده است (Ehsanpoor, 2003).

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌ها و کالوس‌های اولیه از دانشکده علوم دانشگاه اصفهان که در شرایط کاملاً استاندارد نگهداری می‌شدند، تهیه و کشت‌ها در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید. برای کشت از گیاهچه‌ها و کالوس‌های کاملاً رشد یافته، در شرایط استاندارد استفاده شد. جدا کشت‌ها (اکسپلانته‌ها)، در محیط کشت جامد موراشی و اسکوگ (MS) بدون تنظیم کننده‌های رشد قرار داده شدند. کشت‌ها در شرایط کاملاً استریل در زیرهود کشت آزمایشگاهی انجام گردید. محیط کشت‌ها در اتاق کشت در شرایط استریل، تحت دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری متفاوت با تیمارهای مختلف قرار گرفتند. شرایط نوری آزمایش استفاده از تابش‌های نوری ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ لوکس و تیمار تاریکی بود. علاوه بر آن تیمار پرتو فرابنفش (UV-B) با شدت ۳۴۰ نانومتر در نظر گرفته شد، که یک هفته پس از کشت جدا کشت‌ها، بمدت سه هفته و هر روز یک ساعت اعمال می‌گردید (انتخاب این شدت پرتو و مدت‌زمان ذکر شده، پس از چندین بار آزمایش و در نظر گرفتن سوختگی و از

زمانی مشخص در آن اتاقلها قرار داده شد. اتاقلی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. وضعیت در نظر گرفتن تیمارها در جدول ۱ نشان داده شده است.

بین رفتن گیاه انجام شد. بطوریکه حداقل عوارض ناشی از بکار بردن پرتو فرابنفش از الویتها بود). اتاقلهای مختلفی به صورت قفسه مانند تهیه و تیمارها که از هر مورد حداقل سه نمونه بودند، در

جدول ۱: معرفی تیمارهای آزمایش

| شماره تیمار گیاهچه‌ها | شدت تابش | شماره تیمار کالوسها | شدت تابش |
|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| ۱ | ۱۰۰۰ لوکس | ۱ | ۱۰۰۰ لوکس |
| ۲ | ۲۰۰۰ لوکس | ۲ | ۲۰۰۰ لوکس |
| ۳ | ۳۰۰۰ لوکس | ۳ | ۳۰۰۰ لوکس |
| ۴ | اشعه فرابنفش | ۴ | اشعه فرابنفش |
| ۵ | شرایط تاریکی | ۵ | شرایط تاریکی |
| ۶ | شاهد | ۶ | شاهد |

انتهای صفحه TLC بارگذاری شد. این نقاط ۱/۵ سانتی متر نیز از حاشیه فاصله داشتند. بین نمونه‌ها ۱/۵ تا ۲ سانتی متر فاصله وجود داشت. برای هر عصاره از یک لوله موئینه مجزا استفاده شد. نمونه استاندارد آرتیمیزین هم به همین شکل در کنار سایر نمونه‌ها بارگذاری شد.

فاز متحرک (آماده کردن تانک مربوط به TLC): در تانک مربوط به TLC؛ اتیل استات و پترولیوم اتر (در زیر هود) با نسبت ۴:۶، (۴۰ میلی لیتر اتیل استات و ۶۰ میلی لیتر پترولیوم اتر) ریخته شد و درب آن گذاشته شد، تا اشباع گردد. برای بهتر اشباع شدن فضای تانک، دیواره‌های داخلی با کاغذ واتمن پوشانده شدند (Asghari et al., 2015).

گسترش حلال: بعد از تهیه دقیق حجم‌های مورد نظر از حلال‌های تشکیل دهنده فاز متحرک، آنها را در یک استوانه مدرج مخلوط و به محفظه وارد کرده و درب آن بسته شد. بعد از اشباع محفظه، که تقریباً یک ساعت قبل از شروع گسترش آغاز شده بود؛ صفحه TLC که نمونه‌ها روی آن بارگذاری شده بود، به محفظه وارد کرده و اجازه داده شد که حلال تا ۲

این آزمایش چندین بار در مدت پنج ماه که زمان مناسبی برای رسیدن به حجم خوبی از نمونه‌ها جهت آنالیز بود و با تکرارهای متعدد و واکنش‌هایی که هر سه هفته یکبار از تیمارهای مختلف می‌شد، انجام گردید تا از ایجاد خطاهای احتمالی جلوگیری شود. کالوس‌ها و گیاهچه‌های ابتدایی پس از یک هفته تحت تیمار قرار گرفتند و گیاهچه‌ها و کالوس‌های بعدی که واکنش می‌شدند، بلافاصله تحت تیمارهای آزمایش قرار می‌گرفتند.

عصاره‌گیری کالوس و نمونه‌ها: یک گرم از هر کدام از نمونه‌ها (گیاه و کالوس) در لوله‌های درپییچ دار ریخته و به آن‌ها ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان^۱ اضافه و پس از هم زدن به مدت ده دقیقه، برای ۴۸ ساعت در یخچال گذاشته شد. دو معرف (وانیلین در اتانول و اسیدسولفوریک در اتانول) در این آزمایش استفاده شد (Asghari et al., 2015).

بارگذاری نمونه‌ها: پس از تهیه معرف‌ها و ورتکس نمونه‌ها، عصاره‌های حاصل با استفاده از لوله موئینه شیشه‌ای، بر روی خطی به فاصله ۱/۵ سانتی متری

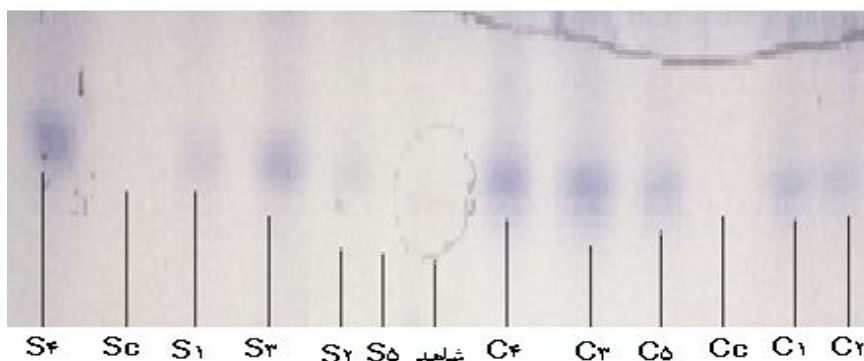
1. Dichloromethane

ابزار تحلیل آماری: برای تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و Excel استفاده شد. در طول آزمایش داده‌های حاصله میانگین سه تکرار $\pm SD$ بوده و با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و پس آزمون Tukey با اختلاف معنی دار براساس $P \leq 0.05$ بررسی شدند.

نتایج: پس از انجام آزمایش TLC و مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های حاصل از استاندارد آرتمیزینین، مشخص گردید، آرتمیزینین در بعضی تیمارها وجود دارد. در واقع تصویر کلی مربوط به این آزمایش (تصویر ۱) و لکه‌های ایجاد شده، نشان از وجود آرتمیزینین در تعدادی از تیمارها بود. آزمایش TLC سه بار تکرار گردید و نتیجه کلی به تصویر ۱ تعمیم داده شد.

سانتی متری انتهای صفحه TLC بالا رود (یعنی حدوداً ۱۵ دقیقه بعد از قرار دادن در تانک)، سپس آن را خارج کرده و مسیر حرکت حلال با مداد علامت گذاری شد.

آشکارسازی: جهت آشکارسازی لکه‌های مورد نظر، از معرف وانیلین-اسید سولفوریک استفاده شد. این معرف شامل دو قسمت وانیلین اتانلی ۱ درصد و اسید سولفوریک اتانولی ۱۰ درصد بود. صفحه به زیر هود برده و با استفاده از گاز ازت معرف‌ها روی آن اسپری شد، ابتدا ۱۰ میلی لیتر وانیلین اتانلی بر روی صفحه اسپری کرده و بلافاصله ۵ تا ۱۰ میلی لیتر محلول اسیدسولفوریک اتانولی بر آن پاشیده شد و صفحه TLC به مدت ۵ دقیقه در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت (Asghari et al., 2015).



شکل ۱: نتیجه کلی آزمایش TLC (مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های حاصل از استاندارد آرتمیزینین)

S1 تا S5: نمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های تیمارهای آزمایش

C1 تا C5: نمونه‌های حاصل از کالوس‌های تیمارهای آزمایش

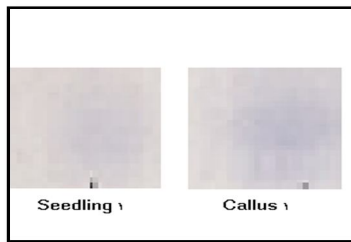
(شکل ۳) و تیمار تحت تابش نوری ۲۰۰۰ لوکس (شکل شماره ۴)، لکه‌های بنفش بسیار کم‌رنگی در حد یک هاله بنفش کم‌رنگ ظاهر شد، اما در تیمار تحت تابش نوری ۳۰۰۰ لوکس (شکل ۵)، هم در گیاهچه‌ها و هم در کالوس‌ها آرتمیزینین مشاهده شد و لکه‌های بنفش ظاهر گردید و با مقایسه Rf لکه‌های

بعد از سه بار تکرار آزمایش و مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین تحت معرف وانیلین-اسیدسولفوریک اتانولی نتایج زیر بدست آمد:

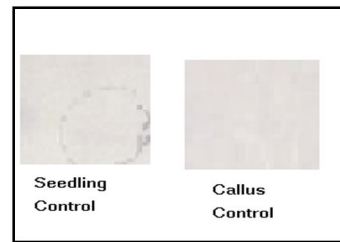
در تیمار شاهد مربوط به گیاهچه‌ها و کالوس‌ها هیچ لکه ای دیده نشد (شکل شماره ۲). در کالوس و گیاهچه‌های تیمار تحت تابش نوری ۱۰۰۰ لوکس

خصوصیات مورفولوژیکی متفاوتی پیدا کرده و اکثراً کوتاه و روزت مانند بودند. وضعیت لکه‌های ایجاد شده در گیاهچه‌ها و کالوس‌های تیمار تحت تاریکی نشان می‌دهد، در این تیمار تولید آرتمیزینین در کالوسها کمی تحریک شده است (شکل ۷).

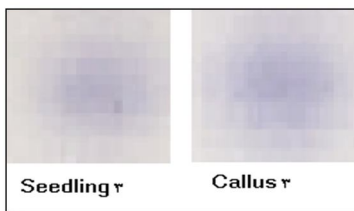
ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین، وجود آرتمیزینین اثبات گردید. وضعیت لکه‌ها و Rf لکه‌های ایجاد شده در تیمار تحت تابش پرتو فرابنفش (UV-B) با شدت ۳۴۰ نانومتر در گیاهچه‌ها و کالوس‌ها، نشان داد تولید آرتمیزینین در این تیمار بیشتر از بقیه تیمارها بود (شکل ۶). ضمن اینکه گیاهچه‌های این تیمار کاملاً



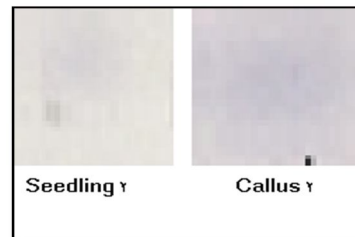
شکل ۳: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار تحت تابش نوری ۱۰۰۰ لوکس (گیاهچه‌ها و کالوس)



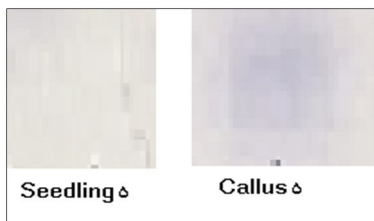
شکل ۲: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار شاهد (گیاهچه‌ها و کالوس)



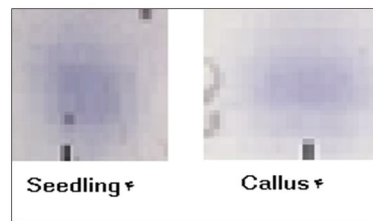
شکل ۵: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار تحت تابش نوری ۳۰۰۰ لوکس (گیاهچه‌ها و کالوس)



شکل ۴: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار تحت تابش نوری ۲۰۰۰ لوکس (گیاهچه‌ها و کالوس)



شکل ۷: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار تحت تاریکی (گیاهچه‌ها و کالوس)



شکل ۶: مقایسه Rf لکه‌های ایجاد شده با لکه‌های استاندارد آرتمیزینین در تیمار تحت تابش اشعه UV-B340nm (گیاهچه‌ها و کالوس)

بحث

ترکیبات جنس درمنه در حال حاضر به‌عنوان داروی ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی اکسیدان و سایتوتوکسیک استفاده می‌شوند. حضور ترکیبات سزکویی ترین لاکتونها^۱ در اعضاء جنس درمنه اهمیت آنها را چند برابر کرده است (Favero et al., 2014).

از جمله این ترکیبات که جایگاه ویژه‌ای در طب دارد، آرتیمیزینین^۲ است (Zhang et al., 2009). این ترکیب اولین بار به وسیله مطالعه طب سنتی و گیاهی چینی‌ها یافت شد. این ماده یک سزکویی ترین لاکتون می‌باشد که توسط بسیاری از گیاهان این جنس تولید می‌گردد و ساختار آن در سال ۱۹۹۷ مشخص گردیده است. آرتیمیزینین و مشتقات آن یکی از پرکاربردترین داروهای ضد مالاریا در بازار دارویی جهان می‌باشند که اثردهی سریع، ایمن و مناسب در برابر گونه‌های حساس و مقاوم به دارو دارند (Meshnick et al., 1996).

ابتدا منبع تولید آرتیمیزینین، گیاه *Artemisia annua* یا افسنطین شیرین (*sweet wormwood*) (بود که در ایران درمنه خزری نامیده می‌شود و در طب سنتی از این گیاه برای درمان مالاریا استفاده می‌کردند. این گیاه به‌طور وسیعی در نواحی معتدل وجود دارد و خاستگاه آن اروپا و آسیا می‌باشد (Yazdani, 2008). سنتز شیمیایی آرتیمیزینین که برای نخستین بار در سال ۱۹۸۰ انجام شد، مراحل متعدد و پرهزینه‌ای داشت و راندمان تولید آن پایین بود (Covello, 2008). بنابراین به علت اینکه سنتز شیمیایی آرتیمیزینین با توجه به صرف وقت و هزینه زیاد مقرون به صرفه نیست، استفاده از رویکردها و روش‌های جدید جهت تولید این ماده دارویی نیاز می‌باشد (Bora and Sharma, 2011). امروزه از پیوند

ژن‌های درگیر در ساخت آرتیمیزینین به داخل مخمرها برای تولید آن استفاده می‌شود. از طرفی با مطالعات مختلف مشخص گردید که تنها *Artemisia annua* حاوی این ماده نیست و با بررسی‌های بعدی وجود ژن تولید کننده آرتیمیزینین در گیاه *Artemisia aucheri* نیز اثبات گردید (Yazdani, 2008). البته متأسفانه این ژن خاموش بوده و تلاش در جهت فعال کردن آن ادامه دارد. بنابراین حضور این ژن در درمنه کوهی بیانگر احتمال فعال شدن آن در کشت بافت و تولید آرتیمیزین در حضور محرک‌های مختلف یا شرایط خاص است، لذا باید روش‌های مختلفی را برای رسیدن به این هدف بررسی نمود. در پژوهشی با استفاده از آگروباکتریوم و یا متیل جاسمونات به‌عنوان محرک تولید آرتیمیزینین مورد آزمایش قرار گرفت و تاثیر آنها بر تولید آرتیمیزینین مثبت ارزیابی شد (Fulzelel and Heblel, 2006). همچنین در مطالعه‌ای که در خصوص تاثیر سدیم آلژینات و فسفر بر تولید آرتیمیزینین در گیاه درمنه خزری بود، این محرکها برای تولید آرتیمیزینین مفید شناخته شدند (Aftab et al., 2014). بر این اساس این مطالعه بررسی تولید آرتیمیزینین در درمنه کوهی *Artemisia aucher* در حضور محرک‌های مختلف نوری طراحی گردید. با بررسی مطالعات انجام گرفته در خصوص تاثیر محرک‌های نوری و پرتو فرابنفش بر تولید آرتیمیزینین مشخص گردید که بر گیاه درمنه کوهی در این زمینه مطالعه‌ای انجام نشده است، اما بعضی از گونه‌های دیگر درمنه بررسی‌های مشابه انجام شده بود. در این آزمایش جهت شناسایی و اثبات کیفی آرتیمیزینین از روش TLC استفاده شد. به‌عنوان یک روش ساده و سریع جهت شناسایی آرتیمیزینین استفاده می‌شود. سطح و شدت رنگ بنفش ایجاد شده بر صفحه TLC می‌تواند نمایانگر وجود آرتیمیزینین در عصاره‌های مورد آزمایش باشد. در این آزمایش

1. Sesquiterpene Lactones.
2. Artemisinin

در این پژوهش تولید آرتمیزیین در درمنه کوهی در تیمار نوری ۳۰۰۰ لوکس می‌تواند موید تاثیر این شدت تابش بر تولید آرتمیزیین باشد که با توجه به این نتیجه و مقایسه با تیمارهای شاهد و تیمارتابش نوری ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس پیشنهاد می‌گردد که در آزمایشات بعدی از شدت تابش نوری بیشتری استفاده شود. ضمن اینکه این آزمایش در محیط کشت و در شیشه انجام گردید و شاید در شرایط طبیعی و اقلیمهای متفاوت نتیجه فرق می‌کند و آزمایشات بیشتری نیاز است. از طرفی با توجه به اینکه در تیمارهای کالوسی تحت تاریکی کالوس تحت تاثیر قرار گرفته، ولی در گیاهچه‌های قرار گرفته در تاریکی تولید آرتمیزیین هیچگونه ظهوری نداشته است. درواقع می‌توان گفت نور در تجمع آرتمیزیین در گیاهچه‌ها موثر است، اما در کالوس وضعیت فرق می‌کند و به آزمایشات وسیع‌تری برای نتیجه‌گیری در خصوص تاثیر تاریکی بر کالوس نیاز است. از طرفی در تیمار تحت تابش اشعه UV-B با شدت ۳۴۰ نانومتر، تولید آرتمیزیین هم در گیاهچه‌ها و هم کالوس قابل ملاحظه بود و این موضوع نشان می‌دهد که با استفاده از پرتو فرابنفش می‌توان گیاه درمنه کوهی را به تولید آرتمیزیین واداشت. البته مسئله مهم در به کارگیری پرتو فرابنفش در نظر گرفتن عوارض احتمالی آن بر روی گیاه است. در این آزمایش شدت تابش فرابنفش بارها آزمایش گردید تا کمترین عوارض جانبی بر گیاه وارد گردد، با این حال با این شدت تابش و در مدت زمان یک ساعت در روز بازهم تغییراتی در شکل و فرم گیاه به وجود آمد و گیاه به سمت کوتولگی تمایل یافت. اما تولید آرتمیزیین در این مرحله مهمترین مسئله بود که با این مدت زمان و این شدت تابش با کمترین تاثیر بر روی گیاه ایجاد شد.

در گیاهچه‌های تحت تیمار تابشی ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ لوکس، در مقایسه با تیمار شاهد تحت تابش نور خورشید آرتمیزیین تولید شد. در حالی که تیمار با شدت ۳۴۰ نانومتر اشعه UV-B باعث تحریک تولید این ماده در کالوس و گیاهچه‌ها شد. تحریک تولید آرتمیزیین در گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua L.*) تحت تابش 2000 ± 500 لوکس مورد اثبات قرار گرفته بود (Thu et al., 2011). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی درمنه خزری انجام شد، نشان داده شد که تابش نور با شدت ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۱۶ ساعت نیز می‌تواند علاوه بر افزایش ریشه‌های مویی در این گیاه، باعث تجمع آرتمیزیین شود (Liu et al., 2007).

در خصوص تاثیر اشعه UV بر تولید آرتمیزیین، در آزمایشی که توسط پان و همکاران (Pan et al., 2014) با عنوان بررسی ژن‌های درگیر برای ساخت آرتمیزیین در گیاه درمنه خزری *Artemisia annua L.* انجام شد، تاثیر اشعه UV-B برای ساخت آرتمیزیین مثبت ارزیابی گردید و این اشعه بعنوان محرکی در تولید آرتمیزیین شناخته شد. احتمالاً استفاده از پرتوهای دیگر نیز می‌تواند بر تولید آرتمیزیین تاثیر گذارد. برای مثال در مطالعه‌ای که در دانشکده علوم دانشگاه اصفهان در خصوص تاثیر اشعه گاما بر تولید آرتمیزیین توسط درمنه کوهی انجام گردید، تاثیر اشعه گاما بر تولید آرتمیزیین در گیاه درمنه کوهی مثبت ارزیابی شد و حضور طول موجهایی از پرتوگاما در این آزمایش، باعث تجمع آرتمیزیین در گیاه بود (Movaseghi, 2013). همچنین طبق نتایج حاصل از مطالعه‌ای که بر روی گیاه درمنه خزری انجام شد، مشخص گردید که استفاده از نور قرمز می‌تواند تاثیر زیادی بر تولید آرتمیزیین داشته باشد و حتی این افزایش تا حد ۸۰ درصد گزارش شده است (Wang et al., 2011).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه با نتایج این پژوهش و تاثیر مثبت اشعه ماورا بنفش و پرتو نوری ۳۰۰۰ لوکس بر تولید ماده دارویی آرتمیزینین در گیاه درمنه کوهی شاید بتوان نتیجه گرفت که با توجه به تاثیر ارتفاع بر تفاوت پرتوهای نوری تابیده شده به گیاهان بویژه پرتوهای ماوراء بنفش جمع‌آوری گیاهان مذکور از ارتفاعات بالاتر احتمال استخراج این ماده را افزایش می‌دهد. البته اثبات این ادعا نیاز به تحقیقات میدانی در این راستا دارد، اما در سطح آزمایشگاهی استفاده از پرتوهای نوری با شدت استفاده شده در این پژوهش یا حتی شدت‌های بالاتر احتمال استخراج آرتمیزینین را درکشت بافت یا گیاهچه‌های درمنه کوهی از نظر کیفی امکان پذیر کرد که برای اندازه گیری میزان کمی آن نیاز به استفاده از روش‌های آنالیز دستگاهی دقیق مانند کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا یا GC هست.

سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات صمیمانه جناب آقای دکتر رسول سلطانی عضو هیات علمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر می نمایند.

References

- Aftab, T., Khan, M.M., Naeem, M., Idrees, M., Siddiqi, T.O. and Varshney, L. 2014. Effect of irradiated sodium alginate and phosphorus on biomass and Artemisinin production in *Artemisia annua*. Carbohydrate Polymers Journal, 110: 396-404.
- Asghari, G., yosefi, M. and Mehdinezhad, N. 2015. Effect of hormones, salicylic acid, chitosan on phenolic compounds in *Artemisia aucheri* in vitro. Journal of Plant Process and Function, 3(10): 93-100.
- Bora, K.S. and Sharma, A. 2011. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. Pharm Biology Journal, 49(1): 101-109.
- Brown, G.D. 2010. The biosynthesis of Artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. Molecules Journal, 15(11): 7603-7698.
- Covello, P.S. 2008. Making Artemisinin. Phytochemistry, 69(17): 2881-2885.
- Ehsanpoor, A. 2003. Cell culture and plant tissue. Publications the University Jahad, Isfahan, 545p.
- Favero, F., Grando, R., Nonato, F.R., Sousa, I.M., Queiroz, N.C., Longato, G.B. and Foglio, M.A. 2014. *Artemisia annua* L. evidence of sesquiterpene lactones' fraction antinociceptive activity. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14: 266-278.
- Fulzele, D.P. and Heble, M.R. 2006. Tissue cultures of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production. International Journal of Phytotherapy Research, 5(4): 149-153.
- Gharehmatrossian, S.A. 2012. Antioxidant activities and cytotoxic effects of whole plant and isolated culture of *Artemisia aucheri* Boiss. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 5(4): 95-98.
- Haynes, R.K. 2006. From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction old and new derivatives stereochemistry and medicinal chemistry requirements. Current Topics in Medicinal Chemistry Journal, 6(5): 509-537.
- Ho, W.E., Peh, H.Y., Chan, T.K. and Wong, W.S. 2014. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. Pharmacology and Therapeutics Journal, 142(1): 126-139.
- Jafari Dinani, N., Madani, H., Naderi, G.H.A. and Mahzuni, P. 2009. Effect of *Artemisia aucheri* on regression of Atherosclerotic plaque in rabbits. Journal of Medicinal Plants, 4(29): 72-79.
- Khangholil, S. and Rezaeinodehi, A. 2008. Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*)

- growing wild in Iran. Pakistan Journal Biology Sciences, 11(6): 934-937 .
14. Lee, S. 2007. Artemisinin promising lead natural product for various drug developments. Mini Review Medical Chemistry, 7(4): 411-422.
 15. Li, W., Liu, X., Ajmalkhan, M. and Yamaguchi, S. 2005. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline conditions. Journal Plant Research, 118(3): 207-214.
 16. Liu, C.Z., Zhou, H.Y. and Zhao, Y. 2007. An effective method for fast determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Analytica Chimica Acta, 581(2): 298-302 .
 17. Mardani, H., Sekine, T., Azizi, M., Mishyna, M. and Fujii, Y. 2015. Identification of safranal as the main allelochemical from saffron (*Crocus sativus*). Natural product communications, 10(5):775-7.
 18. Meshnick, S.R., Taylor, T.E. and Kamchonwongpaisan, S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. Microbiological Reviews Journal, 60(2): 301-315.
 19. Movaseghi, Sh. 2013. The effect of gamma rays on the production of artemisinin in the plant *Artemisia aucheri* Boiss. (Master Thesis), Isfahan university, Isfahan.
 20. Pan, W.S., Zheng, L.P., Tian, H., Li, W.Y. and Wang, J.W. 2014. Transcriptome responses involved in artemisinin production in *Artemisia annua* L. under UV-B radiation. Journal Photochemistry Photobiology, 140:292-300.
 21. Shahbazfar, A.A., Zare, P., Mohammadpour, H. and Tayefi-Nasrabadi, H. 2012. Effects of different concentrations of artemisinin and artemisinin-iron combination treatment on Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells. Interdiscipline Toxicology, 5(1):30-37.
 22. Takatani-Nakase, T. 2014. Artemisinin: a natural product for fighting against cancer. Nihon Yakurigaku Zasshi, 143(2): 61-64.
 23. Thu, B.T., Van Minh, T., Lim, B.P. and Keng, C.L. 2011. Effects of environmental factors on growth and artemisinin content of *Artemisia annua* L. Tropical Life Science Research, 22(2): 37-43.
 24. Wang, Y., Huang, Z., Wang, L., Meng, S., Fan, Y., Chen, T. and Wang, C. 2011. The anti-malarial artemisinin inhibits pro-inflammatory cytokines via the NF-kappa B canonical signaling pathway in PMA-induced THP-1 monocytes. International Journal of Molecular Medicine, 27(2): 233-241.
 25. Watts, G. 2015. Nobel awarded to discoverers of ivermectin and artemisinin. Biochemistry medical journal, 351:53-52.
 26. Wellmann, E. 1975. A quantitative analysis of the light effect on flavonoid synthesis in plant cell and tissue cultures. Planta Medica, 1(2): 107-111.
 27. Zhang, L., Jing, F., Wang, G. and Tang, K. 2009. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin: an effective anti-malarial drug by hairpin-RNA-mediated gene silencing. Biotechnology and Applied Biochemistry Journal, 52(3): 199-207.
 28. Ziyadeh, H.A.M., Abdollahi, F. and Shabankhani, B. 2006. Effects of methanol extract of *Artemisia*, Thyme and on *Trichomonas vaginalis* in vitro. University of Medical Sciences Gorgan, 1(8): 34-38.
 29. Yazdani, N., 2008. Molecular identification of amorphous genes DNA synthase involved in the biosynthesis of artemisinin in different species in Iran. Agricultural Biotechnology (Master's thesis), Iran, Tehran.