جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

استخلاص وتنقية وتوصيف عقار التاكسول من عزلة محلية للفطر *Schizophyllum radiatum* وتقييم فعالياته البايولوجية والمضادة لسرطان المبايض

حنين صالح سالم كردي

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ

الدكتورة شمال يونس عبد الهادي

١٤٤٥هـ ٢٠٢٣م

الخلاصة

البيئة العراقية تزخر بالعديد من النباتات الطبية والفطريات ذات التنوع الحيوي الكبير التي تنتج العديد من المركبات الأيضية الفعالة المضادة للسرطان كالتاكسول لذا جاءت الدراسة المليئة بالتفاصيل وتم خلال العديد من الرحلات المسحية التي شملت محافظتي السليمانية و نينوى العثور على 65 عينة منها 40 نوعاً من النباتات الطبية التي تمثل مستنبتات للعديد من الانواع الفطرية فضلاً عن 25 نوعاً من الأجسام الثمرية تعود لصنفي الفطريات البازيدية والكيسية.

أشارت نتائج الغربلة الأولية الجزيئية للفطريات المستحصل عليها من الحصول على ست عزلات فطرية تمتلك الجين المسؤول عن انتاج التاكسول منها عزلتين فطرية مستنبتة بالرموز العلمية HP-15 و HP-37 وأربع عزلات تعود للفطريات الكبيرة بالرموز العلمية HM-43, HM-55, HM-57 و HM-58 على الترتيب. ولجعل النتيجة الاولية أكثر جدارة بالثقة جرت غربلة ثانوية باستخدام ستة أوساط زرعية مختلفة اتضح أن العزلة بالرمز العلمي HM-58 الأكثر إنتاجاً للتاكسول الذي بلغت قيمته 0.85 غم / لتر عند انماءها بالوسط الزرعي MID ووفقا لهذه النتيجة وقع الاختيار عليها لاكمال متطلبات البحث. قادت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) Polymerase Chain Reaction وباستخدام بادئات منطقة النسخ الداخلي (ITS) Internal Transcribed spacer الى تشخيص العزلة الفطرية نزولاً الى مستوى النوع واتضح تبعيتها التصنيفية للنوع *Schizophyllum radiatum* الذي سجل في بنك الجينات الامريكي لأول مرة في العراق برقم الانضمام OQ709247.

كشفت نتائج الاختبارات البحثية لتوليفة الظروف الزرعية عند إنماء العزلة الفطرية المنتخبة في المزارع المستمرة عن حاجتها الى 18 يوم من الحضن لانتاج اكبر كمية من التاكسول 0.96 غم / لتر والسكروز بالتركيز 3 % كمصدر كاربوني للحصول على 1.04 غم / لتر من التاكسول ومستخلص الخميرة بالتركيز 1 غم / لتر لانتاج 1.23غم / لتر. أما درجة الحرارة المثلى لانتاج التاكسول فبلغت 28 °م بكمية 0.98 غم / لتر وعند الاس الهيدروجيني 6.5 وسرعة رج 160 دورة / دقيقة. توجت فكرة إغناء وسط النمو بفيتامين Vitamine B12 بالتركيز 100 مايكروغرام / لتر عن زيادة في كمية التاكسول المنتج والتي بلغت 1.38 غم / لتر كما أضاف Salicylic acid علامة فارقة لوسط النمو إذ ازدادت كمية التاكسول المنتج الى 1.48 غم / لتر.

نقي التاكسول المستخلص من راشح المزرعة الفطرية بعمود الفصل الكروماتوكرافي وتم الاسترداد بمزيج من الكلوروفورم والاسيتونايتريل وبتراكيز متدرجة وكشفت عملية الاسترداد عن

10 أجزاء كان الجزء 6 Fraction يمتلك فعالية عند الكشف عنها بجهاز المطياف الضوئي والتي بلغت 1.42 غم / لتر.

أثمرت خطوة الكشف عن نقاوة التاكسول المنقى بجهاز كروماتوكرافيا السائل عالِ الاداء بالحصول على قمة واحدة للتاكسول عند زمن احتجاز 19.16 دقيقة المشابهة لزمن الاحتجاز للتاكسول القياسي 19.22. كما كشفت عملية ترحيل التاكسول المنقى على صفيحة السليكا جيل بعد الاظهار عن بقعة واحدة متميزة بقيمة R_f بلغت 0.56 وهي نفس قيمة R_f للتاكسول القياسي.

جاءت نتائج تقييم فعالية التاكسول المنقى المضادة للفطريات البيضية وخاصة الفطر *Pythium ultimum* المسبب لمرض سقوط البادرات لعدد كبير من النباتات المهمة اقتصادياً بنجاح لا يضاهى إذ تمكن التاكسول من تثبيط نمو الفطر وبلغت هالة التثبيط 65 ملم بالمقارنة مع التاكسول التجاري والذي بلغ قطر هالة التثبيط 46 ملم. كما برهنت النتائج على امتلاك التاكسول فعالية مضادة لتكوين الأورام على أقراص البطاطا وتثبيط فعالية بكتريا *Agrobacterium tumefacienus* المسؤولة عن تكوين الاورام بعد مضي 21 يوما على المعاملة.

كما تغلب التاكسول المنقى على مشكلة مقاومة البكتريا المرضية للمضادات الحيوية من خلال تثبيطه لنموها بكلا التركيزين المستخدمين 50 و100 ما يكروغرام / مل وكان الأكثر تاثيراً على بكتريا *Staphylococcus aureus* اذ بلغ قطر التثبيط 48.2 ملم عند التركيز 100 مايكروغرام / مل بالمقارنة مع المضاد التجاري Gentamycin الذي بلغ قطر هالة التثبيط 11 ملم. كما ثبت امتلاك التاكسول المنقى فعالية مضادة لكسح الجذور الحرة بعد مضي 30 دقيقة على المعاملة بالتاكسول والتي ازداد بزيادة التركيز المستخدم وبلغت اعلى قيمة 78 % عند التركيز 100 مايكروغرام / مل وبفارق معنوي مع حامض الاسكوربك القياسي 66 %.

وأظهرت تجربة الكشف عن السمية الخلوية للتاكسول على خطوط الخلايا السرطانية للمبيض SKOV-3 اعلى نسبة تثبيط 82.67 % و15 % على خطوط الخلايا الطبيعية MCF-10 عند التركيز 200 مايكروغرام / مل. أما التركيز المثبط النصف قاتل IC50 فقد بلغ 24 مايكروغرام / مل لخطوط الخلايا السرطانية للمبيض في حين كانت قيمته 733.77مايكروغرام / مل على الخطوط الخلايا الطبيعية. ونتج عن معاملة الخلايا السرطانية للمبيض بالتركيز المثبط النصف قاتل بعد صبغها بصبغة Crystal violet لمدة 24 ساعة حدوث تغييرات مظهرية عديدة في حين لم تعاني الخلايا الطبيعية من اي تغييرات مظهرية تذكر وللكشف عن حدوث الموت الخلوي المبرمج استخدمت الصبغة المزدوجة Acridine orange

واتضح بعد معاملة الخلايا بالتاكسول وصبغها لمدة 24 ساعة وفحصها بالمجهر المتفلور المقلوب اصطباغ الخلايا المعاملة باللون الاحمر وظهور مساحات تخلو من الخلايا دلالة على موتها بينما الخلايا الغير معاملة ظهرت باللون الاخضر. وفي اختبار التدفق الخلوي لبروتينات المايتوكوندريا من خلال الغشاء وبعد معاملة الخلايا السرطانية بصبغة RH123 ظهرت قمة واحدة لخلايا سرطان المبيض ازيحت نحو جهة اليسار بالمقارنة مع الخلايا غير المعاملة التي ظهرت بقمة واحدة باتجاه اليمين. واثبت فحص التدفق الخلوي لبروتين P53 و8 Caspase وهما من اهم مؤشرات الموت الخلوي المبرمج انتاج جزيئات الاوكسجين الفعالة ROS في خلايا سرطان المبيض المعاملة بالتاكسول وتكوين معقد إشارة الموت الخلوي Death Inducing Signaling Complex(DISC) بدلالة ظهور قمة واحدة أزيحت نحو اليسار.

جاءت اللمسات الاخيرة لتكشفها تقنية المذنب Comet assay بالدليل القاطع عن الضرر الذي احدثه التاكسول على المادة الوراثية لخلايا سرطان المبيض المعاملة, إذ ظهرت المادة الوراثية زيادة في طول الذيل والتي بلغت 51.93 مايكروميتر في حين ظهرت المادة الوراثية بشكل هالة موضعية حول نواة الخلية وبلغ طول الذيل 2.3 مايكروميتر.

Abstract:

Due to the environment's richness in medical plants and mushrooms with great biodiversity, that produce various anti-cancer metabolite active compounds, such as *Taxol*, this study was conducted and filled with thorough details. Several scientific trips were done, including Sulaymaniyah and Mosul cities, and finding 65 samples, 40 species of the medical plants that represent endophytes for many fungal types, in addition to 25 species of fruiting bodies that belong to *ascomycetes*. The results of the initial molecular screening of the obtained fungi indicated that six isolates were obtained containing the gene responsible for the Taxol production. Two of which are endophytes fungal isolates, with scientific symbols HP-15, HP-37 and four isolates belong to macrofungi, with scientific symbols, HM-43, HM-55, HM-57, HM-58 respectively. In order to make the initial result more reliable, unbiased secondary screening was carried out using six different cultured medium, it was clear that the isolate, with scientific symbol HM-58, was the most productive in Taxol, with range of 0.85 gm/lit. when grown in the cultured medium MID, and based on this result, it was chosen to complete the research requirements. Polymerase Chain Reaction (PCR) and by using Internal Transcribed Spacer (ITS), led to identifying the fungal isolate to a type level, and it was proved that it belongs to *Schizophyllum radiatum*, which was registered in the US genbank for the first time in Iraq, with serial number OQ709247.

The research outcomes of the cultured conditions synthesis when growing the selected fungal isolate in the cultures revealed its needs to 18 days of incubation to produce a larger amount of taxol (0.96) gm/lit, and the sucrose of concentration 3% as a carbonic source to get 1.04 gm/lit of

taxol. The yeast extract in concentration of 1 gm/lit to produce 1.23/gm/lit. Whereas the ideal temperature to produce taxol reached 28 C, with amount of 0.98 gm/lit and at a pH 6.5 and speed of 160/ circle/min. The idea of enriching the growth medium with Vitamin B12 at concentration 100 microgram/ lit. increased the amount of the produced *Taxol* which reached to 1.38 gm/lit also adding Salicylic acid has become a milestone for the growth medium in which the production amount of taxol has increased to 1.48 gm/lit .

In order to complete what we have started, the extracted taxol was purified from the fungal culture filtrate with a chromatographic separation column. The taxol was recovered with a mixture of chloroform and acetonitrile with gradual concentration. The recovery process revealed 10 parts, part Fraction 6 has activity when detected by the spectrophotometer, which reached 1.42 gm/lit .

The step of detecting the purity of the purified taxol using high performance liquid chromatography, by obtaining one peak of taxol at holding time of 19.16 min. which is similar to the time of the standard taxol 19.22 min .

The process of transferring the purified taxol on a silica gel plate, after the appearance of one unique spot, with value Rf, reaching 0.56, which is the same Rf value for the standard taxol .

As we are facing the spread of plants diseases, the results of evaluating the effectiveness of purified taxol against Oomycetes, especially *Pythium ultimum*, which caused damping off disease for a big number of economically important plants, made an incomparable successful. In which taxol was able to inhibit the mushroom growth, the inhibition aura reached 65 mm compared with the commercial taxol in which the diameter of the diameter aura reached 46 mm. The results

proved that taxol has anti-tumor activity on the potato, and inhibition of bacterial activity, *Agrobacterium tumefaciens*, which is responsible for tumor formation after 21 after 21 of treatment. The purified taxol overcame the problem of antibiotic resistance of pathogenic bacteria by inhibiting their growth with both used concentration 50, 100 microgram/ml, and was the most effective on Staphylococcus aureus bacteria, in which the inhibition diameter reached 48.2 mm. at concentration of 100 microgram/ml compared with the commercial counter Gentamycin, its diameter inhibition aura reached 11 mm. The purified taxol proved to have anti-free radical's activity after 30 minutes of treatment with taxol, which increased as the concentration increased, reaching the highest value 78% at concentration 100 microgram/ ml, with significant difference with the standard ascorbic acid of 66% .

The experiment of revealing cytotoxicity of taxol on the ovarian cancer cell lines SKOV-3, highest inhibition rate 82.67% and 15% on the natural cell lines MCT-10 at concentration 200 microgram/ ml. While the inhibitory half lethal concentration IC50, and reached 24 microgram/ ml for the ovarian cancer cell lines in which its value is 73377.06 microgram/ml on the natural cell lines .

It was resulted from the treatment of ovarian cancer cells with half lethal inhibitory concentration after it was dyed with crystal violet dye, for 24 hours, various apparent changes, in which the natural cells did not undergo any apparent changes. In order to detect the occurrence of programmed cell death, a double dye, Acridine Orange, was utilized. After treating cells with taxol, dyed for 24 hours, examined using inverted fluorescent microscope, the treated cells were dyed with red color, and spaces that are free of cells, this indicates the cells death, while the untreated cells were green .

In the flow cytometry test for mitochondrial proteins through the membrane and treating the cancer cells with RH123 dye, one peak of ovarian cancer cells shifted to the left compared with untreated cells that have appeared with one peak and shifted to the right .

The screening of the flow cytometry for proteins P53, Caspase 8, and they were two of the most important indicators of programmed cell death, the production of active oxygen molecule ROS in the ovarian cancer cells treated with taxol, and produce Death inducing signaling complex (DISC), and the appearance of one peak and shifted to the left.

The final findings have come to reveal the comet assay technique, with concrete evidence of the damage that the taxol has made on the genetic material of treated ovarian cancer cells,The genetic material showed an increase in the tail length, which is 51.93 micro/lit., whereas the genetic material appeared in a form of centered aura around the cell nucleus, and the tail length was 2.3 ml .

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Extraction, Purification, and Characterization of Taxol Drug from the Local Isolate Mushroom *Schizophyllum radiatum* and Evaluating Its Biological Activites and Anti-Ovarian Cancer Activity

Haneen Salih Salim Al-kurdy

M. Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. Shimal Younis Abdul-Hadi

2023 A.D **1445 A.H**