कैंसर प्रतिरोधी मुख्य अणुओं की जाँच के लिए एक पौधे आधारित जैव आमापन का विकास

Development of a Plant-Based Bioassay System to Screen Anti-Cancerous Lead Molecule(s)

अभीक सामन्त[1], सप्तदिपा बैनर्जी[2], तिलक राज माईति[3], बबिता साहा[4] एवं सिराज दत्ता[5]

[1, 2, 3, 5] हल्दिया इंस्टिट्यूट ऑफ टेक्नोलॉजी, हल्दिया, पूर्व मेदिनीपुर, पश्चिम बंगाल, भारत

[1] प्रभात कुमार कॉलेज, पूर्व मेदिनीपुर, कौनटाई, पश्चिम बंगाल, भारत

[4] भवन्स नेताजी सुभाष चन्द्र बोस विद्यानिकेतन, हल्दिया, पूर्व मेदिनीपुर, पश्चिम बंगाल, भारत

[1]aveekbot@gmail.com , [2]saptadiparock@gmail.com ,
[3]tilakrajmaity@gmail.com , [4]babitasaha@gmail.com , [5]dattasiraj@gmail.com

सारांश

चिकित्सा जीवविज्ञान का एक महत्वपूर्ण पहलू है। औषधियों की विकास प्रक्रिया कैंसर प्रतिरोधी मुख्य अणुओं की पहचान और दवा के विकास लिए की गई सभी रणनीतियां पशु कोशिकाओं पर आधारित हैं। यह प्रक्रिया, स्वाभाविक तौर पर समयसाध्य, महंगी और नैतिक अनुमतियों की आवश्यकता रखती है। प्रस्तुत शोध अध्ययन का लक्ष्य है – एक पौधा आधारित जाँचप्रक्रिया का विकास, जो कैंसर–रोधी दवाओं की प्राथमिक जाँच के लिए काम आ सकता है। इस अध्ययन में कुछ विशिष्ट कैंसर–रोधी दवाओं (मेथोट्रेक्सेट, सिस्प्लैटिन, इटोपोसाइड और विनब्लास्टाइन) का पौधों (*Lathyrus sativus* L.) पर प्रभावोत्पादकता का अध्ययन किया गया है। इस अध्ययन के लिए कैंसर कोशिकाओं के कुछ महत्वपूर्ण लक्षण जैसे – अप्राकृतिक क्रोमोसोम संख्या एवं अनियंत्रित कोशिका विभाजन, क्रोमोसोम का बहुगुणिता एवं कैलोस पालन द्वारा पुननिर्माण किया गया है। इस प्रयोग में दवाओं की बढ़ती हुई सांद्रता के साथ उपचारित कोशिकाओं की सूत्रीविभाजक सूचक, गुणवता स्तर और कैलस की वृद्धि कम होते देखी गई। आणविक और जैव रासायनिक अध्ययनों से ये पता चलता है कि मेथोट्रेक्सेट और सिस्प्लैटिन की बढ़ती हुई सांद्रता के साथ संपूर्ण आरएनए का परिमाण पशु कोश की तरह ही कम हो जाता है। इटोपोसाइड, जिसको मानव नमूनों में एक टोपोआइसोमारेस II की निरोधात्मक दवा के रूप में माना जाता है, वो पौधे में भी टोपोआइसोमारेस II की सक्रियता पर प्रतिबंध लगाता है। इन सीलीको अध्ययन ये दर्शाता है कि पौधा और मानव नमूनों में दवा बंधनकारी स्थल एवं परिवाहक प्रोटीन का निर्माण समरूप हैं। इन प्रयोगात्मक परिणामों से यह कहा जा सकता है कि पौधा आधारित ये प्रस्तावित आमापन व्यवस्था पर विदित कैंसर रोधी दवाओं की प्रभावकारिता पशु कोश की तरह ही है। इस तरह यह निष्कर्ष निकाला जा सकता है कि ये पौधा आधारित प्रस्तावित मॉडल एक प्रभावी लागत, सुविधाजनक, कम समयसाध्य प्रक्रिया है जिसको कैंसर विरोधी मुख्य अणुओं की प्राथमिक जाँच के लिए इस्तेमाल किया जा सकता है।

Abstract

The drug development process is one of the important aspects of medical biology. The classical anti-cancerous lead identification strategy in the way of drug development is based on animal cells. The process is time-consuming, expensive and an ethical issue involved. The

following study aims to develop a novel plant-based screening of drugs. Study shows the efficacy of certain anti-cancerous drugs (Methotrexate, Cisplatin, Etoposide and Vinblastine) on a plant-based (*Lathyrus sativus* L.) system. The characteristics of cancer were made by polyploid as chromosome number and callus as uncontrolled dividing cells. With increasing concentration, the drugs reduce mitotic index, ploidy level and callus growth. Molecular and biochemical study reveals a decrease in total RNA content in cisplatin and Methotrexate with increasing concentrations. Topoisomerase II inhibitory drug etoposide inhibits plant topoisomerase II. The results are similar to the animal system. The in-silico study on structural similarity of drug binding and transporter proteins shows similarity among plants and human beings. Experimental results are significant in terms of the efficacy of known anti-cancerous drugs on the plant-based system. The proposed model is a cost-effective, convenient and less time-consuming process for primary screening of anti-cancerous lead molecules.

मुख्यशब्दः कैंसर–रोधी दवाएं, मुख्य अणु, पौधे आधारित प्राथमिक जांच, दवा खोज, जैव सूचनात्मक उपकरण

Keywords: Anti-cancerous drugs, Lead molecule(s), Plant based primary screening, Drug discovery, Bioinformatic tools

परिचय

दवा (Drug) की खोज, चिकित्सा जैवप्रौद्योगिकी (Medical biotechnology) गवेषणा में एक चुनौतीपूर्ण क्षेत्रों में से माना जाता है [1]। इस अनुसंधान की प्रमुख कठिनाई है – संभावित मुख्य अणुओं (Lead molecule) की पहचान करना। सामान्य तौर पर, 10,000 जैव अणु के बीच में से केवल एक अणु को मुख्य अणु के रूप में मान्यता दी जाती है [2]। दवा की खोज के मूल चरण हैं– मुख्य अणु की विनिर्धारण (Lead identification), दवा इष्टतमीकरण (Drug optimization), दवा का विकास (Drug development) और उम्मीदवार दवा उत्पादन (Drug production)। ऊपर दिए हुए चरणों से गुजरने के बाद एक दवा उम्मीदवार नैदानिक परीक्षण (Clinical trial) के लिए उपयुक्त होती है [2]। दवा विकास प्रक्रिया को गति देने के लिए अलग–अलग रणनीतियां प्रस्तावित की गई हैं [3]। कैंसर–रोधी दवा (Anti-cancer drugs) के विकास में प्रारंभिक और महत्वपूर्ण चरणों में से एक है कोशिका–आधारित जीव परख (Cell based bioassay), जो आम तौर पर मानव कैंसर सेल लाइन का उपयोग करके किया जाता है [3]। लेकिन, यह परियोजना समयसाध्य, अतिरिक्त रूप से तकनीकी कुशलता और विशाल वित्तीय सहायता की आवश्यकता रखता है।

वर्तमान समीक्षा में, कैंसर रोधी दवाओं का पौधों के तंत्र (Plant system) पर प्रभाव का अनुसंधान किया गया है। पौधों की प्रणाली को कैंसररोधी कोशिओं की विशेषताओं जैसे प्रेरित बहुगुणिता (Induced polyploidy) एवं कैलस (Callus) के साथ तैयार किया गया है, और यह पता लगाया गया है [4–5] कि उस पर कुछ कैंसररोधी दवाओं का क्या प्रभाव होता है। सभी प्रमुख केमोथैरेप्यूटिक श्रेणी में से, उनके प्रतिनिधि के रूप में कुछ कैंसर–रोधी दवाओं को चुना गया है जिन्हें सारणी 1 में दिखाया गया है [6–9]। चयनित दवाओं की गतिविधि पौधों की तंत्र में मानव प्रणाली की तरह ही है या नहीं, यह सिद्ध करने के लिए कुछ कोशिकीय (Cytological), आणविक (Molecular) और जैव रासायनिक (Biochemical) अध्ययन किए गए थे। इस प्रस्ताव को स्थापित करने के लिए उन चुनिंदा कैंसर–रोधी दवाओं की ड्रग बाधक स्थल (Drug binding site) अथवा ड्रग परिवाहक (Drug transporter) की संरक्षित क्षेत्र (Conserved domain) की विस्तृत इन सिलिको विश्लेषण किया गया है। इस पूरे काम का लक्ष्य है एक नये पौधे आधारित प्रारूप (Plant

based model) की स्थापना करना, जिसका उपयोग किफायती और सुविधाजनक तरीके से कई कैंसर–रोधी मुख्य अणुओं की प्रारंभिक जांच के लिए किया जा सकता है।

सारणी 1: कीमोथेराप्यूटिक प्रतिनिधि (कैंसर विरोधी दवा) और उसकी क्रिया की विधि

Table 1: Chemotherapeutic agents (anti-cancerous drugs) and their mode of action

Anti-cancerous drugs	Mode of action	Cell cycle inhibiting phase
Vinblastine [7]	Block microtubule assembly/ disassembly	M phase
Methotrexate [8]	DNA precursors analogue/ Anti-metabolites	S phase
Etoposide [9]	Topoisomerase inhibitors	
Cisplatin [6]	Cross-linking of DNA	Non-specific (Cell-cycle phase)

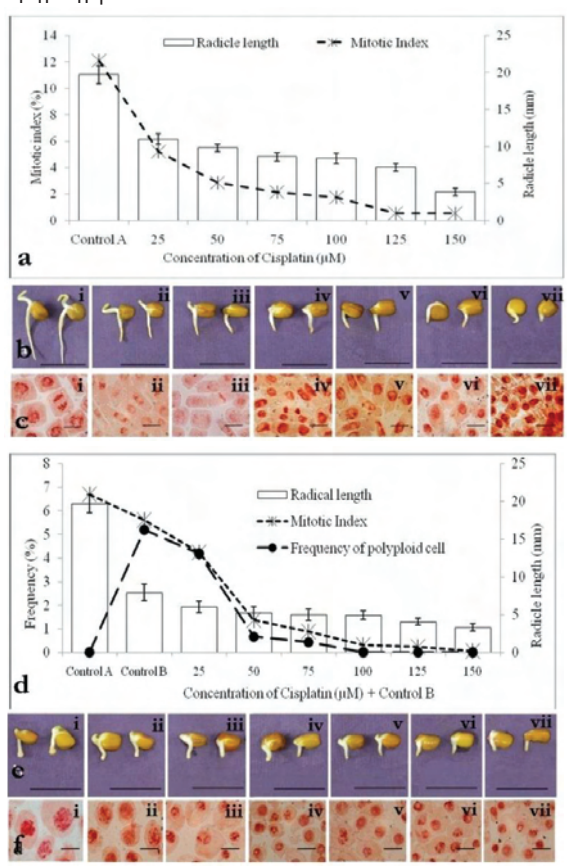
उपकरण एवं पद्धति

जर्मप्लाज्म का चयन

इस काम को करने के लिए *Lathyrus Sativus* L. (परिवार: Papilionaceae; सामान्य नामय घास मटरय 2n = 14) [10] को चुना गया है। पौधे की इस प्रजाति को इसकी आसान उपलब्धता और पूरे वर्ष में समकालिक अंकुरण के आधार पर चुना गया था [11]। इस उद्देश्य के लिए इस पौधे के बीज प्रायोगिक क्षेत्र में रोपित किए गए थे।

इन विवो अध्ययन

L. *sativus* के सूखे बीजों को दवाओं की विभिन्न सांद्रता (विनब्लास्टिन एवं मेथोट्रेक्सेट 0.001, 0.01, 0.1 और 10 µmय ईटोपोसेड एवं सिस्प्लैटिन 25, 50, 75, 100, 125 और 150 µm) में भिगोकर रखा गया था। एक अन्य सेट में बीजों को पहले कोल्चिसीन (0.5%,8h) के जलीय विलयन में भिगोया जाता है और फिर तीन दिनों के लिए कैंसर–रोधी दवाओं के विभिन्न सांद्रता के साथ उपचार किया जाता है। वह बीज, जिन्हें आसवित जल (Distilled water) में भिगोया गया था उन्हें नियंत्रित A (Control A) के रूप में चिन्हित किया गया था और कोल्चिसीन द्वारा उपचारित किया हुआ नमूना को नियंत्रित B (Control B) के रूप में चिह्नित किया गया था। तीन दिनों के बाद जड़ के सिरों (Root tips) को उनकी सांद्रता के हिसाब से उनकी लंबाई और सूत्री विभाजन सूचक (Mitotic index) का अध्ययन किया गया था।



चित्र 1. घास मटर में एक कैंसर विरोधी दवा (सिस्प्लैटिन) के विभिन्न सांद्रता के इन विवो प्रभावः (a) मूलांकुर की लंबाई और उनका सूत्री विभाजन

सूचक। (b) दवा उपचार वालों में कम रेडिकल लंबाई (स्केल बार x= 10mm)। (c) नियंत्रित नमूनों। (i) की तुलना में सिस्प्लैटिन उपचारित नमूनों (ii-vii) में कोशिका विभाजन की मात्रा में कमी देखा गया। (स्केल बार x=25μm)। (d) कोल्चिसीन द्वारा इलाज किये हुए नमूनों को, दवा की विभिन्न सांद्रता से उपचार करने के बाद मूलांकुर की लंबाई, सूत्री विभाजन सूचक और बहुगुणित कोशिकाओं की आवृत्ति की परख। (e) मूलांकुर की लंबाई (नियंत्रित B (1) नमूना में स्पष्ट रूप से गांठ बनी हुई देखी गई, दूसरी ओर उपचारित नमूनों में बढ़ती हुई सांद्रता के साथ साथ गांठ बनने की प्रवृत्ति को गिरता हुआ देखा गया) (स्केल बार x=10mm)। (f) नियंत्रण B में बहुगुणित कोशिकाएंय नियंत्रण बी (i) की तुलना में (ii-vii) कोशिकाओं को विभाजित करने की समाप्ति को प्रकट करने वाले उपचार (स्केल बार x= 25 μm)।

इस अध्ययन में यह देखा गया है कि भिन्न मात्रा में कैंसर–रोधी दवा की व्यवहारिक वृद्धि करने से, जड़ के सिरों में सूत्रीविभाजक सूचक तथा कोशिका विभाजन (Cell division) की आवृत्ति में घटाव हुआ। यह आवृत्ति नियंत्रित A जो कि दवा के बगैर था उन जड़ के सिरों में नहीं देखा गया। रासायनिक कोलचिसिन में भिगोने की कारण जड़ के सिरों ने गांठ का रूप लिया, जिसे बहुगुणिता (Polyploidy) का फल माना जाता है। इस मामले में, नियंत्रित B नमूना के विपरीत, अन्य जड़ के सिरो में बढ़ती दवा सांद्रता के साथ बहुगुणित कोशिकाओं की आवृत्ति भी कम हो जाती है [12-13]। इस से यह अनुमान लगाया जा सकता है कि पौधे की तंत्र में विभिन्न दवाओं का प्रभाव मानव कोशिका जैसे ही समान प्रकार होता है।

इन विट्रो अध्ययनः

प्राथमिक कैलस के विकास के बाद, कैलस का 0.1 ह प्रत्येक उपचार से नमूने के तौर पर लिया गया और तैयार मीडिया (MS Media) में स्थानांतरित किया गया। पांच दिनों के अंतराल पर पैंतीस दिनों तक, दवा उपचारित कैलस का एवं नियंत्रित Control) नमूना का ताजा वजन मापा गया। कैलस की आकृति का भी अध्ययन किया गया।

इन विट्रो अध्ययनों से पता चला कि उपचार के बढ़ते काल के साथ कैलस भूरा हो गया और उच्च सांद्रता में यह परिगलित (Necrotic) हो गया। दवा की बढ़ती सांद्रता के साथ कैलस का ताजा वजन घट गया। यह परिणाम कैलस के अनियंत्रित कोशिका विभाजन पर कैंसररोधी दवाओं के निरोधात्मक प्रभाव के प्रस्ताव को दर्शाता है [12-13] A

इन सिलिको अध्ययनः

विभिन्न चयनित कैंसर–रोधी दवाओं (विनब्लास्टाइन, मेथोट्रेक्सेट, इटोपोसाइड का ड्रग औषधि बंधन स्थल (Drug binding domain) और सिस्प्लैटिन के ड्रग परिवहन प्रोटीन का अनुकरण का अध्ययन किया गया तथा NCBI और TIGR के संरक्षित तथ्य भंडार (Database) से अलग–अलग पौधों की प्रजातियों का अनुक्रम एकत्रित करने के बाद उनकी तुलना CLUSTAL W और PRALINE सॉफ्टवेयर की उपयोग कर के मनुष्यों की ड्रग (सिस्प्लैटिन) परिवहन प्रोटीन की अनुक्रम साथ की गई। प्राप्त आंकड़ों की गणना तथा जातिवृत्तीय संबंध (Phylogenetic relation) बनाने के लिए 5.05 MEGA का उपयोग किया गया [14]।

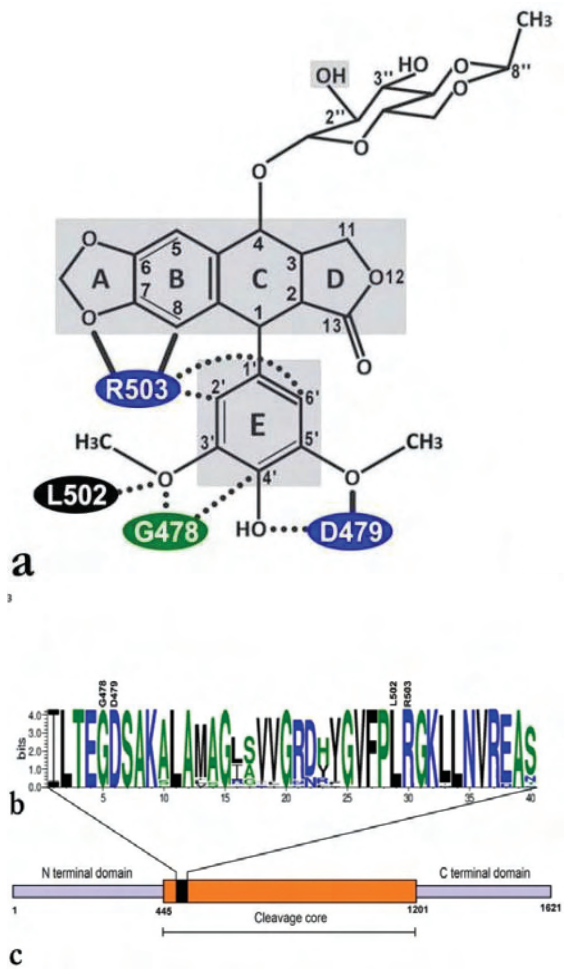
जैव रचनात्मक अध्ययन से पता चला है कि मानव प्रजातियों में और पौधों की प्रजातियों में कैंसर–रोधी ड्रग बंधन स्थल और ड्रग परिवहन का अनुक्रम समान हैं। इस खोज ने सुझाव दिया कि कैंसर रोधी दवाओं का पौधों में समान तरीके से लक्ष्य प्रोटीन से बंधन या परिवहन किया जा सकता है।

जैव रासायनिक और आणविक अध्ययनः

मेथोट्रेक्सेट और सिस्प्लैटिन के लिए दवा उपचारित बीज और कैलस की पूर्ण आरएनए मात्रा (Total RNA content) निर्धारित किया गया। खमीर

(Yeast) के आरएनए (RNA) को मानक मान कर 260nm अवशोषण का उपयोग करके चयन किया गया और नमूनों का पूर्ण आरएनए (RNA) परिमाण मापा गया। अंकुर से डीएचएफआर किण्वक (DHFR enzyme) को अलग किया गया और मेथोट्रेक्सेट की उपस्थिति में किण्वक की सक्रियता निर्धारित की गई।

मेथोट्रेक्सेट एक फोलेट की समधर्मी दवा है जो डीएचएफआर किण्वक के प्रतियोगी अवरोधक (Competitive inhibitor) के रूप में प्यूरीन का जैवसंश्लेषण रोकती है [15–16]। दूसरी ओर सिस्प्लैटिन सीधे मानव कोशिका में आरएनए (RNA) के प्रतिलेखन को रोकता है [17]। दवा उपचारित (मेथोट्रेक्सेट और सिस्प्लैटिन) एवं नियंत्रित नमूनों से पूर्ण आरएनए (RNA) उद्धरण करने के लिए RNeasy Plant Mini Kit (QUIGEN, USA) का उपयोग किया गया। खमीर (Yeast) के आरएनए (RNA) को मानक रूप में उपयोग करके 260nm पर अवशोषण को मापकर आरएनए (RNA) की मात्रा का निर्धारण किया गया। दवाओं की बढ़ती सांद्रता के साथ अंकुर और कैलस के पूर्ण आरएनए (RNA) के परिमाण में घटौती देखी गयी लेकिन विचित्र रूप से, मेथोट्रेक्सेट द्वारा उपचारित नमूनों में 0.001 µm सांद्रता के उपचार में पूर्ण आरएनए (RNA) के परिमाण में वृद्धि होती देखी गई। पूर्व सूचनाओं के आधार पर ये बताया जा सकता है कि मेथोट्रेक्सेट द्वारा उपचारित नमूनों का यह परिणाम निम्न मात्रा में जीन प्रवर्धन के कारण हो सकता है, जैसा कि पहले मानव और पौधे प्रणाली में बताया गया था [18–20]। डीएचएफआर (DHFR) किण्वक की निष्कर्षण और गतिविधि का परीक्षण, मेथोट्रेक्सेट की विभिन्न सांद्रता की उपस्थिति में किया गया था, और 0.001 µm सांद्रता को छोड़कर सभी सांद्रता में डीएचएफआर की सक्रियता की मात्रा निर्भर घटौती देखी गयी।



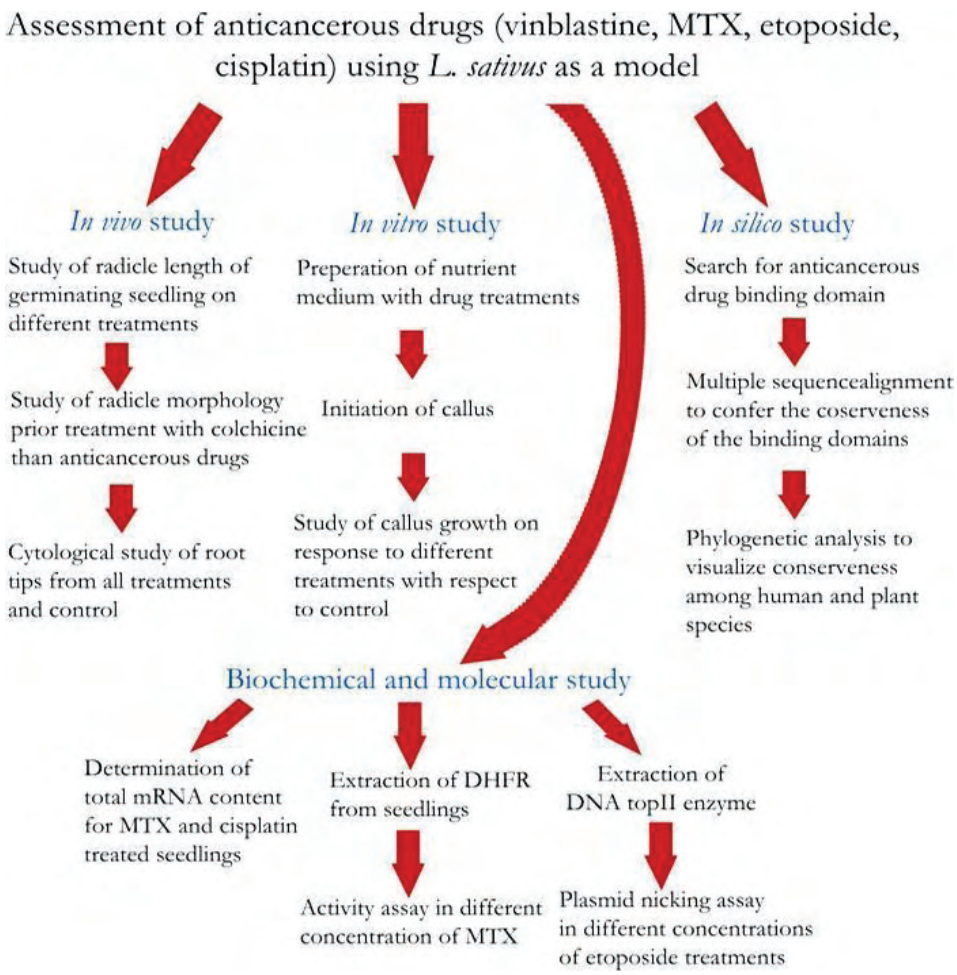
चित्र 2. मानव और पौधों की टोपोआइसोमारेस II में उपस्थित इटोपोसाइड बंधन स्थल की संरचनात्मक समानता। (क) टोपोआइसोमारेस II में उपस्थित इटोपोसाइड का बंधन व अणुओं का आणविक गठन। (ख) पौधों की टोपोआइसोमारेस II में उपस्थित वो स्थान जहाँ इटोपोसाइड बांध सकता है। (ग) पौधों में पायी गयी तीन टोपोआइसोमारेस II बंधन स्थल (काले रंग में चिह्नित)।

इटोपोसाइड एक टोपोआइसोमारेस II एक निरोधात्मक दवा है जो मानव टोपोआइसोमारेस की विनिर्दिष्ट बाधक स्थल पर बाँध सकता है [21]। पौधों की टोपोआइसोमारेस II की जैवरासायनिक अनुसंधान से पता चला है उसकी कार्यकारिता

इटोपोसाइड द्वारा प्रतिरोधित हो सकती है [22]। इस शोध में आणविक संरचना के विश्लेषण से ये पता चला है कि इसमें भी इटोपोसाइड का बंधन स्थल है एवं ये अनुमान लगाया जा सकता है कि मानव टोपोआइसोमारेस II की तरह ही पौधों की टोपोआइसोमारेस II भी इटोपोसाइड के साथ बंध सकता है (चित्र 2)।

निष्कर्ष

वर्तमान अध्ययन के लिए अपनाई गई कार्यप्रणाली को चित्र 3 में दर्शाया गया है। इन सिलिको अध्ययन में मानव और पौधे की प्रजातियों के बीच दवा बंधन स्थल और ड्रग परिवहन की समानता और संरक्षणशीलता का पता चला है। अन्य प्रयोगों और उनके संबंधित परिणामों से यह पता चला है कि विभिन्न कैंसररोधी दवाओं की प्रभावोत्पादकता, *Lathyrus Sativus* L. का बहुगुणित तथा अनियंत्रित कोशिका विभाजन के ऊपर प्रतिबंध लगाता है, जो कि इन विवो या इन विट्रो दोनों अध्ययन में देखा गया है।



चित्र 3. पौधों द्वारा कैंसर विरोधी दवाओं का आकलन करने के लिए किए गए कार्य का प्रवाह चित्र।

सभी प्रायोगिक परिणामों (कोशिकीय, जैवरासायनिक, आणविक और इन सिलिको अध्ययन में) ने पौधों पर विभिन्न कैंसररोधी दवाओं की प्रभाविता के विचार को मजबूत किया है।

अंत में, सभी प्रयासों का परिणाम ये दर्शाता है कि पशु प्रजातियों की तरह ही पौधों की प्रजाति में भी कैंसररोधी दवा समरूप से प्रभावशाली है। इस प्रकार हमारे प्रायोगिक साक्ष्य से, यह मुख्य रूप से प्रस्तावित किया जा सकता है कि पौधे को मुख्य कैंसररोधी अणुओं की प्राथमिक जांच के लिए प्रभावी लागत, सुविधाजनक और कम समय लेने वाले मॉडल के रूप में इस्तेमाल किया जा सकता है।

शोध पत्र में उपयोग किये गए तकनीकी अंग्रेजी शब्दों की हिंदी शब्दावली

Aphabetically sorted technical words in English	वर्णमाला अनुसार हिंदी में लिखे गए तकनीकी शब्द
Anti-Cancer Drugs	कैंसर–रोधी दवा
Binding Site	बाध्यक स्थल
Biochemical	जैवरासायनिक
Cell Based Bioassay	कोशिका–आधारित जीवपरख
Chemotherapeutic	कीमोथैरेप्यूटिक
Competitive Inhibitor	प्रतियोगी अवरोधक
Conserved Domain	संरक्षित क्षेत्र
Cytological	कोशिकीय
Database	तथ्यभंडार
Development	परिवर्धन
Enzyme	किण्वक
Induced Polyploidy	प्रेरित बहुगुणिता
Lead Molecule	मुख्य अणु
Medical Biotechnology	चिकित्सीय जैव प्रौद्योगिकी
Membrane Filter	झिल्ली निस्यंदक
Mitotic Index	सूत्रीविभाजक सूचक
Molecular	आणविक
MS Media	एम एस माध्यम
Necrotic	परिगलित
Optimization	इष्टतमीकरण
Phylogenetic Study	जातिवृत्तीय संबंध
Root Tips	जड़ के सिरे
Transporter	परिवाहक
Yeast	खमीर

स्वीकृति

इस शोध–पत्र के लेखकगण हिंदी पाण्डुलिपि के निर्माण में बहुमूल्य योगदान के लिए श्रीमती संगीता जोअरदर, वरिष्ठ पुस्तकालयाध्यक्ष, नेताजी सुभाष चंद्र बोस विद्या निकेतन, हल्दिया के आभारी हैं। इस काम को DBT (102/IFD/SAN/2268/2019–2020 तारीख 30/09/2019), भारत सरकार की अनुदान सहायता से संपन्न किया गया है।

संदर्भ (References)

1. Butler, M. S. (2004): The role of natural product chemistry in drug discovery. Journal of natural products, 67 (12), 2141-2153.
2. Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005): Drug discovery from medicinal plants. Life sciences, 78 (5), 431-441.
3. Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005): The evolving role of natural products in drug discovery. Nature reviews Drug discovery, 4 (3), 206-220.
4. Caperta, A. D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, W., & Houben, A. (2006): Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma, 227 (2-4), 147-153.
5. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013): Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell, 25 (9), 3159-3173.

6. Desoize, B., & Madoulet, C. (2002): Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. Critical reviews in oncology/hematology, 42 (3), 317-325.
7. Jordan, M. A. (2002): Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 2 (1), 1-17.
8. Bedhomme, M., Hoffmann, M., McCarthy, E. A., Gambonnet, B., Moran, R. G., Rébeillé, F., & Ravanel, S. (2005): Folate metabolism in plants an arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. Journal of Biological Chemistry, 280 (41), 34823-34831.
9. Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005): Etoposide, topoisomerase II and cancer. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 5 (4), 363-372.
10. Talukdar, D. (2010): Cytogenetic characterization of induced autotetraploids in grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Caryologia, 63 (1), 62-72.
11. Ochatt, S. J., Sangwan, R. S., Marget, P., Ndong, Y. A., Rancillac, M., Perney, P., & Röbbelen, G. (2002): New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumeshh. Plant Breeding, 121 (5), 436-440.
12. Samanta, A., Datta, S., Maity, T. R., Mandal, A., & Datta, A. K. (2014): Assessment of methotrexate on dihydrofolate reductase activity, total RNA content and cell division of *Lathyrus sativus* L. The Nucleus, 57 (2), 129-134.
13. Samanta, A., Datta, S., Datta, A. K., Maity, T. R., Mandal, A., & Das, D. (2015): Assessment of Cisplatin, Etoposide, Vinblastine and *Piper betle* leaf extract on some attributes of cell division in *Lathyrus sativus* L. Cytologia, 80 (4), 483-488.
14. Samanta, A., Datta, A. K., & Datta, S. (2014): Study on folate binding domain of dihydrofolate reductase in different plant species and human beings. Bioinformation, 10 (2), 101.
15. Wright, J. E., Yurasek, G. K., Chen, Y. N., & Rosowsky, A. (2003): Further studies on the interaction of nonpolyglutamatable aminopterin analogs with dihydrofolate reductase and the reduced folate carrier as determinants of *in vitro* antitumor activity. Biochemical pharmacology, 65 (9), 1427-1433.
16. Berger, S. H., Pittman, D. L., & Wyatt, M. D. (2008): Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy. Biochemical pharmacology, 76 (6), 697-706.
17. Donn, G., Tischer, E., Smith, J. A., & Goodman, H. M. (1984): Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. Journal of molecular and applied genetics, 2 (6), 621.
18. Alt, F. W., Kellems, R. E., Bertino, J. R., & Schimke, R. T. (1978): Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. Journal of Biological Chemistry, 253 (5), 1357-1370.
19. Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., & Pérez, J. M. (2007): Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 7 (1), 3-18.
20. Cella, R., &Parisi, B. (1993): Dihydrofolate reductase and thymidylate synthase in plants: an open problem. Physiologia Plantarum, 88 (3), 509-521.
21. Mc Clendon, A. K., & Osheroff, N. (2007): DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 623 (1-2), 83-97.
22. Samanta, A., Maity T. R., Das S., Datta A. K., & Datta S. (2019): Effect of etoposide on grass pea DNA topoisomerase II: an *in silico, in vivo, and in vitro* assessments. Bulletin of the National Research Centre, 43 (1), 1-9.