مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۲، شماره‌ی ۹۵، بهمن و اسفند ۱۳۹۳، صفحات ۶۷ تا ۷۹

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌های آبی و الکلی برگ‌های گیاه منتاسپیکاتا (*Mentha spicata*) بر رده‌ی سلول سرطانی K562

الهه اصلانی[۱]، دکتر نوشین نقش[۲]، دکتر منیره رنجبر[۳]

نویسنده‌ی مسوول: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده‌ی زیست شناسی aslani2525@gmail.com

دریافت: ۹۲/۱۱/۱۳ پذیرش: ۹۳/۴/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یک اختلال کلونال بدخیم سلول‌های بنیادی خون ساز است که منجر به‌افزایش سلول‌های میلوئید، سلول‌های اریتروئیدی و پلاکت‌ها در خون محیطی و هیپرپلازی در مغز استخوان می‌شود. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر سیتوتوکسیکی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی برگ‌های منتاسپیکاتا بر روی لاین سلولی K562 به عنوان مدل لوسمی میلوئید مزمن صورت گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی آزمایشگاهی، برگ‌های منتاسپیکاتا از شهر بویین جمع‌آوری و با استفاده از روش سوکسله عصاره‌گیری شد. سلول‌های K562 کشت داده شد و با غلظت‌های عصاره (۱۲/۵ تا ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تحت درمان قرار گرفتند. سمیت سلولی عصاره‌ی منتاسپیکاتا علیه سلول‌های K562 لوسمی با استفاده ازروش MTT برآورد شد. جذب با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.*

یافته‌ها: *عصاره‌ی اتانولی بالاترین اثر سیتوتوکسیک را در (IC50=۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان داد، درحالی که عصاره‌ی آبی حداقل اثر سیتوتوکسیک را در (IC50=۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در میان عصاره‌ها نشان داد. عصاره‌ی متانولی اثر سیتوتوکسیک را در IC50=۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی رده‌ی سلولی K562 بروز داد. عصاره‌های آبی و الکلی اثر سیتوتوکسیک را به صورت وابسته به دز در رده‌ی سلولی K562 به نمایش گذاشت.*

نتیجه گیری: *با توجه به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی والکلی برگ منتاسپیکاتا بر سلول‌های K562، گیاه می تواند به عنوان یک پتانسیل بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان CML مورداستفاده قرارگیرد.*

واژگان کلیدی: ***سیتوتوکسیک، لوسمی، منتاسپیکاتا، سوکسله، K562، CML***

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن [Myeloid Leukemia Chronic(CML)] نوعی سرطان خون است که به دلیل وقوع یک جابه جایی دوطرفه بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

۲- دکترای فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

۳- دکترای فیزیولوژی گیاهی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

توان ایجاد می‌شود (۱). انکوژن Bcr-Abl حاصل از این جابه جایی، پروتئین p210Bcr-Abl را کد می کند که فعالیت تیروزین کینازی پیوسته و مداوم آن سبب تکثیر بی‌رویه‌ی سلول‌های پیش ساز میلوئید می‌شود (۱). این رده‌ی سلولی جداشده از نوعی سرطان خون بنام CML می‌باشد. بیشتر مبتلایان به این سرطان دچار جهش یا تغییر ژنتیکی موسوم به کروموزوم فیلادلفیا هستند (۲). گیاهان دارویی و معطر به عنوان منبع اولیه‌ی حفظ سلامتی تلقی شده و بیش از ۸۰ درصد مردم جهان آن را تهیه و مصرف می‌نمایند (۳). از جمله گیاهانی که به طورگسترده برای اهداف مختلف در جهان مورد بررسی و استفاده قرارگرفته، گیاهان متعلق به خانواده‌ی لامیاسه است که مشتمل بر بیش از ۲۰۰ جنس و ۳۰۰ گونه می‌باشد (۴) و عمدتا در کشورهای معتدل وجود دارد (۶) گیاه پونه با نام علمی متناسپیکاتا از خانواده‌ی لامیاسه بوده که به‌طور عمده به‌عنوان ضدنفخ، ضد اسپاسم و ضدالتهاب در ایران مصرف می‌شود (۵). به‌طور سنتی جوشانده این گیاه برای درمان فیبروز و سرطان گردن رحم مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال هیچ تحقیق علمی مبنی بر سمیت سلولی این داروی گیاهی در سرطان خون میلوئیدی مزمن گزارش نشده است (۶). در گونه‌های این خانواده ترکیبات ترپنوئیدی، فنولیک و فلاونوئید مشاهده شده است منتون از ترکیبات عمده موجود در برگ و گل‌های گیاه پونه است (۷). در جهان گیاهان متناسپیکاتا و متاپیپریتا (*Mentha spicata* و *Mentha piperita*) برای تولید روغن به‌طور تجاری کشت می‌شوند (۸) که ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی دارا می‌باشند (۹) از آنجایی که تولید بالای گونه‌های اکسیژن واکنش دهنده بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن باعث استرس اکسیداتیو و وقایع پاتولوژیکی نظیرسرطان می‌شوند، از راه‌های حذف آن‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که (۳) در این بین خانواده‌ی لامیاسه منبع غنی از گونه‌های گیاهی حاوی مقدار زیادی اسیدهای فنولیک می‌باشند. فلاونوئیدها در خانواده‌ی لامیاسه در شکل ساختمانی گوناگون شامل فلاون‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها، دی‌هیدروفلاونول و چالکون‌ها وجود دارند. این ترکیبات مسوول ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این خانواده‌اند (۱۰). در سال‌های گذشته مطالعات زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی مثل پونه انجام شده است که درطی بررسی عملکرد ضدمیکروبی این گیاه ترکیبات فنولیک با مقدار بالا گزارش شده است (۴). در پژوهشی خواص آنتی‌اکسیدانی گونه متناسپیکاتا در مقایسه با بوتیل‌هیدروکسی آنیزول خواص مساوی و در شرایطی عملکرد بهتر از این گیاه مشاهده شده است (۱۱). در پژوهش دیگر ترکیب اس کارون (S-carvone) موجود در این گونه پونه، باعث بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده که با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آلفا توکوفرول قابل مقایسه است (۹). در پژوهشی گزارش شد که گیاه پونه به‌واسطه داشتن فلاونوئید و فنل بالا می‌تواند به‌عنوان عامل موثر در حذف رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل ایجاد کننده‌ی سرطان‌های مختلف باشد (۸). به‌طوری که امروزه سازمان جهانی بهداشت به مکان‌هایی که به درمان متداول دسترسی ندارند، توصیه می‌کند که از گیاهان بهره‌گیرند (۱۲). با اثبات نقش فنولیک‌های به‌دست آمده از گیاهان بر ممانعت از تولید رادیکال آزاد و کاهش آسیب سلول‌ها طی استرس اکسیداتیو (۱۳) استفاده از گیاهان برعلیه سرطان مساله‌ای حای‌ز اهمیت است. در گیاه متناسپیکاتا، گلیکوزید اریوسیترین،کافئیک اسید، دیمر اسید رزماریک، کلروژنیک اسید و گلیکوزید فلاونوئید هیدروکسیله شده در موقعیت ۳ و ۵ عمده ترکیبات فنولیک شناسایی شده که به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی عمل کرده‌اند (۱۴). عصاره‌ی متانولی و آبی گونه‌های دیگر از پونه به‌واسطه داشتن ترکیباتی شامل ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها، عملکرد آنتی‌اکسیدانی نشان داده است (۱۳). باتوجه به اینکه تاکنون مطالعه جامعی در زمینه‌ی اثر ضد سرطانی گیاه متناسپیکاتا بر

مدل‌های لوسمی صورت نگرفته، از سوی دیگر درمان قطعی برای CML ارایه نشده است، هدف از مطالعه‌ی حاضر تعیین اثر سمیت سلولی عصاره‌های الکلی و آبی برگ گیاه منتاسپیکاتا بر رده‌ی سلولی K562 به‌عنوان مدلی از CML می‌باشد تا اثر ضد سرطانی آن در درمان این نوع لوسمی به‌طور مقدماتی و برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گیرد. امروزه از روش‌های رنگ سنجی به خاطر سهولت در به کارگیری و دقت کافی در حصول نتایج، بیشتر استفاده می‌شود. رنگ‌هایی مثل MTT، نوترال‌رد، XTT کاربرد بیشتری دارند (۱۴). یکی از فاکتورهای موثر درMTT تعداد سلول‌های زنده است که برای اطمینان از درصد سلول‌های زنده، Viabilityسلول‌ها را با تریپان بلو محاسبه می‌نماید. باید توجه نمود که اساس بررسی سمیت سلولی دارو یا گیاهان دارویی بر سلول‌ها مشاهده تغییرات مورفولوژیکی آن‌ها می‌باشد (۱۵). در این مطالعه به بررسی اثر سمیت سلولی ناشی از گیاه دارویی برگ‌های منتاسپیکاتا با غلظت‌های ۱۲،۵، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر لاین سلولی سرطان خون میلوئیدی مزمن انسان (K562) پرداخته شد، آیا برگ‌های گیاه دارویی منتاسپیکاتا با غلظت‌های مورد نظر اثرضد سرطانی بر سلول‌های سرطان خون میلوئیدی مزمن دارد، سوالی بود که این پژوهش به آن پاسخ داد.

روش بررسی

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری: به منظور انجام مطالعه‌ی تجربی آزمایشگاهی حاضر، گیاه منتا سپیکاتا تیرماه سال ۱۳۹۱ از مزارع شهر بویین و میاندشت اصفهان برداشت شد. از پودر برگ این گیاه عصاره‌های الکلی و آبی به‌طورجداگانه به روش سوکسله تهیه شد. برگ گیاه پس از خشک کردن توسط دستگاه خردکننده کاملا آسیاب و پودر حاصل تا زمان عصاره‌گیری در جای خشک و خنک نگهداری گردید. روش سوکسله یک روش متداول عصاره‌گیری بوده که در آن مقدار ۳۴ گرم پودر برگ را ابتدا داخل کاغذ مخصوص کارتوش (Cartush) ریخته و در دستگاه عصاره‌گیری که شامل یک کیسه‌ی حرارتی (Shofbalon) است، قرار می‌دهند. سپس حدود ۴۰۰ سی‌سی الکل اتانول خالص داخل بالن ریخته و همچنان که کیسه‌ی حرارتی گرم می‌شود، الکل نیز گرم شده و آرام آرام عصاره‌ی برگ پونه منتاسپیکاتا با الکل مخلوط و به بالن بر می‌گردد. عصاره‌گیری ۴۸ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در الکل از پودر استخراج شده است. برای تهیه‌ی عصاره آبی و متانولی نیز به شیوه‌ی فوق عمل شده است.در پایان حلال از عصاره‌ی الکلی و عصاره‌ی آبی به‌طور جداگانه حذف شد و عصاره‌ی خالص الکلی و عصاره‌ی آبی به‌دست آمد (۱۶).

رده‌ی سلولی: لاین سلولی K562 در مهر ۱۳۹۱ از انستیتو پاستور ایران-تهران تهیه شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان انتقال یافت. برای رشد این لاین سلولی از محیط کشت RPMI 1640(Bia idea ایران) که غنی شده با سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) ۱۰ درصد (Bia idea ایران) و آنتی‌بیوتیک‌های استروپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، سیناژن تهران) بود، استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت سلولی در انکوباتور Standard انگلیس با شرایط Co_2 ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قرار گرفتند.

سنجش سمیت سلولی بر اساسMTT: به‌منظور بررسی اثرات منتاسپیکاتا بر ظاهر سلول‌های K562 تعداد 10^5 سلول در ظروف ۹۶ چاهکی (Surface دانمارک) قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها باغلظت‌های متفاوت منتاسپیکاتا (۱۲/۵، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در فاصله زمانی ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با منتاسپیکاتا با استفاده از میکروسکوپ

نوری معکوس (Hm-Lux آلمان) در قیاس با نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مورد ارزیابی قرارگرفت. هم‌چنین برای بررسی اثر متناسپیکاتا بر رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و هموسایتومتر استفاده شد. برای این منظور تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. در اولین ردیف پلیت ۹۶ خانه، ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت و در ردیف‌های دیگر ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، به ردیف‌های اول و دوم ۲۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کرده، ردیف اول به‌عنوان بلانک و ردیف دوم به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به‌ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر داروی استاندارد دوکسوروبیسین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه کرده و این ردیف به‌عنوان کنترل مثبت در نظرگرفته شد.۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متناسپیکاتا (۱۲/۵ تا ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ردیف‌های چهارم تا دوازدهم برای زمان ۷۲ ساعت اضافه شد و در این بازه زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده ازلام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Merck آلمان) مورد شمارش قرار گرفت. این آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه به طور مستقل انجام شد. در ادامه جهت بررسی اثر کشندگی برگ متناسپیکاتا بر سلول‌های K562 از آزمون احیای نمک تترازولیوم (Methyl -MTT Thiazol Tetrazzolium) استفاده شد. نمک تترازولیوم به‌واسطه‌ی فعالیت میتوکندریایی سلول‌های زنده به بلورهای فورمازان که جذب متفاوتی دارند احیا می‌شوند. به‌این منظور $۱۰^{۴}$ سلول در هر چاهک بارگذاری شد، پس از ۲۴ ساعت غلظت‌های متفاوت از عصاره‌های آبی و الکلی متناسپیکاتا اضافه شد و با فرا رسیدن هر یک از فواصل زمانی ۲۰ میکرولیتر از نمک تترازولیوم (Sigma مالزی) اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان جذب نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از دستگاه الایزا (Statfix-2100 آمریکا) خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در تحقیق حاضر کلیه‌ی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد نمایش داده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون T استفاده و داده‌های با ارزش $P<۰/۰۵$ از نظرآماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج تستMTT: لازم به توضیح است بازه‌ی انتخابی غلظت متناسپیکاتا بر مبنای اثرات ضدسرطانی آن در مقالات مختلف و همچنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. جدول ۱ بیانگر درصد بقای سلول‌های K562 در حضور گروه‌های کنترل می‌باشد، که برای بررسی دقیق اثرسیتوتوکسیکی از داروی استاندارد دوکسوروبیسین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (جدول۱). با توجه به جدول ۲، عصاره‌ی اتانولی IC50=۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصاره‌ی متانولی IC50=۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره‌ی آبی IC50=۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتیجه داده است. که در غلظت‌های ذکر شده پنجاه درصد سلول‌های زنده توسط عصاره‌های آبی و الکلی متناسپیکاتا ازبین رفته است (جدول۲).

جدول ۱: درصد زیستایی سلول‌های K562 در گروه کنترل منفی (سوسپانسیون سلولی) و در حضور کنترل مثبت (داروی دوکسوروبیسین)

کنترل منفی	کنترل مثبت (دوکسوروبیسین)
۱۰۰±۴/۶	۱۴/۱±۱/۵*

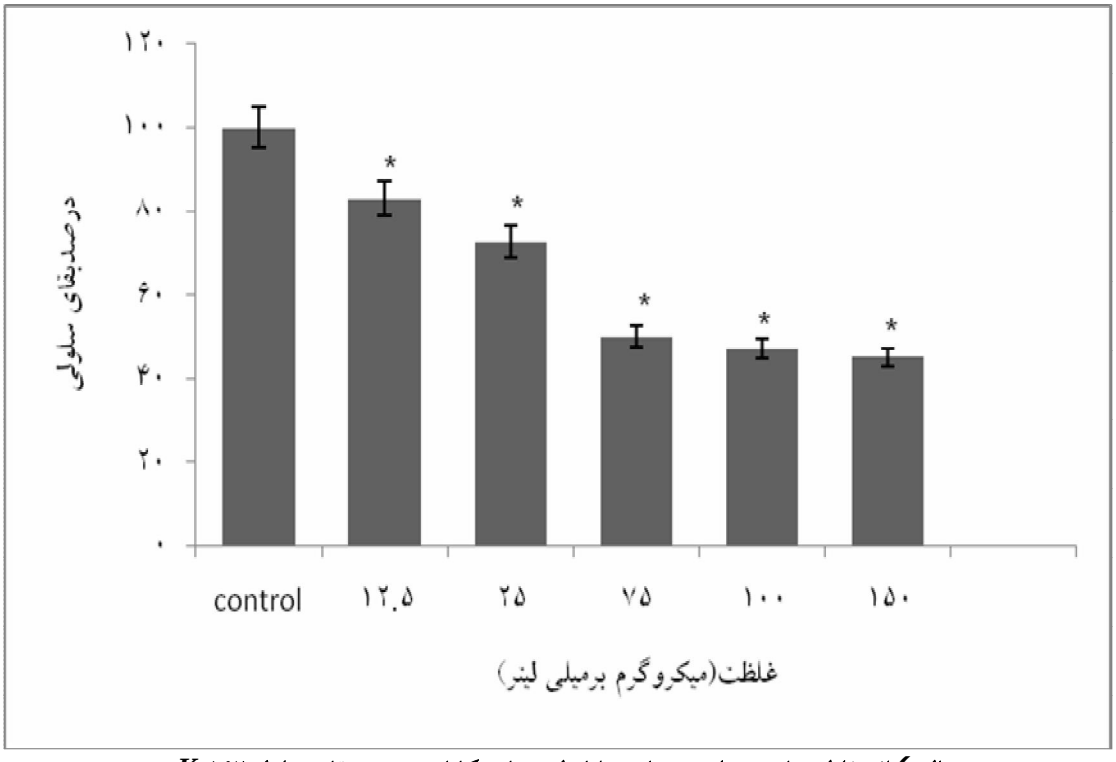
***P<۰/۰۵ ***

جدول ۲: درصدزیستایی سلول‌های K562 تحت تیمار با عصاره‌های آبی والکلی برگ متناسپیکاتاباتوجه به روش MTT± انحراف استاندارد

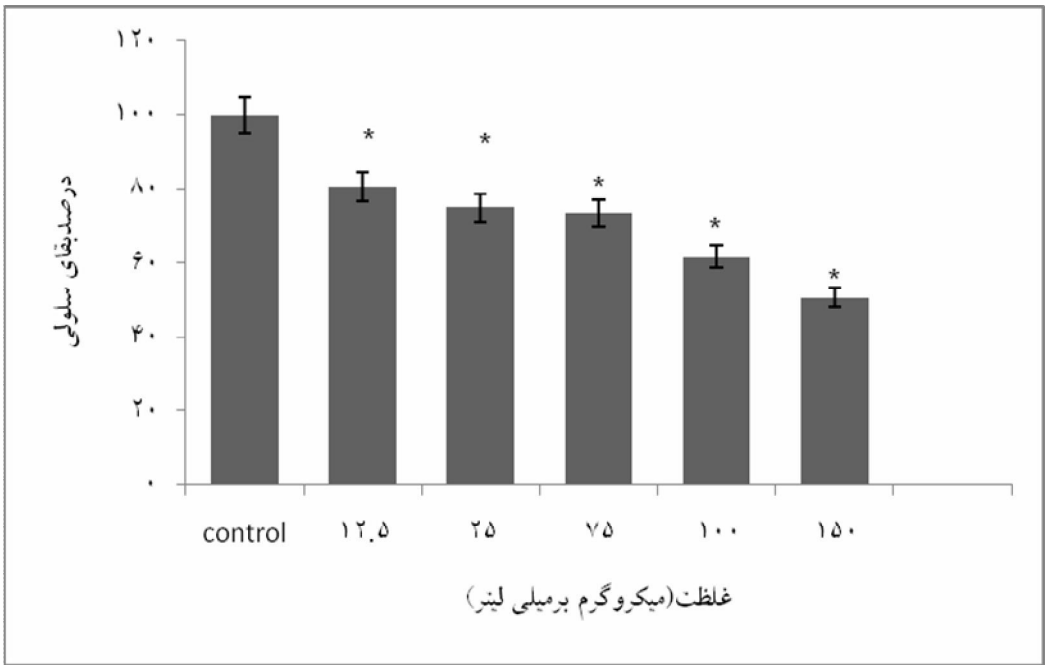
غلظت‌ها (میکروگرم بر میلی‌لیتر):IC50	درصد زیستایی سلولK562	نوع عصاره
۷۵	*۵۰/۱±۳/۱	عصاره اتانولی
۱۰۰	*۵۰/۸±۵/۶	عصاره متانولی
۱۵۰	*۵۰/۶۱±۰/۳۸	عصاره آبی

***P<۰/۰۵ ***

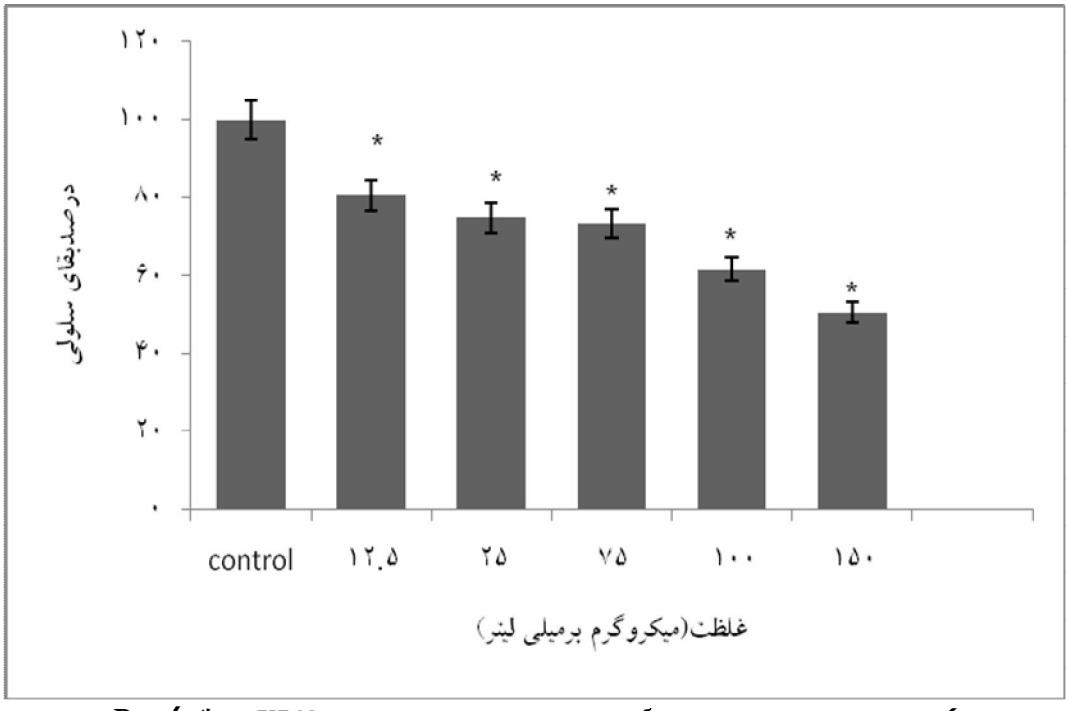
طبق داده‌های نمودار ۱ عصاره‌ی اتانولی در غلظتی پایین‌تر یعنی IC50= ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به عصاره‌ی متانولی و آبی نتیجه داده است. با افزایش غلظت عصاره‌ی اتانولی متناسپیکاتا درصد بقای سلول سرطانی K ۵۶۲ رو به کاهش گذاشته است. به‌گونه‌ای که بیشترین درصد بقای سلول در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین درصد بقا در غلظت ۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر نتیجه شده است.جالب توجه این است که در عصاره‌های آبی و متانولی نیز با افزایش غلظت عصاره‌ی متناسپیکاتا درصد بقای سلولی نسبت به گروه کنترل رو به کاهش گذاشته است (نمودار ۱). نتایج نشان می‌دهد که، میزان بقای سلول K ۵۶۲ در غلظت‌های مختلف رو به کاهش گذاشته است. همچنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده‌ها P<۰/۰۵ را نشان می‌دهد که سطح معنی‌داری در نظرگرفته می‌شود.



الف) اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی متناسپیکاتا بر درصد بقای سلول K ۵۶۲



ب) اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی منتاسپیکاتا بردرصد بقای سلول K ۵۶۲



*ج) اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی منتاسپیکاتا بر درصد بقای سلول K562 *P<۰/۰۵*

نمودار ۱-الف) عصاره‌ی اتانولی ب) عصاره‌ی متانولی ج) عصاره‌ی آبی: اثرات منتاسپیکاتا بر درصد بقای سلول‌های K562 سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از منتاسپیکاتا با استفاده ازشمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است. P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

بحث

امروزه روش‌های مختلفی در درمان سرطان خون به‌کار گرفته می‌شود؛ از جمله این روش‌ها، شیمی درمانی است. اما در این روش به‌دلیل غیر انتخابی بودن داروهای مورد استفاده، درصد زیادی از سلول‌های سالم خون نیز به‌همراه سلول‌های سرطانی از بین می‌روند (۱۷) در مطالعه‌ی حاضر، برگ‌های گیاه منتاسپیکاتا اثرسیتوتوکسیکی وابسته به دز را در عصاره‌های الکلی و آبی نشان دادند. به‌گونه‌ای که در هر سه نوع عصاره (اتانولی، متانولی و آبی) با افزایش غلظت، درصد بقای سلولی کاهش یافته است. البته عصاره‌ی اتانولی در غلظتی پایین‌تر که ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است، IC50 را ثبت کرده و عصاره‌ی آبی در غلظت بالاتر که ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده، پنجاه درصد سلول‌ها را در محیط کشت از بین برده است.

استفاده از روش‌های کشت سلولی درک بسیار عمیق‌تری از تاثیر داروها و گیاهان دارویی بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال پدید می‌آورد. اثرات و تغییراتی که ترکیبات مختلف مانند عصاره‌های برگ گیاه منتاسپیکاتا (که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند) بر سلول‌ها در فضای کنترل شده و قابل بررسی کشت سلولی ایجاد می‌نمایند، شناسایی دقیق‌تر مکانیسم و اثرات بیولوژیکی آن‌ها و همچنین اثرات آن‌ها بر فاکتورهای مختلف داخل سلولی را امکان‌پذیر می‌سازد. این امکانات شناسایی هرچه بهتر فرایندها و فعل و انفعالات داخل سلولی طی درمان سرطان با گیاهان دارویی را ممکن می‌سازد که می‌تواند به ارتقای روش‌های درمانی منجر گردد (۱۸).

گیاه منتاسپیکاتا دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. از آنجایی که تولید بالای گونه‌های اکسیژن واکنش دهنده بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن موجب استرس اکسیداتیو و وقایع پاتولوژیکی نظیر سرطان می‌شوند از راه‌های موثر حذف گونه‌های اکسیژن واکنش دهنده‌ی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. خانواده لامیاسه منبع غنی از گونه‌های گیاهی حاوی مقدار زیادی اسیدهای فنولیک می‌باشد که به‌همراه فلاونوئیدها مسوول ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاهان می‌باشند (۱۹). در بررسی‌های انجام شده برخواص آنتی‌اکسیدانی گونه منتاسپیکاتا در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مثل بوتیل هیدروکسی آنیزول خواص مساوی و در شرایطی عملکرد بالاتر مشاهده شده است (۲۰).

ترکیب S-Carvone موجود در منتاسپیکاتا فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا را ایجادکرده که با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آلفا توکوفرول قابل مقایسه است (۱۹). در گیاه منتاسپیکاتا، گلیکوزید اریوسیترین، کافئیک اسید، دیمر اسید رزماریک، کلروژنیک اسید وگلیکوزید، فلاونوئید هیدروکسیله شده در موقعیت ۳ و ۵ عمده ترکیبات فنولیک شناسایی شده است که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان گیاه را می‌توان استفاده کرد (۲۱).

در مطالعه‌ای، عصاره‌ی اتیل استاتی منتاسپیکاتا بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی را نسبت به عصاره‌ی آبی، کلروفرم و هگزانی آن دارد (۲۲). بانظر اجمالی به جداول و شکل‌های ارایه شده در نتایج می‌توانیم دریابیم که می‌توان ادعا کرد که عصاره‌های الکلی و آبی برگ‌های گیاه منتاسپیکاتا دارای اثر سیتوتوکسیکی بر روی لاین سلولی سرطانی خون میلوئید مزمن انسانی (K۵۶۲) بوده است. در پژوهش حاضر با توجه به اینکه در تمامی غلظت‌های الکلی و آبی خاصیت ضد سرطانی نتیجه شد، نشان دهنده‌ی حضور ترکیبات ضد سرطانی قوی در برگ گیاه منتاسپیکاتا بوده است. فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله اثرات آنتی‌اکسیدان، آنتی‌میکروبی و ضدالتهابی آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است. فعالیت آنتی‌اکسیدان ترکیبات فنلی و نقش مفید آن‌ها در بیماری‌های کرونری و سرطان بررسی شده است (۲۳). آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره‌ی آبی الکلی پونه باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده توسط چربی‌های موجود در کبد می‌شود (۲۴). بنابراین عصاره‌ی

برگ گیاه پونه در دزهای کم و متوسط دارای اثرات محافظتی بر کبد بوده ولی در دزهای بالا به‌دلیل وجود ترکیب روغنی پولگون می‌تواند اثرات سمی بر کبد داشته باشد. عصاره‌ی آبی الکلی پونه از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (۲۵). عصاره‌ی آبی الکلی گیاه پونه دارای فلانوئید است که به‌طور مستقیم بر سنتز پروستوگلاندین‌ها اثر می‌گذارد (۲۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه کوهی با استفاده از ۲ روش بتا کاراتون، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DDPH) بررسی شد (۲۷). ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی گیاه پونه با روش DPPH میزان IC50 عصاره‌ی متانولی را برابر ۷۴/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اعلام کرد (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر حاجی قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی منتاسپیکاتا تحقیق کرده‌اند. در این مطالعه اثر سیتوتوکسیکی عصاره‌ی آبی این گونه نعناع در دو خط سلول توموری فیبر سارکوما و لوسمیک مونوسیت بررسی شد. که LD50 برای لاین سلولی فیبر سارکوما ۵/۹۷، ۴/۶۳ و ۴/۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و LD50 برای لاین سلولی لوسمیک مونوسیت ۵/۶، ۵/۳ و ۴/۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت به‌دست آمد (۲۹). در مقایسه‌ی تحقیق ما با حاجی قاسمی شباهت و همخوانی نزدیکی حاصل می‌شود. زیرا در مقایسه‌ی حاجی‌قاسمی نیز عصاره‌ی آبی به‌دست آمده از منتاسپیکاتا اثر سیتوتوکسیکی خوبی را بر روی هر دو لاین سلولی نشان داده است. در مطالعه‌ای توسط بادیسا و همکارانش (۲۰۰۳)، نوزده عصاره‌ی متانولی از گیاهان خانواده‌ی لامیاسه، جمع‌آوری شده از نقاط مختلف یونان، که برای فعالیت سیتوتوکسیکی علیه میگو آب شور و سه خط سلولی سرطان انسانی همراه با سلول‌های موش معمولی به عنوان یک خط سلول کنترل، مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون مرگبار میگوی آب شور، گیاه پونه تنها نمونه‌ای بود که LC50 را به غلظت ۳۴۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد؛ در حالی که تمام نمونه‌های باقی مانده LC50 را در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. مزیت پژوهش ما در مقایسه با بادیسا، به‌دست آوردن اثر سیتوتوکسیکی منتاسپیکاتا بر روی رده‌ی سرطان خون میلوئیدی مزمن در غظت‌های پایین‌تر از بادیسا بوده است. از طرف دیگر در پژوهش حاضر برای دستیابی به نتایج جامع، سه عصاره مورد بررسی قرار گرفت (۳۸).

فرناندا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اثر ضد تکثیری عصاره‌ی هگزانی گل نعناع در گونه‌ی منتاسپیکاتا را در ارتباط با منتاروتوند و فولیا، در برابر سرطان پستان در انسان، سرطان دهان اپیدرمی انسان و فیبروبلاست جنینی موش، مورد بررسی قرار داده است. نتایج کار فرناندا نشان داد که فعالیت ضد تکثیری عصاره‌ی هگزانی گل نعناع در برابر خط سلولی تومور پستان و دهان IC50 = ۲۹۱/۰۷۸ Mg/ml می‌باشد و هم چنین عصاره‌ی هگزانی نعناع فعالیت ضد تکثیری در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش را برای IC50 در غلظت ۳۸۴/۵۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان می‌دهد (۳۱). تفاوت پژوهش حاضر با کار فرناندا در نوع عصاره، رده‌ی سلول سرطانی، بخش مورد آزمون گیاه منتاسپیکاتا بوده است که در پژوهش حاضر برگ این گیاه، IC50 را در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به‌صورت عصاره‌ی اتانولی به‌دست آورده است.

رحیمی فرد و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر شش گونه اسانس و عصاره‌ی پونه را بر روی سه لاین سلولی Vero (کلیه‌ی میمون سبز آفریقایی)، Hella (سرطان گردن رحم بدخیم) و Hep2 (سرطان حنجره) را بررسی نمودند که *Mentha spicata* بیشترین اثر سیتوتوکسیکی خود را به‌صورت اسانس بر روی رده سلولی Hella نشان داد. مقایسه‌ی پژوهش حاضر با کار رحیمی فرد نشان دهنده‌ی تاثیر خوب سیتوتوکسیکی منتاسپیکاتا هم به‌صورت عصاره و اسانس است که البته باتوجه به‌تفاوت در لاین‌های سلولی مورد پژوهش محققان را برای تاثیر اسانس این گیاه بر روی

لاین سلول K562 راغب خواهد کرد. در پژوهشی توسط اصلانی و همکاران اثر سیتوتوکسیکی گونه دیگری از پونه با نام منتاپولگیوم در مرحله‌ی قبل از گلدهی با IC50=50 میکروگرم بر میلی‌لیتر برروی رده سلول سرطانی K562 به‌نتیجه رسید که ما را به‌سمت اهمیت ضد سرطانی خانواده لامیاسه بر روی لاین‌های سرطان خون رهنمون می‌سازد (۳۳). کاتالینیک ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی که به‌صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی گزارش کردند و بیان کردند که این ترکیبات بیشتر از طریق عصاره‌های گیاهی در مقایسه با اسانس آن‌ها قابل استخراج است (۳۴). از این رو در این پژوهش عصاره‌های الکلی و آبی از برگ منتاسپیکاتا گرفته شد تا ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری استخراج شود. در مطالعه‌ای دیگر که توسط کامکار انجام شده بود، عصاره‌ی به‌دست آمده از پونه در طی استخراج با متانول و آب به‌واسطه‌ی داشتن ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها عملکرد آنتی‌اکسیدانی داشته و قادر به جلوگیری از اکسیداسیون اولیه و ثانویه در روغن آفتابگردان در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی می‌باشد (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر گیاه منتاسپیکاتا (نوعی پونه) گونه دیگری از خانواده لامیاسه و خانواده نعناع می‌باشد که احتمالا به‌دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خاصیت ضد سرطانی را نیز بروز داده است. با توجه به ترکیبات فلاونوئید و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاه مورد پژوهش در این مقاله که خاصیت سمیت سلول سرطانی آن به اثبات رسید، بررسی مکانیسم دقیق مولکولی این اثرات، جداسازی سایر ترکیبات موثره موجود در عصاره‌های گیاه و نیز مقایسه‌ی ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف گیاه توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

از آنجا که نتایج مطالعه بر روی اثر ضد سرطانی این گیاه دارویی در این پژوهش مقدمه‌ای برای رسیدن به جنبه‌های کاربردی این گیاه دارویی در مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد، آزمایشات Invivo در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند قدم موثری در نزدیک شدن و تایید این یافته‌ها جهت به‌کارگیری در موارد بالینی باشد.

تقدیر و تشکر

تمام هزینه‌های این پژوهش توسط نویسنده‌ی مسوول تامین شده است. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از ریاست محترم دانشگاه و مسوول آزمایشگاه تحقیقاتی واحد فلاورجان به‌خاطر فراهم نمودن محیط آزمایشگاه برای انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

References

1- G0ldman J. Treatment strategies for CML. *Res Clin Haematol*. 2009; 22(3): 303-30.

2- Fakhraei M, Nejaty V, Dalirazh N. Vanadium compounds mediated apoptosis and cell cycle arrest in K562 cell line. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2011; 20(78): 23-35.

3- Abbaszadeh B, Valadabadi SA, Aliabadi Farahani H, Hasanpour Darvishi H. Studying of essential oil variations in leaves of Mentha species. *Plant Science J*. 2009; 3(10): 217-21.

4- Nickava B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species. *Pharmaceutical Research*. 2008; 7(3): 203-9.

5- Marderosian AD. Peppermint. In: Marderosian AD, ed.The review of natural Products. USA: *Fact and Comparisons*. 2001; 465-66.

6- Duke JA. *Mentha Pulegium L.*(Lamiaceae) Pennyroyal. In:Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. *CRC Press: Florida, USA*; 2001; 307-8.

7- Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S, Ghorbani A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Pharmaceutica Research.* 2005; 63-79.

8- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species *(Mentha longifolia and Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *Microbiol Biotechnol*. 2009; 25: 2227-38.

9- Gulluce G, Sahin F, Sokmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L.Food Chemistry*. 2007; 103: 1449-56.

10- MohammadiMotamed S, Naghibi F. Antioxidant activity of some edible plants of theTurkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chemistry*. 2010; 119: 1637-42.

11- Zamic A, Sokovic M, Ristic M, et al. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica Serbica.* 2010; 34(1): 57-61.

12- Atanassova M, Georgieva S. comparative polyphenol Composition and Antioxidant capacity of the Bulgarian plants (Dry herbs). *Food Chemistry*. 2010; 9: 1514-23.

13- Kamkar A, Jebelli Javan A, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Chemical Toxicology*. 2010; 48: 1796-1800.

14- Shahrokhabadi KH, Baharara J, Zafar Balanejad S, Hesami Z. The effect of atorvastatin on progress and proliferation of MCF7 breast cancer cell line. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2012; 21(88): 1-11.

15- Shahrokhabadi Kh, Tavakkolafshari J, Rakhshandeh H, Brook A. Study of cytotoxicity effect of total saffrons extract on HepG2 cell line. *Tehran Azad Univ Med Sci J*. 2009; 19: 153-9.

16- Tehrani pour M, Mahmoodzade H, Ghadamyari T. The comparison of neuro-protective effects of total aqua and ethanol extracts of salvia staminea root and leaves on central degeneration of motoneurons in spinal cord neurons following sciatic nerve compression in wistar rats. *AMUJ*. 2010; 13(3): 91-99.

17- Chen Z, Wang ZY, Chen SJ. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentation and apoptosis. *Pharmacol Ther*. 1997; 76: 141-9.

18- Deshpande J, Choudhari A, Mishra MA, Meghre VS, Wadodkar S, Dorle A. Beneficial effects of *Lagenaria siceraria* fruit epicarp in animal models. *Experimental Biology*. 2008; 46: 234-42.

19- Gulluce G, Sahin F, Sokmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the

essential oils and methanol extract from Mentha longifolia. *Food Chemistry*. 2007; 13: 1449-56.

20- Dzamic A, Sokoric M, Norakovic M, Grujic-Jovanovic S, Tesevic V, Marin P. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia(*L) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica Serbica*. 2010; 34(1): 57-61.

21- Arabshahi D, Devi D, Urooj A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat.PH and storage stability. *Food Chemistry*. 2007; 100: 1100-1105.

22- Zeng HH, Tu PF, Zhou K, Wang H, Wang B, Lu JF. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from Rosmarinus officinalis. *Pharmacol Sin*. 2007; 22(12): 1094-8.

23- Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacol*. 2000; 27: 152 -9.

24- Gaikwad NW and Madyastha KM. Biosynthesis of beta-substituted furan skeleton in the lower furanoterpenoids: a model study. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 290(1): 589-94.

25- Gutteridge JM. Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases. *mBr J Biomed Sci*. 1994; 51(3): 288-95.

26- Duke J. Hedeoma pulegioides: CRC handbook of medicinal herbs. *Boca Raton*. FL: CRC Press Inc; 1989: 223-308.

27- Bamdad F, Kadivar M, Keramat J. Evaluation of phenolic content and antioxidant activity of Iranian caraway in comparison with clove and BHT using model systems and vegetable oil. *Food Sci*. 2006; 41: 7-20.

28- Golluce M, Sahin F, Sokmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol exteract from *Mentha longifolia* L.ssp. longifolia. *Food Chem*. 2007; 103: 1449-56.

29- Hajighasemi F, Hashemi V, Khoshzaban F. Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. *Plants Research*. 2011; 5(20): 5142-47.

30- Badisa R, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytother*. 2003; 17: 472-76.

31- Fernanda N, Karine B. Pedro henrique de azambuja carvalho, rRafael guerra lund, fatima T.A. beira, and francisco augusto b. *Medicinal Food*. 2012; 15(11): 955-58.

32- Rahimifard N, Hajimehdipoor H, Hedayati MH, et al. Cytotoxic effects of essential oils and extracts of some *Mentha species* on Vero, Hela and Hep2 cell lines. *Mediecinal plants J*. 2010; 9(35): 88-92.

33- aslani E, naghsh N, ranjbar M. Cytotoxic effects of extracts of *Mentha Pulegium* plants before flowering on human chronic myelogenous leukemia K562 cancer Category. *AUMJ*. 2013; 16 (10): 1-10.

34- Katalinic V, MIlos M, Kulisic T, Jukic M. Sceerning of 70 medical plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*. 2006; 94: 550-77.

35- Kamkar A, Jebelli Javan A, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil.*Food Chem*. 2010; 48: 1796-800.

Cytotoxic Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Mentha spicata* Leaves on K562 Cell Line

Aslani E[1], Naghsh N[1], Ranjbar M[1]

[1]Dept. of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Aslani E, Dept. of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

E-mail: aslani2525@gmail.com

Received: 2 Feb 2014 **Accepted:** 12 Jul 2014

Background and Objective: Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells which results in increase of myeloid and erythroid cells and platelets in the peripheral blood and hyperplasia in bone marrow. This research evaluated the cytotoxic effect of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of *M. spicata* leaves on K562 cell line as a model of chronic myeloid leukemia.

Materials and Methods: In this experimental trial, leaves of *M. spicata* were collected from Booin city and extracted using soxhlet method. K562 cells were cultured and treated with concentrations of extracts (12.5-150µg/ml). Cytotoxicity of *M. spicata* extracts against K562 leukemia cells was estimated by the MTT test method. The absorbance was measured using ELISA plate reader at 540 nm.

Results: Ethanolic extract showed the highest cytotoxic effect (IC50=75 µg/ml) whereas aqueous extract showed the least cytotoxic effect (IC50=150 µg/ml) among the extracts. Methanol extracts showed the cytotoxic effect with IC50=100 µg/ml on K562 cell line. Aqueous and alcoholic extracts exhibited a dose-dependent cytotoxic effect on K562 cell line.

Conclusion: Considering the cytotoxic effects of aqueous and alcoholic extracts of *M. spicata* leaves on K562 cells, this plant can be considered as a potential candidate for further studies in the treatment of CML.

Keywords: Cytotoxic, Leukemia, Mentha spicata, Soxhlet. K562, CML