Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(79): 1- 10

Cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Mentha Pulegium* before flowering on k562 leukemia cell line

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

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

Received: 5 Oct 2013, Accepted: 20 Nov 2013

Abstract

Background: Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells which results in increase of myeloid cells, erythroid cells and platelets in the peripheral blood and hyperplasia in bone marrow. The research evaluates the cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of *M.polegium* before flowering aerial organs on K562 cell line as a model of chronic myeloid leukemia.

Materials and Methods: In this experimental trial, Leaves and stems of *M. pulegium* before flowering collected from Afoos city and extraction using maceration method. K562 cells were cultured and treated with concentrations of extract (12.5-100 µg/ml)and different times(24,48,72 hour). Cytotoxicity of *M. pulegium* before flowering extract against K562 leukemia cells was estimated by the MTT test method. The absorbance was measured using an ELISA plate reader at 540 nm. Survey on data accomplished with the use of SPSS15 software and one-way ANOVA test analysis and Tukey test; and $p < 0.001$ was considered significant.

Results: hydro-alcoholic extract of *Mentha pulegium* before flowering showed the highest cytotoxic effect (IC50=50 µg/ml) and 72 hour after treatment on K562 cell line .in other words, hydro-alcoholic extract of *Mentha pulegium* before flowering extracts a dose and time dependent cytotoxic effect on K562 cell line

Conclusion: Considering the cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of *M.polegium* before flowering aerial organs on K562 cells, the plant can be considered as a potential candidate for further studies on CML treatment.

Keywords: cytotoxic , leukemia , maceration ,*Mentha Pulegium*

*Corresponding author:
Address: Department of Biology,Falavarjan Branch,Islamic Azad University,Isfahan,Iran.
Email:aslani2525@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره10 (شماره پیاپی79)،دی 1392، 1- 10

بررسی اثرسمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه درمرحله قبل از گل دهی برلاین سلولی سرطان خون(K562)

الهه اصلانی[1*]، نوشین نقش[2]، منیره رنجبر[3]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاداسلامی، واحدفلاورجان، اصفهان، ایران
2. استادیار، **دکترای فیزیولوژی جانوری**، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاداسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
3. استادیار، دکترای فیزیولوژی گیاهی، معاون پژوهشی دانشگاه آزاداسلامی، واحدفلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/13 تاریخ پذیرش: 92/8/29

چکیده

زمینه وهدف: لوسمی میلوئیدی مزمن(CML)یک اختلال کلونال بدخیم سلول‌های بنیادی خون ساز است که منجر به افزایش سلول‌های میلوئید، سلول‌های اریتروئیدی و پلاکت‌ها در خون محیطی و هیپرپلازی در مغز استخوان می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی بر روی لاین سلولی K562به عنوان مدل لوسمی میلوئید مزمن صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، اندام‌های هوایی(برگ و ساقه) پونه از شهر افوس جمع آوری و با استفاده از روش خیساندن عصاره گیری شد. سلول‌های K562 کشت داده شد و با غلظت‌های عصاره(12/5-100میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در فاصله‌های زمانی مختلف(24، 48 و 72ساعت)تحت درمان قرار گرفتند. سمیت سلولی عصاره پونه قبل از گل دهی علیه سلول‌های K562 لوسمی با استفاده از روش MTT برآورد شد. جذب با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری شد. بررسی داده‌ها با استفاده ازنرم‌افزار SPSS نسخه 15 و آنالیزیک طرفه ANOVA و آزمون توکی تست صورت گرفت $p<0.001$معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی، بالاترین اثرسمیت سلولی را در IC50=50 میکروگرم برمیلی‌لیتر و 72 ساعت پس از تیمار، از خودنشان داد. به عبارت دیگر، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل‌دهی اثرسمیت سلولی وابسته به دوز وزمان را بر رده سلولیK562 از خود بروز داده است.

نتیجه گیری: با توجه به اثرسمیت سلولی اندام‌های هوایی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی برلاین سلولی K562، گیاه می‌تواند به عنوان یک کاندید بالقوه برای مطالعات بیشتر در مورد درمان سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، لوسمی، خیساندن، پونه

***نویسنده مسئول:** اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی، دانشکده علوم جانوری

Email:aslani2525@gmail.com

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن(Chronic myeloid Leukemia-CML) شایع‌ترین بیماری پرولیفراتیو، بیماری کلونال ناشی از تغییر ژنتیکی در سلول بنیادی خون‌ساز چند توانه است(1). ادغام ژن BCR(Break Point Cluster Region)روی کروموزوم 22 و ژن ABL1(Abelson murine Leukemia Viral Oncogene Homology)روی کروموزوم 9، تیروزین کیناز الحاقی بسیار فعالی را کد می‌کند که منجر به خاصیت تکثیری بیشتر این سلول‌ها می‌شود و از شاخصه‌های مهم این لوسمی محسوب می‌شود. از نظر بالینیCML در سه فاز مزمن، تسریع یافته و بلاستیک نمود پیدا می‌کند(4 -1). هدف از درمان CML، نگه داشتن بیماران در فاز مزمن و جلوگیری از پیشرفت بیماری به فازهای بعد و کم کردن سمیت ناشی از داروهای رایج است. امروزه ایماتینیب مسیلات به عنوان خط اول درمان محسوب می‌شود اما درمان قطعی‌تر پیوند مغز استخوان است(5).

گیاه پونه به طور عمده به عنوان ضد نفخ، ضد اسپاسم و ضد التهاب در ایران مصرف می‌شود(6). به طور سنتی جوشانده این گیاه برای درمان فیبروز و سرطان گردن رحم مورد استفاده قرارمی‌گیرد. با این حال هیچ تحقیق علمی مبنی برسمیت سلولی این داروی گیاهی در سرطان خون میلوئیدی مزمن گزارش نشده است(7).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل سوپراکساید، هیدروکسیل و پراکسیل مدام طی واکنش‌هایی در بدن تولید می‌شوند. تخریب اکسیداتیو ناشی از فعالیت این مولکول‌ها باعث ایجاد بیماری‌های مزمن مثل سرطان می‌شود(8). فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله اثر آنتی اکسیدانی در بسیاری از بررسی‌ها از جمله بیماری‌های کرونری و سرطان بررسی شده است(9) به طوری که اثر حمایتی ایجاد شده به وسیله گیاهان علیه بیماری‌های سرطان، به اجزای آنتی اکسیدان آنها نسبت داده شده است(10). در این بین پونه با نام علمی منتا پولگیوم و از خانواده لامیاسه(نعنا) می‌باشد. موادی که به طور طبیعی در پونه وجود دارند شامل آلفایی نن، بتاپی نن، لیمونن، منتون، پولگون، کاریوفیلن، دیوسزمین، هسپریدین، فلاونون‌ها، ایزوفلاون، فلاونوئید و چالکون می‌باشد(11). ترکیبات موجود در پونه جزو آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند که به دلیل خاصیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد موجب حذف اثرمولکول‌های فعال و آسیب رسان به DNA و پروتئین‌ها می‌شوند(12). در چند سال اخیر مطالعات زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدان گیاهان دارویی از جمله پونه انجام شده که در طی بررسی، ترکیبات فنولیک با مقدار بالا در آن مشاهده شده که مسئول عملکرد آنتی اکسیدانی گیاه بوده‌اند(13). مطالعات جامع بر روی دولاین سلول توموری فیبر سارکوما و لوسمیک مونوسیت حاکی از آن است که خانواده لامیاسه که منتاپولگیوم نیز به این خانواده متعلق است به صورت وابسته به غلظت و زمان اثر سیتوتوکسیکی قوی بر این دولاین سلولی داشته است(14). با توجه به این‌که تاکنون مطالعه جامعی در زمینه اثر ضد سرطانی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی بر مدل‌های لوسمی صورت نگرفته و هم‌چنین محققان در انتخاب گیاهان دارویی دقت زیادی در مرحله زندگی گیاهان(رویشی و گل دهی) نمی‌کنند، هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی پونه در مرحله قبل از گل‌دهی(رویشی) بر رده سلولی K562 به عنوان مدلی ازCML می‌باشد تا اثر ضد سرطانی آن در درمان این نوع لوسمی به طور مقدماتی و برای اولین بار مورد ارزیابی قرارگیرد.

در این راستا سنجش میزان بقا و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضد سرطانی بر روی سلول‌ها، امری مهم به نظرمی‌رسدکه در این خصوص روش‌های متعددی استاندارد شده است(15). امروزه بیش‌تر از روش‌های رنگ سنجی به خاطر سهولت در به کارگیری و دقت کافی در حصول نتایج، استفاده می‌شود(16). روش رنگ‌سنجی احیای نمک متیل تیازول تترازولیوم(Methyl Thiazol Tehrazzolium-MTT) بسیار سریع، حساس و قابل اندازه‌گیری برای پرولیفراسیون همه رده‌های سلولی است.

اساس ارزیابی این روش، قدرت آنزیم دهیدروژنازمیتوکندریایی است(17). یکی از فاکتورهای موثر در MTT تعداد سلول‌های زنده است که برای اطمینان از درصد سلول‌های زنده، سلول‌ها را با تریپان بلو مواجهه می‌نماید. باید توجه نمود که اساس بررسی سمیت سلولی دارو یا گیاهان دارویی بر سلول‌ها مشاهده تغییرات مورفولوژیکی آنها می‌باشد(18).

مواد و روش‌ها

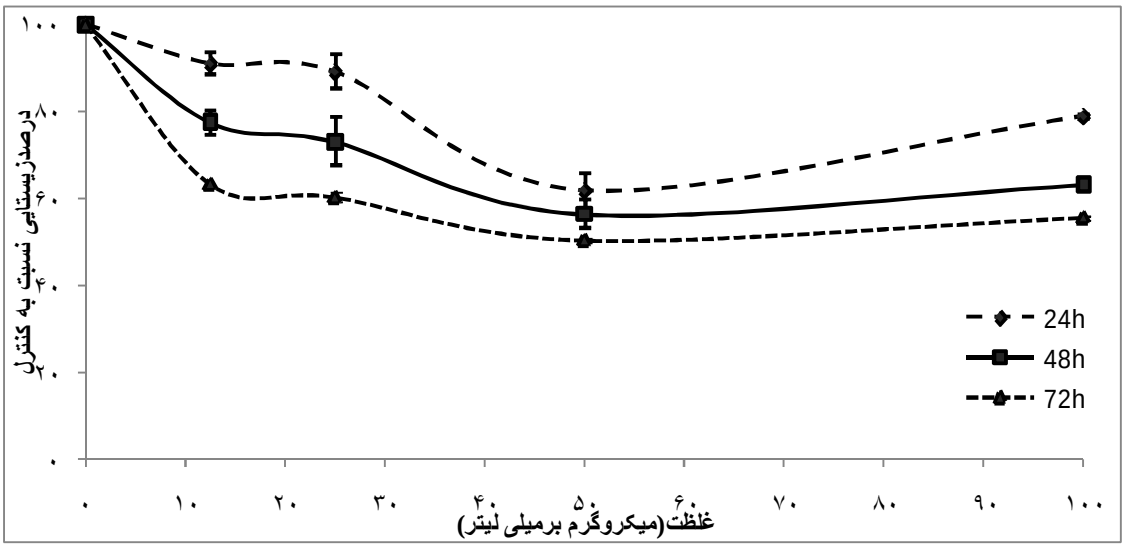
به منظور انجام مطالعه تجربی آزمایشگاهی حاضر، لاین سلولی K562 در مهر 1391 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان انتقال یافت. برای رشد این لاین سلولی از محیط کشت RPMI 1640(Bia idea ایران)که غنی شده با سرم جنین گاوی 10 درصد(Bia idea) (Fetal Bovine Serum-FBS ایران) و آنتی بیوتیک‌های استروپتومایسین(100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی سیلین(100 واحد بر میلی‌لیتر، سیناژن تهران) بود، استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت سلولی داخل انکوباتور تحت شرایط 5 درصد دی اکسید کربن، رطوبت 95 درصد و دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی در خرداد سال 1391 از مزارع افوس اصفهان برداشت شد. توسط هر باریوم گیاه شناسی دانشگاه آزاد واحد فلاورجان کد تایید گرفت. بعد از هر بار جمع آوری، اندام‌های هوایی شامل برگ و ساقه پونه در مرحله رویشی، دور از نور و سرما، خشک شدند. برای حفظ ترکیبات آنتی اکسیدانی در این گیاه، روش خیساندن انتخاب شد. ابتدا 0/01 گرم از عصاره‌های خشک شده را با ترازوی دیجیتال(C 0006 ژاپن) وزن کرده و با بافر فسفات حل کرده و به حجم10میلی‌لیتر رسانده شد و غلظت‌های 12/5، 25، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش کسری رقت از هر یک از عصاره‌ها تهیه شد.

به منظور بررسی اثرات پونه در مرحله قبل ازگل‌دهی بر ظاهر سلول‌های K562 تعداد 10^5 سلول در ظروف 96 چاهکی(Surface دانمارک) قرار داده شد. بعد از 24 ساعت سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت پونه(12/5، 25، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای فواصل زمانی 24، 48 و 72 ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با پونه در مرحله قبل از گل‌دهی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس(Hm-Lux آلمان) در قیاس با نمونه‌های کنترل(سلول‌های تیمار نشده)مورد ارزیابی قرارگرفت. هم‌چنین برای بررسی اثر پونه بر رشد و زیستایی سلولی ازآزمون دفع رنگ تریپان بلو و هموسایتومتر استفاده شد. برای این منظور تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک در ظروف 96 چاهکی قرار داده شد. بعد از 24 ساعت غلظت‌های مختلف از پونه(12/5 تا100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک برای زمان‌های 24 تا 72 ساعت اضافه شد. در هر بازه زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام 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 پونه بر سلول‌های K562 از آزمون MTT استفاده شد. نمک تترازولیوم به واسطه فعالیت میتوکندریایی سلول‌های زنده به بلورهای فورمازان که جذب متفاوتی دارند احیا می‌شوند. به این منظور 10^4 سلول در هر چاهک بارگذاری شد، پس از 24 ساعت غلظت‌های متفاوت پونه قبل از گل‌دهی اضافه شد و با فرا رسیدن هر یک از فواصل زمانی 20 میکرولیتر از نمک تترازولیوم(Sigma مالزی) اضافه گردید. پس از گذشت 24 ساعت میزان جذب نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از دستگاه الایزا(Statfix-2100 آمریکا)خوانده شد. در تحقیق حاضر کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد نمایش داده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزارSPSS نسخه 15 و آنالیز یک طرفه آنووا و آزمون تی استفاده و سطح معنی داری کمتر از 0/001 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس آزمون MTT نتایج جذب نوری(OD) بر حسب غلظت‌های 12/5، 25، 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر پونه قبل ازگل دهی در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار در24، 48 و 72 ساعت به دست آمد. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت پونه در مرحله قبل از گل دهی بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف و هم‌چنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. نمودار 1 بیان‌گر درصد بقای سلول‌های K562 بعد از تیمار با پونه قبل از گل با غلظت‌های متفاوت(12/5 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای زمان‌های مختلف می‌باشد. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود بیش‌ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت 12/5 میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان 24 ساعت بوده است.کم‌ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان 72 ساعت به دست آمد. نتیجه جالب توجه دیگر در این نمودار نشان دهنده50 =IC50میکروگرم بر میلی‌لیتر(غلظتی از عصاره که در آن پنجاه درصد سلول‌ها در محیط کشت از بین می‌روند) و 72 ساعت پس از تیمار بوده است، به طوری که در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد بقای سلول K562، از غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر بود. نتایج نشان می‌دهد که در طول 3 روز، میزان بقای سلول‌های تیمار شده با پونه قبل از گل‌دهی در مقایسه با سلول کنترل، تفاوت بارزی به ویژه در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده است(نمودار 1).



نمودار 1. اثرات پونه در مرحله قبل از گل دهی بر درصد بقای سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از پونه با فاصله‌های زمانی24، 48 و 72 ساعت تیمار و میزان بقای سلول‌ها با استفاده از شمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که در طول 3 روز، میزان بقای سلول K562 در غلظت‌های مختلف رو به کاهش گذاشته است. هم‌چنین آنالیزآماری مربوط به نتایج همه داده‌ها $p<0/001$ را نشان می‌دهد که سطح معنی‌داری در نظرگرفته می‌شود. به عبارت دیگر پونه قبل از گل دهی باعث اثر سیتوتوکسیکی(ضد سرطانی) در سلول‌های K562 می‌شود که البته بهترین خاصیت سمیت سلولی در غلظت پایین یعنی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر و72 ساعت پس از تیمار بروز کرده است. در زمان 24 ساعت بقای سلولی شروع به کم شدن کرده است که کم‌ترین درصد بقای

سلول K562 در زمان 72 ساعت به ثبت رسیده است. در تمام غلظت‌ها بقای سلولی کم شده است ولی در تمامی زمان‌های تیمار، غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر، کم‌ترین درصد بقای سلولی را داشته است(جدول 1).

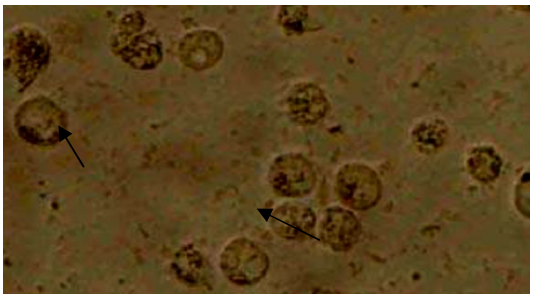
جدول 1. مقایسه درصد رشد سلول‌های K562 در حضور غلظت‌های مختلف پونه قبل از گل دهی

گیاه	غلظت	(میانگین ± انحراف استاندارد) درصد بقا در24ساعت	(میانگین ± انحراف استاندارد) درصد بقا در48ساعت	(میانگین ± انحراف استاندارد) درصد بقا در72ساعت	P	(میانگین ± انحراف استاندارد) درصد بقا کل
پونه قبل از گل دهی	12/5	90/95±2/47	77/45±2/75	63/33±0/60	0/0001***	77/24±12/11
	25	89/08±3/88	73/04±2/63	60/29±1/21	0/0001***	74/14±12/73
	50	61/86±3/86	56/48±0/03	50/41±0/41	0/008**	56/25±05/54
	100	78/91±0/41	63/22±1/05	55/62±0/48	0/0001***	65/92±10/30
	P	0/0001***	0/0001***	0/0001***	0/0001***	0/001**

p<۰/۰۱ ،* p<0/001

نتایج مورفولوژیکی:

بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول‌های تیمار شده با پونه قبل از گل‌دهی، نشان دهنده تغییرات ریخت شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود. در شکل 1 تکه تکه شدن کروماتین و بر هم خوردگی شکل کروی سلول‌ها در IC50=50 میکروگرم بر میلی‌لیتر یعنی دقیقا در غلظتی که بیش‌ترین اثر سیتوتوکسیکی دیده می‌شود، نمایش داده شده است(شکل 1). به طوری که سلول‌ها در این غلظت به طور دسته جمعی یا منفرد، تحلیل رفتگی و واکویله شده و کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن را در مقایسه با کنترل نشان دادند. این نتایج بیان‌گر اثر سمیت سلولی گیاه دارویی پونه قبل ازگل دهی بر رده سلول K562 می‌باشد.



شکل 1. تغییرات ظاهری ایجاد شده در سلول‌های تیمار شده با گیاه پونه قبل از گل دهی. سلول‌ها با غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر پونه قبل از گل دهی پس از گذشت 72 ساعت و تغییرات ظاهری در آنها با استفاده از میکروسکوپ معکوس HM-LUX مورد مطالعه قرار گرفت. به تکه تکه شدن کروماتین و بر هم خوردگی شکل سلول توجه شود(درشت نمایی×400)

بحث

استفاده از روش‌های کشت سلولی درک بسیار عمیق‌تری از تاثیر داروها و گیاهان دارویی بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی پدید می‌آورد. اثرات و تغییراتی که ترکیبات مختلف مانند عصاره گیاه پونه در مرحله قبل ازگل دهی(که در این تحقیق مورد بررسی قرارگرفتند) 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 هر چه 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(19).

به هر حال یکی از مهم‌ترین کاندیداهای سنتز داروهای ضد سرطان، گیاهان دارویی دارای اثر سمی و به ویژه سمیت سلولی هستند، که سمیت آنها بر روی کشت سلولی قابل اندازه‌گیری باشد. از سوی دیگر ترکیبات با منشا گیاهی به علت فراوانی، عوارض جانبی و تداخلات دارویی کمتر، امروزه کانون توجه داروسازان به منظور سنتز داروهای نوین در درمان بیماری‌های صعب العلاج مثل سرطان‌ها می‌باشند(20). با نظر اجمالی به جدول، نمودار و شکل ارائه شده در نتایج می‌توان ادعا کرد که عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل‌دهی دارای اثر سمیت سلولی بر روی لاین سلولی سرطانی خون میلوئید مزمن انسانی(K562) بوده است. در پژوهش حاضر با توجه به این‌که حتی در غلظت پایین عصاره پونه، با گذشت زمان در مقایسه با گروه کنترل، بالاترین خاصیت سمیت سلولی بروز کرده است، نشان دهنده حضور ترکیبات ضد سرطانی قوی مثل فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها و دیگر ترکیبات آنتی آکسیدانی، در پونه در مرحله قبل ازگل دهی بوده است. در مطالعه‌ای توسط بادیسا نوزده عصاره متانولی از گیاهان خانواده لامیاسه جمع آوری شده از نقاط مختلف یونان برای ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیکی علیه میگوآب شور مورد بررسی قرار گرفتند که در آزمون مرگ‌بار میگوی آب شور، گیاه پونه تنها نمونه‌ای بود که خاصیت سیتوتوکسیکی را در IC50=347/3 میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد در حالی که تمام نمونه‌های باقی مانده IC50 را در غلظت‌های بالاتر از 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند(21).

نکته قابل تامل در پژوهش حاضر با آزمایشات بادیسا، این است که در مطالعه حاضر، IC50 در غلظتی پایین‌تر حاصل شدکه می‌تواند به علت انتخاب درست در نوع عصاره‌گیری برای استخراج کامل ترکیبات ضد سرطانی این گیاه و هم‌چنین تفاوت در نوع رده سلولی کار شده در دو پژوهش باشد. از طرف دیگر نوآوری پژوهش حاضر در انتخاب مرحله زندگی گیاه پونه بوده است که در پژوهش‌های محققین دقت در انتخاب گیاهان دارویی با توجه به مرحله‌ای از رشد که در آن قرار دارند(قبل از گل دهی، بعد از گل دهی) مسئله‌ای است که به آن توجهی نمی‌شود.

در مطالعه‌ای دیگر حاجی قاسمی اثر سیتوتوکسیکی گونه دیگری از نعنا با نام منتا سپیکاتا را روی دولاین سلول توموری فیبر سارکوما ولوسمیک مونوسیت بررسی کرد که IC50 برای رده سلولی فیبرسارکوما 63/97، 4/5، 4/77 میکروگرم بر میلی‌لیتر و IC50 برای رده سلولی لوسمیک مونوسیت 5/6، 5/3 4/84 میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب پس از گذشت زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت به دست آمد(22). شباهت نزدیکی بین پژوهش حاضر با مطالعه حاجی قاسمی وجود دارد زیرا در هر دو پژوهش گیاهان متعلق به خانواده لامیاسه توانسته‌اند خاصیت سمیت سلولی(سیتوتوکسیکی) را در لاین‌های سلولی مختلف در الگویی وابسته به دوز و زمان مشخص بروز دهند. از عواملی که در این مطالعه باعث انتخاب پونه قبل از گل دهی بود آن است که میزان آلفا ترپینه آل که یک الکل مونوترپنی می‌باشد، در پونه ایرانی 10 الی 20 برابر بیشتر بوده است. تفاوت مهم دیگر مقدار کم پولگون در پونه ایرانی نسبت به سایر کشورهاست. با توجه به سمی بودن پولگون برتری مصرف پونه ایرانی نسبت به کشورهای دیگرکاملا بارز است(23). نتایج به دست آمده در این

تحقیق در توافق با گزارش‌های قبلی مبنی بر ارتباط مستقیم اجزای فنولیک با فعالیت آنتی اکسیدان است(24).

کاتالینیک ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی اکسیدانی گزارش کردند و بیان کردند که این ترکیبات بیشتر از طریق عصاره‌های گیاهی در مقایسه با اسانس آنها قابل استخراج است(25). از این رو در این پژوهش عصاره هیدروالکلی از پونه قبل ازگل دهی گرفته شد تا ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتری استخراج شود. در مطالعه‌ای دیگر که توسط کامکار انجام شده بود عصاره به دست آمده از پونه در طی استخراج با متانول و آب به واسطه‌ی داشتن ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها عملکرد آنتی اکسیدانی داشته و قادر به جلوگیری از اکسیداسیون اولیه و ثانویه در روغن آفتابگردان در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی می‌باشد(26). در پژوهش حاضر نیز عصاره هیدروالکلی پونه در مرحله قبل ازگل دهی در تمامی غلظت‌ها، حتی در زمان کمتر، اثر سیتوتوکسیکی از خود نشان داد که با مقایسه این پژوهش با مکانیسم ارائه شده توسط ازبن، نقش ترکیبات آنتی اکسیدانی پونه، مثل فلاونوئیدها در بروز خاصیت سیتوتوکسیکی در این گیاه اثبات می‌شود. زیرا لو و کلارک بیان بیش از حد گلیکوپروتئین p را در اغلب سرطان‌های لوسمی و لنفوم گزارش کردند، گلیکوپروتئین p پمپ داخل غشایی است که ژن کد کننده آن MDR1 و MDR2 است و باعث ایجاد مقاومت دارویی متقاطع نسبت به داروهای شیمی درمانی می‌شود(27). تحقیقات ازبن نشان داد که فلاونوئیدها به طور مستقیم با قسمت C ترمینال از دومین گلیکوپروتئین p ارتباط برقرار می‌کنند و از حمل و نقل این گلیکوپروتئین از عرض غشا جلوگیری می‌کنند. فلاونوئیدها هم‌چنین مانع تبدیل آدنوزین‌تری فسفات به آدنوزین دی فسفات می‌شوند و از طریق مکانیسم رقابتی، این گلیکو پروتئین را غیر فعال می‌سازند(28). با توجه به یافته‌های این محققین، بروز اثر سمیت سلولی توسط عصاره پونه در این مقاله نیز احتمالا در اثر مکانیسم ارائه شده فلاونوئیدهای موجود در پونه بوده است.

با توجه به ترکیبات فلاونوئید و دیگر ترکیبات آنتی اکسیدانی در گیاه مورد پژوهش در این مقاله که خاصیت سمیت سلول سرطانی آن به اثبات رسید، بنابر این مکانیسم دقیق مولکولی این اثرات، جداسازی سایر ترکیبات موثره موجود در عصاره گیاه و نیز مقایسه ترکیبات موجود در بخش‌های مختلف گیاه توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر سمیت سلولی و ضد سرطانی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی در غلظت پایین(50 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رشد سلول‌های سرطان خون میلوئیدی مزمن انسان، پیشنهاد می‌شود تحقیق بر روی کاربرد کلینیکی این گیاه دارویی در دوز به دست آمده در جهت پیشگیری و درمان حتی در کنار داروهای شیمی درمانی در این نوع شایع سرطان، به صورت in vivo دستمایه پژوهش‌های بعدی قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد الهه اصلانی با عنوان بررسی سیتوتوکسیکی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه برده سلولی K562با کد ثبت 17230509902007 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می باشدکه تمام هزینه این پژوهش توسط نویسنده مسئول تامین شده است. نویسنده مسئول برخود لازم می داند بدین وسیله مراتب تشکر خود را از تمامی عزیزانی که در این پژوهش راهنمای بنده بوده اند، ابراز نماید.

منابع

1. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods: Elsevier Health Sciences; 2011.p. 616-17.

2. Melo JV, Goldman J. Myeloproliferative disorder. 1th ed. Berlin:Springer.2007.p.1-13.
3. Geary C. The story of chronic myeloid leukaemia. British journal of haematology. 2000;110(1):2-11.
4. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EG. Postgraduate haematology. 6th ed.UK:Wiley Blackwell Publishing. 2011.p. 483-501.
5. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. ASH Education Program Book. 2009;2009(1):453-60.
6. Marderosian AD. Peppermint. In: The review of natural Products. USA: Fact and Comparisons; 2001. P. 465-6.
7. Duke JA. *Mentha Pulegium L.*(Lamiaceae) Pennyroyal. In: Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton: CRC Press; 2001.P.307-8.
8. Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, et al. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(23):6882-90.
9. Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2000;27(3):152-9.
10. Momeni T. Phitology of extracts. 1st ed. Tehran: Shahid Farhad reza Press. 2001.p.218-20.[Persian]
11. Vian MA, Fernandez X, Visinoni F, Chemat F. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. Journal of chromatography a. 2008;1190(1):14-7.
12. Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. Toxicology. 2003;189(1):1-20.
13. Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010;7(3):203-9.
14. Hajighasemi F, Hashemi V, Khoshzaban F. Cytotoxic effect of Mentha spicata aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. J Med Plant Res. 2011;5:5142-7.
15. Shokrgozar M, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Amanzadeh A. Comparison of two staining assays trypan blue and MTT in vitro evaluation of human calprotectin proliferation inhibition on human gastric cancer cell. Kowsar Med J. 2007; 12:127-37.[Persian]
16. Rapport L, Robinson C. Cell Titer 96 and titer 96 AG, non radioactive cell proliferation assay. Promega Notes Magazine. 1993;44:46-7.
17. Goodwin C, Holt S, Downes S, Marshall N. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. Journal of immunological methods. 1995;179(1):95-103.
18. 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.[Persian]
19. Deshpande J, Choudhari A, Mishra M, Meghre V, Wadodkar S, Dorle A. Beneficial effects of Lagenaria siceraria (Mol.) Standley fruit epicarp in animal models. Indian journal of experimental biology. 2008;46(4):234-42.
20. Mongelli E, Pampuro S, Coussio J, Salomon H, Ciccia G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. Journal of ethnopharmacology. 2000;71(1):145-51.
21. Badisa R, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. Phytotherapy Research. 2003;17(5):472-6.
22. Hajighasemi F, Hashemi V, Khoshzaban F. Cytotoxic effect of Mentha spicata aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. Daru. 2011; 5(20): 5142-47.[Persian]

23. Gordon WP, Forte AJ, McMurtry RJ, Gal J, Nelson SD. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. Toxicology and applied pharmacology. 1982;65(3):413-24.
24. Wong C-C, Li H-B, Cheng K-W, Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chemistry. 2006;97(4):705-11.
25. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry. 2006;94(4):550-7.
26. Kamkar A, Javan AJ, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian Mentha pulegium extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology. 2010;48(7):1796-800.
27. Loo T, Clarke D. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. The Journal of membrane biology. 2005;206(3):173-85.
28. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS letters. 2006;580(12):2903-9.