



## بررسی اثر سمیت سلولی اسانس هسته عناب (EOSZ) بر رده سلولی سرطان خون (K562)

الهام قدوسی دهنوی<sup>۱\*</sup>، حسین مقصودی<sup>۲</sup>، رضا حاجی حسینی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه پیام نور، مرکز تهران شرق، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲- دانشگاه پیام نور، مرکز شهرری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: post52043@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۹

### چکیده

اسانس شامل کمپلکس پیچیده‌ای از ترکیبات با فعالیت بیولوژیک از جمله خاصیت ضد سرطانی است. با توجه به عوارض جانبی و مقاومت داروهای سنتتیک شیمیایی، فراورده‌های گیاهی برای درمان سرطان مورد توجه است. این تحقیق به منظور بررسی اثر سمیت سلولی اسانس هسته عناب (EOSZ) بر روی رده سلولی (K562) به عنوان مدل لوسمی میلوئیدی مزمن صورت گرفته است. در این مطالعه، از هسته‌های عناب جمع‌آوری شده از شهر اصفهان توسط دستگاه کولنجر اسانس-گیری و سپس ترکیبات آن توسط کروماتوگرافی گازی و اسپکتروفتومتری شناسایی شد. سلول‌های (K562) کشت داده شد و با غلظت‌های (۱ تا ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در فاصله‌های زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تیمار شدند. سمیت سلولی اسانس هسته عناب (EOSZ) بر علیه سلول‌های K562 لوسمی با استفاده از روش MTT برآورد و جذب با استفاده از دستگاه الیزا با طول موج (۵۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری t.test و ANOVA و SPSS نسخه ۱۵ تجزیه و تحلیل شدند. ۲۴ ترکیب در اسانس شناسایی شد که عمده ترکیب آن اوژنول بود. اسانس هسته عناب، بالاترین اثر سمیت سلولی را در  $LC50=200$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۲ ساعت پس از تیمار، از خود نشان داد. به عبارت دیگر، اسانس هسته عناب اثر سمیت سلولی وابسته به دوز را بر رده سلولی K562 از خود بروز داده است. با توجه به سمیت سلولی اسانس هسته عناب بر رده سلولی K562، اسانس هسته عناب می‌تواند به عنوان یک کاندید بالقوه برای مطالعات بیشتر سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن و سایر سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سیتوتوکسیک، CML، K562، اسانس هسته عناب.

### مقدمه

در آمریکا به تنهایی حدود ۴۴۰۰۰ مرگ و میر ناشی از انواع مختلف لوسمی گزارش شده است (۲). لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یکی از شناخته شده‌ترین سرطان‌های خون می‌باشد که به علت جهش و تغییر در سلول‌های بنیادی چند توان به وجود می‌آید (۳، ۴).

امروزه سرطان، بزرگترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. از جمله سرطان‌هایی که از این نظر مورد توجه بسیاری واقع شده‌اند، سرطان خون (لوسمی) می‌باشد (۱). اطلاعات آماری در مورد مرگ و میرهای ناشی از انواع مختلف لوسمی در هر سال متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۰

بررسی‌ها نشان داده وجود ترکیباتی در میوه و هسته مانند سانجونین A و نوسیفرین و الکلوئیدهایی مانند کآورین و ان متیل اسیملوبین و ترکیبات جانبی آن مانند نوریزوکوریدین باعث القای خواب و فعالیت آرام‌بخشی عناب می‌باشد (۱۷، ۱۸).

همچنین در مطالعه‌ای پودر هسته عناب باعث ثبات در میزان گلوکز خون، حفظ ترکیب چربی در موش‌هایی با رژیم غذایی چرب است و همچنین ثابت شده استفاده از هسته عناب برای رژیم درمانی در کنترل اختلالات متابولیک در بزرگسالان موثر است (۱۷). علاوه بر این در بررسی خواص ضدالتهابی اسانس هسته عناب (EOSZ) بر روی گوش ملتهب موش تحریک شده با TPA، اسانس هسته عناب (EOSZ) باعث کاهش التهاب شد (۱۵).

در میوه خشک عناب چند ماده موثره سایتوتوکسیک شامل BA، OA و UA وجود دارد که خاصیت ضدسرطانی آن در انواع مختلفی از رده‌های سلول-های سرطانی مشخص شده است (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸). در طب سنتی چینی از عصاره عناب در درمان سرطان پستان استفاده می‌شود. ترکیبات فعال زیستی مانند تری‌ترپنیک اسیدها، مانند ZE2 و ZE4، در عصاره عناب موجود هستند که خاصیت ضدسرطانی آنها در سرطان پستان مشخص شده است (۲۹).

با توجه به اینکه تا به حال مطالعه جامعی در زمینه اثر ضد سرطانی اسانس هسته عناب (EOSZ) انجام نگرفته است، هدف از مطالعه حاضر تعیین سمیت سلولی اسانس هسته عناب بر رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدلی از CML می‌باشد تا اثر ضدسرطانی آن در درمان لوسمی به طور مقدماتی و برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گیرد.

ادغام ژن BCR (Break Point Cluster Region) روی کروموزوم ۲۲ و ژن ABL1 (Abelson murine leukemia 1 viral oncogene homolog) روی کروموزوم ۹، تیروزین کیناز الحاقی بسیار فعالی را کد می‌کند که منجر به خاصیت تکثیری بی‌رویه‌ی سلول‌های پیش ساز میلوئید می‌شود که از شاخصه‌های مهم این لوسمی است. این جابجایی کروموزومی به نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می‌شود که در بیش از ۹۵ درصد از بیماران مثبت است (۵، ۶، ۷). رده‌ی سلولی K562 به عنوان یک نمونه سرطانی لوسمی میلوئیدی مزمن مطرح می‌باشد (۸).

توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه با ساختارهای متنوع، طی میلیون‌ها سال در گیاهان تکامل پیدا کرده است. انسان از زمان‌های بسیار دور از گیاهان در درمان بیماری‌های مختلف استفاده نموده است. از خواص دارویی گیاهان در بین اقوام محلی، برای تولید داروهای اولیه استفاده می‌شود (۹، ۱۰).

برخی ترکیبات گیاهی مانند ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، آنزیم‌ها و مواد معدنی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۱۱).

گیاه عناب با نام علمی *Zizyphus jujube* درختی است که بلندی آن به ۲ تا ۸ متر هم می‌رسد (۱۳). میوه عناب خوراکی و دارای خواص دارویی بسیاری است. از عناب به عنوان پادزهر، زیاد کننده ادرار، داروی ملین و خلط‌آور استفاده می‌شود. میوه‌ی خشک شده عناب آرام‌بخش، ضد سرطان، تب‌بر، مسکن، اشتها آور، برطرف کننده اختلالات ادراری و مشکلات کلیوی، عفونت‌های پوستی، مشکلات کبدی، بند آورنده خون و مقوی عضلات است (۱۴، ۱۵، ۱۶).



## مواد و روش کار

**جمع‌آوری گیاه:** به منظور انجام این مطالعه‌ی آزمایشگاهی (In vitro)، میوه عناب در شهریور ۱۳۹۴ از باغات شهر اصفهان برداشت شد. سپس دانه‌ی آن از گوشت میوه جدا، تمیز و به دور از نور آفتاب خشک و سپس توسط دستگاه خرد کننده کاملاً آسیاب شد. سپس برای انجام اسانس‌گیری به مرکز ذخایر ژنتیک ایران منقل شد. استفاده از دستگاه کولنجر یک روش متداول برای تهیه اسانس از گیاهان می‌باشد. در حدود ۲۵۰ گرم پودر هسته عناب را در بالون ژوژه دستگاه ریخته و تا دو سوم حجم بالون را از آب مقطر پر کرده و سپس به مدت سه ساعت تحت تقطیر آبی در دستگاه کولنجر قرار داده شد. آنگاه اسانس را جدا کرده و سپس برای جذب آب اضافی از اسانس از سولفات سدیم استفاده کرده و اسانس حاصل را که در حدود ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود را تا قبل از سایر مراحل آزمایش در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف مخصوصی نگه‌داری شد. برای رقیق کردن اسانس و تهیه رقت‌های سریالی هم از متانول به عنوان حلال استفاده شد.

**کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی:** جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس هسته عناب از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع Agilent6890 با مشخصات دستگاه: ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ساکن ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. اسانس حاصل به دستگاه تزریق شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل و با سرعت حرکت ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای

منبع یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و انرژی یونیزاسیون ۷ الکترون ولت بود. در تمامی طیف‌های بدست آمده GC/MS از روی الگوی خروج آلكان-های نرمال و شاخص بازداري طیف‌ها، اندیس کوواتس برای تک‌تک پیک‌ها محاسبه و با استفاده از مقایسه طیف‌های جرمی بدست آمده با طیف‌های جرمی استاندارد در کتاب آدامز (۲۰۰۴) و اطلاعات کتاب‌خانه‌ای کامپیوتری Wiley 275، طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و فرمول‌های شیمیایی آن شناسایی شد (۳۰).  
**رده سلولی، تهیه و کشت سلولی:** رده سلولی K562 در آبان ۱۳۹۴ از انستیتو پاستور ایران تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور مرکز شهرری انتقال یافت. محیط کشت مورد استفاده برای رشد سلولی در این پژوهش شامل: RPMI-۱۶۴۰ متوسط (GIBCO, Grand Island, NY, USA) غنی شده با ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱۰٪ FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱/۵ گرم بر لیتر سدیم بیکربنات (Sigma-Aldrich)، ۴/۵ گرم بر لیتر قند (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱۰ میلی‌مولار از ۴-β-هیدروکسی اتیل پپیرازین-۱-اتان سولفونیک اسید (HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱ میلی-مولار سدیم پیروات (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و ۰/۰۵ میلی‌مولار مرکاپتوتانول (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین (داروپخش، تهران، ایران)، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (زیست ایده، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفوتریسین میکروگرم در میلی‌لیتر (سیپلا، بمبئی، هند). سلول‌ها در محیط کشت سلولی داخل انکوباتور تحت

شرایط دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  کشت داده شد و پس از رسیدن به تراکم بالای ۸۵ درصد، سلول‌های معلق در محیط کشت توسط سانترفیوژ جدا و توانایی زیستی سلول‌ها با استفاده از روش تریپان‌بلو اندازه‌گیری شد. سپس سلول‌ها با توان زیستی بالا در پلیت‌های ۶ خانه‌ای با تراکم  $5 \times 10^5$  کشت و با همان روش قبلی تیمار شدند.

**تعیین LC50 یا میزان دوز کشندگی اسانس هسته عناب (EOSZ) با استفاده از روش سنجش MTT:** در این روش آنزیماتیک بعنوان سوسترای واکنش از نمک‌های محلول تترازولیوم که مهم‌ترین آنها MTT (۳-۴،۵-دی‌متیل-تيازول-۲-یل)  $2.5 \times 10^5$  دی فنیل تترازولیوم) است استفاده می‌شود. تترازولیوم نمک محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد یا PBS آماده‌سازی گردد ترکیب زرد رنگی را ایجاد می‌کند و زمانی که این محلول رنگی MTT به سلول‌های محیط کشت افزوده گردد، حلقه MTT فقط در میتوکندری سلول‌های سالم در حضور آنزیم دهیدروناز شکسته شده و به ترکیب نامحلول فورمازان تبدیل می‌شود. بلورهای نامحلول در آب فورمازان توسط حلال‌های آلی مانند DMSO و یا ایزوپریل اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ بنفش ایجاد شده توسط ELISA-reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می‌شود. ابتدا به منظور بررسی اثرات اسانس هسته عناب بر ظاهر سلول-های K562 تعداد  $10^5$  را در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت-های متفاوت اسانس هسته عناب (۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در فاصله‌ی زمانی ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با اسانس هسته

عناب با استفاده از میکروسکوپ فاز کتراست مدل OLYMPUS در قیاس با نمونه‌های کنترل (سلول-های تیمار نشده) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو و لام هموسایتومتر استفاده شد. سپس سلول‌های K562 در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با تراکم  $5 \times 10^5$  سلول در هر خانه کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت به پلیت اول به عنوان بلانک چیزی اضافه نشد و به پلیت دوم در حدود ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متانول به عنوان کنترل حلال و به پلیت سوم به عنوان کنترل مثبت مقدار ۲۰ میکرولیتر داروی استاندارد دوکسوروبیسین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. به سایر پلیت‌ها به ترتیب غلظت‌های متفاوت اسانس هسته عناب (۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه و با تکرار ۳ بار تیمار شدند و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و  $\text{CO}_2$  ۵ درصد با رطوبت ۹۰ درصد و اکسیژن ۹۵ درصد نگهداری گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها برای تعیین LC50 کنترل شد. این روند در سه روز (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به منظور تاثیر بازه زمانی تکرار گردید. سپس به هر کدام از پلیت‌ها در حدود ۲۰ میلی‌لیتر از محلول (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) MTT افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. سپس کریستال‌های فورمازان در ۱۰۰ میلی-لیتر از DMSO حل و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه ELISA-reader (Biotech, Germany) اندازه-گیری شد. (پروتکل روش MTT assay از شرکت سیگما).

**ارزیابی آماری:** در تحقیق حاضر کلیه‌ی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ۳

بار تکرار  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شده است. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز یک طرفه ANOVA و آزمون T استفاده شد و سطح معنی‌دار  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

**بررسی ترکیبات شناسایی شده در اسانس هسته عناب:** بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل اسانس، ۲۴ ترکیب در اسانس شناخته شد که در مجموع ۹۳/۹۶ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند. ترکیبات آن در جدول ۱ نشان داده شده است و عمده ترکیبات موجود، شامل اوژنول (۵۱/۲۳ درصد)، ایزواوژول (۱۳/۲۸ درصد)، بتاکاریوفیلین (۸/۱۴ درصد)، ایکالپتول (۴/۲۵ درصد)، کاریوفیلین اکساید (۳/۳۷)، بنزالدهاید (۳/۱۵ درصد) می‌باشد.

**بررسی تغییرات مورفولوژیکی:** ریخت‌شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود. در شکل ۱ مرگ سلولی و برهم خوردگی شکل کروی سلول‌ها در LC50=۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر یعنی دقیقاً در غلظتی که بیش‌ترین اثر سایتوتوکسیکی دیده می‌شود، نمایش داده شده است (شکل ۱). به طوری که سلول‌ها در این غلظت به طور دسته جمعی یا منفرد، تحلیل رفتگی و واکیله شده و کاهش سیتوپلاسم و پیگمانته شدن را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهند. این نتایج بیان گر اثر سمیت سلولی EOSZ بر رده سلولی K562 می‌باشد. بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول‌های تیمار شده با اسانس هسته عناب (EOSZ)، نشان دهنده تغییرات است.

**نتایج تست MTT:** بر اساس آزمون MTT نتایج جذب نوری (OD) بر حسب غلظت‌های (۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) اسانس هسته عناب (EOSZ) در مقایسه

با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به دست آمد. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت هسته عناب بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف و همچنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. نمودار یک بیانگر درصد بقای سلول‌های K562 بعد از تیمار با اسانس هسته عناب با غلظت‌های متفاوت (۱ تا ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌باشد. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌کنید بیش‌ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ ساعت و کم‌ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت نسبت به گروه شاهد که با اسانس تیمار نشده بود به دست آمده است. این نمودار نشان می‌دهد LC50 برابر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (غلظتی از اسانس هسته عناب که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها در محیط کشت از بین می‌روند) و ۷۲ ساعت بعد از تیمار بوده است و در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر درصد بقای سلول K562 تقریباً نزدیک به صفر می‌باشد (نمودار ۲).

نتایج نشان می‌دهد که در طول ۳ روز، میزان بقای سلول‌های K562 در غلظت‌های بالاتر رو به کاهش گذاشته است. هم‌چنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه‌ی داده‌ها  $p < 0/05$  را نشان می‌دهد که سطح معنی‌داری در نظر گرفته می‌شود. به عبارت دیگر اسانس هسته عناب باعث اثر سیتوتوکسیتی (ضد سرطانی) در سلول‌های K562 می‌شود که البته بهترین خاصیت سمیت سلولی در غلظت پایین یعنی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت پس از تیمار بروز کرده است. در زمان ۲۴ ساعت بقای سلولی شروع به کم شدن کرده است که کم‌ترین درصد بقای سلول K562 در زمان ۷۲ ساعت به

شاهد که با اسانس تیمار نشده بود نشان داده شد که بقای سلولی شروع به کم شدن کرده است و کم-ترین درصد بقای سلول‌های K562 در زمان ۷۲ ساعت به ثبت رسیده است.

**تحلیل آماری:** جدول ۲ بیانگر درصد بقای سلول-های K562 در حضور گروه‌های کنترل می‌باشد که برای بررسی دقیق‌تر اثر سیتوتوکسیتی از داروی استاندارد دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جدول ۲ مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی K562 تیمار شده با اسانس هسته عناب (EOSZ) و سنجش میزان بقاء بر اساس تست MTT با درصد بقاء سلول‌های K562 در گروه کنترل منفی سوسپانسون سلولی، کنترل منفی ۲ و کنترل مثبت را نشان می‌دهد.

ثبت رسیده است. در تمام غلظت‌ها بقای سلول‌ها به نسبت غلظت کم شده است ولی در تمامی زمان-های تیمار، غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، کم‌ترین درصد بقای سلولی را داشته است.

نتایج نشان می‌دهد که طی سه روز، درصد بقای سلول‌های K562 در غلظت‌های مختلف، هر چقدر غلظت اسانس هسته عناب بیشتر شده، پایین‌تر آمده است. هم‌چنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده‌ها  $p < 0/05$  را نشان می‌دهد که سطح معناداری در نظر گرفته می‌شود. به عبارت دیگر اسانس هسته عناب باعث اثر سیتوتوکسیتی یا ضدسرطانی در سلول‌های K562 می‌شود که البته بهترین خاصیت سمیت سلولی در غلظت پایین یعنی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان ۷۲ ساعت نسبت به گروه

جدول ۱- مواد شناسائی شده در اسانس هسته عناب (EOSZ).

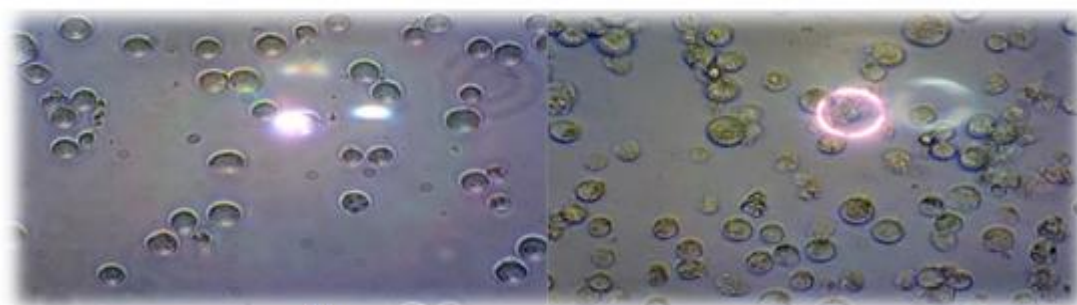
ردیف	نام ترکیب	اندیس کواتس	درصد
۱	$\alpha$ -Humulene	۱۴۴۰	۴/۰۸
۲	$\delta$ -Murolene	۱۴۳۵	۰/۷۴
۳	5-Cadinene	۱۴۶۹	۰/۵۳
۴	Benzaldehyde	۹۸۲	۳/۱۵
۵	Benzyl acetate	۱۱۶۰	۰/۴۳
۶	Caryophyllene-B	۱۴۹۴	۸/۱۴
۷	Caryophyllene oxide	۱۵۶۷	۳/۳۷
۸	Chavicol	۱۲۱۵	۰/۷۸
۹	Cinnamaldehyde	۱۱۷۳	۰/۲۹
۱۰	Dodecanoic acid	۱۴۸۱	۰/۴۲
۱۱	Eugenol	۱۴۱۱	۵۱/۲۳
۱۲	Ethylacetamide	۸۱۲	۰/۳۱
۱۳	Eucalyptol	۱۰۶۱	۴/۲۵
۱۴	Heptanoic acid	۱۰۷۵	۰/۵۴
۱۵	Hexanoicacid	۹۶۴	۰/۴۸
۱۶	Isoeugenol	۱۴۱۸	۱۳/۲۸
۱۷	Ledol	۱۵۱۷	۰/۶۴
۱۸	Linalool	۱۰۹۸	۰/۲۶

۱۹	Lin oleic acid	۲۲۱۸	۰/۴۱
۲۰	Octanoic acid	۱۱۸۴	۰/۲۸
۲۱	Tetradecanoic add	۱۱۷۸	۲/۱۱
۲۲	Turner one	۱۵۹۸	۰/۳۱
۲۳	trans-Z-a-bisabolene epoxide	۱۶۱۲	۰/۷۶
۲۴	Veridiflorol	۱۵۸۴	۳/۲۱

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی K562 در حضور گروه‌های کنترل

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر) LC50	درصد بقاء سلول K562	کنترل منفی سوسپانسیون سلولی (بدون تیمار با اسانس)	کنترل منفی ۲ (متانول به عنوان حلال ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	کنترل مثبت (داروی استاندارد دوکسوروبیسین)
۲۰۰	۵۰/۵۸ ± ۳/۰۷*	۱۰۰ ± ۴/۶	۹۷/۷ ± ۲/۱	۱۵/۱ ± ۱/۲

\*  $p < 0/05$  مقادیر به صورت  $\pm SD$  میانگین بوده و تفاوت میانگین در سطح  $p < 0/05$  (\*) معنادار در نظر گرفته شد.

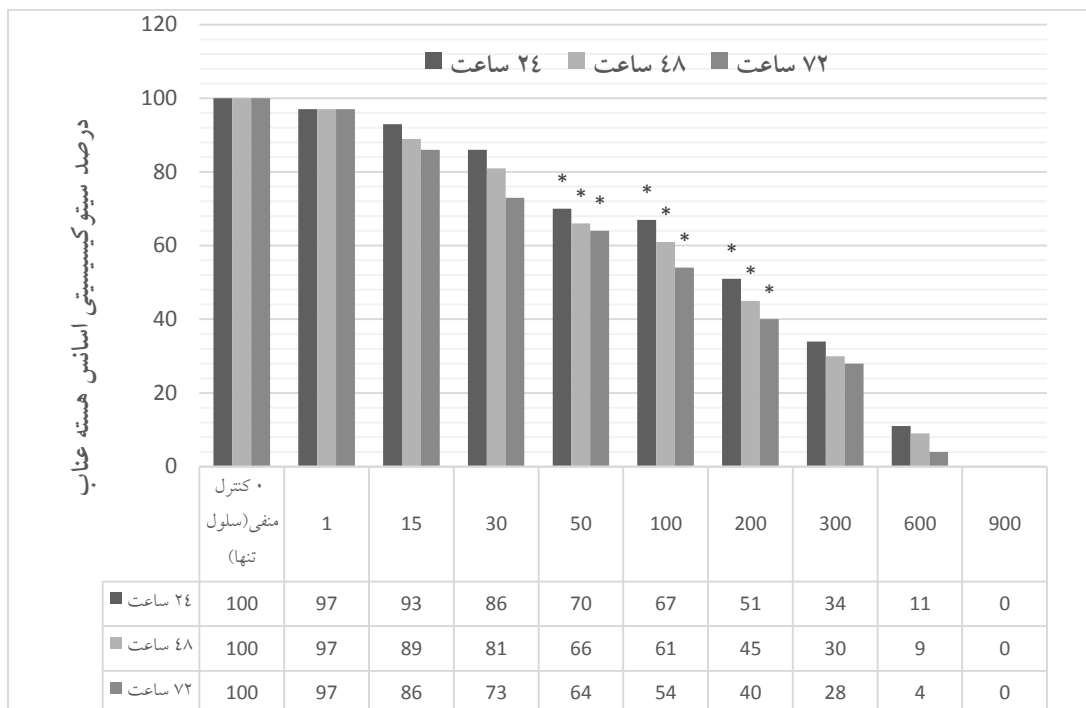


الف

ب

شکل ۱- تغییرات ظاهری ایجاد شده در سلول‌های تیمار شده شده با اسانس هسته عناب (EOSZ).

الف: سلول‌های K562 تیمار نشده با اسانس. ب: سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس هسته عناب (EOSZ). پس از ۲۴ ساعت، تغییرات ظاهری در آنها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مدل OLYMPUS مورد مطالعه قرار گرفت. در قسمت ب، سلول‌های تیمار شده با اسانس در مقایسه با قسمت الف که سلول‌ها یا اسانس تیمار نشده‌اند؛ مرگ سلولی با نشانه‌هایی از جمله دانه‌ای شدن سیتوپلاسم، کوچک شدن اندازه سلولی، تجمع سلول‌های از بین رفته به دلیل شارژ مخالفی که ایجاد نموده‌اند و منجر به جذب شدن به یکدیگر شده و برهم خوردگی شکل سلولی به خوبی مشهود است (بزرگ نمایی ۴۰۰X).



نمودار ۲- اثرات اسانس هسته عناب بر درصد بقای سلول‌های K562.

سلول‌ها با غلظت‌های (۱، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از اسانس هسته عناب (EOSZ) با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار و در مقایسه با گروه کنترل که با اسانس تیمار نشده بود میزان بقای با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل  $\pm$  خطای استاندارد نمایش داده شده است و تفاوت میانگین در سطح  $p < 0.05$  (\*) معنادار در نظر گرفته شد.

## بحث

سرطان مانند وین کریستین، وینبلاستین، کلشی سین، تاکسول، تاکسل و دیگر محصولات گیاهی رایج است. بنابراین نیاز به توسعه داروهای جدید با تاثیر و عملکردی متفاوت با حداقل عوارض جانبی موجود از تولیدات گیاهی مخصوصا اسانس گیاهان وجود دارد. (۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵).

عناب به عنوان یک گیاه دارویی و با خواص غذایی بالا به صورت تازه و خشک مصرف می‌شود. میوه، برگ‌ها، دانه، ریشه و پوست درخت عناب عمدتاً در طب سنتی به عنوان منبع دارو بکار می‌رود. عصاره عناب سبب مهار اثر رادیکال‌های آزاد (به عنوان عامل افزایش التهاب) می‌گردد. عناب حاوی آنتی-

امروزه روش‌های مختلفی از جمله شیمی درمانی در درمان سرطان خون به کار گرفته می‌شود که به دلیل مقاومت‌های دارویی، هزینه و عوارض جانبی بالا و همچنین غیرانتخابی بودن داروهای مورد استفاده، درصد زیادی از سلول‌های سالم خون نیز همراه سلول‌های سرطانی از بین می‌رود و در اغلب موارد باعث عود مجدد بیماری می‌گردد (۳۱).

از سویی دیگر با توجه به عدم وجود داروهای مدرن و بی‌خطر، بررسی ترکیبات فعال و موثر گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها توسط سازمان بهداشت جهانی WHO توصیه شده است و از آن جهت که استفاده از تولیدات گیاهی در درمان



LC50=50 است که طبق بررسی در مقالات استفاده از میانگین LC50 مطلوب‌تر می‌باشد. با توجه به یافته‌های کروماتوگرافی گازی و تجزیه اسانس هسته عنب‌مغز مشخص شد که ماده موثره اسانس هسته عنب‌مغز، اوژنول با نام شیمیایی ۴-آلیل-۲-متوکسی فنل و فرمول  $C_{10}H_{12}O_2$  می‌باشد که تقریباً در حدود ۵۱ درصد از حجم اسانس مربوط به اوژنول است. پس می‌توان چنین فرض کرد که بیشتر خواص سایتوتوکسیستی اسانس مربوط به اوژنول بوده است. اوژنول ماده غیرسرطان‌زا و غیر-موتازن است و از طرف اداره نظارت بر غذا و دارو به عنوان یک ماده بی‌خطر معرفی شده است (۳۸).

از طرفی خاصیت ضدسرطانی آن در انواع رده‌های سلولی به اثبات رسیده است. اثر اوژنول همراه با جمسیتابین در سرطان دهانه رحم مطالعه و مشخص شد. اوژنول باعث کاهش سمیت جمسیتابین و کاهش ژن‌های آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول لنفوم B-۲ یا BCL-۲ و همچنین میزان بیان سیکلواکسیژناز ۲ (COX-۲) و اینترلوکین  $IL-1\beta$  است که باعث کاهش التهاب و افزایش اثربخشی جمسیتابین می‌شود (۴۰).

اثر اوژنول در سرطان معده در موش مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که اوژنول قادر به مهار آپوپتوز سلول، مهار تهاجم سلول‌های سرطانی و مهار رگ‌زایی یا آنژیوژنز بوسیله تنظیم خانواده پروتئین ۲-Bcl و فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوزی ۱ (Apaf-1)، سیتوکروم C و پروتئاز سیستمین آسپارتیک و تغییر فعالیت متالوپروتئاز مزانشیمی MMP-۹ و MMP-۲، فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF)، گیرنده رشد اندوتلیال عروقی ۱ (VEGFR-۱) و مهارکننده‌های متالوپروتئینازهای بافتی (TIMP-2) می‌شود (۴۱).

اکسیدان‌های طبیعی همچون ویتامین C و کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها است که باعث تقویت سیستم ایمنی بدن شده و به جلوگیری از سرطان کمک می‌نماید (۳۶).

استفاده از روش‌های کشت سلولی درک بسیار عمیق‌تری از تاثیر داروها و گیاهان دارویی بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی پدید می‌آورد. تغییر و اثری که اسانس هسته عنب‌مغز (EOSZ) بر سلول‌ها در فضای کنترل شده و قابل بررسی کشت سلولی ایجاد می‌نماید، که شناسایی دقیق‌تر مکانیسم و اثرات بیولوژیکی آنها و هم چنین 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 (۳۷).

تاثیرات ضدباکتریایی اسانس هسته عنب‌مغز بر روی چند گونه باکتری و همچنین خواص ضدالتهابی اسانس هسته عنب‌مغز بر روی گوش ملتهب موش تحریک شده با TPA به اثبات رسیده است (۱۵). ولی با توجه به اینکه تا به حال مطالعه جامعی در زمینه اثر ضدسرطانی اسانس هسته عنب‌مغز (EOSZ) انجام نگرفته است، هدف از مطالعه حاضر، تعیین سمیت سلولی اسانس هسته عنب‌مغز بر روی سلولی K562 به عنوان مدلی از CML می‌باشد تا اثر ضدسرطانی آن در درمان لوسمی به طور مقدماتی و برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گیرد. در راستای این امر، در این مطالعه اثر سیتوتوکسیستی وابسته به دوزهای مختلف اسانس هسته عنب‌مغز (EOSZ) نشان داده شد، به گونه‌ای که با افزایش غلظت، درصد زنده‌مانی سلول کاهش یافت. LC50 ثبت شده برای اسانس هسته عنب‌مغز در حدود ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و میانگین Media



### نتیجه‌گیری

از آنجا که نتایج مطالعه حاضر بر روی اثر ضد-سرطانی اسانس هسته این گیاه دارویی در این پژوهش مقدمه‌ای برای رسیدن به جنبه‌های کاربردی این گیاه در مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد، بنابراین بررسی مکانیسم دقیق مولکولی این اثرات و همچنین جداسازی ترکیبات در اسانس و بررسی اثرات آنها توصیه شده و همچنین آزمایشات در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی (In vivo) می‌تواند قدم موثری در نزدیک شدن و تایید این یافته‌ها جهت به کارگیری در موارد بالینی باشد.

### تشکر و قدردانی

تمام هزینه‌های این پژوهش توسط نویسنده‌ی مسئول تامین شده است. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از ریاست محترم دانشگاه پیام نور واحد شهرری به خاطر فراهم آوردن محیط آزمایشگاه برای انجام این تحقیق اعلام می‌دارد.

### منابع

1. Adams R.P., 2004. Identification of essential oil components by Gaschromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 456p.
2. Al-Reza S.M., Rahman A., Lee J., Kang S.C., 2010. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 119(3): 981-6.
3. Al-Reza S.M., Yoon J.I., Kim H.J., Kim J.S., Kang S.C., 2010. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2): 639-43.
4. Anjali P., Siddiqui F., Kumar Singh A., 2012. Synthetic and green vegetable isothiocyanates target red blood leukemia cancers. *Fitoterapia*, 83.2: 255-265.

علاوه بر این، اثر درمانی از ترکیبی از اوژنول و متوکسی استروئید ۲ (methoxyestradiol) بر سرطان پروستات غیروابسته به آندروژن مورد مطالعه قرار گرفته شده و مشخص شد این ترکیب به طور موثر می‌تواند باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی پروستات و افزایش بیان پروتئین پیش‌ساز آپوپتوز برای جلوگیری از سرطان پروستات شود. علاوه بر این، اوژنول اثر درمانی بهتر در بروز سرطان پوست و ملانوم را نشان داده است. در این آزمایش ما ثابت کردیم که اسانس هسته عناب دارای اثر سایتوتوکسیستی بر روی رده سلولی سرطانی خون میلوئید K562 بوده و با توجه به یافته‌های این محققین، به نظر می‌رسد بروز اثر سمیت و مکانیسم اثر آن احتمالاً با توجه به تاثیرات ضدسرطانی که اوژنول روی سایر رده‌های سلول-های سرطانی داشته است و همچنین به این خاطر که اوژنول عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس هسته عناب می‌باشد، می‌توان چنین فرض کرد که این تاثیرات بیشتر مربوط به اوژنول است. به هر حال یکی از مهم‌ترین کاندیداهای سنتز داروهای ضدسرطان، 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 صعب‌العلاج مثل سرطان‌ها می‌باشند (۴۲).

با نظر اجمالی به جداول، نمودار و شکل ارائه شده در نتایج می‌توان ادعا کرد که اسانس هسته عناب دارای اثر سمیت سلولی بر روی لاین سلولی سرطانی خون میلوئید K562 بوده است.



- biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*, 349(15): 1451-64.
13. Han B.H., Park M.H., 1987. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa*. *Archives of Pharmacal Research*, 10(4):203-7.
14. Heber D., 2004. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of Postgraduate Medicine*, 50(2):145-152.
15. Hung C.F., Hsu B.Y., Chang S.C., Chen B.H. 2012. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition*, 28(1): 98-105.
16. Hung C.F., Hsu B.Y., Chang S.C., Chen B.H., 2012. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition*, 28(1): 98-105.
17. Khalighi-Sigaroodi F., Ahvazi M., Hadjiakhoondi A., Taghizadeh M., Yazdani D., Khalighi-Sigaroodi S., Bidel S., 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1): 295-302. (In Persian).
18. Kim D.K., Baek J.H., Kang C.M., Yoo M., Sung J.W., Kim D.K., Chung H.Y., Kim N.D., Choi Y.H., Lee S.H., Kim K.W., 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer*, 87(5): 629-36.
19. Kim H.S. 2002. Effects of the *Zizyphus jujuba* seed extract on the lipid components in hyperlipidemic rats. *Journal of Food Science and Nutrition*, 7(1): 72-7.
20. Konstantopoulou I., Vassilopoulou L., Mavragani-Tsipidou P., Scouras Z.G., 1992. Insecticidal effects of essential oils.
5. Aslani E., Naghsh N., Ranjbar M., 2014. Cytotoxic effects of hydro-alcoholic extracts of cress (*Lepidium Sativum*)-made from different stages of the plant on k562 Leukemia cell line. *Bimonthly Journal of Hormozgan University of Medical Sciences*, 18(5): 370-8. (In Persian).
6. Boman H.G., 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 65(2): 205-7.
7. Bosch G.J., Joosten A.M., Kessler J.H., Melief C.J., Leeksa O.C., 1996. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD<sup>4+</sup> T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*, 88(9): 3522-7.
8. Chen Z., Wang Z.Y., Chen S.J., 1997. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 76(1-3):141-9.
9. Efferth T., Li P.C., Konkimalla V.S., Kaina B., 2007. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 13(8):353-61.
10. Foroushai S.M.A., Delirez N., Hobbenaghi R., Msayebi G., 2012. Therapeutic effects of all-trans retinoic acid on experimental autoimmune encephalomyelitis and its role in T-helper lymphocyte responses. *Tehran University of Medical Sciences*, 54-68. (11) (Persian).
11. Ghosh R., Ganapathy M., Alworth W.L., Chan D.C., Kumar A.P., 2009. Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME 2) and Eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 113(1): 25-35.
12. Goldman J.M., Melo J.V., 2003. Chronic myeloid leukemia—advances in



- plants on *Drosophila auraria*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 48(6): 616-9.
- a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1(10):1046-51.
30. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.H., King horn A.D., Brown D.M., Wani M.C., 1995. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1(10):1046-51.
31. Prashar A., Siddiqui F., Singh A.K., 2012. Synthetic and green vegetable isothiocyanates target red blood leukemia cancers. *Fitoterapia*, 83(2): 255-65.
32. Saleem T.M., Chetty C.M., Ramkanth S.V., Rajan V.S., Kumar K.M., Gauthaman K., 2010. Hepatoprotective herbs—a review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(1): 1-5.
33. Shah B.N., Seth A.K., Desai R.V. 2010. Phytopharmacological profile of *Lagenaria siceraria*: a review. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(3): 152-7.
34. Shyu M.H., Kao T.C., Yen G.C., 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and down regulation of XIAP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10): 6110-8.
35. Smets L.A. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-cancer Drugs*, 5(1): 3-9.
36. Takada Y., Aggarwal B.B., 2003. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- $\kappa$ B activation through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *The Journal of Immunology*, 171(6): 3278-86.
- A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic
21. Li J., Guo W.J., Yang Q.Y., 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, 8(3), 493-5.
22. Li J.W., Ding S.D., Ding X.L., 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40(11): 3607-13.
23. Manikandan P., Murugan R.S., Priyadarsini R.V., Vinothini G., Nagini S., 2010. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sciences*, 86(25): 936-41.
24. Maura A., Pino A., Ricci R., 1989. Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of Eugenol. *Mutation Research Letters*, 227(2): 125-9.
25. Meloni-Ehrig A., 2013. The cytogenetics of hematologic neoplasms. *In The Principles of Clinical Cytogenetic* Springer New York. pp. 309-370.
26. Mou X., 2005. Cancer prevention by astaxanthin, a natural carotenoid. *Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine*, 114: 21-9.
27. Mukherjee A.K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C., 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 8(12): 1467-86.
28. Nagababu E., Lakshmaiah N., 1992. Inhibitory effect of Eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 43(11): 2393-400.
29. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.H., King horn A.D., Brown D.M., Wani M.C., 1995. Discovery of betulinic acid as



*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*.  
39(10): 803-9.

40. Zhang Y.X., Kong C.Z., Wang H.Q., Wang L.H., Xu C.L., Sun Y.H., 2009. Phosphorylation of Bcl-2 and activation of caspase-3 via the c-Jun N-terminal kinase pathway in ursolic acid-induced DU145 cells apoptosis. *Biochimie*, 91(9):1173-9.

41. Zuco V., Supino R., Righetti S.C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F., 2002. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters*, 175(1):17-25.

37. Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E. 2003. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head & Neck*, 25(9): 732-40.

38. Turrini E., Ferruzzi L., Fimognari C., 2014. Natural compounds to overcome cancer chemoresistance: Toxicological and clinical issues. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(12): 1677-90.

39. Zhang P., Li H., Chen D., Ni J., Kang Y., Wang S., 2007. Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly (ADP-ribose) Polymerase Cleavage.