

اثر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه مورینگا اولیفرا بر روی مهار رده‌های سلولی جورکت (Jurkat) و راجی (Raji) از لوسمی لنفوبلاستی حاد

لیلا رجبی^۱، علی رجبی^۲، امین محمدی^۱، رحیم خادمی^۳، غلامرضا خمیسی‌پور^۴

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستی حاد، اختلال بدخیم هماتولوژیک رده لنفوئیدی می‌باشد. به علت عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی، اخیراً درمان با استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران می‌باشد. مطالعه‌های گذشته بر روی گیاه مورینگا اولیفرا، خاصیت ضد سرطانی آن بر روی برخی سلول‌های سرطانی را نشان داد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمیت سلولی برگ‌های گیاه مورینگا اولیفرا بر روی رده‌های سلولی جورکت و راجی از لوسمی لنفوبلاستی حاد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، پس از تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی از برگ گیاه مورینگا اولیفرا، سلول‌های جورکت و راجی، با غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. زنده‌مانی گروه‌های سلولی توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و آزمون MTT ارزیابی شد. از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به عنوان گروه کنترل استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 و آزمون یک‌طرفه ANOVA انجام شد.

یافته‌ها

تیمار سلول‌های جورکت و راجی با تمامی غلظت‌های مورد مطالعه از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه، منجر به مهار رشد سلول‌ها شد. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۱۵۰ µg/mL عصاره‌های آبی و برای رده‌های سلولی جورکت و راجی به ترتیب ۴۸/۵٪ و ۴۷/۴٪ حاصل شد. هم‌چنین بالاترین درصد کشندگی در غلظت ۵۰ µg/mL عصاره‌های اتانولی و برای رده‌های سلولی جورکت و راجی به ترتیب ۷۳/۴٪ و ۷۸/۵٪ به دست آمد. دوز IC50 در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۵۰ µg/mL حاصل شد.

نتیجه‌گیری

برگ گیاه مورینگا اولیفرا، منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی جورکت و راجی از لوسمی لنفوبلاستی حاد شد.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستی حاد، سلول‌های جورکت، مورینگا

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - گروه هماتولوژی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر - بوشهر - ایران
- ۲- دکترای تخصصی هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- کارشناس ارشد علوم باغبانی - مربی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر - بوشهر - ایران
- ۴- مؤلف مسئول: دکترای تخصصی هماتولوژی و بانک خون - دانشیار گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر - بوشهر - ایران - کد پستی: ۷۵۱۸۷۵۹۵۷۷

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد (Acute Lymphoblastic = ALL) یک سرطان پیشرونده هماتولوژیک می باشد که طی آن سلول های پیش ساز لنفوبلاستی در مغز استخوان و خون محیطی دچار تکثیر بدخیم می شوند (۱). ALL شایع ترین بدخیمی در کودکان کمتر از ۱۵ سال است و تقریباً یک سوم سرطان های دوران کودکی را شامل می شود (۲). بر اساس ایمونوفنوتایپ، ALL به دو زیر گروه اصلی B-cell ALL (حدود ۸۵٪ لوسمی های دوران کودکی) و T-cell ALL (۱۵٪ موارد) طبقه بندی می شود (۳). رده سلولی جورکت (Jurkat) از زیر گروه T-cell ALL است که اولین بار در سال ۱۹۷۷ از خون یک پسر بچه مبتلا به ALL جدا شد و یکی از اولین رده های سلولی برای مطالعه زیست شناسی پیش سازهای لنفوبلاستی T بود (۴). رده سلولی راجی (Raji) از زیر گروه B-cell ALL و سلول های سرطانی لنفوم بورکیت می باشد (۵).

مشکل اصلی در درمان لوسمی های حاد، بروز مقاومت به داروهای شیمی درمانی است. حتی آن دسته از بیماران که کاملاً درمان شده اند، ممکن است دچار عوارض طولانی مدت ناشی از شیمی درمانی شوند (۶، ۷).

در طب سنتی که در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد، گیاهان به عنوان داروهای اولیه و اصلی درمانی هستند که برای معالجه بیماری به کار می روند (۸). داروهای گیاهی معمولاً در مقایسه با درمان های تهاجمی، طبیعی و بی خطر می باشند. از طرفی، به علت دارا بودن ترکیبات بیولوژیکی فعال، می توانند با داروهای شیمی درمانی در تعامل باشند. این ارتباط و تعامل در مورد گیاهانی که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند، به مراتب قوی تر است، زیرا آنتی اکسیدان ها می توانند در به حداقل رساندن عوارض جانبی ناشی از شیمی درمانی نقش قابل توجهی داشته باشند و با تقویت سیستم دفاعی بدن، آسیب اکسیداتیو بافتی را کاهش دهند (۹). عمده ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهان از جمله کاروتنوئیدها، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها، اثرات مفیدی بر سلامتی و جلوگیری از بدخیمی دارند (۱۰). یکی از گیاهان دارویی که پتانسیل آنتی اکسیدانی آن اثبات شده است، گیاه مورینگا اولیفرا

(*Moringa Olifera*) می باشد. مورینگا اولیفرا یکی از شناخته شده ترین و گسترده ترین گونه های طبیعی موجود در خانواده مورینگاسه (*Moringaceae*) می باشد که به علت قدرت بالای آنتی اکسیدانی، پتانسیل درمانی آن اثبات شده است (۱۱). مورینگا اولیفرا به علت مقاومت به خشکی و رطوبت، در مناطق خشک، مرطوب و بسیاری از کشورهای گرمسیری، و در انواع مختلف خاک، به خوبی رشد می کند (۱۰). تقریباً از همه بخش های گیاه، اعم از برگ، ساقه، ریشه و میوه برای درمان سنتی بسیاری از بیماری ها از جمله التهاب، مشکلات پروستات، عفونت های پوستی، هیپرگلیسمی، پرکاری تیروئید و بیماری های قلبی-عروقی استفاده شده است ولی برگ ها حاوی بیشترین میزان ویتامین ها، مواد معدنی، آلکالوئیدها، اسیدآمین های ضروری و پروتئین ها می باشند (۱۲، ۱۳). به نظر می رسد اجزای فیتوشیمیایی موجود در برگ های مورینگا، مانند گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی باشند (۱۴). سازوکار دقیق ضد توموری گیاه مورینگا اولیفرا، به طور کامل شناسایی نشده است اما احتمال می رود که اثرات آنتی پroliferative گیاه، مربوط به کاهش بیان پروتئین های $IK\beta\alpha$ و $NF-kB$ باشد. فعالیت نامناسب $NF-kB$ ، یکی از سازوکارهای بیماری هایی است که با آپوپتوز و یا التهاب همراه هستند. از طرفی، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی مورینگا اولیفرا، ناشی از افزایش بیان ژن های $Nrf2$ (فاکتور هسته ای اریثروئید) توسط ایزوتیوسیانات موجود در گیاه می باشد. ژن های $Nrf2$ تنظیم کننده کلیدی سیستم های دفاعی بدن در مقابله با استرس اکسیداتیو می باشند.

هم چنین طبق شواهد به دست آمده از مطالعه های موجود، برگ گیاه مورینگا اولیفرا، با القای کاسپازها آپوپتوز را فعال می کند (۱۵). از آن جایی که تاکنون خواص ضد سرطانی برگ های گیاه مورینگا اولیفرا به طور دقیق بر روی لوسمی لنفوبلاستی حاد بررسی نشده است، در این مطالعه به بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره های آبی و اتانولی برگ های گیاه مورینگا اولیفرا بر روی سلول های لوسمی لنفوبلاستی حاد در سل لاین های جورکت (Jurkat) و راجی (Raji) پرداختیم.

مواد و روش‌ها**جمع‌آوری و تهیه عصاره‌های گیاه:**

به منظور انجام یک مطالعه تجربی، گیاه مورینگا اولیفرا از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر جمع‌آوری شد. برگ‌های گیاه پس از شستن و خشک شدن در معرض هوا، به مدت ۲۴ ساعت در جارهای مخصوص دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند تا پودر خشک حاصل شود. به منظور تهیه عصاره آبی ۱۰۰ گرم پودر برگ در یک لیتر آب مقطر، و به منظور تهیه عصاره اتانولی ۲۰۰ گرم پودر برگ در یک لیتر اتانول ۹۶ درصد خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر حرارتی با دور ۲۰۰ rpm قرار داده شد. سپس عصاره‌ها صاف شده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء (Rotary evaporator) حلال اضافی تبخیر و تغلیظ شد و عصاره‌های خالص حاصله، در ظروف شیشه‌ای در بسته جمع‌آوری و تا روز شروع کار درون یخچال نگهداری شدند.

حل کردن عصاره‌های گیاه و تهیه غلظت‌های مورد نیاز:

عصاره آبی در محیط کشت سلولی RPMI-1640 استریل حل شد ولی برای حل کردن عصاره اتانولی از ترکیب دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده شد. از آن جایی که DMSO خود دارای اثرات سمیت سلولی می‌باشد، برای حذف اثر این ماده بر روی سلول‌های تیمار شده، غلظت آن در محلول نهایی ۰/۲ درصد (فاقد سمیت) در نظر گرفته شد. پس از استریل نمودن عصاره‌ها با استفاده از فیلترهای سرسنگی ۰/۲۲ میکرومتر، از عصاره اتانولی و آبی برگ گیاه، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. انتخاب دامنه غلظت‌های مورد مطالعه، بر اساس نتایج مطالعه‌های مشابه صورت گرفت.

کشت سلولی:

جهت انجام مطالعه حاضر، رده‌های سلولی جورکت (Jurkat) و راجی (Raji) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت سلولی RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) غیر فعال شده

و ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (محلول پنی‌سیلین و استرپتومایسین)، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ رطوبت، کشت و پاساژهای مکرر داده شدند تا سلول‌ها از نظر تعداد، مورفولوژی و زنده‌مانی، به حد مطلوب برسند. هم‌چنین سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. برای جداسازی سلول‌های PBMC، مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از خون فرد طبیعی در ضد انعقاد هپارین گرفته شد و به نسبت برابر با PBS استریل رقیق شد. ۱۰ میلی‌لیتر فایکول در یک فالكون ریخته شد و خون رقیق‌شده به آرامی با سمپلر بر روی فایکول ریخته و فالكون ۲۵ دقیقه با دور ۶۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس لایه بافی‌کوت حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای، جدا شده و پس از انتقال به یک فالكون دیگر و افزودن PBS، به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰ g سانتریفیوژ شدند. جهت شستشو و خروج کامل فایکول، این کار سه مرتبه تکرار شد.

تعیین درصد سلول‌های زنده توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو:

به منظور شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده، پس از سانتریفیوژ سلول‌ها به مدت ۴ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm و پیتاژ کردن آن‌ها با یک میلی‌لیتر محیط تازه، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط سلول و رنگ تریپان‌بلو (با نسبت برابر) روی لام نئوبار قرار داده شد و زیر میکروسکوپ معکوس، سلول‌هایی که در ۴ خانه ۱۶ تایی در چهار طرف لام قرار گرفته‌اند شمارش شدند. سلول‌های زنده (که غشاء ناتراوا نسبت به رنگ تریپان‌بلو دارند) بی‌رنگ و سلول‌های مرده (که هیچ انتخابی برای ورود رنگ ندارند) و رنگ وارد سیتوپلاسم آن‌ها می‌شود به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند.

تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر به ترتیب زیر محاسبه گردید:

تعداد سلول = میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده × ضریب رقت × ۱۰۰۰۰
درصد زنده‌مانی = میانگین تعداد سلول‌های زنده تقسیم بر تعداد کل سلول‌ها × ۱۰۰

سنجش سمیت سلولی:

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ها با روش آزمون رنگ‌سنجی MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium) انجام شد. MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ محلول در آب است. در اثر فعالیت آنزیم‌های سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلول‌های زنده فعال می‌باشند، در حلقه MTT شکستی ایجاد شده و به بلورهای بنفش رنگ فورمازان که توسط DMSO به شکل محلول درآمده، تبدیل و اندازه‌گیری می‌شود.

به منظور انجام این آزمایش، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه استریل برده شد و با غلظت‌های مختلف دارو تیمار شد. برای هر غلظت، آزمایش سه بار در سه چاهک جداگانه تکرار شد. در چاهک‌های کنترل، دارو افزوده نشد. از چاهک‌هایی که حاوی غلظت‌های مختلف دارو و محیط کشت بودند (چاهک‌های عاری از سلول) به عنوان بلانک استفاده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور، به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) اضافه و پس از ۴ ساعت انکوباسیون مجدد در انکوباتور، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه گردید. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و با دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. سپس از جذب نوری خانه‌های تکرار شده برای هر غلظت، میانگین گرفته شد و از میزان جذب چاهک بلانک کم شد و OD هر غلظت به دست آمد. به منظور تبدیل OD به درصد سلول‌های زنده (Viability) از فرمول زیر استفاده شد:

$$\frac{\text{آزمایش OD}}{\text{کنترل OD}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری:

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Gragh Pad Prism 6 و آزمون یک طرفه ANOVA صورت گرفت و سطح معناداری آزمون ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. طبق اعداد به دست آمده و نمودارها، غلظتی از عصاره

که موجب ۵۰٪ مهار رشد سلول‌های سرطانی شد، به عنوان IC50 دوز در نظر گرفته شد و غلظتی از عصاره که بیشترین اثر مهار بر روی زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده داشت، به عنوان ماکسیمم دوز عصاره‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه (۵۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثر مهار معناداری بر زنده‌مانی رده‌های سلولی جورکت و راجی داشته‌اند (۰/۰۰۱ < p) (جدول و نمودار ۱).

ماکزیمم دوز عصاره‌ها:

عصاره اتانولی برگ گیاه در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره آبی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بالاترین میزان کشندگی بر روی سلول‌های جورکت و راجی را نشان دادند. به گونه‌ای که بالاترین درصد مهار رشد برای جورکت‌های تیمار شده با عصاره آبی، در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۴۸/۵٪ به دست آمد و برای جورکت‌های تیمار شده با عصاره اتانولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۷۳/۴٪ حاصل شد. هم‌چنین بیشترین درصد کشندگی برای سلول‌های راجی تیمار شده با عصاره آبی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۴۷/۴٪ و برای راجی‌های تیمار شده با عصاره اتانولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۷۸/۵٪ به دست آمد.

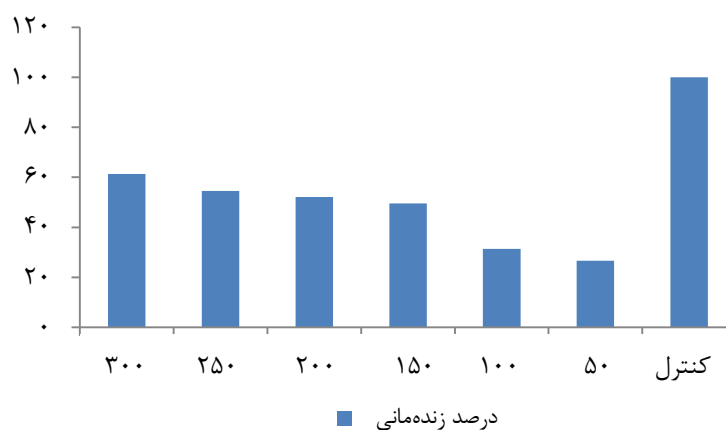
IC50 دوز عصاره‌ها:

دوز IC50 در سلول‌های جورکت و راجی تیمار شده با هر دو نوع عصاره آبی و اتانول برگ گیاه مورینگا، در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد. به طوری که جورکت‌های تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و اتانولی، به ترتیب ۴۸/۵٪ و ۵۰/۵٪ کشندگی را نشان دادند. هم‌چنین راجی‌های تحت تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی، به ترتیب ۴۷/۴٪ و ۵۰٪ کشندگی را نشان دادند.

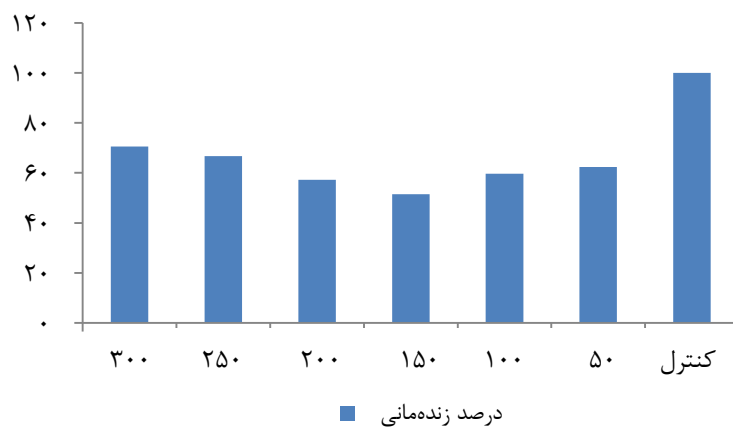
جدول ۱: میزان اثر عصاره های آبی و اتانولی بر درصد زنده ماندی رده های سلولی جورکت و راجی

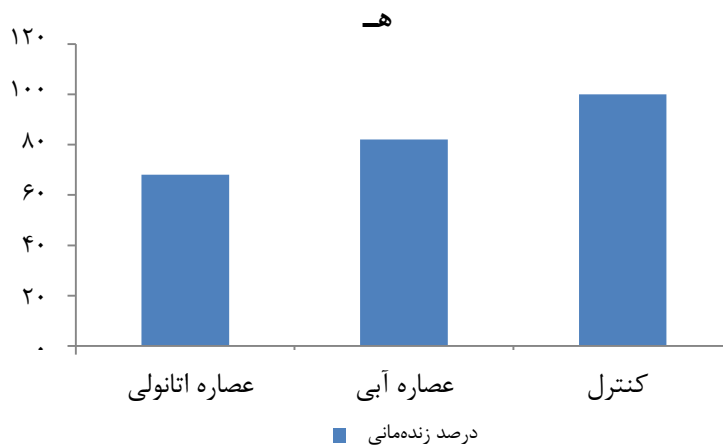
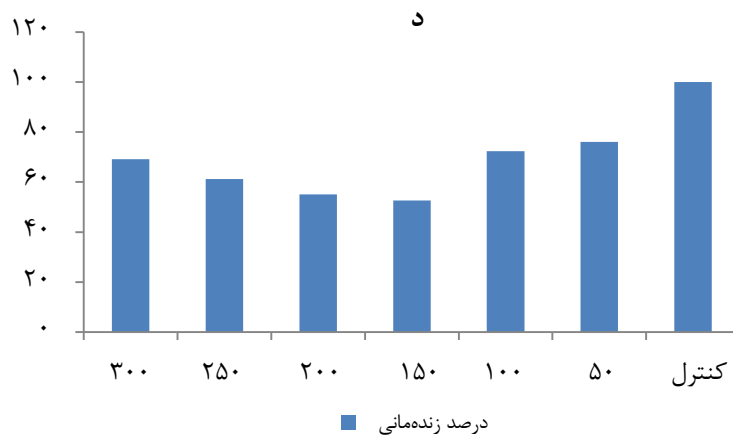
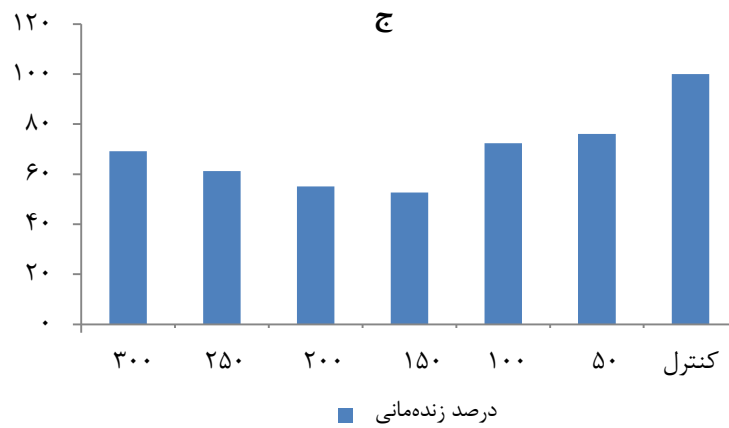
غلظت ($\mu\text{g/mL}$)	درصد زنده ماندی جورکت های تیمار شده با عصاره آبی	درصد زنده ماندی جورکت های تیمار شده با عصاره اتانولی	درصد زنده ماندی راجی های تیمار شده با عصاره آبی	درصد زنده ماندی راجی های تیمار شده با عصاره اتانولی
۵۰	۶۲/۴	۲۶/۶	۷۶/۷	۲۱/۵
۱۰۰	۵۹/۷	۳۱/۵	۷۲/۴	۳۹/۶
۱۵۰	۵۱/۵	۴۹/۵	۵۲/۶	۵۰
۲۰۰	۵۷/۲	۵۳/۳	۶۱/۳	۵۳/۴
۲۵۰	۶۶/۷	۵۵	۵۵/۱	۵۷/۲
۳۰۰	۷۰/۶	۵۷/۶	۶۹/۲	۶۰/۱

الف



ب





نمودار ۱: درصد تکثیر سلول‌های تیمار شده با عصاره برگ گیاه مورینگا اولیفرا: الف) جورکت‌های تیمار شده با عصاره آبی - ب) جورکت‌های تیمار شده با عصاره اتانولی - ج) راجی‌های تیمار شده با عصاره آبی - د) راجی‌های تیمار شده با عصاره اتانولی - ه) تیمار شده با هر دو عصاره آبی و اتانولی با دوز IC50

طرفی، برخی از داروهای ضد سرطان که از منابع طبیعی مشتق شده‌اند، به داروهای فعلی ضد سرطان مانند وین کریستین و وین بلاستین تبدیل شده‌اند (۲۰).

در این پژوهش، گیاه مورینگا اولیفرا به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، خواص دارویی متعدد و همچنین پتانسیل آنتی اکسیدانی، جهت بررسی اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستی حاد (جورکت و راجی) مورد توجه قرار گرفت. در مطالعه حاضر، بررسی اثر سیتوتوکسیک برگ گیاه مورینگا اولیفرا، بر زنده‌مانی رده‌های سلولی ALL، نشان داد که عصاره‌های برگ گیاه مورینگا اولیفرا منجر به مهار رشد وابسته به غلظت رده‌های سلولی جورکت و راجی شد (شکل ۱). مطالعه‌های زیادی توانایی برگ‌های گیاه مورینگا اولیفرا را در محافظت از بدن و سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو نشان داده‌اند (۲۱). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که گیاه مورینگا اولیفرا با توانایی مهار تولید رادیکال‌های آزاد، آسیب به گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش استرس اکسیداتیو، یک آنتی اکسیدان قوی می‌باشد (۲۲). در مطالعه لول و همکاران عصاره برگ گیاه مورینگا اولیفرا با رده سلول سرطانی HL60 مربوط به لوسمی پرومیلوسیتیک تیمار شد و شاهد کاهش استرس اکسیداتیو در سلول سرطانی مذکور بودند (۲۳). رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو، می‌توانند زمینه‌ساز بروز بیماری‌هایی از جمله سرطان باشند. بنابراین ترکیباتی که بتوانند منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در بدن شوند، می‌توانند در درمان علیه سرطان‌ها مؤثر باشند.

علاوه بر این، اثر سیتوتوکسیک برگ‌های گیاه مورینگا اولیفرا بر روی بسیاری از رده‌های سلول‌های سرطانی بررسی شده است. در مطالعه عبدالاتف و همکاران، تیمار منوسیت‌های سرطانی با عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه مورینگا اولیفرا، منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی گردید و عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی اثر مهاری قوی‌تری را نشان داد (۲۴). این یافته با نتایج حاصل از مطالعه ما هم‌خوانی داشت. در مطالعه حاضر تیمار لنفوسیت‌های سرطانی جورکت و راجی با هر دو عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه، اثر مهاری معناداری بر روی رشد

در مقایسه میزان زنده‌مانی بین غلظت‌های مختلف مشخص گردید که عملکرد سیتوتوکسیتی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه، وابسته به غلظت می‌باشد. به طوری که در تیمار هر دو رده سلولی با عصاره اتانولی برگ گیاه، با افزایش غلظت عصاره، زنده‌مانی افزایش یافت. از طرفی در هنگام تیمار سلول‌ها با عصاره آبی برگ گیاه، زنده‌مانی رده‌های سلولی با افزایش غلظت عصاره تا رسیدن به غلظت IC50، کاهش یافت و در غلظت‌های بالاتر از غلظت IC50، زنده‌مانی افزایش یافت.

از طرفی، نتایج حاصل از تیمار سلول‌های PBMC با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها نشان داد که هر دو عصاره، تاثیر کشندگی بسیار کمتری روی سلول‌های PBMC تیمار شده نسبت به سلول‌های جورکت و راجی داشته‌اند. سلول‌های PBMC تحت تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره آبی، ۸۲٪ زنده‌مانی و با عصاره اتانولی، ۶۸٪ زنده‌مانی را نشان دادند.

بحث

شیمی درمانی شایع ترین درمانی است که برای از بین بردن سلول‌های لوسمی و جلوگیری از پیشرفت بیشتر ALL مورد استفاده قرار می‌گیرد. با وجود اثربخشی داروهای شیمی درمانی، عوارضی هم‌چون آسیب به بافت‌های سالم در حال تکثیر، بدشکلی‌های ساختاری و مقاومت سلول‌های توموری در برابر دارو، نیاز به درمان‌های جایگزین یا درمان‌های مکمل را مطرح می‌سازد (۱۶). یکی از کم‌خطرترین درمان‌ها با کمترین اثر سمی در سلول‌های طبیعی، درمان به کمک گیاهان دارویی می‌باشد. استفاده از گیاهان دارویی، به تنهایی یا در ترکیب با شیمی درمانی، عوارض جانبی ناشی از شیمی درمانی را کاهش می‌دهد (۱۷). هم‌چنین گفته شده است که گیاهان دارویی قابلیت غلبه بر مقاومت دارویی و از بین بردن سلول‌های مقاوم را دارند (۱۸). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، برخی از کشورها هنوز هم از درمان‌های گیاهی، به عنوان منبع اصلی دارو بهره می‌برند و کشورهای در حال توسعه، از مزایای ترکیبات طبیعی به طور فزاینده‌ای برای اهداف درمانی استفاده می‌کنند (۱۹). از

مشاهده کردیم که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ مورینگا اولیفرا در غلظت‌های بالاتر از غلظت ۵۰٪ کشندگی، منجر به افزایش زنده‌مانی سلول‌های جورکت و راجی شدند. بنابراین می‌توان اظهار داشت که تاثیر کشندگی عصاره‌های مختلف برگ گیاه مورینگا اولیفرا وابسته به غلظت می‌باشد و از طرفی این تاثیر در رده‌های سلول سرطانی مختلف می‌تواند متفاوت باشد.

هم‌چنین در این مطالعه، اثر مهاری عصاره‌های برگ گیاه مورینگا اولیفرا بر روی رده‌های سلولی سالم (PBMC)، به مراتب بسیار کمتر از رده‌های سلول سرطانی بود. این یافته، تفاوت در پاسخ‌های سلولی بین سلول‌های سالم و سلول‌های سرطانی را می‌رساند و هم‌چنین کم خطر بودن اثر مورینگا اولیفرا بر روی سلول‌های طبیعی را تقویت می‌نماید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه مورینگا اولیفرا بر روی دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستی حاد نشان داده شده است. لذا می‌توان برگ گیاه مورینگا اولیفرا را به عنوان ماده‌ای با پتانسیل کشندگی بر روی رده‌های سرطانی جورکت و راجی پیشنهاد کرد. هم‌چنین عصاره‌های برگ این گیاه می‌تواند به عنوان گیاهی دارویی در مطالعه‌های مرتبط با یافتن داروهای جدید در درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر به جهت همکاری در تهیه گیاه مورینگا اولیفرا و هم‌چنین خانم ملک حیاتی، کارشناس آزمایشگاه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، جهت همکاری در تهیه عصاره‌های گیاه تشکر می‌نمائیم. این مقاله در کمیته اخلاق دانشگاه با کد IR.BPUMS.REC.1398.156 مجوز گرفته است.

سلول‌ها بر جا گذاشتند که این اثر مهاری در مورد عصاره اتانولی قوی‌تر از عصاره آبی بود. علاوه بر این در دو مطالعه دیگر، اثر کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ مورینگا اولیفرا بر روی رده‌های سلول سرطانی HT-29 و HCT-116 مربوط به سرطان کولون بررسی و اثر مهاری قویتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی برگ گیاه گزارش شد (۲۶، ۲۵). گارسیا بلتران و همکاران در سال ۲۰۲۰ ضمن غربالگری فیتوشیمیایی عصاره‌های مختلف برگ گیاه مورینگا اولیفرا اظهار داشتند که عصاره آبی برگ گیاه حاوی ترکیبات فنولی بیش‌تر و عصاره اتانولی دارای ترکیبات فلاونوئیدی بیش‌تری می‌باشد و این تفاوت در میزان ترکیبات مختلف، می‌تواند عامل اساسی در تفاوت اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف برگ گیاه باشد (۲۷). ترکیبات فلاونوئیدی در محافظت از بدن در برابر عملکرد مضر رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش دارند و به کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌کنند (۲۴). بنابراین می‌توان گفت علاوه بر غلظت، ماهیت حلال به کار رفته در چرخه عصاره‌گیری و نیز ماده مؤثر حاصله، در میزان کشندگی سلول‌های تحت تیمار با عصاره‌های گیاه مؤثر می‌باشد. در مطالعه سانگانا و همکاران بر روی رده سلول سرطانی HT-29 و مطالعه پاموک و همکاران بر روی رده سلولی HCT-116 سرطان کولون، با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ مورینگا اولیفرا، شاهد افزایش مهار رشد سلول‌ها بودند (۲۶، ۲۵). در حالی که در مطالعه نیر و همکاران بر روی رده سلولی هلا از سرطان دهانه رحم و مطالعه ریجن و همکاران بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه، افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه مورینگا اولیفرا منجر به افزایش زنده‌مانی رده‌های سلول سرطانی مورد مطالعه گردید (۲۹، ۲۸). یافته‌های حاصل از دو مطالعه اخیر، با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی داشت. در مطالعه حاضر، در غلظت‌های بالاتر از غلظت IC50 هر دو عصاره آبی و اتانولی، شاهد افزایش زنده‌مانی رده‌های سلولی جورکت و راجی بودیم. ما

References:

- 1- Sheykhhasan M, Manoochehri H, Dama P. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL)

treatment: a review study. Cancer Gene Ther 2022; 1-17.

- 2- Shahriari M, Shakibazad N, Haghpahan S, Ghasemi K. Extramedullary manifestations in acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review and guideline-based approach of treatment. *Am J Blood Res* 2020; 10(6): 360-74.
- 3- Lejman M, Kuśmierczuk K, Bednarz K, Ostapińska K, Zawitkowska J. Targeted Therapy in the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia-Therapy and Toxicity Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2021; 22(18): 9827.
- 4- Gioia L, Siddique A, Head SR, Salomon DR, Su AI. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics* 2018; 19(1): 334.
- 5- Shan K, Ji H, You X, Lu T, Ren Y, Ding X, *et al.* Inositol hexakisphosphate induces apoptosis, cell cycle arrest in non-Hodgkin's Burkitt lymphoma cells and mediates anti-angiogenic, antitumor effects in T-cell lymphoma bearing Swiss albino mice. *Arabian Journal of Chemistry* 2022; 15(5): 103760.
- 6- Steinbach D, Legrand O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia* 2007; 21(6): 1172-6.
- 7- Bárcenas-López DA, Mendiola-Soto DK, Núñez-Enríquez JC, Mejía-Aranguré JM, Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Morales S. Promising genes and variants to reduce chemotherapy adverse effects in acute lymphoblastic leukemia. *Transl Oncol* 2021; 14(1): 100978.
- 8- Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants* 2017; 3(8): 17109.
- 9- Yeung KS, Gubili J, Mao JJ. *Herb-Drug Interactions in Cancer Care*. Oncology (Williston Park, NY). 2018; 32(10): 516-20.
- 10- Kashyap P, Kumar S, Riar CS, Jindal N, Baniwal P, Guiné RP, *et al.* Recent Advances in Drumstick (*Moringa oleifera*) Leaves Bioactive Compounds: Composition, Health Benefits, Bioaccessibility, and Dietary Applications. *Antioxidants* 2022; 11(2): 402.
- 11- Hagoel L, Vexler A, Kalich-Philosoph L, Earon G, Ron I, Shtabsky A, *et al.* Combined effect of *Moringa oleifera* and ionizing radiation on survival and metastatic activity of pancreatic cancer cells. *Integr Cancer Ther* 2019; 18: 1534735419828829.
- 12- de Andrade Luz L, Rossato FA, e Costa RAP, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. *Toxicol In Vitro* 2017; 44: 94-9.
- 13- Tiloke C, Phulukdaree A, Chuturgoon AA. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on human esophageal cancer cells. *J Med Food* 2016; 19(4): 398-403.
- 14- Tragulpakseerojn J, Yamaguchi N, Pamonsinlapatham P, Wetwitayaklung P, Yoneyama T, Ishikawa N, *et al.* Anti-proliferative effect of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2017; 16(2): 371-8.
- 15- Tiloke C, Anand K, Gengan RM, Chuturgoon AA. *Moringa oleifera* and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. *Biomed Pharmacother* 2018; 108: 457-66.
- 16- Kashyap D, Tuli HS, Yerer MB, Sharma A, Sak K, Srivastava S, *et al.* Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Semin Cancer Biol* 2021; 69: 5-23.
- 17- Ohnishi S, Takeda H. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. *Front Pharmacol* 2015; 6: 14.
- 18- Lu SH, Zuo HJ, Shi JX, Li CR, Li YH, Wang X, *et al.* Two new glycosides from the leaves of *Ligustrum robustum* and their antioxidant activities and inhibitory effects on α -glucosidase and α -amylase. *South African Journal of Botany* 2019; 125: 521-6.
- 19- Rajeswara Rao B, Singh K, Sastry K, Singh C, Kothari S, Rajput D, *et al.* Cultivation technology for economically important medicinal plants. *Advances in Medicinal Plants* 2015; 6(10): 4103-12.
- 20- Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A. Antiproliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 2006; 235(1): 114-20.
- 21- Pirrò S, Matic I, Guidi A, Zanella L, Gismondi A, Cicconi R, *et al.* Identification of microRNAs and relative target genes in *Moringa oleifera* leaf and callus. *Sci Rep* 2019; 9(1): 1-14.
- 22- Khalafalla MM, Abdellatef E, Dafalla HM, Nassrallah AA, Aboul-Enein KM, Lightfoot DA, *et al.* Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(49): 8467-71.
- 23- Dilworth LL, Stennett D, Omoruyi FO. Effects of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Human Promyelocytic Leukemia Cells Subjected to Oxidative Stress. *J Med Food* 2020; 23(7): 728-34.
- 24- Abdellatef E, Nassrallah HMDAA, Aboul-Enein KM, El-Shemy HA, Khalafalla MM. Antiproliferative action of *moringa oleifera* lam. root extracts in acute myeloid leukemia (AML) Cell Line. *Journal of Experimental Sciences* 2010; 1(8): 27-8.
- 25- Sanganna B, Chitme HR, Vrunda K, Jamadar MJ. Antiproliferative and antioxidant activity of leaves extracts of *Moringa oleifera*. *Int J Curr Pharm Res* 2016; 8(4): 54-6.
- 26- Pamok S, Vinitketkumnien SSU, Saenphet K. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012; 6(1): 139-45.
- 27- García-Beltrán JM, Mansour AT, Alsaqufi AS, Ali HM, Esteban MÁ. Effects of aqueous and ethanolic leaf extracts from drumstick tree (*Moringa oleifera*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, and their cytotoxic, antitumor, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol* 2020; 106: 44-55.
- 28- Nair S, Varalakshmi K. Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts on HeLa cell line. *J Nat Pharm* 2011; 2(3): 138-42.
- 29- Welch RH, Tietje AH. Investigation of *Moringa oleifera* leaf extract and its cancer-selective antiproliferative properties. *Journal of the South Carolina Academy of Science.* 2017; 15(2): 8-13.

Original Article

The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Moringa olifera* leaves on inhibition of Jurkat and Raji cell lines of acute lymphoblastic leukemia

Rajabi L.¹, Rajabi A.², Mohammadi A.¹, Khademi R.³, Khamisipour Gh.¹

¹Faculty of Para- Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³Bushehr Agricultural and Natural Resources Research Center, Bushehr Agricultural Jihad Organization, Bushehr, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant hematologic disorder of lymphoid lineage. As a result of chemotherapy side effects, treatment with medicinal plants has recently been considered by researchers. Previous studies on *Moringa olifera* have shown its anti-cancer properties on some cancer cell lines. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of *Moringa oleifera* leaves on Jurkat and Raji cell lines of acute lymphoblastic leukemia.

Materials and Methods

In this experimental study, after preparing aqueous and ethanolic leaf extract of *Moringa olifera*, Jurkat and Raji cells were treated with different concentrations of extracts for 48 hours. Cell groups' viability was assessed by trypan blue staining and MTT assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used as a control group. Statistical analysis of data was performed using Graph Pad Prism 6 and one-way ANOVA test.

Results

Treatment of Jurkat and Raji cells with all concentrations of aqueous and ethanolic extracts led to inhibition of cell growth. The highest percentage of growth inhibition was obtained at a concentration of 150 µg/mL of aqueous extract, 48.5% and 47.4% for Jurkat and Raji cell lines, respectively. Also, the highest lethal percentage was obtained at a concentration of 50 µg/mL of ethanolic extract, 73.4% and 78.5% for Jurkat and Raji cell lines, respectively. The IC50 dose was obtained in all study groups at a concentration of 150 µg/mL.

Conclusions

The leaves of *Moringa olifera* have the capacity to inhibit the growth and viability of Jurkat and Raji cell lines of acute lymphoblastic leukemia.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia, Jurkat Cells, *Moringa*

Received: 28 Dec 2021

Accepted: 16 Mar 2022

Correspondence: Khamisipour G., PhD in Hematology and Blood Banking, Associate Professor of Faculty of Para-Medicine, Bushehr University of Medical Sciences.

Postal code: 7518759577; Tel: (+9877) 33450178; Fax: (+9877) 33452228

E-mail: khamisipourgholamreza@gmail.com