Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.41; No.2; 2017

Cytotoxic effect of punisic acid of pomegranate seed oil on the cellular line of blood cancer (K652)

Roya Vazirijavid[1*], Hossein Maghsodi[2], Reza Hajihosseini[1]

1. Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Department of Biotechnology, Payame Noor University, Shar Rey, Iran.

(Received: 2016/11/13 Accept: 2017/07/06)

Abstract

Backgrond*: Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells that causes the increase of myeloid, erythroid cells, and blood platelets and hyperplasia in the bone marrow. This study is performed the effect of cytotoxicity of punicic acid of pomegranate seed oil on the cellular line of blood cancer (K652), as a model of Chronic Myeloid Leukemia.*

Materials and Methods: *In this experiential laboratory study. Punicic acid of pomegranate seed oil was purchased from Clarodan Kerman Co., representative of LCG Co. in Iran. K562 cells were cultured and were administered with densities of 8 to 100 micrograms per milliliters (in 24h, 48h, and 72h). Cellular toxicity of punicic acid against K562 leukemic cells was estimated using the MTT, LDH and SDH method. Absorption was measured using Elisa machine. Then the data were analyzed with the computer software SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), t.test and ANOVA.*

Findings: *Punicic acid of pomegranate seed oil shows the most cellular toxicity effect at lc50=50 micrograms per milliliters and 72 hours after treatment. In other words, punicic acid of pomegranate seed oil expresses the effects of cellular toxicity on k562 cells, depending on the dosage.*

Conclusion: *Considering the toxicity of punicic acid of pomegranate seed oil, punicic acid can be considered a potential candidate for further CML studies, and other cancer cells.*

Keywords: *Cytotoxic, CML, K562, Punicic Acid, Leukemia*

**Corresponding author: Roya Vazirijavid*
Email: rvazirijavid@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۹۶، صفحات ۹۷ تا ۱۱۱

بررسی اثر سمیت سلولی پانیسیک اسید روغن هسته انار بر رده سلولی سرطان خون (K562)

رویا وزیری جاوید[1*]، حسین مقصودی[2]، رضا حاجی حسینی[1]

۱- گروه بیوشیمی دانشگاه پیام نور، تهران شرق، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، شهرری، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۵

چکیده:

سابقه و هدف: *لوسمی میلیوئیدی حادمزمن (CML) یک اختلال بدخیم سلول های بنیادی خون است که منجربه افزایش سلول های میلوئیدی، سلولهای اریتروئیدی وپلاکت درخون محیطی و هیپرپلازی درمغز استخوان می شود. این تحقیق به منظوربررسی اثرسمیت سلولی وسیتوتوکسیکی پانیسیک اسید روغن هسته اناربرروی رده سلولی (K562) به عنوان مدل لوسمی میلوئیدی مزمن صورت گرفته است.*

مواد و روش بررسی: *دراین مطالعه تجربی آزمایشگاهی، پانیسیک اسید روغن هسته انار از شرکت کارلاوان کرمان که نمایندگی شرکت LCG درایران میباشد، خریداری شد. سلولهای K562 کشت داده شد و با غلظت های (۸ تا ۱۰۰ ماکروگرم برمیلی لیتر) و در فاصله زمانی (۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت) تحت درمان قرار گرفتند. سمیت سلولی پانیسیک اسید بر علیه سلولهای K562 لوسمی با استفاده از دستگاه الایزا و به ترتیب MTT، SDH و LDH برآورد شد. داده ها با استفاده از آزمون های آماری t.test و ANOVA و SPSS نسخه ۱۵ تجزیه و تحلیل شد.*

یافته‌ها: *پانیسیک اسید روغن هسته انار ، بالاترین اثر سمیت سلولی را در LC50=۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت پس از تیمار، از خود نشان می دهد. به عبارت دیگر، پانیسیک اسید هسته انار اثر سمیت سلولی وابسته به دوز را بررده سلولی k562 از خود بروز داده است.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به سمیت سلولی پانیسیک اسید روغن هسته انار بر رده سلولی k562، پانیسیک اسید می تواند به عنوان یک کاندید بالقوه برای مطالعات بیشتر سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن وساید سلول های سرطانی در نظر گرفته شود.*

واژگان کلیدی *: سیتوتوکسیسیتی، CML، K562، پانیسیک اسید، لوسمی*

***نویسنده مسئول:** رویا وزیری جاوید
پست الکترونیک: rvazirijavid@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

مقدمه:

لوسمی میلیوئیدی مزمن ((Chronic myeloid Leukemia (CML شایع ترین بیماری پرولیفراتیو، بیماری کلونال ناشی از جابجایی دوطرفه بین ژن ABL1(Abelson murine Leukemia Viral Oncogene (Hemology) برروی کروموزوم ۹ و ژن BCR (Break Point Cluster Region) برروی کروموزم ۲۲، در سلولهای بنیادی خون ساز چند توانه می باشد، که تیروزین کیناز پیوسته و مداوم و بسیار فعالی را کد میکند که باعث خاصیت تکثیری بیشتر این سلولها می شود و از فاکتورهای مهم این لوسمی است (۱، ۴). این رده سلولی جداشده از نوعی سرطان خون به نام CML می باشد. اکثر مبتلایان این سرطان دچار جهش یا تغییر ژنتیکی موسوم به فیلادلفیا می باشند (۲). از نظر بالینی CML در سه فاز مزمن، سرعت بالا و بلاستیک ظاهر می شود (۳). هدف از درمان CML، نگه داشتن بیماران در فاز مزمن و جلوگیری از پیشرفت بیماری وکم کردن اثرات سایتوتوکسیکی داروهای مصرفی رایج این بیماران است. در حال حاضر ایماتینیب مسیلات به عنوان خط اول درمان محسوب می شود اما درمان قطعی تر پیوند مغز استخوان است (۵). آپوپتوز، فرایند تنظیم شده مرگ سلولی است، که باعث حذف سلولهای آسیب دیده، بدون صدمه به سلولهای دیگر در ارگانیسم های چند سلولی وثابت نگاه داشتن محیط داخلی بدن است. داروهای شیمی درمانی منجر به القاء آپوپتوز و مهار رشد سلولی می شوند (۶، ۷).

استفاده از گیاهان دارویی و طب مکمل به خاطر اثرات مفید فیتوکمیکال ها در درمان بیماریهای مختلف مخصوصا سرطان مورد توجه محققین علوم پزشکی قرار گرفته است (۵۱). موضوع جالب این است که بیشترین اثر درمانی برروی سلولهای نئوپلاستیک سرطان به علت خواص مواد آنتی اکسیدانی موجود در ترکیبات گیاهی بوده است (۵۱, ۵۲). درخت انار، درخت کوچکی است از خانواده Punicaceae که بومی مشرق زمین است و ایران یکی از تولیدکنندگان عمده انار در جهان می باشد (۸). مقدار روغن هسته انار از ۶/۶٪ تا ۱۹/۳٪ و میزان اسید لینولنیک (C18: 3) (LNA) به عنوان اسیدچرب عمده موجود در روغن هسته انار (۳۱/۸٪ تا ۸۶/۶٪) و لینولئیک اسید (۰/۷٪ تا ۲۴/۴٪) و اسید اولئیک (۰/۴٪ تا ۱۷/۴٪) است (۹). Punicic Acid (PA)، ۷۰٪ تا ۸۵٪ روغن هسته انار را تشکیل میدهد، که از اسید لینولنیک سنتز می شود (۱۰–۱۳). در مطالعات جدید انار بدلیل محتوای بالای فیتوکمیکالها در درمان انواع سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۵۳–۵۵). درمطالعات متعددی اثر ضدالتهابی PA یا پانیسیک اسید از طریق مهار بیان ژنها ی TNF-α، سیتوکین های پیش التهابی، کموکاین ها، سیکلوکسیژناز، NO سنتتاز و متالوپروتئینازها بررسی و تایید شده است (۱۴– ۱۶). قسمت های مختلف انار و ترکیبات آنها در تحقیقات مختلفی درزمینه سرطان مورد بررسی قرار گرفته است از آن جمله درسرطان سینه (برروی رده سلولی MCF-7)، سرطان پروستات (رده سلولی DU-145,LAPC-4) سرطان کولون (رده سلولی K562 و همچنین مطالعه بالینی برروی بیماران)،سرطان پانکراس و سایر سرطان ها انجام شده است (۵۷–۶۲). با توجه به اینکه تا به حال مطالعه جامعی در زمینه اثر ضد سرطانی پانیسیک اسید روغن هسته انار انجام نگرفته است، هدف از مطالعه حاضر تعیین سمیت سلولی پانیسیک اسید روغن هسته انار برده سلولی k562 به عنوان مدلی از CML می باشد تا اثر ضد سرطانی آن در درمان لوسمی به طور مقدماتی و برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها:

این مطالعه به صورت تجربی و با شیوه آزمایشگاهی انجام گرفته است. پانیسیک اسید روغن هسته انار از شرکت کارلاوان کرمان که نماینده شرکت LCG آمریکا است، با خلوص ۹۸٪ خریداری شده است وتازمان استفاده در دمای منفی۲۰ درجه نگهداری شد (نمودار کروماتوگرافی ومدارک ارسالی شرکت درزمینه پانیسیک اسید خریداری شده به پیوست مقاله می باشد).

رده سلولی: به منظور انجام این مطالعه تجربی، رده سلولیk562 در آبان ۱۳۹۴ از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور مرکز شهرری انتقال یافت. برای رشد این رده سلولی از محیط کشت RPMI۱۶۴۰شرکت سیگما (که غنی شده با سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) ۱۰ درصد (Bio- idea ایران) و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (و پنی سیلین ۱۰۰) واحد بر میلی لیتر، سیناژن، استفاده شد. سلول ها در محیط کشت سلولی داخل انکوباتور تحت شرایط دی اکسید کربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرارگرفتند.

سنجش سمیت سلولی بر اساس روش MTT :

به منظور بررسی اثرات پانیسیک اسید روغن هسته انار بر سلول های K 562 تعداد 10^5 سلول در۱۲ پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول ها با غلظتهای متفاوت پانیسیک اسید روغن هسته انار (۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در فاصله زمانی ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس ازاین بازه زمانی تعداد سلولهای هرپلیت با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Merk آلمان) در زیر میکروسکوپ نوری (Hm-Lux آلمان) در قیاس با نمونه کنترل تیمار نشده مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت و جهت بررسی اثر کشندگی پانیسیک اسید روغن هسته انار برروی سلول های K562 از آزمون (MTT– Methyl Thiazol Tetrazzolium) استفاده شد. نمک تترازولیوم به واسطه فعالیت میتوکندریایی سلول های زنده به بلورهای فورمازان که جذب متفاوتی دارند احیاء می شوند. به این منظور 10^5 سلول در هر پلیت کشت داده شد، پس از ۲۴ ساعت غلظت های متفاوتی از پانیسیک اسید و حلال متانول اضافه شد پس از اتمام مراحل کشت، سلول ها را سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰–۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده تا سلولهای معلق در کف پلیت رسوب کنند. سپس سلولها را با PBS سرد شستشو داده و بر روی آنها محیط کشت حاوی MTT می افزائیم به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتورCO2 در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. در طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

آنزیمهای چرخه تنفسی میتوکندری است احیا می شود (۶۳). احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستالهای آبی رنگ فورمازان می شود که در زیر میکروسکوپ براحتی قابل تشخیص هستند. سپس نمونه ها با استفاده از دستگاه الایزا (stafix-2100 آمریکا) خوانده شد.

تجزیه وتحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ آنالیز یک طرفه ANOVA وآزمون T.Student و سطح معنی داری کمتراز $p<0/05$ ازنظرآماری معنی دار درنظر گرفته شده است.

سنجش سمیت سلولی بر اساس روش SDH assay:

به منظور بررسی سنجش سمیت پانیسیک اسید روغن هسته انار بر سلول های$K562$ تعداد 10^6 سلول در۱۲ پلیت قرار داده شد. بعداز ۲۴ ساعت به پلیت اول به عنوان بلانک چیزی اضافه نشد و به پلیت دوم متانول به عنوان حلال و به پلیت سوم به عنوان کنترل مثبت مقدار ۲۰ میکرولیتر داروی استاندارد دوکسوروبیسین با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و به سایر پلیت ها به ترتیب با غلظت های متفاوت پانیسیک اسید روغن هسته انار (۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در فاصله زمانی ۲۴ ساعت تیمار شدند. این روند در ۳روز (۲۴،۴۸و۷۲ساعت) به منظور بررسی بازه زمانی تکرار شد. پس ازاین بازه زمانی تعداد سلولهای هرپلیت با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Merk آلمان) در زیر میکروسکوپ نوری (Hm-Lux آلمان) در قیاس با نمونه کنترل تیمار نشده مورد ارزیابی وشمارش قرار گرفت. در این روش از کیت تشخیص سوکسینات دهیدروزناز استفاده شد.که یک روش رنگ سنجی دقیق می باشد. سوکسینات دهیدروزناز (SDH EC1.3.5.1) آنزیم میتوکندریایی است. این انزیم اکسیداسیون سوکسینات به فومارات را کاتالیز می کند و الکترون ها را از FADH به CoQ را در یوکاریوت ها و باکتری ها حمل می کند. وظیفه اصلی را در نگهداری متابولیسم انرژی سلولی از طریق سیکل کربس (تری کربوکسیلیک اسید) و زنجیره انتقال الکترون را دارد (۶۴). فعالیت SDH توسط تولید محصولی با جذب در ۶۰۰nm متناسب با حضور فعال آنزیمی مشخص شده است. یک واحد از SDH مقادیری از آنزیم است که ۱µmol از DCIP در دقیقه در pH=۷/۲ و در دمای $25\ C^{o}$ (پروتکل روشSDH assay از شرکت سیگما). اندازگیری میزان جذب Ae (Ab) در طول موج 600 nm در فواصل زمانی ۵ دقیقه در طول مدت زمان ۱۰-۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس اندازگیری میزان جذب e (Ab) در طول موج 600 nm هر ۵ دقیقه تا زمانیکه میزان جذب نمونه‌ها بیشتر از میزان جذب نمونه استاندارد با غلظت 40 nanmol/well در این مرحله میزان جذب به دست آمده تقریبا نزدیک به میزان خطی از نمونه استاندارد شد. این میزان برابر با T final می‌باشد. اندازه گیری نمونه‌های استاندارد در انتهای مرحله قرائت شد.وبا استفاده از فرمول ذیل منحنی استاندارد رسم شد.

$$\Delta Ab = Ab\ (T\ Final) - Ab\ (T\ initial)$$

باد استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنزیم اندازه گیری می‌شود.

$$SDH\ activity = Sa/Reaction\ time \times Sv$$

S_a = میزان DCIP (nmole) تولید شده برای هر نمونه چاهک بین اولین و آخرین قرائت میزان جذب

$$Reaction\ Time = Tfinal - Tinitial\ (minutes)$$

Sv = حجم اضافه شده برای هر نمونه

سنجش سمیت سلولی بر اساس روش LDH assay:

به منظور بررسی سنجش سمیت پانیسیک اسید روغن هسته انار بر سلول های$K562$ تعداد 10^6 سلول در۱۲ پلیت قرار داده شد بعداز ۲۴ ساعت به پلیت اول به عنوان بلانک چیزی اضافه نشد و به پلیت دوم متانول به عنوان حلال و به پلیت سوم به عنوان کنترل مثبت مقدار ۲۰ میکرولیتر داروی استاندارد دوکسوروبیسین با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و به سایر پلیت ها به ترتیب باغلظت های متفاوت پانیسیک اسیدروغن هسته انار (۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در فاصله زمانی ۲۴ ساعت تیمار شدند. این روند در سه روز (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به منظور بررسی تاثیر بازه زمانی تکرار گردید. پس ازاین بازه زمانی تعداد سلولهای هرپلیت با استفاده از لام هموسایتومترورنگ تریپان بلو (Merk آلمان) در زیر میکروسکوپ نوری (Hm-Lux آلمان) در قیاس با نمونه کنترل تیمار نشده مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت. در این روش از کیت تشخیص لاکتات دهیدروژناز استفاده گردید. این روش یک روش رنگ سنجی دقیق و بسیار ساده برای تعیین سیتوتوکسیتی با سیتولیز به وسیله سنجش فعالیت لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول های آسیب دیده می باشد. لاکتات دهیدوژناز LDH، آنزیم اکسیدوردوکتازی است که در آخرین مرحله گلیکولیز باعث تبدیل پیرووات به لاکتات می شود. در سلول ها این انزیم پس از آسیب بافتی ویا همولیز گلبول قرمز ترشح می شود. از آنجایی که LDH آنزیم نسبتا پایدار است. این آنزیم در شرایط پاتولوژیک خاص مانند سرطان افزایش می یابد. کمیت سنجی LDH موارد استفاده گسترده ای دارد. LDH موجب احیا NAD به NADH می شود که به طور اختصاصی توسط روش کلوریمتریک در ۴۵۰nm اندازه‌گیری می‌شود.

میزان فعالیت آنزیم LDH،nanomol/min/ml بیان شده و میزانی از آنزیم است که تبدیل پیرووات به لاکتات را به منظور تولید 1.0 µmol از NADH به مدت ۱ دقیقه در دمای$37\ ^{\circ}C$ (پروتکل روش LDH assay از شرکت سیگما).

اندازه گیری به مدت مدت ۱۰ الی ۱۵دقیقه به فواصل ۵ دقیقه تکرار تا این که میزان قرائت شده بیشتر از میزان قرائت شده برای بالاترین غلظت نمونه استاندارد 12.5 nanomol/well شد. برای تعیین میزان فعالیت آنزیم از فرمول زیر استفاده شد. با استفاده از اعداد به دست آمده و غلظت‌های متفاوت محلول استاندارد LDH منحنی استاندارد را رسم شد.

$$Ab\ 450\ final\ Blank - Ab\ final\ St$$

میزان نهایی قرائت شده هر کدام از نمونه‌ها از میزان اولیه قرائت شده از همان نمونه کم می شود.

$$\Delta Ab\ 450 = Ab\ 450\ final\ Sample - Ab\ Initial\ Sample$$

با مقایسه اعداد به دست آمده با منحنی استاندارد، برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم بین زمان اولیه و انتهایی، از فرمول زیر به منظور تعیین فعالیت آنزیم میتوان استفاده شد.

$$LDH\ Activity = B \times Sample\ dilutyion\ factor / Reaction\ time \times V$$

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

تجزیه وتحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ آنالیز یک طرفه ANOVA وآزمون t.student وسطح معنی‌داری کمتراز ۰/۰۰۱ یا p< ۰/۰۵ ازنظرآماری معنی‌دار درنظر گرفته شده است.

یافته‌ها:

نتایج تست MTT:

بر اساس آزمونMTT نتایج جذب نوری (OD) بر حسب غلظت های ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پانیسیک اسید روغن هسته انار در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار پس از۲۴و ۴۸و ۷۲ ساعت به دست آمد. لازم به توضیح است بازه انتخابی غلظت پانیسیک اسید بر مبنای اثرات ضد سرطانی آن در مقالات مختلف وهم چنین مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است نمودار ها بیانگر درصد بقای سلول های K562 بعداز تیمار با پانیسیک اسید با غلظت های متفاوت (۸ تا۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد. همان طور که در این شکل مشاهده میکنید بیش ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر در۲۴ ساعت (جدول ۱) وکم ترین درصد بقای سلول K562 در غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی لیتروبعداز ۷۲ ساعت به دست آمده است. نموداریک نشان می‌دهد ۵۰= LC50 میکروگرم بر میلی لیتر (غلظتی از پانیسیک اسید روغن هسته انار که در آن ۵۰ درصد سلول ها در محیط کشت از بین می روند) می‌باشد.

نتایج نشان میدهد که بعد از ۷۲ ساعت میزان بقای سلولهای K562 در غلظت های مختلف هر چقدر غلظت پانیسیک اسید بیشتر شده است، پایین‌تر آمده تا در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ سلول زنده‌ای مشاهده نشد و بهترین خاصیت سمیت سلولی غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بروز کرده است.

نتایج نشان می‌دهد که طی سه روز، درصد بقای سلولهای K562 در غلظت های مختلف هر چقدر غلظت پانیسیک اسید بیشتر شده است، پایین تر آمده است. همچنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده ها p≤۰/۰۵ را نشان می دهد که سطح معنا داری در نظر گرفته می شود. به عبارت دیگر پانیسیک اسید باعث اثر سیتوتوکسیتی یا ضدسرطانی در سلول‌های K562 می شود که کم ترین درصد بقای سلول K562 در زمان ۷۲ ساعت و با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ثبت رسیده است.

نتایج SDH:

بر اساس آزمونSDH نتایج جذب نوری (OD) بر حسب غلظت های ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پانیسیک اسید روغن هسته انار در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار به دست آمد. همانگونه که در نمودار ۵ ملاحظه می‌شود، پانیسیک اسید در غلضت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر تاثیری بر فعالیت متابولیکی سلول ندارد ولی با افزایش غلظت، منجر به کاهش فعالیت سلولی و کاهش میزان فعالیت سلولی شده به صورتیکه در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر میزان سلول‌های سالم و از بین رفته برابر با۵۰٪ می‌باشد که معادل با LC50 می‌باشد ولی از آنجایی که این غلظت باعث از بین رفتن نیمی از سلول‌ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می‌باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین میانگین Media LC50 امکان پذیر بوده و معادل با ۵۰٪ می باشد.

نتایج نشان می دهد که طی سه روز، درصد بقای سلولهای K562 در غلظت های مختلف هر چقدر غلظت پانیسیک اسید بیشتر شده است، پایین تر آمده است. همچنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده ها p≤0.05 را نشان می دهد که سطح معنا داری در نظر گرفته می شود. به عبارت دیگر پانیسیک اسید باعث اثر سیتوتوکسیتی یا ضد سرطانی در سلول های K562 می شود که البته بهترین خاصیت سمیت سلولی در غلطت پایین یعنی ۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت بقای سلولی شروع به کم شدن کرده است که کم ترین درصد بقای سلول K562 در زمان ۷۲ ساعت به ثبت رسیده است.

نتایج LDH:

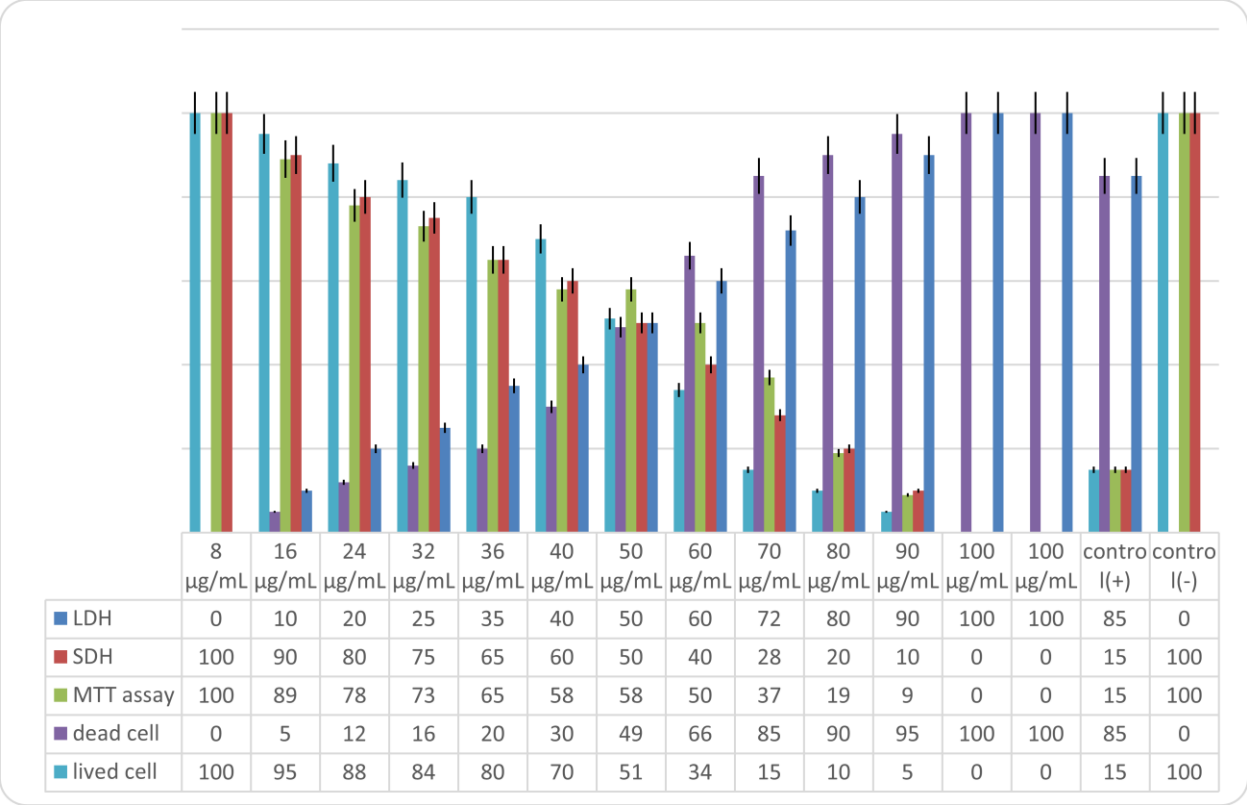
بر اساس آزمون LDH نتایج جذب نوری (OD) بر حسب غلظت های ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۳۸، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پانیسیک اسید در مقایسه با میزان بقای سلولی به صورت رسم نمودار به دست آمد. همانگونه که در نمودار ۶ ملاحظه می‌شود، پانیسیک اسید در غلضت ۸ میکروگرم بر میلی لیتر تاثیری بر فعالیت متابولیکی سلول ندارد ولی با افزایش غلظت، منجر به کاهش فعالیت سلولی و کاهش میزان فعالیت سلولی شده به صورتیکه در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر میزان سلول‌های سالم و از بین رفته برابر با۵۰٪ می‌باشد که معادل با LC50 است ولی از آنجاییکه این غلظت باعث از بین رفتن نیمی‌از سلول‌ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می‌باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین میانگین Media LC50 امکان پذیر بوده و معادل با ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر پانیسیک اسید می باشد.

نتایج نشان می دهد که طی سه روز، درصد بقای سلولهای K562 در غلظت های مختلف هر چقدر غلظت پانیسیک اسید بیشتر شده است، پایین تر آمده است.هم چنین آنالیز آماری مربوط به نتایج همه داده ها p≤۰/۰۵ را نشان می دهد که سطح معنا داری در نظر گرفته می شود.به عبارت دیگرپانیسیک اسید باعث اثر سیتوتوکسیتی یا ضد سرطانی در سلول های K562 می شود که البته بهترین خاصیت سمیت سلولی در غلطت پایین یعنی ۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت بقای سلولی شروع به کم شدن کرده است که کم ترین درصد بقای سلول K562 در زمان ۷۲ ساعت به ثبت رسیده است.

بررسی آماری:

جدول شماره ۲ بیانگر درصد بقای سلول های K562 در حضور گروه‌های کنترل می باشد که برای بررسی دقیق تر اثر سیتوتوکسیتی از داروی استاندارد دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



	8 µg/mL	16 µg/mL	24 µg/mL	32 µg/mL	36 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL	60 µg/mL	70 µg/mL	80 µg/mL	90 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	control (+)	control (-)
LDH	0	10	20	25	35	40	50	60	72	80	90	100	100	85	0
SDH	100	90	80	75	65	60	50	40	28	20	10	0	0	15	100
MTT assay	100	89	78	73	65	58	58	50	37	19	9	0	0	15	100
dead cell	0	5	12	16	20	30	49	66	85	90	95	100	100	85	0
lived cell	100	95	88	84	80	70	51	34	15	10	5	0	0	15	100

نمودار ۱ نمودار LC50 همان طور که در نمودار فوق مشاهده می شود هر چقدر غلظت پانیسیک اسید برروی سلول ها بیشتر شده میزان زنده مانی سول ها کم شده است ودر غلظت ۵۰ماکروگرم بر میلی لیتر ۵۰ درصد سلول ها از بین رفته اند. برای کنترل مثبت از داروی دوکسوروبیسین وبرای کنترل منفی سلول تنها بکار رفته است.

جدول ۱. درصد بقاء سلول های K562 بر اساس تست تریپان بلو و رقت های سریالی تهیه شداز پانیسیک اسید روغن هسته انار

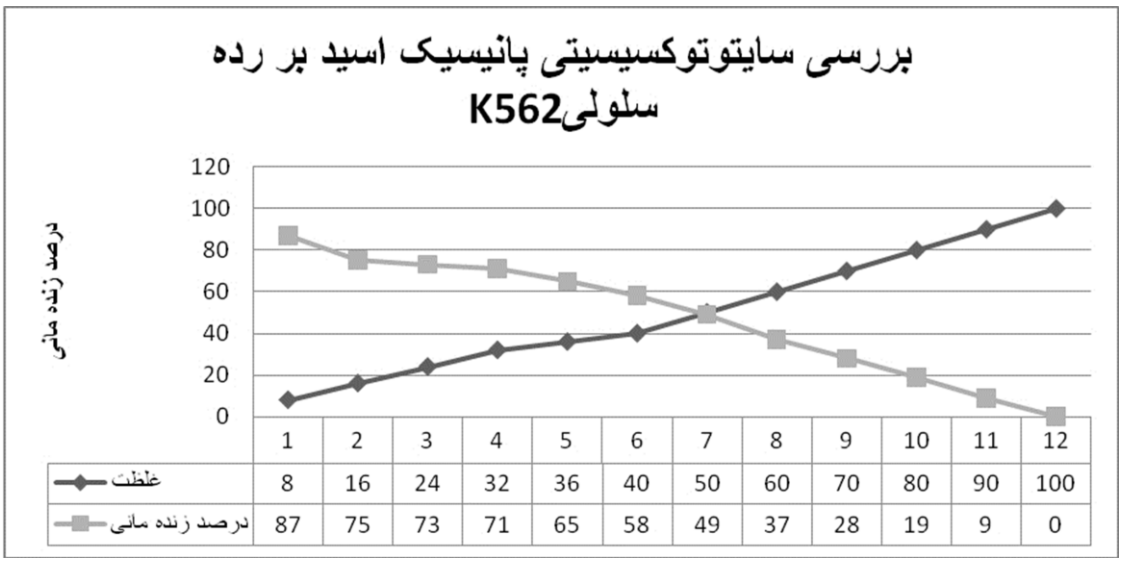
غلظت ها براساس ماکروگرم	۸	۱۶	۲۴	۳۲	۳۶	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰
تعداد سلول زنده	۲۸۴	۱۷۲	۱۵۷	۱۴۵	۱۲۷	۸۲	۴۸	۳۴	۱۵	۱۰	۲	۰
درصد سلول زنده	٪۹۵	٪۸۹	٪۸۶	٪۸۴	٪۸۰	٪۷۰	٪۵۱	٪۳۴	٪۱۵	٪۱۰	٪۲	٪۰
تعداد سلول مرده	۱۶	۲۰	۲۵	۲۷	۳۰	۳۵	۴۵	۶۴	۸۲	۹۵	۱۰۲	۱۵۰
درصد سلول مرده	٪۵	٪۱۱	٪۱۴	٪۱۶	٪۲۰	٪۳۰	٪۴۹	٪۶۶	٪۸۵	٪۹۰	٪۹۸	٪۱۰۰

جدول ۲. درصد بقاء سلول های K526 در گروه کنترل منفی (بدون اسانس)، کنترل منفی ۲ (با متانول به عنوان حلال روغن) و در حضور کنترل مثبت (داروی دوکسوروبیسین)

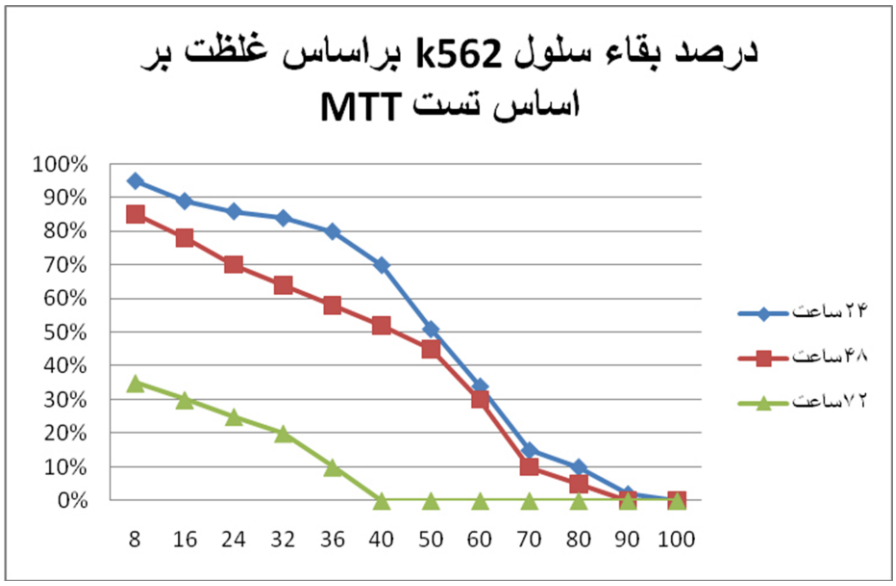
کنترل منفی سلول تنها (بدون اسانس)	کنترل منفی (متانول به عنوان حلال)	کنترل مثبت (دوکسوروبیسین)	نوع تست
۱۰۰±۴/۵	۹۷/۱±۱/۹	۱۵/۳±۱/۵	تریپان بلو
۱۰۰±۴/۶	۹۷/۷±۲/۱	۱۵/۱±۱/۲	MTT
۱۰۰±۴/۶	۹۷/۴±۱/۶	۱۵/۴±۱/۶	SDH
۱۰۰±۴/۶	۹۷/۲±۱/۸	۱۵/۳±۱/۷	LDH

بر اساس نتایج هر چهار سنجش انجام شده؛ غلظتی از پانیسیک اسید که بتواند رشد سلول ها را تا ۵۰ درصد مهار کند ۵۰=LC50 میکروگرم بر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



نمودار ۲و ۳ اثرات پانیسیک اسید روغن هسته انار بر درصد بقای سلول های K562. سلول ها با غلظت های متفاوت از پانیسیک اسید تیمار و میزان بقای سلول ها با استفاده از شمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت نتایج به صورت نمودارفوق نمایش داده شده است.



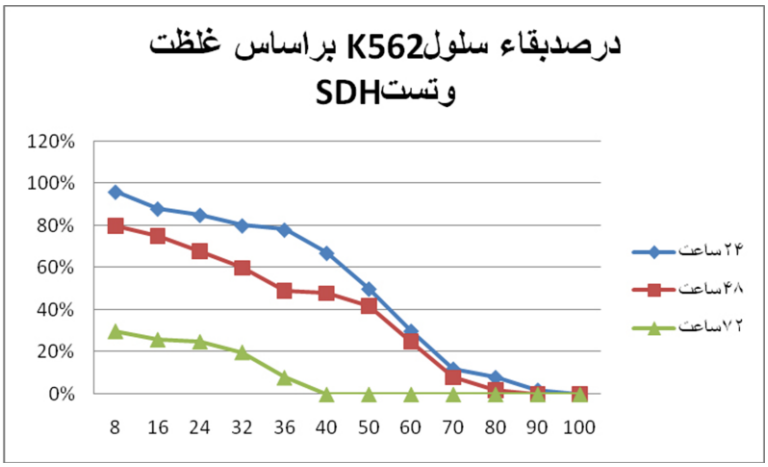
نمودار ۴ اثرات پانیسیک اسید روغن هسته انار بر درصد بقای سلول های K562 سلول ها با غلظت های متفاوت از پانیسیک اسید با فاصله های زمانی ۴۸،۲۴و۷۲ ساعت تیمار و میزان بقای با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است.

میلی لیتر و میزان میانگین آن LC50=۳۲ Media میکرگرم بر میلی لیتر می باشد .به طور کلی بر اساس تست های انجام شده و مقایسه داده های بدست آمده از میزان سنجش قابلیت سلولهای سرطانی K562 تحت تیمار با پانیسیک اسید، تفاوت معنی دار (p≤۰/۰۵) نشان داده شد.

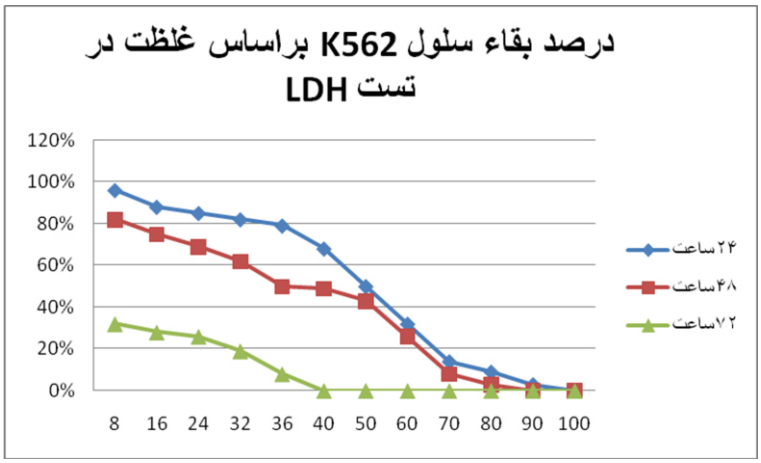
نتایج مورفولوژیکی:

بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول های تیمار شده با پانیسیک اسید، نشان دهنده تغییرات ریخت شناسی مشخصی در سلول های تیمار شده نسبت به کنترل بود. درشکل یک تکه تکه شدن کروماتین و برهم خوردگی شکل کروی سلول ها در LC50=۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر یعنی دقیقا در غلظتی که بیش ترین اثر سایتوتوکسیکی دیده می شود، نمایش داده شده است (شکل۱). به طوری که سلول ها در این غلظت به طور دسته-

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



نمودار ۵ اثرات پانیسیک اسید بر درصد بقای سلول های k562 سلول ها با غلظت های متفاوت از پانیسیک اسید با فاصله های زمانی ۴۸،۲۴و۷۲ساعت تیمار و میزان بقای با استفاده از تست SDH مورد ارزیابی قرار گرفت.نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است.



نمودار ۶ اثرات پانیسیک اسید بر درصد بقای سلول های K562. سلول ها با غلظت های متفاوت از پانیسیک اسید با فاصله های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار و میزان بقای با استفاده از تست LDH مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است.

جمعی یا منفرد، تحلیل رفتگی و واکویله شده وکاهش سیتوپلاسم وپیگمانته شدن و به خصوص توقف تکثیر میتوز را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهند. این نتایج بیان گر اثر سمیت سلولی پانیسیک اسید بر رده سلولی K562 می باشد.

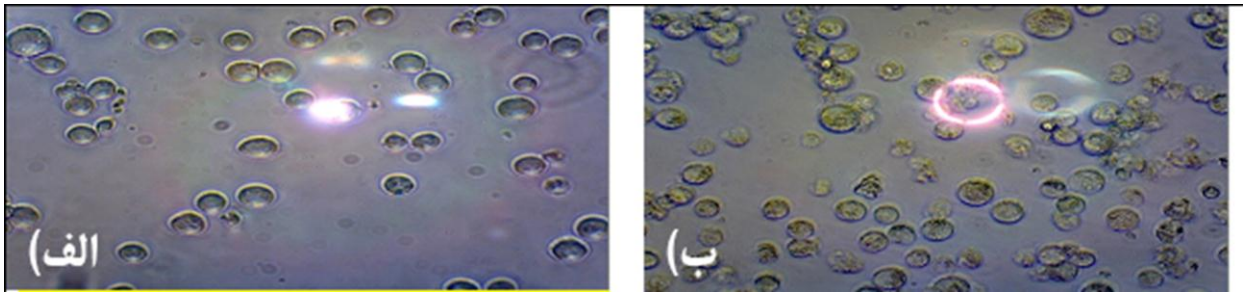
بحث:

امروزه روش‌های مختلفی در درمان سرطان خون به کار گرفته می شود؛ از جمله این روش‌ها شیمی درمانی است. ولی داروهایی که برای درمان لوسمی بکار می روند درصد زیادی از سلولهای سالم خون را نیز به همراه سلول های سرطانی ازبین می برند (۳۰) و سبب ایجاد مقاومت دارویی و عدم تاثیر و در نهایت سبب مرگ بیمار می گردند (۳۲-۳۴). در این راستا سنجش میزان بقاء و تکثیر سلولی در تعیین میزان اثر داروهای ضد سرطانی بر روی سلولها، امری مهم به نظر می رسد که در این خصوص روش های متعددی استاندارد شده است (۲۷). امروزه بیشتر از روش های رنگ سنجی به خاطر استفاده راحت ودقت کافی در رسیدن به نتیجه استفاده می شود (۲۸). روش رنگ سنجی احیای نمک متیل تیازول تترا زولیوم (Methyl Thiazol Tehrazzolium-MTT) بسیار سریع، حساس و قابل اندازه گیری برای همه رده های سلولی است و رنگ هایی مثل MTT و نوترال رد کاربرد بیشتری دارند (۲۹). اساس ارزیابی این روش، قدرت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی است (۳۰). یکی از فاکتورهای موثر در MTT تعداد سلولهای زنده است که برای اطمینان در صد سلولهای زنده (Viability) را با تریپان بلو اندازه گیری میکنیم. باید توجه نمود که اساس بررسی سمیت سلولی دارو ها یا گیاهان دارویی بر روی سلولها، مشاهده تغییرات مورفولوژیکی آن ها می باشد (۳۱). در این مطالعه به بررسی اثر سمیت سلولی ناشی از پانیسیک اسید روغن هسته انار با غلظت های متفاوت بر رده سلولی سرطان خون میلیوئیدی مزمن انسان (k562) پرداخته شد و اثر سایتوتوکسیسیتی وابسته به دوز را نشان داد. به طوری که

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

جدول ۳. LRHDSIمقایسه میانگین درصد توانائی زیستی سلول های سرطانی k562 تیمار شده با پانیسیک اسید وسنجش میزان بقاء بر اساس چهار تست تریپان بلو،MTT، SDH و LDH اندازه گیری شده است.مقادیر به صورت means±SD بوده و تفاوت میانگین در سطح p≤۰/۰۵ معنا دار در نظر گرفته شد.

غلظت (ماکروگرم بر میلی لیتر)LC50	درصد بقاء سلول K562	نوع تست
۵۰	۵۰/۵۸±۳/۰۷	سنجش تریپان بلو
۵۰	۵۱/۶۸±۲/۴۸	سنجش MTT
۵۰	۵۰/۸۱±۲/۶	سنجش SDH
۵۰	۵۰/۶۱±۰/۳۸	سنجش LDH



شکل ۱ تغییرات ظاهری ایجاد شده در سلول های تیمار شده با پانیسیک اسید روغن هسته انار. سلول با پانیسیک اسید غلظت ۵۰ ماکروگرم بر میلی لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت وتغییرات ظاهری آن با میکروسکوپ HM-LUX مورد مطالعه قرار گرفت. به تکه تکه شدن کروماتین و برهم خوردگی شکل سلول ها در قسمت ب توجه نمایید (بزرگ نمایی X ۴۰۰)؛ الف – سلول‌های ابتدایی محیط کشت بدون پانیسیک اسید(PA)، ب – همان سلول ها پس از ۷۲ ساعت که تحت تاثیر PA قرار گرفته اند.

در دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰ درصد سلولها را در محیط کشت از بین برده است.

برای بررسی دقیق تر مکانیسم ها و اثرات بیولوژیکی مواد موثره گیاهی و همچنین اثر آنها بر فاکتورهای مختلف داخل سلولی، استفاده از شرایط کنترل شده کشت سلولی بسیار کمک کننده می باشد. این امکانات شناسایی هر چه بهتر فرایندها و فعل و انفعالات داخل سلولی طی درمان سرطان با گیاهان دارویی را ممکن می سازد که می تواند به ارتقای روش های درمانی منجر گردد (۳۵، ۳۶). انار میوه ای غنی از آنتی اکسیدان است (۶۷–۶۹). از آنجا که تولید انواع اکسیژن واکنش دهنده بیشتر از ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن موجب استرس اکسیداتیو و ایجاد اثرات پاتولوژیکی نظیر سرطان می شوند، یکی از راه های موثر حذف گونه‌های اکسیژن واکنش دهنده ترکیبات آنتی اکسیدانی می باشد. این خواص آنتی اکسیدانی در مقالات مختلف، به عوامل متفاوتی در میوه انار از جمله، محتوای بالای فلاونوئیدها، ساپونین وترکیبات پلی فنولیک موجود در انار وهمچنین به ترکیبات موجود در روغن هسته انار از جمله محتوای پانیسیک اسید آن (یک نوع اسید چرب کونژوگه شده) نسبت داده شده است (۲۱، ۶۵ و ۶۶). بررسی ها نشان داده است که اسید لینولنیک کونژوگه شده Conjugated linolnic Acid (CLnA)اثرسیتوتوکسیک بیشتری نسبت به اسید لینولئیک کونژوگه شده Conjugated linolnic Acid (CLA) درسلول های تومور دارد (۱۸). پانیسیک اسید و سایر ترکیبات موجود در انار (اسید الاژیک، اسید کافئیک و لوتئولین) اثر مهاری در برابر تهاجم های آزمایشگاهی در سرطان سلول های پروستات انسانی (PC-3) و یا تکثیر سلول های DU 145 دارند (۱۷، ۲۱، ۱۹). جالب توجه است، ترکیبی از فراکسیون های فعال انار و روغن هسته انار، اثرات هم افزایی در برابر تهاجم و تکثیر سلول های سرطان پروستات دارد (۱۹). پانیسیک اسید آپوپتوز داخلی ناشی ازیک مسیر درونی وابسته به کاسپاز را مهار میکند، بنابراین به طور موثر مهار رشد سلول های LNCaP وابسته به آندروژن، که ممکن است توسط هر دو مکانیزم ضد آندروژن و طرفدار آپوپتوز باشد را برعهده دارد (۲۰). در مطالعه ای فعالیت سیتوتوکسیک و القاء آپوپتوز ۷ اسیدچرب غذایی ۱۸ کربنه تری انوئیک (از جمله پانیسیک اسید) در برابر سرطان پروستات انسانی مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد قدرت سیتوتوکسیک مربوط به پانیسیک اسید بیشتر از بقیه است (۲۰). اثر سیتوتوکسیک ترکیبات قطبی در عصاره متانولی و آبی ۸۰٪ روغن هسته انار بر روی سلول های سرطان پستان (MCF-7) و (MDA-MB-231) با اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی این ترکیبات اثرات هم افزایی دارند (۵۶). پانیسیک اسید گسترش T24 سرطان مثانه را به صورت وابسته به دوز و آپوپتوز ناشی از آن را مهارمی کند (۲۴). اسید لینولنیک کونزوگه شده، تومور کولورکتال را از طریق مدولاسیون آپوپتوز و کاهش Bcl-2 پروتئین-ها در سلول های سرطانی انسان، از طریق افزایش بیان PPARγ و تنظیم بیان ژن p53 مهار میکند (۲۵). در سرطان پوست، روغن هسته انار اثرات مثبتی در مدل موش CD1 در برابر ۷و ۱۲ دی متیل بنزن تراسن و ۱۳ استات تترا دکا انا فروبول، که سرطان پوست را تحریک می کنند دارد (۲۶).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

همچنین پانیسیک اسید در مهار تکثیر سلولی سرطان پستان نیز دیده شده است (۲۳). لوتئولین و اسید الاژیک (موجود در آب انار) و پانیسیک اسید، اثر مهاری بر گسترش سرطان پروستات، رگ زایی و متاستاز دارند و تکثیر سلولی را در هر دو سلول حساس به استروژن وغیر حساس به استروژن در سرطان پستان مهار می کنند (۲۲). در زمینه اثرات ضد التهابی روغن هسته انار نیز بررسی های متعددی کاهش کبدی NF-kb و مهار بیان سیتوکین های پیش التهابی مانند (TNF-α, IL-12, IL-23, IL-8, IL-6) وکاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی وترمیم ناشی از SOD، کاتالازوگلوتایتون پراکسیدازواکسید نیتریک را نشان می‌دهد (۴۵-۴۷). درزمینه بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیبات متعددی از انار مورد استفاده قرارگرفته است از جمله اثر مفید الاژیک اسید آب انار (که قدرتی دوبرابر چای سبز وشراب قرمز دارد) و روغن هسته انار بررشد سلول های سرطان پروستات، سرطان کولون، ریه، پستان، پوست، لوکمی و کبد می باشد (۱۷، ۳۷، ۱۰، ۲۰، ۲۲، ۳۸، ۵۷، ۵۸، ۶۰). هم چنین اثرات آنتی اکسیدانی وضد اکسیداسیون پانیسیک اسید مورد بررسی قرار گرفته است (۴۸، ۴۹).

به هر حال یکی از بهترین و کم عارضه ترین کاندیداهای سنتز داروهای ضد سرطان، گیاهان دارویی دارای اثر سمی و به ویژه سمیت سلولی هستند، که سمیت آنها بر روی کشت سلولی قابل اندازه گیری باشد. از سوی دیگر ترکیبات با منشا گیاهی به علت فراوانی بیشتر، دسترسی آسان تر و تداخلات دارویی کمتر، امروزه کانون توجه داروسازان به منظور سنتز داروهای جدید در درمان بیماری هایی مثل سرطان ها می باشند (۲۰). با نظر اجمالی به جدول، نمودار و شکل ارائه شده در نتایج می توان ادعا کرد که پانیسیک اسید روغن هسته انار دارای اثر سمیت سلولی بر روی سلول-های سرطانی خون میلوئید K562 بوده است. در مقالات مختلفی اثرات مفید انار بر کاهش غلظت لپتین و افزایش آدیپونکتین و افزایش انسولین و همچنین به عنوان یک آگونیست طبیعی PPARϒ در بافت چربی بررسی شده است (۳۹-۴۴). ولی باتوجه به نیاز به مطالعه بیشتر برروی پانیسیک اسید که قسمت عمده روغن هسته انار را تشکیل میدهد این مطالعه شکل گرفته و ادامه بررسی های مولکولی برروی اثر ضد سرطانی پانیسیک اسید و بررسی برروی بیان متالوپروتئینازها توصیه میشود.

نتیجه‌گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پانیسیک اسید دارای اثرات سمیت برروی سلول های سرطانی k562 می باشد، با توجه به این که نشانه های اثر پانیسیک اسید بر توقف تقسیم میتوز در این تحقیق مشاهده شد پانیسیک اسید می تواند به عنوان یک ماده مکمل شیمی درمانی در دوز بدست آمده جهت درمان وحتی پیشگری از این نوع سرطان رایج و سایر سلول های سرطانی به صورت invivo جهت پژوهش های بعدی میتواند بسیار با ارزش 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 شهر ری به خاطر فراهم آوردن محیط آزمایشگاه برای انجام این تحقیق اعلام می دارد.

منابع:

1. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods: Elsevier Health Sciences; 2011; 616-617.
2. Melo JV, Goldman J. Myeloproliferative disorder. 1thed. Berlin: Springer 2007; 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. 6thed.UK: Wiley Blackwell Publishing 2011; 483-501.
5. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. ASH Education Program Book 2009; 2009(1): 453-460.
6. .Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. J Biochem Mol Biol 2005; 38: 391-398.
7. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C. Discovery of 4-aryl 4Hchromenesas a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based highthroughputscreening assay. 4 structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. J Med Chem 2007; 50: 2858-2864.
8. Ali K, Che-Man YB, Roberts TH. 2014. Physico-chemical properties and fatty acid profile of seed oils from pomegranate (Punica granatum L.) Extracted by cold pressing. Eur J Lipid Sc Tech 224: 547–553.
9. Arao K, Yotsumoto H, Seo HY, Nagao K, Yanagita T. 2004a. The 0cis, 22trans, 23cis isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B200 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG7 cells. Biosc Biotech Biochem 42: 7463–7465.
10. Lansky EP, Newman RA. 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharm 109: 177–206.
11. Lansky EP, Newman RA. 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharm 109: 177–206.
12. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang W. 2005a. Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. Investig New Drugs 23: 121–122.
13. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. 2005b. possible synergistic prostate cancer suppression by

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

anatomically discrete pomegranate fractions. Investig New Drugs 23: 11–20.
14. Spilmont M, Leotoing L, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, Miot-Noirault E, Pilet P, Rios L, Wittrant Y, Coxam V. 2013. Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. J Nut Biochem 76: 2260–2262.
15. Calder PC. 2013. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. Curr Opin Clin Nut Met Care 24: 675–733.
16. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, Imamura J, Tachibana H, Yamada K. 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. Nutrition 77:56–60.
17. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. 2004. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. Cancer Sci 05: 622–624.
18. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Rajabian A, Dolati K, Hoseini A, Paseban M, Farzadnia M. 2014. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. Renal Failure 34: 2522–2524.
19. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang W. 7005a. Pomegranate (Punica granatum) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. Investig New Drugs 73: 272–277.
20. Gasmi J, Sanderson T. 2010. Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of PA in LNCaP human prostate cancer cells. J Agri Food Chem 52(73): 27260–27264.
21. Wang L, Green MM. 2014. Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer. Intl J Mol Sci 25(0):26060–44
22. Grossmann ME, Mizuno NK, Schuster T, Cleary MP. 2010. Punicic acid is an omega-5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. Int J Oncol 34: 672–674.
23. Tran HN, Bae SY, Song BH, Lee BH, Bae YS, Kim YH, Lansky EP, Newman RA. 7020. Pomegranate (Punica granatum) seed linolenic acid isomers: concentration-dependent modulation of estrogen receptor activity. Endocrine Res 35: 2–24.
24. Wang W, Wang H, Wang J, Ye S, Xiao S. 2009. Induction of apoptosis by punicic acid in bladder carcinoma T76 cells. J Dalian Polytechnic Univ 37: 27–35.
25. Tanaka T, Hosokawa M, Yasui Y, Ishigamori R, Miyashita K. 2011. Cancer chemopreventive ability of conjugated linolenic acids. Int J Mol Sci 27: 2500–2605.
26. Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C. 2003. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD2 mice. J Med Food 4: 242–252.
27. 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: 127-137.[Persian]
28. Rapport L, Robinson C. Cell Titer 96 and titer 96 AG, non-radioactive cell proliferation assay. Promega Notes Magazine. 1993; 44: 46-47.
29. 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 Unit Med Sci 2012; 21(88): 1-11.
30. 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.
31. Shahrokhabadi Kh, Tavakkolafshari J, Rakhshandeh H, Brook A. Study of cytotoxicity effect of total saffrons extract on HepG2 cell ine. Tehran Azad Univ Med Sci J 2009; 19: 153-9.
32. Wyllie A, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: Thesignificance of Apoptosis. Int Rev Exp Pathol 1999; 32: 323-354.
33. Rowan S, Fisher DE. Mechanism of apoptotic celldeath. Leukemia 1997; 11: 457-465.
34. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly ImatinibMesylate-resistant Bcr/Abl+ human leukemia cells in association with signaltransducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. Mol Pharmacol 2007; 72: 788-795.
35. 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): 234-242.
36. 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: 234-342.
37. Igarashi M, Miyazawa T. 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. Cancer Let 262: 223–230.
38. Wang L, Green MM. 2014. Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer. Intl J Mol Sci 25(0): 26044–26060.
39. Arao K, Wang Y, Inoue N, Hirata J, Cha J, Nagao K, Yanagita T. 2004b. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 0cis, 22trans, and 23cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. Lipids Health Dis 3: 30–76.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

40. Bassaganya-Riera J. 2011. Method of using punicic acid to enhance immune response and prevent metabolic disorders. US patent No. 70220750732 A2.
41. Bassaganya-Riera J, Guri AJ, Hontecillas R. 2011a. Treatment of obesity-related complications with novel classes of naturally occurring PPAR agonists. J Obesity (http://dx.doi.org/2082255570225202206).
42. Bassaganya-Riera J, DiGuardo M, Climent M, Vives C, Carbo A, Jouni ZE, EInerhand AW, O'Shea M, Hontecillas R. Activation of PPAR gamma and delta by dietary PA ameliorates intestinal inflammation in mice. Br J Nut 2004: 222–224.
43. Nishimura K, Tsumagari H, Morioka A, Yamauchi Y, Miyashita K, Lu S, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K. 2007. Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. Appl Biochem Biotech 2011; 730–750.
44. Vroegrijk IOCM, Diepen JAV, Berg SVD, Westbroek I, Keizer H, Gambelli L, et al. Pomegranate seed oil, a rich source of PA, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. Food Chem Toxicol 2011; 60:2674–30.
45. Colombo E, Sangiovanni E, Dell' Agli M. 2013. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. Evidence-Based Complementary Alt Med, Art. ID 762265, p 22 (http://dx.doi.org/2082255570235762265).
46. Saha SS, Ghosh M. 2012. Comparative study of antioxidant activity of alpha-eleostearic acid and PA against oxidative stress generated by sodium arsenite. Food Chem Toxicol; 62: 7552–7554.
47. Anusree SS, Priyanka A, Nisha VM, Das AA, Raghu KG. 2015. An in vitro study reveals the nutraceutical potential of punicic acid relevant to diabetes via enhanced GLUT6 expression and adiponectin secretion. Food Funct; 5(20): 7402–7500.
48. Mizrahi M, Friedman-Levi Y, Larush L, Frid K, Binyamin O, Dori D, Fainstein N, Ovadia H, Ben-Hur T, Magdassi S, Gabizon R. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: the case of genetic CJD. Nanomedicine 2014; 10: 1353–1363.
49. Mukherjee C, Bhattacharyya DK. Oxidative stability of some seed oils containing conjugated octadecatrienoic fatty acids isomers. J Lipid Sci Tech 2006; 32: 225–227.
50. 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): 145-151.
51. Paudel KR, Panth N. Phytochemical profile and biological activity of Nelumbo nucifera. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2015; 789124.
52. Lee HH, Paudel KR, Kim DW. 2015. Terminalia chebula fructus inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and production of inflammatory mediators in RAW 264.7. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2015; 502182.
53. Chrubasik Hausmann S, Vlachojannis C, Zimmermann B. Pomegranate juice and prostate cancer: importance of the characterisation of the active principle. Phytother Res 2014; 28: 1676–1678.
54. Chen SR, Qiu HC, Hu Y, Wang Y, Wang YT. Herbal medicine offered as an initiative therapeutic option for the management of hepatocellular carcinoma. Phytother Res 2016; 30: 863–877.
55. Arumuggam N, Bhowmick NA, Rupasinghe HP. A review: phytochemicals targeting JAK/STAT signaling and IDO expression in cancer. Phytother Res 2015; 29: 805–817.
56. Vini R, Juberiya AM, Sreeja S. Evidence of pomegranate methanolic extract in antagonizing the endogenous SERM, 27 hydroxycholesterol. IUBMB Life 2016; 68: 116–121.
57. Bhatia D, Thoppil RJ, Mandal A, Samtani KA, Darvesh AS, Bishayee A. Pomegranate bioactive constituents suppress cell proliferation and induce apoptosis in an experimental model of hepatocellular carcinoma: role of Wnt/β-catenin signaling pathway. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2013: 371813.
58. Dahlawi H, Jordan-Mahy N, Clench M, McDougall GJ, Maitre CL. are responsible for the proapoptotic properties of pomegranate juice on leukemia cell lines. Food Sci Nutr 2013; 1: 196–208.
59. Nunez-Sanchez MA, Davalos A, Gonzalez-Sarrias A, et al. MicroRNAs expression in normal and malignant colon tissues as biomarkers of colorectal cancer and in response to pomegranate extracts consumption: critical issues to discern between modulatory effects and potential artefacts. Mol Nutr Food Res 2015; 59: 1973–1986.
60. Shirode AB, Kovvuru P, Chittur SV, Henning SM, Heber D, Reliene R. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. Mol Carcinog 2014; 53: 458–470.
61. Vicinanza R, Zhang Y, Henning SM, Heber D. 2013. Pomegranate juice metabolites, ellagic acid and urolithin a, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2013; 247504.
62. Zhou B, Yi H, Tan J, Wu Y, Liu G, Qiu Z. Anti-proliferative effects of polyphenols from pomegranate rind (Punica granatum L.) on EJ bladder cancer cells via regulation of p53/miR-34a axis. Phytother Res 215; 29: 415–422.
63. Goodwin C, Holt S, Downes S, Marshall N. Microculture tetrazolium assays: a comparison between

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

two new tetrazolium salts, XTT and MTS. Journal of immunological methods1995; 179(1): 95-103.
64. Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. Arthritis Rheum 2006; 54: 2152–2163.
65. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. Advance in Medicine 2016; 1–12.
66. Vlachojannis C, Zimmermann BF, Chrubasik-Hausmann S. 2015. Efficacy and safety of pomegranate medicinal products for cancer. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2015; 258598.
67. Sadrolhosseini AR, Noor ASM, Husin MS, Sairi NA. Green synthesis of gold nanoparticles in pomegranate seed oil stabilized using laser ablation. J Inorg Organometallic Polymers Mate 2014; 24: 1009–1013.
68. Mizrahi M, Friedman-Levi Y, Larush L, Frid K, Binyamin O, Dori D, Fainstein N, Ovadia H, Ben-Hur T, Magdassi S, Gabizon R. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: the case of genetic CJD. Nanomedicine 2014; 10: 1353–1363.
Yuan GF, Sinclair AJ, Xu C, Li D. Incorporation and metabolism of punicic acid in healthy young humans. Mol Nut Food Res 2009; 53: 1336–1342.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

Larodan Fine Chemicals

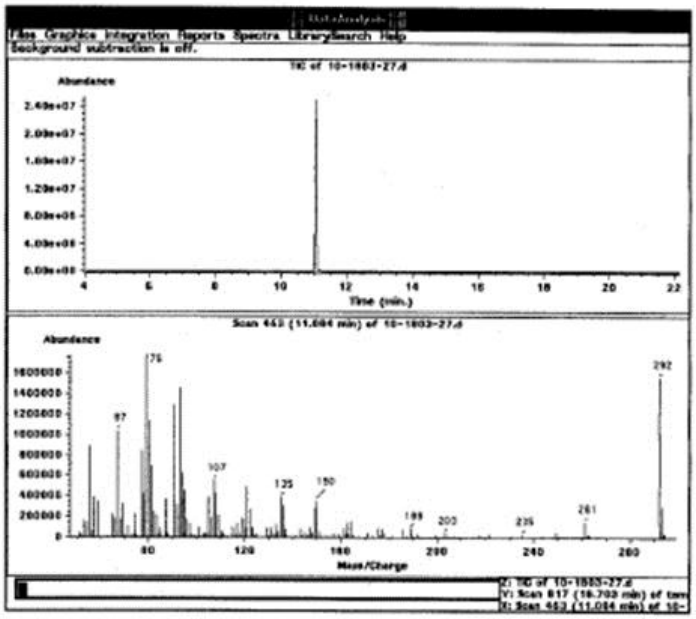
LipidService

9(Z),11(E),13(Z)-Octadecatrienoic acid (Punicic acid)

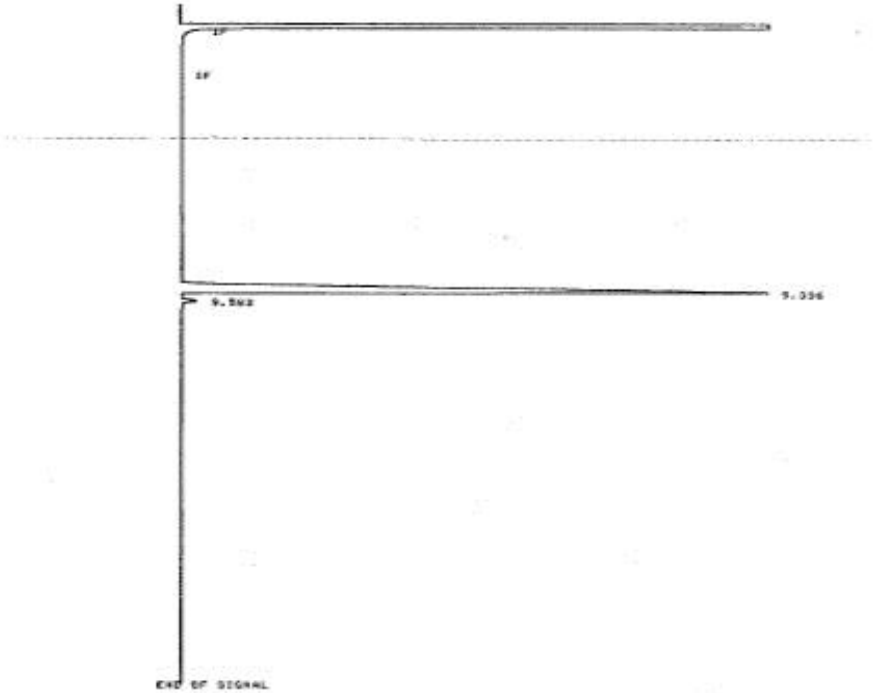
Amount: >25 mg. Crystalline solid
Package: Plastic tube purged and closed under argon
Precautions: Should be stored at -25°C or below. Protect from light.
Cat. no.: 10-1803-27
Lot No.: LS-088

Identity
The identity of the material is based on its mode of preparation and on the mass spectrum (attached) recorded on the methyl ester derivative.

Purity
>98%. The chemical purity was determined by GC-MS analysis of the methyl ester derivative using a capillary column of 5% phenylmethylsiloxane (12 m, 0.33 μm film thickness, carrier gas: helium). The temperature was raised from 120°C to 260°C at a rate of 10°C/min (GC-MS analysis attached). Analysis was also performed by GLC using FID detection and a methylsilicone capillary column (25 m, 0.33 μm film thickness, carrier gas: helium) at 200 °C (attached).



[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



Closing signal file RISIGNAL .SNA

RUN# 6 JAN 1, 1901 19:04:37

SIGNAL FILE: RISIGNAL.SNA

HP3000, Ultra-1, 20m, 19ms)

AREAS:

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
9.336	276634	BP	.141	98.4317
9.582	4313	PB	.986	1.5683

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]