مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره چهارم، پیاپی شانزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۳۳-۲۷)

بررسی خاصیت سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه شیرین بیان (*Glycyrihiza glabra* L.) بر رده سلولی DU-145

سارا فرهادبختیاریان[۱]، کهین شاهانی‌پور[۲*]، رامش منجمی[۳]
۱. کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٦/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۳/۱)

چکیده
سرطان پروستات دومین سرطان شایع در مردان پس از سرطان پوست محسوب می‌گردد. تا کنون گیاهان دارویی متعددی شناسایی شده‌اند که دارای ویژگی‌های ضد سرطانی می‌باشند. گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrihiza glabra* L. متعلق به خانواده Fabaceae، دارای گیاهان علفی چندساله با سه گونه در ایران است. عصاره ریشه آن در سراسر دنیا کاربرد وسیعی در پزشکی، صنایع غذایی، دخانیات و صنایع دیگر دارد. در این پژوهش خاصیت سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدروالکلی ریشه شیرین بیان بر سرطان پروستات انسانی (DU145) با روش رنگ‌سنجی MTT مورد مطالعه قرار گرفت. ریشه شیرین بیان از طریق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه گردید. سپس عصاره‌های آبی و هیدروالکلی از این گیاه تهیه شد. رده سلولی DU-145 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم گاوی در انکوباتور با ۵٪ CO_2 کشت داده شد و تحت غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و هیدروالکلی طی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. از روش MTT برای محاسبه درصد بقای سلول‌ها در حضور و فقدان عصاره‌ها استفاده شد و جذب نوری توسط دستگاه الایزا با طول موج ۵٤۰ نانومتر خوانده شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS بررسی گردیدند (N=۱۲، P-value=۰/۰۵*). نتایج نشان‌دهنده کاهش درصد بقای سلول‌ها بود که با استفاده از روش MTT محاسبه گردید. نتایج حاصل از این مطالعه بیان می‌کند که احتمالاً عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه شیرین بیان تا حدودی دارای اثر سیتوتوکسیک می‌باشند. همچنین در عصاره آبی این گیاه با غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ به دلیل وجود ترکیبات ترپنی کاهش اثرات سیتوتوکسیک دیده شد.

واژه‌های کلیدی: سیتوتوکسیک، گیاه شیرین بیان، رده سلولی.

Evaluation of cytotoxic properties of Aqueous and alcoholic extracts of liquorice plant (*Glycyrihiza glabra* L.) on DU-145 cell line

Sara Farhadbakhtiarian[1], Kahin Shahanipoor[2*], Ramesh Monajemi[3]
1. Graduate Student, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
(Received: Aug. 31, 2015 - Accepted: May 21, 2016)

Abstract
Prostate cancer is the second most common cancer in men after skin cancer. Throughout the years, medicinal plants, in some cases is the only treatment were considered. *Glycyrihiza glabra* L. liquorice plant with the scientific name '*Glycyrihiza glabra* L.' which belongs to the family Fabaceae, there are three species of perennial herbaceous plants in Iran. Root extract is widely used in medicine, food industry, Tobacco and other industries throughout the world. In this study, the cytotoxic effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of licorice root on human prostate cancer (DU145) with the MTT assay was studied. Licorice root through Agriculture and Natural Resources Research Center of Isfahan was prepared. Next the aqueous and hydroalcoholic (ethanol) extracts of the plant was prepared. The cell category of DU-145 in the Cultivation enviroment RPMI-1640 Containing 10% bovine serum in incubator were cultured with 5% CO_2 and in different concentrations of the aqueous and Hydroalcoholic (ethanol) during 24, 48, 72 hours was incubated. The method of MTT for calculating the survival rate of the cells were incubated in the presence and the Lack extracts were used and Light absorption at 540 nm was read by ELISA. Data were evaluated using SPSS software (N=12, *=P-value < 0.05). The results show a decrease in the survival rate of the cells was determined by MTT assay. The results of this study, it states that aqueous extract and hydroalcoholic extracts of licorice plant may have some cytotoxic effects. Because of terpene compounds in licorice.

Keywords: Cytotoxic, Licorice plant, Cell's Line.

* نویسنده مسئول: E-mail: shahanipur_k@yahoo.com

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع بشری است و بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، مسئول حدود ۱۳ درصد از کل مرگ و میرها در سراسر جهان محسوب می‌شود. سرطان پروستات شایع‌ترین نوع بدخیمی در مردان است، و دومین رتبه را در میان علت‌های مرگ وابسته به سرطان دارد. سرطان پروستات یک بیماری چند عاملی است که عوامل ژنتیکی و محیطی در آن نقش دارند (Kaighn, 1979). این نوع سرطان با الگوهای رشد هتروژن مشخص می‌شود و محدوده‌ای است که شامل تومورهایی با رشد آهسته تا آسیب‌های متاستاتیک با رشد بسیار زیاد است (Charrier, 1999). چندین مطالعه، تجمع خانوادگی از سرطان پروستات را نشان داده‌اند و دلیل اصلی برای این تجمع به ارث بردن ژن‌های درگیر است. در ایران، بیماری در ۴۰ تا ۵۰ درصد از مبتلایان به سرطان پروستات در مراحل ابتدایی تشخیص داده می‌شود، اما صرف هزینه‌های زیاد برای پرتودرمانی، دارو درمانی و جراحی بافت مهاجم مشکلات زیادی را برای بیماران به‌وجود می‌آورد، لذا جایگزین کردن روش‌ها و ترکیبات جدید کم هزینه با اثرات جانبی کمتر، می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. طی سالیان متمادی گیاهان دارویی، اساس و در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شدند (Lampronti *et al*., 2005). تاکنون گیاهان دارویی متعددی شناسایی شده‌اند که دارای ویژگی‌های درمانی متنوعی می‌باشند. گیاهان دارویی می‌توانند در حفظ سلامت بدن فرد نقش مهمی داشته باشند و از آن در مقابل انواع بیماری‌ها از جمله سرطان بدون هیچ عارضه سمی محافظت نمایند (Madhuri & Pandey, 2009). گیاه شیرین بیان (*Glycyrihiza glabra* L.) از شاخه اسپرماتوفیت، زیر شاخه نهاندانگان، رده دو لپی‌ها، راسته رزال در تیره پروانه‌آسا قرار دارد (Hayashi *et al*., 2005). شیرین بیان حاوی ۳۰ گونه بومی در نواحی معتدله گرم یا نیمه‌گرمسیری حوزه مدیترانه می‌باشد، که مهمترین آن‌ها گلوبرا می‌باشد که بومی مناطق مدیترانه‌ای، روسیه مرکزی، شبه جزیره آناتولی و ایران می‌باشد (Chunyan *et al*., 2009). در میان انواع متنوع گیاه شیرین بیان تعدادی از آن‌ها از نظر کاربرد صنعتی مورد توجه می‌باشند. شیرین بیان در صنعت برای خواص آروماتیکی و شیرین کنندگی‌اش استفاده می‌شود (Fuenmayor & Montero, 1997). آنالیزهای شیمیایی نشان داده است که تنوع وسیعی از ترکیبات زیستی فعال مانند گلیسریزین، پلی‌ساکارید و فلاونوئید در شیرین بیان وجود دارد (Frankel, 1999). در این پژوهش اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدروالکلی ریشه شیرین بیان بر روی رده سلولی پروستات DU145 با استفاده از روش MTT بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های این گیاه از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه و مورد تایید هرباریوم آن مرکز قرار گرفت، و در تاریکی در مجاورت هوا به طور کامل در زیر سایه خشک گردید و سپس آسیاب شد. عصاره‌گیری با حلال‌های اتانول و آب انجام گرفت. عصاره‌گیری در این پژوهش به روش خیساندن انجام گرفت (Fenwick *et al*., 1990). رده سلولی DU-145 به صورت فلاسک از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین و آنتی بیوتیک کشت داده شدند و در انکوباتور CO_2دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک بار انجام گردید. اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های تهیه شده بر روی سلول‌های سرطان پروستات انسانی با روش رنگ‌سنجی با استفاده از 3-(4-5dimethyl thiazoly1)-2,5 diphenyl tetraxolium bromide در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. این

روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌توان پس از حل کردن در DMSO با دستگاه الایزا ریدر سنجش نمود (Lee *et al*., 2012). به طور خلاصه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ($۵×۱۰^{۴}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌ها اضافه شد. دوکسوروبیسین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و به عنوان کنترل منفی از محیط کشت فاقد عصاره استفاده گردید. میکروپلیت‌های حاوی عصاره و سلول در بازه زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط انکوبه شده با MTT شد و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به آرامی پی‌پت گردید. جذب نوری در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر سنجیده شد. اثر غلظت هر عصاره در سه بازه زمانی ارزیابی شد. درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور شد (Meshkini *et al*., 2007). درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظتی خاص از دارو قرار گرفته‌اند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده، به جذب کنترل منفی ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیب مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد به عنوان IC50 در نظر گرفته شد (Miao *et al*., 2011).

تحلیل آماری

برای انجام آنالیز آماری اطلاعات گروه‌های آزمایشی مختلف از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون یک طرفه ANOVA برای به دست آوردن واریانس داده‌ها جهت تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلافات استفاده گردید. سطح معنی‌دار بودن اختلافات $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

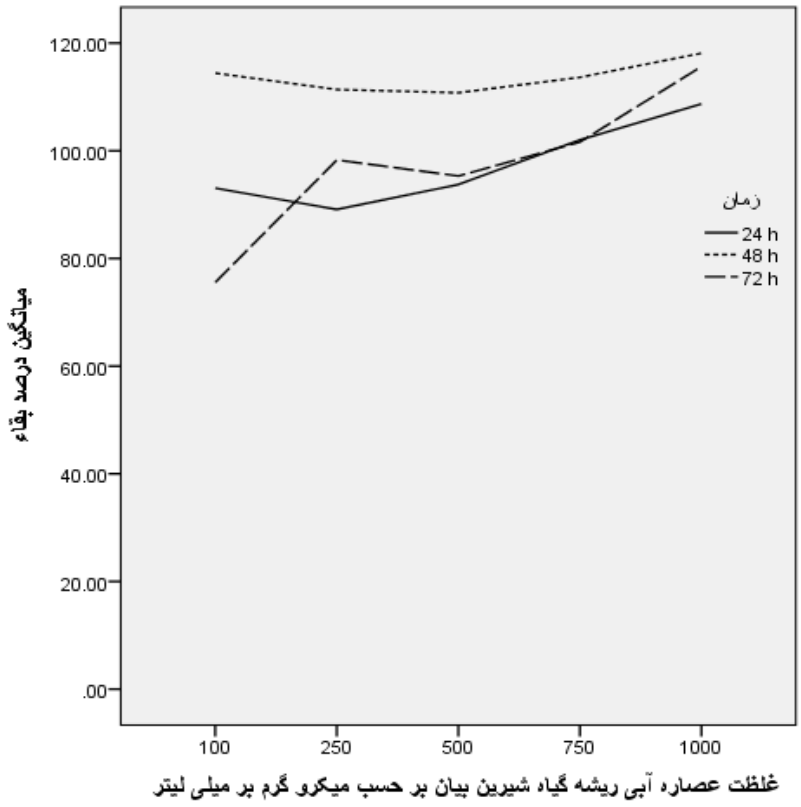
در این آزمایش میزان مهار رشد رده سلولی DU-145 توسط عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه شیرین بیان مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد در نمونه‌های شاهد منفی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و میزان رشد سلول‌ها در مجاورت ۵ غلظت از عصاره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه برای هر غلظت عصاره، سه آزمایش مجزا در طول سه روز متوالی و برای هر روز، چهار بار تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که باعث حداقل مهار رشدی معادل ۵۰ درصد گردیدند به عنوان نمونه‌های سیتوتوکسیک در نظر گرفته شدند.

نمودارهای ۱ و ۲ نشان‌دهنده درصد بقای سلول‌ها می‌باشد که با استفاده از روش MTT محاسبه می‌کنیم.

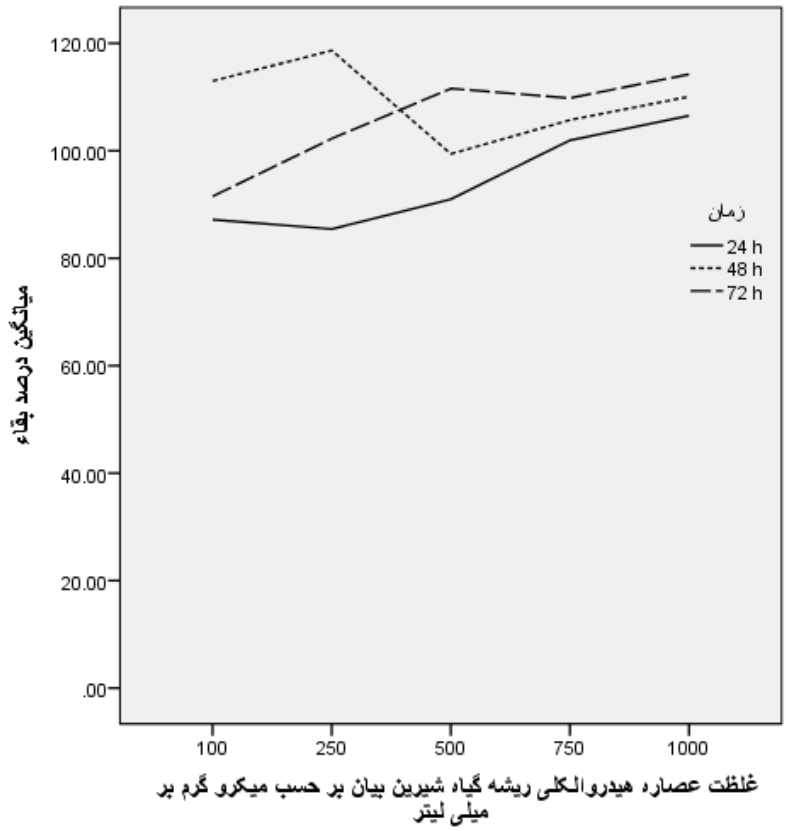
جذب توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقاء گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان غیر جلدی مردان در کشورهای صنعتی می‌باشد. فراوانی آن به‌طور قابل توجهی در میان کشورهای جهان تفاوت دارد و کشورهای ایالات متحده، کانادا، سودان، استرالیا و فرانسه بیشترین میزان مبتلایان را به خود اختصاص داده‌اند. برخلاف تلاش زیادی که جهت درمان این سرطان شده است، هنوز دارویی مؤثر که بتواند باعث درمان قطعی آن شود یافت نشده است (Kris *et al*., 2000).



نمودار ۱. محاسبه درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT



نمودار ۲. محاسبه درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT

دودمان‌های سلولی متنوعی از سرطان پروستات جدا شده که می‌تواند در اولین گام‌های توسعه دودمان سرطان پروستات مورد استفاده قرار بگیرد. از جمله این دودمان‌های سلولی می‌توان به دودمان DU-145، که در سال ۱۹۷۹ توسط استون جداسازی شده است، اشاره کرد. از خصوصیات مهم این دودمان این است که می‌توان آن را به دو صورت کشت تک لایه و اسفروئید کشت داد. سرعت رشد سرطان پروستات و متاستاز آن از بیماری به بیمار دیگر متفاوت است. پیشرفت این بیماری وابسته به تغییرات ژنتیکی درون تومور و اندرکنش بین تومور و بخش محیطی است (Chung, 1992). این در حالتی است که بسیاری از مکانیسم‌های خاص مولکولی، به صورت نامعلوم باقی مانده است. هنگامی که توده سرطانی دچار متاستاز می‌شود انتخاب روش درمانی محدود می‌شود. بیان بالای آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز-۱ در تومورهای پروستات گزارش شده است. مشتقات کومارین با داشتن اثر مهاری بر این آنزیم، فعالیت ضد سرطانی دارند. اثرات ضد سرطانی دو ترکیب سنتزی ۸ و ۵- فارنسیل اکسی کومارین بر سلول‌های سرطان پروستات رده DU-145 و رده سلولی نرمال HFF3، با تکنیک MTT بررسی شده و تفاوت IC_{50} حاصل در این دو نوع سلول بیانگر نقش ضد سرطانی این دو ترکیب است. تغییر ساختار شیمیایی این ترکیبات و یا هم‌افزایی آن‌ها ممکن است نقش مؤثرتری در خاصیت ضد سرطانی آن‌ها در بررسی‌های in vivo و in vitro داشته باشد (Chang *et al*., 1992) مطالعه انجام شده توسط Yokota *et al*. (1988) که به صورت In vitro بر روی سلول‌های ملانوم موش و پوست خوکچه هندی انجام شد، نشان‌دهنده این مطلب بود که گالابریدین که از ترکیبات فلاونوئیدی موجود در ریشه شیرین بیان است قادر به پیشگیری و مهار اریتم و جلوگیری از ازدیاد پیگمانتاسیون ناشی از UVB در پوست خوکچه هندی از طریق مهار تولید آنیون‌های سوپراکسید و مهار فعالیت سیکلو اکسیژناز بوده است. در بررسی که توسط Wang *et al*. (1996) انجام شد به این نتیجه رسیدند که عصاره ریشه شیرین بیان قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. در یک بررسی به مطالعه اثر هم‌افزایی دو ترکیب آسکوربات و منادیون و خاصیت سیتوتوکسیکی آن‌ها بر رده سلولی پروستات انسانی DU-145 پرداخته شد. نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی این پژوهش نشان داد آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در بسیاری از اندامک‌های سلولی ایجاد شده است. این گزارش آسیب در هسته سلول (کروماتین و هستک)، میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی را نشان داد و اثرات سیتوتوکسیک آسکوربات و منادیون بر سلول‌های سرطانی پروستات انسانی به اثبات رسید (Gilloteaux *et al*., 2014). در چند دهه اخیر مطالعه گیاهان دارویی به عنوان یک منبع مفید از ترکیبات فعال بیوشیمیایی و فارماکولوژیک افزایش یافته است. بسیاری از گیاهان و ترکیبات آن‌ها در طب سنتی در اکثر نقاط دنیا برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده هستند، بسیاری از این گیاهان در نواحی حاره و جنگل‌های پر باران رشد می‌کنند. این گیاهان پهنای وسیعی از فرآورده‌های طبیعی را تأمین می‌کنند. امروزه گیاهان دارویی نقش حیاتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها، از جمله سرطان دارند. گیاهان نه تنها دیگر در طب سنتی مطرح هستند بلکه آن‌ها توانسته‌اند، یک خط صنعتی از فرآورده‌های طبیعی را نیز به خود اختصاص دهند. در این بین استفاده از ترکیبات دارویی مشتق شده از گیاهان نه تنها قدمت زیادی دارد بلکه به‌دلیل عوارض جانبی بیشمار داروهای شیمیایی از یک سو، و نارسایی‌های متعدد در طب نوین در درمان برخی از بیماری‌ها با گذشت زمان، بار دیگر پرورش و تولید گیاهان دارویی با رشد قابل توجهی روبرو شده است. مشتقات مولکولی به دست آمده از گیاهان نقش مهمی در سلامت انسان، درمان سرطان و منبعی با عوامل درمانی جدید ایفا کرده است (Cragy & Newman, 2003). Wang *et al*. (1996) و Marian (2000) به بررسی اثر ریشه شیرین بیان بر سلول سرطانی با رده سلولی MCF-7 پرداختند و به این نتیجه رسیدند که عصاره

ریشه شیرین بیان قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 بودند. در مطالعه حاضر میزان مهار رشد سلول‌های رده سلولی DU-145 توسط عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه شیرین بیان مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد در نمونه‌های شاهد منفی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و میزان رشد سلول‌ها در مجاورت ۵ غلظت از عصاره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه، این‌گونه بیان می‌کند که احتمالاً عصاره آبی گیاه شیرین بیان در طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت وابستگی زمانی نداشته است. در این بین بیشترین تأثیر را در دوره زمانی ۲۴ ساعته مشاهده کردیم به علت اینکه عصاره حاوی ترکیبات ترپنی بوده و بسیار فرار می‌باشند و با گذشت زمان از میزان آن‌ها کاسته می‌شود. سپس عصاره‌های ۷۲ و ۴۸ اثر مهاری نشان دادند. با توجه به اینکه در غلظت‌های کم تأثیر عصاره ۷۲ ساعته بیشتر بود در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ بررسی تکرار شد و اثر مهاری و کشندگی سلول‌ها بیشتر نشان داده شد. در غلظت‌های بالا سلول‌ها هم پوشانی پیدا کرده و اثرات مواد ضدسرطانی توسط سایر ترکیب‌ها هم‌پوشانی می‌شود و اجازه اثر نمی‌دهد. عصاره هیدرو الکلی نیز مانند عصاره آبی عمل کرده و نتایج مانند عصاره آبی می‌باشد و احتمالاً وابستگی زمانی در هیچ کدام از غلظت‌ها وجود ندارد، که این می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات موجود در عصاره شیرین بیان از جمله ترپن‌ها باشد. مغایرت نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج فوق احتمالاً به این علت می‌باشد که مجموعه ترکیبات در عصاره آبی شیرین بیان به اندازه تأثیرگذاری، وارد نشده است و یا به دلیل استفاده از عصاره تام برخی ترکیبات موجود در عصاره باعث کاهش خاصیت ضدسرطانی ترکیبات دیگر شده است و یا به دلیل انتخاب محدود حلال ترکیبات مؤثره کاملاً جداسازی نشده‌اند از طرف دیگر گلیسیریزین که در آب محلول می‌باشد و درصد بیشتری از ریشه شیرین‌بیان (۱۰–۱۵ درصد) را شامل می‌شود و احتمالاً به میزان زیادتری در عصاره آبی موجود می‌باشد، اثر کمتری بر این رده سلولی دارد و باعث از بین رفتن سریع آن‌ها نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه شیرین بیان تا حدودی دارای اثر سیتوتوکسیک هستند. همچنین در عصاره آبی این گیاه با غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ به‌دلیل وجود ترکیبات ترپنی در عصاره ریشه شیرین بیان دارای اثر مهاری و کشندگی بیشتری در سلول‌ها می‌باشد و در نتیجه باعث کاهش اثرات سیتوتوکسیک می‌شود.

REFERENCES

Charrier, JP.; (1999). Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. Electrophoresis; 20: 1075-81.

Chung, L.; (1992). Human Prostate Cancer Model: Roles of growth Factors and Extracelluar Matriced. Journal of Cellular Biochemistry; 50: 99-105.

Chunyan, H.; Huaqing, L.; Juan, D.; Baoqing, M.; Hong, Q.; Xinru, W.; Shengai, Y.; Zhong, L.; (2009). Estrogenic activities of extracts of Chinese licorice (Glycyrrhiza uralensis) root in MCF-7 breast cancer cells. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; 1-8.

Cragy, GM.; Newman, DJ.; (2003). Plant as Source of Anti-Cancer and Anti-HIV Agants. Gournal of Anals of Applied Biology; 143(2): 127-133.

Fenwick, GR.; Lutomski, J.; Nieman, A.; (1990). Licorice,Glycyrrhiza Glabra. Compositition, Uses and Analysus. Food Chemistry; 38: 119-143.

Frankel, EN.; (1999). Recent advances I lipid oxidation. J Sci Food Agric; 54: 495-511.

Fuenmayor, M.E.P.; Montero, N.J.M.; (1997). In vitro clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.), stem

shoot of cv Mara; 425: 47-52.

Gilloteaux, J.; Jamison, JM.; Neal, D.; Summers, JL.; (2014). Synergistic Antitumor Cytotoxic Actions of Ascorbate and Menadione on Human Prostate (DU145) Cancer Cells In Vitro, Nucleus and Other Injuries Preceding Cell Death by Autoschizis, Ultrastructural Pathology; 38: 116-140.

Hayashi, H.; Hiraoka, N.; Ikeshiro, Y.; (2005). Differential Regulation of Sayasaponin and Betulinic Acid Production by Yeast Extract in Cultured Licorice Cells. Journal of Plants Biotechnology; 22: 241-244.

Kaighn, ME.; (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). Invest. Urol; 17: 16-23.

Kris Etherton, PM.; Hecker, KD.; Bonanome, A.; Coval, SM.; Binkoski, AE.; Hilpert, KE.; Gire, AE.; Etherton, TD.; (2000). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in The Perention of Cardiovascular disease and Cancer. Am JMED; 113: 71-88.

Lampronti, I.; Saab, A.; Gambari, R.; (2005). Medicinal plants from Lebanon effects of essential oils from Pistacia palaestina on proliferation and erythroid differentiation of human leukemic K562 cells. Minerva Biotec; 17: 153-158.

Lee, WC.; Roziahanim, M.; Pillai, S.; Perumal, S.; (2012). Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium guajava* L. Leaves, APCBEE Procedia; 2: 86-91.

Madhuri, S.; Pandey, G.; (2009). Some anticancer medicinal plants of foreign origin, CurrentScience; 96: 779-783.

Meshkini, A.; Yazdanparast, R.; (2007). Induction of Megakaryocytic Differentiation in Chronic Myelogenous Leukemia Cell K562 by 3-Hydrogenkwadaphnin. Journal of Biochemistry and Molecular Biology; 40(6): 944-951.

Miao, S.; Shi, X.; Zhang, H.; Wang, S.; et al. (2011). Proliferation-Attenuating and Apoptosis-Inducing Effects of Tryptanthrin on Human Chronic Myeloid Leukemia K562 Cell Line in Vitro. International Journal of Molecular Sciences; 12: 3831-3845.

Wang, H.; Cao, G.; Prior, RL.; (1996). Total antioxidant capacity of fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 44: 701-705.

Yokota, T.; Nishio, H.; Kubota, Y.; (1998). The inhibitory effect of glabridin from licorice extracton melanogenesis and inflammation. Pigment cell Res; 11: 355-61.