

BALINIO AJERO (*ACORUS CALAMUS*) ŠAKNŲ EKSTRAKTO POVEIKIO VĖŽINIŲ LĄSTELIŲ PROLIFERACIJAI TYRIMAS

Daiva Baltriukienė¹, Karolis Jankevičius², Ieva Paunksnytė²,
Virginija Bukelskienė¹, Rapolas Liužinas²

¹ Vilniaus universiteto Biochemijos institutas,
Mokslininkų g. 12, LT-08662 Vilnius,

² VŠĮ „Grunto valymo technologijos“,
Antakalnio g. 42, LT-10304 Vilnius

Santrauka. *Naujų gamtinių junginių, pasižyminčių antiproliferaciniu veikimu ir turinčių potencialą kuriant vėžio gydymo strategijas, ieškoma nuolat. Atliekami augalų ekstraktų tyrimai, siekiant išsiaiškinti jų galimas terapines savybes. Šiame darbe mes tyrėme galimą priešvėžinį spiritinio balinio ajero (*Acorus calamus*) šaknų ekstrakto veikimą. Gauti duomenys parodė, kad šis ekstraktas gana efektyviai slopina žmogaus vėžinių ląstelių – krūties vėžio (MCF7), plaučių vėžio (A549) bei neuroblastomos (N2A), gyvybingumą ir proliferaciją.*

Reikšminiai žodžiai: *Balinis ajeras, *Acorus calamus*, ekstraktas, ląstelių linija, proliferacija, gyvybingumas.*

IVADAS

Balinis ajeras (*Acorus calamus*) – aje-rinių (*Araceae*) šeimos daugiametis, 50-125 cm aukščio žolinis augalas. Šio augalo šakniastiebis 1,5-3 cm skersmens, žalsvai rusvas, šliaužiantis, nariuotas, šakotas, su gausiomis pridėtinėmis šaknimis ir ryškioomis nukritusių lapų žymėmis, pasižy-mintis stipriu kvapu, kartus. Jo skerspjū-vis baltai rausvas, nežymiai akytas. Lapai išauga iš šakniastiebio viršūnės, bekočiai, ilgi, ryškiai žali, blizgantys, jų pakraš-tys dažnai banguotas. Žiedai susitelkę į cilindrišką, 4,5-12 cm ilgio ir į šoną pa-krypusią burbuolę (Bentley ir Trimen, 1983; Balakumbahan ir kt., 2010). Sėklos Lietuvoje nesubręsta. Žydi birželio-liepos mėnesiais. Dauginasi šakniastiebiais. Pa-plitęs visoje Lietuvoje. Sudaro sąžalynus ežerų, tvenkinių, kūdrių, nesraunių upių

uždumblėjusiuose pakraščiuose, pelkėse ir pelkėtose vietose. Tankūs ir dideli są-žalynai yra Nemuno deltoje, ežeringuose Rytų ir Pietų Lietuvos rajonuose. Apyre-tis, įtrauktas į „Apribotų ir draudžiamų rinkti bei prekiauti laukinių augalų sąra-šą“.

Balinio ajero šakniastiebiuose yra 2-9% eterinio aliejaus, glikozido akorino, alkaloido kalamino, krakmolo, dervų, 29 mg vitamino C, pėdsakai rauginių ir kitokių medžiagų. Eterinio aliejaus su-dėtyje (ji yra nepastovi) yra 1% d-pine-no, 7% d-kamfeno, 8,7% d-kamfaro, 3% borneolio, eugenolio, azarono, kalomo-lo, kalameno, kalakoreno, kariofileno, gvajeno, akorono ir kt. (Patra and Mitra, 1979; Raja ir kt., 2009; Balakumbahan ir kt., 2010). Lapuose yra eterinio aliejaus, rauginių medžiagų, iki 500 mg vitamino C (Gacche ir Dhole, 2006). Ajero eterinis

aliejus tirštas, geltonas, malonaus kvapo, kartaus skonio.

Egzistuoja trijų tipų *A. calamus* kariotipai besiskiriantys eterinių aliejų sudėtimi. Visi trys ajero kariotipai skiriasi β -asaronu kiekiu eteriniame aliejuje, gautame iš šakniastiebių. Diploidinis kariotipui žinomam kaip var. *americanus* (Raf.) Wulff, ($2n = 24$), augančiam Šiaurės Amerikoje bei Sibire būdingi β -asaronu pėdsakai. Tuo tarpu triploidinis kariotipas (var. *calamus*, $3n = 36$), augantis Centrinėje Europoje ir Kašmyre turi 9–13% β -asaronu, o tetraploidinis (var. *angustata* Engl. arba var. *angusta* Bess., $4n = 48$) turi net 70–96% šio junginio (Hanelt, 2001; Dušek ir kt., 2007). Lietuvoje augantys baliniai ajerai turi 15,7–25,5 proc. β -asaronu (Radušienė ir kt., 2007). β -asaronas pasižymi toksiniu ir kancerogeniniu veikimu (Dušek ir kt., 2007).

Iš džiovintų šakniastiebių ruošiami antpilai, ištraukos, milteliai. Ajero šakniastiebių nuoviras žadina apetitą, gerina virškinimą, vartojamas sveikstant po gripo, nuo inkstų akmenligės, esant žaizdoms. Ajero eterinis aliejus bei šakniastiebių milteliai įeina įvairių vaistinių preparatų, vartojamų gydant šlapimo pūslės ir tulžies pūslės akmenliges, skrandžio ir dvylikapirštės žarnos opas, lėtinį gastritą, sudėtį. Be to, šakniastiebiai vartojami aromatinėms vonioms, plaukų slinkimui sulaukyti (naikina pleiskaną, stiprina ir šviesina plaukus), naudojamas parfumerijos pramonėje, likerių bei kitų gėrimų gamyboje (Chowdhury ir kt., 1997; Raina ir kt., 2003; Raja ir kt., 2009; Balakumbahan ir kt., 2010). Tačiau švieži ajero šakniastiebiai yra nuodingi.

Šiame darbe mes tyrėme galimą priešvėžinį spiritinio *A. calamus* šaknų ekstrakto veikimą.

TYRIMŲ METODIKA

Tiriamąjį ekstraktą paruošimas.

Balinio ajero (*A. calamus*) šakniastiebiai apvytinami ir padalijami į dvi dalis. Apvytusius pirmos dalies šakniastiebius nulupame ir džioviname. Antros dalies šakniastiebiai džiovinami nelupti. Džiovinimo temperatūra neaukštesnė nei 35°C. Išdžiūvę šakniastiebiai mechaniškai susmulkinami (sumalami). Susmulkinta masė ekstraguojama 96° etilo alkoholiu 24 val., kambario temperatūroje purtant. Naudotas balinio ajero šakniastiebių ir etilo alkoholio santykis 1:10 (1g susmulkintų balinio ajero šakniastiebių ekstraguota 10 ml 96° etilo alkoholiu).

Naudotos ląstelės bei jų auginimo sąlygos. Pateikiamame darbe buvo vertintas spiritinių balinio ajero šakniastiebių (visų arba tik šerdinės dalies) ekstraktų poveikis krūties vėžio linijos ląstelėms – MCF7, plaučių vėžio linijos ląstelėms – A549 bei neuroblastomos ląstelėms – N2A. Ląstelių linijos gautos iš ATCC (American Type Culture Collection). Ląstelės auginamos Iscov'e modifikuotoje Dulbec'o terpėje (IMDM), praturtintoje 10 proc. fetaliniu veršelio serumu ir antibiotikais – penicilinu (100 VV) ir streptomycinu (100 µg/ml). Ląstelės persėjamos 2–3 kartus per savaitę, jų monosluoksnį disperguojant EDTA-tripsino (4:1) mišiniu. Ląstelės auginamos 37°C temperatūroje, aplinkoje esant 5 proc. CO₂ ir 95 proc. drėgmei.

Balinio ajero šakniastiebių ekstraktų poveikio ląstelių gyvybingumui tyrimas. Dieną prieš poveikį, paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 200 tūkst. ląstelių/ml, ir išsėjama į 96 duobučių polistirolinę plokštelę. Po 24 val., ląstelėms pradėjus daugintis, auginimo

terpė pakeičiama nauja terpe papildyta skirtingomis koncentracijomis tiriamojo ekstrakto. Lygiagrečiai buvo tiriamas ir ekstragento – etilo alkoholio poveikis ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui. Abiem atvejais poveikio trukmė – 24 val.

Ląstelių proliferacinio aktyvumo įvertinimas. Tiriamų ląstelių proliferacija buvo vertinama naudojant MTT reagentą. Metodas paremtas gyvų ląstelių mitochondrijų fermentų gebėjimu tirpų geltonos spalvos MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromidą] redukuoti iki violetinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas susidariusio produkto – formazano, kiekiui, kuris įvertinamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje, gautus netirpius kristalus ištirpinus etanolyje. Proliferacijos įvertinimui naudojamas 0,2 mg/ml MTT tirpalas paruoštas fosfatiname buferyje, kurio 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ pilama ant ląstelių monosluoksnio prieš tai pašalinus auginimo terpę. Inkubuojama 1 val., susidariusios nuosėdos tirpinamos etanoliu, kurio pilama 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai, 570 nm bangos ilgyje.

Statistinė duomenų analizė. Duomenys pateikti kaip vid. \pm SN, apskaičiuotas iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

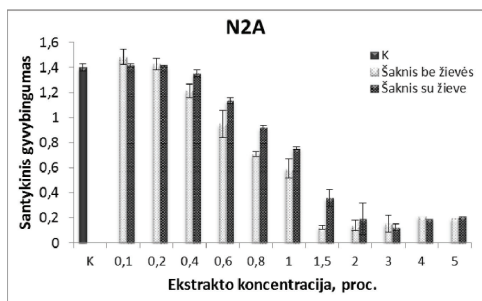
Balinio ajero (*A. calamus*) šaknias tiebių – su žieve ir be žievės, ekstraktų poveikis vėžinių ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui buvo tiriamas, paruošus jų spiritinį ekstraktą. Tyrimams buvo pasirinktos žmogaus vėžinės ląstelių linijos - krūties vėžio MCF7, plaučių vėžio A549

bei neuroblastomos N2A linijų ląstelės. Šių linijų ląstelės buvo 24 valandas veikiamos didėjančiomis *A. calamus* šaknų ekstraktų koncentracijomis. Tyrimams buvo pasirinktas gana platus koncentracijų spektras – nuo 0,1 iki 5 proc. spiritinio ekstrakto buvo pridedama į ląstelių auginimo terpę. Po 24 val. poveikio ląstelės buvo paveikiamos MTT reagentu. Su šiuo reagentu reaguodavo tik metaboliškai aktyvios ląstelės. Tai leido įvertinti balinio ajero ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui bei proliferacijai aktyvumui.

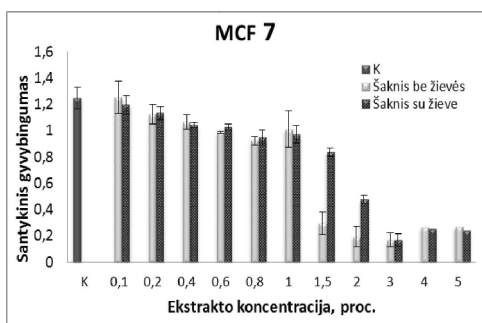
Tyrimai parodė, kad jautriausios *A. calamus* šaknų ekstrakto poveikiui buvo neuroblastomos N2A ląstelės (1 pav.). Jau esant terpėje 0,2-0,6 proc. ekstrakto buvo slopinamas šių ląstelių proliferacinis aktyvumas, o dar labiau padidinus tiriamų ekstraktų koncentraciją ląstelių auginimo terpėje buvo skatinama ląstelių žūtis. Terpėje esant 1 proc. tiriamo ekstrakto, gyvų ląstelių nustatytas apie 30 proc. mažiau.

Kiek kitoks vaizdas registruotas MCF7 bei A549 ląstelių populiacijose (2 ir 3 pav.). Esant 1 proc. tiriamo ekstrakto koncentracijai buvo nustatytas tik ląstelių proliferacijos stabdymas, ląstelės pradėdavo žūti tik esant didesnei nei 1 proc. koncentracijai.

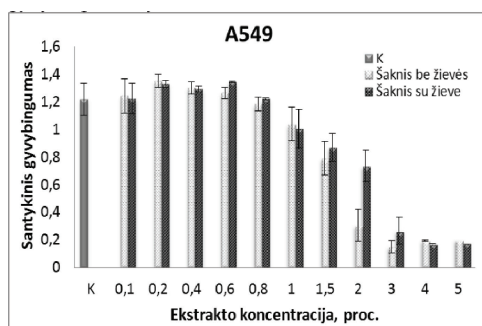
Visas atvejais, kai tiriamas *A. calamus* ekstraktas terpėje sudarė 5 proc., gyvų ląstelių rasta tik apie 20 proc. Taigi, ląstelių gyvybingumas buvo slopinamas iki 80 proc. Pastebėta, kad visais atvejais kiek efektyvesnis veikimas buvo ekstrakto paruošto iš šerdinės balinio ajero šaknies dalies. Kai kuriais atvejais, ekstraktas, paruošto iš šaknies be žievės, buvo net iki 50 proc. veiksmingesnis nei ekstraktas paruoštas iš šaknies su žieve.



1 pav. Balinio ajero ekstrakto, paruošto 96° etanolyje, poveikio N2A ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui tyrimas



2 pav. Balinio ajero ekstrakto, paruošto 96° etanolyje, poveikio MCF-7 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui tyrimas



3 pav. Balinio ajero ekstrakto, paruošto 96° etanolyje, poveikio A549 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui tyrimas

Panašius rezultatus apie ląstelių proliferaciją slopinantį *A. calamus* veikimą

pademonstravo Mehrotra ir kt., 2003 m. Šiuo atveju buvo tiriamas balinio ajero šakniastiebių ekstrakto poveikis pirminių žmogaus periferinio kraujo monobranduolių ląstelių proliferacijai. Be ląstelių dauginimosi slopinančio veikimo buvo parodytas ir imunosupresinis šio ekstrakto veikimas *in vitro* (Mehrotra ir kt., 2003). Tai, kad ajeras gali slopinti vėžinių ląstelių augimą buvo pademonstruota naudojant pelės noeplastines linijų ląsteles, kurios buvo veikiamos iš šakniastiebių ekstraktų išskirtais lektiniais (Bains ir kt., 2005). Literatūros duomenimis, *A. calamus* ekstrakto antiproliferacinis veikimas yra nespecifinis ir nepriklauso nuo ląstelių kilmės (Mehrotra ir kt., 2003).

Nežiūrint to, kad β -asaronas, randamas iš ajero išskiriamame eteriniame aliejuje pasižymi kancerogeniniu veikimu, α -asaronas gali pasižymėti priešvėžiniu veikimu. Tai parodyta tiriant žmogaus karcinomos ląsteles (Hu ir Ji, 1986).

Pastaraisiais metais atsiranda vis daugiau publikacijų aprašančių *A. calamus* ekstrakto bei jo sudedamųjų dalių galimus veikimo mechanizmus (Mehrotra ir kt., 2003; Kim ir kt., 2009; Wu ir kt., 2009). Tačiau tikslūs *A. calamus* veikimo mechanizmai kol kas nėra visiškai aiškūs. Be to, atskirai turi būti ištirti ir ekstrakto veikliųjų medžiagų veikimo mechanizmai.

IŠVADOS

1. Apibendrinus pateiktus rezultatus nustatyta, kad:

Neuroblastomos N2A linijos ląstelės pasižymi didžiausiu jautrumu *A. calamus* šaknų ekstrakto poveikiui;

Ekstraktas, paruoštas iš šerdinės balinio ajero šaknies dalies pasižymi dides-

niu veiksmingumu slopinant vėžinių ląstelių gyvybingumą ir proliferaciją.

LITERATŪRA

- Bains, J.S., Dhuna, V., Singh, J., Kamboj, S.S., Nijjar, K.K., Agrewala, J.N. 2005. Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines. *Int Immunopharmacol.* 5(9), pp. 1470-1478.
- Balakumbahan, R., Rajamani, K., Kumanan, K. 2010. *Acorus calamus*: An overview. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), pp. 2740-2745,
- Bentley, R. and Trimen, H. *Medicinal plants*. Vol-IV; edn-1st (Reprint-1983), pp. 279.
- Chowdhury, A.R., Gupta, R.C., Sharma, M.L.. 1997. Essential oil from rhisomes of *A. calamus* Linn. raised an alkaline soil. *Indian Perfumer*, 41(4), pp. 154–156.
- Dušek, K., Galambosi, B., Hethelyi, E.B., Korany, K., Karlová, K. 2007. Morphological and chemical variations of sweet flag (*Acorus calamus* L.) in the Czech and Finnish gene bank collection. *Hort. Sci. (Prague)*, 34(1), pp. 17–25.
- Gacche, R. N. and Dhole, N. A. 2006. Antioxidant and Possible Anti-Inflammatory Potential of Selected Medicinal Plants Prescribed in the Indian Traditional System of Medicine. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), pp. 389-395.
- Halnet, P. 2001. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. 5th vol., 1st ed. Berlin, Springer.
- Hu, B.Y., Ji, Y.Y. 1986. Research on the anticarcinogenic activation of *Acorus calamus*. Anticarcinogenic activation of alpha-asarone on human carcinoma cells. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 6(8), pp. 480-3, 454.
- Kim, H., Han, T.-H., Lee, S.-G. 2009. Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), pp. 149-156.
- Mehrotraa, S., Mishraa, K.P., Mauryab, R., Srimalc, R.C., Yadava, V.S., Pandeya, R., Singha, V.K. 2003. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. *International Immunopharmacology* 3, pp. 53–61.
- Patra, A. and Mitra, A.K. 1979. Constituents of *Acorus calamus* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 17B, pp. 412–414.
- Radušienė, J., Judžentienė, A., Pečiulytė, D., Janulis, V. 2007. Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 5, pp. 37-44.
- Raina, K.V., Srivastava1, S.K., Syamasunder, K.V. 2003. Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, pp. 18–20.
- Raja, A.E., Vijayalakshmi, M., Devalarao, G. 2009. *Acorus calamus* linn. : Chemistry and Biology. *Research J. Pharm. and Tech.*, 2(2), pp. 256-261.
- Wu, H.S., Zhu, D.F., Zhou, C.X., Feng, C.R., Lou, Y.J., Yang, B., He, Q.J. 2009. Insulin sensitizing activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* L. in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 123(2), pp. 288-292.

ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES OF ETHANOLIC EXTRACT OF ACORUS CALANUS ROOTS

Daiva Baltriukienė,
Karolis Jankevičius,
Ieva Paunksnytė,
Virginija Bukelskienė,
Rapolas Liužinas

Summary

Modulation of antiproliferative properties to alleviate cancer disease has been of interest since long. Plant extracts have been widely investigated for possible therapeutic properties. We have evaluated the anticellular properties of ethanolic extract of Acorus calamus roots. This extract inhibited proliferation of human origin cell lines – a breast cancer cell line (MCF7), adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line (A549) as well as neuroblastoma line cells (N2A).

Keywords: Sweet calamus, Acorus calamus, extract, cell line, proliferation, viability.