

# استخلاص الزيوت الطيارة من نبات النعناع *Mentha Piperita* ودراسة تأثيره السمي في بعض خطوط الخلايا السرطانية

مروه سعيد محمد<sup>1</sup>، مآرب نزيه رشيد<sup>2</sup>، محمد إبراهيم نادر<sup>1</sup>، سارة فيصل حسن<sup>2</sup>

1 قسم التقنية الأحيائية/ جامعة بغداد/ مدينة بغداد/ العراق

2 قسم الهندسة الوراثية/ جامعة بغداد/ مدينة بغداد/ العراق

## الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير بعض المكونات الفعالة الموجودة في أوراق نبات النعناع إذ تم استخلاص الزيت الطيار من أوراق نبات النعناع و درس التأثير السمي لهذا المستخلص الزيتي على نمو الخلايا الورمية المتمثلة بخط خلايا سرطان الرحم Hela و سرطان الحنجرة البشري Hep-2 و سرطان منطقة الحوض RD ومقارنتها مع خط أرومة الخلايا المصفية جنين الجرذ الطبيعية Ref وذلك باستخدام تقنية الزرع النسيجي في الزجاج. وقد أظهرت النتائج فروق معنوية في التأثير السام على خطوط الخلايا السرطانية اعتماداً على التركيز المستخدم ومدة التعريض 48 ساعة في حين لم يظهر للمستخلص تأثير سمي في خط خلايا جنين الجرذ الطبيعية Ref حتى بعد تعريضها لمدة 72 ساعة.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الطيارة، نبات النعناع، التأثير السمي الخلوي.

## المقدمة:

نمو الخلايا الورمية المتمثلة بخط خلايا سرطان الرحم Hela وخط سرطان الحنجرة البشري Hep-2 وخط خلايا سرطان منطقة الحوض RD ومقارنتها مع خط خلايا جنين الجرذ الطبيعية Ref وذلك باستخدام تقنية الزرع النسيجي في الزجاج.

## 2. طرائق العمل:

### 2-1 تحضير مستخلص النعناع الزيتي

استخدمت طريقة التقطير البخاري في استخلاص الزيت الطيار من أوراق نبات النعناع إذ تم استخدام جهاز كلافنجر والموصوف في دستور الأدوية البريطاني للأعشاب (British Herbal pharmacopoeia, 1996) تم الاستخلاص بنسبة 10:1 (وزن/حجم) (أوراق نعناع/ماء) (حسين 1981) إذ يحمل بخار الماء الزيوت الطيارة باتجاه المكثف ثم إلى مصيدة الزيت إذ يتم تجميع الزيت فيها ويكون طافياً فوق سطح الماء يجمع الزيت ويفلتر ويحفظ في قناني نظيفة وجافة ويرعى أن تكون صغيرة الحجم وذات لون داكن وغطاء محكم ويحفظ على 4م° لحين الاستعمال.

### 2-2 خطوط الخلايا السرطانية

استعملت ثلاثة أنواع من خطوط الخلايا السرطانية بالإضافة إلى خط الخلايا الطبيعية (REF).

- 1 - خط خلايا سرطان الرحم (Hela) استعمل هذا الخط عند التمريرة 250.
- 2 - خط خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2) استعمل هذا الخط عند التمريرة 235.

## Corresponding address:

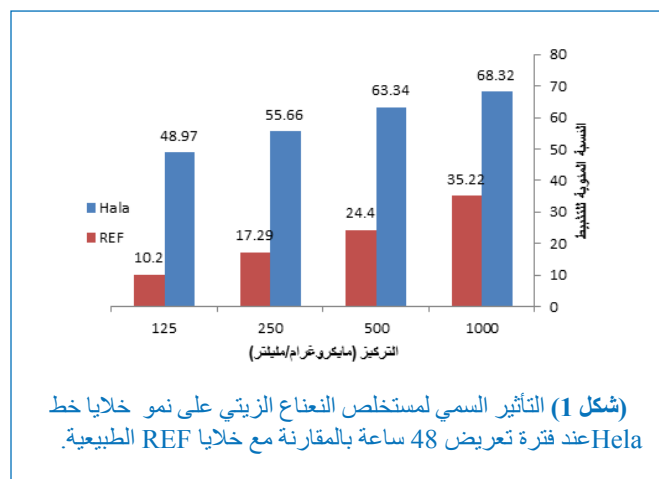
Marib Nazih Rashid

Genetic engineering and bio-technology institute/ Baghdad University

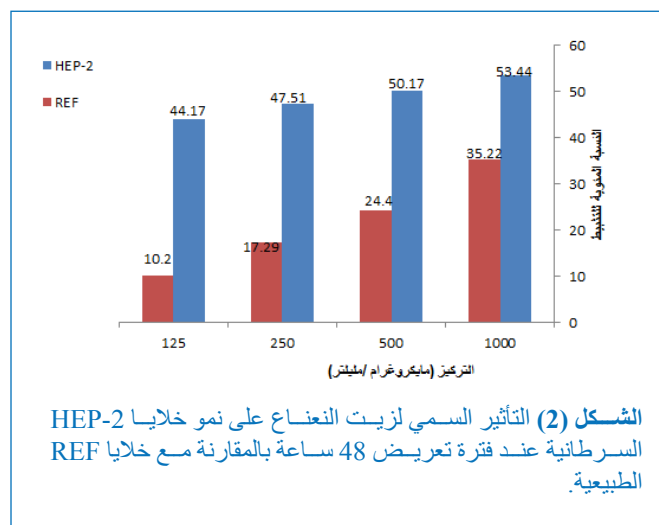
Email: marrabnaz@yahoo.com

استخدمت أوراق النعناع في الطب منذ آلاف السنين وإن البابليين استخدموه لمعالجة سوء الهضم والصينيين للمغص، والرومان لتخفيف الثمالة والتسمم (Evans, 1999; Briggs, 1993). ويعد نبات النعناع من أهم النباتات الطبية والعطرية اقتصادياً ينتج زيت النعناع في العالم والولايات المتحدة بما يقارب 8000 طن /السنة (Yadegacinia, 2006) وزيت النعناع هو الأكثر استخداماً على نطاق الزيوت الطيارة يستخدم النعناع في علاج الربو، والتهاب الجيوب الأنفية، تخفيف السعال والتهاب الحلق، ويستخدم كمطهر ومنكه في غسولات الفم واللثة ومعاجين الأسنان، وبما أنه يؤدي إلى ارتخاء العضلات قد يساعد للتخفيف عن التشنجات المؤلمة ومعالجة نزلات البرد والانفلونزا (Longe, 2005) وقد أظهرت بعض التجارب أن زيت النعناع لديه القدرة على الحد من ألم البطن (المغص) بسبب متلازمة القولون التشنجي (Sparks et al., 1995) ويستخدم في معالجة اضطرابات الجهاز الهضمي منها الإسهال والمغص وفقدان الشهية ومعدل الحموضة وعلاج آلام المعدة (May et al., 1995). وضح Jain وآخرون (2011) تأثير مستخلص أوراق نبات النعناع في أربعة خطوط خلايا سرطانية بشرية وهي خط خلايا سرطان عنق الرحم Hela، خط خلايا سرطان القولون HT-29، خط خلايا سرطان المثانة T-24، خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 وخطين من الخلايا الطبيعية هما Hek-IMr-90 Human embryonic kidney (293 Human embryonic kidney lung fibroblast) (الفعالية المضادة للسرطان تعتمد على وقت التعريض والتركيز إذ أن تنظيم تعبير جينات Bax يتوقف على تركيز المستخلص وكذلك زيادة التعبير في P53 في الخلايا المعاملة لأكسايه نمط الشيخوخة الظاهري وبالتالي تؤثر على آلية التمايز في الخلايا السرطانية البشرية كما درس (Gould 1995) استخدام التربينات في تثبيط مراحل نمو الخلايا الورمية إذ أن لها دور في تثبيط تكوين الورم ومرحلة تعزيز الورم فضلاً على تخفيف تمايز الخلايا ويثبط بصورة فعالة غزو الخلايا الورمية وهذا يرجع إلى وورها في تحويل المواد المسرطنة إلى مواد أقل سمية أو كمناع كيميائي Che-mopreventive يحث الموت المبرمج وذلك بتسارع موت الخلايا السرطانية. أن الهدف من هذه الدراسة هو لمعرفة تأثير مستخلص النعناع الزيتي على

خلايا REF الطبيعية اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط عند هذا التركيز 35.22% وان أقل نسبة مئوية لتثبيط نمو خلايا خط Hela عند تركيز 125 مايكرو غرام /مليلتر كانت 10.2% بالمقارنة مع خط خلايا REF الطبيعية اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط عند هذا التركيز 10.2% كما موضح بالشكل (1)



أما عند دراسة التأثير السمي لزيت النعناع على نمو خلايا خط HEP-2 السرطانية عند فترة تعريض 48 ساعة لوحظ زيادة في تثبيط نمو الخلايا بصورة معنوية مع زيادة التراكيز اذ بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط نمو خلايا خط HEP-2 55.34% عند تركيز 1000 مايكرو غرام /مليلتر بالمقارنة مع النسبة المئوية لتثبيط نمو خلايا REF الطبيعية اذ كانت 35.22% عند نفس التركيز في حين أن أدنى نسبة مئوية لتثبيط نمو خلايا خط HEP-2 السرطانية كانت 44.17% عند تركيز 125 مايكرو غرام /مليلتر بالمقارنة مع النسبة المئوية لتثبيط نمو خلايا REF الطبيعية والتي كانت 10.2% عند التركيز نفسه (كما موضح بالشكل 2).



وقد أظهرت نتائج دراسة التأثير السمي لزيت النعناع على نمو خلايا خط RD السرطانية زيادة معنوية في تثبيط نمو الخلايا مع زيادة التراكيز عند فترة تعريض 48 ساعة اذ بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط خلايا خط RD السرطانية 63.27% عند تركيز 1000 مايكرو غرام /مليلتر بالمقارنة مع خلايا خط REF الطبيعية اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 35.22% عند التركيز نفسه في حين كانت أدنى نسبة مئوية لتثبيط نمو خلايا خط RD عند تركيز 125 مايكرو غرام /مليلتر 40.10% بالمقارنة مع النسبة المئوية لتثبيط نمو خلايا خط REF الطبيعية والتي كانت 10.2% عند التركيز نفسه (كما موضح بالشكل 3).

3 - خط خلايا سرطان منطقة الحوض البشري (RD)) استعمل هذا الخط عند التمريرة 325 .

4 - خط خلايا جنين الجرذ الطبيعية (REF)) استعمل هذا الخط عند التمريرة 25. تم الحصول على هذه الخطوط المذكورة في أعلاه من قبل المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية. الجامعة المستنصرية وهي منمأة على وسط RBMI-1640 المزود ب 10% مصمل العجل البقري Bovine calf serum. 2-3 فحص السمية الخلوية (Cytotoxicity)) للزيوت الطيارة المستخلصة من أوراق نبات النعناع في خطوط الخلايا السرطانية وخط الخلايا الطبيعية تم زرع الخلايا السرطانية في أطباق الزرع النسيجي ذات الحفر المتعددة (96) حفرة مسطحة القعر Flat bottom well وتضمنت التجربة ثلاث مراحل ((Mather and Robert, 1998

المرحلة الأولى زرع أو بذار الخلايا (CELL Seeding)) :أخذت الأوعية الحاوية على طبقة أحادية متكاملة من الخلايا ثم قلعت الخلايا باستعمال محلول التربسين -فيرسين ،أضيف 20مليلتر من الوسط الزرع المزود بالمصل بنسبة 10% إلى كل وعاء ومزج باستعمال ماصة دقيقة Micropipette ووضع 0.2مليلتر من عالق الخلايا في كل حفرة من حفر الطبق بحيث تحتوي كل حفرة على ما يقارب 1x10<sup>5</sup> (خلية /حفرة). تم تغطية سطح الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص بهذا الغرض ثم حضن بدرجة حرارة 37م. الى اليوم التالي للسماح للخلايا بالاتصاق وتكوين طبقة أحادية كاملة.

المرحلة الثانية مرحلة التعريض (Exposure stage)) :بعد فحص الأطباق والتأكد من نمو الخلايا فيها وتكوين طبقة أحادية كاملة عوملت الخلايا النامية في الحفر بتركيز نصفية من الزيت الطيار المستخلص من أوراق نبات النعناع ،تراوحت هذه التراكيز 125-1000 مايكرو غرام /مليلتر إذ حضرت هذه التراكيز بإذابة 0.01غم من خلاصة المستخلص ب 1 مليلتر من Dimethyl sulfoxide وقد عد هذا المحلول محلولاً قياسياً لأجل تحضير التخفيف منه لاحقاً وتم إجراء أربعة تخفيفات (125, 250, 500, 1000) مايكرو غرام /مليلتر. لقد تم تحضير التراكيز عن طريق تخفيف خلاصة المستخلص بالوسط الزراعي الخالي من مصمل العجل البقري . سكب الوسط الزرع القديم من أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق الشفاف منه وأضيف 0.2 مل/حفرة من التراكيز أعلاه وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز كما تم عمل مكررات للسيطرة (خلايا مضاف إليها وسط خالي من المصل). حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م. ولمدة تعريض 48 ساعة ماعدا الخلايا الطبيعية تم حضنها لمدة 72 ساعة .

**المرحلة الثالثة :الكشف عن التأثير السمي لمستخلص النعناع الزيتي من أوراق النعناع**

بعد انتهاء مدة التعريض ،أخذت الأطباق وتم التخلص من وسط التعريض ثم غسلت بمحلول الملح الفسلي ثم صبغت الخلايا بإضافة 0.1مليلتر من صبغة البنفسج البلوري crystal violet وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 30دقيقة وبعدها أزيلت الصبغة وجففت الأطباق،قرأت النتائج لكل طبق باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص بأطباق المعايرة الدقيقة ELISA micro plate spectrophotometer عند الطول الموجي 492 نانومتر. تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية على وفق المعادلة التالية ((Freshney, 2001

$$\text{Inhibitory rate/ I.R \%} = \frac{B - A}{A} \times 100$$

I.R % = النسبة المئوية لمعدل التثبيط.

A = الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.

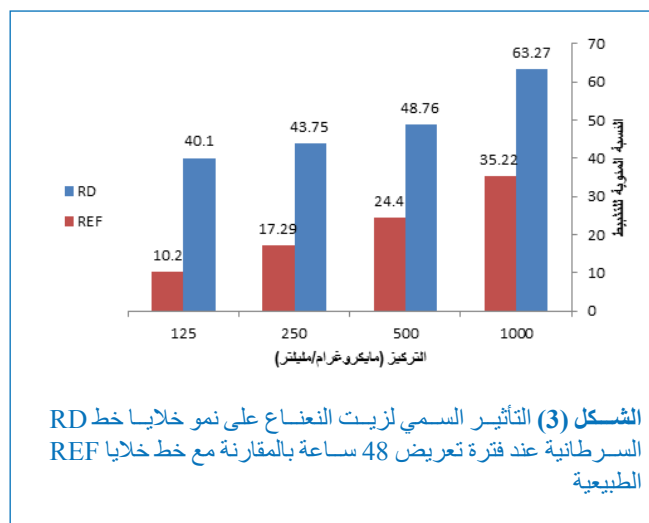
B = الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

### 3 - النتائج والمناقشة:

3-1 نتائج التأثير السمي لزيت النعناع على نمو خلايا خط Hela أظهرت نتائج دراسة التأثير السمي لزيت النعناع على نمو خلايا خط Hela عند فترة تعريض 48 ساعة زيادة في تثبيط نمو الخلايا بصورة معنوية مع زيادة التراكيز اذ بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط نمو خلايا خط Hela 68.32% عند تركيز 1000 مايكرو غرام /مليلتر عند مدة تعريض 48 ساعة بالمقارنة مع خط

الفعالة الموجودة فيه فعلاً مضاداً للأكسدة وحاتاً على الموت المبرمج أو عن رقيق حت الأنزيمات الأيضية المسؤولة عن أبطال السمية الخلوية -cellular detoxification enzyme. وتدخل الخلية في عملية الموت المبرمج. تتميز بعض مركبات الايض الثانوي النباتية ببعض الانتقائية (Selectivity) في التأثير في الخلايا السرطانية، لذلك تم مقارنة الفعالية السمية للمستخلص في الخلايا السرطانية وفي الخلايا الطبيعية لجنين الفأر أيضا Rat Embryo Fibroblast (REF)، مع اعتماد الأخيرة سيطرة عند المقارنة. ومن خلال النتائج، وجد أن هنالك تأثيراً سُمياً واضحاً للمستخلص في الخلايا السرطانية الثلاثة، في حين لم يكن هنالك تأثير مماثل في خلايا (REF)، نستنتج من ذلك إن الانتقائية قد تكون بسبب بعض الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية وغير الموجودة في الخلايا الطبيعية، مثل الطبيعة الايضية لتكون الأوعية الدموية الجديدة وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وإمكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة (Folkman, 2002; Moteki et al., 2000)، فضلاً عن ذلك يكون شريط الـ DNA في الخلايا السرطانية بشكل منبسط (Relaxant) والجزئية ككل تكون غير مستقرة بسبب تباعد الأواصر الهيدروجينية (H-bonds) التي تربط شريط الـ DNA، الأمر الذي يسهل عملية ارتباط المركبات الداخلية أو الخارجية بسلسلاتي الـ DNA، في حين DNA الخلايا الطبيعية يكون مرصوفاً بشكل قوي والأواصر الهيدروجينية غير متباعدة وهذا يعيق ارتباط المركبات المختلفة والتأثير فيها

(Belijanski, 2000). إن الخلايا السرطانية تمتلك صفات ايضية غير موجودة في الخلايا الطبيعية، منها الانتهازية والإفراط في الحاجة إلى التغذية وكذلك القابلية على الغزو والانتشار، لذا هنالك بعض العوامل أو الجينات أو البروتينات تكون موجودة بشكل مختلف عما هو موجود عليه في الخلية الطبيعية وبذلك يمكن أن تكون هدفاً لمركبات الايض الثانوي في التأثير على الخلايا السرطانية، إذ إن عملية أكسدة الدهون (Lipid peroxidation) تعد من العمليات المهمة في توفير الطاقة عند تحول الخلايا الطبيعية إلى السرطانية وتكون هذه العملية نتيجة لعملية الأكسدة المتولد من تكون الجذور الحرة في الخلايا السرطانية (Cho et al., 2003)، لذلك قد تعمل مركبات الايض الثانوي لنبات النعناع في تأثيرها السُمي في الخلايا السرطانية من خلال إيقاف عمل أنزيم أكسدة الدهون (Lipoxygenase) عن طريق تثبيط عمل الجين 5-lipoxygenase mRNA والمُعبّر بشكل عالٍ (Over expressed) في الخلايا السرطانية، الذي بدوره يؤدي إلى تثبيط إنزيم Topoisomerase I المسؤول عن إعادة ارتباط الـ DNA واستمرار نمو الخلية (Cell proliferation) وعند ذلك يتوقف نمو الخلية السرطانية لتدخل مرحلة الموت المبرمج (Apoptosis) (Hoernlein et al., 1999). أما على صعيد العوامل فإن هنالك بعض العوامل التي تكون نشطة في الخلية السرطانية وتكون هدفاً لمركبات الايض الثانوي، وهو العامل (Nuclear transcription factor (NF-B الذي له دور مهم وأساس في تنظيم دورة حياة الخلية ونموها من خلال المساعدة في التشفير عن السايوتوكينات (Cytokines) وعوامل النمو، لذلك فإن تثبيطه سوف يؤدي إلى حدوث خلل في دورة الحياة وبالتالي تدخل الخلية مرحلة الموت المبرمج (Ahmed et al., 2000).



تضمنت هذه الدراسة التحري عن التأثير السمي للزيت المستخلص من نبات النعناع على ثلاثة خطوط خلايا سرطانية وهي ((Hep-2, Hela, RD)) ومقارنتها مع خط الخلايا الطبيعية (REF)) بتركيزات مختلفة هي (125, 250, 500, 1000) مايكرو غرام/مليتر عند فترة تعريض 48 ساعة إن نتائج الدراسة تؤكد أن النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية اعتمدت على التركيز المستعمل فالعلاقة طردية بين النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا مع تركيز الزيت المستخلص من النعناع وإن نتائج هذه الدراسة جاءت متوافقة لما توصل إليه Rahimifard وآخرون (2010)) إذ درس فعالية الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات النعناع على نمو خلايا سرطان الرحم (Hela)) وخط خلايا سرطان الحنجرة البشرية (Hep-2)) بتركيزات مختلفة وأظهرت الزيوت الأساسية أعلى سمية على خط خلايا (Hela)) وأقل سمية على خط خلايا (Hep-2)) بالمقارنة مع خط الخلايا الطبيعية. كما أشار Shirazi وآخرون (2004)) إلى فعالية الزيوت الأساسية من نبات النعناع في تثبيط تكاثر خط خلايا سرطان الرئة A549 وخط خلايا سرطان المبيض الغدي للإنسان Sk-ov-3 وخط خلايا Hela إذ أظهرت النتائج زيادة معنوية في النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا مع زيادة تراكيز الزيوت المستخلصة من نبات النعناع وكما بين Banu (2006)، من خلال دراسة التأثير السمي للزيوت الأساسية التي تتكون من مواد تربينية على خطوط الخلايا السرطانية Chinese hamster lung fibroblast cell خط (V79) وخط خلايا Human lung carcinoma (A549) وأظهرت تأثير سام

على الخلايا في التراكيز العالية والمنخفضة وتؤكد إن الزيوت الأساسية المتكونة من التربينات ممكن استخدامها كمضاد للأورام ولعلاج الأورام في الجسم الحي. ولغرض إيضاح الفعل المضاد للزيوت الأساسية المستخلصة من نبات النعناع إذ أن هذا الفعل هو فعلاً متعدد التأثير ناجماً عن امتلاك المركبات

## References:

1. حسين , فوزي طه .(1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر ، الرياض .
2. Ahmed, N.; Gupta, S.; Husain, M.M.; Heiskanen, K.M. and Muktar, H. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. Clin. Cancer. Res., 6:1524-1528,2000.
3. Banu, Barutca . . (2006) Investigating the cytotoxic activates of some plant extracts on mamalian cell clltures in vitro Anadolou University ,Graduate School of Sciences Biology Program,
4. Belijanski, M. The anticancer agent PB-100 selectivity active ma-
5. Briggs, C. peppermint :Medicinal Herb and Flavouring Agent .CPJ/RPC 8992,1993.
6. British Herbal pharmacopoeia. Determination of essential oils in Vegetable drugs, London App. 9:197-199,1996.
7. Cho, E.J.; Ykoza, T.; Rhyu, D.Y.; Kim, H.Y. and Shibahara, N. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. Am. J. Chin. Med., 31:907-917 ,2003.

8. Evans, W. C. Trease and Evans Pharmacogeny. 14th ed. W.B. Saunders Company Ltd., London, 1999.
9. Folkman, J. Tumor Angiogenesis. In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.F.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F.; Ferri III, E. and Ganster, T.E. (eds.). Cancer Medicine (5th ed.). BC. Decker Inc. Canada, 2000.
10. Freshney, R.I. Application of cell culture to toxicology. Cell Biology and Toxicology, 17:213-230, 2001.
11. Gould, M.N. Prevention and therapy of mammary cancer by onoterpenes 22:44-139, 1995.
12. Hoernlein, R.F.; Orlikowsky, T.; Niethammers, O.; Sailer, E.R.; Simmer, T.; Danneker, G.E. and Ammon, H.P.T. Acetyl - 11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid induces Apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. Pharmacology, 288:613-619, 1999.
13. Jain D, Pathak N, Khan S, Raghuram G, Bhargava A, Samarth R, Mishra P Evaluation of Cytotoxicity and Anticarcinogenic Potential of Mentha Leaf Extracts International Journal of Toxicology vol. 30 no. 2 225-236, 2011.
14. Longe, J. L. The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine. Farmington Hills, MI: Thomson/Gale, 2005.
15. May, B., H.D. Kuntz, M. Kieser, S. Kohler. Efficacy of a fixed peppermint oil/caraway oil combination in non-ulcer dyspepsia. Arzneimittelforsch 46(12):1149-1153, 1996.
16. Mather, J.P. and reports, P.E. (1998). Introduction to cell and tissue culture theory and technique. Plenum press, New York.
17. Moteki, H.; Hibasmai, H.; Yamada, Y.; Katsuzaki, H.; Imai, K. and Komiya, T. Specific induction of apoptosis 1,8 - cineole in two human leukemia cell line, but not in a human stomach cancer cell lines. Oncology Reports, 9:757-760, 2002.
18. Rahimifard N, Hajimehdipour H, Hedayati MH, Bagheri O, Pishevar H, Ajani Y. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some Mentha species on Vero, Hela and Hep2 Cell Lines, Journal of Medicinal Plants Volume 9, No. 35, 2010.
19. Sparks, M.J., P.O. Sullivan, A.A. Herrington, S.K. Morcos. Dose peppermint oil relieve spasm during barium enema? Br J Radiol 68 (812):841-843, 1995.
20. Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh, I. Rasooli. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Mentha communis L., essential oils. Phytochemistry. 67: 1249-1255, 2006.

## Volatile Oils extracted from Plant mint *Mentha Piperita* and study the toxic effect in some cancer cell lines

Marwa Mohammed Saeed, Marib Nazih Rashid, Mohammed Ibrahim Nader, Sarah Faisal Hasan

Genetic engineering and bio-technology institute/ Baghdad University

### SUMMARY:

This study was conducted to determine the impact of the most important active ingredients which are present in leaves of mint plant. The volatile oil was extracted from the leaves of a mint plant and investigated its toxic effects on the growth of tumor cell lines of cervical cancer (Hela) line human larynx cancer (Hep-2), line of cancer cells the pelvic area RD and compared with a Rat embryonic fibroblast line (REF), by using Technology transplant tissue in the glass. The results revealed that significant differences of extract on the tumor cell line, the cytotoxicity for the mentioned line was dependent on concentrations and exposure time 48hr, while had no effect on the REF normal cells even after 72hr at exposure.

**Keywords:** volatile oil, mint plant, toxic effects on cancer cell line.