مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هفتم، شماره اول، پیاپی بیست و پنجم، تابستان ۱۳۹۷ (۸۷-۸۱)

خاصیت سیتوتوکسیته عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های هوایی گیاه ورک در سلول‌های سرطانی هلا در مقایسه با سلول‌های هک

سیما نصری[۱]

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۵/۱۳)

چکیده

به دلیل عوارض فراوان داروهای شیمیایی، داروهای گیاهی در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. گیاه ورک با نام علمی *Hulthemia persica* دارای پنج آنتی‌اکسیدانت فنلی می‌باشد، به همین دلیل در مطالعه حاضر اثر ضد سرطانی آن در سلول‌های هلا در مقایسه با سلول‌های سالم هک مورد مطالعه قرار گرفت. پس از جمع‌آوری گیاه، سرشاخه‌های هوایی آن جدا و به روش پرکولاسیون عصاره‌گیری شد. رده‌های سلولی هلا و هک در پلیت‌های ۹۶ خانهدر مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره µg/ml ۷/۸، ۱۵/۶۲۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند و درصد زنده ماندن سلول‌ها توسط تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. عصاره گیاه اثر مهاری بر سلول‌های هک نداشته است. اما در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در دوزهای ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸ عصاره ورک و در مدت ۴۸ ساعت در همه دوزها و در ۷۲ ساعت دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ کاهش داده است (P<۰/۰۵). احتمالاً عصاره ورک از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانیو تحریک آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی هلا اثر کرده و سبب مهار رشد آنها شده است.

واژه‌های کلیدی: عصاره ورک، سلول هلا، سلول هک، کشت سلول، MTT.

Cytotoxity effect of *Hulthemia persica* on Hela cancer cells in comparison to Hek

Sima Nasri[1]

Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Apr. 15, 2018 - Accepted: Aug. 4, 2018)

Abstract

Because of many side effects of chemical drugs, herbal medicines have been considered for cancer treatment. *Hulthemiapersica* has five phenolic antioxidants.Therefore, in the present study, its anticancer activity in Helacells was studied in comparison with healthy Hek cells. After collecting the plant, its aerial parts were separated and extracted by percolation method. Hela and Hek cell lines were placed in plates of 96 houses with various concentrations of 8.7, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg /mlfor 24, 48 and 72 hours, and the percentage of cell viability Measured by MTT test. Plant extract has no inhibitory effect on Hek cells. However, *Hulthemiapersica* extract decreases viability rate of the Hela cells at doses of 125, 62.5, 31.25, 15.6, and 7.8 in 24 hours,at all doses in 48 hours and at doses of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 in 72 hours compared to the control group (P<0.05).

Keywords: Cell culture, Hek cells, Hela cells, *Hulthemia persica* extract, MTT.

مقدمه

سرطان گردن رحم سومین سرطان شایع جهان در بین زنان محسوب می‌شود (Siegel, 2016) و شایع‌ترین بدخیمی سیستم تولیدمثلی ماده می‌باشد

* نویسنده مسئول: E-mail: s_nasri2000@yahoo.com

(Undurraga, 2010). با توجه به معایب زیاد داروهای ضدسرطان جاری، محققین به دنبال یافتن ترکیبات جدید با فعالیت قوی‌تر و عوارض جانبی کمتر می‌باشند (Alavizadeh, 2016).

ورک یا رز ایرانی با نام‌های علمی *Hultemia persica* و *Rosa persica* Michx. شناخته می‌شود. پراکندگی جهانی آن شامل ایران، افغانستان، ترکمنستان و آسیای مرکزی می‌باشد. جنس *Rosa* دارای خواص دارویی زیادی است (Mozaffarian, 2005).

ورک مهارگر انقباض‌های ایلئومی به وسیله تحریک عصبی Ach می‌باشد (Sadraei, 2016). ترکیبات فنلی آن احتمالاً گیاه را از حمله حشرات گیاه‌خوار، میکروارگانیسم‌ها و اشعه سوزان بیابان محافظت می‌کند. ترپن‌ها، اورسلیک اسید، سیانوتیک اسید و ساکاروز از ترکیبات شیمیایی این گیاه هستند (Ikram, 1978).

با توجه به اثرات جانبی شدید درمان‌های رایج سرطان مانند جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمانی ... و مشکلات وابسته به آنها، امروزه روش‌های درمانی جایگزین مورد توجه قرار گرفته است. به همین دلیل در پژوهش حاضر تأثیر عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های هوایی گیاه ورک بر رشد سلول‌های سرطانی هلا و مقایسه اثر آن بر سلول‌های سالم هک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری گیاه

گیاه از منطقه طالقان جمع آوری شد و در هرباریوم بخش فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفت. سرشاخه‌های هوایی آن جدا و در شرایط استاندارد سایه خشک و سپس آسیابشد. جهت تهیه عصاره از روش پرکولاسیون استفاده گردیدبه این منظور ۱۰۰ گرم پودر را داخل بشر ریخته و در اتانول ۸۰ درصد در پرکولاتورخیس می‌کنیم و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و گرمای ملایم قرار داده و سپس عصاره به صورت قطره‌ای از پرکولاتور خارج و جمع‌آوری می‌شود. کل حجم محلول به‌دست آمده را داخل دستگاه روتاری در دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا محلول غلیظ شده به‌دست آید (Tabibian, 2013).

کشت سلول

سلول‌های Hela (NCBI code 115) و هک (NCBI code 630) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در فلاسک‌های کشت سلولی cm^2 ۲۵ به همراه محیط کشت DMEM[1] حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیرفعال شده و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ نگهداری شده و چند مرحله کشت و پاساژ داده شد تا اینکه سلول‌ها از لحاظ تعداد به حد مطلوب رسیدند. پس از پر شدن بستر فلاسک از سلول‌ها، با استفاده از تریپسین-EDTA سلول‌ها از بستر جدا شده و شمارش آنها با لام نئوبار انجام شد. سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^6 cell/ml تهیه و به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه مسطح کشت افزوده شد. به‌طوری‌که در هر چاهک تعداد 5×10^3 cell/well موجود باشد و پس از ۲۴ ساعت مایع رویی خالی شده و عصاره یا کلشی سین به‌عنوان کنترل مثبت به آن اضافه شد (Gharaei, 2013). غلظت‌های مختلف عصاره حین اضافه کردن به میکروپلیت ساخته شدند. در ستون ۴، ۲۰۰ µl محیط کشت ریخته شد و روی آن ۱ µl از استوک اصلی با غلظت ۱۰۰۰ µg /ml اضافه شد. پس از کمی پیپتاژ، ۱۰۰ µl از آن به چاهک ستون مجاور (۵) ریخته شد و به هر کدام از چاهک‌های ستون ۴ و ۵، ۱۰۰ µl محیط کشت اضافه

1. Dulbeco’s Modification of Eagle’s Medium

شد تا هر دو ستون به حجم نهایی ۲۰۰ µl رسیدند. این عمل تا ستون ۱۰ تکرار شد و در هر انتقال غلظت عصاره به نصف تقلیل یافت. بدین ترتیب رقت‌های کاهش یافته از غلظت اولیه ۱۰۰۰ µg / ml فراهم گردید. برای هر غلظت و حلال عصاره یک ردیف شش‌تایی چاهک در نظر گرفته شد و در هر پلیت یک ردیف شش‌تایی غلظت صفر عصاره به عنوان کنترل منفی و محیط کشت خالی بدون سلول به عنوان بلانک قرار داده شد (Thavamani, 2013).

تست MTT

بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. روش MTT، یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که طی آن نمک تترازولیومکه محلول در آب است و زمانی‌که در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS آماده‌سازی می‌شود، محلول زردرنگی ایجاد می‌کند که توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال احیاشده و به کریستال‌های نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شوند. جذب نوری این کریستال‌ها پس از حل شدن در حلال‌هایی مثل DMSO و ایزوپروپانول اسیدی توسط دستگاه الایزا ریدر قابل اندازه‌گیری است. هرچه میزان زنده بودن سلول‌ها پس از تیمار بیشتر باشد میزان جذب نوری که با دستگاه قرائت می‌شود بیشتر می‌شود، زیرا میزان رنگ ایجاد شده توسط سلول‌های زنده بیشتر است (Dutta, 2005).

پس از انکوباسیون سلول‌های هلا و هک با غلظت‌های ۱۵،۶۲۵، ۳۱،۲۵، ۶۲،۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ µg/ml از عصاره در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد سنجش MTT قرار گرفتند. بدین منظور محلول ۵mg/ml از پودر MTT توسط محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد،۲۰ میکرولیتر از آن به پلیت‌ها اضافه گردید و در انکوباتور CO2 دار قرار داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده، محیط حاوی MTT خارج گردیده و به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از حدود ۱۰ دقیقه توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و OD[1] (جذب نوری) به‌دست آمد (Gharaei, 2013). برای اطمینان از صحت داده‌ها آزمایش در چهار نوبت تکرار گردید و میانگین گرفته شد. درصد سلول‌های زنده به روش زیر محاسبه گردید(Thavamani, 2013):

درصد مهار سلول‌ها =
[(OD سلول‌های کنترل/ OD سلول‌های مجاورشده باترکیب سیتوتوکسیک)−۱]×۱۰۰

درصد سلول‌های زنده = ۱۰۰ − درصد مهار سلول‌ها

آنالیز آماری

تمامی داده‌ها بر اساس mean±S.D محاسبه شده است و برای تأیید اختلاف بین گروه‌های تست و گروه کنترل از آزمون آماری آنووا و برای رسم نمودارها و محاسبه IC_{50} و همچنین آزمون آماری از نرم‌افزار Excel استفاده شد. سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ گرفته شد. IC_{50}[2] (غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد) پس از رسم منحنی با به‌کارگیری غلظت‌های عصاره و تعداد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

نتایج

میزان IC50 برای سلول‌های هلا در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۴۶۲، ۳۱۹ و ۲۶۲ میلی‌گرم بر میکرولیتر عصاره به‌دست آمد. روند نزولی این کمیت با افزایش زمان تیمار نشان‌دهنده این واقعیت

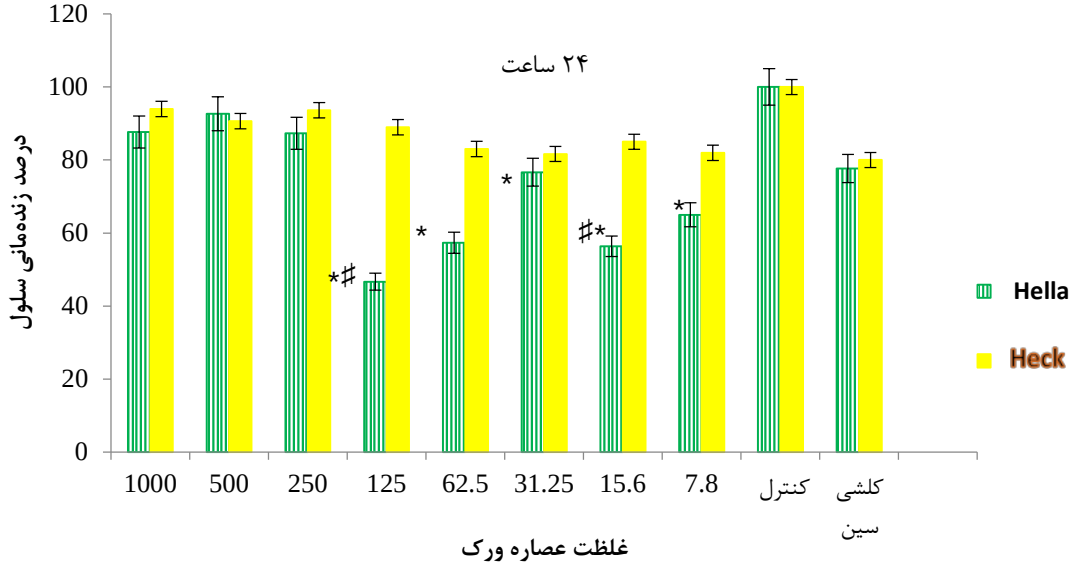
1. Optical Density
۲. Inhibitory Concentration at 50%

است که با افزایش زمان تیمار، به غلظت کمتری از عصاره برای کشتن نیمی از سلول‌ها نیاز است. چنان که از نمودارهای اثر عصاره بر سلول‌های غیر سرطانی هک برمی‌آید، هیچ یک از غلظت‌های مورد استفاده، باعث کشتن نیمی از سلول‌های هک نشده است. تفاوت اثر عصاره بر این دو رده سلولی به احتمال زیاد به علت توان تکثیر متفاوت این دو رده سلولی و عدم سمیت بر سلول‌های طبیعی است.

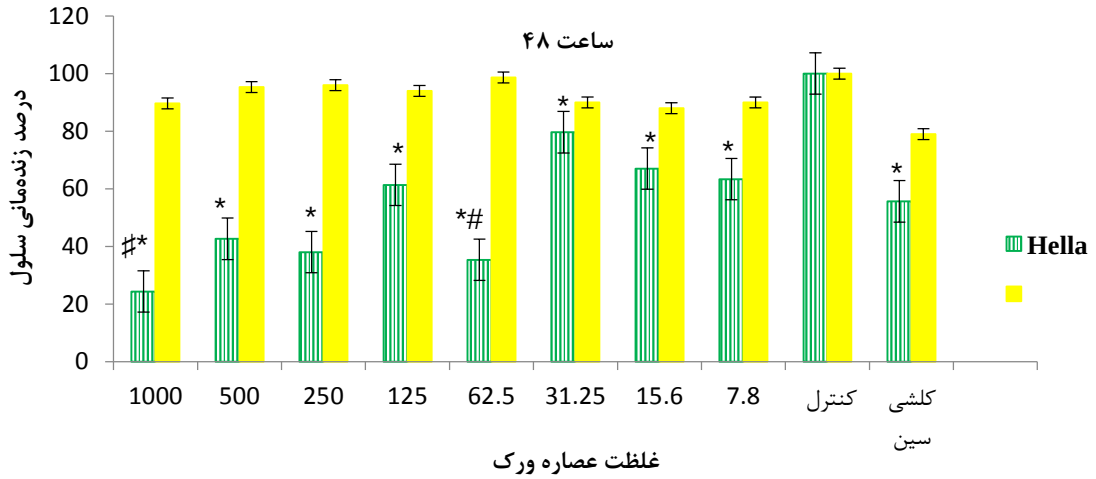
بررسی تأثیر عصاره ورک در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره ورک درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در دوزهای µg/ml ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸ کاهش داده است (P<۰/۰۵). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده دوزهای ۷/۸ و ۱۲۵ ورک با گروه دریافت‌کننده کلشی سین بود (P<۰/۰۵). عصاره ورک تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت (نمودار ۱).

بررسی تأثیر عصاره ورک در مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره ورک درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در همه دوزها کاهش داده است (p<۰/۰۵). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی سین نیز تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده دوزهای ۱۰۰۰ و ۶۲/۵ ورک با گروه دریافت‌کننده کلشی سین بود (p<۰/۰۵). عصاره ورک تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت (نمودار ۲).

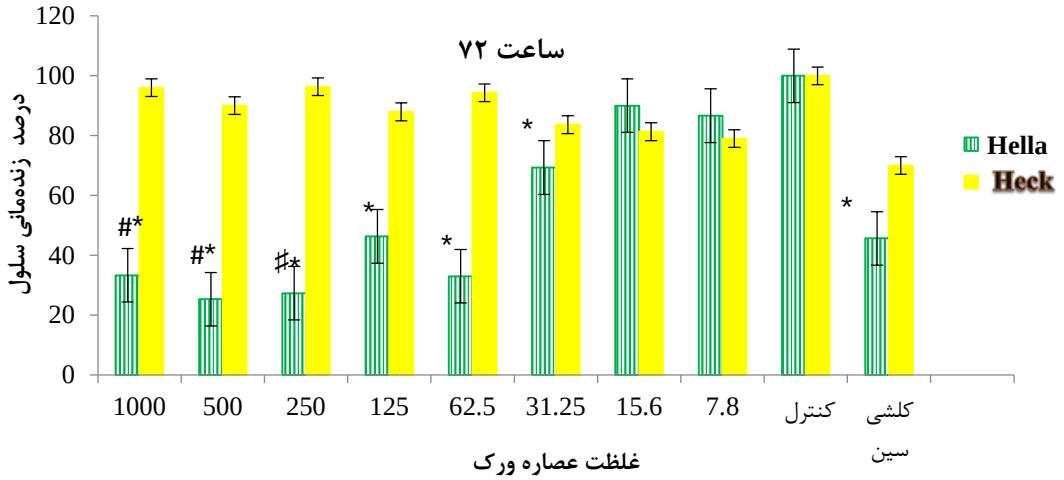
بررسی تأثیر عصاره ورک در مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره ورک درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ کاهش داده است (p<۰/۰۵). در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلشی‌سین نیز تفاوت معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ ورک با گروه دریافت‌کننده کلشی سین بود (p<۰/۰۵). عصاره ورک تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های هک نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Heck پس از ۲۴ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ورک.
علامت * بیانگر p<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.
علامت # بیانگر p<۰/۰۵ نسبت به گروه کلشی سین است.



نمودار ۲. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۴۸ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ورک.
علامت * بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.
علامت # بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کلشی سین است.



نمودار ۳. درصد زنده‌مانی سلول‌های Hela و Hek پس از ۷۲ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ورک.
علامت * بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.
علامت # بیانگر $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کلشی سین است.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های هوایی ورک سبب مهار رشد سلول‌های هلا می‌گردد. در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که عصاره ورک درصد زنده‌مانی سلول‌های هلا را در دوزهای ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸ و در مدت ۴۸ ساعت در همه دوزها و در ۷۲ ساعت دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ کاهش داده است ($p<۰/۰۵$). در صورتی‌که بر مهار رشد سلول‌های هک اثری ندارد (نمودارهای ۱، ۲ و ۳). به نظر می‌رسد که با افزایش زمان مواجهه سلول‌های هلا با عصاره تأثیر بر مهار رشد سلول افزایش یافته است و بیشترین مهار مربوط به دوز ۱۰۰۰ در ۴۸ ساعت و دوز ۵۰۰ در ۷۲ ساعت می‌باشد که نشان می‌دهد با افزایش زمان مواجهه دوز مؤثر کاهش یافته است.

شواهد زیادی نشان می‌دهند که بین تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد سرطان ارتباط وجود دارد.

تأثیر گونه‌های اکسیژن فعال[1] در پیشرفت تومور سلول‌های انسانی اثبات شده است. ROS درونزاد عموماً سبب آسیب به DNA از طریق اکسیده کردن نوکلئوتیدها و شکستن زنجیره آن می‌شود و یک عامل آشکار در ناپایدار کردن کروموزوم بوده که منجر به موتاسیون و حذف شده که نهایتاً منجر به سرطان می‌گردد. بدن دارای چند آنتی‌اکسیدانت است که سبب داکسیده کردن و ترمیم این آسیب‌ها می‌شود. ولی این سیستم‌های آنتی اکسیدانی برای از بین بردن آسیب‌های اکسیداتیو کافی نیستند (Gibellini, 2011).

در بررسی اثرات گونه *Rosa damascena* بر رده سلول سرطانی کولون SW742 ترکیبات نامحلول اسانس این گیاه تقسیم سلولی را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد (Rezaie-Tavirani, 2013).

از ورک پنج آنتی‌اکسیدانت فنلی جدا شده است که شامل سه فلاوونوئید کاتچین[2]، (+)- گالوکاتچین[3]، کوئرستین[4]، تانن هایبتا ۳- پروسیانیدین[5] و گالیک اسید[6] می‌باشد (Jassbi, 2003).

از ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان می‌توان ترکیبات پلی‌فنلی، فلاوونوئیدها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها و آسکوربیک اسید را نام برد که از طریق دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مهار پراکسیداسیون لیپیدی تأثیر می‌کنند و از ترکیبات ضد سرطان می‌توان کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها، فلاوونوئیدها و کورکومین را نام برد که به‌عنوان مهارکننده تومور، مهار رشد تومور و فعالیت ضد متاستاتیک اثر می‌کنند (Saxena, 2013).

اثرات ضد سرطانی چای سبز به پلی فنل کاتچین در آن نسبت داده شده است (Zaveri, 2006).

در بین فلاوونوئیدها، کوئرستین یک آنتی‌اکسیدانت قوی است. به‌علاوه، کوئرستین اثر پروآپوپتوتیک مستقیم بر سلول‌های توموری دارد و سبب مهار رشد چندین رده سلول سرطانی در فازهای متفاوت چرخه سلولی می‌شود (Gibellini, 2011).

گالیک اسید سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی در محیط کشت از طریق تحریک آپوپتوز، فعال کردن کاسپاز۳ و کاسپاز۹ و افزایش بیان ژن Bax و کاهش پتانسیل غشا میتوکندری می‌شود (Liu, 2012).

با توجه به مطالب بالا می‌توان گفت عصاره ورک از طریق از بین بردن گونه‌های اکسیژن فعال و همچنین تحریک آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی هلا اثر کرده و سبب مهار رشد آنها شده است.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل طرح پژوهشی است که در معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور با شماره ۱۰۰۲۴۵/۲۸/د/۱۴۳ به تاریخ ۹۱/۴/۱۰ تصویب شده است.

REFERENCES

Alavizadeh, S.H.; Akhtari, J.; Badiee, A.; Golmohammadzadeh, S.; Jaafari, M.R.; (2016). Improved therapeutic activity of HER2 affibody-targeted cisplatin liposomes in HER2-expressing breast tumor models. Expert Opin Drug Deliv; 13(3): 325-36.

Dutta, A.; Bandyopadhyay, S.; Mandal, C.; Chetterjee, M.; (2005). Develpment of a modified MTT assey for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *ParasitolInt*; 54: 22-119.

Gibellini, L.; Pinti, M.; Montagna, J.P.; Biasi, S.D.; Roat, E.; Bertoncelli, L.; Cooper, E.L.; Cossarizza, A.; (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. Evid Based Complement Alternat Med (2011); 1-15.

1. Reactive Oxygen species(ROS)
2. Catechin
3. Gallocatechin
4. Quercetin
5. Procyanidin β-3
6. Gallic acid

Gharaei, R.; Akrami, H.; Heidari, S.H.; Asadi, M.H.; Jalili, A.; (2013). The suppression effect of *Ferula gummosa* Boiss extracts on cell proliferation through apoptosis induction in gastric cancer cell line. *EUJIM*; 3: 241-247.

Ikram, M.; (1978). Chemical constituents of Rosa persica. Fitoterapia; 49:102.

Jassbi, A.R.; Zamanizadejarib, S.; Tahara, S.; (2003). Polyphenolic antioxidant constituents of Rosa persica. Jour Chem Soc Pak; 4(25): 323-27.

Liu, Z.; Li, D.; Yu, L.; Niu, F.; (2012). Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Chemotherapy; 58(3): 185-94.

Mozaffarian, V.; (2005). Identification of Medicinal and aromatic plants of Iran. Tehran: Fahange Moaser.

Rezaie-Tavirani, M.; Fayazfar, S.; Heydari-Keshel, S.; Rezaee, M.B.; Zamanian-Azodi, M.; Rezaie-Tavirani, M.; Khodarahmi, R.; (2013). Effect of essential oil of Rosa Damascena on human colon cancer cell line SW742. GastroentrolHepatol Bed Bench; 6(1): 25-31.

Sadraei, H.; Asgharei, H.; Jalali, F.; (2016). Assesment of hydro alchoholic and hexane extracts of *Rosa persica* Mich. Flower on rat ileum spasm. Research in Pharmaceutical Sciences; 11(2): 160-7.

Saxena, M.; Saxena, J.; Nema, R.; Singh, D.; Gupta, A.; (2013). Phytochemistry of medicinal plants. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry; 6(1): 168-182.

Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A.; (2016). Cancer statistics. CA Cancer J Clin.; 66(1): 7-30.

Tabibian, M.; Nasri, S.; Kerishchi, P.; (2013). Amin GH. The effect of GundeliaTournefortii hydro-alcoholic extract on sperm motility and testosterone serum concentration in mice. Zahedan J Res MedSci; 15(8): 18-21.

Thavamani, B.S.; Mathew, M.; Dhanabal, S.P.; (2013). In vitro cytotoxic activity of menispermaceae plants against Hela cell line. AncSci Life; 33(2): 81-4.

Undurraga, M.; Loubeyre, P.; Dubuisson, J.B.; Schneider, D.; Petignat, P.; (2010). Early-stage cervical cancer: is surgery better than radiotherapy? Expert Rev Anticancer Ther; 10(3): 451-460

Zaveri, N.T.; (2006). Green tea and its polyphenolic catchins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sci.; 78(18): 2073-80.