اثر عصاره آبی- الکلی بنفشه و فراکسیون های آن بر تکثیر سلول های سرطان گردن رحم

دکتر سید محسن مرتضویان[۱]، دکتر احمد قربانی[۲*]، تقی قربانی حصاری[۳]

۱. دستیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۲. استادیار مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳. دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱ **تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۷/۲۰

خلاصه

مقدمه: مطالعات اخیر نشان داده اند که گیاه بنفشه حاوی تعدادی ترکیبات سیکلوتیدی است که این ترکیبات اثرات کشندگی سلولی قوی ایجاد می کنند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره آبی- الکلی بنفشه و فراکسیون های آن بر تکثیر سلول های سرطان گردن رحم انجام شد.

روش‌کار: با استفاده از دستگاه سوکسله و اتانول ۷۰٪، از قسمت های هوایی بنفشه سه رنگ، عصاره آبی- الکلی تهیه و از این عصاره، سه فراکسیون آبی، اتیل استاتی و ان- بوتانولی استخراج شد. سلول های مذکور در پلیت کشت ۹۶ خانه، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت های مختلف (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) عصاره یا فراکسیون ها قرار گرفتند. سپس میزان تکثیر سلول ها بر اساس روش احیاء MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها پس از گردآوری با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون توکی برای مقایسه های چند گانه استفاده شد. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شد و میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره آبی- الکلی و فراکسیون ان- بوتانولی آن (در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به ترتیب باعث کاهش درصد سلول های زنده از ۵ ± ۱۰۰ درصد به ۵ ± ۶۹ ($p<0/01$) و ۷ ± ۵۱ ($p<0/01$) درصد شد. همچنین، غلظت های ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکسیون اتیل استاتی، درصد سلول های زنده را به ترتیب به ۳ ± ۷۵ ($p<0/05$) و ۳ ± ۴۰ ($p<0/001$) درصد کاهش داد. هیچ یک از غلظت های فراکسیون آبی قادر به تغییر درصد سلول های زنده نبود.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی- الکلی بنفشه اثر مهاری قوی بر تکثیر سلول های سرطان گردن رحم دارد. ماده یا مواد مؤثره مسئول این اثر، بیشتر در فراکسیون اتیل استاتی این گیاه قرار دارند.

کلمات کلیدی: بنفشه، رحم، سرطان، سلول Hela

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر احمد قربانی؛ مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تلفن: ۰۵۱۱-۸۰۰۲۲۶۲؛ **پست الکترونیک:** ghorbania@mums.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از شایع ترین 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 می شود. در این میان، سرطان گردن رحم ششمین سرطان شایع در بین همه انواع سرطان ها و دومین سرطان شایع در بین زنان است. این سرطان در سال ۲۰۰۸ باعث مرگ ۲۷۵ هزار نفر در جهان شد (۱). اگرچه درمان های رایج کنونی توانسته اند پیش آگهی مبتلایان به این سرطان را بهبود بخشند، اما بسیاری از این تومورها به اقدامات درمانی کنونی پاسخ نمی دهند (۲). بنابراین در مورد سرطان گردن رحم نیز همانند سایر سرطان ها، تلاش برای یافتن داروهای مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر ادامه دارد.

گیاهان از دیرباز به عنوان منبع ارزشمندی برای پیدا کردن داروهای جدید محسوب می شوند. امروزه با کشت سلولی و یا استفاده از مدل های حیوانی، اثرات ضد توموری بسیاری از گیاهان دارویی مورد آزمایش قرار گرفته است (۷-۳). عقیده بر این است که اثرات ضد سرطانی گیاهان از طریق مهار آنزیم های محرک سرطان، کمک به ترمیم DNA، تحریک تولید آنزیم های ضد توموری در سلول، افزایش ایمنی بدن و القاء اثرات آنتی اکسیدانی ایجاد می شود (۴).

گیاه بنفشه سه رنگ با نام علمی *Viola tricolor* متعلق به گیاهان خانواده بنفشگان[1] از گل های زینتی ایران به شمار می رود و تاکنون خواص دارویی زیادی برای این گل گزارش شده است که از آن جمله می توان به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ادرار آوری و خواب آوری اشاره کرد (۱۳-۸). همچنین، مطالعات اخیر نشان داده اند که گیاه بنفشه حاوی تعدادی ترکیبات سیکلوتیدی[2] است که اثرات کشندگی سلولی قوی ایجاد می کند (۱۴). سیکلوتیدها گروهی از ترکیبات سیکلوپپتیدی گیاهی هستند که بین ۲۸-۳۷ اسید آمینه دارند و قادرند اثرات گوناگونی مانند مهار تکثیر سلولی و انقباض رحمی ایجاد کنند (۱۴، ۱۵).

1 Violaceae
2 Cyclotides

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره آبی- الکلی بنفشه بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم[3] انجام شد. Hela رده ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول های سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶). همچنین در این مطالعه تلاش شد تا در بین سه فراکسیون اصلی این عصاره، مؤثرترین فراکسیون مشخص شود.

روش کار

تهیه عصاره و فراکسیون ها

گیاه بنفشه سه رنگ از پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع آوری و قسمت های هوایی (شاخه، برگ و گل) آن خشک و آسیاب شد. پس از شناسایی گیاه توسط متخصص گیاه شناسی، یک نمونه از آن در هرباریوم دانشکده داروسازی (۱۲۵۶۸) بایگانی شد. از پودر آسیاب شده گیاه با استفاده از اتانول ۷۰٪ و به روش سوکسله به مدت ۴۸ ساعت عصاره گیری انجام شد. عصاره آبی- الکلی حاصل بر روی بن ماری خشک و سپس در دی متیل سولفوکساید حل شد.

برای تهیه فراکسیون ها، ۱۰ گرم از عصاره آبی- الکلی خشک شده را در آب مقطر ریخته و به قیف جدا کننده منتقل شد. سپس به ترتیب با اضافه کردن حلال های اتیل استات[4] و ان-بوتانول[5]، مواد محلول در اتیل استات (فراکسیون اتیل استاتی) و سپس مواد محلول در ان- بوتانول (فراکسیون ان- بوتانولی) جدا شد و باقی مواد فراکسیون آبی را تشکیل دادند (۱۹-۱۷). پس از حذف کردن حلال فراکسیون ها، فراکسیون آبی در کلرور سدیم ۰/۹ درصد و فراکسیون های اتیل استاتی و ان- بوتانولی در دی متیل سولفوکساید حل شدند.

کشت سلول ها و تیمار آنها

سلول های Hela در محیط کشت Dulbeccos Modified Eagles Medium حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و دارای آنتی بیوتیک (پنی سیلین

3 Hela cells
4 Ethyl acetate
5 n-butanol

۱۰۰ واحد در میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی اکسیدکربن نگهداری شدند. پس از پر شدن بستر فلاسک از سلول ها، با استفاده از تریپسین، سلول ها از بستر جدا و به پلیت کشت ۹۶ خانه منتقل شدند. برای بررسی اثر گیاه بنفشه بر تکثیر سلول ها، به محیط کشت آنها غلظت های مختلفی (۸۰۰-۰ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره و فراکسیون های مورد نظر اضافه شد و سلول ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس وضعیت سلول ها از نظر شکل ظاهری، اتصال به بستر کشت و دانه دار شدن با کمک میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. رقیق سازی عصاره و فراکسیون ها به گونه ای انجام شد تا درصد دی متیل سولفوکساید در محیط کشت سلول از ۱٪ بیشتر نشود. منظور از غلظت صفر، محیط کنترل است که به جای اضافه کردن عصاره یا فراکسیون به محیط کشت، حجم معادلی از حلال (کلرور سدیم ۰/۹ درصد یا دی متیل سولفوکساید) اضافه شده است.

بررسی درصد سلول های زنده

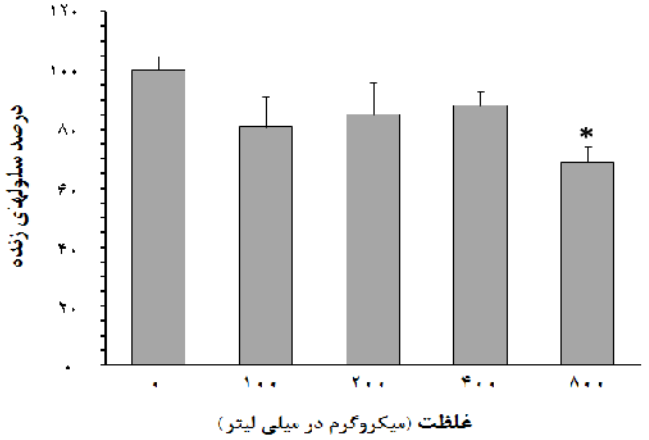
با گذشت ۲۴ ساعت از مجاورت سلول ها با عصاره و فراکسیون ها، درصد سلول های زنده بر اساس روش احیاء نمک تترازولیوم معروف به روش MTT[1] تعیین شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ میلیگرم در میلی لیتر) به هر یک از خانه های پلیت کشت اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت درون انکوبه قرار داده شد. سپس محلول رویی برداشته شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید اضافه شد. میزان جذب نوری محلول رنگی درون هر خانه در طول موج ۵۴۵ نانومتر ثبت شد. برای اطمینان از صحت داده ها آزمایش در سه نوبت و هر نوبت به صورت سه تایی انجام شد. تعداد سلول های زنده تیمار نشده معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و درصد سلول های تیمار شده نسبت به آن تعیین شد (۲۰، ۲۱).

داده ها پس از گردآوری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱) و با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون توکی برای مقایسه های چند گانه استفاده شد. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شد و میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر عصاره آبی- الکلی بر تکثیر سلول ها

درصد بقاء سلول ها در همه غلظت های عصاره آبی- الکلی به جز در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با درصد زنده بودن سلول های گروه شاهد (۵ ±۱۰۰ درصد) هیچ تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۱).



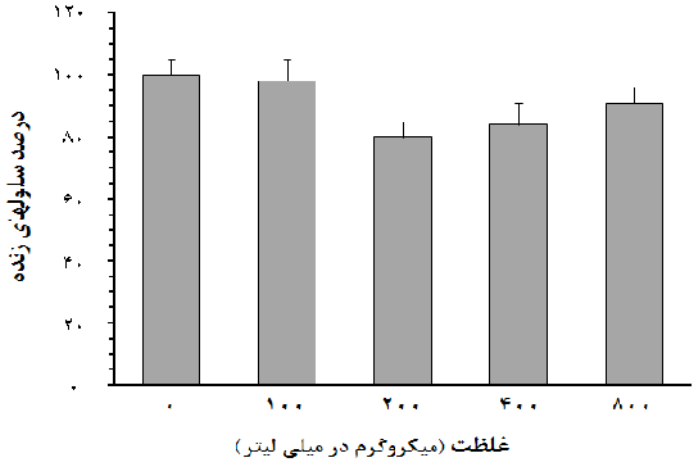
شکل ۱- تأثیر عصاره آبی- الکلی بنفشه بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم. مقادیر بر حسب انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است. علامت * بیانگر p<۰/۰۱ است.

[1] 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide

در حضور غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره، درصد بقاء سلول ها به ترتیب ۸ ± ۸۱، ۱۱ ±۸۵، ۵±۸۸ و ۵±۶۹ ($p<0/01$) درصد بود.

اثر فراکسیون آبی بر تکثیر سلول ها

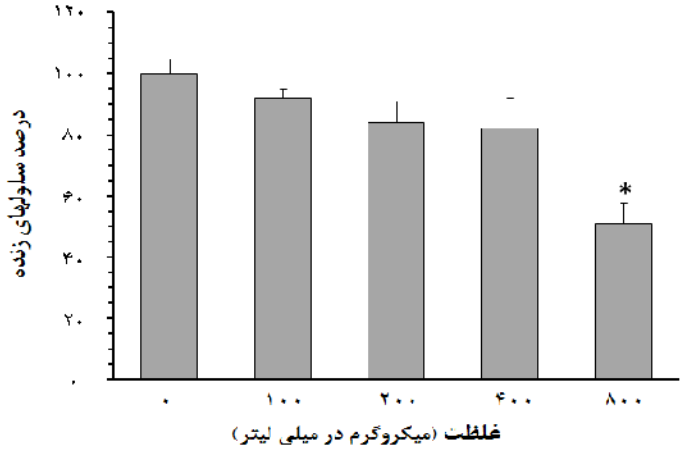
مجاورت سلول ها با فراکسیون آبی، تأثیر معنی داری بر سرعت تکثیر سلول ها نداشت. در مقایسه با سلول های کنترل (۵ ± ۱۰۰ درصد)، میزان سلول های زنده پس از مجاورت با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکسیون آبی به ترتیب شامل ۷ ± ۹۸، ۵ ± ۸۰، ۷ ± ۸۴ و ۵ ± ۹۱ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر فراکسیون آبی بنفشه بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم. مقادیر بر حسب انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است.

اثر فراکسیون ان- بوتانولی بر تکثیر سلول ها

درصد سلول های زنده پس از مجاورت با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکسیون ان- بوتانولی به ترتیب ۳ ± ۹۲، ۷ ± ۸۴ و ۱۰ ± ۸۲ بود که در مقایسه با سلول های کنترل (۵ ± ۱۰۰ درصد) تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳).

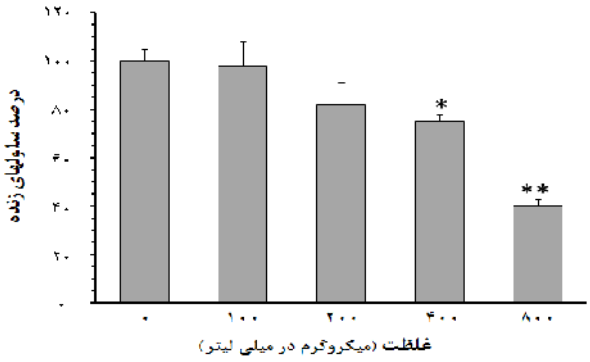


شکل ۳- تأثیر فراکسیون ان- بوتانولی بنفشه بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم. مقادیر بر حسب انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است. علامت * بیانگر $p<0/01$ است.

اثر این فراکسیون تنها در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر معنی دار بود و توانست ۴۹ درصد سلول های زنده را کاهش دهد و به ۷±۵۱ درصد (p<۰/۰۱) برساند.

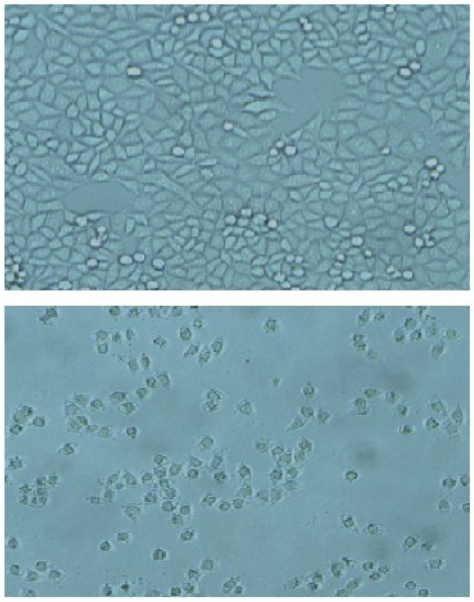
اثر فراکسیون اتیل استاتی بر تکثیر سلول ها

شکل ۴ تأثیر فراکسیون اتیل استاتی بنفشه بر سرعت تکثیر سلول ها را نشان می دهد.



شکل ۴- تأثیر فراکسیون اتیل استاتی بنفشه بر تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم. مقادیر بر حسب انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است. علامت * بیانگر p<۰/۰۵ و علامت ** بیانگر p<۰/۰۰۱ است.

همانگونه که مشاهده می شود درصد سلول های زنده پس از مجاورت با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از این فراکسیون ۱۰±۹۸، ۹±۸۲ بود که در مقایسه با سلول های کنترل (۵ ± ۱۰۰ درصد) تفاوت معنی داری نداشت. اما این فراکسیون قادر بود تکثیر سلولی را در غلظت های ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به ترتیب ۲۵ و ۶۰ درصد کاهش دهد و به ۳ ± ۷۵ (p<۰/۰۵) و ۳±۴۰ (p<۰/۰۰۱) برساند. مشاهدهٔ شکل سلول ها نیز حاکی از دانه دار شدن سیتوپلاسم، تغییر شکل از حالت دوکی به حالت دایره و کنده شدن سلول ها از بستر کشت بود که همه این ویژگی ها تأیید کننده اثر سمی فراکسیون اتیل استاتی بر سلول های مورد نظر است (شکل ۵).



شکل ۵-اثر فراکسیون اتیل استاتی بنفشه بر سلول های رده سرطان گردن رحم. تصویر بالا: سلول های کشت شده در محیط کنترل؛ تصویر پایین: سلول های کشت شده در محیط حاوی ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکسیون اتیل استاتی. بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

بحث

نتایج این مطالعه برای نخستین بار نشان داد که گیاه بنفشه قادر است تکثیر سلول های رده سرطان گردن رحم را مهار کند. این اثر بنفشه در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره آبی- الکلی مشاهده شد که غلظت نسبتاً بالایی است. اما پس از آن که اثر فراکسیون های مختلف تهیه شده از این عصاره روی سلول های مذکور بررسی شد، مشخص گردید که فراکسیون اتیل استاتی قادر است در غلظت کمتر (۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) نیز تکثیر سلول های سرطانی را مهار کند. به علاوه، شدت اثر سمیت سلولی فراکسیون اتیل استاتی بیشتر از دو فراکسیون دیگر یعنی نوع ان- بوتانولی و نوع آبی بود.

تأثیر فراکسیون ان- بوتانولی بسیار شبیه خود عصاره آبی- الکلی بود و فقط توانست در غلظت بالا (۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) اثر سیتوتوکسیک معنی داری نشان دهد. از طرف دیگر، فراکسیون آبی حتی در بالاترین غلظت نیز نتوانست تکثیر سلولی را کاهش دهد. بنابراین در بین سه فراکسیون اصلی این عصاره، فراکسیون اتیل استاتی مؤثرتر از بقیه بود. بنابراین به نظر می رسد که ماده یا مواد مؤثره موجود در عصاره آبی- الکلی گیاه بنفشه بیشتر در فراکسیون اتیل استاتی قرار دارند.

مطالعات نشان داده اند که معمولاً فراکسیون آبی گیاهان، حاوی موادی نظیر گلیکوزیدها[1]، آلکالوئیدها[2] و تانن ها[3]؛ فراکسیون اتیل استاتی حاوی مواد با قطبیت کمتر نظیر فلاونوئیدها[4]؛ و فراکسیون ان- بوتانولی حاوی ترکیباتی نظیر سیکلوتیدها، استرول ها، آلکالن ها و برخی ترپنوئیدها[5] هستند (۱۲، ۲۴-۲۲). اخیراً مقادیر زیادی ساپونین[6]، موسیلاژ[7]، سیکلوتید و فلاونوئید در گیاه بنفشه بنفشه شناسایی شده است (۹، ۱۰، ۲۳، ۲۵). فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنولی هستند که قادرند با مکانیسم های مختلف نظیر القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی، مهار رشد سلولی، مهار فعالیت پروتئین کینازها و جلوگیری از تهاجم سلول ها، اثرات ضد سرطانی ایجاد کنند (۲۶). مطالعات اخیر نشان داده اند که فلاونوئیدهای گوناگون مانند روتین[8] و کرستین[9] در گیاه بنفشه وجود دارد (۱۰). (۱۰). در مطالعه دسچنر و همکاران (۱۹۹۱) که بر روی موش های مبتلا به سرطان کولون انجام گرفت، مشخص شد که رژیم غنی شده با روتین و کرستین می تواند تکثیر سلول های سرطانی را مهار کرده و از وسعت نواحی دیسپلازی در کولون بکاهد (۲۷). همچنین مطالعه یانگ و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که این رژیم غذایی قادر است مرگ برنامه ریزی شده سلولی را در موش هایی که در اثر آزوکسی متان[10] دچار نئوپلازی گسترده کولون شده اند، افزایش دهد (۲۸). نتایج مطالعات فوق در خصوص اثر ضد سرطانی دو فلاونوئید مهم یعنی روتین و کرستین با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت، زیرا در بین فراکسیون های مورد آزمایش بیشترین اثر مهاری بر تکثیر سلول های Hela متعلق به فراکسیون اتیل استاتی بود و همانطور که گفته شد این فراکسیون حاوی موادی نظیر فلاونوئیدها است. از سوی دیگر، در مطالعه ای که نتایج آن اخیراً منتشر شد، نشان دادیم که فراکسیون اتیل استاتی بنفشه سرعت تکثیر سلول های نوروبلاستوما را مهار می کند که این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در مورد تأثیر این فراکسیون بر سلول های رده سرطان گردن رحم همخوانی داشت (۲۹). بررسی های دقیق روی ترکیبات موجود در بنفشه حاکی از وجود تعداد زیادی مواد سیکلوتیدی در این گیاه است. سیکلوتیدها پروتئین های گیاهی کوچکی هستند که در گیاهان مختلف وجود دارند و در مورد تعدادی از آنها اثرات سمیت سلولی گزارش شده است (۱۲، ۲۵). در مطالعه تانگ و همکاران (۲۰۱۰) که روی گیاه بنفشه انجام شد، از فراکسیون ان- بوتانولی آن سیکلوتیدهایی مجزا شدند که توانستند تکثیر سلول سرطانی پروستات، گلیوبلاستومای انسانی و کارسینومای کبدی را مهار کنند (۱۲). این مطالعه تأیید کننده اثر مهاری غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از

[1] Glycosides
[2] Alkaloids
[3] Tanin
[4] Flavonoids
[5] Terpenoids
[6] Saponons
[7] Mucilage

[8] Rutin
[9] Quercetin
[10] Azoxymethane

فراکسیون ان- بوتانولی بنفشه بر تکثیر سلول های Hela است. بنابراین در مجموع می توان گفت که ترکیباتی از بنفشه که حلالیت آنها در آب ناچیز است (نظیر فلاونوئیدها و سیکلوتیدها)، قادرند در محیط کشت، تکثیر سلول های سرطانی رده سرطان گردن رحم را مهار کنند. با جداسازی و تلخیص این مواد و نیز انجام مطالعات تکمیلی می توان از آنها برای ساخت داروهای ضد سرطان مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر استفاده کرد.

نتیجه گیری

عصاره آبی- الکلی بنفشه اثر مهاری بر تکثیر سلول های سرطان گردن رحم دارد. ماده یا مواد مؤثره مسئول این اثر بیشتر در فراکسیون اتیل استاتی این گیاه و تا حدی در فراکسیون ان- بوتانولی آن قرار دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۱۰۳۳۱ و نتایج پیش مطالعه مربوط به پایان نامه آقای تقی قربانی حصاری می باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این طرح را بر عهده داشتند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. World Health Organization. Cancer. Fact Sheets 2012 Feb;N297. Availble at: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html
2. Magné N, Chargari C, Deutsch E, Castadot P, Ghalibafian M, Bourhis J, et al. Molecular profiling of uterine cervix carcinoma: an overview with a special focus on rationally designed target-based anticancer agents. Cancer Metastasis Rev 2008 Dec;27(4):737-50.
3. Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. Anticancer attributes of desert plants: a review. Anticancer Drugs 2012;23:255-71.
4. Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. Int J Pharm Tech Res 2011 Jan-Mar;3(1):298-308.
5. Tavakkol-Afshari J, Hajzadeh MA, Ghorbani A, Parsaie H. Ethanolic extract of Allium sativum has antiproliferative effect on Hep2 and L929 cell lines. Pharmacogn Mag 2006;2(5):29-31.
6. Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food Chem Toxicol 2009 Aug;47(8):1909-13.
7. Tayarani-Najaran Z, Mousavi SH, Asili J, Emami SA. Growth-inhibitory effect of Scutellaria lindbergii in human cancer cell lines. Food Chem Toxicol 2010 Feb;48(2):599-604.
8. Toiu A, Parvu AE, Oniga L, Tamas M. Evaluation of anti-inflammatory activity of alcoholic extract from Viola tricolor. Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi 2007 Apr-Jun;111(2): 525-9.
9. Toiu A, Muntean E, Oniga L, Vostinaru O, Tamas M. Pharmacognostic research on Viola tricolor L. (Violaceae). Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi 2009 Jan-Mar;113(1):246-7.
10. Vukics V, Kery A, Bonn GK, Guttman A. Major flavonoid components of heartsease (Viola tricolor L.) and their antioxidant activities. Anal Bioanal Chem 2008 Apr;390(7):1917-25.
11. Witkowska-Banaszczak E, Bylka W, Matlawska I, Goslinska O, Muszynski Z. Antimicrobial activity of Viola tricolor herb. Fitoterapia 2005 Jul;76(5):458-61.
12. Tang J, Wang CK, Pan X, Yan H, Zeng G, Xu W, et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. Peptides 2010 Aug;31(8):1434-40.
13. Ghorbani A, Javadi Youssofabad N, Rakhshandeh H. Effect of Viola tricolor on pentobarbital-induced sleep in mice. Afr J Pharm Pharmacol 2012 Sep;6(323):2503-9.
14. Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, Norman DG. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. Biochem 1995 Apr;34(13):4147-58.
15. Daly NL, Rosengren KJ, Craik DJ. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. Adv Drug Deliv Rev 2009 Sep 30;61(11):918-30.
16. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med 1953 May;97(5):695-710.
17. Rakhshandah H, Boskabady MH, Mossavi Z, Gholami M, Saberi Z. The differences in the relaxant effects of different fractions of Rosa damascena on guinea pig tracheal smooth muscle. Iran J Basic Med Sci 2010 Summer;13(3):126-32.
18. Ghorbani A, Rakhshandeh H, Asadpour E, Sadeghnia HR. Effects of Coriandrum sativum extracts on glucose/serum deprivation-induced neuronal cell death. Avicenna J Phytomed 2012 Winter;2(1):4-9.

19. Sadeghnia HR, Farahmand SK, Asadpour E, Rakhshandeh H, Ghorbani A. Neuroprotective effect of Lactuca sativa on glucose/serum deprivation-induced cell death. Afr J Pharm Pharmacol 2012 Sep;6(33):2464-71.
20. Rakhshandeh H, Sadeghnia HR, Ghorbani A. Sleep-prolonging effect of Coriandrum sativum hydro-alcoholic extract in mice. Nat Prod Res 2012;26(22):2095-8.
21. Hajzadeh MA, Tavakkol-Afshari J, Ghorbani A, Shakeri MT. Antiproliferative property of aqueous extract of garlic on human larynx tumour and non-tumour mouse fibroblast cell lines. Aust J Med Herbalism 2007 Spring;19:33-7.
22. Seidel V. Initial and bulk extraction. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural product isolation. 2nd ed. New Jersey:Humana Press;2006:27-46.
23. Dominguez M, Keck AS, Jeffery EH, Cespedes CL. Effects of extracts, flavonoids and iridoids from Penstemon gentianoides (Plantaginaceae) on inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-Activated RAW 264.7 macrophage cells and their antioxidant activity. Bol Latin Car Plant Med Aromát 2010;9:397-413.
24. Tian S, Shi Y, Zhou X, Ge L, Upur H. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different Ziziphora clinopodioides Lam extracts. Pharmacogn Mag 2011 Jan;7(25):65-8.
25. Svangard E, Goransson U, Hocaoglu Z, Gullbo J, Larsson R, Claeson P, et al. Cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. J Nat Prod 2004 Feb;67(2):144-7.
26. Kanadaswami C, Lee L, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, et al. The antitumor activities of flavonoids. In Vivo 2005 Sep-Oct;19(5):895-910.
27. Deschner EE, Ruperto JF, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. Carcinogenesis 1991 Jul;12(7):1193-6.
28. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethanol-treated mouse colon. Carcinogenesis 2000 Sep;21(9):1655-60.
29. Mortazavian SM, Ghorbani A. Antiproliferative effect of viola tricolor on neuroblastoma cells in vitro. Aust J Med Herbalism 2012;24:93-6.