

بررسی اثرات سیتوتوکسیک برخی از گیاهان دارویی از تیره‌های نعنائیان، کاسنی، گل سرخ و گل گاو زبان بر لارو آرتیمیا سالینا

احمد رضا گوهری^{۱*}، سودابه سعیدنیا^۱، محمود رضا گوهری^۲، فهیمه مرادی افرایلی^۳، مریم مالمیر^۴، مژگان یزدان پناه^۵، عباس حاجی آخوندی^۵

۱- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۲- استادیار، گروه آمار حیاتی، دانشکده مدیریت و بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی ایران
 ۳- دستیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۴- کارشناس، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۵- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، صندوق پستی: ۶۴۵۱ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۹۵۹۰۹۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: gohari_a@sina.tums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۱۴

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۱۰

چکیده

مقدمه: داروهای سیتوتوکسیک عواملی هستند که به طور مستقیم سلول را نابود می‌نمایند به طوری که بر مراحل مختلف سنتز و فعالیت اسیدهای نوکلئیک اثر می‌گذارند و تقسیم سلولی را مهار می‌کنند. بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های خام گیاهی به روش‌های *in vitro* هزینه کمتری داشته، حساسیت بیشتری دارا بوده و آزمایش در زمان کوتاه قابل انجام است از طرفی مقدار نمونه مورد نیاز برای آزمایش نیز کمتر است.

هدف: در این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک گیاهان دارویی، تعدادی از گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده‌های نعنائیان^۱، گل آفتابگردان یا کاسنی^۲، گاو زبان^۳ و گل سرخ^۴ انتخاب شده‌اند که به صورت وحشی در مناطق مختلف کشورمان ایران می‌رویند و تاکنون مورد مطالعه سیتوتوکسیک قرار نگرفته‌اند.

روش بررسی: به منظور آزمون غربالگری از تست Brine Shrimp Cytotoxicity Bioassay استفاده شده است که به مطالعه اثرات سیتوتوکسیک علیه لارو آرتیمیا سالینا می‌پردازد.

نتایج: گونه *Scutellaria Tornefortii* دارای اثرات کشنده لارو آرتیمیا است و این اثر با افزایش پلاریته عصاره‌ها افزایش می‌یابد به طوری که عصاره متانولی - آبی با $LC_{50} = 6 \mu g/ml$ قوی‌ترین عصاره سیتوتوکسیک در غربالگری حاضر به شمار می‌آید. بنابراین عصاره آبی - متانولی گیاه *Scutellaria Tornefortii* موثرتر از کنترل مثبت (بربرین هیدروکلراید، $LC_{50} = 26 \mu g/ml$) نیز است. عصاره اتیل استاتی گونه *Rubus hyrcanus* دارای $LC_{50} = 28 \mu g/ml$ است و قابل مقایسه با کنترل مثبت یعنی بربرین هیدروکلراید می‌باشد. عصاره‌های اتیل استاتی هر دو گونه *Echium amoenum* و *Onosma bulbotrichum* نیز اثرات سیتوتوکسیک متوسطی نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری: برخی از گیاهان دارویی که به صورت وحشی در شمال ایران پراکنش دارند از جمله *Scutellaria Tornefortii*، *Onosma bulbotrichum* و *Echium amoenum* دارای اثرات کشنده بر لارو میگوی آب شور می‌باشند و می‌توانند به عنوان گیاهان سیتوتوکسیک مورد آزمون‌های اختصاصی تر آنتی کنسر و آنتی تومور قرار گیرند.

گل واژگان: سیتوتوکسیک، *Rubus hyrcanus*، *Scutellaria Tornefortii*، آرتیمیا سالینا

¹ Lamiaceae

² Asteraceae

³ Boraginaceae

⁴ Rosaceae



مقدمه

درمان سرطان به دلیل محدودیت‌های بنیادی در انجام کار بسیار مشکل‌تر از درمان دیگر بیماری‌ها است. مهم‌ترین محدودیت کشتن یا غیرفعال کردن سلول‌های تومور در حضور سلول‌های طبیعی بدون بروز سمیت بر سلول‌های طبیعی است. به منظور دستیابی و تکامل داروهای آنتی‌کانسر از منابع طبیعی نیاز به یک‌سری آزمایش‌های غربالگری^۱ عصاره‌های خام وجود دارد. چندین نوع از عوامل ضدسرطان برای آزمون غربالگری مورد توجه هستند، از آن جمله می‌توان ترکیبات سیتوتوکسیک و ترکیبات موثر بر سیستم ایمنی را نام برد [۱].

داروهای سیتوتوکسیک عواملی هستند که به طور مستقیم سلول را نابود می‌نمایند به عنوان مثال بر مراحل مختلف سنتز و فعالیت اسیدهای نوکلئیک اثر می‌گذارند و تقسیم سلولی را مهار می‌کنند. این عوامل عبارتند از: آنتی‌متابولیت‌ها، متصل‌شونده‌های به DNA، شلات‌کننده‌ها، آلکیل‌کننده‌ها و مهارکننده‌های میتوزی. بسیاری از داروهای سیتوتوکسیک از منابع طبیعی همانند سیکلوسپورین، آلکالوئیدهای وین کریستین و وین‌بلاستین شناسایی شده‌اند [۲].

ارزیابی عصاره‌های خام گیاهی به روش‌های *in vitro* نتایج خوبی در بردارد. از جمله اینکه هزینه کمتری داشته، حساسیت بیشتر دارا بوده، آزمایش در زمان کوتاه قابل انجام است و مقدار نمونه موردنیاز برای آزمایش کمتر است. البته ترکیبات آنتی‌تومور زیادی نیز وجود دارند که با تست‌های فوق شناسایی نمی‌شوند چرا که در رقت‌های بالا به حد کافی قدرت نشان دادن اثراتشان را ندارند. در این مطالعه، برای سنجش اثرات سیتوتوکسیک به روش *brine shrimp cytotoxicity assay* از سیستم‌های گونه‌ای آبری از سخت‌پوستان متعلق به خانواده *Artemidae* به نام *Artemia salina* استفاده شده است. لازم به ذکر است که این گونه خاص از آرتمیا، گونه استاندارد جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک می‌باشد. در سنجش‌های سیتوتوکسیسته سلولی به روش فوق، توانایی مهار رشد سلول یا کشتن آن اندازه‌گیری می‌شود. این روش مزیت‌هایی را بر دیگر روش‌ها به ویژه

سنجش‌های مبتنی بر مکانیسم اثر دار است از جمله این‌که عوامل فعال با هر مکانیسمی که عمل کنند تشخیص داده می‌شوند و از طرفی فقط عواملی تشخیص داده می‌شوند که بتوانند وارد سلول‌ها شده و یا دیواره سلولی را تخریب نمایند [۱].

در این مطالعه تعدادی از گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده‌های نعنائیان^۱، گل‌آفتابگردان یا کاسنی^۲، گاو زبان^۳ و گل سرخ^۴ انتخاب شده‌اند که به صورت وحشی در مناطق مختلف کشورمان ایران می‌رویند و تاکنون مورد مطالعه سیتوتوکسیک قرار نگرفته‌اند. علت انتخاب این تیره‌های گیاهی آن است که تاکنون ترکیبات آنتی‌کانسر و سیتوتوکسیک قابل توجهی از آن‌ها گزارش شده است که از جمله می‌توان به دی‌ترین‌های سیتوتوکسیک جنس سالویا (لابیاته) و آلومیا (آستراسه) اشاره کرد. از طرفی دیگر، اثرات سیتوتوکسیک قوی از سایر گونه‌های موجود در این خانواده‌های گیاهی همچون بوراجیناسه^۵ و لابیاته^۶ و آستراسه^۷ مشاهده شده است [۳،۴،۵،۶].

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده

گیاهانی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند در جدول شماره ۱ آورده شده است.

از تمام گونه‌های فوق پس از جمع‌آوری از رویشگاه طبیعی، دو نمونه هرباریومی از هر گیاه تهیه شده که پس از شناسایی و تعیین نام علمی، یکی در هرباریوم دانشکده داروسازی ساری در مازندران و دیگری در دانشکده علوم دارویی کیوتو در ژاپن نگهداری شده است.

¹ Lamiaceae³ Boraginaceae⁵ *Cordia multispicata*⁷ *Allamanda blanchetii*² Asteraceae⁴ Rosaceae⁶ *Hyphenia salzmannii*¹ Screening

جدول شماره ۱- گیاهان استفاده شده در این مطالعه

نام گیاه	خانواده گیاهی
<i>Scutellaria Tornefortii</i> Benth.	Labiatae (Lamiaceae)
<i>Salvia macrosiphon</i> Boiss.	Labiatae (Lamiaceae)
<i>Stachys byzanthina</i> C. Koch.	Labiatae (Lamiaceae)
<i>Centaurea depressa</i> M. B.	Compositae (Asteraceae)
<i>Echium amoenum</i> Fisch. & Mey.	Boraginaceae
<i>Onosma bulbotrichum</i> DC.	Boraginaceae
<i>Rubus hyrcanus</i> Juz.	Rosaceae
<i>Rubus discolor</i> Weihe & Nees	Rosaceae

عصاره‌گیری

sea salt (که به وسیله پمپ هوادهی شده و در دمای ۳۰ - ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است) تا هنگام پوسته‌اندازی سیست‌ها و تبدیل شدن به لارو فعال انجام گرفته است. لاروهای زنده به گروه‌های ۱۵ تایی شمارش و سپس در چاهک‌های پلیت میکروتیتر (پلیت‌های حاوی ۲۴ چاهک) در محیط آب دریا به میزان ۵۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های ۲۴ تایی تقسیم شدند. ۲۴ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلفی از فراکشن گیاهی (از هر غلظت ۵۰۰ میکرولیتر) به چاهک‌های حاوی لارو فعال، میزان اثر سیتوتوکسیک را با شمارش لاروهای زنده و فعال در هر غلظت در حضور کنترل مثبت (حاوی بربرین هیدروکلراید) و منفی (حاوی آب دریا) سنجیده و این سنجش برای هر غلظت ۳ بار انجام شد. تعیین درصد مرگ و میر در غلظت‌های متفاوت، محاسبه LC_{50} و Confidence interval به روش Probit Analysis انجام شد [۷۸].

نتایج

نتایج مربوط به آزمون سنجش اثرات سیتوتوکسیک در مورد چهار غلظت از هر عصاره گیاهی به صورت میانگین درصد مرگ و میر، LC_{50} و بازه اطمینان^۱ در جداول زیر بیان شده است.

سرشاخه‌های هوایی گیاهان مورد آزمایش در فصل گلدهی آن‌ها جمع‌آوری، در سایه خشک شده و سپس به قطعات کوچکی خرد می‌شود. عصاره‌گیری با حلال‌های هگزان، اتیل استات، متانول و در مورد برخی از گیاهان متانول - آب (۵۰ درصد) به روش پرکولاسیون و به ترتیب افزایش قطبیت، با منظور کردن کلیه پارامترهای موردتوجه برای حفظ تکرارپذیری از جمله تعیین وزن خشک عصاره‌ها و تعیین نسبت وزن عصاره به وزن پودر صورت گرفته است.

آزمون سیتوتوکسیک به روش Brine Shrimp Cytotoxicity Bioassay

برای سنجش اثرات سیتوتوکسیک به روش brine shrimp cytotoxicity assay از سیست‌های گونه‌ای آبی از سخت‌پوستان متعلق به خانواده Artemidae به نام *Artemia salina* استفاده شده است.

ابتدا غلظت‌های مختلف از هر عصاره (چهار غلظت ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در آب مقطر حاوی ۳/۵ درصد از محیط آب دریا^۱ تهیه شده است. در مورد عصاره‌های غیرقطبی از کمک حلال DMSO نیز تا محدوده ۲ درصد استفاده شده است. سپس کشت و پرورش سیست‌های آرتمیا سالینا در محیط حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر

¹ confidence interval

¹ Sea salt



جدول شماره ۲- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Scutellaria Tornefortii*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های انتخابی از هر عصاره (µg/m)				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۴۵	۲۸	۲۱	۱۲	عصاره هگزانی
۲۷۰	۱۱۶	۱۷۷	۹۰	۵۷	۳۰	۱۸	عصاره اتیل استاتی
۴۶	۱۹	۳۰	۱۰۰	۹۶	۵۸	۳۵	عصاره متانلی
۱۸	۲	۶	۱۰۰	۸۳	۷۵	۶۰	عصاره آبی - متانلی

جدول شماره ۳- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Stachys byzanthina*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های انتخابی از هر عصاره (µg/m)				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
۶۰	۲۷	۴۰	۱۰۰	۹۸	۴۷	۲۴	عصاره هگزانی
۱۸۲	۷۶	۱۱۸	۱۰۰	۶۸	۲۸	۱۸	عصاره اتیل استاتی
۱۷	۸	۱۱	۱۰۰	۹۸	۹۵	۴۵	عصاره متانلی
		>۱۰۰۰	۶۳	۳۰	۲۳	۱۵	عصاره آبی - متانلی

جدول شماره ۴- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Salvia macrosiphon*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های انتخابی از هر عصاره (µg/m)				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۴۲	۳۸	۲۶	۱۳	عصاره هگزانی
۵۴۳	۳۲۱	۴۰۱	۹۵	۳۶	۱۳	۴	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۳۱	۲۳	۱۹	۷	عصاره متانلی

جدول شماره ۵- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Centurea depressa*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های انتخابی از هر عصاره (µg/m)				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۳۴	۱۳	۶	۳	عصاره هگزانی
۵۴۱	۴۰۹	۴۸۵	۹۳	۵۵	۱۱	۹	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۱۸	۶	۹	۵	عصاره متانلی



جدول شماره ۶- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Echium amoenum*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های ($\mu\text{g}/\text{m}$) انتخابی از هر عصاره				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۳۹	۳۲	۱۱	۵	عصاره هگزانی
۴۷۵	۳۱۰	۳۹۳	۱۰۰	۵۴	۱۸	۱۳	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۷	۵	۲	۰	عصاره متانلی

جدول شماره ۷- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Onosma bulbotrichum*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های ($\mu\text{g}/\text{m}$) انتخابی از هر عصاره				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۱۸	۱۲	۷	۴	عصاره هگزانی
۵۱۵	۳۶۳	۴۳۹	۱۰۰	۶۱	۸	۴	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۸	۸	۶	۵	عصاره متانلی

جدول شماره ۸- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Rubus hyrcanus*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های ($\mu\text{g}/\text{m}$) انتخابی از هر عصاره				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۱۹	۱۲	۹	۳	عصاره هگزانی
۵۵	۱۴	۲۸	۱۰۰	۷۶	۵۵	۴۲	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۶	۴	۳	۵	عصاره متانلی

جدول شماره ۹- نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف گیاه *Rubus discolor*

CI %95		LC ₅₀	درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های ($\mu\text{g}/\text{m}$) انتخابی از هر عصاره				نام عصاره
Upper	Lower		۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۱۰	
		>۱۰۰۰	۲۵	۱۷	۱۱	۵	عصاره هگزانی
۱۷۸	۸۹	۱۳۴	۱۰۰	۱۰۰	۳۰	۴	عصاره اتیل استاتی
		>۱۰۰۰	۵۲	۹	۷	۲	عصاره متانلی



بحث

اثرات سیتوتوکسیک متوسطی را نشان داده است [۹]. در مورد گیاهان جنس مرزه یا ساتوریا که متعلق به خانواده نعنائیان می‌باشد، پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که اثرات سیتوتوکسیک این گیاهان مربوط به ترکیبات ترپنوییدی و به خصوص تری‌ترین‌های موجود در آن‌ها است که واجد اثرات قوی سیتوتوکسیک هستند. اورسولیک اسید از جمله مهم‌ترین تری‌ترین‌های موثر در این جنس به شمار می‌رود. از مونوترپن‌هایی نظیر تیمول نیز اثرات قوی سیتوتوکسیک گزارش شده است. این ترکیب به ویژه در اسانس و عصاره‌های فرار گیاهان جنس ساتوریا موجود می‌باشند [۸]. هم‌چنین مطالعات قبلی ما، اثرات سیتوتوکسیک بسیار قوی و جالب توجهی از جنس گلپر را نشان می‌دهد که به ترکیبات موجود در روغن فرار این گیاه مربوط می‌شود [۱۰]. در مجموع نتایج حاصل از بررسی اخیر گویای آن است که گیاهان *Scutellaria Tornefortii* و هر دو گونه *Rubus* می‌توانند کاندیدای مناسبی برای مطالعات سیتوتوکسیک بعدی بر رده‌های سلول‌های انسانی باشند، چرا که تاکنون نیز اثرات سیتوتوکسیک خوبی از یک گونه از جنس روبوس به نام *Rubus imperialis* از برزیل گزارش شده است [۱۱]. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود که بررسی فیتوشیمیایی بر گونه *Rubus hyrcanus* که آندمیک کشورمان می‌باشد نیز صورت گیرد که تاکنون مطالعه نشده و به طور بالقوه می‌تواند منجر به جداسازی عوامل سیتوتوکسیک جدیدی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۴۸۷۵ مورخ ۱۳۸۵/۱۲/۵ می‌باشد.

نگاهی به نتایج آزمون سیتوتوکسیک در مورد گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان^۱ نشان می‌دهد که گونه *Scutellaria Tornefortii* دارای اثرات کشنده لارو میگوی آرتیمیا سالینا است و این اثر با افزایش پلاریته عصاره‌ها افزایش می‌یابد به طوری که عصاره متانولی - آبی با $LC_{50} = 6 \mu g/m$ قوی‌ترین عصاره سیتوتوکسیک در غربالگری حاضر به شمار می‌آید. لازم به ذکر است که در مورد کنترل مثبت یا بربرین هیدروکلراید $LC_{50} = 26 \mu g/m$ بوده و بنابراین عصاره آبی - متانولی گیاه *Scutellaria Tornefortii* موثرتر از کنترل مثبت نیز می‌باشد. در مورد گونه *Stachys byzanthina* عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی اثرات سیتوتوکسیک نشان می‌دهند و عصاره متانولی اثرات قوی‌تری ($LC_{50} = 11 \mu g/ml$) نسبت به سایر عصاره‌ها دارد. در مورد گیاه *Salvia macrosiphon* هیچ یک از عصاره‌های هگزانی و متانولی موثر نبوده و فقط عصاره اتیل استاتی آن اثرات سیتوتوکسیک ضعیفی نشان داده است.

در مورد گیاهان متعلق به خانواده کاسنی^۲، اثرات سیتوتوکسیک قابل ملاحظه نیست و تنها عصاره‌های اتیل استاتی اثرات متوسط یا ضعیفی نشان داده‌اند. این وضعیت در مورد گیاهان تیره بوراژیناسه نیز مشاهده می‌شود و فقط عصاره‌های اتیل استاتی هر دو گونه *Echium amoenum* و *Onosma bulbotrichum* اثرات سیتوتوکسیک متوسطی نشان می‌دهند. ارزیابی نتایج آزمون سیتوتوکسیک برای گیاهان تیره گل سرخ این واقعیت را بازگو می‌کند که هر دو گونه *Rubus* دارای اثرات سیتوتوکسیک خوبی در عصاره‌های اتیل استاتی می‌باشند و به ویژه گونه *Rubus hyrcanus* که دارای $LC_{50} = 28 \mu g/ml$ است و قابل مقایسه با کنترل مثبت یعنی بربرین هیدروکلراید می‌باشد.

در گزارش‌های قبلی، ما به بررسی اثرات سیتوتوکسیک برخی از گونه‌های جنس *Achillea* و نیز *Satureja* پرداخته‌ایم. جنس بومادران یا آکیلا که به تیره کاسنی تعلق دارد

¹ Lamiaceae² Asteraceae

1. Hanskell CM. Cancer Treatment. 4th ed. W. B. Saunders Company. USA. 1995, pp: 31 - 57.
2. Rezaeipoor-Kardost R. Cytikines and therapy. Fatemeh University of Medical Sciences. Iran. 1996, pp: 61 - 95.
3. Nino J, Narvaez DM, Mosquera OM and Correa YM. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Braz. J. Microbiol.* 2006; 37: 566 - 70.
4. Scio E, Ribeiro A, Alves TM, Romanha AJ, Dias de Souza Filho J, Cordell GA and Zani CL. Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. *Phytochem.* 2003; 64: 1125 - 31.
5. Badisa RB, Tzakou O, Couladis M and Pilarinou E. Cytotoxic Activities of *Salvia* of the Labiatae Family. *Pharmaceut. Biol.* 2004; 42: 640 - 5.
6. David JP, Meira M, David JM, Brandao HN, Branco A, de Fatima Agra M, Barbosa MRV, de Queiroz LP and Giulietti AM. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatinga* plants. *Fitoter.* 2007; 78: 215 - 18.
7. Mongelli E, Martino V and Coussio J. Screening of Argentine medicinal plants using the Brine Shrimp Microwell Cytotoxicity assay. *Int. J. Pharmacogn.* 1996; 34: 249 - 54.
8. Gohari AR, Hadjiakhoondi A, Sadat Ebrahimi E, Saeidnia and Shafiee A. Cytotoxic terpenoids from *Satureja macrantha* C. A. Mey. *Daru* 2006; 13: 177 – 81.
9. Saeidnia S, Gohari AR, Hadjiakhoondi A, Gohari MR and Moradi F. Cytotoxicity of *Achillea talagonica* Boiss. and *A. tenuifolia* Lam, *Int. J. Biol. Biotech.* 2006; 3: 87 - 9.
10. Saeidnia S, Gohari AR, Hadjiakhoondi A, Afrapoli FM and Shafiee A. Cytotoxicity and chemical constituents of the volatile oil of golpar (*Heracleum persicum* desf. Ex Fischer), *Biosci. Res.* 2005; 2: 107 - 10.
11. Kanegusukuc M, Benassia JC, Pedrosaa RC, Yunesb RA, Filhoc VC, Maiac AA, de Souza MM, Monached FD and Niero R. Cytotoxic, Hypoglycemic Activity and Phytochemical Analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Z. Naturforsch.* 2002; 57c, 272 - 6.

