Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره ۵۵ آذر و دی سال ۱۳۸۵ (۴۹-۴۲)

بررسی سمیت فرآورده گیاهی ACA1 بر رده سلول سرطانی ملانومای انسانی

طوبی غضنفری(Ph.D.)*+ **سمیه شاهرخی**(M.Sc.)** **محسن ناصری** (Ph.D.)***
محمدرضا جلالی ندوشن(Ph.D.)**** **رویا یارائی**(Ph.D.)***** **مژگان کاردر**(M.Sc.)******

چکیده

سابقه و هدف : امروزه از روش‌های درمانی متعددی همانند جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و ایمنی درمانی برای درمان ملانوما بدخیم استفاده می‌شود، ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب همراه با اثرات جانبی نامطلوب می‌باشد. عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع این بیماری محققین را به تلاش جهت دستیابی به داروهای مؤثرتر با اثرات جانبی کم‌تر واداشته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره آبی ترکیب گیاهی ACA1 بر سلول‌های ملانومایی انسان رده SK-MEL3 با الهام از طب سنتی و با استفاده از یک گیاه بومی ایرانی طراحی گردیده است.

مواد و روش‌ها : رده سلولی مورداستفاده از بانک سلولی انستیتوپاستورایران تهیه و تحت شرایط کنترل شده کشت داده شد. پس از چند مرتبه عبور سلول‌ها در فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به صفحات کوچک ۹۶ خانه منتقل گردیدند؛ به طوری‌که در هر خانه ۲۰/۰۰۰ سلول درمحیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS قرار گرفت. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف ACA1 (mg/ml ۰/۰۱ ، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ ، ۱، ۲ و۵) که در RPMI دارای FBS حل شده بود، قرار گرفتند کشت یکسری از سلول‌ها با تمامی شرایط، بدون حضور دارو به عنوان کنترل در فاصله های زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد و میزان اثر کشندگی سلولی با استفاده از آزمون MTT (sigma) بررسی شد.

یافته‌ها : یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ACA1 دارای اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان بر رده سلول سرطانی ملانومای انسان می‌باشد و این اثر با بیش‌ترین غلظت به کار رفته (۵ mg/ml) در ۲۴ ساعت ۴۷ درصد، در ۴۸ ساعت ۶۵ درصد و در ۷۲ ساعت ۷۱ درصد بوده است.

استنتاج : برای نتیجه‌گیری قطعی، انجام مطالعات بیش‌تر بر رده‌های سلولی دیگر و مدل‌های حیوانی و پس از آن مطالعات کارآزمایی بالینی ضروری می‌باشد.

واژه های کلیدی :

* دانشیار گروه ایمنی شناسی، گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ های ایمنی دانشگاه شاهد
+ ✉ تهران : دانشگاه شاهد- دانشکده پزشکی- گروه ایمنولوژی
E-mail : ghazanfari@shahed.ac.ir
** دانش آموخته‌کارشناسی‌ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
*** استادیار گروه فاماکولوژی، گروه تحقیقاتی طب سنتی دانشگاه شاهد
**** دانشیار گروه علوم تشریح و آسیب شناسی دانشگاه شاهد
***** استادیار گروه ایمنی شناسی، گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ های ایمنی دانشگاه شاهد
****** پژوهشگر گروه ایمنی شناسی دانشگاه شاهد

تاریخ دریافت : ۸۴/۴/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۴/۵/۲۲ تاریخ تصویب: ۸۵/۳/۱۰

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

مقدمه

ملانوما تومور بدخیمی است که از ملانوسیت‌ها یا خال‌های تغییر شکل یافته ایجاد می‌شود(۵-۱)، ملانومای بدخیم ۲ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود ولی عامل ۱ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان است(۷،۶،۲). در آمریکا هرسال تقریباً ۵۰۰۰۰ مورد جدید از این بیماری گزارش می‌شود و شیوع آن نسبت به دیگر سرطان‌ها بسیار افزایش داشته است(۹،۸) شیوع این بیماری در مردان و زنان تقریباً یکسان است(۱۰،۹،۶). از عوامل مستعدکننده این بیماری داشتن نژاد سفید، در معرض آفتاب شدید قرار گرفتن، سابقه خانوادگی، ژنتیک، سابقه ملانومای قبلی،سرکوب ایمنی و خال‌های غیرطبیعی است(۶،۹،۱۰،۱۱).

تلاش‌های متعددی جهت درمان مؤثر این بیماری انجام شده است(۸) و روش‌های درمانی آن شامل جراحی(۱۲،۹،۷)، شیمی درمانی(۱۴،۱۳،۱۲،۶)، پرتودرمانی (۱۵،۶تا۱۸)، هورمون درمانی(۱۲،۹،۶) و ایمنی درمانی(۹،۷) می‌باشد. در نوع موضعی بیماری، جراحی مؤثرترین روش درمانی‌است(۱۳،۷،۶)،ولی این نوع بدخیمی معمولاً متاستاتیک می‌شود که بیانگر اهمیت سایر روش‌های درمانی است(۱۳). علی‌رغم مقاوم بودن ملانوما نسبت به اشعه ،گاهی اوقات پرتودرمانی راه مؤثری برای درمان فرم موضعی بیماری است(۹،۸،۶)، همچنین درچند مطالعه (۲۰،۱۹،۶) از هورمون‌ها یا عوامل شبه هورمونی مثل تاموکسیفن در درمان ملانوما استفاده شده است اما اهمیت این روش‌درمانی هنوزکاملاًمشخص نیست(۱۲،۶). ایمنی درمانی به روش‌های مختلف غیر اختصاصی با استفاده از لوامیزول(۶) ، BCG (۲۱،۶)، کورینه باکتریوم پاوروم(۲۲،۸) و روش‌های اختصاصی مثل واکسن‌ها (۲۴،۲۳) و اینترفرون(۸) درکارآزمایی‌های متعدد مورد استفاده قرار گرفته است، عوامل دیگری مثل Megestrol acetate (۲۵) ، و ویتامین A (۲۶) نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

شیمی درمانی سیستمیک اغلب تنها راه حل است اما فقدان سمیت انتخابی اغلب منجر به بروز عوارض جانبی غیر قابل تحمل می‌شود(۱۱).

غیر از استفاده از درمان‌های رایج ذکر شده، استفاده از گیاهان دارویی در درمان سرطان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی‌بومی انجام‌گردیده(۲۸تا۳۱) و اثر داروهای گیاهی بر انواع رده‌های سلول‌های سرطانی(۲۷،۳۲) از جمله رده سرطانی ملانوما (۳۳،۲،۱) مورد ارزیابی قرار گرفته است. در گروه ایمنی شناسی دانشگاه شاهد مطالعاتی جهت شناسایی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بومی ایران آغاز شده و در دست انجام است. ACA-1 یک فرآورده گیاهی است که در طب سنتی ایران به‌عنوان دافع سموم سرطان‌زا ذکر شده است (۳۴تا۳۶)، فرآوردهای با فورمولاسیون خاص با الهام از طب سنتی ایران توسط اساتید دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد از این گیاه تهیه و پس از انجام آزمایش‌هایی با شماره ۳۲۵۰۳ در اداره ثبت مالکیت‌های صنعتی به عنوان اختراع واکتشاف ثبت گردیده است. در مطالعه‌ای باصری، غضنفری و همکاران (۱۳۸۴) اثر ACA1 را بر رده سلول‌های سرطانی آدنوکارسینوم معده (AGS) مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که این فرآورده گیاهی سلول‌های AGS را به طور انتخابی نسبت به سلول‌های L929 از بین می‌برد(۳۷). در این تحقیق اثر سمیت سلولی عصاره آبی گیاهی ACA1 بر رده سلول سرطانی ملانومای انسانی (SK-MEL3) مورد مطالعه قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

مواد و روش ها

تهیه عصاره آبی فرآورده گیاهی ACA1

ACA1 از اندام هوایی گیاه به صورت عصاره آبی تهیه گردیده است. محلول ۱۰ mg/ml ACA1 در محیط RPMI (از شرکت sigma) تهیه و با استفاده از فیلتر میلی پور (0.02) استریل شد و تا زمان مصرف در یخچال نگه داری گردید.

کشت سلول

رده سلول سرطانی ملانومای انسانی SK-MEL3 از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. سلول‌ها در فلاسک‌های ۵۰ml حاوی ۵ml محیط کشت کامل از شرکت sigma (RPMI-FBS 10%) کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ $^{\circ}C$ حاوی CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. هر ۲۴ ساعت یک بار تعویض محیط صورت می‌گرفت. بعد از ۳-۴ روز از کشت اولیه در زیر میکروسکوپ معکوس تراکم سلولی بررسی و در صورت نیاز سلول‌ها در فلاسک‌های جدید عبور داده می‌شدند(۳۳).

سنجش میزان سمیت سلولی

تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از صفحات کوچک ۹۶ خانه کشت داده شد و حجم نهایی هر چاهک با استفاده از RPMI حاوی FBS 10% (از شرکت sigma) به ۲۰۰ میکرولیتر رسید و به مدت یک شب در انکوباتور حاوی CO2 درصد ۵ درصد نگه داری گردید، سپس مایع رویی هر چاهک خارج و غلظت‌های مختلف از عصاره ACA1 به آن اضافه شد (۰/۰۱ mg/ml ، ۰/۰۲ ، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ ، ۱ ، ۲ و ۵)، برای هرغلظت سه چاهک اختصاص داده شد. ۵ چاهک نیز به عنوان کنترل بدون دارو مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با مقادیر مختلف عصاره انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، آزمون MTT انجام شد(۳۲،۳۱،۲) بدین صورت که ابتدا از پودر زرد رنگ MTT (از شرکت sigma) محلول ۵mg/ml تهیه وسپس ۲۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های میکروپلیت اضافه نموده و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه گردیدند. در این مدت رنگ MTT جذب میتوکندری شده و تبدیل به کریستال‌های بنفش رنگ می‌گردد. سپس مایع رویی هر چاهک را خارج نموده و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اسیدی جهت حل کردن کریستال‌ها وکالریمتری اضافه گردید. پس از چند دقیقه که کریستال‌های کف چاهک به طور کامل حل شد، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰ nm با دستگاه خواننده الیزا ثبت گردید.

جذب نوری ثبت شده توسط دستگاه خواننده الایزا با استفاده از فرمول زیر به درصد مرگ سلولی تبدیل شد(۳۸).

$$\text{درصد مرگ سلولی} = \left(1 - \frac{\text{جذب تست}}{\text{جذب کنترل}}\right) \times 100$$

تمامی آزمایشات سه مرتبه تکرار گردید.

روش‌های آماری

با توجه به داشتن مقادیر مختلف و زمان‌های مختلف، ازآزمون‌آماری ANOVA برای به‌دست‌آوردن واریانس داده‌ها و از آزمون آماری ویلکاکسون wilcoxon جهت تعیین‌معنی‌دار بودن یا نبودن اختلافات استفاده گردید. سطح معنی‌دار بودن اختلافات $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

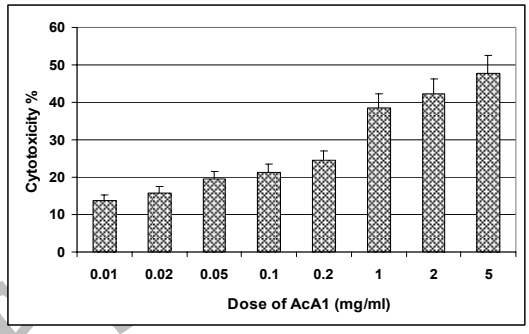
همان‌گونه که نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد به دنبال انکوباسیون ۲۴ ساعته غلظت‌های مختلف عصاره

Archive of SID

www.SID.ir

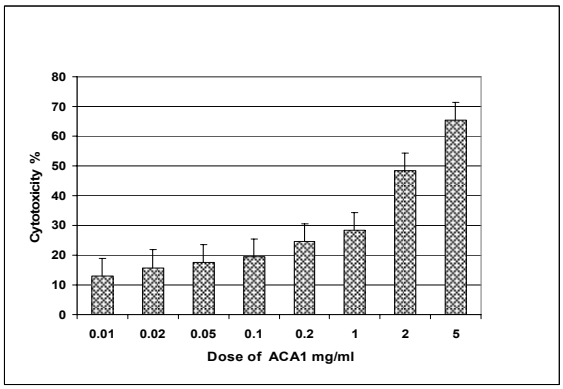
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

آبی ACA1 با سلول‌های سرطانی، بیشترین میزان سمیت سلولی توسط غلظت‌های ۵ mg/ml و ۲ این عصاره مشاهده شد. میزان این کشندگی برای غلظت‌های فوق به ترتیب ۴۷/۶۶ و ۴۲/۱۳ درصد می‌باشد (نمودار شماره ۱).



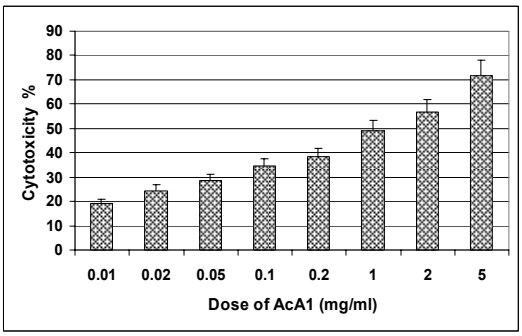
نمودار شماره ۱ : درصد مهار رشد سلول‌های SK-MEL3 پس از ۲۴ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ACA1

نتایج به دست آمده همچنین نشان می‌دهند که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌های SK-MEL3 با غلظت‌های مختلف فرآورده ACA1 ، غلظت‌های بالای این عصاره یعنی مقادیر ۵ mg/ml و ۲ به ترتیب موجب ۴۶ و ۶۵ درصد مرگ سلولی شده‌اند (نمودار شماره۲).



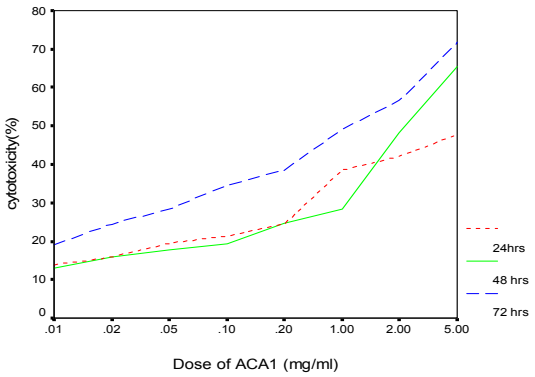
نمودار شماره ۲ : درصد مهار رشد سلول‌های SK-MEL3 پس از ۴۸ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ACA1

انکوباسیون ۷۲ ساعته این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ACA1 نیز بیانگر سمیت سلولی وابسته به غلظت این ترکیب می‌باشد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره، میزان بیشتری از سلول‌ها از بین رفتند. سمیت سلولی غلظت‌های ۵ mg/ml و ۲ به ترتیب ۵۶ و ۷۱ درصد بوده است.



نمودار شماره ۳ : درصد مهار رشد سلول‌های SK-MEL3 پس از ۷۲ ساعت مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ACA1

با توجه به اطلاعات به دست آمده مبنی بر این که کشندگی سلولی ACA1 وابسته به‌غلظت و زمان می‌باشد، به منظور مقایسه این ویژگی در زمان‌های مختلف و اطمینان از این‌که هر غلظت تا چه زمانی این ویژگی را حفظ می‌کند، در نمودارشماره۴ درصد مرگ سلول‌های سرطانی ملانوما در زمان‌های ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت انکوباسیون با هم مقایسه شد. آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری را بین زمان‌های مختلف نشان داد($P\leq0/05$) .



نمودار شماره ٤ : مقایسه درصد مهار رشد سلول‌های SK-MEL3 در اثر مجاورت با مقادیر مختلف عصاره ACA1 در زمان‌های ۲۴،۴۸، ۷۲ساعت انکوباسیون

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

بحث

ملانوما تومور بدخیمی است که از تغییر شکل وتکثیر ملانوسیت‌ها که به طور طبیعی در لایه سلولی پایه اپیدرمیس قرار دارند، ایجادمی‌شود(۹،۲،۱). مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر افزایش شیوع این بیماری بدخیم است(۱۰،۹). روش‌های درمانی متعددی همانند جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و ایمنی درمانی برای درمان ملانوما بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد(۹،۶).

ACA1، یک فراورده گیاهی است که بر مبنای کاربرد آن درطب سنتی با احتمال اثر ضدسرطانی توسط ناصری در گروه داروشناسی دانشگاه شاهد تهیه گردیده است. در این مطالعه اثر آن بر رده سلولی ملانومای انسانی SK-MEL3 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار mg/ml ۰/۰۱ از عصاره آبی ACA1 در یک دوره کشت ۲۴ ساعته می‌تواند موجب کشتن ۱۰ درصد سلول‌های توموری فوق گردد، این میزان به ترتیب با افزایش مقدار ACA1 بیش‌تر شده تا جایی که mg/ml ۵ از ترکیب فوق این عدد را تا حدود ۴۸ درصد افزایش می‌دهد. انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها در مجاورت دارو با غلظت 5mg/ml باعث مرگ ۶۵ درصد سلول‌ها می‌گردد. در ۷۲ ساعت انکوباسیون کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت استفاده شده شامل mg/ml ۰/۰۱ و mg/ml ۵ به ترتیب باعث ۱۹/۱۳ درصد و ۷۱/ ۷۵ درصد درصد مرگ سلولی شده‌اند.

در مورد اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بومی در کشورهای مختلف مطالعات متعددی صورت گرفته است(۲۸تا۳۱) تا جایی که برخی از گیاهان بومی کاربرد درمانی برای برخی سرطان‌ها پیدا نموده‌اند برای مثال در ژاپن گیاه juzen-taiho-to در درمان سرطان بسیار مورد استفاده قرار گرفته است(۳۱). همچنین اثر داروهای گیاهی مختلف بر رده‌های سلول‌های سرطانی از جمله ملانوما مورد ارزیابی قرار گرفته است(۳۳،۲،۱).

در گروه ایمنی شناسی دانشگاه شاهد مطالعه‌ای هدفمند جهت شناسایی ترکیبات ضد سرطانی و ایمونومدولاتوری گیاهان دارویی بومی ایران با تکیه بر استفاده‌های کاربردی از این گیاهان در طب سنتی و همچنین گزارش‌های علمی جدید در دست انجام است. اثر فرآورده گیاهی ACA1 بر رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) توسط همین گروه ارزیابی و نشان داده شد که غلظت‌های مختلف از این ترکیب برای سلول‌های سرطانی‌فوق سمیت بالایی داشته و این میزان با افزایش زمان و غلظت ارتباط مستقیم داشته است. درحالی‌که این اثر برای سلول‌های استاندارد L929 تنها در غلظت‌های بسیار بالا مشاهده شده است(۳۷). نتایج این مطالعه نیز با مطالعه فوق همخوانی دارد. این مطالعات جای امیدواری برای دستیابی به موادی که به طور اختصاصی سلول سرطانی را مورد هدف قرار دهند، فراهم آورده است. این نتایج پیشنهاد می‌کندکه مطالعات بیش‌تری درخصوص اثرات ACA1 بر رده‌های سلولی طبیعی و سپس در مدل‌های حیوانی انجام گردد و در نهایت با کارآزمایی بالینی در انسان اثرات دقیق آن مشخص شود، تا ضمن اثبات اثرات آن در انسان، بامطالعات بیش‌تر و جداسازی و شناسایی مواد مؤثره ضدسرطانی در آنها، اقدام به فرمولاسیون‌های دارویی خاص نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

فهرست منابع

1. Leite V.C, Santos RF, Chen LC, Guillo LA. Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line. ***J Photochemistry and photobiology,*** B; Biology, 2004; 76: 49-53.
2. Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. A study of the role of cell cycle events mediating the action of comarian derivatives in human malignant melanoma cells, ***cancer letters,*** 2004; 214: 43-54.
3. Porta G, Misuraca G, Median related metabolites: a new look at their functional role, melanogenesis malignant melanoma, ***Proc.Int.Symp.***1995;10:49-59.
4. Denkert C , Kobel M, Berger S, Siegert A, Lecere A, Trefzer U, Hauptman S. Expression of cyclo oxygenase in human malignant melanoma, ***cancer research,*** 2001; 61: 303-308.
5. Hossini AM,Eberle J,Fecker LF, Orfanos CE, Geilen C. Conditional expression of exogenous BCL-Xs triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenograft, ***FEBS Letters,*** 2003; 553: 250-256.
6. Molife R, Hancock BW, Adjuvant therapy of malignant melanoma , ***Critical reviews in oncology/hematology,*** 2002; 44: 81-102.
7. Rosenthal SN, Bennet JM. ***Practical cancer chemotherapy.***Medical Examination Publishing Co, Inc, new york, 1981: 373-382.
8. Pawilk TM, Sondak VK, Malignant melanoma: current state of primary and adjuvant treatment. ***Critical reviews in oncology /hematology,*** 2003; 45: 245-264.
9. Braud FD, Khayat D, Kroon BR, Valdagni R, Bruzzi P, Scinelli NC, Malignant melanoma, ***Critical reviews in oncology /hematology,*** 2003; 47: 35-63.
10. Mackie RM, Incidence, Risk factors and prevention of melanoma, ***European journal of cancer,*** 1998; 34(2): 3-6.
11. Mackie RM, ***Skin cancer.*** Martin Dunitz ltd. London. 1989: 178-201.
12. Rubin Ph, Clinical oncology for medical students and physicians, ***American cancer society,*** Inc, 1983: 190-197.
13. Jordan AM,Khan T,Osborn HM, Photiou A,Riley PA.Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): Development of a targeted treatment for malignant melanoma.
14. Retsas S, Adjuvant therapy of malignant melanoma: is there a choice?, ***critical reviews in oncology /hematology,*** 2001; 40: 187-193.
15. Nield DV, Saad MN, Khoo CT, Lott M. Tumor tickness in malignant melanoma : the limitation of frozen section, ***Br J Plast Surg,*** 1988; 41: 403-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

16. Balch CM, Buzaid AC, Soon SJ, Atkins MB, Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. ***J Clin Oncol,*** 2001; 19: 3635-48.
17. Creagan ET, Cupps RE, jvins JC. Adjuvant radiation therapy for regional nodal metastasis, from malignmant melanoma: a randomized, prospective study, ***cancer,*** 1978: 2206-10.
18. Kian A,Byers RM,Regional radiotherapy as adjuvant treatment for head and neck malignant melanoma, ***Arch otolaryngology head neck surg,*** 1990; 116: 169-72.
19. Nesbit RA, Woods RL, Tattersall MHN, Fox RM, Tamoxifen in malignant melanoma, ***N Engl J Med,*** 1979; 301: 1241.
20. Fisher RI, Young RC , Lippman ME, Diethylesterol therapy of surgically nonresectable malignant melanoma. ***Proc Am Soc Clin Oncol ,*** 1978; 19: 339.
21. Terry WD, Immunotherapy of malignant melanoma, ***N Engl J Med,*** 1980; 303: 1174-5.
22. Halpern BN,Biozzi G,Stiffel C,Iinhibition of tumor growth by adminstartion of killed corynebacterium parvum, ***Nature,*** 1996; 212: 853-4.
23. Mortan DL, Eilber FR, Holmes EC ,et al, Preliminary results of arandomised trial of adjuvant immunotherapy in patients with malignant melanoma who have lymph node metastases. ***Aust Nz J Surg,*** 1978; 48: 49-52.
24. Mortan DL, Foshag LJ, Hoon D, Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. ***Ann Surg,*** 1992; 216: 463-82.
25. Barth A,Morton DL, The role of adjuvant therapy in melanoma management,***cancer,*** 1995; 75: 726-34.
26. Wolbach S, Howe P. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. J Exp Med, 1925; 42: 753-78.
27. Lian Z, Niwa K, GAO J, Tagmai K, Mori I, Tamaya T. Association of cellular apoptosis with anti tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistance cancer cell line, ***cancer detection and prevention,*** 2003; 27: 147-154.
28. Utsuyama M, Seidlar H, Kitagawa M, Hirokawa K, Immunological restoration and antitumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice, ***mechanism of aging and development,*** 2001; 122: 334, 352.
29. Galati G, Brien P, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemo preventive and anticancer properties, ***free radical biology&medicine,*** 2004; 17(3): 287-303.
30. Drasor P, Moravcova J, Recent advances in analysis of Chinese herbal medical plants and traditional medicine, ***Journal of chromatography,*** 2004; 812: 3-21.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 6:47 +0330 on Sunday September 24th 2017

۳۴. خراسانی عقیلی، مخزن الادویه، قرن یازدهم. انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی تهران، ۱۳۵۵.

۳۵. حسین محمدمومن، طحفه حکیم مومن، کتابفروشی محمودی، تهران ۱۳۷۶.

۳۶. ابوعلی سینا شیخ الرئیس، القانون فی الطب، قرن چهارم. ترجمه عبدالرحمان شرفکندی، انتشارات سروش، تهران ۱۳۷۰.

۳۷. باصری،غضنفری، پایان‌نامه دکتری عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، ۱۳۸۴.

38. Sundartan SG, Milner JA,Impact of organs compounds in garlic oncanine mammary tumor cells in cultures. ***Cancer letters,*** 1993; 174: 85-90.

31. Sakai I, A Kampo medicine“Juzen-taiho-to” prevention of malignant progression ans metastasis of tumor cells and the mechanism of action. ***Biol Pharm Bull,*** 2000; 23: 677-88.

32. Motoo Y, Sawaba N, Antitumor effect of saikosaponins and baicalin on human hepatoma cell line, Cancer letters, 1994; 86(1): 91-95.

33. Petri-fink A, Chastella M, Juillerat-Jeanneret L, Ferrari A, Hofman H. Development of functionalaized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells, Biometrials, 2004; 5: 1-10.

Archive of SID

www.SID.ir