

Cytotoxic Effect of Methanolic Extract of Papaver rhoeas L. on Vero Cell Line and Its Antioxidant Activity

Mohammad Shokrzadeh¹,
Emran Habibi²,
Mona Modanloo¹,
Somaye Hesami³

¹ Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ MSc Student in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 15, 2016 ; Accepted February 1, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Papaver rhoeas* L (family: Papaveraceae) is commonly known as corn poppy. Recent studies have revealed that *Papaver rhoeas* L extract has cytotoxic, genotoxic, and antioxidant effects. The present study aimed at evaluating the cytotoxic effect and antioxidant activity of *Papaver rhoeas* L. methanolic extract on monkey kidney carcinoma cell lines (Vero).

Materials and methods: Methanolic extract of *Papaver rhoeas* L. was prepared by maceration method. Cultivated cell line Vero was incubated with different concentrations (0, 10, 50, 100, 500, and 1000 µg/ml) of the extract for 72 hours and cell growth inhibition was determined using MTT assay. The antioxidant capacity was assessed using two methods: DPPH and ferric reducing ability of plasma (FRAP). The total phenolic and flavonoid contents were also determined.

Results: The IC₅₀ of cisplatin, as a common drug, is significantly lower than that of the *Papaver rhoeas* L. (IC₅₀= 15.96±0.26 µg/ml). Our results showed that *Papaver rhoeas* L. extract caused a significant decrease in proliferation in monkey kidney cancer cell line (IC₅₀=80.07 µg/ml). The scavenging effect of the extract on DPPH[•] radical was found to be 5.74 µg/ml. The extract's ferric reducing ability of plasma was 2.663 ± 0.002 µg/ml. Also, the extract had more total phenolic content rather than flavonoid contents.

Conclusion: This study showed that methanolic extract of *Papaver rhoeas* L. has potent cytotoxic effect on cancer cell line Vero and considerable antioxidant activity. But further investigations are required to identify efficient compounds and molecular mechanism of this extract so that effective steps could be taken towards finding new drugs in treatment of diseases.

Keywords: *papaver rhoeas*, cancer cell line, MTT assay, antioxidant activity, DPPH, FRAP

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره متانولی گیاه *Papaver rhoeas* L. بر روی رده سلولی سرطانی Vero و فعالیت آنتی اکسیدانی آن

محمد شکرزاده^۱عمران حبیبی^۲منا مدانلو^۱سمیه حسامی^۳

چکیده

سابقه و هدف: گیاه شقایق وحشی (*Papaver rhoeas*) از تیره خشخاش (Papaveraceae) با نام شقایق سرخ (Corn poppy) معروف است. مطالعات اخیر نشان داده که عصاره شقایق وحشی اثرات سیتوتوکسیسیته، ژنوتوکسیسیته و آنتی اکسیدانی دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سیتوتوکسیسیته عصاره متانولی گیاه شقایق وحشی بر روی رده سرطانی کلیه میمون و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره این گیاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره متانولی به روش خیساندن (Maceration) تهیه شد و سپس اثرات محلول‌های حاوی نمونه با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از هر عصاره تهیه بر روی رده سرطانی کلیه میمون توسط متد سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم (MTT) بررسی شد. فعالیت آنتی اکسیدانی با دو روش مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت: روش به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت تام آنتی اکسیدانی پلاسما (FRAP) علاوه بر آن محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی نیز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: یافته‌ها حاکی از آن است که میزان IC₅₀ داروی سیس پلاتین به عنوان یک داروی رایج در بازار به طور معنی‌داری کم‌تر از گیاه شقایق وحشی است (میکروگرم/ میلی‌لیتر ۰/۲۶ ± ۱۵/۹۶). عصاره گیاه *Papaver rhoeas* سبب کاهش معنی‌دار رشد سلول سرطانی کلیه میمون گردید (میکروگرم/ میلی‌لیتر ۸۰/۰۷ = IC₅₀). در بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره اثر به دام اندازی رادیکال DPPH، عصاره گیاه معادل ۵/۷۴ میکروگرم در میلی‌لیتر را از خود نشان داد. قدرت تام آنتی اکسیدانی پلاسما عصاره میزان ۰/۰۰۲ ± ۲/۶۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. هم‌چنین عصاره دارای محتوای تام فنلی بیشتری نسبت به محتوای تام فلاونوئیدی بود.

استنتاج: نتایج نشان داد که عصاره متانولی شقایق وحشی یک ترکیب سیتوتوکسیک موثر بر روی رده سلول سرطانی کلیه میمون و دارای اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجه می‌باشد، جهت یافتن ترکیبات شیمیایی موثر و مکانیسم‌های مولکولی موجود در عصاره گیاه تحقیقات بیش‌تر ضروری می‌باشد تا گامی در جهت یافتن و طراحی داروهای جدید و موثر در درمان بیماری‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: *papaver rhoeas* رده سلول سرطانی، MTT، آنتی اکسیدان، FRAP، DPPH

مقدمه

امروزه سرطان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع بشری است (۱). اگرچه درمان‌های رایج کنونی توانسته‌اند پیش‌آگاهی مبتلایان به سرطان را بهبود بخشند، اما بسیاری از تومورها به اقدامات درمانی کنونی

مؤلف مسئول: سمیه حسامی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیام‌اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: Somayehhesami78@yahoo.com

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی/فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. استادیار، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲

پاسخ نمی‌دهند (۲). بنابراین تلاش برای یافتن داروهای موثرتر و با عوارض جانبی کمتر ادامه دارد. گیاهان از دیرباز به عنوان منبع ارزشمندی برای پیدا کردن داروهای جدید محسوب می‌شدند (۴،۳). کشت سلولی در علم توکسیکوفارماکولوژی به منظور بررسی *In vitro* تمامی ترکیبات طبیعی و سنتتیک و ... پیشرفت شگرفی را پیدا کرده است (۸-۵). همچنین تولید رادیکال آزاد و گونه‌های واکنشگر اکسیژن در فرآیند متابولیسم به علت پتانسیل بالا در تخریب درشت مولکول‌های زیستی مانند DNA، پروتئین‌ها و چربی‌ها یکی از عوامل اصلی پیری و بیش از یکصد نوع بیماری مختلف در بدن محسوب می‌شود (۹،۱۰). گیاه شقایق وحشی با نام علمی *Linn Papaveraceae* از تیره خشخاش یا *Papaver rhoeas* می‌باشد (۱۱). از عصاره این گیاه اثرات آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیسیته و ژنوتوکسیسیته در رده‌های سلولی لنفوبلاستوئیدی انسان (TK6) گزارش شده است (۱۲). با توجه به این‌که تاکنون تحقیق مشابهی از گونه *Papaver rhoeas* در ایران بر روی رده سلول‌های سرطانی Vero و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه انجام نشده، لذا ما اثرات عصاره متانولی شقایق وحشی را به منظور مهار رشد سلول موردنظر و تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر فنل و فلاونوئید کل، مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی (Experimental) نمونه گیاه در اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ از استان مازندران جمع‌آوری گردید، گونه و نوع گیاه، با نمونه هرباریومی دانشکده داروسازی ساری مطابقت و توسط متخصص مربوطه تایید شد. سپس گیاهان در سایه به مدت ۵ روز و پس از حرارت مصنوعی ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته کاملاً خشک گردیدند. گیاه خشک شده به اندازه ذره‌ای با مش ۱۰۰ توسط آسیاب معمولی خرد گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده به روش

خیساندن (Maceration) با مقدار ۲۰۰ سی‌سی متانول خالص عصاره‌گیری و با دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۵۰ درجه تغلیظ شد. و با انتقال به انکوباتور خشک گردید.

جهت بررسی اثر سیتوتوکسیسیته و انجام کشت سلولی رده سلول سرطانی کلیه میمون (Vero) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM که با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیروات ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ g/l سدیم بی‌کربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین که در انکوباتور (BINDER, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد. پس از رشد ۷۰ درصدی سلول‌ها، توسط تریپسین-اتیلن دی‌آمین تتراسدیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد (۱۳). سنجش میزان سمیت سلولی با روش رنگ‌سنجی MTT انجام شد. در این روش میزان ۲۰ μl محیط کشت حاوی ۱۰^۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شد، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های مختلف از عصاره مورد نظر (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) میکروگرم در میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد و طی ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از طی زمان مذکور به هر چاهک پلیت ۲۰ μl MTT (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت چهار ساعت دیگر در تاریکی انکوبه شد. سپس محیط کشت به دقت خارج شده و به هر خانه پلیت ۲۰ μl محلول DMSO رقیق شده جهت حل کردن فورامازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا در طول

محول را بمدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. جذب نمونه‌ها را در طول موج ۷۵۶ نانومتر قرائت نمودیم. از اسید گالیک (غلظت ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و میزان کل فنل بر مبنای اسید گالیک در هر میلی‌گرم عصاره خشک محاسبه شد. برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری گردید. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در بالا بود اما به جای عصاره، همان حجم متانول ۸۰ درصد به آن اضافه شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. نهایتاً آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۶ و به روش ANOVA و T-test انجام شد.

یافته‌ها و بحث

استفاده از کشت سلولی در سم‌شناسی و فارماکولوژی شرایطی را برای تحقیق در انواع مواد دارویی و روش‌های جدید به وجود آورده است (۱۸). طی این مطالعه میزان IC₅₀ عصاره متانولی گیاه شقایق وحشی برای سلول‌های سرطانی Vero، $80/07 \pm 2/52$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای داروی سیس‌پلاتین $15/96 \pm 0/26$ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده در رده سلولی Vero، میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (viability%) پس از مواجه با عصاره متانولی گیاه شقایق وحشی و اتمام تست MTT تعیین گردید (نمودار شماره ۱).

جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش‌های به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH، تست قدرت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما (FRAP) و سنجش محتوای تام فنل و فلاونوئید برای ارزیابی این فعالیت گیاه استفاده

موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد (۱۵،۱۴). درصد بقای سلولی با تقسیم جذب نوری تست بر جذب نوری کنترل در برابر غلظت عصاره حاصل گردید. جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی روش رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) انجام شد. بدین منظور ۱ گرم از عصاره تام را در ۱ میلی‌لیتر از متانول ۹۵ درصد حل شد و سپس از محلول ۱۰۰۰ mg/ml بدست آمده، غلظت‌های مختلف شامل ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰ تهیه شد. $200 \mu\text{M}$ از DPPH در اتانول بصورت محلول در آورده، به هر غلظت هم حجم خودش محلول DPPH اضافه گردید. پس از مخلوط کردن بمدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و از اسیدآسکوربیک $20 \mu\text{g/ml}$ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و درصد به دام‌اندازی رادیکال آزاد با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$R\% = A_c - A_s / A_c \times 100$$

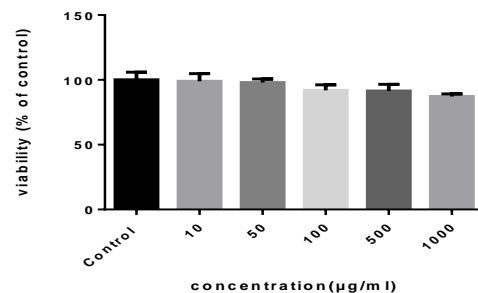
$R\%$ = درصد به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد،
 A_c = جذب کنترل، A_s = جذب نمونه‌ها یا استاندارد جهت بررسی قدرت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما (FRAP) به ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاه ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و در دمای 30°C انکوبه شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP)، بعد از گذشت زمان ۴، ۳۰ و ۶۰ دقیقه خوانده شد. هم‌چنین از محلول آبی $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ با غلظت‌های مختلف برای رسم نمودار کالیبراسیون استفاده شد (۱۷،۱۶). جهت اندازه‌گیری محتوای فنل، فلاونوئید، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه که به نسبت ۱:۱۰ در اتانول تهیه شده ۱ میلی‌لیتر معرف فولین‌سیو کالتو^۱ که با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شده اضافه گردید. پس از گذشت ۴ دقیقه ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (۷۵ گرم بر لیتر) به آن افزوده شد. سپس

1. Folin-Ciocalteu's

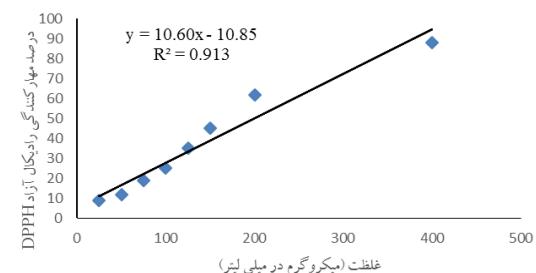
با نظر اجمالی به نمودار شماره ۱ و داده‌های به‌دست آمده در یافته‌ها می‌توانیم دریابیم که گرچه تفاوت معنی‌داری میان مقدار IC_{50} عصاره گیاه *papaver rhoeas* L. (میکروگرم/ میلی‌لیتر $IC_{50}=80/07$) در مقایسه با داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین (میکروگرم/ میلی‌لیتر $IC_{50}=15/96 \pm 0/26$) وجود دارد ($p < 0/05$)، اما می‌توان ادعا کرد که عصاره این گیاه دارای اثرات مهارکنندگی رشد قابل توجهی بر روی رده سلولی Vero بوده است. سیس‌پلاتین یکی از پر مصرف‌ترین داروها در شیمی درمانی سرطان می‌باشد علت اختلاف معنی‌دار IC_{50} سیس‌پلاتین با عصاره شقایق وحشی این است که سیس‌پلاتین یک ترکیب خالص شیمیایی است، اما عصاره گیاه شقایق مخلوط تعدادی از ترکیبات از جمله انواعی از آلکالوئیدهای مختلفی مانند رآدین، اسید رآدیک، اسید پاپوریک، اسید مکوئیک، موسیلاژ می‌باشد که چه بسا در نتیجه مطالعات بیش‌تر ترکیبات خالص شده بتوانند با اثربخشی قوی‌تر و عارضه کم‌تر جایگزین مناسبی برای داروهای هم‌چون سیس‌پلاتین باشند (۱۹، ۲۰). در روش فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH، مقدار IC_{50} به‌دست آمده برای عصاره گیاه برابر با $5/74$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، طی یک مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی گیاه خشخاش (*papaver somniferum* L.) بررسی شد IC_{50} عصاره $48/56 \pm 0/01$ بود که در مقایسه با گیاه مورد مطالعه ما اثر آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری داشت (۲۱). بررسی‌های اندکی بر روی گونه‌های جنس پاپاور در زمینه تست قدرت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما (FRAP) و تعیین محتوای تام فنول و فلاونوئیدی انجام شده است. لذا پیشنهاد می‌نماییم علاوه بر این نوع عصاره اثرات عصاره‌های تام دیگر بر رده‌های سلولی سرطانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، و تست‌هایی با مکانیسم‌های انتقال هیدروژن، تست‌های رادیکال‌های مخرب موجود در انسان مانند سوپراکسید و هیدروکسیل نیز مورد بررسی قرار گیرند. هم‌چنین

شده. در روش رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl-Picryl-Hydrazyl) میزان IC_{50} عصاره گیاه و اسید آسکوربیک به ترتیب $5/74$ و $8/24 \pm 0/03$ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار شماره ۲). در مورد قدرت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما (FRAP) در این تحقیق میزان $0/02 \pm 2/663$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (نمودار شماره ۳) (۱).

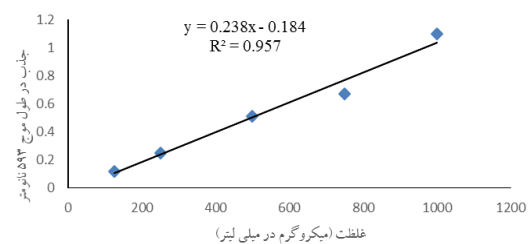
محتوای فنلی عصاره گیاه $255/12 \pm 0/002$ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در یک گرم عصاره و محتوای تام فلاونوئیدی $146/45 \pm 0/01$ میلی‌گرم معادل کوئرستین در یک گرم عصاره گیاه به‌دست آمد.



نمودار شماره ۱: میزان بقای سلولی (درصد) رده Vero در مواجهه با عصاره متانولی گیاه *papaver rhoeas* L. طی زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت



نمودار شماره ۲: نمودار درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH



نمودار شماره ۳: نمودار میزان جذب کمپلکس $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ در تست FRAP

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سمیه حسامی دانشجوی کارشناسی ارشد سم‌شناسی می‌باشد، از همه عزیزانی که در انجام این پایان‌نامه مشارکت داشته‌اند صمیمانه سپاسگزاریم.

ترکیبات موثر موجود در عصاره گیاه را جداسازی و اثرات آن‌ها بر مهار رشد رده‌های سلولی سرطانی مختلف و مکانیسم‌های مختلف مهار رشد ارزیابی گردد، تا گامی در جهت یافتن و طراحی داروهای جدید و موثر در درمان بیماری‌ها باشد.

References

1. Sharma DK, Dhiman K, Gupta DK, Gill NS, Goyal A. A Review on the Medicinally Important Plants of the Family Cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition* 2012; 4(1): 16-26.
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 and Metast Rev* 2008; 27(4): 737-750.
3. Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anti-cancer Drugs* 2012; 23(3): 255-271.
4. Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *International J Pharm Tech Res* 2011; 3(1): 298-308.
5. Yang CC, Lee MR, Hsu SL, Chang CM. Supercritical fluids extraction of capillarisin from *Artemisia capillaris* and its inhibition of in vitro growth of hepatoma cells. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007; 42(1): 96-103.
6. Zhai DD, Supaibulwatana K, Zhong JJ. Inhibition of tumor cell proliferation and induction of apoptosis in human lung carcinoma 95-D cells by a new sesquiterpene from hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Phytomedicine* 2010; 17(11): 856-861.
7. Zhai DD, Jin HZ, Zhong JJ. A new sesquiterpene from hairy root culture of *Artemisia annua*. *Chinese Chem Lett* 2010; 21(5): 590-592.
8. Yuan HD, Jin GZ, Piao GC. Hepatoprotective effects of an active part from *Artemisia sacrorum* Ledeb. against acetaminophen-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol* 2010; 127(2): 528-533.
9. Nagy IZ. On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging, and degenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928: 187-199
10. Ames BN, Shigensaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(17): 7915-7922.
11. Gubruz I, Ustun O, Yesilada E, Sezik E and Kutsal O. Antiulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *J Ethnopharmacol* 2003, 88(1): 93-97.
12. Hasplova K, Hudecova A, Miadokova E, Magdolenova Z, Galova E, Vaculcikova L, et al. Biological activity of plant extract isolated from *Papaver rhoeas* on human lymphoblastoid cell line. *Neoplasma* 2011; 58(5): 386-391.
13. Ghosh K, Chandra K, Ojha AK, Sarkar S, Islam SS. Structural identification and cytotoxic activity of a polysaccharide from the fruits of *Lagenaria siceraria* (Lau). *Carbohydr Res* 2009; 344(5): 693-698.

14. Shokrzadeh M, Habibi E, Dadkhah G, Modanloo M. Evaluating the Cytotoxicity Effect of Hydroalcoholic Extract of *Juglans regia* on Human Cancer Cell Lines (HepG2-HeLa) by MTT Assay. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2016; 26(141): 160-164 (Persian).
15. Saravi SS, Shokrzadeh M, Shirazi FH. Cytotoxicity of *Sambucus ebulus* on cancer cell lines and protective effects of vitamins C and E against its cytotoxicity on normal cell lines. *Afr J Biotechnol* 2013; 12(21): 3360-3365.
16. Chiu S, Bhakthan NM. Experimental acetaminophen-induced hepatic necrosis: biochemical and electron microscopic study of cysteamine protection. Laboratory investigation. *A Journal of Technical Methods and Pathology* 1978; 39(3): 193-203.
17. Mutimer DJ, Ayres RC, Neuberger JM, Davies MH, Holguin J, Buckels JA, et al. Serious paracetamol poisoning and the results of liver transplantation. *Gut* 1994; 35(6): 809-814.
18. Mozdastan S, Ebrahimzadeh M A, Khalili M. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (*Myrtus communis* L.). *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25 (127): 10-24 (Persian).
19. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1841-1856.
20. Miller M. Basic Chemical Information of cisplatin. Available at: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/cisplatin/htmlonly>. Accessed June 14, 2012.
21. Anonymus, Cisplatin the Penicillin of Cancer. (2011). Available at: <http://www.cisplatin.org>. Accessed Aug 2, 2012.
22. Baros S, Karsayová M, Jomová K, Gáspár A, Valko M. Free radical scavenging capacity of *Papaver somniferum* L. and determination of pharmacologically active alkaloids using capillary electrophoresis. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012; 1 (Special issue): 725-732.