اثر سمیت سلولی عصاره گل سفید (*Ammi majus*) بر روی رده سلول‌های سرطانی Hela و MCF7

فرخنده نعمتی*، بهمن اسلامی جدیدی، مهدیه طالبی دارابی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر،گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی، قائمشهر، ایران

مسئول مکاتبات: farkhondnemati@gmail.com

چکیده

امروزه از روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان استفاده می‌شود. ولی متاسفانه 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 محققان را به تلاش جهت دستیابی به داروهای مؤثرتر با اثرات جانبی کم‌تر وا داشته است. در این مطالعه اثر عصاره اتانولی گل سفید (*Ammi majus*) بر روی رده‌ی سلول‌های سرطانی Hela و MCF7 مورد بررسی قرار گرفت. رده‌های سلولی کشت داده شد، سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل گردیدند. سپس سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف *A. majus* قرار گرفتند. میزان سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT بعد از ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره اتانولی گیاه *A. majus* بر روی رده سلولی Hela رشد سلول‌ها را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت کاهش داده است. میزان IC50، mg/ml ۱/۹۲۲ محاسبه شده است. همچنین عصاره اتانولی گیاه *A. majus* در سلول‌های سرطانی MCF7 نیز رشد سلول‌ها را به طور معنا داری نسبت به گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت کاهش داده است. میزان IC50، mg/ml ۰/٤۸٦ محاسبه شده است. این عصاره بر روی سلول‌های خونی(لنفوسیت و مونوسیت) اثر داده شده است، نتایج نشان می‌دهد در غلظت mg/ml ۱۰ عصاره تأثیری بر سلول‌های خونی نداشته است. نتایج پیشنهاد می‌کند عصاره اتانولی گیاه *A. majus* باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی MCF7 و Hela شده است.

کلمات کلیدی: سمیت سلولی، عصاره اتانولی *Ammi majus* ، رده سلولی Hela، رده سلولیMCF7

مقدمه

سرطان سرویکس دومین علت مرگ ناشی از سرطان‌ها در زنان می‌باشد. در سال ۲۰۰٦، حدود ۵۰۰ هزار مورد جدید سرطان سرویکس گزارش شده و پیش‌بینی می‌شود در حدود ۲۸۰۰۰۰ مرگ ناشی از آن واقع شود که اکثر این بیماران در کشورهای درحال توسعه زندگی می‌کنند. سرطان گردن رحم رشد غیرقابل کنترل سلول‌های گردن رحم (بخش واژینال) می‌باشد. این سلول‌ها از نظر عملکرد از بافت‌های مجاور برای رسیدن به ذخایر خونی رقابت کرده و آنها را از بین می‌برند [٤]. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان ٤۰ تا ٤٤ ساله می‌باشد. این سرطان مسئول ۳۳ درصد تمام سرطان های زنان و ۲۰ درصد مرگ ناشی از سرطان می‌باشد. شیوع سرطان سینه در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع‌ترین بیماری بد خیم در بین زنان در آمده است [۱۱].

استفاده از گیاهان داروئی در درمان سرطان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان داروئی بومی انجام گردیده است [۵،۷،۱۳،۱٤].

گل سفید یا وایه با نام علمی *Ammi majus* متعلق به تیره Apiaceae جزء گیاهان یکساله و دولپه با رویش پاییزه می‌باشد. گیاهی باریک و بلند که در شرایط معمولی تا ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متر می‌رسد و در سرزمین‌های نرم و مرطوب، علفزارهای شور و نواحی ساحلی رشد می‌کند.

این گیاه به طور گسترده‌ای در اروپا و منطقه مدیترانه و غرب آسیا یافت می‌شود و در حال حاضر در هند کشت داده می‌شود [۱]. بذر گیاه *A. majus* دارای ماده‌ای بنام گزانتوتوکسین بوده که خواص دارویی دارد از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی از قبیل پسوریازیس و همچنین برای درمان جذام، سنگ کلیه، عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده می‌شود [٦]. همچنین ترکیبات Khellin و Visnagin و کومارین را از *A. majus* جدا کردند که از آسیب‌های سلولی ناشی از اگزالات در سلول‌های اپی تلیال کلیه جلوگیری می‌کند. در مصر از چای تهیه شده از میوه گیاه *A. majus* برای درمان سنگ کلیه استفاده می‌شد [۱۵].

با توجه به این که هیچگونه تحقیق در خصوص سمیت سلولی این گیاه دارویی تا کنون گزارش نگردیده این مطالعه نیز به منظور بررسی اثرات ضدسرطانی گیاه *A. majus* در شرایط in vitro انجام گرفته است که به همراه مطالعات تکمیلی بعدی می‌تواند راهنمایی برای پزشکان در جهت انتخاب داروی مؤثرتر در درمان سرطان باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری گیاه: گیاه گل سفید یا وایه در اواخر بهار ۱۳۹۱ از منطقه جنوب، خوزستان و اهواز تهیه و جمع-آوری شد. بخش‌های گیاه در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس پودر شدند و برای تهیه عصاره استفاده شده است.

استخراج عصاره اتانولی: جهت استخراج عصاره اتانولی از اتانول ۷۰ درجه و از روش سوکسله استفاده شد. حلال اتانول با استفاده از روتاری و با روش تقطیر در خلأ خارج گردید. این عصاره به عنوان عصاره خالص در نظر گرفته شد و از آن غلظت‌های مختلف تهیه گردید.

جداسازی سلول‌های خونی: ۲ سی‌سی فایکول را به درون لوله فالکون منتقل می‌کنیم و ۳ سی‌سی از خون محیطی گرفته شده را اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفوژ می‌کنیم و سپس لایه ابری شکل متشکل از سلول‌های تک هسته‌ای را جدا می‌کنیم و با سانتریفوژ دوباره سلول‌های ته نشین را جدا می‌کنیم.

رده سلولی: ردهای سلولی مورد استفاده در این تحقیق از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران خریداری شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت مایع RPMI1640 که همراه با۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰۰ U/ml پنی-سیلسن و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین بود، در دمای ^{o}c ۳۷ و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO□ و ۹۵ درصد رطوبت و در فلاسک‌های استریل کشت داده شدند.

آزمون MTT: برای اندازه‌گیری اثرات سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *A. majus* از آزمون MTT استفاده شد [۷]. در این روش از نمک ۳- (٤ و ٥- دی متیل تیازول ۲-ایل)- ۲ و ٥- دی فنیل تترازولیوم بروماید و یا به اختصار MTT که زرد رنگ است، توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیر محلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود. جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن در DMSO، به کمک دستگاه الیزا و در طول موج معین قابل اندازه گیری است.

بررسی سمیت سلولی عصاره اتانولی *A. majus* با استفاده از آزمون MTT: سلول‌ها در پلیت‌های ۹٦ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد CO□ و ۹۵ درصد رطوبت برای ٢٤ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از *A. majus*، شامل mg/ml ۰/۱٥٦، ۰/۳۱۲، ۰/٦۲٥، ۱/۲٥، ۲/٥، ٥، ۷/٥ و ۱۰ به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (٥ mg/ml) اضافه گشت. سپس پلیت‌ها به مدت ٤ ساعت در دمای ^{o}c ۳۷ و ٥ درصد CO□ و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. بعد از گذشت ٤ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشته، محتویات رویی آنها دور ریخته شده، به هر چاهک ۱۰۰

میکرولیتر از محلول DMSO اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه بر روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شده و سپس جذب نوری فورمازان در ٤٩٢ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت خوانده شد. درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\%OD = \frac{OD\ \text{چاهک های تحت تاثیر عصاره} - OD\ \text{بلانک}}{OD\ \text{کنترل} - OD\ \text{بلانک}} \times 100$$

در فرمول فوق OD بلانک، چگالی نوری چاهک‌های بدون سلول و تنها حاوی DMSO است و OD کنترل چگالی چاهک‌های حاوی سلول است که فاقد ترکیبات مورد آزمایش می‌باشد. غلظتی از ترکیب مورد بررسی که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد به عنوان IC50 در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده‌اند. اختلاف بین مقادیر بدست آمده از آزمایش‌ها با استفاده از Students t- test بررسی شد. در شرایطی که مقدار $p\leq0.05$ بود، اختلاف میانگین‌ها معنادار (Significant) در نظر گرفته شد. میزان IC50 با استفاده از روش رگرسیون خطی محاسبه شد. کلیه کارهای آماری با نرم‌افزار Exel انجام شد.

نتایج

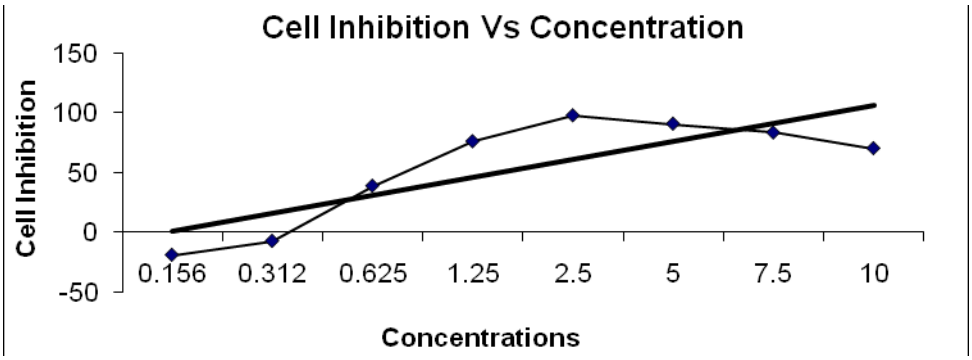
سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *Ammi majus* بر رده سلول سرطانی Hela و MCF7: نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی *A. majus* بر روی رده سلولی Hela و MCF7 در جدول ۱ و به صورت گراف در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که اثر هر غلظت از عصاره بر روی رده سلولی Hela و MCF7 در سه آزمایش مستقل از یکدیگر تحت بررسی قرار گرفت، از این رو اعداد درج شده در جدول، میانگین درصد پاسخ های بدست آمده در مهار رشد سلول برای سه بار تکرار مستقل می‌باشد (Mean±SEM).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره *A. majus* (ستون اول از چپ)، بر روی میزان جذب نوری سلول‌های Hela و MCF7 (ستون دوم از چپ)، بر اساس روش MTT در مقایسه با گروه کنترل.

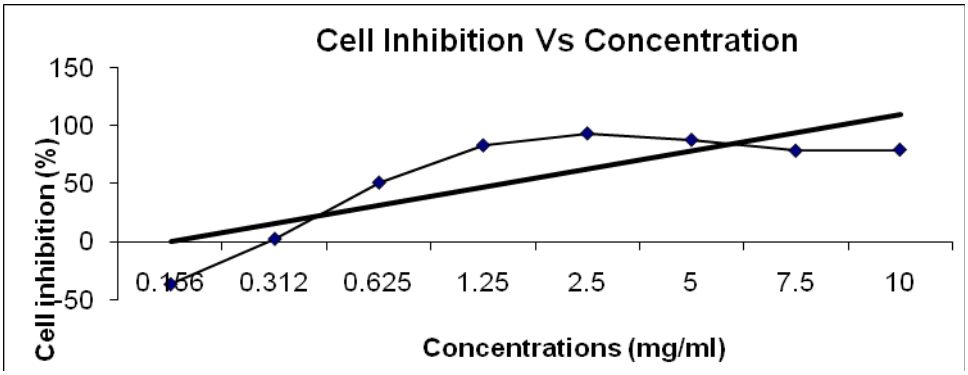
غلظت‌های بکارگرفته شده عصاره *Ammi majus* (mg/ml)	Absorbance		inhibition ٪		IC50 (mg/ml)	
	MCF7	Hela	MCF7	Hela	MCF7	Hela
0.156	0.03 ± 0.847083*	0.024 * ± 0.984875	-36.5757213	-19.0964		
0.312	0.02 ± 0.63325	0.0003 * ± 0.891333	2.426711501	-7.47813		
0.625	0.01 ± 0.193292***	0.15 ± 0.354358	50.80802281	38.7414		
1.25	0.02 ± 0.082958**	0.028 ** ± 0.336792	82.80187574	76.00614		
2.5	0.006 ± 0.0565	0.006** ± 0.044276	93.03610407	97.73007	0.486	1.922
5	0.01 ± 0.106667***	0.001** ± 0.100583	87.53133283	90.73643		
7.5	0.02 ± 0.1601 ***	0.005 ** ± 0.159756	78.17800411	83.38693		
10	0.0 ± 0.15508***	0.086** ± 0.195338	79.06982886	70.20649		
Control	0.004 ± 0.70788	0.010±0.81479				

هر عدد بیانگر میانگین بدست آمده بعلاوه منهای خطای معیار مربوط به سه آزمایش مستقل می‌باشد. $0.001\geq P^{***}$ و $0.02\geq P^{**}$ و $0.05\geq P^{*}$ در مقابل گروه کنترل. میزان درصد مهار رشد (ستون سوم از چپ). میزان IC50 (ستون چهارم از چپ). IC50 غلظتی از عصاره است که موجب جلوگیری از رشد سلول‌ها به میزان ۵۰٪ می‌گردد.

همانگونه که نمودارها نشان می‌دهد به دنبال انکوباسیون ۷۲ ساعته غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی *A. majus* با سلول‌های سرطانی Hela و MCF7، بیشترین میزان سمیت سلولی توسط غلظت ۲/۵ mg/ml از عصاره مشاهده شد. میزان کشندگی برای غلظت فوق در رده‌ی سلولی Hela ۹۷/۷۳ ٪ و در رده‌ی سلولی MCF7 ۹۳/۰۳ ٪ می‌باشد (نمودار ۱و۲). لازم به ذکر است میزان سمیت سلولی عصاره وابسته به غلظت می‌باشد به طوری که با افزایش غلظت عصاره میزان بیشتری از سلول‌ها از بین رفتند و IC50 بدست آمده در رده‌ی سلولی Hela برابر ۱/۹۲۲ mg/ml و در رده‌ی سلولی MCF7 نیز برابر ۰/٤٨٦ mg/ml می‌باشد.

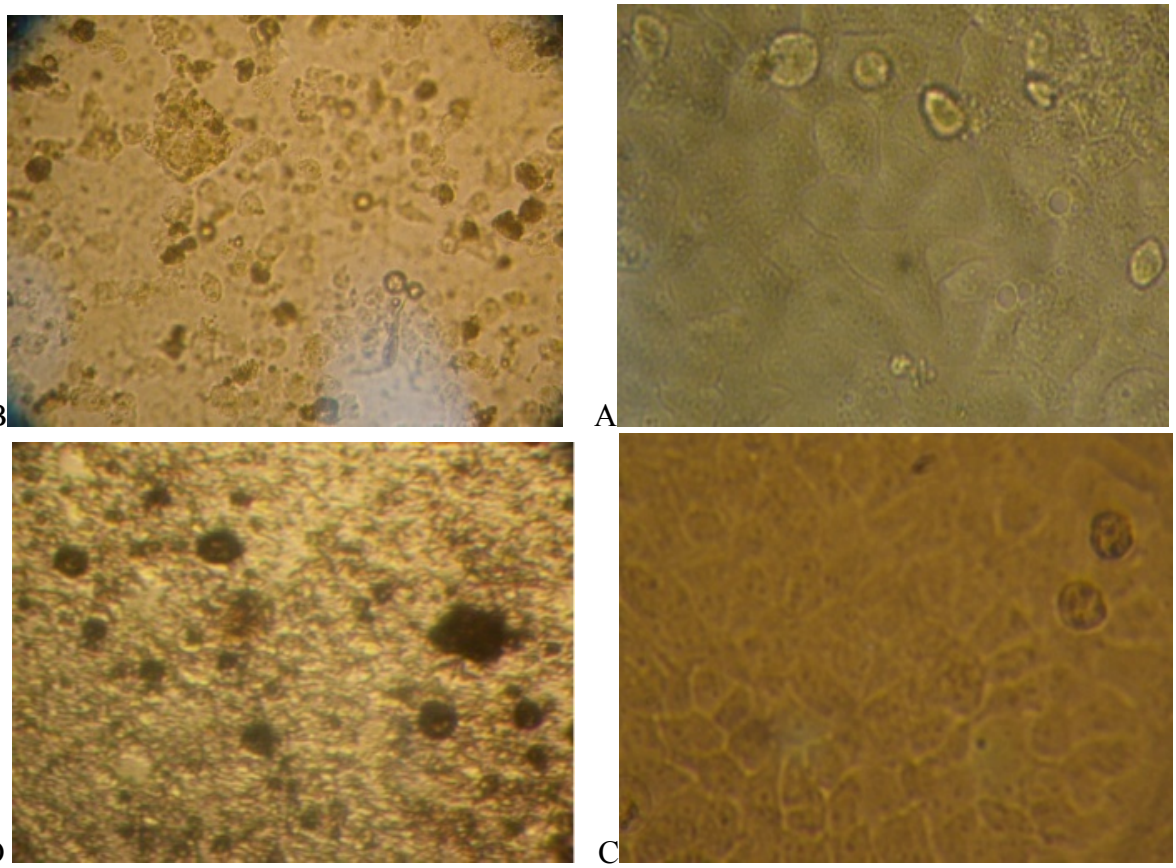


نمودار۱ـ درصد مهار رشد عصاره *A. majus* در غلظت‌های مختلف بر روی سلول‌های Hela به وسیله آزمون MTT. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار رشد افزایش می‌یابد.

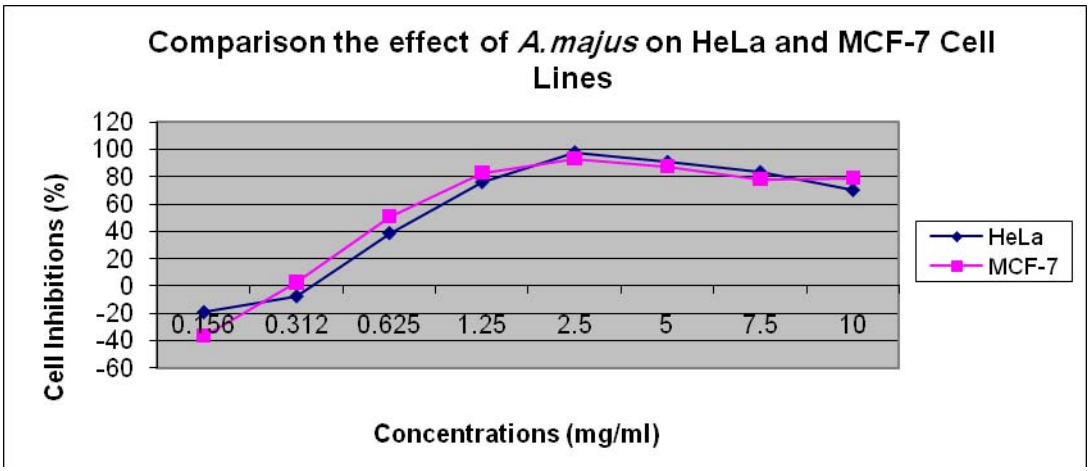


نمودار۲ـ درصد مهار رشد عصاره *A. majus* در غلظتهای مختلف بر روی سلول‌های MCF7 به وسیله آزمون MTT. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار رشد افزایش می‌یابد.

رشد سلول‌های Hela و MCF7 (بدون تیمار با عصاره *A. majus*) (شکل۱ A و C). در مقابل گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره *A. majus* (۲/۵ mg/ml) (شکل۱ B و D) مهار شد. کاهش تعداد سلول و ظاهر حباب مانند غشا سلول‌ها نشان دهنده وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد. مقایسه اثر عصاره *A. majus* بر روی رده‌ی سلول‌های سرطانی Hela و MCF7 (نمودار۳) نشان می‌دهد که این عصاره اثر مشابهی در مهار رشد سلول‌های Hela و MCF7 داشته است.



شکل ۱ـ (A و C) سلول‌های Hela و MCF7 در گروه کنترل (بدون تیمار با عصاره *A. majus*). (B و D) سلول‌های Hela و MCF7 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با عصاره *A. majus* (۲/۵ mg/ml). سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره *A. majus* تیمار شدند. میزان مهار رشد به وسیله آزمون MTT سنجیده شد.



نمودار۳ـ بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره *A. majus* بر روی رده‌ی سلول‌های سرطانی Hela و MCF7. نتایج نشان می‌دهد که این عصاره اثر مشابهی در مهار رشد سلول‌های Hela و MCF7 داشته است.

بحث

سرطان گردن رحم یا سرطان دهانه رحم نوعی بیماری است که در آن رشد بافت سرطانی بدخیم از ناحیه گردن رحم نشأت می‌گیرد و به طور نامنظم و فزاینده‌ای تکثیر و منجر به تراریختگی آن می‌شود. علت بیماری ناشناخته است ولی دانشمندان احتمال می‌دهند که با عفونت‌های ویروسی ارتباط داشته باشد که از آن جمله ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) را می‌توان نام برد [۱۱]. سرطان سینه با تکثیر بدخیم سلول‌های اپیتلیالی پوشاننده مجاری یا لبول‌های پستان رخ می‌دهد. مانند تمام بدخیمی‌های اپیتلیالی، میزان بروز سرطان پستان نیز با افزایش سن تدریجاً بالا رفته، ولی از سن قطع قاعدگی شیب این منحنی کاهش می یابد. سرطان پستان یک بیماری وخیم و کشنده است که در صورت عدم درمان مناسب مبتلایان را به کام مرگ خواهد کشید [۱۲].

در مورد اثرات ضدسرطانی گیاهان داروئی بومی در کشورهای مختلف مطالعات متعددی صورت گرفته است [۵،۷،۱٤،۱۳]. 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 [۱۳]. این ترکیبات درمانی موجود در گیاهان، متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی هستند که دارای ساختار پیچیده‌تری نسبت به متابولیت-های اولیه (مانند اسیدهای آمینه) که برای بقا زندگی سلول‌ها ضروری‌اند می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی ظاهراً نقش مستقیمی در رشد و نمو گیاه ندارند، بسیاری از این ترکیبات سمی هستند و اغلب در وزیکول‌های خاص یا واکوئل‌ها ذخیره می‌شوند. آلکالوئیدها (مورفین، کدئین، آتروپین)، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه‌ها و تانن‌ها از جمله مهمترین این ترکیبات هستند. سلول‌های گیاهی مقادیر متنوعی از این فراورده‌ها را تولید می‌کنند. این نوع ذخیره‌سازی از یک طرف نوعی سمیت‌زدایی برای گیاه است و از طرف دیگر نوعی مخزن ذخیره برای موادی نظیر مولکول‌های غنی از نیتروژن است [۱۰].

یک گیاه محلی با فراوانی زیاد در غرب مصر می‌باشد و فعالیت‌های ضد ویروسی و ضد التهابی بسیار بالائی را نشان داده است [۲]. بذر گیاه *A. majus* دارای ماده‌ای بنام گزانتوتوکسین بوده که خواص دارویی دارد از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی از قبیل پسوریازیس و همچنین برای درمان جذام، سنگ کلیه، عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده می‌شود. همچنین ترکیبات *khellin* و *visnagin* و کومارین را از *A. majus* جدا کردند که از آسیب‌های سلولی ناشی از اگزالات در

سلول‌های اپی‌تلیال کلیه جلوگیری می‌کند. در مصر از چای تهیه شده از میوه گیاه *A. majus* برای درمان سنگ کلیه استفاده می‌شد [۱۵].

Anrep در سال ۱۹٤٥ با تحقیق درباره تأثیر عصاره گیاه *Ammi visnaga* بر سندرم انژینال در سگ چنین بیان داشت که: خلین ماده اصلی *A. visnaga* است اثرات ان بر روی قلب وچرخه آن و همچنین بر روی شش مورد بررسی قرار گرفت در نتیجه خلین گشاد کننده مؤثر با عمل انتخابی بر رگ‌های قلب است [۳].

درسال ۲۰۱۰ دانشمندان کره‌ای اثرات ضد التهابی عصاره گیاه *A. visnagin* در لیپو پلی ساکاریت‌های میکروگلیال BV-2 را مورد برسی قراردادند این ترکیب موجب گشادی عروق و کاهش فشارخون با مهار ورود کلسیم به داخل سلول می‌شود [۹]. در این مطالعه اثر عصاره اتانولی این گیاه بر روی رده ی سلول‌های سرطانی Hela و MCF7 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره اتانولی گیاه *A. majus* بر روی رده سلولی Hela در غلظت‌های ۰/۰۲≤ mg/ml و ۰/۳۱۲ ،۰/۱۵٦ mg/ml (P≤۰/۰۵) ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ رشد سلول‌ها را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت کاهش داده است. همچنین عصاره اتانولی گیاه *A. majus* در سلول‌های سرطانی MCF7 در غلظت‌های (P≤۰/۰۵) ۰/۱۵٦ mg/ml، (P≤۰/۰۲) ۱/۲۵ mg/ml و ۰/٦۲۵ mg/ml (P≤۰/۰۰۱)، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ رشد سلول‌ها را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت کاهش داده است. این عصاره بر روی سلول‌های خونی (لنفوسیت و مونوسیت خون) اثر داده شده است، نتایج نشان می‌دهد در غلظت ۱۰ mg/ml عصاره تأثیری بر سلول‌های سالم نداشته است. بنابراین با وجود ترکیبات مؤثر در این گیاه و همچنین فعالیت ضد التهابی و ضد ویروسی این ترکیبات، بر اساس مطالعات گذشته و با توجه به فعالیت سمیت سلولی عصاره گیاه *Ammi majus* بر روی سلول‌های Hela و MCF-7 که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت به نظر می‌رسد این گیاه توانایی بالقوه مؤثری برای جلوگیری از تکثیر سلولهای سرطانی داشته باشد و این مطالعه به عنوان یک مطالعه مقدماتی، نشان‌دهنده فعالیت بیولوژیکی و فارماکولوژیکی گیاه *Ammi majus* می‌باشد. بنابراین جدا سازی و خالص‌سازی ترکیبات فعال و بیولوژیکی این گیاه و تعیین ساختار و مکانیسم بیو شیمیایی فعالیت ضدسرطانی گیاه از جمله مواردی است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی مورد توجه قرار گیرد. همچنین مطالعات بیشتر در خصوص اثرات این گیاه در مدل‌های حیوانی و در نهایت کار آزمایی بالینی در انسان و استفاده از ماده مؤثره و اقدام به فرمولاسیون‌های داروئی در آینده انجام پذیرد.

منابع

۱- کریمی ز. ۱۳۸۰. معرفی فلور، اشکال زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان مراتع شهرستان دامغان، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ، جلد شانزدهم، ویژه نامه ۱-الف.

۲- گیاهان دارویی. ۱۳۸۲. نوشته ژان ولاگ و ژیری استودولا، ترجمه ساعد زمان، انتشارات ققنوس، چاپ پنجم.

3. Anrep, G.V., Barsoum G.S., Kenawy M.R., and Misrahy G. (1946), *Ammi visnaga* in the treatment of the anginal syndrome. *British Heart Journal*, 8(4): 171–177.

4. Castellsague, X., Diaz, M., Sanjose, S. (2006), Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and itscofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute*: 98: 303–315.

5. Drasor, P., Moravcova J. (2004), Recent advancesin analysis of Chinese herbal edicalplants and traditional medicine, *Journalof chromatography*, 812: 3-21.

6. Farmacy, I.N., Abu- shady, 19479.

7. Galati, G., Brien, P. (2004), Toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemo preventiveand anticancer properties, *free radical biology&medicine,* 17(3): 287-303.
8. Harvey, A.M. (1974), Early contributions to the surgery of cancer: William S. Halsted, Hugh H. Young and John G. Clark. *Johns Hopkins Medical Journal*, 74(135): 399-417.
9. Lee, J.K., Jung, J.S., Park, S.H., Park, S.H., Sim, Y.B., Kim, S.M., Ha, T.S., Suh, H.W. (2010), Anti-inflammatory effect of visnagin in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Archives of pharmacal research,* 33(11): 1843-1850.
10. Montoro, P., Baraca, A., Pizza, C., De Tommasi, N. (2005), Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plants species. *Food Chemistry*, 92: 349-355.
11. O' Hara, M., Kiefer, D., Farrell, K., Kemper K. (1998) A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Archives of Family Medicine*, 7(7): 523-536.
12. Reuters.(2007) «Report sees7.6 million global 2007 cancer deaths»
13. Sakai, I. (2000), A Kampo medicine"Juzen-taihoto": prevention of malignant progression metastasis of tumor cells and the mechanism of action. *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* 23: 677-688.
14. Utsuyama, M., Seidlar, H., Kitagawa, M., Hirokawa, K. (2001), Immunological estoration and antitumor effect by Japanese herbalmedicine in aged mice, *mechanism of aging and development,*; 122: 334-352.
15. Vanachayangkul, P., Byer, K., Khan, S., Butterweck, V. (2010), An aqueous extract of Ammi visnaga fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells. *Phytomedicine*, 17(8-9): 653-658.