دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال سوم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۳

بررسی اثرسمیت عصاره گیاه *Viscum album* L. برده سلول‌های سرطانی MCF-7

ولی الله یوسفی چمازکتی[1*]، عباسعلی دهپور جویباری[2]

[1] گروه زیست‌شناسی گرایش علوم جانوری تکوین سلولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر
[2] گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر

چکیده

گیاه *Viscum album* L. (درواش)، متعلق به تیره Loranthaceae، یک گیاه نیمه انگل است که بر روی درختان میزبان مختلف و سرشاخه‌ها رشد می‌کند. فعالیت‌های زیستی متنوعی از این گونه گزارش شده است از جمله اثرات آنتی‌دیابتیک، آنتی‌اکسیدان، رگ‌گشا، مسکن، کاهنده فشارخون، ضد صرع، ضد التهاب، محرک ایمنی، ضد جهش و نیز ضد سرطان می باشد.هدف از این تحقیق آزمایش فعالیت سمیت سلولی عصاره‌های اتانولی خام تهیه شده از گیاه این بر لاین سلولی MCF-7 با روش رنگ‌آمیزی و آزمون محیط کشت تترازولیوم می‌باشد. محیط‌های کشت با غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰µg/ml از عصاره خام اثر داده شدند.پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون،چگالی نوریدر طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر تعیین شد. همچنین مهار رشد سلول‌ها در معرض عصاره‌ها محاسبه شد. نتایج نشان دادند که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، عصاره اتانولی در غلظت ۲۵۰µg/ml و غلظت‌های بالاتر از آن تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7را با تفاوت معنی‌دار با سلول‌های کنترل، کاهش داد ($p<0.05$). بیشترین اثر ممانعت کنندگی در غلظت ۲۰۰۰µg/ml مشاهده شد (۳۴/۳۰٪). همچنین، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، همه غلظت ها در اثر مهارکنندگی، دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل بودند؛ و بیشترین اثر ممانعت کنندگی در غلظت ۲۰۰۰µg/ml مشاهده شد (۹۹/۵۰٪). نتایج نشاندادندکه عصاره *V. album* تکثیر سلول‌های MCF-7 را وابسته به دوز کاهش داده است. بنابراین به نظر می‌رسد عصاره اتانولی *V. album* قادر به مهار رشد سلول‌های MCF-7 بوده و اثرات سمیت سلولی آن بسیار بالا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیاه *Viscum album* L.، عصاره اتانولی، سمیت سلولی، رده سلول سرطانی MCF-7

مقدمه

امروزه بیماری سرطان یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر در دنیا به شمار می‌رود که در اثر عوامل مختلفی از جمله مواد جهش زا و مواد شیمیایی سرطان‌زا که در محیط وجود دارند، ایجاد می‌شود (Talib, 2011)؛ وبا وجود آنکه پیشرفت‌های بسیاری از طریق تحقیقات بالینی و پایه‌ای اتفاق افتاده است و منجر به تسریع درمان بسیاری از بیماری‌ها شده است ولی بیماری سرطان همچنان به عنوان دومین عامل منجر به مرگ پس از ناهنجاری‌های قلبی به شمار می‌رود (Singh et al., 2012). سرطان پستان

* **مسئول مکاتبات:** gmail @dehpour.com

شایعترین بیماری بدخیم زنان ونیزعمده ترین علت مرگ ناشی ازسرطان برای زنان در سراسر دنیا به شمار می‌رود (Seedhom and Kamal, 2011). سرطان پستان درایران در رأس سرطان‌های زنان قرار دارد و ۲۵/۴ درصدکل بدخیمی‌هاراشامل می‌شود (Moshtagh et al., 2011). سنبروزسرطان پستان در ایران همچون دیگرکشورهای درحال توسعه،پایین ترازکشورهای پیشرفته است وشایع ترین سن مرگ و میر ناشی از این بیماری ۳۵ سالگی است (Sharif et al., 2010). اگرچه یافته‌ها نشان دهنده غیرشایع بودن سرطان پستان در زنان زیر ۴۰ سال وبه ویژه زیر ۳۰ سالاست، اما نتایج یک مطالعه درایران نشان داد که ۲۳ درصد از سرطان‌های پستان درایران در زنان زیر ۴۰ سال مشاهده شده و ۷۰ درصد آنان به علت تشخیص بیماری درمراحل پیشرفته در فاصله زمانی کوتاهی جان خود را از دست داده‌اند (Montazeri et al., 2003).

امروزه داروهایی با منشا طبیعی اهمیت بسیاری پیدا کرده‌اند و به ویژه در کشورهای در حال توسعه این داروهای طبیعی تاریخچه‌ای طولانی داشته و از دیرباز به طور سنتی مصرف می‌شدند. گیاهان نیز از دیرباز به عنوان منبع ارزشمندی برای پیدا کردن داروهای جدیدمحسوب می‌شوند. آنها یکی از منابع اصلی مواد زیستی فعال هستند که در طول دهه گذشته، استفاده از آنها برای تهیه داروهای طبیعی برای درمان سرطان اهمیت جهانی پیدا کرده است؛به طوریکه باکشت سلولی و یا استفاده ازمدل‌های حیوانی، اثرات ضد توموری بسیاری از گیاهان دارویی موردآزمایش قرار گرفته است (Singh et al., 2012).

کشورمان با توجه به شرایط اکولوژیکی حاکم بر اکوسیستم‌های طبیعی، دارای گیاهان متنوع و بسیار گوناگون می‌باشد. در بین گیاهان، برخی از گونه‌ها به علت دارا بودن ترکیبات دارویی، از شهرت بالائی برخوردار هستند. یکی از این گیاهان، درواش با نام علمی *viscumalbum* L. و نام انگلیسی Mistleoes است که به تیره Viscaceae تعلق دارد. همچنین در بعضی از منابع تیره مذکور را Lorantaceae (شیرینک) نامیده می‌شود. درواش بهعلت داشتن سبزینه، نیمه انگلی محسوب می‌شود و یک گیاه همیشه سبز،نیمه انگل و اپیفیت بوده که می‌تواند فتوسنتز نماید. شکل ۱. گیاه درواش *V. album* اینگونه فاقد ریشه و دارای برگ‌های همیشه سبز، چرمی، گوشتی، و به شکل قاشق می‌باشد. میوه آن گرد، سفید روشن (شبیه مروارید) و درشت است و در داخل آن بذرهای بسیار چسبناکی قرار گرفته، به طوری که در گذشته از میوه درواش در تهیه چسب آهن استفاده می‌شدهاست.

بانگاهی به تاریخچه پزشکی گیاه درواش در می‌یابیم که ازگذشته‌های بسیاردوردردرمان بسیاری ازبیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است و بسیاری از اثرهای درمانی آن مانند اثر ضدسرطانی (Zarkovic et al., 2001، Maier and

Fiebig, 2002)، آنتی میکروبیوباکتریایی (Deliorman et al., 2001)، آنتی ویروسی (Karagöz et al., 2003)، القاءکنندگی آپوپتوز (Büssing and Schietzel, 1999) و محرک سیستم ایمنی(Jurin et al., 1993; Karataş-Düğenci et al., 2003) گزارش شده است. همچنین عصاره داروا‌ش می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده درط ی رادیوتراپی و شیمی درمانی را سرکوب کند (Kovacs, 2002).

علاوه بر اینگزارش ها ی متعددی از ترکیبات شیمیایی موجود در گونه‌های مختلف فلومیس وجود دارد. برای مثال، تحقیقات نشان داده‌اند که اصلی‌ترین ترکیبات فعال موجود در گیاه داروا‌ش (*V. album*)، گلیکوپروتئین‌ها (لکتین‌ها با اثر بر تکثیر سلولی)، پلی‌پپتیدها (ویسکوتوکسین‌ها، یک مولکول پروتئینی کوچک با وزن ۱۵ کیلو دالتون) هستند (Romagnoli et al.,2000،Edlund et al., 2000). غلظت آلکالوئیدها معمولاً پایین است و بستگی به نوع درخت میزبان دارد (Peng et al., 2005). الگوهای فلاونوئیدی در گیاه داروا‌ش(*V. album*) بر روی میزبان‌های مختلف، توسط هاس[1] (۲۰۰۳) مورد بررسی قرار گرفت. آنها کوئرستین[2] و مجموعه‌ای از متیل- اترهای کوئرستین را شناسایی کردند، که ممکن است در سطح گیاه تجمع کنند. همچنین فلاونول کمفرول[3]، مشتقات متیل فلاونول کوئرستین[4]، و نیز فلاوانون نارینجنین[5] نیز شناسایی شده‌اند (Haas et al., 2003). علاوه بر این حضور آمین‌ها، اسیدهای کافئیک و سایر اسیدها، ترپنوئیدها، لیگنین‌ها و استیل کولین نیز در این گیاه گزارش شده است (Chevallier , 1996; Ochocka and Piotrowski, 2002). از آنجائیکه تا کنون تأثیرات ضد سرطانی این گونه برروی رده‌ی سلول سرطان پستانی در کشور ایرانان جام نشده است، لذا مطالعه حاضربا هدف بررسی اثرعصاره اتانولی گیاه *V. album* L. بر تکثیر سلول‌های رده سرطان پستان (MCF-7) انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره اتانولی: گیاه V. album L. جنگل‌های اطراف شهر ساری در استان مازندران و از روی درخت ممرز، جمع‌آوری گردید و پس از خشک شدن در معرض هوا، با استفاده از دستگاه آسیاب به صورت پودردر آمد و برای یک دوره سه روزه در اتانول ۹۶ درصدخیسانده و سپس با استفاده از کاغذ صافی فیلترشدودر نهایت بااستفاده ازدستگاه روتاری حلال اضافی تبخیر شد. عصاره به دستآمده سپس درحلال دیمتیل سولفوکساید (DMSO) به میزان ۱۰۰ میکرولیترحل شد.سپس در محیط کشت سلولی (RPMI-1640) رقت‌های مختلف مورد نیاز تهیه شد. رقت‌های به کار رفته در این تحقیق شامل ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و µg/ml ۲۰۰۰ می‌باشند.

رده‌های سلولی و شرایط محیط کشت: سلول‌های MCF-7(NCBI C135) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فلاسک خریداری شدند و در محیط کشت مایع RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوغیر فعال شده (FBS)، ۱۰۰U/ml پنی- سیلین و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت در فلاسک‌های استریل قرار گرفتند.

[1] Haas
[2] quercetin
[3] flavonol kaempferol
[4] flavonol quercetin
[5] flavanone naringenin

محیط کشت‌های آماده درپلیت‌های۹۶تایی با تعدادسلول‌های۳۰۰۰ریخته شد وپس از۲۴ساعت که سلول‌ها مورفولوژی طبیعی یافتنددر معرض عصاره اتانولی دررقت‌های ۳۱/۲۵ تا ۲۰۰۰ µg/ml به مدت۲۴ و ۴۸ساعت قرارگرفتند. همزمان نمونه کنترل فاقدعصاره نیزبه صورت سه‌تایی مانندنمونه‌های حاوی عصاره درنظرگرفته شد.

سنجش سمیّت سلولی در شرایط آزمایشگاهی: روش‌های متنوعی برای تخمین تعدادسلول براساس حضور یک آنزیم یا سوبسترای سلولی خاصی جذب وسپس استخراج یکرنگ معرفی شده‌اند. در این آزمایش بررسی زنده بودن سلول‌هاتوسط تست MTT مورد ارزیابی قرارگرفت. MTT افزوده شده به محیط کشت توسط فعالیت دهیدروژنازسلول‌های زنده به رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. چون محتوای دهیدروژناز سلول‌های نسبتاًثابت است،میزان فورمازان تولیدشده متناسب باتعدادسلول است .به طورخلاصه سلول‌هابه تعداد ۳ هزار در هرچاهک ۹۶تایی پلیت سلولی قرارگرفت و پس از گذشت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از اضافه کردن عصاره به سلول‌ها، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با محلول ۰/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر MTT در PBS به مدت ۴ ساعت قرار گرفت و پس از محلول‌سازی فرمازان توسط ۱۰۰ میکرولیتر دی میتل سولفوکسید جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

مهار رشد سلول‌ها در معرض عصاره‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

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

در نهایت داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۵ و با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش *T-TestStudents* استفاده شد. اختلاف در سطح احتمال معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره گیاه داروواش و درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، که در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد، در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۲۵۰ تا ۲۰۰۰µg/ml دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل بودند ($P\leq 0.05$)؛ و میانگین‌های جذب مربوط به خون و DMSO هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند. غلظتی که در آن غلظت ۵۰ درصد سلول ها از بین می‌روند پس از ۲۴ ساعت بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر است ($IC\ 50 > 2000\mu g/ml$). علاوه بر این نمودار ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد، یعنی وابسته به دوز است.

همچنین همانطور که در جدول ۱مشاهده می‌شود پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون همه غلظت‌های به کار رفته دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل بودند، و از غلظت ۱۲۵ میگروگرم به بعد تقریباً بیش از ۹۸ درصدسلول‌های سرطانی از بین می‌رود. غلظتی که در آن غلظت ۵۰ درصد سلول‌ها از بین می‌روند پس از ۴۸ ساعت تقریباً ۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. نمودار۲ تاثیر عصاره اتانولی داروواش بر روی سلول-

های MCF-7 را پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. در این نمودار اختلاف معنی داری بین ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود، که این نشان دهنده این است که عصاره داروش دارای اثری وابسته به زمان بر سلول های سرطانی می‌باشد.

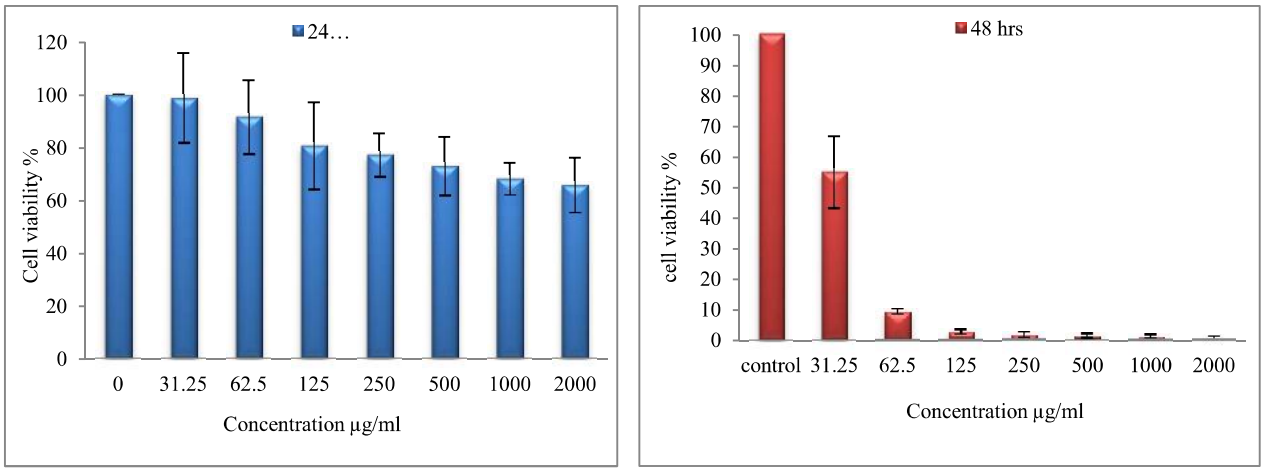
در بررسی اثرات ضد سرطانی داروش گزارشات مختلفی وجود دارد برای مثال مایر و فیبیگ[1] (۲۰۰۲) با بررسی اثر عصاره داروش بر سرطان پستان (لاین سلولی سرطانی MAXF 401NL) نشان دادند که غلظت های بالای لکتین در این گیاه دارای فعالیت ضد توموری در سرطان پستان در غلظت µg/ml ۱۵، با بیش از ۷۰ درصد ممانعت رشد در سلول های سرطانی در مقایسه با سلول‌های کنترل بوده است (Maier and Fiebig, 2002).

جدول ۱. **میانگین درصد مهار سلولی غلظت های مختلف عصاره‌های داروش بر سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون**

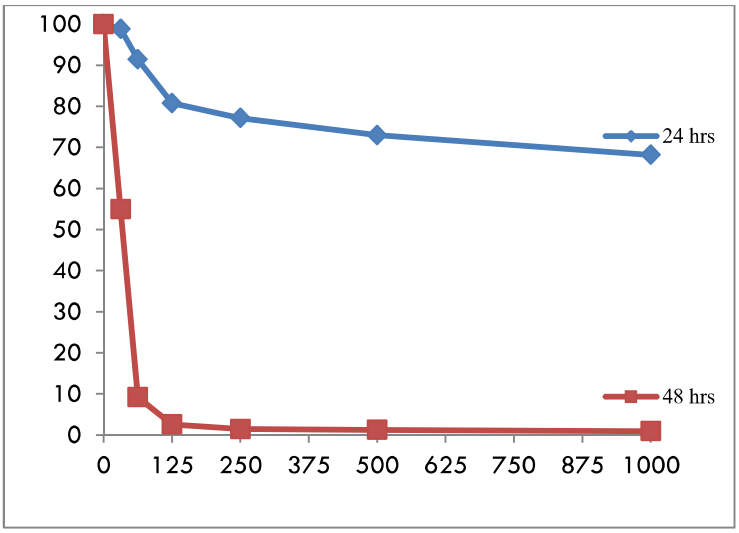
غلظت عصاره (µg/ml) *V. album*	Inhibition (%)	SEM	P-Value
پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون			
Control	0.972±0.156	0.110	-
خون	0.069±0.169	0.119	0.958
DMSO	0.764±0.276	0.195	0.916
31.25	1.176±0.721	0.509	0.916
62.50	8.566±0.426	0.301	0.407
125	19.25±0.750	0.530	0.104
250	22.86±0.594*	0.420	0.021
500	27.02±0.975*	0.689	0.027
1000	31.83±0.630*	0.445	0.012
2000	34.30±0.727*	0.514	0.031
پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون			
Control	0.098±0.612	0.432	-
خون	0.864±0.193	0.136	0.659
DMSO	1.785±0.261	0.184	0.961
31.25	45.05±11.96*	8.457	0.022
62.50	90.80±0.818*	0.578	0.0002
125	97.41±0.698*	0.493	0.0001
250	98.54±0.827*	0.585	0.0002
500	98.75±0.861*	0.608	0.0002
1000	99.05±0.655*	0.463	0.0001
2000	99.50±0.433*	0.306	0.0006

[1] Maier and Fiebig

نمودار ۱ – درصد حیات سلول‌های سرطانی پس از ۲۴ (سمت چپ) و ۴۸ ساعت انکوباسیون (سمت راست) با غلظت‌های مختلف عصاره داروش



نمودار ۲.مقایسه اثر سمیّت عصاره اتانولی گیاه داروشبر رده سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون



هارمسما[1] و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی عصاره-های داروش (گونه Iscador Qu[3]) بر سلول‌های سرطانی ریه (لاین‌های سلولی سرطانی MR 65, NCI-H82) و کولون (Caco-2, HT-29) و پستان (MCF-7) گزارش کردند که این گیاه از چرخه سلولی ممانعت می کند. آپوپتوز نیز با فعال سازی میتوکندریایی، و نه با مسیر وابسته به گیرنده مرگ، القا می‌شود (Harmsma et al., 2004). هولسن[2] و همکاران (۱۹۸۶) عصاره‌های داروش رشد یافته بر گونه های مختلف درخت میزبان مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند که داروش رشد یافته بر گونه *Malus sp.* دارای بیشترین اثر سمیت بر خلاف سلول‌های Molt4 (لاین سلولی لوکمیای لیمفوبلاستیک حاد) بودند؛ این محققان

[1] Harmsma

[2] Hülsen

نشان دادند که عصاره داروش با غلظت ۵۰۰µg/ml، ۹۱/۱۹ درصد از زنده مانی سلول‌ها را پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون کاهش می دهد (Hülsen et al., 1986). اثر ضد سرطانی به دست آمده از این تحقیقات با تحقیق حاضر همخوانی داشت، هرچند که در تحقیق حاضر اثر ممانعت کنندگی ۹۹/۵۰ درصد پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد.

محققان مکانیسم های مختلفی را برای توصیف اثر ضد سرطانی این گونه گزارش کرده اند. برای مثال گزارش شده است که لکتین ها در داروش نقش مهمی در اثرات درمانی این گیاه بازی می‌کنند (Schaller et al., 1996). همچنین گمان می شود که سلول‌های NK توسط لکتین-۱ داروش (ML-*1*) فعال می شوند و این امر ممکن است در از بین بردن سلول های توموری موثر باشد. گذشته از این در آزمایشاتی که به طور جداگانه لکتین‌ها، ویسکوتوکسین و اولیگوساکاریدها (گمان می شود که اولیگوساکاریدها نیز نقش مهمی در فعالیت های بیولوژیکی عصاره های خام *V. album* داشته باشند) را مورد بررسی قرار داده اند نشان داده اند که اثر القا کننده آپوپتوز قوی توسط لکتین ها مشاهده شد. آپوپتوز با اثر کشندگی مستقیم یا غیر مستقیم سلول توسط آسیب به غشای سلولی و پس از آن نفوذ یون کلسیم (+Ca2) القا می شود. همچنین پیشنهاد شده است که از دست دادن یکپارچگی غشا، و در نتیجه تراوش کلسیم به داخل سلول منجر به فعال سازی اندونوکلئازهای مسئول برش DNA[1] می شوند(Ioana and Socaciu, 2007). کلتر[2] وهمکاران (۲۰۰۷) با بررسی اثر عصاره های داروش (لکتین داروش کره‌ای) بر سلول های سرطان کولون (لاین سلولی COLO 320HSR) گزارش کردند که مکانیسم های ضد سرطانی اعمال شده توسط این عصاره شامل فعال‌سازی کاسپازهای ۲، ۳ و ۸ بوده است که توسط گیرنده‌های مرگ میانجی‌گری شد، و کاسپاز ۲ و ۹ که با مسیرهای میتوکندریایی میانجی‌گری شدند (Kelter et al., 2007). کلتر و فیبیگ (۲۰۰۶) اثر مستقیم داروش‌های رشد یافته بر سه نوع مختلف درخت را بر رشد تومور در ۲۶ لاین سلولی سرطانی انسانی به صورت *in vitro*، و با استفاده از آزمون تکثیر سلولی، مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که لکتین موجود در گیاه داروش دارای فعالیت ضد توموری مشخصی می‌باشد (Kelter and Fiebig, 2006). سنجش سمیت سلولی در آزمایشگاه (تست MTT) نشان داد که لاین‌های مختلف سلولی سرطان پستان شامل Kpl-1، MCF-7 و Mfm-223به طور متفاوتی به عصاره گیاه داروش پاسخ دادند. این محققان به منظور بررسی میزان پاسخدهی سلول‌ها، پروفایل بیان ژن را در سلول‌هایی که در معرض عصاره‌های داروش قرار گرفتند، تعیین کردند. نتایج آنالیز رونویسی نشان داد که این عصاره‌ها بر تنظیم ژن های مسئول ایمنی، پاسخ به استرس، آپوپتوز و مسیرهای چسبندگی سلول- سلول اثر می‌گذارند (Eggenschwiler et al., 2006). مکانیسم های مولکولی و سلولی اعمال شده توسط عصاره‌های داروش (*Viscumalbum* L.) شامل اثرات ضد توموری سمیت سلولی و تنظیم ایمنی هستند که هنوز ناشناخته مانده‌اند.

منابع

[1] DNA-cleaving endonuclease
[2] Kelter

1-Büssing, A. and Schietzel, M., 1999. Apoptosisinducingproperties of *Viscum album* L. extractsfrom different host trees, correlate with their contentA. Maksimova, sobornik statei, Moskva, Akad,Nauk., USSR, pp. 268-274. In Russian. Cited byMozafar, 1969.

2-Chevallier A. 1996. The encyclopedia of medicinal plants. London:Dorling Kindersley Limited; p. 281.

3-Deliorman, D., Ergun, F., Şener, B. andPalittapongarnpim, P., 2001. Evaluation ofantimycobacterial activity of *Viscum album*subspecies. Pharmaceutical biology, 39: 381-383.

4-Edlund U, Henzel A, Frose D, Pfuller U, Scheffler A (2000). Polysaccharides from fresh *Viscum album* L berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutin I. Arzneimittelforschung 50: 645-651.

5-Eggenschwiler J., Patrignani A., Wagner U., Rehrauer H., Schlapbach R., Rist L., Ramos M.H.,Viviani A., 2006, Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with theirresponsiveness to fermented mistletoe (Viscum album L.) extracts Iscador from oak (Quercus), pine(Pinus), white fir (Abies) and apple tree (Malus) in vitro, Arzneimittelforschung, 56 (6A), 483-96.

6-Haas K, Bauer M, Wollenweber E (2003). Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. Z Naturforsch 58c:464-470.

7-Harmsma M., Grommé M., Ummelen M., Dignef W., Tusenius K.J., Ramaekers F., 2004,Differential effects of Viscum album extract Iscador®Qu on cell cycle progression and apoptosis incancer cells, Inter J Oncology, 25, 1521-1529

8-Hülsen H., Doser C., Mechelke F., 1986, Differences in the in vitro effectiveness of preparationsproduced from mistletoe of various host trees, Arzneim-Forsch., 36, 433-436

9-Ioana, V. S. and Socaciu, C. 2007.The biological activity of european Mistletoe (*Viscum album*) extracts and their pharmacological impact. Bulletin USAMV-CN, 63.

10- Jurin, M., Zarkovic, N., Hrzenjak, M. and Ilic, Z.,1993. Antitumour and immunomodulatory effects ofthe *Viscum album* L. Preparation Isorel Oncology, 50(6): 393-398.

11- Karagöz, A., Önay, E., Arda, N. and Kuru, A., 2003.Antiviral potency of mistletoe (*Viscum album* ssp.*album*) extracts against human parainfluenza virustype 2 in vero cells. Phytotherapy Research, 17(5):560-562.

12- Karataş-Düğenci, S., Arda, N. and Candan, A., 2003.Some medicinal plants as immunostimulant for fish.Journal of Ethnopharmacology, 88: 99-106.

13- Kelter G., Fiebig H.H., 2006, Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumorcell lines by mistletoe (Viscum album L.) extracts Iscador in vitro, Arzneimittelforschung, 56 (6A),435-40

14- Kelter G., Schierholz j.M., Fischer I.U., Fiebig H.H., 2007, Cytotoxic activity and absence of tumorgrowth stimulation of standardized mistletoe extracts in human tumor models in vitro, AnticancerRes., 27 (1A), 223-33.

15- Kovacs, E., 2002. The in vitro effect of *Viscum album*(VA) extract on DNA repair of peripheral bloodmononuclear cells (PBMC) in cancer patients.Phytotherapy Research, 16(2): 143-147.

16- Maier, G. and Fiebig, H.H., 2002. Absence of tumorgrowth stimulation in a panel of 16 human tumorcell lines by mistletoe extracts in vitro. AnticancerDrugs, 13(4): 373-379.

17- Montazeri A, Ebrahimi M, Mehrdad N, Ansari M, Sajadian A. Delayed presentation in breast cancer: a study in Iranian women. BMC Womens Health 2003; 3(1): 4.

18- Moshtagh Eshgh Z, Rahemi Z, Alavi Majd H, Hoviattalab SK, Yaghamaei F. Effects of walking on quality of life of mastectomy patients at selected hospitals of Tehran. Iranian Journal Of Nursing & Midwifery Research 2011; 16(4): 299-303.

19- Ochocka JR, Piotrowski A. Biologically active compoundsfrom European mistletoe (*Viscum album* L.). Can J PlantPathol. 2002; 24:21-8.

20- Peng HY, Zhang YH, Han Y, Wang M (2005). Studies on the anticancer effects

of total alkaloid from *Viscum coloratum*. Zhongguo Yhong Yao Za Zhi 30:381-387.

21- Romagnoli S, Ugolini R, Fogolari F, Schaller G, Urech K, M Giannattasio, Ragona L, Molinari H (2000). NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. Biochem J 350:569-577.

22- Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of differentviscotoxins and extracts from the European subspecies of*Viscum album* L. Phytother Res. 1996; 10:473-7.

23- Seedhom AE, Kamal NN. Factors affecting survival of women diagnosed with breast cancer in El-Minia Governorate, Egypt. Int J Prev Med 2011; 2(3): 131-8.

24- Sharif F, Abshorshori N, Tahmasebi S, Hazrati M, Zare N, Masoumi S. The effect of peer-led education on the life quality of mastectomy patients referred to breast cancer-clinics in Shiraz, Iran 2009. Health Qual Life Outcomes 2010; 8: 74.

25- Singh, P., Raj, R., Kumar, V., Mahajan, M. P., Bedi, P.M.S., Kaur, T. and Saxena. A. K. 2012. 1,2,3-Triazole tethered b-lactam-Chalcone bifunctional hybrids: Synthesis and anticancer evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry. 47: 594-600.

26- Talib, H. W. 2011. Chapter 6: Anticancer and antimicrobial potential of plant-derived natural products. P: 141-158. University of Applied Science, Jordan. Phytochemicals - bioactivities and impact on health. Edited by Prof. Iraj Rasooli. Pp: 388.

27-

arkovic, K., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M.,Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S.,Konitzer, S. and Mang, S., 2001. An overview onanticancer activities of the *Viscum album* extractisorel. Cancer Biotherapy andRadiopharmaceuticals, 16(1): 55-62.