

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۴، بهمن ۱۳۹۴، ۹۵۲-۹۳۹

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی (*Pistacia Khinjuk*) بر دو رده سلول سرطانی MCF-7 و HeLa

باقر سید علیپور^۱، الهام پورا کبر^۲، علی طراوتی^۳

دریافت مقاله: ۹۳/۷/۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۱۰/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۸/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان مهم‌ترین علت مرگ و میر در سراسر جهان است. فرآورده‌های طبیعی و مشتقات گیاهان دارویی می‌توانند نقش مهمی برای درمان سرطان ایفا کنند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی (*Pistacia Khinjuk*) بر سلول‌های MCF-7 و HeLa بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره اتانولی گیاه *Pistacia Khinjuk* با روش خیساندن استخراج شد و سمیت سلولی آن بر رده سلولی HeLa و MCF-7 بررسی گردید. رده‌های سلولی HeLa و MCF-7 با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰-۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شد و برای بررسی مهار رشد، از آزمون Methy MTT (Thiazol Tetrazolium) استفاده گردید. جذب نوری محلول رنگی در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانت (Dunnett) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی در غلظت‌های مختلف، رشد سلول‌های HeLa و MCF-7 را به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) نسبت به گروه کنترل بعد از ۷۲ ساعت، کاهش داد. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۸۱/۳۳٪ و ۷۶/۷۶٪ بود و مقدار IC_{50} به میزان ۲/۴۱ و ۲/۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای سلول‌های HeLa و MCF-7 محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی دارای اثر مهار بر رده سلولی HeLa و MCF-7 است. لذا به منظور پیدا کردن مکانیسم اساسی این فعالیت، تحقیقات بیشتری باید انجام شود.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، عصاره اتانولی، پسته وحشی، رده سلولی HeLa و MCF-7

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰، دورنگار: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰، پست الکترونیک: b.alipour81@gmail.com

۲- کارشناس ارشد زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران

۳- استادیار گروه آموزشی زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

مقدمه

سرطان یک بیماری است که به رشد غیر قابل کنترل بافت که در نتیجه عدم تعادل بین تقسیم سلولی و پدیده آپوپتوز به خاطر عوامل پیچیده به وجود می‌آید، اطلاق می‌شود [۱]. در سلول‌های سرطانی، کنترل‌های چرخه سلولی وجود ندارند و به سازوکارهای کنترلی بدن به طور طبیعی پاسخ نمی‌دهند. پروتئین‌هایی که در مسیرهای پیام‌رسانی نقش دارند و بر روی چرخه سلولی تأثیر می‌گذارند تغییر پیدا می‌کنند و به هم خوردن چرخه سلولی مشاهده می‌شود، سلول‌ها رفتار متفاوتی نشان می‌دهند و درمان‌های متفاوتی را می‌طلبند [۲]. این بیماری مجموعه‌ای از وقایع ژنتیکی و عوامل مرتبط با محیط و شیوه زندگی می‌باشد [۳] و یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است [۴]. در ایران بعد از بیماری قلبی و عروقی و تصادفات سومین عامل مرگ و میر می‌باشد [۵].

سلول‌های HeLa، سلول‌های اپی‌تلیایی و نامیرا مشتق شده از سرطان گردن رحم است که ششمین سرطان شایع در بین همه انواع سرطان‌ها و دومین سرطان شایع در بین زنان می‌باشد. سلول‌های MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)، سلول‌های شبه اپی‌تلیالی مشتق شده از سرطان پستان هستند. این رده سلولی بسیاری از ویژگی‌های اپی‌تلیوم پستانداران نظیر توانایی پردازش استرادیول از طریق گیرنده‌های استروژنی سیتوپلاسمی را دارا می‌باشد [۶]. مسیر سیگنالینگ Wnt (Wingless/integrated) نقش کلیدی در سرطان‌زایی و

جنین‌زایی دارد و مولکول‌های مسیر سیگنالینگ Wnt اهداف قوی برای تشخیص، پیش‌گیری و درمان سرطان هستند. تحقیقات نشان داد Wnt7B در رده سلول سرطانی پستان (MCF-7) بیان می‌شود و بتا استرادیول بر سطح بیان Wnt7B در رده سلول سرطان MCF-7 تأثیر نمی‌گذارد [۷].

تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع مختلف سرطان شناخته شده است که اکثر آنها درمان قطعی ندارند اما برای جلوگیری از رشد و پیشرفت آنها از روش جراحی، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی، ژن‌درمانی استفاده می‌شود [۸]. علی‌رغم تحقیقات بسیار در مورد سرطان و درمان آن، هنوز هم این بیماری به عنوان یکی از بزرگترین مشکلات سلامت جوامع انسانی مطرح می‌باشد. با توجه به این که داروهای شیمیایی مورد استفاده در درمان سرطان، علاوه بر ایجاد مقاومت دارویی، دارای اثرات جانبی نیز می‌باشند، مطالعه و بررسی عواملی با منشاء طبیعی، مانند ترکیبات به دست آمده از گیاهان که اثرات مضر کمتری دارند، یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است [۹-۱۰]. بنابراین تلاش برای یافتن داروهای مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر در مورد سرطان‌ها با استفاده از گونه‌های بومی مورد توجه می‌باشد. پسته با نام علمی Pistacia از تیره Anacardiaceae شامل ۱۱ گونه در سراسر جهان است. در ایران سه گونه وحشی در بخش‌های مختلف ایران می‌روید که شامل *Pistacia Atlantica* (دارای سه زیر گونه)، گونه *Vera* *Pistacia* و گونه *Pistacia Khinjuk* (فصل بهار می‌روید) می‌باشد [۱۱] و عمدتاً در نواحی مرکزی و شرقی شامل

گیاهان متعددی از این تیره وجود دارد که بعضی از آنها دارای اثر درمانی و برخی دیگر دارای میوه‌های مطبوع و خوراکی هستند. پسته خندان با نام علمی *Pistacia Vera* دارای مقدار زیادی مواد روغنی، آمیدون و مقداری ساکارز در مغز پسته می‌باشد [۱۳]. مطالعات نشان داد داده‌اند رزین *Pistacia khinjuk* برای درمان سوءهاضمه، دندان درد و به عنوان اثر قابض در طب سنتی مورد قرار می‌گرفته و هم‌چنین میوه *Pistacia khinjuk* مصرف خوراکی دارد [۱۴]. قسمت هوایی گیاه *Pistacia Khinjuk* حاوی گلیکوزیدهای فلاونوئیدی شامل میریستین-۳ - گلیکوزید، میریستین-۳ -رتینوزید و میریستین-۳ - گلیکوزید می‌باشد [۱۵] و هم‌چنین مشتقات میریستین بیست درصد مقدار کل پلی فنول برگ *Pistacia* *Lentiscus* را شامل می‌شوند [۱۶]. Benhammou و همکاران گزارش کردند عصاره اتانولی برگ *Pistacia Atlantica* فعالیت آنتی‌میکروبی ندارد [۱۷]. Tohidi و همکاران گزارش کردند که اسانس برگ و صمغ گیاه *Pistacia Atlantica* فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی مناسبی دارد [۱۸].

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیماً در رشد و نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات برخلاف متابولیت اولیه انتشار محدودی در قلمرو گیاهان دارند. آلکالوئیدها، تریپنوئیدها و فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که دارای اثر ضد سرطانی می‌باشند [۱۹]. با توجه به وجود ترکیبات پلی فنول و گلیکوزیدهای فلاونوئیدی در برگ و قسمت هوایی گیاهان تیره پسته و عدم مطالعه تأثیرات ضد سرطانی گونه

نواحی کوهستانی نیمه خشک کشور مانند بلوچستان تا خراسان، لرستان، کردستان، اصفهان، فارس، خوزستان، کرمان، یزد و تهران انتشار قابل توجهی را نشان می‌دهند [۱۲]. پسته وحشی که در مناطق مرکزی ایران به نام خینجوک (*Pistacia khinjuk Stocks*) معروف است (شکل ۱) به دلیل شباهت بسیار زیاد مورفولوژیکی و برگی با *Pistacia Atlantica* معمولاً به اشتباه بنه نامیده می‌شود در حالی که بنه نام فارسی گونه *Pistacia Atlantica* می‌باشد. پسته وحشی گیاهی درختچه‌ای کوتاه به ارتفاع یک تا سه متر، دو پایه، با برگ‌های مرکب تک شانه‌ای، برگچه‌های تخم مرغی شکل، گل‌های ارغوانی مایل به قرمز، گل آذین خوشه مرکب و میوه شفت کوچک می‌باشد [۱۲].



شکل ۱- تصاویری از گیاه *Pistacia khinjuk Stocks* (شهرستان بردسکن در استان خراسان رضوی)

Pistacia Khinjuk بر رده سلولی سرطان دهانه رحم و سرطان پستان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی گونه بومی ایران *Pistacia Khinjuk* بر رده سلول‌های سرطانی HeLa و MCF-7 انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، گیاه *Pistacia Khinjuk* در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ از شهرستان بردسکن در استان خراسان رضوی جمع‌آوری و توسط متخصص گیاه شناسی در دانشگاه قائم شهر شناسایی گردید.

تهیه و آماده سازی عصاره گیاه: ابتدا برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* پس از خشک شدن در معرض هوا، با استفاده از دستگاه آسیاب برقی (Moulinex, model AR1066Q) به صورت پودر در آمده و ۲۵ گرم از آن را به روش خیساندن (ماسراسیون) و با حلال اتانول ۹۶ درصد خیسانده و در یک دوره حداقل سه روزه همراه با تحریک مکرر به منظور حل شدن ماده حل‌شونده در دمای اتاق نگهداری شد. پس از گذشت سه روز، مخلوط عصاره و الکل با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد تا مواد جامد از مایع جدا شوند و در نهایت با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء دوار (Laborota 4000-(Rotary evaporate) efficient, Heidolph, Germany) حلال اضافی تبخیر و تغلیظ شد و به کمک دستگاه فریز درایر (LTE Scientific Ltd, UK) کاملاً خشک شد و به شکل پودر در آمد. در نهایت پودر خشک در ظرف شیشه‌ای در بسته و درون یخچال نگهداری و برای تهیه غلظت‌های مختلف استفاده شد [۲۰].

به دلیل این که عصاره گیاه *Pistacia Khinjuk* مستقیماً در محیط کشت RPMI-1640 حل نمی‌شود و هم‌چنین حلال عصاره گیاهی دی متیل سولفوکساید (DMSO) خود دارای اثرات سمیت سلولی می‌باشد، برای حذف اثر این ماده بر روی سلول‌های تیمار شده، میزان آن را در محلول نهایی کمتر از ۱٪ در نظر می‌گیرند. دی متیل سولفوکساید تا غلظت کمتر از ۱٪ فاقد سمیت است و غلظت این حلال از این حیث مهم می‌باشد [۲۱]. بدین منظور ابتدا ۴۸۰ میلی‌گرم عصاره گیاه بعد از توزین، در ۱۰۰ میکرو لیتر حلال دی‌متیل سولفوکساید حل شد. سپس یک میلی‌لیتر محیط کشت برای حل شدن بهتر اضافه شد و در نهایت حجم محلول با استفاده از محیط کشت به ۲۴ میلی‌لیتر رسانده شد: سپس رقت‌های متوالی از این استوک با نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، برای تهیه غلظت‌های ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد [۲۲]. برای رده سلولی MCF-7 از هشت غلظت استفاده شد در صورتی که برای رده سلولی HeLa از هفت غلظت استفاده شد.

کشت سلول‌های HeLa و MCF-7: رده‌های سلولی HeLa (NCBI C115) و MCF-7 (NCBI C135) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت مایع RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) غیر فعال شده، ۲ میلی‌مولار گلوتامین، محلول پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و در دمای ۳۷ درجه

جدا گردید و پس از انتقال به لوله آزمایش استریل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانترفیوژ شد (Sigma, 3-30k model, Germany). سپس سلول‌ها در محیط کشت تازه با کمک پپیت پاستور دوباره معلق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی همراه با عصاره یا بدون عصاره به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده گردید به طوری که در هر چاهک تعداد ۳۰۰۰ سلول باشد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور (Memmert, Germany) انکوبه شدند تا سلول‌ها از استرس ناشی از تریپسینه شدن به حال عادی بازگردند. سپس، رقت‌های مناسب از عصاره مورد نظر تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به صورت ستونی به چاهک‌های پلیت اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ در انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت از اضافه کردن عصاره به سلول‌ها، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند و پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد [۲۶]. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت‌ها با استفاده از تکان دهنده پلیت، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Awareness Technology Inc, Stat Fax 2100, USA) خوانده شد. چاهک‌های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان چگالی نوری کنترل و چاهک‌های بدون سلول و تنها محیط

سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ رطوبت کشت و پاساژ داده شد تا سلول‌ها از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند (پس از ۳-۴ پاساژ). پس از جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک توسط تریپسین-EDTA (Gibco BRL, EDTA-Scotland) شمارش و ارزیابی حیات سلول انجام شد و تعداد ۳۰۰۰ سلول در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای به همراه و یا بدون عصاره گیاهی *Pistacia Khinjuk* کشت داده شد [۲۳]. تغییرات مورفولوژی و خصوصیات عمومی سلول پس از ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسکوپ invert (Motic, AE31 model, China) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره‌ها با روش آزمون رنگ سنجی MTT (Methy Thiazol Tetrazolium) انجام شد [۲۴]. MTT (Sigma-Aldrich, USA) یک نمک تترازولیوم محلول در آب است که بر اساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است و محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان تبدیل می‌کند (چون محتوای دهیدروناز سلول‌های یک نوع نسبتاً ثابت است، میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول است) که به وسیله دی متیل سولفوکساید به صورت محلول در می‌آید [۲۵].

سلول‌ها در فلاسک‌های تی شکل ۷۵ سانتی‌متر مربع در ۱۵ میلی‌لیتر محیط و با تعداد اولیه $10^6 \times 1-2$ سلول، شروع به رشد کردند. بعد از گذشت سه روز و پوشیده شدن بستر فلاسک از سلول، لایه سلول چسبنده به کف فلاسک به روش آنزیمی و با استفاده از تریپسین-ورسن

RPMI1640 به همراه سرم جنین گاوی به عنوان Blank در نظر گرفته شد.

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

لازم به ذکر است که اثر هر غلظت از عصاره بر رده سلولی HeLa و MCF-7 در سه آزمایش مستقل از یکدیگر تحت بررسی قرار گرفت؛ از این رو اعداد درج شده در جدول، میانگین درصد پاسخ‌های به دست آمده در مهار رشد سلول برای سه بار تکرار مستقل می‌باشد. با توجه به مقادیر جذب نوری به دست آمده به وسیله دستگاه الیزا ریدر درصد مهار رشد مربوط به هر غلظت با به کارگیری فرمول زیر محاسبه شد [۲۸]:

$$\% \text{ مهارت در رده سلولی} = 100 - \frac{OD \text{ برای هر گروه و تیمار}}{OD \text{ برای گروه کنترل}} \times 100$$

در نهایت برای به دست آوردن میزان IC_{50} که بیانگر غلظتی از عصاره است که موجب ۵۰٪ درصد مهار رشد سلولی‌های سرطانی می‌شود، از طریق رگرسیون خطی محاسبه انجام شد. با استفاده از منحنی، معادله خط برای سلول‌های سرطانی MCF-7 و HeLa به ترتیب $Y = -11/99x + 78/89$ و $Y = -28/96x + 120/08$ بدست آمد و سپس با جایگزینی ۵۰ درصد مهار به جای Y در معادله، میزان IC_{50} برای سلول‌های سرطانی MCF-7 و HeLa بدست آمد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار حاصل از ۳ تکرار تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانت

درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۷]:

(Dunnett) تجزیه تحلیل شدند و سطح معنی‌داری در آزمون ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

برای بررسی سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *Pistacia Khinjuk*، غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه شده و اثرات سمیت سلولی هر غلظت با کمک روش MTT بر رده سلول‌های سرطانی HeLa و MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود عصاره گیاه *Pistacia Khinjuk* در غلظت‌های ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری بر رده سلول HeLa داشته است که این اثر معنی‌دار بوده و هم‌چنین بالاترین درصد مهار رشد در سلول‌های HeLa به ترتیب ۸۱/۳۳٪ و ۶۴/۲۱٪ برای این دو غلظت مشاهده شد. در غلظت‌های ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد اما در صد مهار رشد کاهش پیدا کرد. در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییرات معنی‌داری همراه با کاهش در صد مهار رشد مشاهده شد. بنابراین با افزایش غلظت عصاره، در تمام غلظت‌ها در صد مهار رشد کاهش پیدا کرد و شاید بتوان این نتیجه را ناشی از اثر عوامل محرک رشد ناشناخته موجود در عصاره اتانولی در غلظت‌های بالاتر دانست که اثر سمیت سلولی ترکیبات موجود در این عصاره اتانولی را خنثی می‌کنند.

مقدار IC₅₀ برای رده سلولی HeLa، ۲/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Pistacia Khinjuk* بر مهار رشد سلول‌های HeLa

IC ₅₀ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	مقدار P	میانگین درصد مهار کنندگی	انحراف معیار ± میانگین جذب نوری	غلظت عصاره پسته وحشی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۲/۴۱	۰/۰۰۲	۸۱/۳۳	۰/۱۹۳ ± ۰/۰۳۹	۰/۱۵۶
	۰/۰۱۳	۶۴/۲۱	۰/۲۶۴ ± ۰/۰۲۵	۰/۳۱۲
	۰/۰۶۸	۴۹/۲۱	۰/۳۲۷ ± ۰/۰۱۶	۰/۶۲۵
	۰/۵۵۴	۲۶/۰۷	۰/۴۲۴ ± ۰/۰۳۲	۱/۲۵
	۰/۰۴۸	-۵۲/۴۴	۰/۷۵۶ ± ۰/۰۲۵	۲/۵
	۰/۰۰۲	-۷۹/۳۹	۰/۸۷۱ ± ۰/۰۴۷	۵
	۰/۰۲۲	-۵۹/۳۶	۰/۷۸۶ ± ۰/۰۱۶	۱۰
	-	-	۰/۵۳۴ ± ۰/۰۳۹	کنترل

تفاوت میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (one way ANOVA, Dunnett's post-test).

نسبت به کنترل اثر معنی‌داری مشاهده نشد (۰/۰۵ > p). بالاترین درصد مهار رشد در غلظت‌های ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برابر ۷۶/۷۶٪ و ۷۲/۲۵٪ بود. هم‌چنین مقدار IC₅₀ برای رده سلولی MCF-7 به میزان ۲/۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتایج اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *Pistacia Khinjuk* بر رده سلول‌های سرطانی MCF-7 در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر مهاری بر رده سلول MCF-7 داشته است که نسبت به کنترل معنی‌دار می‌باشد در صورتی که در بقیه غلظت‌ها

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Pistacia khinjuk* بر مهار رشد سلول‌های MCF-7

IC ₅₀ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	مقدار P	میانگین درصد مهار کنندگی	انحراف معیار ± میانگین جذب نوری	غلظت عصاره پسته وحشی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۲/۴۰	۰/۰۲۷	۷۶/۷۶	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۱۰	۰/۱۵۶
	۰/۰۴۰	۷۲/۲۵	۰/۱۰۲ ± ۰/۰۱۲	۰/۳۱۲
	۰/۶۸۹	۳۱/۰۶	۰/۱۸۷ ± ۰/۰۴۲	۰/۶۲۵
	۰/۹۴۴	۱۹/۸۹	۰/۲۱۱ ± ۰/۰۲۹	۱/۲۵
	۰/۹۹۹	۳/۴۹	۰/۲۵۹ ± ۰/۰۲۵	۲/۵
	۰/۹۹۹	-۳/۴۶	۰/۲۷۶ ± ۰/۰۰۷	۵
	۰/۹۹۹	-۶/۸۵	۰/۲۷۲ ± ۰/۰۲۲	۷/۵
	۰/۹۹۹	۶/۴۹	۰/۲۴۱ ± ۰/۰۲۷	۱۰
-	-	۰/۲۶۶ ± ۰/۰۲۸	کنترل	

تفاوت میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (one way ANOVA, Dunnett's post-test).

بحث

با پیشرفت‌های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و تکنیک‌های مولکولی، اطلاعات زیادی به دست آمده که در شناخت زودرس بیماری سرطان کمک خواهد کرد. مطالعه و بررسی عواملی با منشاء طبیعی، مانند ترکیبات به دست آمده از گیاهان که اثرات مضر کمتری دارند یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیق در حوزه درمان سرطان است. بدین منظور مطالعات گسترده‌ای بر روی گیاهان مختلف صورت گرفته و اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی آنها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

در این تحقیق اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* به روش سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اثر عصاره اتانولی برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* بر روی سلول‌های HeLa در غلظت ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری (به ترتیب به میزان ۰/۸۱/۳۳؛ ۰/۶۴/۲۱) باعث مهار رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شده است. مطالعه حاضر نشان داد با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* از ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانایی زیستی سلول‌ها افزایش یافت به عبارتی، مهار رشد سلول‌های سرطانی کاهش پیدا کرد. شاید بتوان این نتیجه را ناشی از اثر عوامل محرک رشد ناشناخته موجود در عصاره اتانولی در غلظت‌های بالاتر دانست که در غلظت‌های بالا اثر سمیت سلولی ترکیبات موجود در این عصاره اتانولی را خنثی می‌کنند اما به هر حال، با نظر به این که ترکیبات

موجود در عصاره مورد آنالیز و تجزیه کمی و کیفی قرار نگرفته‌اند و جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات مؤثره و تعیین ساختار جزء مؤثره عصاره موجود در عصاره اتانولی انجام نشد، نمی‌توان در این مورد اظهار نظر قطعی نمود.

امروزه بیش از ۶۰٪ از ترکیبات ضدسرطانی که برای درمان بیماران سرطانی کاربرد دارد از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آیند. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارای اثرات بیولوژیکی متعدد از جمله اثرات ضدالتهاپی، ضد سرطانی، ضد دردی و اثرات متعدد قلبی عروقی هستند. نتایج حاصل از آنالیز اسانس برگ گیاه *Pistacia lentiscus L* توسط GC-MC حاکی از وجود سزکوئنی ترپن (Sesquiterpene) به میزان ۰/۴٪ بود و هیچ گونه الکل منوترپنی مشاهده نشد، در صورتی که در مطالعات قبلی که بر روی گیاهان *Pistacia khinjuk* و *Stocks* و *Pistacia chinensis Bunge* انجام گرفت به ترتیب ۰/۱۶٪ و ۰/۸٪ الکل منو ترپن گزارش شد [۲۹]. مطالعات نشان داد ترکیبات اصلی اسانس قسمت‌های هوای گیاه *Pistacia Khinjuk* شامل pinene، -pinene، myrcene، beta-caryophyllene، germacrene B و spathulenol می‌باشد که مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌قارچی می‌باشند [۳۰]. نتایج به دست آمده از آنالیز اسانس میوه گیاه *Pistacia Khinjuk* نشان داد که جزء اصلی آن شامل phellandrene، -pinene و Limonene- می‌باشد که مقدار آنها به ترتیب ۰/۵۲/۳۳٪، ۰/۱۵/۲۷٪ و ۰/۴/۰۸٪ گزارش شد [۱۴]. از سوی دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نیز برای برگ گیاه *P. Khinjuk* به واسطه حضور ترکیبات فنولیک آنها

گزارش شد [۳۰-۳۱]. در این تحقیق پس از بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره بر رده سلول‌های سرطانی HeLa و تأیید فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حضور ترکیبات فنلی بالاخص فلاونوئید از مطالعات قبلی و نقش فلاونوئید در ارتباط با اثرات ضدسرطانی، این نتیجه حاصل شد که فعالیت ضد سرطانی عصاره برگ *Pistacia khinjuk* می‌تواند به علت ترکیبات فنلی باشد. بنابراین، این یافته با مطالعات مختلفی که در ارتباط با اثرات ضدسرطانی ترکیبات پلی فنول با مکانیسم‌هایی نظیر القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، مهار رشد سلولی، مهار فعالیت پروتئین کینازها و جلوگیری از تهاجم سلول‌ها انجام شده است، مطابقت دارد [۳۲].

نتایج این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* در غلظت‌های ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مهار رشد سلول‌های MCF-7 به ترتیب به میزان ۰/۷۶/۷۶٪، ۰/۷۲/۲۵٪، ۰/۳۱/۰۶٪ و ۰/۱۹/۸۹٪ شده است و هر چه غلظت عصاره بیشتر می‌شود اثر مهار رشد سلول‌های سرطانی کمتر می‌گردد. این احتمال وجود دارد در این محدوده از غلظت، ترکیب مؤثر در عصاره برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* به گونه‌ای نبوده که سبب مهار رشد شود هر چند کاهش رشد مشاهده شد. Balan و همکاران با بررسی فعالیت آنتی تومور صمغ گیاه *Pistacia lentiscus* نشان دادند که این گیاه با القاء آپوپتوز، تکثیر سلول تومور کولورکتال انسان را در *in vitro* مهار می‌کند [۳۳]. Rezaei و همکاران گزارش دادند عصاره میوه *Pistacia Atlantica* رشد سلول‌های کارسینومای

انسان را مشابه با دوکسی روبسین مهار می‌کند [۳۴]. Almehdar و همکاران نشان دادند، روغن رزین *Pistacia Vera* اثر سیتوتوکسیک ملایم در برابر رده سلولی سرطان پستان، رده سلولی سرطان سرویکس و ملانوسیت‌های نرمال دارد [۳۵]. بنابراین، یافته مطالعه حاضر منطبق با نتایج حاصل از گونه‌های مختلف پسته و تأیید نقش ضدسرطانی فلاونوئیدها از طریق مهار پلیمریزاسیون توبولین‌ها، ممانعت از عمل تخریبی رادیکال‌های آزاد و القاء آپوپتوز می‌باشد [۳۶]. مقایسه اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه *Pistacia Khinjuk* بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 با HeLa نشان داد این عصاره دارای اثرات سمیت بیشتری بر روی سلول‌های HeLa در مقایسه با سلول‌های MCF-7 بود، به گونه‌ای که در تمامی غلظت‌های عصاره، درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی HeLa تا حدی بیشتر است. با وجود این شواهد، می‌توان انتظار داشت که فعالیت مهارکنندگی گونه *Pistacia Khinjuk* بر سلول‌های سرطانی احتمالاً به علت وجود ترکیبات فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آن باشد. لذا به نظر می‌رسد خواص سیتوتوکسیک عصاره گیاه *Pistacia Khinjuk* را بتوان به طور کلی به حضور متابولیت‌های ثانویه به خصوص در درجه اول فلاونوئیدها و در درجه دوم به فنل تام موجود در این گیاه نسبت داد.

از آن جا که مطالعه بر روی روش‌های مختلف درمان سرطان، یکی از مهم‌ترین اهداف پژوهشی پزشکی در عصر حاضر به حساب می‌آید، لذا جهت یافتن روش‌های درمانی مناسب و اثربخش، تلاش‌های گسترده‌ای آغاز شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات سمیت سلولی

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص گردید عصاره اتانولی برگ گیاه *Pistacia Khinjuk* در غلظت‌های ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 و HeLa شد به طوری که بالاترین درصد مهار در این دو غلظت مشاهده گردید. برای تأیید توان سیتوتوکسیک ماده مؤثره این گیاه و احتمالاً بهره‌برداری دارویی از آن، تحقیقات بیشتر و تکمیلی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر بهمن اسلامی که در جمع‌آوری و شناسایی نمونه و دکتر نقی‌نژاد در توضیحات گیاه‌شناسی و هم‌چنین از کارشناس آزمایشگاه زیست سلولی و مولکولی سرکار خانم محمدی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند، نهایت تشکر به عمل می‌آید.

مواد نشأت گرفته از گیاهان در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش سنجش MTT اشاره نمود. هرچند روش سنجش MTT یک روش پرکاربرد در آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی مختلف است، اما خود نیز دارای معایبی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به این حقیقت اشاره نمود که این روش بر پایه فعالیت میتوکندری‌های سلول‌های زنده استوار می‌باشد و با استفاده از نتایج این تست تشخیصی، نمی‌توان در مورد کاهش تعداد سلول‌ها با قطعیت کامل قضاوت نمود، زیرا که اگر ماده‌ای سبب تغییر در تعداد میتوکندری‌های سلول شود، اثر آن توسط این تست، مشابه تغییر تعداد سلول‌ها تفسیر می‌گردد. از طرفی برای استفاده بالینی ترکیبات گیاهی نیازمند انجام تست‌های بیشتر و دقیق‌تر بوده و لذا جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات مؤثره موجود در عصاره، تعیین ساختار جزء مؤثره عصاره، تعیین مکانیسم بیوشیمیایی فعالیت ضدسرطان و بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره این گیاه در شرایط *in vivo* پیشنهاد می‌گردد.

References

- [1] Bansal P, Gupta V, Bansal R, Sapra R. Dietary phytochemicals in cell cycle arrest and apoptosis an insight. *J Drug Deliv Ther* 2012; 2(2): 8-18.
- [2] Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Campbell NA. Campbell Biology, 9th edn, San Francisco, California, USA, Benjamin Cummings, 2012; pp: 1464.
- [3] Van Lier EA, van Kranen HJ, Van Vliet JA, Rahamat-Langendoen JC. Estimated number of new cancer cases attributable to infection in the

- Netherlands in 2003. *Cancer let* 2008; 272(2): 226-31.
- [4] Wicki A, Hagmann J. Diet and cancer. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13250.
- [5] Kosha A, Farahbakhsh M, Hakimi S, Abdollahi L, Golzari M, Seif M. Epidemiology of cancer in west Azarbaijan in 2007. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2010; 32(4): 74-9. [Farsi]
- [6] Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* 1997; 57(15): 3071-8.
- [7] Kirikoshi H, Katoh M. Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer. *Int J Oncol* 2002; 21(4): 895-900.
- [8] Shahneh FZ, Valiyari S, Azadmehr A, Hajiaghae Reza, Yaripour S, Bandehagh A, et al. Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Fibrosarcoma Cell Lines by *Echinophora platyloba* DC: In Vitro Analysis. *Adv Pharmacol Sci* 2013; 2013: 512931.
- [9] Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharmaceutical Research* 2010; 27(6): 950-61.
- [10] Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 2001; 80(11): 1387-96.
- [11] Rechinger KH. Anacardiaceae in Flora Iranica. Graz, Akademische Druck-und Verlasanstalt, 1969; 63: pp: 1-8.
- [12] Mozafarian V. Trees and Shrubs of Iran. Tehran, Farhang moaser, 2005; pp: 15-22.
- [13] Zargari A. Medicinal plants. 8th Edition, Tehran, University of Tehran press, 2012; vol 1: pp: 573-86.
- [14] Ghasemi Pirbalouti A, Aghaee K. Chemical Composition of Essential Oil of *Pistacia khinjuk* Stocks Grown in Bakhtiari Zagross Mountains, Iran. *Electronic Journal of Biology* 2011; 7(4): 67-9.
- [15] Kawashty SA, Mosharrafa SAM, El-Gibali M, Saleh NAM. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Ecol* 2000; 28(9): 915-7.
- [16] Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal* 2002; 13(2): 79-86.
- [17] Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharacol* 2008; 2(2): 22-8.

- [18] Tohidi M, Khayami M, Nejati V, Meftahizade H. Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* *J Med Plants Res* 2011; 5(17): 4310-4.
- [19] Kawashty SA, Mosharrata SAM, El-Gibali M, Saleh NAM. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Ecol* 2000; 28(9): 915-7.
- [20] Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal* 2002; 13(1): 8-17.
- [21] Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on CaCO₂/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(12): 1600-3.
- [22] Kanimozhi D. In-Vitro Anticancer Activity of Ethanolic Extract of *Cynodon dactylon* Against HEP-2, HELA and MCF-7 Cell Lines. *IJSRR* 2012; 1(1): 10-23.
- [23] Feridberg R. An investigation into the antimicrobial and anticancer activities of *Geranium incanum*, *Artemisia afra* and *Artemisia absinthium* [Dissertation]. South Africa: Faculty of Health Sciences, Nelson Mandela Metropolitan University; 2009. p.1-245.
- [24] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- [25] Iselt MA, Holtei WJ, Hilgand PT. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Drug Res* 1998; 39: 125-9.
- [26] Carmichale J, De Graff WG, Gazdar AF, Mina JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semi automated colorimetric assay: assessment of chemo sensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47(4): 936-42.
- [27] Stoddart MJ. Mammalian Cell Viability, Methods and Protocols in molecular Biology. Estimation of cell number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 13-9.
- [28] Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. Evaluation of Cytotoxicity of Sagebrush Plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Armaghane danesh* 2013; 18(3): 241-51.
- [29] De Pooter HL, Schamp NM, Aboutabl EA. Essential Oils from the Leaves of Three *Pistacia* Species Grown in Egypt. *Flavour Frag J* 1991; 6(4): 229-32.
- [30] Taran M, Sharifi M, Azizi E. Antimicrobial activity of the leaves of *Pistacia khinjuk*. *J Med Plants* 2010; 9(6): 81-5.

- [31] Peksel A, Arisan-Atac I, Yanardag R. Evaluation of antioxidant and antiacetylcholin esterase activities of the extracts of *pistacia khinjuk* desf leaves. *J of Food Biochem* 2010; 34(3): 451-76.
- [32] Kanadaswami C, Lee L, Lee P, Hwang P, Ke JJ, Huang YT. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 2005; 19(5): 895-910.
- [33] Balan KV, Prince J, Han Z. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine* 2007; 14(4): 263-72.
- [34] Rezaei PF, Fouladdel S, Hassani S. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(3-4): 1054-9.
- [35] Almehdar H, Abdallah HM, Osman M, Abdel-Sattar EA. In vitro cytotoxic screening of selected Saudi medicinal plants. *J Nat Med* 2012; 66(2): 406-12.
- [36] Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 2004; 21(2): 263-77.

The Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of *Pistacia Khinjuk* Leaf on HeLa and MCF-7 Cancerous Cell Lines

B. Seyedalipour¹, E. Pourakbar², A. Taravati³

Received: 23/09/2014

Sent for Revision: 18/01/2015

Received Revised Manuscript: 08/11/2015

Accepted: 06/12/2015

Background and Objectives: Cancer is the most important cause of death worldwide. Natural products and derivatives of medicinal plants can play an important role to cure cancer. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of ethanolic extracts of *Pistacia Khinjuk* leaf on HeLa and MCF-7 cell lines.

Materials and Methods: In this laboratory study, ethanolic extract of *Pistacia Khinjuk* leaves was prepared by using maceration method and its cytotoxic effect on HeLa and MCF-7 cell lines was investigated. HeLa and MCF-7 cell lines were treated with various concentrations of extract (0.156-10.0 mg/ml) for 72 hours and growth inhibition was assayed using MTT (Methy Thiazol Tetrazolium) test. The optical density of the coloured solution was quantified at 570 nm wavelengths by an ELISA Reader. Data were analyzed using one-way ANOVA and Dunnett's post-test.

Results: The results showed that different concentrations of ethanolic extract significantly reduced the growth of HeLa and MCF-7 cell lines compared to the control group after 72 hours ($P < 0.05$). The highest percentages of growth inhibition at concentration of 0.156 mg/ml were 81.33% and 76.76% and the IC_{50} values were 2.41 and 2.40 mg/ml for HeLa and MCF-7 cell lines, respectively.

Conclusion: The findings of the present study showed that the ethanolic extract of *Pistacia Khinjuk* leaf possessed inhibitory effect on HeLa and MCF-7 cell lines. In order to find the underlying mechanism of this activity, further research should be carried out.

Key words: Cytotoxicity, Ethanolic extract, *Pistacia Khinjuk*, HeLa and MCF-7 cell lines

Funding: This research was funded by Islamic Azad University, Qaemshahr Branch.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: This article does not need permission from the Ethics Committee because the information in this article was derived from a non-animal research.

How to cite this article: Seyedalipour B, Pourakbar E, Taravati A. The Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of *Pistacia Khinjuk* Leaf Against HeLa and MCF-7 cancerous Cell Lines. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 14(11): 939-52. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran (Corresponding Author) Tel: (011) 3534 2450; Fax: (011) 3534 2450, E mail: b. alipour81@gmail.com

2- MSc of Cellular and Molecular Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr Iran

3- Assistant Prof., Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran