

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandulla anguostifouliya*) بر روی رده سلولی 8305C

صدیقه مهدی نژاد دوغیکلائی، محسن محمدی*

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تیروئید آناپلاستیک از جمله خطرناک‌ترین نوع سرطان تیروئید است و از آنجایی که اغلب درمان‌های امروزی سرطان ناکارآمد و دارای عوارض جانبی زیادی هستند، لذا یافتن درمان مؤثر و جای‌گزین ضروری به‌نظر می‌رسد. گیاه اسطوخودوس با نام علمی *Lavandulla anguostifouliya* از تیره نعنائیان گیاهی چند ساله است که ارزش غذایی و دارویی بالایی دارد. لذا در پژوهش حاضر تأثیر سیتوتوکسیکی عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، برای اولین بار، اثر سیتوتوکسیکی عصاره اتانولی اندام‌های هوایی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری‌که گیاه اسطوخودوس در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ از منطقه سه هزار تنکابن جمع‌آوری شد و جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH⁰ مورد ارزیابی قرار گرفت. رده سلولی 8305C در محیط DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد. غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی 8305C اثر داده شد. در ادامه توانایی حیات سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: در بررسی حاضر، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH⁰ برابر با ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. نتایج حاصل از تست MTT، این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز بر روی رده سلولی 8305C دارد. IC₅₀ این عصاره برای سلول‌های 8305C غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس به‌صورت وابسته به دوز قادر، به از بین بردن سلول‌های سرطانی بوده و خواص سیتوتوکسیکی از خود نشان داد. بدین ترتیب این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک گیاه دارویی بر علیه سرطان تیروئید آناپلاستیک مورد پژوهش وسیع‌تری قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان، تیروئید آناپلاستیک، عصاره اتانولی، DPPH، روش MTT

مقدمه:

به‌طوری‌که دسترسی به دارویی با اثر بخشی بالا، سمیت کم، که به‌صورت اختصاصی بر سلول‌ها تأثیر گذاشته و ارزان باشد یکی از دغدغه‌های مهم جوامع دارویی دنیا و حوزه درمان است. در این زمینه درمان گیاهان دارویی می‌تواند یکی از پایه‌های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد و به‌نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به‌ویژه گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین باشد. به هر حال سرطان یک مشکل مهم سلامتی در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود و بیش-تر درمان‌ها مناسب و کافی نیستند (۶).

سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی عروقی در بسیاری از جوامع از جمله ایران است (۱).
درمان سرطان‌های مرسوم باعث اثرهای جانبی جدی می‌شود

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد

تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

پست الکترونیکی: dr_mohsenmohamadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۷

برگ‌های گیاه اسطوخودوس در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ از منطقه سه‌هزار شهرستان تنکابن واقع در شمال غرب مازندران جمع‌آوری شدند.

در نهایت نمونه‌ها به دور از نور مستقیم خورشید نگه داشته شده و در سایه خشک گردیدند و توسط دستگاه آسیاب، پودر آن تهیه گشت.

جهت تهیه عصاره اتانولی ۳۰ گرم از پودر خشک شده گیاه اسطوخودوس در کاغذ واتمن به‌صورت ساندویچ قرار داده شد و به‌منظور حذف رنگ و چربی در دستگاه سوکسله به همراه ۵۰۰ میلی‌لیتر N-هگزان قرار داده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ الی ۱۲ ساعت روی دستگاه هیتز گذاشته شد تا پودر داخل کاغذ واتمن بی رنگ و N-هگزان رنگی شود سپس پودر به ارلن حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵٪ اضافه شد و سپس ۱۵ دقیقه مخلوط با حرارت ملایم جوشانده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک، فیلتر شد و در نهایت به‌وسیله دستگاه روتاری مورد تغلیظ قرار گرفت.

ب: اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH⁰

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، از طریق اندازه‌گیری ظرفیت مهار رادیکالی DPPH⁰ مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

بدین‌منظور، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH⁰ به ۱ میلی‌لیتر از عصاره اضافه شد و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت گردید. اسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد و درنهایت، مقدار به دام اندازی رادیکال DPPH⁰ با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

A₀ = جذب شاهد

A_s = جذب عصاره مورد آزمایش

پ: نگهداری و کشت سلولی

رده سلولی 8305C به‌صورت فلاسک کشت از انستیتو پاستور ایران با مشخصات موجود در جدول ۱ خریداری گردید و در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم‌جنین گاوی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (جهت جلوگیری از رشد قارچ) نگهداری و پاساژ داده شد.

شرایط لازم برای رشد سلول‌ها دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان CO₂ ۵٪ همراه با ۹۵٪ رطوبت است که این شرایط به‌وسیله انکوباتور (NÜVE مدل EC160) تأمین شد. برای

سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از بدخیم‌ترین و کشنده‌ترین تومورهای جامد شناخته شده در انسان است (۵).

تومورهای آناپلاستیک دارای رشد سریعی بوده و به‌سرعت بافت اطراف گلورا درگیر می‌کنند و پاسخ به درمان ضعیفی دارند. پیش آگاهی در ATC¹ از زمان تشخیص ۴ تا ۱۲ ماه است (۱۷،۱۸).

سرطان تیروئید آناپلاستیک ۶/۱٪ سرطان‌های تیروئید را شامل می‌شود (۱۱،۱۰).

درمان کارسینوم آناپلاستیک به‌طورکلی موقتی است و به‌ندرت قابل درمان و کم‌وبیش همیشه کشنده است. مرگ به‌دلیل انسداد راه هوایی فوقانی و اختناق تنفسی درنیمی از بیماران صورت می‌گیرد. جراحی به تنهایی درمان مناسب برای بیماری نیست و باید با شیمی درمانی و پرتودرمانی همراه باشد (۱۱).

با این حال عود بیماری و تهاجم گسترده به بافت‌های اطراف، رایج‌ترین مشکل در مورد ATC است. بنابراین بررسی داروهای جدید اجتناب‌ناپذیر است.

نام علمی اسطوخودوس *Lavandula angustifolia* است و نام رسمی‌تر آن *Lavandula Officinalis* است. اسطوخودوس گیاهی چند ساله و همیشه سبز از تیره نعناعیان است. نام انگلیسی این گیاه *Lavander* است (۱۳).

این گیاه بومی اروپا است و چون در ایران به‌صورت خودرو رشد نمی‌کند؛ تهیه و تولید آن تنها از طریق کشت امکان‌پذیر است. بنابراین در تمام پهنه کشورمان به‌صورت کشت شده یافت می‌شود. این گیاه دارای ۳۹ گونه است که رایج‌ترین آن *Lavandula angustifolia* است (۹،۱۳).

مردم درگذشته از اندام هوایی و گل اسطوخودوس استفاده های دارویی متعددی می‌کردند. آن‌ها معتقد بودند که استفاده از آن سبب معالجه افراد فلج و به کار افتادن مجدد دست و پای این افراد می‌شود. هم‌چنین برای درمان بعضی از بیماری‌های مغزی از جمله سردرد و درمان بیماری‌های معده از این گیاه استفاده می‌کردند (۳).

به‌منظور بررسی اثر توکسیسیتی عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر مهار تکثیر رده سلولی 8305C از آزمون MTT استفاده شد.

مواد و روش‌ها:

الف: جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

¹ Anaplastic Thyroid Cancer

اختلاف آماری میان تیمارها توسط آزمون تی بررسی گردید و ($P < 0/05$) به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH⁰ مقدار IC₅₀ سنجش مهار رادیکال آزاد (DPPH) عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی شد که در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲: نتایج آزمون DPPH⁰ عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس جمع‌آوری شده از ارتفاعات سه هزار در شهرستان تنکابن

DPPH ⁰ آزاد	۶/۲۷ ± ۰/۰۷
اسید آسکوربیک	۶/۰ ± ۱۶/۰۷

نتایج سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی سرطانی 8305C توسط روش MTT میزان درصد زنده بودن سلول‌های 8305C با غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج به صورت میانگین ۹ بار تکرار آزمایش است.

جدول ۳: میانگین کل درصد سلول‌های زنده در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C

میانگین توان زیستی	میزان غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)		
	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
کنترل	۱۰۰ ± ۰	۱۰۰ ± ۰	۱۰۰ ± ۰
سلول + محلول	۹۶/۰۲ ± ۰	۹۳/۰۵ ± ۰	۹۰/۰۱ ± ۰
غلظت ۵	۳۳/۶۵ ± ۰/۰۳	۵۰/۶۳ ± ۰/۰۲	۶۰/۱۳ ± ۰/۰۶
غلظت ۱۰	۲۱/۴۶ ± ۰/۰۷	۴۱/۶۷ ± ۰/۰۱	۵۸/۱۳ ± ۰/۰۳
غلظت ۲۰	۱۷/۵۳ ± ۰/۰۱۲	۳۱/۵۷ ± ۰/۰۵	۵۳/۲۷ ± ۰/۰۴
غلظت ۳۰	۱۰/۵۴ ± ۰/۰۶	۱۷/۹۱ ± ۰/۰۱	۴۸/۶۵ ± ۰/۱۳
غلظت ۴۰	۵/۲۵ ± ۰/۰۲	۹/۵۷ ± ۰/۰۱۹	۳۳/۵۹ ± ۰/۱۲
غلظت ۵۰	۳/۵۹ ± ۰/۰۵	۷/۵ ± ۰/۱	۱۷/۵۶ ± ۰/۰۹

*مقادیر به صورت میانگین ± انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

نتایج سمیت سلولی غلظت‌ها و زمان‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C در جدول ۳ نشان داد که ۵۰ درصد از سلول‌ها (شکل ۲) در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به کنترل (شکل ۱) از بین رفته‌اند. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که IC₅₀ عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس برای رده سلولی 8305C غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت است.

انجام تست MTT، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین- اتیل‌دی‌آمین تتراستیک اسید^۱ از ته فلاسک جدا شده و در دور ۱۷۰۰ rpm به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی با مخلوط کردن آن با نسبت مساوی از تریپان بلو، و شمارش آن‌ها توسط لام‌نئوبار در زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد.

پس از اطمینان، از عدم آلودگی سلول‌ها، برای انجام تست از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات رده سلولی 8305C

نام رده سلولی	منشاء	محیط کشت
۸۳۰۵C	تیروئید	DMEM

ت: بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس:

به منظور بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر تکثیر سلول‌های سرطانی 8305C از روش رنگ‌سنجی نمک تترازولیموم (MTT) استفاده شد.

برای این تست تعداد ۱۰^۴ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی 8305C تیمار شد. پس از طی زمان‌های مذکور ۱۰ میکرولیتر محلول MTT و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت پایه به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی درون انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و برای خواندن با جذب نوری ۴۹۲ و ۶۳۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر (DANA مدل DA3200) قرار داده شد. درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} = \text{توانایی زیستی سلول‌ها}$$

برای مقایسه نتایج علاوه بر فرمول اشاره شده در بالا که به صورت میانگین ۹ بار تکرار آزمایش‌ها محاسبه گردید. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شد و

¹ Trypsin-EDTA(1X)

سیوکالتیو،^۱ TEAC آزمایش رادیکال زایی DPPH^۲ هستند. آزمایش سنجش رادیکال زدایی DPPH، روش حساس و مستقل از قطبیت سوبستراست (۲۱).

این گیاه در فرآورده های آرایشی و بهداشتی به عنوان معطر کننده استفاده می شود و گل، بخش دارویی گیاه را تشکیل می دهد. گیاه شامل منو ترپن ها است که مهم ترین مواد متشکله آن شامل لینالیل استات، لینالول، بتا اوسمین، سینئول، تانن، مشتقات رزمارینیک اسید، کومارین و فلاونوئید است (۴،۷).

گزارش های به دست آمده از نتایج تحقیق های انجام شده حاکی از آن است که گیاه اسطوخودوس دارای خواص بالینی بی- شماری از جمله خواص ضدقارچی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، آرام بخشی و کاهش درد است (۲).

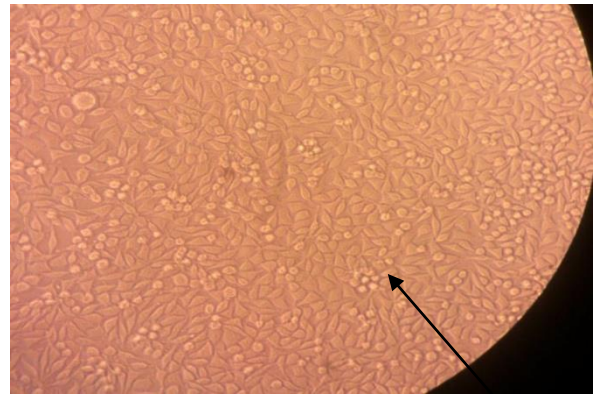
تاکنون مطالعه ای در مورد بررسی خواص سرطانی عصاره اتانولی برگ گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه است و نتایج به دست آمده با نتایج دیگری قابل مقایسه نیستند، اما مطالعه های دیگری در این خانواده انجام شده است از جمله مطالعه وکیلی و همکاران نشان داد روغن لاواندولا دارای خاصیت ضدایسکمی، آنتی اکسیدانی و ضد استرس اکسیداتیو است (۱۹).

در مطالعه های فریرا و همکارانش (۸) و هم چنین پری و همکارانش (۱۴) گیاه اسطوخودوس دارای اثر آنتی اکسیدانی قدرتمندی بود.

بر اساس مطالعه های انجام شده اخیر غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره آبی این گیاه اثرهای چشم گیری بر کاهش عوارض ناشی از آلزایمر و به خصوص ترمیم حافظه دارد و می توان از آن به عنوان فاکتوری در جهت تقویت سیستم عصبی استفاده کرد. سایر تحقیق ها نشان داده که غلظت های پایین تر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره آبی این گیاه می تواند خواص مهار رشد بر سلول های سرطانی نظر سرطان معده، روده و هاچکین داشته باشد (۲).

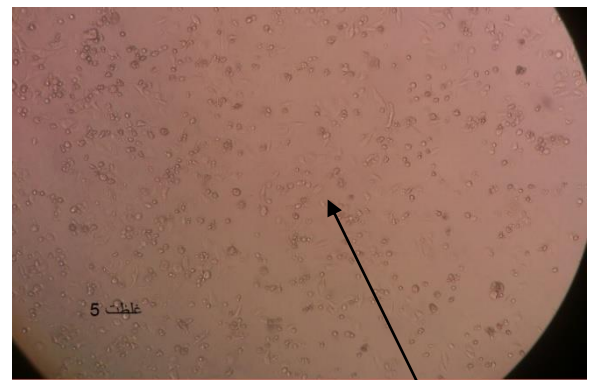
نتیجه گیری:

در پژوهش حاضر نشان داده شد که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس برداشت شده از ارتفاعات سه هزار تنکابن در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و در مدت زمان ۴۸ ساعت



سلول زنده

شکل ۱: تصویر میکروسکوپی از سلول های کنترل بعد از گذشت ۴۸ ساعت



سلول مرده

شکل ۲: تصویر میکروسکوپی از سلول های تحت تاثیر با عصاره اتانولی اسطوخودوس بعد از گذشت ۴۸ ساعت

بحث:

در سال های اخیر استفاده از محصول های گیاهی با توجه به محتویات متابولیت های متنوع گیاهی و ساختارهای شیمیایی مختلف و فعالیت های بیولوژیکی، در درمان بیماری ها رو به افزایش است. هم چنین نگرانی در مورد ایمنی ترکیب های آنتی اکسیدان مصنوعی باعث شده تا محققان به اکتشاف ترکیب های گیاهان آلی و آروماتیک معمولاً در آنتی اکسیدانی از منابع طبیعی بپردازند (۱۵).

اثرهای آنتی اکسیدانی با توجه به مشاهده های مهار اکسیداسیون از یک سوبسترای مناسب، اندازه گیری می شود. طیف گسترده ای از روش ها در شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی توانایی مهار رادیکال آزاد، می توانند مورد استفاده قرار گیرند (۲۰).

روش های در برگیرنده واکنش انتقال الکترون شامل سنجش فنل کل با استفاده از واکنش گر فولین

^۱ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

^۲ DPPH radical-scavenging assay

باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های رده سلولی 8305C می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس ممکن است اثر قابل توجهی در درمان سرطان تیروئید آناپلاستیک داشته باشد. برای چنین نتیجه‌گیری انجام آزمایش‌های تکمیلی به صورت برون تن^۱ و درون تن^۲ مورد نیاز هستند.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن است. لذا از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن تشکر و قدردانی می‌گردد.

¹ In Vitro

² In vivo

منابع

1. Azizzadeh.phD, Farzan A.R, M.D The prophylactic capacity of nepeta Menthoids(Ostokhodus)in prevention of spinal motoneuron Injury. -journad of kerman university of medical sciences.2012,20(3):20-30
2. Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshimi S, Tyagi AK, Tecklenburge M, Sclafani RA, Agarwal R. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*, 2003; 22: 8271-8282.
3. Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. Overview of Major Classes of Plant-Derived Anticancer Drugs. *IJBS*, 2009; 5(1): 1-11.
4. Dalilan S ,Heidari kashl ,Zamanian Azodi,Omidi,Roeintan ,Hoseini ,The Evaluation of Lavender Aqueous Extract on Human Fibroblast Cells. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* ,2013;21(1):143-149
5. Denner SS. *Lavandula angustifolia* Miller. *Holist Nurs Pract*, 2009; 23(1): 57-64.
6. Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araújo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, 2006; 108(1):31-7.
7. Ghelardini C, Galeotti N, Salvatore G, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Med*, 1999; 65(8):700-3.
8. Hadipour A, changes in essential oil content/composition and shoot aerial yield of lavender(*lavanula officinalis* L.)Affected by different Treatments of N1itrogen. *JMP*.2013;2(46);156-9
9. Hajian k FA, Kia MT. Pattern of age distribution of different cancers in babol in 2001 Research in *Medigine*.2003;27(3):293-245
10. Kebebew E, Clark OH, Greenspan FS, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment
11. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R, Robbins basic pathology 8th edition, 2007.
12. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wing PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 1998; 48: 6-29.
13. Palá-Paúl J, Brophy JJ, Goldsack RJ, Fontaniella B. Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004; 32(1): 55-62.
14. Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C. *Salvia* for dementia therapy: review of
15. pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003; 75(3): 651-659.
16. Sharma M, Govind P. Ethnomedicinal plants for prevention and treatment of tumors. *IJGP*, 2009; 2- 5.
17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999; 299: 152-178.
18. Spires JR, Schwartz MR, Miller RH. Anaplastic thyroid carcinoma: association with differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol*, 1988; 114: 40-44.
19. Tallroth E, Wallin G, Lundell G, Lowhagen T, Einhorn J. Multimodality
20. treatment in anaplastic giant cell thyroid carcinoma. *Cancer*, 1987; 60: 1428-1431.
21. Vakili A, Sharifat S, Akhavan MM, Bandegi AR. Effect of lavender oil (*Lavandula angustifolia*) on cerebral edema and its possible mechanisms in an experimental model of stroke. *Brain Res*, 2014; 1548:56-62.
22. Villaño D, Pachón M, Moyá M, Troncoso A, Parrilla M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 2007; 71: 230-235.

23. Yaghoobi k, kaka GR, Davoodi sh, Ashayaeri H. Therapeutic effects of *Lavandula angustifolia*. Journal of Gorgan university of Medical Sciences 2016; 17; 28-30
24. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci Biotechnol Biochem, 1998; 62(6): 1201-4

