

بررسی اثر آنتی اکسیدانی 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 خطرناک ترین نوع سرطان تیروئید است و از آن جایی که اغلب درمان های امروزی سرطان ناکارآمد و دارای عوارض جانبی زیادی هستند، لذا یافتن درمان مؤثر و جایگزین ضروری به نظر می رسد. 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 روش ها: در این مطالعه، برای اولین بار، اثر سیتوتوکسیکی عصاره اتانولی اندام های هوایی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که گیاه اسطوخودوس در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ از منطقه سه هزار تنکابن جمع آوری شد و جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH⁰ مورد ارزیابی قرار گرفت. رده سلولی 8305C در محیط DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد. غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول های سرطانی 8305C اثر داده شد. در ادامه توانایی حیات سلول ها با استفاده از روش MTT بررسی شد.

یافته ها: در بررسی حاضر، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH⁰ برابر با ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر 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 سلول های 8305C غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در مدت ۴۸ ساعت به دست آمد.

نتیجه گیری: عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس به صورت وابسته به دوز قادر، به از بین بردن سلول های سرطانی بوده و خواص سیتوتوکسیکی از خود نشان داد. بدین ترتیب این گیاه می تواند به عنوان یک گیاه دارویی بر علیه سرطان تیروئید آناپلاستیک مورد پژوهش وسیع تری قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سرطان، تیروئید آناپلاستیک، عصاره اتانولی، DPPH، روش MTT

مقدمه:

سرطان دومین عامل مرگومیر بعد از بیماری های قلبی عروقی در بسیاری از جوامع از جمله ایران است (۱). درمان سرطان های مرسوم باعث اثرهای جانبی جدی می شود

به طوری که دسترسی به دارویی با اثر بخشی بالا، سمیت کم، که به صورت اختصاصی بر سلول ها تأثیر گذاشته و ارزان باشد یکی از دغدغه های مهم جوامع دارویی دنیا و حوزه درمان است. در این زمینه درمان گیاهان دارویی می تواند یکی از پایه های اصلی کنترل و درمان سرطان باشد و به نظر می رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به ویژه گیاهان دارویی سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه های تحقیقاتی جهت دستیابی به داروهای نوین باشد. به هر حال سرطان یک مشکل مهم سلامتی در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود و بیش تر درمان ها مناسب و کافی نیستند (۶).

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

سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از بدخیم ترین و کشنده ترین تومورهای جامد شناخته شده در انسان است (۵). تومورهای آناپلاستیک دارای رشد سریعی بوده و به سرعت بافت اطراف گلورا درگیر می کنند و پاسخ به درمان ضعیفی دارند. پیش آگاهی در ¹ATC از زمان تشخیص ۴ تا ۱۲ ماه است (۱۷،۱۸).

سرطان تیروئید آناپلاستیک ۶/۱٪ سرطان های تیروئید را شامل می شود (۱۱،۱۰). درمان کارسینوم آناپلاستیک به طور کلی موقتی است و به ندرت قابل درمان و کم و بیش همیشه کشنده است. مرگ به دلیل انسداد راه هوایی فوقانی و اختناق تنفسی درنیمی از بیماران صورت می گیرد. 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 بافت های اطراف، رایج ترین مشکل در مورد ATC است. بنابراین بررسی داروهای جدید اجتناب ناپذیر است.

نام علمی اسطوخودوس *Lavandula angustifolia* است و نام رسمی تر 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 به صورت خودرو رشد نمی کند؛ تهیه و تولید آن تنها از طریق کشت امکان پذیر است. بنابراین در تمام پهنه کشورمان به صورت کشت شده یافت می شود. این گیاه دارای ۳۹ گونه است که رایج ترین آن *Lavandula angustifolia* است (۹،۱۳).

مردم در گذشته از اندام هوایی و گل اسطوخودوس استفاده های دارویی متعددی می کردند. آن ها معتقد بودند که استفاده از آن سبب معالجه افراد فلج و به کار افتادن مجدد دست و پای این افراد می شود. همچنین برای درمان بعضی از بیماری های مغزی از جمله سردرد و درمان بیماری های معده از این گیاه استفاده می کردند (۳).

به منظور بررسی اثر توکسیسیته عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر مهار تکثیر رده سلولی 8305C از آزمون MTT استفاده شد.

مواد و روش ها:

الف: جمع آوری گیاه و عصاره گیری

برگ های گیاه اسطوخودوس در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ از منطقه سه هزار شهرستان تنکابن واقع در شمال غرب مازندران جمع آوری شدند. در نهایت نمونه ها 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 به صورت ساندویچ قرار داده شد و به منظور حذف رنگ و چربی در دستگاه سوکسله به همراه ۵۰۰ میلی لیتر N- هگزان قرار داده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت 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 میلی لیتر 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 به وسیله دستگاه روتاری مورد تغلیظ قرار گرفت.

ب: اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH⁰

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها، از طریق اندازه گیری ظرفیت مهار رادیکالی DPPH⁰ مورد بررسی قرار گرفت (۱۶). بدین منظور، ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH⁰ به ۱ میلی لیتر از عصاره اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت گردید. اسکوریک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد و در نهایت، 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 به صورت فلاسک کشت از انستیتو پاستور ایران با مشخصات موجود در جدول ۱ خریداری گردید و در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (جهت جلوگیری از رشد قارچ) نگهداری و پاساژ داده شد. شرایط لازم برای رشد سلول ها دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میزان CO₂ ۵٪ همراه با ۹۵٪ رطوبت است که این شرایط به- وسیله انکوباتور (NÜVE مدل EC160) تأمین شد. برای

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 آنتی اکسیدانی 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 جمع آوری 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	
۱۰۰ ± ۰	۱۰۰ ± ۰	۱۰۰ ± ۰	کنترل
۹۶/۰۲ ± ۰	۹۳/۰۵ ± ۰	۹۰/۰۱ ± ۰	سلول + محلول
۳۳/۶۵ ± ۰/۰۳	۵۰/۶۳ ± ۰/۰۰۳	۶۰/۱۳ ± ۰/۰۶	غلظت ۵
۲۱/۴۶ ± ۰/۰۷	۴۱/۶۷ ± ۰/۰۰۱	۵۸/۱۳ ± ۰/۰۳	غلظت ۱۰
۱۷/۵۳ ± ۰/۰۱۲	۳۱/۵۷ ± ۰/۰۰۵	۵۳/۲۷ ± ۰/۰۴	غلظت ۲۰
۱۰/۵۴ ± ۰/۰۰۶	۱۷/۹۱ ± ۰/۰۰۱	۴۸/۶۵ ± ۰/۰۱۳	غلظت ۳۰
۵/۲۵ ± ۰/۰۲	۹/۵۷ ± ۰/۰۰۹	۳۳/۵۹ ± ۰/۰۱۲	غلظت ۴۰
۳/۵۹ ± ۰/۰۰۵	۷/۵ ± ۰/۰۱	۱۷/۵۶ ± ۰/۰۹	غلظت ۵۰

*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 میلی گرم بر میلی لیتر 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 میلی گرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت است.

انجام تست MTT، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین- اتیل دی آمین تتراستیک اسید^۱ از ته فلاسک جدا شده و در دور rpm ۱۷۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک سی سی 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 لامنتوبار 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 رنگ سنجی نمک تترازولیم (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 میلی گرم بر میلی لیتر 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 سانتی گراد 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:

$$OD_{تیمار} = \frac{OD_{تیمار}}{OD_{کنترل}} \times 100$$

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

^۱ 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).

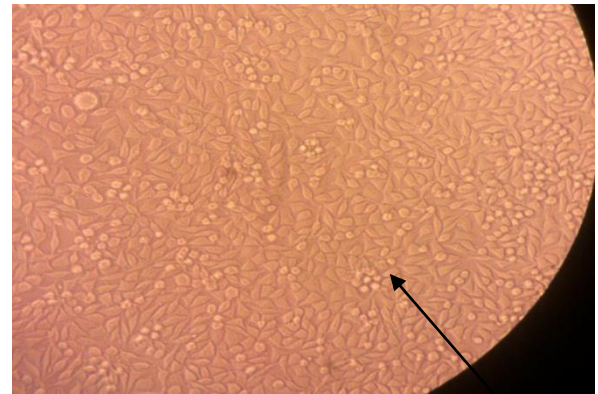
تاکنون مطالعه ای در مورد بررسی خواص سرطانی عصاره اتانولی برگ گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر اولین مطالعه در این زمینه است و نتایج به دست آمده با نتایج دیگری قابل مقایسه نیستند، اما مطالعه های دیگری در این خانواده انجام شده است از جمله مطالعه وکیلی و همکاران نشان 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 معمولا 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 سلول های رده سلولی 8305C می-گردد. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس ممکن است اثر قابل توجهی در درمان سرطان تیروئید آناپلاستیک داشته باشد. برای چنین نتیجه گیری انجام آزمایش های 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 می گردد.

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 NItrogen.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

