Evalution of phytochemical and anticancer properties of cotton thistle (*Onopordon leptolepis* DC.*)* extract on the survival of CACO2 cancer cells

Mirzaei N., MSc[1], Mokhtari B., PhD[2], Kolahi M., PhD[3]
1. MSc Student of organic chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-611-33331045, mkolahi@scu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: The aim of this study was to detect the organic compounds of *Onopordon leptolepis* DC. and also evaluate the anticancer and anti-oxidant effects of the plant extract on CaCO2 cells.

Materials and Methods: The effective compounds of air branches of *Onopordon leptolepis* DC. were studied using phytochemicals methods. Using GC-MS device the components of ethanolic extract of air branches of *Onopordon leptolepis* DC. were isolated by Soxhlet method. Also the ethanolic extract of three parts of the plant including air branches, leaf, and stem were evaluated for anti-cancer properties using MTT and NBT methods based on a complete randomized block design.

Results: Using GC-MS device we identified 27 components in the extract. Among them, A-Neooleana-3 (5), 12-diene (78.92%), 2 (1H) Naphthalenone, 3.5,6,7,8,8a-hexahydro-4, 8a-dimethyl-6 - (1-methylethenyl) - (13.65%), and hexadecanoic acid (1.33%), were the main components of the extract respectively. In this study, presence of alkaloids, cyanogenic glycosides, tannins, and steroids were confirmed in the plant. The results of cell viability analysis using MTT and free radical activity showed that ethanolic extracts of air branches, leaf, and stem of the plant had anticancer activity. The highest rate of neutralization of free radicals produced by cancer cells was observed in the extract of the air branches of the plant.

Conclusion: The medicinal and anti-cancer properties of this plant may be due to the presence of some of the alkaloids, glycosides, phenols and other phytochemical compounds in the plant which can be involved in the antioxidant activity of the plant. The detected chemical compounds in the plant can be used in the food industry and production of effective chemical medicines for the treatment of cancer.

Key words: Anticancer, Chemical compound, Gas chromatography, *Onopordon leptolepis* DC.

Received: Aug 14, 2017 **Accepted:** Apr 20, 2018

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان /دوره بیست و دوم/ خرداد و تیر ۱۳۹۷/۶۹-۵۷

مطالعه فیتوشیمیایی و بررسی اجزای موثر عصاره اتانولی گیاه خارپنبه برگ نازک (*Onopordum leptolepis* DC.) و اثر ضد مهاری بر بقای سلول‌های سرطانی CaCO2

ندا میرزایی[۱]، بابک مختاری[۲]، مریم کلاهی[۳]

۱.کارشناس‌ارشد شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲.دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳.استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، نویسنده مسئول ، تلفن ثابت:۳۳۳۳۱۰۴۵-۰۶۱۱، Email: m.kolahi@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: هدف مطالعه حاضر شناسایی ترکیبات آلی گیاه *Onopordon leptolepis* DC. و بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بر روی سلول‌های سرطانی روده CaCO2 بود.

روش بررسی: ترکیبات موثره سرشاخه هوایی خارپنبه برگ نازک با استفاده از روش‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند، سپس ترکیب‌های متشکله عصاره اتانولی سرشاخه هوایی خارپنبه برگ نازک به روش سوکسله توسط دستگاه GC-MS جداسازی و شناسایی شد. همچنین عصاره اتانولی سه بخش سرشاخه هوایی، برگ و ساقه این گیاه به‌منظور بررسی ویژگی‌های ضدسرطانی با استفاده از روش‌های MTT و NBT در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: شناسایی اجزای عصاره با استفاده از دستگاه GC-MS وجود ۲۷ ترکیب، را نشان داد. در میان ترکیبات شناسایی شده A-Neooleana-3(5),12-diene (۷۸/۹۲درصد)، 2(1H)Naphthalenone,3,5,6,7,8,8a-hexahydro-4,8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)- (۱۳/۶۵درصد)، Hexadecanoic acid (۱/۳۳درصد) به ترتیب اجزای اصلی عصاره بودند. در این تحقیق حضور ترکیب‌های آلکالوئیدی، گلیکوزید سیانوژنیک ، تانن‌دار و استروئیدی در گیاه تائید گردید. نتایج بدست آمده از بررسی میزان بقاء سلولی، با استفاده از روشMTT و میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد نشان داد که عصاره اتانولی در سه بخش سرشاخه هوایی، برگ و ساقه گیاه دارای فعالیت ضدسرطانی بود. بیشترین میزان فعالیت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی در عصاره سرشاخه هوایی گیاه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: خواص دارویی و ضد سرطانی این گیاه ممکن است به دلیل حضور برخی از ترکیبات آلکالوئیدی، گلیکوزیدی، فنلی و دیگر فیتوکمیکال ها موجود در این گیاه باشد که باعث فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه می شوند. ترکیبات شیمیایی شناخته‌شده در گیاه می‌تواند در ساخت و تولید داروهای شیمیایی موثر در درمان سرطان و صنایع غذایی بکار گرفته‌شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات شیمیایی، *Onopordon leptolepis* DC.، گاز کروماتوگرافی، ضد سرطانی.

وصول مقاله:۹۶/۵/۲۳ اصلاحیه نهایی:۹۶/۱۱/۹ پذیرش:۹۷/۱/۲۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

مقدمه

مصرف گیاهان برای درمان سابقه‌ای به قدمت عمر انسان دارد. در سال‌های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و به لحاظ تاثیرات جانبی شناخته-شده داروهای سنتزی، افزایش یافته است. نزدیک به هشت هزار گونه گیاهی شناخته‌شده در ایران می‌روید که اغلب این گیاهان می‌توانند دارای ویژگی‌های دارویی باشند (۱). گیاهان دارویی بسیاری به صورت طبیعی در زیست‌گاه‌های خاص خود یافت می‌شوند. از آنجا که این گیاهان در دنیا جهت تغذیه و درمان بیماری‌ها دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند، شناسایی ترکیب‌های آلی آن‌ها به خصوص گونه‌های بومی کشور، مورد توجه محققان و پژوهشگران قرار گرفته‌است. ایران با وسعت زیاد و در نتیجه تنوع آب وهوایی آن، دارای پوشش گیاهی بسیار متنوعی می‌باشد (۲).

خارپنبه برگ نازک (*Onopordon leptolepis* DC.) گیاهی است یک تا دو ساله با ساقه‌ایی ۱۲۵- ۳۵ سانتیمتری که در کشورهایی از جمله ایران و آذربایجان گسترش دارد. برگ های آن سبز تیره و به شکل پر با حاشیه‌های پوشیده از خار است. این گیاه با نام علمی *Onopordon* عضوی از خانواده کاسنی (Asteraceae) است. گرچه برگ‌های آن نیز مصرف دارویی دارد، اما قسمتی از گیاه که بر دیابت تاثیر می گذارد، میوه (بذر) آن است. این گیاه به حالت خودرو و در ایران بیشتر در دره هراز، دشت مغان، مناطقی از خوزستان و کلاردشت می‌روید. خارپنبه گیاهی با ارزش دارویی است که بطورگسترده در طب سنتی اروپا استفاده می‌شود. عصاره گیاه بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد توموری به عنوان یک عامل محافظتی در فرمولاسیون داروهای مراقبت از پوست استفاده می‌شود (۳). از گونه‌ی *Onopordon leptolepis* DC. در طب سنتی به عنوان ماده‌ی ضد باکتری، مقوی قلب، قابض، عامل کاهنده‌ی فشارخون استفاده می‌شود و در درمان بیماری سرطان، بهبودی زخم‌ها، درمان گرفتگی دردناک عضلات گردن، درمان نرمی استخوان و تسکین درد بکار می‌رود. برخی ترکیبات جدا شده از *Onopordon* دارای خواص دارویی مختلفی مانند آنتی پلاسمودیال و اثرات سمی برای سلول، ضدباکتری، ضد التهابی، ضدقارچی و اثرات ضدتوموری می‌باشند (۱).

آمارها نشان می‌دهند که شیوع سرطان روده در ایران روبه افزایش است و این سرطان به عنوان یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در هر دو جنس مطرح می‌باشد. این سرطان مقام چهارم را در بین کل بیماری‌های سرطانی و رتبه دوم را در بین سرطان‌های دستگاه گوارش دارد. این سرطان در زنان رتبه سوم و در مردان در رتبه پنجم قرار گرفته و در استان‌های مختلف پراکندگی تقریباً یکسانی دارد و میزان بروز این سرطان در طی ۲۵ سال اخیر در کشور ما افزایش یافته‌است (۴). عوارض شیوه‌های درمانی مختلف نظیر شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی غیرقابل چشم‌پوشی است. عوارض حاصل از شیمی درمانی بر حسب نوع دارو متفاوت است و عکس‌العمل افرادی که شیمی درمانی می‌شوند نیز کم و بیش تفاوت دارد. عوارض شایع ناشی از شیمی درمانی عبارتند از: ریزش مو، التهاب و زخم مخاط دهان و لثه، خستگی، تهوع، استفراغ، اسهال و گاهی یبوست، بی-اشتهایی، تشنگی، دفع زیاد ادرار، تغییر رنگ و خونریزی و غیره است. بنابراین پژوهش در رابطه با بکارگیری شیوه‌های درمان با حداقل عوارض جانبی دارای اهمیت است. استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم‌زمان بوده‌است. گیاهان دارویی به واسطه داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال، به عنوان یک منبع بالقوه از داروهای شیمی‌درمانی جدید مورد توجه ویژه هستند؛ گیاهان طی متابولیسم ثانویه، گروه‌های متعددی از فراورده-های طبیعی از قبیل آلکالوئیدها، ترکیبات پلی فنلی، ترپنوئیدها و کومارین‌ها را تولید می‌کنند، که صرف نظر از نقش آنها در خود گیاه، در درمان بیماری‌های انسانی مورد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

استفاده قرار می‌گیرند (۵). گیاه خار پنبه برگ نازک در کشور ما به صورت سنتی مصرف فراوانی دارد، و با توجه به اهمیت این گیاه در درمان بیماری‌های مختلف نظیر سرطان و در طب سنتی بعنوان ماده ضد باکتری، شناسایی ترکیبات آلی و بررسی مقدماتی فیتوشیمیایی سرشاخه گلدار آن نیز از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.

با توجه به بررسی اطلاعات موجود در رابطه با این گونه تاکنون روی ترکیب‌های عصاره گیاه کار قابل توجه‌ای در کشور صورت نگرفته‌است. در این تحقیق، هدف آن است که ابتدا به شناسایی مواد شیمیایی اصلی سرشاخه هوایی گیاه پرداخته شود، سپس به‌منظور شناسایی ترکیبات آلی گیاه *Onopordon Leptolepis* DC. پس از استخراج عصاره اتانولی سرشاخه هوایی به روش سوکسله، اجزای عصاره با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی مورد شناسایی قرار گرفت. همچنین عصاره اتانولی بخش‌های سرشاخه هوایی، برگ و ساقه گیاه به روش سوکسله به‌منظور بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان روده مورد بررسی قرار گرفته‌شد.

جمع آوری نمونه

خارپنبه برگ نازک از جاده اهواز- مسجدسلیمان (۸۵ کیلومتری اهواز) در خرداد ماه جمع آوری و شناسایی گونه گیاه توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشکده داروسازی اهواز انجام شد. کد هرباریومی گیاه A14020001P می‌باشد.



شکل۱: گونه خارپنبه برگ نازک

بررسی‌های فیتوشیمیایی

گیاهان جمع آوری شده برای انجام آزمایش، در شرایط معمولی و دور از نور خورشید خشک گردیدند و توسط آسیاب به صورت پودر درآورده شدند. یکی از گام‌های ابتدایی در بررسی‌های فیتوشیمیایی، تعیین نوع متابولیت‌های ثانویه موجود در ترکیب است. آزمون‌های فیتوشیمیایی مقدماتی با استفاده از نمونه‌های پودر شده و با روش‌های استاندارد برای شناسایی مواد موثره انجام شدند. شش دسته مهم ترکیبات گیاهی شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، پروتئین، فلانوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها وگلیکوزید سیانوژنیک مورد بررسی قرار گرفت (نتایج در جدول ۱).

شناسایی آلکالوئید

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

۰/۵ گرم از پودر گیاهی توسط ۱ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال و ۹ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه روی بن ماری حرارت داده شد. پس از صاف کردن، بر روی یک قطره از محلول نمونه تهیه شده، معرف ید (۶) و بر روی قطره ای دیگر معرف مایر (۶) اضافه شد. در صورت وجود آلکالوئید، رسوب ایجاد می‌گردد. برای تائید آن آزمایش اساسی انجام شد. به باقی‌مانده محلول نمونه ۳ میلی لیتر آمونیاک افزوده شد و توسط ۱۰ میلی لیتر اتر: کلروفرم (۱: ۳) دکانته گردید. فازبالایی آبگیری و تغلیظ شد و سپس در ۳قطره اسیدکلریدریک ۲ نرمال حل و با معرف ید و مایر تست شد، ایجاد رسوب آزمایش قبل را تائید می‌نماید (۷).

شناسایی تانن

الف _ واکنش رنگی با محلول کلرورفریک: ۰/۲ گرم از پودر گیاه با ۱۰ میلی لیتر اتانول برای مدت چند دقیقه تکان داده و صاف شد. سپس با چند قطره محلول کلروفریک تست شد. تغییر رنگ محلول به آبی یا سبز نشان دهنده مثبت بودن جواب آزمایش است (۶).

ب _ واکنش ایجاد رسوب با محلول استات سرب: ۰/۱ گرم از پودر گیاهی با ۱۰ میلی لیتر آب جوشانده شد و pH آن توسط اسیداستیک رقیق و محلول جوش شیرین در محدوده ۶ تا ۸ تنظیم شد. سپس به آن ۳ قطره محلول استات سرب ۱۰٪ اضافه شد. با ایجاد رسوب جواب تست مثبت است (۶).

شناسایی ساپونین

۰/۵ گرم از پودر گیاهی با ۱۰ میلی لیتر آب جوش مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. با ایجاد کف پایدار به ارتفاع حداقل ۱ سانتی متر جواب تست مثبت است (۶).

شناسایی فلانوئیدها

۱ گرم پودر گیاهی با ۱۰ میلی لیتر متانول به مدت ۱۰ دقیقه رفلاکس و صاف شد. سپس با آب رقیق و با پترولئوم اتر دکانته شد. فاز زیرین تغلیظ و در اتیل استات حل و جهت آزمایش‌های بعدی به سه قسمت تقسیم شد.

الف – آزمایش ویلسون تابوک: یک قسمت از نمونه تهیه شده تغلیظ و با ۱۰ قطره استن مرطوب و یک سر اسپاتول اسیدبوریک و اسید اگسالیک به آن اضافه شد مجددا تغلیظ و در ۱۰ میلی لیتر اتر حل شد. زیر لامپ ماوراء بنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر رنگ زرد مایل به سبز دلیل بر جواب مثبت است (۸).

ب – آزمایش پیو[1]: قسمت دوم از نمونه تهیه شده تغلیظ و به ترتیب ۱ میلی لیتر اتانول، ۰/۵ گرم پودر روی و ۲ قطره اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن اضافه شد و بعد از گذشت ۱ دقیقه ۱۰ قطره اسید کلریدریک غلیظ اضافه شد. با ایجاد رنگ قرمز تند، جواب تست مثبت است (۸).

پ – آزمایش سیانیدین: به قسمت سوم محلول نمونه تهیه شده، چند قطعه براده منیزیم و ۱ میلی لیتر اسیدکلریدریک غلیظ اضافه شد. رنگ قرمز دلیل بر جواب مثبت است (۵).

شناسایی گلیکوزید سیانوژینیک

مقدار ۲ گرم از پودر گیاهی با مقدار کافی آب در ارلن ریخته شد وسپس کاغذ آغشته به پیکرات سدیم در ارلن به نحوی قرار داده شد که با محلول تماس پیدا نکند و در آون با درجه حرارت $37^{o}C$ برای مدت ۳ ساعت قرار داده شد. با تبدیل رنگ کاغذ از زرد به قرمز جواب تست مثبت است (۵).

شناسایی استروئیدها

در این روش عصاره گیاه به روش ماسراسیون گرفته می-شود، سپس مقداری عصاره درون لوله آزمایش ریخته شد و بعد به آن مقدار کمی کلروفرم اضافه شد و بعد ۲cc اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید اگر رنگ آن قرمز شود این عصاره حاوی استروئید می‌باشد در غیر این صورت عصاره فاقد استروئید می‌باشد (جواب منفی است) (۵).

شناسایی پروتئین‌ها

[1] Pew's Reaction

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

برای شناسایی پروتئین‌ها در عصاره از معرف Biuret (محلول سدیم هیدروکسید به همراه ۲ قطره محلول مس سولفات ۱٪) استفاده شد. تشکیل رنگ بنفش نشانه وجود پروتئین است (۹).

استخراج

پس از شناسایی متابولیت‌های ثانویه گیاه، عصاره‌گیری از سرشاخه هوایی پودر شده به‌روش زیر انجام شد:

مقدار ۱۰ گرم از پودر گیاه به دقت وزن شد و در کارتوش ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد و در دستگاه سوکسله ۱۰۰ میلی لیتری قرار داده‌شد. حلال اتانول ۹۶٪ در بالن ته گرد ریخته شد وسوکسله به مدت ۸ ساعت انجام گرفت. سپس بالن حاوی محلول جمع آوری شده، توسط روتاری تقطیر شد. عصاره حاصل، جهت جلوگیری از تخریب شدن در یخچال نگهداری شد. قبل از آن عصاره بدست آمده توزین شد (۱۰-۱۱).

تجزیه عصاره‌ها

به‌منظور شناسایی ترکیبات، عصاره‌های بدست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent۵۹۷۵ ، تزریق شد. گستره‌ی طیف جرمی از ۵۰ تا m/z۵۵۰ می‌باشد، گاز حامل، هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت انتخاب گردید. از مقایسه طیف‌های جرمی مربوط به ترکیبات پیشنهادی، با طیف گزارش شده در کتب مرجع و هم‌چنین بررسی الگوهای شکسته شدن ترکیبات عصاره شناسایی شدند (۱۲).

عصاره گیری جهت آزمون‌های ضدسرطان

برای بررسی اثر گیاه خارپنبه برگ نازک بر سلول‌های سرطانی روده، از سه بخش سرشاخه هوایی، برگ و ساقه گیاه به روش سوکسله توسط حلال اتانول جهت استخراج ترکیبات، عصاره‌گیری شد.

کشت سلولی

رده‌ی سلولی آدئوکارسینومای اپی تلیال روده‌ی بزرگ انسانی HT29، (NCBI code: C139) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی ۲۵ cm^2 (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ °C و CO_2 ۵ درصد کشت شدند (۱۳).

بررسی سمیت عصاره‌ی خارپنبه برگ نازک با روش MTT assay

به‌منظور بررسی اثر عصاره گیاه خارپنبه برگ نازک بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک ترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده‌است. جهت انجام آزمایش، سلول‌های CaCO2 در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه $۱۰^۳ \times ۴$ سلول در حجم ۱۵۰ µL محیط DMEM کشت شدند. پس از تیمار سلول‌ها با انواع عصاره‌های خارپنبه برگ نازک در با غلظت $۳۰\mu g\ mL^{-1}$ به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تریپسینه و پس از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. ۵۰ میکرولیتر رسوب سلولی (تست) و ۵۰ میکرولیتر بافر PBS (بلانک) به صورت جداگانه به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (۵ mg/ml، ۰٫۰۰۵ گرم MTT در ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS) افزوده و حداقل ۳٫۵ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و پس از آن جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج براساس مقایسه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. سپس مقادیر IC۵۰ نمونه استاندارد و عصاره‌های خارپنبه برگ نازک محاسبه گردید. همه‌ی آزمایش‌ها به‌صورت تکرار سه‌تایی انجام شد [۱۳].

تست NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

جهت بررسی میزان کاهش ROSها در سلول‌های تیمار شده، ۲۰۰ میکرولیتر NBT به حفره‌ها اضافه و به مدت ۱۲۰ دقیقه انکوبه شد. پلیت به مدت ۵ دقیقه در یخ گذاشته شد و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

دوباره به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، سوچ رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو و سانتریفوژ شدند. محیط رویی دور ریخته شد و روی رسوب، متانل ۷۰٪ ریخته و ۵ دقیقه سلول‌ها سانتریفوژ شدند تا سلول‌ها ثابت شوند، دوباره محیط رویی دور ریخته‌شد و روی سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر، KOH، ۲ مولار اضافه شد. در آخر که به هر حفره، ۲۵ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب در ۶۲۰nm خوانده‌شد (۱۴).

اثر گیاه خارپنبه برگ نازک بر سلول‌های سرطانی در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین ها به روش آزمون آنووا و بدنبال آن آزمون دانکن در سطح احتمال $p< ۰/۰۵$ انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی آزمون‌های فیتوشیمیایی حضور ترکیبات آلکالوئیدی، تانن دار، استرئیدی و گلیکوزیدسیانوژنیک را نشان داد، اما ترکیبات فلاونوئیدی و ساپونینی در این گونه یافت نشده‌است. وزن عصاره بدست آمده در بند استخراج گیاه تقریبا ۴/۵۲ درصد وزن گیاه می‌باشد. نتایج بررسی فیتوشیمیایی بصورت کامل در جدول ۱ ارائه شده‌است:

جدول ۱ : بررسی‌های فیتوشیمیایی سرشاخه هوایی گیاه خارپنبه برگ نازک

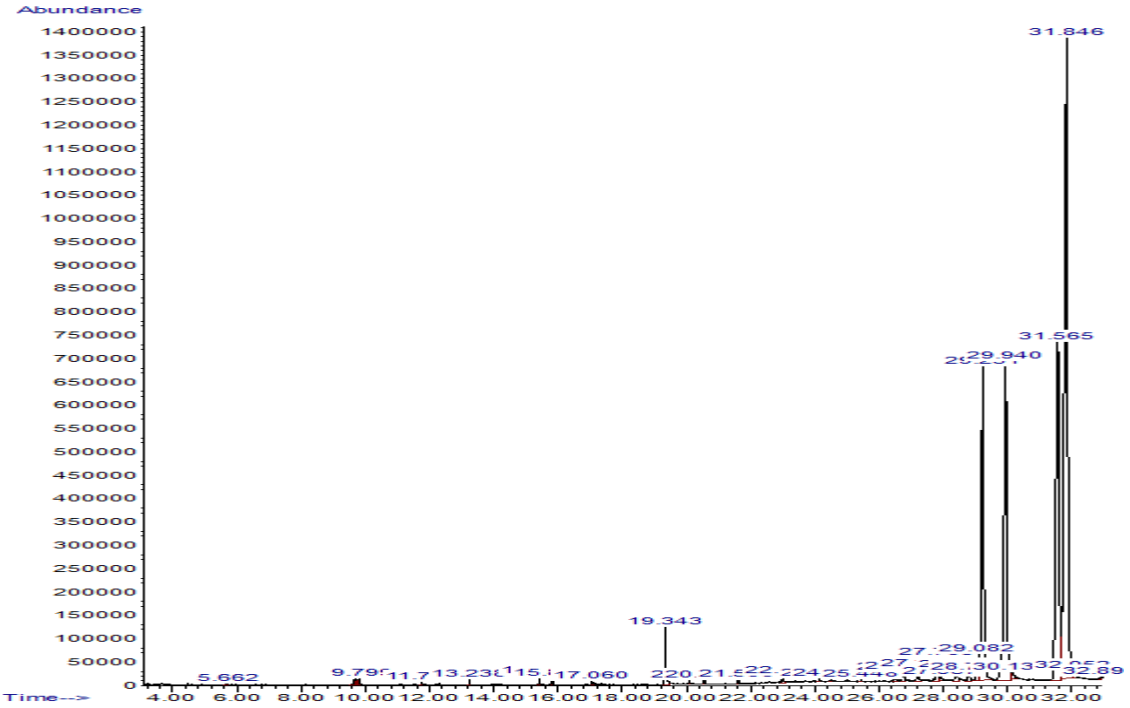
مواد موثره	آلکالوئید		فلانوئید		ترپنوئید		ساپونین	تانن		استروئید	پروتئین	گلیکوزیدسیانوژنیک
آزمون‌های انجام شده	آزمون مایر	آزمون واگنر	آزمایشPew	آزمون سدیم هیدروکسید	آزمون لیبرمن بورشارد	آزمون سالکوسکی	آزمون کف کنندگی	آزمون استات سرب	کلروفریک آزمون	استفاده از اسیدسدلفوریک	Biuretمعرف	کاغذ آغشته به پیکرات سدیم
سرشاخه هوایی گیاه خارپنبه برگ نازک	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

آنالیز عصاره‌ها

در شکل ۱ طیف GC عصاره اتانولی خارپنبه برگ نازک دیده می‌شود. در نتیجه بررسی زمان‌های بازداری طیف GC و همچنین الگوهای شکست طیف جرمی، ۲۷ ترکیب اصلی و عمده شناسایی شد. با توجه به سطح زیر منحنی هریک از پیک‌های طیف GC و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی، درصد نسبی هریک از ترکیب‌های تشکیل دهنده عصاره‌ها تعیین شد. ترکیبات آلی شناسایی شده در عصاره، با توجه به کتب مرجع به گروه‌های متفاوتی از ترکیبات فیتوشیمیایی (ترپن‌ها، اسیدهای چرب، ترکیبات هتروسیکلی و هیدروکسیل آمین‌ها (آلکالوئیدها)) طبقه بندی شدند (۱۷-۱۵). اصلی‌ترین و عمده‌ترین ترکیبات آلی شناسایی در عصاره، در جدول ۲ آورده شده‌است.



شکل ۱: طیف GC عصاره اتانولی خارپنبه برگ نازک به روش سوکسله

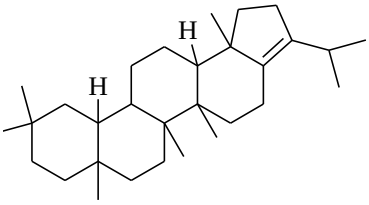
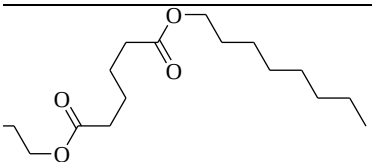
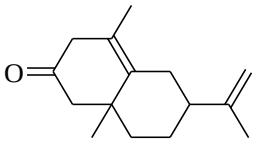
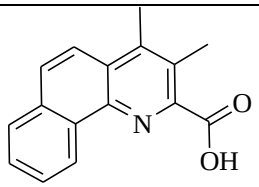
نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT

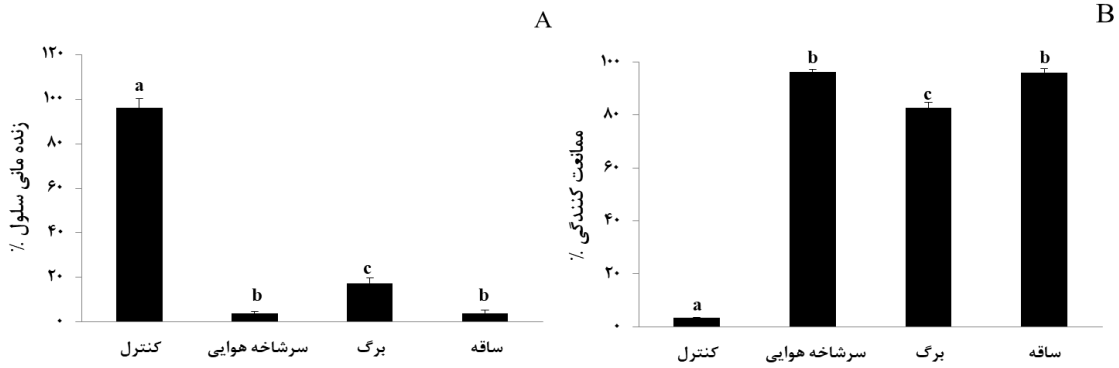
از مقایسه داده‌های به دست آمده از سنجش درصد حیات سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره اتانولی به روش سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمارشده با سه عصاره (اتانولی از سه بخش سرشاخه هوایی، برگ و ساقه گیاه به روش سوکسله) نسبت به گروه کنترل در سطح $p <$ ۰/۰۵ معنی‌دار بود. میانگین زیستی سلول‌های تیمار شده عصاره اتانولی در سرشاخه هوایی گیاه (عصاره۱) اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره اتانولی برگ گیاه (عصاره۳) در اندازه‌گیری درصد بقا سلول نشان نداد. بیشترین میزان بقاء سلول‌های سرطانی تیمارشده در عصاره برگ گیاه مشاهده شد ($p <$ ۰/۰۵) (شکل ۲).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

جدول۲: عمده‌ترین ترکیبات عصاره سرشاخه هوایی خارپنبه برگ نازک با روش سوکسله

ردیف	نام ترکیب(نوع ماده موثر)	درصد ترکیب	ساختار ترکیب
۱	۳-ایزوپروپیل-۵a،۵b،۱۰a،۱۰،۷،۱۳b-هگزامتیل-۱H سیکلوپنتاکریسین (تری ترپنوئید)	(۷۸/۹۲ درصد)	
	زمان بازداری	۳۱/۸۴	
۲	آدیپیک اسید (اسید چرب)	(۱/۱۹ درصد)	
	زمان بازداری	۱۹/۳۴	
۳	(H۱)۲نفتالنون،۸a،۸،۷،۶،۵،۳a-هگزاهیدرو-۸a،۴- دی متیل-۶- (۱- متیل اتنیل) (ترپن)	(۱۳/۶۵ درصد)	
	زمان بازداری	۲۹/۲۳	
۴	۱،۲- دی متیل -۳- هیدروکسی کربونیل- ۴- آزافنانترن (آلکالوئید)	(۱۱/۱۴ درصد)	
	زمان بازداری	۲۹/۹۴	



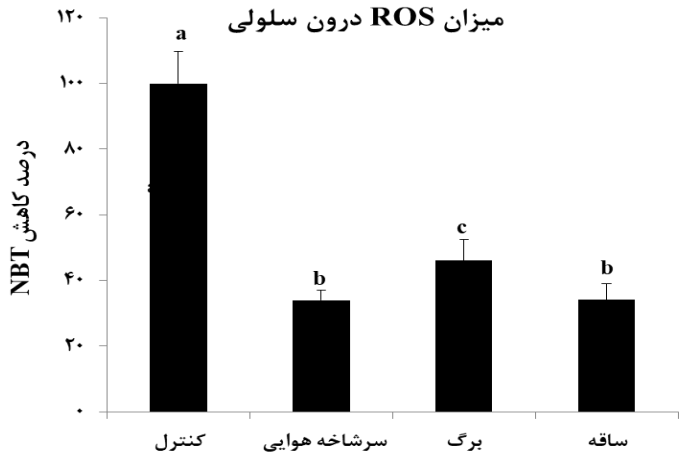
شکل ۲: سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT در عصاره اتانولی بخش‌های مختلف گیاه خارپنبه برگ نازک با استفاده از دستگاه سوکسله. A: درصد بقاء سلول، B: درصد میزان ممانعت‌کنندگی. میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۵$ است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

اندازه‌گیری درصد رادیکال‌های آزاد NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

از مقایسه داده‌های به دست آمده از میزان درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره اتانولی به روش استفاده از دستگاه سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین کاهش NBT در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح $p <$ ۰/۰۵ معنی‌دار بود. میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد عصاره اتانولی در سه بخش سرشاخه هوایی، برگ و ساقه گیاه خارپنبه برگ نازک اختلاف معنی‌داری داشتند. میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد عصاره اتانولی سرشاخه هوایی گیاه (عصاره۱) اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره اتانولی ساقه گیاه(عصاره۳) نشان نداد. بیشترین میزان فعالیت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی در عصاره برگ گیاه مشاهده شد ($p <$ ۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳: درصد کاهش NBT در عصاره اتانولی بخش‌های مختلف گیاه خارپنبه برگ نازک با استفاده از دستگاه سوکسله. میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p <$ ۰/۰۵ است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

بحث

بسیاری از گیاهان داروئی با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهاب، به نظر می‌رسد در فعالیت‌های ضدبدخیمی و ضدجهش‌زایی سلولی دخالت دارند. با توجه به این که گسترش سرطان ارتباط بسیار نزدیکی با التهاب و استرس اکسیداتیو دارد، ترکیبی که خواص ضدالتهابی یا آنتی اکسیدانی داشته باشد، می‌تواند یک عامل ضدبدخیمی سلولی باشد (۱۸).

گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی متعددی هستند که ساختار-های متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آن‌ها حلال و روش استخراج می‌باشند. نوع ترکیبات فیتوشیمیایی ویژه هر گیاه و مدت زمان استخراج می تواند نقش مهمی در انتخاب نوع حلال و غلظت آن داشته باشد (۱۹). یائو و همکاران به وسیله حلال‌های با قطبیت متفاوت (استون، اتانول، متانول) عصاره‌ی دانه‌های جو را استخراج کردند. نتایج تحقیقات آن ها نشان داد که بیش ترین راندمان عصاره‌گیری مربوط به عصاره‌ی متانولی است (۲۰). ماساکو و همکاران راندمان استخراج عصاره استونی ریشه گیاه سنا را ۱/۸۷ درصد گزارش دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی، اتانولی و استونی دانه های جو نیز با دو روش مهار رادیکال های آزاد و قدرت احیاکنندگی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که در هر دو روش، عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشته و اختلاف معنی داری بین عصاره های اتانولی و متانولی مشاهده نگردید(۲۱).

استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم، شناخت ترکیب-های شیمیایی موجود در آنهاست زیرا وجود ترکیب‌های شیمیایی است که باعث اثر درمانی گیاه می‌گردد (۵). از آنجا که گیاه خارپنبه برگ نازک در کشور ما به صورت سنتی مصرف فراوانی دارد و یکی از گونه‌های بومی می-باشد، لذا بررسی مقدماتی فیتوشیمیایی سرشاخه گلدار، عصاره‌گیری و شناسایی اجزاء موجود در گونه گیاهی *Onopordon Leptolepis* برای نخستین بار نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. در این تحقیق آزمون‌های مقدماتی فیتوشیمیایی وجود ترکیب‌های آلکالوئیدی، فلانوئیدی، تانن دار، گلیکوزید سیانوژنیک و استروئیدی را تائید می نمایند. بنابراین با توجه به این نتایج، توجه به مقدار و نوع مصرف بسیار ضروری می باشد.

براساس بررسی طیف GC-MS عصاره سرشاخه هوایی گیاه، ۲۷ ترکیب اصلی و عمده شناسایی شد. ترکیبات آلی شناسایی شده در عصاره، با توجه به کتب مرجع به گروه‌های متفاوتی از ترکیبات فیتوشیمیایی (ترپن‌ها، اسیدهای چرب، هیدروکربن‌ها، ترکیبات هتروسیکلی، فنلی و هیدروکسیل آمین‌ها (آلکالوئیدها) طبقه بندی شدند (۱۵). با توجه به طبقه‌بندی فیتوشیمیایی ترکیبات عصاره گیاه خارپنبه برگ نازک مشخص شد، ترکیب‌های شناسایی شده به گروه‌های متفاوت فیتوشیمیایی مانند ترپن‌ها، اسیدهای چرب، هیدروکربن‌ها، ترکیبات هتروسیکلی و فنلی، گلیکوزید و آلکالوئیدها تعلق دارند. با توجه به درصد، ترکیبات به‌ترتیب زیر قرار می‌گیرند:

ترپن‌ها> هیدروکربن‌ها > آلکالوئیدها > اسیدهای چرب > ترکیبات هتروسیکلی و فنلی > گلیکوزید.

ترکیبات (%92/78) -Neooleana-3(5),12-diene ، آدیپیک اسید(۱/۱۹ درصد)، ۲(H۱)نفتالنون،۳،۵،۶،۷،۸،۸a-هگزاهیدرو-۴،۸a-دی متیل-۶-(۱-متیل اتنیل) (۱۳/۶۵ درصد) و ۱،۲- دی متیل - ۳- هیدروکسی کربونیل- ۴- آزافنانترن(۱/۱۴ درصد) عمده ترین ترکیبات عصاره گیاه خارپنبه برگ نازک می‌باشند. در گونه *Onopordon leptolepis* DC بیشترین درصد عصاره را ترکیب تری ترپنوئید A-Neooleana-3(5),12-diene (۹۲/۷۸ درصد) تشکیل می‌دهد. بنابراین با توجه به اینکه در دستگاه سوکسله استفاده از دمای بالا منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

(مانند: رزینی، صمغ، واکس‌ها و ترپن‌ها) می‌شود، استفاده از این روش با حلال اتانول در استخراج تری ترپنوئید موجود در گیاه با درصد بالا، کارایی بیشتری دارد (۵).

نتایج حاصل از سنجش توانایی زیستی نشان می‌دهد که عصاره‌های اتانولی دو بخش سرشاخه هوایی و ساقه گونه خارپنبه برگ نازک دارای بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی رشد سلول‌های سرطانی است. طبق پژوهش‌های انجام شده بر روی خواص آنتی اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد عصاره سرشاخه هوایی و بخش‌های سبز گیاه *Onopordon Leptolepis* با استفاده از روش‌های FRAP و DPPH ، سرشاخه هوایی این گیاه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی پایینی نسبت به بخش‌های سبز دارد (۱). طبق این پژوهش خاصیت آنتی اکسیدانی به قطبیت حلال بستگی دارد. بطور کلی عصاره بدست آمده از حلال‌های غیرقطبی (هگزان) فعالیت آنتی اکسیدانی پایین‌تری نسبت به عصاره حاصل از حلال-های قطبی (متانول) دارند (۱۹و۱). بنظر می‌رسد در پژوهش حاضر حلال اتانول بدلیل قطبیت کم، باعث می‌شود که میانگین میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی (ترپنوئیدی، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدی و...) بیشتر باشد. همانطور که قبلا ذکر شد، روش استخراج سوکسله باعث افزایش حلالیت ترکیبات پایدار در مقابل حرارت مانند ترکیبات آنتی اکسیدانی(ترپنوئیدی، فلاوتوئیدی و...) می-شود. بر اساس یافته‌های محققین این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ماده موثر اصلی گیاه خارپنبه برگ نازک هستند، که دارای اثر ممانعت کنندگی بر رشد و حیات انواع سلول‌های سرطانی می‌باشد. حضور انواع آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در خارپنبه برگ نازک گزارش شده‌است (۱).

در بررسی میزان کاهش رادیکال آزاد در سلول‌های تیمار شده به روش NBT مشخص شد که عصاره بخش‌های متفاوت گیاه خارپنبه برگ نازک دارای فعالیت بدام اندازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید هستند که این ویژگی مربوط به آنتوسیانین‌ها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره می‌باشد (۲۲)، این ترکیبات علاوه‌براین، توان کلایته کردن فلزات را دارند (۲۳). همچنین نتایج آزمون NBT نشان می‌دهد که عصاره اتانولی سرشاخه هوایی گیاه نسبت به عصاره ساقه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی یکسانی می‌باشند. محمدی و همکاران در نتایج بررسی‌های خود به روی میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی پوست میوه خرمالو نشان دادند که عصاره اتانولی از مقدار ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره متانولی برخوردار بوده‌است (۲۴)،که این ترکیبات نقش مهمی در جذب رادیکال‌های آزاد سلول‌ها دارند. در مطالعه‌ای به روی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد عصاره‌های آنتی اکسیدانی پوست فندق، که به وسیله حلال های مختلفی استخراج شده بودند، عصاره متانولی با راندمان استخراج بالاتر نسبت به عصاره‌های اتانولی، دارای ترکیبات فنلی و قدرت رادیکال‌گیرندگی کمتری نسبت به عصاره به دست آمده از حلال اتانول بود (۲۵).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق نوع حلال بر ویژگی‌های استخراج عصاره (مانند زمان استخراج، سرعت اختلاط، نسبت میزان پودر به حلال و اندازه ذرات پودر) و بر میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد. یافته‌های ما حضور برخی از فیتوکمیکال‌ها از جمله آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک ، تانن‌ها و استروئیدها را نشان می‌دهد. خواص دارویی و ضد سرطانی این گیاه ممکن است به دلیل حضور برخی از ترکیبات آلکالوئیدی، گلیکوزیدی و ترکیبات هتروسیکلی و فنلی و دیگر فیتوکمیکال ها موجود در این گیاه باشد که باعث فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه می‌شوند. عصاره بخش‌های مختلف گیاه فعالیت ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان روده نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی در عصاره برگ گیاه مشاهده شد. با

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی بالای گونه *O. leptolepis* استفاده از این گیاه به‌عنوان گیاه داروئی می-تواند در درمان سرطان موثر باشد. ترکیبات شیمیایی شناخته‌شده در گیاه می‌تواند در ساخت و تولید داروهای شیمیایی و صنایع غذایی بکار گرفته‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده، به عنوان دیدگاه‌های آینده، ارزیابی برخی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های بهبود زخم، ضد-التهاب، ضدمیکروبی و ضدقارچی و همچنین تعیین کمیت ترکیبات فیتوشیمی موجود در عصاره این گیاه مورد توجه است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین هزینه‌های این پژوهش تشکر می‌نمایند.

Reference

1. Valizadeh E, Fatholahy Zonouz N, Zand A, Shahbazi S, Malekian A. Evaluation of antioxidant potentials of extracts of cotton thistle (Onopordum leptolepis DC.) obtained by various solvents. Aust J Crop Sci 2011; 5: 1163-6.
2. Singh RP, Pandey VB. Nivetin, a neoflavonoid from echinops niveus. Phytochemistry 1999; 29: 680-1.
3. Briese DT. Impact of the Onopordum capitulum weevil Larinus latus on seed production by its host-plant. J Appl Ecol 2000; 37: 238-46.
4. Pourhoseingholi M A, Fazeli Z, Fazeli-Bavandpour F S, Abadi A. Study of mortality trends of colorectal cancer in Iran between 1995 and 2004. Medical Sciences 2014; 23: 16-20. [In Persian]
5. Kolahi M, Mokhtari B, Mirzaee N. A phytochemical study and comparison of the effect of pomegranate extracts spongy tissue on colon cancer cells caco2. Jundishapur Sci Med J 2016; 15: 201-15. [In Persian]
6. Mahdavi Meyman Z, Mir-Tajaddinni SM. Phytochemical evaluation of 30 plant species collected from Shahrbabak (Kerman/Iran). JKMU 2006; 13: 95-102. [In Persian]
7. Kokate CK, Gokhale SB, Purohit APA. Textbook of pharmacognosy. 29nd ed. Maharashtra: Nirali Prakashan, 2008: 635.
8. Arora M, Kaur P. Phytochemical screening of orange peel and pulp. IJRET 2013; 12: 517-22.
9. Satheesh Kumar B, Suchetha Kumari N, Vadisha SB, Sharmila KP, Mahesh Prasad B. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. NUJHS 2012; 2: 34-8.
10. Nasrabadi M, Halimi M, Nadaf M. Phytochemical screeningand chemical composition of extract of Muscari neglectum. Middle-East J Sci Res 2013; 14: 566-9.
11. Mokhtari B, Kolahi M, Mirzaei N. A comparison study of extraction methods and mass spectrum for compounds in Echinops dichrous and comparison of effects of extracts on colon cancer cells CaCo2. JMP 2017; 2: 145-57. [In Persian]
12. Zeping H, Xiaoxia Y, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Eli C, et al. Herb-drug interactions: a literature review. Drugs 2005; 65: 1239-82.
13. Khazraei-Moradian S, Andalib A, Ganjalikhani-Hakemi M, Safari Z, Zare A, Kardar GhA. The effect of protein extract of Licorice root in proliferation of HT-29 and CT26 cancer cell lines. J Isfahan Med Sch 2014; 32: 1338-46.
14. Freeman R, King B.A. Modification to the N.B.T. Test. Lancet 1971; 2: 1154.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]

15. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromography/mass spectrometry. Allured publishing corporation. 4nd ed. United States: Allured Publishing Corporation, 2007: 804.
16. Glasby JS. Dictionary of plants containing secondary metabolites. UK: Taylor and Francis, Basingstoke, 1991: 100-200.
17. Knapp DR. Handbook of Analytical Derivatization reactions. United States: John Wiley & Sons Inc, 1979: 18.
19. Davarynejad G, Taghizadeh S, Asili J. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of Zizyphus jujube miller fruits. Journal of Horticultural Science 2017; 31: 158-66.
20. Yao H, Qing L. Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chem 2007; 102: 732-7.
21. Masoko D, Galolo SS, Mokgotho MP, Eloff JN, Howard Rl, Mampara LJ. Evaluation of the antioxidant, antibacterial andante prolife rative activities of the aceton extract of the roots of Sen naitulical (fabaceue). Afr J Tradit Complement Altern Med 2010; 7: 138-48.
22. Zarezadeh Mehrizi RA, Emam-Djomeh Z, Shahedi Bagh Khandan M, Loni E Akhavan HR, Biabani J. Identification and quantification of anthocyanins in pomegranate peel extract. JFST 2015; 12: 31-40.
23. Zolfaghari B, Yegdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. J Herbal Drugs 2010: 1: 51-5. [In Persian]
24. Mohamadi M, ElhamiRad AH, Pourfallah Z. Determination of total phenolic compound contents and antioxidant capacity of persimmon skin. Journal of Food Hygiene 2012; 2: 41-55.
25. Locatelli M, Travaglia F, Coisson J.D, Martelli A, Stevigny C, ArlorioM. Analytical Methods Total Antioxidant Activity of Hazelnut Skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. Food Chem 2010; 119: 1647-55.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

[DOI: 10.29252/sjku.23.2.57]