

Assessment of anticancer properties of *Rosmarinus officinalis L* extract and gamma rays on cell viability of MCF-7, SKBR3, and HU02 cell lines

Nazanin Abdolmaleki¹, Fatemeh Javani Jouni², Parviz Abdolmaleki^{3*},
Zohreh Abdolmaleki⁴

1- M.Sc. Student, Department of Biophysics, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

2- Ph.D., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Parviz@modares.ac.ir

Received: 17/Jun/2017, Accepted: 23/Aug/2017

Abstract

Objective: Despite significant advances in radiation therapy and cancer treatments in the past 30 years, resistance to chemotherapy is a major obstacle in the recovery of patients with cancer. Resistance to chemotherapy drugs inhibits the recovery process. This study aims to evaluate the anticancer activity of the methanolic extract of rosemary alone and in conjunction with gamma rays on growth inhibition of MCF-7, SKBR3 and HU02 cell lines.

Methods: We examined cytotoxicity of different concentrations (1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml) of rosemary extract and various doses of gamma rays (1.5, 3, and 7.5 Gy) on MCF-7, SKBR3, and fibroblast (HU02) cell lines. All three cell lines were obtained from the Iranian Biological and Genetics Reserve Center. The cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin. The cells were allowed to incubate at 37°C in an atmosphere that contained 5% CO₂ and 100% humidity. The standard MTT assay was performed to estimate cell viability after treatment with gamma rays and rosemary extract.

Results: The results of the MTT assay showed that rosemary extract had time- and concentration-dependent anticancer activities on the MCF-7 and SKBR3 cell lines ($p < 0.01$). Rosemary extract had no remarkable cytotoxicity on the normal HU02 cell line. Gamma rays along with rosemary extract had more cytotoxic activity in a time-dependent manner on viability in the cancer cell lines ($p < 0.03$).

Conclusion: Our results, along with results from other studies, have suggested that rosemary extract is a potential candidate, either alone at pre-determined doses or in combination with gamma rays, for the treatment of chemotherapy resistant breast cancer.

Keywords: Rosemary extract, Gamma rays, Cytotoxicity

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و تابش اشعه گاما بر رده‌های سلول‌های سرطان پستان MCF7، SKBR3 و سلول‌های فیرو بلاست HU02

نازنین عبدالملکی^۱، فاطمه جوانی جونی^۲، پرویز عبدالمالکی^{۳*}، زهره عبدالملکی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

Email: parviz@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۶/۰۳/۲۷

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۶/۰۱

چکیده

هدف: با وجود پیشرفت در زمینه پرتو درمانی و درمان سرطان در ۳۰ سال گذشته، مقاومت به شیمی درمانی یک مانع عمده در بهبود بیماران مبتلا به سرطان است. هدف از این تحقیق بررسی آثار ضد سرطانی عصاره الکلی رزماری به تنهایی و بررسی توأم عصاره رزماری و تابش اشعه گاما بر مهار رشد رده سلولی MCF-7 و SKBR3 است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای بهبود درمان سرطان، از عصاره الکلی رزماری با غلظت‌های مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) بر رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و SKBR3 و سلول‌های فیرو بلاست HU02 و نیز دوزهای مختلف اشعه گاما با شدت‌های تابش ۱/۵، ۳، ۷/۵ گری استفاده گردید. سلول‌های سه رده سلولی در محیط DMEM با ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین رشد کردند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ و ۱۰۰ درصد رطوبت نگهداری شدند، روش استاندارد MTT برای برآورد زنده بودن سلول‌ها پس از درمان با عصاره رزماری و تابش اشعه گاما استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد عصاره الکلی رزماری اثر ضد سرطانی وابسته به غلظت و وابسته به زمان بر رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7، SKBR3 دارد ($P < 0/01$)، در حالی‌که عصاره رزماری سمیت سلولی قابل توجهی را روی سلول‌های طبیعی فیرو بلاست نشان نداد. ترکیب توأم عصاره الکلی رزماری و تابش اشعه گاما به صورت وابسته به زمان اثر سمیت بیشتری روی رده‌های سلول سرطانی در مقایسه با استفاده از هرکدام به تنهایی دارد ($P < 0/03$). **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان پیشنهاد کرد که عصاره رزماری می‌تواند به عنوان کاندیدی بالقوه، به تنهایی با دوزی مناسب یا همراه با تابش اشعه گاما، به عنوان یک استراتژی خوب در درمان سرطان پستانی که مقاوم به درمان است، استفاده شود.

کلیدواژگان: عصاره رزماری، تابش گاما، سمیت

مقدمه

افزایش روزافزون آمار مبتلایان به سرطان و مرگ و میر ناشی از آن زنگ خطری برای برنامه‌ریزان نظام سلامت در تمام کشورهاست. بر همین اساس گسترش دامنه و کیفیت پژوهش در خصوص روش‌های پیشگیری، تشخیصی و درمان سرطان ضروری به نظر می‌رسد. در سال ۲۰۱۲ در آمریکا در هر روز ۱۵۰۰ مرگ در اثر سرطان گزارش شده است و از هر ۴ مرگ یکی از آن‌ها به علت سرطان بوده است [۱، ۲].

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میر فراوانی در بین زنان و مردان می‌شود و با وجود پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است، کماکان یکی از مهم‌ترین علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است [۳، ۴]. با این‌که هر روز راه‌کارهای جدیدتری در برخورد با سرطان پستان معرفی می‌شود ولی هنوز هم این بیماری جان عدۀ زیادی را در معرض خطر قرار داده است. شاید توجه بیشتر به ساختار ریزمولکولی و اساس زیست‌شناسی این بیماری باعث شود تا بلکه بتوان با دانسته‌های بیشتری در مورد چگونگی پیدایش این بیماری از سطح سلول‌ها، اطلاعات گسترده‌تری در مورد ایجاد رشد و بیماری‌زایی این بیماری مهلک به‌دست آورد [۵].

آمار بیماری سرطان پستان در کشور ایران نیز متأسفانه در حال افزایش است. در ایران سرطان پستان در زنان جوان‌تر (حداقل یک دهه زودتر از زنان در کشورهای پیشرفته) دیده می‌شود و متأسفانه بیماران در مراحل پیشرفته مراجعه می‌کنند. با این حال خوشبختانه در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشم‌گیری در تشخیص زودرس و درمان این بیماری حاصل شده است، به‌طوری‌که امروزه درصد قابل توجهی از زنان مبتلا، با اتخاذ تدابیر درمانی و مراقبتی لازم سال‌ها به راحتی به زندگی خود ادامه می‌دهند [۶].

استفاده از عصاره‌های گیاهی نظیر رزماری می‌تواند باعث جلوگیری رشد سرطان، کاهش دوز داروهای شیمیایی و به تبع آن به حداقل رساندن آثار جانبی این داروها شود. نتایج بسیاری

از آزمایش‌ها نشان می‌دهد که عصاره رزماری خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی و بهبود حافظه و همچنین خاصیت پایین آوردن قند خون را دارد که آن را به‌عنوان افزودنی مفید به غذای حیوانات و انسان‌ها اضافه می‌کنند [۷، ۸].

رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* متعلق به خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) است. بیشترین اسانس در برگ‌های این گیاه وجود دارد اما ساقه و گل نیز حاوی مقادیر کمی اسانس هستند [۹]. مواد مؤثره این گیاه را اسانس، تانن و مواد تلخ تشکیل می‌دهد. مقدار اسانس در برگ‌های خشک بین ۰/۵ تا ۱/۵ درصد است [۱۰].

بررسی‌ها نشان می‌دهد که استفاده از گیاه رزماری به‌عنوان یک آنتی اکسیدان قوی بیشتر به علت ترکیبات پلی فنلی و ترپنوییدی موجود در گیاه مرتبط می‌شود، این مواد شامل رزمارینیک اسید (*Rosmarinic acid*)، کارنوسول (*Carnosol*)، اسید کافئیک (*Caffeic acid*)، کارنوسیک اسید (*Carnosic acid*)، رزمارینیک اسید (*Rosmarinic acid*)، کامفور (*Camphor*)، پولگون (*Polegone*)، ۸-سیثول (*Isobornyl acetate*) و ایزوبورنیل استات (*Isobornyl acetate*) هستند که در مهار رادیکال‌های آزاد به‌عنوان آنتی اکسیدان مطرح است [۱۱-۱۴]. ترکیبات دیگر گیاه را موادی نظیر فلاونوئیدهای آپی‌ژنین (*Apigenin*)، روتین (*Rutin*)، لوتئولین (*Luteolin*) و کومارین‌های آمبلی‌فرون (*Umbelliferone*)، کومارین (*coumarins*)، هرنیارین (*Herniarin*) تشکیل می‌دهد که در برگ‌ها و تا حدی در ساقه گیاه وجود دارد [۱۰].

رادیکال‌های آزاد یا اکسیژن‌های واکنش‌گر عامل بسیاری از پدیده‌های زیستی از جمله پیری و التهاب و سرطان‌زایی است. جزء سازنده رزماری خواص دارویی متنوع رزماری را در جلوگیری از سرطان نشان می‌دهد [۱۵]. شواهد قابل ملاحظه‌ای که از مطالعات شیمیایی و تحقیقات کشت سلول به‌دست آمده است نشان می‌دهد که آنتی اکسیدان‌ها ممکن است در پیشگیری‌های اولیه، بروز سرطان را کند نمایند یا احتمالاً از بروز

آن جلوگیری نمایند [۱۶]. آثار مختلف ضد توموری از قبیل القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis)، ضد رگ‌زایی، القای تمایز سلولی همچنین خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و تغییر متابولیسم سرطان‌زایی در عصاره گیاه رزماری مشاهده شده است. خاصیت ضد تکثیر عصاره تام رزماری و مواد فنولیک موجود در آن همچون کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید بر چندین رده سلول‌های سرطان انسان از جمله سرطان پستان و خون و نیز در شرایط آزمایشگاهی بر موش نشان داده شده است [۱۷-۲۰].

استفاده از روش‌های سنتی درمان سرطان علاوه بر عوارض جانبی شدید که به دنبال دارد، از نظر عملی و تجربی نیز دارای مشکلات بسیاری است. چندین مکانیسم برای مقاوم شدن سلول سرطانی به شیمی درمانی وجود دارد. این مقاومت سلولی ممکن است از طریق انتشار دارو به خارج، کاهش جذب دارو، افزایش تعداد مولکول‌های هدف در سلول، تغییر مسیر متابولیسمی دارو و یا تغییر فرایندهای ترمیم DNA حاصل شود. مقاومت سلول‌های سرطانی به عوامل ضد سرطان یک مشکلی عمده درمان است. بنابراین بسیاری از بیماران به درمان دارویی پاسخ نمی‌دهند و ممکن است مرگ اتفاق بیفتد [۱]. پرتو درمانی استفاده از پرتوهای یون‌ساز برای از بین بردن یا کوچک کردن بافت‌های سرطانی است. در این روش در اثر آسیب DNA، سلول‌های ناحیه درمان تخریب و ادامه رشد و تقسیم غیر ممکن می‌شود. اگرچه پرتو علاوه بر سلول‌های سرطانی به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌رساند ولی اکثر سلول‌های سالم بهبودی خود را دوباره به دست می‌آورند. هدف از پرتو درمانی از بین بردن حداکثر سلول‌های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم است. روش‌های مختلفی برای پرتودهی و انتقال اشعه با قدرت نفوذ متفاوت وجود دارد. علاوه بر این تعدادی از روش‌های پرتودهی می‌تواند به‌طور دقیق و کنترل شده برای درمان ناحیه کوچکی از بافت بدون آسیب به بافت و اندام‌های اطراف استفاده شود؛ در حالی که برای درمان نواحی بزرگ‌تر از انواع دیگر پرتو استفاده می‌شود.

در تعدادی از بیماران هدف از درمان تخریب کامل تومور و بعضی کوچک کردن تومور یا کاهش علائم آن است. در هر بیمار طراحی درمان برای محافظت بافت‌های سالم تا حد امکان انجام می‌شود. نیمی از بیماران سرطانی پرتو درمانی می‌شوند. پرتو درمانی ممکن است به صورت منفرد یا همراه با دیگر روش‌های درمان سرطان شامل شیمی درمانی یا جراحی استفاده شود؛ حتی در بعضی موارد ممکن است بیش از یک روش پرتو درمانی به کار گرفته شود [۲۱-۲۳].

در تحقیق حاضر آثار سمیت عصاره رزماری و تابش اشعه گاما با غلظت‌های مختلف و طی زمان‌های مختلف در رده‌های سرطانی پستان MCF-7 و SKBR3 و سلول‌های طبیعی فیروبلاست HU02 و همچنین آثار همزمان تیمار عصاره الکلی رزماری و تابش اشعه گاما بر رده‌های سلولی بررسی شد و غلظت‌های IC50 آن‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار محاسبه شد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

نمونه‌های خشک شده گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. سپس برگ خشک رزماری آسیاب و غربال شد تا پودر یک دستی حاصل شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۵۰ میلی‌لیتر متانول طی مدت ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی و در دمای محیط مخلوط شد. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا و مجدداً حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد تا عمل استخراج به حداکثر شکل ممکن صورت پذیرد. سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد و دوباره به وسیله صافی‌های

۰/۴۵ میکرونی برای عاری شدن از میکروارگانسیم‌ها صاف شد، در مرحله آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف شد، سپس عصاره به دست آمده در یک ظرف دردار شیشه‌ای ریخته و در جایی دور از نور نگهداری شد.

کشت سلول

به منظور انجام این پژوهش، رده سلول‌های سرطان پستان MCF-7، SKBR3 و فیروبلات انسانی (HU02) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. رده‌های سلولی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (Fetal bovine serum: FBS)، محلول ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد بین‌المللی/میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) کشت داده شدند. سپس در انکوباتور CO₂ ۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت مناسب نگهداری و هر ۳ روز یکبار محیط کشت آن‌ها تعویض شد.

دستگاه مولد پرتو گاما

به منظور پرتودهی، نمونه‌های سلولی به بخش رادیوتراپی بیمارستان امام خمینی (ره) انتقال یافتند و توسط دستگاه Theratron مدل 780E ساخت کشور آمریکا که حاوی چشمه کبالت-۶۰ ساخت کشور کانادا بود، پرتودهی شدند. پرتودهی نمونه‌ها به روش SSD (Source to Surface Distance) و با آهنگ دز ۰/۴ گری در دقیقه انجام شد. برای ایجاد آهنگ دز ۰/۴ گری در دقیقه، نمونه‌ها در فاصله تقریباً ۱۰۰ سانتی‌متری چشمه کبالت-۶۰ قرار داده شدند.

بررسی سمیت سلولی

برای ارزیابی سمیت سلولی از آزمایش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

بر پایه سنجش قدرت احیای رنگ تترازولیوم (Tetrazolium) استفاده شد. در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلول‌های زنده فعال هستند، در حلقه MTT محلول شکستی ایجاد شد و به بلورهای آبی رنگ فورمازان (Formazan) غیرمحلول تبدیل شد. بنابراین با استفاده از روش نورسنجی میزان فورمازان که توسط دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) یا حلال‌های دیگر به شکل محلول در آمده اندازه‌گیری شد. پس از جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک توسط تریپسین-EDTA (Trypsin) جدا شد و برای ارزیابی توانایی زیستی سلول‌ها از آزمون تریپان بلو (Trypan blue) استفاده شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام ثنوبار (Neobar) (در خانه‌های متعلق به شمارش گلبول‌های سفید) انجام گرفت. سلول‌های آبی رنگ به عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون MTT تعداد ۱۰^۴ سلول از سه رده سلولی به طور جداگانه در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، بعد از ۲۴ ساعت، به منظور تعیین تأثیر مقدار و زمان، عصاره رزماری ۵ غلظت (۱، ۵، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و دوز تابش اشعه گاما با شدت‌های ۱/۵، ۳، ۷/۵ گری و دو زمان متفاوت ۲۴ و ۴۸ ساعت انتخاب شد. این زمان‌ها با توجه به این‌که زمان دو برابر سلول‌های MCF-7، SKBR3 و HU02 زیر ۲۴ ساعت است، انتخاب شدند. در مرحله بعدی برای بررسی آثار همزمان تیمار عصاره الکلی رزماری و تابش اشعه گاما، سلول‌های MCF-7، SKBR3 و HU02 تحت اثر IC50 موثر عصاره الکلی رزماری و شدت تابش مؤثره اشعه گاما قرار داده شد. از دوکسوروبیسین (Doxorubicin) به عنوان کنترل مثبت، برای مشخص شدن حساسیت یا عدم حساسیت سلول‌ها به ماده سمیت سلولی استفاده شد و محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO بدون هیچ گونه عصاره‌ای به عنوان کنترل منفی به منظور بررسی اثر حلال عصاره‌ها یعنی DMSO بر

نتایج

در این پژوهش سه رده سلول‌های MCF-7، SKBR3 و HU02 انتخاب شدند. از رده طبیعی HU02 به‌عنوان سلول‌های طبیعی در آزمایش استفاده شد و علت انتخاب رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 ویژگی $her2^{\pm}$ بودن آن‌ها است، سلول‌های MCF-7، $her2^{-}$ و سلول‌های SKBR3، $her2^{+}$ هستند، انتخاب زمان‌های تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، طبق تحقیقات صورت گرفته و بر اساس مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها انتخاب شده است.

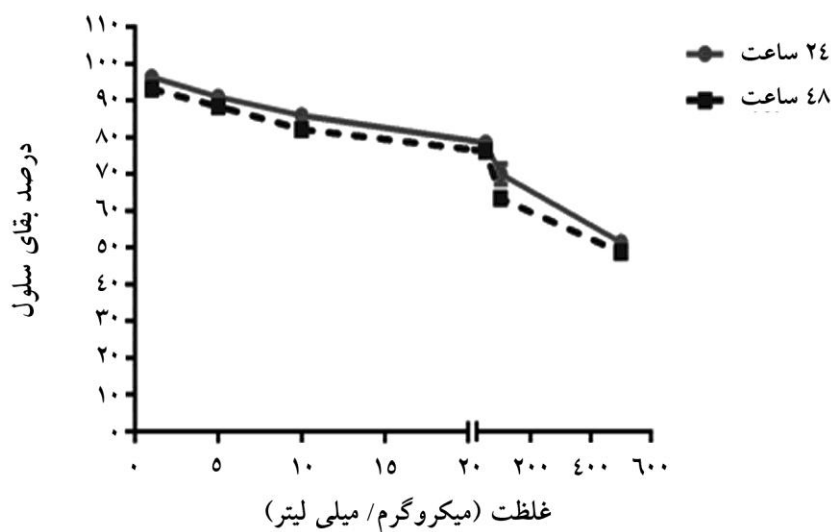
اثر سمیت عصاره رزماری بر رده سلول‌های HU02، MCF-7، SKBR3

اثر سمیت سلولی عصاره الکلی رزماری در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر سلول‌های سرطانی و سلول طبیعی بررسی شد. شکل‌های ۱، ۲ و ۳ تأثیر عصاره رزماری بر سه رده سلولی را نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} حاصل از تیمار با عصاره رزماری در زمان‌های مختلف ۲۴ و ۴۸ ساعت در جدول ۱ آمده است.

سلول‌ها استفاده شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) و ۹۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محیط رویی هر چاهک خارج شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA reader) در طول موج ۵۴۰-۵۷۰ خوانده شد.

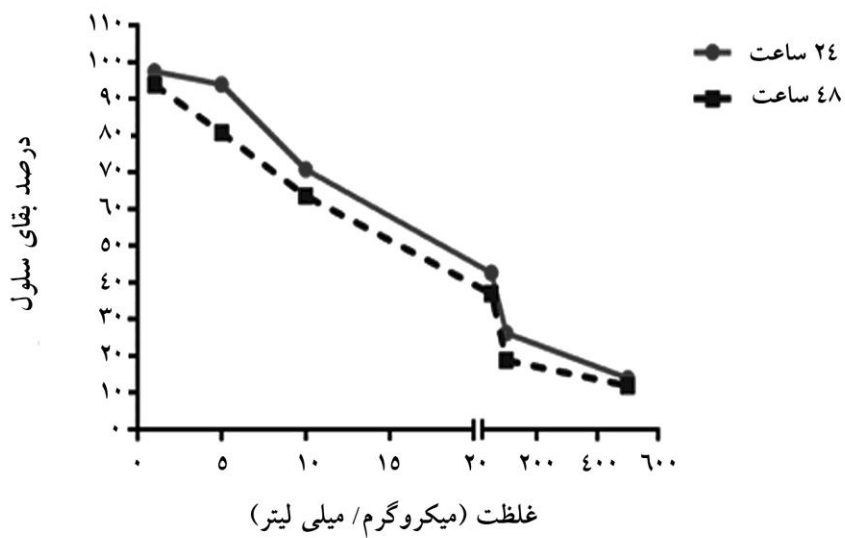
تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار آماری Graphpad prism 6.0 استفاده شد، اطلاعات پس از ورود به نرم‌افزار با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one way Analysis of variance: ANNOVA) تجزیه و تحلیل شد، به دنبال آن از آزمون تکمیلی توکی (Tukey) برای مقایسه آثار گروه کنترل و گروه‌های مختلف تیمار با عصاره رزماری و تابش پرتو گاما استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($Mean \pm SD$) حاصل از ۳ بار تکرار مستقل بیان شد. تفاوت معنی‌دار ما بین گروه‌ها با حدود اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) گزارش شد.

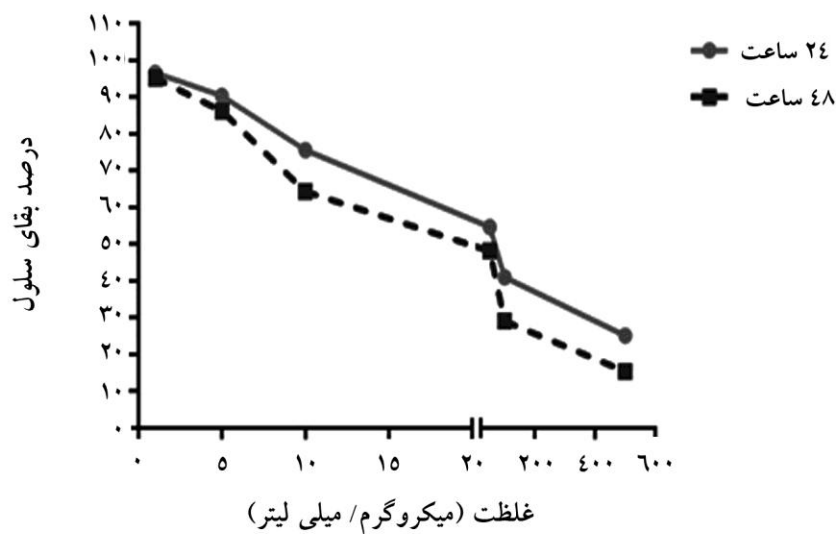


شکل ۱ درصد بقای رده سلولی HU02 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه رزماری در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر ($SD \pm Mean$) است ($n=3$).

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و تابش اشعه گاما بر رده‌های سلول‌های سرطان پستان



شکل ۲ درصد بقای رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه رزماری در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر (SD ± Mean) است (n=۳).



شکل ۳ درصد بقای رده سلولی SKBR3 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه رزماری در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر (SD ± Mean) است (n=۳).

جدول ۱ غلظت (IC50) عصاره رزماری برحسب میکروگرم/میلی لیتر در دو زمان مختلف

غلظت (میکروگرم/ میلی لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
رده سلولی		
MCF-7	۲۴/۶۴	۱۸/۳۶
SKBR3	۳۳/۹	۲۵/۲۱
HU02	۱۱۱/۵	۸۹/۸۶

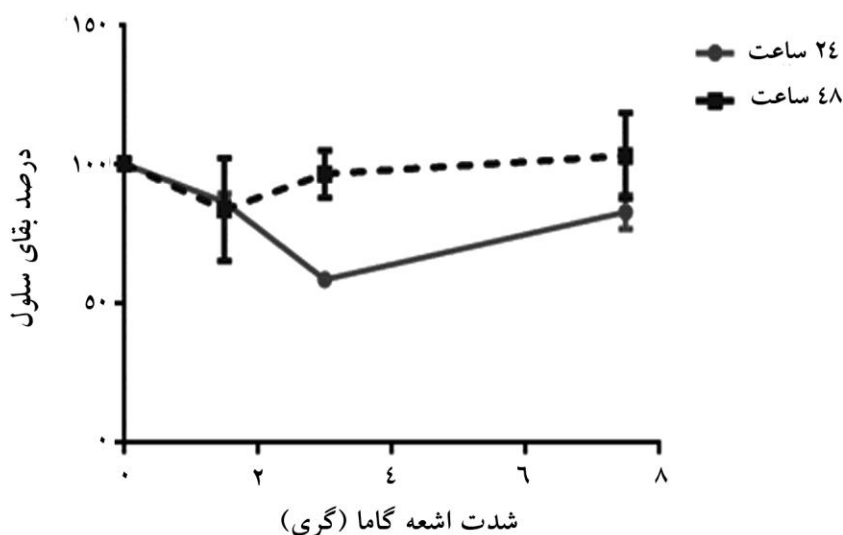
همچنین طبق مقدار IC50 که از تیمار عصاره رزماری بر رده‌های سلولی به‌دست آمد، مشخص شد که IC50 سلول‌های فیروبلاست بیشتر از مقادیر IC50 حاصل از تیمار رزماری بر رده‌های سلول سرطانی MCF-7، SKBR3 است. در نتیجه، سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 در مقایسه با سلول فیروبلاست نسبت به عصاره رزماری حساس‌تر هستند.

اثر سمیت تابش اشعه گاما بر رده سلول‌های

MCF-7، SKBR3 و HU02

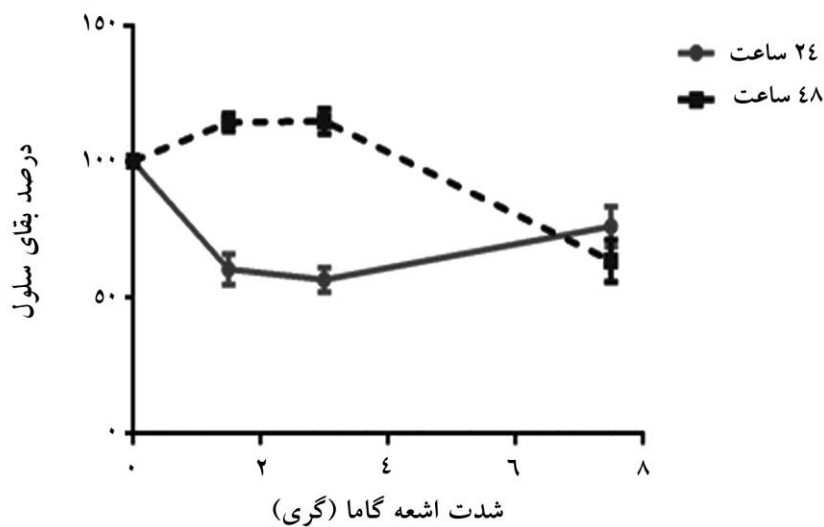
طبق شکل‌های ۴، ۵ و ۶ شدت تابش اشعه گامایی که بیشترین تأثیر را در کاهش درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 با کمترین سمیت سلولی بر رده سلولی طبیعی HU02 به همراه داشت. شدت تابش ۳ گری در ۲۴ ساعت پس از تیمار بود.

نتایج حاصل از اثر عصاره رزماری بر سلول‌های MCF-7 و SKBR3 نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد به‌طوری که کمترین بقای سلولی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره رزماری به ترتیب پس از تیمار سبب کاهش درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تا ۲۶/۲ و ۱۴ پس از تیمار ۲۴ ساعت و ۱۸/۷ و ۱۲ درصد پس از تیمار ۴۸ ساعت شد و این میزان در غلظت‌های پایین‌تر ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت ۹۴ و ۷۱ درصد و در ۴۸ ساعت ۸۱ و ۶۳/۵ درصد مشاهده شد. درصد زنده مانی سلول‌های SKBR3 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره رزماری به میزان ۴۱ و ۲۵/۱ درصد در ۲۴ ساعت و ۲۹ و ۱۵/۳ درصد در ۴۸ ساعت پس از تیمار گزارش شد و این مقدار برای غلظت‌های پایین‌تر ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت ۹۰/۲ و ۷۵/۵ درصد و در ۴۸ ساعت ۸۶ و ۶۴/۲ درصد به‌دست آمد.

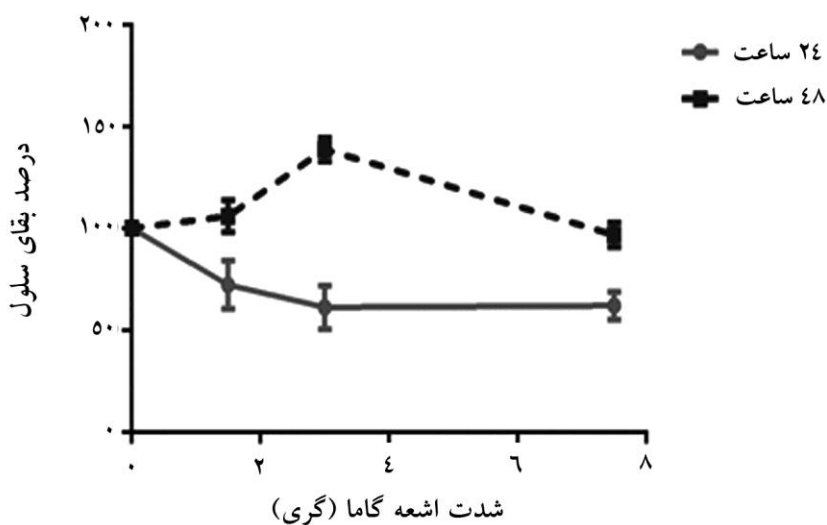


شکل ۴ درصد بقای رده سلولی HU02 پس از تیمار با شدت‌های مختلف تابش اشعه گاما در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر (SD ± Mean) است (n=۳).

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و تابش اشعه گاما بر رده‌های سلول‌های سرطان پستان



شکل ۵ درصد بقای رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با شدت‌های مختلف تابش اشعه گاما در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر (SD ± Mean) است (n=۳).



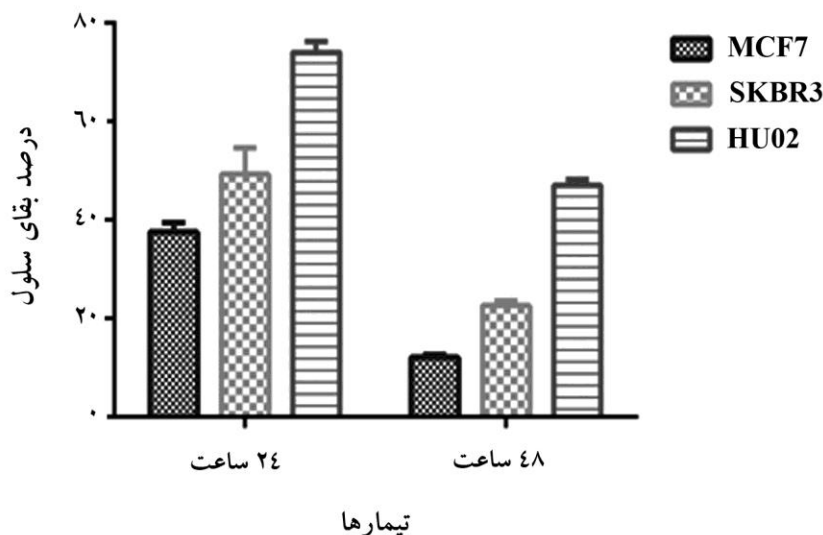
شکل ۶ درصد بقای رده سلولی SKBR3 پس از تیمار با شدت‌های مختلف تابش اشعه گاما در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر (SD ± Mean) است (n=۳).

حاصل از تیمار عصاره رزماری بر رده‌های سلولی و اشعه گاما با شدت تابش ۳ گری بر رده‌های سلولی سرطانی و سلول طبیعی در زمان‌های مختلف آزمایش شد. شکل ۷ نتایج نشان می‌دهد اثر اشعه گاما با شدت ۳ گری توأم با غلظت IC50

اثر سمیت توأم عصاره رزماری و تابش اشعه گاما بر سه رده سلولی MCF-7، SKBR3 و HU02 در مرحله آخر تأثیر توأم عصاره رزماری بر حسب IC50

از تیمار به ترتیب ۳۷/۵، ۴۹/۲ و ۷۴ درصد و در تیمار ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۲، ۲۲/۶ و ۴۷ درصد بوده است ($P < ۰/۰۳$).

عصاره گیاه رزماری بر میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی MCF-7، SKBR3 و سلول طبیعی HU02 در ۲۴ ساعت پس



شکل ۷ درصد بقای رده سلولی MCF-7، SKBR3 و سلول‌های HU02 پس از تیمار توأم غلظت IC50 عصاره رزماری هر رده سلولی با شدت تابش ۳ گری اشعه گاما در دو زمان مختلف؛ Error bar بیانگر ($SD \pm Mean$) است ($n=3$).

از طرفی نتایج به دست آمده در تحقیقات نشان می‌دهد تابش اشعه گاما روی سلول‌های سرطان سینه اثر ضد تکثیر دارد. تابش اشعه گاما سبب توقف چرخه سلولی در فاز G2/M می‌شود و باعث القای اندک مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود. در چرخه سلولی نیز ترکیب عصاره رزماری و اشعه گاما اثر قابل توجهی در توقف رشد سلول‌های سرطانی از خود نشان داده است. در چرخه سلولی نیز ترکیب عصاره رزماری و تابش اشعه گاما اثر قابل توجهی در توقف رشد سلول‌های سرطانی از خود نشان داده است [۲۵].

در این مطالعه نیز نتیجه‌ای مشابه بر سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 حاصل شده است، با این تفاوت که استفاده از عصاره رزماری به همراه اشعه گاما به طور معنی‌داری تأثیر بیشتری را نسبت به تیمار با اشعه گاما و عصاره رزماری به تنهایی داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده

بحث

تا به امروز مشخص شده که تعدادی از گیاهان رایج دارای خاصیت محافظت کننده در برابر سرطان، ضد سرطان هستند، از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه *Allium* (سیر و پیاز و موسیر)، اعضای خانواده نعنائیان (ریحان، نعناع، آویشن و رزماری)، اعضای خانواده *Zingiberaceae* (زنجبیل و زردچوبه) اشاره نمود. گیاه رزماری همانند این گیاهان منابعی غنی از ترکیبات شیمیایی گیاه ضد سرطان مانند فیتواستروئیدها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، ترپنوئیدها را داراست که این مواد نقش آنتی اکسیدانی دارند، رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری می‌کنند و موجب تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شوند و همچنین تشکیل DNA اضافی (DNA adducts) با سرطان‌زا را مهار و علاوه بر این مسیرهای متابولیک مرتبط با گسترش سرطان را مهار می‌کنند [۱۱، ۱۲، ۲۰، ۲۴].

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و تابش اشعه گاما بر رده‌های سلول‌های سرطان پستان

شد که عصاره رزماری به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان باعث کاهش درصد سلول‌های زنده سرطانی MCF-7 و SKBR3 می‌شود. IC50 عصاره رزماری به ترتیب طی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار در رده سلولی MCF-7 با مقادیر ۱۸/۳۶ و ۲۴/۶۴ و بر رده سلولی SKBR3 با مقادیر ۳۳/۹ و ۲۵/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. اما در سلول‌های طبیعی HU02 سمیت قابل توجهی مشاهده نشد و مقادیر IC50 عصاره بر رده سلولی طبیعی طی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار به ترتیب ۱۱۱/۵ و ۸۹/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره رزماری اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان دارد. به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره رزماری به ترتیب سبب کاهش درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تا ۲۶/۲ و ۱۴ درصد طی ۲۴ ساعت پس از تیمار و ۱۸/۷ و ۱۲ درصد در ۴۸ ساعت پس از تیمار شد و این میزان در غلظت‌های پایین‌تر ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت ۹۴ و ۷۱ درصد و در ۴۸ ساعت ۸۱ و ۶۳/۵ درصد مشاهده شد. درصد زنده مانی سلول‌های SKBR3 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره رزماری به میزان ۴۱ و ۲۵/۱ درصد در ۲۴ ساعت و ۲۹ و ۱۵/۳ درصد در ۴۸ ساعت پس از تیمار گزارش شد و این میزان برای غلظت‌های پایین‌تر ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت ۹۰/۲ و ۷۵/۵ درصد و در ۴۸ ساعت ۸۶ و ۶۴/۲ درصد به دست آمد.

از آن‌جا که شدت تابش ۳ گری بیشترین تأثیر را در کاهش درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 با کمترین سمیت سلولی بر رده سلولی طبیعی HU02 به همراه داشت، در بین پرتوهای آزمایش شده، شدت پرتو تابش ۳ گری برای بررسی آثار همزمان با عصاره رزماری انتخاب شد. نتایج اثر اشعه گاما با شدت ۳ گری توأم با غلظت IC50 عصاره گیاه رزماری بر میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7، SKBR3 و سلول طبیعی HU02 در ۲۴ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۳۷/۵، ۴۹/۲ و ۷۴ درصد و در تیمار ۴۸

ساعت به ترتیب ۱۲، ۲۲/۶ و ۴۷ درصد به دست آمد، از مقایسه اثر همزمان عصاره رزماری و شدت پرتو گاما بر هریک از رده‌های سلولی می‌توان نتیجه گرفت که تیمار عصاره رزماری و اشعه گاما به صورت معنی‌داری سبب کاهش درصد زنده مانی سه رده سلول سرطانی MCF-7، SKBR3 و سلول طبیعی HU02 می‌شود ($P < 0.01$)، همچنین از مقایسه نتایج حاصل از تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز می‌توان استنباط نمود که گروه‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته با یکدیگر به صورت وابسته به زمان اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.03$).

یسلی - سلیکتاز (Yesil-Celiktas) و همکارانش با بررسی آثار کشندگی عصاره گیاه رزماری و مواد فعال کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گزارش کردند که IC50 عصاره رزماری در محدوده غلظت ۱۲/۵۰ تا ۴۷/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دارای آثار سمی قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی بودند، در حالی که این مقادیر برای ماده فعال کارنوسیک اسید بسته به حساسیت رده‌های سلولی ۱۰ تا ۳۰ درصد کمتر از IC50 عصاره رزماری بود که به این نتیجه رسیدند که خواص کشندگی کارنوسیک اسید بیشتر از عصاره رزماری است [۱۸].

در مطالعه‌ای که توسط کانتوجیانی (Kantogianni) و همکاران صورت گرفت، فعالیت ضد تکثیری اسانس‌های رزماری و اسانس‌های *Salvia officinalis* بر سلول‌های سرطانی و هماهنگی این فعالیت با مشخصات فیتوشیمیایی‌شان با استفاده از طیف‌سنجی جرمی بررسی شد که مشخص شد هر دو عصاره دارای آثار سمیت وابسته به غلظت بودند. کاهش سلول‌های زنده RINm5F از طریق مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از نیتریک اکسید تعدیل شد. عصاره رزماری فعالیت‌های آنتی اکسیدان، سمیت و اصلاح ایمنی برجسته‌تری را ایجاد کرد که احتمالاً به علت حضور اسید بیتولینیک (Betulinic acid) و غلظت بالاتر اسید کارنوسیک در مشخصات فیتوشیمیایی‌اش است [۳۶].

فعالیت‌های ضد تکثیری و آنتی اکسیدانی سه فرمول‌بندی

کننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده تحت تیمار رزماری تغییر کرده است. این مطالعه نشان داد که عصاره رزماری، تکثیر سلول‌های سرطانی رحم انسان را با تأثیرگذاری بر چرخه سلول در فازهای متعدد مهار می‌کند و این عمل را با تغییر بیان ژن‌های متعدد تنظیم کننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده القا کرده است [۲۸].

نتایج این بررسی نشان داد که درصد سلول‌های زنده رده سلول‌های سرطانی MCF-7 و SKBR3 که تیمار توأم عصاره رزماری و اشعه گاما دریافت کرده‌اند به شکل معنی‌داری به صورت وابسته به زمان، کمتر از سلول‌هایی است که تحت تیمار با عصاره رزماری یا تابش اشعه گاما به تنهایی بوده‌اند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوفیزیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است، نویسنده این مقاله بر خود لازم می‌داند از زحمات و مساعدت‌های همه عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش یاری نمودند، تشکر نماید.

عصاره رزماری (VivOX 20، VivOX 40 و Inolens 50) با محتویات مختلف اسید کارنوسیک و متیل کارنوسل توسط دیلاس (Dilas) و همکارانش بررسی شد. عصاره‌های رزماری آزمایش شده تأثیر ضد تکثیری قابل توجهی را روی سلول‌های HeLa، MCF-7 و HT-29 نشان داد. در هردو رده سلولی HeLa و MCF-7، عصاره‌ها مقادیر بسیار پایین IC50 را نشان دادند. نتایج به‌دست آمده استفاده از عصاره‌های آزمایش شده رزماری را به‌عنوان داروی گیاهی حمایت می‌کند [۲۷].

در مطالعه‌ای که توسط تای (Tai) و همکارانش صورت گرفت، فعالیت کشندگی عصاره رزماری در برابر سلول‌های سرطانی رحم انسان A2780 و این‌که آیا عصاره و سه جزء فعال اصلی آن کارسنول (Carcenol)، کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید می‌توانند فعالیت ضد سرطانی سیس پلاتین را افزایش دهند، ارزیابی شده است. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره رزماری اثر کشندگی مهمی بر سلول‌های سرطانی رحم انسان A2780 و سلول‌های مقاوم به سیس پلاتین دارد. سلول‌های A2780 به ترکیبات فنولی کارسنول، کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید حساس‌تر از سلول‌های مقاوم به سیس پلاتین بودند. مطالعه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های A2780 تیمار شده با عصاره رزماری نشان داد که بیان ژن‌های تنظیم

منابع

- [1] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 714-26.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11-30.
- [3] Howell A, Sims AH, Ong KR, Harvie MN, Evans DG, Clarke RB. Mechanisms of Disease: prediction and prevention of breast cancer--cellular and molecular interactions. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2(12): 635-46.
- [4] Varangot M, Barrios E, Sónora C, Aizen B, Pressa C, Estrugo R, Lavigna R, Musé I, Osinaga E, Berois N. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncol Rep* 2005; 14(2): 537-45.
- [5] Futreal PA, Wooster R, Stratton MR. Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family.

- Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005; 70: 43-9.
- [6] Karimoi HM, Pourdehghan M, Faghihzadeh S, Montazeri A, Milani JM. The Effects of Group Counseling on Symptom Scales of Life Quality in Patients with Breast Cancer Treated by Chemotherapy. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences (Behbood) 2006; 10(1): 10-22.
- [7] Rižnar K, Čelan Š, Knez Ž, Škerget M, Bauman D, Glaser R. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary Extract in Chicken Frankfurters. Journal of Food Science 2006; 71: C425-9.
- [8] Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of *Peganum harmala* L hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16(4): 1-8.
- [9] al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol 1999; 37(2): 124-30.
- [10] Skoula M, Abbes JE, Johnson CB. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. Biochem Syst Ecol 2000; 28(6): 551-561.
- [11] Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry 2008; 110(1): 76-82.
- [12] Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J Agric Food Chem 1996; 44(1): 131-5.
- [13] Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A, Taheri; Mirghaed A, Yadollahi F. Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae* the cause of zoonotic disease in farmed fish. IJFS 2013; 12(3): 702-16.
- [14] Terpin P, Bezjak M, Abramovič H. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. Food Chemistry 2009; 115(2): 740-4.
- [15] Gofman JW. Radiation and human health. San Francisco, CA: Sierra Club Books, 1981; p: 85-120.
- [16] Sakr SA, Lamfon HA. Protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in albino rats. Life Science Journal 2012; 9(1): 779-85.
- [17] Howell PM, Liu Z, Khong HT. Demethylating agents in the treatment of cancer. Pharmaceuticals (Basel) 2010; 3(7): 2022-44.
- [18] Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. Plant Foods Hum Nutr 2010; 65(2): 158-63.
- [19] Petiwala SM, Puthenveetil AG, Johnson JJ. Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. Front Pharmacol 2013; 4: 29.
- [20] González-Vallinas M, Reglero G, Ramírez de Molina A. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*

- L.) Extract as a Potential Complementary Agent in Anticancer Therapy. *Nutr Cancer* 2015; 67(8): 1221-9.
- [21] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 2005; 104(6): 1129-37.
- [22] El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol* 2009; 10(8): 751-2.
- [23] Hendrick RE. Radiation doses and cancer risks from breast imaging studies. *Radiology* 2010; 257(1): 246-53.
- [24] Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(3 Suppl): 491S-499S.
- [25] Chen P, Mrkobrada M, Vallis KA, Cameron R, Sandhu J, Hendler A, Reilly RM. Comparative antiproliferative effects of (111)In-DTPA-hEGF, chemotherapeutic agents and gamma-radiation on EGFR-positive breast cancer cells. *Nucl Med Biol* 2002; 29(6): 693-9.
- [26] Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Gerothanassis IP, Tzakos AG. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem* 2013; 136(1): 120-9.
- [27] Dilas S, Knez Ž, Četojević-Simin D, Tumbas V, Škerget M, Čanadanović-Brunet J, Četković G. In vitro antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations. *International Journal of Food Science & Technology* 2012; 47: 2052-62.
- [28] Tai J, Cheung S, Wu M, Hasman D. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine* 2012; 19(5): 436-43.