



## مقایسه اثر عصاره آبی الکی رزماری روی بقای سلول‌های سرطانی سر و گردن رده HN5 و سلول‌های پیش‌ساز عصبی موش سوری

طیبه محمدی<sup>\*</sup>، الهام حویزی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* E-mail: t.mohammadi@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۵

### چکیده

سرطان یک مشکل اصلی سلامتی در تمام دنیاست و سالانه تعداد بیماران سرطانی افزایش می‌یابد. به علت مقاومت دارویی، درمان سرطان نیازمند تولید داروهای ضد سرطان جدید است. رزماری از جمله گیاهان دارویی است که اثرات ضد سرطانی آن گزارش شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره رزماری روی بقای سلول‌های سرطانی HN5 در مقایسه با سلول‌های پیش‌ساز عصبی موش سوری است. سلول‌های پیش‌ساز عصبی از جنین‌های موش سوری بردار ۱۷ روزه با روش هضم آنزیمی استحصال شد. این سلول‌ها و سلول‌های پیش‌ساز عصبی و سلول‌های HN5 با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره رزماری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و میزان بقای آنها با آزمون MTT اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره رزماری در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقای سلول‌های HN5 را کاهش داد که در مقایسه با اثر آن روی سلول‌های پیش‌ساز عصبی معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). عصاره در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی را افزایش داد ( $P < 0.05$ ) و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقای آنها را کاهش داد ( $P < 0.05$ ). عصاره رزماری می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان بقای سلولی را در سلول‌های سرطانی کاهش و در سلول‌های پیش‌ساز عصبی افزایش دهد.

**کلیدواژه‌ها:** بقا سلولی، رزماری، سرطان، سلول پیش‌ساز عصبی.

### مقدمه

متفاوت است به طوری که در هند حدود ۵۰ درصد انواع سرطان را تشکیل می‌دهد در حالی که در آمریکا بین سال‌های ۱۹۸۷ تا ۱۹۹۱ میزان شیوع آن را ۱۱/۳ مورد در هر صد هزار نفر اعلام نمودند [۲۸، ۷]. در ایران نیز میزان شیوع این سرطان را طی سال‌های

سرطان یک مشکل اصلی سلامتی در تمام دنیاست و شمار مبتلایان به آن روز به روز بیشتر می‌شود. یکی از شایع‌ترین انواع سرطان، سرطان‌های سر و گردن هستند. شیوع این سرطان‌ها در کشورهای مختلف

۱۳۸۱ تا ۱۳۸۲، ۱۳/۵ درصد برآورد کرده‌اند [۱۰]. سرطان‌های سر و گردن در دهان، لب، بینی، سینوس‌ها، حنجره و گلو بروز می‌کنند و بیش از ۹۰ درصد آنها از نوع کارسینومای سلول سنگفرشی<sup>۱</sup> هستند که از بافت پوششی منشا می‌گیرند [۱۴].

سرعت تکثیر زیاد، مقاومت به آپوپتوز و تغییرات مورفولوژیک ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی هستند. سلول‌های طبیعی تولید و ترشح فاکتورهای رشد را به طور دقیق کنترل می‌کنند. فاکتورهای رشد مسئول تنظیم رشد و تکثیر سلولی هستند و از این طریق هومئوستاز سلولی و ساختار بافت طبیعی را حفظ می‌کنند. در سلول‌های سرطانی تنظیم این سیگنال‌ها به هم می‌ریزد و در نتیجه هومئوستاز سلولی از بین می‌رود [۱۲].

سلول‌های بنیادی سرطانی ابزاری مهم جهت طراحی، آزمایش و تولید داروهای ضد سرطان جدید هستند. این سلول‌ها هستند که باعث رشد تومور و مهاجرت آن می‌شوند. از این رو، یکی از اهداف درمانی سرطان، تولید داروهایی است که بتوانند این جمعیت سلولی کوچک در تومور را مورد هدف قرار دهند. مصرف گسترده داروهای ضد سرطان رایج باعث ایجاد مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی شده است و مساله مهم‌تر اینکه بسیاری از داروهای ضد سرطان رایج، روی سلول‌های طبیعی بدن نیز اثر کشندگی دارند. بنابراین، بهترین راه حل برای درمان سرطان، یافتن داروهای جدیدی است که سلول‌های بنیادی سرطانی را بدون اینکه بر سلول‌های بنیادی طبیعی اثر بگذارند هدف قرار می‌دهند [۹]. از این رو، کاهش اثرات سمی داروهای شیمیایی بر سلول‌های سالم یکی از اهداف محققین برای سنتز داروهای

جدید است تا ضمن حفظ و افزایش اثر کشندگی بر سلول‌های سرطانی، کمترین اثر را بر بافت‌های سالم فرد بیمار بگذارند. داروهای گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی به سبب عوارض جانبی اندکی که دارند یکی از گزینه‌های درمانی مورد توجه برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند. یکی از عوامل آسیب رسان اصلی در سرطان استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد است و از آنجا که بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشند. گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* گیاه بوته‌ای معطر با برگ‌های سوزنی شکل است که در بیشتر مناطق دنیا از جمله نواحی مختلف ایران پرورش داده می‌شود. بخش دارویی گیاه، برگ و سرشاخه‌های گلدار آن است که در فصل بهار و تابستان جمع آوری می‌شوند [۳۰]. اسانس این گیاه به تناسب محل رویش آن، دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی است. مهمترین ترکیبات آن کامفن، لیمونن، بورنئول، سینئول، لینالول و ربینول است. از جمله فلاونوئیدهای آن دیزومتین، دیزومین و لوتئولین می‌باشد. همچنین اسانس این گیاه دارای ترکیبات فنلی کافئیک، کلروژنیک، تئوکلروژنیک، لابیاتیک اسید و نیز دارای مقدار زیادی سالیسیلات است. تریترپنویدهای این اسانس گیاه شامل تریترین اولئانولیک اسید، کارنوزیک اسید و دی‌ترین آن به نام کارنوزول است [۶]. در طب سنتی از این گیاه به عنوان ضد آسم، هضم کننده غذا، آرام بخش، برطرف کننده سردرد، برطرف کننده اختلالات گردش خون، افزایش دهنده قدرت بینایی، ضد رماتیسم و محرک حافظه استفاده می‌شود [۵]. اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، کاهش سندرم محرومیت به مرفین و مهار سمیت

<sup>1</sup> Squamous Cell Carcinoma (SCC)

محلول تا زمان استفاده در درمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### جداسازی و کشت سلول‌های پیش‌ساز عصبی موش سوری

بدین منظور یک موش سوری باردار ۱۷ روزه نژاد Balb/c آسان‌کشی شد. جنین‌ها تا حد امکان در شرایط استریل از رحم خارج شدند و پس از شستشو با بافر فسفات سالین (PBS)، سر آنها جدا شد. سپس مغزها خارج و کورتکس مغزها جدا گردید و پس از چندین بار شستشو با PBS، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول Trypsin/ EDTA انکوبه شدند. پس از چند بار پیست کردن، با مش‌های ۴۰ و ۷۰ میکرومتری فیلتر شدند و سوسپانسیون بافتی پس از اضافه کردن محیط کشت، با دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و به پلت سلولی تشکیل شده ۵ میلی لیتر محیط کشت (DMEM (Gibco, USA) (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰٪ FBS و پنی‌سیلین و استرپتومایسین ۱٪، اضافه شد و به عنوان کشت سلول اولیه در فلاسک کشت در شرایط ۵٪ CO<sub>2</sub>، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

### تشکیل نوروسفر

بعد از اینکه سلول‌های پیش‌ساز عصبی از مغز جنین‌ها جدا شدند حدود  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> سلول در هر چاهک از ظروف کشت شش‌خانه غیر چسبنده (باکتریایی) به مدت ۲ تا ۴ روز همراه با محیط کشت کامل انکوبه شدند تا نوروسفر تشکیل گردد.

کبدی برای این گیاه گزارش شده است [۱۳، ۱۷، ۲۱، ۲۶]. برای سلول درمانی به تعداد زیادی سلول نیاز است از این رو استفاده از عواملی که سرعت تکثیر سلولی و همچنین بقاء سلولی را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌دهند حائز اهمیت است. گزارشاتی وجود دارد مبنی بر اینکه رزماری تکثیر سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهد [۱۶]. از این رو با توجه به اثر ضد سرطانی گزارش شده برای رزماری و همچنین اثر تقویت‌کنندگی و محافظت‌کنندگی آن روی حافظه، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی و مقایسه اثر عصاره آبی الکلی گیاه رزماری بر بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی رده HN5 و سلول‌های پیش‌ساز عصبی می‌باشد.

### مواد و روش کار

#### تهیه عصاره آبی الکلی رزماری

رزماری از یکی از عطاری‌های معتبر سطح شهر تهیه و پس از تایید توسط کارشناس مرکز هرباریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه، آسیاب شد. ۱۰۰ گرم از پودر رزماری به نسبت ۱ به ۱ با اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به وسیله پارچه نخی و بعد از آن کاغذ صافی، صاف شد. مایع صاف شده در روتاری تغلیظ و سپس در آون یک شب قرار داده شد تا خشک شود. برای تهیه غلظت‌های مورد آزمایش، مقدار لازم از عصاره وزن و در سرم فیزیولوژی بافر فسفات (PBS) حل شد و سپس با محیط کشت به حجم مناسب رسانده شد. فیلتراسیون محلول عصاره به کمک فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر انجام و

### کشت و پاساژ سلولی

سلول‌های سرطانی سر و گردن رده HN5 از مؤسسه پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ (Gibco, USA) FBS کشت و در انکوباتور (شرکت سینا، ایران) با ۵٪ CO<sub>2</sub>، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C نگهداری شدند. پس از اینکه حدود ۸۰٪ کف فلاسک توسط سلول‌ها پر شد، سلول‌های HN5 با استفاده از تریپسین پاساژ داده شدند.

### بررسی مورفولوژیکی

برای بررسی و مقایسه مورفولوژیکی سلول‌ها، در هر کدام از دو نوع سلول، از گروه کنترل (تیمار نشده) و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ اینورت با عدسی شیئی ۲۰ عکس گرفته شد و تصاویر میکروسکوپی برای هر سلول در گروه‌های کنترل و تیمار بررسی و مقایسه شدند.

### بررسی تغییرات هسته سلول‌های سرطانی با

#### رنگ‌آمیزی DAPI

به منظور ارزیابی تغییرات هسته سلول‌های HN5، این سلول‌ها در محیط کشت حاوی غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر عصاره رزماری به مدت ۷۲ ساعت کشت شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج گردید. سلول‌ها با PBS شسته و با پارافمالدهید ۴٪ تثبیت شدند و با استفاده از رنگ DAPI (Sigma, USA) 300nM رنگ‌آمیزی شدند. هسته‌های چروکیده، قطعه قطعه شده و با شدت فلورسانس بالا به عنوان هسته سلول‌های آپوپتوز شده گزارش گردید.

### آزمون MTT

بقا دو نوع سلول تیمار شده با غلظت‌های مختلف رزماری، با کمک آزمون MTT Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-3-(4,5-Diphenyltertrazolium Bromide) سنجیده شد. ابتدا، سلول‌های سرطانی با تعداد حدود 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> و سلول‌های پیش‌ساز عصبی با تعداد 10<sup>4</sup> نوروسفر در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی حاوی محیط کشت مرسوم کشت شدند. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی الکلی رزماری به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. برای هر سلول یک گروه کنترل هم در نظر گرفته شد که تیمار نشدند. سپس آزمون MTT به صورت زیر انجام شد. به این صورت که در زمان‌های مورد نظر، محیط کشت از چاهک‌های حاوی سلول خارج و به هر خانه حدود ۱۰۰ μl محیط تازه حاوی ۱۰ μl محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد، سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و سپس محلول MTT خارج و به هر چاهک ۱۰۰ μl DMSO (Merck, USA, 100%) اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotek، آلمان) اندازه‌گیری شد.

### بررسی آماری

داده‌های حاصل از آزمون MTT، با کمک نسخه ۱۸ نرم‌افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون آماری (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. نمودارهای لازم با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)

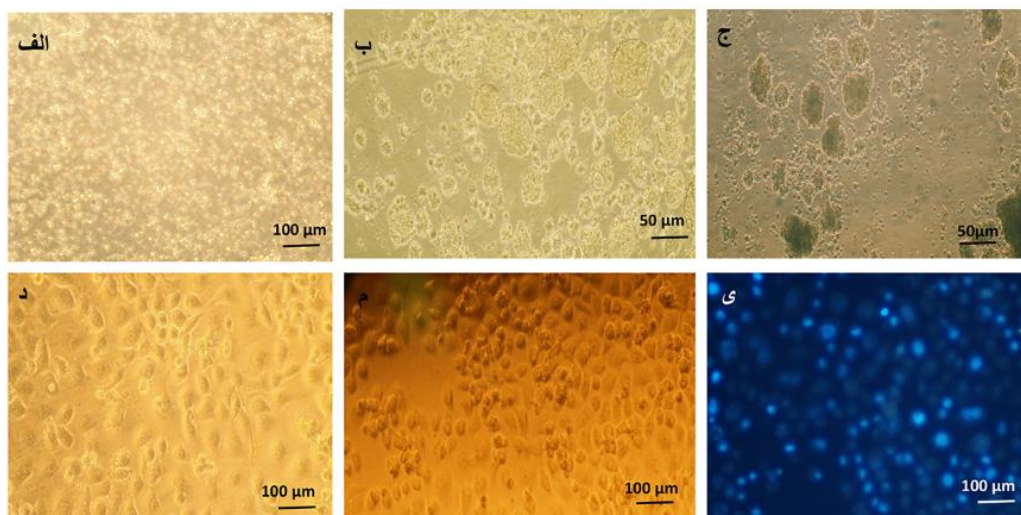
نوروسفر تشکیل دادند. در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات مورفولوژی محسوسی در نوروسفرهای تیمار شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در طی سه روز مشاهده نشد اما در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تغییرات مورفولوژیکی محسوسی شامل تیرگی، چروکیدگی و متلاشی شدن نوروسفرها در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده گردید. با این حال در مقایسه با سلول‌های سرطانی میزان تغییرات مورفولوژی مشاهده شده در سلول‌های پیش ساز عصبی کمتر بود همچنین تغییرات هسته در سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم رزماری در روز سوم با رنگ آمیزی دپی نشان‌دهنده چروکیدگی و پیگمانته شدن هسته و قطعه قطعه شدن کروماتین، نشانه‌ای از تغییرات مورفولوژیک و در نتیجه نشانه‌هایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی HN5 می‌باشد (تصویر ۱).

(USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### مورفولوژی سلولی

مشاهده مورفولوژی سلول‌ها زیر میکروسکوپ اینورت نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رزماری، تعدادی از سلول‌های سرطانی تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل کروی و چروکیده و کوچک شدند و هسته آنها چروکیده و خرد شد که به تدریج با افزایش غلظت عصاره و زمان تیمار تعداد سلول‌های تغییر یافته بیشتر شد. به طوری که در دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت تعداد بیشتری از سلول‌ها تغییر کردند. شایان ذکر است که غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر رزماری تغییرات مورفولوژی خاصی بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با نمونه کنترل نداشت. سلول‌های پیش‌ساز عصبی ۷۲ ساعت بعد از کشت در ظروف باکتریایی

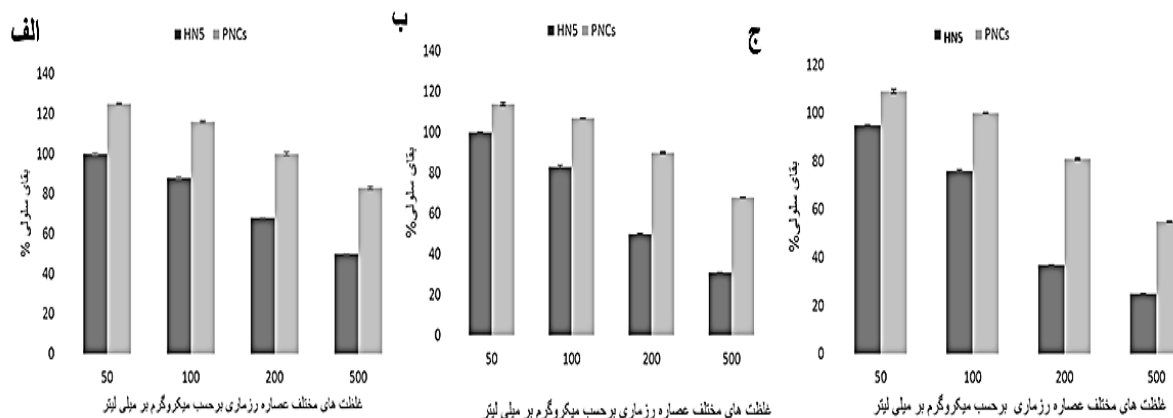


تصویر ۱- مورفولوژی سلول‌ها: الف) سلول‌های پیش ساز عصبی استخراج شده از کورتکس جنین موش سوری ۱۷ روزه ب) تشکیل نوروسفر توسط سلول‌های پیش ساز عصبی بعد از سه روز، ج) سلول‌های پیش ساز عصبی ۷۲ ساعت بعد از تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره رزماری، د) سلول‌های HN5 (کنترل)، م) سلول‌های HN5 ۷۲ ساعت بعد از تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره رزماری و ی) هسته رنگ‌آمیزی شده سلول‌های HN5 با رنگ DAPI بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره رزماری

## بقا زیستی

ارزیابی میزان بقا سلولی در دو نوع سلول نشان داد که رزماری در غلظت‌های پایین (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نه تنها روی سلول‌های پیش‌ساز عصبی اثر کشندگی نداشت بلکه تکثیر آنها را افزایش داد ( $P < 0/05$ )، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۲۴ ساعت پس از تیمار، روی این سلول‌ها اثر کشندگی نداشت ولی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بقا سلولی را کاهش داد ( $P < 0/05$ ) و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هر سه زمان بقا سلول‌ها را کاهش داد که در زمان ۷۲ ساعت بیشترین اثر کشندگی را داشت ( $P < 0/05$ ). در

مقابل، رزماری در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقا سلول‌های سرطانی را در هر سه زمان کاهش داد ( $P < 0/05$ ) ولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هیچ کدام از زمان‌ها اثر کشندگی نداشت ( $P > 0/05$ ). مقایسه میزان بقا بین دو نوع سلول نشان داد که رزماری در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقا سلول‌های سرطانی را در مقایسه با سلول‌های پیش‌ساز عصبی در هر سه زمان کاهش داد ( $P < 0/05$ ) و بیشترین اثر کشندگی آن در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار بود ( $P < 0/05$ ) (تصویر ۲).



تصویر ۲- اثرات غلظت‌های مختلف عصاره رزماری بر بقای سلول‌های HN5 و پیش‌ساز عصبی (PNCs) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با روش MTT (انجام شد. الف) ۲۴ ساعت بعد از تیمار (ب) ۴۸ ساعت بعد از تیمار (ج) ۷۲ ساعت بعد از تیمار.

## بحث

بالا بقا آنها را کاهش داد. لازم به ذکر است که اثر کشندگی عصاره با افزایش غلظت و زمان در هر دو نوع سلول افزایش یافت. تاکنون مطالعات زیادی در شرایط آزمایشگاهی و به میزان محدودتر در مدل‌های حیوانی، اثر ضد سرطانی عصاره رزماری یا ترکیبات آن را نشان

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد سلول‌های سرطانی در همه غلظت‌های عصاره و در همه زمان‌ها کمتر از سلول‌های پیش‌ساز عصبی بود. همچنین، عصاره رزماری در غلظت‌های پایین تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی را افزایش داد در حالی که در غلظت

تنظیم می‌کند افزایش می‌دهد. مور و همکاران همچنین نشان دادند که عصاره رزماری فعال شدن مسیر سیگنالینگ AKt/mTOR/p70s6K را مهار می‌کند که در نتیجه باعث کاهش قابل توجه تکثیر و بقا سلولی می‌شود [۱۸].

در مطالعات زیادی نشان داده شده است که عصاره رزماری بقا سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد که به صورت افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی گزارش شده است. تیمار سلول‌های سرطانی کولون، پانکراس، پستان و ریه با عصاره رزماری باعث افزایش کلیواژ پلی ADP ریبوز پلیمراز (PARP) می‌شود که نشان دهنده افزایش آپوپتوز است [۱۷]. عصاره رزماری باعث افزایش تولید نیتریک اکسید و فاکتور نکروز دهنده توموری در سلول‌های سرطانی پانکراس و کبد می‌شود که نشان دهنده افزایش مرگ سلولی و آپوپتوز وابسته به نیتریک اکساید است. در سلول‌های سرطانی تخمدان افزایش آپوپتوز با افزایش بیان ژن پروتئین‌هایی مانند سیتوکروم C و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (hsp70) همراه بود که به ترتیب در زنجیره انتقال الکترون و چین خوردگی پروتئین و حفاظت سلول از استرس حرارتی و مواد شیمیایی سمی نقش دارند [۱۵، ۲۲]. همچنین رزماری با افزایش بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند Bax و کاسپاز ۳ آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کرده است [۲۳، ۲۹].

مطالعات متعددی القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون را نشان داده اند که جابجاشدن فاکتور شماره ۲ وابسته به فاکتور هسته‌ای اریترئید شماره ۲ (Nrf2) به هسته و القا فعالیت p38 MAPK و PERK در آن نقش دارد. مسیر سیگنال دهی Nrf2/ARE در محافظت از سلول‌ها در برابر سرطان زایی مورد توجه

داده‌اند. در بررسی‌های آزمایشگاهی مختلف، اثرات ضد سرطانی آن روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی کولون، پانکراس، پستان، پروستات، ریه، مثانه، کبد و لوکمی بیان شده است و اثرات ضد سرطانی آن را به صورت کاهش تکثیر و بقا سلولی و القا آپوپتوز به صورت وابسته به دوز و زمان نشان داده‌ند [۱۷].

در شرایط درون تنی نیز با استفاده از مدل‌های حیوانی اثرات ضد سرطانی آن را گزارش کرده‌اند که به برخی از آنها اشاره می‌شود. تجویز خوراکی عصاره رزماری از طریق افزودن آن به آب آشامیدنی، اندازه تومور کولون را در موش‌های سوری کاهش داده است [۱۱]. همچنین خوراندن عصاره حل شده در روغن به موش‌های صحرایی سرطانی شده به مدت ۴ هفته اندازه تومور کولون را نسبت به گروه کنترل کاهش داد [۲۹]. آنالیز بیوشیمیایی سرم در موش‌های نژاد اسپراگ داوولی تیمار شده با غلظت‌های کم و زیاد عصاره رزماری نشان داد که عصاره با تغییر قابل توجه سیگنالینگ ژن و پروتئین و تجمع سلول‌های لنفوییدی اثر ضد سرطانی قابل توجهی داشت [۲]. همچنین اندازه تومور پروستات را در موش سوری سرطانی شده بعد از ۲۲ روز کاهش داد [۲۳].

در رابطه با اثر ضد سرطانی عصاره رزماری چندین مکانیسم ذکر شده است. عصاره رزماری در رده سلول سرطانی لوکمی، بیان mRNA و پروتئین AKT1 را مهار می‌کند. این پروتئین در مسیر سیگنالینگ بقای PI3K/Akt در این رده سلولی نقش دارد. توقف چرخه سلولی مانع از تکثیر بیشتر سلول می‌شود و عصاره رزماری می‌تواند چرخه سلولی را در تعدادی از سلول‌های سرطانی متوقف کند و ژن شماره ۲ وابسته به رتینوبلاستوما که ورود به چرخه سلولی را

سلول‌های پیش‌ساز چند کاره‌ای هستند که قادر به خودتجدیدی هستند و می‌توانند به انواع مختلف سلول‌های سیستم عصبی شامل نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها تمایز یابند [۱۹].

در مطالعه حاضر عصاره رزماری به صورت وابسته به دوز تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی را افزایش داد. به طوری که بیشترین اثر تکثیر کنندگی آن در غلظت ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر بود و با افزایش غلظت اثر تکثیر کنندگی آن کاهش یافت. در مطالعه‌ای مشابه، عبدانی پور و همکاران اثر غلظت‌های مختلف عصاره بهار نارنج را روی تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی بررسی کردند و اعلام نمودند که بهار نارنج تکثیر این سلول‌ها را به صورت وابسته به دوز افزایش داد به طوری که بیشترین اثر تکثیر کنندگی آن در غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و در غلظت‌های بیشتر و کمتر از این دوز اثر تکثیر کنندگی آن کمتر بود [۱].

یکی از ترکیبات مهم موجود در عصاره رزماری، کارنوزیک اسید است که تولید فاکتور رشد عصبی را در سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسان افزایش داده است [۱۶]. فاکتور رشد عصبی یکی از فاکتورهای حیاتی برای رشد و عملکرد بافت عصبی است. از آنجایی که رزماری باعث تحریک تولید فاکتور رشد عصبی می‌شود، احتمال می‌رود تکثیر سلولی را در مطالعه حاضر با این مکانیسم افزایش داده باشد. دلیل دیگری که برای اثر تکثیر کنندگی عصاره رزماری می‌توان مطرح کرد این است که بر اساس مطالعه الغلام و همکاران (۲۰۱۶) مبنی بر اینکه عصاره رزماری توانسته است نورون‌های حرکتی نخاع نوزاد موش‌های صحرائی را در برابر سمیت آکریلامید محافظت کند [۳]، احتمال می‌رود رزماری به واسطه خاصیت آنتی

است و ایجاد سرطان را از طریق ختشی کردن گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) و عوامل سرطانزا کاهش می‌دهد و عصاره رزماری بیان پروتئین‌های این مسیر مانند سستین ۲ و هم اکسیژناز ۱ را در سلول‌های سرطانی کولون افزایش می‌دهد. به طور کلی ارزیابی مطالعات انجام شده مشابه نشان می‌دهد که اثرات ضد سرطانی عصاره رزماری عمدتاً از طریق القا آپوپتوز است [۱۷].

آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که رادیکال‌های آزاد آسیب رسان را از بین می‌برند و از این راه سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو DNA و مرگ حفاظت می‌کنند. اثر آنتی اکسیداتیو عصاره رزماری در سلول‌های سرطانی کولون، پستان و لوکمی نشان داده شده است [۲۴، ۲۵]. درمان‌های ضد سرطان رایج باعث مرگ یا آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شوند. ویژگی‌های آنتی اکسیداتیوی که عصاره رزماری دارد ویژگی محافظت کننده بالقوه آن را نشان می‌دهد که می‌تواند مراحل شروع و پیشرفت سرطان را هدف قرار دهد. اثر آنتی اکسیدان‌ها در راستای برگرداندن DNA آسیب دیده به وضعیت طبیعی و حفاظت سلول از آسیب بیشتر است. بنابراین از جهش سلول و تبدیل آن به سلول سرطانی و در نتیجه تشکیل تومور جلوگیری می‌کند [۱۷].

سلول‌های بنیادی عصبی نقشی اساسی در تکامل سیستم عصبی جنینی دارند و در افراد بالغ هم قابلیت خودتجدیدی این سلول‌ها در اعمالی چون یادگیری، حافظه و پاسخ به آسیب‌های عصبی می‌تواند اثر گذار باشد [۲۷]. طی سال‌های اخیر این سلول‌ها جهت بررسی تکامل سیستم عصبی و هم چنین به عنوان عاملی بالقوه در درمان بیماری‌های تخریب کننده عصبی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها،



- [2]. Ahmad, H.H.; Hamza, A.H.; Hassan, A.Z.; Sayed, A.H., 2013. Promising therapeutic role of *Rosmarinus officinalis* successive methanolic fraction against colorectal cancer. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*; 5: 164-170.
- [3]. Al-Gholam MA, Nooh HZ, El-Mehi AE, El-Barbary Ael-M, Fokar AZ. 2016. Protective effect of rosemary on acrylamide motor neurotoxicity in spinal cord of rat offspring: postnatal follow-up study. *Anat Cell Biol.* ; 49 (1):34-49.
- [4]. Alexandrov, K.; Rojas, M.; Rolando, C. 2006. DNA damage by benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res*, 66, 11938-11945
- [5]. Chandler F. 1995. Memory stimulate: herbal medicine. *Can. Pharm. J.*; 28: 40-53.
- [6]. Dermarderosian A. 2001. *The Review of Natural Products*. First ed. Missouri: Wolters Kluwer Co.; 512-13.
- [7]. Douglas E, Peterson JA, Ambrosis D. 1994. Nonsurgical management of head and neck cancers patients. *Dent Clin of North Am*; 38 (3): 425-445.
- [8]. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M and Tozeren A. 2006. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular Cancer*.; 5:55. doi:10.1186/1476-4598-5-55.
- [9]. Ganz PA. 2009. Survivorship: adult cancer survivors. *Prim Care*; 36(4):721-741.
- [10]. Ghapanchi J, Mortazavi M, Parhiz H. 2004. Analytic Evaluation of the Prevalence of Head and Neck Cancers among Patients with Different Kinds of Cancers Visited in Radiotherapy Department of Nemazee Hospital, 2003-2004. *Shiraz Univ. Dent. J.*; 5(1, 2): 97-105.
- [11]. González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Zarza V, Martín-Hernández R, et al. 2014. Expression of MicroRNA-15b and the Glycosyltransferase GCNT3 Correlates with Antitumor Efficacy of Rosemary Diterpenes in Colon and Pancreatic Cancer. *PLoS ONE*; 9: e98556.
- [12]. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*.; 144: 646-674.

اکسیدانی که دارد توانسته است سلول‌های عصبی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو حفظ کند و از این طریق مرگ سلولی را کاهش و بقا سلولی را افزایش داد.

در رابطه با تفاوت اثر عصاره رزماری روی سلول‌های سرطانی و سالم علاوه بر وابسته بودن اثر عصاره رزماری به دوز و نوع سلول، باید به این نکته نیز اشاره شود که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت مسیرهای سیگنال دهی و متابولیسمی بین سلول‌های سرطانی و سالم باشد. همانگونه که ارتل و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که سنتز ATP، چرخه سلولی، فسفوریلاسیون اکسیداتیو، متابولیسم پورین، پیریمیدین و پیرووات و پروتئازوم و همچنین سرعت متابولیسم نوکلئوتید و تولید RNA در لاین‌های سلولی سرطانی در مقایسه با سلول‌های توموری و سلول‌های سالم همان بافت افزایش می‌یابد. بیان مسیرهای سیگنالینگ که در چسبندگی و ارتباط سلول‌های سرطانی کشت شده نقش دارند در مقایسه با سلول‌های سالم کاهش می‌یابد [۸].

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی الکلی رزماری به صورت وابسته به دوز و زمان، بقا سلول‌های سرطانی سر و گردن را کاهش داد در حالی که در غلظت‌های پایین روی سلول‌های پیش‌ساز عصبی نه تنها اثر کشندگی نداشت بلکه تکثیر آنها را افزایش داد و باید این نکته را نیز در خاطر داشت که اثرات عصاره رزماری به نوع سلول هم بستگی دارد.

#### منابع

- [1]. Abdanipour AR, Shadman B, Salimi Nanehkar F, Bonabi R, Norian A. 2014. In Vitro evaluation of hydroethanolic extracts of citrus aurantium on proliferative rate of NSCs. *J Babol Univ Med Sci*; 16 (7): 36-40.

- [13]. Hosseinzadeh H, Nourbakhsh M. 2003. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother. Res.*; 17:938-41.
- [14]. Irish JC, Bernstein A. 2000. Oncogenes in head and neck. *Cancer Laryngoscope*; 103: 42-52.
- [15]. Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, et al. 2013. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.*; 136: 120-129.
- [16]. Kosaka K, Yokoi T. 2003. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*; 26:1620-2.
- [17]. Moore J, Megaly M, MacNeil AJ, Klentrou P, Tsiani E. 2016. Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*; 83:725-732.
- [18]. Moore J, Yousef M, Tsiani E. 2016. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients*; 8:731. doi:10.3390/nu8110731.
- [19]. Okano H. 2010. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*; 86:438-50.
- [20]. Okumura N, Yoshida H, Nishimura Y, Kitagishi Y, Matsuda S. 2012. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncol. Lett.*; 3:321-324.
- [21]. Ozcan M. 2003. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *J. Med. Food.*; 6:267-270.
- [22]. Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. 2007. Supercritical Fluid Extracts of Rosemary Leaves Exhibit Potent Anti-Inflammation and Anti-Tumor Effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 71:2223-2232.
- [23]. Petiwala SM, Berhe S, Li G, Puthenveetil AG, Rahman O, Nonn L, Johnson JJ. 2014. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extract Modulates CHOP/GADD153 to Promote Androgen Receptor Degradation and Decreases Xenograft Tumor Growth. *PLoS ONE*; 9: e89772.
- [24]. Shabtay A, Sharabani H, Barvish Z, Kafka M, Amichay D, Levy J et al. 2008. Synergistic Antileukemic Activity of Carnosic Acid-Rich Rosemary Extract and the 19-nor Gemini Vitamin D Analogue in a Mouse Model of Systemic Acute Myeloid Leukemia. *Oncology*; 75:203-214
- [25]. Slamenova D, Kuboskova K, Horvathova E, Robichova S. 2002. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Lett.*; 177:145-153.
- [26]. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. 2002. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol.*; 81:145-154.
- [27]. Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. 2006. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J Neurochem*; 97:69-78.
- [28]. Wood NK, Goaz PW. 1997. Differential diagnosis of oral and maxillofacial lesions. 5th ed., Mosby Com.; 587-593.
- [29]. Yan M, Li G, Petiwala SM, Householter E, Johnson JJ. 2015. Standardized rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract induces Nrf2/sestrin-2 pathway in colon cancer cells. *J. Funct. Foods*; 13: 137-147.
- [30]. Zargari A. 1990. Herbal medicines. Tehran University publication center., 4<sup>th</sup> edition, 71-76 (In Persian).

