

بررسی اثر عصاره رزماری در بیان ژن BAX و BCL-2 در رده سلول سرطانی غدد پستانی سگ (CF41.Mg)

سمانه شبانی^۱، پژمان مرتضوی^{۲*}

چکیده

آپوپتوزیس به مرگ برنامه‌ریزی شده ژنتیکی سلول گفته می‌شود که در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش مهمی ایفا میکند. پروتئین BAX به عنوان یک پروتئین کلیدی در آپوپتوز الفاء شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل نموده و BCL-2 یک اثر آنتی آپوپتوتیک در پاسخ به محرک‌های مختلف آپوپتوز از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری، دارد.

در مطالعه‌ی حاضر اثر دزهای مختلف عصاره گیاه رزماری بر بیان ژن‌های BCL-2 و BAX بر روی سلول‌های سرطان پستان سگ (CF41.Mg)، در محیط *invitro* مورد بررسی قرار گرفت و با گروه کنترل (که رده‌ی سلولی CF41.Mg بدون دارو بود) مقایسه شد. سلول‌ها با دوزهای ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۵ میکرومولار عصاره گیاه رزماری به مدت ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعت تحت درمان قرار گرفتند. سپس با استفاده از روش MTT، اثر غلظت‌های مختلف عصاره روی حیات سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از روش Real Time PCR میزان بیان ژن‌های BCL2 و BAX در گروه‌های تحت درمان با مقادیر مختلف عصاره رزماری سنجش شد. نتایج نشان دهنده افزایش بیان ژن BAX در دز ۲۵ میکرو مولار پس از ۴۸ ساعت کشت سلولی بود. این نتایج حاکی از آن است که فعالیت ضد توموری این عصاره پس از ۴۸ ساعت و با دز ۲۵ mg/ml موثر تر واقع شده است. نتایج حاصل از این پژوهش تأیید کننده‌ی اثر مهاري عصاره گیاه رزماری بر تکثیر رده ی سلول سرطانی CF41.Mg می‌باشد.

واژگان کلیدی: تومور غدد پستانی سگ، کشت سلول، عصاره گیاه رزماری، BAX، BCL-2

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲

مقدمه

بدن موجود زنده، مجموعه‌ای از سلول‌هایی است که هر کدام وظیفه‌ی خاصی بر عهده دارند. اگر سلولی به صورت غیرقابل کنترل، رشد و تکثیر پیدا کند، مشکلات متعددی برای خود و

دیگر سلول‌ها ایجاد خواهد کرد (۴). سرطان در واقع رشد غیر قابل کنترل سلول است. تکثیر سلولی، منجر به تشکیل توده‌ای موسوم به «نئوپلاسم» یا «تومور» می‌شود که ممکن است با انتشار به محل‌های دورتر به متاستاز منتهی گردد. اساس ایجاد تمام نئوپلاسم‌ها فقدان پاسخ به مهارهای طبیعی رشد و همچنین فقدان کنترل چرخه‌ی سلولی است (۲).

در جوامع انسانی، سرطان پستان یکی از شایع‌ترین و کشنده-ترین بیماری‌ها در زنان است. این بیماری بعد از سرطان ریه، مهم‌ترین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان می‌باشد (۴). در سگ‌سانان نیز تومورهای غدد پستانی، شایع‌ترین تومورها از بین انواع تومورها بعد از تومورهای پوستی هستند. شیوع این تومور در سگ‌ها سه برابر انسان‌ها است (۱۱).

سگ و انسان تا حدودی شباهت ژنومی دارند؛ بنابراین می‌توان از سگ جهت بررسی بیماری‌های مونوژنیک و پیچیده‌ی ژنتیکی به عنوان یک مدل استفاده کرد (۱۱).

یکی از فاکتورهایی که در بروز سرطان نقش دارد، آسیب ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد در سلول‌هاست. از طرفی مصرف گسترده‌ی داروهای رایج ضدسرطان از قبیل تاکسان و آنتراسیکلین‌ها موجب ایجاد مقاومت‌های درمانی نیز می‌شود به طوری که سایر گزینه‌های درمانی را محدود می‌کنند. در حال حاضر یکی از روشهای رایج درمانی در ارتباط با سرطان غدد پستانی سگ، روش جراحی برداشت غدد پستانی درگیر (Mastectomy) می‌باشد (۱۱).

شواهد قابل ملاحظه‌ای که از مطالعات شیمیایی و تحقیقات کشت سلول به‌دست آمده است نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها

۱- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲* - دانشیار گروه پاتولوژی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (sp.mortazavi@gmail.com)

رده سلولی سرطانی در محیط کشت DMEM که محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی همراه با ۱۰۰ میکرولیتر جتتامایسین بود، کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، ۹۵٪ هوا، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه قرار داده شده و محیط کشت سلول‌ها بر حسب نیاز و به طور میانگین هر سه روز یکبار تعویض و زمانی که به ۸۵٪ هم بارزی (confluency) رسید پاساژ داده شد.

۳- تیمار رده‌ی سلولی با غلظت‌های مختلف عصاره رزماری سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با دانسیته سلولی ۳۰۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر (که بر اساس رنگ سنجی با تریپان بلو و شمارش در لام هموسیستمتر انجام گرفت)، کشت داده شده و در دو گروه کلی شامل گروه کنترل بدون اضافه کردن هیچ دارویی در سه بازه ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعت و گروه تیمار با عصاره رزماری با پنج دوز ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۵ میکرومولار در سه بازه ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند (۳).

۴- بررسی کمیت سلول‌ها به روش MTT assay

به منظور ارزیابی اثر مهارتی عصاره رزماری روی زیست‌پذیری سلول‌های CF41.Mg از آزمون MTT استفاده شد. جهت انجام این آزمایش، محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت هر خانه پلیت اضافه شد و ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس محیط خارج و رسوب در ایزوپروپانول حاوی ۰/۸ درصد HCL حل و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. در نهایت درصد سلول‌های زنده با فرمول: نسبت ODexp به ODcon ضرب در ۱۰۰، محاسبه گردید. ODexp و ODcon به ترتیب جذب نوری گروه مواجه یافته و گروه کنترل است. میزان جذب به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است.

۵- آزمایشات RT PCR و Real Time PCR

برای فهم مکانیسم‌های درگیر در القای مرگ سلولی، به ترتیب پس از زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، RNA آن‌ها طبق

ممکن است در پیشگیری‌های اولیه، بروز سرطان را کند نمایند، یا احتمالاً از بروز آن جلوگیری کنند (۲).

اثرات مختلف ضدتوموری از قبیل القای آپوپتوز، ضد رگزایی، القای تمایز سلولی همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تغییر متابولیسم کارسینوژنی در عصاره گیاه رزماری مشاهده شده است (۱۰ و ۳). با توجه به نقش مهم آنتی‌اکسیدان‌ها در تنظیم و کنترل تومورها و البته خواص درمانی آنها و اینکه بیشتر تحقیقات پیرامون تاثیر این مواد در انسان بوده است و همچنین مطالعه ای مبنی بر اثر گیاه رزماری روی سلول‌های سرطانی پستان سگ و بیان ژنهای BCL2 و BAX صورت نگرفته است، این تحقیق سعی دارد به بررسی اثر عصاره رزماری در سرطان پستان سگ که نسبت به سایر سرطان‌ها در این حیوان شایع تر است بپردازد. در این تحقیق از رده سلولی سرطانی غدد پستانی سگ و کشت آن بهره گرفته شده است.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده و کلیه مراحل کار در آزمایشگاه کشت سلول دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفته است. مراحل کار بطور خلاصه به شرح زیر می‌باشد.

۱- تهیه گیاه و عصاره گیری

ابتدا پس از جمع آوری برگ گیاه رزماری (که از عطاریهای سطح شهر تهران انجام گرفت)، آنها را خشک نموده و با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ به نسبت ۱۰ به ۱ عصاره‌گیری صورت گرفت (۳).

۲- کشت و پاساژ رده‌ی سلولی

رده سلولی سرطان غدد پستانی سگ CF41.Mg از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. محیط کشت DMEM (high glucose) بر اساس دستور تهیه شرکت سازنده (sigma) ساخته شد و محلول ۲۵٪ Tripsin-EDTA جهت پاساژ سلول آماده گردید.

ژنهای BCL2 و BAX انتخاب گردید و به منظور اعتبار سنجی آزمون، از ژن کنترل S26 (که در تمام سلولها بیان می گردد) استفاده گردید. بدین منظور، از پرایمرهای جدول ۱ در آزمون RT-PCR استفاده شد.

دستور العمل رایج، استخراج گردید (۷). سپس مراحل تبدیل RNA به cDNA، انجام گرفت. جهت تبدیل RNA به cDNA از کیت RevertAid First Strand Synthesis Kit (Thermo) استفاده شد. پس از سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژنهای درگیر در آپوپتوز،

جدول ۱- ترادف نوکلئوتیدی مورد استفاده برای بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه که از بانک ژن NCBI استخراج گردیده است.

پرایمر	ترادف (5' → 3')	اندازه باند
S26	Forward: CGTGCTTCCCAAGCTGTACGTGA Reverse: CGATTCCGGACTACCTTGCTGTG	75 bp
BAX	Forward: TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT Reverse: TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA	79 bp
BCL-2	Forward: CATGCCAAGAGGGAAACACCAGAA Reverse: GTGCTTTGCATTCTTGATGAGGG	76 bp

جدول ۲- محتویات Real time-PCR Master mix به ازای یک نمونه جهت بررسی یک ژن.

ماده	میزان بر اساس میکرو لیتر
Master mix	۱۲/۵
آب مقطر	۸/۵
Forward Primer	۰/۵
Reverse Primer	۰/۵
cDNA	۳
حجم کل	۲۵

طبق دستورالعمل، بعد از تهیه مواد در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر به همراه شاهد مثبت و منفی (شاهد مثبت شامل نمونه استخراج شده از موش صحرایی و در کنترل منفی به جای cDNA، آب مقطر به مواد PCR افزوده شد) به دستگاه Thermo cycler منتقل شد. پس از اتمام کار دستگاه Thermo cycler محصول RT-PCR به روی ژل آگاروز ۱/۵٪ برده شد.

پس از انتقال به دستگاه Thermo cycler طبق برنامه زمانی و دمایی جدول ۳، Real Time PCR انجام شد.

سپس برای بررسی میزان بیان ژنهای مورد نظر از آزمون Real Time-PCR استفاده گردید. در این روش نیز از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و محتویات PCR Master mix طبق جدول ۲ اضافه گردید.

جدول ۳- برنامه زمانی و دمایی آزمون Real Time-PCR برای ژنها

مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
UNG treatment ¹	۵۰ درجه سلسیوس	۲ دقیقه	۱
Initial denaturation and polymerase activation	۹۵ درجه سلسیوس	۲ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵ درجه سلسیوس	۱۵ ثانیه	۴۰-۵۰
Annealing and elongation	۶۰-۶۵ درجه سلسیوس ^۲	۱ دقیقه ^۲	۴۰-۵۰

۱- چرخش تکاملی مرحله ۱ تنها در صورتی لازم است که UNG (اوراسیل-ان-گلیکوزیلاز) تیمار اعمال شود. ۲- دمای اتصال بستگی به درجه ذوب پرایمرها و پروب DNA استفاده شده، دارد. ۳- زمان بسط بستگی به طول قطعه دارد (۱ دقیقه برای قطعه ۵۰۰ جفت باز).

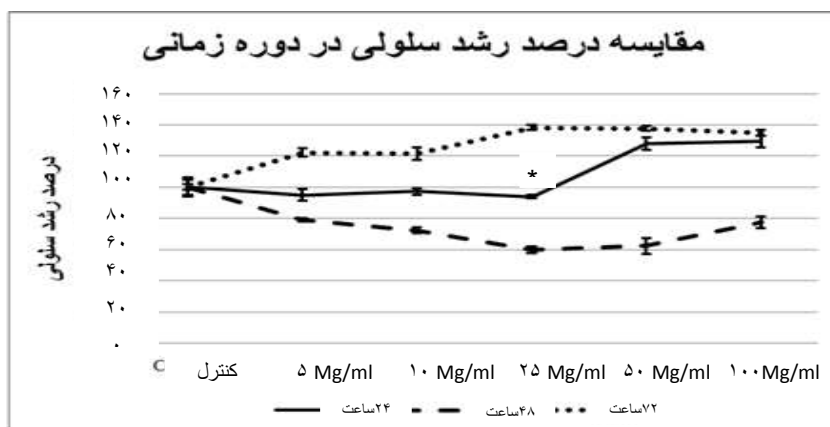
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تائید تست Dunnett و با استفاده از نرم افزار s ۱۸ Spss انجام شد. نمودارها از طریق نرم‌افزار sigmaplat رسم شدند و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

بررسی نتایج MTT

نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره گیاه رزماری توانسته در دزهای مختلف باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شود. نتایج این بررسی در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- مقایسه تاثیر دوزهای مختلف عصاره رزماری در ساعات‌های مختلف کشت در آزمون MTT (*# نشان‌دهنده سطح معنی‌دار در $P < 0/05$ می‌باشد).

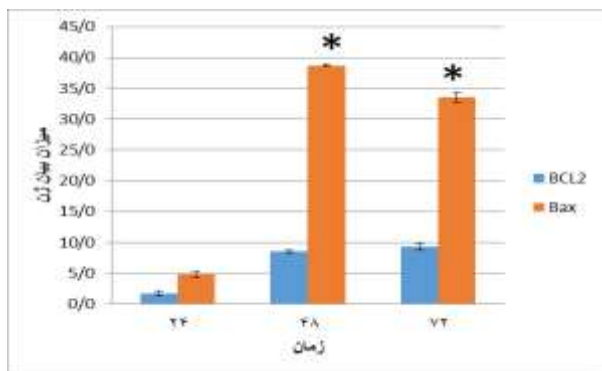


نگاره ۱- بیان ژن‌های BCL2, Bax و S26 در گروه ۲۵ mg/ml در ۴۸ ساعت. C نشان‌دهنده کنترل منفی است.

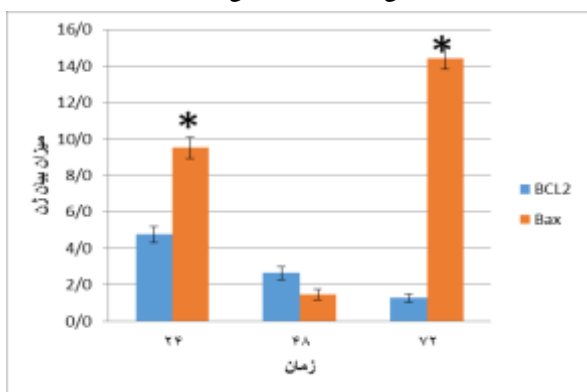
مقایسه درصد رشد سلولی در دوره‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد که عصاره رزماری با دز ۲۵ mg/ml در زمان ۴۸ ساعت بیشتر اثر خود را گذاشته و موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده است.

نتایج آزمون RT-PCR

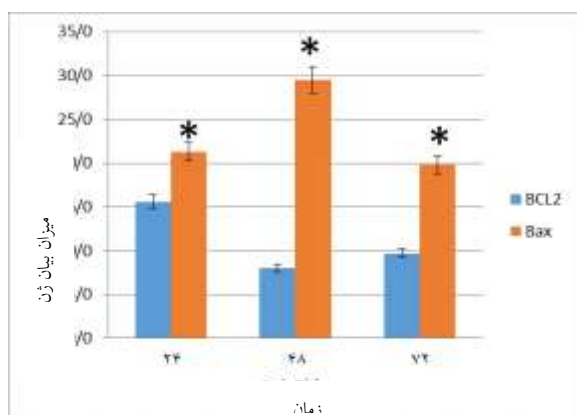
در آزمایش RT-PCR، ژن‌های BCL2 و Bax و S26 در تمام گروه‌های کنترل و درمان تحت مطالعه در ژل آگارز در بالاتر از ۵۰ bp، بیان گردید (نگاره ۱). بنابراین با توجه به بیان ژن‌ها در تمام گروه‌ها، مجبور به استفاده از آزمون Real Time PCR شدیم تا با استفاده از آن به صورت کمی، میزان بیان ژن‌ها در هر کدام از گروه‌های آزمایش مشخص گردد.



نمودار ۴- مقایسه بین میزان بیان ژن BCL2 و Bax در بازه زمانی مختلف در کشت‌های سلولی تحت درمان با دوز ۴ mg/ml (*نشاندنده سطح معنی‌دار در $P < 0.05$ می‌باشد).



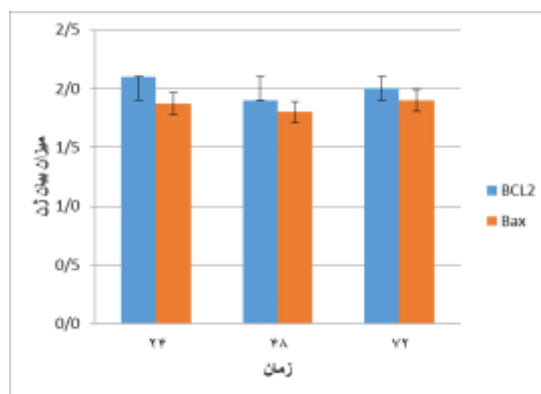
نمودار ۵- مقایسه بین میزان بیان ژن BCL2 و Bax در بازه زمانی مختلف در کشت‌های سلولی تحت درمان با دوز ۵ mg/ml (*نشاندنده سطح معنی‌دار در $P < 0.05$ می‌باشد).



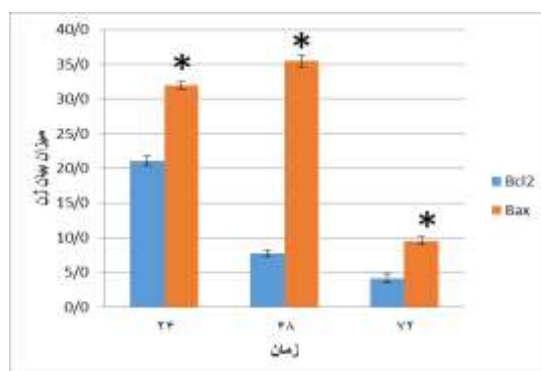
نمودار ۶- مقایسه بین میزان بیان ژن BCL2 و Bax در بازه زمانی مختلف در کشت‌های سلولی تحت درمان با دوز ۱۰ mg/ml (*نشاندنده سطح معنی‌دار در $P < 0.05$ می‌باشد).

نتایج آزمون Real Time PCR

میزان بیان ژن‌های BCL-2, BAX در نمودارهای ۲ تا ۶ آمده است. همانطور که مشاهده می‌گردد بیان ژن BAX به عنوان یک ژن پیش برنده آپوپتوز در ۴۸ ساعت پس از درمان با عصاره رزماری با دز ۲۵ mg/ml نسبت به بقیه گروه‌ها بیشتر بوده است که دقیقاً مطابق با آزمون MTT بوده است. در همین دوز میزان بیان ژن BCL2 به عنوان یک ژن مهارکننده آپوپتوز به طور معنی‌داری پایین بوده است. لازم به ذکر است با توجه به آنکه فقط بیان ژن s26 به عنوان ژن کنترل در آزمون RT PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، در آزمون کمی Real Time مورد استفاده قرار نگرفته است (۷).



نمودار ۲- مقایسه بین میزان بیان ژن BCL2 و Bax در بازه زمانی مختلف در کشت‌های سلولی تحت درمان با دز ۲۵ mg/ml (اختلاف آماری معنی‌داری در $P < 0.05$ مشاهده نمی‌گردد).



نمودار ۳- مقایسه بین میزان بیان ژن BCL2 و Bax در بازه زمانی مختلف در کشت‌های سلولی تحت درمان با دوز ۱۰۰ mg/ml (*نشاندنده سطح معنی‌دار در $P < 0.05$ می‌باشد).

بحث

Lee و همکاران (۱۹۹۶)، با مطالعه روی ۱۰۱ بیمار مبتلا به سرطان مجاری پستان نشان دادند که درصد مثبت شدن ژن BCL2 در درجات پایین تر بدخیمی، بیشتر می باشد و به این ترتیب، بیان ژن BCL2 می تواند با پیش آگهی خوبی همراه باشد. در مطالعه حاضر نیز با استفاده از عصاره رزماری افزایش بیان ژن BAX به عنوان عامل پیش برنده آپوپتوز نسبت به ژن BCL-2 در جلوگیری از رشد سلول های سرطانی مشاهده گردید که با مطالعه Lee و همکاران مطابقت دارد (۶).

Kroger و همکاران (۲۰۰۶)، ۳۰۲ نمونه سرطان پستان با درگیری بیش از ۱۰ گره لنفاوی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که BCL2 یک عامل پیش آگهی مثبت برای بقا می باشد. ولی فاکتور پیش گوئی کننده در سرطان اولیه پستان نمی باشند نتایج مطالعه ما با مطالعه Kroger و همکاران مطابقت ندارد چون میزان بالای مرگ سلول های سرطانی در مطالعه حاضر با بیان پایین BCL2 همراه بود (۸).

Silvestrini و همکاران (۱۹۹۴) بر روی ۲۸۳ نمونه کارسینوم پستان بدون درگیری غدد لنفاوی مطالعه ای انجام دادند و به این نتیجه دست یافته اند که بیان ژن BCL2 با بقای کلی و عدم عود ۶ ساله سرطان همراه می باشد. در مطالعه حاضر نیز بیان بالای ژن BAX و میزان پایین بیان ژن BCL2 با میزان بالای مرگ سلول های سرطانی ارتباط مستقیم و معنی داری را نشان داد که با مطالعه Silvestrini و همکاران مطابقت دارد (۹).

Gasparini و همکاران (۱۹۹۵) در مطالعه ای با روش ایمنوهیستوشیمی که روی ۱۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان اولیه که درگیری غدد لنفاوی داشتند، مشخص کردند که بین میزان بیان ژن BCL2 و درگیری غدد لنفاوی ارتباطی وجود ندارد و گروهی که BCL2 مثبت هستند پیش آگهی بهتر و بقای ۵ ساله بدون عود دارند که مخالف نتایج مطالعه ما می باشد (۵).

در این مطالعه تاثیر غلظت های مختلف عصاره رزماری بر میزان رشد سلول های سرطانی غدد پستانی سگ در محیط کشت سلول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره گیاه رزماری توانایی مهار رشد سلول های سرطانی غدد پستانی سگ را داشته که در دز ۲۵mg/ml و در ۴۸ ساعت پس از درمان بیشترین اثربخشی را داشته است. همچنین نتایج نشان دهنده میزان بالای ژن BAX به عنوان یک ژن پیش برنده آپوپتوز در همین دز دارویی و بازه زمانی بوده است. اثرات ضد سرطانی گیاه رزماری در مطالعات اندکی که بر روی برخی سلول های سرطانی انجام گرفت، مشاهده شده است. در مطالعه همتا و همکاران (۱۳۹۰) که به منظور بررسی خواص ضد سرطانی تاکسول و عصاره های الکلی و آبی رزماری بر سلول های سرطان پستان القا شده توسط DMBA در رت های نژاد SD صورت گرفت، نتایج حاصل حاکی از اثر سایتوتوکسیک این عصاره بر روی سلول های سرطانی بود که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد (۳).

در مطالعه بشاش و همکاران (۱۳۹۱)، نقش عصاره گیاه خارمریم بر روی سلول های سرطانی پستان رده MCF7 بررسی گردید و مشخص شد که میزان بیان mRNA ژن BAX از نظر آماری به طور معناداری افزایش پیدا کرده است، در حالی که در بیان BCL2 تغییری مشاهده نگردید. در PCR هم میزان بیان پروتئین BAX به طور معنی داری افزایش پیدا کرد در حالی که در بیان BCL2 تاثیری نداشته است (۱). در این مطالعه، اثربخشی عصاره گیاه خارمریم بر روی سرطان پستان انسان تأیید گردید. در تحقیق حاضر نیز ما با استفاده از عصاره رزماری به همین نتایج مبنی بر بیان معنادار ژن BAX دست یافتیم. در مطالعه ما نیز بیشترین میزان بیان ژن BAX در دوز ۲۵ و پس از ۴۸ ساعت مشاهده گردید که منطبق با نتایج آزمون MTT بود (۱).

با توجه به دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی بالای گیاه رزماری که در تحقیقات گذشته نیز به اثبات رسیده است (۳۱۰) و با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر می توان بیان نمود که عصاره گیاه رزماری از طریق القا آپوپتوز بواسطه افزایش بیان ژن BAX باعث از بین بردن سلول های سرطانی رده CF41.MG شده است.

البته لازم به ذکر است با توجه به رفتارهای متفاوت سلول های سرطانی در داخل بدن نسبت به محیط کشت سلول لزوم تحقیقات بیشتر بخصوص مطالعه در مدل های حیوانی آزمایشگاهی و به دست آوردن موثرترین دوز در این زمینه وجود دارد.

باید توجه داشت که سرطان در اثر عوامل متعددی ایجاد می شود، بنابراین راه درمان آن نمی تواند محدود به استفاده از یک روش درمانی و دارویی بوده و می بایست که ترکیبی از روشهای درمانی که کمترین اثر سوء را بر روی سلول های زنده داشته باشند بکار گرفته شود و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات غنی از آنتی اکسیدان با حداقل اثرات سوء بر سلول های میزبان یکی از روش های درمانی در کنار دیگر درمان ها می باشد.

فهرست منابع

۱. بشاش، د.، صفا، م.، شهبازی، ع.، محمدیان، م. (۱۳۹۱): اثر آپوپتوتیکی عصاره گیاه خارمریم بر روی سلول سرطان سینه رده MCF-7، فصلنامه علمی- پژوهشی طب مکمل، ۱: ۸۵-۹۵.
۲. پکورینو، ل. (۱۳۹۱): زیست شناسی مولکولی سرطان، ترجمه ای امیری نودیجه، ع.، داوری، م. نشر خانه ی زیست شناسی تهران، ایران: ۱۰-۱۱.
۳. همتا، الف.، پروینی، پ. (۱۳۹۰): بررسی خواص ضد سرطانی تاکسول و عصاره های الکلی و آبی رزماری بر سلول های سرطانی پستان القا شده توسط DMBA در رت های نژاد SD، مجله علمی سلول و بافت، ۲ (۲): ۱۱۷-۱۲۶.

Linjawi و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه ای که بر روی ۷۵ نمونه سرطان پستان انجام دادند، نشان دادند که بیان BAX و BCL2 با میزان بقا ارتباط نداشت و P53 جهش یافته با کاهش واضح در میزان بقای عمر ۵ ساله همراه بود (۷).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با مطالعات صورت گرفته توسط Silverstrini، Kroger و Gasparini مطابقت داشت اما با توجه به ارتباط مستقیم بیان Bax با مرگ سلول های سرطانی در مطالعه حاضر، نتایج این تحقیق با مطالعه Linjawi مغایرت دارد (۹ و ۵،۷۸).

در مطالعه حاضر بغیر از دوز ۵mg، بقیه دوزها دارای اثرات مهارکنندگی بر رشد سلول های سرطانی بودند، ولی میزان سیتوتوکسیسیته عصاره رزماری در دوز ۲۵ mg و در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از کشت سلول نسبت به بقیه دوزها و در ساعات مختلف بیشتر بوده است.

همچنین پس از سنجش میزان بیان ژن BAX بعنوان یک عامل پیش برنده آپوپتوز و مرگ سلولی، مشخص گردید که بیشترین میزان بیان این ژن در دوز ۲۵ mg و پس از ۴۸ ساعت کشت سلولی بوده است که کاملا با نتایج حاصل از MTT مطابقت دارد.

میزان بیان BCL2 نیز به طور معنی داری کاهش یافته است. البته لازم به ذکر است که میزان بیان BAX در ۲۴ و ۷۲ ساعت نیز در دزهای ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ نیز افزایش داشته ولی بیشترین میزان آن مربوط به دز ۲۵ و زمان ۴۸ ساعت بوده که این امر ممکن است به علت اشباع گیرنده های سطح سلولی در دوزهای بالاتر از ۲۵ mg باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و همچنین تحقیقات گذشته باید بیان کرد که میزان بالای بیان ژن BCL2 در جلوگیری از پیشرفت سرطان میتواند نقش کلیدی داشته باشد. چون مطالعه حاضر بر روی محیط کشت سلول های سرطانی بوده است، بنابراین بیان این ژن نقشی در مهار رشد سلولی نداشته است و برعکس بیان بالای ژن BAX توانسته از رشد سلول های سرطانی جلوگیری کند.

4. Croce, C.M. (2008): Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 358(5): 502–11.
5. Gasparini, G., Barbareschi, M., Doglioni, C., Palma, P.D., Mauri, F.A., Boracchi, P. (1995): Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1 (2): 189-98.
6. Lee, W.Y., Jin, Y.T., Tzeng, C.C. (1996): Reciprocal expression of Bcl-2 and P53 in breast ductal carcinoma. *Anticancer Res.* 16(5): 3007-312.
7. Li njawi, A., Kontogiannea, M., Halwani, F., Edwardes, M., Meterissian, S. (2004): prognostic significance of P53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 198(1): 83-90.
8. Kroger, N., Langosch, K., Riethdorf, S., Schmoor, C., Schumacher, M., Zander, A.R. (2006): Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high- risk primary breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 12(1): 159-68.
9. Silvestrini, R., Veneronis, S., Daidone, M.G., Benini, E., Boracchip, P., Mezzettim, M. (1994): The Bcl2 protein: a prognostic indicator strongly related to P53 proteiN in Lymph node-negative breast cancer Patients. *J. Natl. Cancer. Inst.* 86(7): 499-504.
10. Sakr, S.A., Lamfon, H.A. (2012): Protective Effect of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) Leaves Extract on Carbon Tetrachloride - Induced Nephrotoxicity in Albino Rats. *Life. Sci. J.* 9(1):779-785
11. Wilbe, M., Jokinen, P., Truve, K. (2010): Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nate. Genet.* 42:250-254.