مقاله پژوهشی

مجله علمی سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ۱۲۶-۱۱۷

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

احمد همتا [*۱]، پیوند پروینی [۲]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a-hamta@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۵

چکیده

هدف: مطالعه حاضر به بررسی اثرات سایتوتوکسیک گیاه رزماری (Rosmarinus officinalis) روی سلول‌های سرطان پستان القا شده توسط DMBA در رت‌های نژاد SD پرداخته است.

مواد و روش‌ها: ۱۰ میلی‌گرم از کارسینوژن DMBA به رت های گروه تیمار خورانده شد. پس از ایجاد تومورها، جهت تعیین نوع تومور و بررسی هیستوپاتولوژیک، رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت. جهت تهیه سلول از روش خرد کردن تومور استفاده شد. از برگ‌های خشک رزماری با استفاده از متانول به روش digestion عصاره گیری شد. سپس عصاره فیلتر شده و مقداری از آن کنار گذاشته و مابقی آن توسط حلال های غیرقطبی هگزان، دی کلرومتان و اتیل استات شستشو داده شد تا مواد غیرقطبی آن جدا شود. عمل حذف حلال با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی انجام گرفت. از تاکسول و هریک از عصاره‌ها ۵ غلظت تهیه شده و بر روی سلول‌ها اثر داده شد و توانایی زیستی سلول‌ها به دو روش جذب تریپان بلو و رنگ سنجی MTT ارزیابی شد.

نتایج: عصاره‌ی الکلی رزماری و تاکسول برروی سلول‌های سرطانی دارای اثرات سمی قابل توجهی بودند ولی عصاره آبی خواص ضدسرطانی بسیار ضعیفی داشت.

نتیجه گیری: عصاره الکلی رزمای به صورت وابسته به دز قادر به از بین بردن سلول های سرطانی بوده و خواص سایتوتوکسیک آن قابل مقایسه با داروی تاکسول است. همچنین مدل سرطان پستان القایی یک مدل مناسب برای انجام آزمایشاتی از این دست می‌باشد.

واژگان کلیدی: تاکسول، تومورهای پستان، زیستایی سلول‌ها، عصاره رزماری، DMBA

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

طبق آمار منتشر شده از سوی وزارت بهداشت و درمـان در حـال حاضر سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان کشور بـه شمار می‌رود و دومین سرطان کشنده پس از سرطان ریـه اسـت. کارشناسان می‌گویند از هر هشت زن ایرانی، یک نفر شانس ابتلا به سرطان پستان را داراست و حدود یک چهارم کل سرطان‌های زنان در کشور مربوط به سرطان پستان می‌باشـد (۱). بـالا بـودن آمار مبتلایان به این نـوع سـرطان در کشـورمان ضـرورت انجـام تحقیقات بیشتر برای پی بردن به مکانیسم‌های ایجـاد سـرطان و ابداع روش‌های درمانی مؤثرتر را آشکار می‌سازد.

سرطان پستان را می‌توان در رت‌ها توسط انواع مختلفی از عوامل نظیر هورمون‌ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمـود اما یکی از پرکاربرد ترین روش‌های القـا سـرطان پسـتان در رت اسـتفاده از نـوعی مـاده شـیمیایی بـه نـام ۷و۱۲ دی متیـل بنزانتراسن می‌باشد که یک هیدروکربن آروماتیـک چندحلقـه‌ای است که به وفور در دود تنباکو یافت می‌شود (۲).

با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجـود عوامـل متعـدد در ایجـاد سرطان تا کنون درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده اسـت امـا امـروزه از روش‌هـای درمـانی بـرای درمـان سـرطان پسـتان اسـتفاده مـی‌شـود. بـا ایـن حـال وجـود عـواملی ماننـد تنـوع پروسه‌های پاتولوژیک و مکانیسم‌های مقاومت به درمـان انتخـاب مناسـب تـرین و کارآمـدترین نـوع درمـان را بـرای هـر یـک از بیماران مشکل ساخته اسـت و ایـن امـر لـزوم انجـام آزمایشـات in vitro drug sensitivity/resistance را روشن می‌سازد. این آزمایشات قادرند شـناخت و آگـاهی نسـبی در بـاره اثـر عوامـل مختلـف مـورد اسـتفاده در درمـان اسـتاندارد را پـیش از انجـام آزمایشات in vivo فراهم کنند. بـه عبـارت دیگـر ایـن روش بـه انکولوژیست‌ها کمک می‌کند تا بتوانند داروهای مناسبی را بـرای شیمی درمانی بیمـاران برگزیننـد. همچنـین از ایـن روش بـرای انتخاب رژیم‌های شیمی درمانی بالقوه مؤثرتر و نیز جلـوگیری از سمیت بالقوه داروهای غیر مؤثر استفاده می‌شود (۳).

مواد گیاشیمیایی (phytochemicals) که قابلیت کاهش میـزان بروز تعدادی از تومورها را دارا می باشند به صـورت روزافـزون رو به افزایش است و از این میان مشـتقات غـذایی از ایـن نظـر کـه تقریباً غیرسمی می‌باشند مورد توجه خاصی قـرار دارنـد. بـا ایـن حال شواهد علمی محدودی کـه در رابطـه بـا مکانیسـم عمـل و عوارض احتمالی استفاده از این ترکیبات وجود دارد از ورود آنهـا به مسیر اصلی مراقبت‌ها و درمان‌های پزشکی جلـوگیری نمـوده است (۳). تا به امروز مشخص شده که بسـیاری از گیاهـان رایـج دارای خواص یا حفاظت کننده در برابـر سـرطان کموپروتکتیـو (chemoprotective) می‌باشند، از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه Allium (سـیر و پیـاز و موسـیر)، اعضـای خـانواده نعناعیان (ریحـان، نعنـاع، آویشـن و رزمـاری)، اعضـای خـانواده Zingiberaceae (زنجبیل و زردچوبه) اشاره نمود. ایـن گیاهـان منـابعی غنـی از فیتوکمیکـال‌هـای کموپروتکتیـو ماننـد فیتواسـترول‌هـا، فلاونوئیـدها، کاروتنوئیـدها، ترپنوئیـدها و ... می‌باشند که این مواد به عنـوان آنتـی اکسـیدانت عمـل کـرده و رادیکال‌های آزاد را جاروب می‌کنند و موجـب تحریـک سیسـتم ایمنی بدن مـی‌شـوند و همچنـین تشـکیل DNA adducts بـا کارسینوژن‌ها را مهار نموده و علاوه بر این مسـیرهای متابولیـک مرتبط با گسترش سرطان را مهار می‌کنند (۴).

رزماری نیز یکی از گیاهانی است که خاصـیت آنتـی اکسـیدانتی بالایی دارد. اما چیزی که به تازگی و در یکی دو دهه اخیر مـورد توجه محققان قرار گرفتـه اسـت خـواص ضـد سـرطانی و آنتـی کارسینوژنیک آن مـی‌باشـد. از آنجـا کـه سـرطان یـک بیمـاری پیچیده و مولتی فاکتوریال است، یافتن مدل مناسبی کـه بتـوان آن را جایگزین مدل انسـانی نمـود همـواره یکـی از آرمـان‌هـای محققان بـوده اسـت. در ایـن پـژوهش از مـدل مـوش صـحرایی استفاده شده است که قادر به تقلید شرایط تومورهای انسـانی تـا حد بسیار زیادی می‌باشد و بنابراین می تواند مدل مناسبی بـرای مطالعه اثر داروهای ضدسرطان به شمار آید. با بررسـی داده‌هـای به دست آمده از این مطالعه به این موضوع پی خـواهیم بـرد کـه آیا استفاده از مدل موشی سرطان پستان می‌تواند مدل جایگزین مناسبی برای مدل انسانی باشد و اینکه آیا عصـاره‌هـای الکلـی و آبـی (فاقـد عوامـل غیرقطبـی) رزمـاری قـادر بـه از بـین بـردن سلول‌های سرطانی هستند؟ و اگـر ایـن گونـه اسـت میـزان اثـر بخشی آن‌ها در مقایسه با داروی رایـج تاکسـول بـه چـه میـزان است؟

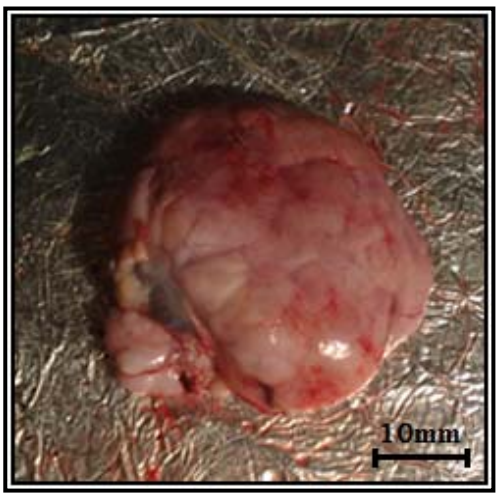
مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش رت‌های مـاده‌ی بـالغ از نـژاد Sprague dawley با میانگین وزنی (۱۰ ± ۱۵۰گـرم) از موسسـه‌ی سـرم سازی رازی خریداری شده و در شرایط ۱۲ سـاعت تـاریکی و۱۲ سـاعت روشـنایی و حـرارت ۳ ± ۲۲ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد و دسترسی آزاد بـه آب و غـذا، در قفـس‌هـای مخصـوص در اتـاق حیوانات نگهداری شوند.

Archive of SID
www.SID.ir

دوز دارو و روش تیمار: حیوانات به ۳ گروه تقسیم شده و به گروه اول (n=۱۰) به عنوان گروه کنترل ۱ میلی لیتر روغن کنجد به گروه دوم (n=۱۰) به عنوان گروه تیمار ۱ میلی لیتر محلول حاوی۱۰ میلی‌گرم DMBA (Sigma، آلمان) که در ۱ میلی لیتر روغن کنجد حل شده بود و به گروه آخر (n=۱۰)، بعنوان گروه تیمار ۲ محلول حاوی ۲۰ میلی گرم DMBA که در۱ میلی لیتر روغن کنجد حل شده بود بوسیله گاواژ داده شد. این دارو۲ بار در طول ۲ هفته و در روز مشخص به گروه تیمار خورانده شد. پس از پایان دوره تیمار و رسیدن تومور به اندازه لازم حیوانات توسط دی اتیل اتر بیهوش و محل تشریح استریل گردید سپس تومور بطور کامل خارج شده و به زیر هود لامینار منتقل شد (شکل۱). یک سوم تومور به منظور تهیه مقاطع بافتی، برای مطالعه پاتولوژیک در فرمالین ۱۰درصد قرار داده شد و دو سوم باقیمانده جهت کشت سلول مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که تمامی اصول بهداشتی در نگهداری و معدوم سازی حیوانات بر اساس پروتکل کمیته اخلاق پزشکی مصوب ۱۳۸۵/۵/۲۸ (مطابق با پروتکل هلسینکی ۱۹۷۵) در این پژوهش رعایت شد.

مطالعه هیستوپاتولوژیکی: نمونه به دست آمده از تومور به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در فرمالین۱۰ درصد قرار داده شد و در ادامه مراحل پاساژ بافتی (به اختصار آبگیری با درجات صعودی الکل، شفاف سازی با زایلین و قالب گیری در پارافین مذاب) بر روی قطعات تومور انجام گرفت. سپس با استفاده از میکروتوم (Leitz 1512) از قالب ها برش هایی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه شده و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین روی برش‌ها انجام گرفت. در نهایت لام‌ها با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین مورد مطالعه و عکس برداری قرار گرفتند.



شکل ۱: تومور خارج شده از رت تیمار شده با DMBA

تهیه سلول‌های منفرد از بافت تومور: برای تهیه سلول از بافت تومور، تومورها به زیر هود لامینار انتقال داده شده و سپس از قسمت‌های داخلی تر قطعاتی بریده و به فالکون‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر HBSS (Gibco، آلمان) استریل انتقال داده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقیماندهٔ تومور با اسکالپل به ذرات بسیار ریز خرد شد (chopping) و سوسپانسیون حاصله به فالکون منتقل شده و با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از آن محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ته فالکون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Gibco، آلمان) حاوی۱۰درصد FBS (Gibco، آلمان) اضافه گشت. پس از پیپتاژ کردن، ۱/۵ تا ۲ میلی لیتر از مخلوط همگن شده به فلاسک‌های T25 منتقل شده و حجم محیط داخل فلاسک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس فلاسک به انکوباتور CO_2 دار (Memmert، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی فلاسک تخلیه و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به فلاسک افزوده گشت. تعویض محیط و پاساژ سلول‌ها هرچند روز یکبار و در صورت نیاز انجام گرفت و این کار تا پاساژ هفتم تکرار شد.

تهیه عصاره های گیاهی: حدود ۲ کیلوگرم برگ و سرشاخه‌های تازه گیاه رزماری چیده شده و در محیطی خنک و به دور از نور آفتاب خشک شد. سپس حدود ۵۰۰ گرم برگ خشک رزماری آسیاب و غربال شد تا پودر یک دستی حاصل شود. ۱۰۰ گرم از پودر در ظرف مناسبی ریخته شده و حدود ۲۵۰ میلی لیتر متانول خالص به آن افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف و عصاره به دست آمده در یک ظرف دردار شیشه‌ای ریخته و در جایی دور از نور نگهداری شد. مجدداً روی تفاله باقی مانده ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص ریخته شده و ظرف حاوی تفاله مجدداً به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار مورد نیاز از عصاره متانولی برداشته شد و بقیه آن در دستگاه تبخیرکننده چرخشی قرار گرفت تا حلال آن کاملاً تبخیر شده و رسوب آن باقی بماند. روی رسوب حاصله ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (حاوی ۵ تا ۱۰ درصد متانول به منظور کمک به انحلال رسوب) ریخته شد و پس از حل کردن رسوبات در آن ظرف محتوی مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت. سپس با کاغذ صافی صاف شد. برای ارزیابی نقش ضد سرطانی ترکیبات قطبی و محلول در آب رزماری، عصاره به دست آمده با استفاده از سه حلال هگزان، دی کلرومتان و اتیل استات (Merck، آلمان) (که قادر به جدا نمودن ترکیبات غیرقطبی می‌باشند) شستشو داده شد و تفاله

Archive of SID

www.SID.ir

باقی مانده به عنوان عصاره حاوی مواد قطبی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره آبی در حمام آب گرم با دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حلال آن کاملاً تبخیر شود و رسوب خشکی برجا بماند. سپس غلظت های مورد نیاز از هر یک از عصاره‌ها با حل کردن مقدار مورد نیاز از پودر عصاره در محیط کشت فاقد سرم و گذراندن آن از فیلتر (milipore) با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر تهیه شده و تا زمان استفاده در یخچال و برای مدت طولانی تر در فریزر نگهداری شد.

سنجش توانائی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو: تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در هر ویال پلیت ۶ خانه کشت داده شد و سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت به منظور اتصال سلول‌ها به کف پلیت در انکوباتور قرار گرفت. محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی غلظتهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول (Ebewe pharma اتریش) به هر چاهک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید. پس از ۲۴ ساعت، تمام خانه‌های پلیت تریپسین زنی شد. سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل، تریپسین غیر فعال شده و به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد (Sigma، آلمان) به هر خانه اضافه و پلیت به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار (در خانه‌های متعلق به شمارش گلبول‌های سفید) انجام گرفت. سلول‌های آبی رنگ به عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی رنگ به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول‌ها در هر غلظت محاسبه گشت.

$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times ۱۰۰$$

سنجش تترازولیوم (MTT) : اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نا محلول فورمازان است. هرچه تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود (و برعکس). برای انجام این تست تعداد ۱۰۴سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دو بار توسط -PBS شسته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت های ۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول به هر چاهک پلیت اضافه و پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین گردید. به هریک از چاهک ها ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma، آلمان) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گشت. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک از پلیت به یک چاهک دیگر منتقل و جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA-reader قرائت و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر، در مورد هر غلظت محاسبه گردید:

$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times ۱۰۰$$

تمامی مراحل فوق برای عصاره الکلی (با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و عصاره آبی فاقد عوامل غیر قطبی (با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تکرار شده و نتایج ثبت گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: برای بررسی اثر دوزهای مصرفی تاکسول، عصارهٔ آبی، عصارهٔ الکلی بر توانایی زیستی سلول‌های سرطان پستان القا شده در موش صحرایی، داده‌های به دست آمده توسط روش آماری Univariate و تست Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

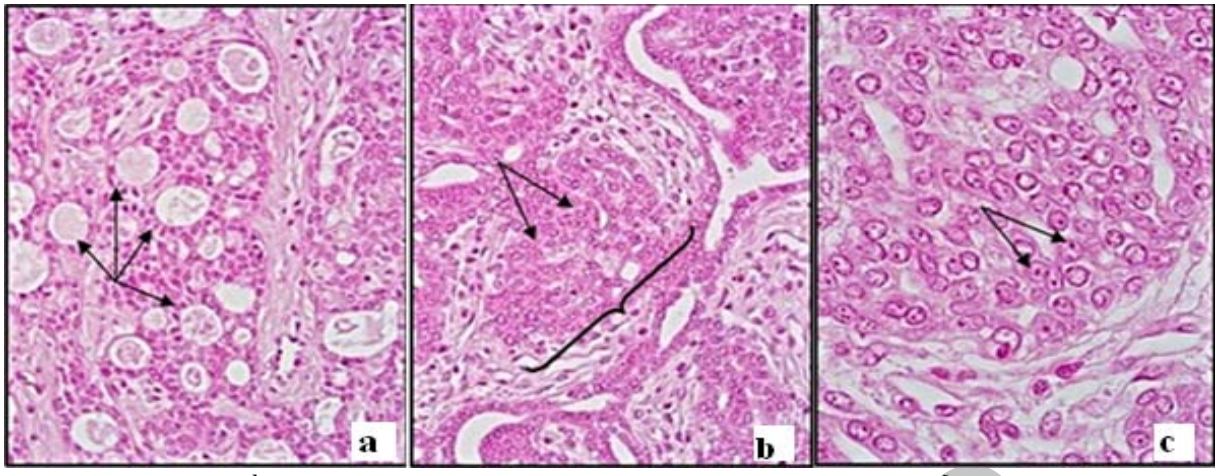
نتایج

نتایج حاصل از مطالعه ی هیستوپاتولوژیک

برش‌های تهیه شده از بافت‌های توموری توسط متخصص هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس اطلاعات هیستوپاتولوژیکی تمامی خصوصیات مرفولوژیک مشاهده شده در برش‌ها مؤید وجود بافت تومورال بدخیم بود. همانطور که در شکل ۲-a و ۲-b سلول های سرطانی در حال تکثیر مشاهده می‌شود، در بافت تومورال، فضاهای غده مانند تغییرشکل یافته‌ای دیده می‌شود که به وسیله یک ردیف از سلول‌های اپی‌تلیال توموری احاطه شده‌اند و تمایل دارند به بافت غده ای توموری تمایز یابند. هردوی مشخصات مزبور از نشانه‌های تشخیصی آدنوکارسینوما می‌باشد. علاوه بر این چنان که در شکل ۲- c مشاهده می‌شود سلول‌های سرطانی دارای هستک های بزرگ و برجسته و الگوی کروماتینی وزیکولی می‌باشند، این در حالی است که در هیچ یک از اعضای گروه کنترل هیچ گونه بافت توموری مشاهده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: a) برشی از تومور که در آن پیکان ها نشان دهنده فضاهای غده مانند متعدد می باشند (عدسی شیئی۲۰x) b)پیکان ها تکثیر سلول های سرطانی را در یک مجرا (که با { نشان داده شده است) نشان می دهد (عدسی شیئی۴۰x)، c) سلول های سرطانی با هسته های مشخص و هستک های بزرگ (پیکان ها) (عدسی شیئی۱۰۰x). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها بر اساس رنگ آمیزی تریپان

مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از گذشت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری میان تمام گروه غلظت‌های ۱ تا ۵ برای هر یک از مواد مذکور به این شرح است: به ترتیب گروه‌های ۱ تا ۵ جدول دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول، دوز های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره الکلی و دوزهای ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی فاقد عوامل غیر قطبی.

بر اساس این نتایج غلظتی که بتواند رشد سلول‌ها را ۵۰ درصد مهار کند (IC50) برای هر یک از ترکیبات مذکور بدین شرح بود:

تاکسول: دوز ۱۲/۷۲ نانومول بر لیتر. عصاره الکلی: دوز ۶۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

عصاره آبی: از آنجا که با افزایش دوز عصاره از ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا قابلیت حیات سلول‌ها افزایش قابل ملاحظه و معنی داری پیدا کرد بنابراین سمی ترین دوز عصاره آبی معادل ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درنظر گرفته شد.

به طور کلی می‌توان گفت مقایسه داده‌های به دست آمده از سنجش قابلیت حیات سلول‌های سرطانی تحت تیمار با تاکسول و عصاره‌ها با داده‌های به دست آمده از گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) نشان داد.

جدول۱: مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصارهٔ آبی، عصارهٔ الکلی در زمان ۲۴ ساعت که به روش رنگ آمیزی تریپان بلو اندازه گیری شده است. مقادیر به صورت means ±SD بوده و تفاوت میانگین‌ها در سطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است. میانگین های با کد حرف‌های متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنی دار می‌باشند (ANOVA, one way, Duncan test).

ماده / دوز	تاکسول	عصاره آبی	عصاره الکلی
۰	۹۴/۷۱^{a}±۰/۹۷	۹۴/۷۵^{a}±۱/۰۳	۹۴/۵۱^{a}±۱/۵۲
۱	۸۰/۵۴^{b}±۳/۹۶	۹۲/۲۵^{a}±۱/۸۲	۷۱/۰۱^{b}±۱/۳۳
۲	۷۶/۸۲^{b}±۳/۰۵	۹۰/۴۶^{ab}±۳/۴۲	۶۴/۹۲^{c}±۲/۱۰
۳	۶۶/۵۰^{c}±۰/۷۷	۸۴/۷۰^{bc}±۳/۴۴	۵۶/۶۷^{d}±۲/۴۸
۴	۵۳/۵۸^{d}±۳/۰۷	۸۲/۲۳^{c}±۲/۷۶	۴۸/۱۷^{e}±۴/۲۰
۵	۳۴/۴۰^{e}±۱/۸۱	۸۶/۷۳^{ab}±۲/۴۵	۲۶/۰۳^{f}±۲/۰۹

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین توانائی زیستی سلول‌های سرطانی در گروه های تیمار شده با تاکسول و عصاره الکلی نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت، اما میانگین توانائی زیستی سلول‌های تیمار شده با این گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره آبی بود (Univariate, P<۰/۰۵). این نتایج نشان داد که دوز تیمار و توانایی زیستی سلول‌های سرطانی دارای اثرات متقابل می‌باشند، به صورتیکه با افزایش میزان دوز، قابلیت حیات سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. البته این مسئله درمورد عصاره آبی به طور کامل صدق نمی‌کرد زیرا همانطور که قبلاً نیز اشاره شد، با افزایش میزان دوز عصاره آبی از ۴۰۰۰ میکروگرم به بالا نه تنها کاهشی در میزان زیستایی سلول‌ها مشاهده نشد بلکه درصد حیات آنها در سطح معنی‌داری افزایش یافت.

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول ها به روش MTT

از مقایسه داده های به دست آمده از سنجش درصد حیات سلول‌های سرطانی تیمار شده با تاکسول، عصاره آبی و عصاره الکلی، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌ها در دوزهای متفاوت و زمان ۲۴ ساعت در گروه های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵معنی دار بود. میانگین زیستی سلول‌های سرطانی در گروه های تیمار شده با تاکسول و عصاره الکلی نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت، اما میانگین زیستی سلول‌های تیمار شده با این دو گروه اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره آبی نشان داد (Univariate, P<۰/۰۵).

همانند نتایج به دست آمده از آزمون تریپان بلو، نتایج تست MTT نیز مؤید این مطلب بود که دوزهای بالاتر از ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره آبی نه تنها موجب کاهش قدرت زیست سلول‌های سرطانی نشده، بلکه قابلیت حیات آنها را در سطح معنی‌داری افزایش داده است. این نتایج همچنین نشان داد که دوز مصرفی دارای اثر متقابل بر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی می‌باشد به این معنا که با افزایش دوز، درصد حیات سلول‌ها به صورت معنی داری کاهش می‌یابد (جدول۲).

غلظت‌های ۱ تا ۵ برای هر یک از گروه‌ها در جدول به این شرح است: به ترتیب از گروه ۱ تا ۵ دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول بر لیتر از تاکسول، دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره الکلی و دوزهای ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی فاقد عوامل غیر قطبی.

میزان IC50 محاسبه شده برای هریک از ترکیبات مورد استفاده بدین شرح بود:

تاکسول: دوز ۱۰/۱۱ نانومول بر لیتر. عصاره الکلی: دوز ۶۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

عصاره آبی: از آنجا که با افزایش دوز عصاره از ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا قابلیت حیات سلول‌ها افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری پیدا کرد. بنابراین سمی‌ترین دوز عصاره آبی معادل ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

جدول ۲: مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصارهٔ آبی و عصارهٔ الکلی در زمان ۲۴ ساعت که به روش MTT اندازه گیری شده است. مقادیر به صورت means ± SD بوده و تفاوت میانگین ها در سطح p< ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شده است. میانگین های با کد حروف متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنادار می باشند (ANOVA, one way, Duncan test).

ماده / دوز	تاکسول	عصاره آبی	عصاره الکلی
۰	۱۰۰^{a}±۰/۰۰	۱۰۰^{a}±۰/۰۰	۱۰۰^{a}±۰/۰۰
۱	۸۶/۷۴^{b}±۲/۸۳	۹۳/۱۶^{a}±۱/۵۴	۶۷/۲۰^{b}±۱/۵۵
۲	۷۶/۹۳^{c}±۱/۶۰	۸۶/۲۳^{b}±۰/۹۹	۵۹/۸۳^{c}±۳/۳۷
۳	۶۵/۴۴^{d}±۴/۴۹	۸۴/۱۴^{b}±۳/۶۸	۵۳/۳۹^{d}±۲/۰۵
۴	۵۰/۰۶^{e}±۱/۶۴	۷۷/۹۲^{b}±۱/۸۹	۴۸/۱۶^{e}±۰/۸۵
۵	۴۴/۸۴^{f}±۱/۰۳	۸۷/۶۷^{c}±۲/۷۶	۳۶/۰۱^{f}±۳/۸۷

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

نتایج بدست آمده از بررسی هیستولوژیک مقاطع تهیه شده از بافت‌های توموری که به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شده بودند مؤید این مطلب بود که پاتولوژی تومورهای ایجاد شده در موش‌های صحرائی مورد استفاده در این تحقیق، شباهت زیادی با تومورهای پستانی در انسان دارد. پیش از این نیز Russo (۵) گزارش کرده بود که اکثر تومورهای پستانی القا شده توسط DMBA از نوع ادنوکارسینوما بوده و مشخصات تومورهای پستان انسانی را از نظر رشد وابسته به هورمون و هیستولوژی تقلید می‌کند و بنابراین مدل حیوانی مناسبی جهت تحقیق در مورد کارسینوژنز تومورهای پستان انسانی می‌باشند. با توجه به این یافته‌ها و با نظر به اینکه ژنوم انسان و رت تا حد زیادی به یکدیگر مشابه است بنابراین از دیدگاه ژنتیکی نیز می‌بایست تشابهات زیادی بین تومورهای پستانی ایجاد شده در رت و تومورهای انسانی وجود داشته باشد. بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون رنگ آمیزی با تریپان بلو و MTT نشان داد که عصاره الکلی و تاکسول موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. گرچه عصاره‌ی آبی نیز توانست سلول‌های سرطانی را تا حدودی از بین ببرد، اما اثرات سایتوتوکسیک آن نسبت به تاکسول و عصاره الکلی بسیار ناچیز بود. نتایج به دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تأیید نمودند.

سایر مطالعاتی که پیش از این در رابطه با اثرات سایتوتوکسیک تاکسول و عصاره‌ی الکلی رزماری صورت گرفته است نیز توانایی این ترکیبات در کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند. تحقیقات متعددی که در مورد اثرات سایتوتوکسیک تاکسول چه به صورت in vivo و چه in vitro صورت گرفته است سمیت تاکسول برای سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند. مشخص شده است که تاکسول با ایجاد وقفه در چرخه سلولی موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. بررسی‌های صورت گرفته بر رده‌های سلولی MCF-7، HeLa ، A549، U373، HT-29، OVG-1، PC-Sh و PC-Zd (۶) NUGC-3، SC-M1 (۷) SKOV3، U937 (۸) همگی سایتوتوکسیسیتی بالای تاکسول را نشان داده‌اند.

مطالعاتی که تا کنون در رابطه با اثرات ضد تکثیری (Anti proliferative) و سایتوتوکسیک عصاره الکلی رزماری بر روی رده‌های سلولی سرطانی انسانی از جمله HL60، K562، MCF7 و MDA-MB-468 (۹) M14 و A375 ، NCI-H82، DU-145، K-562، Hep-3B، MCF7، MDA-MB-231 و PC-3 صورت گرفته نشان می‌دهد و IC50 عصاره وابسته به نوع سلول بوده و در رده‌های سلولی مختلف متفاوت است (۱۰). تاکنون ترکیبات بسیار زیادی از رزماری استخراج شده‌اند که بسیاری از آنها دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد توموری و غیره می‌باشند. عصاره الکلی رزماری حاوی ۰/۵ تا ۱ درصد کارنوسیک اسید، ۳/۸ تا ۴/۶ درصد کارنوسول،۲ تا ۴ درصد رزمارینیک اسید، ۱۶/۵ تا ۱۹/۲ درصد اورسولیک اسید و کمتر از ۰/۵ درصد رزمانول است که از این میان تنها رزمارینیک اسید در آب محلول بوده و سایر ترکیبات در حلال‌های آلی محلول می‌باشند. بسیاری از ویژگی‌های فارماکولوژیکی رزماری را به این ترکیبات منتسب می‌دانند و تا امروز نقش آنتی اکسیدانتی و ضد سرطانی برخی از آنها به خوبی به اثبات رسیده است. مطالعات گسترده‌ای که روی ترکیبات مؤثر رزماری صورت گرفته مکانیسم عمل آنها را تا حدودی مشخص نموده است، با این حال هنوز تا درک کامل مکانیسم عمل این ترکیبات راه زیادی باقی است (۱۱). نتایج بررسی انجام گرفته روی سرطان پستان القا شده توسط DMBA در موش های نژاد FVB/N مشخص نموده است که DMBA بیان برخی از ژن‌های دخیل در روند کارسینوژنز از جمله ژن c-myc و cyclin D1 را افزایش داده و مسیر NF-κB را در این تومورها فعال می‌کند. همچنین DMBA موجب القاء التهاب مزمن و تولید بیش از اندازه ROS و ایجاد آسیب اکسیداتیو در DNA شده و اثرات مخرب خود را بدین صورت اعمال می‌کند (۱۲).

استفاده از عصاره متانلی رزماری روی پوست موش از اتصال کووالان بنزوپیرن به DNA اپیدرمال جلوگیری نموده و آغاز تومور توسط آن را مهار می‌کند. همچنین مشخص شده است که اورسولیک اسید از اتصال بنزوپیرن و DMBA به DNA سلول‌های اپیدرم و اتصال TPA به غشاء این سلول‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. اورسولیک اسید موجود در رزماری مسیر NF-κB را در سلول‌های سرطانی مهار می‌کند و احتمالاً این کار را از طریق سرکوب مهارکننده فسفریلاسیون P65 و NF-κB انجام می‌دهد و بدین ترتیب موجب تنظیم کاهشی انکوژن‌هایی مانند COX-2، MMP-9، Cyclin D1، C-Jun و C-Fos می‌شود. کارنوسول موجود در برگ‌های رزماری نیز مانند اورسولیک اسید عمل کرده و فعالیت NF-κB را مهار می‌کند (۱۳).

COX-2 آنزیمی است که بیان آن در شرایط بدخیم و پیش بدخیم سرطان‌هایی مانند پستان، کولون، کبد، پانکراس، ریه، معده، سر و گردن، پوست و حلق افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان داده اند که بیان بیش از حد COX-2 می‌تواند با جلوگیری از اپپتوزیس، تومورزائز را افزایش دهد (۱۴). فلاونوئیدهای موجود در رزماری، زیره، گشنیز و آویشن PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) را فعال کرده و به موجب آن بیان COX-2 را مهار می‌نمایند. رزمارینیک اسید نیز موجب کاهش COX-2 شده و سلول‌های

Archive of SID
www.SID.ir

سرطان کولون را از بین می‌برد. علاوه بر این رزمانول نیز قادر به مهار کردن بیان COX-2 بوده و نقش ضد التهابی نشان می‌دهد (۱۵).

کارنوسیک اسید موجود در برگ های رزماری نیز با جارو کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن- مانند رادیکال هیدروکسیل و رادیکال‌های لیپید پراکسی- غشاهای بیولوژیک را از گزند آنها حفظ نموده و از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند (۱۶). گزارش شده است که کارنوسیک اسید قادر است تحت شرایط استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی را بین ۸۸ تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد. اورسولیک اسید نیز به روشی مشابه با کارنوسیک اسید قادر به کنترل استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۰). رزمانول هم از مسیر میتوکندریایی و هم از مسیر رسپتور مرگ، موجب القاء مرگ سلولی در سلول‌های COLO 205 می‌شود و ممکن است دارای کاربرد بالینی در درمان و پیشگیری از سرطان باشد (۱۷).

گزارشات متعددی منتشر شده اند که نشان می‌دهند در بسیاری از سلول‌های سرطانی بیان ژن‌هایی مانند bcl-2، bcl-X_l، IAP (پروتئین مهار کننده اپوپتوزیس)، survivin، Cyclin D1 و فاکتور مرتبط با رسپتور TNF1 (TRAF1) افزایش می‌یابد و این افزایش بیان موجب ترقی و افزایش حیات و تکثیر سلول‌های سرطانی شده و آنها را نسبت به اپوپتوزیس مقاوم و غیرحساس می‌کند. اما ترکیبات رزماری از قبیل اورسولیک اسید قادرند از طرق مختلفی همچون مهار رونویسی DNA، تنظیم افزایشی بیان ژن‌های خانواده MMP، القاء بیان ژن سرکوبگر تومور P53، فعال سازی JNK1 و JNK2، فعال کردن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ و همچنین کاهش بیان پروتئین‌های خانواده bcl-2 موجب القاء مرگ سلولی در رده‌های سلولی مختلفی از قبیل K652، HL-60، A549، H460، PC-3، M4Beu، MCF-7 و HepG2 شوند (۱۱). سایر تحقیقات نشان داده اندکه کارنوسول نیز قادر است با کاهش دادن سطوح Bcl-2 به میزان ۳۴ تا ۵۳ درصد موجب القاء مرگ سلولی در سلول‌های لوکمی حاد انسانی شود (۱۸).

از آنجا که اکثر ترکیبات اصلی رزماری (به غیر از رزمارینیک اسید) در آب محلول نبوده و در حلال‌های غیرقطبی و آلی حل می‌شوند (۱۹)، بنابراین نتایج به دست آمده از اثرات عصاره آبی فاقد عوامل غیرقطبی در رزماری دور از انتظار نبود، با این حال این عصاره توانست به میزان ناچیزی سلول‌های سرطانی را از بین برد که شاید بتوان این اثر را ناشی از حضور رزمارینیک اسید دانست، علاوه بر این در گروه تیمار مشاهده شد که با افزایش دوز عصاره آبی از ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانایی زیستی سلول‌ها افزایش پیدا کرد. شاید بتوان این نتیجه را ناشی از اثر عوامل محرک رشد نا شناخته موجود در عصاره آبی دانست که در غلظت‌های بالا اثر سایتوتوکسیک ترکیبات موجود در این عصاره را خنثی می‌کنند اما به هرحال با نظر به اینکه ترکیبات موجود در عصاره مورد آنالیز و تجزیه کمی و کیفی قرار نگرفته‌اند و با توجه به عدم وجود تحقیقات مشابه در این زمینه، نمی‌توان در این مورد اظهار نظر قطعی نمود.

نتیجه گیری

تاکسول و عصاره الکلی رزماری موجب القا مرگ در سلول‌های سرطانی القا شده توسط DMBA شدند ولی عصاره آبی رزماری که فاقد عوامل غیرقطبی است اثرات سایتوتوکسیک چندانی از خود نشان نداد علاوه بر این تشابه نتایج حاصله با نتایج صورت گرفته بر روی رده‌های سلولی انسانی مؤید این مطلب است که مدل القایی سرطان پستان رت که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است یک مدل مناسب و قابل اطمینان برای انجام آزمایشات سایتوتوکسیک می‌باشد که قادر به تقلید رفتار تومورهای پستانی انسانی بوده و می‌توان در بسیاری از پژوهش‌هایی از این قبیل از آن بهره جست.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک جهت تامین هزینه‌های مالی این پژوهش و همچنین آقای فراهانی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Ahmadi M, Asadi F, Jalali-fard B, Sadoghi F.[Management of health nformation]. Tehran:Nopardaz ublications; 2005.

2. Fruebauf JP, Bosanquet AG. In vitro determination of drug response: a discussion of clinical applications. principle and practice of oncology. 1993; 7: 25-32.

3. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model, Cancer Letter. 2008; article in press.

4. Craig wJ. Health promoting properties of common herbs. American journal of clinical nutrition. 1999; 70(3): 491-499.

5. Russo J, Russo IH. Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2000; 5(2): 187-200.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, et al. Cytotoxic studies of Paxlitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. British Journal of Cancer. 1993; 68(6): 1104-1109.
7. Chang YF, Li LL, Wu C, Liu T, et al. Paclitaxel induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. Cancer. 1996; 77(1): 8-14.
8. Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Kurp M, et al. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. Cell Death and Differentiation. 2002; 9(6): 636-642.
9. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis. Oncology reports. 2006; 17: 1525-1531.
10. 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 Human Nutrition. 2010; 65: 158-163.
11. Yasutaka Ikeda A, Hajime Ohigashi M. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. Mol. Nutr. Food Res. 2008; 52(1): 26-42.
12. Currier N, Solomon SE, Demicco EG, Chang D, et al. Oncogenic Signaling Pathways Activated in DMBA-Induced Mouse Mammary Tumors. Toxicologic Pathology. 2005; 33(6): 726-737.
13. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, et al. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. Carcinogenesis. 2002; 23(6): 983-991.
14. Aggarwal BB, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, et al. From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. Oncologic, Endocrine & Metabolic. 2006; 10(1): 87-118.
15. Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. FEBS Letters. 2001; 496(1): 12–8.
16. Serafini M, Bellocco R, Wolk A, Ekstrom AM. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology. 2002; 123(4): 985–91.
17. Cheng A, Lee m, Tsai ML, Lai CS, et al. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. Food and Chemical Toxicology. 2010; article in press.
18. Dorrie J, Sapala K, Zunino SJ. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. Cancer Letters. 2001; 170: 33-39.
19. Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ho CT, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. Cancer Researches. 1994; 54: 701-708.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Summer 2011; 2(2): 117-126

Study of Cytotoxic Effects of Taxol and Rosemary Extracts on Cancerous Cells Derived From DMBA-induced Breast Cancer in SD Rats

Hamta A [1*], Parvini P [2]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc Graduated student in Developmental Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

* Email corresponding author: a-hamta@araku.ac.ir

Received: 5 Jul. 2011 Accepted: 6 Nov. 2011

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts on cancerous cells derived from DMBA induced mammary tumor in SD rats**.**

Materials and methods: Treatment group were gavaged by DMBA (10mg/kg) dissolved in 1ml sesame oil. After tumor development, a part of tissue samples were used for pathological studies using H&E staining to determine the type of the tumor. Cancerous cells were prepared after breaking the tissue using mechanical method. Dried leaves of Rosemary were extracted using digestion method with the help of methanol and filtrated by filter paper. One part of extract was kept away, and to separate the non polar compounds, the rest of the extract was washed with non polar solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate). Then the solvents were removed by rotary evaporator and then the desirable dilutions of extracts as well as Taxol were prepared. After 24 hours treatment of the cells with the extract and taxol the cell viability was evaluated by Trypan blue dye exclusion and MTT colorimetric assay.

Results: Alcoholic extract and Taxol showed significant cytotoxic effects on cancerous cells but the effect of aqueous extract was weaker.

Conclusion: according to this study alcoholic extract of Rosemary had a dose dependent cytotoxic effect on cancerous cells which was comparable to Taxol cytotoxicity. Moreover these data demonstrated that the induced breast cancer in rat is an appropriate model to simulate human breast cancer**.**

Key words: Cell Viability, DMBA, Mammary tumors, Rosemary extracts, Taxol

Archive of SID

www.SID.ir