Arshive of SID

فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۶

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

طیبه محمدی[1*]، الهام حویزی[1]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

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

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۹

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 بقا سلول‌های سرطانی HN5 در مقایسه با سلول‌های پیش ساز عصبی موش سوری است. سلول‌های پیش ساز عصبی از جنین های موش سوری باردار ۱۷ روزه با روش هضم آنزیمی استحصال شد. این سلول‌ها و سلول‌های پیش ساز 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 پیش ساز عصبی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). عصاره در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی را افزایش داد ($P<۰/۰۵$) و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقای آنها را کاهش داد ($P<۰/۰۵$). عصاره رزماری می‌تواند به صورت وابسته به دوز و زمان بقای سلولی را در سلول‌های سرطانی کاهش و در سلول‌های پیش ساز عصبی افزایش دهد.

کلیدواژه‌ها: بقا سلولی، رزماری، سرطان، سلول پیش ساز عصبی.

مقدمه

سرطان یک مشکل اصلی سلامتی در تمام دنیاست و شمار مبتلایان به آن روز به روز بیشتر می‌شود. یکی از شایع‌ترین انواع سرطان، سرطان‌های سروگردن هستند. شیوع این سرطان‌ها در کشورهای مختلف 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[۷،۲۸]. در ایران نیز میزان شیوع این سرطان را طی سال‌های

www.SID.ir

Arshive of SID

۱۳۸۱ تا ۱۳۸۲، ۱۳/۵ درصد برآوردکرده‌اند[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[1] 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 هستندکه 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، کمتریـن 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 آنتی اکسیدان 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 فلاونوییدهای آن دیزومتین، دیزومین و لوتئولین می‌باشد. همچنین اسانس این گیاه دارای ترکیبات فنلی کافئیک، کلروژنیک، نئوکلروژنیک، لابیاتیک اسید و نیز دارای مقدار زیادی سالیسیلات است. تریترپنوییدهای این اسانس گیاه شامل تری ترپن اولئانولیک اسید، کارنوزیک اسید و دی ترپن 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 آنتی اکسیدانی، ضد توموری، کاهش سندرم محرومیت به مرفین و مهار سمیت

[1] Squamous Cell Carcinoma (SCC)

www.SID.ir

Arshive of SID

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 تقویت کنندگی و محافظت کنندگی 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 پیش ساز عصبی می‌باشد.

مواد و روش‌کار

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 فسفاته (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 محلول تا زمان استفاده در درمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی و کشت سلول‌های پیش‌ساز عصبی موش سوری

بدین منظور یک موش سوری باردار ۱۷روزه 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 پیپت کردن، با مش‌های ٤۰ و ۷۰ میکرومتری فیلتر شدند و سوسپانسیون بافتی پس از اضافه کردن محیط کشت، با دورrpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و به پلت سلولی تشکیل شده ۵ میلی لیتر محیط‌کشت 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 ۵CO2٪، ۹۵ ٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تشکیل نوروسفر

بعد از اینکه سلول‌های پیش ساز عصبی از مغز جنین‌ها جدا شدند حدود 5×10^4 cells /cm^2 سلول در هر چاهک از ظروف کشت شش خانه غیر چسبنده (باکتریایی) به مدت ۲ تا ٤ روز همراه با محیط کشت کامل انکوبه شدند تا نوروسفر تشکیل گردد.

www.SID.ir

Arshive of SID

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 (Gibco, USA) ۱۰٪ FBS کشت و در انکوباتور(شرکت سینا،ایران)با ۵٪ CO2 ، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ °C نگهداری شدند. پس از اینکه حدود ۸۰٪ کف فلاسک توسط سلول‌ها پر شد، سلول‌های HN5 با استفاده از ترپسین 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 ۲٤، ٤۸ 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 محیط‌کشت 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 پارافرمالدهید ٤ ٪ تثبیت شدند و با استفاده از رنگ DAPI 300nM (Sigma, USA) 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 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltertrazolium Bromide) سنجیده شد. ابتدا، سلول‌های سرطانی با تعداد حدود $cells/cm^2$ ۱×۱۰^{٤} و سلول‌های پیش ساز عصبی با تعداد ۱۰ نوروسفر در هر چاهک از پلیت۹٦ چاهکی حاوی محیط‌کشت مرسوم کشت شدند. ٢٤ ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی الکلی رزماری به مدت ٢٤، ٤۸ 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 این‌صورت 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 میلی لیتر) 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) اندازه گیری 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,

www.SID.ir

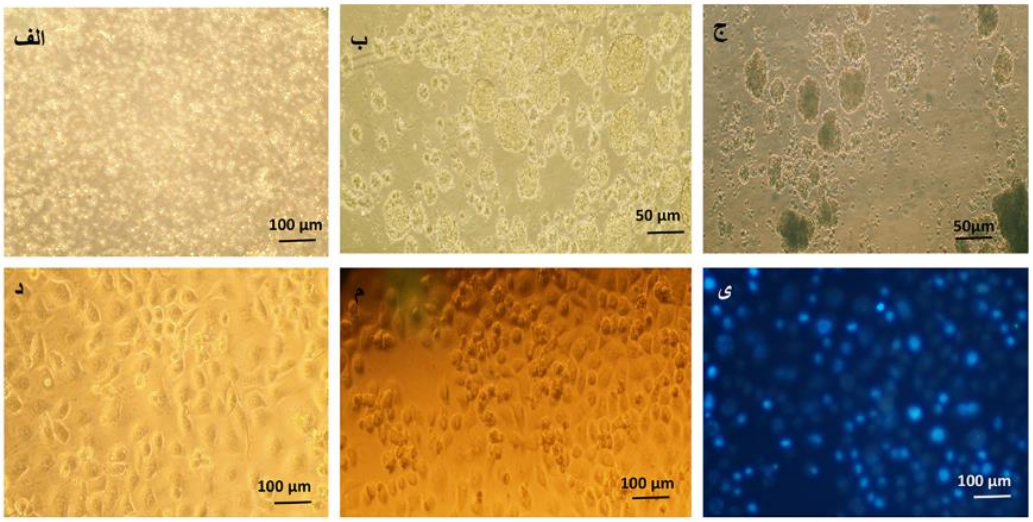
Arshive of SID

(USA) رسم و تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مورفولوژی سلولی

مشاهده مورفولوژی سلول‌ها زیر میکروسکوپ اینورت نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رزماری، تعدادی از سلول‌های سرطانی تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل کروی و چروکیده و کوچک شدند و هسته آنها چروکیده و خرد شدکه 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 میلی‌لیتر رزماری تغییرات مورفولوژی خاصی بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با نمونه کنترل نداشت. سلول‌های پیش‌ساز عصبی۷۲ ساعت بعد از کشت در ظروف باکتریایی نوروسفر تشکیل دادند. در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات مورفولوژی محسوسی در نوروسفرهای تیمار شده با غلظت‌های۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در طی سه روز مشاهده نشد اما در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییرات موفولوژیکی 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 نشانه هایی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی HN5 می‌باشد (تصویر ۱).



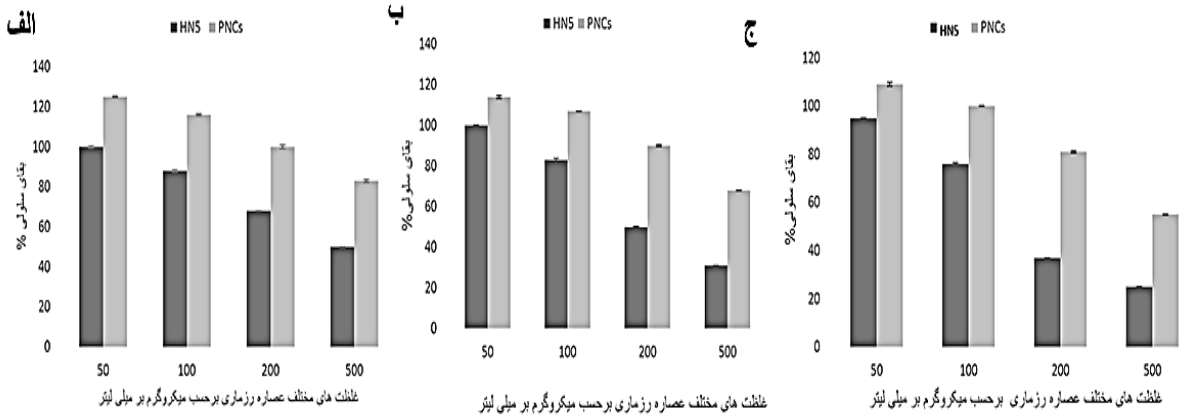
تصویر ۱- مورفولوژی سلول‌ها : الف) سلول‌های پیش ساز عصبی استخراج شده از کورتکس جنین موش سوری ۱۷ روزه ب) تشکیل نوروسفرتوسط سلول‌های پیش ساز عصبی بعد از سه روز ، ج) سلول‌های پیش ساز عصبی ۷۲ ساعت بعد از تیمار با ۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر عصاره رزماری، د) سلول های HN5 (کنترل)، م) سلول‌های HN5 ۷۲ ساعت بعد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

www.SID.ir

Arshive of SID

بقا زیستی

ارزیابی میزان بقا سلولی در دو نوع سلول نشان داد که رزماری در غلظت‌های پایین (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر) پس از زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت نه تنها روی سلول‌های پیش ساز عصبی اثر کشندگی نداشت بلکه تکثیر آنها را افزایش داد (P<۰/۰۵)، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر ۲٤ ساعت پس از تیمار، روی این سلول‌ها اثر کشندگی نداشت ولی در زمان‌های ٤۸ و ۷۲ ساعت بقا سلولی را کاهش داد (P<۰/۰۵) و در غلظت ۵۰۰ میکرومتر بر میلی لیتر در هر سه زمان بقا سلول‌ها را کاهش داد که در زمان ۷۲ ساعت بیشترین اثر کشندگی را داشت (P<۰/۰۵). در مقابل، رزماری در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بقا سلول‌های سرطانی را در هر سه زمان کاهش داد (P<۰/۰۵) ولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هیچ کدام از زمان‌ها اثر کشندگی نداشت (P>۰/۰۵). مقایسه میزان بقا بین دو نوع سلول نشان داد که رزماری در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بقا سلول‌های سرطانی را در مقایسه با سلول‌های پیش‌ساز عصبی در هر سه زمان کاهش داد (P<۰/۰۵) و بیشترین اثر کشندگی آن در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار بود (P<۰/۰۵) (تصویر ۲).



تصویر ۲- اثرات غلظت‌های مختلف عصاره رزماری بر بقای سلول‌های HN5 و پیش ساز عصبی(PNCs) در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با روشMTT انجام شد.الف) ۲٤ ساعت بعد از تیمار ب) ٤۸ ساعت بعد از تیمار ج) ۷۲ ساعت بعد از تیمار.

بحث

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

www.SID.ir

Arshive of SID

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 ٤ هفته اندازه تومور کولون را نسبت به گروه کنترل کاهش داد [۲۹]. آنالیز بیوشیمیایی سرم در موش‌های نژاد اسپراگ داولی تیمار شده با غلظت‌های کم و زیاد عصاره رزماری نشان داد که عصاره با تغییر قابل توجه سیگنالینگ ژن و پروتئین و تجمع سلول‌های لنفوئیدی 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 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 سلول های 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 پروتیئن 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 اریتروئید 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

www.SID.ir

Arshive of SID

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

سلول‌های بنیـادی 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، سلول‌های پیش سـاز چنـد کاره‌ای هستند که قادر به خودتجدیدی هستند و مـی‌توانند بـه انواع مختلف سـلول‌های سیستم عصبی شامل نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها تمایز یابند [۱۹].

در مطالعه حاضر عصاره رزماری به صورت وابسته به دوز تکثیر سلول‌های پیش ساز 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 وهمکاران 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 تکثیرکنندگی 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 صحرایی را در برابر سمیت آکریلامید محافظت کند [۳]، احتمال می‌رود رزماری به واسطه خاصیت آنتی

www.SID.ir

Arshive of SID

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 می تواند ناشی از تفاوت مسیرهای سیگنال دهی و متابولیکی بین سلول های 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 سیگنالینگی که در چسبندگی و ارتباط سلول‌های سرطانی کشت شده نقش دارند در مقایسه با سلول های 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 Nanehkaran 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.

[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.

www.SID.ir

Arshive of SID

[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 Degradationand 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 H2O2 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., 4th edition, 71-76 (In Persian).

www.SID.ir