Archive of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و عصاره لیشمانیا روی سلول‌های سرطانی گردن رحم (هلا)

رضاترکاشوند: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

حسین وزینی: استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران (*نویسنده مسئول) hossein_vazini@yahoo.com

نفیسه یوسفی محمود: استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد. گیاه رزماری دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد. انگل لیشمانیا می‌تواند به واسطه ترشح برخی مدیاتورهای التهابی و فعال کردن برخی مسیرهای القاکننده آپوپتوز، سبب کاهش رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی شود. این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره گیاه رزماری و عصاره لیشمانیا روی سلول‌های سرطانی گردن رحم (هلا) صورت گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی پس از کشت و تکثیر سلول‌های مشتق شده از بافت اپی‌تلیال گردن رحم انسان (HeLa) که از انستیتوپاستور ایران تهیه گردید، این سلول‌ها در مجاورت دوزهای مختلف لیشمانیا و عصاره رزماری (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، از روش آزمون رنگ سنجی MTT و فلوسایتومتری جهت تعیین سمیت سلولی و میزان نکروز–آپاپتوز ناشی از عصاره‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این عصاره اثر ضد سرطانی وابسته به دوز و زمان بر سلول های HeLa دارد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره و انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد. غلظت مهارکنندگی ۵۵ درصد رشد سلول ها (IC50) برای سلول های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت برای عصاره لیشمانیا ۸۳/۱۱۵ و عصاره رزماری ۶۱/۱۲۳ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. ۱/۳۵ درصد از سلول های تیمار شده توسط عصاره لیشمانیا و ۱۵/۴۳ درصد از سلول های تیمار شده توسط عصاره رزماری در هیستوگرام فلوسایتومتری در مکان سلول های نکروزی قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: عصاره لیشمانیا و رزماری با اثر وابسته به دوز و زمان بر سلول‌های سرطانی HeLa می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود؛ لذا به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، می‌توان از ترکیبات آن‌ها در درمان سرطان بهره جست.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سرطان گردن رحم،

عصاره هیدروالکلی،

رزماری،

لیشمانیا

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

شیوه استناد به این مقاله:

Torkashavand R, Vazini H, Yusefi Mahmood N. Evaluation of anticancer effects of rosemary extract and *Leishmania* extract on cervical cancer cells (HeLa). Razi J Med Sci. 2020;27(2):103-112.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

Razi Journal of Medical Sciences.2020;27(2):103-112. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of anticancer effects of rosemary extract and *Leishmania* extract on cervical cancer cells (HeLa)

Reza Torkashavand, MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran
Hossein Vazini, Assistant Professor, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran (*Coresponding author)
hossein_vazini@yahoo.com
Nafiseh Yusefi Mahmood, Assistant Professor, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran

Abstract

Background: Cervical cancer is the second most common cancer in women. Various experiments on rosemary have confirmed that the plant has potent anti-inflammatory and antioxidant properties (one of the most important risk factors for the development and progression of cancer). *Leishmania* parasite can decrease the growth and metastasis of cancer cells by secreting certain inflammatory mediators and activating some of the pathways that induce apoptosis. The aim of this study was to investigate the anticancer effects of Rosemary extract and *Leishmania* extract on cervical cancer cells (HeLa).

Methods: In this experimental study, after cultivation and propagation of HeLa - derived cells purchased from the Pasteur Institute of Iran, these cells were exposed to different doses of *Leishmania* parasitica and Rosemary extract (50, 100, 150, 200 & 250 mg/ml) and incubated for 24, 48 and 72 hours. After incubation, MTT method and flowcytometry were used to determine the toxicity of the extracts.

Results: The results of MTT test showed that the extract had concentration inhibition effect on dose and time of HeLa cells, with the highest concentration of extract and incubation of 72 hours, the highest percentage of cell death was observed. Concentration of 50% Cell Growth (IC50) for cancer cells in 24 hours for *Leishmania* extract was 110.83 mg/ml and Rosemary extract of 123.61 mg/ml. 1.30 % of the cells treated with *Leishmania* extract and 15.43% of the cells treated with rosemary extract in the flowcytometric histogram were placed in the necrosis cells.

Conclusion: *Leishmania* and Rosemary extract through dose and time dependent effect prevent growth of HeLa cancer cell line. It seems with further research, it can be used for cancer treatment.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Cervix cancer,
Hydroalcoholic extract,
Rosemary,
Leishmania

Received: 31/08/2019
Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:
Torkashavand R, Vazini H, Yusefi Mahmood N. Evaluation of anticancer effects of rosemary extract and *Leishmania* extract on cervical cancer cells (HeLa). Razi J Med Sci. 2020;27(2):103-112.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

مقدمه

پس از سرطان سینه، سرطان گردن رحم شایع‌ترین سرطان در زنان است. این سرطان بر اثر ابتلا به ویروس پاپیلومای انسانی ایجاد و از طریق تماس جنسی با فرد مبتلا منتقل می‌شود (۱ و۲). سلول‌های HeLa رده‌ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳و۴). از آنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی، آسیب های کلیوی و ... می‌شوند، دانشمندان به دنبال یافتن داروهایی هستند که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی داشته باشند، در این راستا گیاهان دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته اند .گیاهان دارویی به علت همراه داشتن ترکیبات دیگری همراه با ترکیب با اثر دارویی خاص از عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردارند (۵). تا به امروز مشخص شده که بسیاری از گیاهان رایج دارای خواص کموپروتکتیو (حفاظت کننده در برابر سرطان) می‌باشند، از جمله این گیاهان می‌توان به اعضای گونه Allium (سیر، پیاز و موسیر)، اعضای خانواده نعناعیان (ریحان، نعناع، آویشن و رزماری) و اعضای خانواده (زنجبیل و زردچوبه) اشاره نمود (۶). رزماری نیز یکی از گیاهانی است که خاصیت آنتی اکسیدانتی بالایی دارد. اما چیزی که به تازگی و در یکی دو دهه اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است خواص ضد سرطانی و آنتی کارسینوژنیک آن می‌باشد. اثرات مختلف ضد توموری از قبیل القای آپوپتوز، ضد رگ‌زایی، القای تمایز سلولی همچنین خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و تغییر متابولیسم کارسینوژنی در عصاره گیاه رزماری مشاهده شده است. رزماری گیاهی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه‌های چوبی به ارتفاع ۵۰-۱۰۰ سانتی‌متر که به حالت خودرو در مناطق مدیترانه‌ای مخصوصاً در نواحی ساحلی آن تا آسیای صغیر می‌روید. چون دارای برگ‌های سبز دائمی است و زیبایی خاص و بوی مطبوعی دارد در غالب نواحی پرورش می‌یابد. برگ‌ها و سرشاخه‌های گل‌دار رزماری حاوی اسانس‌های فرار استرها شامل بورنئول، استات، لینالول و کامفور؛ فلاوونوئیدها شامل دیوسمین، اپیژنین و دیوسمتین؛ دی‌ترپن‌ها شامل کارنوسیلیک اسید، پیکروسالوین و رزماری کوئینون؛ تری ترپنیک اسیدها شامل اورسولیک اسید و اولئانیک اسید؛ و کارنوسیک اسیدها شامل رزماریسین می‌باشد (۷). گیاه رزماری دارای اثر مدر، ضد تشنج، صفرابر می‌باشد. مقوی معده و نیرودهنده بسیار قوی است. در استعمال خارجی نیز التیام دهنده و قابض است (۸).

لیشمانیا سرده‌ای است از تک‌یاخته تریپانوزوماتید و عامل بیماری انگلی لیشمانیوز است. انگل لیشمانیا جزو تک یاخته‌های تاژک‌دار است. در بدن میزبان مهره‌دار از جمله انسان در داخل سلول‌های بیگانه خوار بافت‌ها به شکل گرد یا تخم مرغی با اندازه ۴-۲ میکرون رشد و تکثیر پیدا می‌کند. در میزبان بی مهره یا پشه خاکی که ناقل بیماری است و همچنین در محیط کشت به شکل انگلی دراز، دوکی شکل، متحرک و دارای یک رشته باریک به نام تاژک می‌باشد (۹). در دخالت لیشمانیا در فرایند مهار سلول‌های سرطانی، سازوکارهای مختلفی دخیل می‌باشد. یکی از مهم ترین سازوکارهای مداخله گر در مهار و یا سرکوب سلول‌های سرطانی، فعال کردن مسیرهای آپوپتوتیک وابسته به برخی فاکتورهای محیطی می باشد. این فاکتورهای که بعضاً ماهیتی پروتئینی دارند، به دلیل حضور انگل در محیط بدن میزبان آزاد می شود. از مهم ترین نظریه‌های مطرح شده در این زمینه وارد شدن مراحل خاصی از انگل به داخل سلول‌های سرطانی می‌باشد. مراحل پروماستیگوتی و متاسیکلیک سبب آسیب شدید به توده‌های سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۰).

آزمایش ها و تحقیقات مختلفی که بر روی گیاه رزماری انجام گرفته است مؤید این مطلب است که این گیاه دارای خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (که از مهم‌ترین ریسک فاکتورهای ایجاد و پیشروی سرطان است (۱۱))؛ اما هنوز هم آزمایش های بیشتری برای اثبات مؤثر بودن این گیاه در درمان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

سرطان لازم است. هدف این مطالعه بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری و عصاره لیشمانیا روی سلول‌های سرطانی گردن رحم (هلا) صورت خواهدگرفت.

روش کار

کشت و آماده سازی انگل لیشمانیا: در این مطالعه تجربی(in vitro) در ابتدا سویه لیشمانیا ماژور با کد استاندارد MRHO/IR/75/ER از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. جهت رشد انگل در بدن موجود زنده، سویه های خریداری شده به قاعده دم موش Balb/c تلقیح شد. جهت به حداقل رساندن میزان آلودگی میکروبی، همه اصول آسپسی و استریلیزاسیون تزریق رعایت شد. سپس بعد از گذشت حدود ۴ هفته از تزریق انگل، در محل تلقیح زخم لیشمانیوز ایجاد شد که منبع آماستیگوت مورد نیاز برای کشت بود. با اتوپسی موش های آلوده و تلقیح بافت های درگیر مثل غدد لنفاوی، کبد و یا طحال به داخل محیط کشت N.N.N اصلاح شده، عمل کشت انجام گرفت . پس از رشد، پروماستیگوت ها از این محیط NNN به محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر) در دمای مناسب نگهداری شد. انگل به دست آمده جهت بالابردن تعداد، به تعداد سه یا چهار بار کشت داده شد. با رعایت اصول آسپسی (رعایت اصول استریلیزاسیون)، از کشت چهارم به بعد برای بررسی مواد توکسوژنیک استفاده گردید. این امر به دلیل رساندن انگل به حداکثر تعداد خود می باشد. پروماستیگوت‌های به دست آمده بعد از سه بار شستشو با محلول دی-متیل سولفوکساید به محیط RPMI فاقد آنتی بیوتیک منتقل شد. به زمان بندی مناسب در بازه های زمانی ۶ ، ۱۲ ، ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه های انگل با دور ۵۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی از فیلترهای مخصوص عبور داده شد تا انگل های باقی مانده حذف شوند. مواد حاصل به عنوان مواد دفعی ترشحی مورد استفاده قرار گرفت و جهت انجام آزمایش های دیگر در دمای ۷۰- سانتی گراد نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره‌ی اتانولی رزماری: بدین منظور ۲۰۰ گرم از گیاه آسیاب شده رزماری توسط ترازوی دیجیتال وزن گردید و در یک بشر ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته شد و به آن ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه گردید. مخلوط مذکور هر چند ساعت یک بار به کمک همزن شیشه‌ای هم زده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، توسط گاز استریل ۴ لایه و قیف صاف گردید. برای جدا کردن ناخالصی‌های موجود در عصاره مورد نظر، سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. عصاره‌ی صاف شده به دستگاه تقطیر در خلاء برای خروج کامل حلال مورد نظر که اتانول بود منتقل و عصاره تا میزان ۴۰ میلی لیتر غلیظ‌تر گردید. عصاره توسط فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی استریل شده و در میکروتیوب‌های استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

در مرحله بعد غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. یک گرم از عصاره با ترازو وزن شد و در ظرف شیشه‌ای ریخته سپس توسط قاشک فلزی در کنار شعله با اضافه کردن تدریجی یک میلی‌لیتر DMSO ۱ درصد در (pH=7.2, PBS (0.15 M کاملا حل گردید (۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر). این غلظت از عصاره به عنوان ذخیره (استوک) در دمای ۲ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. از این غلظت ذخیره با استفاده از PBS غلظت‌های مورد نیاز تهیه شد. برای تهیه غلظت ۲۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره با ۸۰۰ میکرولیتر از PBS، برای تهیه غلظت ۱۰۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره و ۹۰۰ میکرولیتر از PBS در میکروتیوب حل گردید. برای سایر غلظت‌ها نیز به همین روش انجام شد (۱۲).

رده‌های سلولی مورد بررسی: در این مطالعه از رده سلولی HeLa که از بانک سلولی ایران (NCBI) واقع در انستیتو پاستور ایران خریداری شد، استفاده گردید. این رده به صورت چسبیده به کف فلاسک رشد می نماید. کشت سلولی باید مرتب کنترل می‌شد؛ رنگ محیط در اثر اسیدی شدن به زردی می گرایید که نشانده‌ی رشد و متابولیسم بالای سلول و افزایش pH محیط کشت می‌باشد که در این صورت محیط کشت باید تعویض می‌شد. بسته به رشد سلول‌ها معمولاً بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط سلول‌ها تعویض می‌شد. به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

این منظور با پیپت‌های استریل محیط قبلی سلول‌ها را خارج و حدود ۵ میلی لیتر محیط جدید به آن افزوده می‌شد. فلاسک‌ها با درب نیمه باز (به منظور صورت گرفتن تبادلات گازی) در انکوباتور قرار داده شد. سپس مراحل پاساژ سلولی، انجماد سلول‌ها و ذوب سلول‌ها به ترتیب انجام شد و سلول‌ها به فلاسک انتقال داده شدند و فلاسک به انکوباتور ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد قرار گرفت.

تعیین غلظت کشنده ۵۰ درصدی(IC_{50}) برای عصاره و انگل لیشمانیا: برای بررسی تاثیر عصاره رزماری و انگل لیشمانیا بر روی بقای رده‌ی سلولی HeLa از روش سنجش MTT استفاده شد. برای تهیه محلول MTT به غلظت۵ میلی گرم بر میلی لیتر که به طور معمول در روش سنجش MTT استفاده می‌شود، ۵۰ میلی گرم از پودر MTT را در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات حل کرده، سپس توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل می‌گردد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها (۱۰ هزار سلول) در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط RPMI 1640، حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. عصاره رزماری و انگل لیشمانیا رقیق شده (غلظت‌های ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰، ۱/۶۴۰)، از هر کدام به چاهک‌های جداگانه به صورت ۳ تکرار اضافه شدند. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه کرده و به مدت۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. مایع رویی را حذف کرده، و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتاژ، جذب در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از ELISA Reader (BioTek ELx808) خوانده شد. به منظور تبدیل OD درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر استفاده شد و درصد حیات سلول‌ها در مورد هر غلظت، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید (۱۳).

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{OD \text{ تست}}{OD \text{ شاهد}} \times 100$$

غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد به عنوان IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) در نظر گرفته شد.

بررسی آپوپتوز به وسیله رنگ‌آمیزی Annexin وPI فلوسایتومتری: ابتدا $10^5 \times$ ۱-۵ سلول در هر لوله ریخته شده و با 1XBinding Buffer به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. برای حذف محیط، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. «توجه: رنگ FITC با PI همپوشانی دارند و برای تنظیم صحیح و رفع همپوشانی رنگ‌ها، باید تصحیح همپوشانی (Compensation) صورت گیرد. برای این منظور چهار لوله مورد نیاز است. به عنوان مثال یک لوله بدون رنگ، لوله حاوی Annexin V-FITC ، لوله حاوی رنگ PI و لوله آخر که دارای هر دو رنگ FITC و PI است.» لوله اول که همان سلول بدون رنگ است در ۴ درجه نگه داری شد. به لوله دوم و لوله چهارم ۵ میکرولیتر Annexin V – FITC (ab-14085) اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، لوله‌ها با ۱ میلی‌لیتر Binding Buffer 1X شستشو داده شده و سانتریفیوژ (۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. محلول رویی خارج شده و ۵۰۰ میکرولیتر دیگر از Binding Buffer 1X اضافه گردید. در زمان خوانش نمونه‌ها، به لوله سوم و چهارم ۳ میکرولیتر PI اضافه شد. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey با از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ جهت بررسی و معنی‌داری در سطح ($P\leq ۰/۰۵$) صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داد، سلول‌های سرطانی (HeLa) تحت تأثیر عصاره تفاوت‌های بارز و وابسته به دوز عصاره را نشان دادند. به طوری که به تدریج و با افزایش دوز کمترین درصد زیستایی مشاهده شد. نتایج حاصل از اثر عصاره لیشمانیا بر رده سلول سرطانی هلا در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد به طوری که کمترین بقای سلولی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. غلظت IC50 عصاره لیشمانیا در مدت

www.SID.ir

Archive of SID

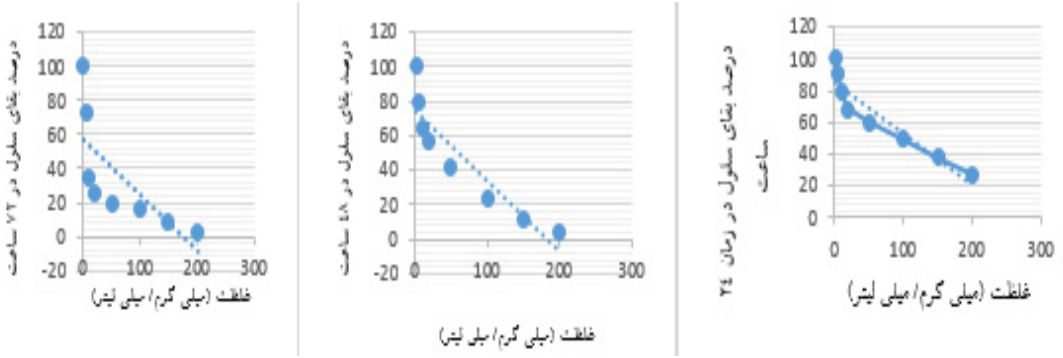
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

زمان ۲۴ ساعت ۱۱۰/۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در انکوباسیون ۴۸ ساعته کاهش درصد زیستایی وابسته به دوز مشاهده شد به طوری که درصد زیستایی از ۴۱ درصد در غلظت (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به ۴ درصد در غلظت (۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کاهش یافت. غلظت IC50 عصاره لیشمانیا در مدت زمان ۴۸ ساعت ۶۱/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز کاهش درصد زیستایی مشاهده شد به طوری که درصد زیستایی از ۲۰ درصد در غلظت (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به کمتر از ۳ درصد در (۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کاهش یافت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که نرخ تکثیر سلول‌های رده‌ی سلولی HeLa با افزایش غلظت عصاره انگل لیشمانیا (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کاهش می‌یابد، به طوری که کمترین میزان تکثیر این سلول‌ها مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره انگل لیشمانیا می‌باشد (نمودار ۱).

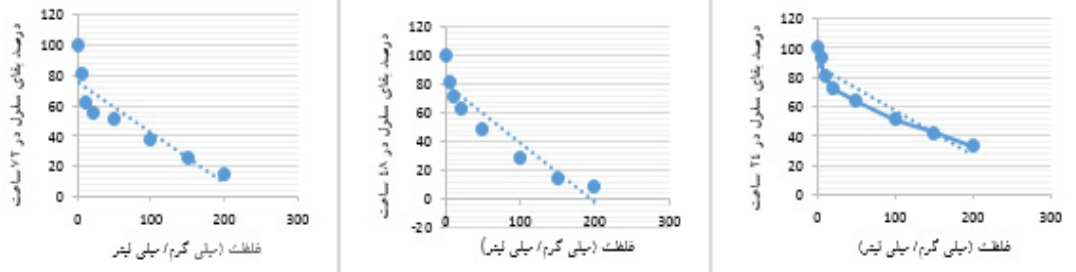
اثر سمیت عصاره رزماری بر رده سلول‌های سرطانی: نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره رزماری توانسته در دوزهای مختلف باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شود. نتایج مقایسه دوزهای مختلف عصاره بر روی رده سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز تیماری عصاره، نوان زیستی سلول‌ها کاهش نشان داد.

مقایسه درصد رشد سلولی در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که عصاره رزماری با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت بیشترین اثر خود را گذاشته و موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده است. غلظت IC50 عصاره رزماری در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۲۳/۶۱، ۷۲/۵۲ و ۳۲/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (نمودار ۲).

مقایسه IC50 عصاره رزماری و لیشمانیا بر رده سلول‌های سرطانی HeLa: مقدار IC_{50} (غلظت مهار ۵۰ درصد سلول‌ها) برای سلول‌های سرطانی گردن رحم تحت تیمار عصاره لیشمانیا به مدت ۲۴ ساعت ۱۱۰/۸۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره رزماری به مدت ۲۴ ساعت ۱۲۳/۶۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین غلظت IC_{50} برای عصاره رزماری بیشتر از مقادیر به دست آمده برای عصاره لیشمانیا بود. در نتیجه، سلول‌های HeLa نسبت به عصاره لیشمانیا حساس‌تر از



نمودار ۱- تعیین IC_{50} عصاره لیشمانیا در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



نمودار ۲- تعیین IC_{50} عصاره رزماری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

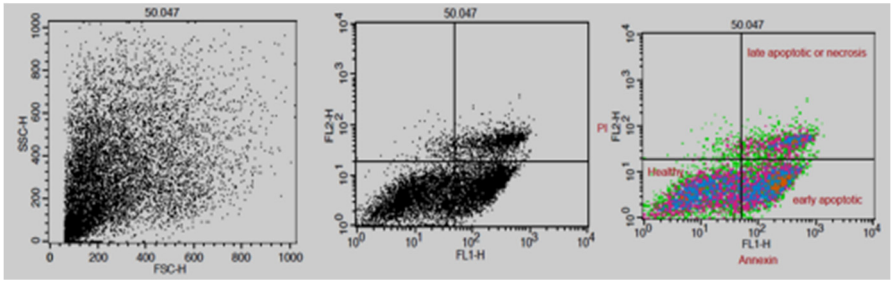
عصاره رزماری بودند.

نتایج فلوسایتومتری عصاره رزماری: نتایج دوزهای مختلف عصاره بر روی رده سلول سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز عصاره رزماری آپوپتوزیس افزایش یافت (شکل ۱).

با توجه به شکل ۱ سلول‌های زنده (LL)، سلول‌هایی که دچار نکروز شده و در ناحیه LR قرار گرفتند و همچنین سلول‌هایی که آپوپتوز تاخیری دارند (UR) قابل مشاهده است که درصد آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin را گرفتند و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آن‌ها اندکی نفوذ پذیر شده با دو رنگ Annexin و رنگ PI رنگ شده و سلول‌هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هر کدام در Plot فلوسایتومتری جداگانه قرار گرفته و به این ترتیب دسته‌های مختلف سلولی جدا شدند (شکل ۲).

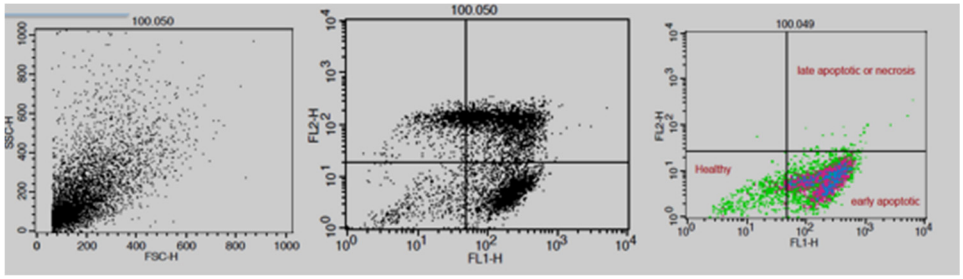
بر اساس اطلاعات (جدول ۲) جمعیت سلول‌های با آپوپتوز اولیه پس از ۷۲ ساعت تیمار رده سلول سرطانی HeLa با عصاره لیشمانیا ۸۴/۹۲ درصد بود، در حالی که تحت تاثیر عصاره رزماری جمعیت سلول‌ها با آپوپتوز اولیه ۳۸/۶۹ درصد بود. داده‌ها بیانگر تاثیر بیشتر عصاره لیشمانیا در مقایسه با عصاره رزماری بر سلول‌های سرطانی HeLa است.



شکل ۱– داده‌های فلوسایتومتریک نشان دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با عصاره رزماری. جمعیت سلول‌ها برای چهار حالت ممکن (یک چهارم ها: quadrant): جمعیت سلول‌های زنده (یعنی، سلول‌هایی که کنترل‌های منفی برای آنکسین Vو پروپیدیوم یدید PI ارائه می‌دهند؛ یک چهارم چپ، پایین). جمعیت سلول‌هایی که متحمل آپوپتوز می‌شوند (PI منفی و V Annexin مثبت؛ یک چهارم راست،پایین)، سلول‌های درگیر در آپوپتوز تاخیری یا نکروز، مثبت برای هر دو رنگ؛ یک چهارم راست، بالا)، سلول های نکروتیک که به صورت مکانیکی تخریب شده اند فقط از نظر PI مثبت هستند؛ یک چهارم چپ، بالا).

جدول ۱– درصد مرگ سلولی مشاهده شده به وسیله‌ی آزمون فلوسایتومتری بر روی رده سلول سرطانی HeLa تیمار شده با عصاره رزماری

	جمعیت سلول زنده (LL)	جمعیت سلول‌های با آپوپتوز اولیه (LR)	جمعیت سلول‌های با نکروز تاخیری (نهایی) (UL)	جمعیت سلول‌های با آپوپتوز تاخیری و نکروز اولیه (UR)
Events	۴۴۰۵	۳۸۶۹	۱۸۳	۱۵۴۳
٪ Gated	۴۴/۰۵	۳۸/۶۹	۱/۸۳	۱۵/۴۳
٪ Total	۴۴/۰۵	۳۸/۶۹	۱/۸۳	۱۵/۴۳



شکل ۲– داده‌های فلوسایتومتریک نشان دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با عصاره لیشمانیا

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

جدول ۲- درصد مرگ سلولی مشاهده شده به وسیله‌ی آزمون فلوسایتومتری بر روی رده سلول سرطانی HeLa تیمار شده با عصاره لیشمانیا

	جمعیت سلول زنده (LL)	جمعیت سلول‌های با آپوپتوز اولیه (LR)	جمعیت سلول‌های با نکروز تاخیری (نهایی) (UL)	جمعیت سلول‌های با آپوپتوز تاخیری و نکروز اولیه (UR)
Events	۵۵۹	۳۴۵۲	۱	۵۳
٪ Gated	۱۳/۷۵	۸۴/۹۲	۰/۰۲	۱/۳۰
٪ Total	۱۳/۷۵	۸۴/۹۲	۰/۰۲	۱/۳۰

بحث و نتیجه‌گیری

در سرطان گردن رحم رشد بافت بدخیم از ناحیه گردن رحم شروع شده و به طور نامنظم و به سرعت تکثیر می‌گردد. عوامل ایجاد کننده این بیماری شامل عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی است، که باعث ترانسفورماسیون سلول‌های اپی‌تلیالی در این ناحیه می‌گردد. مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین علت ایجاد این بیماری ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) می‌باشد که در واقع عامل ضروری برای ایجاد این سرطان می‌باشد.

هدف اصلی از درمان سرطان توسط مواد طبیعی و شیمیایی کند کردن یا مهار فرایند سرطان‌زایی می‌باشد. این نگرش به طور هدفمند روی مسیرهای داخلی غیر طبیعی سلولی متمرکز می‌باشد. درمان‌های رایج سرطان دهانه رحم دارای اثرات جانبی قابل توجهی است. محصولات طبیعی با فتوشیمیایی با توجه به مزایای مانند ایمن‌تر بودن و مقاومت دارویی کمتر جایگاه ویژه‌ای در درمان پیدا کرده‌اند. تلاش‌های بسیاری در راستای توسعه اثربخشی داروهای ضد سرطان گیاهی در حال انجام است. ۶۰ درصد داروهای ضد سرطان از منابع طبیعی مشتق شده اند. داروهای گیاهی سرطان از طریق مهار تکثیر سلولی، القا آپوپتوز و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی همچنین تعدیل مکانیسم استرس اکسیداتیو اثرات خود را بروز می‌دهند (۱۴). در نتیجه در سال‌های اخیر استفاده از داروهای طبیعی گیاهی برای پیشگیری و درمان سرطان مطرح شده است. با توجه به این که خواص دارویی رزماری به اثبات رسیده است و نظر به اهمیت موضوع در استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان سرطان و به دلیل شناخت و بررسی اثرات ضد سرطانی این گیاه و نقش آن درکنترل رشد و یا مرگ سلول‌ها، تحقیق حاضر به بررسی و مطالعه ای اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر روی سلول های رده HeLa پرداخته است. رده سلولی انتخاب شده به عنوان مدل کاملاً شناخته شده برای مطالعات سرطان دهانه رحم در خارج از بدن موجود زنده کاربرد وسیعی داشته و نتایج حاصل بر روی این رده سلولی می‌تواند در شرایط in vivo نیز بررسی شود (۱۵). مطالعاتی که تا کنون در رابطه با اثرات ضد تکثیری و و سایتوتوکسیک عصاره الکلی رزماری بر روی رده‌های سلولی سرطانی انسانی از جمله HL60، K562، MCF7 و MDA-MB-468 (M14، 375 A صورت گرفته نشان می‌دهد IC50 عصاره وابسته به نوع سلول بوده و در رده‌های سلولی مختلف متفاوت است (۱۶).

نتایج مطالعه تای و همکاران نشان داد که عصاره رزماری اثر کشندگی مهمی بر سلول‌های سرطانی رحم انسان دارد. مطالعه مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های A2780 تیمار شده با عصاره رزماری نشان داد که بیان ژن‌های تنظیم کننده مرگ سلولی برنامه ریزی شده تحت تیمار رزماری تغییر کرده است. مطالعه مذکور نشان داد عصاره رزماری تکثیر سلول‌های سرطانی رحم انسان را با تاثیرگذاری بر چرخه سلول در فازهای متعدد مهار می‌کند و این عمل را با تغییر بیان ژن‌های متعدد تنظیم کننده مرگ سلولی برنامه ریزی شده القا کرده است (۱۷). برخی از انگل‌ها دارای توان کنترل و حتی مهار سلول‌های سرطانی شده می‌باشند. تحقیقات اخیر نشان داده است که گونه‌های مختلف مالاریا، فاسیولا هپاتیکا و حتی انگل‌هایی نظیر لیشمانیا که می‌تواند برای انسان خطرناک باشد، به نوعی در کنترل سرطان نقش دارند (۱۸). در مطالعه حاضر که اثرات تخریبی سموم به دست آمده از غلظت‌های مختلف عصاره انگل لیشمانیا مورد ارزیابی قرار گرفت نشان داده شد که این انگل در مقیاس‌های کنترل شده و با غلظت‌های مناسب، می‌تواند دارای خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های سرطانی گردن رحم باشد. این در حالی بود که، با انجام تست MTT در غلظت‌های مختلف و بازه‌های زمانی مختلف، مشخص شد که غلظت‌های بالای عصاره انگل لیشمانیا در زمان‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

طولانی ۷۲ ساعته، اثراتی به مراتب بیشتر و کشنده‌تر علیه سلول‌های سرطانی رده HeLa داشت. انگل لیشمانیا نقش بسیار مهمی در ترشح برخی پروتئین‌های مهاری آنژوژنز می‌تواند داشته باشد. آنژیوژنز فرآیند تشکیل عروق جدید از عروق از پیش تشکیل شده و مهم‌ترین مکانیسم برای تامین احتیاجات سلول‌هایی است که در فاصله دورتری از عروق خونی موجود قرار دارند. اگرچه آنژیوژنز برای بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مثل رشد و تکوین، ترمیم زخم و تولیدمثل ضروری می‌باشد، اما در شرایط پاتولوژیک مانند رشد تومور، متاستاز و خیلی از بیماری‌های مزمن نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۹). نتایج به دست آمده از این مطالعه از اثر دهی عصاره لیشمانیا بر رده سلولی سرطان گردن رحم HeLa نشان داد که در غلظت‌های خاصی از عصاره این انگل، رشد سلول‌های سرطانی مهار گردید. این در حالی بود که در برخی غلظت‌های مرگ سلولی به بیشترین حالت خود، یعنی ۱۰۰ درصد نیز نزدیک بود و میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی در حداقل‌ترین حالت ممکن قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان از اثر بخشی موثر این انگل در کنترل و برخی موارد مهار رشد سلول‌های سرطانی داشت. مشاهدات مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف هم‌خوانی داشت. در مطالعه‌ای که بر روی نقش انگل لیشمانیا در بروز آپوپتوز صورت گرفته بود، مشخص شد که این انگل در فعال کردن برخی مسیرهای آپوپتوتیکی نقش بسیار مهمی دارد. این انگل با فعال کردن مسیرهای وابسته به Fas/FasL آپوپتوز سبب فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی می‌گردد. انگل لیشمانیا با فعال کردن مسیرهای وابسته به مرگ و همچنین در کنار آن فعال کردن TRAIL/TRAIL-R1 ها سبب راه اندازی آبشارهای آپوپتوتیک در مسیرهای مرگ سلول می‌شود (۲۰). در بررسی‌های انجام شده بر روی اثر بخشی انگل لیشمانیا در مسیر کنترل سلول‌های سرطانی، مشاهده شد که این انگل می‌تواند مسیرهای وابسته به P53 و مسیرهای آپوپتوز وابسته به میتوکندری مانند Bax و فعال کردن کاسپاز۳ را نیز سبب شود. انگل لیشمانیا با قرار گیری در بدن میزبان و آزاد سازی برخی پروتئین خاص، سبب فعال شدن مسیرهای Bax/Bcl-2 و فعال شدن مستقیم کاسپاز۳ می‌شود. در این بین سلول‌های سرطانی را مجبور به ورود به فاز مرگ می‌کند. با بررسی انجام شده بر میزان بیان ژن‌های دخیل در کد کردن کاسپاز۳ و مسیرهای دخیل در Bax/Bcl-2 مشخص شد که با حضور و افزایش فعالیت این انگل و همچنین بالا بردن غلظت‌های دوز تزریقی به میزبان، میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای مرگ سلولی تحت تاثیر قرار گرفت. انگل لیشمانیا می‌تواند کینازهای فعالی را تولید کند که اثرات مطلوبی را بر مهار تشکیل آنژوژنز شود. این در حالی است که این انگل یکی از مسیرهایی که این انگل می تواند به واسطه آن تسریع رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند، مسیرهای وابسته به آنژیوژنزهای می‌باشد. در برخی از مطالعات بیان شده است که این انگل ممکن است با اثرات کینازی ضد سرطانی خود، برخی مسیرهای مهاری رشد سلول را فعال کند (۲۱).

هنوز به روشنی مشخص نیست مکانسیم‌های دخیل در ساز و کار دخالت انگل لیشمانیا در بروز یا عدم بروز سرطان به چه نحوی است، اما با بررسی برخی متغیرهای غیر مستقیم، از قبل فعالیت و حضور برخی اینترلوکین‌های دخیل در راه اندازی آبشارهای وابسته به آپوپتوز، می‌تواند این امر را در ذهن پررنگ کند که، این انگل در شرایطی کنترل شده، قادر به تنظیم برخی مسیرهای نکروز، آپوپتوز و مسیرهای جانبی می‌باشد. البته نباید این نکته را فراموش کرد که حضور پروتئین‌های سمی و ترشحی انگل لیشمانیا در فازهای حاد و مزمن، اثر نامطلوبی را به واسطه فعال کردن سیستم‌های کاپونتی فعال می‌توانند بر بدن و سلول‌های بدن بگذارند. گلیکوپروتئین‌ها در بیولوژی انگل‌ها و همین طور در القای احتمالی پاسخ ایمنی میزبان نقش دارند. از این رو به عنوان مولکول‌هایی جهت درمان سرطان‌ها مطرح می‌باشند (۲۲ و ۲۳).

نتایج نشان داد، سلول‌های سرطانی (HeLa) تحت تاثیر عصاره تفاوت‌های بارز و وابسته به دوز را نشان دادند. به طوری که به تدریج و با افزایش دوز کمترین درصد زیستایی مشاهده شد؛ اما سلول‌های سرطانی بدون تأثیر عصاره تغییرات مشخصی را نشان ندادند. آنالیز آماری نتایج نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته درصد زیستایی با افزایش دوز عصاره رزماری در رده سلولی HeLa کاهش یافت. به طوری که درصد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 10:08 IRST on Tuesday October 20th 2020

زیستایی از ۶۴ درصد (در غلظت ۵۰ میلی گرم برمیلی لیتر) به ۳۳ درصد (در غلظت ۲۰۰ میلی گرم برمیلی لیتر) کاهش یافت که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p<0/05$). در انکوباسیون ۴۸ ساعته کاهش درصد زیستایی وابسته به دوز مشاهده شد. به طوری که درصد زیستایی ۴۹ درصد (در غلظت ۵۰ میلی گرم برمیلی لیتر) به ۹ درصد (در غلظت ۲۰۰ میلی گرم برمیلی لیتر) کاهش یافت. در انکوباسیون ۷۲ ساعته نیز کاهش درصد زیستایی مشاهده شد.

References

1. Baharlou R, Atashzar MR, Vasmehjani AA, Rahimi E, Khoshmirsafa M, Seif F, et al. Reduced levels of T-helper 17-associated cytokines in the serum of patients with breast cancer: indicators for following the course of disease. Cent Ent Eur Immunol. 2016;41(1):78.
2. Cox JT, Castle PE, Kitchener HC. Achievements and limitations of cervical cytology screening. Vaccine. 2006;24:S63-S70.
3. Ghorbani A, Ghorbanihesari T, Mortazavian M. Effect of aqueous extract - alcohol b and its fractions brtksyr cervical cancer cells. Iran J Obstet Gynecol Infertil. 2012;15(22):9-16.
4. Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. Anticancer attributes of desert plants: a review. Anticancer Drugs. 2012;23:255-71.
5. Lazhiry A, Vlak J. Herb plants. Translated to Persian by: Zaman S. Tehran: Ghoghnoos Pub;1993.
6. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, et al. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through downregulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. Carcinogenesis. 2002;23(6):983-91.
7. Gao M, Feng L, Jiang T, Zhu J, Fu L, Yuan D, et al. The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (Trachinotus ovatus) fillet during chilled storage. Food Control. 2014;37:1-8.
8. Zargari A. Medicinal Plants. Vol. 3, 6th ed. Tehran University Publication, Tehran 1996; 538.
9. Ryan KJ, Ray CG (editors). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). New York: McGraw Hill; 2004p. 749–54.
10. Pitaluga AN, Mason PW, Traub-Cseko YM. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, Lutzomyia longipalpis. Dev Comp Immunol. 2008; 32:191–7.
11. Mohsenzadegan M, Seif F, Farajollahi MM, Khoshmirsafa M. Anti-oxidants as chemopreventive agents in prostate cancer: A gap between preclinical and clinical studies. Recent Pat Anti-Cancer. 2018;13(2):224-39.
12. Javadi Marand F, Saraei M, Jahani - Hashemi H, Haji Aghaee R. Study of anti-toxoplasmic effect of plant extract of turmeric, turmeric, Artemisia, T. shirazi, Sorkhar Flowers and black pepper in in vitro. J Qazvin Univ Med Sci Health Serv. 2015;57-83.
13. Zaker F. Anti tumoral and differentiation effects of alkaloids of harmine andharmaline on leukaemic cells treated with atra and G-CSF. Razi J Med Sci. 2004;10(38):869-76.
14. TaherianFard A, Hasan F, Bandehpour M, Mosaffa N, Mashhadi Abbas F, Hameed A, et al. Cloning and expression of C-terminal of Clostridium perfringens type A enterotoxin and its biological activity. Afr J Microbiol Res. 2010;4(14):1469-74.
15. Sai L, Xiaoping X, Xin Z, Longjiang L, Qianmimng C, Jing L. Tumor□targeting bacterial therapy: A potential treatment for oral cancer. Oncol Lett. 2014:2359-66.
16. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis. Oncol Rep. 2006;17:1525-31.
17. Tai J, Cheung S, Wu M, Hasman D. Antiproliferation effect of Rosemary rosmarinus officinalis) on human ovarian cancer cells in vitro. Phytomedicine. 2012;19(5):436-43.
18. Chen L, He Z, Qin L, Li Q, Shi X, Zhao S, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity. PLoS One. 2011;6(9):e24407.
19. Jahani M, Modaressi M H, Mansouri K. Hypoxia inducible factor: It's role in angiogenesis and tumor. Tehran Univ Med J. 2016;73(11):757-66 .
20. Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+ CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. J Exp Med. 2007;204(4):805-17.
21. Sanderson L, Yardley V, Croft SL. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against Leishmania spp. J Antimicrob Chemother. 2014;69(7):1888-91.
22. Yousofi Darani H, Soozangar N, Khorami S, Taji F, Yousofi M, Shirzad H. Hydatid cyst protoscolices induce cell death in WEHI-164 fibrosarcoma cells and inhibit the proliferation of baby hamster kidney fibroblasts in vitro. J Parasitol Res. 2012.
23. Hajilooi M, Lotfi P, Seif F, Bazmani A, Momeni M, Ravary A, et al. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4+ 49A/G single nucleotide polymorphism association with visceral leishmaniasis. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(10): e12143.

www.SID.ir