



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

رضاتر کاشوند: 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

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

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان گردن رحم،
عصاره هیدروالکلی،
رزماری،
لیشمانیا

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 مدياتوره‌های 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 سلول‌های HeLa دارد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره و انکوباسیون ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ سلولی مشاهده شد. غلظت مهارکنندگی ۵۵ درصد رشد سلول‌ها (IC50) برای سلول‌های 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 سلول‌های تیمار شده توسط عصاره لیشمانیا و ۱۵/۴۳ درصد از سلول‌های تیمار شده توسط عصاره رزماری در هیستوگرام فلوسایتومتری در مکان سلول‌های 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.

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 به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



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 (*Corresponding 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.



سرشاخه‌های گل‌دار رزماری حاوی اسانس‌های فرار استرها شامل بورنئول، استات، لینالول و کامفور؛ فلاونوئیدها شامل دیوسمین، اپیژنین و دیوسمتین؛ دی‌ترین‌ها شامل کارنوسیلیک اسید، پیکروسالوین و رزماری کوئینون؛ تری‌ترینیک 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 تک‌یاخته‌های ترپانوزوماتید و عامل بیماری انگلی لیشمانیوز است. انگل لیشمانیا جزو تک‌یاخته‌های 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 بی‌مهره یا پشه‌خاکی 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 مهم‌ترین سازوکارهای مداخله گر در مهار و یا سرکوب سلول‌های سرطانی، فعال کردن مسیره‌های آپوپتوتیک وابسته به برخی فاکتورهای محیطی می‌باشد. این فاکتورهای که بعضاً ماهیتی پروتئینی دارند، به دلیل حضور انگل در محیط بدن میزبان آزاد می‌شود. از مهم‌ترین 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).

آزمایش‌ها 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 آزمایش‌های بیشتری برای اثبات مؤثر بودن این گیاه در درمان

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 و ۲). 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 (۳ و ۴). از آنجا که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث اختلالات گوارشی، آسیب‌های 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 گرفته‌اند. 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 (حفاظت‌کننده 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 آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. اما چیزی که به تازگی و در یکی دو دهه اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است خواص ضد سرطانی و آنتی‌کارسینوژنیک آن می‌باشد. اثرات مختلف ضد توموری از قبیل القای آپوپتوز، ضد رگ‌زایی، القای تمایز سلولی همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی، 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

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

روش کار

کشت و آماده سازی انگل لیثمانیا: در این مطالعه تجربی (in vitro) در ابتدا سویه لیثمانیا 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 لیثمانیوز ایجاد شد که منبع آماستیگوت مورد نیاز برای کشت بود. با اتوپیسی 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. پروماستیگوت های 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 ترشحي مورد استفاده قرار گرفت و جهت انجام آزمایش های دیگر در دمای ۷۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره اتانولی رزماری: بدین منظور ۲۰۰ گرم

از گیاه آسیاب شده رزماری توسط ترازوی دیجیتالی 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 ناخالصی های موجود در عصاره مورد نظر، سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. عصاره 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 میکروتیوب های استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در مرحله بعد غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر 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 میلی لیتر DMSO ۱ درصد در (pH=7.2) PBS (0.15 M) کاملاً 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 غلظت های 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 غلظت ها نیز به همین روش انجام شد (۱۲).

رده های 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 می شود؛ رنگ محیط در اثر اسیدی شدن به زردی می گراید که نشانه‌ی رشد و متابولیسم بالای سلول و افزایش pH محیط کشت می باشد که در این صورت محیط کشت باید تعویض می شود. بسته به رشد سلول ها معمولاً بعد از گذشت ۴۸ ساعت محیط سلول ها تعویض می شود. به

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 و PI فلوسایتومتری: ابتدا $10^5 \times 5-1$ سلول در هر لوله ریخته شده و با Binding Buffer 1X 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 سانتی‌گراد 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 واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ جهت بررسی و معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ 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 IC_{50} عصاره لیشمانیا در مدت

این منظور با پیپت‌های استریل محیط قبلی سلول‌ها را خارج و حدود ۵ میلی‌لیتر 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 CO_2 ۵٪ 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 غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که به طور معمول در روش سنجش MTT استفاده می‌شود، ۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT را در ۱۰ میلی‌لیتر 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 مدت ۴ 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 (BioTek ELISA Reader (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

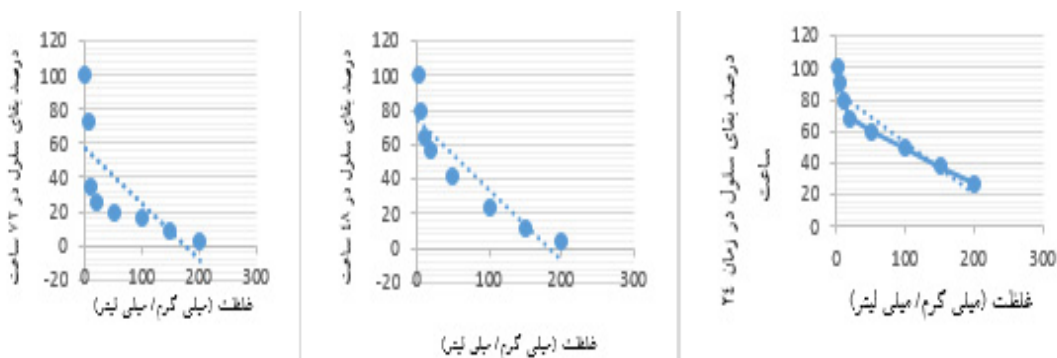
شود. نتایج مقایسه دوزهای مختلف عصاره بر روی رده سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز تیماری عصاره، نوان زیستی سلول‌ها کاهش نشان داد.

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 میلی گرم بر میلی لیتر بود (نمودار ۲).

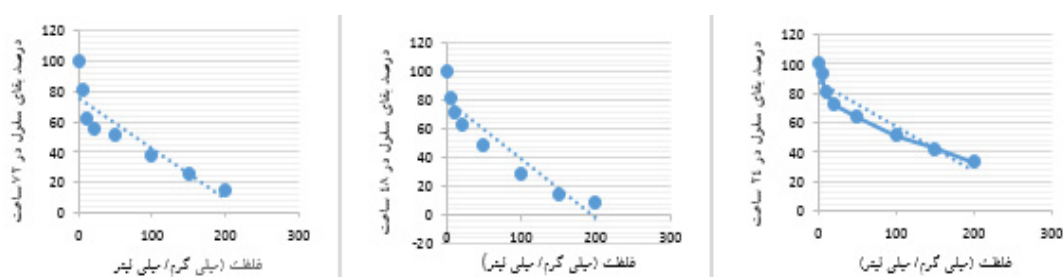
مقایسه IC50 عصاره رزماری و لیشمانیا بر رده سلول‌های سرطانی HeLa: مقدار IC50 (غلظت مهار ۵۰ درصد سلول‌ها) برای سلول‌های سرطانی گردن رحم تحت تیمار عصاره لیشمانیا به مدت ۲۴ ساعت ۱۱۰/۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره رزماری به مدت ۲۴ ساعت ۱۲۳/۶۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین غلظت IC50 برای عصاره رزماری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

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 میلی گرم بر میلی لیتر) کاهش می‌یابد، به طوری که کمترین میزان تکثیر این سلول‌ها مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر 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



نمودار ۱- تعیین IC50 عصاره لیشمانیا در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



نمودار ۲- تعیین IC50 عصاره رزماری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

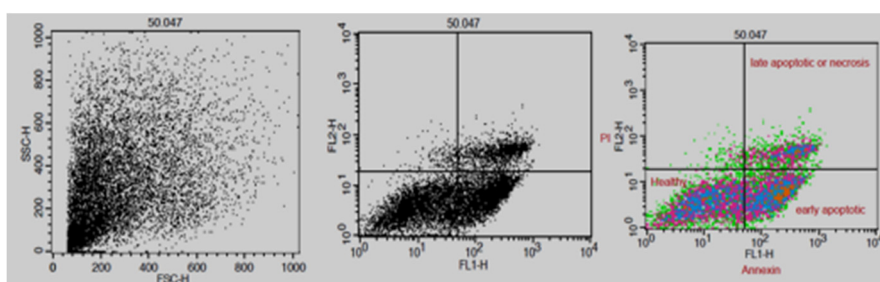
نفوذ پذیر شده با دو رنگ Annexin و رنگ PI رنگ شده و سلول‌هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هر کدام در Plot فلوسایتومتری جداگانه قرار گرفته و به این ترتیب دسته‌های مختلف سلولی جدا شدند (شکل ۲).

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.

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.

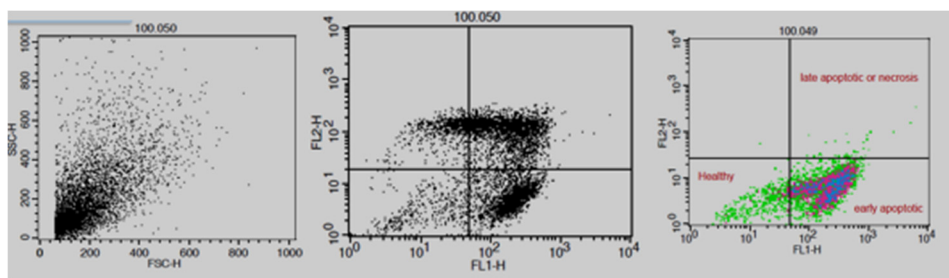
در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin را گرفتند و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آن‌ها اندکی



شکل ۱- داده‌های فلوسایتومتری 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 V و پروپیدیوم بیدید PI ارائه می‌دهند؛ یک چهارم چپ، پایین). جمعیت سلول‌هایی که متحمل آپوپتوز می‌شوند (PI منفی و Annexin V مثبت؛ یک چهارم راست، پایین)، سلول‌های درگیر در آپوپتوز تاخیری یا نکروز، مثبت برای هر دو رنگ؛ یک چهارم راست، بالا)، سلول‌های 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 فلوسایتومتری نشان دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با عصاره لیشمانیا

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

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) A 375 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

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 پاپیلوما 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 مسیره‌های 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 شده‌اند. داروهای گیاهی سرطان از طریق مهار تکثیر سلولی، القا آپوپتوز و تنظیم مسیره‌های 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 در کنترل رشد و یا مرگ سلول‌ها، تحقیق حاضر به بررسی و مطالعه ای اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر روی سلول‌های رده HeLa پرداخته است. رده سلولی انتخاب شده به عنوان مدل کاملاً شناخته شده برای

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 کاسپاز ۳ و مسیره‌های دخیل در Bax/Bcl-2 مشخص شد که با حضور و افزایش فعالیت این انگل و همچنین بالا بردن غلظت‌های دوز تزریقی به میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیره‌های مرگ سلولی تحت تاثیر قرار گرفت. انگل لیشمانیا می‌تواند کینازهای فعالی را تولید کند که اثرات مطلوبی را بر مهار تشکیل آنژیوژنز شود. این در حالی است که این انگل یکی از مسیره‌هایی که این انگل می‌تواند به واسطه آن تسریع رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند، مسیره‌های وابسته به آنژیوژن‌های می‌باشد. در برخی از مطالعات بیان شده است که این انگل ممکن است با اثرات کینازی ضد سرطانی خود، برخی مسیره‌های مهار 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 مسیره‌های نکروز، آپوپتوز و مسیره‌های جانبی می‌باشد. البته نباید این نکته را فراموش کرد که حضور پروتئین‌های سمی و ترش‌های انگل لیشمانیا در فازهای حاد و مزمن، اثر نامطلوبی را به واسطه فعال کردن سیستم‌های کاپوننتی فعال می‌توانند بر بدن و سلول‌های بدن بگذارند. گلیکوپروتئین‌ها در بیولوژی انگل‌ها و همین‌طور 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

طولانی ۷۲ ساعته، اثراتی به مراتب بیشتر و کشنده‌تر علیه سلول‌های سرطانی رده HeLa داشت. انگل لیشمانیا نقش بسیار مهمی در ترشح برخی پروتئین‌های مهارتی آنژیوژنز می‌تواند داشته باشد. آنژیوژنز فرآیند تشکیل عروق جدید از عروق از پیش تشکیل شده و مهم‌ترین مکانسیم 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 ماندن 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 مسیره‌های آپوپتوتیکی نقش بسیار مهمی دارد. این انگل با فعال کردن مسیره‌های وابسته به Fas/FasL آپوپتوز سبب فعال شدن مسیره‌های مرگ سلولی می‌گردد. انگل لیشمانیا با فعال کردن مسیره‌های وابسته به مرگ و همچنین در کنار آن فعال کردن TRAIL/TRAIL-R1 ها سبب راه اندازی آبشارهای آپوپتوتیک در مسیره‌های 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 مسیره‌های وابسته به P53 و مسیره‌های آپوپتوز وابسته به میتوکندری مانند Bax و فعال کردن کاسپاز ۳ را نیز سبب شود. انگل لیشمانیا با قرار گیری در بدن میزبان و آزاد سازی برخی پروتئین خاص، سبب فعال شدن مسیره‌های Bax/Bcl-2 و فعال شدن مستقیم کاسپاز ۳

and clinical studies. *Recent Pat Anti-Cancer*. 2018;13(2):224-39.

12. Javadi Marand F, Saraei M, Jahani - Hashemi H, Haji Aghae 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 and harmaline 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, Modaresi 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.

زیستایی از ۶۴ درصد (در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به ۳۳ درصد (در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کاهش یافت که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0.05$). در آنکوباسیون ۴۸ ساعته کاهش درصد زیستایی وابسته به دوز مشاهده شد. به طوری که درصد زیستایی ۴۹ درصد (در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به ۹ درصد (در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کاهش یافت. در آنکوباسیون 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 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 brtkysr 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