

## 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<sup>۱\*</sup>، پیوند پروینی<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹  
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 پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۴

### چکیده

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

**مواد و روش ها:** ۱۰ میلی گرم از کارسینوژن DMBA به رت های گروه تیمار خورنده 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 برگ های 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 عصاره ها ۵ غلظت تهیه شده و بر روی سلول ها اثر داده شد و توانایی زیستی سلول ها به دو روش جذب تریپان بلو و رنگ سنجی MTT ارزیابی شد.

**نتایج:** عصاره های الکلی رزماری و تاکسول بر روی سلول های سرطانی دارای اثرات سمی قابل توجهی بودند ولی عصاره آبی خواص ضدسرطانی بسیار ضعیفی داشت.

**نتیجه گیری:** عصاره الکلی رزماری 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 می باشد.

**واژگان کلیدی:** تاکسول، تومورهای پستان، زیستایی سلول ها، عصاره رزماری، DMBA

## مقدمه

طبق آمار منتشر شده از سوی وزارت بهداشت و درمان در حال حاضر سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان کشور به شمار می رود و دومین سرطان کشنده پس از سرطان ریه است. کارشناسان می گویند از هر هشت زن ایرانی، یک نفر شانس ابتلا به سرطان پستان را داراست و حدود یک چهارم کل سرطان های زنان در کشور مربوط به سرطان پستان می باشد (۱). بالا بودن آمار مبتلایان به این نوع سرطان در کشورمان ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای پی بردن به مکانیسم های ایجاد سرطان و ابداع روش های درمانی مؤثرتر را آشکار می سازد.

سرطان پستان را می توان در رت ها توسط انواع مختلفی از عوامل نظیر هورمون ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمود اما یکی از پرکاربردترین روش های القا سرطان پستان در رت استفاده از نوعی ماده شیمیایی به نام ۱۲و۷ دی متیل بنزانتراسن می باشد که یک هیدروکربن آروماتیک چندحلقه ای است که به وفور در دود تنباکو یافت می شود (۲).

با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در ایجاد سرطان تا کنون درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده است اما امروزه از روش های درمانی برای درمان سرطان پستان استفاده می شود. با این حال وجود عواملی مانند تنوع پروسه های پاتولوژیک و مکانیسم های مقاومت به درمان انتخاب مناسب ترین و کارآمدترین نوع درمان را برای هر یک از بیماران مشکل ساخته است و این امر لزوم انجام آزمایشات *in vitro drug sensitivity/resistance* را روشن می سازد. این آزمایشات قادرند شناخت و آگاهی نسبی در باره اثر عوامل مختلف مورد استفاده در درمان استاندارد را پیش از انجام آزمایشات *in vivo* فراهم کنند. به عبارت دیگر این روش به آنکولوژیست ها کمک می کند تا بتوانند داروهای مناسبی را برای شیمی درمانی بیماران برگزینند. همچنین از این روش برای انتخاب رژیم های شیمی درمانی بالقوه مؤثرتر و نیز جلوگیری از سمیت بالقوه داروهای غیر مؤثر استفاده می شود (۳).

مواد گیاشیمیایی (phytochemicals) که قابلیت کاهش میزان بروز تعدادی از تومورها را دارا می باشند به صورت روزافزون رو به افزایش است و از این میان مشتقات غذایی از این نظر که تقریباً غیرسمی می باشند مورد توجه خاصی قرار دارند. با این حال شواهد علمی محدودی که در رابطه با مکانیسم عمل و عوارض احتمالی استفاده از این ترکیبات وجود دارد از ورود آنها به مسیر اصلی مراقبت ها و درمان های پزشکی جلوگیری نموده

است (۳). تا به امروز مشخص شده که بسیاری از گیاهان رایج دارای خواص یا حفاظت کننده در برابر سرطان کمپروتکتیو (chemoprotective) می باشند، از جمله این گیاهان می توان به اعضای گونه Allium (سیر و پیاز و موسیر)، اعضای خانواده نعناعیان (ریحان، نعناع، آویشن و رزماری)، اعضای خانواده Zingiberaceae (زنجبیل و زردچوبه) اشاره نمود. این گیاهان منابعی غنی از فیتوکمیکال های کمپروتکتیو مانند فیتواسترول ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، ترپنوئیدها و ... می باشند که این مواد به عنوان آنتی اکسیدانت عمل کرده و رادیکال های آزاد را جاروب می کنند و موجب تحریک سیستم ایمنی بدن می شوند و همچنین تشکیل DNA adducts با کارسینوژن ها را مهار نموده و علاوه بر این مسیرهای متابولیک مرتبط با گسترش سرطان را مهار می کنند (۴).

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 می باشد. از آنجا که سرطان یک بیماری پیچیده و مولتی فاکتوریال است، یافتن مدل مناسبی که بتوان آن را جایگزین مدل انسانی نمود همواره یکی از آرمان های محققان بوده است. در این پژوهش از مدل موش صحرایی استفاده شده است که قادر به تقلید شرایط تومورهای انسانی تا حد بسیار زیادی می باشد و بنابراین می تواند مدل مناسبی برای مطالعه اثر داروهای ضدسرطان به شمار آید. با بررسی داده های به دست آمده از این مطالعه به این موضوع پی خواهیم برد که آیا استفاده از مدل موشی سرطان پستان می تواند مدل جایگزین مناسبی برای مدل انسانی باشد و اینکه آیا عصاره های الکلی و آبی (فاقد عوامل غیرقطبی) رزماری قادر به از بین بردن سلول های سرطانی هستند؟ و اگر این گونه است میزان اثر بخشی آن ها در مقایسه با داروی رایج تاکسول به چه میزان است؟

## مواد و روش ها

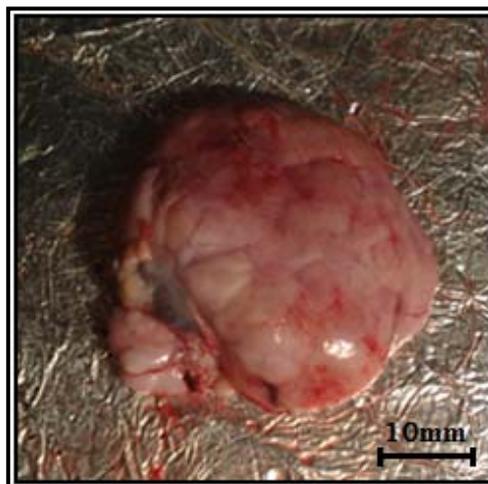
برای انجام این پژوهش رت های ماده ی بالغ از نژاد Sprague dawley با میانگین وزنی  $(10 \pm 150)$  گرم از موسسه ی سرم سازی رازی خریداری شده و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و حرارت  $22 \pm 3$  درجه ی سانتی گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا، در قفس های مخصوص در اتاق حیوانات نگهداری شوند.

**تهیه سلول های منفرد از بافت تومور:** برای تهیه سلول از بافت تومور، تومورها به زیر هود لامینار انتقال داده شده و سپس از قسمت های داخلی تر قطعاتی بریده و به فالكون های حاوی ۱۰ میلی لیتر HBSS (Gibco، آلمان) استریل انتقال داده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقیمانده تومور با اسکالپل به ذرات بسیار ریز خرد شد (chopping) و سوسپانسیون حاصله به فالكون منتقل شده و با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از آن محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ته فالكون ۵ میلی لیتر محیط کشت (DMEM، Gibco، آلمان) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco، آلمان) اضافه گشت. پس از پیتاژ کردن، ۱/۵ تا ۲ میلی لیتر از مخلوط همگن شده به فلاسک های T25 منتقل شده و حجم محیط داخل فلاسک به ۵ میلی لیتر رسانده شد. سپس فلاسک به انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (Memmert، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی فلاسک تخلیه و ۵ میلی لیتر محیط کشت تازه به فلاسک افزوده گشت. تعویض محیط و پاساژ سلول ها هر چند 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 سرشاخه های 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 سانتی گراد قرار گرفت. سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف و عصاره به دست آمده در یک ظرف دردار شیشه ای ریخته و در جایی دور از نور نگهداری شد. مجدداً روی تفاله باقی مانده ۲۵۰ میلی لیتر متانول خالص ریخته شده و ظرف حاوی تفاله مجدداً به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر 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 می باشند) شستشو داده شد و تفاله

**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 حاوی ۱۰ میلی گرم 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 در ۱ میلی لیتر روغن کنجد حل شده بود بوسیله گاوژ داده شد. این دارو ۲ بار در طول ۲ هفته و در روز مشخص به گروه تیمار خورنده 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 (شکل ۱). یک سوم تومور به منظور تهیه مقاطع بافتی، برای مطالعه پاتولوژیک در فرمالین ۱۰ درصد 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 فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و در ادامه مراحل پاساژ بافتی (به اختصار آگیری 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 برش ها 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

(Sigma, آلمان) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سلول ها با استفاده از فرمول زیر، در مورد هر غلظت محاسبه گردید:

$$\text{توانایی زیستی سلول ها} = \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times 100$$

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

**آنالیز آماری داده ها:** برای بررسی اثر دوزهای مصرفی تاکسول، عصاره آبی، عصاره الکلی بر توانایی زیستی سلول های سرطان پستان القا شده در موش صحرایی، داده های به دست آمده توسط روش آماری Univariate و تست Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### نتایج حاصل از مطالعه ی هیستوپاتولوژیک

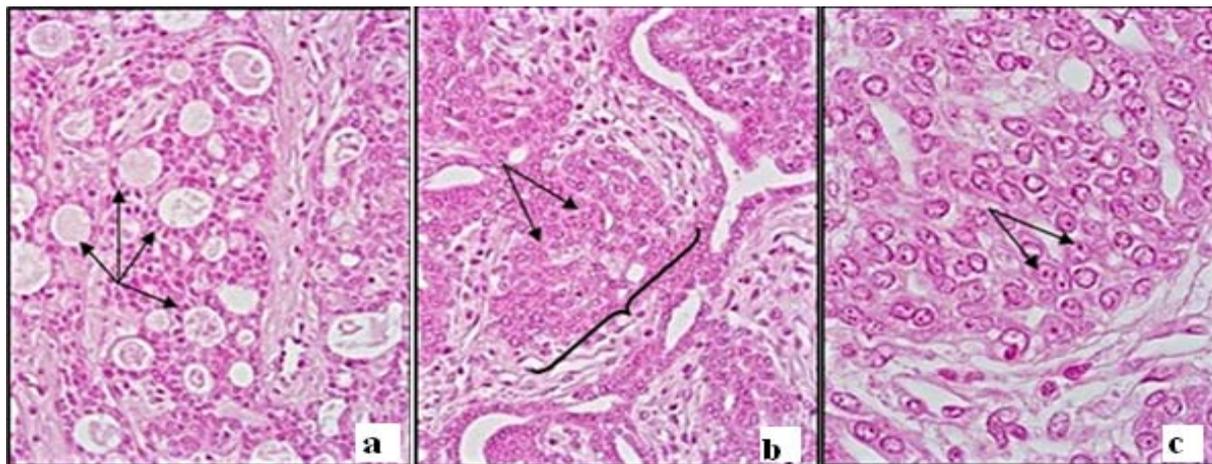
برش های تهیه شده از بافت های توموری توسط متخصص هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس اطلاعات هیستوپاتولوژیکی تمامی خصوصیات مرفولوژیک مشاهده شده در برش ها مؤید وجود بافت تومورال بدخیم بود. همانطور که در شکل ۲-ا و ۲-ب سلول های سرطانی در حال تکثیر مشاهده می شود، در بافت تومورال، فضاهای غده مانند تغییر شکل یافته ای دیده می شود که به وسیله یک ردیف از سلول های اپی تلیال توموری احاطه شده اند و تمایل دارند به بافت غده ای توموری تمایز یابند. هردوی مشخصات مزبور از نشانه های تشخیصی آدنوکارسینوما می باشد. علاوه بر این چنان که در شکل ۲-ج مشاهده می شود سلول های سرطانی دارای هستک های بزرگ و برجسته و الگوی کروماتینی وزیکولی می باشند، این در حالی است که در هیچ یک از اعضای گروه کنترل هیچ گونه بافت توموری مشاهده نشد.

باقی مانده به عنوان عصاره حاوی مواد قطبی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره آبی در حمام آب گرم با دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا حلال آن کاملاً تبخیر شود و رسوب خشکی برجا بماند. سپس غلظت های مورد نیاز از هر یک از عصاره ها 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 توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو:** تعداد  $10^6 \times 1$  سلول در هر ویال پلیت ۶ خانه کشت داده شد و سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت به منظور اتصال سلول ها به کف پلیت در انکوباتور قرار گرفت. محیط رویی سلول ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی غلظت های 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 خانه های 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 سلول ها با استفاده از لام نتوبار (در خانه های متعلق به شمارش گلبول های سفید) انجام گرفت. سلول های آبی رنگ به عنوان سلول های مرده و سلول های بی رنگ به عنوان سلول های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول ها در هر غلظت محاسبه گشت.

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} = \text{توانایی زیستی سلول ها}$$

**سنجش تترازولیوم (MTT):** اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نا محلول فورمازان است. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود (و برعکس). برای انجام این تست تعداد ۱۰۴ سلول 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)



شکل (a) : برشی از تومور که در آن پیکان ها نشان دهنده فضاهای غده مانند متعدد می باشند (عدسی شیئی ۲۰x) (b) پیکان ها تکثیر سلول های سرطانی را در یک مجرا (که با { نشان داده شده است) نشان می دهد (عدسی شیئی ۴۰x)، (c) سلول های سرطانی با هسته های مشخص و هستک های بزرگ (پیکان ها) (عدسی شیئی ۱۰۰x). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.

### نتایج سنجش توانایی زیستی سلول ها بر اساس رنگ آمیزی تریپان

مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول های سرطانی پس از گذشت ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری میان تمام گروه غلظت های ۱ تا ۵ برای هر یک از مواد مذکور به این شرح است: به ترتیب گروه های ۱ تا ۵ جدول دوزهای ۱/۲۵، ۱/۵، 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 میلی لیتر از عصاره آبی فاقد عوامل غیر قطبی.

بر اساس این نتایج غلظتی که بتواند رشد سلول ها 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 میلی لیتر.

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

به طور کلی می توان گفت مقایسه داده های به دست آمده از سنجش قابلیت حیات سلول های سرطانی تحت تیمار با تاکسول و عصاره ها با داده های به دست آمده از گروه کنترل، تفاوت معنی داری ( $P < 0.05$ ) نشان داد.

جدول ۱: مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصاره آبی، عصاره الکلی در زمان ۲۴ ساعت که به روش رنگ آمیزی تریپان بلو اندازه گیری شده است. مقادیر به صورت  $means \pm SD$  بوده و تفاوت میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شده است. میانگین های با کد حرف های متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنی دار می باشند (ANOVA, one way, Duncan test).

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

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 معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۲).

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، ۱/۵، 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 هر یک 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.

میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی در گروه‌های تیمار شده با تاکسول و عصاره الکلی نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت، اما میانگین توانایی زیستی سلول‌های تیمار شده با این گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره آبی بود ( $P < 0.05$ , Univariate). 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 در مورد 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 سلول‌ها به روش MTT

از مقایسه داده‌های 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 گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار بود. میانگین زیستی سلول‌های سرطانی در گروه‌های 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 ( $P < 0.05$ , Univariate).

جدول ۲: مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول، عصاره آبی و عصاره الکلی در زمان ۲۴ ساعت که به روش MTT/اندازه‌گیری شده است. مقادیر به صورت  $means \pm SD$  بوده و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شده است. میانگین‌های با کد حروف متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند ( $ANOVA, one way, Duncan test$ ).

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

## بحث

نتایج بدست آمده از بررسی هیستولوژیک مقاطع تهیه شده از بافت‌های توموری که به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شده بودند مؤید این مطلب بود که پاتولوژی تومورهای ایجاد شده در موش‌های صحرایی 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، PC-Zd (۶) NUGC-3، SC-M1 (۷) SKOV3، U937 (۸) همگی سایتوتوکسیسیته بالایی تاکسول را نشان داده‌اند.

مطالعاتی که تا کنون در رابطه با اثرات ضد تکثیر (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، 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 اکسیدانی 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 موش‌های نژاد FVB/N مشخص نموده است که DMBA بیان برخی از ژن‌های دخیل در روند کارسینوژنز از جمله *c-myc* و *cyclin D1* را افزایش داده و مسیر NF- $\kappa$ B 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 بنزوپیرین به DNA اپیدرمال جلوگیری نموده و آغاز تومور توسط آن را مهار می‌کند. همچنین مشخص شده است که اورسولیک اسید از اتصال بنزوپیرین و DMBA به DNA سلول‌های اپیدرم و اتصال TPA به غشاء این سلول‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. اورسولیک اسید موجود در رزماری مسیر NF- $\kappa$ B را در سلول‌های سرطانی مهار می‌کند و احتمالاً این کار را از طریق سرکوب مهارکننده فسفریلاسیون P65 و NF- $\kappa$ B انجام می‌دهد و بدین ترتیب موجب تنظیم کاهشی انکوژن‌هایی مانند COX-2، MMP-9، Cyclin D1، C-Jun، C-Fos می‌شود. کارنوسول موجود در برگ‌های رزماری نیز مانند اورسولیک اسید عمل کرده و فعالیت NF- $\kappa$ B 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 داده‌اند که بیان بیش از حد COX-2 می‌تواند با جلوگیری از اپتوزیس، توموریزاسیون را افزایش دهد (۱۴). فلاونوئیدهای موجود در رزماری، زیره، گشنیز و آویشن PPAR $\gamma$  (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

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.

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<sub>1</sub>, 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 اند که 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

6. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, et al. Cytotoxic studies of Paclitaxel (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.

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

Hamta A<sup>1\*</sup>, Parvini P<sup>2</sup>

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