



Study of Protective Effect of Nigella Sativa Nanocapsules on Tissue Pathology and IL-10 levels in Lung Tissues Exposed to NNK

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Barzegari A.^{*1} PhD,
Mirdar Sh.² PhD

How to cite this article

Barzegari A, Mirdar Sh. Study of Protective Effect of Nigella Sativa Nanocapsules on Tissue Pathology and IL-10 levels in Lung Tissues Exposed to NNK. Pathobiology Research. 2019;22(1):35-40.

¹Department of physical education, Payame Noor University, Tehran, Iran

²Department of Sport Physiology, Faculty Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

*Correspondence

Address: Payame-e-Noor University, Babol, Mazandaran, Iran. Postal Code: 4716654849
Phone: +98 (11) 32250048
Fax: +98 (11) 32250048
ali_barzegari@pnu.ac.ir

Article History

Received: February 19, 2018
Accepted: April 03, 2018
ePublished: March 11, 2019

ABSTRACT

Aims It is assumed that nitrosamine ketone derived from tobacco (NNK) which is the most important carcinogen in tobacco modulates alveolar macrophage mediator production, such as anti-inflammatory cytokine IL-10. The aims of this study were to investigate the effect of a Nigella sativa on tissue pathology and IL-10 levels in lung tissues exposed to NNK

Materials & Methods In this experimental study, 46 Wistar rats were randomly divided into five groups consist of supplement, supplement+NNK, NNK, solvent and control. NNK-induced groups received NNK subcutaneously one day per week at a rate of 12.5 mg per kg body weight. Supplemented groups also consumed Nigella sativa Nanocapsules for 12 weeks. Levels of IL-10 in homogenized lung tissue were measured by ELISA. To analyze the data; ANOVA and Tukey test were used at a significance level of $p \leq 0.05$.

Findings Exposure to NNK increased levels of IL-10 compared with the solvent group, although not statistically significant ($p \geq 0.05$). Meanwhile, a period of consumption of Nigella sativa Nanocapsules significantly increased levels of IL-10 in NNK + supplement and the supplement groups compared to NNK group ($p=0.038$, $p=0.002$; respectively). In addition, the effect of Nigella sativa Nanocapsules on IL-10 levels of lung tissue was shown that the levels of this variable were significantly higher than the solvent group ($p=0.001$).

Conclusion Generally it could be confirmed that consumption of Nigella sativa Nanocapsules plays an important role in the inhibition of inflammation induced by NNK via Increase of IL-10 activity.

Keywords Nigella Sativa; Nanocapsules; IL-10; NNK; Histologic Structure

CITATION LINKS

[1] Cancer statistics ... [2] Non-small cell lung ... [3] The changing epidemiology of lung cancer in ... [4] Mechanisms of cancer induction by tobacco-specific NNK ... [5] Suppressive oligodeoxynucleotides reduce lung cancer susceptibility in ... [6] Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage ... [7] Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in ... [8] The paradoxical role of IL-10 in immunity and ... [9] Nutrition habits, physical activity, and lung cancer: An ... [10] Therapeutic implications of black seed and its constituent thymoquinone ... [11] Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and ... [12] A review on therapeutic potential of Nigella sativa ... [13] Nigella sativa (black seed) oil does not affect the T-helper 1 and T-helper 2 type ... [14] Array CGH analysis reveals chromosomal aberrations in mouse lung adenocarcinomas ... [15] Preparation and characterization of polyurethane ... [16] Guide to the care and use of experimental ... [17] Dose-response relationship between O6-methylguanine formation in Clara ... [18] Lung Cancer (Advances in Basic and Clinical ... [19] Investigating the effect of one period of Nigella Sativa ... [20] Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer ... [21] Nanothymoquinone, a novel hepatotargeted delivery ... [22] Cytokine production by alveolar macrophages is down ... [23] Immunomodulatory effects of the tobacco-specific ... [24] Role of interleukin-10 ... [25] Effects of Nigella sativa oil extract on inflammatory ... [26] Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) ... [27] In vitro investigation of the potential immunomodulatory ... [28] Modulation of the oxidative stress and inflammatory ... [29] Nigella sativa (black cumin) seed ... [30] Metastatic cancer ...

مطالعه اثر محافظتی نانوکپسول سیاه‌دانه بر آسیب‌شناسی بافتی و سطوح اینترلوکین ۱۰ بافت ریه‌رت‌های در معرض NNK

علی برزگری * PhD

گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

شادمهر میردار PhD

گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

چکیده

اهداف: این فرض وجود دارد که نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو (NNK) که مهم‌ترین کارسینوژن موجود در دخانیات است، تولید واسطه‌های مربوط به ماکروفاژهای آلوئولار از جمله سایتوکین ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ (IL-10) را تعدیل نماید. هدف مطالعه حاضر تاثیر یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه بر آسیب‌شناسی بافتی و سطوح IL-10 بافت ریه‌رت‌های در معرض NNK بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر ۴۶ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار به‌صورت تصادفی به پنج گروه مکمل، مکمل+NNK، NNK، حلال و کنترل دسته‌بندی شدند. گروه‌های تحت القای NNK به‌صورت زیرجلدی یک‌بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته NNK دریافت کردند. گروه‌های مکمل نیز به‌مدت ۱۲ هفته نانوکپسول سیاه‌دانه مصرف نمودند. مقادیر سطوح IL-10 در بافت هموزنیزه‌شده ریه با روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی استفاده شد.

یافته‌ها: قرارگرفتن در معرض NNK موجب افزایش سطوح IL-10 در مقایسه با گروه حلال شد. گرچه از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p \geq 0.05$). ضمناً یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار سطوح IL-10 گروه مکمل+NNK و گروه مکمل در مقایسه با گروه NNK شد (به‌ترتیب $p=0.038$ ، $p=0.002$). علاوه بر این با بررسی اثر مکمل نانوکپسول سیاه‌دانه بر سطوح IL-10 بافت ریه نشان داده شد که سطوح این متغیر در بافت ریه‌رت‌ها نسبت به گروه حلال افزایش معنی‌داری داشته است ($p=0.001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه در مهار آثار التهابی ناشی از القای NNK با افزایش سطوح IL-10، نقش موثری دارد.

کلیدواژه‌ها: نانوکپسول سیاه‌دانه، اینترلوکین ۱۰، NNK، ساختار هیستولوژیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۱۴

* نویسنده مسئول: ali_barzegari@pnu.ac.ir

مقدمه

سرطان ریه یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بدخیم بوده و مهم‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است و هر سال بیش از ۱/۳ میلیون مورد جدید تخمین زده می‌شود که به‌تنهایی علت حدود ۲۲٪ مرگ‌ومیر در دنیا است. شیوع انواع سرطان در کشورهای مختلف دنیا متفاوت است، با وجود این در کشورهای در حال توسعه سرطان ریه شایع‌ترین سرطان در میان مردان و دومین سرطان شایع بین زنان است [1]. سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک (NSCLC) تا ۸۵٪ کل سرطان‌های ریه را تشکیل می‌دهد و آدنوکارسینوما و کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) به‌ترتیب ۵۰٪ و ۳۰٪ کل سرطان را شامل می‌شوند [2، 3]. مصرف دخانیات یک بیماری همه‌گیر و یک مشکل بهداشت عمومی جهانی است که با انواع سرطان‌ها، از جمله سرطان سیستم تنفسی مرتبط است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد ۹۰٪ مرگ ناشی از سرطان ریه با مصرف دخانیات ارتباط دارد [4]. نیکوتین عنصر اصلی انواع محصولات تنباکو و سیگار است که اعتیادآور و غیرسرطان‌زا است. با این حال فرآورده‌های متابولیکی آن شامل بیش از ۷۰ نوع کارسینوژن است که مهم‌ترین آنها شامل نیتروزآمین‌های مشتق از تنباکو (از قبیل

نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو؛ NNK)، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (مانند بنزو (ای) پیرن) و آمین‌های آروماتیک (مانند ۴-آمینوبیوفنیل) هستند. این مواد باعث ابتلا به سرطان یا افزایش خطر ابتلا به آن در حیوان و انسان می‌شوند [4]. از بین ترکیبات خانواده نیتروزآمین‌های مشتق از تنباکو، نیتروزآمین کتون مشتق از نیکوتین یا ۴- متیل نیتروزآمینو-۱- (۳- پیریدیل) - ۱- بوتانون (NNK)، فراوان‌ترین و قوی‌ترین ترکیب کارسینوژن به شمار می‌رود. هنگامی که NNK و مواد سرطان‌زای NNK فعال شوند، به‌راحتی می‌توانند به DNA متصل شده، منجر به تشکیل ترکیبات افزایشی DNA و آغاز جهش در سلول شوند، همچنین از این طریق رشد تومور و التهاب را گسترش می‌دهند [5].

برخی مطالعات ضرورت تنظیم سیستم دفاعی سریع و کارآمد در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در سطح لوکال و سیستمیک توسط پروتئین‌های هماهنگ‌کننده التهاب و پاسخ فاز حاد را ضروری دانسته‌اند. بسیاری از پروتئین‌های دخیل در این زمینه، عمدتاً پیش‌التهابی یا ضدالتهابی هستند [6]. در این راستا پژوهش‌ها نشان داده است که اینترلوکین ۱۰ (IL-10) یک سایتوکین با اثرات متعدد و پلی‌تروپی در تنظیم ایمنی و التهاب است. IL-10 بیان سایتوکین‌های سلول‌های T کمکی ۱ (Th1) و مولکول‌های تحریک‌کننده ماکروفاژها را کاهش داده، همچنین موجب بهبود بقا، تکثیر و تولید آنتی‌بادی سلول B می‌شود [7]. مطالعات در خصوص ایمنی و سرطان نشان داده است که IL-10 نقش بسیار مهمی در تعدیل سلول‌های آسیب بدن و التهاب در بدن دارد [8].

از آن جا که سرطان یک بیماری چندعاملی است و عوامل ژنتیکی و محیطی متعددی در بروز انواع گوناگون آن نقش دارد، مطالعات نشان داده است که استراتژی‌های درمانی موثر مانند تغذیه می‌تواند به پیشگیری و درمان سرطان ریه از طریق تنظیم و تعدیل فرآیند التهابی کمک نماید [9]. در این راستا پژوهش‌های مختلف نشان داده است مصرف گیاهان دارویی در کشورهای مختلف روزبه‌روز در حال افزایش است و به‌دلیل نگرانی روزافزون در خصوص عوارض داروهای شیمیایی و بی‌اثر بودن تعدادی از آنها در مصرف طولانی‌مدت، استفاده از ترکیبات طبیعی به‌صورت جایگزین یا مکمل درمان، بیش‌ازپیش مورد توجه قرار گرفته است [10]. یکی از گیاهان دارویی که در بیماری‌های تنفسی و نیز سرطان‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند، سیاه‌دانه است. تحقیقات متعددی نشان دادند که تیموکینون که از اجزای اصلی سیاه‌دانه است در سلامت انسان و جلوگیری از سرطان نقش موثری ایفا می‌کند. این نقش از طریق فعال‌سازی ژن‌های بازدارنده تومور، آنزیم‌های بازدارنده PPARs، غیرفعال‌سازی آنژیوژنز و القای آپوپتوز صورت می‌گیرد [11]. اگرچه مکانیسم‌های احتمالی پیشنهاد شده است اما نتایج مطالعات در خصوص ارتباط میان مکمل سیاه‌دانه و سطوح اینترلوکین ۱۰ متناقض است، به‌طوری که احمد و همکاران در مطالعه مروری خود در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی تیموکینون در رت‌های نژاد ویستار مبتلا به آرتیت‌های ناشی از کلاژن گزارش کردند که مصرف خوراکی تیموکینون موجب افزایش سطوح IL-10 می‌شود [12]. در حالی که بویوکورتزک و همکاران اظهار داشتند که میزان IL-10 پس از یک هفته تزریق روغن سیاه‌دانه به موش‌های آلرژیک در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است [13]. با توجه به اثر NNK در ایجاد التهاب و متعاقب آن ایجاد سرطان و بدخیمی‌های ریه [14] از یک سو و نقش‌های متعدد IL-10 در کنترل فرآیندهای التهابی و نیز سرکوب رشد تومور [7، 8] نشان داده

(۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند. پس از شکافتن قفسه سینه، بافت ریه از ناحیه ناف جدا و با استفاده از ترازوی سارتریوس بی‌ال ۱۵۰۰ با دقت ۰/۰۰۱ وزن‌کشی شده و سپس لوب فوقانی ریه چپ جدا و به داخل میکروتیوپ قرار گرفت و با استفاده از ازت مایع منجمد شد. به منظور تهیه سرم و انجام تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت ریه با یک میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) ۱۰۰ میلی‌مولار هموژنیزه و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به دست آمده برای سنجش شاخص‌های مورد نظر، پس از جداسازی با استفاده از بیخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد. برای سنجش مقادیر IL-10 بافت ریه از کیت الایزا (IBL International GmbH؛ آلمان) با حساسیت ۱/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

همچنین لوب تحتانی ریه چپ جدا پس از شست‌وشو در سرم فیزیولوژی و بررسی ماکروسکوپی به منظور تثبیت در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شدند تا در مطالعات هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار گیرند.

روش‌های آماری: پس از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا به منظور تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ $p <$ برای بررسی تغییرات سطوح IL-10 استفاده شد. برای انجام کلیه امور آماری نرم‌افزار SPSS 20 و برای رسم نمودار نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ به کار رفت.

یافته‌ها

جدول ۱ میانگین و انحراف معیار وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق را نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق وجود نداشت ($p \geq 0.05$).

جدول ۱) میانگین آماری وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحت مطالعه

گروه‌ها	میانگین آماری
کنترل	۲۴۹/۵ ± ۱۶/۴۶
حلال	۲۵۹/۵ ± ۲۴/۲۳
مکمل NNK	۲۸۲/۳ ± ۶۰/۴۸
NNK	۲۸۵/۶ ± ۷۰/۴۷
مکمل	۲۶۵/۲ ± ۶۱/۴۷

همچنین نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میان مقادیر سطوح IL-10 بافت ریه در گروه‌های تحقیق تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.001$). نتایج آزمون توکی نشان داد که قرارگرفتن در معرض NNK موجب افزایش سطوح IL-10 در مقایسه با گروه حلال شده است، اگرچه از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p \geq 0.05$).

ضمناً یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار سطوح IL-10 گروه مکمل NNK (۴۲/۸۸٪) و گروه مکمل (۵۹/۳۴٪) در مقایسه با گروه NNK شد (به ترتیب $p = 0.002$, $p = 0.038$). از سوی دیگر یافته‌های مربوط به آزمون

است که استفاده از مواد موثره گیاهان دارویی به صورت نانوکپسول سبب می‌شود که در وهله اول سامانه رهایش دارو قابل کنترل باشد، سپس میزان غلظت دارو در پلاسما برای مدت زمان طولانی بدون رسیدن به نواحی نامطلوب و ناموثر حفظ شود و نیز امکان تهیه داروهایی فراهم شود که در مدت زمان کوتاه‌تر یا دوز کمتر، اثربخشی بیشتری داشته باشند^[15]. بنابراین انتظار می‌رود القای نانوکپسول سیاه‌دانه بتواند در مهار پیشرفت و نیز درمان سرطان‌ها موثر باشد. با توجه به این که مطالعه‌ای که به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول سیاه‌دانه بر سطوح IL-10 در بافت ریه رت‌های در معرض عوامل سرطان‌زا مانند NNK پرداخته باشد، یافت نشده است. پژوهش حاضر در پی پاسخ به این پرسش است که آیا یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه می‌تواند آثار مخرب احتمالی قرارگرفتن در معرض NNK موجود در دود سیگار را کاهش دهد؟

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در آزمایشگاه دانشگاه مازندران انجام شد، تعداد ۴۶ سرموش صحرایی بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی $27/93 \pm 0.08$ گرم از انستیتو پاستور خریداری و پس از دو هفته آشنایی با محیط و پروتکل پژوهش، به طور تصادفی به ۵ گروه مکمل (۹ سر)، NNK (۱۰ سر)، مکمل NNK+ (۱۰ سر)، حلال (۱۰ سر) و کنترل (۶ سر) تقسیم شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ °C، رطوبت ۵۵٪ و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد^[16]. حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیارشان قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن‌کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت. تزریق NNK به صورت زیرجلدی یک‌بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته انجام شد. گروه حلال نیز آب مقطر دریافت کرد^[17, 18].

نحوه تهیه عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه: به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش خیساندن، ۵۵ گرم پودر سیاه‌دانه به مدت ۷۲ ساعت در اتانول ۷۱٪ خیسانده شد و در ظرفی در بسته که درب آن پوشیده از پارافیلیم بود قرار داده شد و در دمای 21°C تا 25°C دور از نور نگهداری شد. مخلوط پودر سیاه‌دانه، آب مقطر و اتانول هر ۶ ساعت یک‌بار با میله شیشه‌ای هم‌زده شد و در نهایت پس از عبور از کاغذ صافی با استفاده از دستگاه روتاری، اتانول آن در دمای 61°C حذف شد^[19].

روش آماده‌سازی نانوکپسول سیاه‌دانه: ۵۰ میلی‌گرم آلومین سرم انسانی در داخل یک میلی‌لیتر آب با شرایط PH برابر ۷/۴ حل شد. سپس ۱۰٪ از حجم تویین ۸۰ به نمونه اضافه شده و نمونه با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه برای ۳۰ دقیقه با استفاده از مگنت بهم زده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر اتانول به صورت تدریجی به محلول اضافه و در ادامه ۱۱۷ میکرولیتر گلوکوتارآلدئید به نمونه اضافه شد. این عمل تحت بهم‌زدن ۵۰۰ دور بر دقیقه انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرد^[20]. مکمل سیاه دانه یک روز در هفته و به میزان ۱۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریق زیرجلدی صورت پذیرفت^[21].

آزمایشات تجربی: به منظور نمونه‌گیری از حیوانات، ابتدا با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین

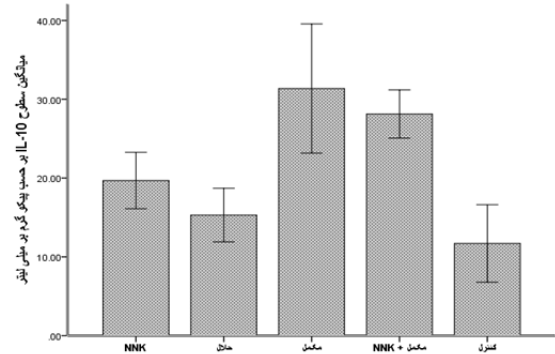
همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که ساختار بخش پارانشیمی بافت ریه در گروه‌های کنترل و حلال کاملاً طبیعی است، در حالی که در گروه NNK، با افزایش نفوذ سلول‌های التهابی شامل لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌ها پلازما در بافت همبند اطراف مجاری تنفسی، عروق و حتی افزایش شدید آنها در بافت بینابینی سبب شده است تا تغییرات ناشی از آمفیژم در این نواحی دیده شده و حجم فضای آئولی کاهش یابد. ضمناً کانون کوچکی از منطقه به ظاهر تومورال نیز رویت شد. همچنین در گروه مکمل، التهاب حاد بسیار کم بوده و کاهش ناچیزی در تعداد و حجم آئول‌ها به وجود آمده و ساختار پارانشیمی ریه نیز اغلب حفظ شده است. در گروه مکمل+NNK نیز التهاب حاد خفیف مشاهده شد ولی ساختار آئول‌ها کاملاً حفظ شده و از وضعیت طبیعی برخوردار بود (شکل ۱).

بحث

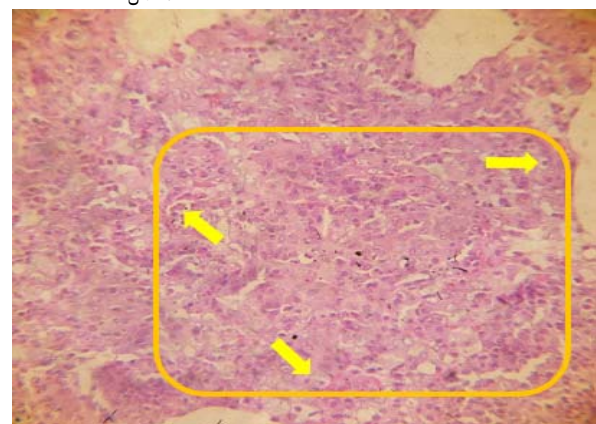
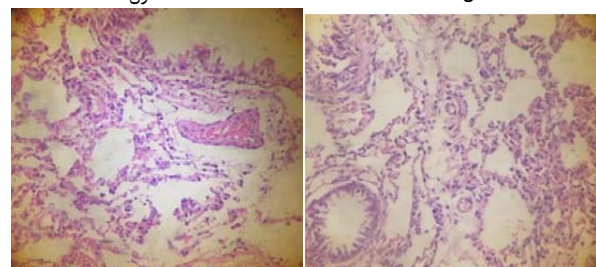
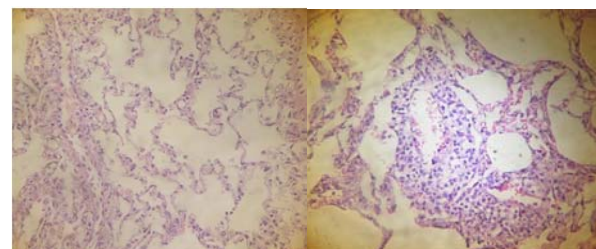
در تحقیق حاضر تاثیر یک دوره برنامه مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه بر سطوح استراحتی IL-10 رت‌های در معرض نیتروزآمین‌کتون مشتق از تنباکو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که سطوح IL-10 بافت ریه در گروه NNK نسبت به گروه‌های کنترل و حلال افزایش یافت، اگرچه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج محققان دیگر که گزارش کردند قرارگیری در معرض NNK موجب تحریک سطوح IL-10 می‌شود، هم‌راستا است [22, 23]. در مطالعه پرولوکس و همکاران گزارش شد که NNK ماکروفاژهای آئولار را در برای تولید PGE2 تحریک نموده و PEG2 نیز تولید IL-10 را تحریک می‌نماید. بنابراین ممکن است افزایش آزادسازی IL-10 با تحریک تولید PGE2 توسط NNK واسطه‌گری شود. آنها همچنین نشان دادند که تحریک ماکروفاژهای آئولار، تولید PEG2 توسط NNK را به‌وسیله COX-2 میانجی‌گری می‌نماید. بیان COX-2 را تحریک نموده و منجر به تنظیم مثبت تولید PGE2 می‌شود که می‌تواند آزادسازی IL-10 توسط ماکروفاژهای آئولار را تنظیم مثبت نماید. حتی با حضور PGE2 که تولید IL-10 را تحریک می‌نماید، می‌توان پیشنهاد نمود که یک مسیر متفاوت در اثر مهاری NNK بر تولید IL-10 ماکروفاژهای آئولار دخیل باشد [22]. از سویی دیگر *تریالت* و همکاران نیز گزارش نمودند که IL-10 یک سایتوکین ضدالتهابی بوده که عملکردهای متعدد داشته و تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی و کموکین‌ها را مهار می‌نماید. IL-10، یک مهارکننده قوی برای فعالیت‌های ضدتوموری ماکروفاژهای آئولار و سلول‌های کشنده طبیعی به حساب می‌آید و توسط سلول‌های توموری تولید می‌شود. افزایش سطوح IL-10 ماکروفاژهای آئولار ناشی از NNK، ممکن است به پیشرفت سرطان ریه کمک نماید، هر چند NNK تولید TGF- β که در رشد تومور موثر است، تعدیل نمی‌نماید [23]. احتمالاً علت افزایش غیرمعنی‌دار سطوح IL-10 در مطالعه حاضر ممکن است با مدت و دوز تزریق NNK در طول این مطالعه مرتبط باشد. همان‌طور که *تریالت* و همکاران گزارش نمودند القای یک مرتبه NNK با دوز کم به میزان (۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش معنی‌دار سطوح IL-10 ماکروفاژهای آئولار را به دنبال خواهد داشت، با این حال همان میزان غلظت به مدت پنج روز (۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر NNK) موجب افزایش ۲/۸ برابری سطوح IL-10 شد [23]. حمیدولاه و همکاران نیز در مطالعه نقش

توکی نشان داد تفاوت معنی‌داری میان سطوح IL-10 گروه مکمل+NNK و گروه مکمل مشاهده نشده است ($p \geq 0.05$).

علاوه بر این با بررسی اثر مکمل نانوکپسول سیاه‌دانه بر سطوح IL-10 بافت ریه نشان داده شد که سطوح این متغیر در بافت ریه رت‌ها نسبت به گروه حلال (۱۰۴/۹۶٪) افزایش معنی‌داری داشت ($p=0.001$; نمودار ۱).



نمودار ۱) تغییرات مقادیر شاخص (IL-10 بر حسب نانوگرم بر لیتر) در بافت ریه گروه‌های مختلف تحت مطالعه؛ *نشانه تغییر معنی‌دار نسبت به گروه حلال؛ #نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه NNK؛ †نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه NNK+مکمل



شکل ۱) ساختار هیستوپاتولوژیک بافت ریه در گروه‌های مختلف تحقیق (فلش‌های زرد نشان‌دهنده تجمع سلول‌های آنتی‌بیوتیک به همراه سلول‌های التهابی است، به طوری که کانون کوچکی از منطقه تومورال مشاهده شد)

اگرچه بسیاری از متغیرها مانند گونه، نژاد، جنس، وزن و عوامل محیطی و برنامه غذایی تحت کنترل بودند. با این وجود پژوهش حاضر با محدودیت‌هایی از جمله عدم کنترل فعالیت شبانه آزمودنی‌های پژوهش و تداخل احتمالی آن بر نتایج تحقیق، عدم کنترل اثر تزریق ماده بی‌هوشی و نیز عدم اندازه‌گیری میزان جذب NNK در آزمودنی‌ها مواجه بود.

این احتمال وجود دارد که با تغییر در تعداد روز و دوز مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه و نیتروزآمین‌کتون مشتق از تنباکو، تغییرات پاتولوژیک دیگری در بافت ریه رخ دهد، بنابراین انجام پژوهش‌هایی در این راستا پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

قرارگیری در معرض NNK موجب کاهش معنی‌دار سطوح اینترلوکین IL-10 و بالارفتن سطوح التهاب شده است. با این حال به دلیل نقش ضدالتهابی مکمل نانوکپسول سیاه‌دانه تا حدود زیادی در جلوگیری از شرایط زیان‌آور قرارگیری در معرض NNK در ریه موش‌های صحرایی اثربخش بوده و می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله نویسندگان از کارکنان دانشگاه علوم پزشکی بابل و دانشگاه مازندران که در اجرای این پژوهش یاری نموده‌اند، قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل (کد No: MUBABOL.HRI.REC.1395.109) تایید شده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: علی برزگری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۷۰٪)؛ شادمهر میردار (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با هزینه شخصی انجام شده است.

منابع

- 1- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(1):8-29.
- 2- Ettinger DR, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10(10):1236-71.
- 3- Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2003;41(3):245-58.
- 4- Xue J, Yang S, Seng S. Mechanisms of cancer induction by tobacco-specific NNK and NNN. *Cancers (Basel)*. 2014;6(2):1138-56.
- 5- Bode C, Kinjo T, Alvord WG, Klinman DM. Suppressible oligodeoxynucleotides reduce lung cancer susceptibility in mice with silicosis. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):1078-83.
- 6- Swisher JF, Khatri U, Feldman GM. Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2007;82(5):1174-84.
- 7- Varma TK, Toliver-Kinsky TE, Lin CY, Koutrouvelis AP, Nichols JE, Sherwood ER. Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect Immun*. 2001;69(9):5249-63.

IL-10 در سرطان سینه اظهار داشتند که IL-10 یک سایتوکین ضدالتهابی بوده که موجب سرکوب نقص در سیستم ایمنی و کمک به مهار تومور می‌شود. IL-10 همچنین می‌تواند نقش تکثیر دواگانه و اثر مهاری روی سلول‌های سرطانی پستان ایفا نماید که نشان‌دهنده نقش پیچیده IL-10 در شروع سرطان پستان و پیشرفت آن است^[24].

براساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مشاهده شد که یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار سطوح IL-10 گروه مکمل+ NNK و گروه مکمل در مقایسه با گروه NNK شد. همسو با نتایج تحقیق حاضر، هادی و همکاران نشان دادند هشت هفته مصرف سیاه‌دانه در بیماران مبتلا به آرتریتر روماتوئید موجب افزایش معنی‌دار سایتوکین ضدالتهابی IL-10 شد، در حالی که کاهش سایتوکین التهابی فاکتور نکروزکننده توموری-آلفا (TNF- α) معنی‌دار نبود^[25]. در مطالعه تک‌گلو و همکاران نیز نشان داده شده که درمان با تیموکینون می‌تواند منجر به کاهش TNF- α در رت‌های مبتلا به آرتریتر شود^[26]. در همین راستا محققین دیگر نیز افزایش سطوح IL-10 را پس از مصرف سیاه‌دانه گزارش نمودند^[27, 28]. احمد و همکاران در مطالعه مروری خود در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی تیموکینون در رت‌های نژاد ویستار مبتلا به آرتریترهای ناشی از کلاژن گزارش کردند که مصرف خوراکی تیموکینون به میزان روزانه ۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌مدت ۲۱ روز منجر به کاهش معنی‌دار در سطوح واسطه‌های پیش‌التهابی (اینترفرون-گاما، فاکتور نکروزکننده توموری-آلفا، اینترلوکین ۶، اینترلوکین 1B و پروستاگلاندین E) و افزایش سطوح IL-10 می‌شود^[12]. مطالعات گذشته در خصوص اثرات فارماکولوژیک سیاه‌دانه و تیموکینون تایید کردند که تیموکینون نقش مهمی در سرکوب سایتوکین‌های پیش‌التهابی، اکسیدان‌ها و تقویت برخی سایتوکین‌های ضدالتهابی مانند IL-10 در مدل‌های حیوانی با درجات مختلف التهاب داشته است^[27]. از سویی دیگر بویوکوزترک و همکاران نشان دادند که میزان IL-10، IL-4 و اینترفرون-گاما پس از یک هفته تزریق روغن سیاه‌دانه به میزان ۳/۰ میلی‌لیتر به موش‌های آلرژیک در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است^[13]. که با نتایج تحقیق حاضر ناهمسو است. همچنین دانکر و همکاران کاهش مقادیر اینترفرون-گاما، IL-4، IL-5 و IL-10 را پس از القای داخل معدی تیموکینون به موش‌های بال‌بسی گزارش کردند^[29]، که علت تناقض یافته‌ها می‌تواند با مقدار دوز تزریق نانوکپسول و طول مدت القای نانوکپسول سیاه‌دانه مرتبط باشد. یکی از مکانیسم‌های احتمالی عملکرد عصاره سیاه‌دانه روی سایتوکین‌ها و تغییرات پاتولوژیک، تنظیم تعادل TH1 و TH2 است. سلول‌های TH2 موجب فعال‌نمودن ماکروفاژ شده و پاسخ التهابی را تنظیم می‌نمایند در حالی که سلول‌های TH1 فعالیت TH2 را مهار می‌کند. سلول‌های TH1 اینترلوکین ۲ و اینترفرون-گاما را تولید می‌نمایند در حالی که سلول‌های TH2، IL-4 و IL-10 را تولید می‌کنند^[26]. تعادل میان سایتوکین‌های TH1 و TH2 برای جهت‌دهی پاسخ‌های التهابی به‌سوی پاسخ‌های سلولی یا هورمونی ضروری است. بنابراین هر عاملی که بتواند روی تعادل TH1/TH2 اثر بگذارد می‌تواند بر پاسخ‌ها نیز موثر باشد. IL-10 به‌عنوان فاکتور مهارکننده اصلی ایمنی شناخته شده که از طریق جلوگیری از پاسخ‌های ایمنی TH1 و فعالیت سیتوتاکسیک سلول‌های T نقش خود را ایفا می‌نماید^[30].

- period of *Nigella Sativa* nanocapsules consumption on the histopathological structure and vascular endothelial growth factor levels of the lung tissue of the rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2018;17(5):435-46. [Persian]
- 20- Keshavarzi M, Shakeri S, Kiani K. Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. *IET Nanobiotechnol*. 2015;9(5):294-9.
- 21- Verma SK, Rastogi S, Javed K, Akhtar M, Arora I, Samim M. Nanothymoquinone, a novel hepatotargeted delivery system for treating CCl₄ mediated hepatotoxicity in rats. *J Mater Chem B*. 2013;1(23):2956-66.
- 22- Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Cytokine production by alveolar macrophages is down regulated by the alpha-methylhydroxylation pathway of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis*. 2004;25(6):997-1003.
- 23- Therriault MJ, Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(2):232-8.
- 24- Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(1):11-21.
- 25- Hadi V, Kheirouri S, Alizadeh M, Khabbazi A, Hosseini H. Effects of *Nigella sativa* oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress status in patients with rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna J Phytomed*. 2016;6(1):34-43.
- 26- Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytother Res*. 2007;21(9):895-7.
- 27- Majdalawieh AF, Carr RI. In vitro investigation of the potential immunomodulatory and anti-cancer activities of black pepper (*Piper nigrum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*). *J Med Food*. 2010;13(2):371-81.
- 28- Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact*. 2012;197(1):40-6.
- 29- Duncker SC, Philippe D, Martin-Paschoud C, Moser M, Mercenier A, Nutten S. *Nigella sativa* (black cumin) seed extract alleviates symptoms of allergic diarrhea in mice, involving opioid receptors. *PLoS One*. 2012;7(6):e39841.
- 30- Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:221-47.
- 8- Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;367(2):103-7.
- 9- Koutsokera A, Kiagia M, Saif MW, Souliotis K, Syrigos KN. Nutrition habits, physical activity, and lung cancer: An authoritative review. *Clin Lung Cancer*. 2013;14(4):342-50.
- 10- Rahmani AH, Alzohairy MA, Khan MA, Aly SM. Therapeutic implications of black seed and its constituent thymoquinone in the prevention of cancer through inactivation and activation of molecular pathways. *Evid Based Complement Altern Med*. 2014;2014:724658.
- 11- Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res*. 2009;23(9):1295-8.
- 12- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(5):337-52.
- 13- Büyükoztürk S, Gelincik A, Ozşeker F, Genç S, Savran FO, Kiran B, et al. *Nigella sativa* (black seed) oil does not affect the T-helper 1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(3):295-8.
- 14- Herzog CR, Desai D, Amin S. Array CGH analysis reveals chromosomal aberrations in mouse lung adenocarcinomas induced by the human lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(3):856-63.
- 15- Rafienia M, Orang F, Hojjati Emami Sh. Preparation and characterization of polyurethane microspheres containing theophylline. *J Bioact Compat Polym*. 2006;21(4):341-9.
- 16- Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Olfert ED, Cross BM, Ann Mc William A, editors. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
- 17- Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR. Dose-response relationship between O⁶-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res*. 1990;50(12):3772-80.
- 18- Hansen HH. Lung Cancer (Advances in Basic and Clinical Research). New York City: Springer Science Business Media Llc; 1994.
- 19- Barzegari A, Mirdar S. Investigating the effect of one