بررسی خواص ضد التهابی اسانس سیاه دانه ایرانی در کاهش بیان ژن های سایتوکین های پیش التهابی TNF-α و IL-18 در سلول های ماکروفاژ و مونوسیت انسانی (Human THP-1)

محمد مقصودی مقدم[1*]، حسین مقصودی[2]، محمد ابراهیمی[2]، عباس قنبری[1]، سید حسین حجازیان[1]

۱) گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور ، تهران، ایران

۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور ، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۹۵/۱/۱۶   تاریخ پذیرش:۹۵/۳/۵

چکیده

مقدمه: استئو آرتریت شایع ترین نوع بیماری مفصلی در انسان است. کشف رد پای التهاب در بروز استئو آرتریت کشف جدیدی نیست. تغییرات تخریبی در مفاصل التهابی با تولید بیش از حد سایتوکین‌های التهاب آور همراه است. در این جریان سلول های مونوسیت و ماکروفاژ به سینوویوم وارد شده و در تولید سایتوکین ها نقش ایفا می‌کنند. هدف این مطالعه بررسی میزان تاثیر اسانس سیاه دانه در کاهش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی در سلول های ماکروفاژ و مونوسیت انسانی در مقایسه با دارو های ضد التهاب استروئیدی در مدلی شبیه به استئوآرتریت است.

مواد و روش ها: کشت سلول های THP-1، تهیه اسانس سیاه دانه، تعیین سمیت با روش‌های SDH، LDH و MTT، تیمار سلول‌ها با LPS، دارونماها و اسانس، جد اسازی RNA و سپس تولید cDNA انجام گردید و میزان بیان TNF-α و IL-18 با روش RT-PCR تعیین و با استفاده از ANOVA، F static و REST آنالیز گردید.

یافته های پژوهش: اسانس سیاه دانه میزان بیان TNF-α و IL-18 را کاهش داده و دارای اختلاف معنی داری ($P<0.05$) با گروه کنترل می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که اسانس سیاه دانه باعث کاهش بیان TNF-α و IL-18 در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS می‌شود و به دلیل خاصیت ضد التهابی می‌تواند در درمان بیماری‌های التهابی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: استئو آرتریت، اسانس سیاه دانه، سایتوکین، سلول‌های THP-1

* **نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری، تهران، ایران

Email: maghsudi67@yahoo.com

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

مقدمه

استئو آرتریت (OA) که به نام بیماری دژنراتیو مفصل نیز نامیده می‌شود شایع ترین نوع آرتریت و بیماری مفصلی در انسان است که می تواند به درد مزمن و ناتوانی شدید منجر شود (۱). این بیماری به دو نوع اولیه و ثانویه تقیسم می‌شود (۲). نوع اولیه که در جریان آن تخریب غضروف مفصل بدون نا هنجاری زمینه ای قبلی روی می‌دهد و معمولا در افراد ۴۰ سال به بالا و در اثر فشارهای مکرر طبیعی یا فشار غیر طبیعی بر مفصل ضعیف ایجاد می‌شود (۳، ۲). استئو آرتریت ثانویه به دنبال یک علت قبلی و زمینه ای هم چون صدمات استخوانی، مفصلی، بیماری‌های مادر زادی و متابولیکی به وجود می آید (۴). امروزه استئو آرتریت را تنها یک بیماری دژنراتیو نمی‌دانند بلکه آن را ناشی از یک پدیده فعال بیو مکانیکی، بیو شیمیایی و سلولی تلقی می‌کنند (۵). کشف رد پای التهاب در بروز استئو آرتریت کشف جدیدی نیست و سال‌هاست مشخص شده که درجاتی از التهاب سینوویوم در مفصل وجود دارد. تغییرات تخریبی در مفاصل التهابی با تولید بیش از حد سایتوکین های پیش التهابی همراه است (۶). مونوسیت ها و ماکروفاژ ها نقش مهمی در شرایط مختلف التهابی بسته به مرحله ای که فعال می شوند بازی می کنند (۷). مونوسیت‌ها و ماکروفاژ ها به سینوویوم وارد شده و در تولید سایتوکین ها و سایر واسطه های التهابی نقش ایفا می‌کنند (۶). گزینه های فعلی درمانی که برای استئو آرتریت استفاده می شود اثر بخش نیستند. در میان عوامل دارویی که در حال حاضر برای درمان استفاده می‌شوند می‌توان از داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAID)، کورتیکو استروئید و داروهای داخل مفصلی مانند اسید هیالورونیک نام برد. در این میان NSAID ها استفاده وسیعی دارند اما مصرف طولانی مدت آن‌ها با عوارض جانبی خطرناک مثل زخم‌های دستگاه گوارشی همراه بوده است. با این تفاسیر نیاز به روش‌های درمانی مؤثر با عوارض کمتر باعث شد که رویکرد های مکمل برای از بین بردن درد و هم چنین بهبود کارکرد و کیفیت زندگی مورد توجه قرار گیرد (۸). امروزه استفاده از ترکیبات گیاهان دارویی جهت کاهش عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی به دلیل نقش آن ها در سرکوب بیان ژن سیتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل TNF-α و IL-18 رو به افزایش می‌باشد (۱۰ ، ۹).

سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) از خانواده آلاله (Ranunculaceae) به طور معمول به عنوان دانه سیاه در طب سنتی شناخته شده است. در هند، کشورهای عربی، اروپا و ایران برای اهداف درمانی استفاده می‌شده است. هم چنین به عنوان ادویه و در درمان بیماری‌هایی مثل آسم، فشار خون، دیابت، التهاب، سرفه، برونشیت، سردرد، اگزما، تب، سرگیجه و آنفولانزا نیز مصرف داشته است (۱۱). اسانس سیاه دانه دارای اثرات ضد دردی و ضد التهابی می‌باشد (۱۲). هم چنین در بررسی Taka و همکاران، فعالیت ضد التهابی تیمو کینون که جز مواد اصلی تشکیل دهنده در سیاه دانه است نشان داده شد (۱۳). در مطالعه‌ی دیگر، Entok و همکاران، اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی سیاه دانه نشان داده شد است (۱۴)؛ بنا بر این احتمالا اسانس سیاه دانه می‌تواند در جهت کاهش درد و التهاب ناشی از بیان سایتوکین های پیش التهابی موثر باشد (۱۴).

هدف اصلی این مطالعه، مقایسه اثر اسانس سیاه دانه بر کاهش بیان ژن های سایتوکین های پیش التهابی TNF-αو IL-18 در سلول های ماکروفاژ و مونوسیت انسانی با دارو های شیمیایی مانند NSAIDs است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه برای تهیه اسانس سیاه دانه اقدام به تهیه نمونه دانه سیاه دانه از ارتفاعات شهر اراک (34°00'N, 49°40') گردید و پس از تایید مرکز ذخایر ژنتیکی ایران، اقدام به اسانس گیری از آن در پژوهشکده گیاهان دارویی وابسته به جهاد دانشگاهی واقع در شهر کرج به روش کلونجر گردید.

کشت سلول‌های THP-1: سلول‌های THP-1 (این سلول‌ها در محیط کشت به دو شکل چسبنده به پلیت و غیر چسبنده وجود دارند) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، پس از انتقال به آزمایشگاه و قرار گرفتن در انکوباتور در شرایط « حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، فشار دی اکسید کربن ۵٪ و اکسیژن ۹۵٪» کنترل روزانه محیط کشت از نظر بررسی آلودگی‌های احتمالی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

و ظاهر سلول ها، تعویض محیط کشت ۴۸-۷۲ ساعت و رسیدن به تراکم بالای ۸۵٪، نگه داری و سپس سلول های معلق در محیط کشت جدا و طی دو الی سه پاساژ برای مراحل نهایی آماده گردید.

تعیین اثر سمیت اسانس با روش‌های SDH, LDH, MTT و Trypan blue: میزان سمیت اسانس سیاه دانه با استفاده از روش های MTT Assay, LDH Assay, SDH Assay و Trypan blue تعیین و میزان LC50 مشخص گردید.

MTT Assay: در این روش آنزیماتیک، به عنوان سوبسترای واکنش از نمک های محلول تترا زولیوم که مهم ترین آن‌ها MTT است استفاده می‌شود. تترا زولیوم نمک محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد یا PBS آماده سازی گردد ترکیب زرد رنگی را ایجاد می‌کند و زمانی که این محلول رنگی MTT به سلول های محیط کشت افزوده گردد، حلقه MTT فقط در میتوکندری سلول های سالم در حضور آنزیم دهیدروژناز شکسته شده و به ترکیب نا محلول فورمازان تبدیل می‌شود. بلورهای نا محلول در آب فورمازان توسط حلال های آلی مانند DMSO و یا ایزو پریل اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ بنفش ایجاد شده توسط اسپکترو فومتری در طول موج 570nm قرائت می‌شود. به وسیله این آزمایش ساده و دقیق می‌توان پاسخ سلول های مختلف را به فاکتور های خارجی از جمله فاکتور های رشد، دارو های سایتو توکسیک و سایر عوامل شیمیایی ارزیابی کرد کلیه مراحل آزمایش در پلیت های ۹۶ خانه ای انجام می پذیرد (۱۵).

برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا یک سوسپانسیون سلولی با غلظت کاملا مشخص مثلا یک میلیون سلول در میلی لیتر از سلول‌های مورد نظر تهیه کرده و پس از بررسی درصد زنده زایی آن‌ها مقادیر مشخص و فزاینده ای از آن را به صورت سه تکرار در پلیت ۹۶ حفره ای کشت سلولی کشت می دهیم. سپس این پلیت را به انکوباتور CO_2 منتقل نموده و ۲۴ ساعت بعد تست MTT انجام داده و با به دست آوردن مقادیر جذب نوری در مقابل تعداد سلول مربوطه منحنی استاندارد را رسم می‌کنیم. قرائت میزان جذب رنگ بنفش ایجاد شده حاصل از شکستن حلقه MTT توسط آنزیم دهیدروژناز و درصد سلول های زنده تعیین می‌گردد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان MTT محاسبه می‌گردد.

SDH Assay: سوکسینات دهیدروژناز یک آنزیم مهم میتوکندریایی می‌باشد که تنها در میتوکندری سلول های یوکاریوت کاملا پایدار و در غلظت بالا وجود دارد. سوکسینات دهیدروژناز به عنوان یک آنزیم نشانگر برای میتوکندری مفید است و تنها آنزیمی است که در سیکل کربس و زنجیره انتقال الکترون شرکت می‌کند و در چرخه ی کربس باعث اکسیداسیون سوکسینات به فومارات می‌شود. فعالیت SDH به وسیله ی مولد یک محصول با جذب در 600nm به نسبت فعالیت آنزیماتیک حاضر تعیین می شود (۱۵).

LDH Assay: آنزیم لاکتات دهیدوژناز (LDH) تقریبا در تمام سلول های زنده (حیوانات، گیاهان و پروکاریوت‌ها) وجود دارد. لاکتات دهیدروژناز اکسید و ردوکتازی است که در آخرین چرخه گلیولیز باعث تبدیل پیرووات به لاکتات می‌شود. دهیدروژنازها آنزیمی‌هایی که در انتقال گروه هیدرید از یک ملکول به ملکول دیگر شرکت می‌کنند. صدمات وارده به بافت و همولیز گلبول‌های قرمز منجر به آزاد شدن آنزیم LDH به جریان خون می‌شود. بنا بر این آنزیمی است که به طور گسترده برای اندازه گیری میزان صدمه به بافت و میزان سمیت بافتی و سلولی استفاده می‌شود. لاکتات دهیدروژناز NAD را به NADH کاهش می‌دهد که به طور خاصی با فعالیت رنگی در طول موج 450 nm شناسایی می‌شود (۱۵).

Trypan blue: ابتدا محتویات محیط کشت توسط سمپلر به لوله فالکون انتقال و به دنبال آن تحت شرایط: سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، زمان ۵ دقیقه، درجه حرارت دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. انتقال لایه فوقانی به آرامی به صورتی که به لایه رسوبی زیرین آسیبی وارد نشود انجام گرفت. سپس ۱ سی سی محیط کشت غنی شده به آن افزوده شده و به آرامی چند بار توسط سمپلر مخلوط و ۱۰λ از این سوسپانسیون با ۹۰λ از محلول ۰/۴٪ تریپان بلو توسط سمپلر به اپندورف اضافه گردید. لوله‌ها به آرامی ۲۰-۱۰ ثانیه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

مخلوط شده و سپس (5) از محتوای لوله برای شمارش به لام همو سایتومتر منتقل گردید. در این آزمایش هسته ی سلول های از بین رفته با جذب رنگ تریپان بلو به رنگ آبی تیره ظاهر شده اما سلول های سالم به رنگ روشن نمایان می گردند. بدیهی است در صورت تعلل در شمارش سلولی بعد از ۵-۴ دقیقه تمام سلول ها رنگ آبی تریپان بلو را به خود جذب می‌کنند که این تغییر در نتیجه ی مرگ سلولی می‌باشد.

تعیین LC50: متوسط غلظت موثر (EC50) غلظت آماری به دست آمده از یک ماده برای تولید یک اثر مشخص در ۵۰٪ از موجودات آزمون در یک جمعیت خاص تحت تعریف مجموعه ای از شرایط است. در مورد خاص از LC50، اثر مرگ ارگانیسم هدف مورد نظر است (۱۶). بعد از رسیدن تراکم سلول ها به بالای ۸۰٪ اقدام به شمارش سلول ها کرده و میزان $۵*۱۰^{۵}$ سلول در پلیت های ۱۲ خانه ته صاف همراه با ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM-F-12 غنی شده با % ۱۰FBS، ۵۰ µg/ml اسید آسکوربیک و ۵۰µg/ml پنی سیلین ۱۰۰ یونیت، استرپتو مایسین µg ۱۰۰، آمفو تریسین B افزوده شد. پلیت ها به مدت ۳-۲ دقیقه به آرامی دورانی داده شد و سپس به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵٪ با رطوبت ۹۰٪ و اکسیژن ۹۵٪ نگه داری گردید و سپس اسانس سیاه دانه در غلظت های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۹، ۰/۰۱، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۹، ۱ و ۹ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شده با استفاده از محیط کشت DMSO، به پلیت های ۱۲ خانه ته صاف افزوده شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکو باتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵% با رطوبت ۹۰٪ و اکسیژن ۹۵٪ نگه داری گردید

بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت ها برای تعیین LC50 کنترل شد. نشانه های لیز سلولی تشکیل توده های سلولی انباشته شده (CLUMP) است که ناشی از سلول های مرده می باشد به عبارت بهتر سلول های مرده بر روی هم انباشته می‌شوند.

تحریک و تیمار سلول های THP-1:

تیمار توسط Lipopolysaccharides (LPS): LPS به عنوان ایجاد کننده مدل بیماری استفاده می‌شود و تزریق LPS به محیط کشت حاوی سلول منجر به افزایش بیان سایتوکین های پیش التهابی و التهابی می‌شود (۱۵).

ابتدا $۶*۱۰^{۶}$ سلول را در محیط کشت، کشت می‌دهیم و پس از ۷۲ ساعت میزان 100ng LPS به محیط اضافه شد. سری اول پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور بیان سایتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF-α و IL-18 در انکو باتور CO_2 دار نگه داری شد.

تیمار توسط Dexamethazone: گلوکور تیکوئید ها علیرغم مزایای بسیار زیاد دارای معایبی مانند؛ سرکوب کننده سیستم ایمنی و ضد التهاب بوده ولی به طور فزاینده برای درمان موارد بسیار زیادی از بیماری ها و سندرم ها مانند حساسیت، سرکوب کردن افزایش بیان سایتوکین‌ها در جریان بیماری های متفاوت و به خصوص در موارد نارسایی های سیستم ایمنی مورد استفاده فراوانی دارند (۱۸). در این مطالعه از دگزا متازون به عنوان کنترل مثبت که توانایی کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی را دارد با دوز 1- nanoM 100 استفاده گردید (۱۹).

تیمار توسط NSAIDs:NSAIDs در کاهش درد، تب و جلوگیری از تورم بسیار موثر می باشد. در این بررسی برای مقایسه اثر ضد التهابی اسانس سیاه دانه با دارو های NSAIDs، از ایبو بروفن به عنوان نماینده NSAIDs به منظور کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی با دوز nanoM 50-100 در سلول های تحریک شده توسط LPS استفاده شد (۲۰).

تیمار توسط DMSO: به منظور بررسی این که حلال (عصاره، ماده موثره یا اسانس) تاثیری بر کاهش بیان ژن سایتوکین های ایجاد شده در سلول های تحریک شده توسط LPS ندارد، از این تیمار استفاده شد.

جدا سازی RNA و انجام PCR: مراحل جداسازی RNA: با استفاده از معرف Trizol (Gregory T.Lucier Carlsbad,California,United States) (Invitrogen) شرکت سینا ژن و در نهایت برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکترو فتومتری (UV-2100 Spectrophotometer) استفاده گردید. در

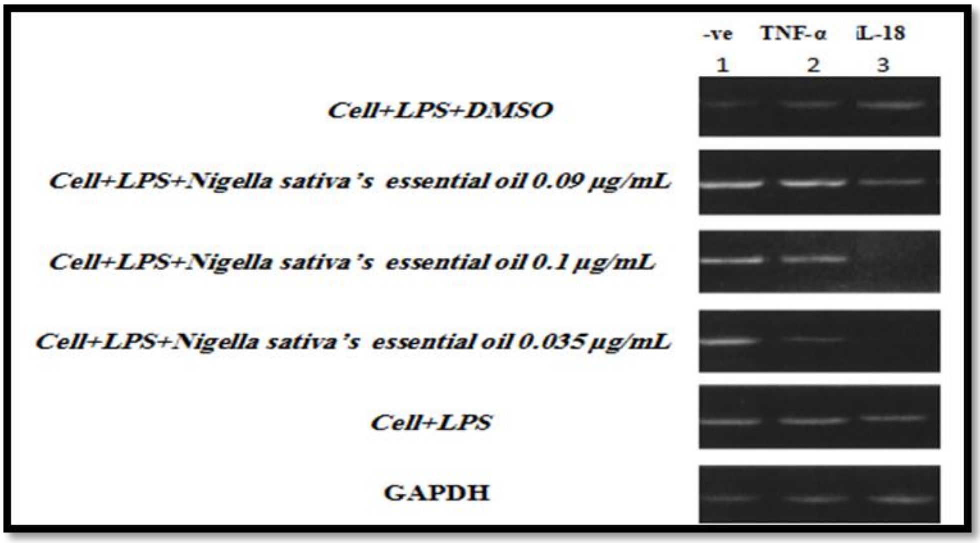
[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

صورت وجود آلودگی DNA، از آنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی استفاده می‌شود.

برای تبدیل RNA به cDNAاز کیت 2step RT-PCR از شرکت vivantis (Malaysia-Selango) بر اساس پروتکل مربوطه استفاده گردید. در انتها بر روی cDNA، با انجام PCR غلظت نمونه تولید شده افزایش پیدا کرد.

تولید cDNA از RNA استخراج شده از سلول های THP-1 و انجام RT-PCR: در مرحله نخست RNA با استفاده از روش نسخه برداری معکوس به cDNA تبدیل شد و در مرحله بعدی cDNA جهت تکثیر توسط RT-PCR در شرایط c ۴۲° به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت c ۹۴° به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

به منظور بررسی میزان تأثیر اسانس سیاه دانه بر مهار بیان ژن های دخیل در تولید سایتوکین های التهابی، میزان mRNA اختصاصی تولید شده توسط ژن‌های مورد نظر ارزیابی گردید جهت این ارزیابی با استفاده از Real Time– PCR و پرایمر های اختصاصی و Total cDNA حاصل از RT-PCR که در مرحله قبل با استفاده از PCR به اندازه کافی ازدیاد شده است میزان mRNA اختصاصی هر یک از ژن های مورد نظر ارزیابی می‌شود در این مطالعه پرایمرهای آماده اختصاصی که سکانس های آن‌ها قبلاً مشخص شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار استفاده گردید. شرایط استاندارد PCR انجام شد و فرآورده PCR در آگارز ژل ۱٪ همراه با اتیدیوم بروماید Mg/ml ۰/۵ چک شد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. آگارز ژل ۱٪ از نمونه‌های *PCR* product، چاهک ۱ مربوط به نمونه کنترل، چاهک ۲ مربوط به TNF-α، چاهک ۳ iL-18 می‌باشد. میزان ۵λ از نمونه + ۵λ از dye 2X loading RNA در چاهک‌ها تزریق گردید و تحت میدان الکتریکی غیر متناوب ولتاژ ۹۰ ولت و ۱۵ میلی آمپر و مدت زمان ۴۵ دقیقه قرار گرفت. در چاهک‌های ۱–۳ ردیف اول (Cell+LPS+DMSO) و ردیف (Cell+LPS) محصول به صورت یک بند کاملا مشخص با وزن ملکولی ۲۰۰ *bp*و بدون آلودگی یا اسمیر مشاهده می‌شود و به معنی عدم تاثیر *DMSO*بر روی بیان سایتوکین‌های حاصل از سلول تحریک شده با *LPS*می‌باشد، در ردیف دوم، سوم و چهارم (تیمار توسط اسانس سیاه دانه با غلظت‌های 0.09, 0.1, 0.35 µg/mL به منظور مقایسه غلظت‌های متفاوت انجام پذیرفت. غلظت 0.09 µg/mL تاثیری بر بیان سایتوکین‌های مورد نظر در سلول‌های تحریک شده توسط LPS ندارد, غلظت,0.1 µg/mL تاثیری بر بیان TNF-α *ندارد* ولی بیان iL-18 را به میزان ۹۰ %*کاهش* می‌دهد و غلظت µg/mL۰.035 منجر به کاهش بیان *TNF-α*به میزان حدودا 70%و کاهش بیان سایتوکین iL-18 به میزان ۹۰% می‌شود. ردیف آخر مربوط به بیان ژن کنترل کننده GAPDHیا Housekeeping gene می‌باشد که بعد از تیمار توسط اسانس سیاه دانه در سلول‌های تحریک شده توسط *LPS* نیز اندازه گیری شد و بیان آن تعیین کننده فعالیت طبیعی سلول‌ها می‌باشد. عکس در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری توسط ژل داک تهیه گردید.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

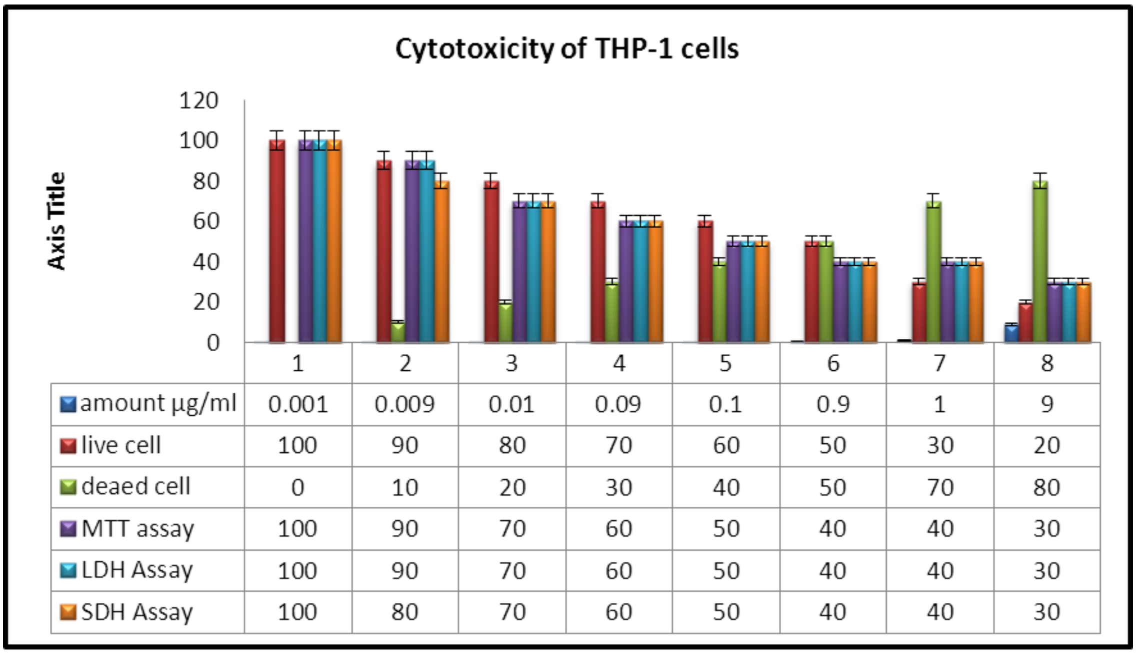
[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

روش Real time PCR Quantilative: PCR در زمان واقعی با استفاده از همان پرایمر هایی که برای PCR کیفی استفاده گردید، انجام شد و از evagreen به عنوان مستر میکس کارخانه سینا کلون استفاده شد. نتایج به دست آمده از CT (Threshold cycle)، توسط دو روش ۱- منحنی استاندارد و ۲- ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری: تمامی داده‌ها به عنوان میانگین 1±SD بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از آنالیز یک سویه واریانس ((ANOVA، F static و REST اجرا شده است. برای آنالیز CT، P<0.05 به شکل آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌های پژوهش

پس از انجام تست های سنجش MTT، LDHو SDH نتایج به شرح نمودار شماره ۱ مشخص گردید. همان طور که در نمودار مشخص است در غلظت ۰/۹ میکرو گرم در میلی لیتر جمعیت سلول های زنده و مرده با هم برابرند (۵۰٪). برای تایید این مساله بعد از گذشت ۲۴ ساعت برای تعیین درصد زنده مانی سلول و شمارش سلول های زنده و مرده از روش تریپان بلو استفاده شد.



	1	2	3	4	5	6	7	8
amount µg/ml	0.001	0.009	0.01	0.09	0.1	0.9	1	9
live cell	100	90	80	70	60	50	30	20
deaed cell	0	10	20	30	40	50	70	80
MTT assay	100	90	70	60	50	40	40	30
LDH Assay	100	90	70	60	50	40	40	30
SDH Assay	100	80	70	60	50	40	40	30

نمودار شماره ۱. سیتوتوکسیتی در سلول‌های THP-1

نتایج MTT Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت ۰/۱µg/ml میزان سلول های سالم و از بین رفته برابر با ۵۰٪ می‌باشد که معادل با LD50% می‌باشد ولی از آن جا که این غلظت باعث از بین رفتن نیمی از سلول ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% امکان پذیر بوده و معادل با ug/ml ۰/۰۳۵ می باشد.

نتایج LDH Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت ۰/۱µg/ml میزان سلول های سالم و از بین رفته برابر با ۵۰٪ می‌باشد که معادل با LD50% می‌باشد ولی از آن جا که این غلظت باعث از بین رفتن نیمی از سلول‌ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% امکان پذیر بوده و معادل با ug/ml ۰/۰۳۵ می‌باشد.

نتایج SDH Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت µg/ml ۰/ ۱ میزان سلول های سالم و از بین رفته برابر با ۵۰٪ می‌باشد که معادل با LD50% می باشد ولی از آنجا که این غلظت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

باعث از بین رفتن نیمی از سلول ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% امکان پذیر بوده و معادل با ۰/۰۳۵ ug/ml می باشد.

نتایج تریپان بلو: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت ۰/۹ µg/ml میزان سلول های سالم و از بین رفته برابر با ۵۰٪ می‌باشد که معادل با LD50% می‌باشد این غلظت با توجه به تریپان بلو به دست آمده است ولی از آن جایی که رنگ تریپان بلو خود سلول های زنده را از بین می‌برد و باعث به وجود آمدن خطا می‌شود بنا بر این نمی توان به آن اکتفا کرد. از طرفی چون MTT، LDH و SDH بر اساس معیار های زنده مانی و حیات سلول ها عمل می‌کنند بنا بر این نتایج دقیق تری در اختیار ما قرار می دهند؛ و LC_{50} برابر با غلظت ۰/۱µg/ml می‌باشد و باید میانه آن تعیین شود که برابر با ۰/۰۳۵µg/ml می‌باشد

آنالیز نتایج و داده ها: آنالیز کمی تاثیر اسانس سیاه دانه بر روی بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در سلول‌های THP-1: نتایج تیمار سلول های THP-1 بعد از کشت در شرایط متفاوت (به صورت گروه های واقع در جدول شماره ۱) انجام شد.

جدول شماره ۱. نتایج CT در سایتوکین‌ها

Gene	Cell	Cell+LPS	Cell+LPS+Steroid	Cell+LPS+NSAID	Cel+LPS+Essential oil	Cell+Vihicle
THP-1 TNF-alpha	31.69±0.411	100	30.15±0.8203	30.38±0.9212	35.42±0.6378	31.69±0.3127
THP-1 iL 18	32.23 ±0.312	100	29.25±0.8203	31.46±0.1034	34.25 ±0.6378	32.23 ±0.3127

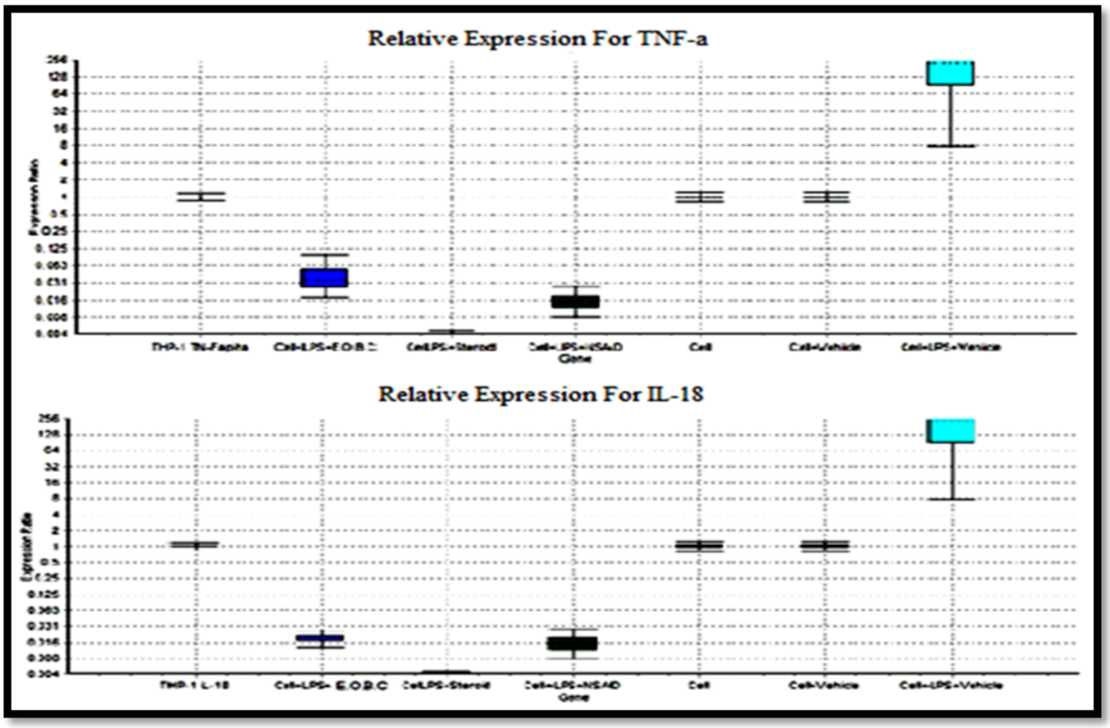
همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در اثر تحریک با LPS به میزان ۱۰۰٪ افزایش یافت و در اثر تیمار با اسانس سیاه دانه میزان بیان آن ها به ترتیب ۶۴/۵۸٪ و ۶۵/۷۵٪ کاهش را نشان داده است.

آنالیز کمی تاثیر اسانس سیاه دانه بر روی بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در سلول‌های THP-1 با استفاده از نرم افزار REST 2009: REST نرم افزاری است برای تخمین افزایش یا کاهش بیان ژن که توسط تکنیک های قوی، بیان ژن را اندازه گیری می‌کند. همچنین این نرم افزار نتایج را به صورت گرافیکی هم گزارش می‌کند و تفاوت هر ژن را نسبت به ژن‌های دیگر به نمایش در می‌آورد.

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از آنالیز داده های نرم افزار REST بر روی بیان ژن سایتوکین Human THP-1 TNF-α

Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
THP-1 TNF-α	0.6973	1.000	0.934 - 1.071	0.878 - 1.139	0.972	
Cell+LPS+EO.BC	0.6973	0.038	0.023 - 0.065	0.018 - 0.094	0.001	DOWN
CelLPS+Steroid	0.6973	0.002	0.002 - 0.004	0.001 - 0.004	0.000	DOWN
Cell+LPS+NSAID	0.6973	0.015	0.010 - 0.022	0.008 - 0.026	0.000	DOWN
Cell	0.6973	1.000	0.895 - 1.117	0.836 - 1.196	0.988	
Cell+Vehicle	0.6973	1.000	0.895 - 1.117	0.836 - 1.196	0.988	
Cell+LPS+Vehicle	0.6973	213.082	57.913 - 764.403	17.106 - 1,566.223	0.000	UP

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]
[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]



نمودار شماره ۲. نمودار بررسی میزان بیان ژن سایتوکین های *Human* THP-1 TNF-α و Human THP-1 IL-18 در مقایسه با گروه های کنترل توسط نرم افزار REST (خط چین ها بیان ژن را نشان می دهد)

جدول و نمودار شماره ۲ نتایج حاصل از بیان ژن سایتوکین TNF-α در مقایسه با گروه های کنترل را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود میزان بیان ژن مذکور در گروه Cell+LPS+Vehicle افزایش یافته اما در تیمار با NSAIDs، Steroid و اسانس سیاه دانه کاهش یافته است.

جدول شماره ۳. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های نرم افزار REST بر روی بیان ژن سایتوکین Human THP-1 IL-18

Gene	*Reaction Efficiency*	*Expression*	*Std. Error*	*95% C.I.*	*P(H1)*	*Result*
THP-1 iL-18	0.6973	1.000	0.934 - 1.071	0.878 - 1.139	0.980	
Cell+LPS+EO.BC	0.6973	0.019	0.016 - 0.022	0.013 - 0.026	0.000	DOWN
CelLPS+Steroid	0.6973	0.002	0.002 - 0.004	0.001 - 0.004	0.001	DOWN
Cell+LPS+NSAID	0.6973	0.015	0.010 - 0.022	0.008 - 0.026	0.000	DOWN
Cell	0.6973	1.000	0.895 - 1.117	0.836 - 1.196	0.984	
Cell+Vehicle	0.6973	1.000	0.895 - 1.117	0.836 - 1.196	0.984	
Cell+LPS+Vehicle	0.6973	213.082	57.913 - 764.403	17.106 - 1,566.223	0.000	UP

جدول ۳ و نمودار شماره ۲ نتایج حاصل از بیان ژن سایتوکین IL-18 در مقایسه با گروه های کنترل را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود میزان بیان ژن مذکور در گروه Cell+LPS+Vehicle افزایش یافته اما در تیمار با NSAIDs، Steroid و اسانس سیاه دانه کاهش یافته است.

بررسی نتایج بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در سلول های THP-1 با استفاده از نرم افزار F static و ANOVA: میزان F static برای بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در سلول های THP-1 بر اساس داده های مندرج در جدول ۴ بدست آمده است. در آنالیز CT توسط ANOVA نتیجه نهایی آماری برابر F می‌باشد که به بررسی تغییرات بین گروه ها می پردازد. در این بررسی تجزیه و تحلیل در دو گروه Cell+LPS+Essential oil و Cell+LPS انجام پذیرفت که در نهایت منجر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

به تولید F گردید. پراکندگی F توسط دو میزان، درجه آزادی را بیان می کند، یکی به نام اختلاف بین گروه ها و دیگری به نام اختلاف داخل گروه‌ها که ترکیب این دو منجر به توزیع F شد. در صورتی که عدد جدول پراکندگی F کمتر از میزان گرفته شده از جدول پراکندگی باشد، فرضیه پیشنهادی قابل قبول می‌باشد و میزان به دست آمده در سطح ۵٪ قابل قبول بوده و بین نمونه ها تفاوتی وجود ندارد و اما در صورتی که F static بیشتر از میزان گرفته شده از جدول پراکندگی باشد، فرضیه پیشنهادی غیر قابل قبول بوده و بین نمونه ها تفاوت معنی داری وجود دارد؛ بنا بر این در صورتی که میزان نهایی F static کم تر از ۳/۸۸۵۳ باشد فرضیه ما قابل قبول است و به معنی این است که اسانس سیاه دانه منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین های مورد نظر در سلول‌های تیمار شده توسط LPS شده است. در صورتی که میزان نهایی F static بیشتر از ۳/۸۸۵۳ باشد فرضیه ما غیر قابل قبول است.

جدول شماره ٤. نتایج F static سایتوکین های TNF-α و IL-18 در تیمار با اسانس سیاه دانه و Vehicle

Gene	*Vehicle*	*Essential oil of Nigella sativa L.*	*Critical Value*	*Result*
THP-1 TNF-α	32.48	1.3	3.89	Accept able
THP-1 iL-18	32.48	0.91	3.89	Accept able

جدول شماره ۵. ارزیابی بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 توسط نرم افزار ANOVA

Result for TNF-α				
Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	187.2	5	37.44	2.373
error	1798.	114	15.78	
total	1986.	119		
The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.043				
Result for IL-18				
Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	219.1	5	43.81	2.814
error	1775.	114	15.57	
total	1994.	119		
The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.020				

با توجه به جدول شماره ۴، نتایج میزان نهایی F static سایتوکین TNF-α در تیمار با اسانس سیاه دانه ۱/۳ بوده است و این مقدار کم تر از p-Value درج شده در جدول فراوانی است. از طرفی با توجه به جدول شماره ۵ نتایج بدست آمده از ANOVA برای سایتوکین TNF-α به فرض فرضیه صفر برابر است با ۰/۴۳، با توجه به مقدار sig=0.043، چون در سطح معنی دار α=0.05، α=0.05> sig=0.043 می‌باشد بنا بر این فرضیه مورد نظر با ضریب اطمینان ۹۹٪ صحیح می باشد؛ و این با نتایج به دست آمده از روش های real-time PCR، ANOVA، CT وREST 2009 مطابقت دارد.

هم چنین با توجه به جدول شماره ۴، نتایج میزان نهایی F static سایتوکین IL-18 در تیمار با اسانس سیاهدانه ۰/۹۱ بوده است و این مقدار کم تر از p-Value درج شده در جدول فراوانی است. از طرفی با توجه به جدول شماره ۵ نتایج بدست آمده از ANOVA برای سایتوکین IL-18 به فرض فرضیه صفر برابر است با ۰/۲۰، با توجه به مقدار sig=0.020، چون در سطح معنی دار α=0.05، α=0.05> sig=0.020 می‌باشد بنا بر این فرضیه ما با ضریب اطمینان ۹۹٪ صحیح می باشد؛ و این با نتایج به دست آمده از روش های real-time PCR، ANOVA، CT وREST 2009 مطابقت دارد.

بحث و نتیجه گیری

استئو آرتری از شایع ترین بیماری های مزمن از مفاصل انسان است. اساس تغییرات پاتولوژیک شامل تمام بافت مفصل است. در حال حاضر، در مراحل اولیه آن ماهیت التهاب با درجات مختلفی از شدت وجود دارد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

(۲۱) .کشف رد پای التهاب در بروز استئو آرتریت کشف جدیدی نیست و سال هاست که مشخص شده که درجاتی از التهاب سینوویوم در مفصل وجود دارد. تغییرات تخریبی در مفاصل التهابی با یک مجموعه از رویدادهای بیوشیمی از جمله تولید بیش از حد سایتوکین‌های التهاب آور تحریک می‌شود (۶). مونوسیت‌ها و ماکروفاژ ها نقش مهمی در شرایط مختلف التهابی بسته به مرحله ای که فعال می‌شوند بازی می کنند (۷). سلول های التهابی مانند مونوسیت ها و ماکروفاژ ها به سینوویوم وارد شده و در تولید سایتوکین‌ها و سایر واسطه های التهابی نقش ایفا می‌کنند (۶). به نظر می‌رسد مهم ترین گروه کنترل بیماری به سایتوکاین های التهابی، از جمله IL-1β، TNFα، IL-6، IL-15، IL-17 و IL-18 تعلق دارد (۲۱).

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر اسانس سیاه دانه در کاهش سطح بیان سایتوکین های پیش التهابی صورت گرفت. پس از تحریک سلول های THP-1 توسط 20 ng/ml LPS میزان بیان سایتوکین های TNF-α و IL-18 به ۱۰۰٪ افزایش یافته است و به دنبال تیمار توسط اسانس سیاه دانه کاهش بیان این سایتوکین‌ها به ترتیب ۳۵/۴۲ و ۳۴/۲۵ مشاهده می گردد، یعنی میزان بیان سایتوکین TNF-α، ۶۴/۵۸٪ و میزان بیان IL-18 نیز ۶۵/۷۵٪ کاهش داشته است. در صورتی که در گروه کنترل منفی که از Vihicle برای تیمار استفاده شده است تغییری در میزان بیان سایتوکین‌های مربوطه وجود ندارد، حال در گروه کنترل مثبت که از Steroid برای تیمار استفاده شد، تغییر قابل ملاحظه ای در میزان بیان ژن ایجاد شده است که قابل پیش بینی بود. این نتایج بیانگر این حقیقت است که اسانس سیاهدانه کاهش قابل توجه ای در میزان بیان سایتوکین‌های TNF-α و IL-18 ایجاد کرده که نمایانگر تاثیر ضد التهابی اسانس سیاه دانه می‌باشد. در مطالعه ای مشابه که به وسیله حاج هاشمی و همکاران، صورت گرفته است از اسید استیک، فرمالین و آزمون Tail flick و نور برای ارزیابی فعالیت ضد دردی و ضد التهابی اسانس سیاه دانه با استفاده از ادم پای کاراگینان و ادم گوش ناشی از روغن کرچک در موش استفاده شده و نتایج حاکی از اثرات ضد دردی و ضد التهابی اسانس دانه‌ی سیاه دانه بوده است (۱۲) که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد.

در مطالعه ای دیگر Entok و همکاران، اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی سیاه دانه نشان داده شده است. در این مطالعه بعد از القا التهاب به وسیله تزریق داخل صفاقی لیپو پلی ساکارید، درمان خوراکی دانه و تزریق داخل صفاقی اسانس صورت گرفته است. بعد از ۲۴ ساعت سطح سرمی آنزیم های ALT و AST کاهش چشم گیری نسبت به گروه های کنترل داشته است. افزایش در فعالیت این آنزیم ها نشان دهنده آسیب های کبدی از جمله التهاب است (۱۴). مطالعه حاضر تایید کننده نتایج این تحقیق است و با آن هم خوانی دارد.

در تایید کار خود آنالیز آماری توسط سه نرم افزار REST، F static و ANOVA صورت گرفت. در بررسی نتایج با نرم افزار REST در گروه‌های مختلف، بیان ژن سایتوکین های TNF-α و IL-18 در گروه Cell+LPS+Vehicle افزایش یافته اما در تیمار با NSAIDs، Steroid و اسانس سیاه دانه کاهش یافته است. این نتایج بیانگر این حقیقت است که اسانس سیاه دانه کاهش قابل توجه ای در میزان بیان سایتوکین TNF-α و IL-18 ایجاد کرده که نمایانگر تاثیر ضد التهابی اسانس سیاه دانه می‌باشد.

نتایج میزان نهایی F static سایتوکین‌های TNF-α و IL-18 در تیمار با اسانس سیاه دانه به ترتیب ۱/۳ و ۰/۹۱ بوده است و این مقادیر کم تر از p-Value درج شده در جدول فراوانی است. پس می‌توانیم نتیجه بگیریم که فرضیه ما مبنی بر این که اسانس سیاه دانه می‌تواند موجب کاهش بیان ژن سایتوکین‌های TNF-α و IL-18 در سلول‌های THP-1 شود مورد قبول است.

از طرفی نتایج به دست آمده از ANOVA برای سایتوکین TNF-α و IL-18 به فرض فرضیه صفر برابر با ۰/۴۳ و ۰/۲۰. بود، با توجه به مقدار sig=0.043 و sig=0.020، چون در سطح معنی دار α=0.05، α=0.05 >sig=0.043 می باشند بنا بر این فرضیه ما مبنی بر این که اسانس سیاه دانه می‌تواند موجب

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]
[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

کاهش بیان سایتوکین‌های TNF-α و IL-18 در سلول‌های THP-1 شود با ضریب اطمینان ۹۹٪ مورد قبول است و این با نتایج به دست آمده از روش های real-time PCR، CT و REST 2009 مطابقت دارد.

با توجه به این که در این مطالعه تاثیر اسانس سیاه دانه در کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی مشاهده گردید، پیشنهاد می‌شود با استفاده از سیستم گاز کروماتو گرافی ماده موثره ی اسانس سیاه دانه مشخص و تخلیص گردد و با انجام آزمایش بر روی موش های آزمایشگاهی میزان تاثیر آن بر کنترل و مهار بیماری مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز ری جناب آقای دکتر محمد احسان تقی زاده و جناب آقای مهدی محمدی مدیر محترم آموزش دانشگاه پیام نور مرکز ری، به دلیل پی گیری‌های مستمرشان در تجهیز آزمایشگاه بیو تکنولوژی، فراهم نمودن محیط آموزشی و تحقیقاتی به دور از استرس همراه با انرژی مثبت نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

تمامی نتایج از پایان نامه اینجانب اقتباس شد و تمام هزینه‌های این پروژه از طرف آقایان محمد مقصودی مقدم و جناب آقای دکتر حسین مقصودی تامین گردیده است.

References

1. Jordan JM, Linder GF, Renner JB, Fryer JG. The impact of arthritis in rural populations. Arth Care Res1995; 8:242-50.
2. owers MF. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: Systemic factors. Curr Opin Rheum 2001; 13:447-51.
3. Katz WA. Osteoarthritis clinical presentations. 3th ed. PhiladelphiaWB Saunders Publication. 2001;P. 231-8.
4.Cole BJ, Hamer CD. Degenerative arthritis of the knee in active patients evaluation and management. J Am Acad Orth Surg 1999; 7:389-402.
5. Feeley BT, Gallo RA, Sherman S, Williams RJ. Management of osteoarthritis of the knee in the active patient. J Am Acad Orthop Surg 2010;18:406-16.
6. Linda JS, Thomas M. Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis. Arth Res 2002; 115-130.
7. Madry H, Kohn D. Conservative treatment of knee osteoarthritis. Unfallchirurg 2004;107:689-99.
8. Salah UA. Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis a review. Oxford Uni J2005;2:301-8.
9. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood 2011; 117: 3720-32.
10. Tian B, Nowak DE, Brasier AR, Brasier N. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kB control. BMC Genomics 2005; 6:137.
11. Ziaei TS, Moharreri N, Hassanzadeh H. [Effects of Pharmacology and Toxicology effects of Nigella sativa]. J Med Plants 2011; 2: 42. (Persian)
12. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil as a potent analgesic and anti-inflammatory Drug. Phytother. Res 2004; 18:195–9.
13. Taka E, Mazzio EA, Goodman CB, Redmon N, Floresrozas H, Reams R, et al. Anti-inflammatory effects of thymoquinone in activated BV-2 microglial cells. J Neuroimmunol 2015; 286:5-12.
14. Entok E, Ustuner MC, Ozbayer C, Tekin N, Akyuz F, Yangi B, et al. Anti-inflammatuar and anti-oxidative effects of Nigella sativa L.18FDG-PET imaging of inflammation. Mol Biol Rep 2014; 41:2827-34.
15. Maleknia N, Shahbazi P. General Biochemistry.4th ed. Tehran Uni Print Publication Ins. 2007. P.131-5.
16. Alan D. Mcnaughtb A, Wilkinson A. IUPAC compendium of chemical terminology.2th ed. Blackwell Sci Oxford Publication.1997; P.244.
17. Andreasen AS, Krabbe KS, Kroghmadsen R, Taudorf S, Pedersen BK, Miller K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. Curr Med Chem 2008; 15:1697-705.
18. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. J. Allergy Clin Immunol 2003; 111:3-22.
19. Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Greco A, Perretti M, Parente L, et al. Down

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. British J Pharmacol1999; 126:1307-14.
20. Bancos S, Matthew P, Bernard L, David J, Richard P, et al. Ibuprofen and other widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit antibody production in human cells. Cell Immunol 2009; 258:18-28.
21. Wojdasiewicz P, Lukasz A, Poniatowski, Dariusz S. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Mediators Inflamm. 2014;2014:561459.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]

Investigation of the Anti-inflammatory Properties of Iranian *Nigella sativa L* in Reducing the Expression of Pre-Inflammatory Cytokines of TNF-α and IL-18 in Human THP-1 Cells

Maghsoudimoghadam M[1], MaghsoudiH[2], EbrahimiM[2], Ghanbari A[1], Hejazwyan H[1]*

(Received: April4, 2016 **Accepted:** May 25, 2016)

Abstract

Introduction: Osteoarthritis is the most common joint disease in humans. Footprints inflammation in osteoarthritis is not a new discovery. The degenerative change in inflammatory joints is associated with overproduction of inflammatory cytokines. In the process, the monocyte and macrophage cells enter the synovium and play a role in the production of the cytokines. The aim of this study was to investigate the effect of the essential oil of *Nigella sativa L* in reducing expression of pre-inflammatory cytokines in human macrophage and monocyte cells in comparison with steroid anti- inflammatory drugs in a model similar to osteoarthritis.

Materials & methods: Culturing THP-1 cells, providing *Nigella sativa L* essential oil, determining the degree of toxicity through SDH, LDH and MTT methods, treatment of the cells with LPS, placebos and essential oil, isolation of RNA and then, producing cDNA were performed. The expression of TNF-α and IL-18 was determined by RT-PCR method and analyzed through ANOVA, F static, and REST methods.

Findings: The essential oil of *Nigella sativa L* reduced the expression of TNF-α and IL-18 and has a significant difference ($p<0.05$) with the control group.

Discussion & conclusions: The results showed that the *Nigella sativa L* essential oil reduces the expression TNF-α and IL-18 in THP-1 cells stimulated with LPS and can be used in treating inflammatory diseases due to its anti- inflammatory properties.

Keywords: Osteoarthritis, Nigella sativa L essential oil, Cytokines, THP-1 cells

1. Dept of Biology, Payam-e Nour University, Tehran, Iran
2. Dept of Biotechnology , Payam-e Nour University, Tehran, Iran
** Correspondin author Email: maghsudi67@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.147]