

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

محمد مقصودی مقام^{*}، حسین مقصودی^۱، محمد ابراهیمی^۲، عباس قنبری^۱، سید حسین حجازیان^۱

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

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

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶

چکیده

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

مواد و روش ها: کشت سلول های THP-1، تهییه اسانس سیاه دانه، تعیین سمیت با روش های SDH، MTT و LDH، تیمار سلول ها با LPS، دارونها و اسانس، جد اسازی RNA و سپس تولید cDNA و سپس انجام گردید و میزان بیان TNF- α و IL-18 با روش RT-PCR تعیین و با استفاده از ANOVA 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 می باشد.

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 می شود و به دلیل خاصیت ضد التهابی می تواند در درمان بیماری های التهابی مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: استئوآرتربیت، اسانس سیاه دانه، سایتوکین، سلول های 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.

مقدمه

شیمیایی به دلیل نقش آن‌ها در سرکوب بیان ژن سیتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل TNF- α و IL-18 رو به افزایش می‌باشد (۹، ۱۰).

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 بیماری‌های مثل آسم، فشار خون، دیابت، التهاب، سرفه، برونشیت، سردرد، آگزما، 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 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 احتمالاً اسانس سیاه دانه می‌تواند در جهت کاهش درد و التهاب ناشی از بیان سایتوکین‌های پیش التهابی موثر باشد (۱۴).

هدف اصلی این مطالعه، مقایسه اثر اسانس سیاه دانه بر کاهش بیان ژن‌های سایتوکین‌های پیش التهابی در سلول‌های ماکروفاز و مونوپلیت انسانی با داروهای شیمیایی مانند NSAIDs است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه برای تهییه اسانس سیاه دانه اقدام به تهییه نمونه دانه سیاه دانه از ارتفاعات شهر اراک (۳۴°۰۰'N, ۴۹°۴۰'E) 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) تهییه شده از انسیتیو 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

استئو آرتیت (OA) که به نام بیماری دژنراتیو مفصل نیز نامیده می‌شود شایع ترین نوع آرتیت و بیماری مفصلی در انسان است که می‌تواند به درد مزمن و ناتوانی شدید منجر شود (۱). این بیماری به دو نوع اولیه و ثانویه تقسیم می‌شود (۲). نوع اولیه که در جریان آن تخریب غضروف مفصل بدون نا هنجاری زمینه‌ای قبلی روی می‌دهد و معمولاً در افراد ۴۰ سال به بالا و در اثر فشارهای مکرر طبیعی یا فشار غیر طبیعی بر مفصل ضعیف ایجاد می‌شود (۳، ۲). استئو آرتیت ثانویه به دنبال یک علت قبلی و زمینه‌ای هم چون صدمات استخوانی، مفصلی، بیماری‌های مادرزادی و متابولیکی به وجود می‌آید (۴). امروزه استئو آرتیت را تنها یک بیماری دژنراتیو نمی‌دانند بلکه آن را ناشی از یک پدیده فعلی بیو مکانیکی، بیو شیمیایی و سلولی تلقی می‌کنند (۵). کشف رد پای التهاب در بروز استئو آرتیت کشف جدیدی نیست و سال‌های است مشخص شده که درجاتی از التهاب سینوویوم در مفصل وجود دارد. تغییرات تخریبی در مفاصل التهابی با تولید بیش از حد سایتوکین‌های پیش التهابی همراه است (۶). مونوپلیت‌ها و ماکروفاز‌ها نقش مهمی در شرایط مختلف التهابی بسته به مرحله‌ای که فعل می‌شوند بازی می‌کنند (۷). مونوپلیت‌ها و ماکروفاز‌ها به سینوویوم وارد شده و در تولید سایتوکین‌ها و سایر واسطه‌های التهابی نقش ایفا می‌کنند (۶). گزینه‌های فعلی درمانی که برای استئو آرتیت استفاده می‌شود 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 NSAID‌ها استفاده وسیعی دارند اما مصرف طولانی مدت آن‌ها با عوارض جانبی خطناک مثل زخم‌های دستگاه گوارشی همراه بوده است. با این تفاسیر نیاز به روش‌های درمانی موثر 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

شده حاصل از شکستن حلقه MTT توسط آنزیم دهیدروژناز و درصد سلول های زنده تعیین می گردد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان MTT محاسبه می گردد.

SDH Assay: سوکسینات دهیدروژناز یک آنزیم مهم میتوکندریایی می باشد 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 می کند و در چرخه ای کربس باعث اکسیداسیون سوکسینات به فومارات می شود. فعالیت SDH به وسیله ای مولد یک محصول با جذب در 600nm به نسبت فعالیت آنژیماتیک حاضر تعیین می شود (۱۵).

LDH Assay: آنزیم لاکتات دهیدروژناز (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 می شود. دهیدروژنازها آنژیمی‌هایی که در انتقال گروه هیدرید از یک ملکول به ملکول دیگر شرکت می کنند. صدمات وارد به بافت و همولیز گلبول‌های قرمز منجر به آزاد شدن آنزیم LDH به جریان خون می شود. بنا بر این آنژیمی است که به طور گسترده برای اندازه گیری میزان صدمه به بافت و میزان سمیت بافتی و سلولی استفاده می شود. لاکتات دهیدروژناز NADH را به NADH کاهش می دهد که به طور خاصی با فعالیت رنگی در طول موج 450 nm شناسایی می شود (۱۵).

Trypan blue: ابتدا محتويات 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 محلotto و ۱۰۸ از این سوسپانسیون با ۹۰٪ از محلول ۰٪ تریپان بلو توسط سمپلر به اپندورف اضافه گردید. لوله‌ها به آرامی ۱۰-۲۰ ثانیه

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

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

MTT Assay: در این روش آنژیماتیک، به عنوان سوبسترانی واکنش از نمک های محلول تترا زولیوم که مهم ترین آنها MTT است استفاده می شود. 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 می کند و زمانی که این محلول رنگی MTT به سلول های محیط کشت افزوده گردد، حلقه MTT فقط در میتوکندری سلول های سالم در حضور آنژیم دهیدروژناز شکسته شده و به ترکیب نا محلول فورمازان تبدیل می شود. بلورهای نا محلول در آب فورمازان توسط حلال های آلی مانند DMSO و یا ایزو پریل اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ بنشش ایجاد شده توسط اسپکترو فومتری در طول موج ۵۷۰nm قرائت می شود. به وسیله این آزمایش ساده و دقیق می توان 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 سلول های مورد نظر تهیه کرده و پس از بررسی درصد زنده زایی آنها مقادیر مشخص و فراینده ای از آن را به صورت سه تکرار در پلیت ۹۶ حفره ای کشت سلولی کشت می دهیم. سپس این پلیت را به انکوباتور CO₂ 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 می کنیم. قرائت میزان جذب رنگ بنشش ایجاد

می‌شود و تزریق LPS به محیط کشت حاوی سلول منجر به افزایش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی و التهابی می‌شود (۱۵).

ابتدا 10^6 سلول را در محیط کشت، کشت می‌دهیم و پس از ۷۲ ساعت میزان LPS ۱۰۰ng به محیط اضافه شد. سری اول پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور بیان سایتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF- α و IL-۱۸ در انکو باتور CO_2 دار نگه داری شد.

تیمار توسط Dexamethazone: گلوکور تیکوئید‌ها 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 بیماری‌ها و سندروم‌ها مانند حساسیت، سرکوب کردن افزایش بیان سایتوکین‌ها در جریان بیماری‌های متفاوت و به خصوص در موارد نارسایی‌های سیستم ایمنی مورد استفاده فراوانی دارند (۱۸). در این مطالعه از دگزا متازون به عنوان کنترل مثبت که توانایی کاهش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی را دارد با دوز ۱- nanoM ۱۰۰ استفاده گردید (۱۹).

تیمار توسط NSAIDs: NSAIDs در کاهش درد، تب و جلوگیری از تورم بسیار موثر می‌باشد. در این بررسی برای مقایسه اثر ضد التهابی اسانس سیاه دانه با داروهای NSAIDs، از ایبو برو芬 به عنوان نماینده NSAIDs به منظور کاهش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی با دوز ۵۰-۱۰۰ nanoM در سلول‌های 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 سایتوکین‌های ایجاد شده در سلول‌های 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 Carlsbad, California, United States) (Invitrogen) شرکت سینا ژن و در نهایت برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکترو فوتومتری (UV-2100 Spectrophotometer) در

مخلوط شده و سپس (۵) از محتوای لوله برای شمارش به لام همو سایتومتر منتقل گردید. در این آزمایش هسته‌ی سلول‌های از بین رفته با جذب رنگ تریپان بلو به رنگ آبی تیره ظاهر شده اما سلول‌های سالم به رنگ روشن نمایان می‌گردند. بدیهی است در صورت تعلل در شمارش سلولی بعد از ۴-۵ دقیقه تمام سلول‌ها رنگ آبی تریپان بلو را به خود جذب می‌کنند که این تغییر در نتیجه‌ی مرگ سلولی می‌باشد.

تعیین LC50: متوسط غلظت موثر (EC50) غلظت آماری به دست آمده از یک ماده برای تولید یک اثر مشخص در 50% از موجودات آزمون در یک جمعیت خاص تحت تعریف مجموعه‌ای از شرایط است. در مورد خاص از LC50، اثر مرگ ارگانیسم هدف مورد نظر است (۱۶). بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بالای 80% اقدام به شمارش سلول‌ها کرده و میزان 10^4 سلول در پلیت‌های ۱۲ خانه ته صاف همراه با ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM-F-12 غنی شده با $5\% FBS$ ، $10\mu\text{g}/\text{ml}$ اسید آسکوربیک و $50\mu\text{g}/\text{ml}$ پنی سیلین $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ استرپتو مايسین $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ، آمفوتیریزین B افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۲-۳ دقیقه به آرامی دورانی داده شد و سپس به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در انکوباتور دمای 37°C درجه سانتی گراد و $5\% CO_2$ با رطوبت 90% و اکسیژن 95% نگه داری گردید و سپس اسانس سیاه دانه در غلظت‌های 0.001 ، 0.009 ، 0.09 ، 0.9 و $9\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ در میلی لیتر تهیه شده با استفاده از محیط کشت DMSO، به پلیت‌های ۱۲ خانه ته صاف افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکو باتور در دمای 37°C درجه سانتی گراد و $5\% CO_2$ با رطوبت 90% و اکسیژن 95% نگه داری گردید.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها برای تعیین کنترل شد. نشانه‌های لیز سلولی تشکیل توده‌های سلولی انباسته شده (CLUMP) است که ناشی از سلول‌های مرده می‌باشد به عبارت بهتر سلول‌های مرده بر روی هم انباسته می‌شوند.

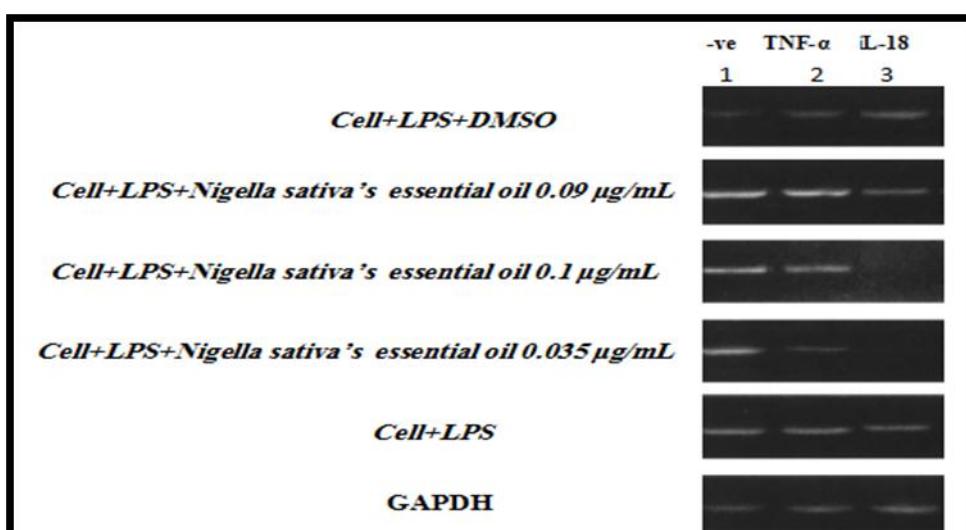
تحریک و تیمار سلول‌های THP-1:

تیمار توسط Lipopolysaccharides (LPS): LPS به عنوان ایجاد کننده مدل بیماری استفاده

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 ژن های مورد نظر ارزیابی گردید جهت این ارزیابی با استفاده از Real Time- PCR و پرایمر های اختصاصی و حاصل از RT-PCR Total cDNA که در مرحله قبل از استفاده از PCR به اندازه کافی افزایش شده است میزان mRNA اختصاصی هر یک از ژن های مورد نظر ارزیابی می شود 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 ۰/۵ Mg/ml چک شد (شکل شماره ۱).

صورت وجود آلوگی DNA، از آنزیم DNase برای از بین بدن DNA اضافی استفاده می شود. برای تبدیل RNA به 2step RT- PCR از شرکت vivantis (Malaysia-Selango) PCR 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 cDNA ۴۲° به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت ۹۴° به مدت ۵ دقیقه انجام شد.



شکل شماره ۱. آگارز ژل ۱٪ از نمونه های PCR product، چاهک ۱ مربوط به نمونه کنترل، چاهک ۲ مربوط به TNF- α ، چاهک ۳ می باشد. میزان ۵۰ از نمونه + ۵۰ از dye 2X loading RNA در چاهک ها توزیق گردید و تحت میدان الکتریکی غیر متنابو و للتاز ۹۰ ولت و ۱۵ میلی آمپر و مدت زمان ۴۵ دقیقه قرار گرفت. در چاهک های ۳-۱ ردیف اول (Cell+LPS+DMSO) و ردیف (Cell+LPS) محصول به صورت یک بند کاملا مشخص با وزن ملکولی ۲۰۰ bp بدون آلوگی یا اسیمیر مشاهده می شود و به معنی عدم تأثیر DMSO بر روی بیان سایتوکین های حاصل از سلول تحریک شده با LPS می باشد، در ردیف دوم، سوم و چهارم (تیمار توسط اسانس سیاه دانه با غلظت های ۰.۰۹، ۰.۱، ۰.۳۵ $\mu\text{g}/\text{mL}$) به منظور مقایسه غلظت های متفاوت انجام پذیرفت. غلظت ۰.۰۹ $\mu\text{g}/\text{mL}$ تأثیری بر بیان سایتوکین های مورد نظر در سلول های تحریک شده توسط LPS ندارد، غلظت ۰.۱ $\mu\text{g}/\text{mL}$ تأثیری بر بیان TNF- α ندارد ولی بیان IL-18 را به میزان ۹۰٪ کاهش می دهد و غلظت ۰.۳۵ $\mu\text{g}/\text{mL}$ منجر به کاهش بیان TNF- α به میزان حدوداً ۷۰٪ و کاهش بیان سایتوکین IL-18 به میزان ۹۰٪ می شود. ردیف آخر مربوط به بیان ژن کنترل کننده Housekeeping gene GAPDH می باشد که بعد از تیمار توسط اسانس سیاه دانه در سلول های تحریک شده توسط LPS نیز اندازه گیری شد و بیان آن تعیین کننده فعالیت طبیعی سلول ها می باشد. عکس در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری توسط ژل داک تهیه گردید.

یافته‌های پژوهش

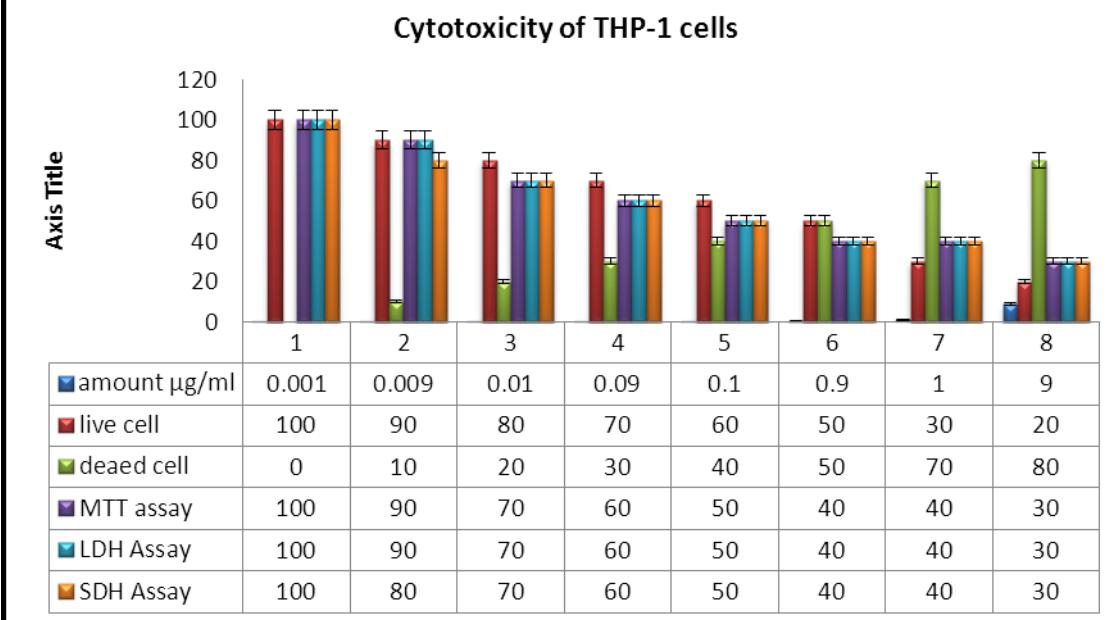
پس از انجام تست‌های سنجش MTT و LDH SDH نتایج به شرح نمودار شماره ۱ مشخص گردید. همان طور که در نمودار مشخص است در غلظت ۰/۹ میکرو گرم در میلی لیتر جمعیت سلول‌های زنده و مرده با هم برابرند (۵۰%). برای تایید این مساله بعد از گذشت ۲۴ ساعت برای تعیین درصد زنده مانی سلول و شمارش سلول‌های زنده و مرده از روش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

روش :Real time PCR Quantitative

در زمان واقعی با استفاده از همان پرایمرهایی 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)، توسعه دو روشن ۱- منحنی استاندارد و ۲- ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

Cytotoxicity of THP-1 cells



نمودار شماره ۱. سیتوتوكسیتی در سلول‌های THP-1

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 می‌باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% امکان پذیر بوده و معادل با $0.35 \mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد.

نتایج SDH Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ میزان سلول‌های سالم و از بین رفته برابر با ۵۰% می‌باشد که معادل با LD50% می‌باشد ولی از آنجا که این غلظت

نتایج MTT Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ میزان سلول‌های 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 می‌باشد که فاقد اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% امکان پذیر بوده و معادل با $0.35 \mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد.

نتایج LDH Assay: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ میزان سلول-

بر اساس معیارهای زنده‌مانی و حیات سلول‌ها عمل می‌کنند بنا بر این نتایج دقیق‌تری در اختیار ما قرار می‌دهند؛ و LC_{50} برابر با غلظت $1/\mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد و باید میانه آن تعیین شود که برابر با $0.35\mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد.

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

باعث از بین رفتن نیمی از سلول‌ها شده، نیاز به استفاده از غلظتی می‌باشد که قادر اثر توکسیک بر سلول باشد که این امر با تعیین Median of LD50% می‌باشد.

نتایج تریپان بلو: بر اساس نمودار شماره ۱ در اثر اسانس سیاه دانه در غلظت $1/\mu\text{g}/\text{ml}$ میزان سلول‌های سالم و از بین رفته برابر با 50% 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 سلول‌های زنده را از بین می‌برد و باعث به وجود آمدن خطا می‌شود بنا بر این نمی‌توان به آن اکتفا کرد. از طرفی چون MTT و LDH به آن اکتفا کرد.

جدول شماره ۱. نتایج CT در سایتوکین‌ها

Gene	Cell	Cell+LPS	Cell+LPS+Steroid	Cell+LPS+NSAID	Cell+LPS+Essential oil	Cell+Vehicle
THP-1	31.69 ± 0.411	100	30.15 ± 0.8203	30.38 ± 0.9212	35.42 ± 0.6378	31.69 ± 0.31
TNF-alpha						27
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

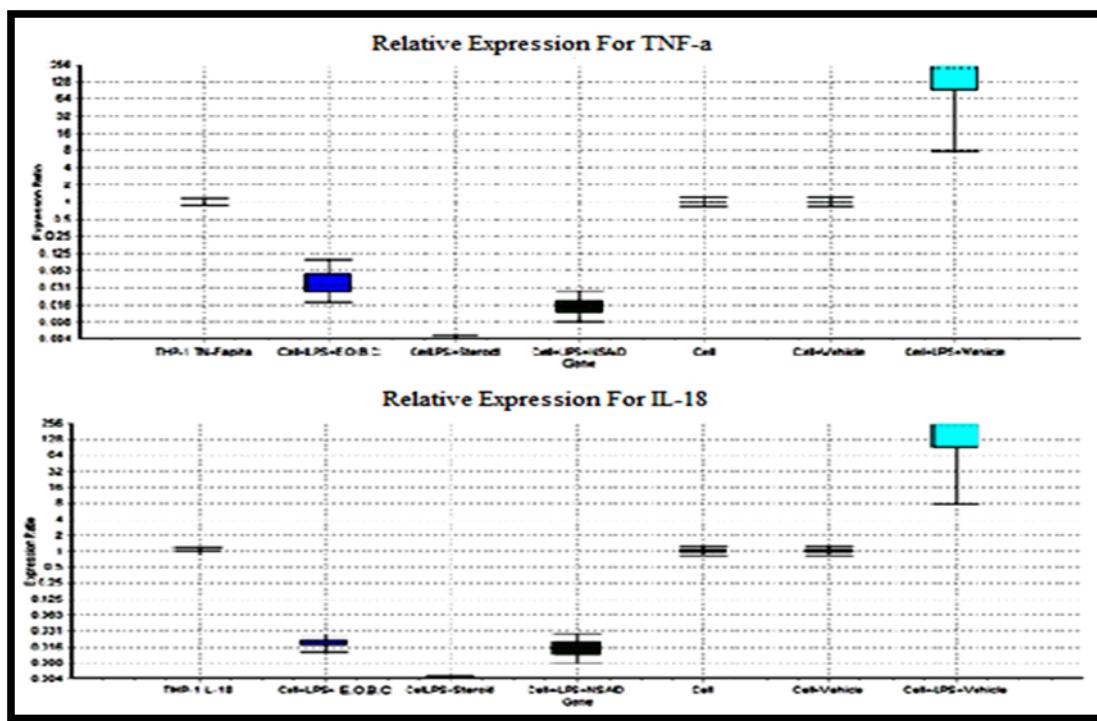
سلول‌های THP-1 با استفاده از نرم افزار REST 2009: REST نرم افزاری است برای تخمین افزایش یا کاهش بیان ژن که توسط تکنیک‌های قوی، بیان ژن را اندازه‌گیری می‌کند. همچنین این نرم افزار نتایج را به صورت گرافیکی هم گزارش می‌کند و تفاوت هر ژن را نسبت به ژن‌های دیگر به نمایش در می‌آورد.

همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن سایتوکین‌های TNF- α و IL-18 در اثر تحریک با LPS به میزان 100% افزایش یافت و در اثر تیمار با اسانس سیاه دانه میزان بیان آن‌ها به ترتیب $65/58\%$ و $64/58\%$ کاهش را نشان داده است.

آنالیز کمی تاثیر اسانس سیاه دانه بر روی بیان ژن سایتوکین‌های TNF- α و IL-18 در

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

Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(HI)	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
CellLPS+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



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)

بیان ژن مذکور در گروه افزایش یافته اما در تیمار با Steroid و NSAIDs و اسانس سیاه دانه کاهش یافته است.

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

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

Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(HI)	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
Cell+LPS+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		UP

نرم افزار ANOVA و F static: 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 می باشد که به بررسی تغییرات بین گروه ها می پردازد. در این بررسی تجزیه و تحلیل در دو گروه Cell+LPS+Essential و Cell+LPS+oil انجام پذیرفت که در نهایت منجر

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 Steroid و NSAIDs افزایش یافته اما در تیمار با 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

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 کمتر از $3/885^3$ باشد فرضیه ما قابل قبول است و به معنی این است که انسانس سیاه دانه منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین LPS های مورد نظر در سلول های تیمار شده توسط LPS شده است. در صورتی که میزان نهایی F static بیشتر از $3/885^3$ باشد فرضیه ما غیر قابل قبول است.

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 گروه ها 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 می باشد 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

جدول شماره ۴. نتایج F static سایتوکین های TNF- α و IL-18 در تیمار با انسانس 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	Acceptable
THP-1 IL-18	32.48	0.91	3.89	Acceptable

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

درج شده در جدول فراوانی است. از طرفی با Value توجه به جدول شماره ۵ نتایج بدست آمده از ANOVA برای سایتوکین IL-18 به فرض فرضیه صفر برابر است با $0/20$ ، با توجه به مقدار $\alpha=0.020$ sig= 0.020 $\leq \alpha=0.05$ ، $\alpha=0.05$ چون در سطح معنی دار $\leq \alpha=0.05$ sig= 0.020 می باشد بنا بر این فرضیه ما با ضریب اطمینان ۹۹٪ صحیح می باشند؛ و این با نتایج به دست آمده از روش های real-time PCR، CT، REST 2009 مطابقت دارد.

بحث و نتیجه گیری

استئو آرتی 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

با توجه به جدول شماره ۴، نتایج میزان نهایی F static سایتوکین TNF- α در تیمار با انسانس سیاه دانه $1/3$ بوده است و این مقدار کمتر 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 $0/43$ sig= 0.043 ، چون در سطح معنی دار $\leq \alpha=0.05$ sig= 0.043 $\leq \alpha=0.05$ فرضیه مورد نظر با ضریب اطمینان ۹۹٪ صحیح می باشد؛ و این با نتایج به دست آمده از روش های REST 2009، CT، ANOVA time PCR مطابقت دارد.

هم چنین با توجه به جدول شماره ۴، نتایج میزان نهایی F static سایتوکین IL-18 در تیمار با انسانس سیاه دانه $0/91$ بوده است و این مقدار کمتر از p-

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 مطالعه‌ای 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 آنزیم‌های ALT و AST کاهش چشم گیری نسبت به گروه‌های کنترل داشته است. افزایش در فعالیت این آنزیم‌ها نشان دهنده آسیب‌های 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 سایتوکین‌های TNF- α و IL-18 در گروه IL-18 با TNF- α افزایش یافته اما در تیمار با Cell+LPS+Vehicle 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 نماینگر 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 کمتر 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 ۰/۰۴۳ و ۰/۲۰ بود، با توجه به مقدار sig=0.043 و sig=0.020 و sig=0.043 < α =0.05 مبنی بر این که اسانس سیاه دانه می‌تواند موجب

(۲۱). کشف رد پای التهاب در بروز استئو آرتیت کشیده جدیدی نیست و سال هاست که مشخص شده که درجهاتی از التهاب سینوویوم در مفصل وجود دارد. تعییرات تخریبی در مفاصل التهابی با یک مجموعه از رویدادهای بیوشیمی از جمله تولید پیش از حد سایتوکین‌های التهاب آور تحریک می‌شود (۶). مونوسیت‌ها و ماکروفاز‌ها نقش مهمی در شرایط مختلف التهابی بسته به مرحله ای که فعال می‌شوند بازی می‌کنند (۷). سلول‌های التهابی مانند مونوسیت‌ها و ماکروفاز‌ها به سینوویوم وارد شده و در تولید سایتوکین‌ها و سایر واسطه‌های التهابی نقش ایفا می‌کنند (۶). به نظر می‌رسد مهم ترین گروه کنترل بیماری به سایتوکاین‌های التهابی، از جمله IL-1 β , IL-15, IL-6, TNF α و IL-18 تعلق دارد.

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر اسانس سیاه دانه در کاهش سطح بیان سایتوکین‌های پیش التهابی صورت گرفت. پس از تحریک سلول‌های THP-1 توسط ۲۰ ng/ml LPS میزان بیان سایتوکین‌های 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 می‌گردد، یعنی میزان IL-18 بیان سایتوکین TNF- α و میزان بیان IL-18 نیز ۶۴/۵۸٪ و ۶۵/۷۵٪ کاهش داشته است. در صورتی که در گروه کنترل منفی که از Vihicle برای تیمار استفاده شده است تعییری در میزان بیان سایتوکین‌های مربوطه وجود ندارد، حال در گروه کنترل مثبت که از Steroid استفاده شده، تعییر قابل ملاحظه ای در میزان بیان ژن ایجاد شده است که قبل پیش بینی بود. این نتایج بیانگر این حقیقت است که اسانس سیاه دانه کاهش قابل توجه ای در میزان بیان سایتوکین‌های TNF- α و IL-18 ایجاد کرده که نماینگر 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

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 گیری های 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 هزینه های این پژوهه 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 Res* 1995; 8:242-50.
2. Powers MF. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: Systemic factors. *Curr Opin Rheum* 2001; 13:447-51.
3. Katz WA. Osteoarthritis clinical presentations. 3rded. 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 J* 2005;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. Ziae 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-inflammattuar 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

کاهش بیان سایتوکین های TNF- α و IL-18 در سلول های THP-1 شود با ضریب اطمینان ۹۹٪ مورد قبول است و این با نتایج به دست آمده از روش های REST 2009 و CT real-time PCR مطابقت دارد. با توجه به این که در این مطالعه تاثیر انسان سیاه دانه در کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی مشاهده گردید، پیشنهاد می شود با استفاده از سیستم گاز کروماتو گرافی ماده موثره ی انسان 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.

- regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *British J Pharmacol* 1999; 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.

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*}, Maghsoudi H², Ebrahimi M², Ghanbari A¹, Hejazwyani H¹

(Received: April 4, 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

* Corresponding author Email: maghsudi67@yahoo.com