مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۶، شهریور ۱۳۹۸
http://rjms.iums.ac.ir
مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی آنکسین ۲ و تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت ریه موش‌های صحرایی در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو و نانوکپسول سیاه‌دانه

علی برزگری: استادیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) ali_barzegari@pnu.ac.ir
شادمهر میردار: استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
محمد رعنایی: استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

چکیده

زمینه و هدف: یکی از قوی‌ترین کارسینوژن‌های تنباکو نیتروز آمین کتون (NNK) مشتق از تنباکو است که با فعال‌سازی بیان آنکسین ۲ در افزایش التهاب ریه مؤثر است. از آن جا که سیاه‌دانه نقش مهمی در درمان سرطان دارد، هدف پژوهش حاضر ارزیابی بیان آنکسین ۲ و تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت ریه موش‌های صحرایی در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو و نانوکپسول سیاهدانه بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۴۵ سر موش صحرایی نر و ماده بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی و انحراف معیار ۲۳/۴۸±۱۰۳/۸۳ گرم به صورت تصادفی به پنج گروه مکمل، مکمل+NNK، NNK، حلال و کنترل تقسیم شدند. گروه‌های تحت القای NNK به صورت زیرجلدی ۱ بار در هفته به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته NNK دریافت کردند. گروه‌های مکمل نیز به مدت ۱۲ هفته به میزان ۱۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت زیرجلدی نانوکپسول سیاهدانه مصرف نمودند. بیان آنکسین ۲ بافت ریه به روش ایمونوهیستوشیمی اندازه‌گیری شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسات چندگانه Tukey جهت تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق NNK موجب افزایش معنی‌دار بیان آنکسین ۲ در مقایسه با گروه حلال شد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین یک دوره مصرف نانوکپسول سیاهدانه موجب کاهش معنی‌دار بیان آنکسین ۲ گروه مکمل + NNK نسبت به گروه NNK شد ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مصرف نانوکپسول سیاهدانه در کنار سایر روش‌های درمانی با کاهش بیان آنکسین ۲ بتواند در کاهش نقش کارسینوژنی NNK و التهاب ناشی از دود سیگار مفید باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها
نانوکپسول سیاهدانه،
آنکسین ۲،
نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو،
موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۵

شیوه استناد به این مقاله:
Barzegari A, Mirdar Sh, Ranaei M. Evaluation of immunohistochemical expression of Annexin A2 and histopathologic changes of lung tissue in rats exposed to tobacco nitrosamine ketone and Nigella sativa nanocapsules. Razi J Med Sci. 2019;26(6):33-43.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(6):33-43. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of immunohistochemical expression of Annexin A2 and histopathologic changes of lung tissue in rats exposed to tobacco nitrosamine ketone and Nigella sativa nanocapsules

Ali Barzegari, Assistant Professor, Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran (*Corresponding author) ali_barzegari@pnu.ac.ir
Shadmehr Mirdar, Professor, Department of Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran
Mohammad Ranaei, Assistant Professor, Department of Pathology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Abstract

Background: One of the powerful carcinogens in tobacco is nicotine nitrosamine ketone (NNK), which can activate annexin a2 and develop the irritation of the lung. Since the Nigella sativa plays a vital role in treating cancer, the aim of this research was to evaluation of annexin a2 expression and histopathologic changes of lung tissue in rats exposed to NNK and Nigella sativa nanocapsules.
Methods: In this experimental research, 45 Wistar male and female rats with average weight and standard deviation of 103.83±23.48 grams were haphazardly separated into five groups including supplement, supplement + NNK, NNK, saline and control. NNK-induced groups received NNK subcutaneously one day per week at a rate of 12.5 mg/kg/bw. Supplemented groups similarly consumed Nigella sativa nanocapsules for 12 weeks at 12.5 µg / kg body weight. Annexin a2 expression in lung tissue were quantified by immunohistochemistry technique. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test were utilized for analyzing the data.
Results: Exposure to NNK significantly augmented annexin a2 expression compared to the saline group ($p<0.001$). On the other hand, a period of Nigella sativa nanocapsules consumption significantly decreased the annexin a2 expression in supplement + NNK group compared to the NNK group ($p<0.001$).
Conclusion: It seems that Nigella sativa nanocapsules consumption along with other therapeutic methods can be useful in reducing the role of carcinogenic NNK and inflammation caused by cigarette smoke.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Nigella sativa nanocapsules, Annexin A2, 4-((hydroxymethyl) nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, Rats

Received: 30/04/2019
Accepted: 06/08/2019

Cite this article as:
Barzegari A, Mirdar Sh, Ranaei M. Evaluation of immunohistochemical expression of Annexin A2 and histopathologic changes of lung tissue in rats exposed to tobacco nitrosamine ketone and Nigella sativa nanocapsules. Razi J Med Sci. 2019;26(6):33-43.

This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

مقدمه

سرطان ریه، دومین سرطان از میان انواع سرطان‌ها است که منجر به بیشترین مرگ‌ومیر شده و انتظار می‌رود که ۱۳ درصد از تشخیص سرطان‌های جدید را شامل شود (۱). ازنظر بالینی، سرطان ریه به دو دسته اصلی شامل سرطان ریه سلول کوچک (حدود ۱۳ درصد) و سرطان ریه سلول غیر کوچک (حدود ۸۷ درصد) تقسیم می‌شود (۲). سیگار کشیدن مهم‌ترین عامل خطر در ابتلا به سرطان ریه است، به‌طوری‌که ۸۵ درصد از دلایل ابتلا به سرطان ریه را به خود اختصاص داده (۳) و همچنین خطر سرطان ریه در افراد سیگاری نسبت به افراد غیر سیگاری ۱۰ برابر بیشتر است (۴). از میان کارسینوژن‌های مستقیم، دود استنشاقی سیگار حاوی ترکیباتی است که می‌تواند پاسخ‌های التهابی مزمن ریه را تحریک نموده (۵) و این روند با افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط است (۶).

بیش از ۷۰ کارسینوژن در دود سیگار وجود دارد. بیشترین مولکول‌های کارسینوژنیک در دود سیگار شامل هیدروکربن‌های آروماتیک پلی سیکلیک و نیتروز آمین‌ها می‌باشد. اگرچه نشان داده شده است که هر دو شکل آن به‌طور معنی‌داری با تومورزایی ریه مرتبط است (۷)، نیتروز آمین‌های موجود در تنباکو (NNK: nicotine nitrosamine ketone) به‌طور گسترده‌ای به عنوان قوی‌ترین عامل سرطان‌زایی ریه شناخته می‌شود (۷، ۸). همچنین NNK به عنوان تنها کارسینوژن تشکیل‌دهنده تومور در ریه موش‌ها، موش‌های صحرایی و خرگوش‌ها از طریق تزریق زیر جلدی، تزریق داخل عروقی و گاواژ شناخته شده است (۸، ۹). علاوه بر قدرت سرطان‌زایی، NNK می‌تواند برای گیرنده‌های استیل کولینی نیکوتینی (nAChRs) لیگاند تشکیل داده و در نورون‌ها و برخی سلول‌های غیرعصبی ازجمله سلول‌های ریه بیان شود (۱۰). قرار گرفتن در معرض دود سیگار یا نیکوتین به‌طور مزمن موجب فعال‌سازی گیرنده‌های استیل کولینی نیکوتینی، سرکوب سیستم ایمنی و مهار آپوپتوز می‌شود (۱۱). همان‌طور که بارتا و همکاران گزارش کردند که التهاب مزمن ریه ناشی از NNK، تومورزایی ریه در موش‌ها را افزایش داده است (۱۲). از آن جا که التهاب نقش کلیدی در شیوع و گسترش تومورهای سرطانی، آنژیوژنز و مقاومت در مقابل درمان دارد، برخی مطالعات ضرورت تنظیم سیستم دفاعی سریع و کارآمد در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در سطح موضعی و سیستمیک توسط پروتئین‌های هماهنگ‌کننده التهاب و پاسخ فاز حاد را ضروری دانسته‌اند. بسیاری از پروتئین‌های دخیل در این مسیر سیگنالینگ، عمدتاً به صورت عوامل پیش التهابی یا ضد التهابی در شروع یا ادامه فرآیند پاسخ ایمنی نقش دارند (۱۳).

آنکسین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم و فسفولیپیدها بوده و تا به حال بیش از ۲۰۰ نوع (ایزوفرم) از آن‌ها در جانوران یافت شده است (۱۴). در این راستا، آنکسین ۲ که بر اساس ساختار بیوشیمیایی از خانواده آنکسین‌ها محسوب می‌شود، پروتئینی سیتوسولیک است که به مقدار زیادی در ماکروفاژها بیان شده و به عنوان یک ترامر در سطح سلول حضور دارد و در آنتی‌ژن‌های باکتریایی و ویروسی شناخته شده است (۱۵). آنکسین ۲ نقش حیاتی در فاگوسیتوز لنفوسیت‌های آپوپتیک در انتهای پاسخ ایمنی دارد و با ترشح سایتوکین‌های سرکوب‌کننده ایمنی موجب کاهش التهاب می‌شود. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که این پروتئین به میزان وسیعی در سطح ماکروفاژها بیان می‌شود و با اتصال به پروتئین‌های مختلف در بسیاری از جنبه‌های زیستی ماکروفاژها شرکت می‌کند (۱۳). بیان غیرطبیعی آنکسین ۲ منجر به پاتوژنز شده و در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها (۱۶) مانند سلول‌های سرطانی ریه (۱۵، ۱۶) مشاهده می‌شود. به‌طوری‌که کویی و وانگ در مطالعه خود میزان آنکسین ۲ بافت ریه و سلول را با روش PCR و وسترن بلات اندازه‌گیری کردند و نشان دادند که بیان آنکسین ۲ در بافت ریه سرطانی افزایش معناداری داشته است (۱۷).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

از آنجا که سرطان ریه ازجمله شایع‌ترین سرطان‌هایی است که منجر به مرگ‌ومیر می‌شود، با این حال ازجمله بیماری‌هایی است که اگر زود تشخیص داده شود قابل درمان است. پزشکان و محققان به دنبال استراتژی‌های درمانی مؤثر همچون تغذیه هستند که می‌تواند به پیش‌گیری و درمان سرطان ریه از طریق تنظیم و تعدیل فرآیندهای التهابی کمک نماید (۱۹). در این راستا به دلیل نگرانی روزافزون در خصوص عوارض داروهای شیمیایی و بی‌اثر بودن تعدادی از آن‌ها در مصرف طولانی مدت، استفاده از ترکیبات طبیعی به صورت جایگزین یا مکمل درمان، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (۲۰). در بین گیاهان دارویی، گیاهان جنس سیاه دانه، *Nigella*، معروف به گیاهان اعجاب انگیز هستند. حدیثی از پیامبر نقل شده است که می‌فرمایند: "سیاه دانه برای هر دردی درمان است به جز مرگ". سیاه دانه بومی مناطق جنوب اروپا، شمال آفریقا، آسیای شرقی می‌باشد، همچنین در مناطقی از خاور میانه، هند، پاکستان و ترکیه نیز کاشته می‌شود. از گونه‌های مهم این جنس می‌توان به *Nigella sativa* اشاره کرد. تیموکینون مهم‌ترین ماده موجود در سیاه دانه از لحاظ دارویی می‌باشد که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی دارد (۲۱). در این راستا سعد ال شدی نیز نشان داد که روغن سیاه دانه به‌طور معنی‌داری، سلول‌های سرطانی ریه انسان را کاهش داده و مورفولوژی سلولی را با توجه به غلظت تغییر داده است (۲۲).

با توجه به اثر NNK در ایجاد التهاب و متعاقب آن ایجاد سرطان و بدخیمی‌های ریه (۲۳) از یک‌سو و نقش‌های متعدد آنکسین ۲ در فرآیندهای التهابی و نیز پیشرفت تومور (۱۳، ۱۵)، استفاده از مواد مؤثره گیاهان دارویی به صورت نانوکپسول در وهله اول می‌تواند موجب کنترل سامانه رهایش دارو شود، سپس میزان غلظت دارو در پلاسمای خون برای مدت زمان طولانی بدون رسیدن به نواحی نامطلوب و نا مؤثر حفظ شود و نیز امکان تهیه داروهایی فراهم شود که در مدت زمان کوتاه‌تر و یا دوز کمتر، اثربخشی بیشتری داشته باشند (۲۴). از این رو انتظار می‌رود القاء نانوکپسول سیاه دانه بتواند در مهار پیشرفت و نیز درمان سرطان‌ها مؤثر باشد. از آنجایی که هیچ تحقیقی تاکنون در زمینه اثر مکمل گیاهی سیاه دانه بر بیان آنکسین ۲ یافت نشده است، تحقیق حاضر در نظر دارد تا به اثر یک دوره مصرف نانوکپسول سیاه دانه بر ساختار هیستولوپاتولوژیک و بیان آنکسین ۲ بافت ریه موش‌های صحرایی در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو بپردازد.

روش کار

تأیید کمیته اخلاق: این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل با (کد No: MUBABOL.HRI.REC.1395.109) تأیید شده است.

حیوانات: این مطالعه تجربی در آزمایشگاه دانشگاه مازندران در تابستان سال ۱۳۹۶ انجام شد. ۴۵ سر موش صحرایی نر و ماده بالغ نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ تا ۸ هفته و میانگین و انحراف معیار وزنی ۲۳/۴۸±۱۰۳/۸۳ گرم از انستیتو پاستور خریداری و پس از دو هفته آشنایی با محیط و پروتکل پژوهش، به‌طور 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 و انحراف معیار دمای ۱/۴±۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات نگه داری شدند. نگه داری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین المللی سلامت و پروتکل های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد (۲۵). حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیار قرار می گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داده شد. تزریق NNK (Sigma-AldrichGermany) به صورت زیر جلدی یک بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته انجام شد. گروه حلال نیز آب مقطر دریافت کرد (۲۷،۲۶).

نحوه تهیه عصاره هیدروالکلی سیاه دانه: دانه‌های گیاه سیاه دانه از فروشگاه گیاهان دارویی شهر بابلسر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

تهیه و شناسایی شد. پس از تأیید واریته دانه گیاه سیاه دانه توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه مازندران، نمونه ای از آن در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی نگه داری شد. در ابتدا جهت تهیه عصاره هیدرو الکلی سیاه دانه به روش خیساندن، ۵۵ گرم پودر سیاه دانه به مدت ۷۲ ساعت در اتانول ۷۱ درصد خیسانده شد و در ظرفی در بسته که درب آن پوشیده از پارافیلم بود قرار داده شد و در دمای ۲۱ تا ۲۵ درجه سانتی گراد دور از نور نگه داری شد. مخلوط پودر سیاه دانه، آب مقطر و اتانول هر ۶ ساعت یک بار با میله شیشه ای هم زده شد و در نهایت پس از عبور از کاغذ صافی (واتمن ۴۲، آلمان) با استفاده از دستگاه روتاری مدل RV8 V-C (IKA, Germany)، اتانول آن در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد حذف شد (۲۸).

روش آماده سازی نانوکپسول سیاه دانه: پس از آماده سازی عصاره هیدرو الکلی سیاه دانه، از آن جا که آلبومین سرم انسانی به صورت کپسول‌های کروی توی خالی سنتز می‌شود، می‌تواند در داخل خود ترکیباتی مانند عصاره سیاه دانه و یا هر ترکیب دیگری را محبوس نموده و به نقاطه مورد نظر در درمان ارسال نماید (۲۹). لذا جهت آماده سازی نانوکپسول، ۵۰ میلی گرم آلبومین سرم انسانی در داخل ۱ میلی لیتر آب با شرایط PH=۷/۴ حل شده و ۰/۵ درصد از حجم توین 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 میلی لیتر اتانول به صورت تدریجی به محلول اضافه شد. در ادامه ۱۱۷ میکرولیتر گلوتارآلدهید به نمونه اضافه شد. بهم زدن با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرد (۳۰). با اضافه شدن عصاره سیاه دانه، ساختار کروی باقی مانده و به علت حضور عصاره مقداری به یکدیگر چسبیده که این موضوع تأییدی بر حضور عصاره در درون نانوکپسول‌های سنتزی است. نانوکپسول سیاه دانه یک روز در هفته، به مدت ۱۲ هفته و به میزان ۱۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریق زیر جلدی صورت پذیرفت (۳۱). نمونه بردای از حیوانات، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تزریق نانوکپسول سیاه دانه انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۵۰-۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش و سپس کشته شدند. پس از شکافتن قفسه سینه، لوب تحتانی ریه چپ را جدا نموده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژی و بررسی ماکروسکوپیک به منظور تثبیت در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شدند سپس مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوکه پارافینی و تهیه برش های ۵ میکرونی توسط میکروتوم (Accu-Cut SRM, USA) انجام شد و با روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند. سپس نمونه های بافتی تحت مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: برش‌های بافتی در بافر تری سدیم سیترات در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت بازیابی آنتی ژن حرارت یافتند. سپس برای اندازه‌گیری بیان نشان گر آنکسین ۲، با آنتی بادی اولیه Monoclonal Mouse Anti_Human CD68 CloneKP1, Ready_to_Use (DakoAutostainer_Autostainer Plus) DACO,) (Denmark به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. بافت‌ها را در اتاقک مرطوب در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سطح بافت‌ها را با پلیمر لیبل شده با پراکسیداز (آنتی بادی ثانویه) به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده شد. در ادامه آن را در بافر T.B.S به مدت ۵ دقیقه (۲ بار) شستشو داده و بافت‌ها را در اتاقک مرطوب در دمای اتاق یا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سطح بافت با محلول کروموژن DAB+ سوبسترا ChemMate™ DAKO EnVision™ Rabbit/Mouse Detection Kit,Peroxidase/DAB,) (DOCO, Denmark)) به میزان یک قطره کروموژن در یک میلی لیتر سوبسترا به مدت ۱۰ الی ۳۰ دقیقه پوشانده شد. بعد از رنگ‌آمیزی لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل U-MDOB3 Olympus,) Japan)، موقعیت آنتی‌ژن در بافت بررسی شد.

ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی آنکسین ۲: در تحقیق حاضر بیان آنکسین ۲ هم در سیتوپلاسم و هم در غشای سلول مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های مثبت به عنوان سلول‌هایی شناخته شدند که رنگ آن‌ها قهوه ای متمایل به زرد بود و شناسایی و بررسی تغییرات سطوح این فاکتور توسط متخصص پاتولوژی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

جدول ۱- طبقه‌بندی بیان آنکسین ۲

نوع درجه	میزان درصد	توصیف
صفر	صفر تا ۵ درصد	منفی
یک	۶ تا ۲۴ درصد	ضعیف
دو	۲۵ تا ۴۹ درصد	متوسط
سه	۵۰ تا ۷۴ درصد	قوی
چهار	۷۵ تا ۱۰۰ درصد	خیلی قوی

صورت پذیرفت. بدین گونه که به وسیله دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک تصویربرداری صورت گرفت و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش مورد آنالیز قرار گرفت و به صورت داده‌های کمی توصیف شدند (جدول ۱) (۳۲).

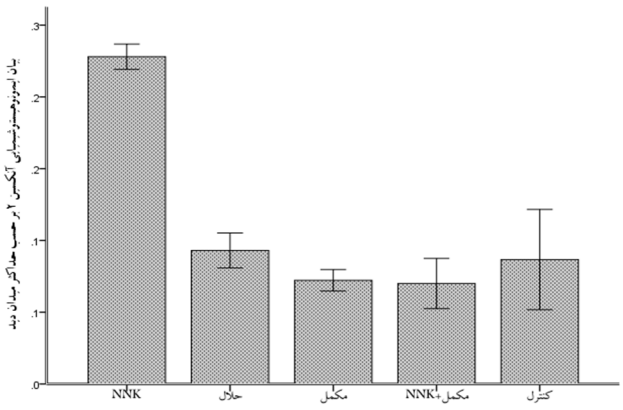
روش‌های آماری: در مطالعه حاضر جهت تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد. برای این منظور ابتدا از آزمون Shapiro-Wilk جهت اطمینان از طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها و آزمون Levene برای تعیین تجانس واریانس استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معناداری ۰/۰۵ برای بررسی تغییرات بیان آنکسین ۲ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معناداری در وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق وجود ندارد (p=۰/۸۶۷). همچنین نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بین مقادیر بیان ایمونوهیستوشیمیایی آنکسین ۲ ریه در گروه‌های تحقیق تفاوت آماری معناداری وجود دارد (p<۰/۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی توکی بیانگر آن بود که ۱۲ هفته مصرف نانوکپسول سیاه دانه موجب کاهش معنادار بیان ایمونوهیستوشیمیایی آنکسین ۲ بافت ریه نسبت به گروه NNK (۲۱۴٪) شده است (p<۰/۰۰۱)، در حالی که نسبت به گروه های حلال و مکمل+NNK تفاوت معناداری وجود نداشت (به ترتیب: P= ۰/۱۷۱ و p= ۰/۹۹۹). ضمناً مشاهده گردید که بیان ایمونوهیستوشیمیایی آنکسین ۲ بافت ریه در گروه NNK به میزان (۵۹٪) نسبت به گروه حلال افزایش معناداری داشت (p<۰/۰۰۱).

علاوه بر این نشان داده شد که در گروه مداخله، مصرف مکمل به همراه القای NNK موجب کاهش معنادار بیان آنکسین ۲ بافت ریه نسبت به گروه NNK، به میزان ۲۱۴٪ شده است (p<۰/۰۰۱)، در حالی که کاهش آن نسبت به گروه حلال معنادار نبوده است (p= ۰/۰۹) (نمودار ۱).

بر اساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی، واکنش منفی نشان گر آنکسین ۲ ملاحظه شد و مقادیر آن به ترتیب در گروه های کنترل (۰/۰۸)، حلال (۰/۰۹)، تمرین + NNK (۰/۰۷) و مکمل (۰/۰۷) حداکثر میدان دید گزارش گردید، با این حال در گروه NNK، واکنش



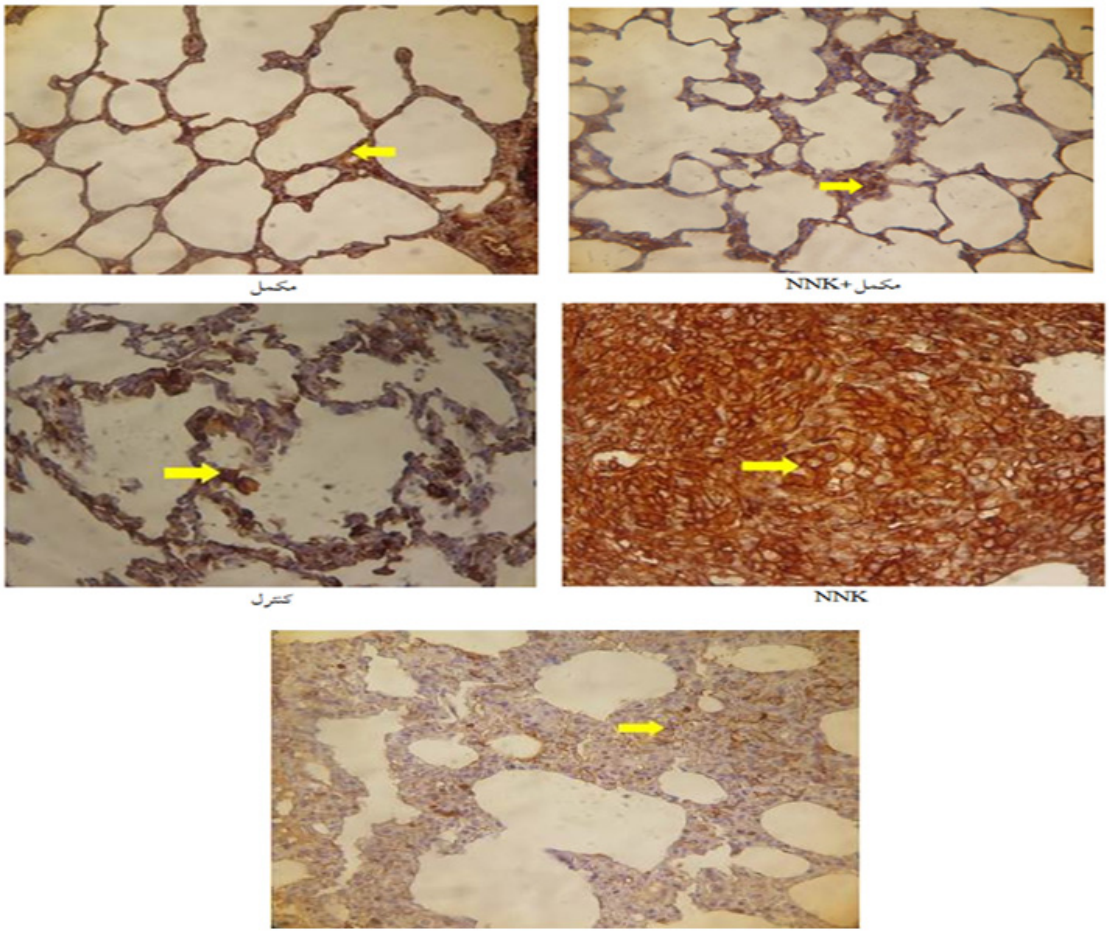
نمودار ۱- تغییرات مقادیر شاخص آنکسین ۲ (برحسب حداکثر میدان دید) در بافت ریه رت ها

گروه مکمل (۹ سر)، NNK (۱۰ سر)، مکمل + NNK (۱۰ سر)، حلال (۱۰ سر) و کنترل (۶ سر)

تحلیل واریانس یک طرفه و Tukey،* نشان دهنده تغییر معنادار نسبت به حلال؛ # نشان دهنده تفاوت معنادار نسبت به گروه NNK.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]



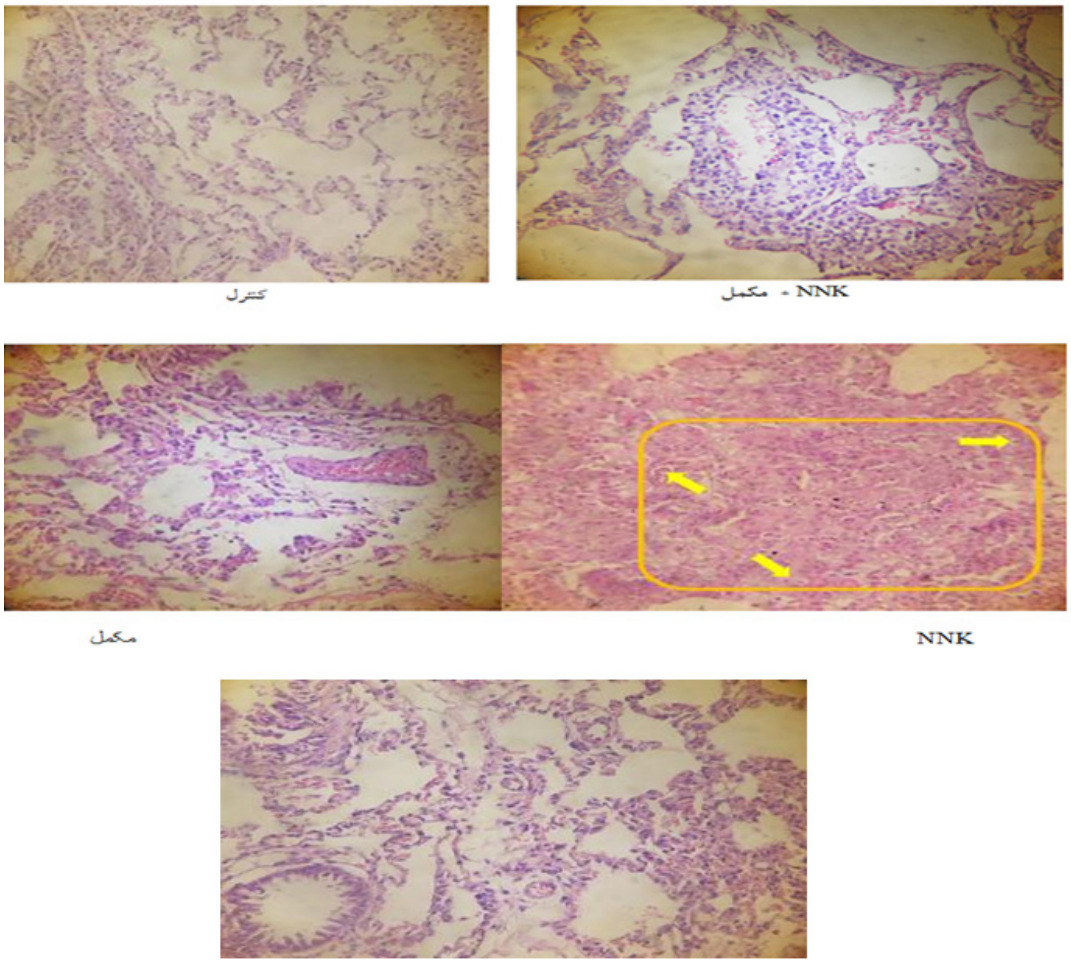
تصویر ۱- بیان ایمونوهیستوشیمیایی نشان گر آنکسین ۲ دربخش پارانشیمی بافت ریه گروه های مختلف (تست ایمونوهیستوشیمی با کروموژن DAB، رنگ آمیزی افتراقی هماتوکسیلین با بزرگ نمایی ۴۰۰×). واکنش های زرد رنگ (فلش) در بافت نشانه بیان مارکر آنکسین ۲ می‌باشد.

نشان‌گر آنکسین ۲ (۰/۲۲) حداکثر میدان دید بود (تصویر ۱). همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که ساختار بخش پارانشیمی بافت ریه در گروه های کنترل و حلال کاملاً طبیعی است در حالیکه در گروه NNK با افزایش نفوذ سلول‌های التهابی شامل لنفوسیت ها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های پلاسما در بافت همبند، اطراف مجاری تنفسی، عروق و حتی افزایش شدید آنها در بافت بینابینی سبب شده است تا تغییرات ناشی از آمفیزم در این نواحی دیده شده و حجم فضای آلوئولی 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 آلوئول به وجود آمده و ساختار پارانشیمی ریه نیز اغلب حفظ شده است. در گروه مکمل+NNK نیز التهاب حاد خفیف مشاهده شده ولی ساختار آلوئول‌ها کاملاً حفظ شده و از وضعیت طبیعی برخوردار بوده است (تصویر ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر تأثیر یک دوره برنامه مصرف نانوکپسول سیاه دانه بر بیان ایمونوهیستوشیمیایی نشان گر زیستی آنکسین ۲ موش‌های صحرایی که در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو قرار گرفته بودند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قرارگیری در معرض NNK منجر به افزایش معنی دار بیان آنکسین ۲ بافت ریه موش‌های صحرایی های نژاد ویستار نسبت به گروه های کنترل و حلال شده است. هم راستا با نتایج تحقیق حاضر، وانگ

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]



تصویر ۲- ساختار هیستوپاتولوژیک بافت ریه در گروه‌های مختلف تحقیق (فلش‌های زرد نشان دهنده تجمع سلول‌های آتیپیک به همراه سلول‌های التهابی است) به طوری که کانون کوچکی از منطقه تومورال مشاهده شد.

و همکاران دریافتند که بیان آنکسین ۲ در تومورهای بیماران NSCLC در مقایسه با بافت های غیر توموری مجاور بیش از حد بیان شده است (۳۳). در پژوهشی دیگر نیز بیان بالای آنکسین ۲ در رده سلولی سرطان پستان گزارش شد (۳۴). در حالی که در مطالعه بنرجی و همکاران کاهش بیان آنکسین ۲ در بافت توموری گزارش شد (۳۵) که با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر ناهمسو است و علت این تناقض را احتمالاً می‌توان به نوع سرطان نسبت داد. از آنجا که آنکسین ۲ هترودایمری است که بر روی سطح سلول قرار دارد و به t-PA متصل می‌شود، می‌تواند تبدیل پلاسمینوژن به پلاسما را فعال نماید. پلاسمین نیز منجر به فعال‌سازی ماتریکس متالوپروتئناز شده و در نهایت ماتریکس خارج سلولی را تخریب می‌نماید. لذا افزایش بیان آنکسین ۲ منجر به افزایش تولید پلاسمین و افزایش تهاجم و متاستاز در بیماران سرطانی می‌شود (۳۶). همچنین نشان داده شده است که سرکوب بیان آنکسین ۲ به ممانعت از تکثیر و تهاجم سلول سرطانی منجر می‌شود (۳۷). از سویی دیگر آنکسین ۲ از طریق مکانیسم شناخته نشده ای، سیگنالینگ JNK را با رونویسی از سرکوب P53 تقویت می نماید (۳۴). با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در تومورزایی ریه، این احتمال وجود دارد که استرس اکسیداتیو در سلول‌های NSCLC موجب تنظیم مثبت آنکسین ۲ به دنبال فعال‌سازی سیگنالینگ JNK شود (۳۸). قرار گرفتن در معرض NNK منجر به آسیب به DNA، ناپایداری ژنومی و توسعه التهاب های سلولی می‌شود. لذا بسیاری از آدنوکارسینوم های ناشی از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

NNK به بی‌ثباتی کروموزوم مربوط بوده و سبب فعال-سازی m-calpain و نیز پروتئین کیناز شده که در نهایت منجر به متاستاز ریه از طریق مسیر ERK1/2 می‌گردد (۳۹)؛ بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش و در مقایسه با نتایج دیگر پژوهش ها نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض دود سیگار و کارسینوژن اصلی (NNK) آن به عنوان قوی‌ترین عنصر مسئول سرطان ریه تأکید شده است.

از سویی دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان آنکسین ۲ بافت ریه رت ها پس از القاء نانوکپسول سیاه دانه نسبت به گروه NNK کاهش معنی‌داری یافته است. با توجه به اینکه سرکوب بیان آنکسین ۲ سبب کاهش سلول‌های سرطانی می‌شود، بنابراین می‌تواند در کاهش التهاب سلولی و در نتیجه جلوگیری از پیشرفت سرطان موثر باشد؛ اما از آنجایی که هیچ تحقیقی در خصوص اثر مکمل گیاهی سیاه دانه روی آنکسین ۲ یافت نشده است، لذا به بررسی اثر سایر مکمل های گیاهی با نتایج مشابه بر آنکسین ۲ پرداخته شده است. رانجان و همکاران اثر ضد-آنزیوژنیک کورکومین را با ارزیابی سطوح پروتئین آنکسین ۲ که موجب تنظیم نئوآنژیوژنز می‌شود بررسی و گزارش کردند که میزان بیان آنکسین ۲ در بافت توموری که تحت درمان با کورکومین قرار گرفتند نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است (۴۰). مکانیسم های احتمالی برای کاهش سطوح آنکسین ۲ ناشی از فعالیت بدنی، اتصال آنکسین ۲ به آنژیوستاتین می‌باشد. اتصال آنژیوستاتین به زنجیره اتصال لیزین با آنکسین ۲ در سلول‌های اندوتلیال منجر به اثر آنتی آنژیوژنیک می‌شود. علاوه بر این تعامل میان آنکسین ۲ و آنژیوستاتین منجر به کاهش تولید پلاسما در سلول‌های کارسینومای ریه می‌شود. این یافته ها نشان می‌دهد که پلاسمینوژن و آنژیوستاتین ممکن است به ناحیه اتصالی مشابه آنکسین ۲ متصل و عملکرد آنتی آنژیوژنیک آنژیوستاتین از طریق تعامل با آنکسین ۲ میانجی گری شود (۳۶)؛ بنابراین با توجه به مکانیسم های احتمالی فوق الذکر در خصوص تنظیم منفی بیان آنکسین ۲ در بافت های توموری توسط نانوکپسول سیاه دانه که در مطالعه حاضر مشاهده شده است، می‌توان آنکسین ۲ را به عنوان یک هدف کلیدی در درمان و یا جلوگیری از پیشرفت سرطان مدنظر قرار داد.

اگرچه در تحقیق حاضر بسیاری از متغیرها از قبیل گونه، نژاد، جنس، وزن، عوامل محیطی (صدا، نور، رطوبت، دما) و برنامه غذایی تحت کنترل بودند. با این وجود پژوهش حاضر با محدودیت هایی ازجمله عدم کنترل فعالیت شبانه آزمودنی های پژوهش و تداخل احتمالی آن بر نتایج تحقیق، عدم کنترل اثر تزریق ماده بیهوشی و نیز عدم اندازه‌گیری میزان جذب NNKدر آزمودنی ها مواجه بوده است.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که قرار گیری در معرض NNK موجب افزایش معنی دار بیان آنکسین ۲ و بالا رفتن سطوح التهاب شده است. با این حال به دلیل نقش ضد التهابی مکمل نانوکپسول سیاه دانه تا حدود زیادی در جلوگیری از شرایط زیان آور NNK در ریه موش‌های صحرایی اثر بخش بوده و می‌تواند به عنوان یک راه کار درمانی مد نظر قرار گیرد. به نظر می رسد با تغییر در تعداد روز و دوز مصرف نانوکپسول سیاه دانه و NNK، تغییرات پاتولوژیک دیگری در بافت ریه رخ دهد، لذا انجام پژوهش های بیشتر در این راستا توصیه می‌شود.

References

1. Bade BC, Thomas DD, Scott JB, Silvestri GA. Increasing Physical Activity and Exercise in Lung Cancer Reviewing Safety, Benefits, and Application. J Thorac Oncol; 2015. 10: 861-871.
2. Das A, Bortner JD, Aliagaa C, Cooper T, Stanley A, Stanley BA, et al. Proteomic profiling of hyperplasia/atypia and adenoma-induced by NNK in mouse lung identified multiple proteins as potential biomarkers for early detection. EuPA Open Proteomics; 2015. 9: 23–33.
3. Koutsokera A, Kiagia M, Saif MW, Souliotis K, Syrigos KN. Nutrition Habits, Physical Activity, and Lung Cancer: An Authoritative Review. Clinical Lung Cancer; 2013. 14(4): 342-50.
4. Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, Giordano A. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. Mass Spectrom Rev; 2013. 32: 129-142.
5. Peterson LA, Thomson NM, Crankshaw DL, Donaldson EE, Kenney PJ. Interactions between methylating and pyridyloxobutylating agents in A/J mouse lungs: implications for 4-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis. Cancer Res; 2001. 61: 5757-5763.

6. Vernooy JHJ, Dentener MA, vanSuylen RJ, Buurman WA, Wouters EFM. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. Am J Res Cell Mol Biol; 2002. 26: 152-159.

7. Hecht SS, Stepanov I, Carmella SG. Exposure and Metabolic Activation Biomarkers of Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamines. Acc Chem Res; 2016. 49(1): 106–114.

8. Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review). Int J Oncol; 2006. 29: 745-752.

9. EL-Meghawry EL-Kenawy A. Apoptotic and anti-angiogenic activity of HypericumperforatumL on 4-(methylnitrosamino) - 1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung cancer in rats. IJAR; 2014. 2(1):1057-1065.

10. Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? Eur J Pharmacol; 2000. 393: 279-294.

11. Razani-Boroujerdi S, and Sopori ML. Early Manifestations of NNK-Induced Lung Cancer Role of Lung Immunity in Tumor Susceptibility. Am J Respir Cell Mol Biol; 2007. 36: 13-19.

12. Barta P, Van Pelt C, Men T, Dickey BF, Lotan R, Moghaddam SJ. Enhancement of lung tumorigenesis in a Gprc5a knockout mouse by chronic extrinsic airway inflammation. Mol Cancer; 2012. 11:4

13. Swisher JF, Khatri U, Feldman GM. Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. J Leukoc Biol; 2007. 82: 1174-1184.

14. Rahimi H, Farajollahi M, Yazdanparast S, Azizi M, Khalaj V. Cellular Localization of AnnexinC3.1 and the Effect of its Overexpression on Growth and Protein Secretion in Aspergillus niger. Razi J Med Sci; 2009. 16: 121-129.

15. Kirschnek S, Adams C, Gulbins E. Annexin II is a novel receptor for Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun; 2005. 327(3): 900-6.

16. Cui JW, Wang YL. Expression and function of Annexin II in lung cancer tissue. Asian Pac J Trop Med; 2013. 6(2): 150-2.

17. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function Int. Int J Mol Sci; 2013. 14(3): 6259-6305.

18. 22. Koutsokera A, Kiagia, M, Saif MW, Souliotis K, Syrigos, KN. Nutrition Habits, Physical Activity, and Lung Cancer: An Authoritative Review. Clinical Lung Cancer; 2013. 342-350.

19. 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. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; 2014. 1-13.

20. Paramasivam A, Raghunandhakumar S, Sambantham S, Anandana B, Rajiv R, Priyadharsini JV, et al. In vitro anticancer and antiangiogenic effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma cells (Neuro-2a). Biomed Prevent Nut; 2012. 2: 283-6.

21. Rashid Shyekh Ahmad M, Sanjarian F, Sabouni F. Toxicity effect of Nigella sativa and Nigella arvensis seed extract on gastric cancer cell lines (AGS) and brain tumor cells (AST). RJMS; 2016. 23(148): 72-79.

22. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Siddiqui MA. Cytotoxicity of Nigella sativa seed oil and extract against human lung cancer cell line. Asian Pac J Cancer Prev. 2014. 15(2): 983-7.

23. Herzog CR, Desai D, Amin S. Array CGH analysis reveal schromosomal aberrations in mouse lung adenocarcinomas induced by the human lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. BiochemBiophys Res Commun; 2006. 341: 856-863.

24. Rafienia M, Orang F, Emamy SH. Preparation and characterization of polyurethane microspheres containing theophylline. J Bioact Compat Polymers; 2006. 21(4): 341-349.

25. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Canad Council Animal Care Ottawa; 1993. p. 1-193.

26. 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): 3772-3780.

27. Hansen HH. Lung Cancer (Advances in Basic and Clinical Research). Copenhagen, Springer Science+Business Media, Llc; 1995.

28. Mirdar SH, Arabzadeh E, Arzani A, Ahmadi S, Neyestani F, baghbani M. Comparison of time periods and different patterns of tipper with black currant supplementation on weight variation and endurance performance of the growing male Wistar rats. J Sport Pec; 2013. 10(20): 115-128.

29. Chen Q, Liang C1, Wang X, He J, Li Y, Liu Z. An albumin-based theranostic nano-agent for dual-modal imaging guided photo thermal therapy to inhibit lymphatic metastasis of cancer post-surgery. Biomaterials; 2014. 35(34): 9355-62.

30. Keshavarzi M, Shakeri S, Kiani K. Preparation and in vitro investigation of antigastric cancer

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]

activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. IET Nanobiotechnol; 2015. 9(5):294-9.

31. 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 Mats Chem; 2013. 1(23): 2956-2966.

32. Jin L, Shen Q, Ding S, Jiang W, Jiang L, Zhu X. Immunohistochemical expression of Annexin A2 and S100A proteins in patients with bulky stage IB-IIA cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Gynecol Oncol; 2012. 126(1):140-6.

33. Wang CY, Chen CL, Tseng YL, Fang YT, Lin YS, Su WC, et al. Annexin A2 Silencing Induces G2 Arrest of Non-small Cell Lung Cancer Cells through p53-dependent and-independent Mechanisms. J Biol Chem; 2012. 287(39): 32512-24.

34. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszy nski GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer. Selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. Exp Mol Pathol; 2006. 81: 146-156.

35. Banerjee AG, Liu J, Yuan Y, Gopalakrishnan VK, Johansson SL, Dinda AK, et al. Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: Differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA. Molecular Cancer; 2003. 2: 34.

36. Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The Role of Annexin A2 in Tumorigenesis and Cancer Progression. Cancer Microenviron; 2011; 4: 199-208.

37. Chetcuti A, Margan SH, Russell P, Mann S, Millar DS, Clark SJ, et al. Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors. Cancer Res; 2001. 61: 6331-34.

38. Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, Shirase T, Hiai H, Toyokuni S. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. Oncogene; 2004. 23: 3980-3989.

39. Barzegari A, Mirdar S. Investigating the Effect of One Period of Nigella Sativa Nano capsules consumption on the histopathological Structure and Vascular Endothelial Growth Factor Levels of the Lung Tissue of the Rats Exposed to Nicotine-Derived Nitrosamine Ketone. JRUMS; 2018. 17(5): 435-446.

40. Ranjan AP, Mukerjee A, Gdowski A, Helson L, Bouchard A, Majeed M, Vishwanatha JK. Curcumin-ER Prolonged Subcutaneous Delivery for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. J Biomed Nanotechnol; 2016. 12: 1-10.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.2.2]