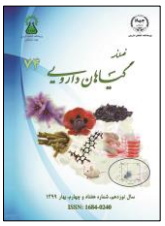
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۴): ۱۱۸-۱۲۸

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

اثر مهاری یک دوره تزریق نانو کپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین D1 در ریه رت‌های نژاد ویستار ناشی از کارسینوژن نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو

محمدباقر نیکزاد[۱،*]، شادمهر میردار[۲]

[۱] گروه ریاضی، دانشکده ریاضی دانشگاه علم و فناوری مازندران، بهشهر، ایران

[۲] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
چرخه سلولی
ژن سایکلین D1
سرطان ریه
نانو کپسول سیاه‌دانه
نیتروزآمین کتون
تنباکو

چکیده

مقدمه: تصور بر این است که مکمل‌ها می‌توانند تا حدودی بر بافت ریه در معرض مواد سرطان‌زای دود سیگار از طریق چرخه سلولی، مؤثر باشند. سایکلین D1 ژنی است که عملکرد آن در چرخه سلولی است. **هدف:** هدف از پژوهش حاضر، تأثیر ۱۲ هفته تزریق نانوکپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین D1 ریه رت ها متعاقب کارسینوژن NNK (نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو) بود. **روش بررسی:** تعداد ۴۶ سر رت ویستار به پنج گروه NNK (N)، مکمل (S)، مکمل +NNK (SN)، کنترل (C) و حلال (V) تقسیم شدند. نانو کپسول سیاه دانه به‌صورت یک روز در هفته و به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی به گروه‌های مکمل و مکمل + NNK تزریق شد. NNK و آب مقطر نیز در گروه‌های NNK و حلال به صورت زیر جلدی یک بار در هفته به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۱۲ هفته تزریق شد. بیان ژن سایکلین D1 به روش Real time PCR-ABI و جهت مقایسه داده‌ها از آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی در سطح $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد. **نتایج:** نتایج بیانگر کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در گروه‌های مکمل +NNK ($P = ۰/۰۰۳$) و حلال ($P = ۰/۰۰۱$) نسبت به گروه NNK بود. این مکمل سبب کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در بافت ریه در معرض کارسینوژن NNK شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد این مکمل می‌تواند با کاهش سایکلین D1 در روند چرخه سلولی، در کنار سایر روش‌های درمانی، در کاهش نقش کارسینوژنی NNK و کاهش تأثیرات منفی ناشی از سیگار ایفای نقش نماید.

مخففها: NNK، نیتروزآمین کتون مشتق از تنباکو؛ CDKs، کینازهای وابسته به سیکلین؛ STAT3، مبدل و فعال کننده پیام رونویسی-۳؛ NF-κB، فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا؛ TNF، فاکتور نکروز توموری؛ GAPDH، گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز.

* نویسنده مسؤول: mnikzad@mazust.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۵ آذر ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۵ بهمن ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۲۹ بهمن ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.118

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

۱. مقدمه

سرطان از مهم‌ترین علل مرگ و میر رو به افزایش در جهان است. آنچه امروزه سرطان را به عنوان یک معضل بهداشتی جهانی مطرح می‌کند، رشد صعودی تعداد مبتلایان به این بیماری است. در میان انواع مختلف سرطان‌ها، سرطان ریه یکی از عمده‌ترین موارد سرطان‌ها در مردان به شمار می‌رود که حدود ۱۸ درصد کل مرگ و میرهای مرتبط با سرطان را به خود اختصاص داده است [۱]. علی رغم پیشرفت‌های تأثیرگذار در شناخت سازوکارهای بیماری‌زایی سرطان‌های وراثتی، می‌توان گفت که کارسینوژن‌های (Carcinogen) محیطی علت غالب شایع ترین سرطان‌ها هستند. از بین تأثیرات محیطی ممکن سرطان ریه، نگران‌کننده‌ترین آنها بعضی عادات شخصی مانند استعمال دخانیات است که از جمله دلایل اصلی این بیماری به شمارمی‌رود [۳، ۲]. دود سیگار حاوی بیش از ۶۰ کارسینوژن است که NNK (Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)) از قوی‌ترین کارسینوژن‌ها به شمار رفته و ارتباط معنی‌داری با سرطان ریه دارد [۴]. روش‌شناسی‌های مختلف و دوزهای متفاوت NNK می‌تواند منجر به پاسخ‌های التهابی مزمن و تولید سرطان‌های ریه بدخیم در میان انواع گونه‌ها شود [۴]. چنانچه تکثیر بیش از حد سلولی می‌تواند از جمله پاسخ‌های التهابی مزمن کارسینوژن NNK باشد. تکثیر بیش از حد سلولی به عنوان یکی از ده نشانه اصلی سرطان‌ها محسوب می‌شود [۵]. انحراف ژنتیکی در چرخه تنظیمی سلول از طریق فاز G1 چرخه سلولی، اغلب در سرطان‌های انسانی دیده می‌شود و بیان بیش از حد سایکلین D1 به عنوان کنترل کننده فاز G1 چرخه سلولی در بخش‌های قابل توجهی از تومورها و انواع سرطان‌های انسانی مانند ریه، پاراتیروئید، پروستات، لنفوم، ملانوم و سرطان کولون مشاهده شده است که بیشتر به خاطر القای آن از طریق سیگنال‌های انکوژنی است. بیان بیش‌ازحد این ژن ممکن است به عنوان یک محرک انکوژنی از طریق افزایش فاز G1 به S چرخه سلولی و افزایش عملکرد تنظیمی چرخه سلولی باشد [۶]. تکثیر بیش از حد این ژن، به‌عنوان تغییر کلیدی مولکولی در سرطان‌ها و پیش‌بینی مقاومت به درمان ضدهورمونی است. لذا ناهمگونی بافت، عاملی است که در اثر بیان این ژن می‌تواند این ژن را به عنوان نشانگر زیستی مناسبی در سرطان‌ها معرفی نماید [۷]. سایکلین D1 پروتئینی است که بوسیله ژن متعلق به خانواده سایکلین کدگذاری می‌شود و عملکرد آن در چرخه سلولی است. سایکلین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده CDKs (کیناز وابسته به سایکلین) عمل می‌کنند و در وقایع میتوزی نقش دارند. از سه نوع سایکلین D که هر یک به CDK می‌چسبند، بیان بیش از حد سایکلین D1 عمدتاً با تومورزایی و متاستاز سلولی مرتبط است. سایکلین D1 علاوه بر تنظیم CDK در چرخه سلولی در تنظیم عوامل رونویسی، انتقال چرخه سلولی، بازسازی پروتئین‌های تومورزایی و متابولیسم سلولی نیز نقش دارد. بسیاری از سیگنال‌های سرطانی موجب بیان ژن سایکلین D1 از طریق توالی مجزای DNA در ناحیه پروموتور ژن می‌شوند که می‌توان از انکوژن STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) نام برد [۶]. از طرفی عوامل متعددی در کاهش عوارض ناشی از تأثیر کارسینوژن ها سهیم هستند که از جمله این عوامل می‌توان به استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی مانند نیجلا ستیوا (سیاه‌دانه یا زیره سیاه) اشاره کرد که ممکن است موجب جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی و افزایش آپوپتوز در تومورها شود [۸]. به نظر می‌رسد اثرات درمانی سیاه‌دانه در انواع التهاب‌ها و سرطان‌ها شناخته شده است. اگر چه ممکن است شکل نانوی این گیاه مؤثرتر از شکل اتانولی آن در کاهش التهاب و مهار مسیرهای منتهی به تومور باشد [۹]. در مورد تأثیر نانو کپسول سیاه‌دانه بر بیان ژن سایکلین

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

D1 پژوهشی یافت نشده است؛ هر چند برخی مطالعات به اثرات ضدسرطانی و مهار چرخه سلولی سیاه‌دانه و تیموکینون در تومورهای سرطانی پرداخته‌اند [۱۱، ۱۰]، لذا بررسی پاسخ ضدالتهابی نانو کپسول سیاه‌دانه و اثرات حفاظتی آن بر مسیرهای منتهی به تومور ناشی از چرخه سلولی مستلزم مطالعه است. به نظر می‌رسد در خلال تأثیر کارسینوژن‌ها بر بافت‌ها و مسیرهای منتهی به تومور، استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی مانند نانوکپسول سیاه‌دانه که ممکن است موجب جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی شود [۸] راهکاری مناسب باشد. این مکمل به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانتی ترکیبات آن قادر به مهار تکثیر سلولی سلول‌های توموری ریه [۱۲] و تنظیم کاهشی عوامل پیش التهابی و میانجی گرهای تکثیر سلولی مانند Cox-2 (Cyclooxygenase) , NF-$_K$B (nuclear factor kappa) , AKT (Protein kinase B) (PKB) و TNF (Tumor necrosis factor) در شرایط پاتولوژیک می‌شود [۱۳] در حالی که اثر آن در مسیر منتهی به تومور از طریق مهار بیان ژن سایکلین D1 نیاز به بررسی بیشتری است. اگر چه ممکن است سیاه دانه دارای ویژگی ضدالتهابی باشد و سبب کاهش التهاب شود [۱۳]، اما این ویژگی در مورد نانو کپسول سیاه‌دانه و اثر آن بر مسیرهای منتهی به تومور چرخه سلولی از طریق کارسینوژن‌های محیطی بخصوص NNK روشن و واضح نیست. از سوی دیگر با توجه به یافته‌های یادشده مبنی بر افزایش فعالیت مسیرهای التهابی در اثر مواد کارسینوژنیک مانند NNK [۴] این پرسش مطرح است که آیا تزریق نانوکپسول سیاه دانه همزمان با تزریق کارسینوژن NNK، بر مهار مسیرهای منتهی به تومور از طریق مهار ژن سایکلین D1 مؤثر است؟ از اینرو در پژوهش حاضر محقق کوشیده است تأثیر یک دوره تزریق نانو کپسول سیاه دانه را بر بیان ژن سایکلین D1 بافت ریه رت‌های نژاد ویستار در پی القای کارسینوژن NNK مورد بررسی قرار دهد.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. تعداد ۴۶ سر رت های نژاد ویستار (Wistar Rat) بالغ با میانگین وزنی ۲۷/۹۳ ± ۱۰۵/۸۴ گرم از مؤسسه تحقیقاتی پاستور خریداری و به آزمایشگاه جانوری منتقل شدند. رت‌ها به صورت جداگانه در قفس‌های پلی کربنات شفاف (هر ۴ رت در یک قفس) تحت شرایط آزمایشگاهی (جهت تطابق فیزیولوژیک) ۱/۴± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۵۵ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی ۶ صبح و خاموشی ۶ عصر) قرار گرفتند. غذای استاندارد پلت و آب نیز در بطری‌های شیشه‌ای در اختیار رت‌ها به صورت آزاد قرار داشت. هفته اول حضور رت‌ها در آزمایشگاه، جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه در نظر گرفته شد و سپس به صورت تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی شامل گروه مکمل (S) (supplement)، گروه NNK (N)، گروه مکمل+ NNK (S.N) – supplement NNK، گروه حلال با تزریق آب مقطر (V) Vehicle و یک گروه ۶ تایی به عنوان گروه کنترل (C) تقسیم شدند. تزریق NNK در گروه S.N و گروه N، به صورت زیر جلدی یک بار در هفته، به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مدت ۱۲ هفته انجام شد و به گروه حلال نیز آب مقطر تزریق شد [۱۴]. بررسی دوزهای مختلف NNK نشان می‌دهد در صورتی که دوز تزریقی NNK در محدوده بین ۰/۰۹ تا ۵۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم به صورت دوز تزریقی تک واحدی و یا چند بار در هفته باشد، سبب ایجاد تومورزایی و اختلال در DNA می‌شود [۱۵]. آب مقطر نیز با مقدار و شرایط مشابه به صورت یک‌بار در هفته به گروه حلال تزریق شد. دانه‌های گیاه سیاه دانه نیز در آبان ۱۳۹۶

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

از فروشگاه گیاهان دارویی شهر بابلسر تهیه و شناسایی شد. پس از تأیید واریته دانه گیاه سیاه دانه توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه مازندران، نمونه‌ای از آن در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی نگه داری شد. پس از تهیه نانو کپسول سیاه‌دانه، این مکمل به صورت یک روز در هفته و به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی به گروه‌های مکمل و مکمل + NNK تزریق شد. ازآنجاکه شکل نانوی سیاه‌دانه برخلاف سیاه دانه در دوزهای مختلف ایجاد سمیت نمی‌کند، بنابراین می‌تواند در درمان شرایط پاتولوژیک همانند انواع سرطان‌ها و عوامل بیماری‌زای مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهشی تزریق ۵۰–۱۰ میکروگرم نانوی سیاه‌دانه با تزریق ۱۰۰ میکروگرم روغن سیاه‌دانه در سلول‌های سرطانی ریه A549 مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دوزهای مختلف پایین نانو تفاوت معنی‌داری با دوز ۱۰۰ میکروگرم روغن سیاه دانه در کاهش سلول‌های سرطانی ریه دارد. ارزیابی MTT نشان داد هر چه دوز نانو به ۵۰ میکروگرم نزدیک‌تر شود، کاهش بیشتری در سلول‌های سرطانی ریه دیده می‌شود [۱۶].

در این پژوهش برای اولین بار از دوز ۱۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن رت‌ها استفاده شد. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و تزریق، موش‌ها پس از بی‌هوش شدن با محلول زایلازین (Xylazine) و کتامین (Ketamine) قربانی شدند و بافت ریه آنها بلافاصله در ازت مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. درکل فرایند پژوهش، اصول اخلاق پژوهشی، منطبق با آیین‌نامهٔ کمیتهٔ اخلاقی پژوهش دانشگاه مازندران (MUBABOL.HRI.REC.1395.109) رعایت شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-19 و طبیعی بودن توزیع متغیرها در مراحل مختلف پژوهش از آزمون کلموگراف اسمیرنوف استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن داده‌ها در این پژوهش، از آزمون پارامتریک آنوای یک طرفه (در سطح معنی داری ($P \leq ۰/۰۵$) و برای مقایسه دو به دوی داده‌ها نیز از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از آمار توصیفی جهت توصیف داده‌ها و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

۱.۲. *تهیه عصاره سیاه‌دانه*

برای تهیه عصاره دانه گیاه سیاه‌دانه از روش خیساندن استفاده شد زیرا در این روش بخش عمده‌ای از ترکیبات فعال سیاه‌دانه مانند تیموکینون وارد عصاره می‌شود [۱۷] بدین‌ترتیب که ۵۵ گرم پودر سیاه دانه با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ وزن کرده و در محلول ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. در طول این مدت درب ظرف با پارافین به‌خوبی پوشانده و در دمای محیط ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مخلوط هر شش ساعت یک‌بار توسط میله‌ی شیشه‌ای هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، مخلوط از کاغذ صافی (واتمن ۴۲، آلمان) عبور داده شد و توسط روتاری مدل C-V RV8 ساخت شرکت IKA آلمان، با دمای ملایم (زیر ۶۰ درجه سانتی‌گراد) حلال آن حذف شد [۱۸].

۲.۲. *تهیه نانوکپسول سیاه‌دانه*

پس از آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه جهت نانوکپسوله کردن سیاه دانه از آلبومین انسانی استفاده شد. آلبومین سرم انسانی به صورت کپسول‌های کروی توی خالی سنتز می‌شود و می‌تواند در داخل خود ترکیباتی مانند عصاره سیاه‌دانه و یا هر ترکیب دیگری را محبوس نموده و به نقاط مورد نظر در درمان ارسال نماید. از این رو جهت آماده‌سازی نانوکپسول، ۵۰ میلی‌گرم آلبومین سرم انسانی در داخل ۱ میلی‌لیتر آب با شرایط PH = ۷/۴ حل شد و ۰/۵ درصد از حجم توین ۸۰ به نمونه اضافه شد. این محلول با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از مگنت هم زده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر اتانول به صورت

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

تدریجی به محلول اضافه شد. در ادامه ۱۱۷ میکرولیتر گلوتارآلدهید به نمونه اضافه شد. این عمل تحت هم زدن ۵۰۰ دور بر دقیقه انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت ادامه یافت [۱۹]. با اضافه شدن عصاره سیاه‌دانه، ساختار کروی باقی مانده و به علت حضور عصاره مقداری به یکدیگر می چسبند که این موضوع تأییدی بر حضور عصاره در درون نانوکپسول‌های سنتزی است (شکل ۱). بر این اساس میزان استحصال نانوکپسول سیاه‌دانه از ۶۰۰ میکرولیتر عصاره با وزن ۰/۵۲۲ گرم، معادل ۰/۰۲۹ گرم بود. برای بررسی صحت سنتز نانوکپسول‌های آلبومین با استفاده از روش پیشنهادی از روش میکروسکوپ الکترونی رویشی استفاده شد. 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.

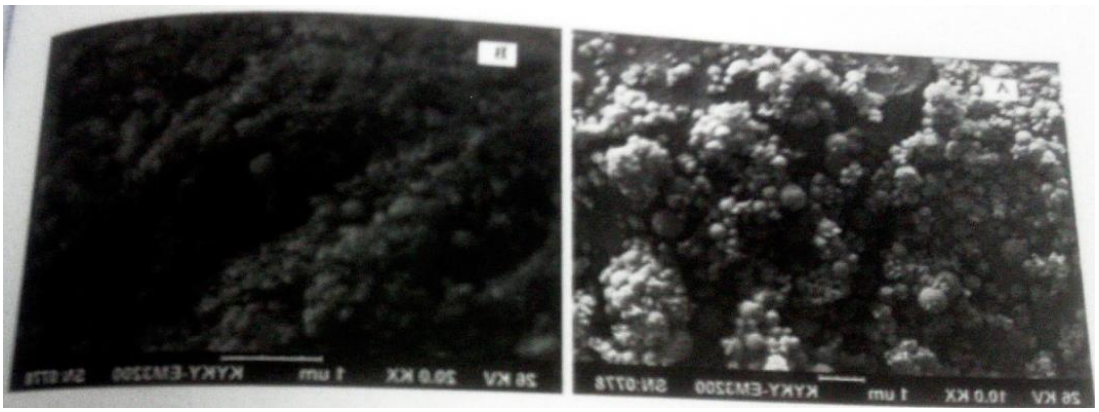
۳.۲. *بررسی بیان ژن سایکلین D1*

پروتکل استخراج RNA از سلول‌های بافت ریه رت های در معرض NNK، پس از خرد کردن و لیز بافت‌ها و لیز سلول‌ها در یک میلی‌لیتر از محلول RNX با استفاده از دستگاه هموژنایزر انجام شد. بر اساس پروتکل ترایزول (Trizol) مراحل استخراج RNA انجام شد. جهت سنتز cDNA ژن سایکلین D1 از RNAهای استخراج شده، از دستورالعمل کیت K1622 100Reaction شرکت ترموساینتیفیک امریکا (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. ابتدا غلظت مطلوب cDNA با استفاده از آزمون سریال غلظت مشخص شد. سپس چرخه‌های واکنشی Real-time PCR بر روی cDNA تولیدشده جهت تکثیر این ژن با برنامه حرارتی Real-time PCR-ABI با دو دمای ۹۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد راند شد [۲۰]. از GADPH (GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع سایکلین D1 استفاده شد (جدول ۱). نتایج به دست آمده بر اساس فرمول پافل (Paffel formula) و نرم‌افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای ژن سایکلین D1 و ژن مرجع [۲۱] در جدول ۱ آمده است. برای تعیین بیان نسبی هر ژن نسبت به ژن مرجع از نفاضل داده‌های سیکل آستانه ژن هدف و ژن مرجع استفاده شد و برای تعیین میزان تغییرات ژن هدف در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل، فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ مورد استفاده قرار گرفت [۲۰].

۴.۲. *آنالیز داده‌ها*

یافته‌های پژوهش حاضر در تحلیل واریانس یک طرفه حاکی از آن بود که بین تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه رت‌های ویستار در پنج گروه تفاوت معنی‌داری ($F = ۸/۰۶۲$ ،$\alpha \leq ۰/۰۵$ ،$Sig = ۰/۰۰$) وجود داشت (جدول ۲).

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]



شکل ۱. تصویر نانوکپسول سیاه‌دانه زیر میکروسکوپ رویشی. قبل از بارگیری (راست) و پس از بارگیری (چپ)

جدول ۱. توالی ژن سایکلین D1 (CCND1) و ژن مرجع GAPDH (گلسیر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز)

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	NCBI
CCND1	ACAGAAGAAATGGAAGACACAG	CGGAAGGAGTTGGTCAATCTCA	ID58919
GAPDH	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	CATACTCAGCACCAGCATCACC	ID24383

جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه تغییرات نسبی ژن سایکلین **D1** بافت ریه ($\alpha \leq$ ۰/۰۵)

منابع تغییر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات (واریانس)	نسبت F	مقدار معنی‌داری
بین گروه‌ها	۶۷/۱۸۹	۴	۱۶/۷۹۷	۸/۰۶۲	۰/۰۰
درون گروه‌ها (خطا)	۸۵/۴۲۴	۴۱	۲/۰۸۴		
مجموع	۱۵۲/۶۱۳	۴۵			

۳. نتایج

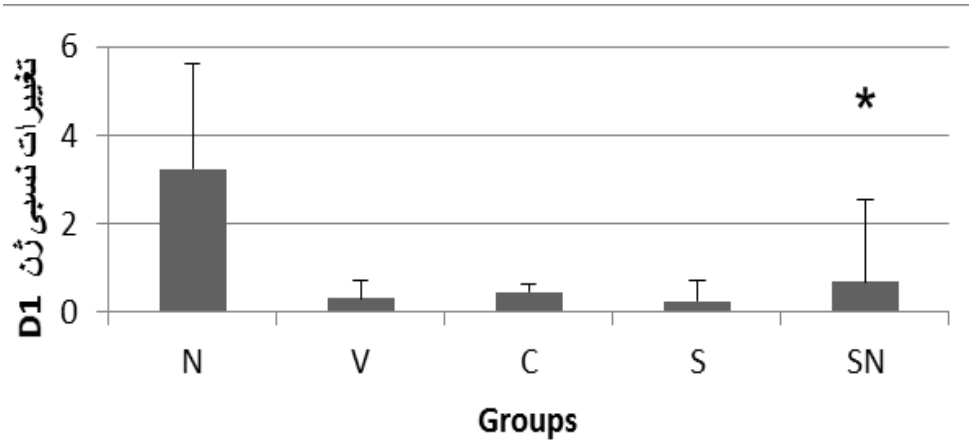
نتایج آزمون تعقیبی توکی (جدول ۳) نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری در تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه بین گروه تزریق NNK و تزریق حلال (P = ۰/۰۰۱) وجود داشت. همچنین مقایسه بین گروه مکمل – NNK با گروه NNK نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه (P = ۰/۰۰۳) وجود دارد، اگر چه تفاوت معنی‌داری بین گروه مکمل – NNK و گروه‌های مکمل (P = ۰/۹۵۲) و حلال (P = ۰/۹۷۶) مشاهده نشد. نتایج این آزمون در دو گروه مکمل و کنترل نیز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین این دو گروه (P = ۰/۹۹۹) بود (جدول ۳، نمودار ۱).

از آنجا که تفاوت معنی‌داری بین گروه مکمل –NNK و گروه‌های حلال (P = ۰/۹۷۶) و مکمل (P =۰/۹۵۲) دیده نشد، لذا می‌توان بیان نمود که کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 در گروه مکمل– NNK ناشی از تأثیر نانوکپسول سیاه‌دانه است.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

جدول ۳. مقایسه میانگین تغییرات نسبی ژن سایکلین **D1** در گروه‌های **NNK**، کنترل، حلال، مکمل و مکمل-**NNK** به روش توکی ($\alpha \leq$ ۰/۰۵)

گروه	گروه‌ها	خطای معیار	Sig
NNK	حلال	۲/۹۲۷	۰/۰۰۱
مکمل-NNK	NNK	-۲/۵۴۵	۰/۰۰۳
	حلال	۰/۳۸۲	۰/۹۷۶
	مکمل	۰/۴۶۰	۰/۹۵۲
مکمل	کنترل	۰/۱۹۲	۰/۹۹۹
	حلال	-۰/۰۵۵	۱/۰۰۰



نمودار ۱. نمودار ستونی مقایسه میانگین تغییرات نسبی ژن سایکلین **D1** بافت ریه در گروه‌های **NNK** (**N**)، حلال (**V**)، کنترل (**C**)، مکمل (**S**) و مکمل -**NNK** (**SN**) *. تفاوت معنی‌دار **SN** با **NNK** (**P** = ۰/۰۰۳)

۴. بحث

مقایسه تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه رت های ویستار در این پژوهش نشان داد که تزریق نانوکپسول سیاه‌دانه در بافت سالم ریه رت‌های ویستار موجب تغییرات نسبی معنی‌داری در ژن سایکلین D1 در گروه مکمل نسبت به گروه حلال نمی‌شود. اگر چه این مکمل می‌تواند از طریق سرکوب فاکتور التهابی اینترلوکین ۶ وعامل رونویسی STAT3 موجب تنظیم کاهشی بیان ژن‌های تنظیمی مسیر سیگنالینگ STAT3 در شرایط پاتولوژیک شود [۱۰] که از جمله ژن‌های این مسیر می‌توان به سایکلین D1 اشاره کرد که سبب جلوگیری از تکثیر سلولی از طریق فاز G1 به S می شود. نانوکپسول سیاه‌دانه و ترکیبات آن به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانتی، قادر به مهار تکثیر سلولی سلول‌های توموری ریه [۱۲] و تنظیم کاهشی عوامل پیش التهابی و میانجی‌گرهای تکثیر سلولی مانند Cox-2 (Cyclooxygenase), NF-κB (nuclear factor kappa), AKT (PKB) (Protein kinase B) Cyclin D1 و TNF (Tumor necrosis factor) در شرایط پاتولوژیک است [۱۳]. به نظر می‌رسد تفاوت در بیان ژن Cyclin D1 با شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک مرتبط باشد. برخی معتقدند که ممکن است اثر سیاه‌دانه و عناصر اصلی آن بر مهار مسیرهای منتهی به تومور به تنهایی

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

مؤثر واقع نشود، بنابراین جهت اثربخشی بیشتر این مکمل، تجویز داروهای ضدالتهابی همراه با این مکمل را توصیه می کنند. چنانچه نشان داده شد که ترکیب داروی تموزولومید (Temozolomide) و تیموکینون موجب جلوگیری از آسیب DNA از طریق توقف چرخه سلولی از فاز G2 به M و مهار بیان ژن بکلین یک (Beclin 1) می‌شود [۲۲]. تکثیر کنترل نشده سلولی، از جمله ده شاه کلید اصلی سرطان‌ها است، که افزایش اندازه تومور، درمان بیماری را مشکل می‌کند. نشان داده شده است که سیاه‌دانه از تکثیر بسیاری از سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. بر این اساس، سیاه‌دانه سبب وقفه چرخه سلولی از فاز G1/S می شود و با افزایش پروتئین‌های P21 و P27 سبب کاهش این مسیر می‌شود. این عمل منجر به کاهش رسپتورهای آندروژنی، سایکلین A و فاکتور رونویسی E2 (E2 Transcription Factor) که در انتقال فاز G1/S چرخه سلولی نقش دارند، می‌شود [۲۳]. اگر چه در این پژوهش عملکرد نانوکپسول سیاه‌دانه بر سایکلین D1 و فاز G1 به S چرخه سلولی بر اساس عملکرد این ژن مدنظر است ولی این مکمل می‌تواند بر فازهای مختلف سلولی نیز اثرگذار باشد. چنانچه نشان داده شد که تیموکینون (اجزای اصلی سیاه‌دانه) سبب توقف چرخه سلولی از فاز G2/M در سلول‌های سرطانی سینه شده که این عمل با افزایش سطح بیان سرکوب‌کننده تومور P53 و کاهش میزان و کاهش پروتئین سایکلین B1 همراه بوده است. این نتایج نشان می دهد که سیاه‌دانه قادر به توقف فازهای مختلف چرخه سلولی می‌شود. افزایش بیان سرکوب‌کننده تومور P53 و فاکتور رونویسی P21 از جمله سازوکارهایی است که این مکمل می‌تواند از این طریق سبب توقف چرخه سلولی شود [۲۴]. در روند چرخه سلولی، برخی فرآورده‌های پروتئینی مربوط به ژن‌های خاصی در تنظیم دقیق چرخه سلولی نقش های تقویت‌کنندگی یا مهارکنندگی چرخه را از خود نشان می‌دهند. سایکلین‌ها و پروتئین کینازهای وابسته به سایکلین ((Cycline Dependent Protein Kinases) (CDKs)) در ارتباط با یکدیگر، در فرآیند ورود به مراحل متنوع چرخه سلولی به عنوان آغازگرهای اصلی برای عبور از یک مرحله به مرحله دیگر چرخه، از اهمیت خاصی برخوردار هستند. گفته می‌شود که تقریباً در همه سرطان‌های انسانی سطح CDKs و سایکلین‌ها تنظیم افزایشی دارند. سیاه‌دانه می‌تواند از طریق سیگنال‌های سرکوبگر رشدی موجب مهار این دو فاکتور شود. چنانچه در سلول‌های سرطانی کولون انسانی، سیاه‌دانه با کاهش فعالیت CDKs و سایکلین‌ها سبب توقف چرخه سلولی در فاز G1 شده است [۲۴]. بنابراین با توقف چرخه سلولی در فاز G1، مهار کننده P21 افزایش یافته و در نتیجه بیان CDK کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر افزایش بیان P21 سبب بلوک CDK2، CDK4 و CDK6 و درنهایت توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌شود [۲۴]. از طرفی تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 بافت ریه رت‌ها در گروه مکمل +NNK نسبت به گروه NNK در این پژوهش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه (P = ۰/۰۰۳) وجود دارد، در حالی که تفاوت معنی‌داری در مقایسه این گروه نسبت به گروه مکمل (P = ۰/۹۵۲) و حلال (P = ۰/۹۷۶) مشاهده نشد. این امر بیانگر اثر نانوکپسول سیاه‌دانه، مهار اثرگذاری NNK و مهار مسیرهایی است که NNK می‌تواند موجب فعال‌سازی آن شود. از جمله مسیرهای منتهی به توموری که NNK می تواند اثرات کارسینوژنی خود را اعمال کند می‌توان به مسیر سیگنالینگ NF-κB و STAT3 اشاره کرد. تکثیر بیش از حد سلولی می‌تواند از جمله پاسخ‌های التهابی مزمن کارسینوژن NNK از طریق فعال‌سازی این مسیرهای منتهی به تومور شود [۵]. بررسی اثرات نانوکپسول سیاه‌دانه در این پژوهش نشان داد که تزریق نانوکپسول سیاه‌دانه در بافت ریه رت‌های ویستار قرار گرفته در معرض NNK سبب

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 شده است. از جمله دلایل کاهش این تغییرات نسبی می‌توان به کاهش و بلوک عامل التهابی IL-6 و فسفوریلاسیون STAT3 اشاره کرد. کاهش IL-6 می‌تواند موجب فسفوریلاسیون STAT3 شده و درنهایت سبب تنظیم کاهشی ژن‌های فرودست در چرخه سلولی از جمله سایکلین D1 شود [۲۵]. از آنجا که فسفوریلاسیون STAT3 نقشی اساسی در تکثیر و بقای سلولی از طریق سایکلینD1 بازی می‌کند، بنابراین با توجه به کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 از طریق نانوکپسول سیاه دانه در رت‌های ویستار در معرض کارسینوژن NNK، می توان بیان کرد که نانوکپسول سیاه‌دانه می‌تواند از طریق سیگنالینگ STAT3 موجب بلوک و یا کاهش سطح IL-6 و STAT3 شده و درنهایت سبب کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 شود. اثر نانوکپسول سیاه‌دانه بر این مسیر سیگنالینگ می‌تواند به سازوکارهای چندگانه‌ای مربوط باشد که سبب سرکوب فعالیت این مسیر سیگنالینگ و در نتیجه کاهش فعالیت ژن سایکلین D1 شود. همکاری بین تیروزین کیناز JAK و Src نیز از جمله سازوکارهایی است که می تواند سبب فسفوریلاسیون STAT3 شده و قطع ارتباط آن می‌تواند منجر به کاهش فسفوریلاسیون STAT3 شود [۲۵]. از دیگر سازوکارهای تأثیر سیاه‌دانه بر سیگنالینگ JAK-STAT3 و بیان سایکلین D1 می‌توان به بیان پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPase, protein tyrosine phosphatase) اشاره کرد. انواع پروتئین تیروزین فسفاتازها می‌توانند در سیگنالینگ منفی این مسیر نقش داشته باشند. یکی از این تیروزین فسفاتاز SH-PTP2 است که از طریق تعدیل عملکرد IL-6 سبب سیگنالینگ منفی این مسیر می‌شود [۲۶]. چنانچه همسو با یافته‌های این پژوهش نشان داده شد که تحریک بیان پروتئین SH-PTP2 در سلول‌های سرطانی با تنظیم کاهشی فسفوریلاسیون STAT3 و به تبع آن کاهش بیان سایکلین D1 مرتبط است [۲۷]. بنابراین با توجه به تأثیر نانوکپسول سیاه‌دانه بر کاهش تغییرات نسبی ژن سایکلین D1 نقش مؤثر نانوکپسول سیاه دانه در فعالیت چرخه سلولی بافت ریه در معرض NNK از اهمیت خاصی برخوردار است. از این رو تنظیم کاهشی سایکلین D1 از مسیر سیگنالینگ JAK-STAT3 می‌تواند توانایی نانوکپسول سیاه‌دانه را در کاهش توقف سلولی در فاز G1 به S توجیه نماید و درنهایت تأثیر بازدارنده‌های متنوعی نظیر P21، P53 و ... را نیز نباید از نظر دور داشت که اثربخشی نانوکپسول سیاه‌دانه بر این بازدارنده‌ها موجب تنظیم کاهشی سایکلین D1 شده و ممکن است در اثر این کاهش، سرعت عبور از مرحله G1 به S چرخه سلولی نیز در سلول‌های قرار گرفته در معرض NNK کاهش یابد. لازم به ذکر است که اغلب سلول‌ها بعد از مرحله‌ی تقسیم وارد مرحله‌ی G1 می‌شوند. سنتز و جمع‌آوری RNA، آنزیم‌ها و پروتئین‌های تنظیمی سنتز DNA، از جمله اعمال سلول در این مرحله است [۲۸]. بر این اساس با توجه به عملکرد سایکلین D1 به عنوان آغازگرهای اصلی برای عبور از یک مرحله به مرحله دیگر (فاز G1 به S) در چرخه سلولی، نقش مهاری نانوکپسول سیاه‌دانه در بافت‌های در معرض مواد سرطانی که سرعت چرخه سلولی در این بافت‌ها افزایش می‌یابد، از اهمیت خاصی برخوردار است.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش مبنی بر مهار ژن سایکلین D1 به عنوان کنترل کننده چرخه سلولی در فازG1 به S از طریق نانو کپسول سیاه‌دانه با دوزهای معین، به نظر می‌رسد بتوان از نقش ضدالتهابی و ضدتکثیری این مکمل، در مهار برخی مسیرهای منتهی به تومور، در بیماری‌های التهابی سود جست.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده به نسبت مساوی در طراحی، جمع‌آوری اطلاعات، نوشتن، ویرایش و تحلیل آماری این مقاله سهیم بوده‌اند.

تضاد منافع

این مقاله فاقد هر گونه تضاد منافع است.

تقدیر و تشکر

تشکر و قدردانی خود را از گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران بخصوص جناب آقای دکتر شادمهر میردار اعلام نمایم.

منابع

1. Jemal A and et al. Global cancer statistics. CA: *A Cancer J. Clinicians* 2011; 61 (2): 69-90.

2. Vargas, AJ and CC. Harris, Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16(8): 525-37.

3. Miller A and et al. Differential involvement of gp130 signalling pathways in modulating tobacco carcinogen-induced lung tumourigenesis. *Oncogene* 2015; 34(12): 1510-9.

4. Ge G.-Z, T.-R. Xu and C. Chen. Tobacco carcinogen NNK-induced lung cancer animal models and associated carcinogenic mechanisms. *ABBS*. 2015; 47(7): 477-87.

5. Moses C and et al. Hallmarks of cancer: the CRISPR generation. *European Journal of Cancer* 2018; 93: 10-8.

6. Fu M and et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinol*. 2004; 145(12): 5439-47.

7. Burandt E and et al. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer. *Breast Cancer* 2016; 23(1): 111-9.

8. Koka PS and et al. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235(6): 751-60.

9. Sayed AAR and M Morcos. Thymoquinone decreases AGE induced NF B activation in proximal tubular epithelial cells. *Phytotherapy Res*. 2007; 21(9): 898-9.

10. Li F, Rajendran P and Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British J. Pharmacol*. 2010; 161(3): 541-54.

11. Attoub S and et al. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & Clinical Pharmacol*. 2013; 27(5): 557-69.

12. Roepke M and et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biology & Therapy* 2007; 6(2): 160-9.

13. Sethi G, Ahn KS and Aggarwal BB. Targeting nuclear factor- B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

of apoptosis. *Molecular Cancer Res.* 2008; 6(6): 1059-70.
14. Lao Y and et al. Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chemical Research in Toxicol*. 2007; 20(2): 235-45.
15. Maertens LA and et al. Formation and distribution of NNK metabolites in an isolated perfused rat lung. *Drug Metabolism and Disposition* 2010; 38(5): 752-60.
16. Manju S and et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of Nigella sativa essential oil coated gold nanoparticles. *Microbial Pathogenesis* 2016; 91: 129-35.
17. Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res*. 2000; 14(5): 323-8.
18. Al-Ghamdi MS. Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. *The American J. Chinese Medicine* 2003; 31(05): 721-8.
19. Maryam K, Shakeri S and Kiani K. Preparation andin vitroinvestigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. *IET Nanobiotechnol*. 2015. 9(5): 294-9.
20. Zhao L and Wang W. miR-125b suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting Sirtuin7. *International J. Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8(10): 18469.
21. Sayers EW and et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2018; 47 (D1): D94-D99.
22. Khazaei M and Pazhouhi M. Temozolomide-Mediated Apoptotic Death Is Improved by Thymoquinone in U87MG Cell Line. *Cancer Investigation* 2017; 35(4): 225-36.
23. Kaseb, AO and et al. Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(16): 7782-8.
24. Gali-Muhtasib HU and et al. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-Cancer Drugs* 2004; 15(4): 389-99.
25. Schneider-Stock R and et al. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discovery Today* 2014; 19(1): 18-30.
26. Ohtani T and et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3-and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 2000; 12(1): 95-105.
27. Dergarabetian E and et al. Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Front Biosci* (Elite Ed). 2013, 5: p: 706-19.
28. Wang JD and Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nature Reviews Microbiol*. 2009; 7(11): 822-7.

How to cite this article: Nikzad MB, Mirdar Sh. Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin d1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 118-128.
doi: 10.29252/jmp.19.74.118

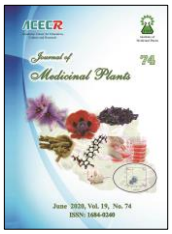
[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]

J. Med. Plants 2020; 19(74): 118-128

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Inhibitory effects of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of cyclin D1 in the lungs of wistar rats exposed to nicotine-derived nitrosamine ketone

Mohammadbagher Nikzad[1,*], Shadmehr Mirdar[2]

[1] *Department of Mathematics, University of Science and Technology of Mazandaran, Iran*
[2] *Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran*

ARTICLE INFO

Keywords:
Cell cycle
Cyclin D1 gene
Lung cancer
Nicotine
Nitrosamine Ketone
Nigella sativa nano-capsule

ABSTRACT

Background: Researchers argue that supplements are somewhat capable of influencing the lung tissue exposed to smoking carcinogens through cell cycle. Cyclin D1 is a gene involved in cell cycle. **Objective:** This study aimed to investigate the effects of 12-week injection of *Nigella sativa* nano-capsule on the expression of Cyclin D1 of the lung tissue of the rats receiving exposure to Nicotine-Derived Nitrosamine Ketone. **Methods:** 46 Wistar rats were assigned into five groups: NNK, Supplement, and Supplement, + NNK, Control and Vehicle group. 125 µg/kg body weight of *Nigella sativa* nano-capsule supplement was injected subcutaneously into the Supplement and Supplement NNK groups once a week. NKK and Vehicle groups received a weekly dose of 12.5 mg/kg NNK and distilled water for 12 weeks through subcutaneous injection. After isolating the lung tissue, the expression of the Cyclin D1 gene was measured using Real Time PCR-ABI. One-way ANOVA parametric analysis and Tukey post hoc test were used to analyze the data at the significant level of $P \leq 0.05$. **Results:** According to the results, the expression of Cyclin 1 gene was relatively reduced in Supplement NNK ($P = 0.003$) and Vehicle ($P = 0.001$) groups in comparison to the NNK group. Nevertheless, no significant difference was observed among the Supplement, Vehicle, and Control groups. We believe that *Nigella sativa* nano-capsule supplement reduced the relative changes of Cyclin 1 in the lung tissues exposed to carcinogen NNK. **Conclusion:** Apparently, this supplement is capable of reducing Cyclin 1 level in cell cycle; hence, it can reduce the carcinogenic effects of NNK and the negative effects of smoking among other therapeutic methods.

Abbreviations: NNK, Nicotine-derived nitrosamine ketone; CDKs, Cyclin-dependent kinase; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; NF-KB, Tumor necrosis factor; TNF, Tumor necrosis factor; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* Corresponding author: mnikzad@mazust.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.74.118
Received 6 December 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 18 February 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.16.4]
[DOI: 10.29252/jmp.19.74.118]