

اثرات درمانی نانوذرات طلائی کوت شده با ۶-جینجروول بر سطح هیپوکامپی فاکتور رشد عصبی، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، آسیب اکسیداتیو DNA و شاخص‌های آپوپتوزی در موش‌های صحرایی متأثر از نانوذرات طلا

قاسم مجدلی یزدی^۱، غلامحسین واعظی^۱، ویدا حجتی^۱ و محمد محمدزاده^{۲*}

^۱ ایران، دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

چکیده

هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات درمانی و محافظتی نانوذرات طلائی کوت شده با ۶-جینجروول بر سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، فاکتور رشد عصبی (NGF)، آسیب اکسیداتیو DNA و شاخص‌های آپوپتوزی Bcl2 و Bax در موش‌های صحرایی متأثر از نانوذرات طلا (AuNPs) می‌باشد. ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. موش‌های گروه کنترل به مدت ۳۰ روز به صورت روز در میان ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین (حلال) بصورت داخل صفاقی دریافت نمودند. در گروه نانوذرات طلا موش‌ها یک بار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نانوذرات طلا حل شده در سالین (۶۰ و ۲۰۰ ppm) و پس از یک ماه به مدت ۳۰ روز بصورت روز در میان ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین دریافت نمودند. در گروه تجربی ۱ مراحل مشابه گروه AuNPs انجام شد اما موش‌ها به جای نرمال سالین بصورت روز در میان ۰/۵ میلی‌لیتر نانوذرات طلائی کوت شده با ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ۶-جینجروول دریافت نمودند. در گروه تجربی ۲ مراحل مشابه گروه AuNPs بود اما به جای نرمال سالین موش‌ها بصورت روز در میان ۰/۵ میلی‌لیتر نانوذرات طلائی کوت شده با ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ۶-جینجروول دریافت نمودند. در پایان دوره درمان، سطح هیپوکامپی BDNF، NGF، ۸-هیدروکسی‌داکسی گوانوزین (8-HOdG) و شاخص‌های آپوپتوزی Bcl2 و Bax توسط روش الیزا مورد سنجش قرار گرفت. در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه نانوذرات طلا AuNPs، سطح NGF، BDNF و Bcl2 به صورت وابسته به دوز تزریقی به طور معنی‌داری افزایش و سطح Bax و 8-HOdG به صورت وابسته به دوز تزریقی به طور معنی‌داری کاهش یافت اما در همه موارد به سطح گروه کنترل نرسید ($p < 0/01$). نانوذرات طلائی کوت شده با ۶-جینجروول از طریق کاهش آپوپتوز و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA سبب بهبود سطح هیپوکامپی فاکتور رشد عصبی و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی در معرض نانوذرات طلا می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: ۶-جینجروول، آپوپتوز، نانوذرات طلا، فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز.

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۱۳۷۱۱۲۵۴۰، ایمیل: mohammadzadehmmh@mums.ac.ir

مقدمه

بر اساس گزارش‌های موجود نانو ذرات طلا می‌توانند در تشخیص و درمان برخی بیماری‌ها نظیر آلزایمر، ایدز، هپاتیت، آرتریت، دیابت و توبرکلوزیس به عنوان حامل دارو یا حامل ژن با لیگاند‌های سازگار زیستی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند و تاثیر آنها روی باکتری‌های گرم منفی، عفونت‌های ادراری و اثرات مثبت دیگر نظیر اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروس و پروتوزوئرها و خواص ویژه آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است. اما نانوذرات طلا

در کنار اثرات مثبت و فواید فراوان می‌توانند یکی از عوامل اختلال در فرایندهای فیزیولوژیک بدن به ویژه سیستم عصبی محسوب شوند از این رو بررسی عوارض نانوذرات طلا بر سلامت انسان و محیط زیست از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۶). نانوذرات طلا به دلیل کوچکی به راحتی می‌توانند در بدن جابجا شوند و ساختار و نفوذپذیری غشاهای سلولی را تغییر دهند و حتی از سد خونی- مغزی عبور نمایند، سیستم‌های دفاعی بدن به راحتی نمی‌توانند با آنها مقابله کنند بنابراین موجب اختلال در عملکرد مغز می‌شوند و مسیر داخلی آپوپتوز را با افزایش رادیکال‌های آزاد فعال می‌نمایند (۱۰ و ۱۷). نانوذرات طلا قادرند با تغییر دادن بیان ژن‌های عوامل تنظیم‌کننده سبب القای آپوپتوز در سلول‌های طبیعی و سرطانی شوند (۲۸) و از طریق اختلال در بیان ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش استرس اکسیداتیو سلول شوند این نانوذرات تولید رادیکال‌های آزاد را در بدن افزایش داده و تعادل سیستم اکسیدانی- آنتی‌اکسیدانی بدن را دچار اختلال نموده سبب استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شوند (۱۶ و ۳۶). نوروتروفین‌ها شامل فاکتور رشد عصبی (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، نوروتروفین ۳ و نوروتروفین ۴، گروهی از فاکتورهای رشد عصبی با ساختار پروتئینی اند که در تکامل سیستم عصبی و حفاظت و شکل‌پذیری نورون‌ها و تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی نقش مهمی برعهده دارند BDNF با اتصال به گیرنده‌های تیروزین کینازی، آبشارهای درون سلولی را راه‌اندازی و موجب تولید و تمایز نورون‌های جدید، بهبود ارتباطات نورونی و توسعه سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌شود (۲۷). بیشترین فعالیت آن در قشر مغز و هیپوکامپ است (۶). فرآیند آپوپتوز از طریق دو مسیر تحریک و فعال می‌شود مسیر بیرونی با تحریک گیرنده‌های غشایی مرگ فعال می‌شود و مسیر درونی یا میتوکندریایی که به واسطه اعضای خانواده Bcl2 تنظیم می‌شود (۳۰). آپوپتوز تحت تاثیر ژن‌های خانواده Bcl2 نظیر: Bcl2، Bcl-XL، Bad، Bax و خانواده

کاسپازها تنظیم می‌شود (۱۹ و ۲۱). استرس اکسیداتیو می‌تواند محرک شروع آپوپتوز باشد. افزایش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) با القاء استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌توانند موجب شروع فرایند آپوپتوز شوند (۳۵). Bcl2 با افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، سلول را در مقابله با رادیکال‌های آزاد یاری می‌کند (۲۱). رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در القاء آپوپتوز و ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو دارند و بنابراین استفاده از ترکیبات یا داروهایی که بتوانند رادیکال‌های آزاد را مهار کنند بسیار مهم به نظر می‌رسد (۳۵). استرس اکسیداتیو و محصولات فرعی آن همچنین می‌توانند به مولکول DNA صدمه وارد نمایند حمله رادیکال‌های هیدروکسیل به موقعیت هشتم مولکول گوانین ترکیبی با عنوان ۸ هیدروکسی دئوکسی گوانوزین (8-HOdG) تولید می‌کند که اندازه‌گیری آن در ارزیابی میزان آسیب به DNA مورد استفاده و دارای اهمیت است. یکی از گیاهان دارویی که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوانی دارد زنجبیل است اثرات دارویی زنجبیل مربوط به اجزای فعال آن یعنی جینجرول‌ها و شوآگول‌هاست و اصلی‌ترین و فراوان‌ترین جینجرول، ۶-جینجرول است (۳۴). این ماده به رادیکال‌های پروکسیل حمله می‌کند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زنجبیل شامل مهار رادیکال‌های آزاد، سرکوب اکسیداسیون لیپید و افزایش مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌هاست (۱۸). همچنین این ترکیبات با تقویت و تسریع مکانیسم‌های دفاع آنتی-اکسیدانی دارای اثرات محافظتی نورونی در موش‌های دیابتی است (۱۲). جینجرول به طور کلی موجب حذف رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال شده که سبب کاهش آسیب اکسیداتیو DNA و ترمیم DNA آسیب‌دیده می‌گردد (۲۳). ۶-جینجرول دارای عمل آنتی‌اکسیدانی در محیط *Invitro* است و به عنوان یک عامل موثر برای جلوگیری از تولید گونه واکنشگر اکسیژن (ROS) و بیان ژن Cox2 القا شده توسط اشعه فوق بنفش به کار می‌رود (۲). و سبب حفاظت سلول‌ها از استرس اکسیداتیو می‌گردد (۲۹).

همچنین ۶-جینجرول با حفظ شرایط فیزیولوژیک نورون‌ها، افزایش ترشح نوروترانسمیترها و کاهش سیگنال مرگ جهت بهبود اختلالات عصبی مرتبط با سن، دارای خاصیت نوروپروتکتیو است (۷). از طرفی می‌تواند از مغز در برابر استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز ناشی از ارگانوفسفر محافظت کند (۲). ترکیبات موثر در ریزوم گیاه زنجبیل از طریق فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی خاص در سلول‌های PC-12 فعالیت عصب‌زایی دارند (۲۹). ترکیبات فنولی زنجبیل نظیر جینجرول‌ها دارای فعالیت ضدسرطانی می‌باشند که این فعالیت از طریق مسیرهای متعدد از جمله مهار بیان سیکلواکسیژناز ۲ (Cox2) صورت می‌گیرد (۲۵). تزریق داخل وریدی عصاره زنجبیل به موش آزمایشگاهی سبب افت فشار خون سرخرگی می‌شود که از عناصر موثر در آن جینجرول و شوآگول است که هر دو دارای اثرات مهارکنندگی می‌باشند و مشخص شده که ۶-جینجرول دارای اثرات بیشتری روی شل‌کنندگی عروق نسبت به ۶-شوآگول است (۱۳). در ایلئوم جدا شده خوک ترکیبات متعدد زنجبیل از قبیل ۶-جینجرول و ۶-شوآگول و گالانولاکتون، دارای اثرات ضد سروتونین می‌باشند و احتمالاً اثر ضدتهوعی زنجبیل یا ترکیبات آن از طریق گیرنده ۵-HT3 واسطه‌گری می‌شود (۱۵). شواهدی نشان داده است که جینجرول یکی از ترکیبات فعال زنجبیل در محیط *In vitro* در مبارزه با هلیکوباکتر پیلوری موثر بوده است که مرتبط با بیماری زخم معده و پیشرفت سرطان معده و کولون است (۳). ترکیبات ۶ و ۸ و ۱۰-جینجرول و ۶-جینجریدیول زنجبیل دارای خواص ضد قارچی نیز می‌باشند (۱۱). به طور کلی عصاره آبی والکلی زنجبیل فعالیت ضد میکروبی دارند و تاثیر آنها روی میکروب‌های *اشرشیا کلی*، *باسیلوس*، *پروتئوس و لگاریس* و *سودوموناس* اثبات شده است (۲۲). تحقیقات دیگر نشان داده است که ۶-جینجرول دارای اثرات محافظتی بر سلول‌های کلیوی در آسیب کلیوی القا شده توسط جنتامایسین می‌باشد، ۶-جینجرول از طریق مهار کاسپاز ۳ و Hsp47 سبب کاهش آپوپتوز در سلول‌های کلیوی

آسیب‌دیده می‌شود (۱۴). ۶-جینجرول، ۱۰-جینجرول، ۶-شوآگول و ۱۰-شوآگول جدا شده از ریزوم زنجبیل سبب از بین رفتن یا کاهش حرکت لارو نماتود *Anisakis simplex* می‌شوند و ۱۰-جینجرول سبب مرگ لاروها شده است (۲۱). تحقیق حاضر با هدف تعیین اثر درمانی نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول بر سطح هیپوکامپی BDNF، NGF و آسیب اکسیداتیو DNA و میزان شاخص‌های آپوپتوزی Bcl2 و Bax در موش‌های صحرانی در معرض نانوذرات طلا انجام شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده: موش‌های صحرایی نر و بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۵-۱۸۵+ که از حیوان‌خانه دانشکده علوم پزشکی مشهد تهیه شده بود در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده مورد استفاده قرار گرفت شرایط نگهداری حیوانات دمای 25 ± 4 درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی تاریکی حدوداً ۱۲ ساعته در نظر گرفته شد. موش‌ها از غذای فشرده و آماده و به صورت آزاد و بطری‌های آب ۵۰۰ میلی‌لیتری استفاده می‌کردند و در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و استاندارد نگهداری می‌شدند (۲۱).

روش تهیه محلول کلوئیدی نانوذرات طلا: نانو ذرات طلا به صورت پودر از شرکت سیگما (sigma-Aldrich Germany) خریداری شد، محلول کلوئیدی نانوذرات طلا (۲۰۰ ppm و ۶۰ nm) توسط شرکت FINE NANO تهیه و از نرمال سالین به عنوان حلال استفاده شده است، جهت جلوگیری از راسب شدن، قبل از تزریق توسط سانتریفیوژ اولتراسونیک به صورت محلول کلوئیدی در می‌آمد (۲۱).

روش تهیه نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول: سنتز نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد بدین منظور: ۱۰۰ میلی‌لیتر از

مورد استفاده قرار گرفت. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها مراحل فوق دردمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد و از محلول فنیل متیل سولفونیل فلوراید به عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد.

روش الایزا: سیتوپلاسم به دست آمده از مرحله قبل یخ-گشایی شد و بر طبق پروتکل کیت‌های BCL2, Bax, NGF, BDNF و 8-HodG به ویال‌های الایزا اضافه شد. قبل از ارزیابی نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا حدود ۱۲ ساعت به نمونه‌ها زمان دادیم تا دمای آنها تنظیم شود سپس با واشر نرمال سالین عمل شستشو انجام شد و رسوب به دست آمده توسط دستگاه الایزای اتوماتیک مورد سنجش و فتومتری قرار گرفت.

روش آماری: نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۰ تحلیل شد با توجه به اینکه نتایج کمی است توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد ($p < 0/001$). نتایج به دست آمده توسط آزمون آماری one-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey تحلیل شد ($p < 0/05$) معنی‌دار بود.

نتایج

مقایسه نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق نانوذرات طلا سطح هیپوکامپی NGF, BDNF را به طور معنی‌داری کاهش داد ($p < 0/001$). همچنین سطح هیپوکامپی 8-HodG در موش‌های صحرایی گروه نانوذرات طلا (AuNps) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). از طرفی سطح هیپوکامپی 8-HodG گروه تجربی ۱ و ۲ (AuNps+AuNps Ging 50,100) وابسته به دوز تزریقی به طور معنی‌داری نسبت به گروه بیمار کاهش پیدا نمود و سطح هیپوکامپی NGF و BDNF افزایش پیدا کرد (شکل ۱). تحلیل داده‌های این مطالعه تجربی نشان داد که سطح هیپوکامپی Bcl2 در موش‌های صحرایی گروه بیمار (AuNps) در مقایسه

محلول جینجرول با غلظت ۱۰ میلی مولار به ۱۰۰ ml محلول نیترات طلا با غلظت ۱ میلی مولار اضافه شد، سپس نانوذرات در شرایط محیطی به مدت ۸ ساعت قرار داده شدند، تغییر رنگ محلول به رنگ قهوه‌ای نشانه سنتز نانوذرات طلای کوت شده است. نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول با روش طیف‌سنجی، نور ماورای بنفش مرئی، طیف‌سنجی نور مادون قرمز، میکروسکوپ الکترونی گذاره شناسایی شدند و غلظت نانوذرات طلای پوشش دار شده با ۶-جینجرول با دستگاه جذب اتمی تعیین شد (۱).

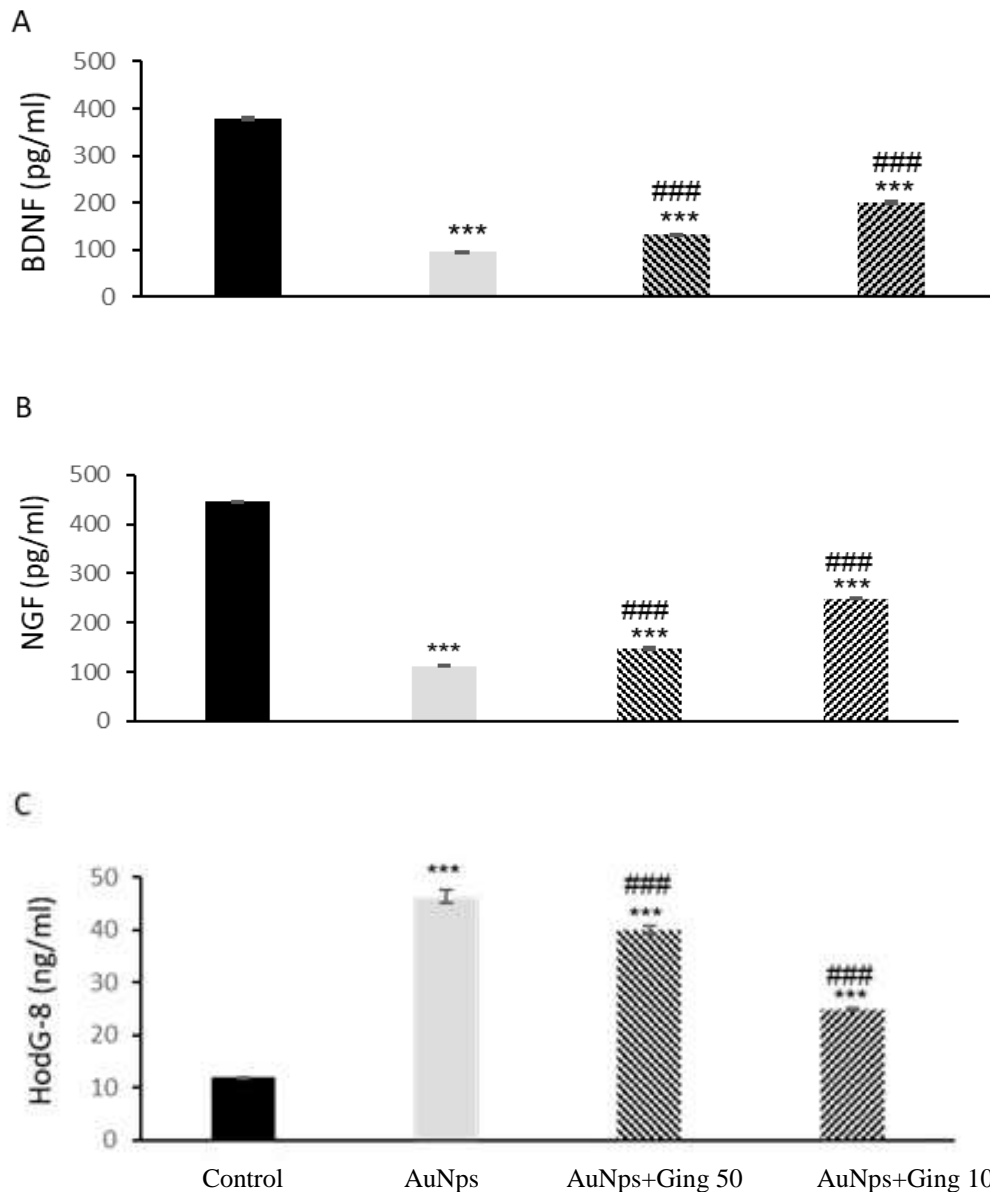
طراحی آزمایش: تعداد ۲۴ سر موش صحرایی به چهار گروه ۶ تایی و به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه کنترل: به مدت ۳۰ روز و روز در میان و به صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین به عنوان حلال دارو دریافت نمودند. گروه AuNps: ابتدا ۰/۵ میلی لیتر نانوذرات طلا (۲۰۰ ppm) و ۶۰ نانومتر) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و پس از یک ماه به مدت ۳۰ روز و روز در میان ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین دریافت کردند. گروه تجربی ۱: یک ماه پس از دریافت AuNps (۲۰۰ ppm و ۶۰ نانومتر) به مدت ۳۰ روز و روز در میان ۰/۵ میلی لیتر نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول با غلظت ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم دریافت کردند. گروه تجربی ۲: یک ماه پس از دریافت AuNps (۲۰۰ ppm و ۶۰ نانومتر)، به مدت ۳۰ روز و روز در میان نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول و با غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم دریافت کردند.

روش تهیه نمونه بافتی: موش‌ها توسط دی اتیل اتر به صورت پایدار بیهوش شدند و مغز به طور کامل خارج شد هیپوکامپ جداسازی و با نرمالین سالین شستشو داده شد، سپس هیپوکامپ با بافر تریس به مدت ۵ دقیقه هموژنیزه و سپس توسط سانتریفیوژ یخچالدار به مدت ۳ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، محلول روئی جداسازی شد و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه مجدداً سانتریفیوژ شد، نمونه به دست آمده جهت سنجش الایزا

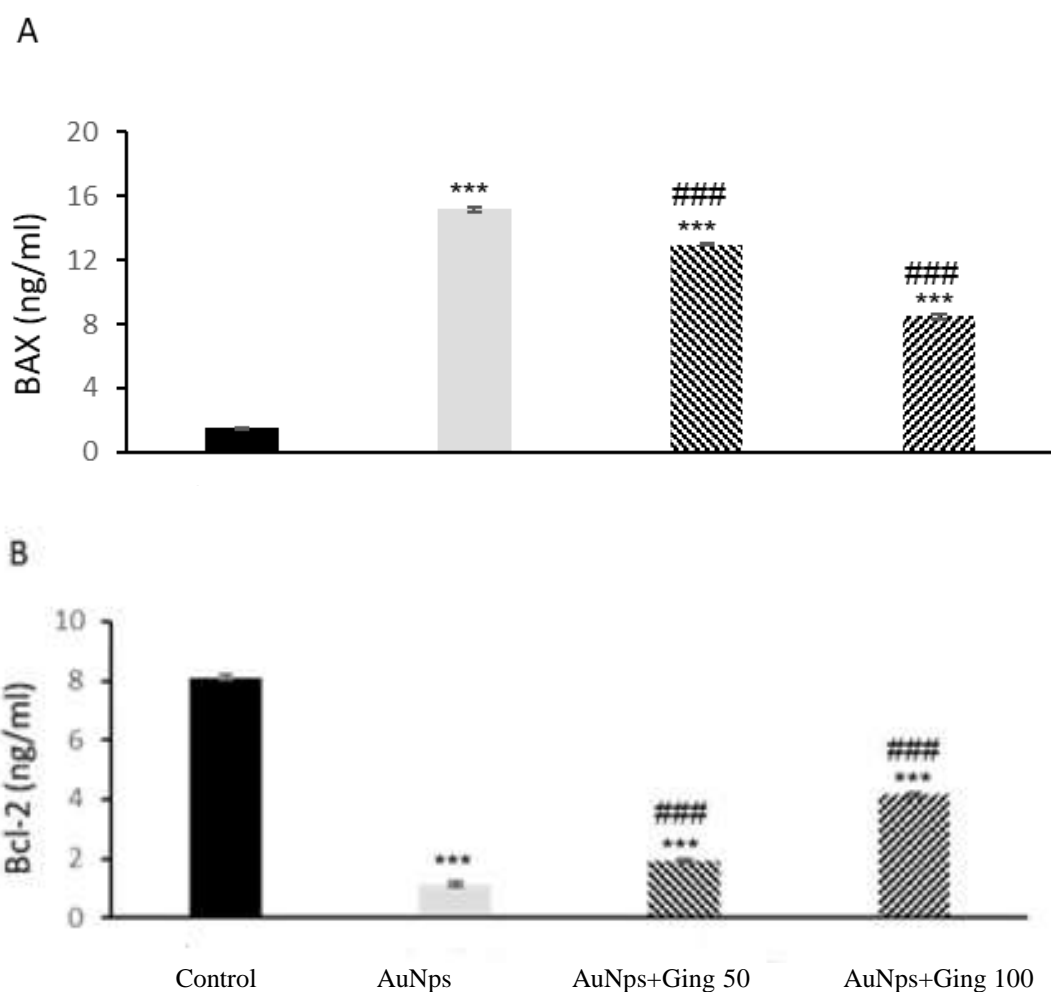
بحث

نتایج بدست آمده نشان داد تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر یک‌بار (۲۰۰ppm، ۶۰ نانومتر) نانوذرات طلا به صورت داخل صفاقی سبب کاهش سطح هیپوکامپی Bcl2 و افزایش Bax می‌شود به عبارت دیگر نانوذرات طلا توانست سبب القاء آپوپتوز در بافت هیپوکامپ شود.

با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش پیدا نمود و میزان Bax افزایش پیدا کرد از طرفی سطح هیپوکامپی Bcl2 در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ در مقایسه با گروه بیمار (AuNps) به طور معنی‌داری وابسته به دوز تزریقی افزایش پیدا نمود اما سطح Bax کاهش پیدا کرد (شکل ۲).



شکل ۱- اثر تزریق نانوذرات طلا و نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول بر سطح هیپوکامپی BDNF (A)، NGF (B)، 8-HodG (C) در موش‌های صحرائی. *** نشان دهنده $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، ### نشان دهنده $p < 0/001$ در مقایسه با گروه نانوذرات طلا. $n=6$.



شکل ۲- اثر تزریق نانوذرات طلا و نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینچرول بر سطح هیپوکامپی. (A) Bax، (B) Bcl2 در موش‌های صحرائی. *** نشان دهنده $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، ### نشان دهنده $p < 0/001$ در مقایسه با گروه نانوذرات طلا. $n=6$

مطالعه دیگری نشان داد که AuNPs سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و تخریب آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلووتاتیون پر اکسیداز (GP)، در مغز موش می‌شود. همچنین سبب ایجاد 8-HOdG ناشی از استرس اکسیداتیو DNA، کاسپاز ۳ و شوک شدید پروتئین ۷۰ (Hsp70) و IFN- γ می‌گردد که ممکن است با التهاب و تخریب DNA باعث مرگ سلول گردد. نانوذرات طلا می‌توانند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی B16F10 ملانوما شوند (۵).

پژوهش دیگری نشان داد نانوذرات طلا از طریق فعال کردن مسیر میتوکندریایی آپوپتوز از طریق کاهش ظرفیت آنتی

از طرفی سطح هیپوکامپی BDNF و NGF به شدت کاهش یافت و سطح هیپوکامپی 8-HOdG که نشانه‌ای از آسیب اکسیداتیو DNA است به شدت افزایش پیدا نمود. نانوذرات عناصر فلزی مثل طلا و نقره و کادمیوم و... باعث استرس اکسیداتیو می‌شوند و درجه بالایی از سمیت دارند، نانوذرات طلا باعث استرس اکسیداتیو شده و پاسخ سلول‌ها شاید اتوفازی باشد (۳۷). اندازه نانوذرات یک فاکتور کلیدی در پاسخ‌های بیولوژیکی به نانوذرات است، نانوذرات با قطر بیشتر اثرات کمتری دارند (۱۸).

آسیب DNA می‌شوند و این امر با افزایش سطح 8-HOdG در ادرار به عنوان نشانگر بیولوژیکی آسیب DNA تایید شده است (۳۱). نتایج پژوهشی نشان داد نانوذرات طلا می‌تواند سطح 8-HOdG را افزایش دهند که این امر نشان از آسیب DNA است (۳۲).

محققین نشان دادند نانوذرات طلای کاتیونی دارای اثرات سمی بر سلول‌ها هستند و این اثرات از طریق افزایش تولید ROS و آسیب اکسیداتیو DNA اعمال می‌شوند (۸). پژوهشی دیگر نشان داد نانوذرات طلا سبب استرس اکسیداتیو و آسیب DNA در سلول‌های فیبروبلاست ریه در شرایط *In vitro* می‌شوند (۲۰).

اثر درمانی نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول در جهت افزایش بیان نوروتروفین‌ها در موش‌های در معرض نانوذرات طلا: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داده است که تیمار موش‌های صحرائی دریافت‌کننده نانو ذرات طلا، با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول، به صورت وابسته به دوز تزریقی موجب افزایش معنی‌دار سطح هیپوکامپی NGF و BDNF می‌شود. همچنین نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول توانست سطح هیپوکامپی 8-HOdG را کاهش و شاخص‌های آپوپتوزی را بهبود بخشد. در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از نانو ذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول در درمان موش‌های آسیب دیده در معرض نانوذرات طلا مشخص شد نانوذرات طلا با افزایش استرس اکسیداتیو و محصولات فرعی ناشی از آن به DNA آسیب وارد می‌کنند به طوریکه در نتیجه حمله رادیکال‌های هیدروکسیل به موقعیت هشتم مولکول گوانین، 8-HOdG تولید می‌شود که وجود و افزایش آن به طور مثال در ادرار فرد آسیب دیده قابل ارزیابی است. در این مطالعه افزایش 8-HOdG در عصاره هیپوکامپ موش‌های در معرض نانوذرات طلا، با دستگاه الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از استفاده از نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول کاهش معنی‌دار 8-HOdG در عصاره

اکسیداتیو و کاهش گلوکاتایون سبب القای آپوپتوز در سلول‌های رده HL7702 می‌شوند (۱۲).

محققین نشان دادند نانوذرات طلا با نفوذ به هسته سلول سبب تخریب ساختار دو رشته‌ای DNA می‌شوند که این موضوع افزایش 8-HOdG را در گروه بیمار توجیه می‌کند. همچنین از طریق مهار سیتوکینز و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سبب مهار رشد تومور می‌شوند (۱۷).

طی پژوهشی دیگر نشان داده شد نانوذرات طلا از طریق مهار Bcl2 و افزایش توکسیسیتی در رده سلول‌های سرطانی HeLa سبب القای آپوپتوز می‌شوند (۹). نانوذرات طلا از طریق افزایش کاسپاز ۳ و Hsp70 سبب القای آپوپتوز و متعاقباً مرگ سلول‌های عصبی می‌شوند (۳۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطح هیپوکامپی NGF و BDNF در موش‌های صحرائی دریافت‌کننده نانو ذرات طلا کاهش می‌یابد. از طرفی نشان داده شده نانو ذرات طلا با عبور از سد خونی- مغزی از طریق مهار بیان ژن، میزان ترشح نوروتروفین‌ها را در سیستم عصبی مرکزی کاهش می‌دهند و پیامد آن اختلال در عملکرد حافظه فضایی مغز است (۴).

گزارش شده است نانو ذرات طلا از طریق کاهش توان آنتی‌اکسیداتیو سلول‌های عصبی به ویژه گلوکاتایون پراکسیداز (GP) سبب اختلال در بیوسنتز نوروتروفین‌ها می‌شوند. همچنین مشخص شده است نانوذرات طلا با اختلال در عملکرد ارگانل‌های درون سلولی سبب کاهش میزان انتقال دهنده‌های عصبی مانند دوپامین و سروتونین می‌شوند که این امر توسط آزمون‌های رفتاری هم به اثبات رسیده است (۳۲). در این مطالعه مشخص شد سطح هیپوکامپی 8-HOdG در موش‌های صحرائی دریافت‌کننده نانوذرات طلا افزایش می‌یابد.

نتایج پژوهشی نشان داد نانوذرات طلا از طریق افزایش قابل توجه در گونه‌های اکسیژن فعال، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین-۶ و افزایش سنتز نیتریک اکساید (NO)، در پلاسما سبب

در این مطالعه مشخص شد نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول می‌تواند سبب مهار Bax و افزایش Bcl2 در موش‌های دریافت‌کننده نانوذرات طلا شوند. همسو با نتایج به دست آمده محققین طی پژوهشی نشان دادند ۶-جینجرول دارای اثر محافظتی بر سلول‌های کلوی در آسیب کلوی القا شده توسط جنتا مایسین است. همچنین مشخص شد ۶-جینجرول از طریق مهار کاسپاز ۳ و Hsp47 سبب کاهش آپوپتوز در سلول‌های کلوی آسیب دیده می‌شود (۱۴).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم داشتن امکانات کافی جهت انجام بررسی‌های رفتاری که نتایج آن می‌توانست مکملی برای نتایج به دست آمده باشد، اشاره کرد. مطالعه حاضر در شرایط In Vivo انجام شده، پیشنهاد می‌شود جهت درک بهتر نتایج به دست آمده و یافتن مکانیسم‌های مولکولی، در شرایط In Vitro هم بررسی‌های لازم صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد ۶-جینجرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی زمانی که همراه نانوذرات طلا استفاده می‌شود سبب کاهش آسیب استرس اکسیداتیو DNA و کاهش آپوپتوز در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرانی در معرض نانوذرات طلا می‌شود. همچنین سبب بهبود سطح هیپوکامپی NGF و BDNF در موش‌های صحرانی در معرض نانوذرات طلا می‌شود.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم مراتب قدردانی خود برای انجام این پژوهش را از معاونت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان اعلام نماییم.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

هیپوکامپ، نشانه‌ای از خاصیت درمانی نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول در موش‌های آسیب دیده بود و چون میزان 8-HOdg تعادل دینامیکی بین آسیب DNA و سرعت ترمیم آن را نشان می‌دهد می‌توان ادعا نمود نانوذرات طلای کوت شده با ۶-جینجرول با کاهش استرس اکسیداتیو و محصولات فرعی آن سبب ترمیم DNA و کاهش آسیب به آن می‌گردند. زنجبیل به دلیل داشتن ۶-جینجرول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است. از سوی دیگر گزارش شده است ترکیبات فلاونوئیدی نظیر ۶-جینجرول دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند و از استرس اکسیداتیو سلول‌های بدن جلوگیری می‌کنند (۲۴).

گزارش شده است که عصاره زنجبیل با داشتن خواص ضد اکسیدانی و با کاهش میزان ROS سبب کاهش اثرات منفی رادیکال‌های آزاد بر آسیب سلول‌های کبدی می‌شود. جینجرول‌های موجود در زنجبیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و موجب حذف رادیکال‌های آزاد و حذف متابولیت‌های فعال در بدن می‌شوند. این امر سبب کاهش آسیب اکسیداتیو DNA و ترمیم DNA آسیب‌دیده می‌شود (۲۳).

نتایج پژوهشی نشان می‌دهد که زنجبیل و ترکیبات آن مانند ۶-جینجرول، دارای خواص نوروپروتکتیو است و از طریق حفظ شرایط فیزیولوژیک نورون‌ها، افزایش ترشح نوروترانسمیترها و کاهش سیگنال مرگ، جهت بهبود اختلالات عصبی مرتبط با سن موثر است (۷). گزارش شده است ۶-جینجرول می‌تواند از مغز در برابر استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز ناشی از Organophosphorus محافظت کند (۲).

نتایج پژوهش دیگری نشان داد ترکیبات موثر در ریزوم گیاه زنجبیل از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ PI3K/AKT و MEK/ERK1/2 در سلول‌های PC-12 فعالیت عصب‌زایی دارند. همچنین ۶-شوآگول به عنوان یکی دیگر از ترکیبات زنجبیل است که می‌تواند همانند NGF عمل کند و رفتارهای فیزیولوژیک آن را تقلید کند (۲۹).

منابع

- 1- Hajbabaie M., Baharara J., Iranbakhsh A., Ramezani T. (2017). Investigation angiogenesis effect of silver nanoparticles coated with silymarin on chick embryo chorioalantoic membrane and evaluation of its antioxidant activity. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(152):54-64
- 2- Abolaji A.O., Ojo M., Afolabi T.T., Arowoogun M.D., Nwawolor D., Farombi E.O. (2017). May; Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 270:15-23.
- 3-Afzal M., Al-Hadidi D., Menon M., Pesek J., Dhimi M.S. (2001). Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 18:159-190.
- 4- Bonoiu A.C., Bergey E.J., Ding H., Hu R., Kumar R., Yong K.T., Prasad P.N., Mahajan S., Picchione K.E., Bhattacharjee A., Ignatowski T.A. (2011). Gold nanorod-siRNA induces efficient in vivo gene silencing in the rat hippocampus. *Nanomedicine*, 6(4):617-630.
- 5- Chang M.Y., Shiau A.L., Chen Y.H., Chang C.J., Chen H.H., Wu C.L. (2008). Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Science*, 99(7):1479-84.
- 6- Chen X.Q., Sawa M., Mobley W.C. (2018). Dysregulation of neurotrophin signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease and of Alzheimer disease in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 114:52-61.
- 7- Choi J.G., Kim S.Y., Jeong M., Oh M.S. (2018). Pharmacotherapeutic potential of ginger and its compounds in age-related neurological disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 182:56-69.
- 8- Chompoosor A., Saha K., Ghosh P.S., Macarthy D.J., Miranda O.R, Zhu Z.J., et al. (2010). The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*, 6(20):2246-2249.
- 9- Daduang J., Palasap A., Daduang S., Boonsiri P., Suwannalert P., Limpaboon T. (2015). Gallic acid enhancement of gold nanoparticle anticancer activity in cervical cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(1):169-174.
- 10- Elahi N., Kamali M., Baghersad M.H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184:537-556.
- 11-Ficker C.E., Arnason J.T., Vindas P.S., Alvarez L.P., Akpagana K., Gbassor M., De Souza C., Smith M.L. (2003). Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extract. *Mycoses*, 46:29-37.
- 12- Gao W., Xu K., Ji L., Tang B. (2011). Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology Letters*, 205(1): 86-95.
- 13- Ghayur M.N., Gilani A.H. (2005). Ginger lowers blood pressure through blockade. *Pharmacology*, 45:74-80
- 14- Hegazy A.M., Mosaed M.M., Elshafey S.H., Bayomy N.A. (2016). 6-gingerol ameliorates gentamicin induced renal cortex oxidative stress and apoptosis in adult male albino rats. *Tissue and Cell*, 48(3):208-216.
- 15- Huang Q.R., Iwamoto M., Aoki S., Tanaka N., Tajima K., Yamahara J., Takiashi Y., Yoshida M., Tomimatso T., Tamai Y. (1991). Anti 5hydroxytryptamine 3 effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger. *Chemistry Pharmacology Bulletin*, 39:397-399.
- 16- Jia H.Y., Liu Y., Zhang X.J., Han L., Du B., Tian Q., Xu Y.C. (2009). Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. *Journal of American Chemical Society*, 131(1): 40-41.
- 17- Kang B., Mackey M.A., El-Sayed M.A. (2010). Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of American Chemical Society*, 132(5): 1517-1519.
- 18- Khaki A., Khaki A.A., Hajhosseini L., Golzar F.S., Ainehchi N. (2014). The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dysfunction of diabetes rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(4):1-8.
- 19- Knight T., Luedtke D., Edwards H., Taub J.W., Ge Y. (2019). A delicate balance - The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. *Biochemistry and Pharmacology*, 162:250-261.
- 20- Li J.J., Zou L., Hartono D., Ong C.N., Bay B.H., Lanry Yung L.Y. (2008). Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in Vitro. *Advanced Materials*, 20(1):138-142.
- 21- Lin R.J., Chen C.Y., Lee J.D., Lu C.M., Chung L.Y., Yen C.M. (2010). Larvicidal constituents of *Zingiber officinale* (ginger) against *Anisakis simplex*. *Plantal Medicine*, 76(16):1852-1858.
- 22- Malu S.P., Obochi G.O., Tawo E.N. Nyong B.E. (2009). Antibacterial activity and medicinal properties of ginger (*Zingiber officinale*). *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 15(3):365-368.

- 23- Mohamed O.I., El-Nahas A.F., El-Sayed Y.S., Ashry K.M. (2016). Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver. *Pharmaceutical Biology*, 54(7):1164-1172.
- 24- Nwozo S.O., Osunmadewa D.A., Oyinloye B.E. (2014). Anti-fatty liver effects of oils from *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* on ethanol-induced fatty liver in rats. *Journal of Integrative Medicine*, 12(1):59-65.
- 25- Ramakrishnan R. (2013). Anticancer properties of *Zingiber officinale*-ginger: A Review. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 3(5):11-20
- 26- Saeedi M., Eslamifar M., Khezri K., Dizaj S.M. (2019). Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111:666-675.
- 27- Scott-Solomon E., Kuruvilla R. (2018). Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91: 25-33.
- 28- Selim M.E., Hendi A.A. (2012). Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4):1617-1620.
- 29- Seow S.L.S., Hong S.L., Lee G.S., Malek S.N.A., Sabaratnam V. (2017). 6-shogaol, a neuroactive compound of ginger (jahe gajah) induced neurotogenic activity via NGF responsive pathways in PC-12 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1):334.
- 30- Shirjani S., Mansoori B., Asghari S., Duijf P.H.G., Mohammadi A., Gjerstorff M., Baradaran B. (2019). MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 139:1-15.
- 31- Shrivastava R., Kushwaha P., Bhutia Y.C., Flora S. (2016). Oxidative stress following exposure to silver and gold nanoparticles in mice. *Toxicology and Industrial Health*, 32(8):1391-1404.
- 32- Siddiqi N.J., Abdelhalim M.A., El-Ansary A.K., Alhomida A.S., Ong W.Y. (2012). Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *Journal of Neuroinflammation*, 9: 123.
- 33- Söderstjerna E., Johansson F., Klefbohm B., Englund Johansson U. (2013). Gold- and silver nanoparticles affect the growth characteristics of human embryonic neural precursor cells. *PLoS One*, 8(3):e58211.
- 34- Srinivasan K. (2017). Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*, 5(1):18-28.
- 35- Tang J.Y., Ou-Yang F., Hou M.F., Huang H.W., Wang H.R., Li K.T. (2019). Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects - involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration. *Seminars in Cancer Biology*, 58:109-117.
- 36- Tedesco S., Doyle H., Redmond G., Sheehan D. (2008). Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 66(1):131-133.
- 37- Wu D., Liu B., Yin J., Xu T., Zhao S., Xu Q., Chen X., Wang H. (2017). Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative damage in peripheral leukocyte DNA by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1064:1-6.

Therapeutic Effects of 6-Gingerol-Coated Gold Nanoparticles on the Hippocampal Level of NGF, BDNF, DNA Oxidative Damage and Apoptotic Indices in Rats Affected by Gold Nanoparticles

Majdi Yazdi Gh.¹, Vaezi Gh.H.¹, Hojati V.¹ and Mohammadzadeh M.²

¹ Dept. of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, I.R. of Iran

² Psychiatry and Behavioral Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

This study aimed to determine the therapeutic and protective effects of 6-gingerol-coated gold nanoparticles at the hippocampal level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), oxidative DNA damage, and Bax and Bcl2 apoptotic indices in gold nanoparticle-affected rats. 24 adult male Wistar rats are included in four equal groups: 1. Control group: animals received intraperitoneal injections of 0.5 ml of saline solution as solvent every other day. 2. AuNPs group: rats received one injection of 0.5 ml of gold nanoparticles dissolved in saline (AuNPs) (200 ppm and 60 nm), and after one month, received 0.5 ml of saline solution every other day. 3. Experimental group 1: all experiments were similar to the AuNPs groups except for saline solution, but they received 0.5 ml of AuNPs coated with 50 mg/kg 6-gingerol dissolved in saline every other day. 4. Experimental group 2: all experiments were similar to the AuNPs groups except for saline solution, but they received 0.5 ml of AuNPs coated with 100 mg/kg 6-gingerol dissolved in saline every other day. At the end of the treatment period, hippocampal levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-HodG), NGF, BDNF, and Bax, Bcl2 apoptotic indices were measured by the ELISA method. In the experimental groups, the levels of NGF, BDNF, and Bcl2 increased significantly, and the levels of Bax and 8-HodG decreased significantly compared to the AuNPs group ($p < 0.001$) in a dose-dependent manner. 6-gingerol-coated gold nanoparticles improve the hippocampal level of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in gold nanoparticles-exposed rats by reducing apoptosis and oxidative DNA damage.

Keywords: 6- Gingerol, Apoptosis, AuNPs, BDNF, NGF.