

مقایسه‌ی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) حاوی عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای (KRGE) نسبت به عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای در درمان سندرم تخمدان پلی‌کیستیک ناشی از تستوسترون

ماندانا امامدوست^۱، سعیده ظفر بلانژاد^۲، خدیجه شاهرخ آبادی^۳، مسعود همایونی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پژوهش حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه‌ی اثرات عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای (Korean red ginseng extract یا KRGE) و نانوذرات پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید [Poly(lactic-co-glycolic acid) یا PLGA] حاوی KRGE در درمان موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS یا Polycystic ovary syndrome) ناشی از تستوسترون انجام شد.

روش‌ها: موش‌های ماده‌ی Naval Medical Research Institute (NMRI) پس از بلوغ به سه گروه شاهد منفی (۱۰ سر موش سالم)، شاهد مثبت (۱۰ سر موش تحت درمان با دارونما) و بیمار (۶۰ سر موش) تقسیم شدند. بیماری PCOS از طریق تزریق زیرجلدی ۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم در روز تستوسترون انانتات به پشت گردن موش‌ها به مدت ۴ هفته در دو گروه شاهد مثبت و بیمار القا گردید. سپس گروه بیمار به صورت داخل صفاقی با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جینسینگ (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ (۳، ۶ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای ۱۵ روز متوالی تحت درمان قرار گرفتند. بافت‌های تخمدان به منظور تعیین مالون دی‌آلدئید (MDA یا Malondialdehyde)، گونه‌ی فعال اکسیداتیو، گلوتاتیون احیا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total Antioxidant Capacity یا TAC)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (Glutathione S-transferase یا GST) و Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) [برای بررسی بیان دو ژن گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase یا GR) و فاکتور هسته‌ای اریثروئید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ (Nuclear factor erythroid 2 یا NRF-2)] با جراحی برداشته شد.

یافته‌ها: عصاره و نانوذرات حاوی جینسینگ، منجر به کاهش MDA و گونه‌ی فعال اکسیداتیو و همچنین، افزایش سطح گلوتاتیون احیا، TAC و فعالیت GST در موش‌های مبتلا به PCOS شد. با توجه به نتایج RT-PCR، مقادیر بیان دو ژن NRF-2 و GR در موش‌های تحت درمان افزایش یافت. بر اساس یافته‌ها، نانوذرات PLGA حاوی جینسینگ مؤثرتر از عصاره بود.

نتیجه‌گیری: نانوذرات PLGA حاوی جینسینگ، در کاهش عوارض ناشی از بیماری PCOS مؤثرتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: جینسینگ قرمز کره‌ای؛ سندرم تخمدان پلی‌کیستیک؛ نانوذرات

ارجاع: امامدوست ماندانا، ظفر بلانژاد سعیده، شاهرخ آبادی خدیجه، همایونی مسعود. **مقایسه‌ی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) حاوی عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای (KRGE) نسبت به عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای در درمان سندرم تخمدان پلی‌کیستیک ناشی از تستوسترون.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۵۰): ۸۸۲-۸۷۵.

همچنین، افزایش خطر اختلالات قلبی-عروقی، دیس‌لیپیدی، چاقی و دیابت نوع دو می‌شود (۲). دلایل ژنتیکی بروز این بیماری به طور کامل شناخته نشده است (۳). با این حال، هورمون‌ها و سبک زندگی در ایجاد آن نقش مهمی دارند (۴). شایع‌ترین ناهنجاری در PCOS، هیپرآندروژنیسم (Hyperandrogenism) می‌باشد (۵-۶). در بیماران

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (Polycystic ovary syndrome یا PCOS)، شایع‌ترین اختلال هورمونی است که سالانه تا ۲۰ درصد زنان در سنین باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). این بیماری باعث ایجاد اختلال در فرایند تخمک‌گذاری، بی‌نظمی قاعدگی، ناباروری و

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سعیده ظفر بلانژاد؛ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

ماده‌ی Naval Medical Research Institute (NMRI) دارای PCOS ناشی از تستوسترون بود. به همین منظور، اثرات این دو ترکیب بر پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی‌آلدئید (MDA)، آنیون سوپراکسید (O_2^-)، گلوکاتایون احیا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total Antioxidant capacity یا TAC)، گلوکاتایون S-ترانسفراز (Glutathione S-transferase یا GST) و هم‌چنین، بیان دو ژن گلوکاتایون ردوکتاز (Glutathione reductase یا GR) و فاکتور هسته‌ای اریثروئید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ (Nuclear factor erythroid 2 یا NRF-2) بررسی گردید. طبق اطلاعات، این مطالعه اولین تحقیقی است که در آن از جینسینگ به همراه نانوذرات حامل آن برای درمان PCOS استفاده می‌شود.

روش‌ها

۸۰ سر موش ماده‌ی NMRI (با وزن ۳۰-۲۰ گرم و سن ۸ هفته) با چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی در یک قفس مخصوص در آزمایشگاه نگهداری شدند و به مدت ۱۴ روز به آب و غذا به طور آزادانه دسترسی داشتند. سپس موش‌های با ۳-۲ چرخه‌ی جنسی منظم در طول ۱۴-۱۲ روز با مشاهده‌ی اسمیر واژن برای آنالیز بیشتر انتخاب شدند. روش انجام طرح توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با کد IR.IAU.MSHD.REC.1399.209 تأیید شد. لازم به ذکر است که مطالعه‌ی حاضر از نوع مورد-شاهدی بود و فاز حیوانی آن از مهر سال ۱۳۹۸ به مدت دو ماه در آزمایشگاه تکوین، دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام گردید.

موش‌های ماده‌ی NMRI پس از بلوغ به دو گروه شاهد منفی (موش‌های سالم: ۱۰ سر) و بیمار (القای بیماری با تزریق زیرجلدی ۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم در روز تستوسترون انانتات به مدت ۴ هفته: ۷۰ سر) تقسیم شدند. اسمیرهای واژن برای تأیید القای بیماری توسط پاتولوژیست تهیه شد. موش‌ها با سلول‌های شاخی در اسمیر واژن خود، به عنوان گروه بیمار PCOS در نظر گرفته شدند (۱۹). همچنین، نمونه‌گیری خون از دو گروه جهت تعیین سطح سرمی تستوسترون، Luteinizing hormone (LH)، Follicle-stimulating hormone (FSH)، استرادیول و پروژسترون به عنوان شاخص‌های اصلی PCOS گرفته شد (۲۰). برای نمونه‌گیری خون، ابتدا موش‌ها با کامین بیهوش شدند و سپس ۱ میلی‌لیتر خون از قلب آن‌ها گرفته شد.

برای تهیه‌ی عصاره‌ی جینسینگ، ریشه‌ی جینسینگ با قرار گرفتن در معرض نور مستقیم خورشید، در شرایط استاندارد خشک گردید و از رطوبت و آلودگی‌های میکروبی دور نگه داشته شد. جینسینگ خشک شده با استفاده از آسیاب برقی پودر شد و برای تولید عصاره،

هیپرانسدرورژنیک، سطح بالای از آندروژن‌های مختلف از جمله تستوسترون، آندروستندیون و دی‌هیدروتستوسترون سولفات و ۳-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در سرم مشاهده می‌شود که نشان دهنده‌ی القای این بیماری با علل مختلف می‌باشد (۷-۸).

درمان‌های مختلفی برای PCOS انجام می‌گیرد که هر کدام مزایا و معایب خود را دارند. در بین درمان‌های دارویی، کلومیفن سترات و متفورمین به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند (۹). با این وجود، از عوارض آن‌ها می‌توان به افزایش نرخ عدم تخمک‌گذاری، خطر حاملگی خارج رحمی، رشد فولیکول‌های متعدد و ناهنجاری‌های مادرزادی اشاره کرد (۱۰).

با توجه به عوارض جانبی درمان‌های دارویی، رویکرد جدیدی نسبت به درمان‌های مکمل در حال توسعه است. از این رو، گیاهان، مواد گیاه شیمی و مکمل‌های غذایی برای پیشگیری، کاهش ابتلا و یا درمان PCOS به همراه کاهش عوارض جانبی مورد توجه قرار گرفته اند (۱۱). Kwon و همکاران با بررسی ترکیبات گیاهی به این نتیجه رسیدند که این ترکیبات توانایی کاهش التهابات و استرس اکسیداتیو را دارند. همچنین، از اتوفاژی و آپوپتوز جلوگیری می‌کنند و فاکتور رشد عصب تخمدان (Nerve growth factor یا NGF) را نیز کاهش می‌دهند (۱۲).

در سال‌های اخیر، عصاره‌ی جینسینگ قرمز کره‌ای (Korean red ginseng extract یا KRGE) به عنوان یک ترکیب گیاهی مهم مورد توجه قرار گرفته است (۱۳، ۲). از مزایای KRGE می‌توان به فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی و تضعیف بیان NGF اشاره کرد (۱۴)، اما استفاده از جینسینگ محدودیت‌هایی نیز دارد. جینسینگ حاوی چندین ماده‌ی فعال شامل جین‌سنوزیدها، پلی‌ساکاریدها، فلاونوئیدها، روغن‌های فرار، اسید آمینه و ویتامین‌ها است. جین‌سنوزیدها مسؤول چهار عمل اصلی جینسینگ یعنی تسریع خون‌رسانی، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و اثر ضد سرطانی می‌باشند. حلالیت کم این ماده در هنگام مصرف خوراکی، کاربردهای بالینی و اثربخشی جینسینگ را کاهش می‌دهد (۱۵). به منظور حل این مشکل، حامل‌های تحویل دارویی مانند لیپوزوم‌ها، نانوذرات و کنژوگه کردن پلیمر- دارو پیشنهاد می‌شود تا کارایی آن را افزایش دهند (۱۶).

یکی از پلیمرهای پیشنهادی برای حمل جینسینگ، پلی‌لاکتیک کولیکولیک اسید [Poly(lactic-co-glycolic acid) یا PLGA] است که دارای تأییدیه‌ی Food and Drug Administration (FDA) می‌باشد (۱۷). PLGA در بدن به محصولات غیر سمی آب و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌شود (۱۸). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر عصاره‌ی جینسینگ و نانوذرات حاوی عصاره‌ی جینسینگ بر موش‌های

جدول ۱. غلظت‌های عصاره‌ی جینسینگ و نانوذرات حاوی عصاره‌ی

جینسینگ به منظور برای درمان Polycystic ovary syndrome

(PCOS) ناشی از تستوسترون

شماره‌ی گروه*	۱	۲	۳
عصاره‌ی جینسینگ	۵۰	۱۰۰	۲۰
(میکروگرم در میلی‌لیتر)			
نانوذرات حاوی PLGA	۳	۶	۱۰
عصاره‌ی جینسینگ			

* هر گروه شامل ۱۰ سر موش بود.

PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid)

جهت تعیین سطح MDA، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه به ۲ میلی‌لیتر معرف Thiobarbituric acid (TBA) حاوی ۰/۳۷۵ درصد TBA، ۱۵ درصد تری‌کلرواستیک اسید، ۰/۲۵ مول در لیتر Hydrochloric acid (HCL) اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده، سرد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در پایان، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

به منظور تعیین TAC، معرف Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) از اسید استیک گلاسیال، ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر استات (pH = ۳/۶) و ۱۰ میلی‌لیتر از 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) در ۴۰ میلی‌مول هیدروکلریک اسید و ۲۰ میلی‌مول کلرید فریک با نسبت حجمی ۱۰:۱:۱ تهیه شد. میزان جذب در ۵۹۳ نانومتر تعیین گردید و TAC نمونه‌ها در برابر منحنی و غلظت‌های استاندارد FRAP (سولفات آهن ۱۰۰۰ میکرومول) اندازه‌گیری شد.

نمونه‌ها با ۰/۱ درصد Nitroblue tetrazolium (NBT) محلول در Phosphate-buffered saline (PBS) (pH = ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۰/۶ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به نمونه‌ها اضافه و جذب در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. سطح O₂- با استفاده از منحنی استاندارد (۱۰-۱۰۰ نانومول در میلی‌لیتر Diformazan) محاسبه گردید.

فعالیت GST با استفاده از روش رنگ‌سنجی تعیین شد. در این روش، GST بر گلوکوتاتیون کاهش یافته و CDNB (1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene) اثر می‌گذارد و باعث تولید Glutathione-S-CDNB می‌شود. سپس جذب محصول در طول موج ۳۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌گردد.

به منظور ارزیابی بیان GR و NRF-2، RNA با استفاده از کیت جداسازی RNA (شرکت Norgen Biotek، کانادا) از بافت تخمدان موش استخراج شد. پس از ارزیابی کیفیت RNAهای استخراج شده با نانودراپ، DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA

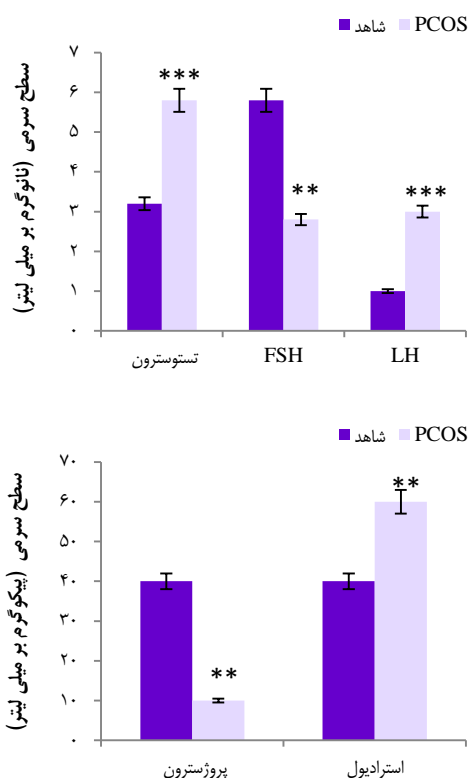
داخل دستگاه سوکسله (SOX406، شرکت Hanon، کره‌ی جنوبی) با ۵۰ درصد اتانول قرار گرفت. محلول نهایی برای استفاده نگهداری شد. نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ به روش تبخیر حلال امولسیون دوگانه‌ی آب در روغن در آب (W/O/W) تهیه شد. ابتدا ۵۰ میلی‌گرم PLGA (شرکت Sigma Aldrich، آمریکا) با نسبت ۵۰:۵۰ در ۱۲/۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان (Dichloromethane) یا DCM (شرکت Merck، آلمان) حل شد. سپس جینسینگ به محلول افزوده شد و مخلوط به مدت ۱ دقیقه در دستگاه فراصوت (Hielscher Ultrasonic، آلمان) به منظور آماده‌سازی امولسیون اولیه قرار گرفت. محلول به دست آمده در ۴ میلی‌لیتر پلی‌وینیل الکل (شرکت Sigma Aldrich، آمریکا) سرد تثبیت شد و مجدد به مدت ۴ دقیقه برای تولید امولسیون ثانویه در دستگاه فراصوت قرار گرفت. پس از تثبیت امولسیون آماده شده در محلول ۱۰ میلی‌لیتر پلی‌وینیل الکل، محلول ثانویه تحت تبخیر حلال آبی قرار گرفت که با هم زدن امولسیون به مدت ۲ ساعت در هود شیمیایی با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و سه بار شستشوی پلت‌ها با آب مقطر، نانوذرات تصفیه شده با استفاده از اپرون (Labconco Corporation, Kansas City، کره‌ی جنوبی) لیوفیلیزه شدند. نانوذرات حاوی عصاره‌ی جینسینگ در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای استفاده نگهداری شد.

جهت اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه‌ی نانوذرات حاوی جینسینگ، از زتاسایزر (Delsa™ Nano C, Beckman Coulter Inc، آمریکا) استفاده شد. اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات بر اساس پراکندگی نور دینامیک (Dynamic light scattering) یا DLS در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید.

چهار هفته پس از دریافت تستوسترون، موش‌های دارای PCOS گروه‌بندی شدند؛ گروه شاهد مثبت (درمان فقط با روغن کنجد به عنوان دارونما: ۱۰ سر) و شش گروه (۱۰ سر در هر گروه) که به صورت داخل صفاقی با غلظت‌های مختلف، جینسینگ و نانوذرات حاوی جینسینگ به مدت ۱۵ روز تحت درمان قرار گرفتند (جدول ۱). پس از دوره‌ی درمان، بافت‌های تخمدان برای انجام آزمایش‌های بیشتر با جراحی برداشته شد.

غلظت‌های عصاره‌ی جینسینگ و نانوذرات حاوی عصاره‌ی جینسینگ که برای درمان PCOS ناشی از تستوسترون مورد استفاده قرار گرفت، در جدول ۱ ارایه شده است.

برای تعیین سطح گلوکوتاتیون احیای بافت تخمدان، از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu، ژاپن) با طول موج ۴۱۲ نانومتر استفاده گردید. سپس سطح کل گلوکوتاتیون احیا با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و گزارش شد.



شکل ۱. مقایسه‌ی نتایج نمونه‌گیری خون بین گروه‌های شاهد منفی (موش‌های سالم) و شاهد مثبت [گروه Polycystic ovary syndrome (PCOS) با درمان دارونما؛ الف] سطح سرمی Follicle-stimulating hormone (FSH) و تستوسترون، ب) سطح سرمی پروژسترون و استرادیول

تجزیه و تحلیل RT-PCR نشان داد که میزان بیان NRF-2 و GR در بافت تخمدان گروه شاهد مثبت در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. اگرچه بیان هر دو ژن در موش‌های تحت درمان به میزان قابل توجهی افزایش داشت. همچنین، آنالیز RT-PCR نشان داد که درمان با نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ، منجر به بیان ۰/۴ برابر NRF-2 و GR در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شد که در مقایسه با غلظت‌های عصاره‌ی جینسینگ، بسیار کمتر است (شکل ۴).

بحث

PCOS نوعی اختلال شایع در زنان در سن باروری (۲۱، ۱۲) و از ویژگی‌های اصلی آن، هیپرآندروژنیسم می‌باشد که ممکن است ناشی از تستوسترون باشد (۲۲). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر جینسینگ به صورت عصاره و همراه با نانوذرات PLGA بر روی PCOS بود.

(شرکت پارس توس، ایران) سنتز گردید. برای برآورد اثرات دو ترکیب جینسینگ بر سطح بیان ژن‌های مذکور، ۲ میکرولیتر cDNA با ۱۰ ترکیب اصلی SYBER Green، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر آغازگر و معکوس و ۷ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز مخلوط شد تا مخلوط واکنش با حجم کل ۲۰ آماده گردد. سپس مخلوط تحت Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) قرار گرفت که فرایند با دستگاه چرخه‌ی نوری (Roche Diagnostics، آلمان) و کیت SYBR Premix Ex Taq (Amplicon، انگلستان) تکمیل گردید. چرخه‌ی حرارتی سه مرحله داشت. مرحله‌ی فعال‌سازی اولیه (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد)، ۴۰ چرخه‌ی دناتوراسیون (۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و مرحله‌ی بازپیختن/گسترش (۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد). با توجه به آستانه‌ی چرخه‌ی ژن خانه‌بان Abl (کنترل داخلی)، تغییر چند برابری سطوح بیان GR و NRF-2 بر اساس فرمول بیان نسبی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار سه آزمایش مستقل ارائه گردید. از آزمون ANOVA در سطح معنی‌داری ۰/۵ < P استفاده شد. همچنین، از آزمون‌های post hoc شامل آزمون Ryan, Einot, Gabriel, Welsh Studentized Range Q (REGWQ) استفاده گردید. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) و نرم‌افزار Graph Pad Prism 5 مورد تجزیه و تحلیل گرفت.

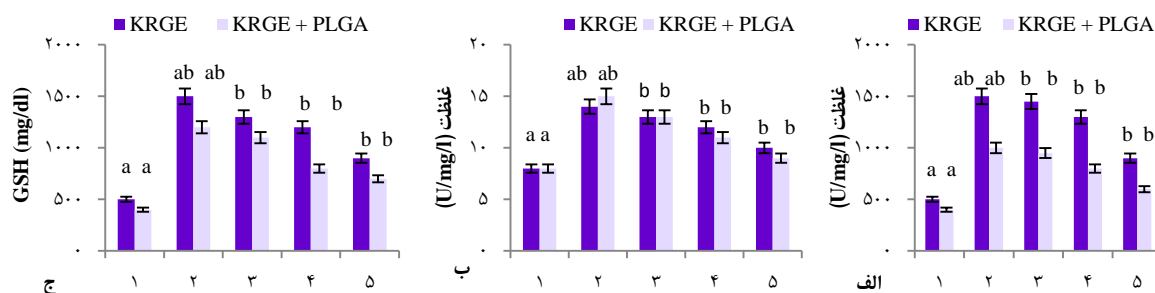
یافته‌ها

نتایج نمونه‌ی خون نشان داد که سطح سرمی LH، استرادیول و تستوسترون در موش‌های بیمار، به میزان قابل توجهی بالاتر و میزان پروژسترون و FSH در آن‌ها کمتر بود (شکل ۱).

با توجه به نتایج DLS و زتا، تشکیل نانوذرات PLGA حاوی جینسینگ تأیید شد.

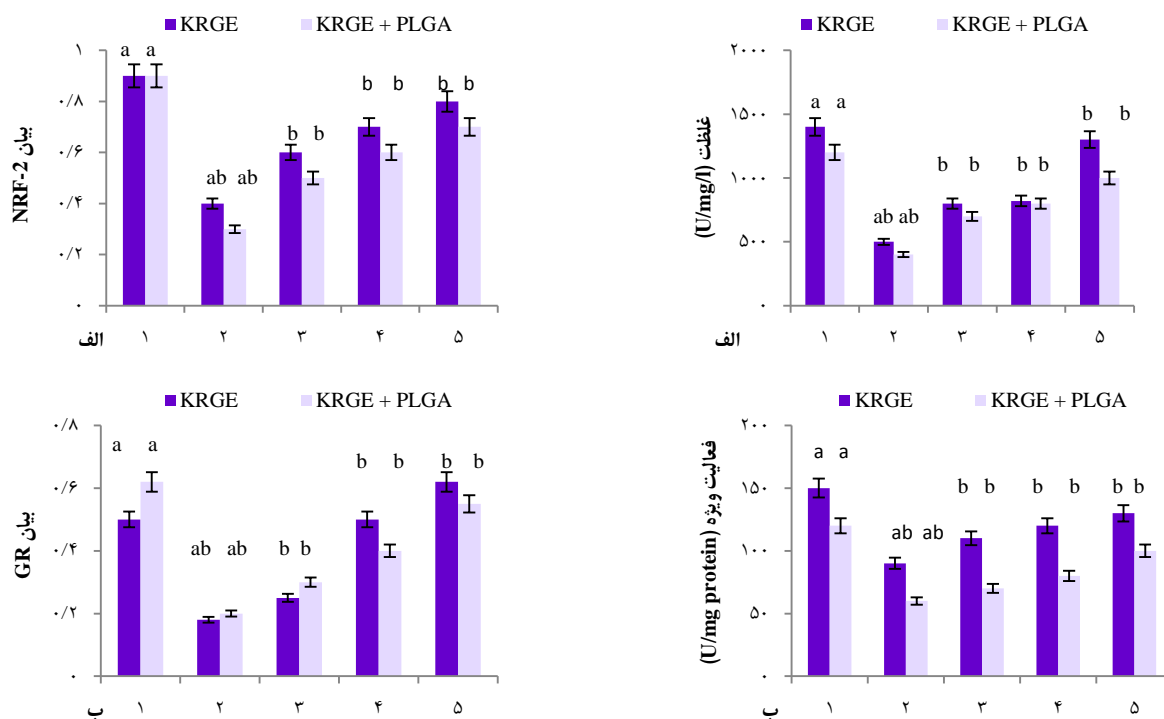
نتایج نشان داد که هر دو نوع جینسینگ آماده شده، منجر به کاهش سطح MDA، گلوتاتیون احیا و O_2^- در بافت تخمدان شد ($P < 0/050$). با این حال، نانوذرات PLGA حاوی جینسینگ، در غلظت‌های بسیار کمتر، نسبت به عصاره‌ی جینسینگ، در کاهش سطوح MDA، گلوتاتیون احیا و O_2^- بسیار موثرتر بودند ($P < 0/050$) (شکل ۲).

نتایج آزمایش‌ها نشان داد که نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ و عصاره‌ی جینسینگ، دارای پتانسیل بالایی برای افزایش قابل توجه سطح TAC و GST در موش‌های بیمار بودند ($P < 0/001$). مقایسه‌ی بین دو ترکیب آماده شده نشان داد که نانوذرات دارای قدرت بالاتری نسبت به عصاره‌ی جینسینگ هستند (شکل ۳).



شکل ۲. اثر نانوذرات (PLGA) Poly(lactic-co-glycolic acid) حاوی عصاره‌ی جینسینگ و عصاره‌ی جینسینگ در سطوح الف) Malondialdehyde (MDA)، ب) O₂⁻ و ج) گلوکوتاتیون احیا (GHS) در غلظت‌های مختلف

۱ و ۲ به ترتیب گروه‌های شاهد منفی و مثبت هستند. برای درمان با عصاره جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند. برای درمان نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۳، ۶ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند.
KRGE: Korean red ginseng extract



شکل ۴. اثر نانوذرات (PLGA) Poly(lactic-co-glycolic acid) حاوی عصاره‌ی جینسینگ و عصاره‌ی جینسینگ بر بیان الف) NRF-2 Nuclear factor erythroid 2 و ب) Glutathione reductase (GR) در غلظت‌های مختلف

۱ و ۲ به ترتیب گروه‌های شاهد منفی و مثبت هستند. برای درمان با عصاره جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند. برای درمان نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۳، ۶ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند.
KRGE: Korean red ginseng extract

شکل ۳. اثر نانوذرات (PLGA) Poly(lactic-co-glycolic acid) حاوی عصاره‌ی جینسینگ و عصاره‌ی جینسینگ در سطوح الف) Total Antioxidant capacity (TAC) و فعالیت ب) Glutathione S-transferase (GST) در غلظت‌های مختلف

۱ و ۲ به ترتیب گروه‌های شاهد منفی و مثبت هستند. برای درمان با عصاره جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند. برای درمان نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ، ۳، ۴ و ۵ گروه بیمار ناشی از القای تستوسترون بودند که به ترتیب با دزهای ۳، ۶ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ درمان شدند.
KRGE: Korean red ginseng extract

آنتی‌اکسیدانی و مسؤول حفظ میزان احیای گلوکوتایون است (۳۰) که در PCOS کاهش می‌یابد (۳۱). نتایج مطالعه‌ی Choi و همکاران نشان داد که جینسینگ به طور قابل توجهی منجر به افزایش NRF-2 در بیماران مبتلا به PCOS شده است (۱۳) که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر تأثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی جینسینگ و نانوذرات حاوی عصاره‌ی جینسینگ را در موش‌های مبتلا به PCOS ناشی از تستوسترون بررسی کرد. هر دو ترکیب به طور قابل توجهی افزایش MDA و عامل اکسیداتیو را مهار نمود و باعث افزایش سطح سرمی TAC و GST در گروه بیمار شد. آنالیز RT-PCR، افزایش سطح بیان NRF-2 و GR را در گروه مبتلا به PCOS تحت درمان نیز نشان داد. مقایسه‌ی آماری بین دو درمان حاکی از عملکرد مؤثرتر نانوذرات PLGA حاوی عصاره‌ی جینسینگ بر درمان PCOS می‌باشد. برای تأیید این فرضیه، بهتر است مطالعات بیشتری انجام شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش علوم جانوری با شماره‌ی ۱۱۱۴۸۰۹۳۳۸۹۹۲۶۲۱۸۸۷۳۶، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد می‌باشد که تحت حمایت مالی نویسنده‌ی اول به انجام رسید. بدین وسیله از زحمات استادان محترم تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوارض PCOS در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۲۳-۲۴). MDA و O_2^- در زنان مبتلا به PCOS بیشتر و TAC و گلوکوتایون احیا در آن گروه در مقایسه با گروه شاهد کمتر می‌باشد (۲۵-۲۶). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز روند مشابهی را برای MDA، O_2^- و TAC در موش‌های PCOS با درمان دارونما گزارش کرد، اما بر خلاف یافته‌های تحقیقات پیشین، گلوکوتایون احیا در موش‌های شاهد مثبت افزایش یافت که می‌توان این افزایش را یک اثر مهارتی برای جلوگیری و سرکوب شاخص‌های اکسیدان در نظر گرفت (در مراحل اولیه‌ی بیماری). درمان با دو ترکیب جینسینگ، روند معکوس یعنی کاهش گلوکوتایون احیا، MDA و O_2^- و افزایش TAC را در موش‌های مبتلا به PCOS نشان می‌دهد. GST یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که در فرایند سم‌زدایی کنتروگه، شکل احیا شده‌ی گلوکوتایون را به ترکیبات زنبوبیوتیک کاتالیز می‌کند (۲۷). نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که درمان با دو ترکیب بیان شده، فعالیت GST بافت تخمدان را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد.

NRF-2 در فعالیت‌هایی مانند اتوفاژی، عملکردهای برنامه‌ای تحریک اکسیدان، ایجاد سیگنال‌های التهابی، استرس Endoplasmic reticulum/Unfolded protein response (ER/UPR)، بیورژن میتوکندریایی و تنظیم سلول‌های بنیادی مشارکت می‌کند (۲۸). طبق گزارش‌ها، مسیر NRF-2/HO-1 نقش مهمی در رویدادهای پاتولوژیک PCOS دارد که در آن، NRF-2/HO-1 به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۹). GR نیز یک آنزیم

References

- Behboodi Moghadam Z, Fereidooni B, Saffari M, Montazeri A. Polycystic ovary syndrome and its impact on Iranian women's quality of life: A population-based study. *BMC Womens Health* 2018; 18(1): 164.
- Moradi N, Bidgoli SA, Chaichian S. Ovarian cysts disappear after 14-day oral regimen of Korean red ginseng extract in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome. *Obstet Gynecol Sci* 2021; 64(3): 274-83.
- Bani MM, Majdi SA. Polycystic ovary syndrome (PCOS), diagnostic criteria, and AMH. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(1): 17-21.
- Landis SC, Amara SG, Asadullah K, Austin CP, Blumenstein R, Bradley EW, et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature* 2012; 490(7419): 187-91.
- Paris VR, Bertoldo MJ. The mechanism of androgen actions in PCOS etiology. *Med Sci (Basel)* 2019; 7(9): 89.
- Azziz R. Androgen excess is the key element in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 80(2): 252-4.
- Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK. Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *PLoS One* 2014; 9(4): e93805.
- Palomba S, Falbo A, Chiossi G, Muscogiuri G, Fornaciari E, Orio F, et al. Lipid profile in nonobese pregnant women with polycystic ovary syndrome: A prospective controlled clinical study. *Steroids* 2014; 88: 36-43.
- Faure M, Bertoldo MJ, Khoueiry R, Bongrani A, Brion F, Giulivi C, et al. Metformin in reproductive biology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 675.
- Kar S, Sanchita S. Clomiphene citrate, metformin or a combination of both as the first line ovulation induction drug for Asian Indian women with polycystic ovarian syndrome: A randomized controlled trial. *J Hum Reprod Sci* 2015; 8(4): 197-201.
- Arentz S, Smith CA, Abbott J, Bensoussan A. Nutritional supplements and herbal medicines for women with polycystic ovary syndrome; a systematic review and meta-analysis. *BMC Complement Altern*

- Med 2017; 17(1): 500.
12. Kwon CY, Cho IH, Park KS. Therapeutic effects and mechanisms of herbal medicines for treating polycystic ovary syndrome: A review. *Front Pharmacol* 2020; 11: 1192.
 13. Choi JH, Jang M, Kim EJ, Lee MJ, Park KS, Kim SH, et al. Korean Red Ginseng alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats via its antiinflammatory and antioxidant activities. *J Ginseng Res* 2020; 44(6): 790-8.
 14. Jung JH, Park HT, Kim T, Jeong MJ, Lim SC, Nah SY, et al. Therapeutic effect of Korean red ginseng extract on infertility caused by polycystic ovaries. *J Ginseng Res* 2011; 35(2): 250-5.
 15. Chen S, Wang Z, Huang Y, O'Barr SA, Wong RA, Yeung S, et al. Ginseng and anticancer drug combination to improve cancer chemotherapy: A critical review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 168940.
 16. Ganesan P, Ko HM, Kim IS, Choi DK. Recent trends of nano bioactive compounds from ginseng for its possible preventive role in chronic disease models. *RSC Adv* 2015; 5(119): 98634-42.
 17. Pandey A, Jain DS. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) copolymer and its pharmaceutical application. In: Thakur VK, Thakur MK, editors. *Handbook of polymers for pharmaceutical technologies*. Hoboken, NJ: Wiley; 2015. p. 151-72.
 18. Rezvantalab S, Drude NI, Moraveji MK, Guvener N, Koons EK, Shi Y, et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1260.
 19. Sadoghi SD, Rahbariyan R. Investigation the effect of glycyrrhizic acid on ovarian follicle in polycystic ovarian syndrome mice model. *J Ilam Univ Med Sci* 2017; 24(6): 138-48. [In Persian].
 20. Malini NA, Roy GK. Evaluation of different ranges of LH:FSH ratios in polycystic ovarian syndrome (PCOS) - Clinical based case control study. *Gen Comp Endocrinol* 2018; 260: 51-7.
 21. Arentz S, Abbott JA, Smith CA, Bensoussan A. Herbal medicine for the management of polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated oligo/amenorrhoea and hyperandrogenism; a review of the laboratory evidence for effects with corroborative clinical findings. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 511.
 22. Ashraf S, Nabi M, Rasool SuA, Rashid F, Amin S. Hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome and role of CYP gene variants: A review. *Egypt J Med Hum Genet* 2019; 20(1): 25.
 23. Deepika ML, Nalini S, Maruthi G, Ramchander V, Ranjith K, Latha KP, et al. Analysis of oxidative stress status through MN test and serum MDA levels in PCOS women. *Pak J Biol Sci* 2014; 17(4): 574-7.
 24. Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Galova Z, Badia R, Martinez P. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(2): 217-22.
 25. Sak S, Uyanikoglu H, Incebiyik A, Incebiyik H, Hilali NG, Sabuncu T, et al. Associations of serum fetuin-A and oxidative stress parameters with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Reprod Med* 2018; 45(3): 116-21.
 26. Sulaiman MA, Al-Farsi YM, Al-Khaduri MM, Saleh J, Waly MI. Polycystic ovarian syndrome is linked to increased oxidative stress in Omani women. *Int J Womens Health* 2018; 10: 763-71.
 27. Diba M, Seghatoleslam A, Namavari M, Assadi S, Vakili SN, Babaei Z, et al. Potential protective role of cyrtopodion scabrum in antioxidant parameters in serum and liver of rats with 5-FU-induced oxidative damage. *Arch Razi Inst* 2021; 76(1): 95-105.
 28. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 2018; 29(17): 1727-45.
 29. Kabel AM, Abd Elmaaboud MA, Albarraq AA. Ameliorative potential of omega 3 fatty acids and HMG-CoA reductase inhibitors on experimentally-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015; 96: 1-9.
 30. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015; 6: 183-97.
 31. Kabel AM, Ashour AM, Omar MS, Estfanous RS. Effect of fish oil and telmisartan on dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats: The role of oxidative stress, transforming growth factor beta-1, and nuclear factor kappa B. *Food Sci Nutr* 2020; 8(9): 5149-59.

A Comparison between Antioxidant Effects of Korean Red Ginseng Extract (KRGE)-Loaded Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles and Korean Red Ginseng Extract (KRGE) in the Treatment of Testosterone-Induced Polycystic Ovarian Syndrome

Mandana Emamdoost¹, Saeedeh Zafar-Balanejad², Khadige Shahrokhbabadi³, Masoud Homayouni⁴

Original Article

Abstract

Background: This study aimed to evaluate and compare the effects of Korean red ginseng extract (KRGE) and KRGE-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (KRGE-loaded PLGA NPs) on testosterone-induced polycystic ovarian syndrome (PCOS) mice.

Methods: Female Naval Medical Research Institute (NMRI) post-pubertal mice were divided into control (n = 10), sham (n = 10), and PCOS (n = 60) groups. PCOS was induced in sham and PCOS groups by subcutaneous injection of testosterone enanthate 1 mg/100mg/day in the back of the mice neck for 4 weeks; then, the PCOS group was intraperitoneally treated with different concentrations of KRGE and KRGE-loaded PLGA NPs for the consecutive 15 days. The ovarian tissues were surgically removed for determinations of malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species, glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), glutathione S-transferase (GST), and qualitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis to detect glutathione reductase (GR) and nuclear factor erythroid 2 (NRF-2) genes.

Findings: Both KRGE and KRGE-loaded PLGA NPs were beneficial to decrease MDA, and oxidative agents as well as increase the level of GSH, TAC, and GST in PCOS mice. According to qRT-PCR analysis, the expressions of NRF-2 and GR genes were elevated in the treated mice. However, statistical analysis revealed that KRGE-loaded PLGA NPs were more effective than KRGE.

Conclusion: Our results are consistent with the beneficial effect of KRGE on the treatment of PCOS. Nonetheless, KRGE coated with PLGA NPs were suggested more effective according to our findings.

Keywords: Korean red ginseng; Polycystic ovarian syndrome; Nanoparticles

Citation: Emamdoost M, Zafar-Balanejad S, Shahrokhbabadi K, Homayouni M. A Comparison between Antioxidant Effects of Korean Red Ginseng Extract (KRGE)-Loaded PLGA Nanoparticles and KRGE in the Treatment of Testosterone-Induced PCOS. J Isfahan Med Sch 2022; 39(650): 875-82.

1- PhD Student, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Saeedeh Zafar-Balanejad, Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; Email: mojgan_zafar@yahoo.com