دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۵، صفحه ۴۴۱ - ۴۳۱ (آذر و دی ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(5): 431-441

تأثیر نانوکیتوزان بارگذاری شده با دونپزیل بر فراموشی القاء شده با اتانول در موش سوری

محمود حیدری (PhD)[1*]، نسرین‌سادات اعظمی (PhD)[1**]، مهدی عبادی (PhD)[2]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران
[2] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۲/۱۲- پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۱۲)

چکیده

زمینه: تخریب پیش رونده سیستم عصبی و اختلال حافظه و یادگیری از ویژگی‌های بیماری آلزایمر می‌باشد. یکی از جنبه‌های مطالعاتی در درمان بیماری‌ها، بهبود فرایند دارورسانی است. در این مطالعه از نانو ذرات کیتوسان جهت انتقال داروی دونپزیل و تأثیر آن بر بهبود فراموشی ناشی از اتانول استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، ۱۳۶ موش سوری نژاد NMRI به وزن تقریبی ۴۰-۳۰ گرم استفاده شد. تمامی تزریق‌ها به‌صورت درون صفاقی صورت گرفت. در آزمایش اول دوز مناسب اتانول جهت القاء فراموشی، آزمایش دوم جهت اثبات عدم تخریب حافظه توسط نانوکیتوسان حاوی دونپزیل و آزمایش سوم، تأثیر نانوکیتوسان حاوی دوزهای مختلف دونپزیل بر فراموشی ناشی از اتانول انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار ثبت گردید. نرم‌افزار گراف پد پریسم، آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey جهت تجزیه و تحلیل استفاده شد. $p< ۰/۰۵$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: آزمایش اول نشان داد که دوزهای (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم) اتانول به‌طور معنی‌داری سبب ایجاد فراموشی می‌شوند. آزمایش دوم نشان داد که نانوکیتوسان حاوی دونپزیل باعث تخریب حافظه نمی‌شوند. آزمایش سوم نشان داد که برخلاف گروه‌های سالین و نانو ذرات کیتوسان، همه گروه‌های نانوکیتوسانی حاوی دوزهای مختلف دونپزیل به‌طور معنی‌داری فراموشی ناشی از اتانول را بهبود می‌بخشند.

نتیجه‌گیری: نانو ذرات کیتوسان استفاده شده در این مطالعه می‌تواند به‌طور مؤثری در انتقال دارو استفاده شود. لیکن تحقیقات بیشتر جهت کاربرد این ترکیب در انتقال خوراکی داروها مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: اتانول، دونپزیل، فراموشی، کیتوسان، نانو ذرات

** گرگان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

Email: Azaminasrin@gmail.com
***ORCID: 0000-0002-9103-2491**
****ORCID: 0000-0002-4549-7220**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم سیستم عصبی که طی آن نورون‌ها شروع به تخریب می‌کنند بیماری آلزایمر است که با اختلال در سیستم شناختی و حافظه مشخص می‌شود (۱ و ۲). به‌طور دقیق‌تر، اختلال در عملکرد سیستم کولینرژیک، وجود استرس اکسیداتیو، مرگ تدریجی سلول‌های عصبی و آتروفی مغز از برجسته‌ترین علایم این بیماری است (۳). یکی از علت‌های اصلی زوال عقل یا دمانس آلزایمر می‌باشد و اینگونه تخمین زده شده است که بیش از ۲۴ میلیون نفر در جهان مبتلا به زوال عقل هستند و سالانه بیش از ۴ میلیون نفر به آن اضافه می‌شوند به نحوی که تعداد کل آن هر بیست سال دو برابر می‌شود. کشور چین، اتحادیه اروپا، ایالات متحده آمریکا سپس هند به ترتیب بیشترین مبتلایان را شامل می‌شوند (۴). دو عامل اصلی که در بروز علایم بیماری آلزایمر مطرح گردیده‌اند عبارتند از تشکیل پلاک‌های بتا آمیلوئید[1] و کلاف‌های نانوفیبریلاری[2] (۵).

یکی از داروهایی که برای بیماران آلزایمری تجویز می‌شود داروی دونپزیل با نام تجاری آریسپت است (۶ و ۷) که در سال ۱۹۹۶ میلادی در آمریکا مورد تأیید قرار گرفته است مهار کننده آنزیم استیل کولین استراز بوده و از طریق افزایش غلظت استیل کولین در فضای سیناپسی، محافظت در مقابل پلاک‌های بتا آمیلوئید، ایسکمی و سمیت گلوتامات، برهمکنش بین نورون‌های سیستم کولینرژیک درگیر در حافظه را بهبود می‌بخشند (۷).

روش‌های مختلفی جهت انتقال داروهای بیماران آلزایمری مطرح شده‌اند از جمله روش سنتی خوراکی، قرص‌های پوشش‌دار خوراکی، برچسب‌های پوستی[3]، روش بینی و روش‌های مبتنی بر نانوتکنولوژی (۸). با این حال، تحویل هدفمند و موضعی دارو بر پایه دانش نانوتکنولوژی در بیماری آلزایمر حائز اهمیت است به این دلیل که تأثیرات جانبی ناخواسته ناشی از رسیدن دارو به بافت‌های سالم را محدود می‌کند (۸). مواد بکار رفته در روش نانوتکنولوژی دارای مزایایی از قبیل اندازه و سطح قابل تنظیم و همچنین میزان سوسپانسیون بالا هستند که اتصال ترکیبات به لیگاندهای مورد نظر جهت افزایش اتصال به سد خونی مغزی را تسهیل می‌کنند و لذا محدودیت‌های ناشی از این سد را کم می‌کنند (۹). یکی از ترکیبات پرکاربرد در حوزه نانوتکنولوژی کیتوسان می‌باشد؛ ترکیبی که از استیل‌زدایی پلیمر کیتین طبیعی در سال ۱۸۵۹ به‌دست آمد و ابتدای دهه ۱۹۹۰ میلادی در حوزه داروسازی وارد شد (۱۰). نانوکامپوزیت‌های کیتوسان در حقیقت پلیمرهایی با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که می‌توانند هر دو ویژگی پلیمری بودن و نانوذره بودن را داشته باشند علاوه بر این، بدلیل پایداری، سمی نبودن، تجزیه‌پذیری و سازگاری خود می‌توانند کاربردهای زیستی زیادی از جمله دارورسانی داشته باشند (۱۱ و ۱۲). مطالعات مختلفی از کیتوسان جهت انتقال داروها استفاده کرده‌اند (۱۱ و ۱۵-۱۳). استفاده از نانوفیلم و نانورشته‌های کیتوسان جهت رهایش مؤثرتر داروی دونپزیل به بافت خون رت نشان داده است که کیتوسان خصوصاً در فرم نانو رشته می‌تواند به طور مؤثرتری داروی دونپزیل را در بدن رهاسازی کند (۱۳). تا آنجا که بررسی‌های ما نشان داد تاکنون از نانو ذرات کیتوسان جهت انتقال داروی دونپزیل در مدل بیماری آلزایمر استفاده نشده

[1] Beta Amyloid Plaques
[2] Neurofibrilary tangles
[3] Transdermal patch

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

است. در مطالعه حاضر، نانوذرات کیتوسان با اندازه یکسان تهیه و داروی دونپزیل در آن بارگذاری گردیده است. سپس تأثیر این نانو حامل با رهاسازی داروی بارگذاری شده بر فراموشی ایجاد شده توسط اتانول در موش سوری مورد ارزیابی قرار گرفته است. لذا هدف اصلی این مطالعه تأثیر نانو ذرات کیتوسان با اندازه مساوی حاوی داروی دونپزیل بر فراموشی ناشی از اتانول بوده است و مقرر است به این پرسش پاسخ داده شود که آیا این نانو ذرات کیتوسان قادرند در محیط in vivo داروی دونپزیل را رها کرده و تأثیری بر فراموشی ناشی از اتانول داشته باشند یا خیر؟

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی که با کد اخلاق IR.IAU.AK.REC .۱۳۹۹ .۰۰۱ مورد تصویب قرار گرفت از موش‌های نر سوری نژاد NMRI به وزن تقریبی ۴۰-۳۰ گرم خریداری شده از انستیوپاستور آمل و با رعایت اصول و موازین اخلاقی کار با حیوانات استفاده شد. پس از انتقال حیوان‌ها به حیوانخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد و آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار داشت. دمای حیوانخانه به‌صورت ۳±۲۲ درجه و چرخه روشنایی به‌صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تنظیم شد. به موش‌ها اجازه داده شد تا به مدت دو هفته با شرایط محیط سازگار شوند. سپس موش‌های سالم به‌طور تصادفی به ۱۷ گروه (در هرگروه ۸ سر موش) تقسیم شدند. همه آزمایش‌ها در یک ساعت مشخص از روز انجام گرفت.

دستگاه تست حافظه اجتنابی غیرفعال (شاتل باکس)

این دستگاه دارای دو محفظه، هر یک با طول و عرض ۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. یکی از این دو محفظه، روشن (ناحیه امن) است که دیواره‌های سفید رنگ دارد و دیگری محفظه تاریک (ناحیه ناامن) می‌باشد که دیواره‌های آن سیاه رنگ است. یک درب گیوتینی بین محفظه‌های روشن و تاریک قرار دارد. میله‌های شوک دهنده از جنس استیل ضدزنگ کف محفظه تاریک را پوشانده‌اند و توسط سیم‌هایی به دستگاه استیمولاتور وصل شده‌اند به‌طوری که جریان الکتریکی با شدت یک میلی‌آمپر و با فرکانس ۵۰ هرتز را به مدت ۳ ثانیه از طریق میله‌های شوک دهنده به بدن حیوان انتقال می‌دهد.

داروها

در این مطالعه از داروی دونپزیل هیدروکلراید (کد محصول ۱۳۱۳۷۷، سیگما) حل شده در نرمال سالین ۰/۹ درصد استفاده شد. در همه گروه‌ها تزریق بصورت درون صفاقی انجام گرفت. همچنین تزریق دارو در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش و در روز تست ۳۰ دقیقه قبل از تست انجام شد.

تهیه کیتوسان و پوشش کردن دونپزیل

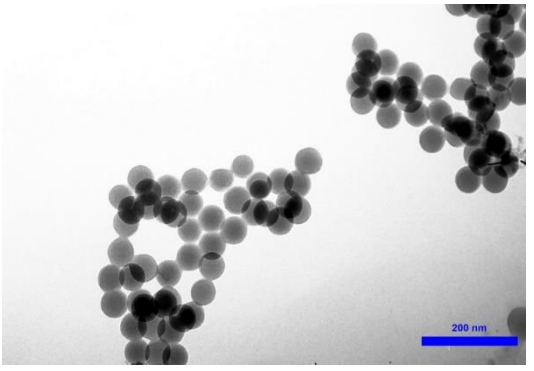
پوست خشک میگوی خلیج فارس (بوشهر) آسیاب شده و مواد معدنی و فلزی آن با استفاده از اسید کلریدریک ۶ درصد جدا گردید. سپس پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در آن به‌ترتیب با استفاده از سود ۵ درصد و اتانول جدا شد تا کیتین حاصل آید. با استیل زدایی از کیتین ماده کیتوسان به‌دست آمد. جهت تهیه کیتوسان با وزن مولکولی پایین (۸۰ کیلو دالتون) از

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

روش الکتروشیمی نوین با پیل H شکل دارای غشاء با روزنه‌های مناسب بهره گرفته شد.

پس از اطمینان از یکنواختی و همسانی در شکل و اندازه نانو ذرات کیتوسان (۵۰ نانومتر) با کمک میکروسکوپ الکترونی گذاره[4] (شکل ۱)، نانوکپسوله کردن دونپزیل در هیدروژل کیتوسانی با استفاده از روش انعقاد یونی که توسط محققین ارائه شده بود، تهیه گردید (۱۶). به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کیتوسانی که در محلول ۱ درصد اسید استیک (با غلظت ۰/۲۴ گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شده است در بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. پس از هم خوردن و یکنواخت شدن محلول کیتوسان، به آن مقادیر مختلف محلول دونپزیل تهیه شده با غلظت اولیه ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به آرامی اضافه شد تا غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم) به‌دست آمدند. محلول فوق به مدت ۳۰-۲۵ دقیقه برروی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس با استفاده از بورت، محلول سدیم تری‌پلی فسفات (۰/۱۳۳ گرم بر میلی‌لیتر) به آرامی و قطره قطره به محلول در حال هم‌خوردن کیتوسان- دونپزیل اضافه شد. محلول به مدت ۱ روز با سرعت ۷۵۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. نانوکپسول‌های انتهای لوله آزمایش را برای بررسی‌های تزریقی و فیزیکو شیمیایی مانند FTIR، HPLC، UV-Vis جداکرده و محلول فوقانی برای اندازه‌گیری کمی میزان داروی باقی مانده جداسازی شد.



شکل ۱) تصویری از نانوذرات کیتوسان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره. اندازه هر ذره در حدود ۵۰ نانومتر و یکنواختی اندازه ذرات قابل مشاهده می باشد.

روش بررسی حافظه اجتنابی غیرفعال

رفتار اجتنابی غیرفعال طی دو روز متوالی صورت گرفت (۱۷). در روز اول آموزش صورت گرفت که خود دارای دو مرحله بود:

عادت: همه موش‌ها حداقل ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در محیط آزمایش قرار داده می‌شوند. معیار ورود به مطالعه به این‌صورت بود که هر موش به آرامی در محفظه روشن قرار داده می‌شود و بعد از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز می‌شود و به حیوان اجازه داده می‌شود که وارد محفظه تاریک شود. زمان تأخیر اولیه یعنی زمانی که طول می‌کشد تا حیوان از محفظه روشن وارد محفظه تاریک شود یادداشت می‌شود. میزان تأخیر کمتر از ۱۰۰ ثانیه نشانه سلامت رفتاری است (موش سالم ذاتاً فضای تاریک را به فضای روشن ترجیح می‌دهد). پس از گذشت ۱۰ ثانیه حیوان به قفس خود بازگردانده می‌شود. حیواناتی که زمان تأخیر ورودی بیش از ۱۰۰ ثانیه داشته باشند از آزمایش حذف می‌شوند.

دریافت حافظه: ۳۰ دقیقه بعد موش مجدداً در محفظه روشن قرار می‌گیرد و بعد از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز

[4] Transmission Electron Microscopy

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

می‌شود و به محض اینکه حیوان وارد محفظه تاریک شد، درب گیوتینی بسته شده و به حیوان شوک داده می‌شود (۵۰ هرتز، ۱ میلی‌آمپر، ۳ ثانیه) و بعد از ۱۰ ثانیه به قفس بازگردانده می‌شود. جهت اطمینان از ایجاد آموزش، دو دقیقه بعد مجدداً حیوان در محفظه روشن قرار داده می‌شود و دو دقیقه به آن فرصت داده می‌شود. در صورتی که آموزش ایجاد شده باشد حیوان وارد محفظه تاریک نخواهد شد (زمان تأخیر به عنوان میزان حافظه ثبت می‌گردد) و لذا آموزش خاتمه یافته است. در غیر این‌صورت، به محض ورود به محفظه تاریک، مجدداً دریافت شوک و تست آموزش تکرار می‌شود.

تست بازیابی حافظه: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، تست بازیابی انجام می‌شود تا حافظه بلند مدت حیوان بررسی شود. در این مرحله حیوان در محفظه روشن قرار می‌گیرد و بعد از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی باز می‌شود و زمانی که طول می‌کشد تا حیوان وارد محفظه تاریک شود یادداشت می‌شود. در صورتی که حیوان حافظه داشته باشد، وارد محفظه تاریک نمی‌شود. زمان خاتمه آزمایش ۵ دقیقه بعد از قرارگیری در محفظه روشن می‌باشد.

طراحی گروه‌های آزمایشی

آزمایش اول: ۵ گروه (هر گروه شامل ۸ سر موش) جهت بدست آوردن Dose response استفاده شد جهت اطلاع از این که کدام دوز از اتانول می‌تواند فراموشی را القاء نماید.

گروه اول: در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش سالین دریافت کردند و در روز تست، ۳۰ دقیقه قبل از تست، تزریق سالین انجام شد و سپس تست حافظه توسط دستگاه شاتل باکس انجام شد.

گروه‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم: در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش تزریق دوزهای مختلف اتانول (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵و ۱) میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی تزریق شد و در روز تست، تست حافظه انجام گرفت.

آزمایش دوم: ۵ گروه (هر گروه شامل ۸ سر موش) دوزهای مختلف داروی دونپزیل پوشش شده را دریافت کردند.

گروه اول: در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش سالین و در روز تست، سالین حاوی کیتوسان هم حجم با میزان سایر گروه‌ها تزریق و سپس تست حافظه انجام گرفت.

گروه دوم، سوم، چهارم و پنجم: در روز آموزش سالین و در روز تست دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱) میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن تزریق و سپس تست حافظه انجام گرفت.

آزمایش سوم: در این آزمایش، در روز آموزش دوز ۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن اتانول که باعث تخریب حافظه شده بود تزریق و در روز تست دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده تزریق شدند سپس تست حافظه انجام شد.

گروه اول: در روز آموزش تزریق دوز تخریب کننده اتانول و در روز تست سالین حاوی کیتوسان تزریق و تست حافظه گرفته شد.

گروه دوم، سوم، چهارم و پنجم: در روز آموزش تزریق دوز تخریب کننده اتانول و در روز تست دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱) میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن تزریق و سپس تست حافظه انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در تمام آزمایش‌های توضیح داده شده میزان تأخیر در ورود به خانه تاریک در روز تست ملاک حافظه محسوب شد که به‌صورت میانگین و انحراف معیار ثبت شدند اطلاعات جمع‌آوری شده شامل گروه‌های تحت

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

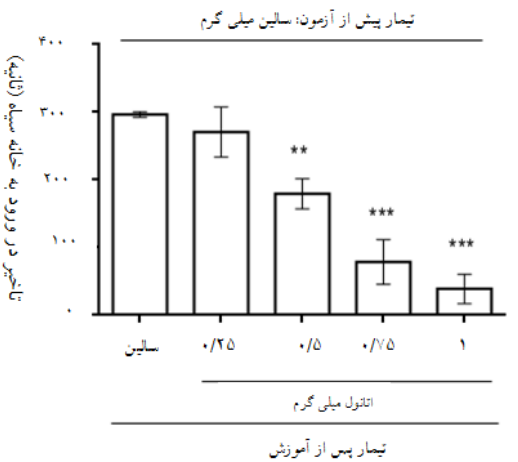
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری گراف پد پریسم ویرایش۸/۳ و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

آزمایش اول Dose response اتانول

نمودار ۱ بر اساس مقدار p در فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد که تزریق دوزهای (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم) اتانول در روز آموزش در مقایسه با حیواناتی که سالین دریافت نمودند به‌طور معنی‌داری سبب تخریب حافظه و ایجاد فراموشی شد. به‌صورتی که تخریب دوزهای ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در $p< ۰/۰۰۱$ و دوز ۰/۵ میلی‌گرم در $p< ۰/۰۱$ معنی‌دار شده است.

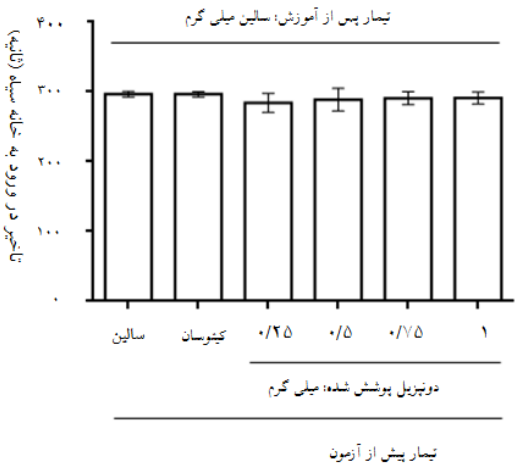


نمودار ۱) اثرات تزریق پس از آموزش اتانول یا سالین بر تأخیر ورود به محل شوک. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. دوزهای ۱، ۰/۷۵ و ۰/۵ میلی‌گرم باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه سالین/ سالین شدند. در حالی که دوز ۰/۲۵ تفاوت معنی‌داری را با گروه سالین/سالین نشان نداد.
$^{***}p < ۰/۰۰۱$ و $^{**}p< ۰/۰۱$

FiG 1): The effect of post-training administration of ethanol on step through latency. Data are expressed as Mean± SD. Doses 0.5, 0.75 and 1 mg/kg significantly impaired memory compared to saline while dose 0.25 mg/kg has no significant effect on memory function (** p<0.01, *** p< 0.001).

آزمایش دوم Dose response دونپزیل پوشش شده

نتایج آزمایش دوم (نمودار ۲) بر اساس مقدار p در فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان داد که تزریق مقادیر مختلف داروی دونپزیل پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان (۰/۲۵ ،۰/۵ ،۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم) قبل از آزمون به حیواناتی که در روز آموزش سالین دریافت کرده بودند، هیچ تغییر معنی‌داری در رابطه با زمان تأخیر ورود به محل شوک (Step – Through Latency) یا به اصطلاح میزان حافظه ۲۴ ساعت بعد، در مقایسه با گروه کنترل (سالین _ سالین) مشاهده نگردید. همان‌طور که انتظار می‌رفت دونپزیل پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان باعث تخریب حافظه نمی‌شود.



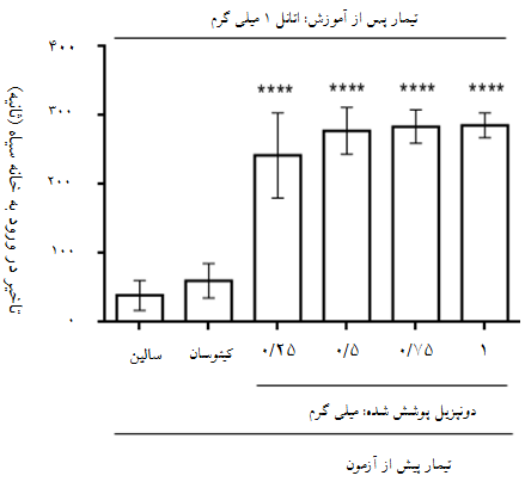
نمودار ۲) تأثیر دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده با نانوذرات کیتوسان و نانوذرات کیتوسان به تنهایی بر حافظه تخریب نشده. در روز آموزش، سالین و در روز تست، دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده و نانو ذرات کیتوسان به تنهایی تزریق شدند. هیچ کدام از گروه‌ها باعث تخریب حافظه نشدند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

FiG 2) The effect of different doses of encapsulated Donepezil and Donepezil alone on full memory. Saline was administered after training while different doses of encapsulated Donepezil and Donepezil alone were administered before test. No significant effect (memory impairment) was observed on memory function. Data are expressed as Mean± SD. p<0.05 was considered as significant level.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

نتایج این آزمایش (نمودار ۳) بر اساس مقدار p در فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان داد که پس از تزریق اتانول (۱ میلی‌گرم) در روز آموزش و تخریب حافظه، همه دوزهای دونپزیل پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم) توانستند به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۰۱) فراموشی ناشی از اتانول را برگردانند. به‌علاوه، تزریق سالین و نانو ذرات کیتوسان در روز تست قادر به برگشت حافظه نشده‌اند.



نمودار ۳) اثر دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان و نانوذرات کیتوسان به تنهایی بر فراموشی ناشی از اتانول. همه دوزهای دونپزیل پوشش شده با نانوذرات کیتوسان با اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۰۰۱ ****) باعث بهبود فراموشی شدند.گروه نانوکیتوسان به تنهایی تأثیری بر بهبود فراموشی نداشت. داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند و p<۰/۰۵ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

FiG 3) The effect of different doses of encapsulated Donepezil and Donepezil alone on memory impaired by ethanol. All doses of encapsulated Donepezil could significantly (**** p<0.0001) improve impaired memory while nano-chitosan alone had no effect on memory improvement. Data are expressed as Mean± SD. p<0.05 was considered as significant level.

بحث

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که کاهش یادگیری و حافظه و به‌طور کلی اختلالات شناختی، در نتیجه مصرف افراطی اتانول بروز می‌کنند که با تحت تأثیر قرار گرفتن هیپوکامپ اتفاق می‌افتند (۱۸). یادگیری اجتنابی یکی از انواع یادگیری‌ها می‌باشد و خود به دو نوع فعال و غیرفعال تقسیم می‌شود. در نوع غیرفعال یادگیری اجتنابی که در این مطالعه نیز انجام گرفت هر چه میزان تأخیر ورود حیوان به محفظه تاریک بیشتر باشد به این معنی است که یادگیری حیوان جهت عدم ورود به محفظه تاریک بیشتر است (۱۹).

در واقع هدف از انجام آزمایش اول در این مطالعه تأیید این فرضیه بود که اتانول حافظه اجتنابی آموزش داده شده توسط سیستم یادگیری اجتنابی غیرفعال را تخریب می‌نماید. هدف دیگر از انجام این آزمایش به‌دست آوردن دوزی از اتانول بود که بتواند فراموشی را القاء نماید. همانطور که نمودار ۱ نشان می‌دهد تزریق دوزهای ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم اتانول پس از آموزش توانستند به‌طور معنی‌داری فراموشی را القاء نمایند به عبارت دیگر، حافظه‌ای که بعد از آموزش در روز آموزش ایجاد شده بود (دریافت شوک در صورت ورود به محفظه تاریک) توسط این سه دوز اتانول تخریب شد و لذا حیوانات این سه گروه در روز تست مجدداً وارد محفظه تاریک شدند. از آنجایی که بیشترین تخریب حافظه توسط دوز ۱ میلی‌گرم اتانول ایجاد شده بود از این دوز جهت تخریب حافظه استفاده شد. البته در برخی از مطالعات، تزریق داروی ایجاد کننده فراموشی پیش از آموزش (۲۰)، در برخی دیگر از مطالعات پس از آموزش و برخی دیگر پیش از تست (۲۱) انجام می شود. در مطالعات پیشین نشان شده است که اتانول تأثیرات سوء خود را بواسطه اختلال در سیستم کولینرژیک مغز گذاشته که منجر به تخریب حافظه اجتنابی می‌شود به نحوی که آزادسازی استیل کولین در هیپوکامپ کاهش می‌یابد (۲۲ و ۲۳). با این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]
[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

حال اتانول روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی تأثیر می‌گذارد ولی به نظر می‌رسد که تأثیر آن بر سیستم کولینرژیک ناحیه هیپوکامپ نقش کلیدتری بر روی حافظه دارد (۲۳). علاوه بر این، مصرف افراطی اتانول منجر به اختلال در عملکرد ماز آبی موریس (Morris maze water) نیز می‌شود که نشان دهنده تخریب حافظه فضایی می‌باشد (۲۴).

آزمایش دوم جهت اطمینان از اینکه نانو ذرات کیتوسان به تنهایی و داروی دونپزیل پوشش شده نمی‌توانند باعث تخریب حافظه شوند انجام گرفت و همانطور که تجزیه و تحلیل آماری نمودار ۲ نشان می‌دهد هیچ‌کدام از دوزهای دونپزیل پوشش شده و همچنین گروه نانو ذرات کیتوسان فاقد دارو تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین نشان ندادند و لذا حافظه حیوانات در همه گروه‌ها کامل بود. از آنجایی که تخریبی در روز آموزش پس از تزریق سالین ایجاد نشده است، می‌توان انتظار داشت که تزریق دونپزیل در روز آزمون تغییری در حافظه ایجاد ننماید. با این حال این نتیجه مخالف نتیجه تحقیق بالسترز (Balsters) و همکاران نشان دادند داروهای مهارکننده استیل کولین استراز مانند دونپزیل می‌تواند باعث تخریب عملکرد شناختی در افراد مسن سالم گردد (۲۵) در این خصوص نتایج متناقضی در مطالعات مختلف گزارش شده است با این توجیه که پاسخ افراد به داروها به دوز دارو، سن افراد، شدت و نوع فراموشی بستگی دارد (۲۶).

نتایج حاصل از آزمایش سوم (نمودار ۳) نشان داد که حافظه ای که در روز آموزش توسط دوز ۱ میلی‌گرم اتانول تخریب شده است، در روز تست توسط همه دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده در سطح بالایی از معنی‌داری بهبود یافته است. این در حالی است که گروه‌هایی که در روز تست، نانو ذرات کیتوسان و یا سالین را به تنهایی دریافت کرده بودند کماکان دارای حافظه تخریب شده بودند. به‌نظر می‌رسد این نتیجه می‌تواند به خوبی نشان دهنده تأثیر بسیار مؤثر و با کیفیت نانو ذرات کیتوسان جهت رساندن داروی دونپزیل و تأثیر مثبت آن بر برگشت حافظه باشد. تا جایی که بررسی‌های ما نشان داد تاکنون پتانسیل نانو ذرات کیتوسان جهت انتقال داروی دونپزیل در موش مدل آلزایمری و تأثیر آن بر بهبود یا عدم بهبود حافظه مورد بررسی قرار نگرفته است. علاوه بر این، هدف دیگر از انجام این تحقیق، ارزیابی عملکردی نانو ذرات کیتوسان تولید شده در سیستم دارورسانی بوده است. پیش از این، ما از این نانو ذرات کیتوسان تولید شده جهت پوشش کردن و انتقال آنتی اکسیدان کورکومین به بافت مغز موش‌های سوری استفاده کردیم و مقدار کورکومین رسیده به بافت مغز را در گروه‌های مختلف با استفاده از تکنیک HPLC مورد بررسی قرار دادیم. نتایج تکنیک HPLC نشان داد که کورکومین پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان به‌طور مؤثرتری به بافت مغز می‌رسد (داده‌ها منتشر نشده‌اند).

یکی از مشکلات اصلی که در خصوص رسیدن داروها به بافت مغز وجود دارد عبور از سد خونی مغزی (Blood Brain Barrier) بدون رسیدن آسیب به ساختار این سد می‌باشد (۲۷). از میان روش‌های مختلف دارورسانی به مغز جهت درمان آلزایمر، مواد پلیمری اهمیت و جایگاه ویژه‌ای دارند (۸). نانوذرات پلیمری poly(lactic-co-glycolic acid) یا به اختصار PLGA جهت انتقال داروی دونپزیل در محیط‌های in vitro و in vivo مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نشان داده شده است که این قبیل نانوذرات پلیمری طبیعی می‌توانند رهایش دارو در محیط in vivo را به نحوی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

انجام دهند که فقط یکبار تجویز دارو در ماه کفایت می‌کند (۲۸).

در مطالعه دیگری نشان داده شده است که نانو رشته‌ها و نانوفیلم‌های کیتوسان نیز پتانسیل بالایی جهت رساندن داروی دونپزیل به‌صورت خوراکی دارا هستند (۱۳) یکی از این ویژگی‌های این نوع کیتوسان، برقراری تعامل خوب با مایع بزاقی است به نحوی که از طریق باز کردن اتصالات محکم مابین سلول‌های اپی‌تلیالی، جذب و تحویل‌رسانی دارو به‌طور مؤثرتری بهبود می‌یابد (۲۹).

نتیجه‌گیری

اگر چه در مطالعه حاضر از روش تزریق درون صفاقی جهت ورود داروی دونپزیل به بدن استفاده شده است، با این حال نتایج حاصل از این مطالعه برای اولین بار تأثیر مثبت نانو ذرات کیتوسان در انتقال دارو و برگشت حافظه در مدل حیوانی آلزایمر را نشان داده است. از آنجا که خوراندن دارو و اطمینان از دریافت دوز کامل آن در حیوانات آزمایشگاهی به عنوان یک محدودیت تحقیقاتی مطرح است، لذا بررسی قابلیت این نانو ذرات کیتوسان جهت انتقال خوراکی دارو و یا تولید نانو رشته و نانو فیلم از آن می‌تواند موضوع تحقیق دیگری در آینده باشد.

سپاس و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح پژوهشی مصوب در شورای پژوهشی و تحت حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان بوده است و تحت ملاحظات اخلاقی صورت پذیرفته است. بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری تقدیر و تشکر بعمل می آید.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Eskandary A, Moazedi AA, Najaph Zade H, et al. Research Paper: Effects Of Donepezil Hydrochloride On Neuronal Response Of Pyramidal Neurons Of The CA1 Hippocampus In Rat Model Of Alzheimer's Disease. Basic Clin Neurosci 2019; 10(2): 109-17.
2.Amani M. Pathophysiology Of Alzheimer's Disease. J Ardabil Univ Med Sci 2017; 16(4): 452-63. (Persian)
3.Palop JJ, Mucke L. Amyloid-B Induced Neuronal Dysfunction In Alzheimer's Disease: From Synapses Toward Neural Networks. Nat Neurosci 2010; 13(7): 812-8.
4.Zali H, Sadat Seyyedi S, Rashidy Pour A, et al. Epidemiology And Etiology Of Alzheimer's Disease. Koomesh 2015; 16(2): 119-27. (Persian)
5.Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. Nat Rev Neurol. 2019;14(7):399–415.
6.Black SE, Doody R, Li H, et al. Donepezil Preserves Cognition And Global Function In Patients With Severe Alzheimer Disease. Neurology 2007; 69(5): 459-69.
7.Kim SH, Kandiah N, Hsu JL, et al. Beyond Symptomatic Effects: Potential Of Donepezil As A Neuroprotective Agent And Disease Modifier In Alzheimer's Disease. Br J Pharmacol 2017; 174(23): 4224-32.
8.Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, et al. Drug Delivery Strategies For Alzheimer's Disease Treatment. Expert Opin Drug Deliv 2011; 8(5): 581-603.
9.Kogan MJ, Bastus NG, Amigo R, et al. Nanoparticle-Mediated Local And Remote Manipulation Of Protein Aggregation. Nano Lett 2006; 6(1): 110-5.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

10.Raafat D, Sahl HG. Minireview Chitosan And Its Antimicrobial Potential -- A Critical Literature Survey. Microb Biotechnol 2009; 2(2): 186-201.
11.Tang C, Chen N, Zhang Q, et al. Preparation And Properties Of Chitosan Nanocomposites With Nanofillers Of Different Dimensions. Polym Degrad Stabil 2009; 94(1): 124-31.
12. Azari A, Rezaei Kalantary R, Keramaty A, et al. Extraction and optimization of chitosan from shrimp shell: preparation, characterization and application in fluoride removal (isotherm, kinetic and thermodynamic studies). Iran South Med J. 2016;19(4): 644–61.
13.Anjireddy K, Karpagam S. Chitosan Nanofilm And Electrospun Nanofiber For Quick Drug Release In The Treatment Of Alzheimer's Disease: In Vitro And In Vivo Evaluation. Int J Biol Macromol 2017; 105(Pt 1): 131-42.
14.Sadeghi M, Ganji F, Taghizadeh SM, et al. Preparation And Characterization Of Rivastigmine Transdermal Patch Based On Chitosan Microparticles. Iran J Pharm Res 2016; 15(3): 283-94.
15.Mendes AC, Gorzelanny C, Halter N, et al. Hybrid Electrospun Chitosan-Phospholipids Nanofibers For Transdermal Drug Delivery. Int J Pharm 2016; 510(1): 48-56.
16.Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel Nanoparticles In Drug Delivery. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(15): 1638-49.
17.Seifhosseini S, Jahanshahi M, Moghimi A, et al. The Effect Of Scopolamine On Avoidance Memory And Hippocampal Neurons In Male Wistar Rats. Basic Clin Neurosci 2011; 3(1): 9-15.
18.Feizolahi F, Azarbayjani MA, Nasehi M, et al. Comparison The Effect Of Short-Term Swimming Training And Curcumin Supplementation On Damaged Spatial Memory After Binge Ethanol Drinking In Male Rats: Preliminary Report. J Med Plants 2017; 16(61 And S10): 174-84. (Persian)
19.Zavvari F, Karimzadeh F. A Review On The Behavioral Tests For Learning And Memory Assessments In Rat. Neurosci J Shefaye Khatam 2017; 5(4): 110-24. (Persian)
20.Piri M, Moshfegh A, Raoufi N, et al. The Influence Of L-Arginine In The Improving Effect Of Nicotine On Ethanol- Induced Amnesia. J Anim Biol 2012; 4(2): 23-32. (Persian)
21.Pakpour B, Hadidi AH, Navaeian M, et al. Repair Ethanol Induced Amnesia With Iranian Lactobacillus Brevis In Rats. J Appl Microbiol Food Ind 2015; 1(1): 1-11. (Persian)
22.Hajizadeh E, Khezri S, Piri M. Influence Of Ethanol On Amnesia And State-Dependent Learning Induced By Scopolamine In Male Mouse. J Anim Biol 2014; 6(4): 1-11. (Persian)
23.Asadi Motlagh M, Pakpour B, Navaian M. The Effect Of 5-HT3 Receptor Agonist Of The Ventral Hippocampus On Amnesia Induced By Ethanol In Mice. Feyz J Kashan Univ Med Sci 2018; 22(3): 239-47. (Persian)
24.Rajaei F, Moghaddam-Shad M, Salehi Z. The Effects Of Amygdalin On The Morphologic Structure Of Mouse Cerebellar Cortex. J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15(3): 26-32. (Persian)
25.Balsters JH, O'Connell RG, Martin MP, et al. Donepezil Impairs Memory In Healthy Older Subjects: Behavioural, EEG And Simultaneous EEG/fMRI Biomarkers. Plos One 2011; 6(9): e24126.
26.Repantis D, Laisney O, Heuser I. Acetylcholinesterase Inhibitors And Memantine For Neuroenhancement In Healthy Individuals: A Systematic Review. Pharmacol Res 2010; 61(6): 473-81.
27.Al Asmari AK, Ullah Z, Tariq M, et al. Preparation, Characterization, And In Vivo Evaluation Of Intranasally Administered Liposomal Formulation Of Donepezil. Drug Des Devel Ther 2016; 10: 205-15.
28.Zhang P, Chen L, Gu W, et al. In Vitro And In Vivo Evaluation Of Donepezil-Sustained Release Microparticles For The Treatment Of Alzheimer's Disease. Biomaterials 2007; 28(10): 1882-8.
29.Abruzzo A, Bigucci F, Cerchiara T, et al. Mucoadhesive Chitosan/Gelatin Films For Buccal Delivery Of Propranolol Hydrochloride. Carbohyd Polym 2012; 87(1): 581-8.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]

Iran South Med J 2020; 23(5): 431-441

Original Article

Effects of Nano-Chitosan Loaded with Donepezil on Ethanol Induced Amnesia in Swiss-type Mice

M. Heidari (PhD)[1*], NS. Azami (PhD)[1**], M. Ebadi (PhD)[2]

[1] Department of Biology, School of Science, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran
[2] Department of Chemistry, School of Science, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

(Received 2 Mar, 2020 Accepted 2 Aug, 2020)

Abstract

Background: Progressive neurodegeneration of nervous system as well as learning and memory disorders is characteristics of Alzheimer's disease. Drug delivery is one of the research aspects for improving treatment of diseases. Chitosan nanoparticles were used for Donepezil transportation and its effect on dimproving amnesia was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, 136 NMRI mice weighing 30-40 mg were used. All injections were done intraperitoneally. The first experiment aimed to determine the optimal dose of ethanol for inducing amnesia, the second experiment was performed to prove nano-chitosan loaded with Donepezil (0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/kg) does not impair memory, and the third experiment assessed the effect of nano-chitosan loaded with different doses of Donepezil on amnesia induced by ethanol. Data were recorded as mean ± SD, analyzed in GraphPad Prism software using ANOVA and Tukey *post hoc* test. $P<0.05$ was considered as significant.

Results: The first experiment showed that ethanol (0.5, 0.75, 1 mg/kg) could significantly induce amnesia. The second experiment showed nano-chitosan loaded with Donepezil doid not impair memory. The third experiment showed that all nano-chitosan groups loaded with different doses of Donepezil could significantly improve amnesia induced by ethanol.

Conclusion: Chitosan nanoparticles used in this study can efficiently be used for drug delivery. However, further research should be done on this compound before it can be used for oral drug transportation.

Keywords: Amnesia, Chitosan, Donepezil, Ethanol, Nanoparticle

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Heidari M, Azami NS, Ebadi M Effects of Nano-Chitosan Loaded with Donepezil on Ethanol Induced Amnesia in Swiss-type Mice. Iran South Med J 2020; 23(5): 431-441

Copyright © 2020 Heidari et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[**] *Address for correspondence:* Department of Chemistry, School of Science, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran
Email: Azaminasrin@gmail.com
*ORCID: 0000-0002-9103-2491
**ORCID: 0000-0002-4549-7220

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.52547/ismj.23.5.431]