



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

محمود حیدری (PhD)^{۱*}، نسرین سادات اعظمی (PhD)^{۱**}، مهدی عبادی (PhD)^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

^۲ 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 کیتوزان جهت انتقال داروی دونیزیل 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 به صورت درون صفاقی صورت گرفت. در آزمایش اول دوز مناسب اتانول جهت القاء فراموشی، آزمایش دوم جهت اثبات عدم تخریب حافظه توسط نانو کیتوزان حاوی دونیزیل و آزمایش سوم، تأثیر نانو کیتوزان حاوی دوزهای مختلف دونیزیل بر فراموشی ناشی از اتانول انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت گردید. نرم‌افزار گراف پد پریم، آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey جهت تجزیه و تحلیل استفاده شد. $p < 0/05$ 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 نانو کیتوزان حاوی دونیزیل باعث تخریب حافظه نمی‌شوند. آزمایش سوم نشان داد که برخلاف گروه‌های سالی‌ن و نانو ذرات کیتوزان، همه گروه‌های نانو کیتوزانی حاوی دوزهای مختلف دونیزیل به‌طور معنی‌داری فراموشی ناشی از اتانول را بهبود می‌بخشند.

نتیجه‌گیری: نانو ذرات کیتوزان 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، دونیزیل، فراموشی، کیتوزان، 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

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم سیستم عصبی که طی آن نوروها 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 علائم 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 علائم بیماری آلزایمر مطرح گردیده‌اند عبارتند از تشکیل پلاک‌های بتا آمیلوئید^۱ و کلاف‌های نانوفیبریلاری^۲ (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 مهارکننده 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 نوروهای سیستم کولینرژیک درگیر در حافظه را بهبود می‌بخشد (۷).

روش‌های مختلفی جهت انتقال داروهای بیماران آلزایمری مطرح شده‌اند از جمله روش سنتی خوراکی، قرص‌های پوشش‌دار خوراکی، برچسب‌های پوستی^۳،

روش بینی و روش‌های مبتنی بر نانو تکنولوژی (۸). با این حال، تحویل هدفمند و موضعی دارو بر پایه دانش نانو تکنولوژی 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 نانو تکنولوژی 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 نانو تکنولوژی کیتوسان می‌باشد؛ ترکیبی که از استیل‌زدایی پلیمر کیتین طبیعی در سال ۱۸۵۹ به دست 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 نانو ذره بودن را داشته باشند علاوه بر این، بدلیل پایداری، سمی نبودن، تجزیه پذیری 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 ۱۳-۱۵). 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 Neurofibrillary tangles

³ Transdermal patch

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 ۰۰۱.۱۳۹۹. IR.IAU.AK.REC مورد تصویب قرار گرفت از موش‌های نر سوری نژاد NMRI به وزن تقریبی ۳۰-۴۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور آمل و با رعایت اصول و موازین اخلاقی کار با حیوانات استفاده شد. پس از انتقال حیوانات 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 به صورت 22 ± 3 درجه و چرخه روشنایی به صورت 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 هر گروه ۸ سر موش) تقسیم شدند. همه آزمایش‌ها در یک ساعت مشخص از روز انجام گرفت.

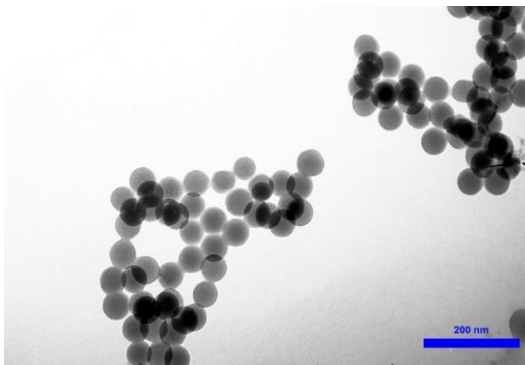
دستگاه تست حافظه اجتنابی غیرفعال (شاتل باکس) این دستگاه دارای دو محفظه، هر یک با طول و عرض ۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. یکی از این دو محفظه، روشن (ناحیه امن) است که دیواره‌های سفید رنگ دارد و دیگری محفظه تاریک (ناحیه ناامن) می‌باشد که دیواره‌های آن سیاه رنگ است. یک درب گیوتینی بین محفظه‌های روشن و تاریک قرار دارد. میله‌های شوک دهنده از جنس استیل ضدزنگ کف محفظه تاریک را پوشانده‌اند و توسط سیم‌هایی به دستگاه استیمولاتور وصل شده‌اند به طوری 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 به ترتیب با استفاده از سود ۵ درصد و اتانول جدا شد تا کیتین حاصل آید. با استیل زدایی از کیتین ماده کیتوسان به دست آمد. جهت تهیه کیتوسان با وزن مولکولی پایین (۸۰ کیلو دالتون) از



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 این صورت 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

روش الکتروشیمی نوین با پیل H شکل دارای غشاء با روزه‌های 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^۴ (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) به دست آمدند. محلول فوق به مدت ۳۰-۲۵ دقیقه بر روی 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 فیزیکی شیمیایی مانند FTIR, HPLC, UV-Vis جدا کرده و محلول فوقانی برای اندازه‌گیری کمی میزان داروی باقی مانده جداسازی شد.

⁴ Transmission Electron Microscopy

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 این صورت، به محض ورود به محفظه تاریک، مجدداً دریافت شوک و تست آموزش تکرار می‌شود.

تست بازبازی حافظه: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، تست بازبازی 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.

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 سالیین و در روز تست، سالیین حاوی کیتوسان هم حجم با میزان سایر گروه‌ها تزریق و سپس تست حافظه انجام گرفت.

گروه دوم، سوم، چهارم و پنجم: در روز آموزش سالیین 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 سالیین 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.

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.

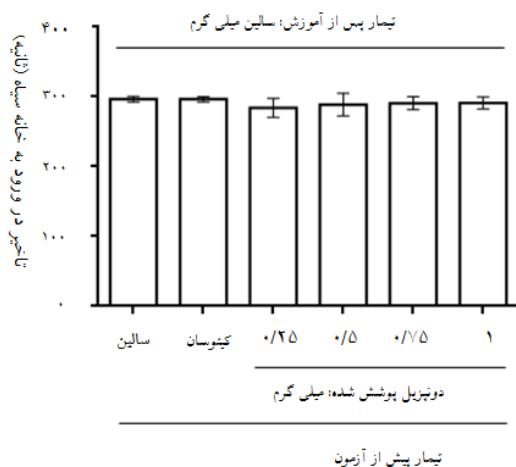
گروه اول: در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش سالیین دریافت کردند و در روز تست، ۳۰ دقیقه قبل از تست، تزریق سالیین انجام شد و سپس تست حافظه توسط دستگاه شاتل باکس انجام شد.

گروه‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم: در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش تزریق دوزهای مختلف اتانول

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 به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت شدند اطلاعات جمع‌آوری شده شامل گروه‌های تحت

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 میلی گرم) قبل از آزمون به حیواناتی که در روز آموزش سالین دریافت کرده بودند، هیچ تغییر معنی داری 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. همان طور که انتظار می رفت دونپزیل پوشش شده در نانو ذرات کیتوسان باعث تخریب حافظه نمی شود.



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 \pm انحراف معیار گزارش شده اند. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شده است.

Fig 2) The effect of different doses of encapsulated Donepezil and Donepezil alone on full memory.

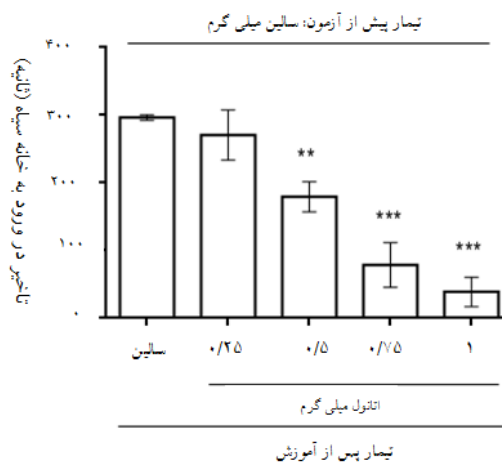
Saline was administered after training while different doses of encapsulated Donepezil and Donepezil alone were administered before test. No significant effect (memory impairment) was observed on memory function. Data are expressed as Mean \pm SD. $p < 0.05$ was considered as significant level.

مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری گراف پد پریسم ویرایش ۸/۳ و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

آزمایش اول Dose response اتانول

نمودار ۱ بر اساس مقدار p در فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان می دهد که تزریق دوزهای (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم) اتانول در روز آموزش در مقایسه با حیواناتی که سالین دریافت نمودند به طور معنی داری سبب تخریب حافظه و ایجاد فراموشی شد. به صورتی که تخریب دوزهای ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در $p < 0.001$ و دوز ۰/۵ میلی گرم در $p < 0.01$ معنی دار شده است.



نمودار ۱) اثرات تزریق پس از آموزش اتانول یا سالین بر تأخیر ورود به محل شوک. دادهها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند. دوزهای ۰/۷۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم باعث ایجاد اختلاف معنی داری در مقایسه با گروه سالین/ سالین شدند. در حالی که دوز ۰/۲۵ تفاوت معنی داری را با گروه سالین/ سالین نشان نداد.

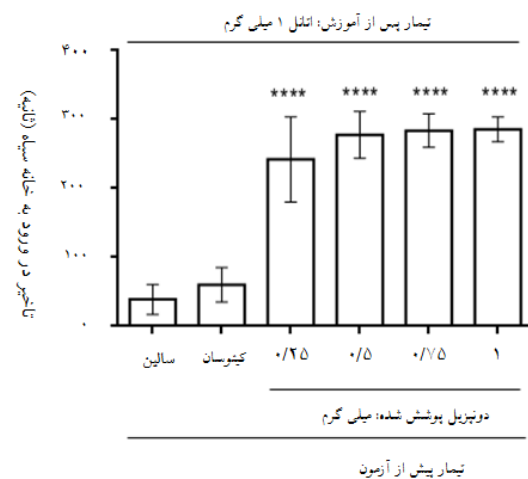
** $p < 0.01$ و *** $p < 0.001$

Fig 1): The effect of post-training administration of ethanol on step through latency. Data are expressed as Mean \pm 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 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

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 به دست 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 به طور 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 می‌شود. 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

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 به طور معنی‌داری ($p < 0.0001$) فراموشی ناشی از اتانول را برگردانند. به علاوه، تزریق سالیین 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 ($p < 0.0001$) باعث بهبود فراموشی شدند. گروه نانوکیتوسان به تنهایی تأثیری بر بهبود فراموشی نداشت. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده‌اند و $p < 0.05$ 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 \pm SD. $p < 0.05$ was considered as significant level.

بحث

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که کاهش یادگیری و حافظه و به طور کلی اختلالات شناختی، در نتیجه

حال اتانول روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی تأثیر می‌گذارد ولی به نظر می‌رسد که تأثیر آن بر سیستم کولینرژیک ناحیه هیپوکامپ نقش کلیدی 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 کیتوزان به تنهایی و داروی دونپزیل پوشش شده نمی‌تواند 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 کیتوزان 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 کیتوزان و یا

سالین را به تنهایی دریافت کرده بودند کماکان دارای حافظه تخریب شده بودند. به نظر می‌رسد این نتیجه می‌تواند به خوبی نشان دهنده تأثیر بسیار مؤثر و با کیفیت نانو ذرات کیتوزان جهت رساندن داروی دونپزیل و تأثیر مثبت آن بر برگشت حافظه باشد. تا جایی که بررسی‌های ما نشان داد تاکنون پتانسیل نانو ذرات کیتوزان 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 کیتوزان تولید شده در سیستم دارورسانی بوده است. پیش از این، ما از این نانو ذرات کیتوزان 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 کیتوزان 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

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 به صورت 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 می‌آید.

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.

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, Navaeian 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. *Carbohydr Polym* 2012; 87(1): 581-8.

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 \pm 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 did 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 reserved

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>