

Neuroprotective Effects of Silymarin-Loaded Chitosan Nanoparticles on Ketamine-Induced Cognitive Disorders and Oxidative Damages in Mice Hippocampus

Akbar Hajizadeh Moghaddam*, Reza Barari, Sedigheh Khanjani Jelodar, Vahid Hasantabar

Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

Article Info:

Received: 6 Jan 2022

Revised: 26 May 2022

Accepted: 6 June 2022

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress plays a key role in the pathophysiology of schizophrenia, a debilitating mental illness. Silymarin (SM) is a flavonoid with antioxidant properties found in *Silybum marianum*. However, the bioavailability of SM is rather low due to poor water solubility. The purpose of this study was to investigate the effect of neuroprotective of silymarin-loaded chitosan nanoparticles (SM-CS-NPs) on ketamine-induced cognitive disorders and hippocampal oxidative damages. **Materials and Methods:** In this study, 35 male mice were divided into five groups; control and four ketamin groups treated with saline, aripiprazole, SM, and SM-CS-NPs at doses of 20 mg/kg/30 days, respectively. In the experimental groups, animals received ketamine (20 mg/kg/day) from the 16th to the 30th day intraperitoneally. Cognitive deficits were evaluated employing a novel object recognition test (NORT). Furthermore, various oxidative stress markers in the hippocampal area were assessed. **Results:** Our results revealed that ketamine significantly reduced the discrimination index and catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase enzyme activity compared with the control group. Moreover, treatment with SM and SM-CS-NPs reduced cognitive impairments, increased the activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase as well as glutathione reductase, and reduced malondialdehyde levels in the treatment groups. **Conclusion:** SM-CS-NPs may improve SM bioavailability and exert stronger neuroprotective effects against ketamine-induced cognitive deficits and hippocampal oxidative damages.

Keywords:

1. Ketamine
2. Silymarin
3. Schizophrenia

*Corresponding Author: Akbar Hajizadeh Moghaddam

Email: a.hajizadeh@umz.ac.ir



اثرات حفاظت عصبی نانوذرات چیتوسان سیلیمارین بر اختلالات شناختی ناشی از کتامین و آسیب‌های اکسیداتیو در هیپوکامپ موش‌ها

اکبر حاجی‌زاده مقدم*، رضا براری، صدیقه خانجانی جلودار، وحید حسن تبار

گروه زیست جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۱۶ خرداد ۱۴۰۱

اصلاحیه: ۵ خرداد ۱۴۰۱

دریافت: ۱۶ دی ۱۴۰۰

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در پاتوفیزیولوژی اسکیزوفرنی که یک بیماری روانی ناتوان کننده است، دارد. سیلی مارین یک فلاونوئید با خواص آنتی‌اکسیدانی است که در گیاه خار مریم یافت می‌شود. با این حال، فراهمی زیستی سیلی مارین به دلیل حلالیت کم در آب، ضعیف است. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظت عصبی نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین بر اختلالات شناختی و آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از کتامین در هیپوکامپ است. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، ۳۵ موش نر به پنج گروه تقسیم شدند؛ کنترل و چهار گروه کتامینی که به ترتیب با سالین، آرپیپرازول، سیلیمارین و نانوذرات چیتوسان-سیلیمارین در دوزهای ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز تحت درمان قرار گرفتند. در گروه‌های بیمار، حیوانات کتامین را با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه از روز ۱۶ تا ۳۰ به صورت درون صفاقی دریافت کردند. اختلالات شناختی با استفاده از آزمون شناسایی شیء جدید مورد ارزیابی قرار گرفت و نشانگرهای استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ ارزیابی شد. **یافته‌ها:** نتایج ما نشان داد که کتامین به طور معنی‌دار شاخص تبعیض و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. نتایج این پژوهش نشان داد که درمان با سیلی مارین و نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین باعث کاهش اختلالات شناختی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش سطح مالون دی‌آلدهید در گروه‌های تحت درمان می‌شود. **نتیجه‌گیری:** نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین می‌تواند فراهمی زیستی سیلیمارین را بهبود بخشد و اثرات حفاظت عصبی قوی تری را در برابر اختلالات شناختی ناشی از کتامین و آسیب‌های اکسیداتیو هیپوکامپ ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی:

- ۱- کتامین
- ۲- سیلیمارین
- ۳- اسکیزوفرنی

*نویسنده مسئول: اکبر حاجی‌زاده مقدم

پست الکترونیک: a.hajizadeh@umz.ac.ir

مقدمه

گلوکوتایون پراکسیداز و کاتالاز در مغز می‌گردد (۹). با این وجود به دلیل عدم حلالیت در آب، جذب خوراکی سیلی مارین تقریباً بین ۴۷-۲۳ درصد است که منجر به دسترسی زیستی کم آن می‌شود (۱۰). سیستم‌های تحویل هدفمند دارو بازده درمانی و جذب دارو را بهبود بخشیده و عوارض جانبی و سمیت آن را کاهش دادند. نانوذره کردن ترکیبات، سبب افزایش نفوذپذیری آنها از سد خونی-مغزی می‌شود (۱۱). امروزه از نانوذرات چیتوسان^۷ به‌عنوان ماده حامل برای افزایش حلالیت داروهای فلاونوئیدی مانند سیلی مارین استفاده می‌کنند که با مزایای حفاظت از تجزیه آنزیمی، کنترل آزاد شدن و بهبود دسترسی زیستی اثبات شده است (۱۲). هدف از این پژوهش بررسی اثر حفاظت نورو سیلی مارین و نانو ذرات چیتوسان-سیلی مارین بر اختلالات شناختی و تغییرات آنتی‌اکسیدانی در بافت هیپوکامپ مدل حیوانی اسکیزوفرنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش سوری نر بالغ با محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم در اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند. غذای مخصوص حیوانات به مقدار مناسب و کافی در دسترس قرار گرفت. به‌منظور سازگاری حیوانات با محیط، آزمایش‌ها یک هفته پس از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه انجام شد. کلیه این آزمایشات مطابق با آیین‌نامه کمیته اخلاق زیستی معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام گردید (IR.U.M.Z.REC.1400.025). به‌منظور ایجاد مدل اسکیزوفرنی، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین به مدت ۱۵ روز به گروه کنترل مثبت، بیمار و گروه‌های تیمار، تزریق شد. حیوانات به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل یا سالم، گروه کنترل مثبت (داروی آرپی‌پرازول^۸ رقیق شده با آب مقطر را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز به‌صورت گاوژ دریافت کردند)، گروه بیمار پیش‌تیمار شده با سیلی مارین که ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سیلی مارین را به‌صورت گاوژ و به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند و گروه بیمار پیش‌تیمار شده با چیتوسان-سیلی مارین که ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از چیتوسان-سیلی مارین را به‌صورت گاوژ و به مدت ۳۰ روز دریافت کردند (۱۴، ۱۳). آزمون رفتاری: آزمون شناسایی شیء جدید^۹ به‌منظور ارزیابی میزان اختلال در حافظه از تمامی گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین گاوژ انجام گرفت. این آزمون دارای سه مرحله عادت، آشنایی و آزمون اصلی است. حیوانات در روز اول برای عادت با محیط به مدت ۵ دقیقه درون محفظه خالی قرار

اسکیزوفرنی^۱ نوعی بیماری روانی جدی و ناتوان کننده است که حدود یک درصد از جمعیت در سراسر جهان را درگیر می‌کند (۱). این بیماری به مجموعه‌ای از علائم مثبت (مانند هذیان و توهم)، علائم منفی (مانند عدم انگیزه) و فقدان شناختی (اختلالات در حافظه، یادگیری و عملکرد اجرایی) تقسیم می‌شود (۲، ۳). اختلال شناختی، نقص موقتی یا پایدار در زمینه پردازش، ذخیره و بازیابی اطلاعات مورد نیاز فرد برای انجام فعالیت‌های معمول است (۴). اسکیزوفرنی به دلیل اختلال در سیستم‌های نوروترانسمیتری، استرس اکسیداتیو و عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی به وجود می‌آید. در این بیماری، سطوح آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته و پراکسیدهای لیپیدی و نیتریک اکسیدها افزایش می‌یابند (۵). شواهد به‌طور گسترده‌ای نشان داده‌اند که اختلال در عملکرد و کاهش فعالیت گیرنده NMDA^۲ به‌ویژه در قشر پیشانی در اسکیزوفرنی وجود دارد. کتامین^۳ به‌طور عمده این گیرنده را مسدود کرده و باعث ایجاد رفتار اسکیزوفرنیک در جوندگان و تشدید روان‌پریشی در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی می‌شود. گیرنده NMDA به‌دلیل نقش خود در قابلیت انعطاف‌پذیری سیناپسی، در یادگیری و حافظه مهم است و کتامین یک آنتاگونیست غیر رقابتی در یکی از سه گیرنده گلوتامات یعنی گیرنده NMDA می‌باشد. در نظریه گلوتاماتریک اسکیزوفرنی، تجویز تحت مزمون کتامین برای انسان‌های سالم می‌تواند یک تصویر بالینی شبیه به اسکیزوفرنی، از جمله نقص شناختی را ایجاد کند (۶). ترکیبات پلی‌فنولی به واسطه ساختارهای شیمیایی منحصر به فردشان مانع استرس اکسیداتیو و همچنین آسیب‌های سلولی و التهاب پس از آن می‌گردند. همچنین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شوند (۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها ناشی از اثرات مهار آنتی‌اکسیدان‌ها بر تولید رادیکال‌های آزاد و به دام اندازی گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و سایر گونه‌های واکنش‌پذیر است (۸). مطالعات نشان دهنده اثرات حفاظتی کاتالاز و گلوکوتایون پراکسیداز در ناحیه هیپوکامپ مغز است (۱). سیلی مارین^۴ فلاونوئید به دست آمده از گیاه خارمریم^۵ با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز^۶، سنتز لوکوترین و تولید پروستاگلاندین از اسید آراشیدونیک را در پاسخ به محرک‌های التهابی مهار کرده و موجب کاهش سطح سرمی سیتوکین‌های التهابی می‌شوند. بیشترین اثر حفاظت عصبی سیلی مارین مربوط به حفاظت از نورون‌های هیپوکامپ در برابر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیلی مارین سبب افزایش گلوکوتایون سلولی و تحریک تولید و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز،

¹ Schizophrenia

² N-methyl-d-aspartate

³ Ketamine

⁴ Silymarin

⁵ Silybum marianum

⁶ Cyclooxygenase

⁷ Chitosan nanoparticles

⁸ Aripiprazole

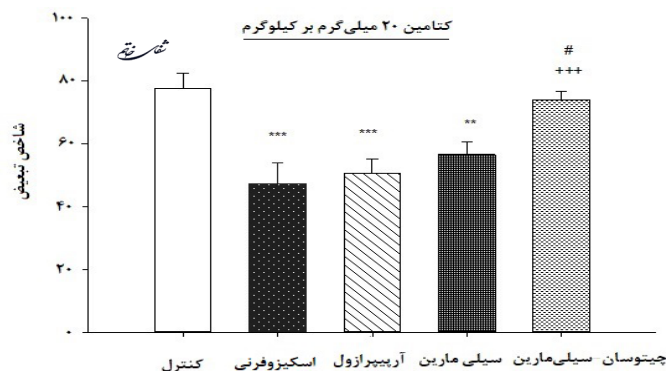
⁹ Novel object recognition test

حاوی ۲/۵ میلی‌مولار GSSG و ۰/۱ میلی‌مولار NADPH می‌باشد. در ادامه ۶۰ میکرولیتر از سوپرناتانت بافت هموزن شده به ۷۴۰ میکرولیتر محلول واکنش افزوده شد. جذب نوری آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر طی ۲ دقیقه اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۸). اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدهید: ۲۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت بافت هموزن شده با ۱ میلی‌لیتر تیوباربیئوریک ۰/۶۷ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. بعد از خنک شدن در دمای اتاق، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و محلول رویی آن جدا گردید. در ادامه جذب محلول رویی در مقایسه با محلول شاهد (حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف (MDA) در طول موج ۵۳۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر ثبت شد. غلظت مالون دی‌آلدهید با استفاده از ضریب خاموشی $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بر پایه قانون بیرلامبرت ($A=\epsilon Ic$) محاسبه و به صورت nmol/ml گزارش شد (۱۹). آنالیز آماری داده‌های به دست آمده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Prism نسخه ۷ انجام گرفته و مقادیر ($P<0/05$) معنی‌دار محسوب شده است. همچنین جهت مقایسه بین گروه‌ها و تجزیه و تحلیل آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید.

یافته‌ها

آزمون شناسایی شئی جدید به‌منظور ارزیابی میزان اختلال حافظه انجام گرفت. با توجه به نمودار ۱ شاخص تبعیض در گروه بیمار و آرپی پرازول کنترل ($P<0/001$) و گروه تیمار با سیلی‌مارین کاهش معنی‌دار ($P<0/01$) در مقایسه با گروه کنترل نشان داده است. در گروه نانوذرات چیتوسان-سیلی‌مارین افزایش معنی‌داری ($P<0/001$) نسبت به گروه بیمار مشاهده گردید. همچنین این شاخص در گروه نانوذرات چیتوسان-سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سیلی‌مارین افزایش معنی‌دار ($P<0/05$) را نشان داد. در بررسی میزان فعالیت آنزیم CAT در ناحیه هیپوکامپ

گرفتند. در روز بعد در مرحله آشنایی، موش‌ها به مدت ۵ دقیقه درون محفظه‌ای با دو شئی یکسان قرار گرفتند. برای مرحله آزمون حافظه بلند مدت ۲۴ ساعت پس از آشنایی، حیوانات به مدت ۵ دقیقه در حضور یک شئی آشنا و یک شئی جدید شروع به کاوش کردند. در فاصله بین آزمایشات برای از بین بردن نشانه‌های بو، اشیاء و جعبه کاملاً با اتانول شستشو داده شده و خشک گردید. زمان صرف شده برای کاوش در هر یک از دو شئی با استفاده از دوربین دیجیتال ثبت گردید. در نهایت اطلاعات به دست آمده تجزیه و تحلیل شد (۱۵). پس از انجام آزمایش رفتاری، موش‌ها سربریده و برش‌گیری از مغز انجام گرفت. ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکامپ مغز در یک میلی‌لیتر بافر شامل ۰/۳۲ مول در لیتر ساکارز، یک میلی‌مول در لیتر EDTA و ۱۰ نانومول در لیتر Tris-HCl با $\text{PH}=7/4$ هموزن شدند. محلول هموزن به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۶۰۰ سانتریفوژ شدند و محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سطح مالون دی‌آلدهید مورد استفاده قرار گرفت. سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد و استاندارد آلبومین سرم گاوی^{۱۰} انجام شد (۱۶). فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت کاتالاز به روش جنت^{۱۱} و همکاران انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل ۱ میلی‌لیتر حاوی بافر سدیم فسفات با $\text{PH}=7$ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار بود که شامل ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 است. جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت زمان ۲ دقیقه و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با محلول شاهد که شامل همه مواد به غیر از بافت هموزن است، اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: مخلوط واکنش در حجم کل ۱ میلی‌لیتر شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات، ۴۸ میلی‌مولار پیروگال، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. تغییر جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۴ دقیقه و دمای ۲۴ درجه در مقایسه با محلول شاهد اندازه‌گیری شد (۱۷). فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز: با روش رومرو^{۱۲} و بر پایه اکسیداسیون NADPH انجام شد. مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با $\text{PH}=7$ است که



¹⁰ Bovine Serum Albumin

¹¹ Genet

¹² Romero

نمودار ۱- بررسی اثر پیش‌تیمار با سیلی‌مارین و نانوذرات چیتوسان-سیلی‌مارین بر شاخص تبعیض در آزمون شئی-جدید، نتایج به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شده است. ($P<0/01$) و ($P<0/001$) در مقایسه با گروه کنترل، ($P<0/001$) در مقایسه با گروه بیمار، ($P<0/05$) در مقایسه با گروه سیلی‌مارین.

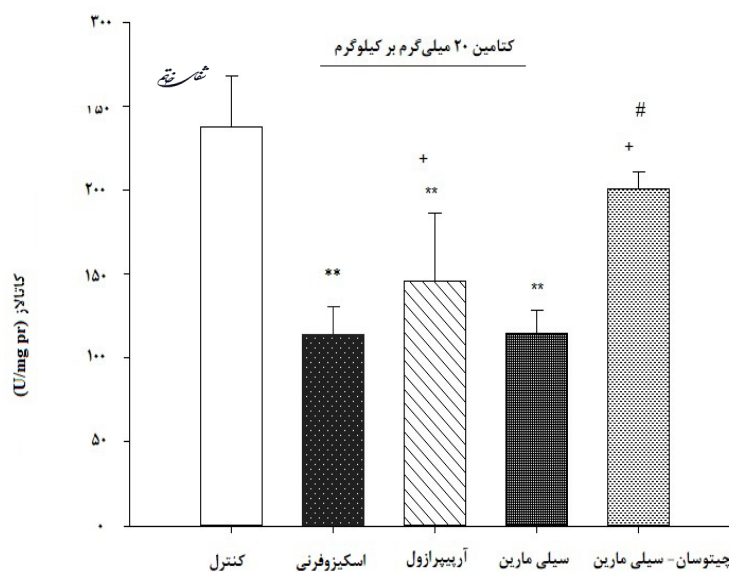
گروه‌های آرپیپرازول و نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) را در مقایسه با گروه بیمار نشان داد.

با بررسی فعالیت آنزیم GRX در ناحیه هیپوکامپ مغز مطابق نمودار ۴ مشخص شد گروه‌های بیمار و آرپیپرازول ($P < 0.01$) و سیلی مارین کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. فعالیت این آنزیم در گروه نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین ($P < 0.05$) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه بیمار داشت. همچنین در گروه نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین نسبت به گروه سیلی مارین افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) مشاهده گردید.

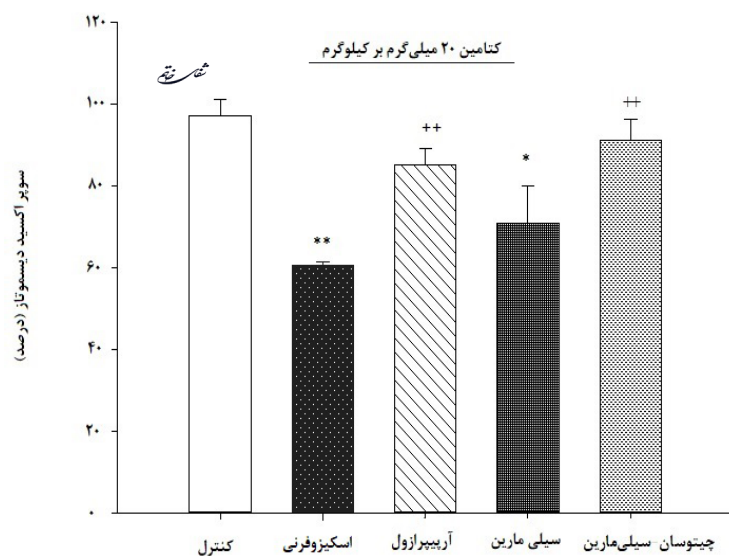
با توجه به نمودار ۵ سطح MDA در ناحیه هیپوکامپ

مغز بر اساس نمودار ۲، گروه‌های بیمار، آرپیپرازول و سیلی مارین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) را نشان دادند. این شاخص در گروه‌های آرپیپرازول و نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین، افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) را نسبت به گروه بیمار نشان داد. همچنین میزان فعالیت کاتالاز در گروه نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین در مقایسه با گروه سیلی مارین افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) را نشان می‌دهد.

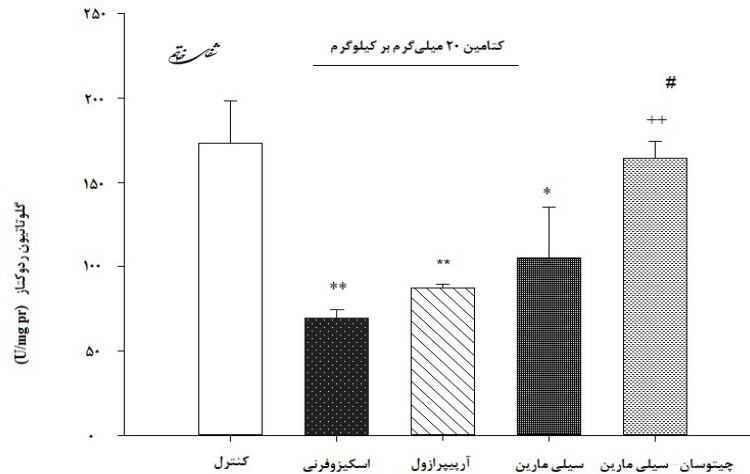
در بررسی میزان فعالیت آنزیم SOD در ناحیه هیپوکامپ مغز بر اساس نمودار ۳، در گروه بیمار ($P < 0.01$) و گروه سیلی مارین ($P < 0.05$) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نمایان گردید. همچنین فعالیت این آنزیم در



نمودار ۲- بررسی اثرات پیش‌تیمار با سیلی مارین و نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین بر میزان فعالیت آنزیم CAT در ناحیه هیپوکامپ مغز، (n=7)، نتایج به صورت Mean±SD بیان شده است. ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل، ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه بیمار، ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه سیلی مارین.



نمودار ۳- بررسی اثرات پیش‌تیمار با سیلی مارین و نانوذرات چیتوسان-سیلی مارین بر میزان فعالیت آنزیم SOD در ناحیه هیپوکامپ مغز، (n=7)، نتایج به صورت Mean±SD بیان شده است. ($P < 0.05$)، ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل، ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه بیمار، ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه سیلی مارین.



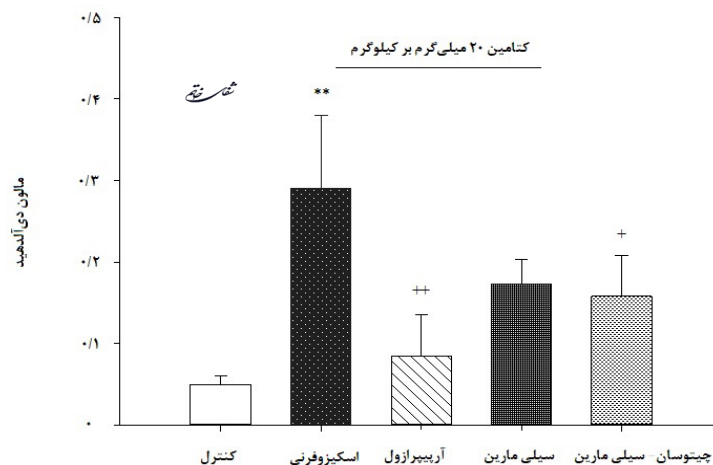
نمودار ۴- بررسی اثرات پیش تیمار با سیلی مارین و نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین بر میزان فعالیت آنزیم GRX در ناحیه هیپوکامپ مغز، نتایج به صورت Mean±SD بیان شده است. ($P < 0.05$) و ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل، ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه بیمار، ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه سیلی مارین.

هیپوکامپ مغز موش کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که تزریق درون صفاقی کتامین با غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مدت ۱۵ روز متوالی موجب اختلال در شناسایی شیء جدید نسبت به گروه کنترل شده و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلو تا ئیون ردو کتاز را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده و میزان مالون دی آلدئید را به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می دهد. کتامین جایگاه اتصال به گیرنده گلو تاماتی نوع NMDA را مسدود می کند و متعاقباً از ورود یون های کلسیم از طریق غشای پلاسمایی نورون جلوگیری کرده و موجب اختلالات شناختی و رفتاری در مدل حیوانی اسکیزوفرنی می شود (۲۱). در این راستا، هاسر و همکاران در سال

مغز مورد سنجش قرار گرفت که گروه بیمار افزایش معنی دار ($P < 0.01$) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. همچنین سطح مالون دی آلدئید در گروه های آریپیرازول و نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین نسبت به گروه بیمار به ترتیب کاهش معنی دار ($P < 0.01$) و ($P < 0.05$) را نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری

از دیرباز گیاه خار مریم در طب سنتی مورد استفاده بوده است. سیلی مارین دارای انواع فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، محافظت کننده عصبی و کبدی و همچنین خواص ضد باکتریایی، ضد ترومبوتیکی و عروقی است (۲۰). در این مطالعه، شاخص های بیوشیمیایی مربوط به سیستم آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در بافت



نمودار ۵- بررسی اثرات پیش تیمار با سیلی مارین و نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین بر سطح MDA در ناحیه هیپوکامپ مغز، نتایج به صورت Mean±SD بیان شده است. ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل، ($P < 0.05$) و ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه بیمار.

عملکرد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین به حساب می‌آیند (۲۷). در این مطالعه، اثر مصرف ۳۰ روزه سیلی‌مارین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر تغییرات رفتاری موش‌هایی که با تزریق درون‌صفاقی کتامین به مدت ۱۵ روز با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دچار رفتارهای شبه اسکیزوفرنی شدند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار با سیلی‌مارین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای مدت ۳۰ روز باعث کاهش شاخص تبعیض در موش‌های دریافت‌کننده کتامین در مقایسه با گروه کنترل گردید. در همین راستا، حدادی و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثر حفاظت عصبی سیلی‌مارین را بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در مغز موش بررسی کرده و نشان دادند که دریافت خوراکی سیلی‌مارین به صورت گاوژ و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای ۱۴ روز متوالی، موجب کاهش استرس اکسیداتیو و نیتروساتیو، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها (کاهش سطح MDA) می‌شود. همچنین سیلی‌مارین باعث افزایش میزان GSH و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در قشر و هیپوکامپ مغز موش می‌گردد (۲۸). در این مطالعه برای بهبود دسترسی زیستی سیلی‌مارین در غلظت‌های پایین از حالت کونژوگه^{۱۶} آن با چیتوسان استفاده شد که سبب افزایش دسترسی زیستی سیلی‌مارین گردید. نتایج بیوشیمیایی حاصل از بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدان‌های بافت هیپوکامپ مغز موش و مصرف نانوذرات چیتوسان- سیلی‌مارین نشان‌دهنده این است که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلووتاتیون ردوکتاز در گروه پیش‌تیمار شده با نانوذرات چیتوسان- سیلی‌مارین با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار نشان داد. همچنین سطح مالون دی‌آلدهید در گروه دریافت‌کننده نانوذرات چیتوسان- سیلی‌مارین با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه بیمار کاهش معنی‌داری را نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط یونیس و همکاران در سال ۲۰۱۶ جهت بررسی اثر نانوذرات چیتوسان در افزایش جذب و دسترسی زیستی^{۱۷} سیلی‌مارین صورت گرفت، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک^{۱۸} مشخص شد که نانوذرات چیتوسان باعث افزایش ثبات سیلی‌مارین شده و از تخریب آن‌ها در دستگاه گوارش جلوگیری کرده و همچنین موجب کاهش تولید ROS می‌شود. تجویز خوراکی چیتوسان- سیلی‌مارین با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳ هفته به‌طور قابل توجهی از استرس اکسیداتیو، روند فیبروز و میزان فاکتور نکروز تومور α (TNF- α)^{۱۹} کاسته و این در حالی است که فاکتور رشد سلول‌های کبیدی

۲۰۱۷ برای ایجاد مدل حیوانی اسکیزوفرنی از کتامین به‌صورت تزریق زیر جلدی^{۱۳} با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۴ روز متوالی استفاده کردند که اختلالات ترکیبی در کشف و شناسایی شی جدید را نشان داد که از علائم منفی و شناختی اسکیزوفرنی می‌باشد (۲۲). بیالون و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای ایجاد مدل حیوانی اسکیزوفرنی از کتامین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۷ روز به صورت تزریق درون‌صفاقی^{۱۴} استفاده نمودند، آن‌ها گزارش کردند که مصرف مزمن کتامین سبب اختلال اجتماعی، اختلال در عملکرد هیپوکامپ و حافظه طولانی مدت و آسیب به حافظه شناختی در آزمون شناسایی شی جدید می‌گردد (۲۳). مطالعه کاوایورا و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد که تزریق درون‌صفاقی کتامین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۸ روز متوالی باعث افزایش مالون دی‌آلدهید و کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در هیپوکامپ می‌گردد (۲۴). حاجی‌زاده مقدم و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثر حفاظتی نانوفیتوزوم کورکومین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۰ روز را در موش‌هایی با مدل کتامینی اسکیزوفرنی بررسی کرده و نشان دادند پیش‌تیمار با نانوفیتوزوم کورکومین به‌طور معنی‌دار آسیب مغزی ناشی از کتامین را بهبود میبخشد که با کاهش قابل توجه رفتارهای افسردگی و شبه اضطرابی، اختلال حافظه و نشانگرهای استرس اکسیداتیو در بافت‌های قشری و زیر قشری مشخص شد. همچنین نانوفیتوزوم کورکومین در مقایسه با کورکومین بهتر عمل کرده است (۱۳). استرس اکسیداتیو به‌دلیل عدم تعادل بین گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها ایجاد می‌شود. کتامین، به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و در نتیجه موجب علائم شناختی و منفی اسکیزوفرنی می‌شود (۲۵). مصرف تحت مزمن کتامین در موش کوچک آزمایشگاهی، فعالیت NADPH اکسیداز را افزایش داده و همچنین باعث افزایش استرس اکسیداتیو در قشر پیش‌پیشانی، تالاموس و هیپوکامپ شده که موجب از بین رفتن اینترنورون‌های پاروالبومین^{۱۵} مشابه با بیماری اسکیزوفرنی می‌شود. فان و همکاران نشان دادند که استرس اکسیداتیو در بیماران اسکیزوفرنی موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، CAT شده و همچنین موجب کاهش آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی در مایعات بدن می‌شود (۲۶). سیلی‌مارین به واسطه مکانیسم‌هایی مثل کاهش سایتوکین‌های التهابی، کاهش استرس اکسیداتیو، تغییر در تشکیلات آپوپتوز سلولی و گیرنده استروژن اثر حفاظت عصبی خود را اعمال می‌کند. همچنین دفع رادیکال‌های آزاد و بهبود

¹³ Subcutaneous injection

¹⁴ Intraperitoneal injection

¹⁵ Parvalbumin interneurons

¹⁶ Conjugated

¹⁷ Bioavailability

¹⁸ Histopathological

نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین بر شاخص‌های رفتاری و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در بافت هیپوکامپ مغز بررسی شد. نتایج بهبود اختلالات شناختی القا شده با کتامین در گروه تحت درمان با نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین را نشان داد. همچنین نتایج شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت هیپوکامپ مغز نشان داد که پیش‌تیمار با نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین باعث افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش در سطح مالون دی‌آلدهید می‌گردد. مصرف نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین نسبت به سیلی مارین به تنهایی، به دلیل افزایش دسترسی زیستی و حلالیت آبی در درمان اسکیزوفرنی و اختلالات متعاقب آن از جمله اختلالات شناختی کارایی بالاتری داشته و موفق‌تر عمل کرده است. بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان استراتژی درمانی مناسب برای بهبود اسکیزوفرنی استفاده نمود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام گرفت. بدین وسیله از مسئولین مربوطه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

1. Alavian F, Alavian K, Ghiasvand S, Rezaeian L. Protective Effects of Cherry Extract on Malondialdehyde Levels, Catalase Activity, and Edema Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in a Rat Stroke Model. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2020; 8(3): 1-9.
2. Ahmadi M, Banazadeh Dardashti M, Karimzadeh F. The anti-aggressive effect of music therapy in an animal model of schizophrenia. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2014; 2(1):51-5.
3. MacDonald AW, Schulz SC. What we know: findings that every theory of schizophrenia should explain. *Schizophrenia bulletin*. 2009; 35(3): 493-508.
4. Hintze B, Borkowska A. Intensity of negative symptoms, working memory and executive functions disturbances in schizophrenic patients in partial remission period. *Psychiatria Polska*. 2011; 45(4): 457-67.
5. Ben-Azu B, Aderibigbe AO, Eneni A-EO, Ajayi AM, Umukoro S, Iwalewa EO. Morin attenuates neurochemical changes and increased oxidative/nitrogenic stress in brains of mice exposed to ketamine: prevention and reversal of schizophrenia-like symptoms. *Neurochemical Research*. 2018; 43(9): 1745-55.

^{۲۰} (HGF) را افزایش داده است (۲۹). حاجی‌زاده مقدم و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر حفاظتی نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را در ایسکمی مغزی^{۲۱} فراگیر بررسی کرده و نشان دادند درمان با سیلی مارین و چیتوسان- سیلی مارین موجب کاهش علائم افسردگی و بهبود اختلالات حافظه و یادگیری شده و مانع از کاهش شاخص تبعیض می‌شود. همچنین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT، SOD و GRx پس از ایسکمی شده و توانسته پراکسیداسیون لیپید را کاهش دهد. همچنین مهار فاکتورهای NF- κ B می‌تواند سیتوکین‌های التهابی مانند TNF- α و IL-6 را کاهش دهد. این در حالی است که نانوذرات چیتوسان- سیلی مارین توانسته به مراتب عملکرد بهتری نسبت به سیلی مارین داشته باشد (۱۴). همچنین حاجی‌زاده مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش دادند که تزریق کتامین سبب بروز اختلالات رفتاری^{۲۲} در موش کوچک آزمایشگاهی می‌گردد (۳۰). مطالعه دیگری توسط کوئن و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد و آنها نشان دادند که بارگذاری سیلی مارین^{۲۳} با نانوذرات چیتوسان موجب افزایش کارایی، انتشار پایدار سیلی مارین و کاهش تخریب حین عبور از دستگاه گوارش شده و همچنین موجب تحویل هدفمند آن به بافت مورد نظر شده است (۳۱). در این پژوهش اثرات محافظت عصبی پیش‌تیمار با سیلی مارین و

منابع

6. Xu K, Lipsky RH. Repeated ketamine administration alters N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit gene expression: implication of genetic vulnerability for ketamine abuse and ketamine psychosis in humans. *Experimental Biology and Medicine*. 2015; 240(2): 145-55.
7. Leri M, Scuto M, Ontario ML, Calabrese V, Calabrese EJ, Bucciantini M, et al. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(4): 1250.
8. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 2019; 299: 125124.
9. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience*. 2002; 16(11): 2103-12.
10. Ghosh A, Ghosh T, Jain S. Silymarin-a review on the pharmacodynamics and bioavailability enhancement approaches. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2010; 2(10): 348-55.
11. Afjeh Dana E, Marivani M, Mehravi B, Karimzadeh F, Ashtari K. Development of Nanoparticles for

¹⁹ Tumor necrosis factor (TNF- α)

²⁰ Hepatocyte growth factor

²¹ Cerebral ischemia

²² Cognitive disorders

²³ Silibinin

- Drug Delivery to the Brain. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam. 2017; 5(2): 76-87.
12. Ali A, Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. International journal of biological macromolecules. 2018; 109: 273-86.
13. Moghaddam AH, Maboudi K, Bavaghar B, Sangdehi SRM, Zare M. Neuroprotective effects of curcumin-loaded nanophytosome on ketamine-induced schizophrenia-like behaviors and oxidative damage in male mice. Neuroscience Letters. 2021; 765: 136249.
14. Moghaddam AH, Sangdehi SRM, Ranjbar M, Hasantabar V. Preventive effect of silymarin-loaded chitosan nanoparticles against global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. European Journal of Pharmacology. 2020; 877: 173066.
15. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive processing. 2012; 13(2):93-110.
16. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. Current Protocols in Pharmacology. 2007; 38(1): A. 3A. 1-A. 3A. 29.
17. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). Molecular and cellular biochemistry. 2002; 236(1): 7-12.
18. Romero FJ, Romá J, Bosch-Morell F, Romero B, Segura-Aguilar J, Llombart-Bosch A, et al. Reduction of brain antioxidant defense upon treatment with butylated hydroxyanisole (BHA) and Sudan III in Syrian golden hamster. Neurochemical research. 2000; 25(3): 389-93.
19. Kim MS, Lee JI, Lee WY, Kim SE. Neuroprotective effect of Ginkgo biloba L. extract in a rat model of Parkinson's disease. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2004; 18(8): 663-6.
20. Demir M, Amanvermez R, Polat AK, Karabıçak I, Cınar H, Kesicioğlu T, et al. The effect of silymarin on mesenteric ischemia-reperfusion injury. Medical Principles and Practice. 2014; 23(2): 140-4.
21. Urban-Kowalczyk M, Pigońska J, Śmigielski J. Pain perception in schizophrenia: influence of neuropeptides, cognitive disorders, and negative symptoms. Neuropsychiatric disease and treatment. 2015; 11: 2023.
22. Hauser MJ, Isbrandt D, Roeper J. Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia. Behavioural brain research. 2017; 332: 316-26.
23. Białoń M, Żarnowska M, Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A. Pro-cognitive effect of 1MeTIQ on recognition memory in the ketamine model of schizophrenia in rats: the behavioural and neurochemical effects. Psychopharmacology. 2020; 237(6): 1577-93.
24. Kawaura K, Koike H, Kinoshita K, Kambe D, Kaku A, Karasawa J-i, et al. Effects of a glycine transporter-1 inhibitor and D-serine on MK-801-induced immobility in the forced swimming test in rats. Behavioural brain research. 2015; 278: 186-92.
25. Coronel-Oliveros CM, Pacheco-Calderón R. Prenatal exposure to ketamine in rats: Implications on animal models of schizophrenia. Developmental psychobiology. 2018; 60(1): 30-42.
26. Fan N, Luo Y, Xu K, Zhang M, Ke X, Huang X, et al. Relationship of serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-18 and schizophrenia-like symptoms in chronic ketamine abusers. Schizophrenia research. 2015; 169(1-3): 10-5.
27. Pradhan S, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian journal of medical research. 2006; 124(5): 491.
28. Haddadi R, Shahidi Z, Eyvari-Brooshghalan S. Silymarin and neurodegenerative diseases: Therapeutic potential and basic molecular mechanisms. Phytomedicine. 2020; 79: 153320.
29. Younis N, Shaheen MA, Abdallah MH. Silymarin-loaded Eudragit® RS100 nanoparticles improved the ability of silymarin to resolve hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016; 81: 93-103.
30. Hajizadeh Moghaddam A. The protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf extract on locomotor activity and anxiety-like behaviors in a ketamine model of schizophrenia. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2016; 19(5): 31-41.
31. Kuen CY, Fakurazi S, Othman SS, Masarudin MJ. Increased loading, efficacy and sustained release of silibinin, a poorly soluble drug using hydrophobically-modified chitosan nanoparticles for enhanced delivery of anticancer drug delivery systems. Nanomaterials. 2017; 7(11): 379.