



Research Article

Effect of Encapsulating Linalool and Ascorbic Acid in Chitosan Nanoparticles on Amyloid Plaque Deposition in the CA3 Region of the Hippocampus in Alzheimer's Disease Model Rats

Mohammad Pakdel¹ , Masoumeh Asle-Rousta^{2*} , Akram Eidi¹

¹. Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

². Department of Physiology, Za.C., Islamic Azad University, Zanzan, Iran.

* **Corresponding author:** Masoumeh Asle-Rousta. Department of Physiology, Za.C., Islamic Azad University, Zanzan, Iran. Email: mrousta@iau.ac.ir

DOI: [10.22034/cmja.16.2.90](https://doi.org/10.22034/cmja.16.2.90)

How to Cite this Article:

Pakdel M, Asle-Rousta M, Eidi A. Effect of Encapsulating Linalool and Ascorbic Acid in Chitosan Nanoparticles on Amyloid Plaque Deposition in the CA3 Region of the Hippocampus in Alzheimer's Disease Model Rats. *Complement Med J.* 2026;16(2): 90-98. DOI: [10.22034/cmja.16.2.90](https://doi.org/10.22034/cmja.16.2.90)

Received: February 25, 2026

Accepted: July 28, 2026

Keywords:

Alzheimer's disease
Ascorbic acid
Beta-amyloid
Hippocampus
Linalool
Nanochitosan

© 2026 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease. The most important indicators of AD are amyloid plaque deposition and tau hyperphosphorylation. The present study aimed to investigate the effect of linalool and ascorbic acid-chitosan nanoparticles on the deposition of amyloid plaques in the CA3 hippocampus of AD model rats.

Methods: Forty male Wistar rats were divided into eight groups, including Control, AD, phosphate-buffered saline (PBS), AD-Chitosan, AD-Linalool, AD-nano Linalool, AD-Ascorbic acid, and AD-nano Ascorbic acid groups. The AD model was induced in rats by bilateral intracerebroventricular injection of beta-amyloid (5 µg in 2 µl). Treatment with linalool (25 mg/kg), nanolinalool (25 mg/kg), ascorbic acid (100 mg/kg), and nanoascorbic acid (100 mg/kg) was performed by gavage for 30 days. At the end of the period, after staining the hippocampus with thioflavin S, the amount of amyloid plaque deposition in the CA3 region was examined.

Results: The percentage of amyloid plaque deposition in the CA3 region of the hippocampus of the AD-Linalool, AD-nano Linalool, AD-Ascorbic acid, and AD-nano Ascorbic acid groups was significantly lower compared to the AD group ($p < 0.001$). Plaque deposition was significantly reduced in the AD-nano Linalool group compared to the AD-Linalool group ($p < 0.05$), and in the AD-nano Ascorbic acid group compared to the AD-Ascorbic acid group ($p < 0.01$).

Conclusion: Encapsulation of linalool and ascorbic acid in chitosan nanoparticles increased the ability of these natural compounds to reduce amyloid plaque deposition in the hippocampus of AD model rats. Encapsulation of these compounds may enhance their neuroprotective effect in the AD model rats.

INTRODUCTION

Amyloid beta ($A\beta$), the main component of amyloid plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD), is a promising target for the AD treatment (1, 2). Linalool is an acyclic monoterpene that has neuroprotective effects (6, 7) and can reduce $A\beta$ production and tau hyperphosphorylation in AD model mice (8). Ascorbic acid is also a potent antioxidant (9) and its protective effects have been demonstrated in the brains of AD model rats (12).

Research has shown that linalool and ascorbic acid do not completely eliminate the damage to the nervous system in AD; for example, they cannot completely prevent the formation and deposition of amyloid plaques in the brain (8, 12). Therefore, it is necessary to find ways to increase their effectiveness. The present study was conducted to investigate the effect of encapsulating linalool and ascorbic acid in chitosan nanoparticles on the deposition of amyloid plaques in the CA3 region of the hippocampus of AD model rats.

METHODS

A total of 40 adult male Wistar rats were randomly divided into eight groups (n=5, each) as follows:

1. Control group (intact rats).
2. Phosphate-buffered saline (PBS) group: These animals received PBS as an $A\beta$ solvent intraventricularly using stereotaxic surgery.
3. AD group: These rats received $A\beta$ 1-42 at a dose of 10 μ g per rat (5 μ g per lateral ventricle) via intracerebroventricular injection (16).
4. AD-Chitosan group: These rats received chitosan (200 mg/kg) after intracerebroventricular injection of $A\beta$ 1-42 (17).
5. AD-Linalool group: These animals received linalool (25 mg/kg) after intracerebroventricular injection of $A\beta$ 1-42 (18).
6. AD-nano-Linalool group: These rats received nano-linalool (25 mg/kg) after intracerebroventricular injection of $A\beta$ 1-42.
7. AD-Ascorbic acid group: These rats received ascorbic acid (100 mg/kg) after intracerebroventricular injection of $A\beta$ 1-42 (12).
8. AD-nano-Ascorbic acid group: These animals received nano-ascorbic acid (100 mg/kg) after intracerebroventricular injection of $A\beta$ 1-42.

All rats except the control group underwent stereotaxic surgery. The coordinates of AP: -0.8 mm, L: $\pm$ 1.5 mm, V: 3.8 mm were selected for the injection site using a rat brain atlas (20). Chitosan, linalool, nano-linalool, ascorbic acid, and nano-ascorbic acid were administered by gavage one day after stereotaxic surgery and continued for 30 consecutive days. Then, the brain hemispheres were transferred to 10% formalin solution for histological examination. The sectioning was performed at a distance of 2.7 mm to 3.7 mm posterior to the bregma. Then, 1% thioflavin S was used to stain amyloid plaques, and the percentage

of amyloid plaque deposition (indicated by green color) was calculated for each animal (21).

Results are presented as mean $\pm$ standard error. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used to determine differences between groups. A P -value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Examination of the nanoparticles using field emission scanning electron microscopy revealed that the nanoparticles have a nearly spherical structure, are clustered together, and have a diameter of less than 0.2 μ m. The results of the dynamic light scattering test also confirmed this, reporting a diameter of 159 nm for the linalool nanoparticle and a diameter of 125 nm for the ascorbic acid nanoparticle.

The percentage of amyloid plaque deposition in the CA3 region of the hippocampus of the AD group was significantly increased compared to the control group ($p < 0.001$). While the percentage of amyloid plaque deposition in the AD-Linalool, AD-nano-Linalool, AD-Ascorbic acid and AD-nano-Ascorbic acid groups was significantly lower compared to the AD group ($p < 0.001$). Plaque deposition was significantly reduced in the AD-nano Linalool group compared to the AD-Linalool group ($p < 0.05$), and in the AD-nano Ascorbic acid group compared to the AD-Ascorbic acid group ($p < 0.01$; Figure 4).

CONCLUSION

Overall, encapsulation of linalool and ascorbic acid in chitosan nanoparticles increases the ability of these natural compounds to reduce the deposition of amyloid plaques in the CA3 region of the hippocampus of AD model rats.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All procedures for working with animals were carried out in accordance with ethical principles (Ethics code: IR.IAU.SRB.REC.1402.338).

Funding

This research received no financial support.

Authors' Contributions

Mohammad Pakdel performed the experiments and collected the required data. Masoumeh Asle-Rousta conceived and designed the experiments, analyzed the collected data, and wrote and revised the manuscript. Akram Eidi conceived and designed the experiments.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Dr. Mehdi Sadegh for his invaluable support.



اثر کپسوله کردن لینالول و اسید آسکوربیک در نانوذرات کیتوزانی بر رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی

در ناحیه CA3 هیپوکامپ رت‌های مدل بیماری آلزایمر

محمد پاکدل^۱، معصومه اصل روستا^{۲*}، اکرم عیدی^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲ گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

* نویسنده مسئول: معصومه اصل روستا. گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

ایمیل: mrousta@iau.ac.ir

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۰۶

واژگان کلیدی:

بیماری آلزایمر

بتا آمیلوئید

لینالول

اسید آسکوربیک

هیپوکامپ

نانوکیتوزان

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

مقدمه: بیماری آلزایمر نوعی بیماری تحلیل‌برندهٔ عصبی پیشرونده است. مهم‌ترین شاخص‌های بیماری آلزایمر عبارت‌اند از رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی و هیپرفسفریلاسیون تاو. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر نانوذرات کیتوزانی لینالول و اسید آسکوربیک بر رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیهٔ CA3 هیپوکامپ موش‌های مدل آلزایمر انجام شد.

روش کار: چهل رت نر نژاد ویستار به گروه‌های کنترل، آلزایمر، PBS، آلزایمر-کیتوزان، آلزایمر-لینالول، آلزایمر-نانولینالول، آلزایمر-اسید آسکوربیک و آلزایمر-نانو اسید آسکوربیک تقسیم شدند. مدل آلزایمر در رت‌ها با تزریق داخل بطن مغزی و دوطرفهٔ بتا آمیلوئید (5 µg در 2 µl) ایجاد شد. تیمار با لینالول (25 mg/kg)، نانولینالول (25 mg/kg)، اسید آسکوربیک (100 mg/kg) و نانو اسید آسکوربیک (100 mg/kg) طی ۳۰ روز به صورت گاواژ انجام شد. در پایان دوره، پس از رنگ‌آمیزی هیپوکامپ با تیوفلاوین S، میزان رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیهٔ CA3 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: درصد رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیهٔ CA3 هیپوکامپ گروه‌های آلزایمر-لینالول، آلزایمر-نانولینالول، آلزایمر-اسید آسکوربیک و آلزایمر-نانو اسید آسکوربیک در مقایسه با گروه آلزایمر به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0/001$). رسوب پلاک‌ها کاهش معنی‌داری را در گروه آلزایمر-نانولینالول در مقایسه با گروه آلزایمر-لینالول ($p < 0/05$) و همچنین در گروه آلزایمر-نانو اسید آسکوربیک در مقایسه با گروه آلزایمر-اسید آسکوربیک ($p < 0/001$) نشان داد.

نتیجه گیری: کپسوله کردن لینالول و اسید آسکوربیک در نانوذرات کیتوزانی موجب شد توانایی این ترکیبات طبیعی در کاهش رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در هیپوکامپ رت‌های مدل بیماری آلزایمر افزایش یابد. احتمال دارد کپسوله کردن این ترکیبات، اثر محافظت عصبی آنها را در رت‌های مدل بیماری آلزایمر تقویت کند.

لازم است روش‌هایی برای افزایش اثربخشی آنها پیدا کرد.

چالش‌های متعددی در تولید دارو برای بیماری‌های سیستم عصبی ازجمله بیماری آلزایمر وجود دارد. یکی از این موارد، نفوذپذیری انتخابی سد خونی-مغزی است که اجازه ورود هر ماده‌ای را به مغز نمی‌دهد. چالش دیگر آن است که بسیاری از داروهای سیستم عصبی مرکزی، برای اثربخشی مناسب باید در دوزهای بالا تجویز شوند که ممکن است عوارض جانبی به جای بگذارد. نانوحامل‌های پلیمری، راه حل امیدوارکننده‌ای برای کاهش این عوارض جانبی ارائه می‌دهند. آن‌ها نه تنها محدودیت‌های مربوط به انتقال دارو از طریق سد خونی-مغزی را کاهش می‌دهند، بلکه امکان رهاسازی کنترل‌شده دارو را نیز فراهم می‌کنند. نانوذرات کیتوزانی حامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر اما پایداری هستند که واجد امتیازاتی همچون زیست‌سازگاری، آزادسازی پایدار دارو، سمیت ناچیز و تهیه آسان و ارزان هستند (۱۳، ۱۴).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کپسوله‌کردن لینالول و اسیدآسکوربیک در نانوذرات کیتوزانی بر رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیه CA3 هیپوکامپ رت‌های مدل آلزایمر طراحی و اجرا شد.

روش کار

ابتدا ۲ گرم لینالول (سیگماآلد ریچ، آمریکا) و ۵ گرم اسیدآسکوربیک (سیگماآلد ریچ، آمریکا) به‌طور جداگانه به‌ترتیب در دی‌متیل سولفوکسید ۱۰٪ و آب مقطر حل شده و سپس به‌صورت مجزا به محلول اسیداستیکی کیتوزان (۱ mg/ml) (سیگماآلد ریچ، آمریکا) اضافه شدند. پس از حل کردن کامل و همگن‌سازی مخلوط، محلول سدیم تری‌پلی‌فسفات (۰/۲ mg/ml) به‌صورت قطره‌قطره اضافه شد. پس از یک ساعت، محلول به‌طور کامل حل شد و نانوذرات تشکیل شدند. برای جداسازی نانوذرات، سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت یک ساعت انجام شد. سپس رسوب حاصل در آب مقطر حل شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵). ریخت‌شناسی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مورد مطالعه قرار گرفت و قطر آنها توسط تست پراکندگی نور پویا (DLS) اندازه‌گیری شد.

در این تحقیق تجربی تعداد ۴۰ رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد شامل دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، چرخه نور و تاریکی منظم ۱۲:۱۲ ساعته، تهویه مناسب و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

رت‌ها به‌صورت تصادفی به ۸ گروه (هر گروه شامل ۵ رت) به‌ترتیب زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل: در این گروه، رت‌ها جراحی نشدند و تیماری هم دریافت نکردند.

گروه بافر فسفات سالین (PBS): این حیوانات تحت جراحی با دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند و PBS را به‌عنوان حلال $A\beta$ به‌صورت داخل بطن مغز دریافت کردند.

گروه آلزایمر: این گروه از حیوانات، $A\beta 1-42$ (سیگماآلد ریچ،

آلزایمر یک بیماری تحلیل‌برنده عصبی است که عمدتاً در سالمندان ظاهر می‌شود. مهم‌ترین شاخص‌های این بیماری عبارت‌اند از رسوب خارج سلولی پلاک‌های آمیلوئیدی و تجمع درون سلولی کلافه‌های نوروفیبریل (که از پروتئین تاو هیپرفسفریله تشکیل شده است) در مناطق مختلف مغز ازجمله هیپوکامپ و نئوکورتکس. آمیلوئید بتا ($A\beta$) که در مسیر آمیلوئیدوژنیک به‌دنبال عملکرد پروتئولیتیک آنزیم‌های بتاسکرتاز و گاماسکرتاز از پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید تولید می‌شود، جزء اصلی پلاک‌های آمیلوئیدی است. براساس فرضیه آبشار آمیلوئید، رسوب $A\beta$ در مغز به‌معنی آغاز پیدایش بیماری آلزایمر است، زیرا $A\beta$ محرکی برای فسفریلاسیون تاو، مرگ سیناپس‌ها و مرگ نورونی است که به اختلال شناختی منجر می‌شود. درحال حاضر، محققان بر این باور هستند که $A\beta$ یک هدف امیدوارکننده برای درمان بیماری آلزایمر است (۱، ۲) در این راستا شرکت‌های داروسازی، ترکیبات سنتتیک نظیر Verubecestat، LY2886721 و AN-1792 را برای ممانعت از رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز معرفی کردند. این ترکیبات باوجود موفقیت نسبی در کاهش علائم بیماری آلزایمر، اثرات جانبی فراوانی را به‌جای گذاشتند و به همین علت، مورد تأیید قرار نگرفتند. امروزه ترکیبات طبیعی به‌عنوان درمان‌های ایمن و ارزان، توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. درحال حاضر، استفاده از ترکیبات طبیعی بر دو رویکرد متمرکز شده است که عبارت‌اند از هدف‌گیری سکرتازهای سازنده $A\beta$ و تداخل مستقیم با تجمع $A\beta$ (۳).

لینالول یک مونوترپن غیرحلقوی است که در گیاهان مختلف ازجمله اسطوخودوس، ترنج و اکالیپتوس وجود دارد. لینالول پس از مصرف خوراکی، به‌راحتی از روده جذب می‌شود و توانایی عبور از سد خونی-مغزی را نیز دارد (۴، ۵). تحقیقات نشان داده است لینالول دارای اثرات محافظت عصبی است (۶، ۷). این مونوترپن می‌تواند تولید $A\beta$ و هیپرفسفریلاسیون تاو را در موش‌های مدل بیماری آلزایمر کاهش دهد (۸).

اسید آسکوربیک یک ترکیب آلی محلول در آب است که به‌فراوانی در میوه‌ها و سبزیجات وجود دارد و یک آنتی‌اکسیدان قوی محسوب می‌شود (۹). شواهد حاکی از آن است که سطح اسید آسکوربیک در پلاسما بیماران مبتلا به آلزایمر، کمتر از افراد سالم است (۱۰). اسیدآسکوربیک توسط حامل سدیم-ویتامین C از سد خونی-مغزی عبور می‌کند (۱۱). اثرات حفاظتی اسید آسکوربیک در مغز رت‌های مدل بیماری آلزایمر به اثبات رسیده است (۱۲).

باوجود اینکه لینالول و اسید آسکوربیک دارای اثرات محافظت عصبی در مدل بیماری آلزایمر هستند، اما تحقیقات نشان داده است این ترکیبات طبیعی، آسیب‌ها را به‌طور کامل از بین نمی‌برند؛ مثلاً نمی‌توانند به‌طور کامل از تشکیل و رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز جلوگیری کنند (۸، ۱۲). بنابراین

تزریق مطمئن شویم، ۲ دقیقه پس از پایان هر تزریق، نیدل را از محل تزریق خارج نمودیم.

یک روز پس از جراحی و تزریق $\text{A}\beta 1-42$ ، روند درمان به روش گاواژ روزانه، به مدت ۳۰ روز متوالی انجام گرفت. یک روز پس از پایان درمان، موش‌ها تحت بیهوشی عمیق با گاز CO_2 کشته شدند و مغز آنها استخراج شد و بررسی‌های بافت‌شناسی انجام گرفت.

نیمکره‌های مغز به مدت ۷۲ ساعت در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. سپس آب‌گیری با درجات صعودی اتانول انجام شد و از زایلول برای سخت‌شدن و آماده‌سازی بافت برای قالب‌گیری در پارافین استفاده شد. پس از قالب‌گیری، برش‌گیری در فاصله ۲/۷ میلی‌متر تا ۳/۷ میلی‌متر خلفی برگما (که حاوی هیپوکامپ است) انجام گرفت. تعداد ۱۰ برش به ضخامت ۵-۶ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم از هر حیوان تهیه و به لام‌ها انتقال داده شد. سپس از تیوفلاوین S ۱٪ (سیگماآلد ریچ، آمریکا) برای رنگ‌آمیزی پلاک‌های آمیلوئیدی استفاده شد. تعداد ۱۰ برش از هر حیوان برای رسوب یا عدم رسوب پلاک آمیلوئیدی (که با رنگ سبز مشخص شد) در ناحیه CA3 مورد مطالعه قرار گرفت و درصد رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی برای هر حیوان محاسبه شد (۲۱).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شده‌اند. برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تصویر نانوذرات کیتوزانی لینالول و اسیدآسکوربیک که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی تهیه شده است در شکل ۱ نمایش داده شده است. در تصویر مشخص است که نانوذرات، ساختار تقریباً کروی دارند، به حالت تجمعی در کنار هم قرار گرفته‌اند و قطر آنها کمتر از ۰/۲ میکرومتر است. نتایج حاصل از تست پراکندگی نور پویا نیز این موضوع را تأیید کرد، زیرا قطر ۱۵۹ نانومتر را برای نانوذره لینالول و قطر ۱۲۵ نانومتر را برای نانوذره اسیدآسکوربیک گزارش کرد (شکل ۲).

آمریکا) را با دوز ۱۰ میکروگرم برای هر رت (۵ میکروگرم به ازای هر بطن جانبی) از طریق تزریق داخل بطنی توسط جراحی با دستگاه استریوتاکسی دریافت کردند (۱۶).

گروه آلزایمر-کیتوزان: این رت‌ها پس از تزریق داخل بطنی $\text{A}\beta 1-42$ ، کیتوزان (۲۰۰ mg/kg) را دریافت کردند (۱۷).

گروه آلزایمر-لینالول: این گروه پس از تزریق داخل بطنی $\text{A}\beta 1-42$ ، لینالول (۲۵ mg/kg) را دریافت کردند (۱۸).

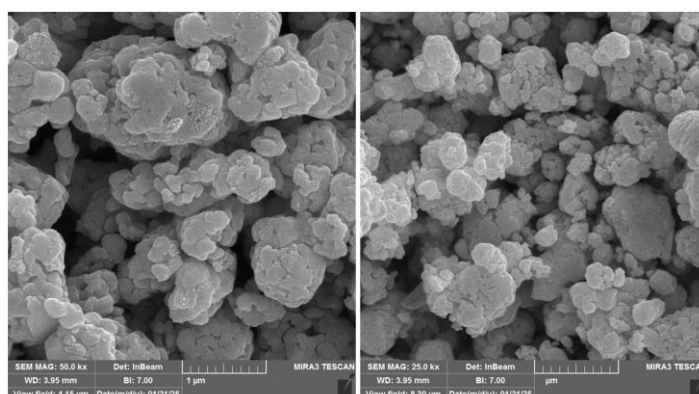
گروه آلزایمر-نانولینالول: این رت‌ها پس از تزریق داخل بطنی $\text{A}\beta 1-42$ ، نانولینالول (۲۵ mg/kg) را دریافت کردند.

گروه آلزایمر-اسیدآسکوربیک: این رت‌ها پس از تزریق داخل بطنی $\text{A}\beta 1-42$ ، اسید آسکوربیک (۱۰۰ mg/kg) را دریافت کردند (۱۲).

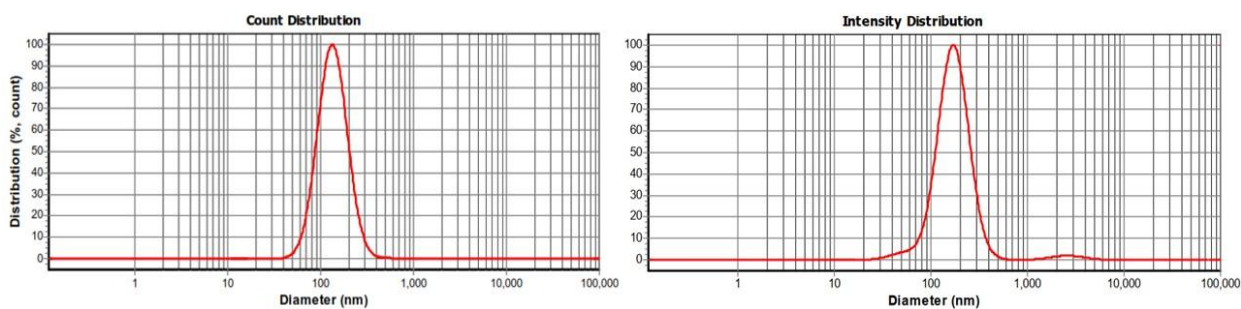
گروه آلزایمر-نانواسیدآسکوربیک: این حیوانات پس از تزریق داخل بطنی $\text{A}\beta 1-42$ ، نانواسید آسکوربیک (۱۰۰ mg/kg) را دریافت کردند.

تیمار کیتوزان، لینالول، نانولینالول، اسیدآسکوربیک و نانواسیدآسکوربیک به‌روش گاواژ، یک روز پس از جراحی استریوتاکسی آغاز شد و به مدت سی روز متوالی، هر روز یک بار در ساعت ۹ تا ۱۰ صبح، ادامه یافت. در پایان دوره، حیوانات با دی‌اکسیدکربن بیهوش شدند و پس از جداسازی سر، نیمکره‌های مغز به محلول فرمالین (به‌عنوان تثبیت کننده) منتقل شد.

همه رت‌ها، به‌جز گروه کنترل، تحت جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند. ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ mg/kg) و زایلین (۲۰ mg/kg) بیهوش شدند (۱۹). سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس قرار گرفت و با مشخص شدن استخوان جمجمه، مختصات محل تزریق پیدا شد. مختصات $V: 3.8 \text{ mm}$, $L: \pm 1.5 \text{ mm}$, $AP: -0.8 \text{ mm}$ با استفاده از اطلس مغز رت برای محل تزریق انتخاب شد (۲۰). در گروه PBS، ۲ میکرولیتر PBS به‌عنوان حلال $\text{A}\beta$ با استفاده از میکروسرنج همیلتون به هر بطن تزریق شد. در بقیه گروه‌ها نیز برای القای آلزایمر، $\text{A}\beta 1-42$ (۵ میکروگرم در ۲ میکرولیتر) به هر بطن جانبی تزریق شد. سرعت تزریق، ۱ میکرولیتر در هر دقیقه بود. برای اینکه از خارج‌نشدن PBS یا $\text{A}\beta 1-42$ از محل



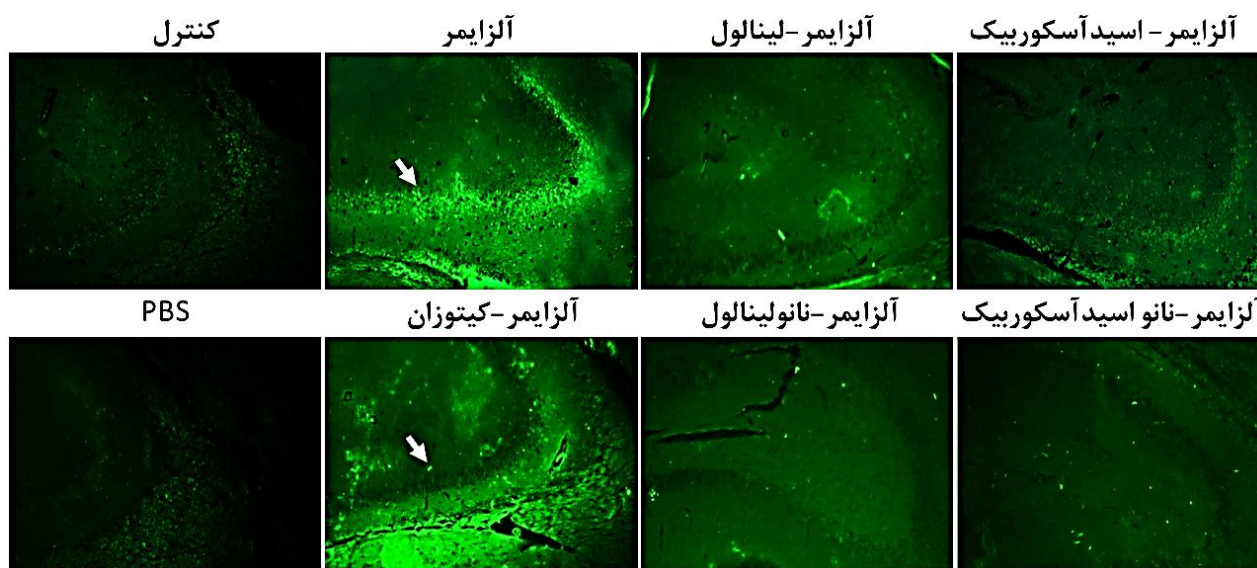
شکل ۱. تصویر نانوذرات کیتوزانی لینالول (راست) و اسیدآسکوربیک (چپ) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM).



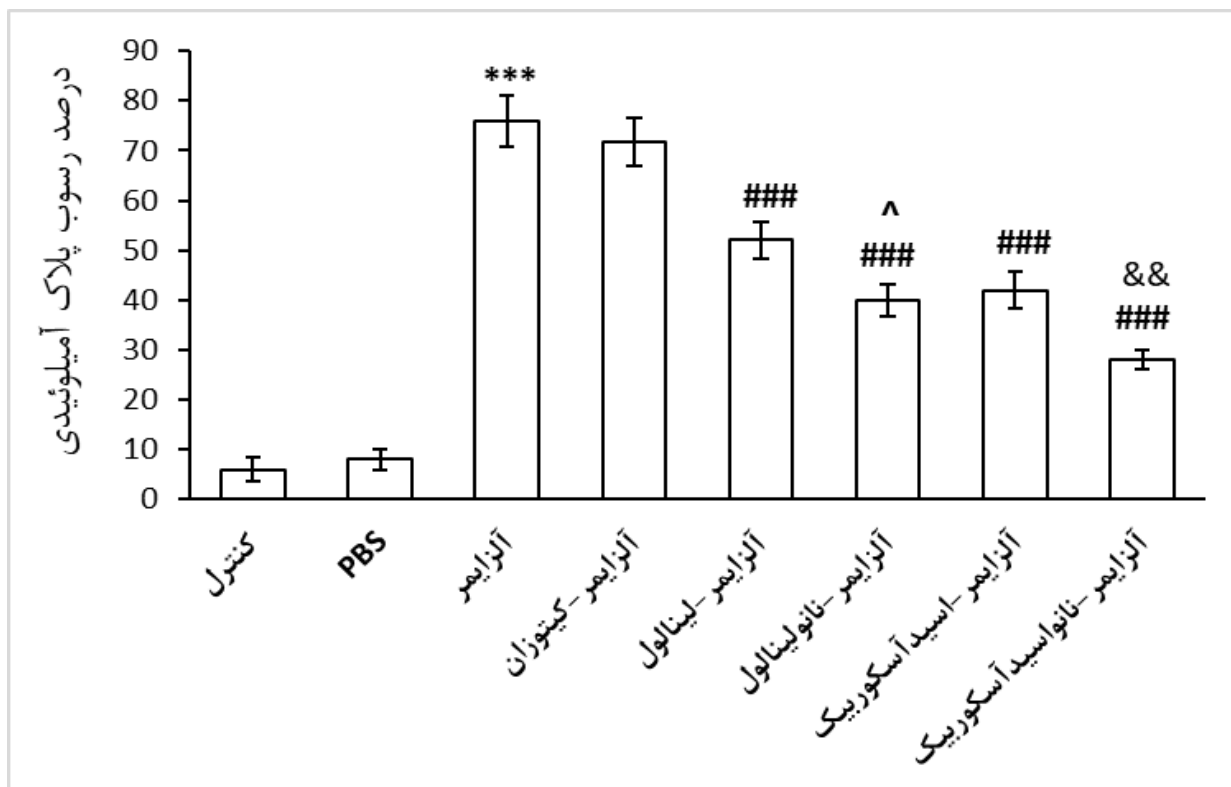
شکل ۲. نتایج حاصل از تست پراکندگی نور پویا (DLS) برای نانوذرات کیتوزانی لینالول (راست) و اسیدآسکوربیک (چپ).

آلزامر-نانواسیدآسکوربیک در مقایسه با گروه آلزامر به طور معنی داری کمتر بود (به ترتیب $p=0/0005$ ، $p=0/0002$ ، درصد رسوب پلاک‌ها در گروه آلزامر-نانولینالول در مقایسه با گروه آلزامر-لینالول، کاهش معنی داری را نشان داد ($p=0/023$) و درصد رسوب پلاک‌ها در گروه آلزامر-نانواسیدآسکوربیک نیز در مقایسه با گروه آلزامر-اسیدآسکوربیک به طور معنی داری کمتر بود ($p=0/009$) (شکل ۴). تفاوت معنی داری بین گروه‌های کنترل و PBS و نیز بین گروه‌های آلزامر و آلزامر-کیتوزان مشاهده نشد.

بررسی میکروسکوپی برش‌های رنگ‌آمیزی شده با تیوفلاوین، حاکی از رسوب گسترده پلاک آمیلوئیدی در گروه‌های آلزامر و آلزامر-کیتوزان بود، اما تیمار با لینالول، نانولینالول، اسیدآسکوربیک و نانواسیدآسکوربیک، تا حد زیادی از رسوب پلاک‌ها ممانعت کرد (شکل ۳). بررسی آماری نشان داد درصد رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیه CA۳ در گروه آلزامر، افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p=0/0001$)؛ درحالی‌که درصد رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه‌های آلزامر-لینالول، آلزامر-نانولینالول، آلزامر-اسیدآسکوربیک و



شکل ۳. فتومیکروگراف‌های ناحیه CA۳ هیپوکامپ رنگ‌آمیزی شده با تیوفلاوین. فلش سفید، پلاک آمیلوئیدی را نشان می‌دهد (۱۰۰X).



شکل ۴. مقایسه آماری درصد پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیه CA3 هیپوکامپ. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شده است ($n=5$). $p<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، $p<0.001$ در مقایسه با گروه آلزایمر، $p<0.05$ در مقایسه با گروه آلزایمر-لینالول و $p<0.01$ در مقایسه با گروه آلزایمر-اسیدآسکوربیک (مقایسه بین گروه‌ها توسط تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام گرفته است).

بحث

این تحقیق، با هدف بررسی اثر کپسوله کردن لینالول و اسیدآسکوربیک بر رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیه CA3 هیپوکامپ رت‌های مدل بیماری آلزایمر طراحی شد. القای بیماری آلزایمر با استفاده از تزریق دوطرفه و داخل بطنی $A\beta 1-42$ انجام گرفت که پس از سی روز، موجب رسوب گسترده پلاک‌های آمیلوئیدی در ناحیه CA3 هیپوکامپ رت‌ها شد. نتایج این بخش از مطالعه با گزارش هالدر (Halder) و همکاران (۲۲) همسو است. پس از تیمار سی‌روزه لینالول، اسیدآسکوربیک، نانولینالول و نانواسیدآسکوربیک، رسوب پلاک‌ها در ناحیه CA3 حیوانات مدل آلزایمر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

بررسی میکروسکوپی ناحیه CA3 نشان داد لینالول و نانولینالول، رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی را در موش‌های مدل آلزایمر کاهش دادند. اخیراً ساین (Singh) و همکاران (۲۳) ثابت کردند لینالول به طور مستقیم به پپتید $A\beta$ متصل می‌شود و نه تنها از تشکیل فیبریل‌های $A\beta$ جلوگیری می‌کند، بلکه موجب تخریب فیبریل‌های قبلی در مغز حیوانات مدل بیماری آلزایمر می‌شود. این گزارش با نتایج مطالعه حاضر همسو است. اما گروه آلزایمر-نانولینالول در مقایسه با گروه آلزایمر-لینالول، کاهش معنی‌داری در رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی داشت. تحقیقات نشان داده است که ۹۰ دقیقه پس از ورود لینالول به بدن، غلظت آن در مغز به طور قابل توجهی بالا می‌رود اما ۳۰ دقیقه بعد، غلظت آن به شدت کاهش می‌یابد (۲۴). این موضوع را می‌توان چالش بزرگی در اثرگذاری لینالول برای مهار رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی دانست.

کامپوس (Campos) و همکاران (۲۵) نشان دادند کپسوله کردن لینالول و کارواکرول در نانوذرات کیتوزانی امکان آزادسازی آهسته و پایدار این ترکیبات را فراهم می‌کند. بنابراین کاهش معنی‌دار رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه آلزایمر-نانولینالول در مقایسه با گروه آلزایمر-لینالول ممکن است به دلیل جلوگیری از کاهش سریع سطح لینالول در مغز باشد.

علاوه بر این، مطالعه حاضر نشان داد رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در موش‌های مدل آلزایمر که با اسیدآسکوربیک و نانواسیدآسکوربیک تیمار شده بودند، به طور معنی‌داری کمتر از گروه آلزایمر بود. در تأیید یافته‌های این بخش از مطالعه، نتایج حاصل از یک تحقیق نشان داد که بین اسیدآسکوربیک و مونومرهای $A\beta 1-42$ برای اتصال به الیگومرهای $A\beta 1-42$ رقابت وجود دارد. به ویژه، اسیدآسکوربیک می‌تواند الیگومرهای کوچک را بی‌ثبات کند و حتی ممکن است فیبریل‌های $A\beta$ را معکوس کند (۲۶). در مطالعه حاضر، نانو اسیدآسکوربیک در کاهش و مهار رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی مؤثرتر از اسیدآسکوربیک عمل کرد. تحقیقات نشان داده است بیان حامل سدیم-اسیدآسکوربیک، که نقش اساسی را در ورود این ویتامین به مغز ایفا می‌کند، در مغز موش‌های مدل آلزایمر کاهش می‌یابد؛ به طوری که افزایش بیان این حامل، موجب بهبود انعطاف‌پذیری سیناپسی و تقویت حافظه در این حیوانات می‌شود (۲۷).

این گزارش نشان می‌دهد ورود اسیدآسکوربیک به مغز حیوان مدل آلزایمر با مشکل مواجه می‌شود. با توجه به این که نانوذرات کیتوزانی می‌توانند داروها را از یک مسیر ترانسیتوز (که مجزا از

آمیلوئیدی در ناحیه CA³ هیپوکامپ رت‌های مدل بیماری آلزایمر افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر مهدی صادق به جهت حمایت‌های بی‌دریغشان در طراحی و اجرای تحقیق قدردانی می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل کار با حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و زیر نظر کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست-پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد (کد اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1402.338).

سهم نویسندگان

محمد پاکدل در طراحی تحقیق و جمع‌آوری داده‌ها، معصومه اصل روستا در طراحی تحقیق، تجزیه و تحلیل داده‌ها، تهیه پیش‌نویس مقاله و اصلاح آن و اکرم عیدی در طراحی تحقیق مشارکت داشتند.

تعارض منافع

تضاد منافعی در این تحقیق وجود ندارد.

References

- Long JM, Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell* 2019;179(2):312-39. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001 pmid
- Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in alzheimer's disease: pathogeny, etiology, and related therapeutic directions. *Molecules*. 2022;27(4):1210. doi: 10.3390/molecules27041210 pmid
- Lee JH, Ahn NH, Choi SB, Kwon Y, Yang SH. Natural products targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2341. doi: 10.3390/ijms22052341 pmid
- Aprosoae AC, Hăncianu M, Costache II, Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour frag J*. 2014;29(4):193-219. doi: 10.1002/ffj.3197
- Weston-Green K, Clunas H, Jimenez Naranjo C. A review of the potential use of pinene and linalool as terpene-based medicines for brain health: discovering novel therapeutics in the flavours and fragrances of cannabis. *Front Psychiatry*. 2021;12:583211. doi: 10.3389/fpsy.2021.583211 pmid
- Park H, Seol GH, Ryu S, Choi IY. Neuroprotective effects of linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. *Arch Pharm Res*. 2016;39(4):555-64. doi: 10.1007/s12272-016-0714-z pmid
- Chang WH, Hsu HT, Lin CC, An LM, Lee CH, Ko HH, et al. Linalool, a fragrance compound in plants, protects dopaminergic neurons and improves motor function and skeletal muscle strength in experimental models of parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):2514. doi: 10.3390/ijms25052514 pmid
- Sabogal-Guáqueta AM, Osorio E, Cardona-Gómez GP. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology*. 2016;102:111-20. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.002 pmid
- Njus D, Kelley PM, Tu YJ, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2020;159:37-43. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013 pmid
- Hamid M, Mansoor S, Amber S, Zahid S. A quantitative meta-analysis of vitamin C in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:970263. doi: 10.3389/fnagi.2022.970263 pmid
- Nualart F, Mack L, García A, Cisternas P, Bongarzone ER, Heitzer M, et al. Vitamin C transporters, recycling and the bystander effect in the nervous system: SVCT2 versus gluts. *Stem Cell Res Ther*. 2014;4(5):209. doi: 10.4172/2157-7633.1000209 pmid
- Olajide OJ, Yawson EO, Gbadamosi IT, Arogundade TT, Lambe E, Obasi K, et al. Ascorbic acid ameliorates behavioural deficits and neuropathological alterations in rat model of Alzheimer's disease. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;50:200-11. doi: 10.1016/j.etap.2017.02.010 pmid
- Manek E, Darvas F, Petroianu GA. Use of biodegradable, chitosan-based nanoparticles in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*. 2020;25(20):4866. doi: 10.3390/molecules25204866 pmid
- Sarvaiya J, Agrawal YK. Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:454-65. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.052 pmid
- Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;44(2-3):65-73. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.06.001 pmid
- Karakelle NA, Dinçer S, Sağlam AS. The effect of intracerebroventricular amyloid beta 1-42 application on cognitive

حامل است) از سد خونی-مغزی عبور دهند (۲۸). بنابراین امکان دارد سطح اسیدآسکوربیک در مغز گروه آلزایمر-نانواسیدآسکوربیک، متفاوت از گروه آلزایمر-اسیدآسکوربیک باشد چون مسیرهای ورودی متفاوتی را طی می‌کند. ازسوی دیگر، تأکید شده است که سطح اسیدآسکوربیک برای عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن در مغز بسیار مهم است. هنگامی که هیپوکامپ در معرض ازن قرار می‌گیرد، اسیدآسکوربیک به‌صورت وابسته به دوز، پراکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهد. باین‌حال، توانایی آن در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، در دوزهای پایین و دوزهای بسیار بالا کاهش می‌یابد (۲۹). ازآنجاکه استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تولید Aβ در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر دارد (۳۰) و نانو ذرات کیتوزانی، امکان آزادسازی مداوم دارو را فراهم می‌کنند (۳۱) احتمالاً نانو اسیدآسکوربیک کیتوزانی با آزادسازی تدریجی اسید آسکوربیک، سطح آن را در مغز حیوانات مدل آلزایمر در حد متعادل حفظ می‌کند و دوز بهینه‌ای از اسید آسکوربیک را در اختیار نورون‌ها قرار می‌دهد. از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم سنجش سطح لینالول و اسیدآسکوربیک در گروه‌های مختلف اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

کپسوله کردن لینالول و اسید آسکوربیک در نانوذرات کیتوزانی، توانایی این ترکیبات طبیعی را در کاهش رسوب پلاک‌های

- functions in aged rats supplemented with taurine and the change of peroxisomal proteins in this process. *Brain Res Bull.* 2021;172:89-97. doi: [10.1016/j.brainresbull.2021.04.011](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.011) pmid
17. Bilginaylar K, Aykac A, Sayiner S, Özkayalar H, Şehirli AÖ. Evaluation of the antiapoptotic and anti-inflammatory properties of chitosan in methotrexate-induced oral mucositis in rats. *Mol Biol Rep.* 2022;49(4):3237-45. doi: [10.1007/s11033-022-07158-x](https://doi.org/10.1007/s11033-022-07158-x) pmid
 18. Koriem KM, El-Qady SW. Linalool attenuates hypothalamus proteome disturbance facilitated by methamphetamine induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology.* 2023;99:70-81. doi: [10.1016/j.neuro.2023.09.007](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.09.007) pmid
 19. Oh SS, Narver HL. Mouse and rat anesthesia and analgesia. *Curr protoc.* 2024;4(2):e995. doi: [10.1002/cpz1.995](https://doi.org/10.1002/cpz1.995) pmid
 20. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates in Stereotaxic Coordinates*, 2006, 6th ed. Academic press, New York. [Link](#)
 21. Pakdel M, Asle-Rousta M, Sadegh M, Eidi A. Linalool vs linalool-loaded chitosan nanoparticles in an A β -induced rat model of Alzheimer's disease: A molecular, biochemical, histological, and behavioral study. *Iran J Basic Med Sci.* 2025;28(11):1495-1504. doi: [10.22038/ijbms.2025.88638.19143](https://doi.org/10.22038/ijbms.2025.88638.19143) pmid
 22. Halder T, Saha B, Dhas N, Acharya S, Acharya N. Development and evaluation of multi-functionalized sialic acid conjugated asiatic acid nanoconstruct to mitigate cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Drug Dev Res.* 2024;85(1):e22146. doi: [10.1002/ddr.22146](https://doi.org/10.1002/ddr.22146) pmid
 23. Singh R, Kaur N, Dhingra N, Kaur T. Linalool acts as a chemical chaperone by inhibiting amyloid- β aggregation. *Neurochem Int.* 2024;177:105762. doi: [10.1016/j.neuint.2024.105762](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105762) pmid
 24. Satou T, Hayakawa M, Kasuya H, Masuo Y, Koike K. Mouse brain concentrations of α -pinene, limonene, linalool, and 1, 8-cineole following inhalation. *Flavour Fragr J.* 2017;32(1):36-9. doi: [10.1002/ffj.3342](https://doi.org/10.1002/ffj.3342)
 25. Campos EV, Proença PL, Oliveira JL, Pereira AE, de Moraes Ribeiro LN, Fernandes FO, et al. Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. *Sci Rep.* 2018;8(1):7623. doi: [10.1038/s41598-018-26043-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26043-x) pmid
 26. Sampaio I, Quatroni FD, Lins PM, Nascimento AS, Zucolotto V. Modulation of beta-amyloid aggregation using ascorbic acid. *Biochimie.* 2022;200:36-43. doi: [10.1016/j.biochi.2022.05.006](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.05.006) pmid
 27. Portugal CC, Santos EC, Pacheco AM, Costa-Pinto S, Almeida TO, Tedim-Moreira J, et al. Increasing the vitamin C transporter SVCT2 in microglia improves synaptic plasticity and restrains memory impairments in Alzheimer's disease models. *bioRxiv.* 2024 doi: [10.1101/2024.02.29.582679](https://doi.org/10.1101/2024.02.29.582679)
 28. Caprifico AE, Foot PJ, Polycarpou E, Calabrese G. Overcoming the blood-brain barrier: Functionalised chitosan nanocarriers. *Pharmaceutics.* 2020;12(11):1013. doi: [10.3390/pharmaceutics12111013](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111013) pmid
 29. Figueroa-Méndez R, Rivas-Arancibia S. Vitamin C in health and disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front Physiol.* 2015;6:397. doi: [10.3389/fphys.2015.00397](https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00397) pmid
 30. Cai Z, Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2011;13(4):223-50. doi: [10.1007/s12017-011-8155-9](https://doi.org/10.1007/s12017-011-8155-9) pmid
 31. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EV, Rodríguez-Torres MD, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J nanobiotechnology.* 2018;16(1):71. doi: [10.1186/s12951-018-0392-8](https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8) pmid