

Neuroprotective Effect of Quercetin in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Model of Parkinson's Disease

Neda Nikokalam Nazif¹, Maryam Khosravi^{1*}, Ramesh Ahmadi², Maryam Bananej¹, Ahmad Majd¹

¹Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Physiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Article Info:

Received: 20 Feb 2019

Revised: 9 Jul 2019

Accepted: 25 Aug 2019

ABSTRACT

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a common neuropathological disorder caused by degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Quercetin (SNPC) is a compound with both anti-inflammatory and anti-oxidant effects, which can cross the blood brain barrier. The aim of the present study was to evaluate neuroprotective effect of quercetin in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced model of PD in male mice. **Materials and Methods:** 48 male NMRI mice were divided into 6 groups (n=8); control, saline, MPTP, MPTP+ 20mg/kg quercetin, MPTP+ 25mg/kg quercetin, and MPTP+ 30mg/kg quercetin. To induce PD model, MPTP (25mg/ Kg) was injected intraperitoneally (i.e.) for 4 day. Catalepsy test was assessed by test bars one and 21 days after the last injection MPTP. Quercetin (20, 25, 30mg/kg/day) was applied orally for 21 days. Dopaminergic neurons of SNPC were determined by immunohistochemical labeling. The levels of interleukin 10 and TNF- α were determined in the substantia nigra and the striatum using ELISA technique. **Results:** Treatment with quercetin was significantly improved catalepsy. Furthermore, quercetin significantly enhanced the number of neurons in SNPC, increased interleukin 10 protein levels, and reduced TNF- α protein values. **Conclusion:** Quercetin may exert a neuroprotective effect on progressive cell damage and the neuronal death in the substantia nigra in PD; possibly via modulation of inflammatory mediators.

Key words:

1. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
2. Quercetin
3. Mice

*Corresponding Author: Maryam Khosravi

E-mail: maryam-khosravi@iaui-tnb.ac.ir



اثر حفاظت عصبی کوئرتستین در مدل تجربی بیماری پارکینسون القاء شده با ۱-متیل-۴-فنیل-۳، ۳، ۳، ۱-تتراهیدروپیریدین

ندا نیکوکلام نظیف^۱، مریم خسروی^{۱*}، رامش احمدی^۲، مریم بنانج^۱، احمد مجد^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲گروه فیزیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۳ شهریور ۱۳۹۸

اصلاحیه: ۱۸ تیر ۱۳۹۸

دریافت: ۱ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

مقدمه: بیماری پارکینسون یک اختلال نوروپاتولوژیک شایع است که به علت دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه ایجاد می‌شود. کوئرتستین ترکیبی است با اثرات ضد التهابی و ضد اکسیدانی که می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظت عصبی کوئرتستین در مدل بیماری پارکینسون القاء شده با ۱-متیل-۴-فنیل-۳، ۳، ۳، ۱-تتراهیدروپیریدین درموش‌های سوری بود. **مواد و روش‌ها:** ۴۸ موش سوری نر نژاد NMRI به ۶ گروه (n=۸) کنترل، سالین، MPTP، MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرتستین، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرتستین، MPTP+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرتستین تقسیم شدند. برای القا مدل بیماری پارکینسون MPTP به صورت داخل صفاقی به مدت ۴ روز (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تزریق گردید. کاتالپسی توسط آزمون میله، یک روز پس از آخرین تزریق MPTP و در روز بیست و یک بررسی شد. کوئرتستین به مدت ۲۱ روز به صورت خوراکی (۳۰، ۲۵، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) گاوژ شد. نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه به کمک روش ایمنوهیستوشیمی مشخص و شمارش گردیدند. سطوح اینترلوکین-۱۰ و TNF- α در نواحی توده سیاه و جسم مخطط مغز توسط روش الایزا سنجش شد. **یافته‌ها:** درمان با کوئرتستین، به طور معنی‌داری سبب بهبود کاتالپسی شد. علاوه بر این کوئرتستین به صورت معنی‌داری شمارش نورونی در جسم سیاه را افزایش داده، سطوح پروتئین اینترلوکین-۱۰ را افزایش داده و سطح پروتئین TNF- α را کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** کوئرتستین ممکن است اثرات محافظت کننده‌ای عصبی از آسیب پیش‌رونده سلولی و مرگ سلول‌های عصبی دوپامینرژیک جسم سیاه در بیماری پارکینسون احتمالاً از طریق تنظیم واسطه‌های عصبی داشته باشد.

کلید واژه‌ها:

- ۱- ۱-متیل-۴-فنیل-۳، ۳، ۳، ۱-تتراهیدروپیریدین
۲. کوئرتستین
۳. موش

* نویسنده مسئول: مریم خسروی

آدرس الکترونیکی: maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir

مقدمه

اسیدهای فنلیک می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر عمل کنند (۱۵). گزارش شده مکانیسم‌های تخریب سلولی می‌تواند در اثر فعال شدن میکروگلیا و بروز آسیب‌های بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی^۳ ناشی از عملکرد آن‌ها رخ دهد. هرچند فعال شدن میکروگلیا برای بروز پاسخ ایمنی مناسب ضروری است ولی فعال شدن بیش از حد آن ایجادکنندهٔ آسیب‌های توکسیک است. این آسیب‌ها به واسطهٔ مسیره‌های مختلفی نظیر تولید سایتوکین‌های پیش التهابی مانند تومور نکروز آلفا (TNF- α)^۴ و اینترلوکین‌ها^۵ اعمال می‌شوند. این سایتوکین‌ها میکروگلیا را تحریک کرده و آزادسازی گلوتامات و مهار بازجذب آن را به دنبال دارد (۱۶). در این مطالعه ما اثر حفاظت عصبی کوئرستین در مدل تجربی بیماری پارکینسون القاء شده با ۱-متیل-۴-فنیل-۳،۲،۳-تتراهیدروپیریدین در موش‌های سوری نر را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

جهت انجام این مطالعه ۴۸ سر موش سوری نر نژاد NMRI، در محدودهٔ وزنی 25 ± 23 گرم خریداری شده از مرکز انیستو پاستور کرج استفاده شد. حیوانات در محدودهٔ دمایی ۲۴-۲۰ درجهٔ سانتیگراد، رطوبت ۴۵-۴۰ درصد و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌های پلاستیکی پوشیده شده با خاک اره در اتاق حیوانات نگهداری قرار گرفتند. انجام این آزمایشات مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (چاپ مؤسسهٔ سلامت ملی آمریکا، شمارهٔ ۲۳-۸۵ بازنگری شده در سال ۱۹۸۵) بود و مورد تأیید کمیتهٔ اخلاق دانشگاه آزاد واحد تهران شمال قرار گرفت.

گروه‌های آزمایشی

موش‌های سوری نر نژاد NMRI به‌طور تصادفی به ۶ گروه: ۱- گروه کنترل (دست نخورده)، ۲- گروه سالین، ۳- گروه MPTP، ۴- گروه MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین، ۵- گروه MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین، ۶- گروه MPTP+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین تقسیم شدند (n=۸). قبل از تزریق، حیوانات توسط ترازوی مخصوص توزین موش‌های سوری نر به‌منظور مشخص کردن میزان داروی لازم برای تزریق، وزن شدند.

ایجاد بیماری پارکینسون

طی چهار روز متوالی، گروه‌های پارکینسونی به صورت

بیماری پارکینسون یک اختلال عصبی پیشرونده که نوروپاتی‌های دوپامینی در مغز میانی و پروجکت‌های پوتامن و استریاتوم مغزی و قشر مغز را درگیر می‌سازد، همراه با لرزش، سفتی و کندگی و همچنین علائمی از جمله اختلالات اتونوم، اختلال در بویایی، اختلال در خواب، افسردگی و زوال عقل است (۱). شیوع بیماری پارکینسون در کشورهای پیشرفته ۰/۳ درصد در جمعیت عمومی، در حدود ۱ درصد در افراد بالای ۶۰ سال و ۴ درصد در افراد بالای ۸۰ سال است (۲). مهم‌ترین عوامل دژنراسیون نوروپاتی‌های دوپامینرژیک از قبیل استرس اکسیداتیو، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب DNA و کاهش سطح گلوپروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند (۳). در بیماری پارکینسون عوامل دخیل، منجر به اختلال در عملکرد میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیره‌های آپوپتوزی می‌گردند که در نهایت باعث تخریب نوروپاتی‌های دوپامینرژیک می‌گردند (۴). عوامل محیطی در آسیب تخریب‌کنندهٔ عصبی نقش مهمی ایفاء می‌کنند (۵). ایدهٔ مشارکت عوامل محیطی از کشف سم MPTP^۱ ناشی شده است که این محصول به صورت انتخابی در انسان و مدل‌های آزمایشگاهی باعث مرگ نوروپاتی‌های جسم سیاه می‌شود (۶).

کوئرستین^۲ یک پلی‌فنول طبیعی است که در سبزیجات و میوه‌جات یافت می‌شود و فلاونوئید اصلی در رژیم غذایی ما می‌باشد (۷). فلاونوئیدها فراوان‌ترین پلی‌فنول رژیم غذایی انسان می‌باشند (۸). فلاونوئیدها شامل آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، فلاوانول‌ها، فلاوانون‌ها، فلاوون‌ها و ایزوفلاوون‌ها می‌باشند که کوئرستین با ساختار ۳ و ۵ و ۷ و ۳-۴ - پنتاهیدروکسی فلاوون یکی از مهم‌ترین آن‌ها در گروه فلاونوئیدهاست (۹). کوئرستین استفادهٔ دارویی نیز دارد و می‌توان از آن برای پیشگیری و درمان بیماری‌های انحطاط نوروپاتی (بیماری‌های نوروژنیک) از جمله آلزایمر و پارکینسون استفاده کرد (۱۰). کوئرستین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد و همچنین این ماده می‌تواند از سد خونی مغزی عبور نماید (۱۱). در واقع کوئرستین اثرات محافظت‌کننده‌ای از نوروپاتی‌ها در مدل‌های ناشی از توکسین پارکینسون را دارد (۱۲). مطالعات جدیدی در ارتباط با گیاهان دارویی در درمان اختلالات حرکتی و شناختی ناشی از بیماری پارکینسون وجود دارد (۱۳). در یک بررسی نشان داده شده که در ارتباط با درد و اختلالات خلقی، ترکیب فنلی موجود در گیاهان دارویی، در بهبود درد ناشی از مدل پارکینسون است (۱۴). مطالعات نشان می‌دهد که در سطح مولکولی فنل‌های گیاهی از قبیل فلاونوئیدها، فلاونولیکان‌ها و

¹ 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

² Quercetin

³ Neurodegenerative

⁴ Tumor necrosis factor alpha

⁵ Interleukin

تثبیت شدند. سپس با HCL ۲ نرمال به مدت یک ساعت و به دنبال آن با بافر بورات ۰/۱ مولار (PH=۸/۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۰/۳ درصد تربیتون X-۱۰۰ و سرم بز ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد تیروزین هیدروکسیلاز (abcam)-(۱:۱۰۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد، پس از شستشو با بافر فسفات با آنتی‌بادی ثانویه DABi (abcam)-(۱:۱۰۰) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تاریکی قرار داده شد. مقاطع با میکروسکوپ ۱۰Y Medacm n و دوربین Dino Lite camera و نرم افزار ۲/۰ Dino Capture مطالعه و عکسبرداری شد. پس از رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی، وضعیت بافتی و تعداد نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه شمارش و تحلیل شد. نحوه تعداد شمارش نورون‌های عصبی با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus (V ۶)، در این بررسی نقاط با سایز بزرگتر از ۷ میکرومتر به‌عنوان هسته نورون‌های عصبی در نظر گرفته شد.

سنجش کمی سطح اینترلوکین -۱۰ و TNF- α توسط روش الایزا

با توجه به اطللس پاکسینوس، مغزهایی که از جمجمه خارج نموده‌ایم، نواحی جسم سیاه و جسم مخطط از سایر قسمت‌های مختلف مغز سریعاً جدا شده و در نیتروژن مایع قرار گرفت. پس از منجمد شدن، بافت در یخچال مخصوص و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از هموژنیز و سانتریفیوژ، در نهایت اندازه‌گیری سطح پروتئین TNF- α و اینترلوکین -۱۰ با استفاده از کیت الایزا (۱۰۰ ۷۴۷ ab) - Mouse TNF alpha (ELISA Kit, Mouse IL-10 ELISA kit (Interleukin-10 (ab ۱۰۸۸۷۰) محصول شرکت abcam اندازه‌گیری شد. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ۲۱۰۰ Stat Fax کشور فرانسه در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل معرف بلانک انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای هر گروه بیان شدند. به‌منظور طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف -اسمیرنوف استفاده شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. مقادیر $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بین گروه‌های MPTP، MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرتستین، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و

داخل صفاقی داروی MPTP (σ), در نرمال سالین حل نمودیم و دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند.

روش آماده‌سازی داروی کوئرتستین

۱ گرم کوئرتستین را در ۵ درصد دی متیل سولفوکسید در روغن ذرت حل شد سپس به هر حیوان میزان ۳۰، ۲۵، ۲۰، میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از محلول تهیه شده به صورت خوراکی و مدت ۲۱ روز متوالی گاوژ شدند.

آزمون میله

برای ارزیابی کاتالپسی از آزمون میله^۶ استفاده شد. این آزمون در جوندگانی که در آن‌ها پارکینسونیسم تجربی توسط هالوپریدول، متی‌روزین و رزپین و MPTP ایجاد شده است، برای ارزیابی کاتالپسی به کار می‌رود (۱۷). وسیله مورد استفاده در این آزمون، یک بارفیکس دارای یک سکوی چوبی بود. ارتفاع بارفیکس از سکو ۹ سانتی‌متر و قطر میله ۰/۹ سانتی‌متر است. برای انجام آزمایش، حیوان بر روی سکو قرار داده شد و دو دست آن به آرامی روی میله بارفیکس قرار داده شد مدت زمانی که حیوان در این وضعیت باقی ماند ثبت شد. بدیهی است هرچه کاتالپسی حیوان شدیدتر بود مدت زمان بیشتری در وضعیت اتصال سپری می‌کرد. پس از ایجاد مدل و درمان با کوئرتستین، سپس موش‌ها را ۲۴ ساعت پس از آخرین آزمایش، با رعایت اصول اخلاقی ابتدا با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین بیهوش نموده و سر آن‌ها با کمک قیچی مخصوص و جدا کردن کل مغز از جمجمه برای ایمنوهیستوشیمی، سنجش کمی سطح اینترلوکین -۱۰ و TNF- α خارج نموده‌ایم.

رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی

به‌منظور تأیید تخریب نورون‌های دوپامینی بخش متراکم جسم سیاه در اثر آسیب با نوروتوکسین، از آنتی‌بادی آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز (TH)^۷ استفاده شد. به‌منظور انجام این روش بافت‌های مغز پس از استخراج ۲۴ ساعت در فرمالین -سالین قرار داده شد، سپس مراحل آبیگری و پردازش روی آن‌ها انجام گرفت. بافت‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شد. ۲۴ ساعت پس از قالب‌گیری و سرد شدن کامل، قالب‌ها آماده برش‌گیری شد. برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری معمولاً با ضخامت ۱۰ میکرون انجام شد. برش‌ها پس از عبور از حمام آب گرم، زمانی که کاملاً بدون چروک بافتی بودند بر روی لام‌هایی که قبلاً آغشته به چسب شده‌اند قرار گرفت. چسب مورد استفاده در این روش با توجه به متعدد بودن مراحل شست و شو از چسب آلبومین استفاده شد که کاملاً سطح لام با آن آغشته شد. پس از قرار دادن لام‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت نیم ساعت

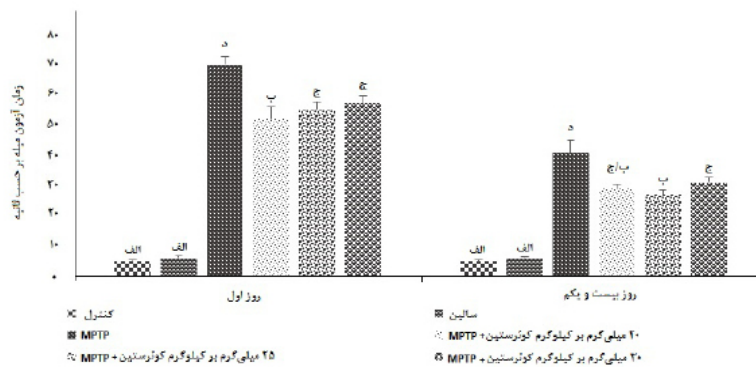
⁶ Bar-test

⁷ Tyrosine hydroxylase

تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است ($P > 0/05$)، ولی بین گروه $25+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین با $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین تفاوت معنی‌داری وجود داشته است ($P > 0/05$)، در یک نگاه کلی به نمودار، میزان اثر 25 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین در زمان آزمون میله نسبت به 20 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و 30 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین بیشتر بوده و کاهش معنی‌داری در زمان آزمون میله در مقایسه با گروه $MPTP$ ایجاد کرده است.

جدول ۱ مقادیر میانگین و انحراف معیار مربوط به شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه را نشان می‌دهد. آزمون ANOVA یکطرفه و تست تعقیبی توکی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تعداد شمارش نورونی بین گروه‌های کنترل ($151/67 \pm 7/638$) و سالین ($147/63 \pm 10/149$) با گروه $MPTP$ ($83/67 \pm 7/572$) وجود دارد ($P < 0/001$). گاوژ 20 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین ($103/67 \pm 9/019$) و 25 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین ($99/33 \pm 7/371$) به همراه $MPTP$ تفاوت معنی‌داری در تعداد شمارش نورونی ایجاد نکرد ($P > 0/05$) ولی گاوژ 30 میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین به همراه $MPTP$ افزایش معنی‌داری در تعداد شمارش نورونی ایجاد کرد ($30+MPTP$) میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین $145/33 \pm 7/095$ ($P < 0/001$) - ($83/67 \pm 7/572$ $MPTP$ و $145/33$

$30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین دارای افزایش معنی‌داری در زمان آزمون میله نسبت به گروه کنترل بودند ($P < 0/05$)، در حالی که گروه‌های کنترل و سالین تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P < 0/05$)، گروه‌های $25+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین، $20+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین با گروه $MPTP$ تفاوت معنی‌داری داشته است ($P < 0/05$)، در حالی که بین گروه‌های $25+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است ($P < 0/05$)، همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در روز ۲۱ گروه‌های $MPTP$ ، $20+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین، $25+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین دارای افزایش معنی‌داری در زمان آزمون میله نسبت به گروه کنترل بودند ($P < 0/05$)، در حالی که بین گروه‌های کنترل و سالین تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P > 0/05$)، در روز ۲۱ آزمون میله بین گروه $MPTP$ و سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشته است ($P < 0/05$)، همان‌گونه که در نمودار ۱ در روز ۲۱ آزمون میله مشخص است، بین گروه $20+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین با گروه‌های $25+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین و $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین



نتیجه

نمودار ۱- بررسی اثر کوئرتستین بر زمان آزمون میله در موش‌های سوری نر مبتلا به پارکینسون در روزهای اول و بیست و یکم. مقایسه زمان آزمون میله در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در روزهای اول، بیست و یکم، حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

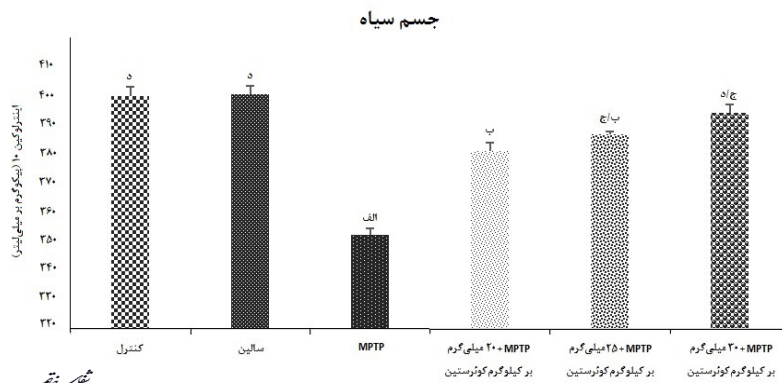
جدول ۱- شمارش نورونی دوپامینرژیک در برش‌های ناحیه جسم سیاه گروه‌های مورد آزمایش انجام شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است. میزان از دست رفتن معنی‌داری نورونی در گروه $MPTP$ در مقایسه با گروه‌های کنترل و سالین به صورت $P < 0/001$ نشان داده شده است. همچنین گروه $30+MPTP$ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین با گروه $MPTP$ افزایش معنی‌داری را نشان داده است ($P < 0/001$).

شمارش نورونی	گروه‌های مورد آزمایش
151/67 ± 7/638 ^a	کنترل (دست نخورده)
147/63 ± 10/149 ^b	سالین
83/67 ± 7/572 ^a	MPTP
103/67 ± 9/019 ^a	20 + MPTP میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین
99/33 ± 7/371 ^a	25 + MPTP میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین
145/33 ± 7/095 ^b	30 + MPTP میلی گرم بر کیلوگرم کوئرتستین

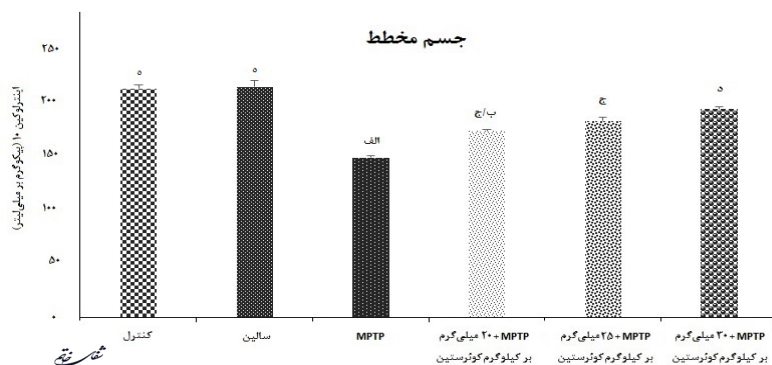
مشخصه

همان‌گونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، گروه MPTP ($147/6 \pm 1/808$) نسبت به گروه کنترل ($3/67$) $211/53 \pm$ کاهش معنی‌دار، سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم مخطط را دارا می‌باشد ($P < 0/05$). اینترلوکین -۱۰، به‌عنوان یک فاکتور ضد التهاب محسوب می‌شود و در گروه MPTP باعث کاهش سطح اینترلوکین -۱۰ در نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم مخطط در مدل حیوانی بیماری پارکینسون می‌شود. همچنین گروه‌های MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($172/23 \pm 1/779$)، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($181/4 \pm 3/387$) و MPTP+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($192/47 \pm 2/15$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار، سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم مخطط مشاهده شده است. در گروه‌های MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($172/23 \pm 1/779$)، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($181/4 \pm 3/387$) و MPTP+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($192/47 \pm 2/15$) نسبت به گروه MPTP ($147/6 \pm 1/808$) افزایش معنی‌دار سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم مخطط مشاهده شد ($P < 0/05$). گاوژ منظم کوئرستین به دلیل بودن خواص ضد التهابی باعث افزایش سطح اینترلوکین -۱۰ شده و از افزایش التهاب ناشی از MPTP در ناحیه جسم مخطط جلوگیری می‌شود.

همان‌گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، در گروه MPTP ($352/2 \pm 2/129$) نسبت به گروه کنترل ($3/383$) $399/77 \pm$ کاهش معنی‌دار، سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم سیاه را دارا می‌باشد ($P < 0/05$). اینترلوکین -۱۰، به‌عنوان یک فاکتور ضد التهاب محسوب می‌شود و در گروه MPTP باعث کاهش سطح اینترلوکین -۱۰ در نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه در مدل حیوانی بیماری پارکینسون می‌شود. همچنین گروه‌های MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($381/13 \pm 2/6$)، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($386/67 \pm 1/07$) نسبت به گروه کنترل ($399/77 \pm 3/383$) کاهش معنی‌دار، سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم سیاه شده است. در گروه‌های MPTP+۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($381/13 \pm 2/6$)، MPTP+۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($386/67 \pm 1/07$) و MPTP+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($394/17 \pm 2/815$) نسبت به گروه MPTP ($352/2 \pm 2/129$) افزایش معنی‌دار سطح اینترلوکین -۱۰ در جسم سیاه مشاهده شد ($P < 0/05$). گاوژ منظم کوئرستین به دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی باعث افزایش سطح اینترلوکین -۱۰ شده و از افزایش التهاب ناشی از MPTP در ناحیه جسم سیاه جلوگیری می‌شود.



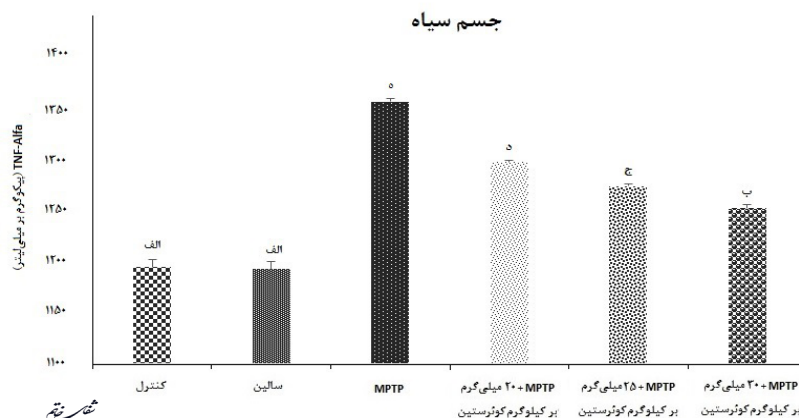
نمودار ۲- مقایسه سطح پروتئین اینترلوکین -۱۰ در ناحیه جسم سیاه مغز، داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است.



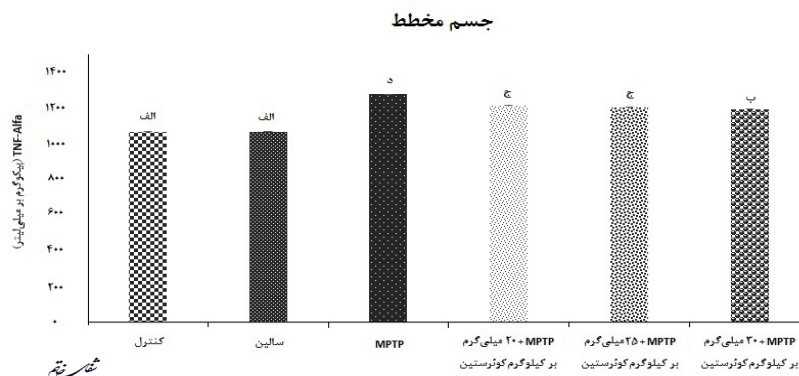
نمودار ۳- مقایسه سطح پروتئین اینترلوکین -۱۰ در ناحیه جسم مخطط مغز، داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است.

همچنین نتایج در نمودار ۵ نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار، سطح TNF- α در جسم مخطط در گروه MPTP ($1272/0.3 \pm 2/0.84$) نسبت به گروه کنترل ($1062/0.3 \pm 3/884$) می‌باشد که باعث افزایش میزان التهاب در نوروں‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم مخطط در مدل حیوانی شده است ($P < 0.05$). همچنین در گروه‌های MPTP+ 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1207/0.3 \pm 3/86$)، MPTP+ 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1198/7 \pm 1/552$) و MPTP+ 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1187/47 \pm 2/85$) نسبت به گروه کنترل ($1062/0.3 \pm 3/884$) افزایش معنی‌دار سطح TNF- α در جسم مخطط مشاهده شده است. در گروه‌های MPTP+ 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1207/0.3 \pm 3/86$)، MPTP+ 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1198/7 \pm 1/552$) و MPTP+ 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1187/47 \pm 2/85$) نسبت به گروه MPTP ($1272/0.3 \pm 2/0.84$) کاهش معنی‌دار سطح TNF- α در جسم مخطط مشاهده شد ($P < 0.05$). گواژ منظم کوئرستین به دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش سطح TNF- α شده است.

همان‌گونه که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، در گروه MPTP ($1354/2 \pm 3/172$) نسبت به گروه کنترل ($8/0.3 \pm 1193/3$) افزایش معنی‌دار، سطح TNF- α در جسم سیاه مشاهده شد که MPTP باعث افزایش میزان التهاب در نوروں‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه در مدل حیوانی بیماری پارکینسون می‌شود ($P < 0.05$). همچنین در گروه‌های MPTP+ 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1295/7 \pm 1/834$)، MPTP+ 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1272/5 \pm 2/303$) و MPTP+ 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1250/7 \pm 3/386$) نسبت به گروه کنترل ($1193/3 \pm 8/0.3$) افزایش معنی‌دار سطح TNF- α در جسم سیاه مشاهده شده است. در گروه‌های MPTP+ 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1295/7 \pm 1/834$)، MPTP+ 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1272/5 \pm 2/303$) و MPTP+ 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئرستین ($1250/7 \pm 3/386$) نسبت به گروه MPTP ($1354/2 \pm 3/172$) کاهش معنی‌دار سطح TNF- α در جسم سیاه مشاهده شد ($P < 0.05$). گواژ منظم کوئرستین به دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش سطح TNF- α شده است.



نمودار ۴- مقایسه سطح پروتئین TNF- α در ناحیه جسم سیاه مغز. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است.



نمودار ۵- مقایسه سطح پروتئین TNF- α در ناحیه جسم مخطط مغز. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معنی‌داری است.

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر حفاظت عصبی کوئرستین در مدل تجربی بیماری پارکینسون القاء شده با ۱-متیل-۴-فنیل-۲،۳،۶-تراهیدروپیریدین انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داده گاوژ کوئرستین در سه دوز ۲۵-۳۰-۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز موجب بهبود کاتالپسی و اثرات محافظتی عصبی نورونی در جسم سیاه و افزایش سطح اینترلوکین-۱۰ و کاهش سطح TNF- α در دو ناحیه جسم سیاه و جسم مخطط را دارا می باشند.

در مطالعات پیشین MPTP بعد از تجویز سیستمیک به سرعت از سد خونی مغز می گذرد، MPTP می تواند به واسطه آنزیم منوآمینواکسیداز-B (MAO-B)^۸ به یون ۱-متیل-۴-فنیل پیریدینیوم^۹ (MPP⁺) تبدیل شود. بعد از آن این ماده با مکانیسم ناشناخته‌ای به فضای خارج سلولی آزاد می شود، در داخل نورون‌های دوپامینرژیک تجمع پیدا کرده و کمپلکس میتوکندریال زنجیره انتقال الکترونی را مهار می کند و بدین صورت موجب افزایش گونه‌های رادیکال آزاد درون سلولی می شود که منجر به مرگ سلولی می گردد (۱۸) آزمون میله، برای ارزیابی کاتالپسی (سفتی عضلانی) القاء شده با MPTP استفاده شد. نتایج آزمون میله نشان داد که گروه MPTP نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری در زمان آزمون میله داشته است. بنابراین بر اساس تحقیقات انجام شده و همچنین طبق نتایج آزمون میله می توان اثرات مفید کوئرستین در بیماری پارکینسون را تأیید کرد. در نتیجه اثر یک دوره ۲۱ روز گاوژ کوئرستین، در گروه‌های دریافت کننده MPTP+۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرستین، گروه MPTP+۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرستین و MPTP+۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم کوئرستین باعث کاهش معنی داری در زمان آزمون میله نسبت به گروه MPTP شده است و به دلیل خواص آنتی اکسیدانتهی و ضد التهابی موجب بهبود کاتالپسی گردید. کوئرستین یکی از رایج ترین فلاونولها است و یک داروی محافظت کننده از نورون می باشد که می توان برای درمان پارکینسون استفاده نمود (۱۹). کوئرستین نیز به عنوان یک مهار کننده MAO-A^{۱۰} با جلوگیری از شکسته شدن دوپامین موجب حفظ سطوح دوپامین در نورون‌های دوپامینرژیک می شود (۲۰). مطالعات اخیر نشان دادند که کوئرستین از سد خونی مغزی عبور و با مهار تشکیل ROS^{۱۱} نقش محافظت نورونی ایفاء می کند (۲۱). شواهدی وجود دارد که فلاونوئیدها به طور مؤثری اثرات زیان بار رادیکالها، ROS و RNS^{۱۱} را رقیق می کنند (۲۲). کوئرستین از سلول‌های عصبی در مقابل تحلیل عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو در بیماری‌های عصبی محافظت می کند و موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، بهبود فعالیت کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز

و همچنین جلوگیری از کاهش گلوتاتیون می گردد (۲۳). نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داده تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه موش‌های دریافت کننده MPTP کاهش یافته است. در حالی که گاوژ کوئرستین به مدت ۲۱ روز موجب افزایش تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه شده است.

کوئرستین با خاصیت آنتی اکسیدانی، با مهار کاتکول-0-متیل با جلوگیری از کاهش دوپامین و حفظ سطح دوپامین موجب بهبود بقای سلول‌های عصبی می گردد، بنابراین در درمان بیماری پارکینسون شناخته شده است (۲۴). در مدل پارکینسونی ناشی از سم MPTP در سه غلظت کوئرستین ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورد بررسی قرار گرفته بود، نتایج نشان داده مؤثرترین غلظت از دو غلظت دیگر منجر به افزایش سطح دوپامین، استیل کولین و فعالیت حرکتی می گردد (۲۵). اگر غلظت کوئرستین به طور مستمر تکرار و باعث تجمع در پلاسما (نیمه عمر پلاسمائی کوئرستین ۸ تا ۱۱ ساعت) می گردد و سبب نتیجه مطلوب می شود (۲۶). در تحقیقات انجام شده سیستم عصبی نسبت به التهاب بسیار حساس بوده است و شواهد نشان داده که کوئرستین قادر به کاهش IL-1 α و TNF- α دو سایتوکین مرتبط با التهاب است. همچنین کوئرستین موجب کاهش مرگ نورون‌های دوپامینرژیک ناشی از فعالسازی میکروگلیاها می گردد. کوئرستین پلی فنل که موجب کاهش مرگ نورونی و به عنوان یک ضد التهاب قوی، فعالیت میکروگلیاها را مهار کرده و بنابراین به کاهش التهاب که مشخصه اختلالات تحلیل برنده عصبی است، کمک می کند (۲۷). پژوهش حاضر نشان داد که هر سه دوز ۲۵، ۳۰، ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم کوئرستین باعث کاهش سطح TNF- α و در کاهش میزان التهاب در نورون‌های دوپامینرژیک در نواحی جسم سیاه و جسم مخطط در مدل پارکینسون القاء شده با MPTP مؤثر بوده است.

کوئرستین توانایی کاهش سایتوکین‌های التهاب‌زا مانند اینترلوکین-۱۸ و اینترلوکین-۸ و افزایش سایتوکین‌های ضد التهابی مانند اینترلوکین-۱۰ را دارا است (۲۸). کوئرستین با کاهش بیان سایتوکین پیش التهابی در بیماران پارکینسونی و با افزایش فعالیت چندین آنزیم اکسیدانی سبب مهار فعالیت بالای میکروگلیا از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد می شود (۲۸). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که هر سه دوز ۲۵، ۳۰، ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم کوئرستین باعث افزایش سطح اینترلوکین-۱۰ در نورون‌های دوپامینرژیک در نواحی جسم سیاه و جسم مخطط در مدل پارکینسون القاء شده با MPTP مؤثر واقع شده است. در نهایت کوئرستین به عنوان یک عامل ضد التهاب عمل کرده است. در گروه‌های دریافت کننده کوئرستین این فاکتور

⁸ Monoamine oxidase B

⁹ 1-methyl-4-phenylpyridinium

¹⁰ Monoamine oxidase A

¹¹ Reactive oxygen species

¹² Regulatory news service

التهاب مؤثر بوده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس بخشی از پایان‌نامه دانشجویی دکتری تایید شده توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفته است. بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

افزایش معنی‌داری نسبت به MPTP داشته است و در نتیجه باعث شده است تا التهاب در آن‌ها کاهش پیدا کند. این تحقیق نشان می‌دهد که با وجود آنکه کوئرتستین می‌تواند در مدل بیماری پارکینسون اثر درمانی اعمال کند، با این حال مصرف کوئرتستین به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی نسبت به بیماری در کاهش سفتی حرکتی در نتیجه موجب بهبود کاتالپسی و محافظت از آسیب نورونی و کاهش میزان

منابع

1. Quik M, Bordia T, Zhang D, Perez XA. Nicotine and nicotinic receptor drugs: potential for Parkinson's disease and drug-induced movement disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2015; 124: 247-71.
2. Dorsey E, Constantinescu R, Thompson J, Biglan K, Holloway R, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007; 68(5): 384-6.
3. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003; 39(6): 889-909.
4. Lin T-K, Liou C-W, Chen S-D, Chuang Y-C, Tiao M-M, Wang P-W, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J.* 2009; 32(6): 589-99.
5. Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL. Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol.* 2003; 53(S3): S3-S15.
6. Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 2010; 17(7): 1115-25.
7. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995; 155(4): 381-6.
8. Li X, Wang R, Zhou N, Wang X, Liu Q, Bai Y, et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in a NAFLD cell model. *Biomed Rep.* 2013; 1(1): 71-6.
9. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord.* 2013; 12(1): 43. doi: 10.1186/2251-6581-12-43.
10. Panchal SK, Poudyal H, Brown L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr.* 2012; 142(6): 1026-32.
11. Haleagrahara N, Siew CJ, Mitra NK, Kumari M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett.* 2011; 500(2): 139-43.
12. Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, et al. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(7): 1329-36.
13. Cao LF, Peng XY, Huang Y, Wang B, Zhou FM, Cheng RX, et al. Restoring spinal noradrenergic inhibitory tone attenuates pain hypersensitivity in a rat model of Parkinson's disease. *Neural Plast.* 2016; 2016.
14. Shobana C, Kumar RR, Sumathi TJC, neurobiology m. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2012; 32(7): 1099-112.
15. Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1999; 70(3): 491s-9s.
16. Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, et al. Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J Neurosci.* 2008; 28(22): 5756-61.
17. Toy WA, Petzinger GM, Leyshon BJ, Akopian GK, Walsh JP, Hoffman MV, et al. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014; 63: 201-9.
18. Ferreira M, Massano J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol Scand.* 2017; 135(3): 273-84.
19. Furia E, Marino T, Russo NJDT. Insights into the

coordination mode of quercetin with the Al (III) ion from a combined experimental and theoretical study. Dalton Transactions. 2014; 43(19): 7269-74.

20. Ginwala R, McTish E, Raman C, Singh N, Nagarkatti M, Nagarkatti P, et al. Apigenin, a natural flavonoid, attenuates EAE severity through the modulation of dendritic cell and other immune cell functions. J Neuroimmune Pharmacol. 2016; 11(1): 36-47.

21. Wruck C, Claussen M, Fuhrmann G, Römer L, Schulz A, Pufe T, et al. Luteolin protects rat PC 12 and C6 cells against MPP⁺ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. J Neural Transm Suppl. 2007; 72: 57-67.

22. Gazal M, Kaufmann FN, Acosta BA, Oliveira PS, Valente MR, Ortmann CF, et al. Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats. Neurochem Res. 2015; 40(7): 1421-30.

23. Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol KJE-BC, et al. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; 2012.

24. Xia SF, Xie ZX, Qiao Y, Li LR, Cheng XR, Tang X, et al. Differential effects of quercetin on hippocampus-dependent learning and memory in mice fed with different diets related with oxidative stress. Physiol Behav. 2015; 138: 325-31.

25. Sharma DR, Wani WY, Sunkaria A, Kandimalla RJ, Verma D, Cameotra SS, et al. Quercetin protects against chronic aluminum-induced oxidative stress and ensuing biochemical, cholinergic, and neurobehavioral impairments in rats. Neurotox Res. 2013; 23(4): 336-57.

26. Nassiri-Asl M, Hajjali F, Taghiloo M, Abbasi E, Mohseni F, Yousefi F. Comparison between the effects of quercetin on seizure threshold in acute and chronic seizure models. Toxicol Ind Health. 2016; 32(5): 936-44.

27. Radonjić NV, Knežević ID, Vilimanovich U, Kravić-Stevović T, Marina LV, Nikolić T, et al. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. Neuropharmacology. 2010; 58(4-5): 739-45.

28. Das N, Sikder K, Bhattacharjee S, Majumdar SB, Ghosh S, Majumdar S, et al. Quercetin alleviates inflammation after short-term treatment in high-fat-fed mice. Food Funct. 2013; 4(6): 889-98.