

اثر حفاظتی کوئرستین و نانوکریستال آن بر رفتارهای شبه اضطرابی در مدل حیوانی بیماری آلزایمز

اکبر حاجی‌زاده مقدم^{۱*}، محبوبه زارع^۲، سپیده رستمیان^۳، صدیقه خانجانی^۴

۱- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
 ۲- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
 ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
 ۴- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
 * آدرس مکاتبه: ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
 تلفن: ۳۵۳۰۲۴۵۳ (۰۱۱)، نمابر: ۳۵۳۰۲۴۵۰ (۰۱۱)
 پست الکترونیک: a.hajizadeh@umz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۴

تاریخ تصویب: ۹۵/۹/۱۶

چکیده

مقدمه: آلزایمز یکی از بیماری‌های تحلیل‌عصبی است که با از دست دادن پیشرونده حافظه، کاهش توانایی شناختی و اختلالات رفتاری از جمله رفتارهای شبه اضطرابی مشخص می‌شود. کوئرستین ترکیب پلی‌فنلی با اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفاظت‌نورونی است. هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد اضطرابی کوئرستین و نانوکریستال آن در مدل بیماری آلزایمز می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۹ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به هفت گروه کنترل (موش‌های سالم)، شاهد (آب مقطر را به صورت خوراکی و سالی‌ن را به صورت درون‌بطنی دریافت کردند)، بیمار (۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$ استرپتوزوتوسین درون‌بطنی و آب مقطر به صورت خوراکی دریافت کردند) و گروه‌های بیمار درمان‌شده (کوئرستین و نانو بلورهای کوئرستین را با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه به مدت چهار هفته به صورت خوراکی بعد از تزریق استرپتوزوتوسین دریافت کردند) تقسیم شدند. برای ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی از تست ماز صلیبی مرتفع استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که تزریق درون‌بطنی استرپتوزوتوسین به طور معنی‌داری درصد زمان سپری شده و درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز در تست ماز صلیبی بالاتر از کاهش داد و درمان با کوئرستین و نانوکریستال آن این شاخص‌های رفتاری را در هفته سوم و چهارم افزایش معنی‌داری داد. همچنین درمان با نانوکریستال کوئرستین درصد زمان سپری شده و درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز را بیشتر از کوئرستین افزایش داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اثر حفاظتی کوئرستین و نانو کریستال‌ها آن را در پیشگیری از رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از مدل آلزایمز در موش نشان داد. و درمان با نانوکریستال‌های کوئرستین مؤثرتر از کوئرستین است.

کل‌واژگان: آلزایمز، استرپتوزوتوسین، اضطراب، نانوکریستال کوئرستین، موش صحرایی نر



مقدمه

دیابت [۱۱] می‌تواند مؤثر باشد. با وجود خواص دارویی فراوان کوئرستین، به دلیل حلالیت ضعیف در آب و سوخت و ساز سریع آن، فراهمی زیستی کوئرستین پایین بوده و استفاده از آن محدود شده است [۱۲]. امروزه برای غلبه بر این مشکلات روش‌هایی از قبیل سیستم‌های تحویل نانو، میکرومولسیون‌سازی و نانوکریستاله کردن کوئرستین در میان تکنیک‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]. امروزه نانوکریستاله کردن یکی از بهترین روش‌ها برای افزایش حلالیت داروهایی با فراهمی زیستی پایین به شمار می‌رود. نانوکریستال‌ها دارای ویژگی‌هایی از قبیل حلالیت اشباع و سرعت انحلال بالا، چسبندگی به سطح سلول و غشاء، ثبات بالا و عملکرد بیولوژیکی بهتر نسبت به حالت اولیه دارو می‌باشند [۱۴]. هدف از این مطالعه بررسی اثر حمایت نوروئی کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه اضطرابی القایی در مدل حیوانی آلزایمر است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه نانوکریستال کوئرستین:

نانوکریستال کوئرستین به روش رسوب گذاری تبخیری نانوسوسپانسیون تهیه شد [۱۵]. در این روش به طور خلاصه کوئرستین خالص (۵ میلی‌گرم) در حلال اتانول (۱ میلی‌لیتر) حل و نانوکریستال کوئرستین با اضافه کردن سریع ضدحلال هگزان (۲۵ میلی‌لیتر) تشکیل شد. ذرات کریستاله شده با پراندن حلال و ضدحلال به وسیله دستگاه روتاری به دست آمد. سایز و مورفولوژی نانو دارو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رومیزی مورد بررسی قرار گرفت.

گروه‌های آزمایشی

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۹ سر موش صحرایی نر با محدوده وزنی ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم از پژوهشکده انیستیتو پاستور آمل خریداری و به اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران انتقال داده شدند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲

بیماری آلزایمر، یک بیماری مزمن عصبی است که با کاهش توانایی شناختی، اختلالات رفتاری شناخته شده و با از دست دادن گسترده‌ی نورون‌ها در قشر مغز در ارتباط است. این بیماری با سن مرتبط است که به عنوان یک عامل ایجادکننده زوال عقلی در سالخورده‌گی مورد توجه قرار می‌گیرد [۱]. شایع‌ترین علائم آن اختلال در به خاطر سپردن اطلاعات جدید می‌باشد که به علت تخریب سلول‌ها در ناحیه‌ای از مغز است که در شکل‌گیری حافظه جدید نقش دارند. در مراحل اولیه بیماری، افراد ممکن است تحریک‌پذیری، اضطراب و یا افسردگی را تجربه کنند [۲]. عوامل بسیاری در بروز آلزایمر مؤثر هستند که می‌توان به نقص ژنتیکی، کمبود عوامل نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و استرس اکسیداتیو اشاره کرد [۳]. مطالعات نشان دادند که آسیب اکسیداتیو در مغز سبب اختلال در سیستم عصبی می‌شود و در پی آن سبب بروز رفتارهای اضطرابی در مدل‌های حیوانی و در انسان شود [۴]. برای ایجاد مدل بیماری آلزایمر در موش‌ها از ماده شیمیایی استرپتوزوتوسین استفاده می‌شود، مطالعات نشان داده‌اند که تزریق استرپتوزوتوسین سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و این امر موجب افزایش استرس اکسیداتیو و رها شدن نیتریک اکساید در مغز موش می‌شود [۵]. فلاونوئیدها شناخته شده‌ترین گروه ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی موجود در میوه‌ها، سبزی‌ها و سایرغذاهای گیاهی هستند [۶]. کوئرستین یکی از رایج‌ترین فلاونوئیدهای موجود در طبیعت است که در مواد طبیعی خوراکی بسیاری از جمله سیب، چای، توت و پیاز به عنوان گلايسين یا کربوهیدرات یافت می‌شود. این ترکیب دارای طیف گسترده‌ای از اثرات سلامت، بیولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، محافظت از قلب و محافظت نوروئی است. اثرات محافظت نوروئی کوئرستین به طور عمده بوسیله ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی آن جهت پاکسازی رادیکال آزاد می‌باشد [۷]. همچنین مطالعات نشان داده است که کوئرستین از پوکی استخوان جلوگیری کرده [۸] و در درمان آسیب کبدی [۹]، پارکینسون [۱۰]، آلزایمر [۴] و



شدند و به مدت ۵ دقیقه اجازه داشتند تا در بازوهای باز و بسته حرکت کنند. پارامترهای زیر به‌روش مشاهده و با استفاده از کرنومتر اندازه‌گیری شد. تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می‌شود، تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می‌شود، مدت زمانی که حیوان در بازوی باز باقی می‌ماند، مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته باقی می‌ماند. درصد زمان گذراندن شده در بازوی باز (%OAT) و درصد ورود به بازوی باز (%OAE) به عنوان فاکتورهای استاندارد ارزیابی اضطراب [۱۷] به صورت زیر محاسبه شدند:

معادله ۱:

$$\%OAT = \frac{\text{مدت زمان گذراندن شده در بازوی باز}}{\text{مدت زمان گذراندن شده در بازوی باز} + \text{مدت زمان گذراندن شده در بازوی بسته}} \times 100$$

معادله ۲:

$$\%OAE = \frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی باز} + \text{تعداد ورود به بازوی بسته}} \times 100$$

هر چه مدت زمان صرف شده در بازوی باز و تعداد دفعات ورود به آن کمتر باشد، رفتار شبه‌اضطرابی در آن بیشتر می‌باشد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام شد و سطح معنادار آزمون‌ها P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار سیگما پلات با ویرایش ۱۲/۵ استفاده شد.

نتایج

بررسی اندازه ذرات نانوکریستال کوئرستین

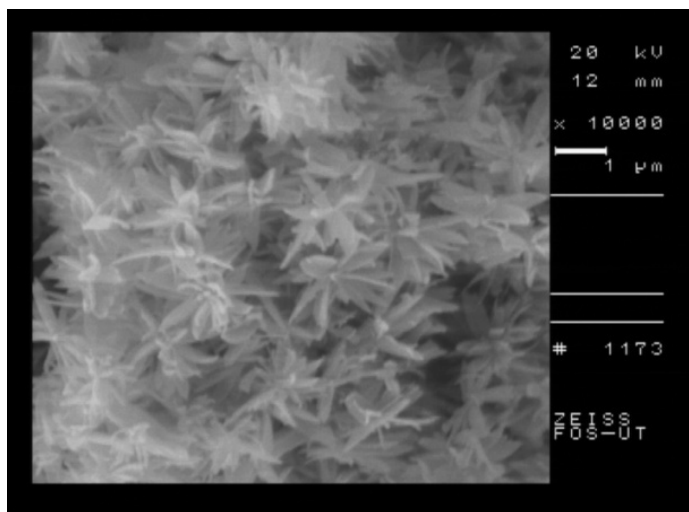
موفولوژی و سایز ذرات نانوکریستال کوئرستین بوسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سایز ذرات حدود ۱۲۰ نانومتر بود (شکل شماره ۱).

ساعت تاریکی در حالی که به آب و غذا به جز در هنگام آزمایش‌ها به صورت نامحدود دسترسی داشتند، نگهداری می‌شدند. آزمایش‌ها یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به حیوان‌خانه به منظور سازگاری با محیط انجام شدند. همه آزمایش‌ها با پیروی از قوانین و مقررات استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت که مورد تأیید کمیته اخلاق زیستی معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران بودند. حیوانات به هفت گروه ۷ تایی تقسیم شدند: گروه سالم یا کنترل که جراحی و درمان نشدند. گروه شاهد که بعد از جراحی، حلال استرپتوزوتوسین را به صورت تزریق درون بطنی مغزی و حلال کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین را به صورت گاوژ دریافت نمودند. گروه بیمار که ۱۰ میکروگرم بر رت استرپتوزوتوسین را به صورت تزریق درون بطن مغزی و حلال کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین به صورت گاوژ دریافت نمودند. چهار گروه بیمار درمان شده با کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین، داروها را در دوزهای ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۰ روز به صورت گاوژ بعد از تزریق استرپتوزوتوسین دریافت کردند.

تست رفتاری (ماز صلیبی مرتفع)

در این مطالعه از تست رفتاری ماز صلیبی مرتفع (Elevated plus Maze: EPM) برای بررسی رفتارهای شبه‌اضطرابی استفاده شد. دستگاه مورد استفاده یک ماز چوبی به شکل به علاوه است. این ماز دارای دو بازوی باز بدون دیواره و دو بازوی بسته با دیواره‌ای به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. طول و عرض بازوی باز به ترتیب ۵۰ و ۱۰ سانتی‌متر است که به صورت عمود به بازوهای بسته به ابعاد ۱۰ سانتی‌متر مربع در ناحیه مرکز، متصل می‌باشند. این مجموعه بر روی پایه‌ای به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار دارد. لامپ کم نوری در اتاق تست به عنوان منبع روشنایی در طول آزمایش استفاده شد [۱۶]. قبل از شروع آزمایش، موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفتند تا با محیط آشنا شوند. حیوانات در قسمت مرکز دستگاه و رو به بازوی باز قرار داده





شکل شماره ۱- اندازه نانوکریستال کوئرستین با میکروسکوپ الکترونی روشی

اثر کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه اضطرابی در پایان هفته سوم

نتایج در هفته سوم فاکتورهای OAT% و OAE% در گروه‌های درمان شده با کوئرستین کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P \leq 0/01$). همچنین در تمامی گروه‌ها این فاکتورها اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های درمان شده با کوئرستین و نانوکریستال آن در مقایسه با گروه بیمار نشان دادند ($P \leq 0/01$). از سوی دیگر نتایج گروه‌های درمان شده با نانوکریستال کوئرستین دارای اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) نسبت به گروه‌های درمان شده با کوئرستین بود (نمودار شماره ۲).

اثر کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه اضطرابی در پایان هفته چهارم

در گروه‌های درمان شده با دوزهای ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کوئرستین کاهش معنی‌داری در فاکتورهای OAT% و OAE% در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P \leq 0/01$). این شاخص‌ها در گروه‌های درمان شده با نانوکریستال کوئرستین اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند. علاوه بر این فاکتورهای OAT% و OAE% در تمامی گروه‌های درمان شده با کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه بیمار نشان دادند ($P \leq 0/05$). در این شاخص‌ها همچنین اختلاف معنی‌دار گروه ۱۰ و ۲۵

اثر تزریق استریوتوزوتوسین بر رفتارهای شبه اضطرابی

نتایج هفته اول نشان داد درصد زمان سپری شده در بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ولی طی هفته‌های بعد این شاخص‌ها در گروه بیمار کاهش معناداری ($P < 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل داشتند. این نتایج نشان‌دهنده بروز رفتارهای شبه اضطرابی در مدل حیوانی آلزایمر است که با گذشت زمان بر شدت آنها افزوده شد.

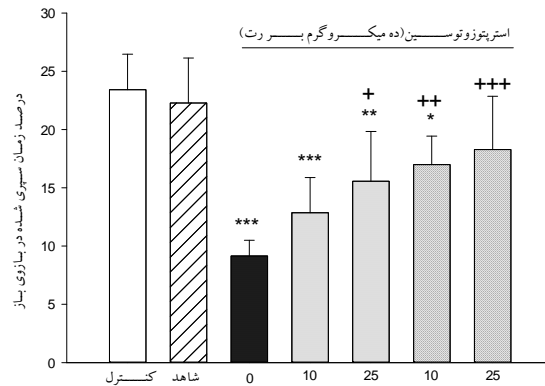
اثر کوئرستین و نانوکریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه اضطرابی در پایان هفته دوم

با توجه به نتایج نمودار شماره ۱، در پایان هفته دوم در گروه‌های بیمار درمان شده با کوئرستین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوکریستال کوئرستین کاهش معنی‌دار OAT% و OAE% در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P \leq 0/05$). در تمامی گروه‌ها به غیر از گروه درمان شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کوئرستین فاکتور OAT% اختلاف معنی‌دار با گروه بیمار نشان دادند. از طرف دیگر فاکتور OAE% دارای اختلاف معنی‌دار در گروه‌های درمان شده با غلظت‌های مختلف نانو کریستال کوئرستین در مقایسه با گروه بیمار می‌باشد. در صورتی که این اختلاف در گروه‌های درمان شده با کوئرستین وجود ندارد. همچنین در این پارامتر اختلاف معنی‌دار بین گروه نانوکریستال کوئرستین و کوئرستین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد ($P \leq 0/01$) (نمودار شماره ۱).

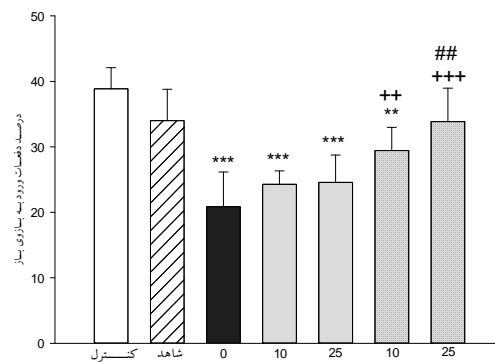


میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوکریستال کوئرستین نسبت به گروه ۱۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کوئرستین مشاهده می شود ($P \leq 0/05$) (نمودار شماره ۳).

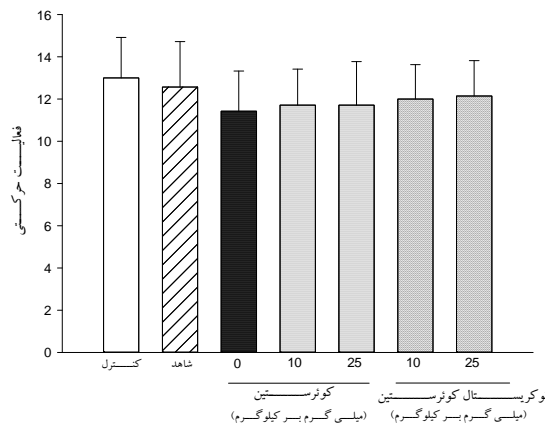
خاطر نشان می شود در فاکتور فعالیت حرکتی هیچ هفته ای اختلاف معنی دار در تمامی گروه ها مشاهده نشده است.



(A)



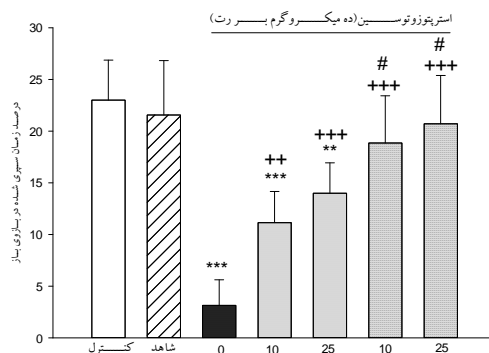
(B)



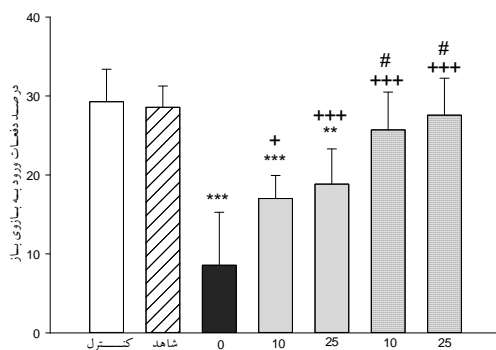
(C)

نمودار شماره ۱- اثر غلظت های مختلف کوئرستین و نانو کریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه اضطرابی در آزمون ماز صلیبی در هفته دوم نمودار A: درصد زمان سپری شده در بازاری باز، نمودار B: درصد دفعات ورود به بازاری باز، نمودار C: فعالیت حرکتی. اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($***P \leq 0/001$) و ($**P \leq 0/01$)، ($*P \leq 0/05$)، اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه بیمار ($+++P \leq 0/001$) و ($++P \leq 0/01$)، اختلاف معنی دار گروه نانو کریستال کوئرستین در مقایسه با گروه کوئرستین ($###P \leq 0/001$)، ($++P \leq 0/01$)، ($+P \leq 0/05$).

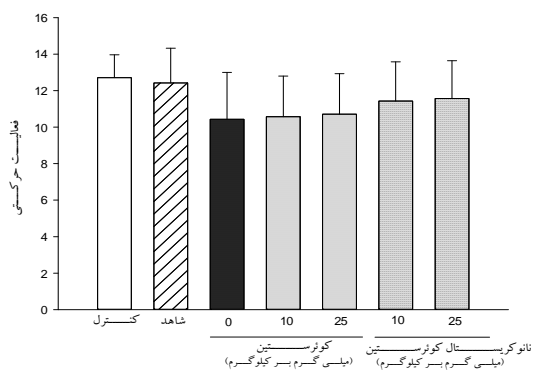




(A)



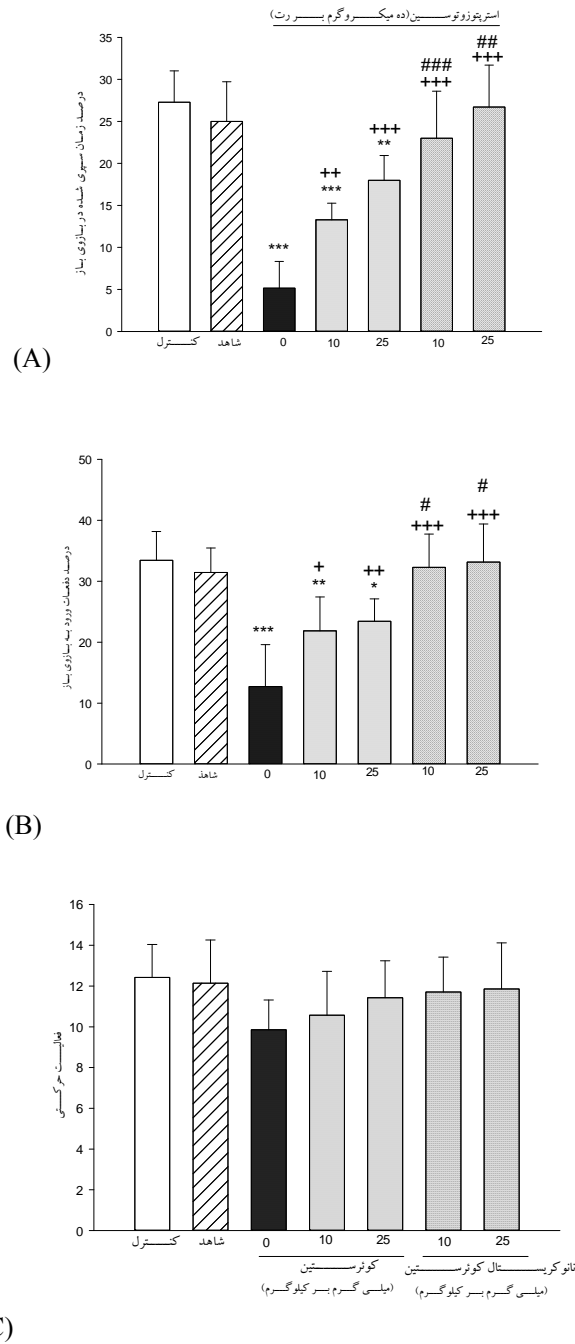
(B)



(C)

نمودار شماره ۲- اثر غلظت‌های مختلف کوئرستین و نانو کریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه‌اضطرابی در آزمون ماز صلیبی در هفته سوم نمودار A: درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز، نمودار B: درصد دفعات ورود به بازوی باز، نمودار C: فعالیت حرکتی (n=7)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($***P \leq 0.001$) و ($**P \leq 0.01$)، ($*P \leq 0.05$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه بیمار ($+++P \leq 0.001$) و ($++P \leq 0.01$)، ($+P \leq 0.05$) اختلاف معنی‌دار گروه نانو کریستال کوئرستین در مقایسه با گروه کوئرستین ($\#P \leq 0.05$) Mean±SD





نمودار شماره ۳- اثر غلظت‌های مختلف کوئرستین و نانو کریستال کوئرستین بر رفتارهای شبه‌اضطرابی در آزمون ماز صلیبی در هفته چهارم

نمودار A: درصد زمان سپری شده در بازوی باز، نمودار B: درصد دفعات ورود به بازوی باز، نمودار C: فعالیت حرکتی

(n=7)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (***) و (***) و (*P≤0/05)

اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه بیمار (+P≤0/05)، (+P≤0/01) و (+P≤0/001)

اختلاف معنی‌دار گروه نانو کریستال کوئرستین در مقایسه با گروه کوئرستین (###P≤0/001) و (#P≤0/05) Mean±SD



بحث

روش‌های درمانی فعلی جهت درمان آلزایمر تنها بخشی از نشانه‌های آسیب شناختی ناشی از بیماری را تسکین می‌دهند، این داروها علائم را بهبود می‌بخشند اما مسیر پیشرفت بیماری را تغییر نمی‌دهند. در همین راستا، استفاده از مواد طبیعی برای درمان بیماری آلزایمر در حال افزایش است. در مطالعات متعددی خواص محافظت نورونی فلاونوئیدها گزارش شده است و فلاونوئیدها می‌توانند به عنوان ترکیباتی برای توسعه داروهای بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرند [۲۶]. کوئرستین ترکیب فلاونوئید طبیعی است که اثرات مفید متعددی بر سلامت انسان از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، ضدایسکمی، حفاظت از قلب و عروق و اثرات محافظت نورونی اعمال می‌کند. میوه‌ها و سبزیجات گوناگونی سرشار از کوئرستین هستند که از بافت مغز در برابر بیماری‌های عصبی مربوط به استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. کوئرستین در نوروپاتی با مهار هیدروپراکسید و رادیکال‌های آزاد و حفظ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانع آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۷]. سابوگال و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که کوئرستین نشانه هیستوپاتولوژی بیماری آلزایمر را معکوس کرده و اختلالات شناختی و عاطفی در موش ترانس ژنیک مدل آلزایمر xTg-AD³ را بهبود می‌بخشد [۲۸]. این فلاونوئید علاوه بر محافظت نورونی، اثرات مفید دیگری بر روی سیستم عصبی مرکزی، مانند ضداضطراب و افزایش شناختی، با تحریک یا مهار فعال‌سازی آنزیم و یا مسیرهای انتقال سیگنال اعمال می‌کند [۲۸]. اگر چه بسیاری از این ترکیبات در بدن جذب شده و تا حدی به گردش خون سیستمیک می‌رسند، اما غلظت آنها در اکثر موارد به اندازه کافی بالا نیست، تا اعمال بیولوژیکی سلولی خود را در داخل بدن اعمال کند [۲۹]. کوئرستین بسیار آبگریز است و دارای فراهمی زیستی پایین و جذب ضعیف در دستگاه گوارش می‌باشد، بنابراین نیاز است که فرمولاسیون آن بهبود یافته تا با افزایش انحلال کوئرستین جذب آن تا حد زیادی افزایش یابد. روش‌های مختلفی به منظور افزایش حلالیت و همچنین فراهمی زیستی داروهای کم محلول در آب مانند کوئرستین توسعه یافته است از جمله

بیماری آلزایمر علت اصلی زوال عقل است و با از دست رفتن پیشرونده حافظه و سایر عملکردهای شناختی مشخص می‌شود [۱۸]. شواهد نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو نقش چشمگیری در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کند [۱۹]. تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در شروع، حفظ و پیشرفت بیماری‌های تحلیل برنده عصبی بسیار مهم است [۲۰] و از طرف دیگر استرس اکسیداتیو در افسردگی، اختلالات اضطرابی و سطوح بالای اضطراب نقش دارد [۴]. بر اساس مطالعات، اضطراب یکی از علائم رفتاری بیماری آلزایمر است [۲۱]. در مطالعات متعددی نشان داده شد که تیمار با استرپتوزوتوسین موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش استرس اکسیداتیو و رها شدن نیتریک اکساید در مغز موش می‌شود [۲۲، ۲۳]. پینتون و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که تزریق استرپتوزوتوسین در موش سبب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در تست صلیبی ماز مرتفع شده و زمان سپری شده و تعداد دفعات ورود به بازوی باز کاهش می‌یابد. اختلال شناختی ناشی از استرپتوزوتوسین همراه با افزایش اضطراب در موش است و رفتارهای شبه اضطرابی در مدل آلزایمر پراکنده به وجود می‌آورد [۲۴]. تست ماز صلیبی مرتفع به طور گسترده‌ای برای ارزیابی رفتاری جوندگان استفاده می‌شود و بررسی اثر ضداضطراب عوامل دارویی و هورمون‌های استروئیدی و مکانیسم‌های رفتار مرتبط با اضطراب توسط این آزمون تأیید می‌شود [۲۵].

در پژوهش حاضر از استرپتوزوتوسین برای ایجاد مدل آلزایمری به صورت تزریق درون بطنی مغزی استفاده و برای بررسی رفتارهای شبه اضطرابی القاء شده بوسیله استرپتوزوتوسین از تست ماز صلیبی مرتفع در چهار هفته متوالی استفاده شد. نتایج نشان داد که تزریق درون بطنی این سم در گروه بیمار در هفته اول اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشته است ولی در هفته‌های بعدی احتمالاً با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب ایجاد رفتارهای شبه اضطرابی و کاهش درصد زمان سپری شده و درصد دفعات ورود به بازوی باز در گروه بیمار نسبت به سایر گروه‌ها شد.



کاهش اختلالات شبه اضطرابی موش آلزایمری می‌شود که این یافته‌ها احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی کوئرستین و توانایی آن در حذف رادیکال‌های آزاد ناشی از استریتوزوتوسین است. همچنین درمان با نانو کریستال کوئرستین اثر بیشتری نسبت به کوئرستین دارد که این به علت افزایش جذب زیستی کوئرستین در اثر نانو شدن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق درون بطنی استریتوزوتوسین موجب القاء رفتارهای شبه اضطرابی در مدل حیوانی بیماری آلزایمر شده و درمان با کوئرستین و نانو کریستال آن احتمالاً به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها سبب کاهش این رفتارها می‌شود. همچنین غلظت‌های پایین نانو کریستال کوئرستین احتمالاً به سبب افزایش حلالیت و جذب زیستی آن در مقایسه با کوئرستین باعث کاهش چشمگیر رفتارهای شبه اضطرابی القایی در مدل حیوانی بیماری آلزایمری شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های مالی و معنوی حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تشکر و قدردانی می‌شود.

رایج‌ترین روش‌ها افزایش سطح دارو توسط میکرو و یا نانو سایز کردن می‌باشد (کاهش اندازه) [۱۴]. پژوهش‌های گذشته نشان داده است که در اثر تبدیل کوئرستین به نانو ذرات آن، نفوذ کوئرستین به مغز به طور قابل توجهی بهبود می‌یابد [۳۰]. همچنین مطالعات در سال ۲۰۱۴ نشان داد که کوچک شدن ذرات کوئرستین در حد نانومتر باعث بالارفتن میزان انتشار آن و افزایش فراهمی زیستی آن می‌شود [۳۱]. در مطالعه‌ای که به منظور افزایش سرعت انحلال کوئرستین در آب با استفاده از ساخت نانو کریستال انجام گرفت، مشخص شد انحلال نانو کریستال کوئرستین بیشتر از کوئرستین می‌باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در نتیجه‌ی افزایش انحلال، مهار رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانی نانو کریستال کوئرستین نسبت به کوئرستین افزایش می‌یابد [۳۲]. نیتو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز نشان داده‌اند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌توموری کوئرستین در اثر نانو کریستاله شدن در شرایط آزمایشگاهی بهبود می‌یابد [۳۳]. در پژوهش حاضر برای افزایش جذب زیستی کوئرستین نانو کریستال آن با استفاده از تکنیک رسوب‌گذاری تبخیری نانوسوسپانسیون تهیه شد و اندازه ذرات نانو کریستال کوئرستین ساخته شده بوسیله میکروسکوب الکترونی رویشی حدود ۱۲۰ نانومتر تعیین شد. نتایج یافته‌های این تحقیق در تست رفتاری ماز صلیبی مرتفع نشان داد درمان بوسیله کوئرستین و نانو کریستال آن باعث

منابع

1. Mao P and Reddy PH. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *BBA-Mol Basis Dis.* 2011; 1812 (11): 1359 - 70.
2. Hureau C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coordin. Chem. Rev.* 2012; 256 (19): 2164 - 74.
3. Gella A and Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell. Adhes. Migr.* 2009; 3 (1): 88-93.
4. Bouayed J, Rammal H and Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009; 2 (2): 63 - 7.
5. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S and Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic

Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J. Neural. Transm.* 2013; 120 (1): 233-52.

6. Latif R. Flavonoids as novel neuroprotective nutraceuticals. *Saudi J. Health Sci.* 2015; 4 (1): 1 - 4.

7. Jembrek M J, Vukovic L, Puhovic J, Erhardt J and Orsolich N. Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J. Mol. Neurosci.* 2012; 47 (2): 286 - 99.

8. Wattel A, Kamel S, Prouillet C, Petit JP, Lorget F, Offord E and Brazier M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NFκB and AP-1. *J. Cell. Biochem.* 2004; 92 (2): 285 - 95.

9. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J and Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 2003; 48 (4): 824 - 9.

10. Zhang ZJ, Cheang LC, Wang MW and Lee SM. Quercetin exerts a neuroprotective effect through inhibition of the iNOS/NO system and pro-inflammation gene expression in PC12 cells and in zebrafish. *Int. J. Mol. Med.* 2011; 27 (2): 195 - 203.

11. Mahesh T and Menon VP. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* 2004; 18 (2): 123 - 7.

12. Lakhanpal P and Rai D K. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet J. Medical Up.* 2007; 2 (2): 22-37.

13. Thilakarathna SH and Rupasinghe H. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 2013; 5 (9): 3367 - 87.

14. (a) Chang T, Zhan H, Liang D and Liang JF. Nanocrystal technology for drug formulation and delivery. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 2015; 9 (1): 1 - 14. (b) Kakran M, Sahoo NG, Li L and Judeh Z. Fabrication of quercetin nanoparticles by anti-solvent

precipitation method for enhanced dissolution. *Powder Technol.* 2012; 223: 59 - 64.

15. Kakran M, Sahoo NG and Li L. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion. *Colloids Surf B.* 2011; 88: 121 - 30.

16. Braun AA, Skelton MR, Vorhees CV and Williams MT. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol. Biochem. Be.* 2011; 97 (3): 406 - 15.

17. Rodgers R and Johnson N. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Be.* 1995; 52 (2): 297 - 303.

18. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F and Gong CX. Non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol. Neurobiol.* 2013; 47 (2): 711-25.

19. Sultana R and Butterfield DA. Redox proteomics studies of in vivo amyloid beta-peptide animal models of Alzheimer's disease: Insight into the role of oxidative stress. *Proteomics Clin. Appl.* 2008; 2 (5): 685 - 96.

20. Dajas F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Blasina F, Echeverry C, Martínez M, Rivera F, Vaamonde L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochem. Int.* 2015; 89: 140 - 8.

21. Teri L, Ferretti LE, Gibbons LE, Logsdon RG, McCurry SM, Kukull WA, McCormick WC, Bowen JD and Larson EB. Anxiety in Alzheimer's disease: Prevalence and comorbidity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1999; 54 (7): M348-352.

22. Shoham S, Bejar C, Kovalev E and Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp. Neurol.* 2003; 184 (2): 1043 - 52.



23. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D and Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacol.* 2007; 52 (3): 836 - 43.
24. Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. *Behav. Brain Res.* 2011; 223 (1): 1-6.
25. Walf AA and Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. protoc.* 2007; 2 (2): 322 - 8.
26. Williams RJ, Spencer JP and Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36 (7): 838 - 49.
27. Merzoug S, Toumi ML, Tahraoui A. Quercetin mitigates Adriamycin-induced anxiety-and depression-like behaviors, immune dysfunction, and brain oxidative stress in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arc. of Pharmacol.* 2014; 387 (10): 921-33.
28. Sabogal-Guaqueta AM, Munoz-Manco JI, Ramlrez-Pineda JR, Lamprea-Rodriguez M, Osorio E and Cardona-Gomez GP. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacol.* 2015; 93: 134-45.
29. Walle T. Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects. *Int. J. Mol.* 2009; 10 (11): 5002 - 19.
30. Dhawan S, Kapil R and Singh B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 63: 342 - 51.
31. Rasaie S, Ghanbarzadeh S, Mohammadi M and Hamishehkar H. Nano phytosomes of quercetin: a promising formulation for fortification of food products with antioxidants. *Pharmaceutical Sci.* 2014; 20 (3): 96 - 101.
32. Sahoo N, Kakran M, Shaal L, Li L, Muller R, Pal M and Tan L. Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100 (6): 2379 - 90.
33. Neethu CS, Kavitha VB, Krishnakumar K, Anish J and Dineshkumar B. Quercetin Nanocrystal Formulation: In Vitro Anti -tumor Activity against Dalton Lymphoma Cells. *JDDTBP.* 2015; 3: 9 - 17.



The Protective Effect of Quercetin and it Nanocrystal on Anxiety-Like Behaviors Induced by Animal Model of Alzheimer's Disease

Hajizadeh Moghaddam A (Ph.D.)^{1*}, Zare M (Ph.D.)², Rostamian S (M.Sc.)¹, Khanjani S (Ph.D. Student)³

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2- Faculty of Herb, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

3- Department of Physiology, Faculty of Biology Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Tel: +98- 11-35302453, Fax: +98-11-35302450

E-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir

Abstract

Introduction: Alzheimer is a neurodegenerative disease which is characterized by progressive memory loss, diminished cognitive ability and behavioral disturbances such as anxiety-like behaviors. Quercetin is a polyphenolic compound with antioxidant and neuroprotective effects.

Objective: Purpose of this study is evaluated anxiolytic effect of quercetin and its nanocrystal in model of Alzheimer's disease.

Methods: In this experimental study, forty-nine male rats were randomly divided into seven groups, as follows: control group (intact rats), vehicle (received distilled water orally and intracerebroventricularly), disease (received 10µg/rat STZ intracerebroventricularly and distilled water orally) and disease treated groups (received quercetin and its nanocrystal at doses of 10 and 25 mg/kg/day orally for four weeks after injection of STZ). Elevated plus maze (EPM) test was used to assess anxiety-like behaviors.

Results: Results indicated that icv-STZ injection significantly decrease percent of open arm times (%OAT) and percent of open arm enters (%OAE) in the EPM test ($P<0.001$) and treatment with the quercetin and its nanocrystal significantly increased these behavioral indexes in the end of third and fourth weeks ($P<0.001$). Furthermore, treatment with quercetin nanocrystal increased %OAT and %OAE more than the quercetin.

Conclusion: This study showed the protective effect of quercetin and its nanocrystal in the prevention of anxiogenic-like behaviors induced by Alzheimer's model of rat and treatment with quercetin nanocrystal was more effective than quercetin.

Keywords: Alzheimer, Anxiety, Rat, Streptozotocin, Quercetin nanocrystal

