

The effect of p-cymene in amelioration of catalepsy Behavior, memory recovery and hippocampus cell damage in an animal model of Parkinson's disease

Milad Ansari¹, Mohammad Amin Edalatmanesh²

¹ MSc Candidate in Animal Physiology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

²Associate Professor of Physiology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Abstract

Background: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra and reduction of dopamine in the striatum. Several studies have shown that oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of PD, and antioxidant agents can be useful in reducing the rate of neurodegeneration. This study aimed to evaluate the antioxidant and neuroprotective effect of p-Cymene in the reserpine-induced (RES) PD rat model.

Materials and methods: 40 male Wistar rats were divided into 5 groups, including control, receiving vehicle of p-Cymene + receiving vehicle of reserpine (VP+VR), receiving reserpine (1 mg/5 days/intraperitoneal) + vehicle of p-Cymene (RES+VP), receiving p-Cymene (50 mg/14 days/oral) + vehicle of reserpine (p-Cymene+VR) and receiving reserpine+p-Cymene (RES+p-Cymene) were divided. After the treatment, the animals were subjected to behavioral evaluation (catalepsy test and shuttle box test). At the end, the level of hippocampal catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) by ELISA and malondialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid method and the density of apoptotic neurons in different areas of the hippocampus were measured.

Results: The results showed a significant reduction in catalepsy behavior, amelioration of avoidance memory, a significant increase in CAT and SOD, and a decrease in MDA in the RES+p-Cymene group compared to the p-Cymene+VR group. On the other hand, p-Cymene prevented the increase in the density of apoptotic neurons caused by RES in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus.

Conclusion: In general, the results showed that p-cymene had a protective effect in the PD model and prevented motor-cognitive disorders and neuronal damage caused by RES.

Keywords: Reserpine, Parkinson's disease, Monoterpene, Catalepsy.

Cited as: Ansari M, Edalatmanesh MA. The effect of p-cymene in amelioration of catalepsy Behavior, memory recovery and hippocampus cell damage in an animal model of Parkinson's disease. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(2): 129-139.

Correspondence to: Mohammad Amin Edalatmanesh

Tel: +98-71-36410041

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

Received: 20 Sep 2023; **Accepted:** 12 Nov 2023

اثر p-cymene در بهبود رفتار کاتالپسی، بازیابی حافظه و آسیب سلولی هیپوکامپ در مدل حیوانی بیماری پارکینسون

میلاد انصاری^۱، محمد امین عدالت منش^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
^۲ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری پارکینسون (PD) نوعی بیماری تحلیل برنده عصبی است که با آسیب پیشرونده نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه و کاهش دوپامین در اجسام مخطط مشخص می‌شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی PD ایفا می‌کند و عوامل آنتی اکسیدانی می‌توانند برای کاهش سرعت تخریب عصبی مفید باشند. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی و محافظت کننده عصبی p-cymene در مدل موش صحرایی PD/القاء شده با رزپین (RES) انجام شد.

روش بررسی: ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۵ گروه کنترل، دریافت کننده حلال p-Cymene + دریافت کننده حلال رزپین (VP+VR)، دریافت کننده رزپین (۱ میلی گرم/۵ روز/درون صفاقی) + حلال p-Cymene (RES+VP)، دریافت کننده p-Cymene (۵۰ میلی گرم/۱۴ روز/دهانی) + حلال رزپین (p-Cymene+VR) و دریافت کننده رزپین + p-Cymene (RES+p-Cymene) تقسیم شدند. پس از تیمار، حیوانات تحت ارزیابی رفتاری (آزمون کاتالپسی و آزمون شاتل باکس) قرار گرفتند. در پایان، سنجش سطح هیپوکامپی کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به روش الایزا و مالون دی‌آلدهید (MDA) به روش تیوباربیتوریک اسید و تراکم نورون‌های آپوپتیک در نواحی مختلف هیپوکامپ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده کاهش معنی دار رفتار کاتالپسی، بهبود حافظه اجتنابی، افزایش معنادار CAT و SOD و کاهش MDA در گروه RES+p-Cymene نسبت به گروه p-Cymene+VR بود. از طرفی، p-cymene از افزایش تراکم نورون‌های آپوپتیک ناشی از RES در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ جلوگیری کرد.

نتیجه گیری: به طور کلی، نتایج نشان داد که p-cymene اثر محافظتی در مدل PD دارد و از اختلالات حرکتی-شناختی و آسیب نورونی ناشی از RES جلوگیری می‌کند.

واژگان کلیدی: رزپین، بیماری پارکینسون، مونوترپن، کاتالپسی.

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) نوعی اختلال تحلیل برنده عصبی وابسته به سن است. این بیماری دومین اختلال پیشرونده عصبی

شایع در بین انسان‌ها است (۱). اگرچه عوامل متعددی با آسیب شناسی PD مرتبط است، اما علت اصلی آن هنوز ناشناخته باقی مانده است. مشخصه اصلی این بیماری، تحلیل پیشرونده نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه است که منجر به کاهش نورون‌های دوپامینرژیک در اجسام مخطط می‌شود. شیوع PD با افزایش سن افزایش می‌یابد و بین ۸۵ تا ۸۹ سالگی به اوج خود می‌رسد. بروز بیماری در مردان در مقایسه با زنان بیشتر است (۲). اگرچه هم علائم حرکتی و هم غیر حرکتی در PD شناسایی

آدرس نویسنده مسئول: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی،

محمد امین عدالت منش (email: amin.edalatmanesh@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۶/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۱

(۱۲). لذا با توجه به اینکه تا کنون اثر p-cymene در مدل‌های بیماری پارکینسون بررسی نشده است، هدف از این مطالعه دستیابی به نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظت کننده عصبی p-cymene در بهبود عوارض حرکتی و غیر حرکتی (شناختی) در مدل موش صحرایی بیماری پارکینسون است.

مواد و روشها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۸ ماه و وزن 20 ± 20 گرم استفاده شد. حیوانات در گروه‌های پنج‌تایی در یک قفس شفاف پلاستیکی (با ابعاد 37×16 سانتی‌متر)، تحت شرایط استاندارد و کنترل شده دما (22 ± 1 درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (45 ± 5 درصد) و چرخه نور/تاریکی $12/12$ ساعت (با شروع در ساعت ۶:۰۰ صبح) قرار گرفتند. دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد آزمایشگاهی برای حیوانات فراهم شد. به منظور سازگاری موش‌های صحرایی با شرایط محیطی جدید و تعیین میزان غذای مصرفی بر حسب گرم به ازای هر سر موش صحرایی، حیوانات به مدت یک هفته در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز نگهداری و در طول این دوره، هیچ مداخله‌ای اعمال نگردید. تمام مراحل انجام کار توسط کمیته اخلاق حیوانات آزمایشگاهی تأیید شد (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1402.009). تمام تلاش‌ها برای به حداقل رساندن درد، رنج یا ناراحتی حیوانات صورت گرفت. همچنین کمترین تعداد حیوانات در این مطالعه استفاده شد.

داروها

P-Cymene (خلوص $\geq 98\%$) و رزپین از شرکت سیگما آلدريج (St. Louis, MO, USA) خریداری شد. P-Cymene با حلال آن یعنی روغن آفتابگردان امولسیون شد و با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد. ابتدا رزپین (RES) با 0.3 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل شد و سپس به کمک آب مقطر غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر آن تهیه شد. در گروه دریافت کننده حلال رزپین (VR)، از محلول اسید استیک گلاسیال همراه با آب مقطر استفاده شد (۱۳). طی دوره تیمار، P-Cymene و RES روزانه تهیه و در فاصله بین دو نوبت تزریق در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

گروه‌بندی و طراحی آزمایش

حیوانات به صورت تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی شامل ۱. گروه کنترل، ۲. گروه دریافت کننده حلال P-Cymene و دریافت کننده حلال رزپین (VP+VR)، ۳. گروه دریافت کننده رزپین و

شده است، درمان‌های بالینی فعلی بیشتر بر بهبود علائم حرکتی تکیه دارند (۳). علائم حرکتی PD شامل کندی حرکت، سفتی عضلانی، لرزش در حالت استراحت و بی‌ثباتی وضعیتی است، در حالی که علائم غیرحرکتی شامل افسردگی و اضطراب، درد، اختلال عملکرد اتونومیک (مانند یبوست)، اختلالات شناختی، و اختلالات خواب را شامل می‌شود (۴). علائم حرکتی و غیرحرکتی PD، هر دو به طور جدی بر کیفیت زندگی این بیماران و مراقبان آنها تأثیر می‌گذارد و علاوه بر این منجر به بار اجتماعی سنگین می‌شود (۵).

تاکنون هیچ یک از درمان‌های موجود قادر به توقف یا حتی کاهش سرعت تخریب بافت عصبی در PD نبوده‌اند و تنها درمان علامتی برای بیماران PD در دسترس است (۶). هرچند، جایگزینی دوپامین با لوودوپا (L-dopa) راه اصلی در درمان علائم حرکتی PD است، با این حال، اثربخشی L-dopa با گذشت زمان کاهش می‌یابد و بازگشت عوارض حرکتی مانند نوسان و اختلال در حرکت با درمان طولانی مدت L-dopa دیده شده است (۷). از این رو، در سالهای اخیر مطالعات متعددی بر شناسایی داروهای جدید متمرکز شده‌اند. این داروها قادر به بهبود علائم حرکتی و غیر حرکتی و اصلاح مسیر درمانی PD خواهند بود.

از طرفی، در سال‌های اخیر مدل‌های حیوانی PD القاء شده توسط نوروتوکسین‌ها، از جمله رزپین (RES)، ابزار مفیدی را برای بررسی مکانیسم‌های درگیر در فیزیوپاتولوژی PD فراهم نموده است. در این مدل، ارزیابی اثر داروهای جدید محافظت کننده عصبی مورد بررسی قرار گرفته است (۸).

اسانس‌ها ترکیبات پیچیده، فرار و با بوی قوی هستند که از متابولیسم ثانویه گیاهان معطر تشکیل می‌شوند (۹). اجزای شیمیایی عمده اسانس‌ها مونوترپن‌ها و سسکوئی‌ترپن‌ها هستند (۹). p-cymene نوعی مونوترپن است که در روغن‌های فرار بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی وجود دارد و به طور طبیعی در آب پرتقال، گریپ فروت، نارنگی، هویج، تمشک، کره، جوز هندی، پونه کوهی و بیشتر ادویه‌ها وجود دارد. مطالعات قبلی، طیف گسترده‌ای از خواص درمانی p-cymene از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد درد، ضد اضطراب، ضد سرطان و اثرات ضد میکروبی را نشان داده‌اند (۱۰).

از آنجایی که استرس اکسایشی در پاتوژنز و تخریب عصبی نوروهای دوپامینرژیک در PD نقش دارند، بنابراین، شناسایی عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند استراتژی درمانی یا پیشگیری برای PD باشند (۱۱). چندین مطالعه نشان داده‌اند که طیف وسیعی از ترکیبات خالص مشتق شده از داروهای گیاهی در بهبود عوارض حرکتی PD در شرایط *invivo* و *invitro* مؤثر هستند

حلال p-Cymene (RES+VP)، ۴. گروه دریافت کننده p-Cymene و حلال رزپین (p-Cymene+VR) و ۵. گروه دریافت کننده رزپین+ p-Cymene (RES+p-Cymene) تقسیم شدند. در هر گروه ۸ سر حیوان قرار داشت. تزریق رزپین به صورت درون صفاقی و به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان و به مدت ۵ روز متوالی روزانه یک تزریق انجام شد. با مشاهده علائم حرکتی پارکینسون، پس از اتمام تزریق رزپین، p-Cymene به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، به مدت روز و به صورت خوراکی گاوژ شد (۱۴).

آزمون کاتالپسی

برای ارزیابی کاتالپسی از تست میله استفاده شد. وسیله مورد استفاده در این آزمون، یک میله بارفیکس چوبی دارای یک سکو است. ارتفاع میله بارفیکس از سکو، ۹ سانتی متر و قطر میله ۰/۹ سانتی متر بود. مدت زمانی را که هر دو پای جلویی حیوان به صورت ثابت روی میله افقی قرار می گرفت، اندازه گیری شد. حداکثر زمانی باقی ماندن بر روی میله افقی ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. زمان قطع آزمایش زمانی است که حیوان یکی از پاهای جلویی خود را از روی میله بردارد و یا اینکه سر خود را به طور جستجوگرانه تکان دهد. این کار سه مرتبه با فواصل ۳ دقیقه تکرار شد (۱۵).

ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال

به کمک دستگاه شاتل باکس، حافظه اجتنابی غیر فعال سنجیده شد. شاتل باکس، جعبه ای از جنس پلاستیک شفاف و شامل دو محفظه روشن و تاریک است که بین دو محفظه آن یک در گیوتینی تعبیه شده است. کف این دستگاه، از میله های استیل متصل به یک مدار الکتریکی تشکیل شده است که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی با مدت، شدت و فرکانس مشخص از کف آن عبور می کند. اساس این آزمون بر پایه فرار غریزی جوندگان از روشنایی و وجود عامل احترازی (شوک الکتریکی) در محیط تاریک است. این آزمون شامل سه مرحله اصلی است. ۱. سازش: به منظور سازگاری حیوانات با محیط، حیوان به مدت یک دقیقه در محیط روشن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه با باز شدن در گیوتینی حیوان به اختیار خود به محفظه تاریک می رود. ۲. اکتساب: ۲۴ ساعت پس از مرحله سازش انجام شد. در این مرحله حیوان پس از ۳۰ ثانیه قرار گرفتن در محیط روشن با باز شدن در گیوتینی به محیط تاریک وارد شد. سپس، در بسته و جریان الکتریکی به میزان ۲ میلی آمپر، به مدت ۲ ثانیه و فرکانس ۵۰ هرتز به کف وارد شد. ۲۰ ثانیه پس از شوک الکتریکی، حیوان از دستگاه برداشته شد و به قفس منتقل شد. ۳. به خاطر آوری: ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مرحله اکتساب صورت گرفت. در این مرحله

حیوان در محیط روشن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شده و مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک (LDR) و کل زمان سپری شده در محفظه تاریک (TDR) ثبت گردید (۱۷). در مرحله به خاطر آوری هیچ گونه شوک الکتریکی داده نشد. زمان قطع این آزمون ۳۰۰ ثانیه است. طولانی تر بودن تأخیر اولیه ورود به محفظه تاریک در مرحله آزمون، به معنی بازیابی حافظه است.

سنجش شاخص های استرس اکسایشی در هیپوکامپ

در پایان دوره تیمار، تعدادی از حیوانات هر گروه (n=۴) با استنشاق گاز کلروفرم به طور عمیق بیهوش و بلافاصله سر حیوان با استفاده از گیوتین مخصوص جوندگان جدا شد. تمامی مغز از جمجمه خارج شد و به سرعت بر روی یخ قرار گرفت. سپس، هیپوکامپ در زیر استریوسکوپ (Olympus, Japan) از بقیه قسمت های مغز با دقت جدا شد. پس از شستشوی بافت جدا شده با محلول نرمال سالین به همراه بافر تریس (Sigma, Germany)، هموژیناسیون بافتی با کمک دستگاه هموژنایزر (IKA, Germany) به مدت ۵ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. محلول هموژنیزه شده توسط سانتریفوژ یخچال دار (Hermle, Germany) سانتریفوژ و از محلول ۰/۵ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (Sigma-Aldrich, PMSF; Germany) به عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد (۱۷). از محلول رومانند پس از سانتریفوژ جهت سنجش فاکتورهای استرس اکسایشی استفاده شد. توسط روش ELISA و کیت های شرکت فاین تست (Fine Test, China) و به استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax, USA)، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سنجیده شد. سپس، سطح بافتی مالون دی آلدئید (MDA) بر پایه واکنش با تیوباریتوریک اسید (Merck, Germany) به روش روش طیفسنجی و با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۵ نانومتر و مقایسه جذب با منحنی استاندارد در نمونه های هیپوکامپ مورد سنجش قرار گرفت.

هیستوپاتولوژی

به منظور ارزیابی بافتی هیپوکامپ و سنجش تراکم نورون های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ (CA1 و CA3)، در پایان دوره تیمار با p-Cymene، حیوانات (n=۴) در هر گروه با قرار گرفتن در دسیکاتور حاوی کلروفرم به طور عمیق بیهوش شدند و بلافاصله پرفیوژن قلبی با جایگزینی فرمالین ۱۰ درصد متعاقب شستشوی خون از بدن با کلرور سدیم انجام شد. در پایان، مغز با دقت از جمجمه خارج و پردازش بافتی با کمک دستگاه اتوتکنیکون صورت گرفت. پس از تهیه بلوک های پارافینه، برش گیری از ناحیه هیپوکامپ مغز به کمک راهنمای اطلس

SPSS ویرایش ۲۲ استفاده شد. برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف استفاده شد و پس از تایید توزیع نرمال داده‌ها، جهت تعیین اختلاف معنادار بین گروه‌های مطالعه، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی به کار گرفته شد. مقادیر $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.

یافته‌ها

ارزیابی رفتار کاتالپسی

نتایج تجزیه و تحلیل آماری به کمک آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$ و $27/369 = F_{4,35}$). در واقع، مدت زمان آزمون میله (رفتار کاتالپسی) در گروه RES+VP و گروه RES+p-Cymene نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (به ترتیب: $p < 0/001$ و $p < 0/01$). از طرفی، کاهش معنی‌داری در زمان آزمون میله در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p- Cymene نسبت به گروه RES+VP دیده شد ($p < 0/001$). با این حال اختلافی بین گروه p-Cymene+VR با گروه کنترل دیده نشد ($p > 0/05$ ، شکل ۱).

ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال

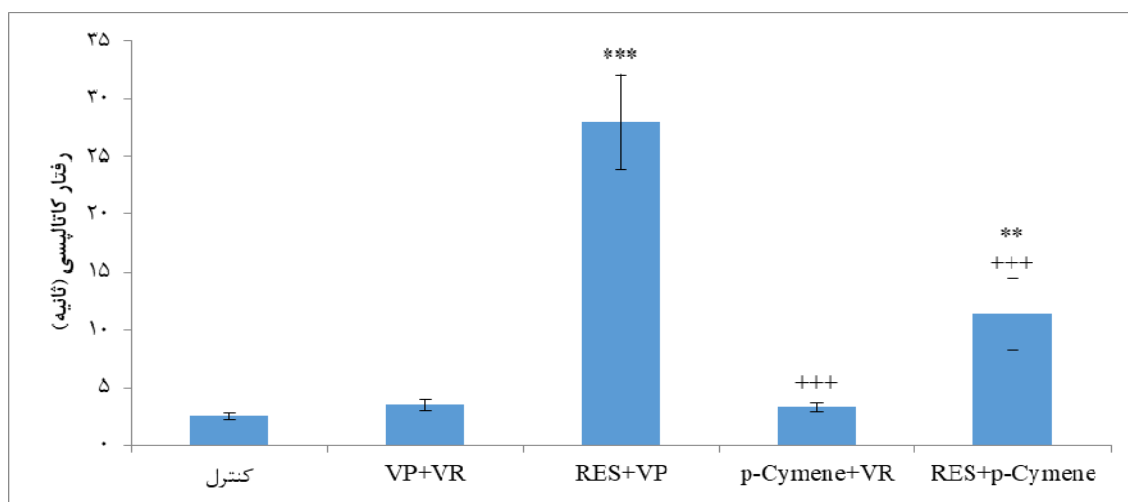
به کمک آنالیز واریانس یک طرفه، تأخیر در ورود به اتاق تاریک (LDR)، در مرحله آموزش تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان نداد (شکل ۲). میزان LDR، ۲۴ ساعت پس از القاء شوک اختلاف معنی‌داری را در بین

پاکسینوس و واتسون انجام شد. جهت سنجش تراکم نورون‌های تیره از رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین استفاده شد (۱۷). به طور خلاصه، پس از پارافین‌زدایی از اسلایدهای تهیه شده و فرایند آبدهی با درجات نزولی اتانول، اسلایدها به مدت یک دقیقه در رنگ آبی تولوئیدین ۱ درصد قرار گرفتند. در پایان، برش‌ها مجدداً با درجات صعودی اتانول آبگیری و پس فرایند شفاف‌سازی، تصویربرداری با میکروسکوپ نوری (Olympus-BH₂, Japan) متصل به سیستم کامپیوتری و آنالیز به کمک نرم افزار استریولایت صورت گرفت.

با روش نمونه‌برداری تصادفی و با استفاده از روش دایسکتور سنجش تراکم نورن‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ انجام شد. به طور خلاصه، در این روش شمارش سلول‌ها در یک چهارچوب مرجع انجام شد. اگر سلولی در هر دو چهارچوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌شود. اما اگر سلولی در چهارچوب مرجع باشد، ولی در چهارچوب بعدی (برش دوم) نباشد، مورد شمارش قرار می‌گیرد. پس از شمارش سلول‌ها، دانسیته نورونی، با فرمول $N_A = \sum Q / \sum P \times AH$ محاسبه شد که در آن $N_A =$ دانسیته نورونی، $\sum Q =$ مجموع سلول‌های شمارش شده در یک نمونه، $\sum P =$ تعداد دفعات نمونه برداری شده در یک نمونه، $A =$ مساحت چهارچوب نمونه برداری و $H =$ فاصله بین دو برش متوالی، یا ضخامت هر برش می‌باشد (۱۸). حداقل ۱۰ اسلاید از هر نمونه هیپوکامپ (۵۰ اسلاید در هر گروه) جهت ارزیابی دانسیته نورون‌های تیره شمارش شدند.

ارزیابی آماری

جهت تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف از نرم افزار آماری

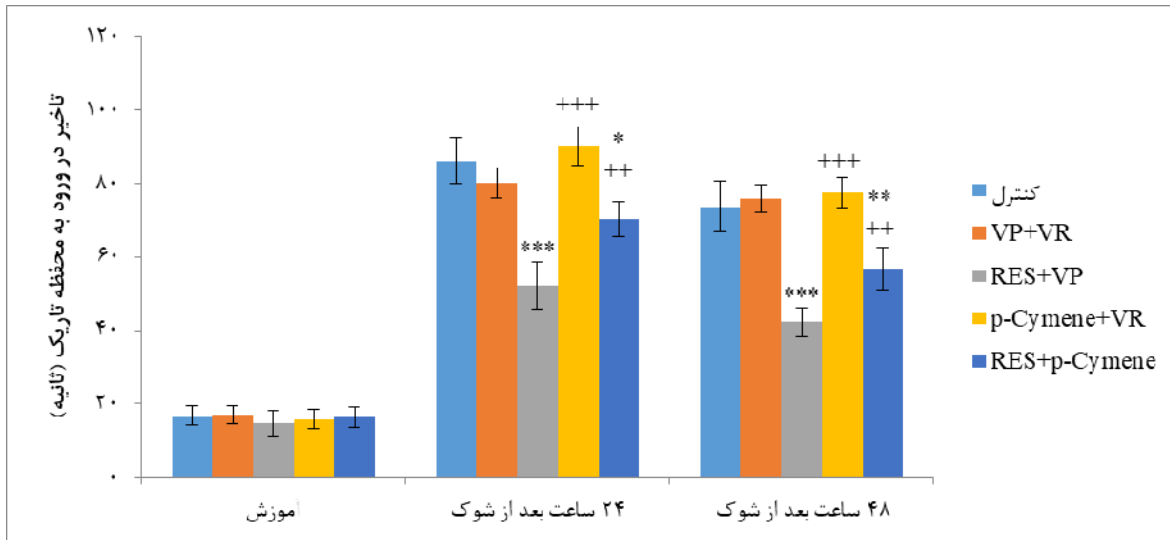


شکل ۱. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف استاندارد مدت زمان آزمون میله در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج نشان می‌دهد بین گروه کنترل با گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p < 0/001$ و $p < 0/01$). در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene در مقایسه با گروه RES+VP، کاهش معنی‌داری دیده شد ($p < 0/001$).

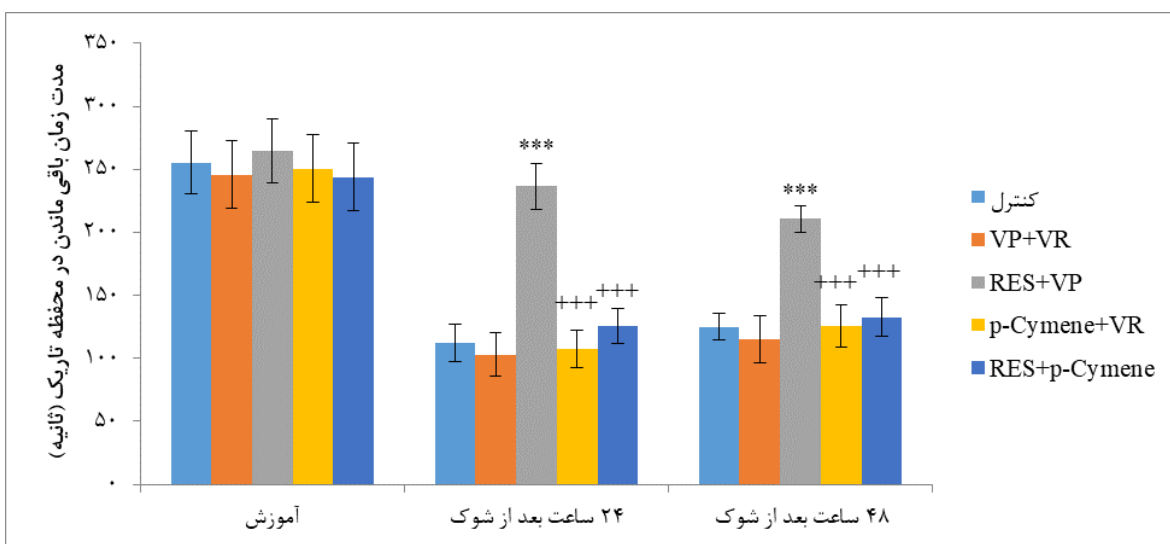
گروه‌های مورد مطالعه نشان داد ($p < 0/001$) و $F_{3,35} = 7/569$ ، در مقایسه با گروه کنترل، گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene کاهش معنی‌داری نشان دادند (به ترتیب: $p < 0/001$ و $p < 0/01$). از طرفی، گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene نسبت به گروه RES+VP افزایش معنی‌داری داشت (به ترتیب: $p < 0/001$ و $p < 0/01$).

در شکل ۳، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، میانگین مدت زمان حضور حیوان در محفظه تاریک (TDR)

در آزمون تعقیبی توکی، کاهش معنی‌داری در گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene نسبت به گروه کنترل دیده شد (به ترتیب: $p < 0/001$ و $p < 0/05$). همچنین، در مقایسه با گروه RES+VP افزایش معنی‌داری در گروه RES+p-Cymene ($p < 0/01$) دیده شد. بین گروه کنترل و گروه VP+VR اختلاف معنی‌دار نبود. ۴۸ ساعت پس از القاء شوک نیز اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0/001$).



شکل ۲. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف استاندارد مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک: قبل از اعمال شوک اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود ندارد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القاء شوک بین گروه کنترل با گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0/001$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/05$). در مقایسه با گروه RES+VP، گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene افزایش معنی‌داری را در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القاء شوک نشان داد ($p < 0/001$ و $p < 0/01$).

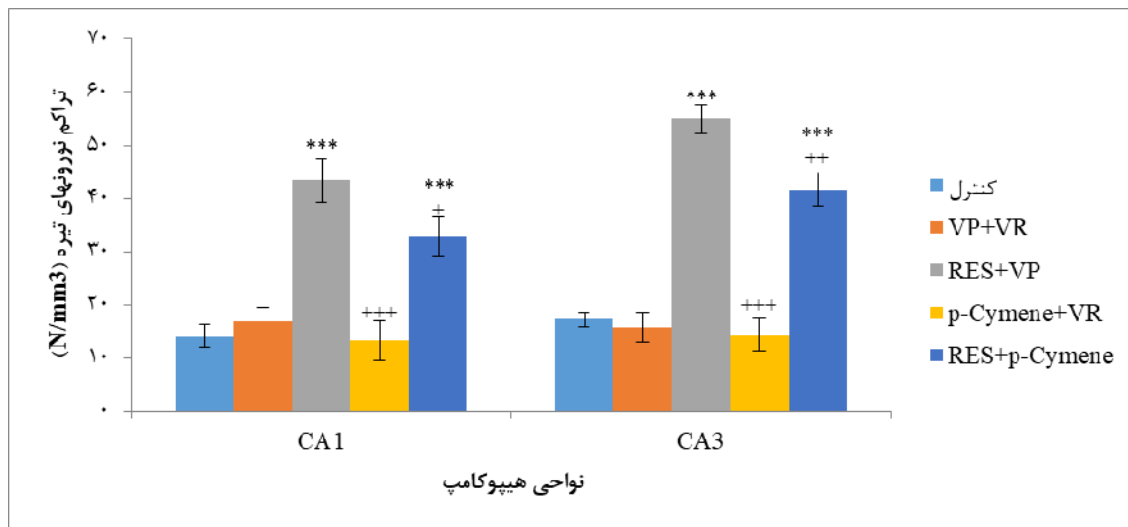


شکل ۳. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف استاندارد مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک. قبل از اعمال شوک اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القاء شوک بین گروه کنترل با گروه RES+VP اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/001$). گروه RES+VP با دو گروه p-Cymene+VR و RES+p-Cymene در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القاء شوک اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0/001$).

جدول ۱. میانگین فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و MDA در هیپوکامپ

گروه	پارامتر	CAT (mIU/ml)	SOD (pg/ml)	MDA (ng/ml)
کنترل		۱۳۵/۹۱±۸/۲۷	۶۸/۴۵±۴/۳۲	۳۵/۶۱±۳/۵۵
VP+VR		۱۲۷/۶۳±۶/۳۸	۶۳/۳۸±۵/۱۱	۳۳/۱۸±۳/۲۸
RES+VP		***۵۳/۷۴±۴/۱۱	***۳۹/۴۴±۳/۵۵	***۸۴/۵۲±۶/۳۴
p-Cymene+VR		***۱۴۲/۸۶±۱۲/۰۷	***۷۱/۴۵±۵/۸۲	***۳۰/۶۱±۴/۲۵
RES+p-Cymene		***۸۵/۴۲±۶/۵۵	***۵۸/۱۵±۳/۷۰	***۵۵/۱۱±۵/۳۹
سطح معنی داری		۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱

در مقایسه با گروه کنترل، گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene اختلاف معناداری در میزان SOD، CAT و MDA نشان دادند ($p < ۰/۰۰۱$) و $***p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه RES+VP، اختلاف معناداری در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene دیده شد ($***p < ۰/۰۰۱$).



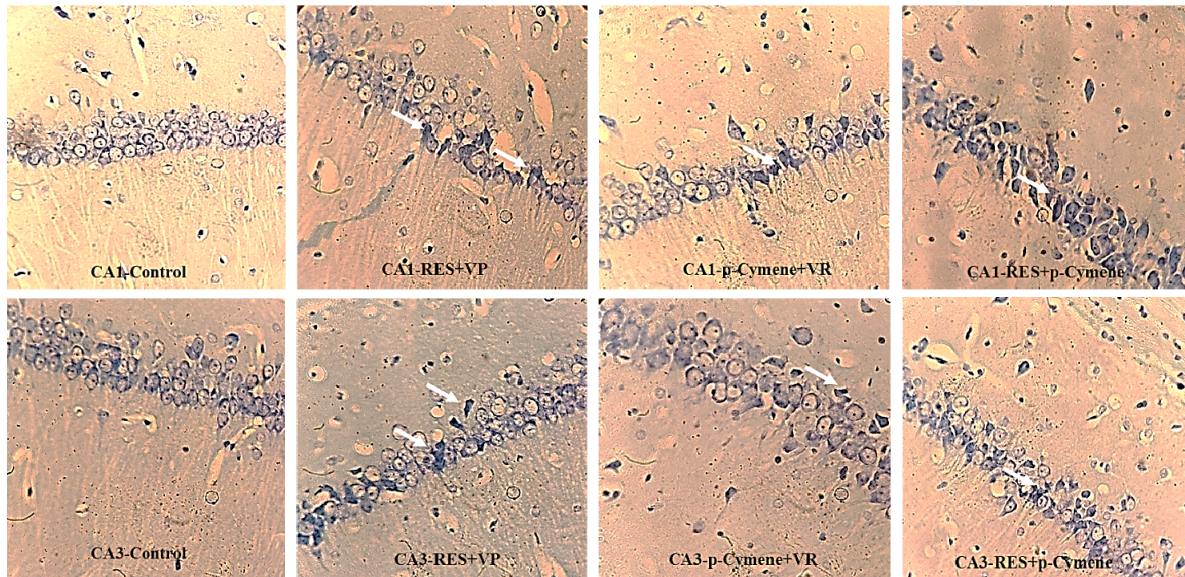
شکل ۴. مقایسه میانگین $\pm$ انحراف استاندارد تراکم نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ در گروه‌های مطالعه. در هر دو ناحیه مورد بررسی بین گروه کنترل با گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene اختلاف معنی دار است ($p < ۰/۰۰۱$). از طرفی، کاهش معنی داری در تراکم نورون‌های تیره در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene نسبت به گروه RES+VP دیده شد ($p < ۰/۰۰۱$) و $***p < ۰/۰۰۱$.

هیپوکامپ گروه‌های مورد مطالعه در مرحله آموزش نشان داد ($F_{۳,۱۱} = ۶/۵۵۳$ و $p < ۰/۰۰۱$). در واقع، گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین، در گروه p-Cymene+VR و گروه RES+p-Cymene در مقایسه با گروه RES+VP افزایش معنی داری در CAT هیپوکامپی دیده شد (جدول ۱، $p < ۰/۰۰۱$). همچنین، اختلاف معنی داری در میزان SOD در گروه‌های مورد مطالعه دیده شد ($F_{۳,۱۱} = ۸/۱۷۶$ و $p < ۰/۰۰۱$). کاهش معنی دار فعالیت هیپوکامپی آنزیم SOD در گروه‌های RES+VP و RES+p-Cymene نسبت به گروه کنترل وجود داشت (به ترتیب: $p < ۰/۰۰۱$ و $p < ۰/۰۱$). از طرفی، گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene نسبت به

اختلافی بین گروه‌های مورد مطالعه در مرحله آموزش نشان نداد. ۲۴ ($F_{۳,۳۵} = ۱۳/۶۹۲$ و $p < ۰/۰۰۱$) و ۴۸ ($F_{۳,۳۵} = ۲۷/۷۳۵$ و $p < ۰/۰۰۱$) ساعت پس از القاء شوک، میزان TDR در بین گروه‌ها معنی دار بود. در آزمون تعقیبی توکی دیده شد که میزان TDR در گروه RES+VP در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین، در مقایسه با گروه RES+VP کاهش معنی دار TDR در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القاء شوک دیده شد ($p < ۰/۰۰۱$).

ارزیابی فاکتورهای استرس اکسایشی در هیپوکامپ

به کمک آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی فاکتورهای استرس اکسایشی در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت، میزان فعالیت آنزیم CAT در



شکل ۵. فوتومیکروگراف نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ در گروه‌های مورد مطالعه. افزایش تراکم نورون‌های تیره در گروه RES+VP نسبت به گروه کنترل دیده می‌شود. این در حالی است که در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene تراکم نورون‌های تیره کمتری قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو. پیکان‌های سفید نورون‌های تیره را نشان می‌دهند. بزرگنمایی تصاویر ۴۰X

گروه کنترل دیده شد ($p < 0.001$). در واقع، افزایش معنی-دار تراکم نورون‌های تیره در گروه RES+VP و RES+p-Cymene در مقایسه با گروه کنترل نشان‌دهنده مرگ سلولی و آپوپتوز در این نواحی از هیپوکامپ است. از طرفی، در مقایسه با گروه RES+VP، حیوانات گروه RES+p-Cymene در هر دو ناحیه CA1 و CA3 کاهش معنی‌داری در تراکم نورون‌های تیره نشان دادند (به ترتیب: $p < 0.05$ و $p < 0.01$). گروه p-Cymene+VR در مقایسه با گروه RES+VP کاهش معناداری را در تراکم نورون‌های تیره در هر دو ناحیه CA1 و CA3 نشان داد ($p < 0.001$).

بحث

در مطالعه حاضر، اثر محافظت‌کننده عصبی p-Cymene در موش‌های صحرایی مدل PD به دنبال تجویز مکرر RES مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که p-Cymene از رفتار کاتالپسی ناشی از RES جلوگیری می‌کند، حافظه اجتنابی غیر فعال را بهبود می‌بخشد، و سطح فعالیت هیپوکامپی آنزیم‌های SOD و CAT را افزایش و میزان MDA را در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مدل PD کاهش می‌دهد. علاوه بر این، p-Cymene از تولید نورون‌های تیره در نتیجه تجویز RES مناطق CA1 و CA3 هیپوکامپ جلوگیری به عمل می‌آورد.

گروه RES+VP افزایش معنی‌داری را در فعالیت SOD هیپوکامپی نشان دادند (جدول ۱، $p < 0.001$).

در سنجش سطح هیپوکامپی MDA اختلاف بین گروه‌های مختلف معنی‌دار بود ($p < 0.001$ و $F_{(9,11)} = 6.787$). در واقع، افزایش معنی‌داری در گروه RES+VP نسبت به گروه کنترل داشت ($p < 0.001$). مقایسه گروه‌های دریافت‌کننده p-Cymene با گروه RES+VP نشان داد که در گروه‌های p-Cymene+VR و RES+p-Cymene در مقایسه با گروه RES+VP کاهش معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.001$). گروه RES+p-Cymene در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری در میزان MDA از خود نشان داد (جدول ۱، $p < 0.001$).

تراکم نورون‌های آپوپتیک

نورون‌های آپوپتیک (نورون‌های تیره) با استفاده از رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین در نواحی مختلف هیپوکامپ قابل مشاهده بود (شکل ۵). نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه در ناحیه CA1 ($p < 0.001$ و $F_{(9,11)} = 9.052$) و CA3 ($p < 0.001$ و $F_{(9,11)} = 11.723$) بود. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه کنترل و گروه RES+VP در نواحی CA1 و CA3 اختلاف معنی‌دار دارند (شکل ۴، $p < 0.001$). همچنین، افزایش معنی‌داری در تراکم نورون‌های آپوپتیک در گروه RES+p-Cymene در مقایسه با

مونوآمین‌ها، متابولیسم آنها توسط آنزیم مونوآمین اکسیداز (MAO) را افزایش می‌دهد و سبب افزایش استرس اکسایشی می‌گردد (۲۶). همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده شد، p-Cymene احتمالاً با اثرات بالقوه آنتی اکسیدانی رفتار کاتالپسی ناشی از RES را در موش‌های صحرایی کاهش داد. در مطالعه حاضر، علاوه بر اختلال حرکتی، اختلال شناختی در آزمون حافظه اجتنابی غیر فعال دیده شد. چنانچه گفته شد، اختلال در مسیرهای غیر از مسیر نیگرواستریاتال نقش مهمی در بروز علائم غیر حرکتی PD دارد. مطالعه حاضر اختلال حافظه احترازی غیر فعال را به کمک آزمون شاتل باکس و ۲۴ ساعت پس از تزریق پنجم رزپین نشان داد. برخی از نواحی مغزی درگیر در شناخت مانند هیپوکامپ و قشر فرونتال میانی با آوران‌های سروتونرژیک و دوپامینرژیک که به ترتیب از کمپلکس رافه و مسیر مزوکورتیکولیمبیک منشأ می‌گیرند، عصب دهی می‌شوند (۲۷). این احتمال وجود دارد که اختلال حافظه ناشی از RES در مطالعه حاضر، ناشی از تغییرات نوروشیمیایی در نواحی قشری مغز باشد که سبب آسیب نورون‌های هرمی هیپوکامپ و تولید نورن‌های آپوپتیک در نواحی CA1 و CA3 می‌شود.

RES به عنوان القاءگر استرس اکسایشی، در محدوده دوز ۱-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، می‌تواند سبب کاهش آنزیم کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون احیاء و ATP شود. از طرفی، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش دهد (۲۸). با این وجود، برخی از مطالعات نتایج متناقضی را گزارش داده‌اند. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها ناشی از دوزهای متفاوت RES، روش درمانی و ناحیه مغزی مورد مطالعه باشد. به عنوان مثال، تجویز مکرر با دوزهای پایین RES (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم) اثرات تجمعی بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی در جسم مخطط دارد، در حالی که چنین تغییری در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیده نشده است. همچنین، فعالیت کاتالاز به طور کلی در تمام نواحی مغز به جز جسم مخطط کاهش می‌یابد (۲۸). با این حال، در مطالعه حاضر که از میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن RES استفاده شد، پس از پایان دوره تیمار سطح آنزیم‌های CAT و SOD در هیپوکامپ گروه RES+VP در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت. به نظر می‌رسد استرس اکسایشی در مسیر نیگرواستریاتال یا هیپوکامپ ناشی از تجویز RES برای انحطاط نورونی و تولید نورون‌های آپوپتیک (نورون تیره) کافی است. استرس اکسیداتیو می‌تواند با تولید رادیکال‌های آزاد، سیستم آنتی اکسیدانی مغز را تضعیف نموده

RES مهارکننده ناقل وزیکولی مونوآمین نوع ۱ و ۲ (VMAT-1 و VMAT-2) است، ذخیره وزیکولی مونوآمین را کاهش می‌دهد و باعث کاهش قابل توجه محتوای مونوآمینی در مغز می‌شود (۱۹). این اثر منجر به بروز علائم حرکتی و غیر حرکتی و تغییرات نوروشیمیایی در مغز انسان و حیوانات می‌گردد که مشابه آن در بیماران مبتلا به PD دیده می‌شود (۲۰). در حیوانات آزمایشگاهی، RES تغییرات حرکتی مانند کاتالپسی، کندی حرکت، سفتی عضلانی، لرزش، دیسکینزی دهان و ناتوانی وضعیتی را القاء می‌کند (۲۱). همچنین، اختلالات شناختی مانند نقص توجه، اختلال در یادگیری و حافظه اپیزودیک و اجرایی در مدل رزپینی PD دیده شده است (۲۲). اختلالات حرکتی عمدتاً در نتیجه از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه است، که مسیر دوپامینرژیک اصلی به هسته‌های تنظیم کننده حرکت در عقده های قاعده‌ای می‌باشد. با این وجود، نقص نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه شکمی تگمنتوم (VTA) که مسیر آن به سیستم لیمبیک و قشر جلوی مغز می‌رسد، در PD گزارش شده است. نقص در این مسیر منجر به بروز اختلالات غیر حرکتی، عاطفی و شناختی می‌گردد (۲۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گروه RES+VP افزایش قابل توجهی در رفتار کاتالپسی دارد که منطبق با مطالعات قبلی بود (۱۳). از طرفی، تیمار با p-Cymene توانست از رفتار کاتالپسی ناشی از RES جلوگیری کند (شکل ۱). رفتار کاتالپسی به عنوان ناتوانی حیوان در تصحیح وضعیت تحمیلی خارجی است که با ناتوانی بیماران PD در شروع حرکات قابل مقایسه است (۲۱). این تغییر رفتاری با اختلال در عملکرد برخی از نواحی مغزی مانند جسم مخطط و گلوبوس پالیدوس، و تغییرات سطح دوپامین در سیستم نیگرواستریاتال مرتبط است (۲۴). بنابراین، آزمون کاتالپسی ابزار مفیدی برای بررسی تغییرات حرکتی مرتبط با PD است و آن را می‌توان با آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین نیز القاء کرد (۱۳). از طرفی، پیشنهاد می‌شود که آگونیست‌های گیرنده دوپامین بتوانند از این رفتار جلوگیری کنند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که p-Cymene بتواند سبب فعالیت گیرنده‌های دوپامینرژیک شود و از این طریق اثر محافظتی خود را در آزمون کاتالپسی اعمال کند (۲۵).

از آنجایی که RES سبب ایجاد اختلال در ذخیره مونوآمین‌های وزیکولی سیناپسی می‌شود، سطح درون سلولی مونوآمین‌ها را افزایش داده و سبب تخلیه مونوآمین در پایانه‌های عصبی می‌شود. افزایش سطح درون سلولی

و منجر به ایجاد آسیب‌های جبران ناپذیر به مغز می‌شود (۲۹). استرس اکسایشی و التهاب مزمن ناشی از بیماری پارکینسون با تغییر سطوح miRNA و پروتئین‌های هدف آن‌ها، موجب تخریب سلول‌های عصبی می‌گردد. این در حالی است که بر اساس مطالعات قبلی، آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند با تغییر سطوح miRNA و پروتئین‌های هدف آن‌ها، از سلول‌های عصبی محافظت نمایند (۳۰).

p-cymene دارای اثرات آنتی اکسیدان بالقوه در داخل بدن است و ممکن است به عنوان یک عامل محافظت کننده عصبی در مغز عمل کند. این ترکیب می‌تواند یک استراتژی جدید در مسیر درمان بسیاری از بیماری‌هایی باشد که در آن‌ها استرس اکسایشی نقش مهم پاتوفیزیولوژیکی دارد (۳۱). در این مطالعه، این ترکیب، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD را افزایش و میزان MDA را کاهش داد که همسو با مطالعات پیشین است (۳۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که p-cymene با مهار آپوپتوز و توقف چرخه سلولی می‌تواند سبب پیشگیری از مرگ سلولی در نواحی مختلف مغزی گردد (۱۰). در مطالعه حاضر، تجویز p-cymene سبب کاهش نوروهای تیره در

نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ شد. این مسئله همراه با بهبود حافظه اجتنابی و کاهش رفتار کاتالپسی در گروه RES+p- Cymene در مقایسه با گروه دریافت کننده حلال (VR+VP) دیده شد. از طرفی، عربلوئی و همکاران نشان دادند که p-cymene می‌تواند با تنظیم مسیر پیام رسانی Akt/mTOR اثرات کاهنده قند خون دارد و آسیب بافت کبد و پانکراس را در مدل بیماری دیابت کاهش می‌دهد (۳۳).

مطالعه حاضر نشان داد که p-cymene اثر محافظت کننده عصبی، بهبود حافظه اجتنابی و پیشگیری از تولید نورونهای آپوپتیک در نواحی مختلف هیپوکامپ در مدل رزپینی PD دارد. با این حال، محدودیت‌های مطالعه حاضر باید در نظر گرفته شود، چرا که در این مطالعه روش‌های مختلف برای ارزیابی مکانیسم‌های مرتبط با اثر محافظتی p-cymene نشده است. بنابراین، نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه اثر p-cymene بر تغییرات حرکتی و غیر حرکتی در مدل رزپینی PD می‌باشد که می‌تواند ما را به درک بهتری برای پیشگیری یا درمان PD سوق دهد.

REFERENCES

1. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2021;20:385-97.
2. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2017;124:901-905.
3. Church FC. Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Biomolecules* 2021;11:612.
4. Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease. *Med Clin North Am* 2019;103:337-350.
5. Beitz JM. Parkinson's disease: a review. *Front Biosci (Schol Ed)* 2014;6:65-74.
6. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med* 2019;132:802-807.
7. Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review. *Neurol India* 2018;66:S26-35.
8. Leão AH, Sarmiento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathol* 2015;25:377-90.
9. Dehsheikh AB, Sourestani MM, Dehsheikh PB, Mottaghipisheh J, Vitalini S, Iriti M. Monoterpenes: Essential Oil Components with Valuable Features. *Mini Rev Med Chem* 2020;20:958-74.
10. Balahbib A, El Omari N, Hachlafi NE, Lakhdar F, El Menyiy N, Salhi N, et al. Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. *Food Chem Toxicol* 2021;153:112259.
11. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2013;106-107:17-32.
12. Rekha KR, Inmozhi Sivakamasundari R. Geraniol Protects Against the Protein and Oxidative Stress Induced by Rotenone in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 2018;43:1947-62.
13. Lins LCRF, Souza MF, Bispo JMM, Gois AM, Melo TCS, Andrade RAS, et al. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. *Brain Res Bull* 2018;139:9-15.
14. Seifi-Nahavandi B, Yaghmaei P, Ahmadian S, Ghobeh M, Ebrahim-Habibi A. Cymene consumption and physical activity effect in Alzheimer's disease model: an in vivo and in vitro study. *J Diabetes Metab Disord* 2020;19:1381-89.

15. Bricker B, Sampson D, Ablordeppey SY. Evaluation of the potential of antipsychotic agents to induce catalepsy in rats: assessment of a new, commercially available, semi-automated instrument. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;120:109-16.
16. Edalatmanesh MA, Hosseini M, Ghasemi S, Golestani S, Sadeghnia HR, Mousavi SM, et al. Valproic acid-mediated inhibition of trimethyltin-induced deficits in memory and learning in the rat does not directly depend on its anti-oxidant properties. *Ir J Med Sci* 2016;185:75-84.
17. Abutalebi Ardakani Z, Edalatmanesh MA. The effect of coenzyme-Q10 on neuroinflammation and hippocampal cell damage in a model of monosodium glutamate induced excitotoxicity. *Pars Journal of Medical Sciences*. 2022; 19: 45-54. [In Persian]
18. Roshanfekar H, Edalatmanesh M A, Aghababa H. The effect of gallic acid on oxidative stress parameters and hippocampal cell density in ischemia-renal reperfusion model. *Medical Sciences* 2022; 32 :379-388. [In Persian]
19. Li Y, Yin Q, Wang B, Shen T, Luo W, Liu T. Preclinical reserpine models recapitulating motor and non-motor features of Parkinson's disease: Roles of epigenetic upregulation of alpha-synuclein and autophagy impairment. *Front Pharmacol* 2022;13:944376.
20. Ribeiro AM, Silva RH, Santos JR. Testosterone propionate improves motor alterations and dopaminergic damage in the reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 2022;187:162-168.
21. Lima AC, Meurer YSR, Bioni VS, Cunha DMG, Gonçalves N, Lopes-Silva LB, et al. Female Rats Are Resistant to Cognitive, Motor and Dopaminergic Deficits in the Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2021;13:757714.
22. Crippa JA, Vânia D, Silva RH, Abílio VC. Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats. *Front Pharmacol* 2016;7:343.
23. Changes in the mesocorticolimbic pathway after low dose reserpine-treatment in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Implications for cognitive deficits in a progressive animal model for Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2021;410:113349.
24. Waku I, Magalhães MS, Alves CO, de Oliveira AR. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *Eur J Neurosci* 2021;53:3743-3767.
25. de Santana MF, Guimarães AG, Chaves DO, Silva JC, Bonjardim LR, de Lucca Júnior W, et al. The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. *Pharm Biol* 2015;53:1583-90.
26. Rahman MM, Chakraborti RR, Pitol MA, Abir AH, Sharmin O, Alam M, et al. Epalrestat improves motor symptoms by reducing oxidative stress and inflammation in the reserpine induced mouse model of Parkinson's disease. *Animal Model Exp Med* 2019;3:9-21.
27. Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel ER. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:14835-14840.
28. Leão AH, Sarmento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathol* 2015;25:377-90.
29. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* 2019;18:e13031.
30. Santos-Lobato BL, Vidal AF, Ribeiro-Dos-Santos Â. Regulatory miRNA-mRNA Networks in Parkinson's Disease. *Cells* 2021;10:1410.
31. Cao XL, Sparling M, Dabeka R. p-Cymene, a natural antioxidant, in Canadian total diet foods: occurrence and dietary exposures. *J Sci Food Agric* 2019;99:5606-609.
32. de Oliveira TM, de Carvalho RB, da Costa IH, de Oliveira GA, de Souza AA, de Lima SG, de Freitas RM. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharm Biol* 2015;53:423-8.
33. Arabloei Sani M, Yaghmaei P, Hajebrahimi Z, Hayati Roodbari N. Therapeutic Effect of P-Cymene on Lipid Profile, Liver Enzyme, and Akt/Mtor Pathway in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Wistar Rats. *J Obes* 2022;2022:1015669.