



بررسی اثر ضد سرطانی کوئرستین بر روی سلول های Saos2 استئوسارکوما

شیمیا نوروزی: گروه فارماکولوژی - سم شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ریحانه نمازی: گروه فارماکولوژی - سم شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پروانه نجفی زاده: گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

گلاره وهاب زاده: گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*)
نویسنده مسئول (Vahabzadeh.g@iums.ac.ir)

چکیده

کلیدواژه‌ها

استئوسارکوم،
کوئرستین،
Saos2،
نیتریک اکساید

زمینه و هدف: استئوسارکوم یک نئوپلاسم بدخیم غیر هماتوپوئیتیک پیش‌رونده ناشی از تغییر شکل سلول‌های اولیه استخوان از منشا مزانشیم است. این بیماری بسیار تهاجمی است و تومور تشکیل شده آن ثابت، سخت و نامنظم می‌باشد. کوئرستین یک فلاوونول طبیعی زیر مجموعه بیوفلاوونوئیدها با اثرات جانبی کم می‌باشد که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی است. هدف از این مطالعه ارزیابی کوئرستین به عنوان ماده ضدسرطانی بر روی سلول‌های Saos-2 می‌باشد.

روش کار: پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌های Saos2 در پلیت ۹۶ خانه، غلظت‌های متفاوت از کوئرستین به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها با داروی مورد نظر انکوبه شدند و سپس جهت تاثیر زنده مانی سلول‌ها در حضور و عدم حضور دارو از روش MTT برای تعیین اثر زنده مانی سلول‌ها و از روش گریس جهت اندازه‌گیری میزان تولید نیتریک اکساید (NO) استفاده شد. داده‌ها با روش آماری واریانس یک طرفه (One way ANOVA) تجزیه و تحلیل و معنی داری در سطح $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد کوئرستین می‌تواند موجب کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل شود. بهترین دوز موثر در غلظت ۱۲۰ میکرومول می‌باشد. همچنین داده‌ها نشان داد که کوئرستین در تمامی غلظت‌ها توانسته است باعث کاهش تولید NO در سلول‌های سرطانی شود و بهترین غلظت موثر ۱۲۰ میکرومول می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد که کوئرستین توانسته است باعث کاهش زنده مانی سلول‌های Saos2 شود که بخشی از اثرات آن را می‌توان وابسته به کاهش مقدار NO تولید شده نسبت داد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Norouzi S, Namazi R, Najafzadeh P, Vahabzadeh G. The Effect of Quercetin on Saos2 Osteosarcoma Cell Line. Razi J Med Sci. 2023;29(11):47-57.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

The Effect of Quercetin on Saos2 Osteosarcoma Cell Line

Shima Norouzi: Department of Toxicology & Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Reyhaneh Namazi: Department of Toxicology & Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Parvaneh Najafizadeh: Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Gelareh Vahabzadeh: Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Razi Drug Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) Vahabzadeh.g@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Osteosarcoma (also called osteogenic sarcoma) is the most common type of cancer that starts in the bones. It is a malignant mesenchymal cell tumour, characterized by pleomorphic spindle-shaped cells, capable of producing an osteoid matrix. Tumour cells metastasize primarily via the haematogenous route. This disease is very aggressive and the tumor formed is fixed, hard and irregular. The cancer cells in these tumors look like early forms of bone cells that normally help make new bone tissue, but the bone tissue in an osteosarcoma is not as strong as that in normal bones. Overall, osteosarcoma is a rare disease, however, children and teens are the most commonly affected age group, but osteosarcoma can develop at any age. Although this disease occurs sporadically, approximately 70% of tumor specimens show an abnormality in the chromosome. Moreover, regulation of cell cycle has been reported to demonstrate inherited defects in some cases. The incidence of osteosarcoma is bimodal. The first peak occurs at the ages of puberty, implying the ages of 15 to 19 in boys and the ages of 10 to 14 in girls. The second peak occurs in the elderly with the age of 75 years. Noteworthy, osteosarcoma is rare before the age of 5. With the application of multimodal chemotherapy, disease-free survival of patients with high-grade osteosarcoma has been improved to more than 60% compared to 10–20% which was reachable with the surgery as the only therapeutic approach. At present, treatment of osteosarcoma is a combination of surgery and chemotherapy both before and after the surgery. Additionally, the use of common chemotherapeutic agents such as high-dose methotrexate, cisplatin, doxorubicin and/or etoposide and ifosfamide frequently causes both acute and long-term toxicity. Although several chemotherapy regimens have been applied in the past 20 years, survival rates of patients are still not satisfying and no practical targeted therapy is discovered. Therefore, it is important to investigate different therapeutic methods and anti-tumor agents in order to find an approach that provides a higher survival rate. Flavonoids possess several biological and pharmacological activities. In addition, flavonoids have the advantage of being less toxic and can be prescribed for an extended duration. Therefore, various plant-derived flavonoids use as drugs have been reported as a modulator for chronic inflammation caused by virus infection and other diseases, such as human papillomavirus, hepatitis virus, SARS-CoV-2, autoimmune disease, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and cancer. Quercetin is a naturally occurring polyphenolic flavonoid, whose chemical name is 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone (C₁₅H₁₀O₇), can be found in a wide range of daily foods, such as grains, fruits, and vegetables and in higher levels in capers, buckwheat seeds, radish, onions, apples, red leaf lettuce, asparagus, nuts, and teas. It is reported that oral

Keywords

SaOS2,
Nitric oxide,
Osteosarcoma,
Quercetin

Received: 17/12/2022

Published: 07/02/2023

administration of 1 g quercetin per day is safe and is absorbed up to 60%. Quercetin has a high ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) molecules; therefore, exhibiting beneficial effects in preventing obesity, diabetes, cardiovascular diseases, and inflammation. Furthermore, quercetin is indicated to exert various anti-tumor effects both *in vitro* and *in vivo* against several cancers, such as ovarian cancer, colorectal cancer, lymphoma, gastric cancer, and breast cancer. On the other hand, the high toxic effect of quercetin against cancer cells is accompanied with little or no side effects or harm to normal cells. Its wide accessibility, efficacy, and a broad range of activity, and low toxicity as compared with other examined compounds, make it an attractive chemical in the fight against diseases including cancer. It has been recognized and employed as an alternative drug in treating different cancers alone or in combination with other chemotherapeutic drugs. NO is a free radical that regulates several physiological functions and is formed by the conversion of L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthases (NOS). NO is a dual molecule that can have a tumor-protecting or stimulating effect, depending on its local concentration. Certain reports demonstrated a cytotoxic role of NO; others presented a protective role. Many investigations have shown that quercetin has anti-inflammatory activity that pulls out the nitric oxide, catalase, and cytokines, specifically TNF- α , IL- β , and IL-6, which are inflammatory mediators. Therefore, we tried to elucidate the influence of quercetin in order to suggest a new candidate for the treatment of this cancer, on *in vitro* NO production from Saos2 osteosarcoma cell line

Methods: After 24 hours of culture of Saos2 cells in 96-well plates, different concentrations of quercetin were added to the wells for 72 hours. Cell viability was measured using the colorimetric MTT assay. Briefly, cells were incubated with 0.5mg/mL MTT in DMEM at 37 °C under 5 % CO₂ for 3 h. The blue formazan reduction product, which is generated by the action of the succinate dehydrogenase on the dye only in living cells, was dissolved in 100 μ L DMSO, and its absorbance was read at 570nm using a Dynex MMX microplate reader. The level of nitrite as an indicator of NO production in the culture medium was measured using modified Griess reagent. In brief, after the experiment, the medium in each well was removed and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 20 °C. Then, 100 μ L of the supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent at room temperature for 10 min, and the absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader. The nitrite concentration was determined from a sodium nitrite standard curve.

The data were analyzed by one-way ANOVA and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The results of this study showed that quercetin can decrease the percentage of cell viability of Saos2 cells compared to the control group. The best effective dose is 120 μ M. Also, the data showed that quercetin in all concentrations was able to reduce the production of NO levels in Saos2 cells and the best effective concentration is 120 μ M.

Conclusion: In this study, it was found that quercetin was able to reduce the viability of Saos2 cells, and part of its effects could be mediated partially by a decrease in NO production. However, further studies are needed on this natural compound.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Norouzi S, Namazi R, Najafizadeh P, Vahabzadeh G. The Effect of Quercetin on Saos2 Osteosarcoma Cell Line. Razi J Med Sci. 2023;29(11):47-57.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

استئوسارکوم یک تومور بدخیم اولیه استخوانی نادر است و شیوع جهانی آن ۳/۴ نفر در هر میلیون نفر در سال می‌باشد. با این حال جز شایع‌ترین بدخیمی‌ها در کودکان می‌باشد (۱). این سرطان، سومین سرطان رایج در بین نوجوانان می‌باشد و پیک شیوع آن در دهه دوم زندگی بیشتر می‌باشد. قبل از سال ۱۹۷۰، قطع عضو بهترین روش درمان بود. اما بعد از آن با توجه به حضور عوامل شیمی‌درمانی، مدیریت درمان برای این تومور بدخیم تغییر پیدا کرد (۲). در سال‌های اخیر، شیوع استئوسارکوم رو به افزایش است. اگرچه شیمی‌درمانی و درمان جراحی جدید معمولاً برای درمان استئوسارکوم استفاده می‌شود، اما اثر درمانی و پیش‌آگهی آن نسبتاً ضعیف است. میزان بقای ۵ ساله برای بیماران مبتلا به استئوسارکوم بدون متاستاز کمتر از ۷۰ درصد است. برخی از بیماران مبتلا به شیمی‌درمانی (سیس پلاتین، متوترکسایت، دوک سوروبی سین و ایفو سفامید) حساس نیستند و برخی دیگر قادر به تحمل عوارض جانبی شیمی‌درمانی از جمله سرکوب مغز استخوان، سمیت کلیه و واکنش‌های گوارشی نمی‌باشند (۳، ۴). بنابراین، لازم است جهت درمان بیماران، از مواد جدید با عوارض جانبی کمتر و سرعت بهبودی بیشتر در نظر گرفته شود.

بر اساس طیف وسیعی از آزمایشات انجام شده، مواد شیمیایی گیاهی شامل پلی فنول‌ها، فلاون‌ها و فلاونوئیدها دارای ویژگی‌های ضد سرطانی قابل توجهی هستند که می‌تواند در انواع مختلف سرطان‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۵). در این راستا، کوئرستین که می‌تواند به طور گسترده در غذاهای روزانه از جمله آجیل، چای، سبزیجات، بروکلی، سیب و به طور کلی برنامه غذایی روزانه مردم مشاهده شود، یک ماده فیتوشیمیایی رایج می‌باشد (۶). علاوه بر این، این ماده از نظر تجاری قابل دسترس است، و در حال حاضر استفاده خوراکی آن با دوز ۱ گرم در روز به اندازه کافی ایمن می‌باشد و می‌تواند تا ۶۰ درصد در بدن جذب شود (۷). طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی برای کوئرستین گزارش شده است، از جمله آنها می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد التهابی، ضد روماتیسم، ضد تکثیر سلولی و همچنین اثرات محافظتی بر روی سلول‌ها، کبد و رگ اشاره کرد (۸-۱۰). علاوه بر این، تعداد قابل

توجهی از مطالعات بر روی خواص ضد سرطانی کوئرستین متمرکز شده است. بر اساس شواهد موجود، کوئرستین می‌تواند طیف وسیعی از سرطان‌ها مانند سینه، ریه، نازوفارنکس، روده بزرگ، پروستات، پانکراس و سرطان تخمدان را مهار کند (۱۱، ۱۲). در این زمینه کوئرستین از راه‌های متفاوتی باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی در مطالعات *IN-VIVO* و *IN-VITRO* می‌شود، از جمله از طریق مسیرهای آپوپتوز، تکثیر، التهاب و اوتوفاژی (۱۶-۱۳). در محیط *IN-VITRO* کوئرستین توانسته است باعث کمتر شدن مقاومت در استفاده از داروهای ضد سرطان شود و همچنین نقش سینرژیستی آن با بسیاری از داروهای ضد سرطانی مشخص شده است (۱۳، ۱۷، ۱۸). با توجه به اینکه کوئرستین بر روی سلول‌های سالم اثری ندارد، بنابراین آن را کاندید مناسبی برای درمان سرطان به عنوان یک عامل مکمل در کنار سایر داروهای ضد سرطان می‌توان به شمار آورد (۱۹). همچنین این ماده از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی خود نیز می‌تواند باعث اثرات ضد سرطانی شود که یکی از آنها کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن می‌باشد (۲۰). NO یک رادیکال آزاد بیولوژیکی ناپایدار، چربی دوست و بسیار قابل انتشار است که عملکردهای بیولوژیکی متعددی را تنظیم می‌کند (۲۱). نقش NO در فرآیندهای بیولوژیکی به منبع تولید، مدت زمان و غلظت مکانی آن بستگی دارد. در غلظت‌های پایین‌تر، NO اثرات محافظت بر روی سلول‌های سرطانی را دارد و از طریق فعال‌سازی مسیرهای انکوژنیک باعث ایجاد سرطان می‌شود. با این حال، در غلظت‌های بالاتر، نشان داده شده است که NO اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کند و آپوپتوز را القا می‌کند (۲۲). در بسیاری از مطالعات NO باعث بی‌ثباتی ژنومی، تحریک رگ‌زایی، مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۳). در یکی از مطالعات انجام شده نشان داده شد که نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) که باعث تولید NO می‌شود ممکن است یک نشانگر زیستی مفید برای ارزیابی پیشرفت تومور برای اوستئوسارکوم باشد که از طریق سیگنالینگ Wnt/ β -catenin می‌تواند باعث تکثیر، پیشرفت و تهاجم در این نوع از سلول‌ها شود (۲۴). بنابراین در این مطالعه، به بررسی اثر کوئرستین بعنوان

فورمازان می‌شود که این امر در نتیجه تأثیر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریه‌های سلول‌های زنده صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازان ایجاد شده سپس در دی متیل سولفواکسید (DMSO) حل و یک محلول بنفش رنگ ایجاد می‌کنند. بعد از گذشت 72 ساعت از اضافه نمودن دارو به چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سلول‌ها بیرون ریخته و بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده MTT به چاهک‌ها اضافه می‌شود و پلیت به مدت ۳-۴ ساعت انکوبه شود. بعد از گذشت این مدت، باقیمانده محیط را از چاهک خارج نموده و به هر چاهک ۱۰۰ ml DMSO اضافه می‌شود تا فورمازان حاصله حل گردد. با استفاده از شیکر، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه تکان می‌خورد و حل شدن فورمازان را تسهیل می‌نماید (۲۵).

اندازه‌گیری NO: مقدار نیتريت (NO_2^-) موجود در محیط‌های مصرف شده پس از اتمام دوره کشت نشان دهنده مقدار نیتريك اكساید-----د تولید شده توسط سلول‌ها می‌باشد زیرا نیتريك اكساید بسیار ناپایدار بوده و پس از تولید سریعاً به نوع پایدار نیتريت تبدیل می‌شود و بنابراین نیتريت یک شاخص قابل اطمینان جهت اندازه‌گیری مقدار نیتريك اكساید تولید شده توسط سلول‌ها می‌باشد. این مولکول برخلاف NO، پایدار و غیر فرار می‌باشد. این روش برای اولین بار توسط گریس (Greiss assay method) ارائه شد (۲۶).

به منظور تهیه منحنی استاندارد، از NaNO_2 استفاده می‌شود. جهت بی‌آب کردن این ترکیب، آن را به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از آن غلظت‌های مختلف سدیم نیتريت تهیه شده و در هر ستون از چاهک‌های پلیت ۹۶ به میزان $100 \mu\text{L}$ ریخته می‌شود. به میزان $100 \mu\text{L}$ از معرف Greiss (متشکل از سولفانیل‌امید ۱٪ + نفتالین دی‌هیدروکلرید ۰/۱٪ حل شده در اسید ارتو فسفریک ۲/۵٪) نیز به همه چاهک‌ها اضافه می‌شود. همچنین از محیط کنترل نیز بعنوان (blank) استفاده شد. این مرحله در تاریکی صورت می‌گیرد و به مدت ۲۰ دقیقه پلیت به آرامی توسط شیکر، تکان خورده و در آخر با دستگاه الیزا جذب نوری در 450 nm خوانده می‌شود. برای هر نمونه، سنجش نیتريت دو بار تکرار شد. اطلاعات به دست آمده در نرم

یک داروی ضد سرطان بر روی سلول‌های سرطانی Saos-2 پرداخته شد و اینکه آیا NO تولید شده در حضور کوئرستین می‌تواند در کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد یا خیر.

روش کار

کشت سلولی سلول‌های Saos-2: سلول‌های Saos-2 از بخش فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه گردید. کرایوتیوب حاوی human cell line saos2 از تانک ازت خارج شد و محتویات داخل کرایوتیوب به فالکون ۱۵cc منتقل و به جهت حذف DMSO استفاده شده در مرحله دفریز سلول‌ها، از محیط کشت DMEM به همراه FBS برای سانترفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm2000 استفاده گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شده و پلت سلولی که ته فالکون مشخص است با رعایت شرایط اسپیتک با حجم نهایی ۵cc به داخل فلاسک فیلتر دار ۲۵cc که حاوی ۱٪ آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS منتقل می‌شود. کشت مورد نظر در انکوباتور با ۵٪ CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری می‌شوند. بعد از رشد سلول‌ها آنها را به پلیت ۹۶ خانه (در هر چاهک ده هزار سلول) انتقال داده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با داوری کوئرستین تیمار می‌شوند.

تیمار کردن سلول‌های Saos2 با کوئرستین: محیط کشت حاوی کوئرستین با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰ و ۱۵۰ میکرومولار به سلول‌های Saos-2 اضافه شده (غلظت‌های بدست آمده با توجه سایر مقالات تعیین شده‌اند) و مجدداً پلیت به مدت ۷۲ ساعت جهت تأثیر دارو در انکوباتور قرار داده می‌شود. پس از طی دوره انکوباسیون از روش MTT برای بررسی میزان حیات سلول‌ها استفاده می‌شود.

بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT: این روش به عنوان یک شاخص بقای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. در این روش احیا MTT ($0/5 \text{ mg/ml}$) منجر به تشکیل کریستال‌های

آزمون TUKEY و به وسیله نرم افزار graphpad prism (ویرایش ۸) انجام گرفت و نتایج حاصله بصورت Mean (\pm SEM) گزارش شد. $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

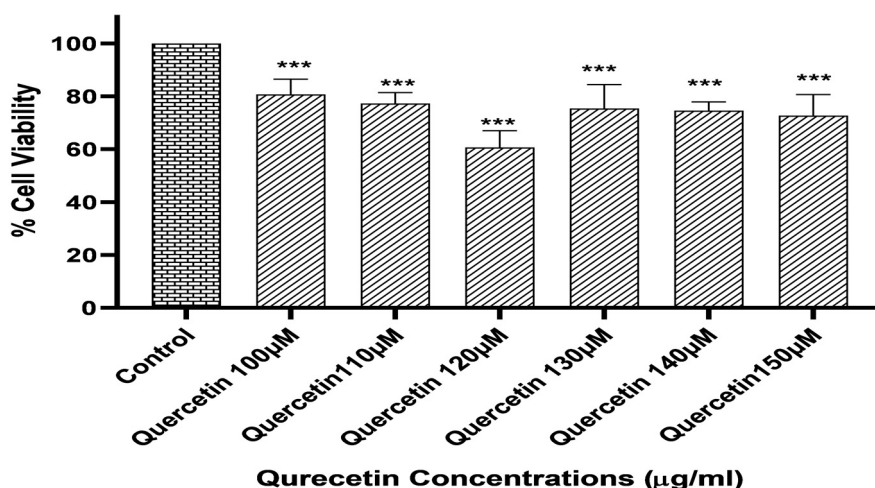
یافته‌ها

بررسی زنده بودن سلول‌های Saos₂ با غلظت‌های مختلف کوئرستین: با توجه به نمودار ۱ مشخص می‌شود کوئرستین موجب کاهش درصد زنده مانی سلول‌های Saos₂ در مقایسه با گروه کنترل شده است. با اینکه در تمامی غلظت‌ها کاهش زنده مانی سلول‌ها مشاهده می‌شود اما غلظت ۱۲۰ میکرومولار ($60/66 \pm 2/1$) بهترین درصد کاهش زنده مانی را نسبت به بقیه غلظت‌های کوئرستین و گروه کنترل (۱۰۰٪) ایجاد کرده است که این اختلاف معنی دار می‌باشد (نمودار ۱). تفاوت معنی داری بین غلظت‌های ۱۵۰-۱۳۰ میکرومولار کوئرستین با غلظت ۱۱۰ میکرومولار مشاهده نشد.

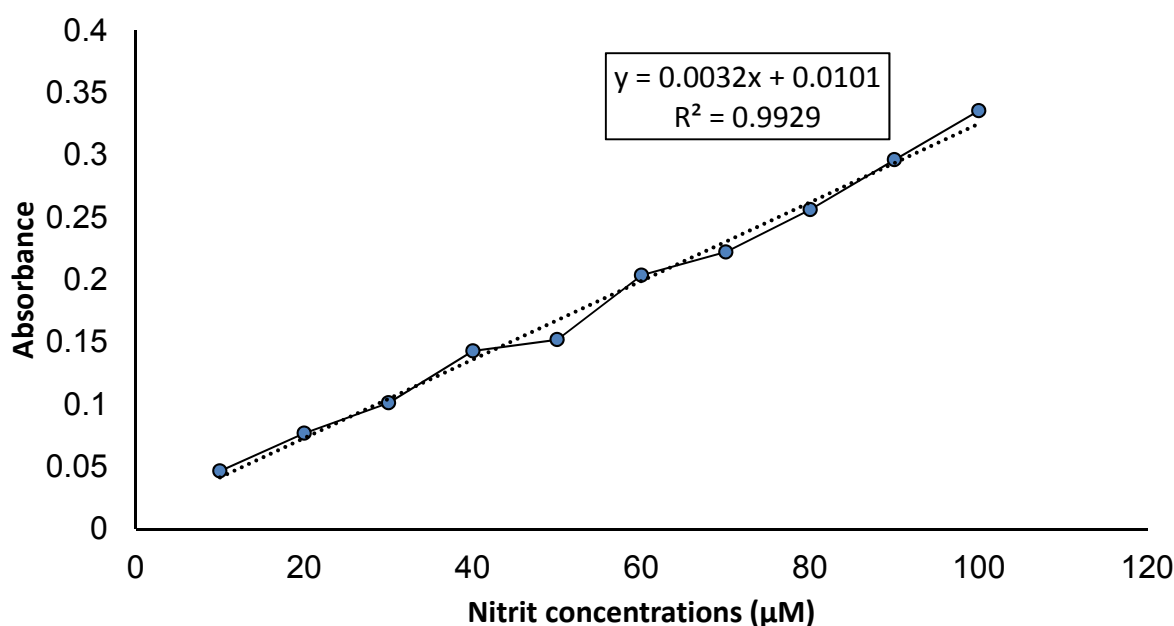
بررسی اثر کوئرستین بر مقدار NO تولید شده در سلول‌های Saos₂: با استفاده از رگرسیون خطی، مقدار نیتريت در نمونه‌های مختلف از روی منحنی استاندارد تعیین گردید (نمودار ۲). با توجه به نمودار ۳ مشخص می‌شود که میزان تولید NO توسط سلول‌های سرطانی Saos₂ تیمار شده با غلظت‌های مختلف کوئرستین تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشته است. بهترین کاهش در

افزار اکسل وارد می‌شود. سپس با استفاده از رگرسیون خطی (ضریب رگرسیون بالای ۰/۹۵) مقدار نیتريت در نمونه‌های مختلف از روی منحنی استاندارد تعیین گردید. برای اندازه‌گیری مقدار NO در نمونه‌ها، بعد از شمارش سلول‌ها و انتقال آنها به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به روش ذکر شده در تست MTT و گذشت ۲۴ ساعت از انکوما سیون آنها، ۱۰۰ ml محیط کشت حاوی غلظت‌های مشخص کوئرستین به چاهک‌ها اضافه می‌شود و ۷۲ ساعت زمان انکوباسیون در نظر گرفته می‌شود. بعد از گذشت این مدت در مرحله انجام این تست ۱۰۰ ml از محلول رویی هر چاهک به دقت و آرامی برداشته می‌شود و به میکروتیوپ مخصوص همان چاهک منتقل می‌شود و بلافاصله میکروتیوپ‌های در بسته را در ظرف حاوی یخ قرار می‌دهند. میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور 10^4 rpm در میکروسانتريفوژ قرار داده می‌شوند. حدود $50 \mu\text{l}$ از محلول سانتريفوژ شده هر میکروتیوپ به ۹۶ plate خانه استریل منتقل می‌شود و به نسبت ۱ به ۱ به آنها معرف گریس تازه تهیه شده در غیاب نور محیط اضافه می‌شود. پلیت را دور از نور یا در پوشش آلومینیومی نگهداری می‌کنند و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه جذب نوری نمونه را 570 nm می‌خوانند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت آنالیز آماری داده‌ها و مقایسه بین گروهی از واریانس یک طرفه ANOVA و

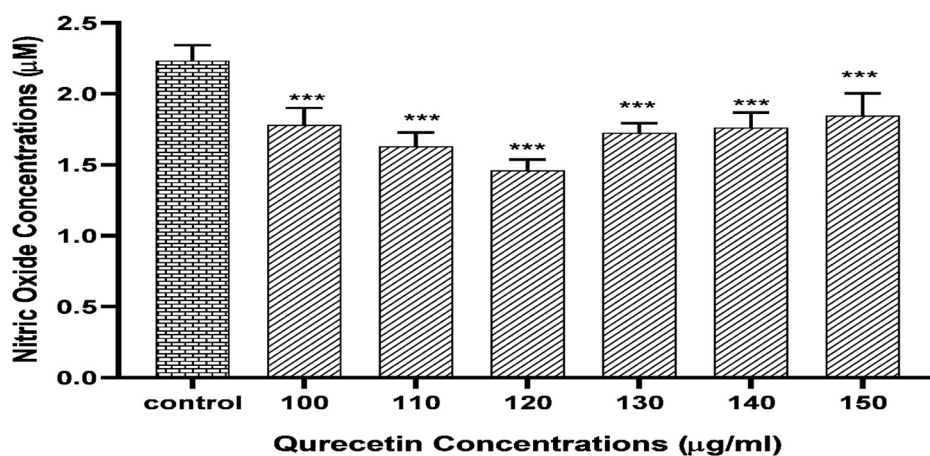


نمودار ۱- درصد بقای سلول‌های Saos₂ در مجاورت غلظت‌های مختلف کوئرستین. $P < 0.05$ *** در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۲- منحنی استاندارد NaNO₂

در روش NO، منحنی استاندارد نیتريت سدیم برای اندازه گیری NO رسم می شود و معادله خط محاسبه می گردد. عدد به دست آمده به عنوان Y در معادله خط منحنی استاندارد قرار داده می شود و X یا غلظت NO هر نمونه محاسبه می گردد.



نمودار ۳- بررسی غلظت‌های مختلف کوئرستین بر مقدار NO تولید شده در سلول‌های Saos₂. $P < 0.05$ *** در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

اولیه استخوان شناخته شده است و توانایی آن برای مهاجرت به بافت‌های دورتر نشان دهنده پیشرفت سریع این بیماری است. علاوه بر این، بیماران مبتلا به استئوسارکوم متاستاتیک به عوامل شیمی درمانی رایج فعلی (سیس پلاتین، متوترکسات، دوکسوروبیسین و ایفوسفامید) پاسخ ضعیفی می دهند (۱، ۲۸). اگرچه چندین رژیم شیمی درمانی در ۲۰ سال گذشته برای این بدخیمی در نظر گرفته شده است، اما میزان بقای بیماران

غلظت ۱۲۰ میکرومولار دیده شد ($1/46 \pm 0/01$).

بحث

استئوسارکوم یک تومور استخوانی با منشأ مزانشیمی است که اغلب در مرحله رشد سریع استخوان‌های بلند رخ می دهد و معمولاً در صفحات رشد اپی فیزیال استخوان ران یا درشت نی قرار دارد (۲۷). استئوسارکوم در کودکان و نوجوانان بعنوان شایع ترین تومور بدخیم

موش‌های حاوی استئوسارکوم انسانی متاستاز شده در ریه می‌باشند. نتایج نشان داد که کوئرستین دارای اثرات مهاری در استئوسارکوم انسانی بوده و همچنین باعث جلوگیری از متاستاز آن در دیگر بافتها گردید (۲۸). مطالعه دیگری به بررسی اثرات کوئرستین (۸۰-۲۰ ماکرومول) بر روی رده سلول های Saos-2 و U2OS پرداخت. نتایج تاثیر اثر کوئرستین بر روی زنده ماندن سلول ها در این شرایط از طریق اندازه گیری Sulforhodamine B (SRB) انجام گرفت و مشخص شد که کوئرستین در هر دو رده سلولی توانسته است بطور معنی دار و وابسته به دوز باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها شود (۳۴). در مطالعه دیگری که توسط لیانگ و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که کوئرستین زنده ماندن سلول های MG-63 (یک نوع از سلول های اوستئوسارکوم) را وابسته به دوز و زمان مهار کرد. ظاهرا این اثر کوئرستین در این تحقیق به افزایش بیان پروتئین های پرو آپوپتوتیک (Bax و سیتوکروم C) و کاهش بیان پروتئین های آنتی آپوپتوتیک (Bcl-2) نسبت داده شده است (۳۵). در مطالعه دیگری که توسط زنگ و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که کوئرستین با دوز ۵ ماکرومول می تواند باعث اثر بخشی بیشتر داروی سیس پلاتین در درمان اوستئوسارکوم رده سلولی 143B شود که این اثر مربوط به تنظیم مسیر miR-217-KRAS می باشد. این یافته نشان می‌دهد که کوئرستین می تواند باعث افزایش حساسیت داروی سیس پلاتین به سلول های سرطانی استئوسارکوم شود (۳۶). مطالعه دیگری نشان داد که کوئرستین در سلول های اوستئوسارکوم U2-OS مقاوم به متوترکسایت، توانست باعث کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها با اختلال در عملکرد میتوکندریایی و دفسفریلاسیون AKT شود (۳۷). در مطالعه دیگری نیز اثرات ضد سرطانی کوئرستین در کنار داروی متوترکسایت در سلول های Saos-2 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شده که در حضور کوئرستین IC_{50} ($IC_{50}=142.3 \mu M$) متوترکسایت از 13.7 ng/ml به 8.45 ng/ml کاهش پیدا کرد. همچنین این مطالعه نشان داد که کوئرستین همراه با متوترکسایت توانست باعث کاهش پرولیفراسیون

هنوز رضایت بخش نیست و هیچ درمان هدفمند عملی پیدا نشده است. بنابراین، مطالعاتی با هدف توسعه درمان های جدید برای بهبود این سرطان ضروری است. بر اساس طیف گسترده ای از آزمایشات، فیتوکمیکال‌ها از جمله پلی فنول ها، فلاون ها و همچنین فلاونوئیدها دارای ویژگی های ضد سرطانی قابل توجهی هستند که می تواند در برابر انواع مختلف سرطان استفاده شوند (۱۱). کوئرستین، یک فلاونوئید فعال زیستی می باشد که به طور طبیعی در بسیاری از غذاهای رایج وجود دارد و به دلیل ماهیت لیپوفیلیک خود می‌تواند از غشای سلولی عبور کرده و مسیرهای مختلف درون سلولی را تحت تاثیر قرار دهد. کوئرستین دارای اثراتی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد ویروسی بوده و فعالیت حرکتی دستگاه گوارش را تنظیم کرده و اثر حفاظتی بر روی سیستم قلب و عروق دارد. همچنین شواهد نشان می‌دهد که کوئرستین دارای اثرات ضد سرطانی هم در محیط *In-Vivo* و هم در محیط *In-Vitro* نیز می باشد که به اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن بر می‌گردد (۱، ۲۹-۳۲). با این وجود مطالعات کمی بر روی اثرات این دارو روی استئوسارکوم انجام گرفته است (۲۸). قابلیت دسترسی گسترده این ماده، اثربخشی خوب، سمیت کم و قیمت ارزانتر آن نسبت به داروهای شیمیایی، آن را به یک ماده مناسب در مبارزه با بیماری ها از جمله سرطان تبدیل کرده است. این دارو به عنوان یک داروی جایگزین در درمان سرطانهای مختلف به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای شیمی درمانی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۳).

مطالعه ما نشان داد که کوئرستین توانسته است در تمامی غلظت‌های بکار برده شده باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی Saos-2 شود و بهترین غلظت ۱۲۰ ماکرومول می باشد که توانسته است باعث ۵۰ درصد کاهش در زنده ماندن سلول های Saos-2 شود. مطالعه ما همسو با دیگر مطالعات انجام شده است. بعنوان مثال در یکی از تحقیقات، به بررسی اثرات کوئرستین بر روی مهاجرت و تهاجم استئوسارکوم تحت شرایط *in-vitro* و *in-vivo* پرداخته است. سلول های مورد استفاده در این مطالعه HOS و MG63 و حیوان مورد استفاده نیز

اکساید شود. هر چند غلظت ۱۲۰ میکرومول بهترین کاهش در تولید NO را داشت. با توجه به نتایج چنین استنباط می‌شود که کاهش مقدار تولید NO در سلول‌های Saos-2 در حضور کوئرستین می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی این ماده اشاره داشته باشد. در مطالعات متعددی به بررسی ساختار کوئرستین پرداخته شد و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن را بعلاوه وجود استخلاف‌های مختلف این ماده در از بین بردن رادیکال‌های آزاد بیان کردند (۹، ۴۲). در آزمایشات دیگری نیز نقش کوئرستین در کاهش مقدار NO مورد بررسی قرار گرفته است. بطور مثال در یک مقاله مشخص شد که کوئرستین توانسته است باعث کاهش التهاب ایجاد شده از طریق کاهش تولید NO و کاهش بیان iNOS در سلول‌های ماکروفاژ شود (۴۳). در مطالعه دیگری اثرات فلاونوئیدها در حذف NO مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که اثرات آنتی‌اکسیدانی این مواد نقش موثری در کاهش مقدار NO دارد (۴۴). در مقاله دیگری به بررسی اثرات حفاظتی کوئرستین بر روی استخوانها پرداخته است. در این مقاله اثرات حفاظتی کوئرستین به استئوکلاستونزیز، آپوپتوز اوستئوبلاست، پاسخ‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن مربوط می‌باشد و یکی از فاکتورهای مهم در افزایش اثرات آنتی‌اکسیدانی این ماده وابسته به کاهش مقدار NO در استخوان می‌باشد. با توجه به اثر مهم کوئرستین در تنظیم هموستاز استخوان، ممکن است این ماده به عنوان یک فاکتور اقتصادی و امیدوار کننده برای بهبود سلامت استخوانها در نظر گرفته شود (۴۵). در مطالعه دیگری که توسط ابدلکارم و همکاران انجام شد نقش کوئرستین در کاهش آسیب وارده به استخوان از طریق القا نانو-زینک اکساید به اثبات رسید. در این مطالعه مشخص شد کاهش تجزیه استئوکلاست‌ها به بطور معنی داری با کاهش مقدار NO بعد از استفاده از کوئرستین در ارتباط می‌باشد (۴۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به مقالات و همچنین مطالعه اخیر می‌توان به این نتیجه رسید که کوئرستین احتمالاً با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود از جمله کاهش در تولید NO در سلول

سلول‌های Saos-2 و افزایش بیان ژن‌های تومور ساپرسور‌ها شوند (۳۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که کوئرستین می‌تواند کاندیدای موفقی جهت کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی در کنار داروهای شیمی‌درمانی و افزایش حساسیت این داروها به پاسخ درمانی شود. همچنین با توجه به اینکه اقدام به موقع در تشخیص و درمان این سرطان نقش مهمی در تعویق قطع اندام می‌تواند داشته باشد بنابراین استفاده از یک داروی گیاهی و بی‌خطر می‌تواند کمک زیادی در بهبود روند درمان این سرطان داشته باشد و به نظر می‌رسد که کوئرستین یک گزینه مناسب برای درمان سرطان به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل درمانی است (۱).

NO یک مولکول با نیمه عمر بسیار کوتاه است که توسط نیتریک اکسید سینتاز تولید می‌شود. NO برای اولین بار جزء عوامل ریلکس کننده اندوتلیوم تشخیص داده شد، اما در حال حاضر تعداد فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که تحت سیگنالینگ NO قرار می‌گیرند همچنان در حال افزایش است (۳۹). در بسیاری از مطالعات مشخص گردید که NO بر رشد و متاستاز سلول‌های توموری تأثیر می‌گذارد و این در حالی است که مطالعات دیگر نظری متفاوت از نظر اولیه را دارند. در حال حاضر به نظر می‌رسد که اثرات NO بر روی سلول‌های سرطانی دوگانه می‌باشد، از یک طرف این ماده قادر است باعث رشد تومور شود و از طرف دیگر می‌تواند باعث از بین رفتن آن شود. در حال حاضر با توجه مطالعات انجام شده این اثر دوگانه NO بر روی تومور، به نوع سلول سرطانی، مقدار NO تولید شده و محیط پیرامون آن بافت نسبت داده شده است (۴۰، ۴۱). بعنوان مثال بورک و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که غلظت NO می‌تواند عامل مهمی در روند جلوگیری و یا پیشرفت تومور داشته باشد. در این مطالعه مشخص شد غلظت کم NO می‌تواند باعث افزایش رشد، آنژیوژنز و متاستاز در سلول شود اما غلظت‌های زیاد آن می‌تواند منجر به افزایش اکسیداتیو استرس، آسیب به DNA و افزایش آپوپتوز شود (۴۱).

در این مطالعه مشخص شد که کوئرستین در تمامی غلظت‌ها توانسته است باعث کاهش تولید مقدار نیتریک

2007;45(11):2179-205.

8. Hirpara KV, Aggarwal P, Mukherjee AJ, Joshi N, Burman AC. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2009;9(2):138-61.

9. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*. 2008;585(2-3):325-37.

10. Saccol RdSP, da Silveira KL, Manzoni AG, Abdalla FH, de Oliveira JS, Dornelles GL, et al. Antioxidant, hepatoprotective, genoprotective, and cytoprotective effects of quercetin in a murine model of arthritis. *J Cell Biochem*. 2020;121(4):2792-801.

11. Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, Ghasemi Y, et al. Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Biosci*. 2020;10(1):10-17.

12. Yang Y, Wang T, Chen D, Ma Q, Zheng Y, Liao S, et al. Quercetin preferentially induces apoptosis in KRAS-mutant colorectal cancer cells via JNK signaling pathways. *Cell Biol Int*. 2019;43(2):117-24.

13. Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, Yerer MB, Sak K, Sharma AK, et al. Fisetin and quercetin: promising flavonoids with chemopreventive potential. *Biomolecules*. 2019;9(5):174.

14. Kashyap D, Tuli HS, Garg VK, Goel N, Bishayee A. Oncogenic and tumor-suppressive roles of MicroRNAs with special reference to apoptosis: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(2):179-201.

15. Sezer ED, Oktay LM, Karadaş E, Memmedov H, Selvi Gunel N, Sözmen E. Assessing anticancer potential of blueberry flavonoids, quercetin, kaempferol, and gentisic acid, through oxidative stress and apoptosis parameters on HCT-116 cells. *J Med Food*. 2019;22(11):1118-26.

16. Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109604.

17. Shanmugam MK, Lee JH, Chai EZP, Kanchi MM, Kar S, Arfuso F, et al., editors. *Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds*. *Semin Cancer Biol*; 2016: Elsevier.

18. Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr Cancer*. 2011;63(2):161-73.

19. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev*.

های Saos₂ می تواند باعث اثرات حفاظتی برآسیب وارد شده به استخوان شود.

با توجه به این نتایج می توان پیشنهاد کرد که کوئرستین بعنوان یک ماده آنتی اکسیدان می تواند باعث کاهش تولید مقدار NO در سلول های سرطانی Saos-2 و در نتیجه کاهش زنده مانی آنها شود. هر چند تحقیقات گسترده تری جهت مکانسیم این دارو در محیط آزمایشگاهی و آزمایشات بیشتر بر روی حیوانات دچار اوستئوسارکوم باید انجام گردد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از سرکام خانم اشرف السادات معظم که ما را در پایان رساندن این مطالعه یاری دادند.

References

1. Maleki Dana P, Sadoughi F, Asemi Z, Yousefi B. Anti-cancer properties of quercetin in osteosarcoma. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):1-9.
2. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. *Sicot J*. 2018;4.
3. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, Aro H, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO–PaedCan–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:iv79-iv95.
4. Xie WP, Zhang Y, Zhang YK, Li G, Xin J, Bi RX, et al. Treatment of Saos-2 osteosarcoma cells with diallyl trisulfide is associated with an increase in calreticulin expression. *Exp Ther Med*. 2018;15(6):4737-42.
5. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *IJC*. 2007;120(3):451-8.
6. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickanaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(1-2):107-16.
7. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca J, Flamm G, Williams G, Lines T. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *FCT*.

2010;68(7):418-28.

20. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anticancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3177.

21. Khan FH, Dervan E, Bhattacharyya DD, McAuliffe JD, Miranda KM, Glynn SA. The role of nitric oxide in cancer: master regulator or NOT? *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9393.

22. Korde Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013;11(1):1-11.

23. Huerta S. Nitric oxide for cancer therapy. *Future Sci OA.* 2015;1(1).

24. Chu W, Cao L, Daokun G, Zhao J. iNOS promotes the development of osteosarcoma via Wnt/ β -catenin pathway. *J Immunol Res.* 2021;

25. Fotovat Eskandari N, Vahabzadeh G, Golab F, Karimzadeh F, Rahimi-Moghadam P, Nasiripour S, et al. Neuroprotective Effects of Stiripentol on Oxygen-Glucose Deprivation in Primary Culture of Fetal Mice Cortical Neurons. *Neurosci J Shefaye Khatam.* 2017;5(1):7-10.

26. Hamby DM. A review of techniques for parameter sensitivity analysis of environmental models. *Environ Monit Assess.* 1994;32(2):135-54.

27. de Azevedo JWV, Fernandes TAA, Fernandes JV, de Azevedo JCV, Lanza DCF, Bezerra CM, et al. Biology and pathogenesis of human osteosarcoma. *Oncol Lett.* 2020;19(2):1099-116.

28. Lan H, Hong W, Fan P, Qian D, Zhu J, Bai B. Quercetin inhibits cell migration and invasion in human osteosarcoma cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(2):553-67.

29. El-Gogary RI, Rubio N, Wang JT-W, Al-Jamal WT, Bourgoignon M, Kafa H, et al. Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *ACS nano.* 2014;8(2):1384-401.

30. Lakhanpal P, Rai DK. Quercetin: a versatile flavonoid. *IJMU.* 2007;2(2):22-37.

31. Kim H, Moon JY, Ahn KS, Cho SK. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013.

32. Filipa Brito A, Ribeiro M, Margarida Abrantes A, Salome Pires A, Jorge Teixeira R, Guilherme Tralhao J, et al. Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics? *Curr Med Chem.* 2015;22(26):3025-39.

33. Rauf A, Imran M, Khan IA, ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2018;32(11):2109-30.

34. Li S, Pei Y, Wang W, Liu F, Zheng K, Zhang X. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1. *Biomed*

Pharmacother. 2019;114:108839.

35. Liang W, Li X, Li C, Liao L, Gao B, Gan H, et al. Quercetin-mediated apoptosis via activation of the mitochondrial-dependent pathway in MG-63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep.* 2011;4(5):1017-23.

36. Zhang J-Y, Lin M-T, Zhou M-J, Yi T, Tang Y-N, Tang S-L, et al. Combinational treatment of curcumin and quercetin against gastric cancer MGC-803 cells in vitro. *Mol Cells.* 2015;20(6):11524-34.

37. Xie X, Yin J, Jia Q, Wang J, Zou C, Brewer KJ, et al. Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt. *Oncol Rep.* 2011;26(3):687-93.

38. Mohammadi E, Alemi F, Maleki M, Malakoti F, Farsad-Akhtar N, Yousefi B. Quercetin and Methotrexate in Combination have Anticancer Activity in Osteosarcoma Cells and Repress Oncogenic MicroRNA-223. *Drug Res.* 2022;72(04):226-33.

39. Mintz J, Vedenko A, Rosete O, Shah K, Goldstein G, Hare JM, et al. Current advances of nitric oxide in cancer and anticancer therapeutics. *Vaccines.* 2021;9(2):94.

40. Kamm A, Przychodzen P, Kuban-Jankowska A, Jacewicz D, Dabrowska AM, Nussberger S, et al. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. *Nitric Oxide.* 2019;93:102-14.

41. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013;34(3):503-12.

42. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5.

43. Kao TK, Ou YC, Raung SL, Lai CY, Liao SL, Chen CJ. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci.* 2010;86(9-10):315-21.

44. Vanacker SA, Tromp MN, Haenen GR, Vandervijgh W, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214(3):755-9.

45. Wong SK, Chin K-Y, Ima-Nirwana S. Quercetin as an agent for protecting the bone: a review of the current evidence. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6448.

46. Abdelkarem HM, Fadda LM, Kaml OR. Alleviation of bone markers in rats induced nano-zinc oxide by quercetin and α -lipolic acid. *Toxicol Mech Methods.* 2016;26(9):692-9.