

Curcumin Ameliorates Sodium Valproate Induced Neurotoxicity through Suppressing Oxidative Stress and Preventing Mitochondrial Impairments

Sholeh Akbari¹,
Zahra Talebi²,
Fereshteh Talebpour Amiri³,
Maloos Naderi¹,
Fatemeh Shaki^{4,5}

¹ PhD Candidate in Toxicology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate professor, Department of Anatomy, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 25, 2022 ; Accepted August 16, 2022)

Abstract

Background and purpose: Curcumin is a natural polyphenolic compound in turmeric (*Curcuma longa*). Curcumin has potent free radical scavenger and antioxidant properties that could significantly reduce oxidative damage. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contribute to valproate sodium induced tissue damage. This study investigated the protective effects of curcumin against valproate sodium induced oxidative stress and mitochondrial toxicity in brain of rats.

Materials and methods: Male rats were exposed to sodium valproate (500 mg/kg/day, i.p.) alone, or in combination with different doses of curcumin (25, 50, and 100 mg/kg/day, i.p.) and vitamin C (100 mg/kg/day, i.p.) for eight weeks. Then, brain tissues were separated and factors associated with oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and histopathological changes were investigated.

Results: Sodium valproate induced mitochondrial dysfunction, increased oxidative stress parameters and caused significant histopathological changes in brain tissue. Administration of curcumin attenuated the induction of oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and histopathological changes induced by sodium valproate in brain tissue.

Conclusion: Curcumin showed protective effect against sodium valproate-induced neurotoxicity which may be attributed to its antioxidant activity. So, it can be considered as an effective supplement against oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by sodium valproate in brain tissue.

Keywords: sodium valproate, curcumin, neurotoxicity, mitochondria, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (213): 15-28 (Persian).

Corresponding Author: Fatemeh Shaki- Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: fshaki.tox@gmail.com)

اثرات کورکومین در محافظت سمیت عصبی ناشی از والپروات سدیم از طریق سرکوب استرس اکسیداتیو و جلوگیری از اختلالات میتوکندری

شعله اکبری¹زهرا طالبی²فرشته طالب پورامیری³ملوس نادری¹فاطمه شکی^{5,4}

چکیده

سابقه و هدف: کورکومین یک ترکیب پلی فنولیک طبیعی در زردچوبه است. کورکومین پاک کننده قوی رادیکال های آزاد است و با خواص آنتی اکسیدانی، اثرات معنی داری را در کاهش آسیب اکسیداتیو دارد. والپروات سدیم از طریق استرس اکسیداتیو و ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری سبب بروز آسیب بافتی می شود. در این مطالعه، اثرات محافظتی کورکومین بر استرس اکسیداتیو و سمیت میتوکندریایی ناشی از والپروات سدیم در بافت مغز رت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: موش های صحرایی نر با والپروات سدیم (500 میلی گرم بر کیلوگرم در روز، داخل صفاقی) به تنهایی یا همراه با دوزهای مختلف کورکومین (25، 50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز، داخل صفاقی) و ویتامین C (100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز، داخل صفاقی) به مدت 8 هفته مواجهه داده شدند. سپس بافت های مغز جدا شد و فاکتورهای استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت ارزیابی شد.

یافته ها: سدیم والپروات باعث اختلال عملکرد میتوکندری، افزایش پارامترهای استرس اکسیداتیو و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک معنی داری در بافت مغز شد. تجویز کورکومین القای آسیب اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از والپروات سدیم را در بافت مغز کاهش داد.

استنتاج: اثر محافظتی کورکومین در برابر سمیت عصبی ناشی از والپروات سدیم نشان داد که ممکن است به فعالیت آنتی اکسیدانی آن نسبت داده شود. بنابراین می توان آن را یک مکمل موثر در برابر استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از سدیم والپروات در بافت مغز در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: والپروات سدیم، کورکومین، سمیت عصبی، میتوکندری، استرس اکسیداتیو

مقدمه

آمار آمریکا و اروپا سالیانه بیشتر از 100000 نفر به دلیل علت های وابسته به دارویی می میرند (1).

درمان دارویی بیماری ها و پیامدهای سمی بالقوه درمان دارویی، مسئله چالش برانگیزی است. براساس

E-Mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: 17 کیلومتر جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی دکترای تخصصی سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی دکترای عمومی داروسازی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، مؤسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1401/2/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/2/20 تاریخ تصویب: 1401/5/25

مورد بررسی قرار گرفته است (9). کورکومین با اثر اسکونجری بر روی آنیون سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل موجب مهار لیپید پراکسیداسیون می‌شود (10). علاوه بر این، کورکومین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی است که توانسته از میتوکندری‌های مغز در برابر استرس‌های اکسیداتیو مختلف محافظت کند (11). در تحقیقات نشان داده شد که کورکومین می‌تواند باعث افزایش بیان پروتئین‌های حفاظت سلولی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکوتاتیون ردوکتاز، گلوکوتاتیون پراکسیداز، گلوکوتاتیون-S-ترانسفراز، NAD(P)H و γ -گلوتامیل سیستئین لیگاز (γ GCL) شود (12) و کورکومین با القا γ GCL موجب افزایش سنتز و غلظت گلوکوتاتیون در آستروسیت و نورون می‌گردد (12). بنابراین، در مطالعه حاضر، برای اولین بار، ما اثر سدیم والپروات را بر روی بافت مغز و میتوکندری سلول‌های عصبی موش صحرایی و مهار سمیت احتمالی آن را توسط کورکومین مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

کورکومین از شرکت مرک آلمان و والپروات سدیم از شرکت روز دارو ایران تهیه شد. در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار (وزن بدن محدوده 200-250 گرم) در هفت گروه 6 تایی تقسیم و تحت شرایط استاندارد در یک اتاق با سیکل 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری شدند. کلیه آزمایش‌های انجام شده، با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.441 انجام گرفت.

حیوانات در هفت گروه شامل. گروه اول: کنترل نرمال سالین، گروه دوم: والپروات (500mg/kg) داخل

علاوه بر این، اثرات جانبی ناشی از مصرف دارو، یکی از علت‌های مهم جمع‌آوری دارو از بازار می‌باشد. از این جهت شناسایی اثرات جانبی دارو و مکانیسم‌های درگیر در آن اهمیت به سزایی دارد (2). صرع و داروهای ضد صرع در تشکیل رادیکال‌های آزاد نقش دارند، بنابراین می‌توانند منجر به استرس اکسیداتیو شوند (3). سیستم عصبی به دلیل فراوانی بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر و مستعد تشکیل لیپید پراکسیداسیون می‌باشد. بنابراین افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث تخریب نورون‌ها گردد (4). درمان طولانی مدت با داروهای ضد صرع علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو با اختلال در میتوکندری نیز همراه است (5). سدیم والپروات یک داروی ضد صرع وسیع‌الطیف است که در درمان انواع خاصی از تشنج‌ها با تغییر در سطح نوروترانسمیترهای گابا θ ریک و گلوتامینرژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌چنین از سدیم والپروات در درمان سردردهای میگرنی، بیماران دو قطبی و کودکان بیش‌فعال استفاده می‌شود. در آزمایشات کلینیکی عوارض جانبی مختلفی از این دارو گزارش شده است. سدیم والپروات با تشکیل متابولیت‌های سمی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث آسیب بافت کلیه می‌شود (6). سدیم والپروات با مهار کمپلکس I و IV میتوکندری، اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری می‌تواند باعث آسیب سلولی گردد (7,5). امروزه شناخت، مدیریت و مهار سمیت عصبی مرتبط با دارو، به مسئله‌ی مهمی در انتخاب درمان تبدیل شده است. ترکیبات طبیعی مانند پلی‌فنل‌ها برای جلوگیری و درمان سمیت عصبی وابسته به دارو به کار می‌روند (8). کورکومین (دی فروئیل متان) یک ترکیب پلی‌فنل طبیعی از دسته دی‌آریل هپتانوئیدها است که باعث ایجاد رنگ نارنجی مایل به زرد در زردچوبه می‌شود. توانایی عبور کورکومین از سد خونی مغزی و نقش حفاظت نورونی آن، در بسیاری از اختلالات تخریب‌کننده نورون‌ها

دهیدراته، در زالن شفاف‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت 5 میکرون با دستگاه میکروتوم تهیه شد و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدهای بافتی توسط هیستولوژیست که به گروه‌های تحقیق نا آشنا بود با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی در بافت مغز

تعیین غلظت پروتئین

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (18) که محدوده سنجش غلظت پروتئین 200-2000 میکروگرم بر میلی‌لیتر است. ابتدا محلول استوک کوماسی بلو (کوماسی بلو 50 میلی‌گرم، متانول 25 میلی‌لیتر، اسید فسفریک 50 میلی‌لیتر و آب مقطر تا 200 میلی‌لیتر) آماده شد و در ادامه غلظت‌های مختلفی پروتئین‌های استاندارد در محدوده 200-2000 $\mu\text{g/ml}$ تهیه گردید و نهایتاً جذب در 595 نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. منحنی استاندارد رسم شده و غلظت‌های پروتئین سوسپانسیون میتوکنندری از روی منحنی محاسبه شد و سوسپانسیون میتوکنندری با بافر موردنظر تا غلظت 1000 $\mu\text{g/ml}$ رقیق شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی

مالون دی آلدئید (MDA) محصول اصلی اکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. ابتدا به 0/2ml هموژن بافت مغز 0/1ml از معرف thiobarbituric acid (TBA) شامل 0/5 HCl نرمال، 15 درصد TCA و 0/3 درصد TBA اضافه و به خوبی مخلوط شدند. نمونه‌ها ابتدا به مدت 30 دقیقه داخل یک حمام آب گرم و سپس به مدت 5 دقیقه داخل یک کیسه یخ گذاشته شدند. در ادامه، 0/2ml بوتانول به هر لوله اضافه شد و سانتریفیوژ به مدت 10 دقیقه با 3500 دور در دقیقه انجام شد. سرانجام، میزان MDA هر نمونه با مشاهده میزان جذب نوری با دستگاه الیزا در طول موج 532 نانومتر محاسبه شد (19).

صفاقی (13,14) به مدت 8 هفته (روزی یک بار) گروه سوم و چهارم و پنجم: والپرووات (500 mg/kg داخل صفاقی) به مدت 8 هفته + (کورکومین 50, 100, 200 mg/kg) (15-17)، به مدت 8 هفته (روزی یک بار داخل صفاقی). گروه ششم: تک دوز کورکومین 200mg/kg، به مدت 8 هفته (روزی یک بار) به صورت داخل صفاقی گروه هفتم: ویتامین C (00mg/kg) + والپرووات (500mg/kg داخل صفاقی) به مدت 8 هفته پس از اتمام مواجهه، حیوانات با زایلازین و کتامین بیهوش و با کم‌ترین درد و رنج کشته شدند. در مرحله بعد، با باز کردن جمجمه، مغز حیوان خارج شد. نمونه ابتدا با نرمال سالین شستشو داده شد و بخشی از مغز در فرمالین 10 درصد جهت انجام بررسی‌های پاتولوژی قرار داده شد و بقیه بافت مغز در بافر مانتیول سرد حاوی 0.25M sucrose، 10mM Tris-HCl 250 μg BSA/ml قرار داده شد. در مرحله بعد با قیچی بافت مغز تکه تکه و سپس با هموژنایزر دستی شیشه‌ای هموژن شد. بافت هموژن شده به میکروتیوب‌ها انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای 4 درجه سانتی‌گراد ابتدا با سرعت 2000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام زمان سانتریفیوژ، محلول رویی را به آرامی به میکروتیوب‌های دیگر انتقال داده شد و به دو قسمت تقسیم گردید. قسمتی از محلول به دمای 80- سانتی‌گراد برای بررسی‌های بیوشیمیایی انتقال داده شد و قسمت دیگر، به مدت 10 دقیقه با دور 12000 g سانتریفیوژ شد و بعد از آن مایع رویی میکروتیوب دور ریخته شد و رسوبات میتوکنندری در میکروتیوب باقی ماند که به این رسوبات بافر تریس اضافه شد و برای بررسی تست‌های میتوکندریایی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل روی یخ انجام شد.

بررسی هیستولوژیکی بافت مغز

نمونه‌های بافت مغز از بخش لوب فرونتال بخش پره فرونتال گرفته شدند و در فرمالین 10 درصد برای مدت 48 ساعت فیکس شدند. سپس در سری الکل‌ها

اندازه‌گیری سطح گلو تاتیون

یک میلی‌لیتر از هموژن برداشته و به آن 0/25 میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) 20 درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت 20 دقیقه در 1000 سانتی‌فیوژ انجام دادیم. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن 2 میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات 0/3 مولار و 0/5 میلی‌لیتر و 0/4 درصد DTNB اضافه کرده و ورتکس گردید. سپس برای تکمیل واکنش، 15 دقیقه انکوبه انجام دادیم. در ادامه میزان جذب در طول موج 412 نانومتر خوانده شد و غلظت گلو تاتیون از روی منحنی استاندارد گلو تاتیون بر حسب nmol/ml به دست آوردیم (20).

تعیین میزان پروتئین کربونیل

میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف 2,4-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) اندازه‌گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، 500 μl از تری کلرواستیک اسید (20 درصد w/v) به 250 μg از نمونه اضافه شد و در 4°C به مدت 15 دقیقه نگهداری گردید. سپس پروتئین های رسوب داده شده با دور 6500 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب زیرین کاملاً در 500 μl از 0.1 M NaOH پراکنده شده و 500 μl از 10mM DNPH حل شده در 2 M HCl به نمونه‌ها اضافه شد. هم‌چنین یک بلانک با اضافه کردن 500 μl از 2 M HCl بدون DNPH به نمونه پروتئین تهیه شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و دور از نور انکوبه شده و 500 μl از تری کلرواستیک اسید (20 درصد w/v) اضافه و رسوب پروتئینی با سانتریفیوژ در 6500g به مدت 10 دقیقه جمع‌آوری و سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوب زیرین با 1 میلی‌لیتر از مخلوط 1:1 (v/v) اتانول و اتیل استات ترکیب و مجدداً در 6500g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب پروتئین نهایی در 200 μl از محلول گوانین هیدروکلراید 6M پراکنده شد. میزان پروتئین کربونیل با خواندن جذب در 365 nm با

ضریب جذب $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد که به صورت $\text{nmol of DNPH per milligram of protein}$ بیان گردید (21).

بررسی سمیت میتوکندری در میتوکندری جدا شده از سلول‌های مغز

اندازه‌گیری میزان فعالیت میتوکندری

برای سنجش عملکرد میتوکندری از تترازولیوم بروماید (MTT) به‌عنوان معرف استفاده شد. MTT توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری احیا می‌شود و بلور ارغوانی (فورمازان) رنگ غیرمحلول تولید می‌کند. 100 میکرولیتر از سوپانسیون میتوکندری در هر چاهک پلیت 96 خانه‌ای ریخته و سپس محلول MTT (0/4 درصد) به همراه سوکسینات (10mM) به هر چاهک اضافه شده و به دور از نور در دمای 37°C سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت انکوباسیون انجام گرفت. با اضافه شدن دی‌متیل سولفوکساید 100 μl ، کریستال‌های فورمازون تشکیل شده، حل گردید و سپس جذب نمونه‌ها در 570 نانومتر با استفاده از الیزا ریدر خوانش شد. درصد تغییر در فعالیت آنزیم با سنجش جذب گروه‌ها در برابر جذب گروه کنترل محاسبه شد (18).

اندازه‌گیری میزان پتانسیل غشای میتوکندری

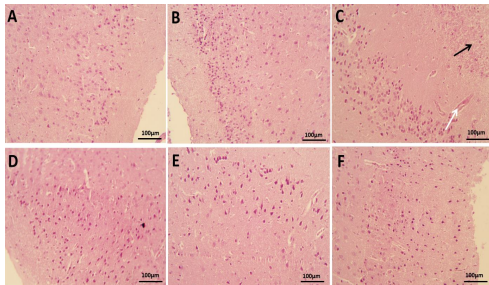
از رنگ فلورسنت کاتیونی (رودامین 123) برای اندازه‌گیری پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) استفاده می‌شود. ابتدا 10 میکرومولار رودامین به نمونه‌های میتوکندری (1 میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر) اضافه شد و سپس، شدت فلورسانس رودامین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فلورسانس در طول موج‌های تحریک و انتشار 490nm و 535nm محاسبه شد (22).

تعیین تورم میتوکندری

تورم میتوکندری از طریق بررسی تغییرات پراکندگی نور در میتوکندری انجام می‌شود. میتوکندری های جدا

موثرتری در مقایسه با دوز 50 میلی گرم/کیلوگرم (D) کورکومین دارد. موش هایی که والپروات سدیم را به همراه ویتامین C دریافت کردند، ساختار مغزی مشابه گروه Cur 100+Val داشته اند.

شده در بافر تورم قرار داده شدند سپس، جذب را با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج 540 نانومتر اندازه گیری کردیم. کاهش جذب، نشان دهنده افزایش تورم میتوکنندری است (18).



تصویر شماره 1: ارزیابی هیستوپاتولوژیک اثر کورکومین بر آسیب بافت مغز القا شده توسط والپروات سدیم

A. Control; D. Cur (50mg/kg)+Val;
B. Curcumin(100mg/kg); E. Cur (100mg/kg)+Val;
C. Val(500mg/kg); F. Vit C(500mg/kg)+Val.

در تصویر C پیکان سفید نشان دهنده اتساع و احتقان عروق در ناحیه اطراف منژ و پیکان مشکی نشن پلازما در زیر لایه گرانولر مغز را نشان می دهد. رنگ آمیزی با H&E انجام شده است و تصاویر با بزرگنمایی $20\times$ تهیه شده است. Scale bar=100 μm .

val: والپروات سدیم، cur: کورکومین

اثر کورکومین بر پراکسیداسیون لیپیدی در بافت مغز موش صحرائی

افزایش میزان مالون دی آلدئید یک مارکر مهم برای آسیب اکسیداتیو غشای سلول است که سطح آن با استفاده از TBA سنجیده می شود. با توجه به نمودار شماره 1، سطح مالون دی آلدئید در مغز تمامی موش هایی که سدیم والپروات دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P<0/001$). علاوه بر این، میزان مالون دی آلدئید در گروه هایی که کورکومین با غلظت های مختلف دریافت کردند به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت که این اثر در غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/05$). همچنین کورکومین به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تغییر قابل ملاحظه ای بر میزان لیپید پراکسیداسیون ایجاد نکرد.

آنالیز آماری

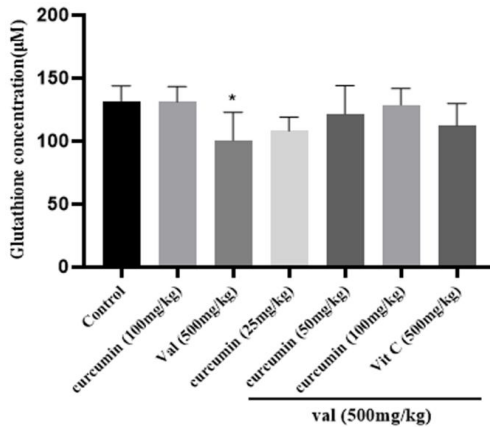
نتایج بر حسب میانگین \pm انحراف معیار با 3 بار تکرار آزمایشات گزارش شد و همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری 8 Graphpad Prism انجام گرفت و تست های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey بود. حد معنی داری ($P<0/05$) تعریف شده است.

یافته ها

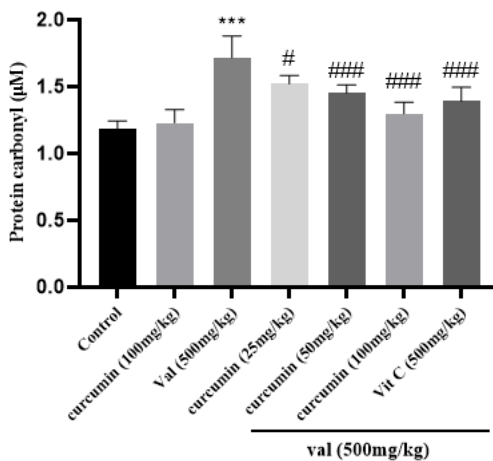
اثر کورکومین بر شاخص های پاتولوژیک بافت مغز موش صحرائی

تصویر شماره 1، تاثیر کورکومین و والپروات سدیم را بر ساختار مغز در تمام گروه ها نشان می دهد. تصویر A گروه کنترل را نشان می دهد. در این گروه، لایه های کورتکس و بخش مدولا کاملاً نرمال است. موش هایی که تنها کورکومین دریافت کردند، ساختار بافتی مشابه گروه کنترل داشتند (B). تصویر C نشان می دهد حیواناتی که والپروات سدیم دریافت کرده اند، اتساع و احتقان عروق در بخش هایی از نواحی مغز دیده شد که این اتساع و احتقان عروق در ناحیه اطراف منژ بیش تر مشهود بود. نشن پلازما در زیر لایه گرانولر مغز دیده شد. در برخی از نواحی مغز، ساختار لایه های مغزی از بین رفته و سلول های نکروزی و حتی سلول های التهابی نیز دیده شد. تجویز کورکومین در موش های دریافت کننده والپروات سدیم توانست ساختار بافتی مغز را بهبود ببخشد. اتساع و احتقان عروق پراکنده تر و التهاب در حد بسیار خفیف بود. ارزیابی هیستوپاتولوژی نشان داد که دوز 100 میلی گرم/کیلوگرم (E) کورکومین نقش

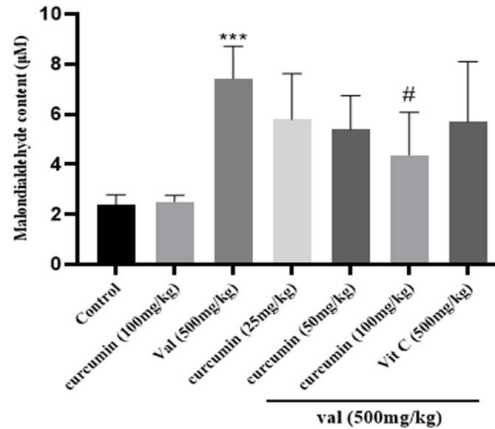
پروتئین کربونیل داشته است ($P < 0/001$). هم چنین کورکومین به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری بر میزان پروتئین کربونیل ایجاد نکرد.



نمودار شماره 2: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر تولید گلو تاتیون (GSH) در بافت مغز موش صحرائی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. * اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/05$), val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)



نمودار شماره 3: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر میزان پروتئین کربونیل در بافت مغز موش صحرائی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. *** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/001$), # اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/05$), ### اختلاف معنی دار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/001$), val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)



نمودار شماره 1: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت مغز موش صحرائی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. *** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/001$), # اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/05$). val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)

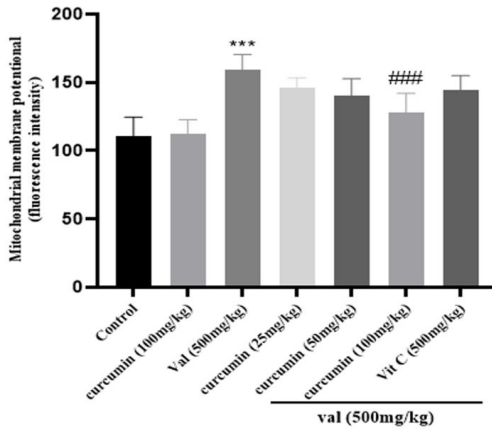
اثر کورکومین بر غلظت گلو تاتیون در بافت مغز موش صحرائی

بر اساس نمودار 2، سدیم والپروات سبب تخلیه سطح گلو تاتیون در بافت مغز موش، در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0/05$). از طرف دیگر، تجویز کورکومین تا حدودی توانست از کاهش سطح گلو تاتیون در این بافت ممانعت کند، اما این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبودند.

اثر کورکومین بر میزان پروتئین کربونیل در بافت مغز موش صحرائی

با توجه به نمودار شماره 3، میزان پروتئین کربونیل بافت مغز در مواجهه با والپروات سدیم با افزایش معنی دار سطح پروتئین کربونیل همراه بود ($P < 0/001$). در حالی که، میزان پروتئین کربونیل در گروه‌های دریافت کننده کورکومین به صورت وابسته به غلظت به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد که این کاهش در همه‌ی غلظت‌های کورکومین معنادار بوده است و کورکومین توانسته به میزان قابل توجهی از آسیب جلوگیری کند. Vit C به عنوان کنترل مثبت، تاثیر معنی داری روی کاهش

کورکومین در دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم توانست از کاهش پتانسیل غشای میتوکنندری در مقایسه با گروه سدیم والپروات به صورت معنی دار جلوگیری کند ($P < 0/001$). مواجهه با کورکومین تنها، تغییری در پتانسیل غشای میتوکنندری نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد.



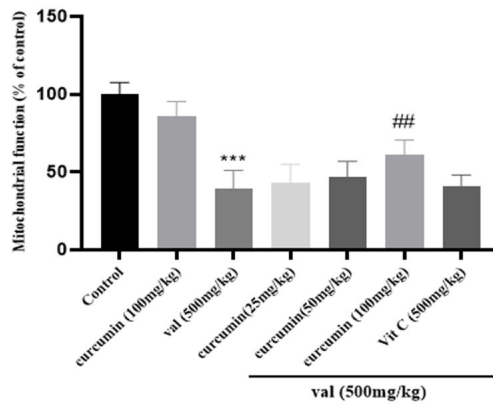
نمودار شماره 5: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر پتانسیل غشای میتوکنندری سلول‌های مغز موش صحرایی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. ***: اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/001$). ####: اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/001$). val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)

اثر کورکومین بر تورم میتوکنندی

یکی از شاخص‌های اصلی نفوذپذیری غشا میتوکنندری میزان تورم میتوکنندری است که از طریق پراکندگی نور محاسبه می‌شود و کاهش جذب نشان دهنده افزایش تورم میتوکنندری است. همان‌طور که در نمودار شماره 6 نشان داده شده است، سدیم والپروات باعث کاهش جذب و افزایش التهاب میتوکنندری در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0/001$). تجویز کورکومین در دوز 50 میلی گرم بر کیلوگرم توانست به طور معنی داری تورم میتوکنندری را در مقایسه با گروه سدیم والپروات کاهش دهد. تورم میتوکنندری در دو گروه کورکومین تنها و گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.

اثر کورکومین بر میزان فعالیت میتوکنندری

بر طبق نتایج نمودار شماره 4، میزان عملکرد میتوکنندری در بافت مغز موش‌هایی که سدیم والپروات دریافت کردند. در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($P < 0/001$). در گروه مواجهه یافته با کورکومین تنها، تغییری در فعالیت میتوکنندری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. از طرف دیگر، تجویز کورکومین به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش سمیت والپروات سدیم می‌شود که این کاهش در دوز کورکومین میلی گرم بر کیلوگرم 100 از نظر آماری معنی دار است ($P < 0/001$).



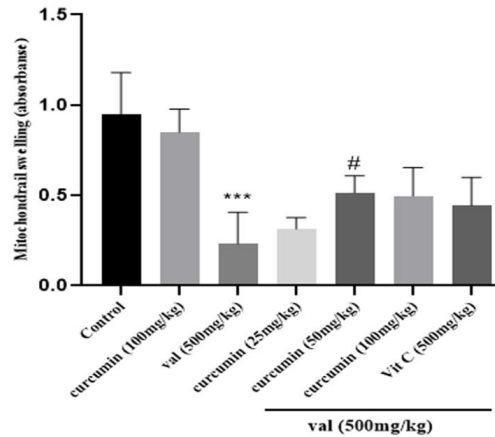
نمودار شماره 4: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر میزان عملکرد میتوکنندری مغز موش صحرایی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. ***: اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/001$). ##: اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/01$). val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)

اثر کورکومین بر میزان پتانسیل غشای میتوکنندری

بالا رفتن شدت فلورسانس رودامین نشان دهنده کاهش پتانسیل غشای میتوکنندری و آسیب دیدن غشای میتوکنندری مغز است. همان‌طور که در نمودار شماره 5، نشان داده شده است، مواجهه رت‌ها با سدیم والپروات باعث کاهش قابل توجه پتانسیل غشای میتوکنندری مغز در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0/001$) که این کاهش باعث آسیب دیدن غشای میتوکنندری مغز می‌گردد. تجویز

و اختلال عملکرد میتو کندری از مهم ترین مکانیسم های دخیل در آسیب کبدی ناشی از والپروات سدیم است (26). رادیکال های آزاد با اکسیداسیون لیپیدهای غشا منجر به تولید MDA می شود (27). بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و میتو کندری فراوان و سطوح آنتی اکسیدانی پایین، در برابر حمله رادیکال های آزاد بسیار آسیب پذیر است (28). بر اساس گزارش بسیاری از مطالعات تغییر پارامترهای استرس اکسیداتیو و سطوح آنزیم آنتی اکسیدانی در بیماران مصرف کننده والپروات سدیم مشاهده شده است. حامد و همکاران نشان دادند که سطح MDA و گلو تاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در بیماران دریافت کننده والپروات سدیم در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده افزایش یافت (29).

Verrotti و همکاران نشان دادند که درمان با والپروات سدیم پس از یک سال می تواند استرس اکسیداتیو را در کودکان دارای اضافه وزن ایجاد کند (30). خواص اکسیدانی والپروات سدیم می تواند باعث به هم زدن تعادل آنتی اکسیدانی شود و آسیب بافتی ایجاد کند (5). در مطالعات حیوانی، والپروات سدیم با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و تغییر ساختار سلولی، تخریب بافت کبد را تسریع می بخشد (31). در مطالعه ای که در سال 2021 توسط رضوان امیدپور و همکاران بر روی 48 موش صحرایی نر انجام شد، مشخص شد میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه های دریافت کننده والپروویک اسید افزایش یافته که نشان دهنده تخریب غشای سلولی کبد موش ها در اثر مصرف دارو است. با توجه به بعضی از مطالعات حیوانی و انسانی، والپروات سدیم یک داروی سمی با نارسایی های کبدی برگشت پذیر و غیر قابل برگشت از طریق القا یا افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو است (32). با توجه به تحقیق Noha و همکاران، بررسی هیستوپاتولوژیک موش های تحت درمان با والپروات سدیم تغییراتی را در بافت طبیعی کبد، انحطاط سلول های کبدی و انفیلتراسیون سلول های التهابی نشان داد. طبق این مطالعه استرس



نمودار شماره 6: اثرات سدیم والپروات و غلظت های مختلف کورکومین بر تورم میتو کندری مغز موش صحرایی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. ***: اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/001$), #: اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/05$). val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)

بحث

در این مطالعه، اثر محافظتی کورکومین در سرکوب آسیب های اکسیداتیو و اختلال میتو کندری ناشی از والپروات سدیم در بافت مغز مورد بررسی قرار گرفت. داده های مطالعه ما نشان داد والپروات سدیم می تواند سبب القای استرس اکسیداتیو و اختلال میتو کندری در بافت مغز موش صحرایی شود که آسیب پاتولوژی مشاهده شده، تایید کننده ارتباط بین استرس اکسیداتیو و آسیب مغزی می باشد. از سوی دیگر کورکومین، باعث سرکوب آسیب های اکسیداتیو و اختلال میتو کندری ناشی از والپروات سدیم در این بافت گردید. والپروات سدیم دارویی است که در درمان انواع تشنج ها، سردردهای میگرنی، بیماران دو قطبی و بیش فعالی کودکان مورد استفاده قرار می گیرد. طبق مطالعات، اثرات نوروپروتکتیو والپروات سدیم در بیماری های حاد سیستم عصبی ثابت شده است (23، 24). با این وجود از والپروات سدیم تداخلات دارویی و سمیت های متعددی مانند اثر تراوتورنی، آسیب کبدی، هیپرآمونمی و آتروفی مغزی برگشت پذیر گزارش شده است (25). استرس اکسیداتیو

اکسیداتیو ناشی از والپروات سدیم باعث فعال شدن آبشار التهابی و فاکتورهای رونویسی می‌شود (33). در یک مقاله گزارش موردی در بیماران دریافت کننده والپروات سدیم به مدت سه ماه روزانه 800 mg بعد انجام سی تی، آتروفی مغزی برگشت پذیر گزارش شد (34). نتایج هیستوپاتولوژی در این مطالعه، شواهدی از آسیب بافتی را نشان داد. با توجه به مطالعات ذکر شده در بالا و یافته‌های ما، به نظر می‌رسد که استفاده طولانی مدت از والپروات سدیم می‌تواند عوارض بافتی را نشان دهد که در نهایت منجر به مرگ سلولی، التهاب گردد. در این مطالعه مشاهده شد که استفاده از والپروات سدیم باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بافت مغز رت می‌شود. در مطالعات ثابت شده که استرس اکسیداتیو در چندین آسیب عصبی انسان از جمله هیپوکسی حاد-ایسکمی/خون‌رسانی مجدد و اختلالات عصبی مزمن مانند بیماری‌های پارکینسون و آلزایمر دخالت دارد (35). سطوح بالای گلو تامات خارج سلولی، که منجر به کاهش گلو تاتیون و آسیب سلولی می‌شود، علاوه بر مهار سمیت گلو تامات توسط چندین آنتی اکسیدان، از جمله α -توکوفرول و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، نشان دهنده سمیت اکسیداتیو گلو تامات است. سلول‌های عصبی قشری کشت شده از موش‌هایی که بیش از حد آنزیم مهار کننده رادیکال‌های آزاد SOD را بیان می‌کنند، نشان داده شد که در برابر سمیت گلو تامات مقاوم هستند و حضور گلو تاتیون مانع تخریب عصبی می‌شود. همچنین حدس زده می‌شود که عملکرد اصلی آسکوربات و α -توکوفرول به عنوان آنتی اکسیدان ممکن است بر اساس اثر هم افزایی با گلو تاتیون در سیستم عصبی مرکزی است (36). استفاده از یک آنتی اکسیدانت قوی همراه با تجویز والپروات سدیم با توجه به عوارض و مکانیسم سمیت این ماده باعث کاهش عوارض آن می‌شود. نقش آنتی اکسیدان‌ها، محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد است. آنتی اکسیدان‌های گیاهی مانند فنل‌ها در تنظیم فعالیت آنزیم‌های کبدي موثر هستند. این آنتی اکسیدان‌ها

باعث کاهش آسیب سلولی ناشی از اکسیدان‌ها یا سیتوکین‌های التهابی می‌شوند (37). کورکومین پلی فنول دارای فعالیت‌های بسیاری از جمله اثر ضد التهابی، کاهش قندخون، آنتی اکسیدان، التیام زخم و ضد میکروبی است. در طب سنتی از زردچوبه به عنوان مسهل صفاوی و محافظ کبد یاد شده است. اثر محافظتی زردچوبه ممکن است به علت اثرات آنتی اکسیدانی آن باشد. به علاوه زردچوبه باعث افزایش فعالیت آنزیم گلو تاتیون-S-ترانسفراز می‌شود (12). کورکومین همچنین دارای فعالیت‌های محافظتی و نروپاتیک است، باعث مهار ترومبوز شده و در برابر انفارکتوس میوکارد محافظت ایجاد می‌کند. دارای خواص هیپوگلیسمی و ضد رماتیسمی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلو تاتیون پراکسیداز است و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در مدل‌های حیوانی مختلف و مطالعات انسانی کورکومین حتی در دوزهای بسیار بالا ایمن است (38). خواص بالای کورکومین ممکن است به علت فعالیت آنتی اکسیدانی آن باشد. ثابت شده است که وجود گروه فنلی در ساختار کورکومین به آن توانایی واکنش با انواع مختلفی از رادیکال‌های آزاد را داده است (39). اثرات محافظتی کورکومین در شرایط مختلفی که استرس‌های اکسیداتیو درگیر بوده‌اند، در مطالعات متعددی آورده شده است. اثرات محافظتی کورکومین در برابر سمیت میتو کندری ناشی از سایر مواد سمی در مطالعات قبلی ثابت شده است. براساس مطالعه Sabet و همکاران، کورکومین با مهار گونه‌های آزاد اکسیژن در میتو کندری، باعث مهار از بین رفتن پتانسیل غشا و تورم میتو کندری شده و با تثبیت غشا از غشای سلول در برابر لیپید پراکسیداسیون محافظت می‌کند و در میتو کندری قلب موش اثرات محافظتی در برابر مسمومیت ناشی از بواسیزامب ایجاد می‌کند (40). کورکومین علاوه بر تعامل مستقیم با رادیکال‌های آزاد، می‌تواند به صورت غیر مستقیم باعث افزایش تولید آنتی اکسیدان‌های دفاعی درون‌زا، به ویژه گلو تاتیون شود (12). در سلول‌های در

مختلف مکانیسمی و بیان آنزیمی است هم چنین قرار گرفتن در معرض سدیم والپروات باعث کاهش قابل توجه پتانسیل غشای میتوکندری مغز می شود. تجویز کورکومین توانست از کاهش پتانسیل غشای میتوکندری جلوگیری کند و باعث کاهش آسیب دیدن غشای میتوکندری مغز شود. در این مطالعه والپروات سدیم سبب افزایش تورم و ورود آب و الکتروولیت به داخل میتوکندری شد که تجویز کورکومین باعث کاهش میزان آسیب و تورم میتوکندری شد.

تحریک تولید بیش از حد رادیکال های آزاد یکی از مهم ترین مکانیسم های سمیت عصبی والپروات سدیم است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نقش اساسی استرس اکسیداتیو و آسیب رسیدن به میتوکندری که نتیجه تولید رادیکال های آزاد توسط والپروات سدیم است را تایید می کند. تجویز کورکومین که یک آنتی اکسیدانت است، توانست به طور معنی داری میزان فاکتورهای استرس اکسیداتیو را در بافت مغز مرت کاهش دهد که این اثرات محافظتی را می توان به خاصیت آنتی اکسیدانی کورکومین مرتبط دانست. بنابراین پیشنهاد می شود از کورکومین به عنوان درمان مکمل در برابر آسیب های بافتی و شرایط پاتولوژیک مشابه که ناشی از مواجهه با استرس اکسیداتیو است، استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه ی دکترای عمومی داروسازی خانم زهرا طالبی با کد اخلاق (IR.MAZUMS..REC.1400.8821) و کد طرح 8821 می باشد و منابع مالی آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

معرض گلو تامات افزایش میزان MDA مشاهده شد. MDA، محصولی از تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده چند گانه است، که معمولاً به عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو شناخته می شود و نشان می دهد که سمیت تحریکی گلو تامات ممکن است با استرس اکسیداتیو مرتبط باشد. MDA همچنین یک شاخص هم برای پراکسیداسیون لیپیدی است (41). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تجویز کورکومین به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش MDA و به تبع آن پراکسیداسیون لیپیدی صورت گرفته توسط والپروات سدیم در میتوکندری سلول های مغز شد. گلو تاتیون نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو، حفظ تعادل ردوکس، افزایش سم زدایی متابولیک و تنظیم سیستم ایمنی دارد. علاوه بر آن، گلو تاتیون نقش مهمی را در بخش های مختلف سلولی ایفا می کند که در میتوکندری نقش کلیدی را در تنظیم آپوپتوز در مقابل نکروز دارد (42). در این مطالعه تجویز کورکومین منجر به افزایش غلظت گلو تاتیون به صورت وابسته به غلظت شد، اما این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبودند. در این مطالعه مواجهه با والپروات سدیم باعث افزایش میزان پروتئین کربونیل شد. میزان پروتئین کربونیل در گروه های دریافت کننده کورکومین به صورت وابسته به غلظت به میزان قابل ملاحظه ای کاهش پیدا کرد که این کاهش در همه غلظت های کورکومین معنی دار بوده است و کورکومین توانسته به میزان قابل توجهی از آسیب اکسیداتیو پروتئین ها جلوگیری کند. در این مطالعه کورکومین به صورت وابسته به غلظت، از میتوکندری سلول های مغز در مواجهه با والپروات سدیم، محافظت کرده و باعث افزایش میزان میتوکندری های فعال شده که نشان دهنده اثر آنتی اکسیدانی کورکومین است. از محدودیت های پژوهش حاضر عدم بررسی مسیرهای

References

1. Vuda M, Kamath A. Drug induced mitochondrial dysfunction: Mechanisms and adverse clinical consequences. *Mitochondrion* 2016; 31: 63-74.

2. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med* 2016; 14(1): 1-11.
3. Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12(6): 527-550.
4. Das A, Sarwar MS, Hossain MS, Karmakar P, Islam MS, Hussain ME, et al. Elevated serum lipid peroxidation and reduced vitamin C and trace element concentrations are correlated with epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 2019; 50(1): 63-72.
5. Finsterer J, Zarrouk Mahjoub S. Mitochondrial toxicity of antiepileptic drugs and their tolerability in mitochondrial disorders. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012; 8(1): 71-79.
6. Galaly SR, Abdella EM, Mohammed HM. Effects of royal jelly on genotoxicity and nephrotoxicity induced by valproic acid in albino mice. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 2014; 3(1): 1-15.
7. Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, Shaki F, Shahraki J, Fard JK. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicology in Vitro* 2012; 26(4): 545-551.
8. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, MH EZ, Ahmadi Moghaddam K, Goodarzi G, Ghasemi Hamidabadi H. Evaluation proliferative effect of nettle leaf extract on neural stem cell in oxidative stress condition. *Journal of Cell & Tissue* 2018; 9(4): 333-343.
9. Garcia-Alloza M, Borrelli L, Rozkalne A, Hyman B, Bacskai B. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 2007; 102(4): 1095-1104.
10. Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement J-P. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett* 2001; 495(1-2): 131-136.
11. Mythri RB, Jagatha B, Pradhan N, Andersen J, Bharath MS. Mitochondrial complex I inhibition in Parkinson's disease: how can curcumin protect mitochondria? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 399-408.
12. Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 2013; 1(1): 448-456.
13. Rafiei S, Edalatmanesh MA, Rezaei E. Effect of Sex and Age on Repetitive, Stereotyped, and Exploratory Behaviors in a Rat Model of Valproic Acid-Induced Autism. *Shefaye Khatam* 2017; 5(3): 11-17.
14. Amrani A, Boubekri N, Benaissa O, Benayache F, Benayache S, Zama D. Sodium Valproate Affect Brain Antioxidant/Oxidant Status in Mice: Ameliorative Effect of Vitamin E and Chrysanthemum fontanesii Extract. *Curr Bioact Compd* 2020; 16(5): 576-580.
15. Sadoughi SD, Khayatzaadeh J. Effect of Curcumin on Hippocampal Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Serum Levels of Inflammatory Cytokines in Rat Model for Alzheimer's Disease. *Shefaye Khatam* 2018; 6(1): 1-9.
16. Yadav RS, Shukla RK, Sankhwar ML, Patel DK, Ansari RW, Pant AB, et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology* 2010; 31(5): 533-539.

17. Zhao J, Zhao Y, Zheng W, Lu Y, Feng G, Yu S. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2008; 1229: 224-232.
18. Arab-Nozari M, Mohammadi E, Shokrzadeh M, Ahangar N, Amiri FT, Shaki F. Co-exposure to non-toxic levels of cadmium and fluoride induces hepatotoxicity in rats via triggering mitochondrial oxidative damage, apoptosis, and NF-kB pathways. *Environ Sci Pollut Res Int* 2020; 27(19): 24048-24058.
19. Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26(2): 232-236.
20. Akbari S, Amiri FT, Naderi M, Shaki F, Seyedabadi M. Sodium arsenite accelerates D-galactose-induced aging in the testis of the rat: Evidence for mitochondrial oxidative damage, NF-kB, JNK, and apoptosis pathways. *Toxicology* 2022; 470: 153148.
21. Ahangar N, Naderi M, Noroozi A, Ghasemi M, Zamani E, Shaki F. Zinc deficiency and oxidative stress involved in valproic acid induced hepatotoxicity: protection by zinc and selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res* 2017; 179(1): 102-109.
22. Shaki F, Teymoori M, Motafeghi FS, Hemmati N, Arab-Nozari M. L-arginine Ameliorated Mitochondrial Oxidative Damage Induced by Sub-chronic Exposure to Cadmium in Mice Kidney. *Pharmaceutical and Biomedical Research* 2021; 7(2): 79-86.
23. Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J, et al. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS One* 2010; 5(6): e11383.
24. Vajda F. Valproate and neuroprotection. *J Clin Neurosci* 2002; 9(5): 508-514.
25. Wadzinski J, Franks R, Roane D, Bayard M. Valproate-associated hyperammonemic encephalopathy. *J Am Board Fam Med* 2007; 20(5): 499-502.
26. Kamkar A, Khodabakhshian S. Determination of the total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Sabalan honey. *Res Vet J* 2017; 72(1): 53-61.
27. Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2005; 86(2): 436-443.
28. David S, Hamilton JP. Drug-induced liver injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev* 2010; 6: 73-80.
29. Hamed SA, Abdellah M. Trace elements and electrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patients. *J Pharmacol Sci* 2004; 96(4): 349-359.
30. Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res* 2008; 78(2-3): 171-177.
31. Tanvir E, Afroz R, Chowdhury MAZ, Khalil MI, Hossain MS, Rahman MA, et al. Honey has a protective effect against chlorpyrifos-induced toxicity on lipid peroxidation, diagnostic markers and hepatic histoarchitecture. *Eur J Integr Med* 2015; 7(5): 525-533.
32. Omidipour R, Zarei L, Boroujeni MB, Rajabzadeh A. Protective effect of thyme honey against valproic acid hepatotoxicity in Wistar rats. *Biomed Res Int* 2021; 2021: 8839898.
33. Abdelkader NF, Elyamany M, Gad AM, Assaf N, Fawzy HM, Elesawy WH. Ellagic

- acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. *J Pharmacol Sci* 2020; 143(1): 23-29.
34. De Michele G, Sorrentino P, Nesti C, Rubegni A, Ruggiero L, Peluso S, et al. Reversible valproate-induced subacute encephalopathy associated with a MT-ATP8 variant in the mitochondrial genome. *Front Neurol* 2018; 9: 728.
35. Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Srinivas Bharath M, Shankar S. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2012; 37(2): 358-369.
36. Aoyama K, Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. *Int J Mol Sci* 2012; 13(9): 12017-12035.
37. Sokmen BB, Tunali S, Yanardag R. Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(10): 3562-3566.
38. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1590-1611.
39. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomed Pharmacother* 2017; 87: 223-229.
40. Sabet NS, Atashbar S, Khanlou EM, Kahrizi F, Salimi A. Curcumin attenuates bevacizumab-induced toxicity via suppressing oxidative stress and preventing mitochondrial dysfunction in heart mitochondria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020; 393(8): 1447-1457.
41. Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord* 2010; 125(1-3): 287-294.
42. Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)* 2014; 13(1): 8-12.