

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 کیلو گرم در روز، داخل صفاقی) به تنهایی یا همراه با دوزهای مختلف کورکومین (25، 50 و 100 میلی گرم بر کیلو گرم در روز، داخل صفاقی) و ویتامین C (100 میلی گرم بر کیلو گرم 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

درمان دارویی بیماری ها و پیامدهای سمی بالقوه درمان دارویی، مسئله چالش برانگیزی است. براساس آمار آمریکا و اروپا سالیانه بیشتر از 100000 نفر به دلیل علت های وابسته به دارویی می میرند (1).

E-Mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: 17 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 می شود (10). علاوه بر این، کورکومین دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی است که توانسته از میتوکندری های مغز در برابر استرس های اکسیداتیو مختلف محافظت کند (11). در تحقیقات نشان داده شد که کورکومین می تواند باعث افزایش بیان پروتئین های حفاظت سلولی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون-S-ترانسفراز، NAD(P)H و γ -گلو تامیل سیستئین لیگاز (γ GCL) شود (12) و کورکومین با القا γ GCL موجب افزایش سنتز و غلظت گلوکاتایون در آستروسیت و نورون می گردد (12). بنابراین، در مطالعه حاضر، برای اولین بار، ما اثر سدیم والپروات را بر روی بافت مغز و میتوکندری سلول های عصبی موش صحرایی و مهار سمیت احتمالی آن را توسط کورکومین مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش ها

طراحی مطالعه

کورکومین از شرکت مرک آلمان و والپروات سدیم از شرکت روز دارو ایران تهیه شد.

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، موش های 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 سانتی گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری شدند. کلیه آزمایش های انجام شده، با توجه به دستورالعمل های 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 علت های مهم جمع آوری دارو از بازار می باشد. از این جهت شناسایی اثرات جانبی دارو و مکانیسم های درگیر در آن اهمیت به سزایی دارد (2). صرع و داروهای ضد صرع در تشکیل رادیکال های آزاد نقش دارند، بنابراین می توانند منجر به استرس اکسیداتیو شوند (3). سیستم عصبی به دلیل فراوانی بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در برابر استرس اکسیداتیو آسیب پذیر و مستعد تشکیل لیپید پراکسیداسیون می باشد. بنابراین افزایش رادیکال های آزاد می تواند باعث تخریب نورون ها 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 وسیع الطیف است که در درمان انواع خاصی از تشنجه ها با تغییر در سطح نوروترانسمیترهای گابا ترژیک و گلو تامینرژیک مورد استفاده قرار می گیرد. هم چنین از سدیم والپروات در درمان سردردهای میگرنی، بیماران دو قطبی و کودکان بیش فعال استفاده می شود. در آزمایشات کلینیکی عوارض جانبی مختلفی از این دارو گزارش شده است. سدیم والپروات با تشکیل متابولیت های سمی و رادیکال های آزاد اکسیژن باعث آسیب بافت کلیه می شود (6). سدیم والپروات با مهار کمپلس I و IV میتوکندری، اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو، افزایش تولید رادیکال آزاد اکسیژن و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری می تواند باعث آسیب سلولی گردد (7،5). امروزه شناخت، مدیریت و مهار سمیت عصبی مرتبط با دارو، به مسئله ی مهمی در انتخاب درمان تبدیل شده است. ترکیبات طبیعی مانند پلی فنل ها برای جلوگیری و درمان سمیت عصبی وابسته به دارو به کار می روند (8). کورکومین (دی فروئیل متان) یک ترکیب پلی فنل طبیعی از دسته دی آریل هپتانوئیدها است که باعث ایجاد رنگ نارنجی مایل به زرد در زردچوبه می شود. توانایی عبور کورکومین از سد خونی مغزی و نقش حفاظت نورونی آن، در بسیاری از اختلالات تخریب کننده نورون ها

دهیدراته، در زالن شفاف سازی و در پارافین قالب گیری شدند. برش هایی به ضخامت 5 میکرون با دستگاه میکروتوم تهیه شد و با همتاکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. اسلایدهای بافتی توسط هیستولوژیست که به گروه های تحقیق نا آشنا بود با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی در بافت مغز

تعیین غلظت پروتئین

اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (18) که محدوده سنجش غلظت پروتئین 200-2000 میکروگرم بر میلی لیتر است. ابتدا محلول استوک کوماسی بلو (کوماسی بلو 50 میلی گرم، متانول 25 میلی لیتر، اسید فسفریک 50 میلی لیتر و آب مقطر تا 200 میلی لیتر) آماده شد و در ادامه غلظت های مختلفی پروتئین های 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 غلظت های پروتئین سوسپانسیون میتوکنندری از روی منحنی محاسبه شد و سوسپانسیون میتوکنندری با بافر موردنظر تا غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ رقیق شد.

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی

مالون دی آلدئید (MDA) محصول اصلی اکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. ابتدا به $0/2\text{ml}$ هموژن بافت مغز $0/1\text{ml}$ از معرف thiobarbituric acid (TBA) شامل $0/5\text{HCl}$ نرمال، 15 درصد TCA و $0/3$ درصد TBA اضافه و به خوبی مخلوط شدند. نمونه ها ابتدا به مدت 30 دقیقه داخل یک حمام آب گرم و سپس به مدت 5 دقیقه داخل یک کیسه یخ گذاشته شدند. در ادامه، $0/2\text{ml}$ 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 الایزا در طول موج 532 نانومتر محاسبه شد (19).

صفافی (14,13) به مدت 8 هفته (روزی یک بار) گروه سوم و چهارم و پنجم: والپرووات (500 mg/kg داخل صفافی) به مدت 8 هفته + (کورکومین $50,100,200 \text{ mg/kg}$) (15-17)، به مدت 8 هفته (روزی یک بار داخل صفافی)، گروه ششم: تک دوز کورکومین 200mg/kg ، به مدت 8 هفته (روزی یک بار) به صورت داخل صفافی گروه هفتم: ویتامین C (00mg/kg) + والپرووات (500mg/kg داخل صفافی) به مدت 8 هفته پس از اتمام مواجهه، حیوانات با زایلازین و کتامین بیهوش و با کم ترین 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 بررسی های پاتولوژی قرار داده شد و بقیه بافت مغز در بافر مانتیول سرد حاوی 0.25M sucrose، $250\mu\text{g BSA/ml}$ ، 10mM Tris-HCl قرار داده شد. در مرحله بعد با قیچی بافت مغز تکه تکه و سپس با هموژنایزر دستی شیشه ای هموژن شد. بافت هموژن شده به میکروتیوب ها انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای 4 درجه سانتی گراد ابتدا با سرعت 2000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام زمان سانتریفیوژ، محلول رویی را به آرامی به میکروتیوب های دیگر انتقال داده شد و به دو قسمت تقسیم گردید. قسمتی از محلول به دمای -80 سانتی گراد برای بررسی های 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 تست های میتوکندریایی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل روی یخ انجام شد.

بررسی هیستولوژیک بافت مغز

نمونه های 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 الکل ها

اندازه گیری سطح گلو تاتیون

یک میلی لیتر از هموژن برداشته و به آن 0/25 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) 20 درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت 20 دقیقه در 1000 سانتیفریوژ انجام دادیم. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن 2 میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات 0/3 مولار و 0/5 میلی لیتر 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) اندازه گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، 500 μl از تری کلرواستیک اسید (20 درصد v/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 g 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 10 mM DNPH حل شده در 2 M HCl به نمونه ها اضافه شد. هم چنین یک بلانک با اضافه کردن 500 μl از 2 M HCl بدون DNPH به نمونه پروتئین تهیه شد. در ادامه نمونه ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و دور از نور انکوبه شده و 500 μl از تری کلرواستیک اسید (20 درصد v/v) اضافه و رسوب پروتئینی با سانتریفیوژ در 6500 g به مدت 10 دقیقه جمع آوری و سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوب زیرین با 1 میلی لیتر از مخلوط 1:1 (v/v) اتانول و اتیل استات ترکیب و مجدداً در 6500 g 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

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

بررسی سمیت میتوکندری در میتوکندری جدا شده از سلول های مغز

اندازه گیری میزان فعالیت میتوکندری

برای سنجش عملکرد میتوکندری از ترازولیوم بروماید (MTT) به عنوان معرف استفاده شد. MTT توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری احیا می شود و بلور ارغوانی (فورمازان) رنگ غیر محلول تولید می کند. 100 میکرو لیتر از سوپانسیون میتوکندری در هر چاهک پلیت 96 خانه ای ریخته و سپس محلول MTT (0/4 درصد) به همراه سوکسینات (10 mM) به هر چاهک اضافه شده و به دور از نور در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت انکوباسیون انجام گرفت. با اضافه شدن دی متیل سولفوکساید 100 μl، کریستال های فورمازون تشکیل شده، حل گردید و سپس جذب نمونه ها در 570 نانومتر با استفاده از الیزا ریدر خوانش شد. درصد تغییر در فعالیت آنزیم با سنجش جذب گروه ها در برابر جذب گروه کنترل محاسبه شد (18).

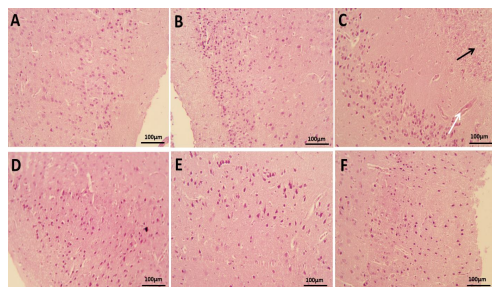
اندازه گیری میزان پتانسیل غشای میتوکندری

از رنگ فلورسنت کاتیونی (رودامین 123) برای اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) استفاده می شود. ابتدا 10 میکرومولار رودامین به نمونه های میتوکندری (1 میلی گرم پروتئین بر میلی لیتر) اضافه شد و سپس، شدت فلورسانس رودامین با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتمتر فلورسانس در طول موج های تحریک و انتشار 490 nm و 535 nm محاسبه شد (22).

تعیین تورم میتوکندری

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

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



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 پلاسما در زیر لایه گرانولر مغز را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی با H&E staining انجام شده است و تصاویر با بزرگنمایی 20× تهیه شده است. Scale bar=100 μm.

val: والپروات سدیم، cur: کورکومین

اثر کورکومین بر پراکسیداسیون لیپیدی در بافت مغز موش صحرایی

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

شده در بافر تورم قرار داده شدند سپس، جذب را با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری کردیم. کاهش جذب، نشان‌دهنده افزایش تورم میتوکاندری است (18).

آنالیز آماری

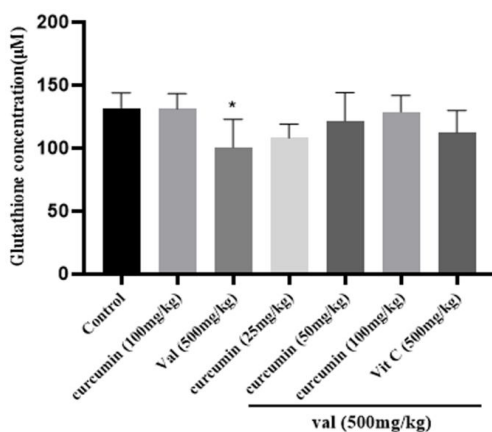
نتایج برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار با 3 بار تکرار آزمایشات گزارش شد و همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Graphpad Prism 8 انجام گرفت و تست‌های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey بود. حد معنی‌داری ($P < 0/05$) تعریف شده است.

یافته‌ها

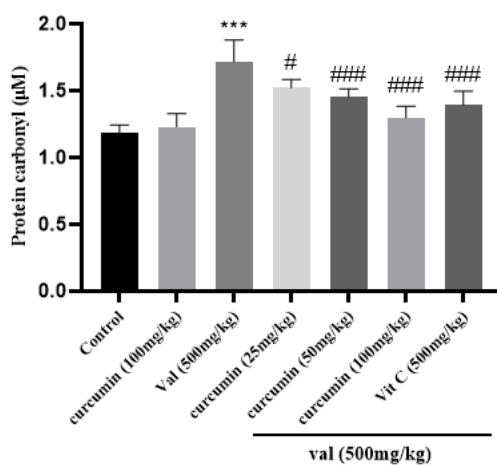
اثر کورکومین بر شاخص‌های پاتولوژیک بافت مغز موش صحرایی

تصویر شماره 1، تاثیر کورکومین و والپروات سدیم را بر ساختار مغز در تمام گروه‌ها نشان می‌دهد. تصویر A گروه کنترل را نشان می‌دهد. در این گروه، لایه‌های کورتکس و بخش مدولا کاملاً نرمال است. موش‌هایی که تنها کورکومین دریافت کردند، ساختار بافتی مشابه گروه کنترل داشتند (B). تصویر C نشان می‌دهد حیواناتی که والپروات سدیم دریافت کرده‌اند، اتساع و احتقان عروق در بخش‌هایی از نواحی مغز دیده شد که این اتساع و احتقان عروق در ناحیه اطراف منژر بیش‌تر مشهود بود. نشن پلاسما در زیر لایه گرانولر مغز دیده شد. در برخی از نواحی مغز، ساختار لایه‌های مغزی از بین رفته و سلول‌های نکروزی و حتی سلول‌های التهابی نیز دیده شد. تجویز کورکومین در موش‌های دریافت کننده والپروات سدیم توانست ساختار بافتی مغز را بهبود ببخشد. اتساع و احتقان عروق پراکنده‌تر و التهاب در حد بسیار خفیف بود. ارزیابی هیستوپاتولوژی نشان داد که دوز 100 میلی گرم/کیلوگرم (E) کورکومین نقش

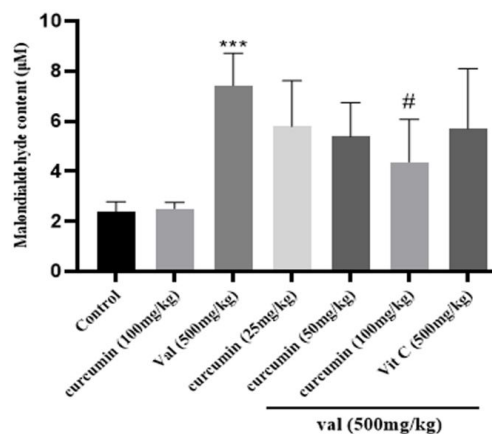
پروتئین کربونیل داشته است ($P < 0/001$). هم چنین کورکومین به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری بر میزان پروتئین کربونیل ایجاد نکرد.



نمودار شماره 2: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر تولید گلو تاتیون (GSH) در بافت مغز موش صحرایی 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 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 ($P < 0/05$). ####: 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 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)

اثر کورکومین بر غلظت گلو تاتیون در بافت مغز موش صحرایی

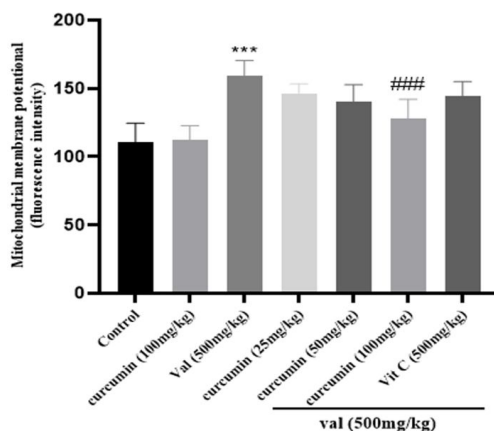
بر اساس نمودار 2، سدیم والپروات سبب تخلیه سطح گلو تاتیون در بافت مغز موش، در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0/05$). از طرف دیگر، تجویز کورکومین تا حدودی توانست از کاهش سطح گلو تاتیون در این بافت ممانعت کند، اما این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبودند.

اثر کورکومین بر میزان پروتئین کربونیل در بافت مغز موش صحرایی

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

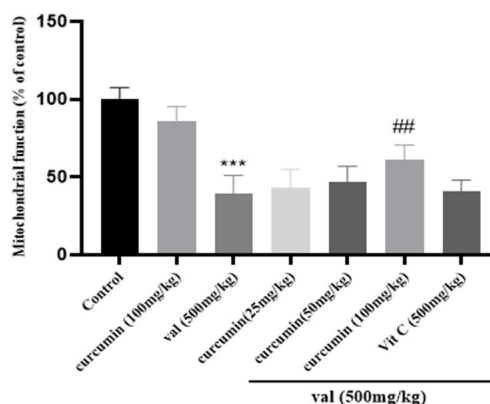
اثر کورکومین بر میزان فعالیت میتوکندری

بر طبق نتایج نمودار شماره 4، میزان عملکرد میتوکندری 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 میتوکندری 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 5: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین

بر پتانسیل غشای میتوکندری 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)



نمودار شماره 4: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین

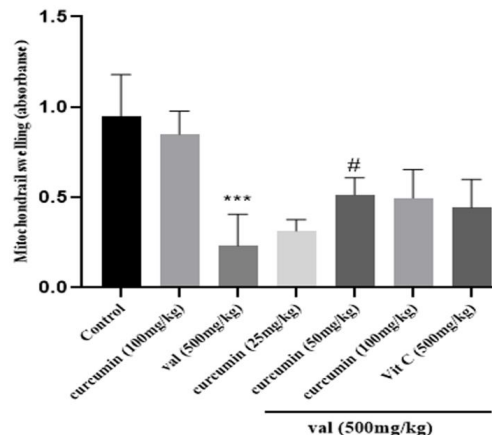
بر میزان عملکرد میتوکندری مغز موش صحرایی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. ***: اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/001$). #: اختلاف معنادار با گروه سدیم والپروات ($P < 0/01$). val: سدیم والپروات، vit C: ویتامین C (کنترل مثبت)

اثر کورکومین بر میزان پتانسیل غشای میتوکندری

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

اثر کورکومین بر تورم میتوکندری

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



نمودار شماره 6: اثرات سدیم والپروات و غلظت‌های مختلف کورکومین بر تورم میتوکندری مغز موش صحرایی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. ***: اختلاف معنی‌دار 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 آسیب‌های اکسیداتیو و اختلال میتوکندریایی ناشی از والپروات سدیم در بافت مغز مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های مطالعه ما نشان داد والپروات سدیم می‌تواند سبب القای استرس اکسیداتیو و اختلال میتوکندریایی در بافت مغز موش صحرایی شود که آسیب پاتولوژی مشاهده شده، تاییدکننده ارتباط بین استرس اکسیداتیو و آسیب مغزی می‌باشد. از سوی دیگر کورکومین، باعث سرکوب آسیب‌های اکسیداتیو و اختلال میتوکندریایی ناشی از والپروات سدیم در این بافت گردید. والپروات سدیم دارویی است که در درمان انواع تشنج‌ها، سردردهای میگرنی، بیماران دو قطبی و بیش‌فعالی کودکان مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق مطالعات، اثرات نوروپروتکتیو والپروات سدیم در بیماری‌های حاد سیستم عصبی ثابت شده است (23، 24). با این وجود از والپروات سدیم تداخلات دارویی و سمیت‌های متعددی مانند اثر تراوتونی، آسیب کبدی، هیپوآمونمی و آتروفی مغزی برگشت‌پذیر گزارش شده است (25). استرس اکسیداتیو

و اختلال عملکرد میتوکندری از مهم‌ترین مکانیسم‌های دخیل در آسیب کبدی ناشی از والپروات سدیم است (26). رادیکال‌های آزاد با اکسیداسیون لیپیدهای غشا منجر به تولید MDA می‌شود (27). بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و میتوکندری فراوان و سطوح آنتی‌اکسیدانی پایین، در برابر حمله رادیکال‌های آزاد بسیار آسیب‌پذیر است (28). براساس گزارش بسیاری از مطالعات تغییر پارامترهای استرس اکسیداتیو و سطوح آنتی‌اکسیدانی در بیماران مصرف‌کننده والپروات سدیم مشاهده شده است. حامد و همکاران نشان دادند که سطح MDA و گلوپاتین پراکسیداز (GSH-Px) در بیماران دریافت‌کننده 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 می‌تواند استرس اکسیداتیو را در کودکان دارای اضافه وزن ایجاد کند (30). خواص اکسیدانی والپروات سدیم می‌تواند باعث به هم زدن تعادل آنتی‌اکسیدانی شود و آسیب بافتی ایجاد کند (5). در مطالعات حیوانی، والپروات سدیم با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و تغییر ساختار سلولی، تخریب بافت کبد را تسریع می‌بخشد (31). در مطالعه‌ای که در سال 2021 توسط رضوان امیدپور و همکاران بر روی 48 موش صحرایی انجام شد، مشخص شد میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه‌های دریافت‌کننده والپرویک اسید افزایش یافته که نشان‌دهنده تخریب غشای سلولی کبد موش‌ها در اثر مصرف دارو است. با توجه به بعضی از مطالعات حیوانی و انسانی، والپروات سدیم یک داروی سمی با نارسایی‌های کبدی برگشت‌پذیر و غیرقابل برگشت از طریق القا یا افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو است (32). با توجه به تحقیق Noha و همکاران، بررسی هیستوپاتولوژیک موش‌های تحت درمان با والپروات سدیم تغییراتی را در بافت طبیعی کبد، انحطاط سلول‌های کبدی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی نشان داد. طبق این مطالعه استرس

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. هم چنین 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 کبدی 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 نفروپاتیک 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 در گیر بوده‌اند، در مطالعات متعددی آورده شده است. اثرات محافظتی کورکومین در برابر سمیت میتوکندری ناشی از سایر مواد سمی در مطالعات قبلی ثابت شده است. براساس مطالعه‌ی Sabet و همکاران، کورکومین با مهار گونه‌های آزاد اکسیژن در میتوکندری، باعث مهار از بین رفتن پتانسیل غشا و تورم میتوکندری شده و با تثبیت غشا از غشای سلول در برابر لیپید پراکسیداسیون محافظت می‌کند و در میتوکندری 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 الکترولیت 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 رت 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 Neuroparmacol* 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, Bacsikai 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-Chaverri 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, Khayatzaheh 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, Tunalı 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. Pizzomo J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)* 2014; 13(1): 8-12.