

Zinc and Selenium Protects against Sodium Valproate Induced Nephrotoxicity through Modulation of Oxidative Stress

Maloos Naderi¹,
Nematoollah Ahangar²,
Fatemeh Shaki³

¹ MSc Student in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 23, 2016 ; Accepted September 14, 2016)

Abstract

Background and purpose: Valproic acid (VPA) is used worldwide as a major drug in the intervention of epilepsy and in control of several kinds of seizures. The aim of our investigation was to evaluate the nephrotoxic potential of VPA and protective effects of zinc and selenium against VPA-induced nephrotoxicity in Wistar rats.

Materials and methods: In this study, the animals were divided into five groups: control, VPA (200 mg/kg IP), VPA + Zn (10 mg/kg IP), VPA + Se (1 mg/kg IP), and VPA + Zn + Se. After the administration of VPA for 4 consecutive weeks, the animals were killed and kidney tissues were separated. Finally, oxidative stress markers including glutathione (GSH) content, lipid peroxidation (LPO), protein carbonyl (PCO) were measured and blood was taken for measuring biochemical markers (BUN and Cr).

Results: The administration of VPA for 4 consecutive weeks resulted in an increase in kidney marker (BUN and Cr). Also, oxidative stress was evident in VPA group by increased lipid peroxidation (LPO), protein carbonyl (PCO) and glutathione (GSH) oxidation. Zn and Se administration was able to protect against deterioration in kidney markers and suppressed the increase in oxidative stress markers.

Conclusion: Our study showed the critical role of oxidative damage in Valproate-induced nephrotoxicity that markedly inhibited by administration of Zn and Se. Therefore, Zn and Se supplementation could be suggested for prevention of valproate-induced nephrotoxicity.

Keywords: valproic acid, kidney, toxicity, oxidative stress, selenium, zinc

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 111-122 (Persian).

اثر حفاظتی روی و سلنیوم در جلوگیری از سمیت کلیوی ناشی از سدیم والپروات با مکانیسم مهار استرس اکسیداتیو

ملوس نادری^۱نعمت الله آهنگر^۲فاطمه شکی^۳

چکیده

سابقه و هدف: سدیم والپروات یک داروی پر مصرف و مهم در درمان صرع و کنترل انواع خاصی از تشنج ها است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر حفاظتی روی و سلنیوم در سمیت کلیوی ناشی از سدیم والپروات در رت های ویستار می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه رت ها به پنج گروه کنترل، سدیم والپروات (۲۰۰mg/kg IP)، سدیم والپروات + روی ۱۰mg/kg IP، سدیم والپروات + سلنیوم ۱mg/kg IP، سدیم والپروات + روی + سلنیوم تقسیم شدند. در پایان بعد از دریافت والپروات ۴ هفته متوالی، حیوانات کشته شده و بافت کلیه جدا شد و پارامترهای استرس اکسیداتیو شامل اندازه گیری محتوای گلو تاتیون، پراکسیداسیون لیپید پروتئین کربونیل و خون جهت پارامترهای بیوشیمیایی (اوره و کراتینین) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: دریافت سدیم والپروات برای ۴ هفته متوالی منجر به افزایش مارکرهای کلیوی اوره و کراتینین شد. هم چنین استرس اکسیداتیو در گروه والپروات با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، پروتئین کربونیل و اکسیداسیون گلو تاتیون مشهود است. دریافت روی و سلنیوم قادر به حفاظت علیه بدتر شدن در مارکرهای کلیوی و مهار افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو شد.

استنتاج: مطالعه ما نشان داد که تخریب اکسیداتیو نقش حیاتی در سمیت کلیوی ناشی از والپروات دارد. که به طور چشمگیری با دریافت روی و سلنیوم مهار می شود. بنابراین مکمل های روی و سلنیوم می تواند برای حفاظت از سمیت کلیوی ناشی از والپروات پیشنهاد شود.

واژه های کلیدی: سدیم والپروات، کلیه، سمیت، استرس اکسیداتیو، سلنیوم، روی

مقدمه

صرع یک اختلال عصبی سیستم عصبی مرکزی است که در آن فعالیت سلول های عصبی در مغز مختل می شود. صرع یک مشکل عمده سلامت عمومی است که نزدیک به ۵۰ میلیون نفر (۱-۲ درصد جمعیت جهان) را در سراسر جهان در تمام سنین تحت تاثیر قرار داده است و آن را به عنوان چهارمین اختلال عصبی شایع در نظر گرفته است (۲،۱). والپروئیک اسید (VPA) یک داروی ضد صرع پرمصرف است که در درمان انواع خاصی از تشنج ها مورد استفاده قرار می گیرد (۳). مکانیسم عمل آن شامل افزایش سطح نوروترانسمیترهای

E-mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

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

۳. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۴

گابائترژیک و گلوتامینرژیک است (۴). والپروئیک اسید در مراقبت‌های روان پزشکی و درمان بیماران مانیک و دو قطبی به تنهایی یا به شکل ترکیبی با دیگر عوامل آنتی سایکوز، در بیش فعالی کودکان و همچنین در درمان سرردهای میگرنی استفاده می‌شود (۱۰-۳). اخیراً این دارو به تنهایی یا به صورت ترکیبی با دیگر داروهای آنتی‌تومور در شروع درمان سرطان استفاده می‌شود (۱۱). هم‌چنین پتانسیل حفاظت نورونی آن در بیماران آلزایمری مشاهده شده است (۱۲). سدیم والپروات دارای عوارض جانبی مختلفی است که در طی آزمایش‌های کلینیکی گزارش شده است.

از اثرات جانبی سدیم والپروات می‌توان به بروز سمیت کلیوی اشاره نمود که به شکل کاهش مقاومت و استحکام عضلات پروگزیمال و اختلال توبول‌های کلیوی نمایان می‌گردد (۱۳). مونوتراپی طولانی مدت یا پلی‌تراپی با داروهای ضد تشنج باعث تشکیل متابولیت‌های سمی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده (ROS) که به دنبال آن اثرات سمیت کلیوی را از خود نشان می‌دهند (۱۴). در مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نقش استرس اکسیداتیو در سمیت کلیوی ناشی از سدیم والپروات به اثبات رسیده است و مکانیسم سمیت سدیم والپروات بر سلول‌ها و بافت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۱۵). نتایج نشان داد که سمیت سلولی سدیم والپروات با سوراخ شدن غشای لیزوزومی، افزایش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش پتانسیل غشایی میتوکندری ارتباط دارد (۱۶). بنابراین افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در مکانیسم سمیت سدیم والپروات نقش به سزایی دارند که در نتیجه آن افزایش تولید این مواد باعث کاهش چشمگیر دفاع آنتی اکسیدانی بدن به ویژه گلوکاتایون (GSH) و ایجاد پدیده استرس اکسیداتیو در سلول‌های مختلف می‌شود (۱۷).

روی (Zn) و سلیوم (Sn) از عناصر ضروری بدن می‌باشند و در ساختار و عملکرد بیش از ۳۰۰ آنزیم در

بدن شرکت دارند (۱۸). این عناصر در طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی چون تکثیر سلولی و حفظ عملکردهای فیزیولوژی بدن دخالت دارد. هم‌چنین می‌توان به نقش آن به عنوان کوفاکتور رشد، تنظیم‌کننده مهم ایمنی، محافظت‌کننده سلولی (آنتی اکسیدانت)، آنتی آپوپتوز و خواص ضد التهابی آن اشاره کرد (۱۹). رژیم حاوی روی اثر قدرتمندی در کاهش صدمه ناشی از عواملی که باعث تحریک تخریب اکسیداتیو از طریق تشکیل رادیکال فعال می‌شوند دارد (۲۰). روی در آزمایش‌های مختلف به عنوان یک عنصر محافظ استفاده شده و بیوسنتز متالوتونین (MT) که یک پروتئین غنی از گروه‌های تیول با وزن مولکولی پایین است و با مهار روند پراکسیداسیون لیپیدی، روند تثبیت غشای سلولی را تحریک می‌کند و با اتصال به سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ایفای نقش کوفاکتوری، استحکام ساختاری سلول را تامین می‌کند (۲۳-۲۱). سلیوم جزء جدایی ناپذیر سایت کاتالیزوری آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز است و عملکرد آن از طریق شرکت در تشکیل سلنوپروتئین‌ها تشخیص داده شده است (۲۴، ۲۵). سلنوپروتئین پی، یک پروتئین مهم حاوی سلیوم در پلاسما است که هم اعمال انتقالی و هم آنتی اکسیدانی دارد (۲۲). سلنوآنزیم‌هایی چون گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) نیز در قدم دوم مسیر آنتی اکسیدانی خود تبدیل H_2O_2 به H_2O را کاتالیز می‌کند (۲۳). از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای اثر سدیم والپروات بر میزان روی سرم و نقش محافظتی مکمل‌های روی و سلیوم را در جلوگیری از سمیت کلیوی سدیم والپروات از طریق کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو نشان دهد انجام نشده است. لذا در این مطالعه برای اولین بار به بررسی نقش محافظتی روی و سلیوم و اثر ترکیبی آن‌ها در جلوگیری از سمیت کلیوی سدیم والپروات پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

سدیم والپروات، سدیم سلنیت، سولفات روی از

شرکت مرک آلمان، ۲،۴-دی نیترو فیل تریس، تری کلرواستیک اسید، تیوبایتوریک اسید، بوتانل و سایر مواد شیمیایی از شرکت های استاندارد خریداری شدند. در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، از رت های نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 220 گرم که در ۵ گروه در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و غذا در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند، استفاده شد.

حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند. گروه اول کنترل، آب مقطر (حلال دارو)، گروه دوم تک دوز سدیم والپروات 200mg/kg، گروه سوم تک دوز 200mg/kg سدیم والپروات + 10mg/kg روی، گروه چهارم تک دوز 200mg/kg سدیم والپروات + 1mg/kg سلنیوم و گروه پنجم 200mg/kg سدیم والپروات + 10mg/kg روی + 1mg/kg سلنیوم به صورت داخل صفاقی به مدت چهار هفته دریافت نمودند. تمامی دوزها بر اساس مطالعات قبلی تعیین شدند (۲۶-۲۹). ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، حیوانات کشته شده و کلیه آن ها جهت بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو پروتئین کربونیل (PCO)، مالون دی آلدئید (MDA) و گلوتاتیون (GSH) خارج شد. هم چنین ۲ سی سی خون از قلب حیوانات جهت اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی (اوره-کراتینین) گرفته شد.

اندازه گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو

نرمالیز کردن داده ها

تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام می شود. برای هر کدام از شاخص های مورد نظر می توان میزان فعالیت را بر حسب پروتئین بافتی نرمالایز کرد.

اندازه گیری پراکسید/سیون لیپیدی

بر اساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه گیری می شود. بدین ترتیب که به ۰/۲ ml از سوسپانسیون بافتی ۰/۱ ml از معرف TBA شامل ۵HCl، ۱۵٪ TCA،

و ۳TBA ۰/۳ درصد اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می گردد و بعد از سرد شدن به آن ۰/۲ ml -n بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده و سپس در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده لایه -n بوتانل برای سنجش در طول موج ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار TBARS از روی منحنی استاندارد محاسبه می گردد (۳۰).

تعیین میزان پروتئین کربونیل

میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف ۲/۴-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) اندازه گیری می شود. بعد از تعیین پروتئین بافت، ۵۰۰ μl از تری کلرواستیک اسید (20% w/v) به ۲۵۰ μg از نمونه اضافه شده و در 4°C به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری می کنیم. سپس پروتئین های رسوب داده شده با دور 6500×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته می شود.

رسوب زیرین کاملاً در ۵۰۰ μl از 0.1M NaOH پراکنده شده و ۱۰ μl از 10mM DNPH حل شده در 2 M HCl به نمونه ها اضافه می شود. هم چنین یک بلانک که با اضافه کردن ۵۰۰ μl از 2 M HCl بدون DNPH به نمونه پروتئین تهیه می شود. سپس نمونه ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شده، و سپس ۵۰۰ μl از تری کلرواستیک اسید (20%w/v) اضافه می شود. رسوب پروتئینی با سانتریفوژ در 6500×g به مدت ۱۰ دقیقه جمع آوری شده و سوپرناتانت دور ریخته می شود. رسوب زیرین با ۱ میلی لیتر از مخلوط 1:1 (v/v) اتانول و اتیل استات ترکیب شده و مجدداً در 6500×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده تا محلول رویی برداشته شود. رسوب پروتئین نهایی در ۲۰۰ μl از محلول گوانین هیدروکلراید 6M پراکنده می شود. میزان پروتئین کربونیل با خواندن جذب در 365nm با ضریب جذب $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ارزیابی می شود که به صورت nmol of DNPH per milligram of protein

بیان می‌شود (۳۱). نویسندگان این عبارت را ترجمه کند: مانند میلی گرم از پروتئین به ازای هر نانومول از DNPH

اندازه گیری گلوکوتائون

یک میلی لیتر از هموژن بافتی را برداشته و به آن ۰٫۲۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت ۲۰ دقیقه در $1000 \times g$ سانتریفیوژ می‌کنیم. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰٫۳/۰ مولار و ۰٫۵ میلی لیتر ۰٫۴٪ DTNB اضافه کرده و ورتکس می‌کنیم و ۱۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم تا واکنش کامل شود سپس میزان جذب را در طول موج ۴۱۲ نانومتر می‌خوانیم. غلظت گلوکوتائون را از روی منحنی استاندارد گلوکوتائون برحسب $nmol/ml$ به دست می‌آوریم (۳۲).

اندازه گیری سطح روی سرم

جهت تعیین غلظت روی در نمونه‌های سرمی ابتدا محلول‌های استاندارد روی ساخته شد. ۴ محلول استاندارد روی با غلظت‌های ۰٫۱، ۰٫۲۵، ۰٫۵ و ۱ ppm ساخته شد. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از فریزر و باز شدن یخ آن‌ها از هر نمونه سرمی ۱ میلی لیتر برای سنجش فلز روی جدا شد. سرم‌ها در بالن ژوژه‌های ۵ میلی لیتری ریخته شد. سپس برای اندازه گیری فلز روی از محلول گلیسرول ۵ درصد برای به حجم رساندن بالن ژوژه‌ها استفاده شد غلظت محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها با دستگاه جذب اتمی شعله‌ای (Flame Atomic Absorption Spectrophotometry) مدل Perkin Elmer Analyst100 در طول موج ۲۱۳٫۹ نانومتر برای روی خوانده شد (۳۳).

اندازه گیری سطح اوره و کراتینین سرم

روش سنجش کراتینین بر اساس رنگ سنجی بدون حذف پروتئین‌ها به روش Jaffe (۳۴) و سنجش اوره بر اساس اوره از می باشد (۳۵).

آنالیز آماری

نتایج برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده و همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مدل ۱۷ انجام شد. تست‌های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey استفاده شد و حد معنی‌داری $p < 0/05$ تعریف شده است.

یافته ها

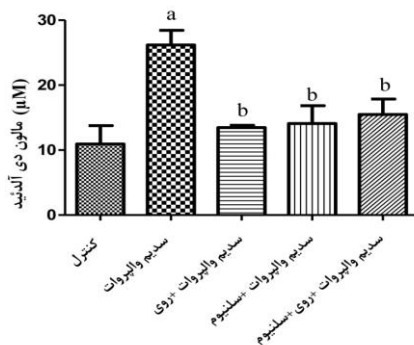
همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، به منظور ارزیابی اثر سدیم والپروات بر عملکرد کلیه، میزان اوره (BUN) و کراتینین (Cr) در سرم رت‌های تحت درمان اندازه گیری شد که افزایش قابل توجه در این مارکرها تایید کننده بروز آسیب کلیوی ناشی از سدیم والپروات بود. از طرفی تجویز روی و سلیوم به‌طور معنی‌داری از افزایش بیومارکرها عملکرد کلیه جلوگیری کرد و علاوه بر آن تجویز هم زمان روی و سلیوم اثر بهتری را نسبت به تجویز هر کدام به تنهایی نشان داد.

جدول شماره ۱: اثر روی و سلیوم بر مارکهای کلیوی

اوره (mg/dl)	کراتینین (mg/dl)	
21.5 ± 1.5	0.57 ± 0.05	کنترل
32.8 ± 2.2	0.75 ± 0.06	سدیم والپروات
21.8 ± 1	0.5 ± 0.03	سدیم والپروات+روی
26 ± 3.6	0.5 ± 0.06	سدیم والپروات+سلیوم
21.3 ± 1	0.6 ± 0.02	سدیم والپروات+روی+سلیوم

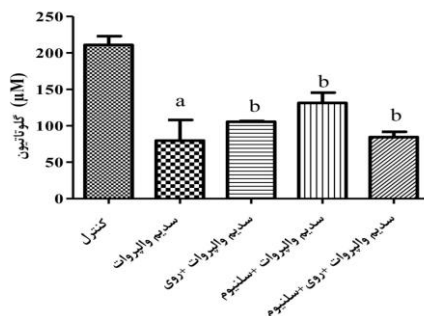
نتایج به صورت $mean \pm SD$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. a: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0/05$), b: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سدیم والپروات ($p < 0/05$).

سطح روی در سرم رت‌های تحت مواجهه با سدیم والپروات کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است (جدول شماره ۲). میزان پروتئین کربونیل، در بافت کلیه رت در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان پروتئین کربونیل، در گروه دریافت کننده سدیم والپروات تنها مشاهده شد که در گروه دریافت



نمودار شماره ۲: اثر روی و سلیوم بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از والپروات در بافت کلیه

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. a: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($p < 0.05$). b: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه والپروات است ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۳: اثر روی و سلیوم بر اکسیداسیون گلوکاتایون ناشی از والپروات در بافت کلیه

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. a: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($p < 0.05$). b: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه والپروات است ($p < 0.05$).

بحث

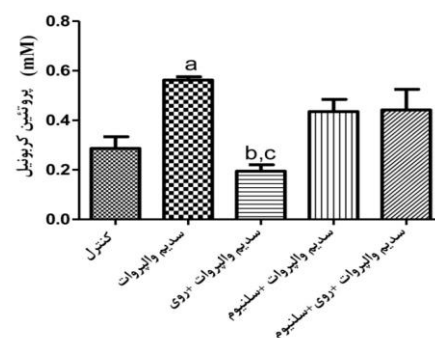
سدیم والپروات یک داروی ضد صرع شایع می باشد که از سال ۱۹۷۸ در آمریکا برای درمان صرع به کار گرفته شده است (۳۶). اختلال توپول های کلیوی در بیماران صرعی در طی درمان با سدیم والپروات گزارش شده است. در یک مطالعه روی یک کودک ۱۲ ساله مبتلا به صرع کوچک که تحت درمان با سدیم والپروات بود هاپیر آمینواسید اوری، گلوکوزوری، پروتئینوری و فسفات اسیدوزیس گزارش شد که اشاره به اثرات سمیت کلیوی مستقیم سدیم والپروات دارد (۳۷). در این مطالعه نیز اندازه گیری میزان اوره و

کننده روی و سلیوم، کاهش معنادار در میزان پروتئین کربونیل نسبت به گروه سدیم والپروات تنها مشاهده شد. هم چنین تجویز روی به تنهایی اثر بهتری را در کاهش پروتئین کربونیل ناشی از سدیم والپروات نسبت به تجویز همزمان روی و سلیوم از خود نشان داد.

جدول شماره ۲: اثر سدیم والپروات بر روی سطح سرمی روی

رومی (μg/dl)	
۱۶/۶ ± ۰/۴	کنترل
۱۰/۶ ± ۰/۴ ^a	سدیم والپروات
۳۳/۸ ± ۸/۷ ^b	سدیم والپروات + روی

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. a: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($p < 0.05$). b: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه سدیم والپروات است ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۱: اثر روی و سلیوم پروتئین کربونیل ناشی از والپروات در بافت کلیه

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. a: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($p < 0.05$). b: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه والپروات است ($p < 0.05$). c: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه روی و سلیوم است ($p < 0.05$).

بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کمترین سطح گلوکاتایون در گروه دریافت کننده سدیم والپروات تنها مشاهده شد. در گروه دریافت کننده روی و سلیوم، کاهش معنی دار در میزان پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش میزان گلوکاتایون احیا نسبت به گروه سدیم والپروات تنها مشاهده شد. هم چنین تجویز هم زمان روی و سلیوم اثر بهتری را در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از سدیم والپروات نسبت به تجویز هر کدام به تنهایی نشان داد (نمودارهای شماره ۲ و ۳).

کراتینین سرم نشان دهنده افزایش میزان آسیب کلیوی ناشی از سدیم والپروات نسبت به گروه کنترل بود که تاییدکننده بروز سمیت کلیوی در مصرف والپروات است. اندازه گیری اوره رایج ترین آزمایش در بررسی عملکرد کلیه ها می باشد. اوره آخرین محصول ایجاد شده از متابولیسم اسیدهای آمینه و کاهش پروتئین ها است و افزایش مقدار کراتینین در پلاسما گویای کاهش تصفیه ی گلومرولی و اختلال در عملکرد کلیه است (۳۵-۳۷). هم چنین مطالعات مختلف نقش استرس اکسیداتیو را در سمیت کلیوی ناشی از سدیم والپروات به اثبات رسانده اند (۱۵). پراکسیداسیون لیپیدی یکی از پیامدهای افزایش تشکیل ROS می باشد (۴۰-۳۸). در واقع استرس اکسیداتیو می تواند منجر به آسیب به مولکول های بزرگ سلولی مثل پروتئین، لیپیدها باعث اختلال در غشای سلول و پاره شدن سلول و یا از طریق آسیب به DNA باعث شروع مرگ سلولی و در نهایت آسیب بافتی شود (۴۱). بنابراین با مهار استرس اکسیداتیو می توان جلوی مرگ سلول و نهایتاً آسیب بافتی را گرفت. روی و سلنیوم از عناصر ضروری در بسیاری از سیستم های بیولوژیکی می باشند و نقش آن ها به عنوان آنتی اکسیدانت های مهم سلولی تثبیت شده است (۴۲). در مطالعه ای نشان داده شده است که کمبود روی منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن در رت می شود (۲۰). در مطالعه ای اثر روی بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از کلرید جیوه در کلیه رت مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که روی باعث افزایش فعالیت آنزیم های حفاظتی و گلوکوتاتیون که خود باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدی است می شود (۵۷). محققان زیادی اثر حفاظتی روی را در سمیت کبدی استامینوفن - بروموبنزن و تراکلرید کربن مشاهده کردند (۲۱). مطالعات قبلی نشان داد که سدیم والپروات به شکل محکمی به البومین در پلاسما باند می شود و ممکن است جایگزین روی از پروتئین حامل آن در پلاسما شود و در نتیجه به کاهش سطح پلاسمایی روی منجر شود (۳۶، ۴۳).

سدیم والپروات همچنین باعث کاهش سطح سلنیوم بدن می شود و با توجه به این که سدیم والپروات منجر به کاهش گلوکوتاتیون می شود و سلنیوم نیز از اجزای گلوکوتاتیون پراکسیداز می باشد، بنابراین می توان گفت که کاهش سطح سلنیوم با کاهش فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز که یک آنزیم آنتی اکسیدانی است همراه است و این امر در سمیت سدیم والپروات دخیل است (۴۴). چندین شواهد از این مفهوم حمایت می کند که روی باعث مهار تخریب اکسیداتیو مولکول ها - ارگان ها و سلول ها در خارج بدن می شود و تزریق دوز بالای روی در موش ها باعث مهار صدمه ناشی از تراکلرید کربن، اندوتوکسین و اشعه می شود (۴۵). هم چنین میکروزوم های رت نسبت به فقر روی تجمع رادیکال ها و افزایش سطح پراکسیداسیون را نشان دادند (۴۶، ۴۷) و کمبود روی در رت ها سطوح پایین متالوتیونین که یک پروتئین با اعمال آنتی اکسیدانی است را نشان می دهد (۵۰-۴۸). اثر روی نیز در بالا رفتن سطح گلوکوتاتیون نیز گزارش شده است. پیش از این نشان داده شده است که روی و سلنیوم به شکل موثری از اختلال کبد و تیروئید ناشی از کادمیوم محافظت می کنند (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داده که اثر ترکیبی روی و سلنیوم در خنثی کردن استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم در کلیه بسیار قدرتمندتر از مصرف هر یک به تنهایی است (۵۱). در رت هایی که در معرض همزمان روی و سلنیوم در مواجهه با کادمیوم قرار گرفته بودند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX) به طور چشمگیری بیش تر از رت های در معرض کادمیوم بود (۲۰). یکی از اثرات تولید رادیکال های آزاد در یک محیط بیولوژیک مثل سلول، حمله به اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ساختمان غشا سلولی است که به عنوان پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده که به صورت زنجیروار باعث افزایش میزان رادیکال های آزاد شده و می تواند باعث پارگی غشای سلول، بروز نکروز و در نهایت فیبروز بافتی شود (۵۲). نتایج حاصل از این مطالعه افزایش پراکسیداسیون

درمان ترکیبی مکمل‌های روی و سلنیوم نقش موثر و مهمی را در حفاظت کلیوی، عصبی و کبدی ناشی از متیل جیوه ایفا می‌کند (۵۶).

هم‌چنین مقایسه اثرات محافظتی گروه‌های درمانی نشان داد که تجویز هم زمان روی و سلنیوم در اکثر پارامترهای ارزیابی شده اثر بهتری در کاهش سمیت ناشی از سدیم والپروات داشته است. از طرفی کاهش فاکتورهای سرمی آسیب کلیوی ناشی از تماس با سدیم والپروات پس از تجویز داروهای محافظ هم راستا با کاهش سطح استرس اکسیداتیو در بافت کلیه بوده است که نشان دهنده نقش بهبود وضعیت آنتی‌اکسیداتی بدن توسط این ترکیبات و کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از والپروات است.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج مطالعه ما آسیب اکسیداتیو به بافت کلیه را در رت‌های دریافت‌کننده سدیم والپروات تأیید کرد. هم‌چنین داده‌های ما به خوبی اثربخشی روی و سلنیوم به خصوص در تجویز هم زمان را در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از سدیم والپروات در بافت کلیه رت نشان داد. بنابراین در مطالعه صورت گرفته مشخص شد که درمان ترکیبی با مکمل‌های روی و سلنیوم در استرس اکسیداتیو ناشی از سدیم والپروات در کلیه می‌تواند به عنوان یک راه کار در کاهش عوارض ناشی از مصرف سدیم والپروات پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه خانم ملوس نادری دانشجوی کارشناسی ارشد سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بودجه این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شد.

لپیدی را در کلیه رت‌های تحت مواجهه با والپروات نشان داد. مالون‌دی‌آلدئید مارکر آسیب اکسیداتیو به لپیدها بوده که در گروه والپروات افزایش معنی‌داری در مطالعه حاضر داشت و در گروه‌های تحت درمان با روی و سلنیوم کاهش این مارکر مشاهده گردید ($p < 0.05$). پروتئین کربونیل بیومارکر ایده آلی در بررسی اکسیداسیون شدید پروتئین‌هاست (۵۳). مطالعه حاضر نیز همسو با مطالعات قبلی و نشان دهنده افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$). محتوای پروتئین کربونیل در گروه سدیم والپروات بود که پس از تحت درمان قرار گرفتن با روی و سلنیوم به میزان چشم‌گیری مقدار این فاکتور کاهش یافت. در مطالعه پیشین هم کوئرستین (Quercetin) که یک فلاونوئید یا رنگدانه گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی است که باعث کاهش سطوح مارکرهای استرس اکسیداتیو چون پروتئین کربونیل و مالون‌آلدئید ناشی از سدیم والپروات در بافت کلیه داشت (۱۵).

گلو‌تاتیون یکی از مهم‌ترین دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد که نقش مهمی را در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن در سلول را به عهده دارد و سدیم والپروات به‌طور معنی‌داری میزان گلو‌تاتیون را کاهش داد ($p < 0.05$) و تجویز روی و سلنیوم به‌طور معنی‌دای سطح آن را به‌طور اولیه احیا نمود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که مکمل‌های سلنیوم باعث مهار استرس اکسیداتیو از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لپیدی و کاهش صدمات کلیوی در رت‌های تحت مواجهه با جنتامایسین شده است (۵۴). در مطالعه‌ای دیگر استفاده کلینیکی از یون‌های روی در حفاظت از زخم‌های گوارشی ناشی از اتانول مورد مطالعه قرار گرفته است که نقش کمک‌کننده و موثری داشته است (۵۵). در مطالعات دیگری نتایج نشان داد که

References

1. Shaalan S, El-wakkad AS, Saleh H. Protective Effect Of L-Carnitine And Baker

- Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Against Hepatic Toxicity Induced By Valproate As

- Antiepileptic Drug In Rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015; 7(5): 89-95.
2. Kumar V, Sharma SK, Nagarajan K, Dixit PK. Effects of Lycopene and Sodium Valproate on Pentylentetrazol-Induced Kindling in Mice. *Iran J Med Sci* 2016; 41(5): 430-436 (Persian).
 3. Emekli-Alturfan E, Alev B, Tunali S, Oktay S, Tunali-Akbay T, Ozturk LK, et al. Effects of edaravone on cardiac damage in valproic acid induced toxicity. *Ann Clin Lab Sci* 2015; 45(2): 166-172.
 4. Bialer M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? *Epilepsia* 2012; 53(sup7): 26-33.
 5. Vasudev K, Mead A, Macritchie K, Young AH. Valproate in acute mania: is our practice evidence based? *Int J Health Care Qual Assur* 2012; 25(1): 41-52.
 6. Soares-Weiser K, Vergel YB, Beynon S, Dunn G, Barbieri M, Duffy S, et al. A systematic review and economic model of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of interventions for preventing relapse in people with bipolar disorder. *Health Technol Assess* 2007; 11(39): iii-iv.
 7. Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(5): 539-551.
 8. Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clinical Biochem* 2013; 46(15): 1323-1338.
 9. Johannessen S, Johannessen Landmark C. Antiepileptic drug interactions-principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8(3): 254-267.
 10. Silberstein D. Valproic acid: clinical efficacy and use in other neurological disorders. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Antiepileptic Drugs. 5th ed. Philadelphia: LWW; 2002. p. 818-827.
 11. Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 2010; 3(1): 1-13.
 12. Zhang XZ, Li XJ, Zhang HY. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2010; 81(1): 3-6.
 13. Altunbas S, Yıldız D, Anarat A, Burgut HR. Renal tubular dysfunction in epileptic children on valproic acid therapy. *Pediatr Nephrol* 2001; 16(3): 256-259.
 14. Galaly SR, Abdella EM, Mohammed HM. Effects of royal jelly on genotoxicity and nephrotoxicity induced by valproic acid in albino mice. *Beni-Seuf Univ J Applsci* 2014; 3(1): 1-15.
 15. Chaudhary S, Ganjoo P, Raiusddin S, Parvez S. Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid. *Protoplasma* 2015; 252(1): 209-217.
 16. 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. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(4): 545-551.
 17. Kiang TK, Teng XW, Surendraddoss J, Karagiozov S, Abbott FS, Chang TK. Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(3): 318-324.
 18. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993; 73(1): 79-118.

19. Malhotra A, Dhawan D. Current view of zinc as a hepatoprotective agent in conditions of chlorpyrifos induced toxicity. *Pestic Biochem Physiol* 2014; 112: 1-6.
20. DiSilvestro RA, Carlson GP. Effects of mild zinc deficiency, plus or minus acute phase response, on CCl₄ hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(1): 57-61.
21. Szymańska JA, Świątlicka EA, Piotrowski JK. Protective effect of zinc in the hepatotoxicity of bromobenzene and acetaminophen. *Toxicology* 1991; 66(1): 81-91.
22. Asare GA, Osae S, Nortey ENN, Yambire FK, Amedonu E, Doku D, et al. Evaluation of serum metallothionein-1, selenium, zinc, and copper in Ghanaian type 2 diabetes mellitus patients. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2013; 33(2): 86-95.
23. Jihen el H, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(5): 1559-1564.
24. Galażyn-Sidorczyk M, Brzóska MM, Rogalska J, Roszczenko A, Jurczuk M. Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol* 2012; 26(1): 46-52.
25. El-Boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 29: 104-110.
26. Abdel-Dayem MA, Elmarakby AA, Abdel-Aziz AA, Pye C, Said SA, El-Mowafy AM. Valproate-induced liver injury: modulation by the omega-3 fatty acid DHA proposes a novel anticonvulsant regimen. *Drugs RD* 2014; 14(2): 85-94.
27. Ogle CW, Cho CH. Protection by zinc sulphate against reserpine-induced ulceration and other gastric effects in the rat. *Pharmacology* 1978; 17(5): 254-261.
28. Baldew GS, van den Hamer CJ, Los G, Vermeulen NP, de Goeij JJ, McVie JG. Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res* 1989; 49(11): 3020-3023.
29. Karavelioglu E, Boyaci MG, Simsek N, Sonmez MA, Koc R, Karademir M, et al. Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity. *Acta Cir Bras* 2015; 30(6): 394-400.
30. Shaki F, Hosseini M-J, Shahraki J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated liver mitochondria: a revised mechanistic vision for justification of clinical complication of depleted uranium (DU) on liver. *Toxicol Environ Chem* 2013; 95(7): 1221-1234.
31. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6(9): 2675-2683.
32. Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Lin TH. Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals* 1999; 12(4): 353-359.
33. Salehifar E, Shokrzadeh M, Ghaemian A, Akbari AS. Comparison of copper and zinc levels in the serum of ischemic cardiomyopathy patients with healthy volunteers. *JBUMS* 2008; 10(2): 23-30 (Persian).
34. Foster-Swanson A, Swartzentruber M, Roberts P, Feld R, Johnson M, Wong S. Reference interval studies of the rate-blanked creatinine/

- Jaffe method on BM/Hitachi systems in six US laboratories. *Clin Chem* 1994; 40: 1057.
35. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1995.
 36. Daffron JC, Kasarskis EJ. Effect of valproic acid on zinc metabolism in the rat. *Toxicol Lett* 1984; 23(3): 321-325.
 37. Lenoir GR, Pèrignon J-L, Gubler M-C, Broyer M. Valproic acid: a possible cause of proximal tubular renal syndrome. *J Pediat* 1981; 98(3): 503-504.
 38. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
 39. Buchi KN, Gray PD, Rollins DE, Tolman KG. Protection Against Sodium Valproate Injury in Isolated Hepatocytes by α -Tocopherol and N, N'-Diphenyl-p-phenylenediamine. *J Clin Pharmacol* 1984; 24(4): 148-154.
 40. Jurima-Romet M, Abbott FS, Tang W, Huang HS. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* 1996; 112(1): 69-85.
 41. Shaki F, Pourahmad J. Mitochondrial toxicity of depleted uranium: protection by beta-glucan. *Iran J Pharm Res* 2012; 12(1): 131-140 (Persian).
 42. Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 2003; 133(5): 1448S-1451S.
 43. Gugler R, Mueller G. Plasma protein binding of valproic acid in healthy subjects and in patients with renal disease. *Br J Clin Pharmacol* 1978; 5(5): 441-446.
 44. Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; 34(12): 2181-2191.
 45. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(3): 281-291.
 46. Hammermueller JD, Bray TM, Bettger WJ. Effect of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver. *J Nutr* 1987; 117(5): 894-901.
 47. Sullivan J, Jetton M, Hahn H, Burch R. Enhanced lipid peroxidation in liver microsomes of zinc-deficient rats. *Am J Clin Nutr* 1980; 33(1): 51-56.
 48. Blalock TL, Dunn MA, Cousins RJ. Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J Nutr* 1988; 118: 222-228.
 49. Bettger WJ, O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences* 1981; 28(13): 1425-1438.
 50. Dreosti IE, Partick EJ. Zinc, ethanol, and lipid peroxidation in adult and fetal rats. *Biol Trace Elem Res* 1987; 14(3): 179-191.
 51. Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F, Saïd K, Kerkeni A. Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biol Trace Elem Res* 2009; 130(2): 152-161.
 52. Shokrzadeh M, Shaki F, Mohammadi E, Rezagholizadeh N, Ebrahimi F. Edaravone decreases paraquat toxicity in a549 cells and lung isolated mitochondria. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(2): 675 (Persian).
 53. Sytze van Dam P. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological

- mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18(3): 176-184.
54. Randjelovic P, Veljkovic S, Stojilkovic N, Velickovic L, Sokolovic D, Stoilkovic M, et al. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 2012; 35(2): 141-148.
 55. Rodrigues L, Galle P, Siry P, Vinhaes A. The protective effect of zinc on gastric ulceration caused by ethanol treatment. *Braz J Med Biol Res* 1988; 22(1): 41-50.
 56. Deepmala J, Deepak M, Srivastav S, Sangeeta S, Kumar SA, Kumar SS. Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2013; 27(3): 249-256.
 57. Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73(3): 395-401.