



Original Paper

Effect of Resveratrol on Sodium Valproate-Induced Oxidative Stress in the Hippocampal Tissue of BALB/c Mouse Fetuses

Zakieh Solbi¹ , Gholamhassan Vaezi (Ph.D)^{*2}  , Abbasali Dehpour Juibari (Ph.D)³  
Nahid Masoudian (Ph.D)⁴  , Vida Hojati (Ph.D)⁵  

¹ Ph.D Candidate in Biology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ² Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ³ Assistant Professor, Department of Biology, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran. ⁴ Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ⁵ Associate Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Sodium valproate (SV) is a commonly used antiepileptic drug; however, its therapeutic application is limited due to its potential to induce oxidative stress. Resveratrol, a natural polyphenol, possesses antioxidant properties. This study was conducted to determine the effect of resveratrol on SV-induced oxidative stress in the hippocampal tissue of BALB/c mouse fetal brains.

Methods: In this experimental study, 40 pregnant female BALB/c mice were randomly assigned to 5 groups of 8, including control, SV at 40 mg/kg/bw, SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.6 mg/kg/bw, SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.35 mg/kg bw, and SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.225 mg/kg/bw. SV was administered orally per day, and resveratrol was administered daily via intraperitoneal injection. From gestational day 8 to 18, pharmacological interventions were initiated and continued until the birth of the neonates. On gestational day 18, the maternal mice were anesthetized, and 8 fetuses from each group were separated. Following the anesthesia of the fetuses, the brain tissue was dissected. Subsequently, oxidative stress parameters, including the malondialdehyde (MDA) level in nmol/mg as an index of lipid peroxidation, glutathione (GSH) level alterations in $\mu\text{g}/\text{mg}$, and protein carbonyl (PC) level alterations in nmol/mg, were evaluated in the hippocampal tissue.

Results: SV induced oxidative stress by increasing MDA (4.8 nmol/mg) and PC (51.4 nmol/mg protein), and also decreasing GSH (31.86 $\mu\text{g}/\text{mg}$) in the brain tissue compared to the control group ($P < 0.05$). In a concentration-dependent manner, resveratrol reduced oxidative stress by decreasing MDA and PC to 3.02 and 37.21 nmol/mg, respectively, and also by increasing GSH to 49.76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the brain tissue. The most significant effect was observed at a concentration of 0.6 mg/kg/bw, which was statistically significant compared to the SV group ($P < 0.05$).

Conclusion: The combined administration of SV and resveratrol culminates in a reduction in inflammation and oxidative stress-related factors in mouse fetuses.

Keywords: Epilepsy, Resveratrol, Oxidative Stress, Valproic Acid

*Corresponding Author: Gholamhassan Vaezi (Ph.D), E-mail: vaezi@yahoo.com



Received 28 Jan 2024

Final Revised 25 May 2024

Accepted 25 May 2024

Published Online 16 Apr 2025

Cite this article as: Solbi Z, Vaezi Gh, Dehpour Juibari A, Masoudian N, Hojati V. [Effect of Resveratrol on Sodium Valproate-Induced Oxidative Stress in the Hippocampal Tissue of BALB/c Mouse Fetuses]. J Gorgan Univ Med Sci. 2025; 27(1): 9-16. [Article in Persian]





Introduction

A seizure is defined as a transient alteration in behavior resulting from the synchronous and simultaneous discharge of a population of neurons in the central nervous system. If these seizures recur, the condition is termed epilepsy. Temporal lobe epilepsy is the most prevalent epileptic disorder in humans and typically develops months or even years after the initial neurological disturbances. Epileptogenesis refers to the process by which, during a latent period, a normal brain becomes susceptible to recurrent and chronic seizures. Pharmacotherapy is the most common treatment modality for patients with epilepsy, proving effective in over 70% of cases.

One of the most widely utilized antiepileptic drugs globally is valproate. By employing a combination of diverse neurophysiological and neurochemical mechanisms, valproate exhibits the broadest spectrum of antiepileptic activity in the treatment of both focal and generalized seizures in adults and children. Valproate holds particular significance in the management of complex drug-resistant epilepsies and is generally well-tolerated in a substantial proportion of patients. The adverse and side effects of valproate are typically mild to moderate; however, the primary concerns associated with its use are its teratogenicity and specific hepatotoxicity.

Sodium valproate (SV) and carbamazepine can induce neural tube defects (such as spina bifida), in the fetus, with a higher likelihood associated with SV consumption. Cardiac defects are among the most prevalent major congenital anomalies following exposure to antiepileptic drugs like carbamazepine, lamotrigine, valproic acid (VPA), and phenobarbital.

VPA is a fatty acid exhibiting anticonvulsant properties. Currently, its salt form is employed in humans for the treatment of seizures and bipolar disorders, as well as for migraine prophylaxis. In veterinary medicine, the sole application of this drug is in the management of seizures.

VPA has the potential to induce oxidative stress through the disruption of mitochondrial function and the reduction of endogenous antioxidants. From a clinical standpoint, the monitoring of antioxidant levels and the investigation of protective strategies to manage VPA-induced oxidative stress are crucial.

Resveratrol is a plant-derived polyphenolic compound found in numerous plant species, including berries, peanuts, and grapes. By traversing the blood-brain barrier, it can prevent redox disturbances within the brain. Resveratrol exerts neuroprotective effects by mitigating oxidative stress via the activation of the silent information regulator 1/protein kinase B (SIRT1/Akt) signaling pathway, consequently culminating in the suppression of induced neurotoxicity.

Given that resveratrol is recognized as a drug with minimal adverse effects and significant antioxidant and cell-protective properties, and considering the established perspectives regarding the use of VPA during pregnancy as an anticonvulsant and antipsychotic agent known to induce teratogenic, apoptotic, and oxidative stress effects on the internal organs of the neonate, this study was conducted to determine the effect of resveratrol on SV-induced oxidative stress in the hippocampal tissue of BALB/c mouse fetuses.

Methods

This experimental study was conducted on 40 female BALB/c mice weighing 25-30 g.

Initially, two female mice were housed with one male mouse in cages of 5 and were checked daily for their estrous cycle. Subsequently, the female mice were checked daily for vaginal plugs, and the day a plug was observed was considered day one of pregnancy. Drug interventions commenced on days 8 to 18 of gestation and continued until the neonates were born. The pregnant mice were randomly divided into 5 groups of 8 as follows:

- Control Group: No intervention was performed.
- Experimental Group 1: SV at 40 mg/kg/bw.
- Experimental Group 2: SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.6 mg/kg/bw.
- Experimental Group 3: SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.35 mg/kg/bw.
- Experimental Group 4: SV at 40 mg/kg/bw + resveratrol at 0.225 mg/kg/bw.

SV was administered orally, and resveratrol was injected

intraperitoneally. Pregnant mice were surgically operated under ketamine-xylazine anesthesia on gestational day 18, and 8 fetuses were collected from each group. Subsequently, the fetuses were anesthetized with 0.1 mL of ketamine and dissected. Following dissection, the hippocampus was isolated from the fetal brains.

Glutathione (GSH) was measured using the Ellman's technique. Subsequently, 0.1 g of the dissected tissue was weighed using a balance and transferred to a homogenizer tube. One mL of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was added, and homogenization was carried out several times with a piston until a uniform mixture was obtained. The contents of the homogenizer tube were then transferred to a centrifuge tube, and an additional 0.5 mL of EDTA was added to the homogenizer tube. After vortexing, the contents were also transferred to the centrifuge tube. In the next step, 1.5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to the centrifuge tube to precipitate proteins. This was followed by centrifugation at 3500 rpm for 15 minutes. One mL of the supernatant was then transferred to a test tube, and 2.5 mL of Tris buffer (0.4 M) and 0.5 mL of 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were added to achieve a uniform yellow color in the tube. Finally, the absorbance of the resulting solution was read at 412 nm. By reading the UV absorbance of the solution at this wavelength and comparing it with a standard curve, the GSH concentration was determined and expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Lipid peroxidation was measured based on the thiobarbituric acid (TBA) assay. The amount of malondialdehyde (MDA) was calculated in nmol/mg using a standard curve.

Results

In fetuses, SV caused an increase in lipid peroxidation, elevated MDA levels, reduced GSH levels, increased oxidative stress, and elevated protein carbonyl (PC) levels compared to the control group ($P < 0.05$). In the groups receiving resveratrol, a concentration-dependent trend caused a decrease in MDA, an increase in GSH, and a reduction in PC. The most significant effect was observed at a concentration of 0.6 mg/kg/bw, which was significant compared to the SV group ($P < 0.001$).

Conclusion

Based on the results of this study, VPA increased the levels of MDA and PC compared to the control group, and decreased GSH levels, indicating the induction of oxidative stress. Resveratrol treatment was able to reverse these effects of VPA in a dose-dependent manner. The highest protective effects of resveratrol were observed at doses of 0.6 mg/kg/bw and 0.35 mg/kg/bw. These results suggest that resveratrol treatment significantly reduces lipid peroxidation and protein oxidation, and restores the activity of antioxidant enzymes, effectively counteracting VPA-induced oxidative stress.

Oxidative stress is a principal etiological factor in the development of various neurological disorders, including epilepsy and neurotoxicity. VPA, a commonly prescribed antiepileptic drug, culminates in the induction of oxidative stress within the brain, subsequently causing neuronal damage and dysfunction. The precise mechanism by which VPA elicits oxidative stress remains incompletely elucidated; however, several factors, including the inhibition of mitochondrial respiratory chain complexes, the generation of reactive oxygen species (ROS), and the reduction of antioxidant defenses, may be involved. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, has demonstrated potent antioxidant and neuroprotective properties, capable of directly scavenging ROS, modulating the activity of antioxidant enzymes, and regulating signaling pathways associated with cell survival and apoptosis.

Ethical Statement

The current study was approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Damghan Branch (IR.IAU.DAMGHAN.REC.1401.018).

Funding

This article has been extracted from Zakiéh Salbi's Ph.D dissertation in Animal Physiology at the Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch.

Conflicts of Interest

No conflicts of interest.

Acknowledgement

We would like to thank the staff of the laboratory and animal house at Islamic Azad University, Mazandaran Medical Sciences Branch.

Resveratrol exhibits a protective effect against VPA-induced oxidative stress in the brain tissue of BALB/c mice.



تحقیقی

اثر رزوراترول بر استرس اکسیداتیو القا شده ناشی از مواجهه تحت سدیم والپروات در بافت هیپوکامپ مغز جنین‌های موش سوری

زکبه صلیبی^۱، دکتر غلامحسن واعظی^{۲*}، دکتر عباسعلی دهپور جویباری^۳، دکتر ویدا حجتی^۴، دکتر ناهید مسعودیان^۵

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی زیست‌شناسی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ^۴ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ^۵ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سدیم والپروات (Sodium valproate: SV) یک داروی ضدصرع پرکاربرد است؛ اما استفاده درمانی از آن به دلیل توانایی آن در ایجاد استرس اکسیداتیو محدود است. رزوراترول، یک پلی‌فنل طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر رزوراترول بر استرس اکسیداتیو القا شده ناشی از مواجهه تحت سدیم والپروات در بافت هیپوکامپ مغز جنین‌های موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش ماده باردار نژاد BALB/c به پنج گروه هشت تایی شامل کنترل، سدیم والپروات ۳۵ mg/kg/bw و سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۶ mg/kg/bw، سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۲۲۵ mg/kg/bw تقسیم شدند. سدیم والپروات روزانه به روش دهانی و رزوراترول روزانه به صورت داخل صفاقی تجویز شد. در روز ۸ تا ۱۸ بارداری مداخلات دارویی شروع و تا زمان تولد نوزادان ادامه یافت. در روز ۱۸ بارداری موش‌های مادر تحت بیهوشی قرار گرفتند و ۸ جنین مربوط به هر گروه جدا گردید. پس از بیهوشی جنین‌ها، بافت مغز جدا شد. سپس پارامترهای استرس اکسیداتیو از جمله میزان مالون‌دی‌آلدید (MDA) برحسب nmol/mg به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، تغییرات سطح گلووتاتیون (GSH) برحسب µg/mg و تغییرات سطح پروتئین کربونیل (PC) برحسب nmol/mg در بافت هیپوکامپ مغز ارزیابی شدند.

یافته‌ها: سدیم والپروات موجب ایجاد استرس اکسیداتیو از طریق افزایش MDA (۴/۸ nmol/mg) و PC (۵۱/۴ nmol/mg) و نیز کاهش GSH (۳۱/۸۶ µg/mg) در بافت مغزی نسبت به گروه کنترل گردید (P < ۰/۰۵). رزوراترول با یک روند وابسته به غلظت باعث کاهش استرس اکسیداتیو از طریق کاهش MDA و PC به ترتیب با مقادیر ۳/۰۲ nmol/mg و ۳۷/۲۱ nmol/mg و همچنین افزایش GSH (۴۹/۷۶ µg/mg) در بافت مغزی شد. و بیشترین اثر در غلظت ۰/۶ mg/kg/bw بود که نسبت به گروه SV از نظر آماری معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: استفاده از سدیم والپروات به همراه رزوراترول موجب کاهش التهاب و عوامل ناشی از استرس اکسیداتیو در جنین موش می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: صرع، رزوراترول، استرس اکسیداتیو، والپروات اسید

* نویسنده مسؤول: دکتر غلامحسن واعظی، پست الکترونیکی: vaezi@yahoo.com

نشانی: دامغان، بلوار چشمه علی، بالاتر از میدان سعدی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان. تلفن: ۰۲۳-۳۵۲۲۵۰۷۱

وصول ۱۴۰۲/۱۱/۱۸ اصلاح نهایی ۱۴۰۳/۳/۱۵ پذیرش ۱۴۰۳/۳/۱۵ انتشار ۱۴۰۴/۱/۲۷

مقدمه

فرآیندی گفته می‌شود که طی یک دوره نهفته، مغز طبیعی را مستعد تشنج‌های مکرر و مزمن می‌کند. دارو درمانی معمول‌ترین روش درمان بیماران صرعی است که در بیش از ۷۰ درصد از بیماران مؤثر است.^۱

یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضدصرعی در جهان والپروات است. والپروات با استفاده از ترکیبی از مکانیسم‌های نوروفیزیولوژیکی و نوروشیمیایی مختلف، گسترده‌ترین طیف فعالیت ضدصرعی را در درمان تشنج‌های کانونی و عمومی در

به تغییر‌گذار رفتار به دلیل تخلیه هماهنگ و هم‌زمان جمعی از نورون‌های دستگاه اعصاب مرکزی تشنج گفته می‌شود و اگر این تشنج‌ها تکرار شوند؛ بیماری صرع نامیده می‌شود. صرع مجموعه‌ای از اختلالات عصبی مزمن، با میزان شیوع ۰/۸ درصد در جهان، بعد از سکنه مغزی رایج‌ترین اختلال عصبی در انسان است.^۲ صرع لوب گیجگاهی شایع‌ترین اختلال صرعی در انسان است و معمولاً ماه‌ها یا حتی سال‌ها بعد از اولین اختلالات عصبی ایجاد می‌شود. صرع‌زایی به

بزرگسالان و کودکان دارد. والپروات اهمیت ویژه‌ای در درمان صرع‌های مختلط مقاوم به دارو دارد و به خوبی در بسیاری از بیماران تحمل می‌شود. اثرات ناخوشایند و جانبی والپروات، خفیف یا متوسط هستند و بخش اصلی نگرانی در مصرف این دارو، تراوتونیک بودن و سمیت کبدی ویژه آن است.^۴

داروهای سدیم والپروات و کاربامازپین می‌توانند باعث ایجاد نقایص لوله عصبی (مانند دوپارگی فقرات) در جنین شوند که این احتمال با مصرف سدیم والپروات بیشتر است.^۵ نقص قلبی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های مادرزادی عمده پس از در معرض قرار گرفتن به داروهای ضد صرع کاربامازپین، لاموتریژین، اسید والپروئیک (VPA) و فنوباریتال است.^۶

VPA یکی از اسیدهای چربی است که خاصیت ضد تشنجی دارد. امروزه برای درمان تشنج، اختلالات دوقطبی و پیشگیری از میگرن در انسان، از فرآورده نمکی آن استفاده می‌شود. در حیوانات تنها مورد مصرف این دارو در درمان تشنجات است. VPA همانند سایر داروهای ضد تشنج در غلظت‌های مناسب درمانی، پتانسیل عمل‌های انفجاری مکرر در سلول‌ها به‌خصوص در نورون‌ها را مهار می‌کند.^۷ احتمالاً مکانیسم اثر ضد تشنجی این دارو به دلیل مهار جریان سدیم و همچنین افزایش اثر گابا است. از طرف دیگر نشان داده‌اند که والپروات در غلظت‌های بالا می‌تواند انتقال پتاسیم از غشای سلول‌ها را افزایش داده و در غلظت‌های پایین باعث هیپرپلاریزه شدن پتانسیل‌های غشای سلول‌ها شود و می‌توان چنین نتیجه گرفت که عمل خود را از طریق اثر مستقیم بر کانال‌های پتاسیم در غشاء سلول‌ها اعمال می‌کند.^۸

VPA می‌تواند استرس اکسیداتیو را با اختلال در عملکرد میتوکندری و کاهش آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا ایجاد کند.^۹ استرس اکسیداتیو به عنوان یک حالت فیزیولوژیک طبیعی در بدن شناخته می‌شود. وقتی که تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های محافظ بدن ناکافی شوند؛ استرس اکسیداتیو به‌وجود می‌آید. این فرایند موجب تولید رادیکال‌های آزاد شده که می‌توانند باعث تخریب سلول‌ها شوند و به عملکرد سیستم‌های بیولوژیکی بدن آسیب برسانند. اثرات استرس اکسیداتیو بر بافت عصبی به طور خاص آسیب‌پذیرترین ساختار در برابر استرس اکسیداتیو است.^{۱۰} رادیکال‌های آزاد می‌توانند با آسیب دادن به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، ساختار و عملکرد سلول‌های عصبی را تحت تأثیر قرار دهند که می‌تواند منجر به اختلالات نوروتوکسیک و بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر شود.^{۱۱} از نظر بالینی، نظارت بر سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و بررسی استراتژی‌های محافظتی برای مدیریت استرس اکسیداتیو ناشی از VPA ضروری است.^{۱۲}

رزوراترول ترکیب پلی‌فنولی با منشأ گیاهی است که در بسیاری از

گونه‌های گیاهی مانند توت، بادام زمینی و انگور یافت می‌شود و با عبور از سدخونی مغزی از بروز اختلال ردوکس در مغز جلوگیری می‌کند.^{۱۳} رزوراترول از طریق کاهش استرس اکسیداتیو به‌واسطه فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ SIRT1/Akt منجر به سرکوب سمیت عصبی القا شده و اثر محافظت‌کننده عصبی دارد.^{۱۴} در مطالعه Zhang و همکاران بر نقش رزوراترول در یادگیری و حافظه موش‌های صحرایی مبتلا به زوال عقل عروقی تأکید و نشان داده شد که رزوراترول با کاهش مقدار MDA بیان Bax و caspase-3 و افزایش بیان SOD و Bcl-2 هیپوکامپی به واسطه مهار آپوپتوز و استرس اکسیداتیو، به طور قابل توجهی یادگیری فضایی و حافظه موش‌های صحرایی مبتلا به زوال عقل عروقی را بهبود بخشیده است.^{۱۵}

Faggi و همکاران به بررسی هم‌افزایی VPA و رزوراترول در کاهش آسیب مغزی در سکنه مغزی ایسکمیک پرداختند و در موش‌هایی که تحت ۶۰ دقیقه انسداد شریان مغزی میانی قرار گرفتند؛ ارتباط رزوراترول ۶۸۰ میکروگرم بر کیلوگرم و والپروات ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به‌طور قابل توجهی باعث کاهش حجم انفارکتوس و همچنین نقایص عصبی شد.^{۱۶} Bakshi و همکاران به بررسی نقش آنتی‌اکسیدان/محافظ عصبی رزوراترول در معکوس کردن اوتیسم ناشی از VPA در موش‌های آلینو سوئیسی پس از تولد پرداختند و نتایج نشان داد که درمان با رزوراترول به‌طور قابل توجهی علائم اوتیسم را در مقایسه با کنترل منفی کاهش داده است. درمان با رزوراترول تفاوت سودمند قابل توجهی را در تغییرات رفتاری، نشانگرهای اکسیداتیو، انتقال‌دهنده‌های عصبی و بازسازی سلول‌های پورکنژ تغییر یافته در اوتیسم نشان داد.^{۱۷}

باتوجه به اینکه رزوراترول به عنوان یک داروی کم‌عارضه و با خواص آنتی‌اکسیدان‌ی و حفاظت سلولی بالا است و دیدگاه‌های ثابت شده‌ای در خصوص مصرف VPA در دوران بارداری به عنوان یک داروی ضد تشنج و ضدسایکوز وجود دارد که موجب عوارض تراوتونیک، آپوپتوتیک و استرس اکسیداتیو اندام‌های داخلی نوزاد می‌شود؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر رزوراترول بر استرس اکسیداتیو القا شده ناشی از مواجهه تحت سدیم والپروات در بافت هیپوکامپ مغز جنین‌های موش سوری انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش ماده نژاد BALB/c با وزن ۲۵-۳۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور در مرکز مجتمع حیوانات علوم پزشکی مازندران انجام شد. مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی - واحد دامغان (IR.IAU.DAMGHAN.REC.1401.018) قرار گرفت و پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

مولار) و ۰/۵ میلی لیتر DTNB اضافه شد تا رنگ زرد یکنواختی در لوله حاصل گردید. در نهایت جذب محلول حاصله در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. با خواندن جذب UV محلول در این طول موج و مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت GSH برحسب $\mu\text{g}/\text{mg}$ به دست آمد.

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوبایوتوریک اسید انجام شد.^{۲۲} بدین ترتیب که به ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون بافتی، ۰/۱ میلی لیتر از معرف TBA شامل HCl ۰/۵ نرمال، TCA ۱۵ درصد و ۰/۳ TBA اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از آن ۰/۲ میلی لیتر n-بوتانول اضافه شد و در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه n-بوتانول برای سنجش در طول موج ۵۳۲ نانومتر جدا شد و مقدار مالون دی آلدید (MDA) برحسب nmol/mg از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

برای اندازه گیری سطح پروتئین کربونیل (PC) ۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه به ۵۰۰ میکرو لیتر محلول TCA و EDTA اضافه شد. سپس در دور ۶۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از معرف DNP-H به میکروتیوب اضافه شد و به میکروتیوب کنترل فقط ۵۰۰ میکرو لیتر HCL ۲ مولار اضافه گردید و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر محلول TCA و EDTA اضافه شد و در دور ۶۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول اتانول + اتیل استات مخلوط شد و در دور ۶۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از این سانتریفیوژ، ۲۰۰ میکرو لیتر گوانین هیدروکلراید ۶ مولار اضافه شد و جذب در ۳۶۵ نانومتر خوانده شد و مقدار PC برحسب nmol/mg محاسبه گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-21 تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مشخص و به دنبال آن از آزمون Tukey برای مشخص کردن سطح معنی داری بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سدیم والپروات باعث افزایش لیپید پراکسیداسیون، افزایش شاخص مالون دی آلدید، کاهش شاخص گلوکوتایون، افزایش اکسیداتیو استرس و افزایش شاخص پروتئین کربونیل در جنین‌ها

در ابتدا ۲ سر موش ماده با یک سر موش نر در قفس‌های ۵ تایی نگهداری شدند و هر روز برای سیکل استرال چک شدند. سپس موش‌های ماده هر روز برای پلاک واژینال چک شدند که در صورت مشاهده پلاک، روز اول بارداری در نظر گرفته شد. در روز ۸ تا ۱۸ بارداری مداخلات دارویی شروع شد و تا زمان تولد نوزادان ادامه یافت. به طوری که موش‌های بارداری به پنج گروه هشت تایی به شرح زیر تقسیم شدند.^{۱۸}

گروه کنترل: مداخله‌ای صورت نگرفت.

گروه اول تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw.

گروه دوم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۶ mg/kg/bw.

گروه سوم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۳۵ mg/kg/bw.

گروه چهارم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۲۲۵ mg/kg/bw.

سدیم والپروات به روش دهانی خورانده شد و رزوراترول به صورت داخل صفاقی تزریق شد.^{۱۹،۱۸} موش‌های مادر تحت بیهوشی با کتامین زایلین در روز ۱۸ بارداری جراحی شدند و تعداد ۸ سر جنین مربوط به هر گروه جدا شد. سپس جنین‌ها با ۰/۱ میلی لیتر کتامین بیهوش و تشریح شدند. پس از تشریح جنین‌ها، جداسازی بخش هیپوکامپ از مغز انجام گردید.^{۲۰}

اندازه گیری گلوکوتایون (GSH) به روش المن انجام شد.^{۲۱} سپس ۰/۱ گرم از بافت جدا شده را با ترازو وزن و به لوله هموژنایزر انتقال دادیم. یک میلی لیتر EDTA به آن اضافه شد و چند بار عمل هموژن کردن با پیستون انجام گرفت تا مخلوط یکنواختی حاصل به دست آمد. سپس محتویات لوله هموژنایزر به لوله سانتریفیوژ انتقال یافت و همچنین ۰/۵ میلی لیتر EDTA دوباره به لوله هموژنایزر اضافه شد و پس از تکان دادن، محتویات آن به لوله سانتریفیوژ منتقل گردید. در مرحله بعدی به لوله سانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتر TCA ۱۰ درصد برای رسوب پروتئین‌ها اضافه شد. سپس در دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت و یک میلی لیتر از محلول بالایی به لوله آزمایش منتقل گردید و به آن ۲/۵ میلی لیتر بافر تریس (۰/۴)

جدول ۱: ارزیابی نشانگرهای استرس اکسیداتیو در بافت مغز

گروه‌ها	مالون دی آلدید (nmol/mg protein)	گلوکوتایون ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)	پروتئین کربونیل (nmol/mg protein)
کنترل	۳/۴۱±۰/۲	۶۵/۷۳±۱/۸۳	۱۲/۵±۱/۰۶
تجربی اول	۴/۸±۰/۱۳ *	۳۱/۸۶±۱/۱۱ *	۵۱/۴±۳ *
تجربی دوم	۳/۰۲±۰/۱۷ #	۴۹/۷۶±۲ #	۳۷/۲۱±۱/۴۳ #
تجربی سوم	۳/۹۶±۰/۱۴ #	۴۰/۷۸±۱/۶ #	۴۷/۸±۱/۱۲
تجربی چهارم	۳/۸۸±۰/۱۲ #	۳۱/۶۵±۱/۵۴	۵۲/۲±۱/۹۸

گروه اول تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw؛ گروه دوم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۶ mg/kg/bw

گروه سوم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۳۵ mg/kg/bw و گروه چهارم تجربی: سدیم والپروات ۴۰ mg/kg/bw + رزوراترول ۰/۲۲۵ mg/kg/bw

* P<۰/۰۵ گروه تجربی اول در مقایسه با گروه کنترل، # P<۰/۰۱ گروه‌های تجربی دوم و سوم و چهارم در مقایسه با گروه تجربی اول

نسبت به گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). در گروه‌های دریافت کننده رزوراترول با یک روند وابسته به غلظت موجب کاهش مالون‌دی‌آلدید، افزایش گلو‌تاتیون و کاهش پروتئین کربونیل گردید که بیشترین اثر در غلظت $0/6 \text{ mg/kg/bw}$ بوده که نسبت به گروه سدیم والپروات معنی‌دار بود ($P < 0/01$) (جدول یک).

بحث

با توجه نتایج این مطالعه، والپروات اسید سطح مالون‌دی‌آلدید و پروتئین کربونیل را نسبت به گروه کنترل افزایش و گلو‌تاتیون را کاهش داد که نشان‌دهنده القا استرس اکسیداتیو بود. درمان با رزوراترول توانست این اثرات والپروات اسید را به روشی وابسته به دوز معکوس نماید. بالاترین اثرات محافظتی رزوراترول در دوزهای $0/6 \text{ mg/kg/bw}$ و $0/35 \text{ mg/kg/bw}$ مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که درمان با رزوراترول به‌طور قابل توجهی اکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین را کاهش داده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بازیابی کرده است و به‌طور موثر با استرس اکسیداتیو ناشی از والپروات اسید مقابله نموده است.

استرس اکسیداتیو یک عامل اصلی در بروز اختلالات عصبی مختلف از جمله صرع و سمیت عصبی است. والپروات اسید، یک داروی ضدصرع متداول است که سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در مغز شده و منجر به آسیب و اختلال نورونی می‌شود. مکانیسم دقیق ایجاد استرس اکسیداتیو توسط والپروات اسید، به‌طور کامل درک نشده است؛ اما چندین عامل از جمله مهار کمپلکس‌های زنجیره تنفسی میتوکندری، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی ممکن است درگیر باشند.^{۲۳} رزوراترول، یک پلی‌فنل طبیعی است که خواص آنتی‌اکسیدانی و نوروپروتکتیو قوی نشان داده است که قادر است به‌طور مستقیم ROS را از بین برده؛ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم نموده و مسیرهای ارتباطی مرتبط با بقا و آپوپتوز را تنظیم نماید.^{۲۴} در این مطالعه، درمان با رزوراترول به‌طور قابل توجهی اکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین ناشی از والپروات اسید را کاهش داد که نشان‌دهنده توانایی آن در محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو به لیپیدها و پروتئین‌ها در بافت مغز است. اگر رزوراترول در آزمایشات بالینی ایمن و موثر ثابت شود؛ می‌تواند گزینه درمانی ارزشمندی برای بیمارانی باشد که نورو‌توکسیسته ناشی از والپروات اسید را تجربه می‌کنند. رزوراترول می‌تواند به عنوان یک درمان همراه با والپروات اسید استفاده شود و به کاهش خطر عوارض جانبی نورو‌توکسیک و بهبود تحمل کلی درمان والپروات اسید کمک کند. به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که رزوراترول کاربردهای بالینی بالقوه در مدیریت نورو‌توکسیسته ناشی از والپروات اسید دارد.

در مطالعه Verrotti و همکاران درمان با والپروات اسید پس از

یک سال توانست استرس اکسیداتیو را در کودکان دارای اضافه وزن ایجاد کند.^{۲۵} خواص اکسیدانی والپروات اسید می‌تواند باعث به هم زدن تعادل آنتی‌اکسیدانی شود و آسیب بافتی ایجاد کند. در مطالعات حیوانی، سدیم والپروات با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و تغییر ساختار سلولی، تخریب بافت کبد را تسریع می‌بخشد.^{۲۶} در مطالعه امیدپور و همکاران که روی ۴۸ سر موش صحرایی نر انجام شد؛ میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه‌های دریافت کننده والپروات اسید افزایش یافت که نشان‌دهنده تخریب غشای سلولی کبد موش‌ها در اثر مصرف دارو بود. با توجه به بعضی از مطالعات حیوانی و انسانی، سدیم والپروات یک داروی سمی با نارسایی‌های کبدی برگشت‌پذیر و غیرقابل برگشت از طریق القا یا افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو است.^{۲۷}

در مطالعه Faggi و همکاران به ارزیابی هم‌افزایی والپروات و رزوراترول در کاهش آسیب مغزی در سکنه مغزی ایسکمیک پرداخته شد. در موش‌هایی که تحت ۶۰ دقیقه انسداد شریان مغزی میانی قرار گرفتند؛ ارتباط رزوراترول ۶۸۰ میکروگرم بر کیلوگرم و والپروات ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به‌طور قابل توجهی باعث کاهش حجم انفارکتوس و همچنین نقایص عصبی شد که نشان داد والپروات و رزوراترول ممکن است یک استراتژی آماده برای استفاده امیدوارکننده برای درمان آسیب مغزی پس از ایسکمیک باشند.^{۱۶}

در مطالعه Bakshi و همکاران نقش آنتی‌اکسیدانی / محافظ عصبی رزوراترول در معکوس کردن اوتیسم ناشی از والپروات اسید در موش‌های آلینو سوئسی پس از تولد ارزیابی شد. درمان با رزوراترول به‌طور قابل توجهی علائم اوتیسم را در مقایسه با کنترل منفی کاهش داد. درمان با رزوراترول تفاوت سودمند قابل توجهی را در تغییرات رفتاری، نشانگرهای اکسیداتیو، انتقال‌دهنده‌های عصبی و بازسازی سلول‌های پورکنژ تغییر یافته در اوتیسم نشان داد. رزوراترول دارای یک عامل آنتی‌اکسیدانی قوی، محافظت کننده عصبی، ضد اضطراب، تقویت کننده یادگیری و حافظه در برابر اوتیسم ناشی از والپروات اسید بود.^{۱۷}

در مطالعه Amrani و همکاران اثر محافظتی عصاره n-بوتانولی گل داوودی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از والپروات اسید در مغز موش ماده در مقایسه با ویتامین E ارزیابی شد. درمان تحت حاد موش با والپروات اسید منجر به افزایش قابل توجهی در آسیب اکسیداتیو شد. در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، هر دو عصاره n-بوتانولی و ویتامین E با مهار پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش محتوای گلو‌تاتیون مغز و بازگرداندن فعالیت GPx به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو ناشی از والپروات اسید را کاهش دادند.

رزوراترول در کاهش استرس اکسیداتیو نظیر مطالعه اثر رژیم‌های غذایی حاوی رزوراترول نیز ارزیابی گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که رزوراترول دارای اثر محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از والپروات اسید در بافت مغز موش نژاد BALB/c است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم زکيه صلبى برای اخذ درجه دکتری در رشته زیست‌شناسی فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان بود. بدین‌وسیله از کارکنان آزمایشگاه و حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی می‌شود. بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

References

- Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002 Jun;50(1-2):105-23. doi: 10.1016/s0920-1211(02)00073-6.
- Wyckhuys T, Raedt R, Vonck K, Wadman W, Boon P. Comparison of hippocampal Deep Brain Stimulation with high (130Hz) and low frequency (5Hz) on afterdischarges in kindled rats. *Epilepsy Res.* 2010 Feb;88(2-3):239-46. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2009.11.014.
- Bausch SB. Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2005 Nov;7(3):390-400. doi: 10.1016/j.yebeh.2005.07.019.
- Sander JW. The use of antiepileptic drugs--principles and practice. *Epilepsia.* 2004;45(Suppl 6):28-34. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.455005.x.
- Margulis AV, Hernandez-Diaz S, McElrath T, Rothman KJ, Plana E, Almqvist C, et al. Relation of in-utero exposure to antiepileptic drugs to pregnancy duration and size at birth. *PLoS One.* 2019 Aug;14(8):e0214180. doi: 10.1371/journal.pone.0214180.
- Battino D, Granata T, Binelli S, Caccamo ML, Canevini MP, Canger R, et al. Intrauterine growth in the offspring of epileptic mothers. *Acta Neurol Scand.* 1992 Dec;86(6):555-57. doi: 10.1111/j.1600-0404.1992.tb05485.x.
- Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology.* 9th ed. New York: McGraw-Hill Publishing Co. 2004.
- Chung SS, Wang NC, Treiman DM. Comparative Efficacy and Safety of Antiepileptic Drugs for the Treatment of Status Epilepticus. *J Pharm Pract.* 2007;20(2): 137-46. doi: 10.1177/0897190007305134.
- Li D, Bai X, Jiang Y, Cheng Y. Butyrate alleviates PTZ-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuron apoptosis in mice via Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. *Brain Res Bull.* 2021 Mar;168:25-35. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.12.009.
- Sies H. *Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects.* Antioxidants (Basel). 2020 Sep;9(9):852. doi: 10.3390/antiox9090852.
- Zaric BL, Macvanin MT, Isenovic ER. Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2023 Jan;154:106346. doi:

ترکیبات گیاهی موجود در عصاره n-بوتانولی مسؤول اثر بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی / اکسیدانی مغز تحت تاثیر والپروات اسید ارزیابی شدند.^{۲۸}

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم ارزیابی نواقص لوله عصبی جنین‌ها و استفاده از یک روش برای ارزیابی معیارهای اکسیداتیو اشاره نمود.

مطابق با نتایج این مطالعه می‌توان پیشنهاد نمود که رزوراترول می‌تواند با جلوگیری از استرس اکسیداتیو ناشی از والپروات اسید در بیماران مبتلا به صرع از سیستم عصبی محافظت نماید. هرچند نیاز به انجام مطالعات بیشتری بر روی مکانیسم دقیق عمل رزوراترول و اثر آن بر سلامت عصبی انجام شود تا بهتر بتوان از این ترکیبات برای کاهش استرس اکسیداتیو و پشتیبانی از سلامت عصبی استفاده نمود. همچنین پیشنهاد می‌گردد اثر روش‌های دیگر در جایگزینی

10.1016/j.biocel.2022.106346.

- Adewole KE, Attah AF, Osawe SO. Exploring phytotherapeutic approach in the management of valproic acid-induced toxicity. *Adv Tradit Med (ADTM).* 2023; 23:347-67. doi: 10.1007/s13596-021-00575-6.
- Kiskova T, Kubatka P, Büsselberg D, Kassayova M. The Plant-Derived Compound Resveratrol in Brain Cancer: A Review. *Biomolecules.* 2020 Jan 19;10(1):161. doi: 10.3390/biom10010161.
- Wang H, Dong X, Liu Z, Zhu S, Liu H, Fan W, et al. Resveratrol Suppresses Rotenone-induced Neurotoxicity Through Activation of SIRT1/Akt1 Signaling Pathway. *Anat Rec (Hoboken).* 2018 Jun;301(6):1115-25. doi: 10.1002/ar.23781.
- Zhang Y, Li Y, Wang Y, Wang G, Mao L, Zhang D, et al. Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia. *Mol Med Rep.* 2019 Nov;20(5):4587-93. doi: 10.3892/mmr.2019.10723.
- Faggi L, Pignataro G, Parrella E, Porrini V, Vinciguerra A, Cepparulo P, et al. Synergistic Association of Valproate and Resveratrol Reduces Brain Injury in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan;19(1):172. doi: 10.3390/ijms19010172.
- Bakshi V, Sunand K, Begum N, Kakalij RM, Tekula MR. Neuroprotective Effect of Resveratrol on Valproic Acid Induced Oxidative Stress Autism in Swiss Albino Mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research (IJPSDR).* 2018;10:103-10. doi: 10.25004/ijpsdr.2018.100301.
- Sun XY, Qin HJ, Zhang Z, Xu Y, Yang XC, Zhao DM, et al. Valproate attenuates diabetic nephropathy through inhibition of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *Mol Med Rep.* 2016 Jan;13(1):661-68. doi: 10.3892/mmr.2015.4580.
- Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J Biomed Sci.* 2011 Jun 23;18(1):47. doi: 10.1186/1423-0127-18-47.
- Moreno DG, Utagawa EC, Arva NC, Schafermak KT, Mufson EJ, Perez SE. Postnatal Cytoarchitecture and Neurochemical Hippocampal Dysfunction in Down Syndrome. *J Clin Med.* 2021 Jul;10(15):3414. doi: 10.3390/jcm10153414.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase

- activity. *Biochem Pharmacol.* 1961 Jul;7:88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res.* 1978 Nov;19(8):1053-57.
23. Hansen JM, Lucas SM, Ramos CD, Green EJ, Nuttall DJ, Clark DS, et al. Valproic acid promotes SOD2 acetylation: a potential mechanism of valproic acid-induced oxidative stress in developing systems. *Free Radic Res.* 2021 Dec;55(11-12):1130-44. doi: 10.1080/10715762.2021.2017913.
24. Koushki M, Amiri-Dashatan N, Ahmadi N, Abbaszadeh HA, Rezaei-Tavirani M. Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Sci Nutr.* 2018 Oct;6(8):2473-90. doi: 10.1002/fsn3.855.
25. Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res.* 2008 Feb;78(2-3):171-77. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2007.11.005.
26. Tanvir EM, 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):525-33. doi: 10.1016/j.eujim.2015.04.004.
27. Omidipour R, Zarei L, Boroujeni MB, Rajabzadeh A. Protective Effect of Thyme Honey against Valproic Acid Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Biomed Res Int.* 2021 Feb;2021:8839898. doi: 10.1155/2021/8839898.
28. 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): 576-80. doi: 10.2174/1573407215666190308152505.