

Research Paper

Effects of Rotenone and Resveratrol on Apoptosis and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats



Mahboobeh Aghagolzadeh¹ , AhmadAli Moazedi¹ , *Hossein Najafzadehvarzi² , Hadi Parsian³

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

3. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.



Citation Aghagolzadeh M, Moazedi A, Najafzadehvarzi H, Parsian H. [Effects of Rotenone and Resveratrol on Apoptosis and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2024; 33(3):310-325. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.3.2135.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.3.2135.1>

Received: 13 Jul 2023

Accepted: 17 Feb 2024

Available Online: 01 Oct 2024

ABSTRACT

Background Exposure to neurotoxins increases the risk of neurodegenerative diseases. Oxidative stress and apoptosis play a central role in the initiation and progression of these disorders. Low estrogen aggravates oxidative stress and apoptosis caused by neurodegenerative diseases in menopausal women. Therefore, the use of resveratrol with antioxidant and protective properties and signaling pathways common with estrogen, can be a useful therapeutic approach in preventing the progression of oxidative stress and apoptosis.

Objective The present study aims to investigate the protective effect of resveratrol on the antioxidant factors and rotenone-induced apoptosis in the hippocampus of ovariectomized rats.

Methods Thirty female rats were divided into five groups of 6, including rotenone (5 m/kg), ovariectomized, ovariectomized+rotenone, ovariectomized+resveratrol (40 m/kg), and ovariectomized +rotenone+resveratrol. Rotenone was administered intraperitoneally, and resveratrol was administered orally for 21 days. In the end, Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and expression of BAX and BCL2 genes were measured in the hippocampus.

Results Enzyme activity and BCL2 expression in the rotenone and ovariectomized groups significantly decreased, while BAX expression and MDA level significantly increased. Resveratrol significantly increased enzyme activity (57.9 ± 1.94 U/mg protein) and BCL2 expression (0.78 ± 0.05) in the ovariectomized + rotenone + resveratrol group ($P < 0.001$). Also, resveratrol significantly reduced BAX expression (4.5 ± 0.11) and MDA level (1.91 ± 22.35 μ M/g) in this group ($P \leq 0.001$).

Conclusion Resveratrol corrected the simultaneous effects of low estrogen and rotenone consumption on changes in apoptosis gene expression and oxidative stress factors and returned to a normal level.

Keywords:

Resveratrol,
Hippocampus,
Ovariectomized,
Rotenone, oxidative
stress, Apoptosis

* Corresponding Author:

Hossein Najafzadehvarzi

Address: Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Tel: +98 (11) 32199592

E-Mail: h.najafzadeh@mubabol.ac.ir



Copyright © 2024 The Author(s);

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Extended Abstract

Introduction

Neurodegenerative diseases represent a heterogeneous group of disorders that affect millions of people worldwide.

These diseases are characterized by the progressive and irreversible loss of function or death of neurons in specific regions of the brain, leading to severe cognitive and functional decline. The most well-known neurodegenerative diseases include Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease, and amyotrophic lateral sclerosis, with oxidative stress and apoptosis being the primary shared cellular and molecular mechanisms involved in these neurological disorders [1-3]. Evidence suggests that one of the major contributors to the exacerbation and increased risk of neurodegenerative diseases is environmental neurotoxins, which, in modern societies, are increasingly and uncontrollably threatening the health of living organisms directly or indirectly, thereby raising the risk of disease development [4].

Pesticides are environmental neurotoxins that, upon exposure, increase the risk of neurodegenerative diseases [5, 6]. Rotenone, a naturally occurring insecticide and pesticide derived from leguminous plants, is a potent environmental neurotoxin. Due to its highly lipophilic nature, it readily crosses all biological membranes, including the mitochondrial membrane and the blood-brain barrier, without requiring specific transporters [7-9]. The primary neurotoxic mechanism of rotenone involves inhibiting complex I of the mitochondrial electron transport chain. This inhibition leads to oxidative stress, apoptosis, and impaired autophagy. Rotenone disrupts electron transfer from Fe-S centers in complex I to ubiquinone within the electron transport chain, subsequently inhibiting oxidative phosphorylation, reducing adenosine triphosphate levels, and simultaneously increasing reactive oxygen species production, thereby inducing oxidative stress. Elevated reactive oxygen species levels and oxidative damage to DNA, lipids, and proteins contribute to neuronal cell degeneration [10].

Given the rising incidence of neurodegenerative diseases and the association of various environmental neurotoxins, including rotenone, with neurodegenerative disorders, understanding the inflammatory, apoptotic, and oxidative stress pathways involved in rotenone-induced toxicity is crucial. Moreover, protective mechanisms, such as the neuroprotective role of estrogen and the modulatory effects of resveratrol—a well-known polyphenol with anti-apoptotic, anti-inflammatory,

and antioxidant properties—require further exploration. The present study investigates these processes by inducing estrogen depletion (ovariectomy in Wistar rats) and exposing the animals to rotenone, a pesticide commonly used in agriculture, to assess its impact on consumers and agricultural workers. Molecular assessments focused on gene expression changes in Bcl2, BAX, and the antioxidant factor superoxide dismutase (SOD) in the hippocampus of the treated rats.

Methods

This study utilized 30 female Wistar rats (weighing approximately 170 ± 20 g) obtained from the Laboratory Animal Center of Babol University of Medical Sciences (Babol City, Iran). The animals were housed under standard conditions (12-h light/dark cycle, ad libitum access to food and water, and an ambient temperature of 20-25 °C). All experimental procedures were performed following the ethical guidelines set by the Animal Ethics Committee of the Shahid Chamran University of Ahvaz.

The rats were randomly assigned to five groups ($n=6$ per group). Group 1 was the rotenone group (intraperitoneal injection of 5 mg/kg rotenone; Sigma-Aldrich), group 2 was ovariectomy (OVX) (bilateral ovariectomy), group 3 was OVX + resveratrol group (40 mg/kg resveratrol via gavage), group 4 were OVX + rotenone group, and group 5 were OVX + rotenone + resveratrol group. All treatments were administered daily for three weeks. At the end of the experiment, the animals were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) (Alfasan, Netherlands). The hippocampal tissue samples were then collected for analysis.

Statistical analysis

Biochemical assay data were analyzed using IBM SPSS Statistics software, version 20, employing a one-way analysis of variance followed by the Tukey post hoc test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Following ovariectomy, the highest malondialdehyde (MDA) levels were observed in the OVX + rotenone group (40.06 ± 2.22 $\mu\text{M/g}$), which showed a significant increase compared to the OVX group (32.92 ± 1.12 $\mu\text{M/g}$; $P < 0.001$). MDA levels in the OVX + resveratrol group (21.42 ± 0.97 $\mu\text{M/g}$) were significantly lower compared to those in the OVX group ($P < 0.001$). Resveratrol administration significantly reduced MDA levels in the OVX

+ rotenone + resveratrol group ($22.35 \pm 1.91 \mu\text{M/g}$) compared to the OVX + rotenone group ($P < 0.001$).

SOD activity ($16.36 \pm 0.61 \text{ U/mg}$) significantly decreased in the OVX + rotenone group compared to the OVX group ($70.69 \pm 1.58 \text{ U/mg}$; $P \leq 0.001$). However, resveratrol administration in the OVX + resveratrol group did not significantly increase SOD activity ($77.02 \pm 2.2 \text{ U/mg}$) compared to the OVX group. In the OVX + rotenone + resveratrol group, SOD activity ($57.9 \pm 1.94 \text{ U/mg}$) was significantly higher than in the OVX + rotenone group ($P < 0.001$).

The highest BAX gene expression levels were observed in the OVX + rotenone group (5.9 ± 0.05), which was significantly higher than in the OVX group (1.3 ± 0.11 ; $P < 0.001$). BAX expression in the OVX + resveratrol group (1.2 ± 0.11) did not significantly differ from the OVX group. However, resveratrol administration significantly reduced BAX expression in the OVX + rotenone + resveratrol group (4.5 ± 0.11) compared to the OVX + rotenone group ($P < 0.001$).

The lowest Bcl2 gene expression levels were recorded in the OVX + rotenone group (0.93 ± 0.05), which was significantly lower than in the OVX group (5.9 ± 0.05 ; $P < 0.001$). Bcl2 expression in the OVX + resveratrol group (1.13 ± 0.03) did not significantly increase compared to the OVX group. However, resveratrol administration significantly elevated Bcl2 expression in the OVX + rotenone + resveratrol group (0.78 ± 0.05) compared to the OVX + rotenone group ($P < 0.001$).

Conclusion

In this study, rotenone was used as a pesticide-induced neurotoxicant, while ovariectomy (estrogen depletion) was used as an experimental model of menopause. The protective effects of resveratrol against rotenone-induced hippocampal damage were evaluated. The findings demonstrated that rotenone significantly reduced SOD activity and Bcl2 gene expression while increasing MDA levels and BAX gene expression in the hippocampus.

Overall, resveratrol mitigated the neurotoxic effects of rotenone and estrogen depletion on apoptosis and oxidative stress markers. This study supports previous findings that resveratrol supplementation may be beneficial in improving key biomarkers associated with neurodegenerative diseases, particularly in high-risk populations, such as agricultural workers and postmenopausal individuals. Future research should investigate the role of proteins, such as Nrf2, SIRT, and NF- κ B, along with their signaling

pathways, as well as the effects of estrogen replacement therapy at different concentrations on oxidative stress and apoptosis indices.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Shahid Chamran University of Ahvaz](#), Ahvaz, Iran (Code: EE.1400.3.02.10568).

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors' contributions

Conceptualization and study design: Hossein Najafzadehvarzi, AhmadAli Moazedi and Mahboobeh Aghagolzadeh; Data analysis, interpretation, and statistical analysis: Mahboobeh Aghagolzadeh and Hossein Najafzadehvarzi; Financial resources and project administration, technical or material support: AhmadAli Moazedi and Hussain Naj Fazadeh Warzi; Supervision: Hossein Najafzadehvarzi, Ahmad Ali Moazdi, and Hadi Parsian; Writing the original draft: Mahboobeh Aghagolzadeh; Review and editing: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of the Department of Biology, [Shahid Chamran University of Ahvaz](#), and the Vice Chancellor for Research, [Shahid Chamran University of Ahvaz](#), Ahvaz, Iran and [Babol University of Medical Sciences](#), Babol, Iran during the implementation of this research.



مقاله پژوهشی

اثر روتنون و رسوراترول بر آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در رت‌های اوارکتومی شده

محبوبه آقاگل‌زاده^۱، احمدعلی معاضدی^۱، حسین نجف‌زاده ورزی^۲، هادی پارسیان^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. گروه فارماکولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
۳. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.



Citation Aghagholzadeh M, Moazedi A, Najafzadehvarzi H, Parsian H. [Effects of Rotenone and Resveratrol on Apoptosis and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats Effects of Rotenone and Resveratrol on Apoptosis and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2024; 33(3):310-325. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.3.2135.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.33.3.2135.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۲ تیر ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۲۸ بهمن ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۴۰۳

زمینه: قرار گرفتن در معرض نوروتوکسین‌ها به افزایش ابتلا به بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی منجر می‌شود. در شروع و پیشرفت اختلالات، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز نقش محوری دارند و کاهش استروژن، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی را در افراد منوپوز تشدید می‌کند. بنابراین استفاده از رسوراترول با خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظتی که مسیرهای پیام‌رسانی مشترک با استروژن دارد می‌تواند رویکرد درمانی مفیدی در جلوگیری از پیشرفت استرس اکسیداتیو و آپوپتوز باشد.

هدف: پژوهش حاضر اثر حفاظتی رسوراترول بر تغییر فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوزی ناشی از روتنون را در هیپوکامپ رت‌های اوارکتومی بررسی کرده است.

روش‌ها: در این مطالعه ۳۰ سر موش صحرایی ماده به ۵ گروه ۶ تایی بدین ترتیب روتنون (۵ میلی گرم)، اوارکتومی، اوارکتومی+روتنون، اوارکتومی+رسوراترول (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و اوارکتومی+روتنون+رسوراترول تقسیم شدند. روتنون و رسوراترول به ترتیب به صورت داخل صفاقی و خوراکی ۲۱ روز تجویز شدند. در پایان، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقدار مالون دی‌آلدهید و بیان ژن‌های BAX و Bcl2 در هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم و بیان ژن BCL2 در گروه‌های دریافت‌کننده روتنون و اوارکتومی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، در حالی که بیان ژن BAX و سطح MDA به‌طور قابل‌توجهی افزایش پیدا کرد. رسوراترول به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم (۵۷/۹±۱/۹۴) واحد بر میلی گرم پروتئین و بیان BCL2 (۰/۷۸±۰/۰۵) را در گروه اوارکتومی+روتنون+رسوراترول افزایش داد (P<۰/۰۰۱). همچنین، رسوراترول به‌طور معنی‌داری بیان BAX (۴/۵±۰/۱۱) و سطح MDA (۱/۹۱±۲۲/۳۵) میکرومول بر گرم را در این گروه کاهش داد (P≤۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: رسوراترول اثرات همزمان کاهش استروژن و مصرف روتنون بر تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوز و عوامل استرس اکسیداتیو را اصلاح کرده و به سطح نرمال بازگرداند.

کلیدواژه‌ها:

رسوراترول، هیپوکامپ، اوارکتومی، روتنون، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز

* نویسنده مسئول:

حسین نجف‌زاده ورزی

نشانی: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی پزشکی.

تلفن: ۳۲۱۹۹۵۹۲ (۱۱) ۰۹۸

رایانامه: h.najafzadeh@mubabol.ac.ir



Copyright © 2024 The Author(s);

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

مشخص شده است که رادیکال‌های آزاد با تحریک استرس اکسیداتیو، آسیب‌های عصبی را تشدید می‌کنند؛ از این رو نقش عمده‌ای در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی ایفا می‌کنند. بنابراین می‌توان تنظیم و تعدیل رادیکال‌های آزاد به واسطه تقویت آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا و همچنین تنظیم بیان پروتئین‌های آپوپتوزی را به عنوان اهداف بالقوه عمل دارویی در مدیریت بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی به کار گرفت. سوپراکسید دیسموتاز^۱ آنزیمی است که نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند. در مغز سوپراکسید دیسموتاز، به دلیل فعالیت متابولیک بالا و مصرف اکسیژن بالای نورون‌ها که آن‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر می‌کند، اهمیت ویژه‌ای دارد. این آنزیم آنتی‌اکسیدانی با تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو نقش دارد [۱۳].

مطالعات نشان داده‌اند کاهش سطح یا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در مغز با افزایش استرس اکسیداتیو و تخریب عصبی مرتبط است. همان‌طور که در بیماری آلزایمر مشاهده شد، سطح این آنزیم در مناطق آسیب‌دیده مغز کاهش یافته است [۱۴]. به‌طور مشابه یان و همکاران در مطالعه مروری خود نقش سوپراکسید دیسموتاز را در شرایط مختلف پاتولوژیک در مطالعات انسانی و حیوانی متعددی بررسی کرده‌اند و اثرات مضر کاهش سطح و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تشدید آسیب‌های اکسیداتیو تحت شرایط بیماری‌های مختلف را نشان دادند [۱۵].

۱۷-بتا-استرادیول (E2، استروژن) هورمون استروئیدی است که به عنوان محافظت‌کننده عصبی در برابر انواع بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی، از جمله پارکینسون و آلزایمر نقش دارد [۱۶-۱۹]. استروژن به دلیل وزن مولکولی پایین و خاصیت لیپوفیلی از سد خونی-مغزی عبور می‌کند و به راحتی خود را به بافت عصبی می‌رساند [۲۰]. وون و همکاران نشان دادند استروژن بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 و Bcl-xL را برای جلوگیری از تشکیل منافذ نفوذپذیر افزایش می‌دهد و با جلوگیری از انتقال پروتئین‌های پروآپوپتوز مانند Bcl-2 و Bcl-xL از سیتوزول به غشای میتوکندری مانع از رهایی سیتوکروم C القاشده توسط اختلالات عصبی می‌شود [۲۱]. همچنین در مطالعه دیگر نشان دادند که استروژن از طریق فعال‌سازی مسیر Nrf2-ARE آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا را تنظیم می‌کند [۲۲]. شواهد نشان می‌دهد درمان طولانی‌مدت با استروژن در بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی، علاوه بر فواید خود با عوارض جانبی همراه است [۲۳، ۲۴].

بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی نمایانگر مجموعه‌ای از اختلالات ناهمگن است که میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری‌ها با از دست دادن پیش‌رونده و برگشت‌ناپذیر عملکرد و یا مرگ نورون‌ها در مناطق خاص مغز مشخص می‌شوند که به افت شدید شناختی و عملکردی منجر می‌شوند. شناخته‌شده‌ترین بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی عبارت‌اند از بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و اسکروز جانبی آمیوتروفیک که استرس اکسیداتیو و آپوپتوز از اصلی‌ترین مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مشترک دخیل در این اختلالات عصبی می‌باشند [۱-۳]. علت دقیق شیوع و سیر افزایشی بیماری‌ها به‌طور واضح مشخص نیست، اما شواهد نشان دادند که یکی از دلایل تشدید و افزایش احتمال ابتلا به بیماری‌های عصبی نوروتوکسین‌های محیطی می‌باشند که در جوامع امروزی به‌صورت کنترل نشده و بی‌رویه سلامت موجودات زنده را به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم تهدید می‌کنند و ریسک ابتلا به بیماری‌ها را افزایش می‌دهند [۴].

آفت‌کش‌ها، نوروتوکسین‌های محیطی هستند که قرار گرفتن در معرض آن‌ها به افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی منجر می‌شود [۵، ۶]. نوروتوکسین محیطی روتنون، حشره‌کش و آفت‌کش طبیعی است که از گیاهان تیره لگومینوز استخراج می‌شود، به علت ویژگی لیپوفیلیک بالا به راحتی و بدون نیاز به حامل‌ها از تمام غشاهای بیولوژیک، از جمله میتوکندری و سد خونی-مغزی عبور می‌کند [۷-۹]. مکانیسم اصلی سمیت عصبی القاشده توسط روتنون، مهار کمپلکس I زنجیره انتقال الکترون میتوکندری است. استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و مهار اتوفازی از نتایج کلیدی مهار کمپلکس I زنجیره انتقال الکترون می‌باشند. روتنون با مهار انتقال الکترون‌ها از مراکز آهن - گوگرد در کمپلکس I به یوبیکوئینون در زنجیره انتقال الکترون به مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو و کاهش سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) و به‌طور هم‌زمان افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و در نتیجه استرس اکسیداتیو منجر می‌شود. افزایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و آسیب اکسیداتیو DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها در تخریب سلول‌های عصبی نقش دارند [۱۰].

یار محمدی و همکاران نشان دادند روتنون به واسطه القای مسیر سیگنالینگ JNK، p38 MAPK و در نتیجه افزایش پروتئین‌های پروآپوپتوز BAX و BAD به رهایی سیتوکروم C و فعال‌سازی کاسپازهای آغازگر و افکتور و نهایتاً القای آپوپتوز منجر می‌شود. از طرفی روتنون به واسطه سرکوب مسیر سیگنالینگ Akt/PI3K به تشدید آپوپتوز منجر می‌شود [۱۱]. کاووری و همکاران نشان دادند تزریق درون صفاقی روتنون به تغییرات پارامترهای آنتی‌اکسیدانی و اکسیداتیو منجر شده است [۱۲]. بنابراین به‌خوبی

روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق از ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل به وزن تقریبی 20 ± 170 گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی آسان به آب و غذا و دمای اتاق $20-25$ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. کلیه مراحل مطابق با دستور کمیته اخلاقی آزمایش‌های حیوانی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد.

گروه‌بندی

موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه و هر گروه شامل ۶ سر موش تقسیم شدند: گروه روتنون تزریق داخل صفاقی ۵ میلی گرم بر کیلوگرم روتنون (سیگما آلدریج)، گروه اوارکتومی (دو طرفه)، گروه اوارکتومی + رسوراترول، گروه اوارکتومی + روتنون، گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول، داروها روزانه به مدت ۳ هفته تجویز شدند. رسوراترول به مقدار ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم گاوژ شد. در پایان موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۵ میلی گرم بر کیلوگرم (آلفاسان هلند) بی‌هوش شدند. نمونه‌های بافت هیپوکامپ جدا شدند (تصویر شماره ۱).

جراحی اوارکتومی

موش‌ها با استفاده از تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۵ میلی گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شدند و توسط برش کوچکی در ناحیه میانی تحتانی شکم، تخمدان‌ها خارج و انتهای لوله‌های فالوپ با استفاده از نخ بخیه به‌طور کامل بسته شد. پس از بخیه فاشیا، عضلات و پوست، دوره ریکاوری به مدت ۱۰ روز سپری شد [۴۱].

تزریق دارو

تزریق داروها ۱۰ روز (دوره ریکاوری) بعد از انجام اوارکتومی انجام شد. روتنون با مقدار ۵ میلی گرم بر کیلوگرم [۴۲، ۴۳] روزانه و به مدت ۲۱ روز به‌صورت درون صفاقی تزریق شدند. رسوراترول به‌صورت خوراکی به مدت ۲۱ روز، ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مقدار ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم گاوژ شد [۴۴].

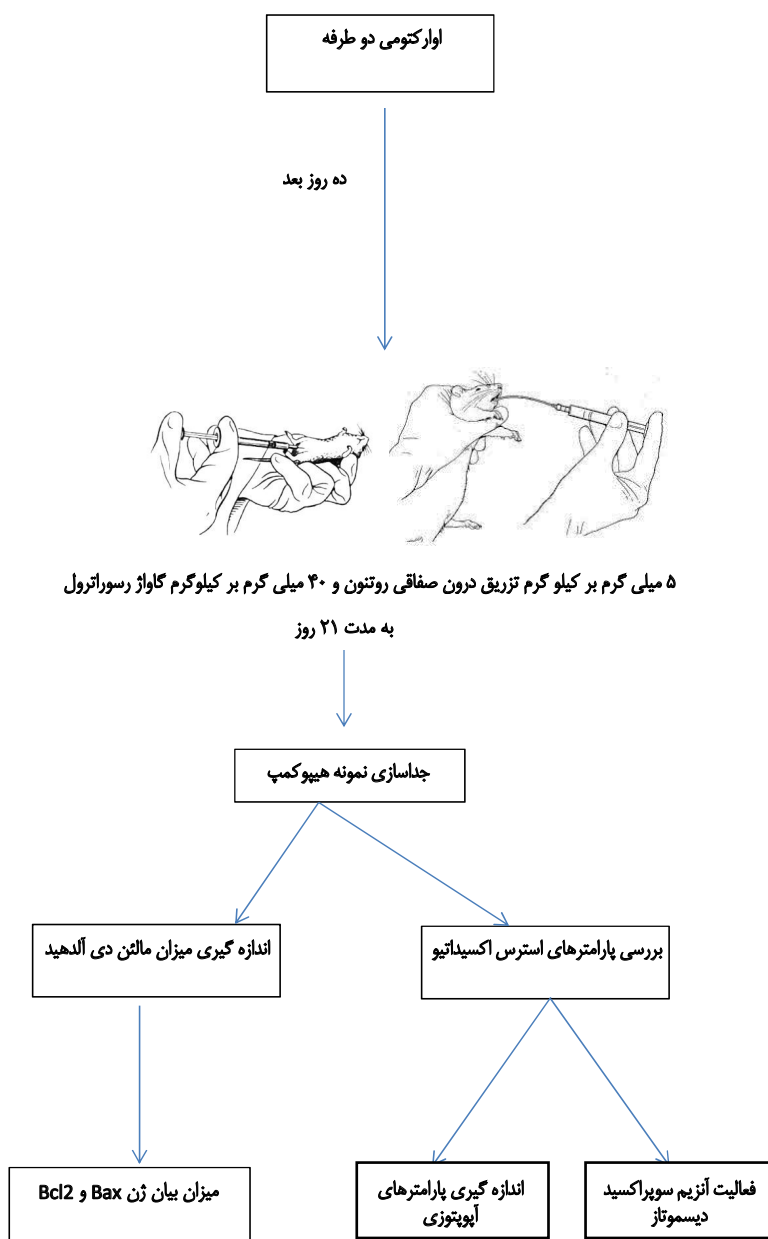
جداسازی بافت هیپوکامپ

به‌منظور سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آپوپتوزی در بافت هیپوکامپ، موش‌ها سربریده شدند و ناحیه هیپوکامپ مغز در دمای -80°C - درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. به منظور سنجش شاخص‌های آپوپتوزی به میکروتیوپ حاوی هیپوکامپ به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول RNeasy

مطالعات نشان داده‌اند رژیم غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان طبیعی به‌دلیل خواص مهار رادیکال آزاد یا اکسیژن فعال به‌طور بالقوه از آسیب اکسیداتیو و زوال شناختی جلوگیری می‌کند [۲۵-۲۸]. رسوراترول (۳، ۴، ۵ تری‌هیدروکسی - ترانس استیل بن، استیل بنوئید) ترکیب پلی‌فنولی متعلق به گروه فیتوالکسین به نام استیلین است. رسوراترول در بسیاری از گونه‌های گیاهی شامل توت، زغال اخته، تمشک، بادام زمینی و به‌خصوص پوست و هسته انگور قرمز وجود دارد [۲۹-۳۲]. رسوراترول دارای اثرات بیولوژیک متعدد است و در مدل‌های آزمایشگاهی بیماری صرع، آلزایمر، پارکینسون و اسکروز جانبی آمیوتروفیک اثرات مفیدی نشان داد [۳۳-۳۸]. رسوراترول در از بین بردن انواع اکسیدان‌ها مانند آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل، اکسید نیتروژن و پراکسی‌نیتريت بسیار مؤثر است. خواص آنتی‌اکسیدانی رسوراترول به وجود حلقه‌های فنلی با سه گروه هیدروکسیل در موقعیت‌های ۳، ۴ و ۵ و پیوند دوگانه کونژوگه و همچنین پتانسیل جداسازی الکترون در ساختار مولکول مرتبط است. درواقع رسوراترول با تعدیل بیان SIRT1 و در نتیجه پروتئین‌های غیرهیستونی مانند NF- κ B، p53 و PGC-1 α نقش قابل توجهی در دفاع آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوتیک در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند.

ترونگ و همکاران نشان دادند رسوراترول از طریق سرکوب فعال‌سازی IKK α و فسفوریلاسیون، تخریب I κ B α و همچنین از طریق مهار فعالیت‌های COX-2 و دکربوکسیلاز اورنیتین به مهار استرس اکسیداتیو و آپوپتوز منجر شده و در نتیجه از سلول‌ها و بافت‌ها محافظت می‌کند [۳۹]. همچنین وانگ و همکاران نشان دادند رسوراترول از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ SIRT1/Akt باعث سرکوب سمیت عصبی القاشده توسط روتنون شد [۴۰].

بنابراین باتوجه به افزایش فزاینده بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی و اختلالات تخریب‌کننده عصبی مرتبط با بسیاری از نوروتوکسین‌های محیطی همانند روتنون و درک مسیرهای مختلف التهابی، آپوپتوزی و استرس اکسیداتیو در عملکرد روتنون و از طرفی تعامل مسیرهای محافظتی از جمله نقش محافظتی استروژن در این مسیرها و نقش تعدیل‌کننده رسوراترول به‌عنوان پلی‌فنول شناخته‌شده با خواص ضدآپوپتوزی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی در مطالعه حاضر، این فرایند با به‌کارگیری حذف استروژن (برداشت تخمدان موش‌های صحرایی) و تجویز روتنون به‌عنوان سم کشاورزی در معرض مصرف‌کنندگان مواد غذایی و کشاورزان ارزیابی شد. از نظر مولکولی بررسی تغییر بیان ژن‌های Bcl2، Bax و فاکتور آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز در هیپوکامپ موش‌ها از اهداف مطالعه حاضر بود.



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۱. دیاگرام پروسه انجام کار

دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۳۰۰۰ مایع رویی جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در یخچال معمولی نگهداری شد. سپس با کمک سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه RNAlater از بافت هیپوکامپ جدا شد.

اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید^۲

هموژن هیپوکامپ

جهت اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید در بافت هیپوکامپ از کیت سنجش مالون دی آلدئید شرکت طب پژوهان رازی استفاده شد. به طور خلاصه در این روش مالون دی آلدئید موجود در

جهت هموژن کردن بافت مغز با استفاده از ترازو بافت هیپوکامپ وزن شد و به میزان ۳ برابر وزن نمونه به آن بافر فسفات سالین اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر با دور ۱۲۰ به مدت ۲۰ ثانیه بافت ها هموژن شدند و با استفاده از

2. Malondialdehyde (MDA)

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌ها

توالی پرایمر	نوع پرایمر
TTTTGCTACAGGTTTCATCC	Forward- BAX
CACATCAGCAATCATCCTCTG	Reverse- BAX
AGGATAACGGAGGCTGGGATG	Forward- Bcl2
GAGTGATGCAGGCCCCACC	Reverse- Bcl2
GACACCGCATCTTCTTG	Forward-GAPDH
GGTAACCAGGCGTCCGATAC	Reverse-GAPDH

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

معرف تترا بروموفنول آبی^۷ به همه چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شود. در نهایت، بلافاصله جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های آپوپتوز

طراحی پرایمر

پس از دانلود فرمت FASTA توالی mRNA ژن BAX, BCL2 و GAPDH موش صحرایی از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^۸، از نرم‌افزار الیگو^۹ برای طراحی پرایمر Forward و Reverse هریک از ژن‌ها استفاده شد (جدول شماره ۱). شرکت سینازن سنتز پرایمرها را انجام داد. پرایمرهای لیوفیلیزه تهیه‌شده از شرکت سینازن طبق دستورالعمل این شرکت با حجم مشخصی از آب دپس^{۱۰} رقیق شد. پرایمر استوک اصلی با غلظت ۱۰۰ پیکومول حاصل شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از بافت هیپوکامپ براساس دستورالعمل یادشده در کیت استخراج RNA شرکت پارس توس انجام شد. به‌طور خلاصه بدین روش انجام شد: ابتدا بافت هیپوکامپ با کمک اسکالپل به قطعات کوچک برش داده شد و ۲۰ میلی گرم از بافت به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و ۷۵۰ میکرولیتر محلول لیزکننده^{۱۱} به آن اضافه شد. سپس بافت به خوبی پیپتاژ شد و بعد ۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق، ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۳۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و فاز رویی به میکروتیوپ ۱/۵

نمونه‌ها با اسید تیوباربیتوریک^۳ واکنش داده و به تولید ترکیب مالون دی آلدئید-تیوباربیتوریک اسید^۴ منجر می‌شود که به سادگی با روش رنگ‌سنجی (۵۳۰-۵۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سنجش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت هیپوکامپ براساس درصد بازدارندگی این آنزیم در برابر اتواکسیداسیون پیروگالول برای هر نمونه‌ها در مقایسه با نمونه بلانک محاسبه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۰ نانومتر طی ۳ دقیقه ثبت شد. به‌طور خلاصه در این روش میزان بازدارندگی با اضافه کردن بافر سنجش به ۷۶۰ میکرولیتر از سوپرناتانت بافت هیپوکامپ انجام شد.

روش تهیه بافر سنجش

به ۵۰ سی‌سی از بافر سدیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار) تهیه شده، ۰/۰۰۱۸ گرم اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (۰/۱ میلی‌مولار) و ۰/۰۰۳ گرم پیروگالول (۴۸/۰ میلی‌مولار) اضافه شد [۴۵].

سنجش غلظت پروتئین

سنجش پروتئین در بافت هیپوکامپ براساس دستورالعمل یادشده در کیت سنجش پروتئین به روش برادفورد که از شرکت طب پژوهان رازی خریداری شده بود انجام شد. در این روش از تغییر رنگ کوماسی^۵ هنگام اتصال به پروتئین در محیط اسیدی استفاده می‌شود. به‌طور خلاصه اندازه‌گیری پروتئین بدین روش انجام شد: ابتدا ۱۰ میکرولیتر نمونه/استاندارد آلبومین سرم گاوی (بومین سرم آلبومین)^۶ به چاهک اضافه شد. سپس ۱۹۰ میکرولیتر

7. Tetrabromophenol Blue (TPB)
8. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
9. Oligo Primer Analysis
10. Water Depce
11. RNA Lysis Solution

3. Thiobarbituric Acid (TBA)
4. Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid (MDA-TBA)
5. Coomassie
6. Bovine Serum Albumin (BSA)

بررسی کارایی پرایمرها

جهت بررسی کارایی پرایمرها، رقت سریالی از cDNA نمونه با غلظت مشخص تهیه شد و Real-Time PCR این رقت‌ها طبق پروتکل بیان‌شده در بخش Real-Time PCR انجام شد. با تنظیم دستگاه، نمودار استاندارد رسم شد. با توجه به شیب خط که دستگاه نشان داد و فرمول مربوط به کارایی، کارایی پرایمر محاسبه شد.

Real-Time PCR

بعد از سنتز cDNA از RNA استخراج‌شده به روشی که در سطور قبل بیان شد، به منظور تعیین میزان بیان ژن‌های موردنظر از کیت سایبرگرین ریل تایم PCR شرکت **SimBio** استفاده شد. مواد موردنیاز برای هر نمونه طبق دستورالعمل کیت محاسبه شد. واکنش‌های PCR با انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و سپس ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد (برای Bcl-2) و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (برای Bax) برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه آغاز شد. جهت نرمال کردن داده‌ها از ژن کنترل داخلی گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) استفاده شد. روش پافل^{۱۵} برای تجزیه و تحلیل داده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در استفاده شده است. وجود قله منفرد در منحنی ذوب هریک از نمونه‌ها مؤید تکثیر اختصاصی محصول Real-Time PCR بود.

اندازه‌گیری میزان بیان ژن

بعد از انجام Real-Time PCR مقادیر CT به دست آمده برای هریک از نمونه‌ها و برای هریک از ژن‌های BAX و Bcl2 و ژن کنترل داخلی (GAPDH) از دستگاه استخراج شد. جهت بررسی میزان بیان هریک از ژن‌ها از فرمول پافل استفاده شد.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از سنجش‌های بیوشیمیایی در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ با آنالیز آزمون آنووا^{۱۶} (آزمون توکی^{۱۷}) بررسی شدند و سطح معنی‌دار آزمون‌ها P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقدار مالون دی‌آلدهید

با حذف تخمدان‌ها بیش‌ترین مقدار مالون دی‌آلدهید در گروه اوارکتومی+ روتنون (۲/۲۲±۴۰/۰۶ میکرومول بر گرم) ثبت شد که

میلی لیتری جدید منتقل شد و به میزان برابر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. مخلوط به ستون چرخشی^{۱۲} منتقل شد و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محتویات کالکشن تیوپ تخلیه شد. در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر محلول مراحل شست‌وشو^{۱۳} اضافه و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محتویات کالکشن تیوپ تخلیه شد (مرحله ۷ تکرار شد). به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس Spin Column به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب دپس اضافه شد و ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و RNA استخراج‌شده در دمای ۸۰- ذخیره شد.

سنجش کیفیت و کمیت استخراج RNA

به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده و عدم آلودگی به پروتئین و DNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در این روش ۲ میکرولیتر از هر نمونه در مقابل بلانک خوانده شد. غلظت RNA برحسب نانوگرم، نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر (اگر اعداد حاصل از آن در حدود ۰±۲/۱۵ باشد نشان‌دهنده خلوص بالای RNA می‌باشد)، نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر (اگر اعداد حاصل از آن در حدود ۱/۸ تا ۲/۲ باشد درصد خلوص مناسب است) برای هر نمونه به دست آمد.

سنتز cDNA

به منظور سنتز cDNA از کیت استخراج RNA شرکت **پارس توس** مشهود استفاده شد. در این روش به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس^{۱۴} از RNAهای استخراج‌شده در مراحل قبلی، مولکول DNA مکمل یا همان (Complementary DNA) که موسوم به cDNA است، ساخته شد. به‌طور خلاصه ابتدا، نمونه‌های RNA استخراج‌شده اسپین شدند و به هر نمونه، مقدار مناسب مسترمیکس طبق دستورالعمل کیت اضافه شد و دوباره چرخانده شدند. در نهایت نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و به ترتیب در ۳ دمای مختلف قرار گرفتند. دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، جهت اتصال پرایمر، سپس اتصال آنزیم و سنتز cDNA است. دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد، جهت غیرفعال کردن آنزیم است و دمای سوم جهت خنک کردن نمونه. پس از اتمام واکنش، نمونه‌ها به فریز منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و در آنجا نگهداری شدند.

15. Pfaffl
16. One-way Anova
17. Tukey

12. Spin Column
13. Preparation Wash (PW)
14. Reverse Transcriptase

بحث

در مطالعه حاضر از روتنون به عنوان سم کشاورزی ایجادکننده اختلالات عصبی و از برداشتن تخمدان موش های صحرایی (حذف استروژن) جهت ایجاد مدل تجربی منوپوز استفاده شد و اثر حمایتی رسوراترول در برابر این آسیب در هیپوکامپ ارزیابی شد. بررسی بیان ژن های Bcl2 و Bax، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مقدار مالون دی آلدئید در هیپوکامپ موش ها از اهداف این مطالعه بود.

نتایج نشان داد روتنون در حضور استروژن به طور قابل توجهی به کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و همچنین بیان ژن Bcl2 و افزایش معنی دار مقدار مالون دی آلدئید و میزان بیان ژن BAX در هیپوکامپ منجر شد.

در همین راستا مطالعات یارمحمدی، پامیز و شیخپور نشان دادند روتنون با افزایش سطح بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و کاهش پارامترهای آنتی اکسیدانی به ایجاد بیماری تحلیل برنده عصبی پارکینسون در مدل حیوانی منجر شد. مواجهه با روتنون، مسیر پیام رسانی Keap1-Nrf2-ARE، عمده ترین مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو را تحت تأثیر قرار می دهد [۹-۱۱].

بنابراین شاخص های استرس اکسیداتیو و آپوپتوز یادشده در سطور قبل، برخی از نشانگرهای پاتولوژیک مواجهه با نوروتوکسین و در نتیجه ابتلای به بیماری های تحلیل برنده عصبی بود و تنظیم و بهبود این نشانگرها، اثرات سودمند و مفیدی در برابر تخریب عصبی ناشی از آسیب مغزی نشان داده است. باتوجه به عدم منع مصرف روتنون و در معرض قرار گرفتن افراد به طور غیرمستقیم و مستقیم به ویژه کشاورزان، به تقویت و استفاده از عوامل محافظتی در برابر این نوروتوکسین نیاز است. بنابراین، تصور می شود فعال سازی سیگنالینگ Nrf2 به عنوان تنظیم کننده اصلی بسیاری از ژن های دخیل در استرس آنتی اکسیدانی و در نهایت افزایش فعالیت آنتی اکسیدان های درون زاد و همچنین تنظیم بیان ژن های دخیل در مکانیسم آپوپتوز، استراتژی امیدوارکننده برای پیشگیری، درمان و یا جلوگیری از پیشرفت آسیب باشد. اثرات یائسگی بر تشدید بیماری های تخریب کننده عصبی، به خوبی در مدل های سلولی، حیوانی و مطالعات بالینی نشان داده شده است [۴۶].

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، حذف تخمدان در موش های صحرایی به طور قابل توجهی به کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بیان ژن Bcl2، افزایش معنی دار بیان ژن BAX و مقدار مالون دی آلدئید در هیپوکامپ منجر شد. از طرفی کاهش شاخص آنتی اکسیدانی و آنتی آپوپتوزی و افزایش شاخص پروآپوپتوزی یادشده در پژوهش حاضر گروه هایی که تزریق روتنون همراه با حذف تخمدان بود، تغییرات بیشتری نسبت به گروه هایی که در حضور تخمدان یا به عبارتی در حضور استروژن

افزایش معنی داری را نسبت به گروه اوارکتومی ($1/12 \pm 32/92$) میکرومول بر گرم) نشان داد ($P < 0/001$). مقدار مالون دی آلدئید در گروه اوارکتومی+رسوراترول ($0/97 \pm 21/42$) میکرومول بر گرم) نسبت به گروه اوارکتومی کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0/001$). رسوراترول به کاهش معنی دار مالون دی آلدئید در گروه اوارکتومی+روتنون+رسوراترول ($1/91 \pm 22/35$) میکرومول بر گرم) نسبت به گروه اوارکتومی+روتنون منجر شد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۲).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

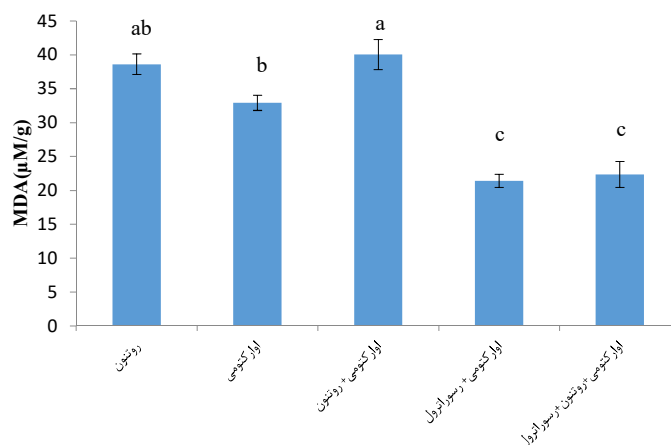
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($0/61 \pm 16/36$) واحد در میلی گرم) در گروه اوارکتومی+روتنون کاهش معنی داری را نسبت به گروه اوارکتومی ($1/58 \pm 70/69$) واحد در میلی گرم) نشان داد ($P < 0/001$). دریافت رسوراترول در گروه اوارکتومی+رسوراترول به افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم ($2/2 \pm 77/02$) واحد در میلی گرم) نسبت به گروه اوارکتومی منجر نشد. رسوراترول در گروه اوارکتومی+روتنون+رسوراترول نیز به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($1/94 \pm 57/9$) واحد در میلی گرم) نسبت به گروه اوارکتومی+روتنون منجر شد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۳).

میزان بیان ژن BAX

باتوجه به نتایج مندرج در تصویر شماره ۴ بیشترین میزان بیان ژن BAX در گروه اوارکتومی+روتنون ($0/05 \pm 5/9$) ثبت شد که افزایش معنی داری را نسبت به گروه اوارکتومی ($0/11 \pm 1/3$) نشان داد ($P < 0/001$). کاهش میزان بیان ژن BAX در گروه اوارکتومی+رسوراترول ($0/11 \pm 1/2$) نسبت به گروه اوارکتومی معنی دار نبود. رسوراترول به کاهش معنی دار میزان بیان ژن BAX در گروه اوارکتومی+روتنون+رسوراترول ($0/11 \pm 4/5$) نسبت به گروه اوارکتومی+روتنون منجر شد ($P < 0/001$).

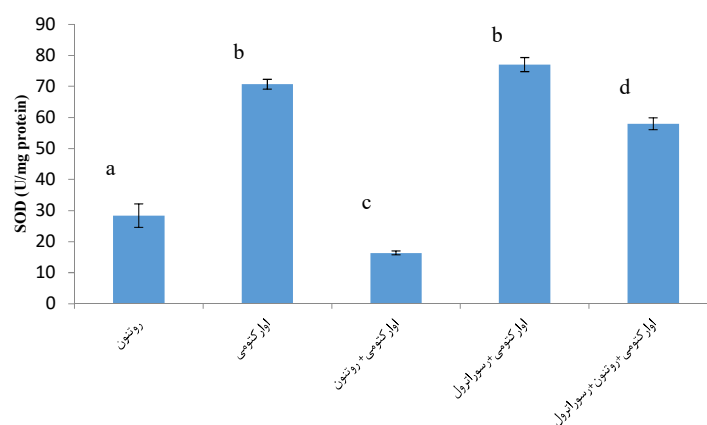
میزان بیان ژن Bcl2

کمترین میزان بیان ژن Bcl2 در گروه اوارکتومی+روتنون ($0/05 \pm 5/9$) ثبت شد که کاهش معنی داری را نسبت به گروه اوارکتومی ($0/05 \pm 0/93$) نشان داد ($P < 0/001$). میزان بیان ژن Bcl2 در گروه اوارکتومی+رسوراترول ($0/03 \pm 1/13$) به افزایش معنی دار این شاخص نسبت به گروه اوارکتومی منجر نشد. رسوراترول به افزایش معنی دار میزان بیان ژن Bcl2 در گروه اوارکتومی+روتنون+رسوراترول ($0/05 \pm 0/78$) نسبت به گروه اوارکتومی+روتنون منجر شد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۵).



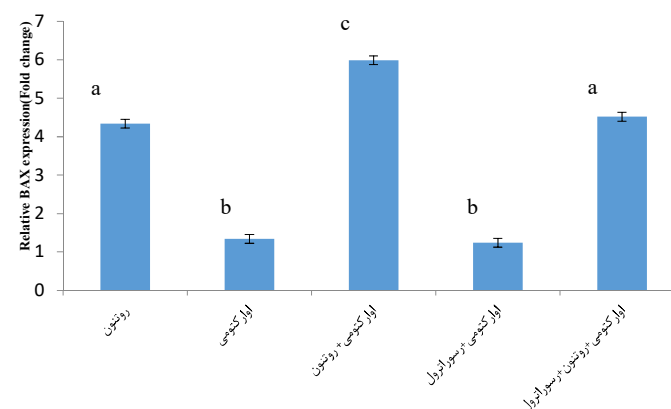
مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۲. مقدار مالون دی آلدئید در گروه‌های آزمایشی: نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. وجود حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی دار بین میانگین فعالیت آنزیم SOD است ($P \leq 0.05$).



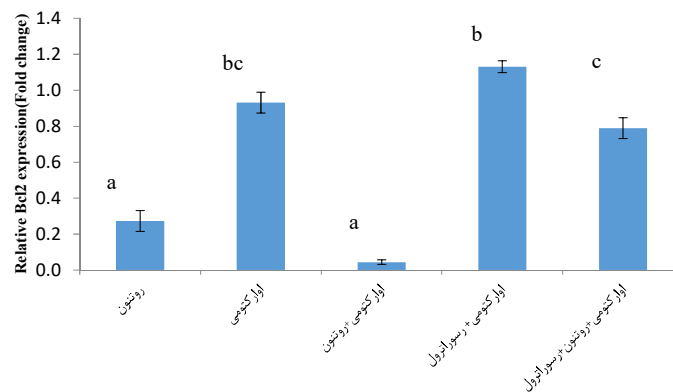
مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۳. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های آزمایشی: نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. وجود حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی دار بین میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است ($P \leq 0.05$).



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۴. بیان نسبی ژن BAX در گروه‌های آزمایشی: نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. وجود حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی دار بین میانگین بیان نسبی ژن BAX است ($P \leq 0.05$).



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۵. بیان نسبی ژن Bcl2 در گروه‌های آزمایشی: نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. وجود حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی دار بین میانگین بیان نسبی ژن Bcl2 است ($P \leq 0.05$).

به واسطه خاصیت عبور از سد خونی-مغزی [۵۰] و نقش تنظیمی رسوراترول در چندین مسیر سیگنالینگ عصبی، به انتخاب این آنتی اکسیدان به عنوان کاندیدای اثر محافظت نورونی منجر شد.

در مطالعه حاضر رسوراترول فعالیت SOD و بیان ژن Bcl2 را در هیپوکامپ گروه اوار کتومی + روتنون + رسوراترول به صورت معنی داری افزایش داد. علاوه بر این رسوراترول بیان ژن BAX و مقدار MDA را به صورت معنی داری کاهش داد.

در راستای نقش محافظت نورونی رسوراترول، مطالعه کومار و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد تجویز رسوراترول با مهار ROS در مخچه و القای انتقال Nrf2 از سیتوپلاسم به هسته و تنظیم بیان و فعالیت ژن‌های هدف پایین دست آن مانند سوپراکسید دیسموتاز، NADPH کوئینون اکسید و ردوکتاز ۱ از آپوپتوز ناشی از اتانول جلوگیری می‌کند [۵۱]. مسیر پیام رسانی Nrf2/ARE که از مسیرهای سرکوب شونده توسط نوروتوکسین روتنون بود و مکانیسم محافظتی استروژن می‌باشد و باتوجه به آنچه در مطالب یادشده، رسوراترول نیز با تنظیم افزایشی این مسیر و افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش محافظت عصبی خود را ایفا می‌کند. بنابراین در پژوهش حاضر مسیر پیام رسانی Nrf2/ARE و به ویژه تنظیم بیان پروتئین Nrf2 می‌تواند مکانیسم احتمالی مشترکی باشد که به واسطه آن رسوراترول و استروژن اثر خود را در گروه‌هایی که در حضور استروژن و رسوراترول، تحت تأثیر روتنون قرار گرفتند اعمال کردند.

علاوه بر این سانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند رسوراترول به واسطه تنظیم افزایشی نسبت Bcl-2/Bax و تنظیم کاهش بیان پروتئین Bax و سیتوکروم C باعث کاهش آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مدل پیری موش صحرایی می‌شود، همچنین رسوراترول به تنظیم سطوح SOD، CAT، و GSH و سطح MDA در هیپوکامپ منجر شد [۱۸].

در معرض روتنون قرار گرفتند داشتند و مؤید این مطلب است که حذف تخمدان به واسطه کاهش استروژن به تشدید فاکتورهای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از آسیب در بافت هیپوکامپ مغز منجر می‌شود.

استروژن می‌تواند با بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی درون‌زا و تنظیم بیان پروتئین‌های دخیل در مرگ برنامه ریزی شده سلول، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز و در نتیجه تخریب عصبی را در مدل حیوانی ¹⁸SWI و مدل سمیت عصبی ناشی از روتنون و ۶-هیدروکسی دوپامین را کاهش دهد [۴۷-۴۹].

باتوجه به عملکرد شناختی و نقش محافظت عصبی استروژن حاصل از تخمدان‌ها در دستگاه عصبی و نقش محافظتی آن در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی از جمله آلزایمر و پارکینسون، در چند دهه گذشته در استروژن درمانی استفاده می‌شود، اما عوارض جانبی ناشی از استفاده طولانی مدت آن که خطر ابتلا به برخی بیماری‌ها را افزایش می‌دهد، بسیار نگران کننده است [۲۴]. باتوجه به نقش محوری استرس اکسیداتیو در شروع و پیشرفت بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و تشدید استرس اکسیداتیو در افراد منوپوز در معرض آفت کش روتنون، جست‌وجو برای ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی توجه بسیاری را به خود جلب می‌کند.

ترکیب‌های طبیعی با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و یا جلوگیری از اثرات مضر ROS، استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون را کاهش می‌دهند. بنابراین آنتی اکسیدان‌های طبیعی مانند رسوراترول می‌تواند در این شرایط مفید باشند. از اثرات بیولوژی رسوراترول شامل خواص آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوزی و خواص اتوفازیک و همچنین بهبود جریان خون مغزی و افزایش انعطاف پذیری سیناپسی است [۳۳]. در مجموع

18. Stab Wound Injury (SWI)

حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان های تأمین مالی در بخش های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی و طراحی مطالعه: حسین نجف زاده ورزی، احمدعلی معاضدی و محبوبه آقاگل زاده؛ تحلیل و تفسیر داده ها و تحلیل آماری: محبوبه آقاگل زاده و حسین نجف زاده ورزی؛ تهیه پیش نویس دست نوشته: محبوبه آقاگل زاده؛ جذب منابع مالی و حمایت اداری، فنی یا موادی: احمدعلی معاضدی و حسین نجف زاده ورزی؛ نظارت بر مطالعه: حسین نجف زاده ورزی، احمدعلی معاضدی، هادی پارسیان؛ بازبینی نقادانه دست نوشته: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز و معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای تخصیص پژوهانه و دانشگاه علوم پزشکی بابل در مراحل اجرای این پژوهش قدردانی می کنند.

با تأثیر رسوراترول بر شاخص اکسیداتیوی و آپوپتوزی پژوهش حاضر مطابقت داشت. همچنین اوتی و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند رسوراترول با کاهش کاسپاز ۳ و ۹ و نسبت Bax/Bcl-2 می تواند به عنوان آنتی اکسیدان و عامل درمانی در برابر استرس اکسیداتیو عصبی ناشی از هیپوکسی و بیماری های تحلیل برنده عصبی عمل کند [۵۲] که تمام این مطالعات مشابه با نتایج پژوهش حاضر در مورد نقش محافظت نورونی رسوراترول به واسطه تنظیم افزایشی شاخص های آنتی اکسیدانی و آنتی آپوپتوزی و تنظیم کاهشی شاخص آپوپتوزی BAX بودند.

نتیجه گیری

به طور خلاصه، اوارکتومی به کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، افزایش مقدار مالون دی آلدید و بیان ژن Bax منجر شد اما تأثیری بر بیان ژن Bcl2 نداشت. روتنون همراه با اوارکتومی کاهش قابل توجهی بر فعالیت آنزیم و بیان ژن Bcl2 و افزایش چشمگیری بر مقدار MDA و میزان بیان ژن Bax نشان داد. مصرف رسوراترول در موش های گروه اوارکتومی به کاهش قابل توجه در مقدار MDA منجر شد و تأثیر چندانی بر بیان ژن Bcl2 و Bax و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نداشت. در صورتی که مصرف هم زمان رسوراترول و روتنون در موش های اوارکتومی شده به افزایش قابل توجهی در فعالیت این آنزیم و میزان بیان ژن Bcl2 و همچنین کاهش مقدار MDA و بیان ژن Bax منجر شد. به طور کلی، رسوراترول توانست اثر روتنون و نبود استروژن را در تغییرات ناشی از روتنون و اوارکتومی را در آپوپتوز و استرس اکسیداتیو اصلاح کند.

از این رو پژوهش حاضر نیز هم راستا با دیگر پژوهش ها پیشنهاد می کند از رسوراترول برای بهبود بیومارکرهای کلیدی مؤثر در بیماری های تخریب عصبی در افراد با ریسک بالای ابتلا به این بیماری ها به ویژه کشاورزان و افراد منوپوز استفاده شود. همچنین جهت تکمیل و تداوم این کار تحقیقاتی، بررسی تغییرات پروتئین های SIRT، Nrf2 و NF-kB و مسیر پیام رسانی آن ها و وابستگی و تأثیر آن ها بر شاخص های مورد بررسی در پژوهش حاضر و همچنین بررسی تأثیر جایگزینی استروژن درمانی با غلظت های مختلف به جای استروژن درون زا (ترشح شده از تخمدان) بر شاخص های استرس اکسیداتیو و آپوپتوزی پیشنهاد می شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز (EE.1400.3.02.10568) تصویب شد.

References

- [1] Babazadeh A, Vahed FM, Liu Q, Siddiqui SA, Kharazmi MS, Jafari SM. Natural bioactive molecules as neuromedicines for the treatment/prevention of neurodegenerative diseases. *ACS Omega*. 2023; 8(4):3667-83. [DOI:10.1021/acsomega.2c06098] [PMID]
- [2] Davenport F, Gallacher J, Kourtzi Z, Koychev I, Matthews PM, Oxtoby NP, et al. Neurodegenerative disease of the brain: A survey of interdisciplinary approaches. *Journal of the Royal Society Interface*. 2023; 20(198):20220406. [DOI:10.1098/rsif.2022.0406] [PMID]
- [3] Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladăncu O, Roza E, et al. An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(11):5938. [DOI:10.3390/ijms23115938] [PMID]
- [4] Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS, Kanthasamy AG. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*. 2019; 138(3):343-62. [DOI:10.1007/s00401-019-02033-9] [PMID]
- [5] Sivagurunathan N, Gnanasekaran P, Calivarathan L. Mitochondrial toxicant-induced neuronal apoptosis in Parkinson's Disease: What we know so far. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. 2023; 13:1-13. [DOI:10.2147/DNND.S361526] [PMID]
- [6] Oguh CE, Okpaka CO, Ubani CS, Okekeaji U, Joseph PS, Amadi EU. Natural pesticides (biopesticides) and uses in pest management-A critical review. *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*. 2019; 2(3):1-18. [Link]
- [7] Chiaradia E, Renzone G, Scaloni A, Caputo M, Costanzi E, Gambelunghe A, et al. Protein carbonylation in dopaminergic cells exposed to rotenone. *Toxicology Letters*. 2019; 309:20-32. [DOI:10.1016/j.toxlet.2019.04.002] [PMID]
- [8] Lawana V, Cannon JR. Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Advances in Neurotoxicology*. 2020; 4:209-54. [DOI:10.1016/bs.ant.2019.11.004]
- [9] Pamies D, Block K, Lau P, Gribaldo L, Pardo CA, Barreras P, et al. Rotenone exerts developmental neurotoxicity in a human brain spheroid model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018; 354:101-14. [DOI:10.1016/j.taap.2018.02.003] [PMID]
- [10] Sheikhpour E, Mard SA, Farbood Y, Bavarsad K, Sarkaki A. The effects of gallic acid and vagotomy on motor function, intestinal transit, brain electrophysiology and oxidative stress alterations in a rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *Life Sciences*. 2023; 315:121356. [DOI:10.1016/j.lfs.2022.121356] [PMID]
- [11] Yarmohammadi F, Wallace Hayes A, Najafi N, Karimi G. The protective effect of natural compounds against rotenone-induced neurotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020; 34(12):e22605. [DOI:10.1002/jbt.22605] [PMID]
- [12] Kavuri S, Sivanesan S, Rajagopalan V. Oxidative stress and antioxidant status in rotenone induced rat Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2020; 11(1):1-5. [DOI:10.26452/ijrps.v11i1.1776]
- [13] McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: A brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005; 59(4):139-42. [DOI:10.1016/j.biopha.2005.03.005] [PMID]
- [14] Aborode AT, Pustake M, Awuah WA, Alwerdani M, Shah P, Yarlagadda R, et al. Targeting oxidative stress mechanisms to treat Alzheimer's and Parkinson's disease: A critical review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022; 2022:7934442. [DOI:10.1155/2022/7934442] [PMID]
- [15] Yan W, Wu J, Song B, Luo Q, Xu Y. Retraction Note to: Treatment with a brain-selective prodrug of 17 β -estradiol improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by regulating klf5-NF- κ B pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2021; 394(9):1989. [DOI:10.1007/s00210-021-02121-2] [PMID]
- [16] Makav M, Eroğlu HA. Recuperative effect of estrogen on rotenone-induced experimental model of Parkinson's disease in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021; 28(17):21266-75. [DOI:10.1007/s11356-020-11985-5] [PMID]
- [17] Shvetsov A, Ruitenberg MJ, Delerue F, Gold WA, Brown DA, Finney CA. The neuroprotective effects of estrogen and estrogenic compounds in spinal cord injury. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2023; 146:105074. [DOI:10.1016/j.neubiorev.2023.105074] [PMID]
- [18] Song YJ, Li SR, Li XW, Chen X, Wei ZX, Liu QS, et al. The effect of estrogen replacement therapy on Alzheimer's disease and Parkinson's disease in postmenopausal women: A meta-analysis. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14:157. [DOI:10.3389/fnins.2020.00157] [PMID]
- [19] Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008; 29(4):507-19. [DOI:10.1016/j.yfrne.2008.04.001] [PMID]
- [20] Banks WA. Brain meets body: The blood-brain barrier as an endocrine interface. *Endocrinology*. 2012; 153(9):4111-9. [DOI:10.1210/en.2012-1435] [PMID]
- [21] Won CK, Kim MO, Koh PO. Estrogen modulates Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2006; 68(3):277-80. [DOI:10.1292/jvms.68.277] [PMID]
- [22] Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Sexual hormones regulate the redox status and mitochondrial function in the brain. *Pathological implications*. *Redox Biology*. 2020; 31:101505. [DOI:10.1016/j.redox.2020.101505] [PMID]
- [23] Azam S, Lange T, Huynh S, Aro AR, von Euler-Chelpin M, Vejborg I, et al. Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: A cohort study. *Cancer Causes & Control*. 2018; 29(6):495-505. [DOI:10.1007/s10552-018-1033-0] [PMID]
- [24] Cagnacci A, Venier M. The controversial history of hormone replacement therapy. *Medicina*. 2019; 55(9):602. [DOI:10.3390/medicina55090602] [PMID]

- [25] Acero N, Ortega T, Villagrasa V, Leon G, Muñoz-Mingarro D, Castillo E, et al. Phytotherapeutic alternatives for neurodegenerative dementias: Scientific review, discussion and therapeutic proposal. *Phytotherapy Research*. 2023; 37(3):1176-211. [DOI:10.1002/ptr.7727] [PMID]
- [26] Luthra R, Roy A. Role of medicinal plants against neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022; 23(1):123-39. [DOI:10.2174/1389201022666210211123539] [PMID]
- [27] Rana K, Gautam P. A review on antioxidants as therapeutic in use of oxidative stress and neurodegenerative disease. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2022; 13(1):77-82. [Link]
- [28] Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Volceanov A, Teleanu DM. Antioxidant therapies for neuroprotection-A review. *Journal of Clinical Medicine*. 2019; 8(10):1659. [DOI:10.3390/jcm8101659] [PMID]
- [29] Fonseca-Santos B, Chorilli M. The uses of resveratrol for neurological diseases treatment and insights for nanotechnology based-drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 589:119832. [DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119832] [PMID]
- [30] Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules*. 2021; 26(1):229. [DOI:10.3390/molecules26010229] [PMID]
- [31] Gu J, Li Z, Chen H, Xu X, Li Y, Gui Y. Neuroprotective effect of trans-resveratrol in mild to moderate Alzheimer disease: A randomized, double-blind trial. *Neurology and Therapy*. 2021; 10(2):905-17. [DOI:10.1007/s40120-021-00271-2] [PMID]
- [32] Jardim FR, de Rossi FT, Nascimento MX, da Silva Barros RG, Borges PA, Prescilio IC, et al. Resveratrol and brain mitochondria: A review. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55(3):2085-101. [DOI:10.1007/s12035-017-0448-z] [PMID]
- [33] Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, Dos Santos SM, Rodrigues CA, Gonçalves PR, et al. Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: Role of SIRT1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 2018:8152373. [DOI:10.1155/2018/8152373] [PMID]
- [34] Acungil ZK, Nacar T. Effect of resveratrol on a penicillin-induced epilepsy model in rats. *Archives of Epilepsy*. 2022; 28(2):78-84. [Link]
- [35] Chinraj V, Raman S. Neuroprotection by resveratrol: A review on brain delivery strategies for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2022; 12(7):001-17. [DOI:10.7324/JAPS.2022.120701]
- [36] Kung HC, Lin KJ, Kung CT, Lin TK. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neuroprotection of polyphenols with respect to resveratrol in Parkinson's disease. *Biomedicines*. 2021; 9(8):918. [DOI:10.3390/biomedicines9080918] [PMID]
- [37] Sarroca S, Gatiús A, Rodríguez-Farré E, Vilchez D, Pallàs M, Griñán-Ferré C, et al. Resveratrol confers neuroprotection against high-fat diet in a mouse model of Alzheimer's disease via modulation of proteolytic mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021; 89:108569. [DOI:10.1016/j.jnutbio.2020.108569]
- [38] Zamora-Bello I, Rivadeneyra-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Anticonvulsant effect of turmeric and resveratrol in lithium/pilocarpine-induced status epilepticus in wistar rats. *Molecules*. 2022; 27(12):3835. [DOI:10.3390/molecules27123835]
- [39] Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*. 2018; 44(1):36-49. [DOI:10.1002/biof.1399] [PMID]
- [40] 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. *The Anatomical Record*. 2018; 301(6):1115-25. [DOI:10.1002/ar.23781] [PMID]
- [41] Sharifi F, Reisi P, Malek M. The effects of estrogen on passive avoidance memory impairment induced by acute kidney injury in ovariectomized rats. *Journal of Isfahan Medical School*. 2019; 37(515):86-92. [DOI:10.22122/jims.v37i515.11140]
- [42] Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2009; 34(2):279-90. [DOI:10.1016/j.nbd.2009.01.016] [PMID]
- [43] Jiang XW, Qiao L, Feng XX, Liu L, Wei QW, Wang XW, et al. Rotenone induces nephrotoxicity in rats: Oxidative damage and apoptosis. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2017; 27(7):528-36. [DOI:10.1080/15376516.2017.1333553] [PMID]
- [44] Abdu SB, Al-Bogami FM. Influence of resveratrol on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019; 26(1):201-9. [DOI:10.1016/j.sjbs.2017.09.003] [PMID]
- [45] Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 236(1-2):7-12. [DOI:10.1023/A:1016103131408] [PMID]
- [46] Cheng YJ, Lin CH, Lane HY. From menopause to neurodegeneration-molecular basis and potential therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(16):8654. [DOI:10.3390/ijms22168654] [PMID]
- [47] Luine V, Frankfurt M. Estrogenic regulation of memory: The first 50 years. *Hormones and Behavior*. 2020; 121:104711. [DOI:10.1016/j.yhbeh.2020.104711] [PMID]
- [48] Saeed K, Jo MH, Park JS, Alam SI, Khan I, Ahmad R, et al. 17 β -Estradiol abrogates oxidative stress and neuroinflammation after cortical stab wound injury. *Antioxidants*. 2021; 10(11):1682. [DOI:10.3390/antiox10111682] [PMID]
- [49] Shen D, Tian X, Zhang B, Song R. Mechanistic evaluation of neuroprotective effect of estradiol on rotenone and 6-OHDA induced Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*. 2017; 69(6):1178-85. [DOI:10.1016/j.pharep.2017.06.008] [PMID]
- [50] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006; 5(6):493-506. [DOI:10.1038/nrd2060] [PMID]

- [51] Kumar A, Singh CK, LaVoie HA, DiPette DJ, Singh US. Resveratrol restores Nrf2 level and prevents ethanol-induced toxic effects in the cerebellum of a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders. *Molecular Pharmacology*. 2011; 80(3):446-57. [\[DOI:10.1124/mol.111.071126\]](#) [\[PMID\]](#)
- [52] Auti A, Alessio N, Ballini A, Dioguardi M, Cantore S, Scacco S, et al. Protective effect of resveratrol against hypoxia-induced neural oxidative stress. *Journal of Personalized Medicine*. 2022; 12(8):1202. [\[DOI:10.3390/jpm12081202\]](#) [\[PMID\]](#)