Original Article

The effect of resveratrol on changes of oxidative stress factors induced by rotenone in hippocampus of ovariectomized rats

Aghagolzadeh M[1], Moazedi AA[2], Najafzadehvarzi H[2*], Parsian H[2]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Shahid Chamran of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.
2- Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R. Iran.

Received: 2023/01/1 | Accepted: 2023/04/17

Abstract:

Background: Rotenone as a pesticide, damages the nervous system by oxidative stress. According to the published articles that reported the protective role of estrogen in the nervous system and resveratrol against oxidative stress, in this study, the protective effect of resveratrol was evaluated on oxidative stress factors induced by rotenone in hippocampus at present and absence of estrogen in female ovariectomized rats.

Materials and Methods: Forty-eight female rats were respectively divided groups and treated with saline, rotenone, ovariectomized, resveratrol, ovariectomized+rotenone, ovariectomized+resveratrol, rotenone+resveratrol and ovariectomized+rotenone+resveratrol. Rotenone was administrated intraperitoneally and resveratrol was given orally every day for 21 days. At the end of experiment, malondialdehyde and glutathione level, catalase, and glutathione peroxidase activity in hippocampus were evaluated. Also, estrogen and progesterone in serum were measured.

Results: Rotenone significantly decreased estrogen and progesterone. Furthermore, glutathione level and glutathione peroxidase and catalase activity reduced, while malondialdehyde significantly increased. Although, estrogen and progesterone and glutathione and catalase significantly decreased in ovariectomized group, but malondialdehyde significantly increased. Resveratrol could significantly increase estrogen and progesterone in resveratrol+rotenone and resveratrol+ovariectomized groups. It significantly increased glutathione, glutathione peroxidase and catalase in the intact ovariectomized rats that received rotenone, while reduced malondialdehyde in the rotenone, ovariectomized and ovariectomized+rotenone groups were observed.

Conclusion: Resveratrol was able to reduce the oxidative stress which induced by rotenone and absence of estrogen in the hippocampal tissue of rats.

Keywords: Resveratrol, Rotenone, Oxidative stress, Hippocampus, Ovariectomized rat

***Corresponding Author**
Email: najafzadehvarzi@yahoo.com
Tel: 0098 113 219 9592
Fax: 0098 113 219 0181

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2023; Vol. 27, No 2, Pages 118-130

Please cite this article as: Aghagolzadeh M, Moazedi AA, Najafzadehvarzi H, Parsian H. The effect of resveratrol on changes of oxidative stress factors induced by rotenone in hippocampus of ovariectomized rats. ***Feyz*** 2023; 27(2): 118-30.

اثر رسوراترول بر تغییر فاکتورهای استرس اکسیداتیو القاشده توسط روتنون در هیپوکامپ رت‌های اوارکتومی‌شده

محبوبه آقاگل‌زاده [۱]، احمدعلی معاضدی [۲]، حسین نجف‌زاده [۳*]، هادی پارسیان [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: روتنون به‌عنوان آفت‌کش، به‌واسطه استرس اکسیداتیو به سیستم عصبی آسیب می‌رساند. با توجه به نقش محافظتی استروژن در سیستم عصبی و اثرات محافظتی رسوراترول در برابر استرس اکسیداتیو، در این مطالعه نقش حفاظتی رسوراترول بر تغییر فاکتورهای استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون در هیپوکامپ در حضور و عدم حضور استروژن در موش‌های ماده اوارکتومی‌شده و سالم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۴۸ سر موش صحرایی ماده به ۸ گروه ۶ تایی شامل کنترل (سالین)، روتنون، اوارکتومی، رسوراترول، اوارکتومی + روتنون، اوارکتومی + رسوراترول، روتنون + رسوراترول و اوارکتومی + روتنون + رسوراترول تقسیم شدند. روتنون به‌صورت داخل صفاقی و رسوراترول به‌صورت خوراکی مدت ۲۱ روز تجویز شد. در پایان، مقدار مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون، فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در هیپوکامپ و استروژن و پروژسترون در سرم اندازه‌گیری شد.

نتایج: روتنون به‌طور معنی‌داری سطح استروژن و پروژسترون و گلوتاتیون و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را کاهش داد و مالون‌دی‌آلدئید را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. استروژن و پروژسترون و گلوتاتیون و کاتالاز در گروه اوارکتومی به‌طور معنی‌داری کاهش و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. رسوراترول، استروژن و پروژسترون را در گروه‌های رسوراترول + روتنون و رسوراترول + اوارکتومی به‌طور قابل‌توجهی افزایش داد و نیز گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را در موش‌های اوارکتومی + روتنون + رسوراترول، به‌طور قابل‌توجهی بالا برد. همچنین رسوراترول، به‌طور قابل‌توجهی مالون‌دی‌آلدئید را در گروه روتنون، اوارکتومی و اوارکتومی + روتنون کاهش داد.

نتیجه‌گیری: رسوراترول، استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون و عدم وجود استروژن را درهیپوکامپ موش‌ها کاهش داد.

واژگان کلیدی: رسوراترول، روتنون، استرس اکسیداتیو، هیپوکامپ، اوارکتومی

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲، صفحات ۱۳۰-۱۱۸

مقدمه

اگرچه آفت‌کش‌ها به‌عنوان ابزاری ضروری برای کنترل آفات در کشاورزی به‌کار می‌روند، اما شواهد نشان می‌دهند که قرارگرفتن در معرض آفت‌کش‌های محیطی مانند روتنون با بسیاری از اختلالات عصبی و رفتاری بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون مرتبط است [۱-۳].

۱. دانشجوی دکترای فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۱۱۳۲۱۹۹۵۹۲ **دورنویس:** ۰۱۱۳۲۱۹۰۱۸۱

پست الکترونیک: h.najafzadeh@mubabol.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۲/۱/۲۸

روتنون با مهار کمپلکسI میتوکندری و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد منجر به استرس اکسیداتیو سلولی می‌گردد. علاوه‌بر این روتنون از طریق سرکوب مسیر سیگنالینگ Nrf2 و بیان ژن هدف آن منجر به کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد که نهایتاً منجر به تشدید استرس اکسیداتیو می‌شود [۳]. استرس اکسیداتیو اصلی‌ترین عامل پاتولوژی در تشدید و پیشرفت بسیاری از اختلالات عصبی است که با عدم تعادل بین پرواکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به مرگ سلول‌های عصبی می‌شود [۴]. در مطالعه‌ای Fikry و همکارانش نشان دادند که روتنون به واسطه افزایش مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان پارامتر اکسیداتیو و کاهش پارامترهای آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز، منجر به نورودژنراتیو می‌شود [۵]. همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داد که در مدل‌های حیوانی روتنون، سطح بالایی از پروتئین‌های کربونیله و مارکر اکسیداسیون پروتئین‌ها در مناطق مختلف مغز مشاهده شده است [۶]. مطالعات اولیه نشان دادند که استروژن فقط در تنظیم چرخه‌های قاعدگی و رفتار جنسی نقش دارد، اما امروزه واضح شده است که استروژن بر عملکردهای عصبی نیز تأثیر می‌گذارد [۷-۱۰]. همچنین مطالعه اپیدمیولوژیک نشان داده

است که بروز اختلالات عصبی چون پارکینسون در مردان بیشتر از زنان است، که این موضوع نشان‌دهنده تأثیر محافظتی هورمون جنسی زنانه استروژن است [۱۱]. استروژن با فعال‌کردن چندین پاسخ محافظت‌کننده عصبی - مولکولی و سلولی، نقش مهمی در عملکردهای عصبی از جمله یادگیری و حافظه دارد و حذف آن به‌شدت با شرایط تخریب عصبی مرتبط است [۱۲]. همچنین نشان داده شده است که با کاهش استروژن در دوره‌ی یائسگی، خطر ابتلا به بیماری‌های عصبی در زنان افزایش می‌یابد [۱۳]. Luine در مطالعه خود استروژن را به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده در حافظه به‌واسطه افزایش تراکم خارهای دندریتی در هیپوکامپ معرفی کرد [۱۴]. علاوه‌بر این، استروژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میتوکندری را فعال و تولید رادیکاهای آزاد را مهار می‌کند [۱۵]. مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که، استروژن اثرات بالقوه‌ای در بهبود عملکرد شناختی و حفاظت اکسیداتیو در مدل حیوانی بیماری آلزایمر دارد [۱۶]. همچنین بررسی دیگر بیان کرد که استروژن‌درمانی به طور قابل‌توجهی، تشدید و پیشرفت بیماری آلزایمر را در زنان یائسه کاهش داد [۱۷]. استروژن اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدّآپوپتوز و ضدّالتهابی در برابر تخریب عصبی را از طریق فعال‌کردن چندین مسیر درون‌سلولی اعمال می‌کند و درنتیجه بر رونویسی ژن‌های هدف محافظت‌کننده عصبی در مغز تأثیر می‌گذارد [۱۰، ۱۸]. اگرچه استروژن‌درمانی در چند دهه اخیر مورد استفاده قرار گرفته است اما شواهد نشان می‌دهد که خطر ابتلا به برخی بیماری‌ها به‌عنوان مثال، بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان سینه و غیره برای زنان با مصرف طولانی‌مدت استروژن افزایش یافته است [۱۹،۲۰]. رسوراترول، ترکیب پلی‌فنولی با منشأ گیاهی است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی مانند توت، بادام‌زمینی و انگور یافت می‌شود و با عبور از سدّ خونی مغزی از بروز اختلال ردوکس در مغز جلوگیری می‌کند [۲۵-۲۱]. بسیاری از مطالعات نشان دادند که رسوراترول می‌تواند منجر به جلوگیری و یا کندشدن پیشرفت اختلالات نورودژنراتیو شود [۲۳،۲۶،۲۷]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که رسوراترول از طریق کاهش استرس اکسیداتیو به‌واسطه فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ SIRT1/Akt، منجر به سرکوب سمیت عصبی القاشده توسط روتنون می‌شود و اثر محافظت‌کننده عصبی دارد [۲۷]. در مطالعه اخیر که توسط Zhang و همکارانش انجام شد، بر نقش رسوراترول در یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی مبتلا به زوال عقل عروقی (VD) تاکید و نشان داده شد که رسوراترول با کاهش مقدار MDA، بیان Bax و caspase-3 و افزایش بیان SOD و Bcl-2 هیپوکامپی به‌واسطه مهار آپوپتوز و استرس اکسیداتیو، به‌طور قابل‌توجهی یادگیری فضایی و حافظه موش‌های صحرایی VD را بهبود می‌بخشید [۲۸]. Xia و همکاران نشان دادند که درمان با رسوراترول منجر به تنظیم افزایشی چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی ازجمله SOD، GPx و CAT و تنظیم کاهشی NADPH اکسیداز شده و باعث کاهش سطح سوپراکسید و اکسیداتیو در مدل آپولیپوپروتئین E گردید [۲۹]. همان‌طور که در بالا ذکر شد، هم‌پوشانی در مسیر عملکردی استروژن و رسوراترول به‌طور بالقوه اثرات سودمندی را در اختلالات عصبی اعمال می‌کند. مطالعه حاضر تأثیر برهمکنش استروژن و رسوراترول را بر استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون در هیپوکامپ موش‌های سالم و اوارکتومی بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق از ۴۸ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار تهیه‌شده از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل (بابل، ایران) به وزن تقریبی ۲۰±۱۷۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی آسان به آب و غذا دمای اتاق ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. کلیه مراحل مطابق با دستور کمیته اخلاقی آزمایش‌های حیوانی دانشگاه شهید چمران اهواز با کد اخلاق: EE/1400/3/02/10568/scu.ac.ir انجام گرفت.

گروه‌بندی

موش‌ها به‌طور تصادفی به ۸ گروه و هر گروه شامل ۶ سر موش تقسیم شدند: گروه کنترل (C) (دریافت سالین)، گروه روتنون (R) تزریق داخل‌صفاقی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روتنون (سیگما آلدریچ)، گروه رسوراترول (Res) (دریافت۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسوراترول به صورت گاواژ)، گروه اوارکتومی (دوطرفه) (OVX)، گروه اوارکتومی + رسوراترول (OVX + Res)، گروه روتنون + رسوراترول (R+Res)، گروه اوارکتومی + روتنون (OVX+R) و گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول (OVX+ R+ Res). داروها روزانه به مدت ۳ هفته تجویز شدند. در پایان، موش‌ها با تزریق داخل‌صفاقی کتامین۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (آلفاسان هلند) بی‌هوش شدند. خونگیری از قلب انجام و سرم جدا شد. نمونه‌های بافت هیپوکامپ هموژنیزه و سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برای انجام تست استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی جمع‌آوری و در دمای۸۰- نگهداری شد (شکل ۱).

جراحی اوارکتومی

تخمدان موش‌ها بعد از بیهوشی، توسط برش کوچکی در ناحیه میانی تحتانی شکم، خارج و انتهای لوله‌های فالوپ با استفاده

از نخ بخیه به‌طور کامل بسته شد. دوره ریکاوری پس از بخیه‌ی فاشیا، عضلات و پوست، به‌مدت ده روز سپری شد.

نمونه‌گیری خون از قلب موش صحرایی

پس از آخرین تزریق، خونگیری از قلب موش‌ها انجام شد.

تعیین مقدار استرادیول (E2) سرم

سنجش میزان استرادیول در سرم خون براساس دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش استرادیول که از شرکت سامان تجهیز نور خریداری شده بود، انجام گرفت. به‌صورت خلاصه این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است و بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت‌شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضدّاسترادیول صورت می‌گیرد. اندازه‌گیری مقدار E2 به‌صورت خلاصه به‌روش زیر انجام شد: ابتدا ۲۵ میکرولیتر نمونه و استاندارد به داخل چاهک اضافه شد. ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتین E2 به همه چاهک‌ها اضافه شدند و پلیت به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز تکان داده شد و سطح آن با چسب پوشانده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیم E2 به تمام چاهک‌ها اضافه شد. سپس سطح آن را با چسب پوشانده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و محتویات داخل پلیت خالی شدند. ۳۵۰ میکرولیتر از محلول شستشو به چاهک‌ها اضافه و سپس تخلیه شد. عملیات فوق ۳ بار تکرار گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به تمام چاهک‌ها اضافه و سپس پلیت به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در محیط تاریک انکوبه شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به تمام چاهک‌ها اضافه و پلیت به‌مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد. درنهایت، جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج مرجع ۶۳۰ نانومتر) خوانده شد.

تعیین مقدار پروژسترون سرم

سنجش میزان پروژسترون در سرم خون براساس دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش پروژسترون که از شرکت ایده‌آل تشخیص آتیه خریداری شده بود، انجام گردید. به‌صورت خلاصه این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است و بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت‌شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضدّاسترادیول صورت می‌گیرد. اندازه‌گیری مقدار پروژسترون به روش زیر انجام شد: ابتدا ۲۵ میکرولیتر از نمونه و کالیبراتور داخل پلیت ریخته شدند. ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک‌ها اضافه و سپس پلیت به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز تکان داده شد. ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتین نیز به تمام چاهک‌ها اضافه و سپس پلیت به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز تکان داده و سطح پلیت با برچسب پوشانده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محتویات پلیت، تخلیه و چاهک‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شستشوی آماده، شسته شدند. عملیات فوق ۳ بار تکرار شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا به تمام چاهک‌ها اضافه شد و سپس پلیت به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در محیط تاریک انکوبه شد. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به همه چاهک‌ها اضافه و سپس پلیت به‌مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد و جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر) خوانده شد.

تعیین استرس اکسیداتیو و عوامل آنتی‌اکسیدانی

هموژن‌کردن بافت مغز

جهت هموژن‌کردن بافت مغز با استفاده از ترازو بافت هیپوکمپ وزن شد و به میزان سه برابر وزن نمونه به آن بافرفسفات سالین اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر با دور ۱۲۰ به مدت ۲۰ ثانیه بافت‌ها هموژن شدند، سپس مایع رویی با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۰۰۰ جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۸۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت هیپوکمپ براساس دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش کاتالاز که از شرکت طب‌پژوهان رازی خریداری شده بود، انجام شد. به‌صورت خلاصه این کیت فعالیت CAT را از طریق واکنش کاتالاز موجود در نمونه با متانول در حضور غلظت بهینه H_2O_2 برای تولید فرمالدئید اندازه‌گیری می‌کند. تشکیل فرمالدئید با استفاده از کروموژنی که آلدئیدها را ارغوانی می‌کند به‌صورت رنگ‌سنجی در طول موج ۵۴۰ تعیین می‌شود. فعالیت آنزیم کاتالاز به‌روش زیر انجام شد: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Assay Buffer، ۳۰ میکرولیتر متانول و ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد به چاهک کنترل اضافه شد. در مرحله دوم، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Assay Buffer، ۳۰ میکرولیتر متانول و ۲۰ میکرولیتر نمونه به چاهک نمونه‌ها اضافه گردید. ۲۰ میکرولیتر معرف پراکسید هیدروژن به همه چاهک‌ها اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفتند. درنهایت ۳۰ میکرولیتر معرف Stopper و ۳۰ میکرولیتر معرف کروموژنیک به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفتند و میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

مقدار مالون دی آلدهید

اندازه‌گیری مقدار MDA در بافت هیپوکمپ براساس

دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش MDA که از شرکت طب‌پژوهان رازی خریداری شده بود، انجام شد. در این روش MDA موجود در نمونه‌ها با اسید تیوباربیتوریک (TBA) واکنش نشان می‌دهد و منجر به تولید ترکیب MDA-TBA می‌شود که به‌سادگی با روش رنگ‌سنجی (۵۳۰-۵۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری می‌گردد. اندازه‌گیری مقدار MDA به‌روش زیر انجام شد: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر نمونه استاندارد به میکروتیوب‌ها اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر معرف Detergent به همه میکروتیوب‌ها اضافه و به‌خوبی مخلوط گردید و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از معرف رنگ به همه میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در آب جوش قرار داده شد و بعد از یک ساعت میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی آب یخ قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. درنهایت، ۲۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت هر میکروتیوب به چاهک مرتبط منتقل شد و میزان جذب در طول موج ۵۴۰-۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

گلوتاتیون پراکسیداز

بررسی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در بافت هیپوکمپ براساس دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش گلوتاتیون پراکسیداز که از شرکت طب‌پژوهان رازی خریداری شده بود، انجام شد. این کیت فعالیت GPx را از طریق واکنش GPx موجود در نمونه با کومن هیدروپراکسید (درحالی‌که GSH را به GSSG اکسید می‌کند) اندازه‌گیری می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت GPx به روش زیر انجام شد: ابتدا ۵۰ میکرولیتر بافر 1 X Assay به چاهک Reagent Control اضافه و بعد از آن ۵۰ میکرولیتر از بافر b Assay و ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به چاهک‌های نمونه اضافه شدند. سپس۴۰ میکرولیتر مخلوط واکنش (۱۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون ردوکتاز + ۹۰۰ میکرولیتر از GSH+NADPH) به چاهک نمونه‌ها و Reagent Control اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند. درنهایت، ۱۰ میکرولیتر از معرف Cumene Hydroperoxide به همه چاهک‌ها اضافه و بلافاصله جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانند شد.

سطح گلوتاتیون

سنجش مقدار گلوتاتیون بافت هیپوکمپ براساس دستورلعمل ذکرشده در کیت سنجش گلوتاتیون که از شرکت کیازیست خریداری شده بود، انجام شد. در این کیت محلول Ellman که به DNTB نیز معروف است در واکنش با گروه‌های سولفیدریل (SH) که به حالت احیا و آزاد وجود دارند، واکنش داده و منجر به تولید کمپلکس DNTB و سولفیدریل احیا به رنگ زرد می‌شود که در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل‌اندازه‌گیری است. اندازه‌گیری مقدار GSH به روش زیر انجام شد: ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد، به چاهک‌ها اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از Lysis buffer به‌عنوان بلانک، به چاهک بلانک اضافه گردید. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول کاری‌تیول (۲ میکرولیتر معرف تیول + ۱۹۸ میکرولیتر بافر تیول) به هر چاهک اضافه و پلیت به‌خوبی تکان داده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. درنهایت، جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش غلظت پروتئین

سنجش پروتئین در بافت هیپوکمپ براساس دستورالعمل ذکرشده در کیت سنجش پروتئین به روش برادفورد که از شرکت طب‌پژوهان رازی خریداری شده بود، انجام شد. در این روش از تغییر رنگ Coomassie هنگام اتصال به پروتئین در محیط اسیدی استفاده می‌شود. اندازه‌گیری پروتئین به روش زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر نمونه / استاندارد (BSA) به چاهک اضافه شد. ۱۹۰ میکرولیتر معرف TPB به همه چاهک‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. درنهایت، بلافاصله جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

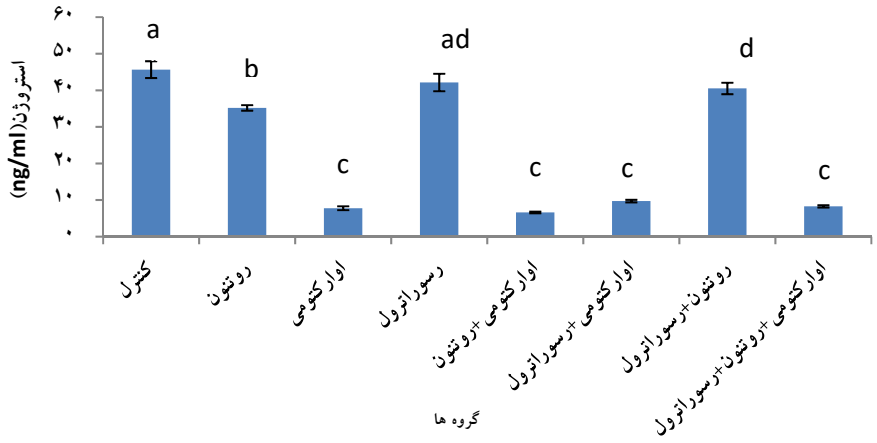
تحلیل آماری

داده‌های حاصل از سنجش‌های بیوشیمیایی در نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 20 با آنالیز One-way Anova (تست LSD) بررسی شدند و سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

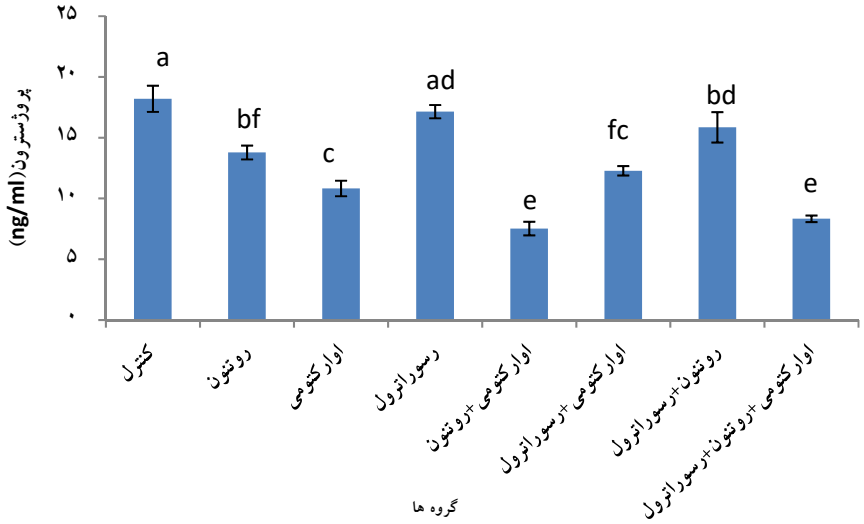
مقدار سرمی استروژن و پروژسترون

نتایج حاصل از سنجش استروژن نشان داد که سطح استروژن در گروه روتنون، اوارکتومی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P<۰/۰۰۱$) و این مقدار در گروه اوارکتومی به پایین‌ترین میزان، کاهش یافته است. همچنین مقدار استروژن در گروه رسوراترول، با گروه کنترل یکسان بود و تفاوت معنی‌داری بین گروه روتنون + رسوراترول و گروه رسوراترول مشاهده نشد. کمترین میزان استروژن در گروه اوارکتومی + روتنون (۷/۷۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) ثبت شد. در گروه اوارکتومی + رسوراترول مقدار استروژن نسبت به گروه اوارکتومی افزایش یافت ولی این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نبود. مقدار استروژن تفاوت معنی‌داری را در گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول در مقایسه با گروه اوارکتومی + روتنون نشان نداد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین مقدار استروژن سرمی گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\bar{X} \pm SD$ است.

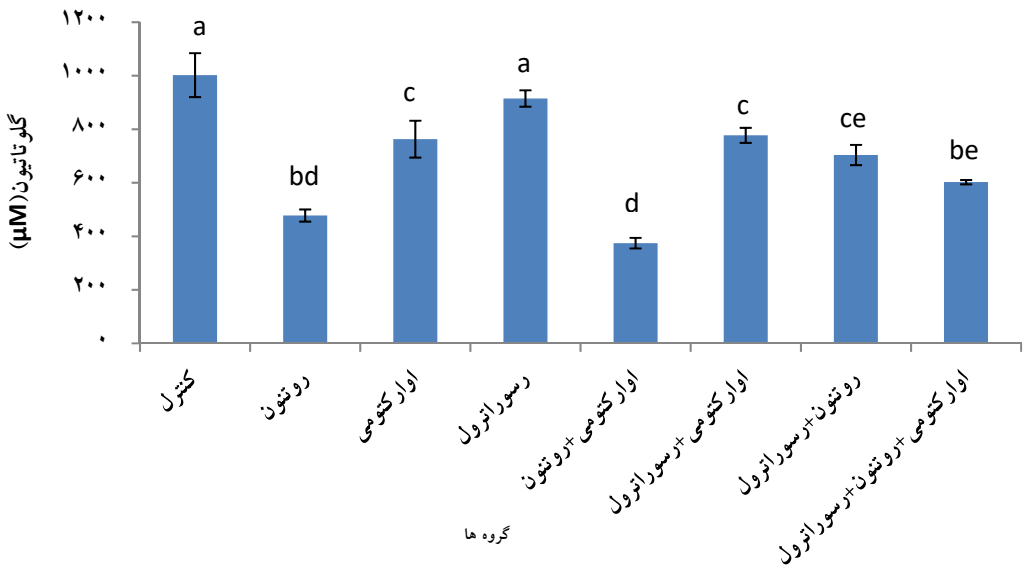
با توجه به نتایج ارائه‌شده در نمودار شماره ۲، مقدار پروژسترون در گروه روتنون نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). با حذف تخمدان‌ها، پروژسترون سرم با کمترین مقدار یعنی ۱۰/۸ نانوگرم در میلی‌لیتر در گروه اوارکتومی و ۷/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر در گروه اوارکتومی + روتنون ثبت شد. مقدار پروژسترون در گروه رسوراترول مشابه با گروه کنترل بود. همچنین مقدار پروژسترون گروه روتنون + رسوراترول تفاوت معنی‌داری با گروه رسوراترول نداشت. پروژسترون در گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول در مقایسه با گروه اوارکتومی + روتنون افزایش معنی‌داری را نشان نداد.



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین سطح پروژسترون سرم گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\bar{X} \pm SD$ است.

مقدار گلوتاتیون

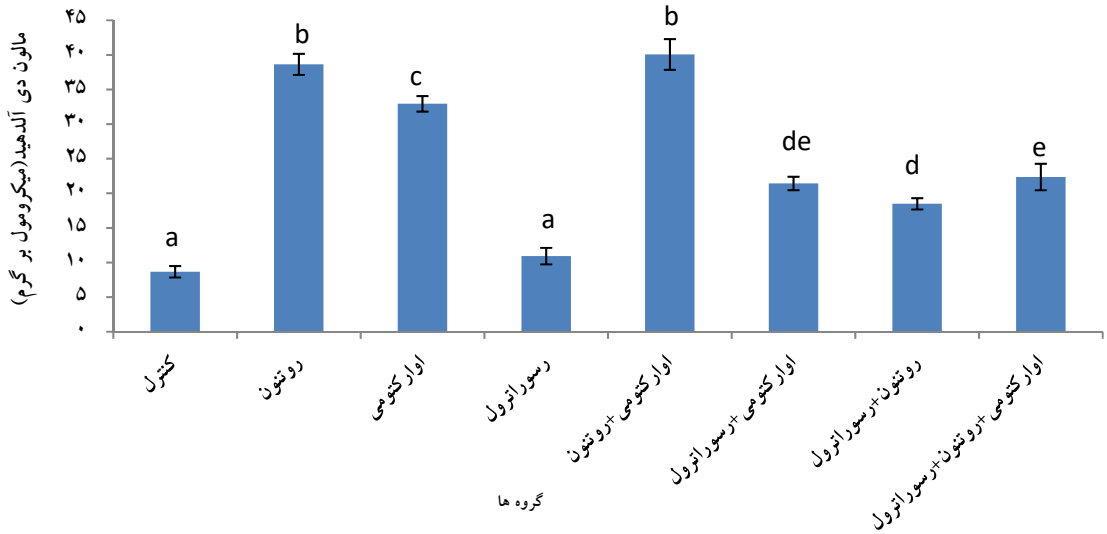
نتایج حاصل از سنجش گلوتاتیون نشان داد که مقدار گلوتاتیون در بافت هیپوکامپ در گروه روتنون و اوارکتومی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۰۱$). مقدار GSH در گروه اوارکتومی + روتنون در مقایسه با گروه کنترل و گروه اوارکتومی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). رسوراترول منجر به افزایش معنی‌داری در مقدار GSH در گروه روتنون + رسوراترول نسبت به گروه روتنون شد ($P<۰/۰۰۱$). در گروه اوارکتومی + رسوراترول، مقدار GSH نسبت به گروه اوارکتومی افزایش معنی‌دار نشان نداد. GSH در گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول، به‌طور قابل توجهی نسبت به گروه اوارکتومی + روتنون افزایش یافت ($P<۰/۰۲۲$) (نمودارشماره ۳).



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین مقدار GSH گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\overline{X} \pm SD$ است.

مقدار مالوندی‌آلدهید

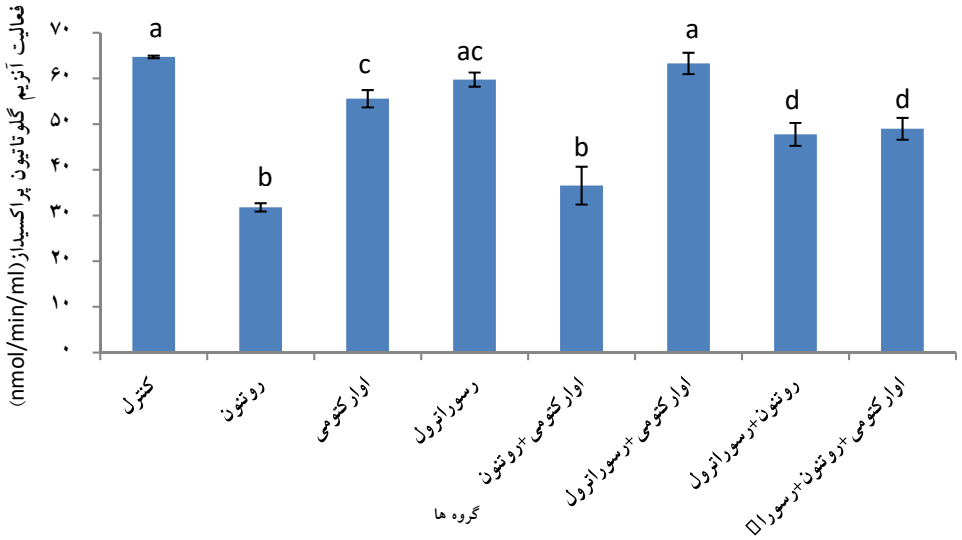
نتایج حاصل از سنجش مالوندی‌آلدهید نشان داد که تزریق روتنون به‌طور معنی‌داری سطح MDA را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P<۰/۰۰۱$). سطح MDA در گروه اوارکتومی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$). در گروه اوارکتومی + روتنون، سطح MDA به‌طور قابل‌توجهی نسبت به همه گروه‌ها به جز گروه روتنون افزایش یافت. سطح MDA در گروه اوارکتومی + رسوراترول نسبت به گروه اوارکتومی کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۰۱$). رسوراترول به‌طور قابل‌توجهی مقدار MDA را در گروه روتنون + رسوراترول و گروه اوارکتومی + رسوراترول ($P<۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه روتنون و اوارکتومی کاهش داد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین مقدار MDA گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\overline{X} \pm SD$ است.

فعالیت آنزیم گوتاتیون پراکسیداز

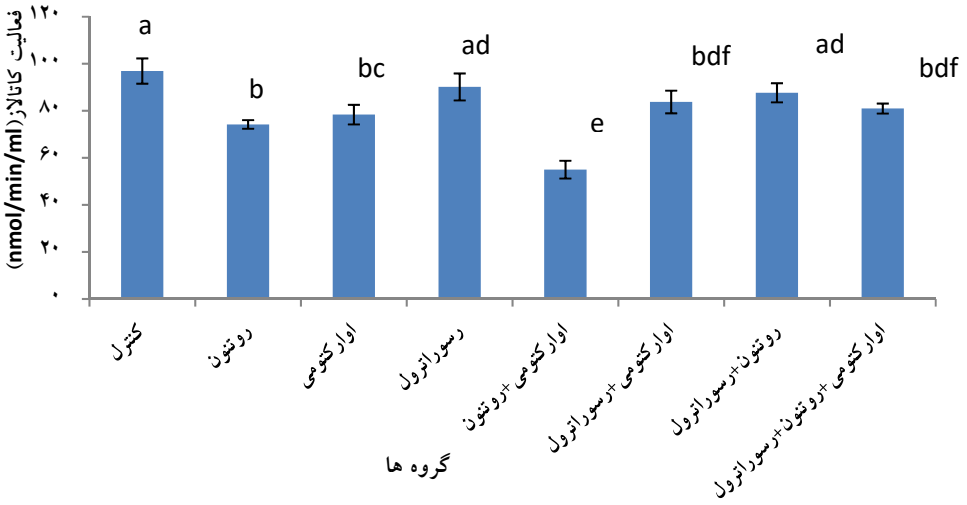
نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم گوتاتیون پراکسیداز نشان داد که روتنون به‌طور معنی‌داری فعالیت GPx را نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). فعالیت این آنزیم پس از برداشتن تخمدان‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تغییر کرد ($P<۰/۰۰۱$). درمان با رسوراترول در گروه رسوراترول، فعالیت این آنزیم را در سطح گروه کنترل نشان داد. فعالیت GPx در گروه اوارکتومی + روتنون به‌جز گروه روتنون تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. رسوراترول به‌طور معنی‌داری منجر به معکوس‌شدن اثر کاهشی روتنون بر فعالیت GPx در گروه روتنون + رسوراترول نسبت به گروه روتنون شد ($P<۰/۰۰۱$) (نمودارشماره ۵).



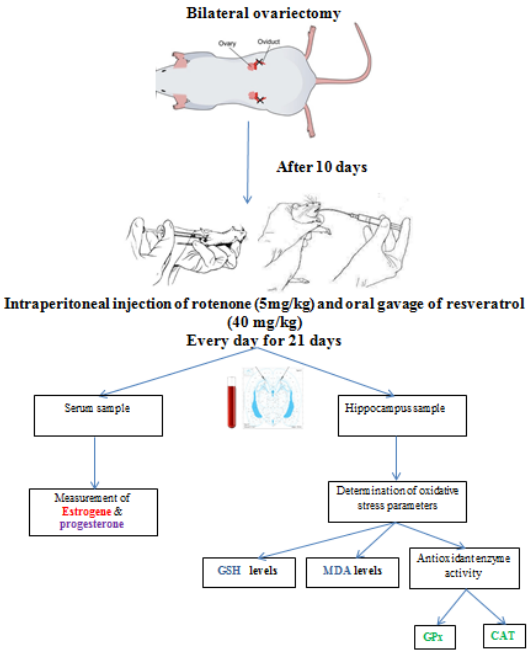
نمودار شماره ۵- مقایسه میانگین فعالیت GPX گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\bar{X} \pm SD$ است.

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکامپ در گروه‌های روتنون ($P<۰/۰۰۱$)، اوارکتومی ($P<۰/۰۰۳$) و اوارکتومی + روتنون ($P<۰/۰۰۱$) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. درمان با رسوراترول در گروه رسوراترول، فعالیت این آنزیم را در سطح گروه کنترل نشان داد. فعالیت این آنزیم در گروه اوارکتومی + رسوراترول نسبت به گروه اوارکتومی افزایش معنی‌داری را نشان نداد؛ درحالی‌که افزایش قابل توجهی از فعالیت CAT زمانی مشاهده شد که گروه روتنون + رسوراترول و اوارکتومی + روتنون + رسوراترول به‌ترتیب در مقایسه با گروه روتنون و گروه اوارکتومی + روتنون، تحت درمان با رسوراترول قرار گرفتند ($P<۰/۰۰۱$). افزایش معنی‌داری در فعایت این آنزیم در گروه روتنون + رسوراترول در مقایسه با گروه اوارکتومی + روتنون + رسوراترول مشاهده نشد (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۶- مقایسه میانگین فعالیت CAT گروه‌های آزمایشی: وجود حروف مشترک در هر گروه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P<۰/۰۵$). مقادیر شامل $\overline{X} \pm SD$ است.



شکل شماره ۱ - چکیده گرافیکی

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات نوروتوکسیک مواجهه با روتنون به‌عنوان آفت‌کش و حشره‌کش در حضور و یا عدم حضور استروژن همراه با نقش محافظتی رسوراترول بر عوامل استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ موش صحرایی انجام شد. داده‌ها نشان داد که روتنون به‌طور قابل‌توجهی منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی همراه با کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و مقدار GSH در هیپوکامپ شد. اثرات نوروتوکسیک روتنون توسط بسیاری از محققان، مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۰-۳۲]. مطالعات قبلی نشان دادند که روتنون فعالیت خود را از طریق اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو اعمال می‌کند [۲،۳۰،۳۲]. Kavuri و همکاران گزارش دادند که روتنون باعث افزایش سطوح بیومارکرهای استرس اکسیداتیو مانند MDA و پروتئین کربونیل و کاهش پارامترهای آنتی‌اکسیدانی از جمله GPX، کاتالاز و GSH در مدل پارکینسون در موش صحرایی شد [۳]. همچنین Unal و همکاران نشان دادند که قرارگرفتن در معرض روتنون با کاهش فعالیت گلوتاتیون-s-ترانسفراز و CAT و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، تعادل اکسیدانی / آنتی‌اکسیدانی مغز گورخرماهی را مختل می‌کند [۳۳]. از طرف دیگر مغز به‌دلیل مصرف بالای اکسیژن، محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباعِ قابل‌اکسیدشدن و ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانی پایین در برابر استرس اکسیداتیو، آسیب‌پذیر است [۳۴]. مطالعات حیوانی نیز نقش استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون را در تغییرات نوروپاتولوژی نشان دادند [۳۵-۳۷]. استروژن با فعال‌کردن چندین مسیر مولکولی و سلولیِ محافظت‌کننده عصبی، نقش مهمی در عملکردهای عصبی، از جمله یادگیری و حافظه دارد و حذف آن به‌شدت با شرایط تخریب عصبی مرتبط است [۳۸]. از سوی دیگر، دوره یائسگی خطر ابتلا به بیماری‌های عصبی را در زنان افزایش می‌دهد [۳۹]. مطالعه Luine استروژن را به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده در حافظه، به‌واسطه افزایش تراکم خارهای دندریتی در هیپوکامپ معرفی کرد [۴۰]. علاوه‌بر این، استروژن

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میتوکندری را فعال و تولید رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند [۱۵]. براساس مطالعه حاضر، حذف تخمدان در موش‌های صحرایی به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش استروژن، پروژسترون، سطح GSH و فعالیت آنزیم کاتالاز و گوتاتیون پراکسیداز و افزایش معنی‌دار سطح MDA در هیپوکامپ شد. مطالعه‌ای نشان داد که دریافت استروژن، مغز موش را از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt به واسطه SRC3، در برابر آسیب استرس اکسیداتیو ناشی از خونریزی داخل‌مغزی بهبود بخشیده است که با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۹]. مطالعه دیگر نشان داد که استروژن از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ Nrf2/HO-1 و MAP-kinase در مغز موش، استرس اکسیداتیو و تخریب عصبی ناشی از سمیت گلوتامات را سرکوب می‌کند [۴۱]. بررسی که توسط سعید و همکاران انجام شد، نشان داد که استروژن، استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی ناشی از آسیب به قشر مغز را از بین می‌برد [۱۸]. اگرچه در چند دهه گذشته استروژن‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما عوارض جانبی ناشی از استفاده طولانی‌مدت آن که خطر ابتلا به برخی بیماری‌ها را افزایش می‌دهد بسیار نگران‌کننده است [۲۰]. از طرفی برهمکنش کمبود استروژن و حضورآفت‌کش‌هایی مانند روتنون می‌تواند خطر استرس اکسیداتیو و القای تخریب عصبی را افزایش دهد. بنابراین زنان در دوران یائسگی همراه با قرارگرفتن در معرض آفت‌کش‌ها یا حشره‌کش‌ها بیشتر مستعد ابتلا به بیماری‌های عصبی هستند. لذا، استرس اکسیداتیو با تجویز روتنون و کمبود استروژن، به‌طور هم‌افزایی افزایش می‌یابد. در این راستا استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند مفید باشند. رسوراترول به دلیل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی، در شرایط تخریب عصبی متعدد مانند آسیب مغزی ایسکمیک [۴۲]، بیماری آلزایمر [۲۷]، صرع [۴۳]، خونریزی زیر عنکبوتیه [۴۴] و آسیب مغزی تروماتیک مورد مطالعه قرار گرفته است [۲۳،۲۶، ۴۵]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که رسوراترول استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون و حذف استروژن را کاهش می‌دهد. رسوراترول به‌طور قابل‌توجهی مقدار گلوتاتیون، فعالیت کاتالاز و GPX را در گروه‌های روتنون + رسوراترول و اوارکتومی + روتنون + رسوراترول افزایش داد. همچنین رسوراترول مقدار MDA را در گروه‌های روتنون + رسوراترول، اوارکتومی + رسوراترول و اوارکتومی + روتنون + رسوراترول در هیپوکامپ کاهش داد. مطالعه‌ای نشان داد که اختلال شناختی و ازدست‌دادن نورون در آسیب ایسکمی‌پرفیوژن مجدد در نورون‌های هیپوکامپ موش صحرایی از طریق تعدیل مسیر سیگنالینگ JAK/ERK/STAT شده توسط رسوراترول محافظت شد [۴۶]. علاوه‌بر این، مطالعه اخیر در مورد اثر محافظت عصبی رسوراترول گزارش داده است که اثر ضدّاسترس اکسیداتیو رسوراترول از طریق افزایش بیان Nrf2 منجر به کاهش سطوح افزایش یافته ROS در آسیب مغزی ناشی از تشعشعات گشت [۴۷]. مطالعه دیگر نشان داد که رسوراترول باعث کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید، اینترلوکین ۶ و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون در مدل موش دیابتی همراه با بیماری آلزایمر شد [۴۸].

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، باتوجه به نتایج این تحقیق رسوراترول و استروژن به‌تنهایی و با استفاده همزمان، استرس اکسیداتیو ناشی از روتنون را در هیپوکامپ موش‌ها کاهش دادند. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بهبود پارامترهای آنتی‌اکسیدانی مانند GPX، کاتالاز و GSH و کاهش بیومارکر استرس اکسیداتیوی (MDA)، یکی از مکانیسم احتمالی است که رسوراترول و استروژن توسط آن به‌طور مستقیم منجر به بهبود استرس اکسیداتیو شدند. اگرچه مطالعات بیشتر برای مصرف همزمان رسوراترول و استروژن برای کاهش میزان استرس اکسیداتیو مورد نیاز است، اما نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که به‌دلیل هم‌پوشانی در عملکردهای مفید رسوراترول و استروژن، رسوراترول می‌تواند برای افزایش اثربخشی استروژن و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های تخریب عصبی به‌ویژه در کشاورزان درمعرض خطر، در دوره یائسگی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مادی و معنوی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشگاه علوم پزشکی بابل در مراحل اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RH, Kanthasamy AG. Neurotoxicity of pesticides. ***Acta Neuropathol*** 2019; 138(3): 343-62.

[2] Yarmohammadi F, Wallace Hayes A, Najafi N, Karimi G. The protective effect of natural compounds against rotenone-induced neurotoxicity. ***J Biochem Mol Toxicol*** 2020; 34(12): e22605.

[3] Kavuri S, Sivanesan S, Rajagopalan V. Oxidative stress and antioxidant status in rotenone induced rat models of Parkinson's disease. ***Int J Res Pharmaceutical Sci*** 2020; 11(1): 1.

[4] Biney RP, Mpofana T, Kasanga EA. Free radicals in oxidative stress, aging, and neurodegenerative disorders. ***In Research Anthology on Supporting Healthy Aging in a Digital Society*** 2022; (pp. 225-52). IGI Global.

[5] Fikry H, Saleh LA, Abdel Gawad S. Neuroprotective effects of curcumin on the cerebellum in a rotenone-induced Parkinson's disease Model. ***CNS Neurosci Ther*** 2022; 28(5):732-48.

[6] Chiaradia E, Renzone G, Scaloni A, Caputo M, Costanzi E, Gambelunghe A, et al. Protein carbonylation in dopaminergic cells exposed to rotenone. ***Toxicol Lett*** 2019; 309: 20-32.

[7] 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 Biol*** 2020; 31: 101505.

[8] Dubal DB, Wise PM. Estrogen and neuroprotection: from clinical observations to molecular mechanisms. ***Dialogues Clin Neurosci*** 2002; 4(2): 149–61.

[9] Marrocco J, McEwen BS. Sex in the brain: hormones and sex differences. ***Dialogues Clin Neurosci*** 2016; 18(4): 373-83.

[10] Siddiqui AN, Siddiqui N, Khan RA, Kalam A, Jabir NR, Kamal MA, et al. Neuroprotective role of steroidal sex hormones: an overview. ***CNS Neurosci Ther*** 2016; 22(5): 342-50.

[11] Thadathil N, Xiao J, Hori R, Alway SE, Khan MM. Brain selective estrogen treatment protects dopaminergic neurons and preserves behavioral function in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. ***J Neuroimmune Pharmacol*** 2021; 16: 667-78.

[12] Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. ***Learn Mem*** 2015; 22(9): 472-93.

[13] Cheng YJ, Lin CH, Lane HY. From menopause to neurodegeneration—molecular basis and potential therapy. ***Int J Mol Sci*** 2021; 22(16): 8654.

[14] Luine V. Estradiol: mediator of memories, spine density and cognitive resilience to stress in female rodents. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 2016; 160: 189-95.

[15] Kovesdi E, Szabo-Meleg E, Abraham IM. The Role of Estradiol in Traumatic Brain Injury: Mechanism and Treatment Potential. ***Int Mol Sci*** 2021; 22(1): 11.

[16] Yan W, Wu J, Song B, Luo Q, Xu Y. Retraction Note to: Treatment with a brain-selective prodrug of 17β-estradiol improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by regulating klf5-NF-κB pathway. ***Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*** 2021; 394(9): 1989.

[17] 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. ***Front Neurosci*** 2020; 14: 157.

[18] Saeed K, Jo MH, Park JS, Alam SI, Khan I, Ahmad R, et al. 17β-Estradiol abrogates oxidative stress and neuroinflammation after cortical stab wound injury. ***Antioxidants*** 2021; 10(11): 1682.

[19] 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.

[20] Cagnacci A, Venier M. The controversial history of hormone replacement therapy. ***Medicina*** 2019; 55(9): 602.

[21] Kiskova T, Kubatka P, Busselberg D, Kassayova M. The plant-derived compound Resveratrol in brain cancer: A review. ***Biomolecules*** 2020; 10(1): 161.

[22] Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. ***Molecules*** 2021; 26(1): 229.

[23] Nath J, Roy R, Sathyamoorthy YK, Paul S, Goswami S, Chakravarty H, et al. Resveratrol as a therapeutic choice for traumatic brain injury: an insight into its molecular mechanism of action. ***Brain Disord*** 2022: 100038.
[24] Auti A, Alessio N, Ballini A, Dioguardi M, Cantore S, Scacco S, et al. Protective Effect of Resveratrol against Hypoxia-Induced Neural Oxidative Stress. ***J Personalized Med*** 2022; 12(8): 1202.
[25] Bryl A, Falkowski M, Zorena K, Mrugacz M. The Role of Resveratrol in Eye Diseases—A Review of the Literature. ***Nutrients*** 2022; 14(14): 2974.
[26] Kaur A, Tiwari R, Tiwari G, Ramachandran V. Resveratrol: A vital therapeutic agent with multiple health benefits. ***Drug Res*** 2022; 72(01): 5-17.
[27] 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*** 2018; 301(6): 1115-25.
[28] 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; 20(5): 4587-93.
[29] Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, et al. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. ***J Pharmacol Exp Ther*** 2010; 335(1): 149-54.
[30] Adedara AO, Otenaike TA, Olabiyi, AA, Adedara IA, Abolaji AO. Neurotoxic and behavioral deficit in Drosophila melanogaster co-exposed to rotenone and iron. ***Metabolic Brain Disease*** 2023; 38: 349-60.
[31] Lawana V, Cannon JR. Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. Advances in Neurotoxicology. Elsevier; 2020. p. 209-54.
[32] Pamies D, Block K, Lau P, Gribaldo L, Pardo CA, Barreras P, et al. Rotenone exerts developmental neurotoxicity in a human brain spheroid model. ***Toxicol Appl Pharmacol*** 2018; 354: 101-14.
[33] Unal i, UstUndag UV, Ateş PS, Egilmezer G, Alturfan AA, Yigitbaşı T, et al. Rotenone impairs oxidant/antioxidant balance both in brain and intestines in zebrafish. ***Int J Neurosci*** 2019; 129(4): 363-8.
[34] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. ***Oxidative Med Cellular Longevity*** 2017; 2017.
[35] Zhang D, Li S, Hou L, Jing L, Ruan Z, Peng B, et al. Microglial activation contributes to cognitive impairments in rotenone-induced mouse Parkinson's disease model. ***J Neuroinflammation*** 2021; 18(1): 1-16.
[36] Nie S, Ma K, Sun M, Lee M, Tan Y, Chen G, et al. 7, 8-Dihydroxyflavone protects nigrostriatal dopaminergic neurons from rotenone-induced neurotoxicity in rodents. ***Parkinson's Dis*** 2019; 2019.
[37] Lv DJ, Li LX, Chen J, Wei SZ, Wang F, Hu H, et al. Sleep deprivation caused a memory defects and emotional changes in a rotenone-based zebrafish model of Parkinson's disease. ***Behav Brain Res*** 2019; 372: 112031.
[38] Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. ***Learning Memory*** 2015; 22(9): 472-93.
[39] Cheng YJ, Lin CH, Lane HY. From menopause to neurodegeneration—molecular basis and potential therapy. ***Int J Molecular Sci*** 2021; 22(16): 8654.
[40] Luine V, Frankfurt M. Estrogenic regulation of memory: the first 50 years. ***Hormones Behav*** 2020; 121: 104711.
[41] Khan I, Saeed K, Jo MG, Kim MO. 17-β estradiol rescued immature rat brain against glutamate-induced oxidative stress and neurodegeneration via regulating Nrf2/HO-1 and MAP-kinase signaling pathway. ***Antioxidants*** 2021; 10(6): 892.
[42] Machado ND, Armas GV, Fernández MA, Grijalvo S, Diaz Diaz D. Neuroprotective Effects of Resveratrol in Ischemic Brain Injury. ***NeuroSci*** 2021; 2(3): 305-19.
[43] Zamora-Bello I, Rivadeneyra-Dominguez E, Rodríguez-Landa JF. Anticonvulsant Effect of Turmeric and Resveratrol in Lithium/Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Wistar Rats. ***Molecules*** 2022; 27(12): 3835.

[44] Tan J, Song R, Luo S, Fu W, Ma Y, Zheng L, et al. Efficacy of Resveratrol in Experimental Subarachnoid Hemorrhage Animal Models: A Stratified Meta-Analysis. ***Frontiers Pharmacol*** 2022; 13.
[45] Feng Y, Ju Y, Yan Z, Ji M, Li J, Wu Q, et al. Resveratrol attenuates autophagy and inflammation after traumatic brain injury by activation of PI3K/Akt/mTOR pathway in rats. ***Folia Neuropathologica*** 2022; 60(2): 153-64.
[46] Chang C, Zhao Y, Song G, She K. Resveratrol protects hippocampal neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulating JAK/ERK/STAT signaling pathway in rats. ***J Neuroimmunol*** 2018; 315: 9-14.
[47] Zhang Y, Zhu Xb, Zhao Jc, Gao Xf, Zhang Xn, Hou K. Neuroprotective effect of resveratrol against radiation after surgically induced brain injury by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis through NRf2/HO-1/NF-κB signaling pathway. J ***Biochem Mol Toxicol*** 2020; 34(12): e22600.
[48] Ma X, Sun Z, Han X, Li S, Jiang X, Chen S, et al. Neuroprotective effect of resveratrol via activation of Sirt1 signaling in a rat model of combined diabetes and Alzheimer's disease. ***Front Neurosci*** 2020; 13: 1400.