ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Nanoceria against Renal Mitochondrial Damage in Streptozocine-induced Diabetic Mice

Mohammad Shokrzadeh[1,2],
Monireh Jahani[3],
Zeinab Vafaeipour[3],
Fatemeh Shaki[2,4]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Msc Student of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 7, 2015 Accepted December 9, 2015)

Abstract

Background and purpose: Diabetes is a health problem worldwide with increasing prevalence in most countries. Nephropathy is a common microvascular complication of diabetes. Diabetes is directly associated with oxidative stress and mitochondrial damage that result in renal tissue damage. This study evaluated the efficiency of nanoceria in attenuation of oxidative damage in renal isolated mitochondria of STZ-induced diabetes mice.

Materials and methods: In an experimental study, the mice were divided into five groups (n=6 per group). Diabetes was induced by a single dose of streptozocin (65mg/kg body wt, IP) and the mice with glucose concentrations exceeding 200 mg/dl were considered diabetic and were treated with nanoceria and vit E for 4 weeks. Afterwards, the animals were anaesthetized and kidney tissues were excised at 4°C and mitochondrial fraction was separated by different centrifuge technique. Finally, oxidative stress markers including measuring glutathione (GSH) content, lipid peroxidation (LPO), reactive oxygen species (ROS) and MTT test were assayed in isolated kidney mitochondria.

Results: The level of GSH and mitochondrial function significantly decreased in diabetic mice compared to those in control group ($P<0.05$). Also, significant increase in LPO and ROS formation were observed ($P<0.05$) in the renal mitochondria of diabetic mice that decreased significantly after nanoceria administration ($P<0.05$).

Conclusion: Our findings showed the protective effects of nanoceria against renal mitochondria damage. Therefore, it could be used as a complementary therapy alongside other blood glucose-lowering drugs to reduce the rate of complications resulting from diabetes.

Keywords: nanoceria, diabetes, nephropathy, oxidative stress, streptozocin

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 258-269 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۲ دی سال ۱۳۹۴ (۲۶۹-۲۵۸)

اثرمحافظتی نانوسریا در کاهش آسیب میتوکندریایی بافت کلیه در موش های سوری نر دیابتی شده با استرپتوزوسین

محمد شکرزاده[۱و۲]
منیره جهانی[۳]
زینب وفایی پور[۳]
فاطمه شکی[۴و۲]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت نوع دویکی ازبزرگ‌ترین اپیدمی‌های قرن حاضر می‌باشد. یکی ازشایع‌ترین‌عوارض میکرووواسکولار در دیابت ملیتوس، نفروپاتی است. دیابت ملیتوس با استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری ارتباط مستقیم دارد که در نهایت می‌تواند منجر به آسیب بافتی در کلیه شود. در این مطالعه، اثرات نانوسریا بر جلوگیری از آسیب اکسیداتیو در میتوکندری‌های ایزوله از بافت کلیه موش‌های سوری دیابتی شده با استرپتوزوسین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، حیوانات در ۵ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. دیابت با تزریق استرپتوزوسین (65mg/kg,IP) در موش‌ها القاء گردید و موش‌هایی که قندخون بالاتر از 200 mg/dl داشتند، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند و پس از تایید دیابتی شدن، نانوسریا و vit E را به مدت ۴ هفته دریافت کردند. سپس بافت کلیه موش‌های سوری از گروه‌های مختلف جدا شده و میتوکندری آن‌ها با روش سانتریفیوژ متعدد جداسازی و عملکرد میتوکندری‌ها با تست MTT و پارامترهای استرس اکسیداتیو شامل گلوتاتیون (GSH)، میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و لیپید پراکسیداسیون (LPO) ارزیابی شد.

یافته‌ها: کاهش قابل توجه ($p<۰/۰۵$) در فعالیت میتوکندری و هم‌چنین غلظت GSH در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه موش‌های گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. هم‌چنین افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را در سطوح LPO و ROS در گروه دیابتی شاهد بودیم که پس از تجویز نانوسریا به موش‌های دیابتی، بهبودی نسبتاً معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در فاکتورهای استرس اکسیداتیو و عملکرد میتوکندری‌های ایزوله از کلیه موش‌های دیابتی حاصل گردید.

استنتاج: نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که نانوسریا اثرات محافظتی در کاهش آسیب میتوکندریایی بافت کلیه دارد و می‌توان آن را به‌عنوان درمانی مکمل درکنار سایر داروهای پایین‌آورنده قندخون درکنترل عوارض دیابت استفاده کرد.

واژه های کلیدی: نانوسریا، دیابت، میتوکندری، نفروپاتی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

دیابت شایع‌ترین بیماری متابولیک ناشی از کمبود نسبی ترشح یا عملکرد انسولین است(۱). تیپ دو دیابت، بیش از ۹۰ درصد موارد دیابت را به ویژه در کشورهای در حال توسعه در بر می‌گیرد و بر طبق بررسی‌های کمیته جهانی دیابت،تعداد افراد مبتلا به دیابت تا سال ۲۰۳۰ ممکن است به ۵۵۲ میلیون نفر هم برسد. در واقع

مولف مسئول: فاطمه شکی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: fshaki.tox@gmail.com
۱. دانشیار، فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازنداران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازنداران، ساری، ایران
۳. کارشناسی ارشد سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندارن، ساری، ایران
۴. استادیار، فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازنداران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۹/۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

دیابت نوع دو، بزرگ ترین اپیدمی قرن بوده که در حال حاضر، سریع ترین روند رشد را در میان سایر بیماری‌ها درکل جهان دارد(۲). عوارض دیابت در دوگروه عوارض کوتاه مدت از جمله افزایش قند خون، پرنوشی، پر ادراری، پرخوری و ظهور گلوکز در ادرار و عوارض بلند مدت و مزمن شامل عوارض قلبی، کلیوی، عصبی، چشمی و آسیب‌های عروقی قرار می گیرد(۳). یکی از شایع‌ترین عوارض میکرووواسکولار در دیابت ملیتوس، نفروپاتی است که بیش از یک سوم از بیماران دیابتی آن را تجربه کرده‌اند(۵،۴). کلیه‌ها نقش مهمی را در فیلتراسیون مواد زائد خون ایفا می کنند و در شرایط قند خون بالا، آسیب‌پذیرتر از دیگر بافت‌ها هستند(۶). از طرفی دیابت ملیتوس با استرس اکسیداتیو که ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، هیدروکسیل یا کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی است، ارتباط مستقیم دارد(۸،۷). استرس‌اکسیداتیو ناشی از قندخون بالای دیابت، درپیشرفت عوارض دیابت از جمله نفروپاتی نیز دخیل است(۹).

افزایش قندخون در بیماران دیابتی، سبب تولید بیش‌تر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بدن می‌شود(۱۰). مطالعات قبلی نشان داده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت دیابت دارد و میتوکندری به عنوان مهم‌ترین هدف در این سمیت، مطرح شده است و آسیب به میتوکندری می‌تواند منجر به تشدید استرس اکسیداتیو و بروز مرگ سلولی شود که در نهایت منجر به آسیب بافتی در کلیه می‌شود(۱۱). میتوکندری منبع اصلی تولید ROS در سلول‌هاست و تولید ROS از راه زنجیره تنفسی میتوکندری علت اصلی آسیب‌های ناشی از هایپرگلیسمی است. عدم وجود دفاع آنتی‌اکسیدانت قوی می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ وابسته به استرس اکسیداتیو شود. در واقع یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های سلولی به غلظت بالای گلوکز، استرس اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری و نهایتاً بروز آپوپتوز ازجمله بروز آپوپتوز در سلول و بافت می‌باشد(۱۲). درحالت فیزیولوژیک، برخی ازمولکول‌های آنتی‌اکسیدانت آندوژن مثل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و بیلی روبین ردوکتاز از آسیب سلول‌های کلیوی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری می کنند(۱۳). اما تولید رادیکال‌های آزاد در افراد دیابتی افزایش می‌یابد و سطح آنتی‌اکسیدانت‌های بدن کم می‌شود و در نتیجه، یک سلسله واکنش‌های پیوسته شامل پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و بازهای آلی ساختمان اسیدهای نوکلئیک و در نتیجه تخریب سلولی و آسیب بافتی و جهش ایجاد می‌شود. امروزه با دو استراتژی کنترل قندخون و کاهش استرس اکسیداتیو در میتوکندری کلیه، می‌توان نفروپاتی دیابتی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش داد(۱۳). درمان هایپرگلایسمی با داروهای شیمیایی یا انسولین منجر به عوارض متعددی مثل عوارض ناشی از سولفونیل اوره‌ها و بی اشتهایی مزمن، آتروفی مغزی و کبد چرب ناشی از انسولین می گردد(۱۴). بنابراین یکی از راه‌های موثر و اقتصادی برای کنترل بهتر عوارض ناشی از هایپرگلایسمی، خنثی کردن مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و استفاده از آنتی اکسیدانت‌های گیاهی یا سنتزی می‌باشد که بی‌خطر بوده و به راحتی توسط سیستم سلولی پذیرفته می‌شود(۱۵). یکی از درمان‌های پیشنهادی برای این استرس‌های اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله رادیکال‌های آزاد، استفاده از نانوذرات سریم است. سریم جز لانتانیدها می‌باشد که در ۲ حالت اکسیداسیون ۳+ و ۴+ وجود دارد. در واقع این یون با انتقال بین این حالت‌های اکسیداسیون، منجر به مهار و خنثی شدن گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود(۱۴). هم‌چنین به نظر می‌رسد نانوسریا می‌تواند فعالیت هر ۲ آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را تقلید کند. فعالیت مشابه سوپراکسید دیسموتاز، بیش‌تر هنگامی ظاهر می‌شود که سریم اکسید شده است (Ce4+)، و فعالیت مشابه آنزیم کاتالاز هنگامی ظاهر می‌شودکه سریم احیا می‌شود (Ce3+). بنابراین نانوسریم می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد(۱۶). تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات در رابطه با اثرات نانوسریا روی عوارض دیابت بسیار محدود است و از آن‌جایی‌که شیوع دیابت در طی دو دهه گذشته در جهان بسیار چشمگیر بوده(۱۷)، بایستی مطالعات بیش‌تری پیرامون اثرات نانوسریا صورت گیرد. چرا که عواقب دراز مدت ناشی از دیابت، علاوه بر هزینه‌های بالایی که بر سیستم درمان تحمیل می‌کند، کیفیت زندگی افراد را تحت شعاع خود قرار می‌دهد. بنابراین ما در این مطالعه به بررسی اثر محافظتی نانوسریا در جلوگیری از استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو در میتوکندری‌های ایزوله از بافت کلیه موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین پرداختیم.

مواد و روش ها

استرپتوزوسین (از شرکت سیگما آمریکا)، نانو سریوم اکساید (از شرکت نوترینو ایران، سایز کم تر از ۱۰۰ نانومتر)، رنگ MTT (۳-[۴،۵-دی متیل تیازول-۲-ایل]-۲،۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) (از شرکت Sigma-Aldrich (St.Louis, MO))، ویتامین (E شرکت آریا ایران)، سدیم سیترات، EDTA، kcl، Na_2HPO_4، $Mgcl_2$، Tris-Hcl، KH_2PO_4، سوکسینات، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، 4,2hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES)، Morpholinopropansulfonicacid (MOPS)، معرف دی کلرو فلوئوروسین- دیاستات، تیوبابیتوریکاسید، HCl، گلوتاتیون، آلبومین، n-بوتانل، معرف 5,5dithiobis-2-nitrobenzoic acid DTNB، ethyleneglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,Ń, Ń-tetraacetic acid (EGTA) از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. روش القاء دیابت: دو هفته پس از این که موش‌ها با محیط آشنا شدند، دیابت با تزریق استرپتوزوسین که از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شده بود، در موش‌ها القاء گردید. استرپتوزوسین در بافر سیترات (0.1 M pH 6.5) حل شده و با دوز 65mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق گردید. گروه کنترل، بافر سیترات (0.1 M, pH 6.5) دریافت کردند. قندخون قبل از آزمایش و یک هفته پس از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوسین اندازه‌گیری شد و موش‌هایی که قندخون بالاتر از 200 mg/dl داشتند، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند(۱۸). نانوسریوم اکساید را در نرمال سالین حل کرده تا آماده تزریق شود و موش‌های سوری پس از دیابتی شدن، به مدت ۴ هفته نانو سریا را به میزان ۶۰ mg/kg دریافت کردند. هم‌چنین میزان ویتامین E را به‌عنوان‌گروه کنترل مثبت آزمایشات، به میزان ۱۰۰mg/kg برای ۴ هفته به موش‌های دیابتیک تزریق گردید.

حیوانات مورد مطالعه: در این آزمایش، از ۳۰ سر موش سوری نر با میانگین وزن ۳۵gr-۳۰ استفاده شد. حیوانات جهت سازگاری بامحیط، دو هفته قبل آزمایشات، در قفس‌های جداگانه استاندارد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی به آب و غذای کافی در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حیوانات در ۵ گروه و بر طبق مطالعات پیشین در هر گروه، ۶ موش سوری نر به ترتیب زیر قرارگرفت:

گروه اول: کنترل (هیچ دارویی دریافت نمی‌کند)، گروه دوم:گروه دیابتی که استرپتوزوسین را به میزان ۶۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کنند، گروه سوم: استرپتوزوسین + نانوسریا به این صورت که استرپتوزوسین را به میزان ۶۵mg/kg دریافت کرده و پس از تایید دیابتی شدن، نانوسریا را به میزان ۶۰mg/kg به صورت داخل صفاقی در ۴ هفته دریافت می‌کنند، گروه چهارم: فقط نانوسریا را به مدت ۴ هفته دریافت کرده و گروه پنجم: گروه کنترل مثبت موش‌های دیابتیکی بوده که ویتامین E را به میزان ۱۰۰mg/kg به مدت ۴ هفته دریافت کردند. پس از سپری شدن دوره درمان، حیوانات را با اتر بیهوش، سپس جراحی کرده و بافت کلیه آن ها را خارج و با بافر مانیتول، شستشو داده و با نرمال سالین توسط هموژنایزر دستی هموژن کردیم. بافت هموژن شده را ابتدا با سرعت ۲۰۰۰x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بعد محلول رویی را با سرعت

Archive of SID
www.SID.ir

۱۰۰۰۰xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکندری است، در بافر تریس (ساکارز M 0.25، KCL 20mM، MgCl2 2mM، Na2HPO4 1 mM، Tris-HCl .05 mM) سرد پراکنده کردیم(۱۹). تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین با استفاده از معرف کوماسی بلو با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. در تمامی آزمایشات، از میتوکندری‌های با غلظت پروتئینی mg/ml ۱ استفاده شد(۲۰). تمامی فرآیندهای گفته شده در بالا، بر روی یخ انجام شده تا جداسازی میتوکندری با کیفیت بالا انجام گیرد. اندازه گیری ROS: میتوکندری هارا در بافر تنفسی (Succinate(5mM) (0.5mM)+KH2PO4(0.1mM)+ Tris-Hcl (10mM)+MOPS (20mM)+EGTA (50µM)+Mgcl2) پراکنده کرده و سپس به آن‌ها معرف (DCFH-DA با غلظت نهایی ۱۰µM) اضافه کرده و بعد از ۳۰ دقیقه، میزان شدت فلورسانس با فلوریمتری خوانده می‌شود(۲۱).

سنجش درصد بقای میتوکندری با نمک تترازولیوم (MTT) : ابتدا میتوکندری‌ها را با غلظت mg/ml ۱ در بافرتریس حل‌کرده، سپس در پلیت۹۶ خانه‌ای در هر ستون ۱۰۰µl از نمونه‌ها را می‌ریزیم، بعد به هر چاهک، ۵۰µl معرف MT (۰/۴T درصد) اضافه و سپس نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از آن، به هر چاهک ۱۰۰µDMSOl اضافه کرده و جذب آن را توسط الایزا، در طول موج ۵۷۰nm قرائت گردید(۲۲).

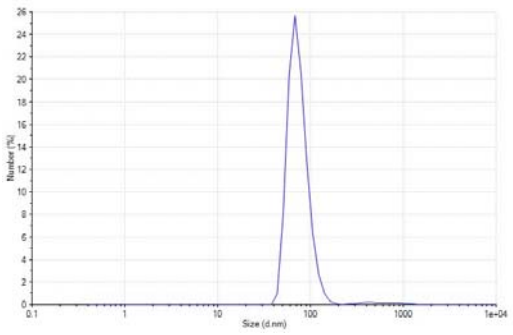
اندازه گیری میزان لیپید پراکسیداسیون: پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوبابیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین‌ترتیب‌که به ۰/۲ml از سوسپانسیون میتوکندریائی، ۰/۱ ml از معرف TBA شامل ۰/۵ HCl درصد، نرمال ۱۵ TCA درصد و ۰/۳ TBA درصد اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از سرد شدن به آن ۰/۲ ml n–بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده شد و سپس در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ گردید. لایه n– بوتانل برای سنجش در طول موج ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار TBARs از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید(۲۳).

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیا در نمونه: یک میلی‌لیتر از میتوکندری را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ xg سانتریفیوژ می‌کنیم. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی لیتر DTNB 0.4% اضافه کرده و ورتکس می‌کنیم و ۱۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم تا واکنش کامل شود. سپس میزان جذب را در طول موج ۴۱۲ نانومتر می‌خوانیم. غلظت گلوتاتیون را از روی منحنی استاندارد گلوتاتیون برحسب µg /ml به دست می‌آوریم(۲۴).

آنالیز آماری: در نهایت نتایج بر حسب میانگین± انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار گزارش شده و همه آنالیزهای آماری با استفاده از تست‌های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey تجزیه و تحلیل می‌شوند.

یافته ها

اندازه نانوذرات سریوم اکساید: اندازه نانوذرات با روش تفرق نور پویا (DLS) تعیین شد که نشان داد اندازه ذره‌ای نانوسریوم کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر می باشد (نمودار شماره ۱).



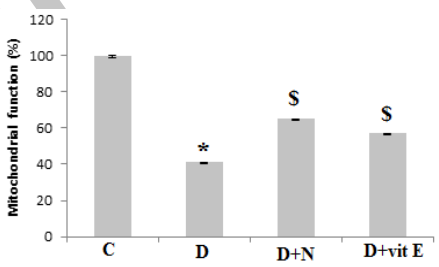
نمودار شماره ۱: تعیین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به روش پراکندگی نور پویا (DLS) برای سریوم اکساید

Archive of SID

www.SID.ir

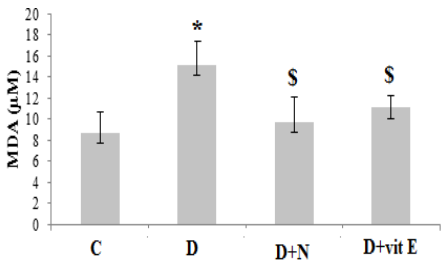
در طول دهۀ گذشته، استفاده از تکنیک کشت سلولی برای ارزیابی‌های سم‌شناسی ترکیبات مختلف، توسعه یافته است(۲۵). برای شمارش سلولی و تعیین درصد بقاء نیز می‌توان از MTT (۲۶) استفاده نمود که در واقع، یک تست ارزیابی سلامت میتوکندری است. دراین مطالعه، سلامت و عملکرد میتوکندری با تست MTT ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده این بود که تجویز نانوسریا در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بقای میتوکندری‌ها را افزایش داده است (نمودار شماره ۲).

نمودار شماره ۳ میزان تولید ROS را در میتوکندری گروه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. میزان ROS در گروه دیابتی دریافت کننده نانوسریا پس از ۴ هفته، کاهش چشمگیری ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه دیابتیک پیدا کرده است.



نمودار شماره ۲: تاثیر نانوسریا در محافظت میتوکندری های کلیوی در برابر آسیب ناشی از دیابت

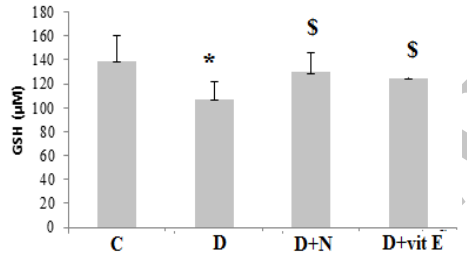
درصد بقای میتوکندری را در موش‌های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با تست MTT ارزیابی شد. نتایج به صورت mean±sd نشان داده شده‌اند. *: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$)، $: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p<۰/۰۵$).



نمودار شماره ۳: تاثیر نانوسریا در جلوگیری از تولید ROS ناشی از دیابت در میتوکندری های کلیوی

میزان تولید ROS را در موش های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با استفاده از معرف DCFH-DA ارزیابی شد. نتایج به صورت mean±sd نشان داده شده‌اند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$)، $: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p<۰/۰۵$).

لیپیدپراکسیداسیون، با اندازه‌گیری تولید MDA در میتوکندری‌های ایزوله شده تعیین می‌شود. همان‌طور که در نمودار شماره۳ نشان داده شده است، لیپیدپراکسیداسیون درمیتوکندری‌های ایزوله از بافت کلیه موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل، به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش پیدا کرده است و درمان با نانوسریا به مدت ۴ هفته (۶۰ mg/kg) سبب کاهش لیپیدپراکسیداسیون ناشی از دیابت در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه موش‌های دیابتی شد. هم‌چنین سطح مالون دی آلدئید در گروهی که نانوسریا را دریافت می‌کردند، کم‌تر از گروه دیابتیکی بود که در دوره درمان، ویتامین E را به مدت ۴ هفته دریافت می‌کردند (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: تاثیر نانوسریا در میزان لیپیدپراکسیداسیون ناشی از دیابت در میتوکندری های ایزوله از کلیه

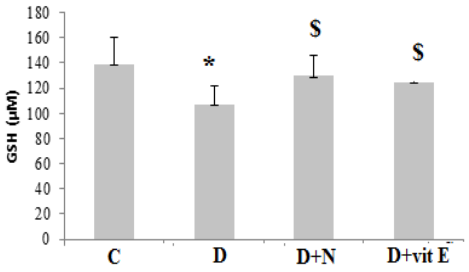
میزان لیپیدپراکسیداسیون در موش‌های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با استفاده از معرف TBA ارزیابی شد نتایج به صورت mean±sd نشان داده شده‌اند.*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$)، $: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p<۰/۰۵$).

گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های دفاعی غیرآنزیمی در میتوکندری است که نقش مهمی را در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکندری‌ها به عهده دارد. بر طبق نتایج به دست آمده از آزمایشات ما، میانگین GSH در گروه دیابتی (µg/mg protein) ۱۰۷ و در گروه دیابتیکی که نانوسریا دریافت می‌کنند، (µg/mg protein) ۱۲۹/۸

Archive of SID

www.SID.ir

بوده است که نشان دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانتی نانوسریا بر میتوکندری کلیه موش‌های دیابتی بوده است (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: تاثیر نانوسریا در محافظت در برابر اکسیداسیون گلوتاتیون ناشی از دیابت در میتوکندری های کلیوی

غلظت گلوتاتیون را در موش‌های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با معرف DTNB ارزیابی شد. نتایج به صورت mean±sd نشان داده شده‌اند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$)، $: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p<۰/۰۵$).

بحث

در مطالعه حاضر، اثر نانوذرات سریوم اکساید بر جلوگیری از نفروپاتی دیابتی در میتوکندری‌های ایزوله بافت کلیه موش‌های سوری نر دیابتی شده با استرپتوزوسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از اثرات آنتی‌اکسیدانتی و کاهش چشمگیر آسیب اکسیداتیو میتوکندری کلیه موش‌های دیابتیک در مقایسه با گروه کنترل و دیابتیک پس از ۴ هفته درمان با نانوسریا بود.

در مطالعه‌های مختلف، از استرپتوزوتوسین (STZ) به‌عنوان ماده‌ای برای القاء دیابت در مدل‌های حیوانی استفاده شده است(۲۸،۲۷). عوارض دیررس شایع دیابت شامل عوارض قلبی- عروقی، رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی می‌باشد. نفروپاتی دیابتی از شایع‌ترین علل نارسایی کلیه و دیالیز محسوب می‌شود و بر اساس مطالعه سال ۲۰۰۸ آمریکا، ۴۴ درصد موارد جدید را شامل شده و حدود یک سوم بیماران دیابتی در صورت کنترل نامناسب قندخون در سیر بیماری خود دچار عوارض کلیوی شده که در صورت عدم کنترل مناسب، عوارض این بیماری سبب ناتوانی و مرگ و میر بالایی می‌شود(۲۹). مطالعات بالینی اخیر مشخص کرده که هیپرگلیسمی، علت مهم پیشرفت و توسعه اختلال عملکرد کلیه در افراد دیابتی است، از طرفی در افراد دیابتی، استرس اکسیداتیو یک نقش کلیدی در پاتوژنز عوارض عروقی بازی می‌کند. امروزه بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، به عنوان بیماری میتوکندریایی شناخته شده است(۳۲-۳۰) و از میتوکندری ایزوله، به عنوان ابزاری ارزشمند در بررسی عملکرد میتوکندری و اختلالات مرتبط در طیف وسیعی از تحقیقات بالینی و پایه استفاده می‌شود(۳۳). هایپرگلایسمی مهم‌ترین عامل شناخته شده عوارض طولانی مدت دیابت است که باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمدتاً از طریق NADPH oxidase، مسیر پلی فنول و محصولات گلیکوزیله می‌شود(۱۲). به طور کلی نتایج حاصل از سنجش مارکرهای آسیب اکسیداتیو میتوکندری، نشان دهنده‌ی ارتباط مستقیم بین افزایش تولید ROS و پیشرفت نفروپاتی دیابتی است. مطالعات زیادی نشان‌دهنده نقش ROS در پیشرفت نفروپاتی دیابتی بوده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط SAYED در سال ۲۰۱۲ انجام شد، استفاده از دو آنتی‌اکسیدانت طبیعی تیموکینون و پروآنتوسیانین در رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوسین، باعث کاهش تولید ROS، نیتریک اکساید (NO) و لیپیدپراکسیداسیون و جلوگیری از نفروپاتی دیابتی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو شده است(۳۴). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که نانوسریا اثرات قابل توجهی را در کاهش ROS دارد. در مطالعه نجاران و همکاران در سال ۲۰۱۰، غلظت‌های مختلف گلوکز بر سمیت سلولی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و نقش حفاظتی زعفران در سلول PC12 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، برای بررسی سمیت سلولی از روش MTT استفاده شد و نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار میزان بقای سلولی در شرایط گلوکز بالا بود که پس از تیمار سلول‌ها با زعفران و در حضور GSH، سمیت سلولی کاهش یافت(۳۵).

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه حاضر نیز تزریق نانوسریا با غلظت ۶۰ mg/kg، میزان درصد میتوکندری‌های زنده را افزایش داد و لذا این نتیجه بیان‌کننده اثر احیایی و به عبارتی اثر آنتی‌اکسیدانتی نانوسریا است. روش MTT برای تعیین درصد بقاء سلول‌ها و شمارش سلولی، کاربرد فراوانی دارد؛ به‌طوری‌که میتوکندری‌های سلول‌های زنده که دارای آنزیم‌های دهیدروژناز می‌باشند، قادرند نمک زردرنگ تترازولیوم را به کریستال‌های فورمازون بنفش رنگ تبدیل کنند(۳۶). در مطالعات بسیاری، میزان لیپیدپراکسیداسیون ناشی از دیابت ارزیابی شده است. در مطالعه‌ای که توسط محبوب و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی سطوح سرمی لیپیدپراکسیداسیون (مالون‌دی‌آلدئید) و آنزیم آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتیک زن و مرد در هند انجام گرفت، نتایج حاکی از افزایش غلظت مارکر لیپیدپراکسیداسیون (مالون‌دی‌آلدئید) و کاهش گلوتاتیون سرم در هر دو گروه زن و مرد بیماران تیپ دو دیابت در مقایسه با گروه غیردیابتیک بود و نتیجه‌گیری آن‌ها این بود که تغییر در این دو فاکتور، ممکن است خیلی زودتر از شروع عوارض ثانویه دیابت نوع دو اتفاق بیفتد(۳۷).

مالون دی آلدئید، مارکر آسیب اکسیداتیو به لیپیدها بوده که در میتوکندری گروه دیابتی افزایش معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) در مطالعه حاضر داشت و در گروه‌های تحت درمان با نانوسریا، شاهد کاهش این مارکر بودیم. میتوکندری محدوده دفاعی بر ضد آسیب اکسیداتیو دارد؛ برای مثال آنزیم آنتی اکسیدانت MnSOD، سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید تبدیل می‌کند(۳۸) و یا این که ۱۵-۱۰ درصد از گلوتاتیون سلولی در داخل میتوکندری قرار دارد(۳۹). میتوکندری که اندامکی مهم در داخل سلول است، نقش مهمی را در تولید ROS و فراهم آوردن انرژی مورد نیاز سلول بر عهده دارد(۴۰). از طرفی آسیب به میتوکندری سبب خروج فاکتورهای پروآپوپتوتیک که آغاز کننده مرگ سلولی است، از میتوکندری می‌شود(۴۱) که در شرایط دیابت، میزان گلوتاتیون سلولی میتوکندری، کاهش می‌یابدکه در این آزمایش، بعد از تحت درمان قرار گرفتن موش‌های سوری دیابتی با نانوسریا، بهبودی نسبتاً خوبی در سطح گلوتاتیون مشاهده کردیم. در بسیاری از مطالعات، اثر آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی و سنتتیک بر نفروپاتی دیابتی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج این مطالعات نشان دهنده مهار نفروپاتی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو بوده است(۴۲،۳۴). مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدانت‌ها از قبیل ویتامین E، نقش مهمی در استرس اکسیداتیو دارند(۴۳) و سلول در برابر رادیکال‌های آزاد به صورت آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک دفاع می‌کند. خیلی از عوارض دراز مدت دیابت، به خاطر تثبیت حالت هایپرگلیسمی و عدم کنترل قند خون است(۴۴). در مطالعه‌ای که به وسیله Xiaohong Zhou در سال ۲۰۱۱ انجام شد، نشان داده شد که نانوذرات سریم با مهار اکسیژن فعال به درمان بیماری‌های عصبی دژنراسیون ماکولا (AMD) و رتینوپاتی دیابتی (DR) کمک می‌کند(۱۶).

در مطالعه دیگری که توسط A.Y. Estevez و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، نتایج نشان دهنده این بود که نانوذرات سریم با اندازه ذره‌ای زیر ۲۵ نانومتر، می‌توانند باعث کاهش ۵۰ درصدی مرگ سلولی در مغز موش شوند. این نانوذرات، گونه‌های فعال اکسیژن و اکسید نیتریک را ۱۵ درصد کاهش می‌دهند. هم‌چنین نانوذرات سریم با مهار Peroxynitrite، باعث کاهش آسیب اکسیداتیو پس ازسکته مغزی می‌شوند(۴۵). هم‌چنین در مطالعات قبلی، ترکیب نانوسریا (با اندازه ذره‌ای زیر ۱۰۰ نانومتر) و سلنیت سدیم، اثر مناسبی را در جلوگیری از بروز استرس اکسیداتیو به خصوص کاهش تولید مولکول‌های فعال اکسیژن و لیپیدپراکسیداسیون در بافت‌های مختلف موش‌های دیابتی نشان دادند که باز هم فرضیه استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها را در کاهش عوارض دیابت تایید می‌کند(۴۷،۴۶). هم‌چنین نوایی نیژه و همکاران به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانت نانوذرات

Archive of SID
www.SID.ir

سریو اکساید (با انـدازه ذره‌ای زیـر ۱۰۰ نـانومتر) و فـرم فلزی و معمول سریوم پرداختند که نشان دادند نانوذرات سریوم اکساید، اثرات بهتری در کاهش آسیب‌های ناشـی از استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف رت‌های دیـابتی دارد(۴۷). خواص آنتی‌اکسیدانت ذرات نانوسریا، مکانیسـم پیشنهاد شده برای اثرات آنتی‌اکسیدانت نانوسریا به قابلیـت تبدیل ایـن ذرات بـین دو حالـت احیـا (Ce^{3+}) و اکسـید (Ce^{4+}) بر می‌گردد که در حالت احیا (Ce^{3+})، قابلیت دادن الکترون به مولکول‌های فعال اکسیژن مثل سوپراکسید را داشته و آن‌ها را به فرم پایدارتری تبدیل می‌کند که ایـن عمل آن‌ها، مشابه عملکرد آنـزیم سوپراکسـید دسـموتاز است(۴۸). هم‌چنین یک مولکول هیدروژن پراکساید می تواند به فرم اکسید (Ce^{4+}) متصل شده و طـی تبـدیل بـه فرم احیا (Ce^{3+})، هیدروژن پراکساید بـه آب و اکسـیژن تبدیل شود که عملکردی شبیه آنـزیم کاتـالاز دارد(۴۹). البته اثرات بیولوژیک نانوذرات سریوم اکساید، می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل روش سنتز، انـدازه ذرات و پایدارکننده قرار گیرد(۵۰).

در مطالعـه Ivanov و همکـاران، نشـان دادنـد کـه خاصیت خنثی‌کننـدگی رادیکـال‌هـای آزاد، وابسـته بـه انـدازه ذره‌ای اسـت و هرچـه انـدازه ذره‌ای کوچـک‌تـر شـود، منجـر بـه اثـرات آنتـی‌اکسـیدانت بهتـری خواهـد شـد(۵۱). در مطالعـه مـا از نـانوذرات سـریوم اکسـاید بـا اندازه ذره‌ای ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر استفاده شـد کـه خـواص آنتـی اکسـیدانت قابـل قبـولی در مقایسـه بـا ویتـامین E داشت. با توجه به این کـه کـه شـیوع دیابـت در طـی دو دهه گذشته در جهان بسیار چشمگیر بود(۱۷)، بـه‌طـوری که از آن با نام اپیـدمی خـاموش یـاد مـی‌شـود، پیشـنهاد می‌شود که مطالعات بیش‌تری پیرامون اثرات نانوسـریا و تعیـین دوز سـمی آن و اثـرات سینرژیسـتی آن در کنـار دیگر داروهای پایین آورنده قند خون صورت گیرد. بـه طور کلی نتایج ایـن مطالعـه نشـان مـی‌دهـد کـه تجـویز نانوذرات سریوم اکساید به مدت ۴ هفته، می‌تواند سـبب بهبود عوارض کلیوی ناشی از دیابت شود، چرا کـه ایـن ماده با خواص کاتالیزوری و آنتـی‌اکسـیدانتی کـه دارد، روند اسـترس اکسـیداتیو و آثـار مخـرب ناشـی از آن را مهار می‌کند و می‌توان از این مـاده پـس از بررسـی‌هـای بیش‌تر، در درمان مکمل عوارض دیابت در کنـار دیگـر داروهای پایین آورنده قند خون به خوبی استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشـگاه علـوم پزشـکی مازنـدران، به دلیل تامین هزینه این طرح اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل بخشـــــی از پایان‌نامه خانم منیره جهانی، دانشـجوی کارشناسی ارشد سم‌شناسی دانشکده داروسازی ساری بوده است.

References

1. Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K, Kumagai K. Immunologic aspects of the nonobese diabetic(NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. Diabetes1983; 32(3): 247-253
2. Ramachandran V, Saravanan R. Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. Funct Foods 2013; 5(3): 1077-1087.
3. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. Clinic Al Diabetes 2008: 26(2): 77-82.
4. Battisti WP, Palmisano J, Keane WE. Dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. ClinChem Lab Med 2003; 41(9): 1174-1181.
5. Tai TY, Tseng CH, Sung SM, Huang RF, Chen CZ, Tsai SH. Retinopathy, neuropathy and nephropathy in non-insulin-dependent

Archive of SID
www.SID.ir

diabetic patients. J Formos Med Assoc 1991; 90(10): 936-940.

6. Farokhi F, Kafash-Farkhad N, Asadi-Samani M. Preventive effects of hydroalcoholic extract of *Prangosferulacea*(L.) Lindl.on kidney damages of diabetic rats induced by alloxan. J Sharekord Univ Med Sci 2013; 14(6): 72-81.
7. Sklavos MM, Bertera S, Hubert MT, Bottino R, He J, Beilke JN, et al. Redox Modulation Protects Islets From Transplant-Related Injury. Diabetes 2010; 59(7): 1731–1738.
8. Girard D, Rondeau P, Catan A, Planesse C, Giraud P, Bourdon E. Oxidative damage in diabetics: Insights from a graduate study in La Reunion University. Biochem Mol Biol Educ 2014; 42(5): 435-442.
9. Das J, Sil PC. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. Amino Acids 2012; 43(4): 1509-1523.
10. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest 2004; 114(12): 1752-1761.
11. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacol Res 2000; 42(4): 361-362.
12. Sun LQ, Zhao J, Zhang TT, Qu L, Wang X, Xue B, et al. Protective effects of Salvianolic acid B on Schwann cells apoptosis induced by high glucose. Neurochem Res 2012; 37(5): 996-1010.
13. Krishan P, Chakkarwar VA. Diabetic nephropathy: Aggressive involvement of oxidative stress. J Pharm Educ Res 2011; 2(1): 35-41.
14. Zhang Y, Liu D. Flavonolkaempferolimproves chronic hyperglycemiaimpaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. Eur J Pharmacol 2011; 670(1): 325-332.
15. Kapoor R, Kakkar P. Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes. Plos One 2012; 7(8): e41663.
16. Zhou X, Wong LL, Karakoti AS, Seal S, McGinnis JF. Nanoceria Inhibit the Development and Promote the Regression of Pathologic Retinal Neovascularization in the Vldlr Knockout Mouse. Plos One 2011; 6(2): e16733.
17. Nair M. Diabetes mellitus, Part 1: physiology and complications. Br J Nurs 2007; 16(3): 184-188.
18. Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. J Am Soc Nephrol 2003; 14(8 Suppl): S250–S253.
19. Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. Biochim Biophys Acta 2012; 1820(12): 1940-1950.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation ofmicrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dy binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
21. Gao X, Zheng CY, Yang L, Tang XC, Zhang HY. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β-amyloid peptide. Free Radical Bio Med 2009; 46(11): 1454-1462.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55–63.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. Environ Toxicol Pharmacol 2008; 26(2): 232-236.
24. Sadegh C, Schreck RP. The Spectroscopic Determination of Aqueous Sulfite Using Ellman's Reagent. MURJ .2003; 8:39-43.
25. Charles AT, Frazier JM. In vitro biological system.In Methods in Toxicology.NewYork: Academic press. 1983.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55–63.
27. Sameni H, Ramhormozi P, Bandegi A, Taherian A, Safari M, Tabriziamjad M. Effects of hydroalcoholic extract of Iranian propolis on blood serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats. Koomesh 2014; 15(3): 388-395.
28. Roghani M, Malayeri O, Malayeri S. Effect of Ttibylus Terrestris Oral Feeding On Learning and Memory in Streptozotocin-diabetic Rats: Investigating the Role of lipid Proxidation. J Guilan Univ Med Sci 2011; 85: 88-95.
29. Reutens AT. Epidemiology of diabetic kidney disease. Med Clin N Am 2013; 97: 1-18.
30. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 1999; 283(5407): 1482-1488.
31. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(11): 870-879.
32. Camara AK, Lesnefsky EJ, Stowe DF. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. Antioxid Redox Signal 2010; 13(3): 279-347.
33. Pourahmad J, Hosseini MJ. Application of Isolated Mitochondria in Toxicological and Clinical Studies.Iran J Pharm Res 2012; 11(3): 703-704.
34. SAYED AA. Thymoquinone and proanthocyanidin attenuation of diabetic nephropathy in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012; 16(6): 808-815.
35. Tayarani-Najaran Z, Parsaee H, Mousavi SH. Study of High Glucose-Induced Toxicity and Reactive Oxygen Species Production and the Protective Effect of Saffron Extract in PC12 Cells. The Scientific Journal of ZUMS 2010; 18(72): 42-51.
36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immumol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
37. Mahboob M, Rahman M F, Grover P. Serum lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in male and female diabetic patients. Singapore Med J 2005; 46(7): 322-324.
38. Forman HJ, Azzi A.On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. Faseb J 1997; 11(5): 374–375.
39. Zhong Q, Putt DA, Xu F, Lash LH. Hepatic mitochondrial transport of glutathione: Studies in isolated rat liver mitochondria and H4IIE rat hepatoma cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 2008; 474(1): 119-127.
40. Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of Arsenic (III) on Isolated Liver Mitochondria: A New Mechanistic Approach. Iran J Pharm Res 2013; 12(Suppl): 121-138.
41. Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new

Archive of SID

www.SID.ir

mechanistic approach. Metallomics 2013 5(2): 152-166.

42. Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary Glutathione Protects Rats from Diabetic Nephropathy and Neuropathy. J Nutr 2002; 132(5): 897–900.
43. Garcia-Estrada J, Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Martinez-Conteras A, Luquin S, de La Mora PG, et al. An alpha-lipoic acid-vitamin E mixture reduces post-embolism lipid peroxidation, cerebral infarction, and neurological deficit in rats. Neurosci Res 2003; 47(2): 219-224.
44. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. Diabetes 2004; 53(Suppl 1): 110-118.
45. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. Free Radical Bio Med 2011; 51(6): 1155–1163.
46. Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, Hassani S, Pakzad M, Baeeri M, et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. World J Diabetes 2011; 2(11): 204-210.
47. Navaei-Nigjeh M, Rahimifard M, Pourkhalili N, Nili-Ahmadabadi A, Pakzad M, Baeeri M, et al. Multi-organ Protective Effects of Cerium Oxide Nanoparticle/Selenium in Diabetic Rats: Evidence for More Efficiency of Nanocerium in Comparison to Metal Form of Cerium. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 2012; 7(7): 605-612.
48. Xu C, Qu X. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications Open. NPG Asia Materials 2014; 6.
49. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. Chem Commun (Camb) 2010; 46(16): 2736–2738.
50. Estevez AY, Erlichman JS. The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy. Nanomedicine (lond) 2014; 9(10): 1437–1440.
51. Ivanov VK, Shcherbakov AB, Ryabokon IG, Usatenko AV, Zholobak NM,Tretyakov YD. Inactivation of the nitroxyl radical by ceria nanoparticles. Dokl Chem 2010; 430(5): 639-642.

Archive of SID

www.SID.ir