ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Nanoceria against Streptozotocin Induced Mitochondrial Dysfunction in Embryo of Diabetic Mice

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

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

(Received February 22, 2015 ; Accepted May 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: Gestational diabetes is known as increasing blood glucose level for the first time during pregnancy. Mitochondrial damage and oxidative stress are the most important factors in the development of diabetic complications. Cerium nanoparticles have antioxidant properties. In this study we examined the protective effect of nanoceria in preventing mitochondrial damage induced by diabetes.

Materials and methods: In this study, the mice were divided into five groups including control, diabetic, Nanoceria, diabetes+Nanoceria, and diabetes + vit E groups. Diabetes was induced by STZ (60 mg/kg IP). Blood glucose level was checked in days 1,5,10, and 15 of pregnancy. The diabetic state was confirmed when the blood glucose concentration exceeded 200 mg/dl. On day 16 of pregnancy the embryos were excised and their mitochondria were isolated using different centrifuge technique. Then, oxidative stress markers and mitochondrial damage were measured.

Results: Diabetes significantly increased the production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and oxidation of glutathione in isolated mitochondrial in embryo of diabetic mothers ($P<0.05$). Nanoceria treatment (60 mg/kg) significantly prevented the mitochondrial oxidative stress induced by gestational diabetes in embryo of mice ($P<0.05$). Also, mitochondrial function significantly decreased in diabetic group compared to that of the control group, which was caused by nanoceria treatment that significantly inhibited diabetes-induce mitochondrial toxicity ($P<0.05$).

Conclusion: Cerium oxide nanoparticles had significant effects in preventing oxidative stress and mitochondrial damage induced by gestational diabetes and could be considered in reducing the effects of gestational diabetes.

Keywords: Diabetes, nanoceria, mitochondrial damage, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(125): 109-120 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۵ خرداد سال ۱۳۹۴ (۱۲۰-۱۰۹)

اثر محافظتی نانوسریا در جلوگیری از آسیب میتوکندریایی در جنین موش های سوری دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

زینب وفائی پور[۱]
محمد شکرزاده[۲]
منیره جهانی[۱]
فاطمه شکی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت بارداری به افزایش گلوکز خون در دوران بارداری که برای اولین بار شروع یا تشخیص داده شود گفته می‌شود. آسیب میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو بیش‌ترین اهمیت را در ایجاد عوارض دیابت دارند. نانوذرات سریم اکساید دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. در این مطالعه اثر محافظتی نانوسریا در جلوگیری از آسیب میتوکندری ایجاد شده به دنبال القاء دیابت بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موش‌ها به پنج گروه کنترل، دیابتی، نانوسریا، دیابت + نانوسریا ، و دیابت + ویتامین E تقسیم شدند. دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین (۶۰ mg/kg IP) القا شد. قند خون در روزهای ۱،۵،۱۰ و ۱۵ بارداری بررسی گردید. قندخون بالاتر از ۲۰۰mg/dl به عنوان دیابتی در نظر گرفته شد. در روز ۱۶ بارداری جنین‌ها با عمل سزارین خارج شده و میتوکندری آن‌ها با روش سانتریفیوژ متعدد جداسازی شد. سپس فاکتورهای استرس اکسیداتیو و آسیب میتوکندریایی اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: دیابت باعث افزایش معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) تولید گونه‌های فعال اکسیژن، لیپید پراکسیداسیون و اکسیداسیون گلوتاتیون در میتوکندی‌های جدا شده از جنین مادر دیابتی شد. تجویز نانوسریا (۶۰mg/kg) به صورت معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$). باعث جلوگیری از بروز عوارض ناشی از دیابت بارداری در میتوکندری جنین موش‌ها شد. هم‌چنین عملکرد میتوکندری‌ها به صورت معنی‌داری در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد که تجویز نانوسریا باعث مهار معنی‌دار سمیت میتوکندریایی ناشی از دیابت گردید ($p < ۰/۰۵$).

استنتاج: نانوذرات سریم اکساید اثرات معنی‌داری را در جلوگیری از استرس اکسیداتیو و آسیب میتوکندریایی ناشی از دیابت بارداری نشان داد که می‌تواند جهت کاهش عوارض دیابت بارداری پیشنهاد گردد.

واژه های کلیدی: دیابت، نانوسریا، آسیب میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

دیابت بارداری به افزایش گلوکز خون گفته می‌شود که در دوران بارداری برای اولین بار شروع یا تشخیص داده می‌شود(۱). این نوع دیابت با افزایش شیوع چاقی و بالا رفتن سن باروری در زنان افزایش می‌یابد(۳،۲). نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که فرزندان متولد شده از مادران مبتلا به دیابت بارداری بیش‌تر دچار دیابت

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۴۵۶ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

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

دوران کودکی و بزرگسالی، عدم تحمل گلوکز و چاقی می‌شوند(۵،۴). هم‌چنین شیوع نقص‌های مادرزادی از قبیل ناهنجاری در لوله عصبی و قلب، سقط‌های جنینی و تاخیر رشد داخل رحمی در نوزادان مادران دیابتی نسبت به نوزادان مادران سالم بیش‌تر مشاهده می‌شود(۸-۶). گلوکز با افزایش ذرات فعال اکسیژن (ROS) باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در دیابت و نیز در دیابت بارداری می‌شود(۱۰،۹). استرس اکسیداتیو زمانی در یک سیستم سلولی رخ می‌دهد که تولید رادیکال های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن باشد(۱۲،۱۱). این فرآیند در بیماران دیابتی باعث تشدید عوارض دیابت و نیز ادامه مقاومت به انسولین می‌شود(۱۳). تعدادی از عوامل سیستم دفاعی بدن مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، بیلی روبین و مولکول‌های دارای گروه تیول در داخل بدن تولید می‌شوند، اما آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامینE، ویتامین C و بتاکاروتن باید از طریق تغذیه روزانه فراهم گردند(۱۵،۱۴). حال اگر آنتی‌اکسیدان‌های سلولی باعث حذف رادیکال‌های آزاد نشوند، رادیکال‌ها باعث آسیب به پروتئین، لیپید و اسید نوکلئیک می‌شوند. محصولات اکسید شده ناشی از رادیکال‌های آزاد فعالیت بیولوژیکی را کاهش می‌دهند و در نتیجه باعث کاهش متابولیسم انرژی، سیگنالینگ سلولی و حمل و نقل می‌شوند. تجمع چنین آسیب‌هایی در سلول منجر به مرگ سلول از طریق نکروز یا آپاپتوز می‌شود(۱۷،۱۶). استرس اکسیداتیو منجر به تغییر در هموستاز، آسیب به جنین و مرگ در نوزادان مادران دیابتی می‌شود(۱۸). توانایی جنین در حال تکامل با شرایط استرس اکسیداتیو به میزان زیادی به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن وابسته است(۱۹). جنین در حال رشد به سطح بالای ROS بسیار حساس است زیرا این رادیکال‌های سوپراکسید منجر به تولید اکسیژن و نیتروژن بسیار فعال شده که به جنین آسیب می‌رسانند. بنابراین هر عامل محیطی یا بیماری‌های مادر که منجر به افزایش سطح این رادیکال‌های آزاد گردد از طریق افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین منجر به آسیب DNA و RNA در جنین می‌شود(۲۰). میتوکندری مهم‌ترین منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS و بروزاسترس اکسیداتیو است و در انواع سلول یافت می‌شود(۲۱). اهمیت میتوکندری به این دلیل است که اختلال در عملکرد آن نقش مهمی در پاتوژنز انسولین بازی می‌کند(۲۳،۲۲). به علاوه، میتوکندری مرکز متابولیسم سلولی و ساخت ATP است که این عمل حیاتی را از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو انجام می‌دهد(۲۴). هم‌چنین میتوکندری نقش مهمی را در شروع فرآیند مرگ سلولی از نوع آپوپتوز و یا نکروز دارد(۲۴).

مطالعات بالینی نشان می‌دهد که در معرض قرار گرفتن جنین با ترکیبات و سمومی که اکسیداتیو هستند از جمله غلظت بالای گلوکز می‌تواند موجب افزایش محصولات رادیکال‌های آزاد اکسیژن در میتوکندری شود که این فرآیند قادر به مختل کردن رشد و نمو جنین و در نهایت ایجاد تراتوژن می‌باشد(۲۵). هم‌چنین پراکسیداسیون غشاء لیپیدی میتوکندری که از طریق واکنش زنجیره رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد می‌تواند موجب تورم میتوکندری شود که از طریق آنتی‌اکسیدان‌هایی که سبب شکستن این واکنش می‌شوند، مهار می‌گردد(۲۵).

بسیاری از مطالعات حیوانی اثربخشی آنتی‌اکسیدان‌ها را در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ثابت کرده‌اند(۲۶)، ولی تنها استفاده از ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان مثل ویتامین E و ویتامین C یا فولیک اسید برای این امر کافی نیست و امروزه تمایل زیادی برای استفاده از فلاوونوئیدهای گیاهی یا محصولات سنتزی وجود دارد که علاوه بر دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدان‌های قوی تر دارای سمیت کمی هم باشند. بنابراین یکی از موثرترین راه‌ها برای کاهش آنرمالی‌های مادرزادی شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های موثر و با عوارض کم می‌باشد(۲۹-۲۷). یکی از درمان‌های پیشنهادی برای این

استرس‌های اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله رادیکال‌های آزاد استفاده از نانوذرات سریم است. سریم جزو لانتانیدها می‌باشد که در دو حالت اکسیداسیون ۳+ و ۴+ وجود دارد. در واقع این یون با انتقال بین این حالت‌های اکسیداسیون منجر به مهار و خنثی شدن ذرات فعال اکسیژن می‌شود(۳۲،۲۷-۳۰). اکسید نانو ذرات سریم موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌شود که این واقعه به علت اثر کاتالیزوری آن در تحریک فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و سم زدایی از رادیکال های آزاد فعال باقیمانده در بافت‌ها برای مدت طولانی از طریق حرکت بین حالت اکسید و احیا می‌باشد(۳۳). هم‌چنین به نظر می‌رسد نانوسریا می‌تواند فعالیت هر دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را تقلید کند. فعالیت مشابه سوپراکسید دیسموتاز بیشتر هنگامی ظاهر می‌شود که سریم اکسید شده است (Ce^{4+}) و فعالیت مشابه آنزیم کاتالاز هنگامی ظاهر می‌گردد که سریم احیا می‌شود (Ce^{3+}). خواص کاتالیزوری سریم زمانی که اندازه ذرات کم‌تر ۴ نانومتر باشند بیش‌تر می شود(۳۴). درنتیجه نانوسریم می‌تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد(۳۵،۲۸). تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی اثر محافظتی نانو سریا در جلوگیری از آسیب میتوکندریایی در دیابت بارداری انجام نشده است، بنابراین ما در این مطالعه به بررسی اثر محافظتی نانوسریا در جلوگیری از آسیب میتوکندریایی ناشی از استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین می‌پردازیم.

مواد و روش ها

مواد. نانوسریم اکساید از شرکت نوترینو (ایران) خریداری شد. استرپتوزوسین از شرکت Merck Sigma Chemical Co. (USA) (آمریکا)؛ رنگ MTT (۳-[۴،۵-دی متیل تیازول-۲-ایل]-۲، ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) از شرکت Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) (آمریکا)؛ سدیم سیترات؛ کومازی بلو از شرکت Merck (آلمان)؛ اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) از شرکت Merck (آلمان)؛ ۵و۵ دی تیو بیس-۲ نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) از شرکت Merck (آلمان)؛ گلوتاتیون (GSH) از شرکت Sigma (آمریکا)؛ Tris-HCl از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا)؛ ۲و۴ هیدروکسی اتیل -۱- پی‌پرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES)، مورفولینو پروپان سولفونیک اسید) (MOPS) از شرکت Merck (آلمان)؛ اتیلن گلایکول بیس (۲-آمینو اتیلن اتر) -N,N,Ń,Ń- تترا استیک اسید (EGTA)، KCl از شرکت کیان کاوه (ایران)؛ $MgCl_2$ از شرکت قطران شیمی (ایران)؛ KH_2PO_4 از شرکت Merck (آلمان)؛ سوکسینات، اتانول از شرکت الکل طب اراک (ایران)؛ ۷و۲- دی کلروفلئوروسین دی استات (DCFH-DA) از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا)؛ n-بوتانل از شرکت Merck (آلمان)؛ تیوباربیتوریک اسید(TBA) از شرکت Merck (آلمان)؛ اسید فسفریک، تری کلرواستیک اسید (TCA) از شرکت از شرکت Merck (آلمان)؛ متانول از شرکت کیان کاوه(ایران)، آلبومین، مانیتول از شرکت Merck (آلمان)؛ ساکارز از شرکت Merck (آلمان)؛ سدیم استات، دی متیل سولفوکسید DMSO، فسفات سدیمNa_2HPO_4 از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند.

روش کار: دو هفته پس از این که موش‌ها با محیط آشنا شدند، موش‌های سوری ماده یک شب با موش‌های سوری نر غیر دیابتی جفت گیری کرده و در صورت مشاهده پلاک واژنی، آن روز به عنوان اولین روز بارداری در نظر گرفته شد. سپس دیابت با تزریق استرپتوزوسین در موش‌های ماده ایجاد گردید. استرپتوزوسین در بافر سیترات (۰/۱ μ، pH ۴/۶) حل شده و با دوز ۶۰mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق شد. قند خون قبل از آزمایش و نیز در روزهای ۱،۵،۱۰و ۱۵ بارداری اندازه‌گیری شده و موش هایی که قند خون بالاتر از۲۰۰mg/dl داشتند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند.

در این آزمایش از پنج گروه موش سوری استفاده شد که بر طبق مطالعات پیشین در هر گروه ۶ موش سوری باردار قرار گرفت. گروه اول شامل کنترل (تزریق نرمال سالین)، گروه دوم شامل نانوسریا (۶۰mg/kg)، گروه سوم شامل استرپتوزوسین (۶۰mg/kg)، گروه چهارم شامل استرپتوزوسین + نانوسریا، و گروه پنجم شامل استرپتوزوسین+ویتامین E(۱۰۰mg/kg) بود. نانوسریا در نرمال سالین حل شده و با دوز 60mg/kg در روز اول بارداری به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز ۱۶ بارداری جنین‌ها را با عمل سزارین از رحم موش‌ها خارج نموده و در بافر مانیتول سرد (مانیتول 0.255 M، ساکارز75mM، 0.2 mM EDTA) شستشو داده و سپس بافت را هموژن نمودیم. بافت هموژن شده را ابتدا با سرعت ۲۰۰۰x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و بعد محلول رویی را با سرعت ۱۰۰۰۰x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکندری است در بافر تریس (ساکارز 0.25 M، 20mM KCL، 2mM MgCl2 1 mM Na_2HPO_4، 0.05 mM Tris-HCl) سرد پراکنده کردیم(۳۶). بعد از هموژن کردن و خارج نمودن میتوکندری، تعیین پروتئین کرده و سپس میزان عملکرد میتوکندری (MTT) و فاکتورهای استرس اکسیداتیو شامل تعیین مقدار گلوتاتیون، ROS و LPO انجام گرفت.

اندازه گیری غلظت پروتئین.

غلظت پروتئین با استفاده از معرف کومازی بلو یا همان روش برادفورد اندازه گیری گردید و از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد (۳۷).

روش اندازه گیری میزان لیپید پراکسیداسیون

پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که به ۲۰۰µl از سوسپانسیون میتوکندریایی، ۲۰۰µl اسید فسفریک M ۰/۲ اضافه کرده و سپس TBA ۲۵ µl نیز اضافه نموده و به خوبی مخلوط کرده و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه نمودیم و بعد از سرد شدن به آن ۵۰۰ µl n بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده و سپس در ۱۲۰۰۰xg به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ کردیم. لایه n بوتانل برای سنجش در طول موج ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار TBARs از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید(۳۹،۳۸).

روش اندازه گیری گلوتاتیون

یک میلی‌لیتر از هموژن بافتی را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ xg سانتریفیوژ نمودیم. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر DTNB ۰/۴ درصد اضافه کرده و متعاقبا ورتکس نموده و۱۵ دقیقه انکوبه کردیم تا واکنش کامل شود. سپس میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. غلظت گلوتاتیون را از روی منحنی استاندارد گلوتاتیون برحسب nmol/ml به دست آوردیم(۴۰).

اندازه گیری هیدروژن پر اکساید با فلو سایتومتری

میتوکندری‌ها را در بافر تنفسی پراکنده کرده و سپس به آن‌ها معرف DCFH-DA با غلظت نهایی ۱۰ µM اضافه نمودیم و بعد از ۳۰ دقیقه میزان شدت فلورسانس با فلوسایتومتری خوانده شد(۴۱،۳۵).

ارزیابی عملکرد میتوکندری

ارزیابی سمیت میتوکندریایی بر اساس اندازه‌گیری میزان احیای MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز انجام شد. این آنزیم موجود در میتوکندری، در زمانی که عملکرد میتوکندری دچار اختلال شده، از کار می‌افتد و در نتیجه تبدیل MTT به ترکیب بنفش رنگ MTT فورمازون انجام نمی‌گیرد. در ابتدا میتوکندری‌ها را با غلظت ۱۰۰۰mg/ml در بافر تریس حل کرده و سپس ۲/۷۵ mg سوکسینات و ۱/۲ mg MTT را با ۱ ml

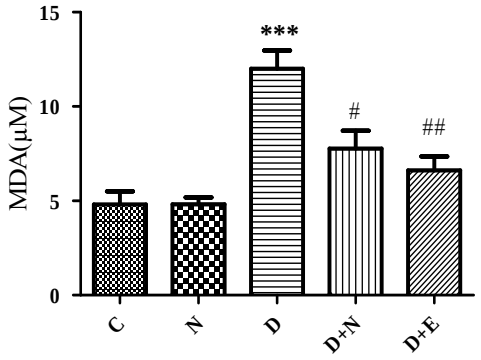
بافر تریس ترکیب کرده و دور آن‌ها را فویل پیچیده و به آرامی همزده تا کاملاً حل شود. سپس در پلیت ۹۶ خانه‌ای در هر ستون ۱۰۰µl از نمونه‌ها را ریخته و بعد به هر چاهک ۵۰µl معرف MTT اضافه نمودیم. دور پلیت را فویل پیچیده و سپس نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. بعد از آن به هر چاهک ۱۰۰µl از DMSO اضافه کرده و جذب آن توسط الایزا در ۴۹۰nm خوانده شد(۴۲).

آنالیز آماری

تمامی آنالیزهای آماری با استفاده ازنسخه ۱۷ نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفته است. نتایج بر حسب میانگین±انحراف معیار گزارش شده و میانگین برای مقایسه آماری مورد استفاده قرار گرفت. تست آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey بود. حد معنی‌داری p <۰/۰۵ تعریف شده بود.

یافته ها

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که لیپید پراکسیداسیون، که یکی از محصولات ذرات فعال اکسیژن در بروز استرس اکسیداتیو است و با اندازه‌گیری تولید MDA در میتوکندری‌های ایزوله شده تعیین می‌شود، در گروه دیابتی به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (p <۰/۰۵) این یافته حاکی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد درتماس با استرپتوزوتوسین است. در گروه‌هایی که به مدت ۱۶ روز نانوسریم را در دوران بارداری دریافت کرده بودند کاهش لیپید پراکسیداسیون در میتوکندری‌های ایزوله از جنین‌های موش‌های سوری مشاهده شد. میزان لیپید پراکسیداسیون در میتوکندری‌های ایزوله از بافت جنین به ترتیب در گروه کنترل ۴/۸±۱/۲۱µM، در گروه نانوسریا ۴/۸۱±۰/۶۴ µM، در گروه دیابتی ۱۲±۱/۶۷µM، درگروه دیابتی + نانوسریا ۷/۷۶±۱/۶۵ µM و در گروه دیابتی + ویتامینE ۶/۶۱±۱/۲۸µM بود. با توجه به تصویر شماره ۱، در گروه دیابتی که نانوسریا استفاده شده بود، کاهش معنی‌دار MDA مشاهده شد (p <۰/۰۵).



تصویر شماره ۱: اثر محافظتی نانوسریا بر میزان لیپید پراکسیداسیون درمیتوکندری جنین

میزان لیپید پراکسیداسیون در میتوکندری های ایزوله شده از جنین در گروه کنترل (C)، نانوسریا (N)، دیابتی (D)، دیابتی که نانوسریا (D+N) و دیابتی که ویتامین E (D+E) دریافت کرده است بااستفاده از معرف TBA سنجیده شد. نتایج به صورت mean±SD گزارش شده است (۶ موش در هر گروه).

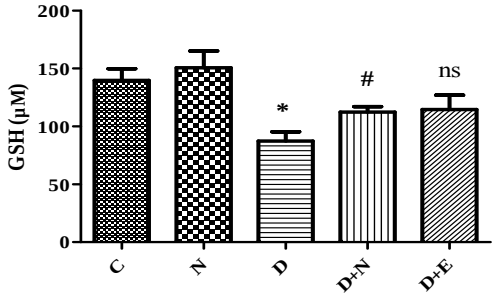
***: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p <۰/۰۰۱)،

#: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه دیابتی است (p <۰/۰۵)

##: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی است (p < ۰/۰۱).

در این مطالعه غلظت گلوتاتیون در میتوکندری ایزوله از بافت جنین مورد اندازه گیری قرار گرفت. میزان گلوتاتیون احیا در گروه کنترل ۱۳۹/۶۶±۱۷/۶۱ nM، در گروه نانوسریا ۱۵۰/۶۶±۲۵/۳۲ nM، در گروه دیابتی ۸۷/۳۳±۱۴/۰۱ nM، در گروه دیابتی + نانوسریا ۱۱۲/۳۳±۸/۰۸۲ nM، ودر گروه دیابتی+ ویتامین E ۱۱۴/۶۶±۲۱/۵۹ nM بود. با توجه به تصویر شماره ۲، استفاده از نانوسریا در گروه دیابتی افزایش معنی‌داری را در میزان گلوتاتیون به همراه داشت (p <۰/۰۵). ذرات فعال اکسیژن یا ROS منجر به تولید اکسیژن و نیتروژن بسیار فعال می‌شوند که می‌توانند به جنین آسیب برسانند. میزان ROS در میتوکندی ایزوله از جنین در گروه کنترل ۱۰۲±۱۴/۷۳، در گروه نانوسریا ۹۸/۶۶±۲۱/۵۴، در گروه دیابتی ۳۸۰±۲۸/۱۶، در گروه دیابتی + نانو سریا ۲۸۶/۳۳±۲۶/۱۰۲، و در گروه دیابتی+ ویتامین E

۱۲۶۱/۳۳±۳۴/۵۳ بر حسب شدت فلورسانس ندازه‌گیری شد. همان‌طورکه در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود، میزان ROS در گروه دیابتی که نانوسریا دریافت کرده بودند کاهش معنی‌داری (p <۰/۰۵) داشت. میزان فعالیت میتوکندری با تست MTT سنجیده شد که این میزان در گروه نانوسریا ۹۳/۵±۵/۸۵۹ درصد، در گروه دیابتی ۷/۹۳ ± ۳۹/۵ درصد، در گروه دیابتی + نانوسریا ۶/۲۱ ± ۶۵/۷ درصد، و در گروه دیابتی+ ویتامین E ۵۲/۷±۷/۹۶ درصد نسبت به گروه کنترل اندازه‌گیری گردید. با توجه به تصویر شماره ۴، میزان فعالیت میتوکندری در گروه دیابتی که نانو سریا دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری (p <۰/۰۵) داشت.

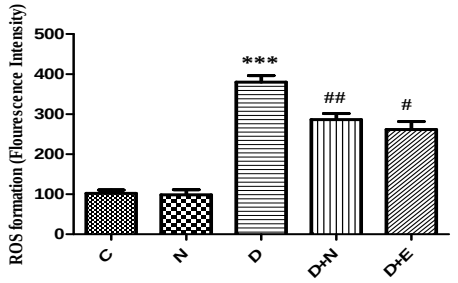


تصویر شماره ۲: اثرمحافظتی نانوسریا برمیزان گلوتاتیون موجود در میتوکندری جنین

میزان گلوتاتیون در میتوکندری های ایزوله شده از جنین در گروه کنترل (C)، نانوسریا (N)، دیابتی (D)، دیابتی که نانوسریا (D+N) و دیابتی که ویتامین E (D+E) دریافت کرده است با استفاده از معرف DTNB سنجیده شد. نتایج به صورت mean±SD گزارش شده است (۶ موش در هر گروه)

*: نشان دهنده اختلاف معنی دار باگروه کنترل است (p <۰/۰۵)،

#: نشان دهنده اختلاف معنی دار باگروه دیابتی است (p <۰/۰۵).



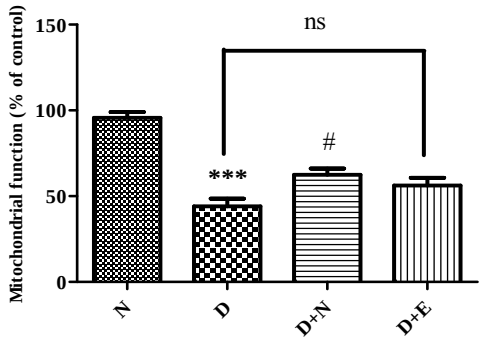
تصویر شماره ۳: اثر محافظتی نانوسریا بر تولید ROS (H_2O_2) در میتوکندری جنین

میزان ROS در میتوکندری های ایزوله شده از جنین در گروه کنترل (C)، نانوسریا (N)، دیابتی (D)، دیابتی که نانوسریا (D+N) و دیابتی که ویتامین E (D+E) دریافت کرده است با استفاده از معرف DCFH-D سنجیده شد. نتایج به صورت mean±SD گزارش شده است (۶ موش در هر گروه).

***: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p <۰/۰۰۱)،

#نشان‌دهنده اختلاف معنی دار باگروه دیابتی است (p <۰/۰۵)،

##: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی است (p <۰/۰۱).



تصویر شماره ۴: اثرمحافظتی نانوسریا بر عملکرد میتوکندری در جنین

میزان فعالیت میتوکندری یا MTT در میتوکندری‌های ایزوله شده از جنین در گروه کنترل (C)، نانوسریا (N)، دیابتی (D)، دیابتی که نانوسریا (D+N) و دیابتی که ویتامین E (D+E) دریافت کرده است با معرف DMSO سنجیده شد. نتایج به صورت درصد نسبت به گروه کنترل گزارش شده است (۶ موش در هر گروه).

***: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (p <۰/۰۰۱)،

#: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی است (p <۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر به بررسی اثرات محفاظتی نانوسریا (۶۰ mg/kg) در پیشگیری از آسیب میتوکندریایی با اندازه‌گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو پرداخته است داده‌های حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که دیابت موجب اختلال در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله از جنین می‌شود و می‌تواند اثر قابل توجهی بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو داشته باشد، زیرا افزایش در مقدار گلوکز عاملی است برای ایجاد اکسیداسیون در میتوکندری و سایر اعضای سلول از جمله غشاء لیپیدی، پروتئین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی. این بررسی نشان داد که استفاده از نانوسریا در

دیابت اثر قابل ملاحظه‌ای در فاکتورهای استرس اکسیداتیو و عملکرد میتوکندری دارد. هم‌چنین نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر این است که مصرف همزمان نانوسریا در دیابت دوران بارداری می‌تواند به عنوان یک درمان مکمل انجام گیرد. افزایش گلوکز خون ناشی از دیابت در دوران بارداری به علت وجود میزان بالای ذرات فعال اکسیژن موجب ایجاد فرآیند استرس اکسیداتیو می‌شود(۱۷). هم‌چنین افزایش وقوع آپاپتوز در جنین یکی از نتایج استرس اکسیداتیو می‌باشد(۴۳). در حقیقت استرس اکسیداتیو حاصل برهم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های بدن می‌باشد و هایپرگلیسمی یکی از عوامل بسیار مهم دخیل در ایجاد استرس اکسیداتیو است(۴۴). امروزه مطالعات زیادی بیانگر تاثیر استرس اکسیداتیو در ایجاد عوارض دیابت بارداری می‌باشند(۴۷-۴۵). از جمله عوارض جانبی دیابت بارداری می‌توان به ناهنجاری‌های مادرزادی، تولد زودرس نوزاد، ماکروزومی و مرگ نوزاد اشاره نمود. لازم به ذکر است که شخص باردار به علت کاهش مقاومت به انسولین مستعد ایجاد دیابت می‌باشد(۴۸). طبق مطالعات گذشته، اندازه‌گیری پروستاگلاندین E_2 در جنین رت‌های دیابتی کاهش چشمگیری را نشان داده است. هم‌چنین با افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد و ROS در جنین، تاثیرات تراتوژنی دیابت نیز افزایش می‌یابد. این نکته به اثبات رسیده است که مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدان مانند اسیدفولیک، NAC، ویتامین E و ویتامین C موجب کاهش بدشکلی‌ها شده و تاثیر مهمی در فاکتورهای استرس اکسیداتیو دارد(۴۳). افزایش سطح ROS در مادر، به خصوص اگر دیابت قبل از بارداری ایجاد شده باشد، می‌تواند باعث آسیب به پروتئین، لیپید، DNA، RNA و میتوکندری در جنین در حال رشد شود(۵۲،۵۱). نتایج بررسی‌های صورت گرفته نشان داد که دیابت یک عامل سمی برای جنین بوده و می‌تواند باعث افزایش فاکتورهای لیپید پراکسیداسیون، تولید هیدروژن پروکساید و کاهش مقدار گلوتاتیون (GSH) و کاهش عملکرد میتوکندری گردد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که با پیشگیری و مهار استرس اکسیداتیو می‌توان از عوارض دیابت بارداری جلوگیری نمود.

با توجه به عوارض دیابت بارداری بهتر است زنانی که دارای فاکتور خطر ابتلا به دیابت بارداری هستند (BMI>۳۰، سابقه تولد نوزاد با وزن بیش از ۴/۵ کیلوگرم، سابقه دیابت بارداری، اضافه وزن بارداری و سابقه دیابت فامیلی در اقوام درجه یک) در هفته ۲۴ تا ۲۸ بارداری تحت غربالگری تست تحمل گلوکز قرار گیرند تا بتوان از عوارض نا خواسته دیابت بارداری پیشگیری نمود(۴۹).

تکنولوژی نانو مبتنی بر ابزارها و تکنیک‌هایی است که در علم پزشکی رشد قابل توجهی را داشته‌اند و استفاده از نانو سریم اکساید یکی از این درمان های جدید می‌باشد. سریم یک عنصر کمیاب است که در جدول تناوبی جزو لانتانیدها به حساب می‌آید. از توانایی منحصر به فرد نانوسریم اکساید، اکسیداسیون بین دو حالت ۴ و ۳ می‌باشد(۵۰). نانوسریا با داشتن این دو حالت اکسیداسیون می‌تواند موجب تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدان هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز گردد(۵۴،۵۳،۳۳). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثرات نانوسریا درپیشگیری از آسیب اکسیداتیو میتوکندری صورت نگرفته است.

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوسریا می‌تواند به طور چشمگیری افزایش تولید ROS و نیز اکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها را مهار نماید و باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در جنین شود زیرا نانوسریا قدرت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به ویتامین E دارد. این نکته حائز اهمیت است که بسیاری از مطالعات گذشته اثربخشی آنتی اکسیدان‌ها را در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ثابت کرده‌اند ولی تنها استفاده از ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین E و ویتامین C یا

فولیک اسید برای این امر کافی نیست و امروزه تمایل زیادی برای استفاده از فلاوونوئیدهای گیاهی یا محصولات سنتزی وجود دارد که علاوه بر دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدان های قوی‌تر، دارای سمیت کمی هم باشند(۲۹-۲۷). بنابراین یکی از موثرترین راه‌ها برای کاهش آسیب‌های میتوکندریایی شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های موثر و با عوارض کم می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از نتایج پایان نامه خانم زینب وفایی‌پور در مقطع کارشناسی ارشد سم شناسی می‌باشد. بودجه این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است. نویسندگان این مقاله از موسسه تحقیقات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خصوص خانم دکتر مخلوق که ما را در این مسیر یاری رساندند تشکر می‌نمایند.

References

1. Shahbazian HB, Shahbazian N, Yarahmadi M, Saiedi S. Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus in Pregnant Women Referring to Gynecology and Obstetrics Clinics. Jundishapur Sci Med J 2012; 11(2): 113-121 (Persian).
2. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2007; 30(8): 2070-2076.
3. Nodine PM, Hastings-Tolsma M. Maternal obesity: improving pregnancy outcomes. MCN Am J Matern Child Nurs 2012; 37(2): 110-115.
4. Turok DK, Ratcliffe SD, Baxley EG. Management of gestational diabetes mellitus. Am Fam Physician 2003; 68(9): 1767-1772.
5. Dabelea D, Snell-Bergeon JK, Hartsfield CL, Bischoff KJ, Hamman RF, McDuffie RS, et al. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM) over time and by birth cohort: Kaiser Permanente of Colorado GDM Screening Program. Diabetes Care 2005; 28(3): 579-584.
6. Yessoufou A, Moutairou K. Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". Exp Diabetes Res 2011; 2011: 218598.
7. Allen VM, Armson BA, Wilson RD, Allen VM, Blight C, Gagnon A, et al. Teratogenicity associated with pre-existing and gestational diabetes. J Obstet Gynaecol Can 2007; 29(11): 927-944.
8. Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. Reprod Toxicol 2007; 24(1): 31-41.
9. Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. Diabetes Metab Res Rev 2001; 17(3): 189-212.
10. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. Cardiovasc Diabetol 2005; 4: 5.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44-84.

12. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci 2003; 1005: 43-54.
13. Alkayyali S, Lyssenko V. Genetics of diabetes complications. Mamm Genome 2014; 25(9-10): 384-400.
14. Bouayed J and Bohn T, Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Oxid Med Cell Longev 2010; 3(4): 228-237.
15. Yu S, Paetau-Robinson I. Dietary supplements of vitamins E and C and beta-carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. Vet Res Commun 2006; 30(4): 403-413.
16. Alkan I, Koprulu O, Alkan B. Latest advances in world tea production and trade, Turkey's aspect. World Journal of Agricultural Sciences 2009; 5(3): 345-349.
17. Mohammadi M, Ramezani Binabaj M, Mirjalili M, GhaedniayeJahromi M, Jafari M, Salem F. Effect of Atorvastatin on Pancreatic Oxidative Stress inStreptozotocin-induced Diabetic Rat. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2013; 15(2): 197-204.
18. Damasceno DC, Volpato GT, de Mattos Paranhos Calderon I, Cunha Rudge MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. Anim Reprod Sci 2002; 72(3-4): 235-244.
19. Shivananjappa MM, Muralidhara. Abrogation of maternal and fetal oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic rat by dietary supplements of Tinospora cordifolia. Nutrition 2012; 28(5): 581-587.
20. Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. Antioxid Redox Signal 2011; 15(12): 3061-3100.
21. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature. 2000; 404(6779): 787-790.
22. Kang KA, Kim JS, Zhang R, Piao MJ, Maeng YH, Kang MY, et al. KIOM-4 Protects against Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Damage in Pancreatic β-cells via Its Antioxidant Effects. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: 978682.
23. Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Endocrinol 2010; 320(1-2): 25-33.
24. Karbowski M. Mitochondria on guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis. Adv Exp Med Biol 2010; 687: 131-142.
25. Yang X, Borg LA, Simán CM, Eriksson UJ. Maternal antioxidant treatments prevent diabetes-induced alterations of mitochondrial morphology in rat embryos. Anat Rec 1998; 251(3): 303-315.
26. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007; 18(9): 567-579.
27. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. Biomaterials 2008; 29(18): 2705-2709.
28. Estevez YA, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. Free Radical Biology & Medicine 2011; 51: 1155-1163.

29. Prater MR, Zimmerman KL, Pinn LC, Keay JM, Laudermilch CL, Holladay SD. Role of maternal dietary antioxidant supplementation in murine placental and fetal limb development. Placenta 2006; 27(4-5): 502-509.
30. Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. Nat Nanotechnol 2006; 1(2): 142-150.
31. Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel LM, Seal S, et al. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. Biomaterials 2007; 28(10): 1918-1925.
32. Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. Nano Lett 2005; 5(12): 2573-2577.
33. 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.
34. Kim CK, Kim T, Choi IY, Soh M, Kim D, Kim YJ, et al. Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke. Angew Chem Int Ed Engl 2012; 51(44): 11039-11043.
35. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. Biomaterials 2007; 28(31): 4600-4607.
36. 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.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
38. 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.
39. Daraie B, Pourahmad J, Hamidi-Pour N, Hosseini MJ, Shaki F, Soleimani M. Uranyl acetate induces oxidative stress and mitochondrial membrane potential collapse in the human dermal fibroblast primary cells. Iran J Pharm Res 2012; 11(2): 495-501.
40. Sadegh C, Schreck RP. The Spectroscopic Determination of Aqueous Sulfite Using Ellman's Reagent. MURJ 2003; 8: 39-43.
41. Gao X, Zheng CY, Yang L, Tang XC, Zhang HY. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against beta-amyloid peptide. Free Radic Biol Med 2009; 46(11): 1454-1462.
42. Ghazi-khansari M, Mohammadi-Bardbori A, Hosseini MJ. Using Janus Green B to Study Paraquat Toxicity in Rat Liver Mitochondria Role of ACE Inhibitors (Thiol and Nonthiol ACEi). Ann N Y Acad Sci 2006; 1090: 98-107.
43. Eriksson UJ. Congenital anomalies in diabetic pregnancy. Semin Fetal Neonatal Med 2009; 14(2): 85-93.
44. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003; 17(1): 24-38.
45. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health 2003; 27(4): 277-284.
46. Krishan P, Chakkarwar VA. Diabetic nephropathy: Aggressive involvement of

oxidative stress. J Pharm Educ Res 2011; 2(1): 35-41.

47. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res 2010; 107(9): 1058-10570.
48. Luo ZC, Simonet F, Wei SQ, Xu H, Rey E, Fraser WD. Diabetes in pregnancy may differentially affect neonatal outcomes for twins and singletons. Diabet Med 2011; 28(9): 1068-1073.
49. Wilmot EG, Mansell P. Diabetes and pregnancy. Clin Med 2014; 14(6): 677-680.
50. Giri S, Karakoti A, Graham RP, Maguire JL, Reilly CM, Seal S, et al. Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. PLoS One 2013; 8(1): e54578.
51. Cederberg J. Oxidative stress, antioxidative defence and outcome of gestation in experimental diabetic pregnancy. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine; 2001. Available from: www.diva-portal.org/smash/get/diva2:167274/FULLTEXT01.pdf. Accessed May 2, 2014.
52. Verma R, Mishra S, KAUL JM. Cellular changes in the placenta in pregnancies complicated with diabetes. Int J Morphol 2010; 28(1): 259-264.
53. Rzigalinski BA, Meehan K, Davis RM, Xu Y, Miles WC, Cohen CA. Radical nanomedicine. Nanomedicine (Lond) 2006; 1(4): 399-412.
54. Horie M, Nishio K, Kato H, Fujita K, Endoh S, Nakamura A, et al. Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. J Biochem 2011; 150(4): 461-471.