ORIGINAL ARTICLE

Comparing the Therapeutic Effects of Vitamin C and CoQ10 in Reducing the Number of Damaged Cells in Mice Hippocampus Following Ischemia-Reperfusion

Jalal Hassanshahi[1],
Gholam Hossein Hassanshahi[2],
Mohammad Zamani[3],
Elham Hakimizadeh[4],
Mansoreh Soleimani[5]

[1] MSc Student in Physiology, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, Immunology and Hematology, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
[3] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Esfahan University of Medical Sciences, Esfahan, Iran
[4] MSc Student in Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
[5] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received April 22, 2012; Accepted October 21, 2012)

Abstract

Background and purpose: Vitamin C and CoQ10 are known as two potent antioxidants. We studied the protective role of CoQ10 and ascorbic acid against ischemia-reperfusion. Also, we compared the therapeutic effect of these two antioxidants.

Materials and methods: In this study 35 male balb-C were divided into five groups: intact, ischemic control, sham control and treatment groups with CoQ10 and ascorbic acid. In treatment groups, the mice were treated with CoQ10 and vitC as pre-treatment for a week. Then, ischemia induced by Common Carotid artery ligation and the mice were post-treated with CoQ10and ascorbic acid for a week. Nissl staining was applied to count the necrotic cells of hippocampus. TUNNEL kit was used to quantify apoptotic cell death and to measure short term memory we applied y-maze and shuttle box tests.

Results: High rate of apoptosis was seen in ischemic group. In the treatment groups using these antioxidants resulted in lower rate of apoptosis compared with that of the control group. Furthermore, less neuronal death was seen in the group treated with CoQ10 compared with those treated with ascorbic acid.

Conclusion: According to the results, the intake of ascorbic acid and CoQ10 significantly reduced apoptosis and decreased memory loss. But the antioxidant effect of CoQ10 was stronger than vitamin C in this zone of brain.

Keywords: Hippocampus, ischemia-reperfusion, neuroprotective effect, CoQ10, ascorbic acid

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(94): 2-13 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۴ آبان سال ۱۳۹۱ (۱۳-۲)

مقایسه ی تاثیر درمانی ویتامین C و CoQ10 روی میزان کاهش سلول های آسیب دیده ی ناحیه ی CA1 هیپوکامپ موش سوری به دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن

جلال حسن شاهی[۱]
غلامحسین حسن شاهی[۲]
محمد زمانی[۳]
الهام حکیمی زاده[۴]
منصوره سلیمانی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: ویتامین C و CoQ10 به عنوان دو آنتی اکسیدان قوی شناخته می‌شوند. مطالعه حاضر نقش محافظتی CoQ10 و اسید اسکوربیک را بر ایسکمی- ریپرفیوژن و مقایسه تأثیر درمانی این دو را مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها: ۳۵ سر موش سوری نر بالغ، نژاد balb-C به پنج گروه هفت تایی تقسیم شدند. این گروه ها شامل گروه سالم، ایسکمی کنترل، شم کنترل، گروه تحت درمان با CoQ10 و گروه تحت درمان با ویتامین C بودند. در گروه‌های درمان، موش‌ها قبل از القای ایسکمی، باCoQ10 و ویتامین C به مدت یک هفته تحت درمان قرار گرفتند. سپس ایسکمی القاء شد و بعد از کاهش التهاب، موش‌ها مجدداً به مدت یک هفته تحت درمان با CoQ10 و ویتامین C قرار گرفتند. از رنگ‌آمیزی نیسل برای شمارش سلول‌های نکروتیک و از کیت تانل برای بررسی آپوپتوز استفاده شد و برای سنجش حافظه کوتاه مدت، تست‌های حافظه y-maze و شاتل باکس انجام شد.

یافته‌ها: میزان بالای آپوپتوزیس در گروه ایسکمی مشاهده شد. همچنین در گروه تحت درمان با این دو آنتی‌اکسیدان، مرگ سلول‌ها به مقدار قابل توجهی کم تر ازگروه ایسکمی کنترل بود. گروه تحت درمان با CoQ10 مرگ نورون‌های کمتری از گروه تحت درمان با اسید اسکوربیک نشان داد. نتایج تست‌های حافظه با نتایج تست‌های بافتی منطبق بود.

استنتاج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد، مصرف این دو آنتی‌اکسیدان به مقدار قابل توجهی، مرگ سلول‌ها و از دست دادن حافظه را کاهش می دهد اما اثر آنتی‌اکسیدانی CoQ10 قوی‌تر از ویتامین C در این ناحیه از مغز است.

واژه های کلیدی: هیپوکامپ، ایسکمی- ریپرفیوژن، اثرنوروپروتکتیو، CoQ10، اسید آسکوربیک

مقدمه

هیپوکامپ ساختاری درکف بطن طرفی در لوب تمپورال مغز است(۱، ۲). در سازماندهی اطلاعات نقش داشته و با احساسات و خاطرات در ارتباط است(۳، ۴). آسیب به هیپوکامپ باعث ایجاد فراموشی بعدی

مولف مسئول: غلامحسین حسن شاهی- رفسنجان: دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان E-mail :ghhassanshahi@rums.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی و هماتولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی- فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۵. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۲/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۳/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۷/۳۰

و ضعف حافظه کوتاه مدت و حافظه فضایی می‌شود ولی اطلاعات قبلی حفظ شده و بیمار دچار این ضایعه، می‌تواند آن‌ها را به خاطر آورد(۵). این حافظه باقیمانده قبلی، ما را متقاعد می‌کند که تقویت بیشتر حافظه باعث انتقال اطلاعات به بیرون از هیپوکامپ و بخش‌های دیگری از مغز می‌شود(۶). آسیب به هیپوکامپ دو طرف، موجب فراموشی بعدی یا anterograde amnesia شده ولی اگر یکی از آن‌ها آسیب ببیند فرد دچار فراموشی بعدی نمی‌شود(۷). ایسکمی به کاهش خون‌رسانی به اندام یا ناحیه‌ای از بدن اطلاق می شود که باعث کاهش انتقال اکسیژن و مواد مغذی به بافت‌ها ودر نتیجه اختلال عملکرد آن اندام می‌گردد(۸، ۹). مشاهدات اولیه نشان می‌دهد که آسیب‌های ایسکمی مغزی در اثر تغییر ارتباطات ساده بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در نتیجه اختلال جریان خون ایجاد می شود(۱۰). ایسکمی مغزی بعد از سرطان و سکته قلبی، از دلایل عمده مرگ و میر در جهان است(۱۱، ۱۲). هیپوکامپ به ایسکمی و هیپوکسی بسیار حساس است و هیپوکسی در این قسمت باعث مهار پتانسیل سیناپسی شده که مکانیسمی برای کاهش انرژی مصرفی سلول در حالت هیپوکسی است(۱۳). صدمه به هیپوکامپ بعد از ایسکمی-ریپرفیوژن باعث اختلالات زیادی در عملکرد این عضو می‌شود. آسیب‌های ریپرفیوژن به آسیب‌هایی گفته می‌شود که در اثر بازگشت مجدد خون در بافت پس از یک دوره ایسکمیک ایجاد می‌شود، غیاب اکسیژن و مواد مغذی، وضعیتی را ایجاد می‌کند که در آن بازگشت جریان خون به‌جای بازگشت فعالیت نرمال بافت، باعث التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو از طریق القای استرس اکسیداتیو می‌شود(۱۴). بعد از برقراری جربان خون مغزی، جریان بازگشتی به دنبال انسداد باعث بازگشت اکسیژن در سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از تولید و تهاجم رادیکال‌های سوپرا اکسید می‌گردد. این امر می‌تواند بر روی سلول‌ها تأثیر گذاشته و باعث نکروز و آپوپتوز بافتی گردد(۱۵). انسداد شریان کاروتید مشترک چپ و راست به مدت چند دقیقه باعث به‌وجود آمدن ایسکمی در ناحیه هیپوکامپ می‌گردد. در میان قسمت‌های دچار ایسکمی شده درهیپوکامپ ناحیه هیلوس و نورون‌های ناحیه CA1 حساس‌ترین نقاط مستعد به آسیب، به‌دنبال ایسکمی هستند. آسیب هیپوکامپ اختلالات حافظه بعدی و اشکالات یادگیری را به دنبال دارد و وجود ضایعه باعث به‌وجود آمدن انواع اختلالات درطرح‌های رفتاری می‌شود(۱۶). روغن زیتون به علت داشتن اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند میزان کلسترول را کاهش دهد و به این ترتیب از رسوب کلسترول در رگ‌ها نیز جلوگیری کند(۱۷).

CoQ10 از جمله موادی است که معمولاً در میتوکندری و در ارتباط با تولید انرژی دیده می‌شود و آن نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده است کوآنزیم Q10 یک آنتی‌اکسیدان قوی است و ممکن است در حفظ عملکرد طبیعی عضله نقش داشته باشد. کاهش سطوح سرمی آن در بیماری پارکینسون گزارش شده است(۱۸،۱۹). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با حذف رادیکال‌های آزاد و ترکیبات ناشی از صدمات سلولی، مانع آسیب به سلول‌های سالم به‌خصوص در قسمت‌هایی مثل غشای سلولی و نیز DNA می‌شوند که با این مکانیزم مانع مرگ سلول‌ها می‌شوند(۲۰). CoQ10، در بدن تولید می‌شود و برای کارکرد پایه‌ای سلول ضروری است. غنی‌ترین مواد غذایی حاوی CoQ10 روغن ماهی، مغز دانه‌ها، انواع ماهی‌ها و انواع گوشت می‌باشد(۲۱). آنتی‌اکسیدان‌ها مانند یک سد از بدن در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. اگر چه سیستم‌های آنزیمی متعددی برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در بدن وجود دارد، ولی آنتی‌اکسیدان‌های اصلی مانند ویتامین های E، C و بتاکاروتن و نیز ماده معدنی سلنیم هم مهم هستند(۲۲). بدن انسان قادر به تولید این ترکیبات نیست، بنابراین بایستی از طریق غذا آن‌ها را دریافت کرد(۲۳). نیاز روزانه به ویتامین c، ۶۰ میلی‌گرم است و نگهداری

طولانی مدت در یخچال، پختن، گرمای هوا، نور و دخانیات باعث از بین رفتن این ویتامین می‌شوند. از این رو افراد سیگاری به این ویتامین نیاز بیشتری دارند(۲۴). مرکبات بهترین منابع ویتامین C می‌باشند(۲۵). همچنین مصرف این ویتامین باعث جذب بهتر آهن در بدن می‌شود(۲۶). ویتامین C به عقیده برخی کارشناسان احتمال بروز سکته مغزی در افراد غیر سیگاری را تا ۳۰ درصد و در افراد سیگاری تا ۷۰ درصد کاهش می‌دهد. این ویتامین از اکسید شدن سلول‌های چرب حاضر در غشاء سلولی توسط عوامل اکسید کننده جلوگیری می‌کند(۲۹-۲۷) مطالعه حاضر به این علت، نورون‌های موجود در ناحیه CA1 هیپوکامپ را مورد بررسی قرار داد و این نورون ها نسبت به سایر نورون‌های موجود در مغز، از حساسیت فوق العاده بالاتری در برابر هیپوکسی برخوردارند وهمچنین تجمع رادیکال‌های آزاد در اطراف این نورون‌ها به سرعت باعث فعال شدن روندهای نکروز و آپوپتوز سلولی می‌شود. در مطالعات مختلف تأثیرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C بررسی شده بود(۳۱،۳۰). CoQ10 می‌تواند تخریب سلولی را مخصوصاً در غشای سلولی و DNA کاهش و باعث کاهش عوارض پس از ایسکمی شود(۳۲). تا به حال اثر ویتامین C و C0Q10 در ناحیه CA1 هیپوکامپ و تأثیرات درمانی آن‌ها در کاهش تخریب حافظه کوتاه مدت به دنبال آسیب دیدن نورون‌های موجود در آن به دنبال ایسکمی ریپرفیوژن بررسی نشده بود. هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و درمانی ویتامینC و C0Q10 روی کاهش میزان مرگ و میر نورون‌های این ناحیه از مغز به دنبال ایسکمی ریپرفیوژن و نهایتاً کاهش عوارض متعاقب آن (بهبود وضعیت حافظه کوتاه مدت وکاهش میزان نکروز و آپوپتوز نورون‌ها در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی کنترل) و در نهایت مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و C0Q10 بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در تحقیق حاضر تعداد ۳۵ موش سوری نر بالغ (با سن ۴ هفته‌ای) نژاد bulb-c با وزن ۴۰- ۳۵گرم که از موسسه رازی ایران خریداری شدند مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌ها در یک اتاق مخصوص در شرایط دمای C ۱ ± ۲۱ با رطوبت ۱۰± ۵۰ درصد ودر یک سیکل ۲۴ ساعته ۱۲ ساعت در نور و ۱۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. موش ها به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) تغذیه می شدند. در ضمن، بررسی بر اساس پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده توسط انستیتو ملی بهداشت آمریکا برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و راهکارهای علمی موجود در داخل کشور همچنین رعایت اصول اخلاق در پژوهش هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق اساسنامه اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، به انجام رسید.

گروه های تحت بررسی

موش‌ها به‌طور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱. گروه سالم (n=7) و بدون القای ایسکمی و بدون دریافت دارو
۲. گروه ایسکمی کنترل (n=7)
۳. گروه شم کنترل (n=7)
۴. گروه تحت درمان با ویتامین C (n=7)
۵. گروه تحت درمان با CoQ10 (n=7)

ابتدا آسکوربیک اسید و CoQ10 از یک هفته قبل از القای ایسکمی، روزانه و به مدت یک هفته به موش‌ها (گروه‌های درمان) داده شد که CoQ10 به صورت گاواژ (450mg/kg) واسید آسکوربیک به صورت تزریق داخل صفاقی (100mg/kg) بود. سپس موش‌ها (گروه‌های درمان و

ایسکمی کنترل) با کتامین (mg/kg100) یا ketamin (*Sigma*Chemical Co., Saint Louis, USA) (100mg/kg, I.P injection) و زایلازین (mg/kg10) یا xylozine (*Sigma*Chemical Co., Saint Louis, USA) (10mg/kg, I.P injection) بیهوش شدند و به دنبال دریافت داروی بیهوشی ایسکمی با جراحی ناحیه قدامی- طرفی گردن با مشخص شدن غلاف کاروتید و سپس بستن شریان کاروتید مشترک توسط کلمپ میکروبولداگ (micro bulldog clamp) به مدت ۱۵ دقیقه القا شد و تا یک هفته بعد از ایسکمی برای کاهش التهاب ناحیه ایسکمیک و به دلیل این‌که جذب این داروها در ناحیه التهاب، کم است هیچ دارویی تزریق نشد. از یک هفته بعد از القای ایسکمی مجدداً داروها با همان دوز اولیه، به مدت یک هفته و به صورت روزانه به موش‌ها داده شد سپس با اتمام دوره درمان، تست‌های آزمون حافظه کوتاه مدت (شاتل باکس و y-maze) در تمام گروه‌ها انجام شد. این تست‌ها فقط در پایان دوره درمان انجام و سپس مغز موش‌ها با پارافرمالدئید به روش پرفیوژن فیکس شده و خارج و سپس برش‌های با ضخامت ۷ میکرونی از قالب‌های پارافینی تهیه شد. با تهیه این برش‌ها از هر گروه ۵ برش با فاصله ۵۰ میکرونی از یکدیگر انتخاب شد به‌طوری‌که فاصله هر برش نسبت به برگما در تمام گروه‌ها یکسان و برای مطالعات بافتی آماده شد که شامل رنگ آمیزی بافتی با استفاده از رنگ کرزیل ویوله (نیسل) وتست تانل بود.

رنگ‌آمیزی نیسل: این روش برای رنگ‌آمیزی اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. دراین روش اجسام نیسل به رنگ بنفش -آبی دیده می‌شوند.این رنگ‌آمیزی معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود(۳۳).

تست تانل: با کمک کیت تانل هسته نورون‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص می‌شود ولی نورون‌های نکروتیک و سالم رنگ زیادی را جذب نمی‌کنند. در این تست انتهای کروماتین های شکسته شده برای تمایز آپوپتوز و رنگ آمیزی این هسته‌ها توسط آنزیم‌هایی مشخص شده و با دی‌آمینوبنزیدین (DAB) رنگ می شود(۳۴).

Y-maze: این دستگاه برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده و از ۳ راهرو با انتهای بسته و ارتفاع ۴۰- ۳۵ سانتی متر ساخته شده است. قبل از ورود موش به بازوی شروع، همه بازوها از لحاظ تمیز بودن و عدم وجود سوراخ و شکاف بازبینی می‌شود. هر یک از بازوهای دستگاه با یک حرف انگلیسی مشخص شده است. بازوی A محل استقرار موش در ابتدای آزمایش است و همزمان با آن زمان سنج نیز تنظیم می‌گردد. سپس هر سه حرکت پشت سر هم در صورت مشابه نبودن، بازوهای طیش دهیک امتیاز مثبت و درصورت تکراری بودند و باز و از سه بازوی ثبت شده یک امتیاز منفی محسوب می‌شود. ورود حیوان به داخل یک بازو، زمانی است که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل باز و قرار گیرد. موش به مدت ۸ دقیقه در بازوهای دستگاه به‌دنبال محل خروج می گردد. با عبور قاعده دم موش از ابتدای هر بازوی دستگاه نام ان بازو ثبت می‌شود تا زمان مورد نظر تمام شود. سپس نتایج ثبت شده با استفاده از فرمول، PerCent Alternation محاسبه و آنالیز می گردد.

$$\text{PerCent Alternation} = PA = \frac{x \times 3}{y-2} \times 100$$

(x=number of CorreCt and y = CorreCt + wrong number)

شاتل باکس

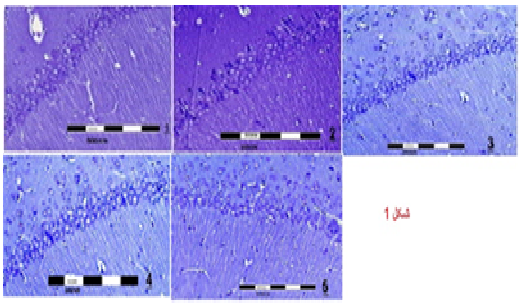
این دستگاه شامل یک شوکر الکتریکی و دو محفظه روشن و تاریک و یک لامپ ۱۵ وات است. ته دستگاه از یک شبکه فلزی رسانا ساخته شده است. بین دو محفظه درب کشویی قرار دارد. این تست که بر اساس‌ترس طراحی شده در ۴ روز پیاپی انجام می‌شود. ابتدا دستگاه کاملاً تمیز شده و تست شروع می شود. روز اول و دوم برای آموزش و آشنایی موش‌ها با دستگاه می‌باشد هر دو تست حافظه بعد از ظهر باید

انجام شود و تست به این صورت است که موش در اتاقک روشن به مدت ۵ دقیقه می‌ماند و سپس لامپ دستگاه روشن شده و همزمان درب کشویی بین اتاقک روشن و تاریک باز می‌شود. به‌طور معمول به‌خاطر نور تشدید شده اتاقک روشن و تمایل ذاتی جوندگان به محیط تاریک، حیوان به اتاقک تاریک رفته و در آن‌جا هم ۵ دقیقه می‌ماند و در نهایت از دستگاه خارج می‌شود. روز دوم کاملاً شبیه روز اول آزمایش ادامه می‌یابد. در روز سوم با ورود حیوان به اتاقک تاریک شوک الکتریکی به میزان ۰/۳ میلی‌آمپر به‌مدت ۱ ثانیه داده می‌شود و سپس حیوان از دستگاه خارج می‌شود. در روز چهارم حیوان ۲ دقیقه در اتاقک روشن می‌ماند و با روشن شدن لامپ و باز شدن دریچه بین دو اتاقک، زمان ورود موش به اتاقک تاریک اندازه‌گیری می‌شود. تحقیق حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی (Randomyzed Design Completely) انجام و کلیه اطلاعات به وسیله نرم افزار SPSS16 و واریانس یک طرفه (One- way Anova) و همچنین تست LSD به عنوان PostHoc جهت مقایسه میانگین ها، محاسبه و آنالیز گردید. $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح اطمینان تعیین گردید.

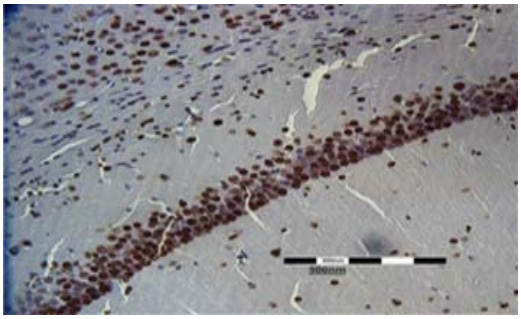
یافته‌ها

در مطالعه حاضر، از رنگ آمیزی نیسل برای شمارش سلول‌های نکرتیک و ازتست تانل نیز برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک درمنطقه CA1 هیپوکامپ استفاده شد. نتیجه حاصل از این روش در تصاویری که در زیر نشان داده شده مشخص گردیده است.

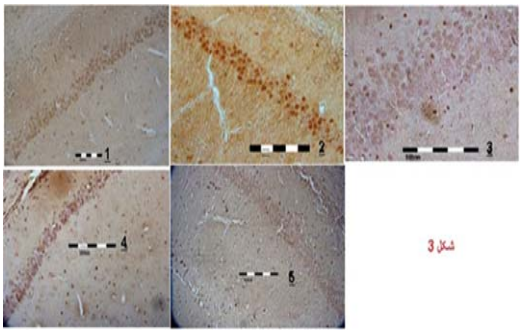
۱- گروه سالم بدون سلول‌های نکروتیک، ۲- گروه ایسکمی کنترل با تعداد زیادی سلول های نکروتیک، ۳- گروه شم کنترل (روغن زیتون) با سلول‌های نکروتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی کنترل، ۴- گروه تحت درمان با ویتامین C با سلول های نکروتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی کنترل و گروه شم کنترل ۵- گروه تحت درمان با CoQ10 با سلول‌های نکروتیک بسیارکمتر نسبت تمام گروه ها (به جز گروه اینتکت).



تصویر شماره ۱: رنگ آمیزی نیسل درپنج گروه در این روش، سلول های نکروتیک با هسته های تیره جمع شده دیده می شوند.



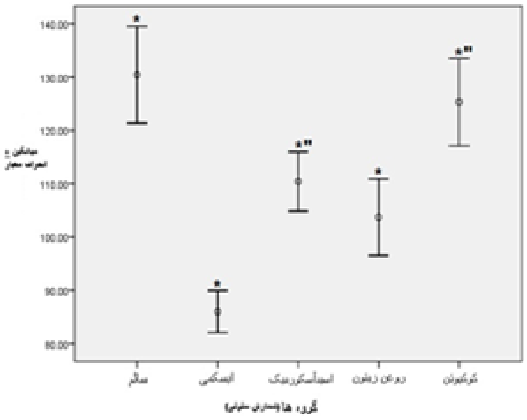
تصویر شماره ۲: کنترل مثبت. تعداد بسیار زیادی سلول تانل مثبت در این گروه دیده می شود که با کمک DNase با تانل رنگ می شوند (5oonm)



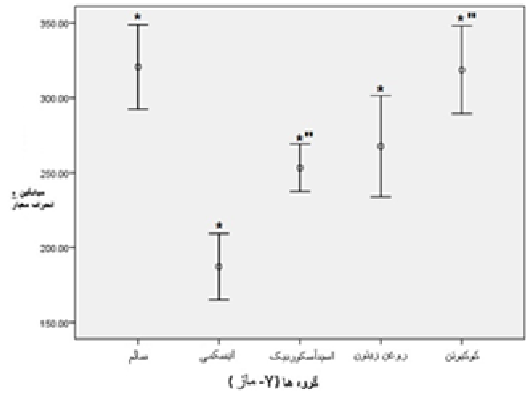
تصویر شماره ۳: تست تانل درپنج گروه مورد مطالعه

۱- گروه سالم بدون سلول های آپوپتوتیک، ۲- گروه ایسکمی کنترل با تعداد زیادی سلول های آپوپتوتیک (سلول‌های قهوه‌ای تیره)، ۳- گروه شم کنترل با سلول‌های آپوپتوتیک کمتر در مقایسه با گروه

ایسکمی کنترل، ۴- گروه تحت درمان با ویتامین C با سلول‌هایآپوپتوتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی وشم کنترل، ۵- گروه تحت درمان با CoQ10 با سلول های آپوپتوتیک بسیارکمتر نسبت تمام گروه ها (به جز گروه اینتکت).

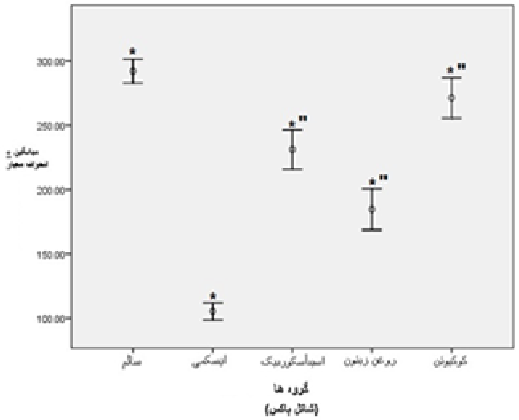


نمودار شماره ۱. مقایسه تراکم سلول‌های سالم در منطقه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی کنترل تعداد سلول‌های سالم بسیار کاهش یافته است. *(p<0.05). تراکم سلول‌های سالم در گروه‌های تحت درمان با CoQ10 در مقایسه با گروه تحت درمان با ویتامین C افزایشی معنی‌دار داشت"*(p<0.001) .



نمودار شماره ۲: مقایسه حافظه‌ی کوتاه مدت y-maze (آنالیز داده‌ها، بهبود بیشتر حافظه را در گروه درمانی CoQ10 در مقایسه با ویتامین C نشان داد."*(p<0.001)

رنگ آمیزی کرزیل ویوله (نیسل) وضعیت سلول‌های سالم و نکروتیک را در ناحیه تحت بررسی نشان داد. حیوانات درمان شده با آنتی‌اکسیدان‌ها مرگ سلولی کمتر وتراکم سلولی بیشتری در مقایسه با گروه ایسکمی داشتند. در گروه‌های درمانی، کمترین سلول‌های نکروتیک در گروه تحت درمان با CoQ10 دیده شد. در گروه کنترل مثبت، تعداد بسیار زیادی سلول تانل مثبت دیده می‌شود که با کمک DNase با تانل رنگ می‌شوند.



نمودار شماره ۳: مقایسه حافظه کوتاه مدت با تست شاتل باکس. گروه ایسکمی با تمام گروه‌های درمانی مقایسه شد که تفاوت معنی‌داری داشت.*(p<0.05). تفاوت معنی‌داری بین گروه تحت درمان با ویتامین C با گروه تحت درمان با CoQ10 مشاهده شد. "*(p<0.001).

تست تانل که برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک استفاده می‌شود. نتایج این تست در مطالعه حاضر افزایش این سلول‌ها رادرگروه ایسکمیک و کاهش آن ها را درگروه‌های تحت درمان نشان داد. در گروه‌های درمان، سلول های آپوپتوزیک متری نسبت به گروه ایسکمیک دیده شد، این سلول‌های در حال آپوپتوز در گروه سالم دیده نشدند.

تست رفتاری شاتل باکس نشان داد که ایسکمی منجر به اختلال زیادی در حافظه کوتاه مدت می‌شود. در گروه‌های درمانی نتایج بسیار بهتری نسبت به گروه ایسکمی کنترل به‌دست آمد به‌طوری که در گروه شم کنترل که روغن زیتون به موش‌ها داده شده بود اختلالات حافظه کاهش یافته و در گروه تحت درمان با ویتامین C نیز به مقدار زیادی کاهش اختلالات حافظه کوتاه مدت را نشان می داد. در گروه تحت

درمان با CoQ10 به دلیل وجود آنتی اکسیدان‌های قوی و مؤثر، علایم بهبود حافظه کوتاه مدت، بیشتر از گروه‌های تحت درمان با روغن زیتون و ویتامین C مشاهده شد. در گروه سالم، این اختلالات دیده نشد. تست رفتاری y-maze نشان داد که ایسکمی منجر به آسیب زیادی در حافظه کوتاه مدت می شود. بهترین نتایج در گروه تحت درمان با CoQ10 به دست آمد. به طوری که در گروه‌های تحت درمان به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌ها علایم بهبود سلامت ذهنی را به‌وضوح مشاهده کرد. در گروه سالم این اختلالات وجود نداشت.

بحث

ایسکمی- ریپرفیوژن باعث کاهش سطح اکسیژن درون سلولی می‌شود که متابولیسم طبیعی سلول را مختل می‌کند و در صورت نرسیدن سریع اکسیژن، سلول می‌میرد. به‌دنبال ریپرفیوژن مرگ سلول شروع می‌شود. در این شرایط سلول یا بلافاصله تحت تأثیر این مواد دچار نکروز می‌شود و یا این که یکسری از واکنش‌ها درون سلول شروع و در نهایت باعث مرگ سلول به‌صورت برنامه ریزی شده یا همان آپوپتوز می‌شود (۳۷-۳۵). هنگامی که ایسکمی مغزی به صورت تجربی در موش‌ها القاء شد تغییراتی در رفتار و حرکات موش‌ها نسبت به قبل از القای ایسکمی رخ داد که ناشی از مرگ تعدادی از سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد(۳۸). ناحیه CA1 هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین قسمت‌های مغز در مقابل ایسکمی می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از رنگ آمیزی نیسل پس از القای ایسکمی، در گروه ایسکمی کنترل کاهش سلول‌های سالم را درناحیه هیپوکامپ نشان دادکه دلیل واضحی بر وجود تخریب نورونی در این ناحیه از مغز به‌دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن است.

مطالعات نشان داد که مصرف هم زمان روغن زیتون و روغن نباتی جامد درخرگوش ها با کاهش معنی‌دار سطح تری‌گلیسرید خون همراه است(۳۹). محققان مصرف مکرر روغن زیتون را در پیشگیری از اختلالات حافظه‌ای ناشی از ایسکمی به اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آن مربوط دانسته‌اند(۴۲-۴۰). در مطالعه حاضر از روغن زیتون به عنوان حلال CoQ10 استفاده شد. روغن زیتون روی میزان کاهش مرگ و میر سلول‌های ناحیه CA1هیپوکامپ نیز بررسی و در نتیجه در گروه تحت درمان کاهش میزان مرگ و میر سلول‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده شد که احتمالاً به علت اثرات آنتی‌اکسیدان‌ها و چربی‌های غیر اشباع موجود در روغن زیتون می‌باشد.

ترکیبات موجود در روغن زیتون، بر فعالیت سیستم کولینرژیک مغزی نیز اثر تعدیلی دارد(۴۴،۴۳). و سیستم کولینرژیک، دوپامینرژیک، سروتونرژیک نقش مهمی در فرآیند یادگیری و حافظه دارند(۴۶،۴۵). با توجه به یافته‌های به دست آمده از تست حافظه در گروه تحت درمان با روغن زیتون، مشخص شد که حافظه در گروه تحت درمان نسبت به گروه ایسکمی تغییرات تخریبی بسیار کمتری داشته که علت این نیز احتمالاً به خاطر وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر در روغن زیتون بوده که قبل و بعد از ایسکمی به موش‌های این گروه داده شده بود. علاوه بر آن، بخشی از تأثیرات روغن زیتون بر فرآیند بازیابی یادگیری و حافظه کوتاه مدت نیز شاید مربوط به تعدیل فعالیت این سیستم‌های نوروترانسمیتری باشد. از اثرات ویتامین C بر روی بیماران می‌توان به تقویت سیستم ایمنی، کاهش متاستاز سلول‌های سرطانی و اثر مستقیم سمی بر روی سلول‌های سرطانی اشاره کرد(۴۹-۴۷).

ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان مهم در رژیم غذایی است. این ویتامین به طور مطلوب عوارض جانبی مولکول‌های واکنشی موجود در ترکیبات بدن که به دنبال ایسکمی در بدن تولید می‌شوند را کاهش می‌دهد که در غیاب آن، تجمع و ترکیب این مولکول ها با یکدیگر می‌توانستند سبب آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌هایی

شبیه لیپیدها غشای سلول‌ها، DNA و پروتئین‌های موجود در آن شوند که به نوبه خود در بیماری‌های مزمن شامل بیماری‌های قلبی و عروق، سکته، سرطان، بیماری‌های دژنریتیو عصبی دخیل باشند(۳۱،۳۰).

اثرآنتی اکسیدانی ویتامین C کاملاً روشن بوده اما مطالعه حاضر، اثر آن‌را روی میزان کاهش عوارض حافظه‌ای و جلوگیری از تخریب وسیع سلولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ مورد بررسی قرار داد. ویتامین C به صورت pre-treatment و post-treatment به موش‌ها داده شد. این ویتامین از طریق جریان خون وارد قسمت‌های مختلف مغز از جمله هیپوکامپ می‌شود و احتمالاً در این ناحیه به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود با رادیکال‌های ایجاد شده به‌دنبال القای ایسکمی واکنش نشان داده و آن‌ها را خنثی می‌سازد از ترکیب با کروموزوم و لیپیدهای غشای سلول های مستعد جلوگیری کرده و نتیجتاً عوارض متعاقب ایسکمی را کاهش می‌دهد. در مقایسه نتایج بافتی این گروه با گروه ایسکمی کنترل، تخریب نورونی کمتری در گروه تحت درمان مشاهده شد که به‌علت تأثیر درمانی این آنتی‌اکسیدان بوده است. در گروه تحت درمان نتایج تست‌های شاتل باکس و y-maze درمقایسه با گروه ایسکمی کنترل به نتایج این تست‌ها در گروه intaCt نزدیک‌تر بود که این نیز دلیلی بر اثرات درمانی ویتامین C بر سلول های این ناحیه است.

روغن ماهی که منبعی از CoQ10 می‌باشد نیز اثرات نوروپروتکتیو وآنتی‌اکسیدانی موثری در هیپوکامپ مغزدارد. احتمالاً این تاثیر به علت وجود آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آن باشد. با توجه به سایر اثرات مفید این روغن، استفاده از آن در رژیم غذائی می‌تواند در سلامت جامعه نقشی اساسی را ایفا کند(۵۰).CoQ10 با این توانایی می‌تواند تخریب سلولی را مخصوصاً در غشای سلولی و DNA کاهش داده و شرایط و زمان کافی را برای ترمیم در اختیار سلول قرار دهد. بنابراین مصرف CoQ10 باعث کاهش تعداد سلول‌های تخریب شده و به‌دنبال آن کاهش عوارض پس از ایسکمی می‌شود(۳۲).

در مطالعه حاضر تأثیر CoQ10 روی میزان کاهش مرگ و میر سلول‌های هیپوکامپ مغز بررسی و در گروه تحت درمان با آن، کاهش میزان مرگ سلول‌ها در این ناحیه مشاهده شد که به علت اثرات آنتی‌آکسیدان آن و احتمالاً اثرات سینرژیستی آن با ویتامین E می‌باشد. این ترکیبات بعد از جذب از دستگاه گوارش وارد خون می‌شود. مقداری از آن بعد از این‌که به مغز می رسد به علت خاصیت محلول بودن در چربی، وارد قسمت‌های مختلف آن از جمله هیپوکامپ مغز شده و به علت قوی آنتی‌اکسیدانی بر روی رادیکال‌های آزاد و اسیدهای تجمع یافته به دنبال ایسکمی به آن‌ها واکنش نشان داده و آن‌ها را خنثی می‌کنند. از این طریق ، از واکنش این رادیکال‌ها با لیپیدهای موجود در غشای سلول‌های مجاور آن‌ها، جلوگیری و نتیجتاً باعث کاهش وسعت تخریب نورون‌های این ناحیه از مغز به‌دنبال ایسکمی-ریپرفیوژن می‌شوند و این نتایج با تست‌های انجام شده در گروه درمان با این آنتی‌اکسیدان نیز منطبق است. در مطالعه حاضر ما با استفاده از رنگ آمیزی بافتی نیسل و تست تانل سعی شد تا کلیه نتایج به‌دست آمده از همه زوایا مورد بررسی قرار گرفته و بتوان داده‌های مربوط به هر تست را با سایر داده ها مقایسه کرد تا از صحت آن اطمینان حاصل شود. در رنگ‌آمیزی نیسل کاهش سلول‌های نکروتیک در گروه‌های درمانی دیده شد و تست تانل این کاهش را در مورد سلول‌های آپوپتوتیک اثبات کرد.در مجموع نتایج به‌دست آمده از تست‌های مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از آنتی‌اکسیدان هایی مثل CoQ10، روغن زیتون ، ویتامین C به عنوان یک عامل پیشگیرانه و درمانی، می‌تواند آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در شرایط استرس‌زا، آسیب‌های وارده به نورون‌ها را کاهش و در نتیجه بقای نورون‌های هیپوکامپ مغز را افزایش دهد. در نهایت نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ها و تست‌های حافظه‌ای نشان دادند که

هـر چنـد هـر دو آنتـی‌اکـسیدان مـورد مطالعـه اثـرات نوروپروتکتیو موثری را در کاهش مرگ سلول‌های ایـن ناحیـه از مغـز را ایفـا کردنـد امـا اثـرات آنتـی‌اکـسیدانی CoQ10 قوی‌تر از ویتامین C بوده و پیش‌آگهـی بهتـری را در بهبـود حافظـه بعـد از مـصرف CoQ10 نـسبت بـه ویتامین C داشته است.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کـرد کـه ناحیـه CA1 مغز در مقابل ایسکمی و هیپوکسی و رادیکـال‌هـای آزاد آسیب‌پذیر مـی‌باشـد. مـصرف آنتـی‌اکـسیدان‌هـای مثـل روغن زیتون، CoQ10 ، ویتامین C به‌دنبال ایسکمی‌هـای مغزی می‌تواند مرگ و میر نورون‌های این ناحیه را کـاهش داده و باعث حفظ نورون‌ها از عوامل مـضر شـود. مـصرف CoQ10 قبل و بعد از ایسکمی‌های مغزی می‌تواند حتـی ایـن سـلول‌هـای حـساس در ایـسکمی را هـم در مقابـل عوارض متعاقب آن محافظت کرده و با کاهش دادن مرگ آن‌هـا، عـوارض نـامطلوب متعاقـب ایـسکمی را در حـد چشمگیری کاهش دهد که این اثرات در مصرف ویتـامین C نیز دیده شد. اثرات آنتی‌کسیدانی CoQ10 قوی‌تـر از ویتامین C است.

References

1. Paul CM, Magda G, Abel S.Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. Behav Brain Res 2009; 203(2): 151-164.
2. Ganong W.F. Medical physiology. Harcourtace Jovanovich, Inc; 2007. p. 643-645.
3. Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. J Neurosci 2004; 24(12): 2953-2962.
4. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. Brain Res 2003; 965(1-2): 108-113.
5. Ahmadiasl N, Alaei H, Hanninen O. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats hippocampus. J Sports Sci Med 2003; 2: 106-109.
6. Barinaga M. Neurobiology. How cannabinoids work in the brain. Science 2001; 291(5513): 2530-2531.
7. Guyton A C, Hall JE. Textbook Of Medical Physiology. 11rded. Elsevier Saunders; 2006.
8. Hadjinikolaou L, Kotidis K, Galinanes M. Relationship between reduced elasticity of extracardiac vessels and left main stem coronary artery disease. Eur Heart J 2004; 25(6): 508-513.
9. Nussmeier NA. A review of risk factors for adverse neurologic outcome after cardiac surgery. J Extra Corpor Technol 2002; 34(1): 4-10.
10. Wityk RJ, Goldsborough MA, Hillis A, Beauchamp N, Barker PB, Borowicz LM Jr, et al. Diffusion-and perfusion-weighted brain magnetic resonance imaging in patients with neurologic complications after cardiac surgery. Arch Neurol 2001; 58(4): 571-576.
11. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. Neuropharmacology 2008; 55(3): 310-318.
12. Huang L, Chen N, Ge M, Zhu Y, Guan S, Wang JH. Ca2+ and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. Biochem Biophys Res Commun 2010; 394(3): 709-714.
13. Simonova Z, Sterbova K, Brozek G, Komarek V, Sykova E. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the

morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. Behav Brain Res 2003; 141(2): 195-205.

14. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampaldamage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology 1987; 37: 1281-1286.
15. Weglicki WB, Dickens BF, Mak IT. Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysophospholipid production due to free radicals. Biochem Biophys Res Commun 1984; 124(1): 229-235.
16. Kesner RP, Adelstein TB, Crutcher KA. Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. Brain Cogn 1989; 9(2): 289-300.
17. Capannesia C, Palchettia I, Mascinia M, Parentib A. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. Food Chemistry 2000; 71(4): 553-562.
18. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme Q10 Ameliorates Neurodegeneration, Mossy Fiber Sprouting, and Oxidative Stress in IntrahippocampalKainate Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rat. J Mol Neurosci 2012; 49(1): 194-201.
19. Greenberg S, Frishman WH. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. J Clin Pharmacol 1990; 30(7): 596-608.
20. Gokce M, Saydam O, Hanci V, Can M, Bahadir B. Antioxidant vitamins A, C, E and coenzyme Q10 vs Dexamethasone: comparisons of their effects in pulmonary contusion model. J Cardiothorac Surg 2012; 7(1): 92.
21. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. Biochim Biophys Acta 2004; 1660(1-2): 171-199.
22. Thanonkaewa A, Benjakula S, Visessanguanb W, Deckerc EA. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (Sepia pharaonis) muscle during frozen storage. Food Science and Technology 2008; 41(1): 161-169.
23. Ramaiya SD, Bujang JS, Zakaria MH, King WS, Sahrir MA. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (Passiflora) cultivars. J Sci Food Agric. 2012.
24. Frei B, Trabe MG. The new US Dietary Reference Intakes for vitamins C and E. Redox Rep 2001; 6(1): 5-9. PMID: 11333117
25. Justi KC, Visentainer JV, Evelázio de Souza N, Matsushita M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (Myrciariadubia) pulp. Arch Latinoam Nutr 2000; 50(4): 405-408.
26. Frei B. Vitamin C as an antiatherogen: mechanism of action.In: Vitamin C in Health and disease. Packer L. 4thed. New York: Taylor & Francis; 1997. p. 163-182.
27. Okamoto K. Vitamin C intake and apolipoproteins in a healthy elderly Japanese population. Prev Med 2002; 34(3): 364-369.
28. Matsuoka Y, Yamato M, Yamasaki T, Mito F, Yamada KI. Rapid and convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch. Free Radic Biol Med 2012. pii: S0891-5849 (12) 01166-5.
29. Combs GF. Vitamans. In: Mahan Lk, Escott-stump S, (eds). Krause`s food،nutrition & diet therapy. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saundrs; 2000. p. 67-109.
30. Simone II CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrientsdo not interfere with chemotherapy orradiation therapy and can increase killand increase survival, Part 2. Alternative Therapies 2007; 13(2): 40-47.
31. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications

for cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007; 47: 143-183.

32. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaee A, Bristow MR, et al. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. J Card Fail 2005; 11(6): 473-480.
33. Erdogan S, Sagsoz H, Akbalik ME. Anatomical and histological structure of the tongue and histochemical characteristics of the lingual salivary glands in the Chukar partridge (Alectorischukar, Gray 1830). Br Poult Sci 2012; 53(3): 307-315.
34. Chang S, Sen S, Zhang P, Gyarfas B, Ashcroft B, Lefkowitz S, et al. Palladium electrodes for molecular tunnel junctions. Nanotechnology. 2012; 23(42): 425202.
35. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. Transplantation. 2002; 73(4): 493-499.
36. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Bromiker R, Eidelman AI, et al. Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 35(3): 344-349.
37. Wu B, Ootani A, Iwakiri R, Fujise T, Tsunada S, Toda S, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia- reperfusion- induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 286(4): G580-7.
38. Contartese A, Valoti M, Corelli F, Pasquini S, Mugnaini C, Pessina F, et al. A novel CB2 agonist, COR167, potently protects rat brain cortical slices against OGD and reperfusion injury. Pharmacol Res. 2012.
39. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, et al. A MUFA-rich diet improves posprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. J Am Coll Nutr 2007; 26(5): 434-444.
40. Cho J, Kang JS, Long PH, Jing J, Back Y, Chung KS. Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. Arch Pharm Res 2003; 26(10): 821-825.
41. Reis EA, Zugno AI, Franzon R, Tagliari B, Matté C, Lammers ML, et al. Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. Metab Brain Dis 2002; 17(3): 211-217.
42. Castagne V, Rougemont M, Cuenod M, Do KQ. Low brain glutathione and ascorbic acid associated with dopamine uptake inhibition during rat's development induce long-term cognitive deficit: relevance to schizophrenia. Neurobiol Dis 2004; 15(1): 93-105.
43. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol 2006; 16(6): 710-715.
44. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Brain Res Rev 2003; 41(2-3): 268-287.
45. Lee L, Kang SA, Lee HO, Lee BH, Jung IK, Lee JE, et al. Effect of supplementation of vitamin E and vitamin C on brain acetylcholinesterase activity and neurotransmitter levels in rats treated with scopolamine, an inducer of dementia. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2001; 47(5): 323-328.
46. Biessels GJ, Kerssen A, de Haan EH, Kappelle LJ. Cognitive dysfunction and

diabetes: implications for primary care.Prim Care Diabetes 2007; 1(4): 187-193.

47. Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. CMAJ 2006; 174(7): 937-942.
48. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. J Korean Med Sci 2007; 22(1): 7-11.
49. Yarish M. The Benefits of IV Vitamin C in Cancer Treatment. 2011. Available at :http://www.thelakesideclinic.com.
50. Pepe S, Marasco SF, Haas SJ, Sheeran FL, Krum H, Rosenfeldt FL. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease.Mitochondrion. 2007; 7(Suppl): S154-167.