

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

Mohammad Shokrzadeh^{1,2},
Monireh Jahani³,
Zeinab Vafaeipour³,
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

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

محمد شکرزاده^{۱،۲}منیره جهانی^۳زینب وفایی پور^۳فاطمه شکی^{۴،۵}

چکیده

سابقه و هدف: دیابت نوع دویکی ازبزرگترین اپیدمی های قرن حاضر می باشد. یکی از شایع ترین عوارض میکروواسکولار در دیابت ملیتوس، نفروپاتی است. دیابت ملیتوس با استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری ارتباط مستقیم دارد که در نهایت می تواند منجر به آسیب بافتی در کلیه شود. در این مطالعه، اثرات نانوسریا بر جلوگیری از آسیب اکسیداتیو در میتوکندری های ایزوله از بافت کلیه موش های سوری دیابتی شده با استرپتوزوسین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، حیوانات در ۵ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. دیابت با تزریق استرپتوزوسین (65mg/kg, IP) در موش ها القاء گردید و موش هایی که قندخون بالاتر از 200 mg/dl داشتند، به عنوان 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 موش های سوری از گروه های مختلف جدا شده و میتوکندری آن ها با روش سانتریفیوژ متعدد جداسازی و عملکرد میتوکندری ها با تست MTT و پارامترهای استرس اکسیداتیو شامل گلوتاتیون (GSH)، میزان گونه های فعال اکسیژن (ROS) و لیپید پراکسیداسیون (LPO) ارزیابی شد.

یافته ها: کاهش قابل توجه ($p < 0.05$) در فعالیت میتوکندری و همچنین غلظت GSH در میتوکندری های ایزوله از کلیه موش های گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. هم چنین افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را در سطوح LPO و ROS در گروه دیابتی شاهد بودیم که پس از تجویز نانوسریا به موش های دیابتی، بهبودی نسبتاً معنی داری ($p < 0.05$) در فاکتورهای استرس اکسیداتیو و عملکرد میتوکندری های ایزوله از کلیه موش های دیابتی حاصل گردید.

استنتاج: نتایج مطالعه ما نشان می دهد که نانوسریا اثرات محافظتی در کاهش آسیب میتوکندریایی بافت کلیه دارد و می توان آن را به عنوان درمانی مکمل در کنار سایر داروهای پایین آورنده قندخون در کنترل عوارض دیابت استفاده کرد.

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

مقدمه

در حال توسعه در بر می گیرد و بر طبق بررسی های کمیته جهانی دیابت، تعداد افراد مبتلا به دیابت تا سال ۲۰۳۰ ممکن است به ۵۵۲ میلیون نفر هم برسد. در واقع

دیابت شایع ترین 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

E-mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشیار، فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. کارشناسی ارشد سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱۸

دیابت نوع دو، بزرگ ترین اپیدمی قرن بوده که در حال حاضر، سریع ترین روند رشد را در میان سایر بیماری‌ها در کل جهان دارد (۲). عوارض دیابت در دو گروه عوارض کوتاه مدت از جمله افزایش قند خون، پرنوشتی، پرادراری، پرخوری و ظهور گلوکز در ادرار و عوارض بلند مدت و مزمن شامل عوارض قلبی، کلیوی، عصبی، چشمی و آسیب‌های عروقی قرار می‌گیرد (۳). یکی از شایع ترین عوارض میکروواسکولار 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 می‌کنند 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). استرس اکسیداتیو ناشی از قندخون بالای دیابت، در پیشرفت 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 هاپرگلیسمی 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 از جمله بروز آپوپتوز در سلول و بافت می‌باشد (۱۲). در حالت فیزیولوژیک، برخی از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانت

آندوزن مثل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گلو‌تاتیون پراکسیداز، کاتالاز و بیلی روبین ردوکتاز از آسیب سلول‌های کلیوی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند (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 هاپرگلیسمی با داروهای شیمیایی یا انسولین منجر به عوارض متعددی مثل عوارض ناشی از سولفونیل اوره‌ها و بی‌اشتهایی مزمن، آتروفی مغزی و کبد چرب ناشی از انسولین می‌گردد (۱۴). بنابراین یکی از راه‌های موثر و اقتصادی برای کنترل بهتر عوارض ناشی از هاپرگلیسمی، خنثی کردن مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های 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 لاتانیدها 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 نانوسریم می‌تواند فعالیت هر ۲ آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز را تقلید کند. فعالیت مشابه سوپراکسید دسموتاز، بیش‌تر هنگامی ظاهر می‌شود که سریم اکسید شده است (۴+Ce)، و فعالیت مشابه آنزیم کاتالاز هنگامی ظاهر می‌شود که سریم احیا می‌شود (۳+Ce). بنابراین نانوسریم می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد (۱۶). تعداد

مطالعات در رابطه با اثرات نانوسریا روی عوارض دیابت بسیار محدود است و از آنجایی که 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 روش‌ها

استرپتوزوسین (از شرکت سیگما آمریکا)، نانو سربوم اکساید (از شرکت نوترینو ایران، سایز کم تر از ۱۰۰ نانومتر)، رنگ MTT (۳-۵، ۴-دی متیل تیا زول-۲-یل) [۵، ۲- دی فنیل تترازولیوم بروماید) (از شرکت St. Louis, MO) Sigma-Aldrich، ویتامین E (شرکت آریا ایران)، سدیم سیترات، EDTA، kcl، Na_2HPO_4 ، سوکسینات، KH_2PO_4 ، Tris-Hcl، MgCl_2 ، دی متیل سولفو کسید (DMSO)، 4,2hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)، Morpholinopropansulfonicacid (MOPS) معرف دی کلرو فلوئوروسین - دیاستات، تیوبایتوریکاسید، HCl، گلو تاتیون، آلبومین، n- بوتانل، معرف 5,5dithiobis-2-nitrobenzoic acid DTNB، ethyleneglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-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). نانو سربوم اکساید را در نرمال سالین حل کرده تا آماده تزریق شود و موش‌های سوری پس از دیابتی شدن، به مدت ۴ هفته نانو سربوم را به میزان 60 mg/kg دریافت کردند. هم چنین میزان ویتامین E را به عنوان گروه کنترل مثبت آزمایشات، به میزان 100mg/kg برای ۴ هفته به موش‌های دیابتیک تزریق گردید.

حیوانات مورد مطالعه: در این آزمایش، از ۳۰ سر موش سوری نر با میانگین وزن ۳۵-۳۰gf 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 22 ± 2 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. حیوانات در ۵ گروه و بر طبق مطالعات پیشین در هر گروه، ۶ موش سوری نر به ترتیب زیر قرار گرفت:

گروه اول: کنترل (هیچ دارویی دریافت نمی‌کند)، گروه دوم: گروه دیابتی که استرپتوزوسین را به میزان 65 mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کنند، گروه سوم: استرپتوزوسین + نانوسریا به این صورت که استرپتوزوسین را به میزان 65mg/kg دریافت کرده و پس از تایید دیابتی شدن، نانوسریا را به میزان 60mg/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 100mg/kg به مدت ۴ هفته دریافت کردند. پس از سپری شدن دوره درمان، حیوانات را با اتر بیهوش، سپس جراحی کرده و بافت کلیه آن‌ها را خارج و با بافر مانیتول، شستشو داده و با نرمال سالین توسط هموژنایزر دستی هموژن کردیم. بافت هموژن شده را ابتدا با سرعت $2000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بعد محلول رویی را با سرعت

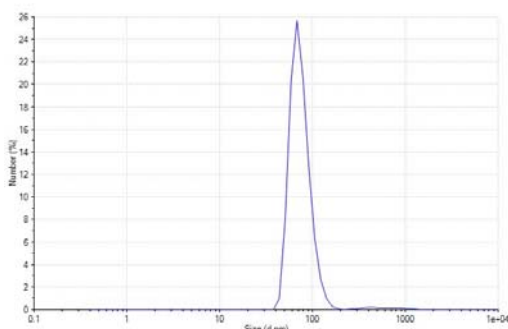
گردید. لایه n- بوتانل برای سنجش در طول موج nm ۵۳۲ جدا شده و مقدار TBARS از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید (۲۳).

اندازه گیری گلوکاتینون /حیا در نمونه: یک میلی لیتر از میتوکنندری را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ xg سانتریفیوژ می کنیم. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی لیتر ۰.۴٪ DTNB اضافه کرده و ورتکس می کنیم و ۱۵ دقیقه انکوبه می کنیم تا واکنش کامل شود. سپس میزان جذب را در طول موج ۴۱۲ نانومتر می خوانیم. غلظت گلوکاتینون را از روی منحنی استاندارد گلوکاتینون برحسب $\mu\text{g/ml}$ دست می آوریم (۲۴).

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

یافته ها

اندازه نانوذرات سربوم اکساید: اندازه نانوذرات با روش تفرق نور پویا (DLS) تعیین شد که نشان داد اندازه ذره ای نانو سربوم کم تر 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 سربوم اکساید

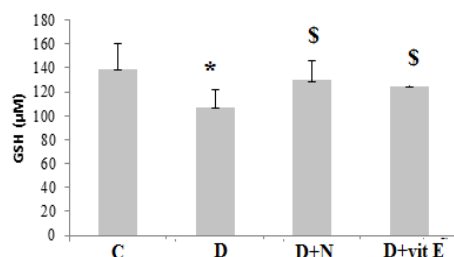
۱۰۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکنندری است، در بافر تریس (ساکارز ۰.۲۵ M، Na_2HPO_4 1 mM، MgCl_2 2mM، KCL 20mM، Tris-HCl 0.05 mM) سرد پراکنده کردیم (۱۹). تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین با استفاده از معرف کوماسی بلو با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. در تمامی آزمایشات، از میتوکنندری های با غلظت پروتئینی ۱ mg/ml استفاده شد (۲۰). تمامی فرآیندهای گفته شده در بالا، بر روی یخ انجام شده تا جداسازی میتوکنندری با کیفیت بالا انجام گیرد. اندازه گیری ROS: میتوکنندری هارا در بافر تنفسی (Succinate (5mM) (0.5mM)+ KH_2PO_4 (0.1mM)+ (Tris-Hcl (10mM)+ MOPS (20mM)+ EGTA (50 μM)+ Mgcl_2) پراکنده کرده و سپس به آن ها معرف (DCFH-DA) با غلظت نهایی ۱۰ μM) اضافه کرده و بعد از ۳۰ دقیقه، میزان شدت فلورسانس با فلوریمتری خوانده می شود (۲۱).

سنجش درصد بقای میتوکنندری با نمک تترازولیوم (MTT): ابتدا میتوکنندری ها را با غلظت ۱ mg/ml در بافر تریس حل کرده، سپس در پلیت ۹۶ خانه ای در هر ستون ۱۰۰ μl از نمونه ها را می ریزیم، بعد به هر چاهک، ۵۰ μl معرف MT (۰/۴٪ درصد) اضافه و سپس نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از آن، به هر چاهک ۱۰۰ μl DMSO اضافه کرده و جذب آن را توسط الایزا، در طول موج ۵۷۰ nm قرائت گردید (۲۲).

اندازه گیری میزان لیپید پراکسید/اسیون: پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه گیری شد. بدین ترتیب که به ۰/۲ ml از سوسپانسیون میتوکندریائی، ۰/۱ ml معرف TBA شامل HCl ۰/۵ درصد، نرمال TCA ۱۵ درصد و TBA ۰/۳ 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، سانتریفیوژ

استفاده از معرف DCFH-DA ارزیابی شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{sd}$ نشان داده شده‌اند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$), \$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p < 0.05$).

لیپیدپراکسیداسیون، با اندازه‌گیری تولید MDA در میتوکندری‌های ایزوله شده تعیین می‌شود. همان‌طور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است، لیپیدپراکسیداسیون در میتوکندری‌های ایزوله از بافت کلیه موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل، به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرده است و درمان با نانوسریا به مدت ۴ هفته (60 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).

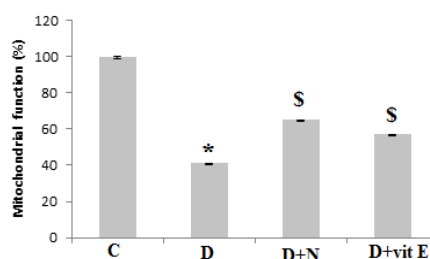


نمودار شماره ۴: تاثیر نانوسریا در میزان لیپیدپراکسیداسیون ناشی از دیابت در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه
میزان لیپیدپراکسیداسیون در موش‌های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با استفاده از معرف TBA ارزیابی شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{sd}$ نشان داده شده‌اند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$), \$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p < 0.05$).

گلوکاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های دفاعی غیر آنزیمی 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 ($107 \mu\text{g/mg protein}$) و در گروه دیابتیکی که نانوسریا دریافت می‌کنند، ($129/8 \mu\text{g/mg protein}$)

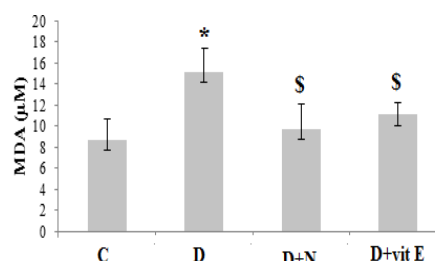
در طول دهه گذشته، استفاده از تکنیک کشت سلولی برای ارزیابی‌های سم‌شناسی ترکیبات مختلف، توسعه یافته است (۲۵). برای شمارش سلولی و تعیین درصد بقاء نیز می‌توان از MTT (۲۶) استفاده نمود که در واقع، یک تست ارزیابی سلامت میتوکندری است. در این مطالعه، سلامت و عملکرد میتوکندری با تست MTT ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده این بود که تجویز نانوسریا در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) 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 دریافت‌کننده نانوسریا پس از ۴ هفته، کاهش چشمگیری ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه دیابتیک پیدا کرده است.



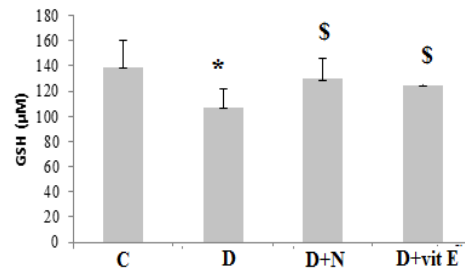
نمودار شماره ۲: تاثیر نانوسریا در محافظت میتوکندری‌های کلیوی در برابر آسیب ناشی از دیابت

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 $\text{mean} \pm \text{sd}$ نشان داده شده‌اند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$), \$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۳: تاثیر نانوسریا در جلوگیری از تولید ROS ناشی از دیابت در میتوکندری‌های کلیوی
میزان تولید ROS را در موش‌های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده‌اند، با

بوده است که نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدانتی نانوسریا بر میتوکنندری کلیه موش های دیابتی بوده است (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: تاثیر نانوسریا در محافظت در برابر اکسیداسیون گلوکاتیون ناشی از دیابت در میتوکنندری های کلیوی غلظت گلوکاتیون را در موش های گروه کنترل (C)، دیابتیک (D) و دیابتی که نانوسریا (D+Nc) و ویتامین E (D+vit E) دریافت کرده اند، با معرف DTNB ارزیابی شد. نتایج به صورت mean±sd نشان داده شده اند. *: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.05$)، \$: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه دیابتی ($p < 0.05$).

بحث

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

در مطالعه های مختلف، از استرپتوزوسین (STZ) به عنوان ماده ای برای القاء دیابت در مدل های حیوانی استفاده شده است (۲۸، ۲۷). عوارض دیررس شایع دیابت شامل عوارض قلبی-عروقی، رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی می باشد. نفروپاتی دیابتی از شایع ترین علل نارسایی کلیه و دیالیز محسوب می شود 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 می شود (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 می کند. امروزه بسیاری از بیماری ها از جمله دیابت، به عنوان بیماری میتوکندریایی شناخته شده است (۳۰-۳۲) و از میتوکنندری ایزوله، به عنوان ابزاری ارزشمند در بررسی عملکرد میتوکنندری و اختلالات مرتبط در طیف وسیعی از تحقیقات بالینی و پایه استفاده می شود (۳۳). هیپرگلیسمی مهم ترین عامل شناخته شده عوارض طولانی مدت دیابت است که باعث تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) عمدتاً از طریق NADPH oxidase، مسیر پلی فنول و محصولات گلیکوزیله می شود (۱۲). به طور کلی نتایج حاصل از سنجش مارکرهای آسیب اکسیداتیو میتوکنندری، نشان دهنده ارتباط مستقیم بین افزایش تولید ROS و پیشرفت نفروپاتی دیابتی است. مطالعات زیادی نشان دهنده نقش ROS در پیشرفت نفروپاتی دیابتی بوده اند. در مطالعه ای که توسط SAYED در سال ۲۰۱۲ انجام شد، استفاده از دو آنتی اکسیدانت طبیعی تیموکینون و پروآنتوسیانین در رت های دیابتی شده توسط استرپتوزوسین، باعث کاهش تولید ROS، نیتریک اکساید (NO) و لیپید پراکسیداسیون 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، غلظت های مختلف گلوکز بر سمیت سلولی و افزایش گونه های 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 معنی دار میزان بقای سلولی در شرایط گلوکز بالا بود که پس از تیمار سلول ها با زعفران و در حضور GSH، سمیت سلولی کاهش یافت (۳۵).

در مطالعه حاضر نیز تزریق نانوسریا با غلظت ۶۰ mg/kg، میزان درصدهای میتوکنندگی‌های زنده را افزایش داد و لذا این نتیجه بیان‌کننده اثر احیایی و به عبارتی اثر آنتی‌اکسیدانتی نانوسریا است. روش MTT برای تعیین درصد بقای سلول‌ها و شمارش سلولی، کاربرد فراوانی دارد؛ به‌طوری‌که میتوکنندگی‌های سلول‌های زنده که دارای آنزیم‌های دهیدروناز می‌باشند، قادرند نمک زردرنگ ترازولیوم 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 گلوکاتایون 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 دی‌آلدئید، مارکر آسیب اکسیداتیو به لیپیدها بوده که در میتوکنندگی گروه دیابتی افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در مطالعه حاضر داشت و در گروه‌های تحت درمان با نانوسریا، شاهد کاهش این مارکر بودیم. میتوکنندگی محدوده دفاعی بر ضد آسیب اکسیداتیو دارد؛ برای مثال آنزیم آنتی‌اکسیدانت MnSOD، سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید تبدیل می‌کند (۳۸) و یا این که ۱۵-۱۰ درصد از گلوکاتایون سلولی در داخل میتوکنندگی قرار دارد (۳۹). میتوکنندگی 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 میتوکنندگی سبب خروج فاکتورهای پروآپتوتیک که آغاز کننده مرگ سلولی است، از میتوکنندگی می‌شود (۴۱) که در شرایط دیابت، میزان

گلوکاتایون سلولی میتوکنندگی، کاهش می‌یابد که در این آزمایش، بعد از تحت درمان قرار گرفتن موش‌های سوری دیابتی با نانوسریا، بهبودی نسبتاً خوبی در سطح گلوکاتایون 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 از سکتة 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 نیزه و همکاران به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانت نانوذرات

اندازه ذره‌ای ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر استفاده شد که خواص آنتی اکسیدانت قابل قبولی در مقایسه با ویتامین E داشت. با توجه به این که که شیوع دیابت در طی دو دهه گذشته در جهان بسیار چشمگیر بود (۱۷)، به‌طوری که از آن با نام اپیدمی خاموش یاد می‌شود، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیش‌تری پیرامون اثرات نانوسریا و تعیین دوز سمی آن و اثرات سینرژیستی آن در کنار دیگر داروهای پایین آورنده قند خون صورت گیرد. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز نانوذرات سریوم اکساید به مدت ۴ هفته، می‌تواند سبب بهبود عوارض کلیوی ناشی از دیابت شود، چرا که این ماده با خواص کاتالیزوری و آنتی اکسیدانتی که دارد، روند استرس اکسیداتیو و آثار مخرب ناشی از آن را مهار می‌کند و می‌توان از این ماده پس از بررسی‌های بیش‌تر، در درمان مکمل عوارض دیابت در کنار دیگر داروهای پایین آورنده قند خون به خوبی استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، به دلیل تامین هزینه این طرح اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم منیره جهانی، دانشجوی 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. Diabetes 1983; 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

سریو اکساید (با اندازه ذره‌ای زیر ۱۰۰ نانومتر) و فرم فلزی و معمول سریوم پرداختند که نشان دادند نانوذرات سریوم اکساید، اثرات بهتری در کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف رت‌های دیابتی دارد (۴۷). خواص آنتی اکسیدانت ذرات نانوسریا، مکانیسم پیشنهاد شده برای اثرات آنتی اکسیدانت نانوسریا به قابلیت تبدیل این ذرات بین دو حالت احیا (Ce^{3+}) و اکسید (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 این عمل آن‌ها، مشابه عملکرد آنزیم سوپراکسید دسموتاز است (۴۸). هم‌چنین یک مولکول هیدروژن پراکساید می‌تواند به فرم اکسید (Ce^{4+}) متصل شده و طی تبدیل به فرم احیا (Ce^{3+})، هیدروژن پراکساید به آب و اکسیژن تبدیل شود که عملکردی شبیه آنزیم کاتالاز دارد (۴۹). البته اثرات بیولوژیک نانوذرات سریوم اکساید، می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل روش سنتز، اندازه ذرات و پایدارکننده قرار گیرد (۵۰).

در مطالعه Ivanov و همکاران، نشان دادند که خاصیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد، وابسته به اندازه ذره‌ای است و هرچه اندازه ذره‌ای کوچک‌تر شود، منجر به اثرات آنتی اکسیدانت بهتری خواهد شد (۵۱). در مطالعه ما از نانوذرات سریوم اکساید با

- 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. Flavonolkaempferol improves chronic hyperglycemia impaired 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 of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye 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.

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*. New York: 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 *Tribulus Terrestris* Oral Feeding On Learning and Memory in Streptozotocin-diabetic Rats: Investigating the Role of lipid Peroxidation. *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 Immunol 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

- 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.