

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

Jalal Hassanshahi¹,
Gholam Hossein Hassanshahi²,
Mohammad Zamani³,
Elham Hakimzadeh⁴,
Mansoreh Soleimani⁵

¹ MSc Student of Physiology, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Microbiology & Immunology & 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 of 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. Finally, we have compared the therapeutic effect of these two together.

Materials and methods: 35 male balb-c were divided into seven subgroups. Includes five groups: intact, ischemic control, sham control and treatment groups with CoQ10 and treatment groups with ascorbic acid. In treatment groups, the mice treated with CoQ10 and vitC as pre-treatment for a week. Then, ischemia induced by common carotid artery ligation. The mice post-treated with CoQ10 and ascorbic acid for a week. Nissl staining applied to counting necrotic cells of hippocampus. TUNNEL kit was used to quantify apoptotic cell death while to short term memory scale, we apply y-maze and shuttle box tests.

Results: High rate of apoptosis was seen in ischemic group associated with significantly short-term memory loss. In the treatment groups with these antioxidants, cell death was significantly lower than the ischemic control group. Between treatment groups, group treated with CoQ10 was less neuronal death than the group treated with ascorbic acid.

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

Keywords: Hippocampus, Ischemia-Reperfusion, neuroprotective effect, CoQ10, ascorbic acid

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-ریپر فیوژن

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 می شوند. ما نقش محافظتی CoQ10 و اسید اسکوربیک را در برابر ایسکمی-ریپر فیوژن بررسی کردیم. نهایتاً تأثیر درمانی این دو را با هم مقایسه کردیم.
مواد و روش ها: ۳۵ سر موش سوری نر بالغ، نژاد balb-C به پنج گروه هفت تایی تقسیم شدند. شامل گروه سالم، ایسکمی کنترل، شم کنترل، گروه تحت درمان با CoQ10 و گروه تحت درمان با ویتامین C بودند. در گروه های درمان، موش ها قبل از القای ایسکمی، با CoQ10 و ویتامین C به مدت یک هفته درمان شدند. سپس ایسکمی القاء شد و بعد از کاهش التهاب موش ها مجدداً به مدت یک هفته تحت درمان با CoQ10 و ویتامین C قرار گرفتند. از رنگ آمیزی نیسل برای شمارش سلول های نکروتیک و از کیت تانل برای بررسی آپوپتوز استفاده شد. در حالی که برای سنجش حافظه کوتاه مدت، تست های حافظه y-maze و شاتل باکس انجام شد.
یافته ها: ریت بالای آپوپتوزی سدر گروه ایسکمی دیده شد. در گروه تحت درمان با این دو آنتی اکسیدان، مرگ سلول ها به مقدار قابل توجهی پایین تر از گروه ایسکمی کنترل بود. بین دو گروه درمان، در گروه تحت درمان با CoQ10 مرگ نوروها کمتر از گروه تحت درمان با اسید اسکوربیک بود. نتایج تست های حافظه با نتایج تست های بافتی منطبق بود.
استنتاج: با توجه به یافته های این مطالعه، مصرف این دو آنتی اکسیدان به مقدار قابل توجهی مرگ سلول ها و از دست دادن حافظه را کاهش داد. اما اثرات آنتی اکسیدانی CoQ10 قوی تر از ویتامین C در این ناحیه از مغز بود.

واژه های کلیدی: هیپوکامپ، ایسکمی-ریپر فیوژن، اثر نوروپروتکتیو، CoQ10، اسید اسکوربیک

مقدمه

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

E-mail : ghassanshahi@rums.ac.ir

مؤلف مسئول: غلامحسین حسن شاهی - رفسنجان: دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۲. گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی و هماتولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
 ۳. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
 ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
 ۵. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۳/۱۸ تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۳۰

فراموشی بعدی و ضعف حافظه کوتاه مدت و حافظه فضایی می شود ولی اطلاعات قبلی حفظ می شوند و بیمار دچار این ضایعه می تواند آن‌ها را به خاطر آورد (۵). این حافظه باقیمانده قبلی، ما را متقاعد می کند که تقویت بیشتر حافظه باعث انتقال اطلاعات به بیرون از هیپوکامپ و بخش های دیگری از مغز می شود (۶). آسیب به هیپوکامپ دو طرف، موجب فراموشی بعدی یا anterograde amnesia می شود ولی اگر یکی از آن‌ها آسیب بیند فرد دچار فراموشی بعدی نمی شود (۷). به کاهش خون‌رسانی به اندام یا ناحیه ای از بدن ایسکمی می گویند که باعث کاهش انتقال اکسیژن و مواد مغذی به بافت‌ها و در نتیجه اختلال عملکرد آن اندام می گردد (۸، ۹). مشاهدات اولیه نشان می دهد 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 سکتة 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 می شود. آسیب‌های ریپرفیوژن به آسیب‌هایی گفته می شود که در اثر بازگشت مجدد خون در بافت پس از یک دوره ایسکمیک ایجاد می شود، غیاب اکسیژن و مواد مغذی وضعیتی را ایجاد می کند که در آن بازگشت جریان خون به جای بازگشت فعالیت نرمال باعث التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو از طریق القای استرس اکسیداتیو می شود (۱۴). بعد از برقراری جریان خون مغزی، جریان بازگشتی به دنبال انسداد باعث بازگشت اکسیژن در سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از تولید و تهاجم رادیکال‌های سوپرا اکسید می گردد. این امر می تواند بر روی سلول‌ها تأثیر گذاشته و باعث نکرروز و آپوپتوز

بافتی گردد (۱۵). انسداد شریان کاروتید مشترک چپ و راست به مدت چند دقیقه باعث به وجود آمدن ایسکمی در ناحیه هیپوکامپ می گردد. که در میان قسمت‌های دچار ایسکمی شده در هیپوکامپ ناحیه هیلوس و نورون‌های ناحیه CA1 حساس‌ترین نقاط مستعد به آسیب، به دنبال ایسکمی هستند. به دنبال آسیب هیپوکامپ اختلالات حافظه بعدی و اشکالات یادگیری را داریم و وجود ضایعه باعث به وجود آمدن انواع اختلالات در طرح‌های رفتاری می شود (۱۶). روغن زیتون به علت داشتن اسیدهای چرب غیراشباع می تواند میزان کلسترول را کاهش دهد و به این ترتیب از رسوب کلسترول در رگ‌ها نیز جلوگیری کند (۱۸).

CoQ10 از جمله موادی است که معمولاً در میتوکاندری و در ارتباط با تولید انرژی دیده می شود و آن نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان هم 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 (۱۹، ۲۰). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی اند که با حذف رادیکال‌های آزاد و ترکیبات ناشی از صدمات سلولی، مانع آسیب به سلول‌های سالم به خصوص در قسمت‌هایی مثل غشای سلولی و نیز DNA می شوند. با این مکانیزم مانع مرگ سلول‌ها می شوند (۲۱). CoQ10 در بدن تولید می شود و برای کارکرد پایه‌ای سلول ضروری است. غنی‌ترین مواد غذایی حاوی CoQ10 روغن ماهی، مغز دانه‌ها، انواع ماهی‌ها و انواع گوشت‌ها می باشد (۲۲). آنتی‌اکسیدان‌ها مانند یک سد از بدن در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می کنند. اگر چه سیستم‌های آنزیمی متعددی برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در بدن وجود دارد، ولی آنتی‌اکسیدان‌های اصلی، ویتامین های C، E و بتاکاروتن و نیز ماده معدنی سلنیم مهم هستند (۲۳). بدن قادر به تولید این ترکیبات نیست، بنابراین بایستی از طریق غذا آن‌ها را دریافت کرد (۲۴). نیاز روزانه به ویتامین C، ۶۰ میلی گرم است و نگهداری

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق تعداد ۳۵ موش سوری نر بالغ (با سن ۴ هفته‌ای) نژاد bulb-c با وزن ۴۰-۳۵ گرم از موسسه رازی ایران خریداری شد. موش‌ها در یک اتاق مخصوص در دمای 1 ± 21 C نگهداری می‌شدند (با رطوبت 10 ± 50 درصد و در یک سیکل ۲۴ ساعته که ۱۲ ساعت در نور و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داشتند. حیوان‌ها به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) دسترسی داشتند. 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 به انجام رسید و رعایت اصول اخلاق در پژوهش هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق اساسنامه اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، به انجام رسید.

گروه‌های 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 گاوآز (450mg/kg) و اسید آسکوربیک به صورت تزریق داخل صفاقی (100mg/kg) به آن‌ها داده شد و سپس موش‌ها (گروه‌های درمان و ایسکمی کنترل) با کتامین (100mg/kg) یا

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 (۲۵). مرکبات بهترین منابع ویتامین C می‌باشند (۲۶). همچنین مصرف این ویتامین باعث جذب بهتر آهن در بدن می‌شود (۲۷). ویتامین C به عقیده برخی کارشناسان احتمال بروز سکنه 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 اکسیدکننده جلوگیری می‌کند (۲۸-۳۰) ما به این علت نورون‌های موجود در ناحیه CA1 هیپوکامپ را مورد بررسی قرار دادیم که این نورون‌ها نسبت به سایر نورون‌های موجود در مغز، از حساسیت فوق‌العاده بالاتری در برابر هیپوکسی برخوردارند و همچنین تجمع رادیکال‌های آزاد در اطراف این نورون‌ها به سرعت باعث فعال شدن روندهای نکرروز و آپوپتوز سلولی می‌شود. در مطالعات مختلف تأثیرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C بررسی شده بود (۴۸، ۴۹). CoQ10 می‌تواند تخریب سلولی را مخصوصاً در غشای سلولی و DNA کاهش دهد باعث کاهش عوارض پس از ایسکمی می‌شود (۵۱). تا به حال اثر ویتامین C و CoQ10 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 این تحقیق، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و درمانی ویتامین C و CoQ10 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 و کاهش میزان نکرروز و آپوپتوز نورون‌ها در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی کنترل) بوده است. در نهایت پس از آنالیز داده‌ها اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و CoQ10 با هم مقایسه گردید.

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 می‌شود (۳۲).

Y-maze: این دستگاه برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده و از ۳ راهرو با انتهای بسته و ارتفاع ۳۵-۴۰ سانت 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. همزمان زمان سنج تنظیم می‌گردد. سپس هر سه حرکت پشت سر هم در صورت مشابه نبودن بازوهای پیش دهیک امتیاز مثبت و در صورت 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 بازو و قرار گیرد. موش به مدت ۸ دقیقه در بازوهای دستگاه به دنبال محل خروج می‌گردد. با عبور قاعده دم موش از ابتدای هر بازوی دستگاه نام آن بازو ثبت می‌شود تا زمان مورد نظر تمام شود. سپس نتایج ثبت شده با استفاده از فرمول زیر، PerCent Alternation محاسبه و آنالیز می‌گردد.

$$\text{PerCent Alternation} = \frac{PA}{y-1} \times 100$$

(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 اساس ترس طراحی شده است در ۴ روز پیاپی انجام می‌شود. مانند آزمایش قبل، ابتدا دستگاه کاملاً تمیز شده و تست شروع می‌شود. روز اول و دوم برای آموزش و آشنایی موش‌ها با دستگاه می‌باشد هر دو

ketamin (SigmaChemical Co., Saint Louis, USA) (100mg/kg, I.P injection) و زایلازین (10mg/kg, I.P injection) یا xylozine (SigmaChemical 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 لقا شد. تا یک هفته بعد از ایسکمی برای کاهش التهاب ناحیه ایسکمی و به دلیل این که 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 شد. 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 به طوری که فاصله هر برش نسبت به برگما در تمام گروه‌ها یکسان باشد و برای مطالعات بافتی آماده شد که شامل رنگ آمیزی بافتی با استفاده از رنگ کرزیل ویوله (نیسل) و تست تانل بود.

رنگ آمیزی نیسل: این روش برای رنگ آمیزی

اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش اجسام نیسل به رنگ بنفش-آبی دیده می‌شوند. این رنگ آمیزی معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود (۳۱).

تست تانل: با کمک کیت تانل هسته نورون‌های

آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص می‌شود ولی نورون‌های نکروتیک و سالم رنگ زیادی را جذب

تست حافظه بعد از ظهر باید انجام شود و به این صورت است که موش در اتاقک روشن به مدت ۵ دقیقه می ماند و سپس لامپ دستگاه روشن شده و همزمان درب کشویی بین اتاقک روشن و تاریک باز می شود. به طور معمول به خاطر نور شدید شده اتاقک روشن و تمایل ذاتی جوندگان به محیط تاریک، حیوان به اتاقک تاریک رفته و در آن جا هم ۵ دقیقه می ماند و در نهایت از دستگاه خارج می شود. روز دوم کاملاً شبیه روز اول آزمایش ادامه می یابد. در روز سوم با ورود حیوان به اتاقک تاریک شوک الکتریکی به میزان ۰/۳ میلی آمپر به مدت ۱ ثانیه داده می شود و سپس حیوان از دستگاه خارج می شود. در روز چهارم حیوان ۲ دقیقه در اتاقک روشن می ماند و با روشن شدن لامپ و باز شدن دریچه بین دو اتاقک، زمان ورود موش به اتاقک تاریک اندازه گیری می شود.

پردازش آماری داده ها

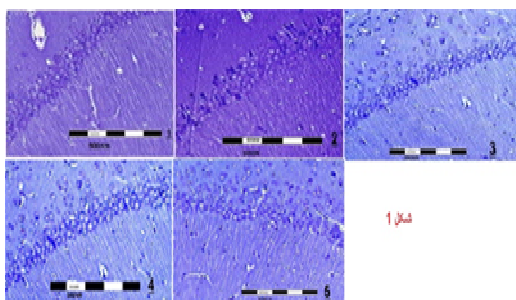
طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Randomized Design Completely) و کلیه اطلاعات ثبت شده در طول آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست LSD به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگین ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلافات بین میانگین ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $p < 0/05$ تعیین گردید. کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS با ورژن ۱۶ مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها

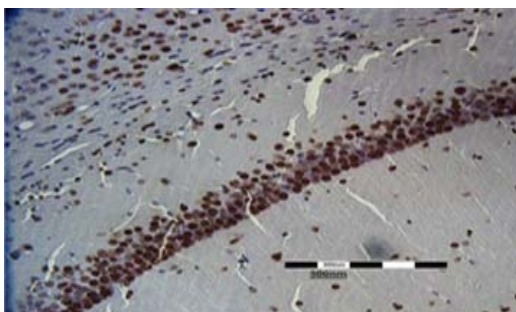
در این مطالعه ما از رنگ آمیزی نیسل برای شمارش سلول های نکریتیک استفاده کردیم و از تست تانل نیز برای شناسایی سلول های آپوپتوتیک در منطقه CA1 هیپوکامپ استفاده شد. تصاویری که در زیر نشان داده شده نتیجه های حاصل از این روش هاست.

۱- گروه سالم بدون سلول های نکریتیک،

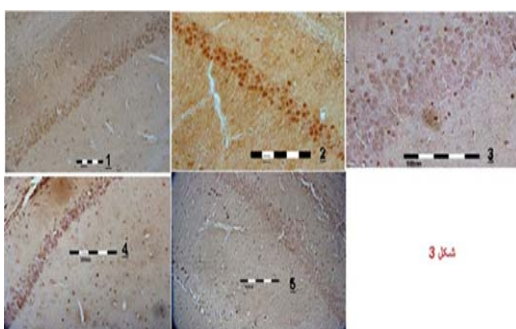
۲- گروه ایسکمی کنترل با تعداد زیادی سلول های نکریتیک، ۳- گروه شم کنترل (روغن زیتون) با سلول های نکریتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی کنترل، ۴- گروه تحت درمان با ویتامین C با سلول های نکریتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی کنترل و گروه شم کنترل ۵- گروه تحت درمان با CoQ10 با سلول های نکریتیک بسیار کمتر نسبت تمام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



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

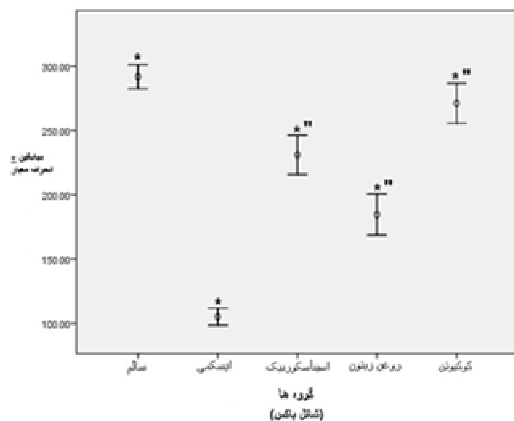


تصویر شماره ۲: کنترل مثبت. تعداد بسیار زیادی سلول تانل مثبت در این گروه دیده می شود که با کمک DNase با تانل رنگ می شوند (500nm)



تصویر شماره ۳: تست تانل در پنج گروه مورد مطالعه

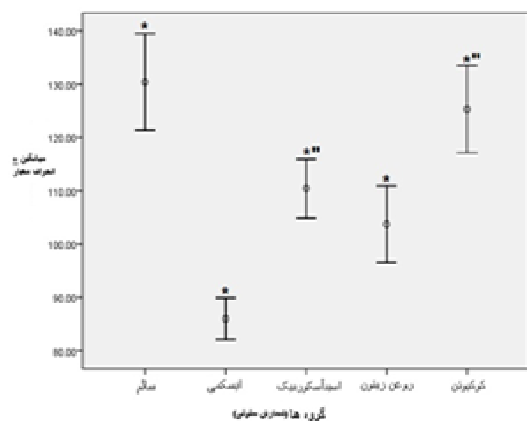
رنگ آمیزی کرزیل ویوله (نیسل) وضعیت سلول‌های سالم و نکروتیک را در ناحیه تحت بررسی نشان داد. حیوانات درمان شده با آنتی‌اکسیدان‌ها مرگ سلولی کمتر و تراکم سلولی بیشتری در مقایسه با گروه ایسکمی داشتند. در گروه‌های درمانی، کمترین سلول‌های نکروتیک در گروه تحت درمان با CoQ10 دیده شد. در کنترل مثبت، تعداد بسیار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



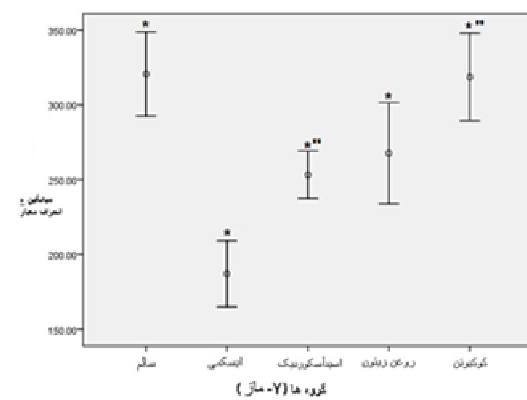
نمودار شماره ۳: مقایسه حافظه کوتاه مدت با تست شاتل باکس. گروه ایسکمی با تمام گروه‌های درمانی مقایسه شد که تفاوت معنی‌داری داشت. $p < 0.05$. تفاوت معنی‌داری بین گروه تحت درمان با ویتامین C با گروه تحت درمان با CoQ10 مشاهده شد. $p < 0.001$.

تست تانل که برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک استفاده می‌شود که این تست افزایش این سلول‌ها را در گروه ایسکمی و کاهش این سلول‌ها را در گروه‌های تحت درمان نشان داد. در گروه‌های درمان، سلول‌های آپوپتوتیک متری نسبت به گروه ایسکمی دیده شد، این سلول‌های در حال آپوپتوز در گروه سالم دیده نشد. 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 به دست آمد به طوری که در گروه شم کنترل که روغن زیتون به

۱- گروه سالم بدون سلول‌های آپوپتوتیک،
 ۲- گروه ایسکمی کنترل با تعداد زیادی سلول‌های 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 سلول‌های آپوپتوتیک کمتر نسبت به گروه ایسکمی و شم کنترل،
 ۵- گروه تحت درمان با CoQ10 با سلول‌های آپوپتوتیک بسیار کمتر نسبت تمام گروه‌ها (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 حافظه کوتاه مدت y-maze (آنالیز داده‌ها، بهبود بیشتر حافظه را در گروه درمانی CoQ10 در مقایسه با ویتامین C نشان داد. $p < 0.001$).

موش‌ها داده شده بود اختلالات حافظه کاهش یافته بود و در گروه تحت درمان با ویتامین C نیز به مقدار زیادی کاهش اختلالات حافظه کوتاه مدت را داشتیم. در گروه تحت درمان با CoQ10 به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌های قوی و مؤثر موجود در آن علائم بهبود حافظه کوتاه مدت را بیشتر از گروه‌های تحت درمان با روغن زیتون و ویتامین C مشاهده کردیم. در گروه سالم این اختلالات دیده نشد. تست رفتاری y-maze نشان داد که ایسکمی منجر به آسیب زیادی در حافظه کوتاه مدت می‌شود. بهترین نتایج در گروه تحت درمان با CoQ10 به دست آمد. ما می‌توانیم در گروه‌های تحت درمان به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌ها در آن‌ها علائم بهبود سلامت ذهنی را به وضوح ببینیم. 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. به دنبال 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 می‌شود که در نهایت باعث مرگ سلول به صورت برنامه ریزی شده یا همان آپوپتوز می‌شود (۳۵-۳۳). 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 (۳۶). ناحیه CA1 هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین قسمت‌های مغز در مقابل ایسکمی می‌باشد. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی نیسل پس از القای ایسکمی، در گروه ایسکمی کنترل کاهش سلول‌های سالم را در ناحیه هیپوکامپ نشان داد که دلیل واضحی بر وجود تخریب نورونی در این ناحیه از مغز به دنبال

ایسکمی - ریپرفیوژن است.

دانشمندان مشاهده کردند که مصرف هم‌زمان روغن زیتون و روغن نباتی جامد در خرگوش با کاهش معنی‌دار سطح تری‌گلیسرید خون همراه بود (۳۷). محققان مصرف مکرر روغن زیتون را در پیشگیری از اختلالات حافظه‌ای ناشی از ایسکمی به اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آن مربوط دانسته‌اند (۴۰-۳۸). در این مطالعه ما از روغن زیتون به عنوان حلال CoQ10 استفاده کردیم. روغن زیتون روی میزان کاهش مرگ و میر سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ نیز بررسی شد. که به دنبال بررسی، در گروه تحت درمان با این روغن کاهش میزان مرگ و میر سلول‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده شد که احتمالاً به علت اثرات آنتی‌اکسیدان‌ها و چربی‌های غیر اشباع موجود در این روغن می‌باشد. مشخص شده که ترکیبات موجود در روغن زیتون، بر فعالیت سیستم کولینرژیک مغزی نیز اثر تعدیلی دارد (۴۱، ۴۲). و سیستم کولینرژیک، دوپامینرژیک، سروتونرژیک نقش مهمی در فرآیند یادگیری و حافظه دارد (۴۳، ۴۴). 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 است 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 (۴۷-۴۵).

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 می شوند را کاهش می دهد که در غیاب آن، تجمع و ترکیب این مولکول ها با یکدیگر می توانستند سبب آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول هایی شبیه لیپیدها غشای سلول ها، DNA و پروتئین های موجود در آن شوند که به نوبه خود در بیماری های مزمن شامل بیماری های قلبی و عروق، سکنه، سرطان بیماری های دژنراتیو عصبی دخیل هستند (۴۸، ۴۹).

اثر آنتی اکسیدانی ویتامین C برای ما کاملاً روشن بود اما ما در این مطالعه، اثر آن را روی میزان کاهش عوارض حافظه ای و جلوگیری از تخریب وسیع سلولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ بررسی کردیم. ویتامین C به صورت pre-treatment و post-treatment به موش ها داده شد. این ویتامین از طریق جریان خون وارد قسمت های مختلف مغز از جمله هیپوکامپ می شود و احتمالاً در این ناحیه به علت خاصیت آنتی اکسیدانی خود با رادیکال های ایجاد شده به دنبال القای ایسکمی واکنش داده و آن ها را خنثی می سازد و از واکنش دادن این ترکیبات با کروموزوم و لیپیدهای غشای سلول های مستعد جلوگیری می کند و نتیجتاً عوارض متعاقب ایسکمی را کاهش می دهد. در مقایسه نتایج بافتی این گروه با گروه ایسکمی کنترل، تخریب نورونی کمتری در گروه تحت درمان مشاهده شد که به علت تأثیر درمانی این آنتی اکسیدان بوده است. در گروه تحت درمان نتایج تست های شاتل باکس و y-maze در مقایسه با گروه ایسکمی کنترل به نتایج این تست ها در گروه intaCt نزدیک تر بود که این نیز دلیلی بر اثرات درمانی ویتامین C بر سلول های این ناحیه است. روغن ماهی که منبعی از CoQ10 می باشد نیز اثرات نوروپروتکتیو و آنتی اکسیدانی موثری در هیپوکامپ مغز دارد. احتمالاً این اثر آن به علت وجود آنتی اکسیدان های موجود در آن می باشد. با توجه به سایر اثرات مفید این روغن استفاده از آن در رژیم غذایی می تواند در سلامت جامعه نقشی اساسی را ایفا کند (۵۰). CoQ10 با این توانایی اخیر

خود می تواند تخریب سلولی را مخصوصاً در غشای سلولی و DNA کاهش دهد و شرایط و زمان کافی را برای ترمیم در اختیار سلول قرار دهد. پس در مجموع مصرف CoQ10 باعث کاهش تعداد سلول های تخریب شده و به دنبال آن کاهش عوارض پس از ایسکمی می شود (۵۱).

در این مطالعه تأثیر CoQ10 روی میزان کاهش مرگ و میر سلول های هیپوکامپ مغز بررسی شد. به دنبال این بررسی در گروه تحت درمان با آن، کاهش میزان مرگ سلول ها در این ناحیه مشاهده شد که به علت اثرات آنتی اکسیدان آن و احتمالاً اثرات سینرژیستی آن با ویتامین E می باشد. این ترکیبات بعد از جذب از دستگاه گوارش وارد خون می شود. مقداری از آن بعد از این که به مغز رسید به علت خاصیت محلول بودن در چربی، وارد قسمت های مختلف آن از جمله هیپوکامپ مغز می شود. در این محل باعث اثرات قوی آنتی اکسیدانی بر روی رادیکال های آزاد و اسیدهای تجمع یافته به دنبال ایسکمی می شوند. با آن ها واکنش داده و آن ها را خنثی می کنند. از این طریق از واکنش این رادیکال ها با لیپیدهای موجود در غشای سلول های مجاور آن ها جلوگیری می کنند و نتیجتاً باعث کاهش وسعت تخریب نورون های این ناحیه از مغز به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن می شوند و این حقایق با تست های انجام شده در گروه درمان با این آنتی اکسیدان نیز منطبق است. در این مطالعه ما با استفاده از رنگ آمیزی بافتی نیسل و تست تانل سعی کردیم تا کلیه نتایج به دست آمده را از همه زوایا مورد بررسی قرار دهیم و بتوانیم داده های مربوط به هر تست را با سایر داده ها مقایسه کنیم تا از صحت آن اطمینان حاصل کنیم. در رنگ آمیزی نیسل کاهش سلول های نکروتیک در گروه های درمانی دیده شد و تست تانل این کاهش را در مورد سلول های آپوپتوتیک اثبات کرد. در مجموع آنالیز داده های به دست آمده از تست های این مطالعه نشان داد که استفاده از آنتی اکسیدان هایی مثل CoQ10،

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که ناحیه CA1 مغز در مقابل ایسکمی و هیپوکسی و رادیکال های آزاد آسیب پذیر می باشد. مصرف آنتی اکسیدان های مثل روغن زیتون، CoQ10، ویتامین C به دنبال ایسکمی های مغزی می تواند مرگ و میر نورون های این ناحیه را کاهش دهد و باعث حفظ نورون ها از عوامل مضر شود. مصرف CoQ10 قبل و بعد از ایسکمی های مغزی می تواند حتی این سلول های حساس در ایسکمی را هم در مقابل عوارض متعاقب آن محافظت کرده و با کاهش دادن مرگ آن ها عوارض نامطلوب متعاقب ایسکمی را در حد چشمگیری کاهش دهد که این اثرات در مصرف ویتامین C نیز دیده شد. اثرات آنتی کسیدانی CoQ10 قوی تر از ویتامین C است.

روغن زیتون، ویتامین C بصورت یک عامل پیشگیرانه و نیز یک عامل درمانی می تواند با کاهش آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد در شرایط استرس زا، آسیب های وارده به نورون ها را کاهش و در نتیجه بقای نورون های هیپوکامپ مغز را افزایش دهد. در نهایت نتایج حاصل از رنگ آمیزی ها و تست های حافظه ای نشان دادند که هر چند هر دو آنتی اکسیدان مورد مطالعه اثرات نوروپروتکتیو موثری را در کاهش مرگ سلول های این ناحیه از مغز ایفا کردند اما اثرات آنتی اکسیدانی CoQ10 قوی تر از ویتامین C بوده است و پیش آگهی بهتری را در بهبود حافظه بعد از مصرف CoQ10 نسبت به ویتامین C داشتیم.

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. PMID: 19467271.
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. PMID: 15044534
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. PMID: 12591126
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. PMID: 11286259
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. PMID: 15039131
9. Nussmeier NA. A review of risk factors for adverse neurologic outcome after cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 2002; 34(1): 4-10. PMID: 11911628
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. PMID: 11295987

11. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55(3): 310-318. PMID: 18308346
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. PMID: 20227392
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. PMID: 12742256
14. Petit CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 1987; 37: 1281-1286. PMID: 3614648
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. PMID: 6497879
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. PMID: 2923719
17. Amonrat T, Soottawat B, Wonnop V, Eric A, Decker C. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. *Food Science and Technology* 2008; 41(1): 169-161.
18. 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.
19. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme Q10 Ameliorates Neurodegeneration, Mossy Fiber Sprouting, and Oxidative Stress in Intrahippocampal Kainate Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rat. *J Mol Neurosci* 2012. [Epub ahead of print] PMID: 23008120
20. Greenberg S, Frishman WH. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol* 1990; 30(7): 596-608. PMID: 2202752
21. 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. PMID: 23013526
22. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660(1-2): 171-199. PMID: 14757233
23. 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.
24. 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. doi: 10.1002/jsfa.5876. [Epub ahead of print]. PMID: 23027609
25. Frei B, Trabe MG. The new US Dietary Reference Intakes for vitamins C and E. *Redox Rep* 2001; 6(1): 5-9. PMID: 11333117
26. 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. PMID: 11464674

-
27. 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.
 28. Okamoto K. Vitamin C intake and apolipoproteins in a healthy elderly Japanese population. *Prev Med* 2002; 34(3): 364-369. PMID: 11902853
 29. 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. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2012.09.032. [Epub ahead of print] PMID: 23026412
 30. Combs GF. Vitamins. In: Mahan Lk, Escottstump S, (eds). Krause's food·nutrition & diet therapy. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 67-109.
 31. 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. PMID: 22978586
 32. Chang S, Sen S, Zhang P, Gyarfaz B, Ashcroft B, Lefkowitz S, et al. Palladium electrodes for molecular tunnel junctions. *Nanotechnology*. 2012; 23(42): 425202. doi: 10.1088/0957-4484/23/42/425202. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23037952
 33. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002; 73(4): 493-499. PMID: 11889418
 34. 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. PMID: 12352525
 35. 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. PMID: 15010362
 36. 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. pii: S1043-6618(12) 00163-6. doi: 10.1016/j.phrs. 2012.08.003. [Epub ahead of print] PMID: 23036353
 37. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(5): 434-444. PMID: 17914131
 38. 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. PMID: 14609130
 39. 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. PMID: 12322790
 40. 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. PMID: 14751774
41. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16(6): 710-715. Epub 2006 Sep 29. PMID: 17011181
 42. 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. PMID: 12663083
 43. 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. PMID: 11814146
 44. 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. doi: 10.1016/j.pcd.2007.10.002. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18632044
 45. 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. PMID: 16567755
 46. 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. PMID: 17297243
 47. Yarish M. The Benefits of IV Vitamin C in Cancer Treatment. 2011. Available at :<http://www.thelakesideclinic.com>. Accessed .
 48. Simone II CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Alternative Therapies* 2007; 13(2): 40-47.
 49. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143-183. PMID: 17029566
 50. Pepe S, Marasco SF, Haas SJ, Sheeran FL, Krum H, Rosenfeldt FL. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion*. 2007; 7(Suppl): S154-167. Epub 2007 Mar 16. PMID: 17485243
 51. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabae 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. PMID: 16105639