ORIGINAL ARTICLE

Comparing the Effect of Acute and Chronic Cyclophosphamide Administration on Cognitive and Avoidance Memories and Histopathology of the Hippocampus in Mice

Ashraf Eskandari[1],
Mahnaz Kesmati[2],
Annahita Rezaie[3]

[1] MSc in Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received February 17, 2019 ; Accepted August 12, 2019)

Abstract

Background and purpose: The quality of life in patients with cancer is affected by cognitive changes after chemotherapy. There are different reports about the effect of cyclophosphamide as a chemotherapy agent on cognitive function. So, the present study aimed to investigate the effects of acute and chronic injections of cyclophosphamide on passive avoidance and novel object recognition memory in an animal model.

Materials and methods: In this experimental study, 56 male mice (weighing 30±5g) were investigated in 8 groups, including a control group (saline) and a group that received cyclophosphamide with acute injection (single dose) and two similar groups with chronic injection (4 injections per week for 4 weeks) for passive avoidance test. In the next four groups the novel object recognition test was performed. Cyclophosphamide was injected at 50 mg/kg intraperitoneally and before training. In order to investigate the histopathology of the hippocampal tissue, the brains of the mice were removed after the tests. Data were analyzed applying independent t-test in SPSS.

Results: Acute cyclophosphamide administration had no significant effect on the two types of memory, but in chronic injections, it decreased the passive avoidance memory ($P<0.05$), while it did not affect cognitive memory. Ischemic changes were observed in neurons CA1 to CA3 (Cornu Ammonis areas) and DG (Dentate Gyrus) hippocampal in chronic cyclophosphamide administration.

Conclusion: Cyclophosphamide was not found to affect all aspects of memory, and the avoidance memory impairment due to its chronic administration seems to be due to neurological damage to the hippocampus.

Keywords: cyclophosphamide, passive avoidance memory, new object recognition, hippocampus

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(177): 1-12 (Persian).

*** Corresponding Author: Ashraf Eskandari -** Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
(E-mail: m.kesmati@scu.ac.ir)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره ۱۷۷ مهر سال ۱۳۹۸ (۱۲-۱)

مقایسه اثر تجویز حاد و مزمن سیکلوفسفامید بر حافظه و هیستوپاتولوژی هیپوکامپ در موش سوری

اشرف اسکندری[۱]
مهناز کسمتی[۲]
آناهیتا رضایی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان تحت تأثیر تغییرات عملکرد شناختی پس از شیمی درمانی قرار دارد. با توجه به نتایج متفاوت ارائه شده‌ی اثر سیکلوفسفامید به عنوان یکی از عوامل شیمی درمانی بر عملکرد شناختی، مطالعه حاضر با هدف بررسی دقیق تر اثرات سیکلوفسفامید در تزریق حاد و مزمن بر حافظه اجتنابی غیرفعال و تشخیص شیء جدید در مدل حیوانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۵۶ سر موش سوری نر بالغ (۵±۳۰ گرم) در ۸ گروه استفاده شد. ۲ گروه شامل کنترل (سالین) و سیکلوفسفامید با تزریق حاد (تک دوز)، ۲ گروه مشابه با تزریق مزمن (به مدت یک ماه هر هفته یک تزریق) جهت آزمون اجتنابی غیرفعال، به همین ترتیب ۴ گروه بعدی جهت آزمون تشخیص شیء جدید در نظر گرفته شد. سیکلوفسفامید ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و قبل از آموزش تزریق شد. جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژی بافت هیپوکامپ، مغز موش‌ها پس از انجام آزمون‌ها خارج شد. داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین مستقل (t test) تحت نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند.

یافته‌ها: تجویز حاد سیکلوفسفامید اثر قابل توجهی بر دو نوع حافظه نداشت، اما در تزریق مزمن به صورت وابسته به مدت، باعث کاهش حافظه اجتنابی غیرفعال شد ($P<۰/۰۵$)، در حالی که بر حافظه تشخیص شی جدید اثری اعمال ننمود. تغییرات ایسکمیک در نورون‌های مناطق CA1 تا CA3 (Cornu Ammonis areas) و DG (Dentate Gyrus) هیپوکامپ در تجویز مزمن سیکلوفسفامید مشاهده گردید.

استنتاج: سیکلوفسفامید تمامی جنبه‌های حافظه را تحت تاثیر قرار نداده و به نظر می‌رسد نقص حافظه اجتنابی ناشی از تجویز مزمن به دلیل آسیب‌های نورونی موجود در هیپوکمپ باشد.

واژه های کلیدی: سیکلوفسفامید، حافظه اجتنابی غیرفعال، حافظه تشخیص شیء جدید، هیپوکامپ

مقدمه

برخی از بازماندگان سرطان، اختلال شناختی را تجربه می‌کنند. بسیاری از شواهد ارتباط این اختلال را با شیمی درمانی نشان می‌دهند، اگرچه سایر عوامل مرتبط با تشخیص و درمان سرطان هم ممکن است به این اختلال کمک کند(۱). نقص در عملکرد شناختی ناشی از شیمی‌درمانی ممکن است از اختلالات خفیف تا عمیق

مولف مسئول: مهناز کسمتی– اهواز: دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم E-mail:m.kesmati@scu.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۱۱/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۱۱/۲۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۸/۵/۲۰

عصبی رخ دهد. تغییرات خفیف تا متوسط معمولاً به عنوان شیمی- مغز (Chemo brain) یا اختلال ناشی از شیمی درمانی (CICI)[1] نامیده می‌شود، که در طیف وسیعی از فرایندها مانند یادگیری، حافظه، توجه، سرعت پردازش اطلاعات، عملکرد اجرایی و مهارت حرکتی رخ می‌دهد(۵-۲). اختلال شناختی اغلب به صورت موقت رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد که تعدادی از این اختلالات برای سال‌ها ادامه داشته باشند و این‌ها می‌توانند برکیفیت زندگی بازماندگان وسلامت عملکردشان تأثیر منفی بگذارند(۷،۶). با این حال برخی مطالعات نشان دادند عملکرد شناختی بعد از شیمی درمانی تغییر نمی‌کند(۸). ماهیت، درجه و مدت اختلال شناختی متأثر از تعدادی عوامل مثل نوع سرطان و درمان، سن، جنس، بهداشت و وضعیت هورمونی بیمار، وجود افسردگی، اضطراب و چاقی است(۳). امروزه مطالعات بالینی زیادی پیرامون اثرات حاد داروهای شیمی درمانی بر عملکرد هیپوکامپ[2]، حافظه و یادگیری در حال انجام است. همچنین گزارش شده که شیمی درمانی در کوتاه مدت نه تنها باعث آسیب حاد به سلول‌های مولد نورون می‌شود(۹)، بلکه می‌تواند سبب ایجاد آسیب در میلین نورون‌ها گردد(۱۰). سیکلوفسفامید[3] یک عامل ضد نئوپلاستی[4] است(۱۳-۱۱) که همراه با سایر داروها به عنوان یک یاری‌کننده اصلی شیمی درمانی(۱۴) و به عنوان یک سرکوب‌کننده ایمنی در پیوند عضو، در پیوند مغز استخوان و در درمان بیماری‌های التهابی از جمله لوپوس اریتماتوز سیستماتیک به کار می‌رود(۱۶،۱۵،۱۳). سیکلوفسفامید باعث استرس اکسیداتیو می‌شود(۱۸،۱۷،۴). مغز و سیستم عصبی به خصوص به علت ظرفیت محدود آنتی‌اکسیدانی به استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر هستند(۱۸).

شواهد حاکی از آن است که سیکلوفسفامید ممکن است یک اثر حاد در تکثیر سلولی در منطقه زیرگرانولی DG[5] هیپوکامپ بزرگسال داشته باشد که در طول این مدت منجر به نقص شناختی می‌شود(۹). اگرچه وجود اختلالات ناشی از سیکلوفسفامید به طورکلی پذیرفته شده است(۱۹،۱۴،۹)، بسیاری از جزئیات این مفهوم هنوز بحث برانگیز یا مبهم هستند. نرخ‌های گزارش شده از اختلالات شناختی در مطالعات صورت گرفته متفاوت است. داده‌های مربوط به نواحی شناختی درگیر و طول اختلال شناختی با یکدیگر منطبق نیست(۱۳). برخی مطالعات حفظ یادگیری(۲۰،۳) و بعضی دیگر اختلال شناختی(۲۱،۱۴) را پس از شیمی درمانی با سیکلوفسفامید (به تنهایی یا ترکیبی) گزارش کردند. از آن‌جایی‌که مطالعات حیوانی یک راهکار برای ارزیابی اثرات مربوط به عوامل ضد سرطانی به تنهایی و مستقل از تأثیر روان‌شناختی سرطان و نقش بالقوه خود سرطان فراهم می‌کند و با توجه به افزایش نگرانی در مورد اختلال‌شناختی ناشی از کاربرد داروهای شیمی درمانی از جمله سیکلوفسفامید، بررسی دقیق تر اختلال شناختی ناشی از تجویز حاد و مزمن این دارو و اثر بافتی آن بر مرکز حافظه یعنی هیپوکامپ در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش سوری نر بالغ نژاد NMARI با وزن متوسط ۵±۳۰ گرم از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد و در شرایط مناسب (درجه حرارت کنترل شده ۲±۲۳ درجه سانتی گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی همراه با تهویه مناسب و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری شدند. پس از یک هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، حیوانات پس از توزین به طور تصادفی به ۸ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. دو گروه شامل کنترل و سیکلوفسفامید با تزریق حاد و دو گروه مشابه با تزریق مزمن (به مدت یک ماه هر هفته یک تزریق) جهت آزمون اجتنابی غیر فعال و به

1. Chemotherapy-induced cognitive impairment
2. Hippocampus
3. Cyclophosphamide
4. Anti-neoplastic
5. Dentate Gyrus

همین ترتیب ۴ گروه بعدی جهت آزمون تشخیص شیء جدید در نظر گرفته شد. در تزریق مزمن، آزمون رفتاری یک هفته بعد از آخرین تزریق انجام شد. آزمایش‌های حافظه در دوره‌ی روشنایی و در محدوده‌ی ساعت ۱۴-۸ انجام گردید. کلیه آزمایشات بر روی حیوانات با توجه به مقررات و اخلاق پژوهشی و تحت مجوز با کد EE/97.24.3.17723/scu.ac.ir انجام شد.

آماده سازی دارو

دوز مصرفی سیکلوفسفامید ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم محلول در نرمال سالین در نظر گرفته شد. این دوز بر مبنای تحقیقات قبلی انتخاب گردید(۲،۲۱،۲۲). در گروه‌های کنترل، سرم فیزیولوژی تزریقی با دوز ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به روش مشابه تزریق شد. تزریقات در شکل حاد به صورت تک دوز و در شکل مزمن، چهار تزریق هفته‌ای یک بار به صورت درون صفاقی قبل از آموزش انجام شد.

روش ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال

ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال با استفاده از دستگاه استپ داون که جعبه‌ای از جنس پلاکسی‌گلاس و به ابعاد ۵۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر بود، انجام گرفت. کف دستگاه از میله‌های فلزی فولادی به قطر ۰/۳ سانتی‌متر با فاصله ۱ سانتی‌متر از هم ساخته شده بود و در مرکز، سکوی چوبی به ابعاد ۴×۴×۴ سانتی‌متر قرار داشت. در مرحله آموزش حیوان به آرامی بر روی سکوی کف جعبه قرار داده می‌شد و تأخیر در پایین رفتن با چهار دست و پا روی میله‌های فلزی کف جعبه برای هر حیوان با زمان سنج ثبت می‌گردید. حیوانی که بیش از ۲۰ ثانیه از پایین آمدن خودداری می‌کرد از ادامه آزمایش حذف می‌شد. بلافاصله بعد از پایین رفتن حیوان از سکو، یک شوک الکتریکی با مشخصات ۵۰ ولت و فرکانس ۱ هرتز به مدت ۱۵ ثانیه به میله‌های کف جعبه وارد می‌شد که سبب انتقال شوک به دست و پای حیوان می‌گردید. سنجش حافظه کوتاه مدت، ۹۰ دقیقه بعد از آموزش صورت می‌گرفت. در این مرحله حیوانی که ۶۰ ثانیه کامل را روی سکو می‌گذراند، از دستگاه خارج می‌شد و شوکی به آن وارد نمی‌شد که نشان دهنده این بود که یادگیری اجتنابی صورت گرفته است. حیواناتی که کم‌تر از ۶۰ ثانیه روی سکو مانده بودند به منزله عدم یادگیری در آموزش بود و شوک مجدد به آن‌ها وارد می‌شد. مرحله آزمون برای سنجش حافظه طولانی مدت، ۲۴ ساعت بعد از آموزش انجام گرفت و از نظر روش کاملا مشابه روز آموزش بود. به استثنای این که در این مرحله از شوک الکتریکی استفاده نشد. مبنای محاسبات، زمان توقف موش بر روی سکو در نظر گرفته شد. سقف زمانی برای توقف موش بر روی سکو حداکثر ۳۰۰ ثانیه بود(۲۳،۲۴).

روش تشخیص شی جدید

این آزمون با بهره‌گیری از تمایل ذاتی جوندگان به جستجوی بیش‌تر شی جدید نسبت به شی قدیمی که قبلا طی دوره‌ای با آن آشنا شده‌اند، انجام گرفت و جهت بررسی تغییرات حافظه شناختی، تحت تأثیر درمان‌های مختلف دارویی و آسیب‌های مغزی استفاده شد(۲۵). وسیله مورد نیاز این آزمون، اطاقک روبازی بود که برای مشاهده بهتر رفتار موش یک دیوار آن شفاف در نظر گرفته شد. این اطاقک از جنس پلاکسی‌گلاس با ابعاد ۵۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر بود. یک دوربین در بالای اطاقک و ضبط‌کننده ویدیوئی برای نظارت و ثبت رفتار حیوان مورد استفاده قرار گرفت. اشیاء مورد استفاده از جنس پلاستیک و مقاوم نسبت به تخریب بودند. نکته مهم این بود که شیء توسط حیوان قابل حمل نباشد. این روش در طی سه مرحله‌ی خوگیری، آموزش و آزمون در محیطی آرام با مقدار نور ثابت انجام گردید. در مرحله خوگیری هر موش برای اولین بار در اطاقک خالی و بدون شیء در فضای عملیاتی قرار می‌گرفت و به او اجازه داده می‌شد به مدت ۱۰

دقیقه آزادانه محوطه درون اطاقک را بررسی کند. در مرحله آموزش که ۲۴ ساعت بعد از مرحله اول صورت گرفت، دو شیء کاملاً یکسان (مکعب) در اطاقک به فاصله ۵ سانتی‌متر از دیوار قرار داده و به موش فرصت داده می‌شد تا به مدت ۵ دقیقه به بررسی اشیاء بپردازد. در روز آزمون یعنی ۲۴ ساعت بعد از آشنایی با دو شیء یکسان، یکی از اشیاء توسط شیء جدید(استوانه) جایگزین می‌گردید. اشیا در مکان های مشابه قرار گرفتند، سپس هر موش به مدت ۵ دقیقه در اطاقک قرار می‌گرفت و هر شی ء را جستجو می کرد. رفتار کاوشگرانه به عنوان هدایت بینی به جسم در فاصله ۲ سانتی‌متری یا لمس آن با بینی یا پیشانی تعریف شد. هر جلسه در ویدئو ضبط و متعاقباً مدت زمان اکتشاف برای شی ء قدیم و جدید به صورت دستی با کرونومترثبت شد. در بین آزمایش برای جلوگیری از ایجاد نشانه‌های بویایی اشیاء با الکل تمیز شدند(۲۷،۲۶). مبنای محاسبات بر اساس نسبت زمان جستجوی شیء جدید به کل زمان جستجوی هر دو شیء برحسب درصد در نظرگرفته شد(۲۶).

آزمون فعالیت حرکتی

جهت اطمینان از عدم تأثیر دارو بر فعالیت حرکتی حیوان، ۲۴ ساعت بعد از تزریق دارو و بلافاصله بعد از آزمون حافظه از دستگاه میدان باز استفاده گردید. این دستگاه اطاقکی ازجنس پلکسی‌گلس با ابعاد ۵۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر بود که بر روی یک صفحه قرار داشت. این صفحه با ۴ خط متقاطع به ۹ قسمت تقسیم شده بود. در این روش هر گاه سر و اندام جلویی حیوان از یکی از این خطوط عبور می‌کرد، یک شماره برای حیوان در نظر گرفته می‌شد. تعداد عبور از خطوط در مدت ۳۰۰ ثانیه به عنوان فعالیت حرکتی مبنای محاسبات در نظر گرفته شد(۲۹،۲۸،۲۳).

آماده سازی بافت مغز جهت بررسی هیستوپاتولوژی هیپوکامپ

بعد از آزمون‌های رفتاری، به منظور بررسی و تأیید اثر احتمالی داروهای تزریقی بر بافت هیپوکامپ، حیوان با اتر بیهوش و آسان‌کشی شده و سر حیوان قطع گردید. متعاقباً مغز خارج و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد(۱۲) با حجم ۲۰ برابر نمونه قرار داده شد. به منظور تکمیل فرایند پایدارسازی محلول فرمالین بعد از ۲۴ ساعت تعویض گردید. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف سازی، آغشته‌گیری انجام و از نمونه‌ها بلوک تهیه گردید. از بلوک‌ها با استفاده از میکروتوم مقاطعی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه شد. مقاطع به روش استاندارد هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت لام‌های تهیه شده مورد مطالعه کیفی میکروسکوپی قرار گرفتند. به منظور بررسی کمی، تعداد نورون‌های آسیب دیده در قسمت شکنج دندانه‌ای هر دو نمیکره مغز با لنز ۴۰ مورد شمارش دستی قرار گرفت، عکس برداری و ویرایش تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Quickphoto Micro 2.3 انجام گرفت و نتایج مشاهدات ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

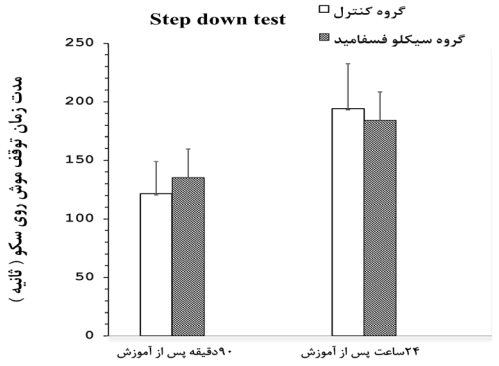
ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف مورد تأیید قرارگرفت و سپس از آزمون‌های مقایسه میانگین مستقل (t test) برای تجزیه وتحلیل داده‌ها تحت نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. داده‌های میانگین در نرم‌افزار excel نسخه ۲۰۱۶ رسم گردید.

یافته ها

اثر تزریق حاد سیکلوفسفامید بر حافظه اجتنابی غیر فعال در دوره کوتاه مدت و بلندمدت

تصویر شماره ۱، اثر تزریق حاد سیکلوفسفامید (۵۰mg/Kg) پیش از آموزش را نشان می‌دهد. تحلیل داده‌ها نشان داد تفاوت معنی‌داری در مدت زمان توقف موش سوری بر سکو بین گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید با گروه کنترل وجود ندارد ($P\geq۰/۰۵$). به عبارتی تزریق دارو تأثیری بر حافظه اجتنابی غیرفعال در

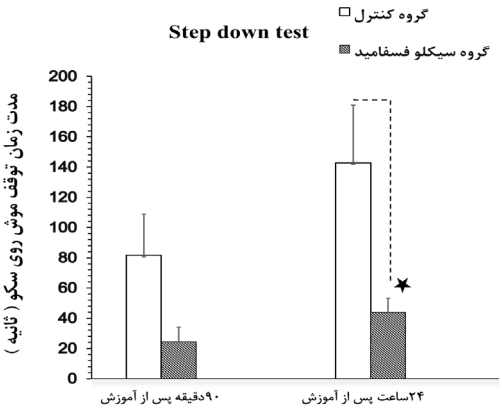
دوره کوتاه مدت (۹۰ دقیق پس از آموزش) و بلند مدت (۲۴ ساعت پس از آموزش) نداشته است.



تصویر شماره ۱: اثر تزریق مزمن سیکلوفسفامید بر مدت زمان توقف موش سوری در دستگاه step-down جهت تست حافظه اجتنابی غیرفعال، هر ستون بیانگر Mean±SEM مربوط به هفت موش سوری است. در دوره کوتاه مدت تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و گروه‌کنترل سالین وجود ندارد (P≥ ۰/۰۵). در دوره بلند مدت تفاوت معنی دار قابل مشاهده است (P < ۰/۰۵).

اثر تزریق مزمن سیکلوفسفامید بر حافظه اجتنابی غیرفعال در دوره کوتاه مدت و بلندمدت

تصویر شماره ۲، اثر تزریق مزمن سیکلوفسفامید (۵۰mg/Kg) پیش از آموزش را نشان می‌دهد.

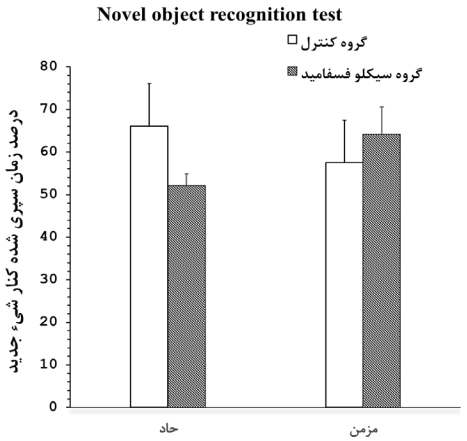


تصویر شماره ۲: اثر تزریق مزمن سیکلوفسفامید بر مدت زمان توقف موش سوری در دستگاه step-down جهت تست حافظه اجتنابی غیرفعال، هر ستون بیانگر Mean±SEM مربوط به هفت موش سوری است. در دوره کوتاه مدت تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و گروه‌کنترل سالین وجود ندارد (P≥ ۰/۰۵). در دوره بلند مدت تفاوت معنی دار قابل مشاهده است (P < ۰/۰۵).

در دوره کوتاه مدت اگرچه میان گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داده نشد (P≥۰/۰۵)، اما اثر سیکلوفسفامید بر کاهش شاخص حافظه کوتاه مدت نسبت به گروه کنترل قابل مشاهده می‌باشد. در دوره بلندمدت بین گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P <۰/۰۵). به طوری‌که سیکلوفسفامید باعث کاهش مدت زمان توقف موش بر سکو می‌شود. نتیجه آنکه سیکلوفسفامید سبب کاهش حافظه در دوره بلند مدت شده است.

اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید بر حافظه تشخیص شیء جدید

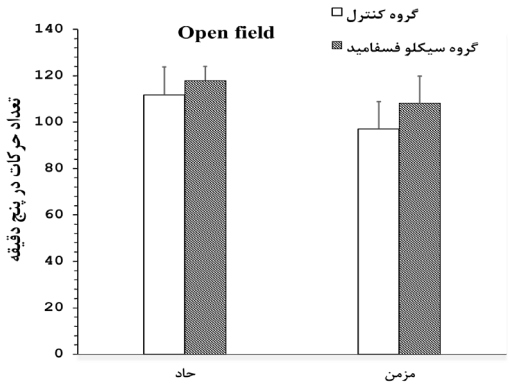
تصویر شماره ۳، اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید (۵۰mg/Kg) پیش از آموزش را نشان می‌دهد. محور عمودی میانگین درصد زمان سپری شده هر گروه موش سوری در کنار شیء جدید می باشد. ۲۴ ساعت پس از آموزش در هر دو حالت (تزریق حاد و مزمن) میان گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P≥ ۰/۰۵).



تصویر شماره ۳: اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید بر مدت زمان سپری شدن کنار شیء جدید توسط موش سوری ۲۴ ساعت پس از آموزش (درتست تشخیص شیء جدید)، هر ستون بیانگر Mean±SEM مربوط به هفت موش سوری است. در هر دو حالت تفاوت معنی داری بین گروه های دریافت کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل سالین وجود ندارد (p ≥ ۰/۰۵).

اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید بر فعالیت حرکتی

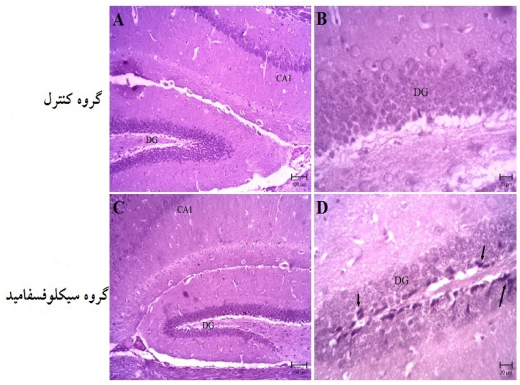
تصویر شماره ۴، اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید (۵۰mg/Kg) پیش از آموزش را نشان می‌دهد. تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد میان گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل در هر دو حالت تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P≥۰/۰۵). بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که اختلال حافظه حاصل از داروی فوق بدون هر گونه تأثیر بر فعالیت حرکتی صورت گرفته است.



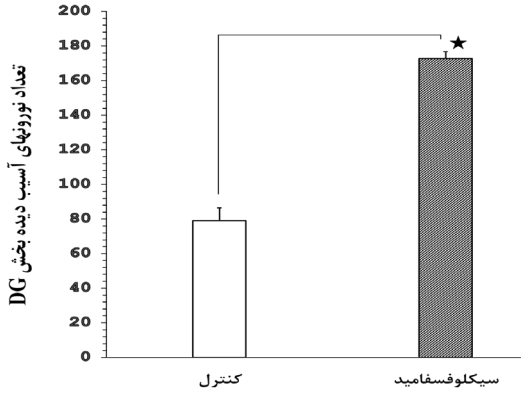
تصویر شماره ۴: اثر تزریق حاد و مزمن سیکلوفسفامید بر فعالیت حرکتی توسط موش سوری. هر ستون بیانگر Mean±SEM مربوط به هفت موش سوری است. تفاوت معنی داری بین گروه های دریافت کننده مواد و گروه کنترل سالین وجود ندارد (p ≥۰/۰۵).

بررسی هیستوپاتولوژی اثر سیکلوفسفامید بر هیپوکامپ

تصویر شماره ۵، نمونه‌هایی از تصاویر میکروسکوپی مقاطع تهیه شده از مغز موش‌های گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و گروه کنترل در تزریق مزمن را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است چون در تزریق حاد تغییر قابل ملاحظه‌ای در شاخص‌های رفتاری مربوط به حافظه مشاهده نشد، ارزیابی بافتی نیز صورت نگرفت. در بررسی‌های میکروسکوپی، مربوط به گروه سیکلوفسفامید مزمن، تغییرات ایسکمیک سلولی دیده شد. برخی از نورون‌های قسمت‌های مختلف هیپوکامپ از قبیل CA1، CA2، CA3 (Cornu Ammonis) و DG آسیب مذکور را نشان دادند. این سلول‌ها کوچک‌تر از سلول‌های مجاور خود بودند، همچنین سیتوپلاسم و هسته آن‌ها پررنگ‌تر شده بود. پس از شمارش سلول‌های نورون آسیب دیده در بخش DG هیپوکامپ معلوم گردید که گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید در تجویز مزمن تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل دارد. این امر در تصویر شماره ۶ نمایش داده شده است.



تصویر شماره ۵: مقاطع هیپوکامپ مغز موش سوری (رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین). به افزایش تعداد نورون های آسیب دیده (پیکان) در منطقه شکنج دندانه ای، در گروه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل توجه شود (تصاویر A و C اسکال بار= ۱۰۰µm – تصاویر B و D اسکال بار= ۲۰µm).
DG: Dentate gyrus , CA1 : Cornu Ammonis



تصویر شماره ۶: اثر تزریق مزمن سیکلوفسفامید بر نورون های بخش DG هیپوکامپ موش سوری. هر ستون بیانگر Mean±SEM تعداد نورون‌های آسیب دیده بخش DG هیپوکامپ است. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده مواد و گروه کنترل وجوددارد (P < ۰/۰۵).

بحث

یافته‌های ما در تزریق تک دوز سیکلوفسفامید هیچ اختلالی در حافظه نشان نداد و در تزریق مزمن به

صورت وابسته به مدت باعث کاهش حافظه اجتنابی غیر فعال شد، درحالی‌که برحافظه تشخیص شی جدید اثری اعمال ننمود. مغایر با یافته‌های ما، Reiriz و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند تزریق تک دوز باعث اختلال حافظه در ۲۴ ساعت بعد از آموزش می‌شود، اما زمانی که یک هفته قبل از آزمون تجویز صورت می‌گیرد، بر حافظه تأثیری ندارد(۱۹).

Yang و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تزریق تک‌دوز سیکلوفسفامید از طریق مهار موقت نورون‌زایی باعث اختلال یادگیری و حافظه، ۱۲ ساعت بعد از تزریق شده است و ۲ تا ۱۰ روز بعد از درمان هیچ اختلالی در حافظه مشاهده نکردند. به عبارتی تک‌دوز سیکلوفسفامید با مهار موقت نورون‌زایی هیپوکامپ، باعث ایجاد اختلال گذرا گردیده است(۱۳). مطالعات رفتاری حیوانات نشان داده که نقص شناختی بعد از شیمی درمانی رخ می‌دهد(۵،۴،۲)، اما همه مطالعات حتی زمانی که کارشان مشابه بقیه بود این اختلالات را مشاهده نکردند(۲۱،۳). شواهد به دست آمده از مطالعات رفتاری و ساختاری عصبی جوندگان نشان می‌دهد که شیمی درمانی با اختلال در نورون‌زایی(۲،۲۰،۲۱،۳۰) و آسیب به میلین منجر به اختلال شناختی می‌شود(۱۰). بنابراین انواع آسیب در CNS، پس از شیمی درمانی شروع به تظاهر می‌کند. با این حال این‌که چرا فقط برخی از بیماران، دچار اختلال شناختی طولانی مدت می‌شوند هنوز مشخص نیست. تعدادی از عوامل ژنتیکی پیشنهاد شده است(۳۱،۳).

به نظر می رسد بررسی اختلالات شناختی ناشی از شیمی درمانی نیاز به زمان دارد. این که کاهش موقت نورون زایی بتواند روی شناخت تأثیر بگذارد نیاز به بررسی بیش‌تر دارد(۳). نتایج تست‌های رفتاری ما در تزریق مزمن نشان داد که سیکلوفسفامید باعث القای اختلال عملکرد شناختی وابسته به هیپوکامپ می‌شود. جالب توجه این‌که حافظهٔ تشخیص شی جدید، در مطالعهٔ ما دچار اختلال نشد که نشان می‌دهد همهٔ روش‌های شناختی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند. در حالی که حافظهٔ اجتنابی غیرفعال وابسته به هیپوکامپ می‌باشد(۱۱)، حافظه تشخیص شیء جدید وابسته به قشر پیشانی است که باعث می‌شود عملکرد آن دست نخورده باقی بماند(۲۹، ۳۴-۳۲). این نتایج با مطالعات Salas-Ramirez وهمکاران (۲۰۱۵) هم‌خوانی دارد. در مطالعه صورت گرفته توسط آنان، ترکیب سیکلوفسفامید و دکسوربیسین باعث اختلال حافظهٔ فضایی و کاری گردید. در صورتی که روی حافظهٔ تشخیص شئ جدید تأثیر نگذاشت(۲۹).

اختلال شناختی ناشی از شیمی‌درمانی محدود به مدت زمان قرارگیری در معرض مواد شیمی‌درمانی نیست بلکه ممکن است پس از درمان هم ادامه یابد(۵). Fardell و همکاران (۲۰۱۰) اختلال در تشخیص شیء جدید را در ۱۱، ۹۵ و ۲۲۵ روز بعد و همچنین اختلال در حافظهٔ فضایی (آزمون ماز آبی) را ۴ ماه پس از درمان با متوترکسات (دارای عملکرد مشابه سیکلو فسفامید) گزارش کردند(۳۵). Mondie و همکاران (۲۰۱۰) دریافتندکه تشخیص شیء جدید ۸ و ۱۲ هفته بعد از درمان با تیوتپا دچار آسیب شد ولی ۲، ۴، ۲۰ یا ۳۰ هفته بعد از تزریق، این آسیب مشاهده نشد(۳۶). این امر نشان می‌دهد که میزان نقص به محدودهٔ زمانی مورد بررسی بستگی دارد زیرا نقص ممکن است روزها تا هفته‌ها پس از قرارگیری در معرض عوامل شیمی‌درمانی ظاهر شود(۵). بنابراین، اگر چه در محدوده زمانی در نظر گرفته شده در تجویز مزمن اختلالی در حافظه تشخیص شی جدید دیده نشد، این موضوع نمی‌تواند دلیلی بر رد آسیب به این حافظه طی زمان‌هایی غیر از محدوده زمانی مطالعه ما باشد. بنابراین ما نمی‌توانیم احتمال این‌که موش‌ها در یک نقطه زمانی آسیب را در تشخیص شی جدید نشان دهند را رد کنیم. از طرفی نبودن یک اختلال پایدار بعد از شیمی‌درمانی قابل تعمیم به همهٔ درمان‌ها و آزمایش‌ها نیست(۲۰).

در تأیید نتایج آزمون‌های رفتاری ما در تزریق مزمن، بررسی میکروسکوپی هیپوکامپ نشان داد که برخی نورون‌های مناطق CA3، CA2، CA1 و DG

دچار آسیب شدند. این سلول‌ها کوچک‌تر از سلول‌های مجاور خود بودند. این نتایج با مطالعات نیاکانی و همکاران (۱۳۹۱) هم خوانی دارد(۱۲). سیکلوفسفامید باعث استرس شدید اکسیداتیو در CNS[1] می‌شود(۱۸،۱۷،۴). تولید گونه‌های اکسیژن فعال سلولی ROS[2] به طور معمول با آسیب پروتئین و DNA سمیت و مرگ عصبی همراه است(۴). از طرفی اثرات سمی ناشی از متابولیت‌های سیکلوفسفامید مقاومت سلولی به استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد که می‌تواند به سد خونی مغزی آسیب برساند، در نتیجه اجازهٔ ورود احتمالی مولکول‌های نوروتوکسیک مانند سیتوکین‌ها را به مغز می‌دهد(۱۳). هم‌چنین سیکلوفسفامید باعث کاهش میزان گلوتاتیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد(۱۸،۴). کاهش سطح گلوتاتیون در مغز موش‌هایی که با سیکلو فسفامید درمان شده‌اند، گزارش شده است(۳۷،۱۸).

Wu وهمکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که اختلال شناختی ناشی از تزریق ۵۰ mg/kg سیکلوفسفامید یکبار در هفته طی ۴ هفته با هر دو سرکوب نورون‌زایی سلول‌های بالغ و توسعهٔ غیرطبیعی دندریت‌های سلول‌های گرانول تازه متولد شده هیپوکامپ مرتبط است(۲۲). مطالعات نشان داده که سیکلوفسفامید و دوکسوربیسین ممکن است از طریق کاهش سطح BDNF[3] محیطی (نه BDNF هیپوکامپ) و کاهش D_1 سیکلین (Cyclin D1) باعث اختلال نورون‌زایی و اختلال شناختی شود(۲۱). این مطالعات همگی از این فرضیه که داروهای شیمی‌درمانی باعث کاهش شناختی می‌شوند، حمایت می‌کنند. تحقیق حاضر نیز مطالعات فوق مبنی بر ایجاد اختلال شناختی ناشی از شیمی‌درمانی را تأیید می نماید.

علی‌رغم مطالعات فوق، سایرین نشان دادند که موش‌های ماده مدتی بعد از شیمی‌درمانی فاقد اختلال در عملکرد شناختی بودند(۳۸). از طرفی، یادگیری و حافظه که از طریق هیپوکامپ کنترل می‌شوند، می‌توانند نسبت به شیمی‌درمانی مقاوم باشند(۲۰). یک مطالعهٔ دیگر با استفاده از موش‌های مادهٔ C57CL/6J نشان داد که این موش‌ها همانند برخی از انسان‌ها ممکن است به برخی از جنبه‌های اختلال شناختی ناشی از شیمی‌درمانی مقاوم باشند(۳). نوع شیمی‌درمانی، روش مصرف (دوز مصرفی- تعداد دفعات مصرف)، آزمون‌های مختلف رفتاری مورد استفاده و محدوده زمان بررسی ممکن است باعث این اختلافات شود(۱۳،۳). به هر حال صرف‌نظر از وجود یا عدم وجود نقص در خود حافظه، سرعت پردازش، توجه و تمرکز نیز می‌توانند به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر شیمی‌درمانی قرار گیرند(۲۰،۵،۳). با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات قبلی به نظر می‌رسد تجویز تک دوز سیکلوفسفامید در حیوانات سالم آسیب چندانی در مدت زمان کوتاه به حافظه اجتنابی و تشخیص شیء جدید اعمال ننموده و تجویز مزمن سیکلوفسفامید از طریق ایجاد آسیب به نورون‌های موجود در هیپوکامپ فقط باعث اختلال در حافظه اجتنابی غیر فعال شده و احتمالاً ارزیابی اثر تجویز حاد آن بر حافظه نیاز به زمان بیش‌تری دارد.

سپاسگزاری

این مطا لعه بخشی از پایان نامه مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۱۳۹۷ با عنوان بررسی رفتاری و هیستوپاتولوژیکی تداخل اثر داروی سیکلوفسفامید و نانوذره اکسید منیزیم بر حافظه (کوتاه مدت و بلند مدت) و هیپوکامپ در موش سوری نر بالغ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به سبب کمک‌های مالی برای انجام این پروژه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

1. Central nervous system
2. Reactive oxygen species
3. Brain-derived neurotrophic factor

References

1. Vardy J, Tannock I. Cognitive function after chemotherapy in adults with solid tumours. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 63(3): 183-202.
2. Christie LA, Acharya MM, Parihar VK, Nguyen A, Martirosian V, Limoli CL. Impaired cognitive function and hippocampal neurogenesis following cancer chemotherapy. Clin Cancer Res 2012; 18(7): 1954-1965.
3. Fremouw T, Fessler CL, Ferguson RJ, Burguete Y. Preserved learning and memory in mice following chemotherapy: 5-Fluorouracil and doxorubicin single agent treatment, doxorubicin–cyclophosphamide combination treatment. Behav Brain Res 2012; 226(1): 154-162.
4. Gaman AM, Uzoni A, Popa-Wagner A, Andrei A, Petcu EB. The role of oxidative stress in etiopathogenesis of chemotherapy induced cognitive impairment (CICI)- "Chemobrain". Aging Dis 2016; 7(3): 307-317.
5. Philpot RM, Ficken M, Wecker L. Doxorubicin and cyclophosphamide lead to long-lasting impairment of spatial memory in female, but not male mice. Behav Brain Res 2016; 307: 165-175.
6. Schagen SB, Wefel JS. Chemotherapy-related changes in cognitive functioning. EJC Suppl 2013; 11(2): 225-232.
7. Stanton AL. Psychosocial concerns and interventions for cancer survivors. J Clin Oncol 2006; 24(32): 5132-5137.
8. Hermelink K, Untch M, Lux MP, Kreienberg R, Beck T, Bauerfeind I, Münzel K. Cognitive function during neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: results of a prospective, multicenter, longitudinal study. Cancer 2007; 109(9): 1905-1913.
9. Lyons L, ELBeltagy M, Bennett G, Wigmore P. The effects of cyclophosphamide on hippocampal cell proliferation and spatial working memory in rat. PloS One 2011; 6(6): e21445.
10. Han R, Yang YM, Dietrich J, Luebke A, Mayer-Pröschel M, Noble M. Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. J Biol 2008; 7(4): 12.
11. Jafari-Sabet M. NMDA receptor blockers prevents the facilitatory effects of post-training intra-dorsal hippocampal NMDA and physostigmine on memory retention of passive avoidance learning in rats. Behav Brain Res 2006; 169(1): 120-127.
12. Niakani A, Farokhi F, Tukmechi A. The Effects of Decapeptyl on Morphology and Quantity of Neurons in Hippocampus of Mice Treated with Cyclophosphamide. Journal of Isfahan Medical School 2012; 30(182): 326-334 (Persian).
13. Yang M, Kim JS, Song MS, Kim SH, Kang SS, Bae CS, Kim JC, Wang H, Shin T, Moon C. Cyclophosphamide impairs hippocampus-dependent learning and memory in adult mice: possible involvement of hippocampal neurogenesis in chemotherapy-induced memory deficits. Neurobiol Learn Mem 201093(4): 487-494.
14. Janelsins MC, Heckler CE, Thompson BD, Gross RA, Opanashuk LA, Cory-Slechta DA. A clinically relevant dose of cyclophosphamide chemotherapy impairs memory performance on the delayed spatial alternation task that is sustained over time as mice age. Neurotoxicology 2016; 56: 287-293.
15. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. Scientific World Journal 2002; 2: 1808-1815.
16. Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell

modulation. Cancer Treat Rev 2016; 42: 3-9.
17. Seigers R, Fardell JE. Neurobiological basis of chemotherapy-induced cognitive impairment: a review of rodent research. Neurosci Biobehav Rev 2011; 35(3): 729-741.
18. Zarei M, Shivanandappa T. Neuroprotective effect of Decalepis hamiltonii on cyclophosphamide-induced oxidative stress in the mouse brain. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2016; 27(4): 341-348.
19. Reiriz AB, Reolon GK, Preissler T, Rosado JO, Henriques JA, Roesler R, et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. Clin Cancer Res 2006; 12(16): 5000-5001.
20. Long JM, Lee GD, Kelley-Bell B, Spangler EL, Perez EJ, Longo DL, de Cabo R, Zou S, Rapp PR. Preserved learning and memory following 5-fluorouracil and cyclophosphamide treatment in rats. Pharmacol Biochem Behav 2011; 100(1): 205-211.
21. Kitamura Y, Hattori S, Yoneda S, Watanabe S, Kanemoto E, Sugimoto M, et al. Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation. Behav Brain Res 2015; 292: 184-193.
22. Wu L, Guo D, Liu Q, Gao F, Wang X, Song X, et al. Abnormal development of dendrites in adult-born rat hippocampal granule cells induced by cyclophosphamide. Front Cell Neurosci 2017; 11: 171.
23. Abdolahzadeh Dashty M, Kesmati M, Khaje Por L, Najafzadeh Varzi H. The preventative role of MgO nanoparticles in amnesia induced by morphine in mouse. Iran Vet J 2014; 10(3): 55-64 (Persian).
24. Joshi H, Parle M. Pharmacological evidences for antiamnesic potentials of Phyllanthus amarus in mice. Afr J Biochem Res 2007; 10(2): 165-173.
25. Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. Behav Processes 2010; 83(1): 61-71.
26. Huang TN, Hsueh YP. Novel object recognition for studying memory in mice. Bio-protocol 2014; 4(19): e1249.
27. Huang Y, Huang X, Zhang L, Han F, Pang KL, Li X, Shen JY. Magnesium boosts the memory restorative effect of environmental enrichment in Alzheimer's disease mice. CNS Neurosci Ther 2018; 24(1): 70-79.
28. Nootarki ZS, Kesmati M, Borujeni MP. Effect of magnesium oxide nanoparticles on atropine-induced memory impairment in adult male mice. Avicenna Neuro Psych Physio 2015; 2(4): e36924.
29. Salas-Ramirez KY, Bagnall C, Frias L, Abdali SA, Ahles TA, Hubbard K. Doxorubicin and cyclophosphamide induce cognitive dysfunction and activate the ERK and AKT signaling pathways. Behav Brain Res 2015; 292: 133-141.
30. Seigers R, Schagen SB, Coppens CM, van der Most PJ, van Dam FS, Koolhaas JM, et al. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. Behav Brain Res 2009; 201(2): 279-284.
31. Small BJ, Rawson KS, Walsh E, Jim HS, Hughes TF, Iser L, et al. Catechol-O-methyltransferase genotype modulates cancer treatment-related cognitive deficits in breast cancer survivors. Cancer 2011; 117(7): 1369-1376.
32. Winters BD, Bussey TJ. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval,

and consolidation of object recognition memory. J Neurosci 2005; 25(17): 4243-4251.

33. Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. J Neurosci 2004; 24(26): 5901-5908.
34. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. Neurosci Biobehav Rev 2008; 32(5): 1055-1070.
35. Fardell JE, Vardy J, Logge W, Johnston I. Single high dose treatment with methotrexate causes long-lasting cognitive dysfunction in laboratory rodents. Pharmacol Biochem Behav 2010; 97(2): 333-339.
36. Mondie CM, Vandergrift KA, Wilson CL, Gulinello ME, Weber ET. The chemotherapy agent, thioTEPA, yields long-term impairment of hippocampal cell proliferation and memory deficits but not depression-related behaviors in mice. Behav Brain Res 2010; 209(1): 66-72.
37. Bhatia AL, Manda K, Patni S, Sharma AL. Prophylactic action of linseed (Linum usitatissimum) oil against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mouse brain. J Med Food 2006; 9(2): 261-264.
38. Lee GD, Longo DL, Wang Y, Rifkind JM, Abdul-Raman L, Mamczarz JA, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. Clin Cancer Res 2006; 12(1): 198-205.