

Original Article

Therapeutic Effect of Ascorbic Acid on Reducing the Neuronal Damage Following Irradiation Focusing on Hippocampal CA1 Region of Mice

Jalal Hassanshahi¹, Mohammad Zamani^{2*}

¹Department of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

²Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Hormozgan, Iran

Received: 16 Apr, 2014 Accepted: 12 Jun, 2014

Abstract

Background & Objectives: Irradiation is common treatment in most cancers but the effect of radiation on healthy cells, could be prevented its use in high doses. Ascorbic acid is known as a potent antioxidant. In this study the role of vitamin c to reduce cell death and complications after radiotherapy was tested.

Materials and Methods: In this study, 3 groups of race bulb-c mice (control, irradiation, treatment with ascorbic acid) were chosen. Two groups received 6 Gray of radiation. Medications was given intraperitoneally to them one week prior to radiotherapy and then after a week of radiotherapy, again they were given the drug again for a week and at the end of treatment, y-maze memory test and shuttle box test were done and then the brain of rats was fixed by paraformaldehyde perfusion and removed and was prepared for histological studies.

Results: 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 applied maze and shuttle box tests. Memory tests were indicated to reduction of irradiation effects on short-term memory in treatment group. Nissl staining showed significant decrease in necrotic cells, Evaluation of cell apoptosis, also showed significant decrease in apoptotic cells in treatment group.

Conclusion: Treatment the mice with ascorbic acid caused reduction of cell death and complications after radiotherapy.

Keywords: Mice, Hippocampus, Irradiation, Ascorbic acid, Antioxidant

*Corresponding author:

E-mail: mz123esf@gmail.com

مقاله پژوهشی

تاثیر درمانی ویتامین C در کاهش میزان آسیب نوروئی به دنبال رادیوتراپی با تمرکز بر ناحیه هیپوکامپ موش سوری

جلال حسن شاهی^۱، محمد زمانی^{۲*}^۱گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
^۲گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، هرمزگان، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۲۷ پذیرش: ۹۳/۳/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: رادیوتراپی یکی از درمان‌های رایج در اکثر سرطان‌ها است ولی تاثیر رادیوتراپی بر روی سلول‌های سالم، خود می‌تواند مانع استفاده از آن در دوزهای بالا شود. ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی شناخته شده است. در این بررسی نقش ویتامین C بر کاهش مرگ و میر سلولی و کاهش عوارض متعاقب رادیوتراپی مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳ گروه از موش‌های نژاد bulb-c (سالم، رادیوتراپی و گروه تحت درمان با ویتامین C) انتخاب شد. دو گروه از آنها ۶ گری اشعه دریافت کردند. ویتامین C از یک هفته قبل از رادیوتراپی به صورت تزریق داخل صفاقی، به آنها داده شد و سپس با گذشت یک هفته از رادیوتراپی مجدداً دارو به مدت یک هفته به آنها داده شدند. در انتهای درمان تست‌های حافظه y-maze و شاتل باکس انجام شد، سپس مغز موش‌ها توسط پرفیوژن با پارافرمالدهید، فیکس و خارج شد و برای بررسی‌های بافتی آماده شد.

یافته‌ها: از تست‌های حافظه جهت سنجش حافظه فضایی و اجتنابی استفاده شد. از رنگ‌آمیزی نیسل برای نشان دادن سلول‌های نکروتیک و از کیت تانل برای بررسی آپوپتوز استفاده شد.

نتیجه‌گیری: تست‌های حافظه y-maze و شاتل باکس نشانگر کاهش عوارض رادیوتراپی بر روی حافظه کوتاه مدت در گروه درمان بود. رنگ‌آمیزی نیسل کاهش قابل ملاحظه‌ای را در سلول‌های نکروتیک و بررسی آپوپتوز سلولی و نیز کاهش آپوپتوز نوروئی را در گروه درمان نشان داد. درمان رت‌های در معرض دریافت اشعه با ویتامین C باعث جلوگیری از تراکم نوروئی و کاهش عوارض متعاقب شد.

کلید واژه‌ها: موش، هیپوکامپ، رادیوتراپی، ویتامین C، آنتی اکسیدان

* ایمیل نویسنده رابط: mz123esf@gmail.com

مقدمه

سلول‌ها، با از بین بردن سلول‌های اندوتلیال مویرگ‌ها، باعث هیپوکسی قسمت‌های تحت تابش مغز می‌شود (۸). هیپوکامپ به هیپوکسی بسیار حساس است و هیپوکسی در این قسمت باعث مهار پتانسیل سیناپسی می‌شود. عوامل مختلفی از جمله رادیوتراپی باعث کاهش اکسیژن رسانی به سلول و در نتیجه کاهش ATP می‌شود. در این حالت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر اکسیداتیوها نیز تشکیل می‌شوند که باعث تخریب سلول با شدت بیشتری نسبت به هیپوکسی می‌شود. کاهش این اثرات تخریبی به مداخلات سریع پزشکی برای کاهش نکرور و آپوپتوز بستگی دارد (۸). رادیوتراپی در مغز باعث تخریب نوروئها و نیز آتروفی مغز می‌شود. در حالت عادی، مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدان‌های موجود در بدن، آنها را قادر

هیپوکامپ ساختاری در کف بطن طرفی در لوب تمپورال مغز است (۱). هیپوکامپ و قشرهای مربوط به آن نقش حیاتی در انتقال اطلاعات از حافظه کوتاه مدت به حافظه دائمی ایفا می‌کنند (۲). هیپوکامپ در سازماندهی اطلاعات نقش دارد و با احساسات و خاطرات در ارتباط است (۳). آسیب به هیپوکامپ باعث ایجاد فراموشی بعدی، همچنین ضعف حافظه کوتاه مدت و حافظه فضایی می‌شود (۴و۵). آسیب به هیپوکامپ دو طرف، موجب فراموشی بعدی می‌شود (۶). سرطان یکی از دلایل عمده مرگ و میر در جهان است که هنوز درمان قطعی و قابل قبولی برای آن بدست نیامده است (۷). رادیوتراپی یکی از راه‌های از بین بردن سلول‌های سرطانی در مغز و دیگر سرطان‌ها است و علاوه بر تاثیر بر روی این

ابتدا اسکوربیک اسید از یک هفته قبل از شروع رادیوتراپی، روزانه و به صورت تزریق داخل صفاقی و به مدت یک هفته به موش‌ها (گروه درمان) داده شد (۱۰۰ mg/kg) و سپس موش‌ها (گروه درمان) و رادیوتراپی کنترل) با کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلوزین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند و به دنبال دریافت داروی بیهوشی، رادیوتراپی با ۶ گری به تمام قسمت‌های مختلف مغز تابانده شد. یک هفته بعد از رادیوتراپی (باید التهاب کاهش یابد چون در صورت وجود التهاب، ورود دارو به ناحیه مورد نظر کاهش می‌یابد) مجدداً به مدت یک هفته، اسید اسکوربیک روزانه به گروه درمان به صورت تزریق داخل صفاقی با همان دوز داده شد. سپس با اتمام دوره درمان، تست‌های آزمون حافظه کوتاه مدت (شاتل باکس و y-maze) بعد از دو هفته از رادیوتراپی انجام شد و سپس مغز موش‌ها با پارافمالدئید به روش پرفیوژن فیکس شده و خارج شد و برای مطالعات بافتی آماده شد که شامل رنگ‌آمیزی نیسل و تست تانل بود. دستگاه شاتل باکس (Passive Avoidance - step)، حافظه کوتاه مدت را مورد سنجش قرار می‌دهد. این دستگاه متشکل از یک جعبه با کف مشبک فلزی که به دو محفظه تاریک و روشن و درب کشویی بین آنها و یک دستگاه شوک الکتریکی تقسیم شده است. در این تست با استفاده از دستگاه شوکر و در محفظه تاریک، شوکی به میزان ۰/۳ میلی‌آمپر به موش‌ها داده می‌شود و ۲۴ ساعت بعد، مدت زمان تاخیر موش‌ها برای ورود از منطقه روشن به منطقه تاریک اندازه‌گیری می‌شود. تست y-maze حافظه بر پایه‌ی شناسایی و جستجو بین سه بازوی دستگاه است. سه بازوی متقارن در اطراف مثلث متساوی الاضلاع نصب شده است. در این تست موش‌ها داخل این سه بازو به دنبال محل خروج می‌گردند و ورود به هر بازو توسط ناظر ثبت می‌شود. سپس هر سه حرکت پشت سر هم در صورت تکراری بودن دو بازو 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 قرار گیرد. این نتایج در ۸ دقیقه ثبت شده و با استفاده از فرمول زیر، Percent Alternation محاسبه و آنالیز می‌گردد.

$$\text{Percent Alternation} = PA = \frac{x \times 3}{y - 2} \times 100 \quad (x = \text{number of correct and } y = \text{correct} + \text{wrong number})$$

روش رنگ‌آمیزی نیسل برای رنگ‌آمیزی اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رنگ آمیزی معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود (۱۷-۱۹). با تست تانل کمک کیت تانل هسته نورون‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص می‌شود ولی نورون‌های نکروتیک و سالم رنگ زیادی را جذب نمی‌کنند. در این تست انتهای کروماتین‌های شکسته شده DNA، برای تمایز آپوپتوز و رنگ‌آمیزی این هسته‌ها توسط آنزیم-هایی مشخص شده و با دی‌آمینوبنزیلین (DAB) رنگ می‌شود. کلیه عملیات مربوطه بوسیله نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده اند. تست LSD به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگین‌ها

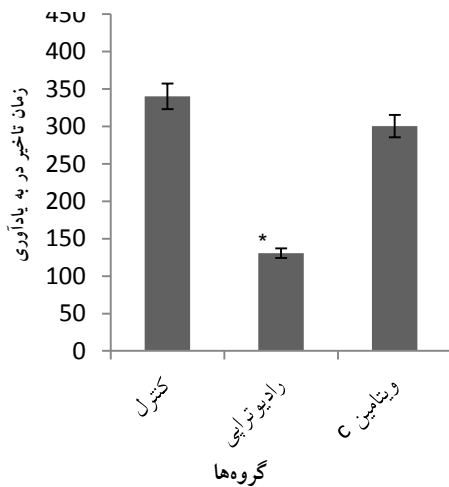
می‌سازد که رادیکال‌های آزادی را که در بدن بوجود می‌آیند خنثی و بی‌ضرر می‌کند (۹). برای جلوگیری از عمل این اتم‌ها، بدن باید دارای یک سد دفاعی از آنتی‌اکسیدان‌ها باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که جلوی عمل رادیکال‌های آزاد را گرفته و مانع از تخریب سلول‌های حیاتی بدن می‌شوند. اگر چه سیستم‌های آنزیمی متعددی برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در بدن وجود دارد، ولی ویتامین‌های E، C و بتاکاروتن و نیز ماده معدنی سلنیم، آنتی‌اکسیدان‌های اصلی موجود در بدن هستند (۱۰). ویتامین C محلول در آب است و در تمامی مایعات بدن وجود دارد. به همین دلیل یکی از خطوط دفاعی بدن است. نیاز روزانه آن ۶۰ میلی‌گرم است و نگهداری طولانی مدت در یخچال، پختن، گرمای هوا، نور و دخانیات باعث از بین رفتن این ویتامین می‌شوند (۱۱). مرکبات بهترین منابع ویتامین C می‌باشند (۱۲). ویتامین C به عقیده برخی کارشناسان احتمال بروز سکنه مغزی در افراد غیرسیگاری را تا ۳۰٪ و در افراد سیگاری تا ۷۰٪ کاهش می‌دهد (۱۳ و ۱۴). 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 نکروز و آپوپتوز سلولی می‌شود. در مطالعات مختلف تأثیرات آنتی‌اکسیدانی این ویتامین در درمان انواع سرطان‌ها بررسی شده بود. علاوه بر آن مطالعات فراوانی، کاربرد رادیوتراپی را در درمان انواع سرطان‌ها مورد مطالعه قرار داده بودند (۱۵ و ۱۶). اما عوارض رادیوتراپی در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز و اثر این ویتامین در این ناحیه از مغز و تأثیرات درمانی آن در کاهش تخریب حافظه کوتاه مدت به دنبال آسیب دیدن این نورون‌ها توسط رادیوتراپی بررسی نشده بود. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و تأثیرات درمانی آن روی کاهش میزان مرگ و میر نورون‌های این ناحیه از مغز به دنبال رادیوتراپی و نهایتاً کاهش عوارض متعاقب آن بوده است.

مواد و روش‌ها

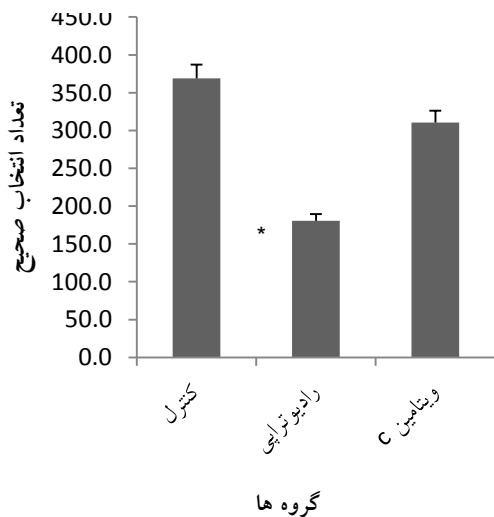
در این تحقیق تعداد ۲۱ موش سوری نر بالغ (با سن ۴ هفته‌ای) نژاد Balb-c با وزن ۳۵-۴۰ گرم از موسسه رازی ایران خریداری شد. موش‌ها در یک اتاق مخصوص در دمای 21 ± 1 C نگهداری می‌شدند (با رطوبت 50 ± 10 درصد) و در یک سیکل ۲۴ ساعته که ۱۲ ساعت در نور و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داشتند. حیوان‌ها به آب لوله کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) دسترسی داشتند. در ضمن، بررسی بر اساس پروتکل-ها 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. در آغاز آزمایش موش‌ها بطور تصادفی به ۳ گروه ۷ تایی زیر تقسیم شدند: ۱. گروه سالم: بدون دریافت اشعه رادیوتراپی و بدون دریافت ویتامین C ۲. گروه رادیوتراپی کنترل: فقط رادیوتراپی شدند. ۳. گروه درمان با ویتامین C.

آپوتوتیک کمتر در مقایسه با گروه رادیوترابی که نشانگر کاهش چشمگیر سلول‌های آپوتوزی در درمان با ویتامین C است. بزرگنمایی در تمام تصاویر ۵۰۰ nm است.

رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (نیسل) وضعیت سلول‌های سالم و نکروتیک را در ناحیه تحت بررسی نشان داد. حیوانات درمان شده با ویتامین C مرگ سلولی کمتر و تراکم سلولی بیشتری در مقایسه با گروه رادیوترابی داشتند. تست تانل که برای شناسایی سلول‌های آپوتوتیک استفاده می‌شود که این تست افزایش این سلول‌ها را در گروه رادیوترابیک و کاهش این سلول‌ها را در گروه تحت درمان نشان داد. در گروه درمان، سلول‌های آپوتوزی کمتر از گروه رادیوترابیک دیده شد، این سلول‌های در حال آپوتوز در گروه سالم دیده نشد.



شکل ۲: مقایسه حافظه کوتاه مدت با تست شاتل باکس. گروه رادیوترابی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری دارد ($P < 0.05$). گروه رادیوترابی با گروه درمان مقایسه شد که تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).



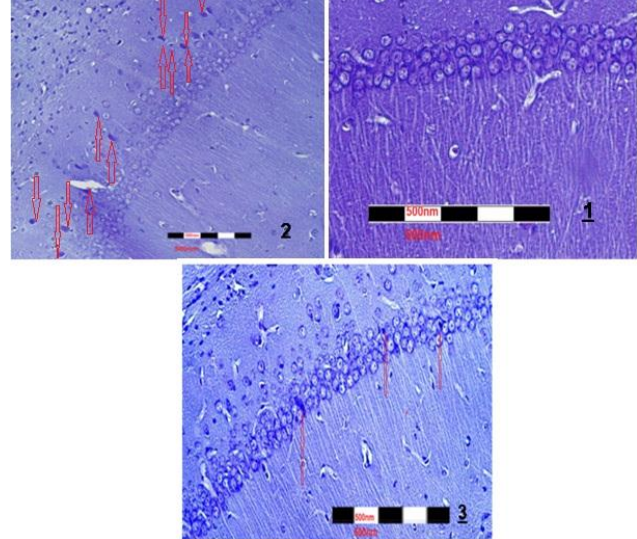
شکل ۳: مقایسه حافظه کوتاه مدت (Y-maze). گروه رادیوترابی با گروه کنترل مقایسه شد، بین دو گروه، تفاوت معنی داری بود ($P < 0.05$) و نیز گروه درمان در مقایسه با گروه رادیوترابی نیز تفاوت معنی داری دارد ($P < 0.05$).

تست رفتاری شاتل باکس نشان داد که رادیوترابی منجر به اختلال زیادی در حافظه کوتاه مدت می‌شود. در گروه تحت

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلافات بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $P < 0.05$ تعیین گردید.

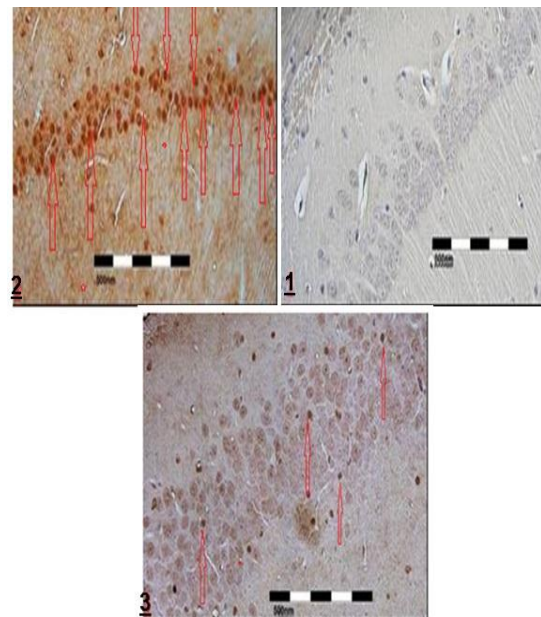
یافته‌ها

در این مطالعه ما از رنگ‌آمیزی نیسل برای شمارش سلول‌های نکروتیک استفاده کردیم و از تست تانل نیز برای شناسایی سلول‌های آپوتوتیک در منطقه CA1 هیپوکامپ استفاده شد. تصاویری که در زیر نشان داده شده نتیجه‌های حاصل از این روش‌هاست.



شکل ۱: رنگ‌آمیزی نیسل در سه گروه. در این روش، سلول‌های نکروتیک با هسته‌های تیره جمع شده دیده می‌شوند.

۱- گروه کنترل بدون سلول‌های نکروتیک، ۲- گروه رادیوترابی تعداد زیادی سلول‌های نکروتیک. تعدادی از سلول‌های نکروتیک با فلش‌های قرمز مشخص شده است. ۳- گروه درمان با سلول‌های نکروتیک کمتر نسبت به گروه رادیوترابی که نشانگر تأثیرات درمانی ویتامین C در کاهش دادن میزان سلول‌های نکروتیک است. سلول‌های نکروتیک با فلش‌های قرمز مشخص شده است. بزرگنمایی عدسی در تمام تصاویر ۵۰۰ nm است.



شکل ۲: تست تانل در سه گروه مورد مطالعه. ۱- گروه کنترل که نورون‌های این گروه با هسته‌های مشخص قابل رویت اند. ۲- گروه رادیوترابی با تعداد زیادی سلول‌های آپوتوتیک (سلول‌های قهوه‌ای تیره که توسط فلش‌های قرمز شده است). ۳- گروه درمان با سلول‌های

اکسیدانها در بدن تجمع می‌یابند و به این دلیل است که استفاده از مواد غذایی حاوی آنتی اکسیدانها ضروری به نظر می‌رسد، چون این رادیکال‌های آزاد با برخی قسمت‌های سلول مثل DNA و غشای سلولی واکنش انجام داده و باعث تخریب و مرگ سلولی می‌شوند (۲۳-۲۱). ویتامین C یکی از ویتامین‌هایی است که نقش مهمی را در سیستم ایمنی و زنجیره آنتی اکسیدانتی که در برابر آسیب اکسیداتیو قرار می‌گیرند بر عهده دارد (۲۴). در مطالعه ما، تغییرات حافظه و بافتی را بعد از انجام رادیوتراپی در گروه رادیوتراپی کنترل نسبت به گروه سالم مشاهده و مقایسه کردیم. تخریب نورونی در گروه رادیوتراپی کنترل احتمالاً به علت تجمع رادیکال‌های آزاد و اکسیدانها در این ناحیه از مغز بوده که با واکنش با غشای سلولی نورون‌ها و ترکیبات داخل سلولی آنها، مخصوصاً کروموزوم باعث تخریب و مرگ نورون‌ها شده‌اند. 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 (۲۵ و ۲۶). ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان محلول در آب می‌باشد که علاوه بر پاکسازی رادیکال‌های آزاد موجب ورود مجدد آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مانند ویتامین E و اورات به چرخه آنتی اکسیدانتی می‌شود (۲۷). ویتامین C یک آنتی اکسیدان مهم در رژیم غذایی است. این ویتامین به طور مطلوب عوارض جانبی مولکول‌های واکنشی موجود در ترکیبات بدن، مثل اکسیژن و نیتروژن را که به دنبال اشعه درمانی در بدن تولید می‌شوند، کاهش می‌دهد (۲۸). در مطالعه ما، احتمالاً ویتامین C از طریق جریان خون وارد قسمت‌های مختلف مغز از جمله هیپوکامپ می‌شود و احتمالاً در این ناحیه به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود با رادیکال‌های ایجاد شده به دنبال رادیوتراپی واکنش داده و آنها را خنثی می‌سازد و از واکنش دادن این ترکیبات با کروموزوم و لیپیدهای غشای سلول‌های مستعد جلوگیری می‌کند و نتیجتاً عوارض متعاقب رادیوتراپی را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که همیشه مقداری رادیکال آزاد در بدن تولید می‌شود و مقدار آن در شرایط کمبود اکسیژن به شدت افزایش می‌یابد و تجمع این رادیکال‌ها در اطراف سلول‌ها باعث اکسیداسیون غشای آنها می‌شود. از طرفی ویتامین C دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی است و در اکثر مرکبات و سبزیها به مقدار زیاد وجود دارد و دسترسی به میوه و سبزیجات نیز در جامعه آسان می‌باشد لذا مصرف میوه و سبزیجات تازه که از مقدار بیشتری ویتامین C برخوردارند توصیه می‌گردد.

درمان با ویتامین C نتایج بسیار بهتری نسبت به گروه رادیوتراپی کنترل بدست آمد که توانستیم در گروه تحت درمان با ویتامین C به دلیل وجود آنتی اکسیدانها در آن علایم بهبود حافظه کوتاه مدت را ببینیم. در گروه سالم این اختلالات دیده نشد. تست رفتاری y-maze نشان داد که رادیوتراپی منجر به آسیب زیادی در حافظه کوتاه مدت می‌شود. بهترین نتایج در گروه تحت درمان با ویتامین C به دست آمد. ما می‌توانیم در گروه تحت درمان با ویتامین C به دلیل وجود آنتی اکسیدانها در آن علایم بهبود سلامت ذهنی را به وضوح ببینیم. در گروه سالم این اختلالات وجود نداشت.

بحث

رادیوتراپی در مغز باعث تخریب نورون‌ها و نیز آتروفی مغز می‌شود. بسته به اینکه این نورون‌ها مربوط به کدام ناحیه مغز باشد، این تخریب باعث ایجاد عوارضی همچون کاهش حافظه کوتاه مدت، حالت تهوع، بی‌اختیاری در دفع ادرار، اسهال، سردرد، افزایش فشار داخل مغز و فراموشی می‌گردد (۱۹). مطالعات فراوانی در مورد عوارض ایجاد شده توسط رادیوتراپی در مغز، هنگام استفاده از آن در برابر سرطان‌های مغزی، انجام شده است. پژوهشگران در مقالات مختلف تایید کرده‌اند که درمان غالب تومورهای مغزی پس از جراحی اولیه پرتو درمانی می‌باشد و اندوکرینوپاتی ناشی از اختلال در محور هیپوفیز و هیپوتالاموس از عوارض مهم پرتو درمانی در تومورهای مغزی می‌باشد (۲۰). این پژوهش از این جهت با سایر پژوهش‌ها تفاوت دارد که ما اختصاصاً نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ را با رادیوتراپی با دوز بالا (۶ گری) مورد بررسی قرار دادیم در صورتی که در مطالعات دیگر، عوارض در سایر بخش‌های مغز و به طور کلی‌تر مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه هیپوکامپ را، به لحاظ اینکه یکی از مهمترین و حساس‌ترین قسمت‌های مغز در مقابل اشعه است، مورد بررسی قرار دادیم. نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی نیسل و کیت تانل در گروه رادیوتراپی کنترل پس از تاباندن اشعه به مغز موش‌ها، کاهش سلول‌های سالم و تخریب نورونی واضحی را در ناحیه هیپوکامپ نشان داد. علاوه بر آن نتایج بدست آمده از تست های حافظه، اختلال مشخصی را در حافظه کوتاه مدت موش‌های گروه رادیوتراپی کنترل بعد از دریافت پرتو نشان داد که این خود دلیلی واضح، بر وجود تخریب نورونی در این ناحیه از مغز، به دنبال دریافت اشعه با دوز بالا است. اکسیدان‌های با منشا خارجی در نتیجه کشیدن سیگار و مصرف الکل و نور خورشید و موادی مثل نیتريت‌ها و سرب ایجاد می‌شوند و اکسیدان‌های حاصل از فرایندهای داخل بدن در نتیجه تنفس هوازی، متابولیسم، التهاب و فشارهای عصبی و شکستن ناقص چربی‌ها و پروتئین‌ها تشکیل می‌شوند. بنابراین

References

1. Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on

experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009; **203**(2): 151-164.

2. Meilandt WJ, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. *J Neurosci* 2004; **24**: 2953-2962.
3. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnianian S. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 2003; **965**: 108-113.
4. Ahmadiasl N, Alaei H, Hanninen O. Effect of exercise on learning, memory and levels of Epinephrine in rats hippocampus. *J Sport Sci Med* 2003; **2**: 106-109.
5. Thompson J, Gregory J, Benjamin B, Kirk J. "Exercise and obesity: etiology, physiology, and intervention. *Psychological Bulletin* 1982; **91**(1): 55.
6. Holley SK. Evaluating patients' distress from cancer related fatigue: an instrument development study. *Oncol Nurs Forum* 2000; **27**(9): 1425-1430.
7. Null G, Robins H. Patrick "Vitamin C & Treatment of Cancer: Part I Abstracts and Commentary from the Scientific Literature." Townsend Letter for Doctors & Patients 1997.
8. Šimonová Z, Štěrbová K, Brožek G. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 2003; **141**: 195-205.
9. Khong PL, Leung LH, Fung AS. White matter anisotropy in post-treatment childhood cancer survivors: preliminary evidence of association with neurocognitive function. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 884-890.
10. Amonrat T, Soottawat B, Wonnop V. 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.
11. Frei B, Traber M. The new US dietary reference for vitamins C and E. *Redox Rep* 2001; **6**: 5-9.
12. Justi K. "Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp." *Arch Latinoam Nutr* 2000; **50**(4): 405-408.
13. Okamoto K. Vitamin C intake and Apo lipoproteins in a healthy elderly Japanese population. *Pre Med* 2002; **34**(3): 364-369.
14. Kallner A, Hartmann D, Hornig D. On the requirement of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers. *Am J Clin Nutr* 1981; **34**: 1347-1355.
15. Koizumi M, Nishimura T, Kagiya T. Clinical trial of adverse effect inhibition with glycosides of vitamin C and vitamin E in radiotherapy and chemotherapy. *Cancer Res Ther* 2005; **1**(4): 239.
16. Vollbracht C, Schneider B, Leendert V. Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo, radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo* 2011; **25**(6): 983-990.
17. Zamani M, Hassanshahi J, Soleimani M, Zamani F. Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 2013; **4**(2): 164.
18. Kiernan JA. *Histological & Histochemical Methods*. 3rd ed. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1999.
19. DNB Nadia Al-Kharusi, FRCS(C), Anuradha Ganesh M. *Arch Ophthalmology* 2011; **129**(3): 375-377.
20. Abramov JP, Wells PG. Embryonic catalase protects against endogenous and phenytoin-enhanced DNA oxidation and embryopathies in acatalasemic and human catalase-expressing mice. *FASEB J* 2011; **25**(7): 2188-2200.
21. Wong AW, McCallum GP. Oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) protects against methamphetamine-enhanced fetal brain oxidative DNA damage and neurodevelopmental deficits. *J Neurosci* 2008; **28**(36): 9047-9054.
22. Jeng W, Ramkissoon A, Parman T, Wells PG. Prostaglandin H synthase-catalyzed bio activation of amphetamines to free radical intermediates that cause CNS regional DNA oxidation and nerve terminal neurodegeneration. *FASEB J* 2006; **20**: 638-650.
23. McCallum GP, Wong AW, Wells PG. Cockayne syndrome B (CSB) protects against methamphetamine-enhanced oxidative DNA damage in murine fetal brain and postnatal neurodevelopmental deficits. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**(5): 747-756.
24. Siddique YH, Beg T, Afzal M. Anticlastogenic effects of ascorbic acid against the genotoxic damage induced by Norethynodrel. *Adv Environ Biol* 2007; **1**(1): 27-32.
25. Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *Canadian Medical Association Journal* 2006; **174**(7): 956-957.
26. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *Journal of Korean Medical Science* 2007; **22**(1): 7-11.
27. Greggi Antunes, Lusânia M, D'arc C Darin, Maria De Lourdes P. Bianchi. "Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study." *Pharmacological Research* 2000; **41**(4): 405-411.
28. Simone CB, Simone NL, Simone V. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2007; **13**(2): 40-47.