

The Effect of Lipopolysaccharide Pretreatment on Trauma-Induced Dark Neurons in the Hippocampus

Mansoureh Eslami^{1*}, Leila Alizade², Mohammad Sayyah^{3*}

¹Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

³Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 10 Oct 2016

Article Info:

Accepted: 11 Sep 2017

ABSTRACT

Introduction: Traumatic brain injury (TBI) is a serious medical condition that affects annually year more than 2 million people worldwide. This study was aimed to evaluate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the number of dark neurons induced by TBI in the parieto-temporal cortex. **Materials and Methods:** LPS (0.1 and 0.5 mg/kg) was injected i.p. to rats 5 days before induction of TBI in the parieto-temporal cortex. Using toluidine blue staining, we evaluated the number of dark neurons in the hippocampus in sham and LPS preconditioned rats 4 and 12 hours after the trauma. **Results:** The increase in dark neurons was significantly higher after 4 h of trauma compared to 12 h after TBI. LPS preconditioning significantly decreased the mean number of dark neurons in the hippocampus. In LPS preconditioned rats the mean number of dark neurons was also significantly higher 4 hours after trauma compared to 12 h after TBI. **Conclusion:** These data indicate that hippocampal cellular damage produced during the first hours after induction of TBI. This cellular damage could be prevented by administration of LPS.

Key words:

1. Neurons
2. Hippocampus
3. Rats

*Corresponding Author: Mansoureh Eslami, Mohammad Sayyah

E-mail: eslami342@sbmu.ac.ir; sayyahm2@pasteur.ac.ir

اثر پیش‌درمانی با لپیو پلی‌ساکارید بر نورون‌های تیره ناشی از تروما در هیپوکامپ

منصوره اسلامی^{۱*}، لیلا علیزاده^۲، محمد سیاح^{۳*}

^۱دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
^۲مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران
^۳گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۲۰ شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۹ مهر ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: آسیب مغزی پس از ضربه یک وضعیت جدی پزشکی است که سالانه بیش از ۲ میلیون نفر در جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هدف این مطالعه بررسی اثر لپیو پلی‌ساکارید بر تعداد نورون‌های تیره ناشی از آسیب مغزی پس از ضربه در قشر آهیانه‌ای - گیجگاهی بود. **مواد و روش‌ها:** لپیو پلی‌ساکارید (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۵ روز قبل از اعمال به موش‌های صحرایی تزریق شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو تعداد نورون‌های تیره در هیپوکامپ در موش‌های صحرایی گروه شاهد و پیش‌درمانی شده با لپیو پلی‌ساکارید ۴ و ۱۲ ساعت بعد از تروما مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** نورون‌های تیره ۴ ساعت بعد از تروما در مقایسه با ۱۲ ساعت بعد از آسیب مغزی پس از ضربه به طور معنی‌داری بیشتر بود. تعداد نورون‌های تیره در هیپوکامپ در گروه پیش‌درمانی شده با لپیو پلی‌ساکارید به طور معنی‌داری کاهش یافت. در موش‌های صحرایی پیش‌درمانی شده با لپیو پلی‌ساکارید تعداد نورون‌های تیره ۴ ساعت پس از تروما در مقایسه با ۱۲ ساعت بعد از آسیب مغزی پس از ضربه به طور معنی‌داری بیشتر بود. **نتیجه‌گیری:** داده‌ها نشان داد که آسیب سلولی هیپوکامپ در ساعات اولیه بعد از اعمال آسیب مغزی پس از ضربه ایجاد می‌شود. به کارگیری لپیو پلی‌ساکارید می‌تواند از آسیب سلولی جلوگیری کند.

کلید واژه‌ها:

۱. نورون‌ها
۲. هیپوکامپ
۳. موش‌های صحرایی

* نویسنده مسئول: منصوره اسلامی، محمد سیاح

آدرس الکترونیکی: eslami342@sbmu.ac.ir, sayyahm2@pasteur.ac.ir

مقدمه

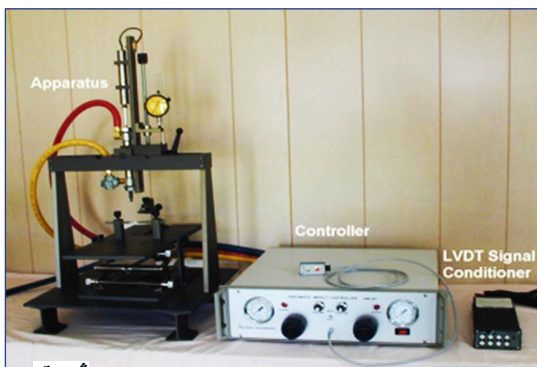
مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم که در محیطی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده بودند استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، رطوبت (۵۵-۵۰ درصد) و حرارت (۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. همه آزمایش‌ها بر طبق دستورالعمل برخورد با حیوانات آزمایشگاهی، تصویب شده توسط کمیته اخلاقی انستیتو پاستور ایران انجام شد. حیوانات به ۳ گروه تقسیم شدند. در هر گروه ۵ موش مورد بررسی قرار گرفت. گروه اول قبل از اعمال تروما نرمال سالیین و گروه دوم و سوم قبل از اعمال تروما لپیو پلی‌ساکارید را با دوزهای ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند در هر یک از گروه‌های فوق، ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تروما مغز خارج شده و از نظر بافتی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

اعمال صدمه مغزی

حیوانات تحت بیهوشی عمیق با کلرال هیدرات ۳ درصد (Sigma-Aldrich; 350 mg/kg) قرار گرفتند (۱۵). پس از تثبیت حیوان در دستگاه استریوتاگس در ناحیه قشر آهیانه‌ای چپ^۲، با مختصات ۴ میلی‌متر در سمت طرفی و ۴ میلی‌متر خلف برگما استخوان جمجمه به شکل دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر توسط مت‌مخصوص برداشته شد. سپس حیوان در دستگاه تروما قرار داده شده و تروما به روش (CCI)^۳ با فشار بالای ۱۳۰ psi، فشار پایین ۲۰ psi، سرعت حرکت پیستون ۴/۵ m/s و زمان ۱۵۰ msec ضربه اعمال شد (تصویر ۱). سپس استخوان بر روی محلش قرار داده شده و با سیمان دندانپزشکی ثابت گردید، پوست بخیه زده شده و تا زمان بیهوش آمدن حیوان به اتاق recovery منتقل گردید. برای اطمینان از اینکه ضربه مناسب بوده و توانسته ضایعه‌ای به عمق ۲ میلی‌متر ایجاد کند از روش رنگ‌آمیزی با ۲ و ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC)^۴ استفاده شد.

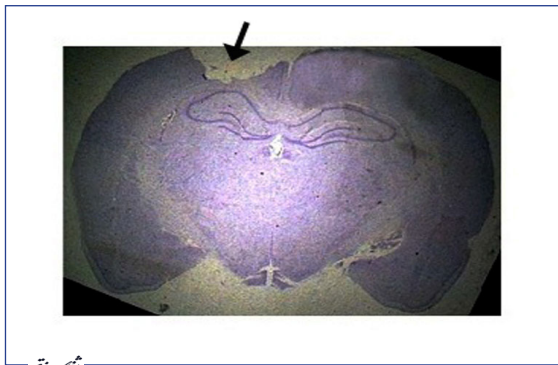


تصویر ۱- دستگاه CCI.

آسیب‌های ناشی از ضربات مغزی (TBI)^۱ یکی از مشکلات جدی پزشکی است که علی‌رغم تمهیدات فراوان جهت افزایش ایمنی، هنوز سالیانه بیش از ۲ میلیون نفر در جهان درگیر عوارض فوری و تأخیری ناشی از تروما بوده و این امر هزینه‌های زیادی را به سیستم دارو درمانی تحمیل می‌کند (۱). کشور ما ایران نیز از دو جنبه در این مسئله درگیر می‌باشد. یکی بالا بودن آمار تصادفات جاده‌ای است که از این نظر جزء چند کشور اول در جهان بوده و تعداد زیاد مصدومین آسیب‌های مغزی را به دنبال داشته است و دیگری تعداد قابل توجه جانبازان آسیب مغزی ناشی از جنگ ایران و عراق می‌باشد. صدمات مغزی شامل ترومای مغزی، سکته مغزی، عفونت‌های ویروسی و التهاب می‌باشد که یکی از تبعات آن بیماری صرع می‌باشد (۵-۲). لذا بررسی این موضوع حائز اهمیت است.

بررسی‌ها نشان داده است، متعاقب آسیب ناشی از ضربه، عفونت و ایسکمی حالتی التهابی در مغز ایجاد می‌شود که با فعال شدن سلول‌های ایمنی مستقر در مغز (میکروگلیاها) و آزاد شدن مدیاتورهای التهابی همچون اینترلوکین-۱ بتا، عامل نکروز دهنده تومور آلفا، نیتریک اکسید، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و غیره همراه است و التهاب عصبی ایجاد شده و مدیاتورهای فوق زمینه‌ساز عوارض ناشی از تروما می‌باشند (۸-۶). از طرفی بررسی‌ها نشان داده که اگر سیستم ایمنی قبل از ایجاد ضایعه (ایسکمی، ضربه، عفونت) به طور خفیف تحریک شود پاسخ ایمنی ایجاد شده متعاقب ضایعه، از شدت کمتری برخوردار بوده و این امر ضایعات مغزی ایجاد شده را به شدت تقلیل می‌دهد (۱۱-۸). یکی از موادی که موجب تحریک سیستم ایمنی مغز می‌گردد لپیو پلی‌ساکارید است. مطالعات نشان داده است که لپیو پلی‌ساکارید با دوز بالا منجر به افزایش مرگ و میر سلولی می‌گردد. همچنین تحقیقات نشان داده است که تجویز مقادیر کم لپیو پلی‌ساکارید قبل از تروما و ایسکمی صدمات متعاقب آن را کاهش می‌دهد (۱۳، ۱۲، ۱۰). آسیب‌های ناشی از ضربه مغزی منجر به آپوپتوز و نکروز در هیپوکامپ می‌شود. نتایج محققین نشان داده است که عوارض حاصل از تروما در ساعات مختلف بعد از اعمال تروما متفاوت می‌باشد (۱۴). لذا در این تحقیق بر آن شدیم که مقایسه‌ای انجام دهیم بین تعداد نوروئ‌های تیره در هیپوکامپ ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تروما در موش‌های ترومایی و موش‌های ترومایی پیش درمانی شده با لپیو پلی‌ساکارید، تا به این ترتیب بتوانیم در ساعات مختلف بعد از تروما آسیب وارد شده به هیپوکامپ را در هر دو حالت مورد بررسی قرار دهیم.

¹ Traumatic brain injury² Left parietal cortex³ Controlled cortical injury⁴ Triphenyl tetrazolium chloride 2,3,5



تصویر ۳- مشاهده ضایعه ایجاد شده در لوب قشر آهیانه‌ای - گیجگاهی.

حیوانات بعد از پرفیوژن خارج شده و پس از آماده‌سازی بافتی با پارافین قالب‌گیری شد. سپس برش‌های ۷ میکرونی عرضی از هیپوکامپ تهیه و از هر موش سه برش به صورت تصادفی انتخاب و پس از مراحل پارافین‌زدایی و آبدهی با رنگ تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شدند. عکسبرداری از نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مدل Olympus, Japan BX51 با بزرگنمایی 40X صورت گرفت سپس به کمک برنامه نرم‌افزاری ImageJ تعداد نورون‌های تیره نسبت به کل نورون‌ها در واحد حجم نواحی CA1، CA3 و Dentate gyrus هیپوکامپ شمارش شدند (۱۶-۳).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام گردید. ابتدا آزمون Shapiro-wilk برای ارزیابی نرمالیتیه بودن جامعه استفاده شد. جهت مقایسه میانگین در جامعه نرمال، آزمون ANOVA یکطرفه و سپس آزمون توکی انجام گردید. در جامعه غیرنرمال، آزمون کروسکال والیس و من ویتنی استفاده شد. در مقایسه بین گروه‌ها، سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از رنگ آمیزی با ۲ و ۳ و ۵ تری فیل تترازولیوم کلراید و کریزل ویوله

نتایج حاصل از رنگ آمیزی با TTC نشان داد، تروما با روش CCI در شرایط مشخص، ضایعه‌ای به عمق 2 ± 0.5 میلی‌متر از سطح قشر ایجاد کرده است (تصویر ۲). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با کریزل ویوله نیز تأیید کننده روش رنگ‌آمیزی با TTC بود و نشان داد که تروما با روش CCI توانسته ضایعه متوسطی در سطح قشر ایجاد نماید (تصویر ۳).

نتایج حاصل از مقایسه درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ

نتایج حاصل از مقایسه درصد نورون‌های تیره در نواحی

روش پیش درمانی با لیپو پلی‌ساکارید

پنج روز قبل از اعمال تروما، لیپو پلی‌ساکارید با دوزی که تحقیقات قبلی ما اثر حفاظتی آن را تأیید کرده بود (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) داخل نرمال سالین حل شده و به طریق داخل صفاقی تزریق گردید (۱۳). برای گروه شاهد نیز قبل از اعمال تروما نرمال سالین به طریق داخل صفاقی تزریق گردید.

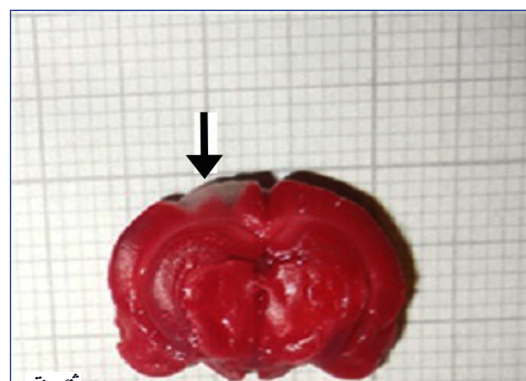
روش انجام مطالعات بافتی

رنگ‌آمیزی با ۲ و ۳ و ۵ تری فیل تترازولیوم کلراید و کریزل ویوله

جهت کنترل اعمال آسیب مغزی در حد متوسط، ۶ موش، ضربه مغزی را با مشخصات ذکر شده دریافت کرده و با اثر بیهوش شدند. سر با گیوتین جدا گردید، مغز خارج شد و در سالین ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس توسط برشگیر^۵ از هر مغز دو برش ۳ میلی‌متری از محل ضایعه تهیه شد، برش‌ها داخل TTC با غلظت ۲ درصد قرار داده شد. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه برش‌ها رنگ گرفت به طوری که مناطق آسیب دیده به رنگ سفید و مناطق سالم قرمز رنگ شد. برش‌ها بر روی کاغذ میلی‌متری انتقال یافته و عمق ضایعه از سطح قشر اندازه‌گیری شد (تصویر ۲). برای اطمینان از القاء ضایعه‌ای در حد متوسط، نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله نیز کنترل شد. برای این منظور مغز موش‌های پرفیوژن شده خارج شد و پس از آماده‌سازی بافتی با پارافین قالب‌گیری گردید. سپس برش‌های ۷ میکرونی عرضی از هیپوکامپ تهیه شد و جهت ذوب پارافین، لام‌های حاوی نمونه بر روی هیتز قرار داده شد تا پارافین آن ذوب شود. بعد به ترتیب در محلول‌های الکل با درصدهای مختلف جهت آبگیری و رنگ کریزل ویوله قرار گرفت و در هر موش ۵ برش از نظر عمق ضایعه از سطح قشر جهت تأیید القاء ضایعه‌ای در حد متوسط مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۳).

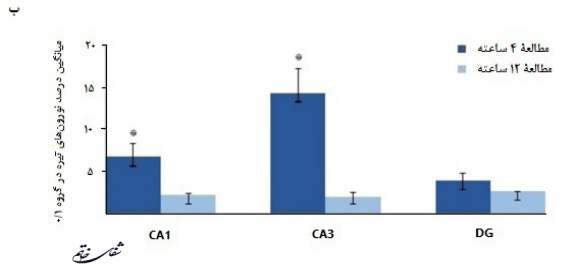
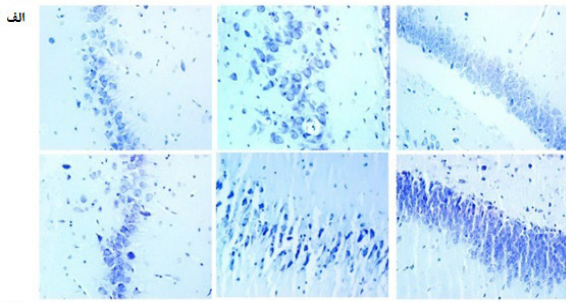
رنگ‌آمیزی با تولوئیدن بلو

حیوانات با ۲۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین و به دنبال آن ۲۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدئید ۱ درصد پرفیوژن شدند. مغز



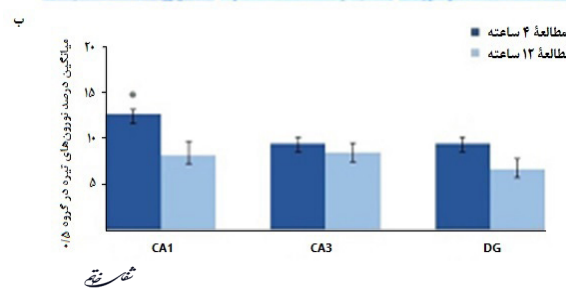
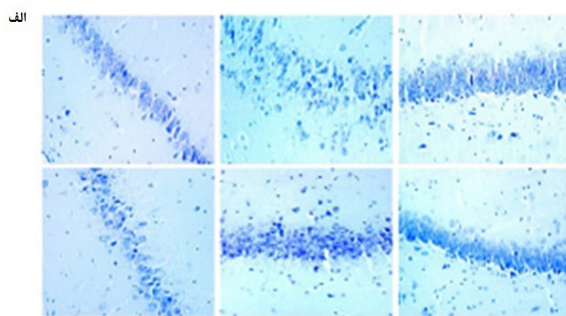
تصویر ۲- اندازه‌گیری عمق ضایعه با رنگ آمیزی TTC.

⁵ Brain slicer



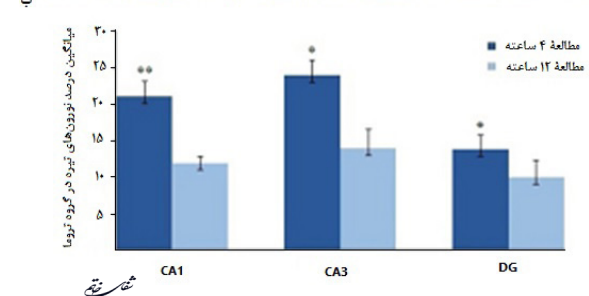
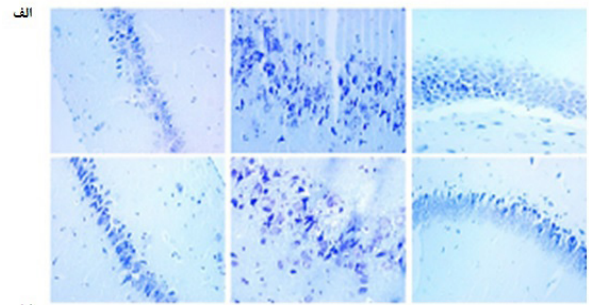
نمودار ۲- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم بر درصد نورون‌های تیره در مناطق مختلف هیپوکامپ نشان می‌دهد که ۴ ساعت بعد از تزریق در نواحی CA1, CA3 درصد نورون‌های تیره به طور معنی‌داری بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تزریق می‌باشد ($P < 0.05$).

گروه‌های پیش درمانی شده با لیپوپلی ساکارید (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) در گروهی که LPS را با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم پنج ساعت قبل از تزریق داخل صفاقی دریافت کردند درصد نورون‌های تیره در ناحیه CA1 ($12/66 \pm 1/06$) ۴ ساعت بعد از تزریق به طور معنی‌داری بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تزریق CA1 ($8/75 \pm 2/98$) بود ($P < 0.05$) و درصد نورون‌های تیره ۴ ساعت بعد از تزریق در نواحی CA3 ($7/66 \pm 1/26$) و Dentate gyrus با ۱۲ ساعت بعد از تزریق در نواحی CA3 ($7/25 \pm 2/21$) و Dentate gyrus ($8/33 \pm 1/29$) اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم در مناطق مختلف هیپوکامپ نشان می‌دهد که ۴ ساعت بعد از تزریق در نواحی CA1, CA3 اختلاف معنی‌داری با ۱۲ ساعت بعد از تزریق دارد ($P < 0.05$).

هیپوکامپ ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تزریق همان گونه که در نمودار ۱ مشخص است درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ CA3 ($24/04 \pm 4/22$) و CA1 ($21/13 \pm 1/93$) ۴ ساعت بعد از اعمال تزریق به طور معنی‌داری بیشتر از Dentate gyrus ($9/04 \pm 4/22$) و CA3 ($13/99 \pm 5/11$) و CA1 ($12/04 \pm 4/07$) ۱۲ ساعت بعد از تزریق است ($P < 0.05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ (CA1, CA3, Dentate gyrus) ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تزریق نشان می‌دهد که ۴ ساعت بعد از تزریق در نواحی تیره به طور معنی‌داری بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تزریق است ($P < 0.05$) و ($P < 0.01$).

نتایج حاصل از مقایسه درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ، ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تزریق در گروه‌های پیش درمانی شده با لیپوپلی ساکارید (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم): نتایج حاصل از پیش درمانی با لیپوپلی ساکارید نشان می‌دهد که این ماده تعداد نورون‌های تیره را در تمام گروه‌های تیمار پیش درمانی شده با لیپوپلی ساکارید نسبت به گروه‌های تیمار با LPS که نرمال سالیین دریافت کرده بودند کاهش داده است. در این تحقیق مقایسه اثر LPS، ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از تزریق در نواحی تیره که در گروهی که LPS را با دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم پنج روز قبل از تزریق داخل صفاقی دریافت کردند درصد نورون‌های تیره در نواحی CA3 ($14/31 \pm 6/26$) و CA1 ($6/72 \pm 2/9$) ۴ ساعت بعد از اعمال تزریق به طور معنی‌داری بیشتر از CA3 ($2/88 \pm 0/87$) و CA1 ($2/13 \pm 0/32$) ۱۲ ساعت بعد از تزریق در نواحی تیره به طور معنی‌داری بیشتر از ۴ ساعت بعد از تزریق در نواحی تیره بود ($P < 0.05$) (نمودار ۲). درصد نورون‌های تیره ۴ ساعت بعد از تزریق در ناحیه Dentate gyrus ($3/87 \pm 1/77$) با ۱۲ ساعت بعد از تزریق در ناحیه Dentate gyrus ($2/59 \pm 0/68$) اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتایج حاصل از مقایسه درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ، ۴ ساعت و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تزریق در

بحث و نتیجه گیری

نوعی شرطی شدن (pre conditioning) در سیستم ایمنی به وجود آید به طوری که در صورت تحریک بعدی و شدید سیستم ایمنی پاسخ‌های ایمنی به شکل شدید رخ ندهد و در نتیجه عوارض مربوطه نیز تخفیف یابد (۲۲، ۹). گزارشات اخیر نشان داده است که ۲۴ ساعت بعد از تزریق داخل مغز کاینیک اسید که با سمیت نورونی منجر به آسیب مغزی می‌شود اگر پیش شرطی با LPS انجام شود فعالیت میکروگلیاها تنظیم شده و نورون‌های کورتیکال از سمیت و مرگ نورونی محافظت می‌شوند (۲۳). گیرنده‌های TLR2 و TLR4 در واکنش میکروگلیا و مهار مرگ نورونی نقش دارند (۲۴). با توجه به نقش تحریک سمیت در اپی لپتوزن بعد از تروما، پیش شرطی با LPS از طریق کند کردن تحریک سمیت، موجب مهار تسهیل اپی لپتوزن متعاقب تروما نیز می‌شود (Longhi.L, ۲۵-۲۷). همکارانش نشان دادند که در موش‌های مبتلا به TBI تزریق LPS با دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ روز قبل از ضربه مغزی، نقایص حرکتی کمتری در مقایسه با گروه شاهد ایجاد می‌کند. موش‌هایی که LPS را ۵ روز قبل از ضربه مغزی دریافت کردند حجم کوفتگی و مرگ سلولی کمتری داشتند. اثر حفاظتی LPS تا یک ماه بعد از آسیب هنوز وجود داشت (۹).

تحقیقات قبلی ما نیز نشان داده بود در گروهی که LPS را با دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم قبل از تروما دریافت کرده بودند درصد نورون‌های تیره در نواحی هیپوکامپ نسبت به گروه ترومایی که LPS دریافت نکرده بودند کاهش معنی‌داری داشت (۱۳). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که پیش درمانی با لپو پلی ساکارید درصد نورون‌های تیره را در تمام گروه‌های ترومایی پیش درمانی شده با لپو پلی ساکارید نسبت به گروه‌های ترومایی که نرمال سالیین دریافت کرده بودند کاهش داده است که این در راستای نتایج حاصل از تحقیقات قبلی ما نیز بود (۱۳).

در این تحقیق هدف ما مقایسه تعداد نورون‌های تیره هیپوکامپ در گروه‌های ترومایی و گروه‌های ترومایی پیش درمانی شده با لپو پلی ساکارید در ساعات اولیه بعد از تروما بود که نشان داد ۴ ساعت بعد از تروما تعداد نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ بیش از ۱۲ ساعت بعد از تروما بود. همچنین در حیواناتی که با LPS پیش درمانی شده بودند و به دلیل نقش حفاظتی LPS در دوزهای مذکور تعداد نورون‌های تیره کاهش یافته بود نیز ۴ ساعت بعد از تروما درصد نورون‌های تیره بیش از ۱۲ ساعت بعد از تروما بود. این نتایج نشان می‌دهد که مقدار نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ در حیوانات ترومایی و حیوانات پیش درمانی شده با LPS در ساعات اولیه بعد از تروما بیشتر است.

نتایج اخیر نشان داد در ساعات اولیه اعمال تروما، آسیب سلولی در نواحی مختلف هیپوکامپ اتفاق افتاده است. این آسیب به صورت افزایش تعداد نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ مشاهده شد. تعداد نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ به طور معنی‌داری ۴ ساعت بعد از تروما بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تروما بود. از این نتایج دریافتیم که اثرات حاصل از تروما بلافاصله بعد از تروما شدیدتر می‌باشد. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که سمیت سلولی و مرگ سلولی غالباً در زمان کوتاهی بعد از تروما به وجود می‌آید (۱۵). یافته‌های پاتولوژیک در TBI و تشنج لوب گیجگاهی نشان‌دهنده از بین رفتن نورونی کورتیکال و هیپوکامپ (نواحی CA1, CA3, dentate hillus) می‌باشد که در اپی لپتوزن نیز نقش دارد (۱۵). در این تحقیق نیز تحلیل عصبی هیپوکامپی مشاهده شد. ما در این تحقیق برای اعمال تروما از روش CCI استفاده کردیم که یکی از بهترین مدل‌های شناخته شده حیوانی است، آسیب موضعی ایجاد می‌کند، صدمه در آن قابل کنترل بوده و پارامترهای مکانیکی قابل محاسبه‌اند. در این روش آسیب مغزی تکرارپذیر است و با تغییرات پاتولوژیک مشابه آسیب‌های کلینیکی وارد شده به سر همراه می‌باشد (۱۶، ۱۳).

تحقیقات قبلی نشان داده است که اگر سیستم ایمنی قبل از ایجاد ضایعه (ضربه مغزی، عفونت و...) به طور خفیف تحریک شود پاسخ ایمنی ایجاد شده متعاقب ضایعه از شدت کمتری برخوردار بوده و این امر ضایعات مغزی ایجاد شده را به شدت تقلیل می‌دهد (۱۱، ۹). یکی از موادی که موجب تحریک سیستم ایمنی مغز می‌گردد لپو پلی ساکارید است که از دیواره سلولی باکتری گرم منفی جدا می‌گردد. این ماده دارای گیرنده اختصاصی از نوع TLR4 است (۱۲). بررسی‌ها نشان داده است که لپو پلی ساکارید در غلظت بیش از ۱ میلی گرم بر کیلوگرم منجر به آپوپتوز سلولی در سیستم عصبی مرکزی از جمله هیپوکامپ می‌شود (۱۷). تحقیقاتی که بر روی اثر LPS بر آسیب‌های مغزی از جمله ایسکمی انجام شده به نقش حفاظتی LPS و اثرات درمانی آن در دوز کم اشاره کرده است (۲۱-۱۸، ۹). بنابراین لپو پلی ساکارید به عنوان یک مداخله‌گر در سیستم ایمنی شناخته شده است (۱۹). تحقیقات نشان داده است که تجویز LPS قبل از تروما^۶ و همچنین بلافاصله بعد از تروما^۸ در کاهش التهاب عصبی و به دنبال آن کاهش ضایعات بعدی نقش دارد (۲۰). مفهوم pre conditioning بدین معنا است که چنانچه LPS با دوز کم و به صورت پیشگیرانه قبل از وقوع ضایعه عصبی و آغاز فرایندهای التهابی تجویز شود با تحریک خفیف سیستم ایمنی موجب می‌شود که

⁶ Neurodegeneration

⁷ Pre conditioning

⁸ Post conditioning

که تروما در مناطق مختلف هیپوکامپ منجر به مرگ سلولی شده است که ۴ ساعت بعد از تروما مرگ سلولی بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تروما می‌باشد. در صورتی که حیوانات قبل از اعمال تروما با لیپوپلی‌ساکارید پیش‌درمانی شوند تعداد نورون‌های مرده کاهش می‌یابد که در این مورد نیز ۴ ساعت بعد از تروما تعداد نورون‌های مرده در بعضی از مناطق هیپوکامپ بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تروما می‌باشد که این هم به دلیل آسیب بیشتر هیپوکامپ در ساعات اولیه بعد از تروما می‌باشد.

آسیب سلولی در هیپوکامپ ۴ ساعت بعد از تروما بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تروما است. در گروه‌های پیش‌درمانی شده با لیپوپلی‌ساکارید نیز آسیب سلولی در بیشتر مناطق هیپوکامپ ۴ ساعت بعد از تروما بیشتر از ۱۲ ساعت بعد از تروما است. این نتایج نشان‌دهنده آسیب سلولی بیشتر هیپوکامپ در ساعات اولیه بعد از تروما می‌باشد.

تحقیقات محققان قبلی نشان داده بود که تروما در مغز با آزادسازی گلوتامات موجب تحریکات سمی شدیدی شده و منجر به آسیب سلولی می‌شود (۲۸-۳۰). در این تحقیق نیز با اعمال تروما تعداد نورون‌های تیره نسبت به گروهی که سالین دریافت کرده بودند افزایش داشت. ما در این تحقیق نورون‌های تیره را به‌عنوان نورون‌هایی که دچار مرگ سلولی شده‌اند در نظر گرفته‌ایم زیرا سرنوشت نورون‌های تیره بستگی به نواحی مختلفی از مغز دارد که در آن نواحی قرار گرفته‌اند برای مثال بعد از تروما تعدادی از نورون‌های تیره در نئوکورتکس زنده باقی می‌مانند در صورتی که در هیپوکامپ تعداد نورون‌های تیره تقریباً برابر با تعداد نورون‌های مرده است (۳۱-۳۳). در همین راستا Ooigawa و همکارانش نشان دادند که نورون‌های تیره در هیپوکامپ ۲۴ ساعت بعد از اعمال تروما دچار مرگ سلولی می‌شوند (۳۴). به همین دلیل ما در این تحقیق می‌توانیم بیان کنیم

منابع

- Leonardi M, Ustun TB. The global burden of epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43(6): 1-5.
- Dudek FE, Staley KJ. The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neurosci Lett*. 2011; 497(3): 240-6.
- Blumenfeld H. New strategies for preventing epileptogenesis: perspective and overview. *Neurosci Lett*. 2011; 497(3): 153-4.
- Karimi M, Naseri M, Sayyah M, Kamalinejad M, Amiri S. Evaluation of anticonvulsive effect of methanol extract of ferula asafoetida gum in mice. *Shefaye Khatam*. 2014; 2(1): 46-50
- Eftekhari B, Sahraian MA, Nouralishahi B, Khaji A, Vahabi Z, Ghodsi M, et al. Prognostic factors in the persistence of posttraumatic epilepsy after penetrating head injuries sustained in war: clinical article. *J Neurosurg*. 2009; 110(2): 319-26.
- Ravizza T, Balosso S, Vezzani A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett*. 2011; 497(3): 223-30.
- Granata T, Cross H, Theodore W, Avanzini G. Immune-mediated epilepsies. *Epilepsia*. 2011; 52(3): 5-11.
- Aarli JA. Epilepsy and the immune system. *Arch Neurol*. 2000; 57(12): 1689-92.
- Longhi L, Gesuete R, Perego C, Ortolano F, Sacchi N, Villa P, et al. Long-lasting protection in brain trauma by endotoxin preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31(9): 1919-29.
- Lin HY, Huang CC, Chang KF. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. *Pediatr Res*. 2009; 66(3): 254-9.
- Mirrone MM, Konomos DK, Gravanis I, Dewey SL, Aguzzi A, Heppner FL, et al. Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurobiol Dis*. 2010; 39(1): 85-97.
- Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience*. 2009; 158(3): 1007-20.
- Eslami M, Sayyah M, Soleimani M, Alizadeh L, Hadjighassem M. Lipopolysaccharide preconditioning prevents acceleration of kindling epileptogenesis induced by traumatic brain injury. *J Neuroimmunol*. 2015; 289: 143-51.
- Hu K, Li S-y, Xiao B, Bi F-f, Lu X-q, Wu X-m. Protective effects of quercetin against status epilepticus induced hippocampal neuronal injury in rats: involvement of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Acta Neurol Belg*. 2011; 111(3): 205-12.
- Nourzad Z, Ghadiri T, Modarres Mousavi M, Karimzadeh F, Eshaghabadi A, Hosseini Ravandi H, et al. Neuroprotective effects of concomitant use of erythropoietin and progesterone in traumatic brain

injury. *Shefaye Khatam*. 2014; 2(2): 1-12.

16. Alizadeh L, Gorizan A, Akbari Dana M, Ghaemi A. Immunotherapy of glioblastoma multiforme tumors: from basic to clinical trial studies. *Shefaye Khatam*. 2015; 3(2): 77-84.

17. Yu JT, Lee CH, Yoo K-Y, Choi JH, Li H, Park OK, et al. Maintenance of anti-inflammatory cytokines and reduction of glial activation in the ischemic hippocampal CA1 region preconditioned with lipopolysaccharide. *J Neurol Sci*. 2010; 296(1-2): 69-78.

18. Hassan H, Grecksch G, R  thrich H, Krug M. Effects of nicardipine, an antagonist of L-type voltage-dependent calcium channels, on kindling development, kindling-induced learning deficits and hippocampal potentiation phenomena. *Neuropharmacology*. 1999; 38(12): 1841-50.

19. Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, et al. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNF α after stroke: a novel role for TNF α in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27(10): 1663-74.

20. Bingham D, John CM, Panter SS, Jarvis GA. Post-injury treatment with lipopolysaccharide or lipooligosaccharide protects rat neuronal and glial cell cultures. *Brain Res Bull*. 2011; 85(6): 403-9.

21. Pitk  nen A, Bolkvadze T, Immonen R. Anti-epileptogenesis in rodent post-traumatic epilepsy models. *Neurosci Lett*. 2011; 497(3): 163-71.

22. L  scher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev*. 2010; 62(4): 668-700.

23. Larochelle A, Bellavance MA, Rivest S. Role of adaptor protein MyD88 in TLR-mediated preconditioning and neuroprotection after acute excitotoxicity. *Brain Behav Immun*. 2015; 46: 221-31.

24. Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, et al. 'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(6): 834-45.

25. Hunt RF, Boychuk JA, Smith BN. Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 89. doi: 10.3389/fncel.2013.00089.

26. Goodrich GS, Kabakov AY, Hameed MQ, Dhamne SC, Rosenberg PA, Rotenberg A. Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat. *J Neurotrauma*. 2013; 30(16): 1434-41.

27. Vandresen-Filho S, Hoeller AA, Herculano BA, Duzzioni M, Duarte FS, Piermartiri TC, et al. NMDA preconditioning attenuates cortical and hippocampal seizures induced by intracerebroventricular quinolinic acid infusion. *Neurotox Res*. 2013; 24(1): 55-62.

28. Meldrum BS. Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathology*. 1993; 3(4): 405-12.

29. Parsons MP, Raymond LA. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*. 2014; 82(2): 279-93.

30. Jayaram B, Khan RS, Kastin AJ, Hsueh H, Wu X, Pan W. Protective role of astrocytic leptin signaling against excitotoxicity. *J Mol Neurosci*. 2013; 49(3): 523-30.

31. Cortez SC, McIntosh T, Noble L. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res*. 1989; 482(2): 271-82.

32. Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci*. 1992; 12(12): 4846-53.

33. Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurons to hypoxia after mild concussion in the rat. *Neurol Res*. 1995; 17(6): 455-60.

34. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol*. 2006; 112(4): 471-81.