● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هجدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۲۲-۱۰۷، ۱۳۹۰

مقالهٔ پژوهشی

نقش سیتوکین‌های پیش‌برنده التهاب در واسطه‌گری اثر ضدخیز مغزی استروئیدهای جنسی زنانه بعد از جراحت تروماتیک مغزی

زهرا سلطانی[۱]، محمد خاکساری حداد*[۲]، علیرضا سرکاکی[۳]، زکیه کشاورزی[۴]، فرزانه اسماعیلی[۵]، سیاوش جوکار[۶]

خلاصه

مقدمه: علت اصلی خیز مغزی به‌دنبال جراحت تروماتیک مغزی (TBI)، رهایش سیتوکین‌های پیش‌برنده التهاب می‌باشد و از آنجا که بر اساس پژوهش‌های قبلی استروئیدهای جنسی دارای اثر ضدخیز مغزی می‌باشند، در این پژوهش تغییرات در مقادیر مغزی این سیتوکین‌ها به‌دنبال تجویز استروژن و پروژسترون در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی بررسی شد.

روش: در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده استفاده شد که به ۷ گروه تقسیم شدند. گروه اول و دوم به‌ترتیب کنترل و شم بودند و در بقیه حیوانات تخمدان به‌صورت دوطرفه برداشته شده و به گروه‌های حلال، دوز فیزیولوژیک استروژن (E_1)، دوز فارماکولوژیک استروژن (E_2)، دوز فیزیولوژیک پروژسترون (P_1) و دوز فارماکولوژیک پروژسترون (P_2) تقسیم شدند. حلال و هورمون‌های استروئیدی جنسی نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به روش داخل صفاقی تزریق شدند. ضربه مغزی متوسط از نوع منتشر و به روش مارمارو ایجاد شدند. نمرات نورولوژیک (VCS)، بلافاصله بعد از ضربه، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مغزی سیتوکین‌های IL-1β، TNF-α، و IL-6، TGF-β و استروئیدها، ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی با روش ELISA اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: گروه‌های E_1 و E_2 در مقایسه با گروه حلال به‌ترتیب ۲۷/۵ ٪ و ۲۷٪ کاهش در میزان مغزی IL-1β نشان دادند. IL-1β در گروه حلال در مقایسه با گروه شم، افزایش نشان داد. مقدار IL-6 مغزی در گروه‌های E_1 و P_1 به‌ترتیب ۴۷٪ و ۲۰/۵٪ در مقایسه با گروه حلال کاهش یافت. در گروه E_2 میزان مغزی TNF-α ۴۸/۵٪ در مقایسه با گروه حلال افزایش داشت. هر دو هورمون استروژن و پروژسترون و در هر دو دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک باعث افزایش TGF-β شدند که بیشترین افزایش ۹/۵ برابر بود که توسط دوز فیزیولوژیک استروژن ایجاد شد، در حالی که غلظت بتا- استرادیول مغزی در گروه E_2 ۱/۸ برابر و غلظت پروژسترون مغزی در گروه P_2، ۱/۸۴ برابر در مقایسه با گروه حلال افزایش نشان داد. یک ساعت بعد از TBI، در گروه‌های E_1، E_2، P_1 و P_2 نمرات نورولوژیک افزایش داشتند، در حالی که در ۴ ساعت بعد فقط در گروه‌های P_1 و E_1 و در ۲۴ ساعت بعد از TBI در گروه‌های E_1، E_2 و P_1 نمرات نرولوژیک افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: هورمون‌های استروئیدی جنسی احتمالاً قسمتی از ویژگی ضد التهابی خود برای کاهش خیز مغزی و بهبودی پیامدهای نورولوژیک بعد از TBI از طریق کاهش در مقادیر مغزی IL-1β و IL-6 و افزایش در میزان مغزی TNF-α و TGF-β موجب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: TBI، استروژن، پروژسترون، IL-1β، TNF-α، IL-6، TGF-β

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد مرکز تحقیقات فیزیولوژی، مرکز آموزش بین‌الملل بم، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز ۴- دانشجوی دکترای فیزیولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵- مربی فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۶- استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** کرمان –انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه و مرکز تحقیقات فیزیولوژی ● **آدرس پست الکترونیک:** khaksar38@yahoo.co.uk

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۷ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۹/۴/۱۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۹/۶/۱۶

مقدمه

جراحت تروماتیک مغزی (TBI) منجر به ادم غالب، اما متغیر در بافت‌های مغزی می‌شود که از لحاظ بالینی به‌صورت افزایش فشار داخل جمجمه‌ای (ICP) تعریف می‌شود و این افزایش به‌عنوان یکی از نتایج نامناسب به دنبال TBI است (۱). خیز مغزی یک علت عمده مرگ و میر و ناتوانی، همراه با TBI است (۲). تشکیل خیز مغزی بعد از جراحت تروماتیک همراه با یک سری حوادث پیچیده سیتوتوکسیک و هم‌چنین نشت عروقی به‌علت شکسته شدن سد خونی - مغزی (BBB) است (۳). تجمع لوکوسیت‌ها در داخل مغز بعد از تروما گزارش شده است که این امر باعث جراحت ثانویه مغزی از قبیل افزایش خیز مغزی و افزایش ICP می‌شود (۴). پاسخ التهابی داخل مغزی وسیع بعد از TBI رخ می‌دهد. التهاب عروق مغزی یک حادثه اولیه در آسیب‌شناسی سکته مغزی بوده و به‌وسیله پیش‌بردن انفیلتراسیون لوکوسیتی به داخل مغز (۵)، آسیب BBB (۶) و خیز وازوژنیک (۷) در ایجاد آسیب مغزی ثانویه شرکت می‌کند.

ماکروفاژها و میکروگلیاها عناصر سلولی کلیدی در پیشرفت جراحت ثانویه در مغز به دنبال TBI هستند که همراه با رهایش مولکول‌های سیتوتوکسیک از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سیتوکین‌های التهابی ممکن است در میانجی‌گری پاسخ التهابی موضعی به تروما نقش داشته باشند (۸). سیتوکین‌های ویژه و فاکتورهای رشدی که در آبشار حوادث بعد از تروما نقش دارند، شامل فاکتورنکروز دهنده توموری نوع آلفا (TNF-α)، اینترلوکین ۱ (IL-1)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور رشد تومری (TGF-β) (۹،۱۰) می‌شوند. علاوه بر این گزارش شده است که تولید سیتوکین‌های التهابی به‌خصوص IL-1β و TNF-α منجر به التهاب و مرگ نورونی به‌دنبال ایسکمی می‌شوند (۱۱). تغییر در غلظت‌های مغزی و سرمی سیتوکین‌های التهابی و هم‌چنین TGF-β در بیماران، به‌دنبال جراحت شدید به سر در انسان و در موش صحرایی گزارش شده‌است (۱۲،۱۳).

مشخص شده است تشکیل خیز که به‌دنبال التهاب در سیستم عصبی مرکزی (CNS) رخ می‌دهد، نقش مهمی در تنظیم ترومای مغزی دارد، به‌طوری که مسیرهای التهابی ممکن است نقش حیاتی برای شروع پاسخ به تروما داشته باشند (۱۴) و به همین دلیل کوشش‌های زیادی برای کاهش التهاب (خیز) مغزی بعد از تروما صورت گرفته است (۱۱). از جمله موادی که برای کاهش خیز مغزی استفاده شده‌اند، هورمون‌های استروئیدی زنانه می‌باشند و توجه به نقش این استروئیدها در ترومای مغزی با مشاهده‌ای شروع شد که در آن حیوان‌های ماده به‌دنبال القای ضربه، خیز کم‌تری نسبت به حیوان‌های نر داشتند (۱۷-۱۵) و هم‌چنین دیده شد که در حالت هیپرپروژستینمی خیز مغزی وجود ندارد (۱۵). علاوه بر این موش‌های صحرایی ماده در مقایسه با نرها، انفارکتوس با وسعت کوچک‌تری بعد از ایسکمی داشتند و مصرف دوز فیزیولوژیک استروژن (۱۸) نقش حفاظتی داشت. مهار التهاب و خیز ناشی از جراحت مغزی توسط استروژن (۱۹) و پروژسترون (۲۰) گزارش شده است.

از آنجا که در مطالعات قبلی نویسندگان نشان داده شده که مصرف تنهای استروژن یا پروژسترون (۱۶،۲۱) یا مصرف ترکیبی استروژن با پروژسترون (۱۷) باعث کاهش خیزمغزی بعد از TBI در موش‌های صحرایی ماده می‌شود و از سوی دیگر بیان شده است که پروژسترون تولید سیتوکین‌های التهابی (IL-1β و TNF-α) را بعد از تروما و ایسکمی مغزی کاهش داده (۲۲) و استروژن مرگ سلول را از طریق کاهش TNF-α موجب می‌شود و به‌عبارت دیگر سیتوکین‌های التهابی و فاکتورهای رشد در آبشار حوادث بعد از TBI نقش دارند (۱۴)؛ بنابراین در مطالعه حاضر به منظور تعیین مکانیسم ضد التهابی و ضد خیزی استروئیدهای جنسی، اثر احتمالی دوزهای فیزیولوژیک و

فارماکولوژیک این هورمون‌ها بر روی مقادیر مغزی IL-1β، IL-6، TNF-α و TGF-β در موش‌های صحرایی ماده فاقد تخمدان در ۲۴ ساعت بعد از TBI بررسی شده است.

روش بررسی

در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی که با مجوز شماره ک/ع/۱۹-۸۷ کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت، از ۴۹ سر موش صحرایی (Rat) ماده از نژاد Albino NMARI با وزن ۲۵۰-۱۸۰ گرم استفاده شد که ۳ ماهه بوده و قبل از باروری از موش‌های صحرایی نر جدا شدند. حیوان‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی کرمان نگهداری شدند و آب و غذا آزادانه در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

حیوانات به‌طور تصادفی به ۷ گروه ۷تایی تقسیم شدند که در آن‌ها نمره نورولوژیک (VCS) بلافاصله بعد از ضربه، یک، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه و هم‌چنین میزان سیتوکین‌ها، ۱۷- بتااسترادیول و پروژسترون مغزی، ۲۴ ساعت بعد از ضربه اندازه‌گیری شد. گروه ۱، گروه کنترل شامل موش‌های صحرایی ماده طبیعی و سالم و گروه ۲، گروه شم (sham) در نظر گرفته شدند. گروه ۳، گروه حلال (veh) بود که شامل موش‌های صحرایی ترومایی بود که تخمدان آن‌ها برداشته شده بود و هم حجم استروژن یا پروژسترون (۰/۳۳ml/kg)، حلال آن‌ها (روغن کنجد+ بنزیل الکل) نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به‌صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد (۲۳). گروه ۴، گروه دوز فیزیولوژیک استروژن(E1)، شامل موش‌های صحرایی ماده‌ای می‌شد که تخمدان آن‌ها برداشته شده بود و ۳۳/۳μg/kg استروژن به‌صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به آن‌ها تزریق شد (۲۳). گروه ۵، گروه دوز فارماکولوژیک استروژن (E2) که مشابه با گروه ۴ ولی با دوز استروژن ۱mg/kg بود (۲۴). گروه ۶، گروه دوز فیزیولوژیک پروژسترون (P1) که مشابه با گروه ۴ بود، با این تفاوت که پروژسترون با دوز ۱/۷mg/kg مصرف شد (۲۳). گروه ۷، گروه دوز فارماکولوژیک پروژسترون (P2) که مشابه با گروه ۶، اما با دوز مصرفی پروژسترون ۸mg/kg بود (۲۴). استروژن، پروژسترون و حلال آن‌ها از شرکت دارویی ابوریحان (ایران) خریداری شد.

روش برداشتن تخمدان‌ها (ovariectomy)

بعد از بی‌هوشی با مخلوط کتامین (۶۰ mg/kg) و رامپون (۱۰mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی، حیوان به پشت خوابانده شده و موهای قسمت تحتانی شکم تراشیده و یک برش افقی به طول ۲ سانتی‌متر ایجاد می‌شد. سپس پوست، فاسیا و عضلات شکم باز شده، چربی‌ها و روده کنار زده شده تا رحم و لوله‌های رحمی مشاهده شوند. لوله رحم و پایه عروقی تخمدان با نخ کاتکوت ۴ در ناحیه پروگزیمال مسدود و از ناحیه دیستال قطع می‌شد و همین عمل در مورد تخمدان سمت دیگر بدن تکرار می‌شد. در انتها ۲-۱ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی داخل شکم ریخته، عضلات و پوست به‌ترتیب با نخ کاتکوت و سیلک ۲ صفر به روش پیوسته بخیه و محل زخم با محلول بتادین ضدعفونی می‌شد. حیوان تا ۲ ساعت تحت مراقبت ویژه قرار می‌گرفت (۲۵). هیچ‌یک از حیوانات حین عمل جراحی یا بعد از آن نمردند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی، تخمدان‌ها حداقل دو هفته قبل از هر عملیات دیگری برداشته می‌شدند.

روش ایجاد ضربه مغزی

ضربه مغزی ایجاد شده با شدت متوسط (moderate) از نوع منتشر (diffuse) و به روش مارمارو (Marmarou) بود و از دستگاه القای ضربه مغزی ساخت گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان استفاده شد که در آن وزنه ۲۵۰ گرمی از داخل ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲ متر به‌طور آزادانه بر روی سر حیوان بی‌هوش شده (توسط اتر) فرود می‌آمد در حالیکه یک صفحه استیل به‌منظور پخش یکنواخت ضربه

بر روی جمجمه قرار داشت. بعد از القای ضربه مغزی حیوان سریعاً به پمپ تنفسی (Animal respitator, SE, Germany) وصل می‌شد و پس از برقراری تنفس خودبه‌خودی، حیوان از دستگاه ونتیلاتور جدا و به قفس بازگردانده می‌شد (۲۳).

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک با اندازه‌گیری V.C.S (Veterinary Coma Scale) انجام شد. پیامد نورولوژیک به‌صورت نمره (۱۵-۳) بر اساس جدول ۱ که مجموع سه نمره: عمل حرکتی (۸-۱)، عمل چشمی (۴-۱) و عمل تنفسی (۳-۱) می‌باشد بیان می‌گردد (۲۶). هر چه این نمره بالاتر باشد پیامد نورولوژیک بهتر و هر چه پایین‌تر باشد پیامد نورولوژیک وخیم‌تر است. در این مطالعه این پیامد فوراً بعد از ضربه و ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه توسط فردی که اطلاعی نسبت به گروه‌بندی حیوانات نداشت، اندازه‌گیری می‌شد.

جدول ۱. *نحوه نمره‌گذاری برای ارزیابی پیامدهای نورولوژیک در روش veterinary coma scale*

متغیر		نمره
عمل حرکتی	طبیعی	۸
	خواب‌آلودگی خفیف با حرکات خودبه‌خودی و هدف‌دار	۷
	خواب‌آلودگی، قادرنبودن به ایستادن، اما حفظ خمیدگی سخت	۶
	خواب‌آلودگی، عقب‌کشیدن در برابر نیشگون گرفتن، بلندکردن سرنسبت به محرکات بینایی، بدون خمیدگی سخت	۵
	عقب‌کشیدن یا پا زدن در برابر نیشگون گرفتن	۴
	پا زدن خودبه‌خودی	۳
	وضعیت اکستانسیون (خودبه‌خودی یا در برابر محرکات)	۲
	پاسخ ندادن به تحریکات	۱
عمل چشم	طبیعی	۴
	بازشدن در برابر تحریکات	۳
	طبیعی بودن رفلکس‌های پلک	۲
	پاسخ ندادن پلک به تحریکات	۱
تنفس	طبیعی	۳
	آتاکسی	۲
	آپنه	۱

روش اندازه‌گیری سیتوکین‌ها، استرادیول وپروژسترون در مغز

موش‌های صحرایی ۲۴ ساعت بعد از ضربه با تیوپنتال (۵۰mg/kg) بی‌هوش شده و سپس مغز از جمجمه خارج و توسط نیتروژن مایع منجمد می‌گردید. هموژنیزاسیون مغز توسط دستگاه هموژنایزر انجام می‌گرفت. به این صورت که ۵۰۰ میلی‌گرم از هر مغز با ۲ میلی‌لیتر بافر (pH=۷/۲)

حـاوی Tris 50 mmol، Triton 100-x 0.5%، Nacl 150 mmol و کوکتل مهارکننده پروتئاز (Roche آلمان) مخلوط و محلول هموژنایز مـی‌شـد. سـپس بـا سـانتریفوژ یخچـال‌دار بـا دور g۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و روشناور آن برای اندازه‌گیری سیتوکین‌ها، β-استرادیول و پروژسترون استفاده می‌شد. اندازه‌گیری بـا کیت‌های ELISA (BMS، آمریکا) مخصوص اندازه‌گیـری Il-1β، Il-6، TNF-α و TGF-β و هـم‌چنـین β-اسـترادیول و پروژسترون در موش صحرایی انجام شد. به‌طـور خلاصـه نمونه‌های مورد نظر به چاهک‌هایی که حاوی آنتـی‌بـادی اولیـه ضـد Il-1β، Il-6، TNF-α و TGF-β، β-اسـترادیول و پروژسترون بودند ریخته و پس از نیم ساعت محلول متوقف کننده به محیط اضافه می‌گردید. تغییر رنگ کروموژن در طیف نوری ۴۵۰nm خوانده می‌شـد. مقـادیر Il-1β، TNF-α، Il-6 و بتا-استرادیول مغز به‌صورت پیکوگرم در میلی‌لیتر از هموژنایز مغز و مقادیر TGF-β و پروژسترون مغز به‌صورت نانوگرم در میلی‌لیتر از هموژنایز مغز بیان گردید (۱۳).

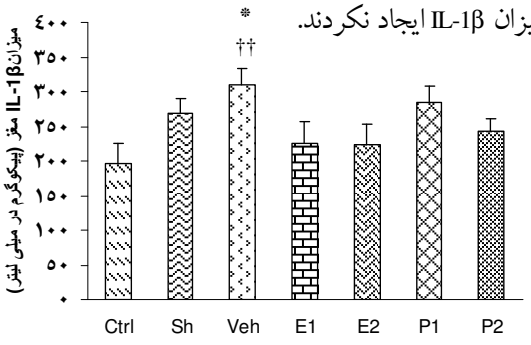
آنالیزآماری داده‌ها

داده‌های کمی به‌دست آمده برای گروه‌هـای مختلـف پس از آن که توزیع نرمال آن‌هـا مـشخص شـد، توسـط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و در صورت معنی‌دار شدن آزمون اولیه، برای پی‌بردن به اختلاف بین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده شـد. همـه داده‌هـا بـه‌صـورت میـانگین ± خطـای معیـار میـانگین (Mean ± SEM) بیان شد و نتایج با P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

مقادیر مغزی IL-1β به دنبال TBI

همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود مقـادیر مغـزی IL-1β در ۲۴ ساعت بعد از TBI افزایش پیدا کرد، به‌طوری که میزان IL-1β که در گروه کنترل pg/ml ۲۸/۷ ± ۱۹۶/۶ بود، در گروه ترومای مغزی تحت درمان با حلال به میزان pg/ml۳۰۹/۶±۲۴/۴ افزایش داشت (P<۰/۰۱). این میزان در گروه‌های ترومـای تحـت درمـان بـا دوز فیزیولوژیـک (pg/ml ۲۲۴/۶±۳۲/۸) یا دوز فارماکولوژیـک اسـتروژن (pg/ml۲۲۳/۶±۳۰/۱) در مقایسه با گروه ترومـایی تحـت درمان با حلال کاهش معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵)، اگر چه دوزهـای فیزیولوژیـک و خـصوصاً فارماکولوژیـک پروژسترون در مقایسه با گروه حـلال کـاهش در میـزان IL-1β ایجاد کردند، اما این کاهش معنی‌دار نبود. دوزهـای مختلف استروژن نیز با یکـدیگر اخـتلاف معنـی‌داری در میزان IL-1β ایجاد نکردند.



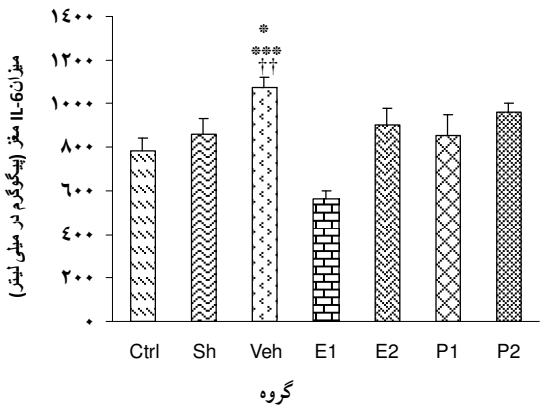
نمودار ۱. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون برروی میزان IL-1β (pg/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

Ctrl: گروه کنترل، Sh: گروه شم، Veh: گروه حلال، E1 و E2 به‌ترتیب گروه‌های دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن، P1 و P2 به‌ترتیب گروه‌های دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون. *: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 و E2 با گروه حلال (P<۰/۰۵)، ††: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه کنترل (P<۰/۰۱).

مقادیر مغزی IL-6 به دنبال TBI

همان‌طور که در نمـودار ۲ دیـده مـی‌شـود جراحـت تروماتیک مغزی (TBI) باعث افزایش معنی‌دار در میزان IL-6 می‌شود، به‌طوری که این میزان در گروه ترومایی تحـت درمان با حلال (pg/ml۱۰۷۳±۴۶/۱) در مقایسه با گروه شم (pg/ml۸۵۹/۳±۷۴/۶) و کنتـــــرل (pg/ml۷۸۴/۲±۵۸/۹)

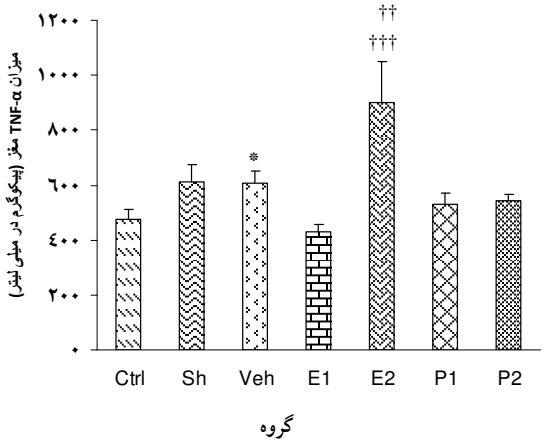
افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد (P<۰/۰۱). بعد از درمان گروه ترومایی با دوز فیزیولوژیک استروژن میزان IL-6، ۵۶۳/۹±۳۲/۷pg/ml بود که در مقایسه با گروه ترومایی تحت درمان با حلال کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱)؛ هم‌چنین دوز فیزیولوژیک پروژسترون (۸۵۲/۴±۹۹/۱pg/ml) نیز در مقایسه با گروه حلال میزان IL-6 را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵). هیچ‌یک از دوزهای فارماکولوژیک استروژن یا پروژسترون اثر مهاری معنی‌دار روی میزانIL-6 در مقایسه با حلال نداشتند.



نمودار ۲. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون برروی میزان IL-6 (pg/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. *: اختلاف معنی‌دار گروه P1 با گروه حلال (P<۰/۰۵)، ***: اختلاف معنی‌دار گروه E1 با گروه حلال (P<۰/۰۰۱)، ††: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه‌های کنترل و شم (P<۰/۰۱).

فارماکولوژیک استروژن pg/ml ۹۰۲/۱±۲۴۸/۵ بود که در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی‌دار را نشان داد (P<۰/۰۵)، اگرچه هیچ‌یک از گروه‌های دیگر دارای اختلاف معنی‌دار با گروه حلال نداشتند، اما اختلاف معنی‌دار بین دوز فارماکولوژیک استروژن با دوزهای فیزیولوژیک استروژن (P<۰/۰۰۱، ۴۳۱/۱±۲۸/۵pg/ml)، فیزیولوژیک پروژسترون (P< ۰/۰۱، ۵۳۰/۵±۴۲pg/ml) و فارماکولوژیک پروژسترون (P<۰/۰۱ و ۵۴۵/۶±۲۱/۲pg/ml) وجود داشت.



نمودار ۳. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون برروی میزان TNF-α (pg/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. *: اختلاف معنی‌دار گروه E2 با گروه حلال (P<۰/۰۵)، ††:اختلاف معنی‌دار گروه E2 با گروه‌های P1 و P2(P<۰/۰۱)، †††: اختلاف معنی‌دار گروه E2 با گروه E1 (P<۰/۰۰۱).

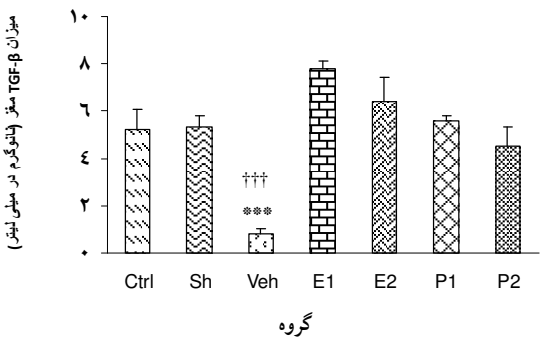
مقادیر مغزی TNF-α به دنبال TBI

در نمودار ۳، مقادیر مغزی TNF-α در گروه‌های مختلف مطالعه نشان داده شده‌است، مقدار TNF-α در گروه شم، ۶۰۹/۸±۶۳/۶pg/ml بود که با گروه‌های ترومایی تحت درمان با حلال (۶۰۷/۲±۴۶/۹pg/ml) و کنترل (۴۷۳/۴±۴۰/۲pg/ml) دارای اختلاف معنی‌دار نیست. میزان TNF-α در گروه ترومایی تحت درمان با دوز

مقادیر مغزی TGF-β به دنبال TBI

مقادیر TGF-β به‌عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی نیز اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در نمودار ۴ دیده می‌شود مقادیر مغزی TGF-β بعد از جراحت تروماتیک مغزی در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان تحت درمان با حلال (۰/۸±۰/۲ng/ml) در مقایسه با گروه‌های شم (۵/۳±۰/۵ng/ml) و کنترل (۵/۲±۰/۹ng/ml) کاهش

معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) نشان داد. میزان TGF-β در گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک (۷/۸±۰/۳ng/ml) یا فارماکولوژیک استروژن (۶/۵±۱ng/ml) و هم‌چنین گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک (۵/۶±۰/۲ng/ml) یا فارماکولوژیک پروژسترون (۴/۵±۰/۸ng/ml) در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۰۱). دوزهای مختلف استروژن و یا پروژسترون در این زمینه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نکردند.

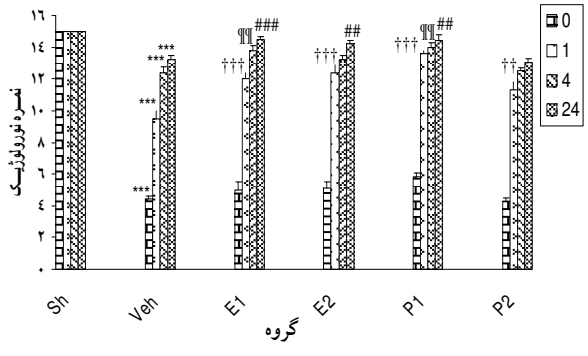


نمودار ٤. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان TGF-β (ng/ml) در ٢٤ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. ***: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 یا E2 یا P1 یا P2 با گروه حلال (P< ۰/۰۰۱)، †††: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه‌های کنترل و شم (P<۰/۰۰۱).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری پیامد نورولوژیک

یک ساعت قبل از ضربه، نمره نورولوژیک در همه گروه‌ها ۱۵ بود (در نمودار نشان داده نشده‌است). در لحظه صفر، یعنی فوراً بعد از TBI نمره پیامد نورولوژیک در گروه شم (۱۵) بیشتر از گروه حلال (۴/۴±۰/۲) بود (P<۰/۰۰۱). در یک ساعت بعد از TBI نمره پیامد نورولوژیک در گروه حلال (۹/۵±۰/۵) کمتر از گروه‌های شم (P<۰/۰۰۱، ۱۵)، E1 (P<۰/۰۰۱، ۱۲±۰/۴)، E2 (P<۰/۰۰۱، ۱۲/۴±۰/۵)، P1 (P<۰/۰۰۱، ۱۳/۶±۰/۲) و P2 (P<۰/۰۱، ۱۱/۳±۰/۵) بود. در۴ ساعت بعد از TBI این نمره (۱۲/۴±۰/۴) در گروه حلال کمتر از گروه‌های شم (P<۰/۰۰۱، ۱۵)، E1 (P<۰/۰۱، ۱۳/۸±۰/۳) و P1 (P<۰/۰۱، ۱۴±۰/۳) و در۲۴ ساعت بعد از TBI این نمره (۱۳/۲±۰/۳) در گروه حلال کمتر از گروه‌های شم (P<۰/۰۰۱ ، ۱۵)، E1 (P<۰/۰۱ ، ۱۴/۵±۰/۲)، E2 (P<۰/۰۱ ، ۱۴/۲±۰/۲) و P1 (P<۰/۰۱ ، ۱۴/۴±۰/۴) بود (نمودار ۵).



نمودار ۵. *اثر تجویز استروژن یا پروژسترون بر روی نمره نورولوژیک (VCS) فورا بعد از ضربه، ۱، ٤ و ٢٤ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

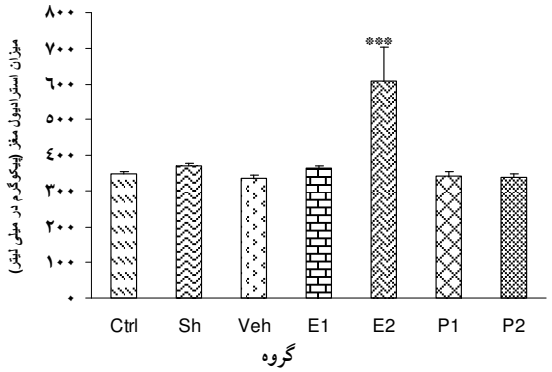
معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. ***: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه شم فورا، یک، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه (P< ۰/۰۰۱). ††: اختلاف معنی‌دار گروهP2 با گروه حلال در یک ساعت بعد از ضربه (P< ۰/۰۱). †††: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1، E2 و P1 با گروه حلال در یک ساعت بعد از ضربه (P< ۰/۰۰۱). ¶¶: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 و P1 با گروه حلال در ۴ ساعت بعد از ضربه (P< ۰/۰۱). ##: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E2و P1 با گروه حلال در ۲۴ ساعت بعد از ضربه (P<۰/۰۱). ### اختلاف معنی‌دار گروه E1 با گروه حلال در ۲۴ ساعت بعد از ضربه (P<۰/۰۰۱).

تغییرات در مقادیر مغزی هورمون‌های استروئیدی جنسی

میزان ۱۷- بتا استرادیول مغزی در ۲۴ ساعت بعد از TBI اندازه‌گیری و در نمودار ۶ نشان داده شده است. مقدار۱۷-بتا استرادیول در گروه تحت درمان با حلال ۳۳۳/۴±۱۰/۵pg/ml بود که تقریباً معادل با میزان ۱۷-بتا استرادیول در گروه‌های شم (۳۷۰/۹±۷/۷pg/ml) و کنترل (۳۴۷/۵±۸/۱pg/ml) است. مقدار۱۷- بتا استرادیول در گروه

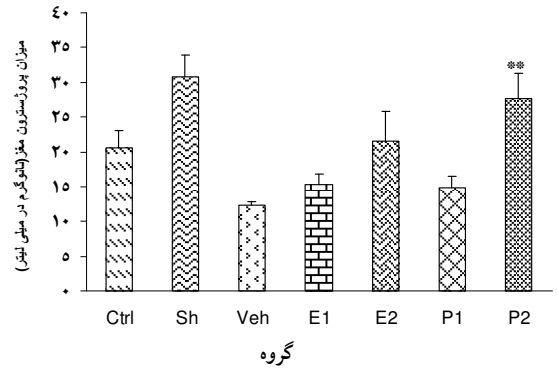
دوز فارماکولوژیک استروژن (۶۰۸/۷±۹۴/۳ pg/ml) دارای بیشترین مقدار بوده و افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱)، علاوه بر این بین گروه دوز فارماکولوژیک استروژن با بقیه گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۰۱).

تغییرات در مقادیر مغزی پروژسترون در گروه‌های مختلف در نمودار ۷ نمایش داده شده است. میزان پروژسترون در گروه شم ۳۰/۷±۳/۳ng/ml بود که اختلاف معنی‌دار با گروه تروماپی تحت درمان با حلال (۱۲/۳±۰/۵۱ng/ml) داشت (P< ۰/۰۱). میزان پروژسترون در گروه دوز فارماکولوژیک ۲۷/۷±۳/۶ ng/ml بود که در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۱). هم‌چنین اختلاف معنی‌دار بین گروه دوز فارماکولوژیک پروژسترون با گروه‌های دوزهای فیزیولوژیک استروژن، پروژسترون و یا دوز فارماکولوژیک استروژن از نظر مقادیر مغزی پروژسترون وجود داشت (P<۰/۰۱).



نمودار ٦. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان بتا – استرادیول ۲٤ ساعت بعد از ضربه مغزی متشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. ***: اختلاف معنی‌دار گروه E2 با گروه حلال (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۷. *اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان پروژسترون ۲٤ ساعت بعد از ضربه مغزی متشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان*

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. **: اختلاف معنی‌دار گروه P2 با گروه حلال (P< ۰/۰۱).

بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد که IL-1β و IL-6 مغزی ۲۴ ساعت بعد از TBI افزایش می‌یابد، به‌طوری که اختلاف معنی‌دار بین مقادیر این دو سیتوکین در گروه TBI در مقایسه با شم وجود دارد. دوزهای فیزیولوژیک یا فارماکولوژیک استروژن باعث کاهش میزان IL-1β، بعد از جراحت می‌شوند. غلظت IL-1β در بیماران با ICP بالاتر، در مقایسه با ICP کمتر، بیشتر است (۲۷). مهار تولید IL-1β، آسیب نورونی ناشی از TBI را مهار نموده (۲۸) و تجویز آنتاگونیست گیرنده IL-1β به‌دنبال TBI، کاهش پاسخ‌های آناتومیکی و عملکردی التهاب نورونی را موجب می‌شود (۲۹) که این عمل IL-1β ممکن است با واسطه PGE_2 (۳۰)، NO (۳۱) و PLA_2 (۳۲) باشد. هم‌چنین افزایش میزان IL-1β بعد از TBI نیز ممکن است به‌علت افزایش IL-6 باشد (۱۴).

دوزهای فیزیولوژیک استروژن یا پروژسترون باعث کاهش میزان IL-6 می‌شوند. مقدار IL-6 در CSF، ۲۴ ساعت بعد از تروما به حداکثر خود می‌رسد و رهایش IL-6 در CNS همراه با پاسخ حاد به‌دنبال TBI در انسان است (۳۳). بنابراین کاهش ساخت این سیتوکین توسط استروژن و پروژسترون هم‌زمان با افزایش بیان ژن و ساخت حداکثری

این سیتوکین است. افزایش تولید IL-6 منجر به از دست رفتن نورونی، اختلال در عملکرد سد خونی – مغزی و نارسایی عروق همراه با بیماری شدید نورولوژی می‌شود (۳۴) که این افزایش IL-6 ممکن است به‌علت افزایش IL-1β بعد از تروما باشد (۳۰).

روش ایجاد تروما در مطالعه حاضر که همان ترومای منتشر مغزی با روش پیشنهادی مارمارو می‌باشد و یک TBI متوسط (Moderate) ایجاد می‌کند، باعث تغییر در میزان TNF-α مغزی در ۲۴ ساعت بعد از TBI نمی‌شود، به‌طوری که اختلاف معنی‌دار بین حلال و شم وجود نداشت. عدم افزایش TNF-α در مطالعه دیگری نیز تأیید شده است (۳۵). در مطالعه حاضر با وجود این‌که میزان TNF-α بعد از تروما افزایش پیدا نکرده، میزان آن در حیوان ترومایی بعد از مصرف دوز فارماکولوژیک استروژن افزایش پیدا کرد. گزارش شده است که افزایش TNF-α در فاز حاد بعد از TBI مضر است در حالی که افزایش آن در دراز مدت بعد از جراحت مفید است که یکی از مکانیسم‌های مفید آن تولید فاکتور رشد عصبی (NGF) است (۳۶).

TBI، منجر به کاهش TGF-β در ۲۴ ساعت بعد از جراحت می‌شود. همه دوزهای مصرفی مربوط به هر دو هورمون استروئیدی جنسی باعث افزایش TGF-β می‌شوند که افزایش ناشی از استروژن بیشتر از پروژسترون است. در اختلالات TBI، TGF-β باعث مهار تولید IL-1β، TNF-α و رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۳۷). تولید موضعی TGF-β در مغز نشان داده شده و این ماده احتمالاً باعث تضعیف التهاب مغزی می‌شود (۳۸).

مشاهدات مطالعه حاضر، نشان‌دهنده این است که اولاً اگر این هورمون‌ها فوراً بعد از TBI مصرف شوند توانایی تغییر میزان سیتوکین‌های مغزی را دارند؛ ثانیاً اثرات استروژن و پروژسترون بر روی میزان مغزی IL-6 و TNF-α وابسته به دوز است؛ بدین معنی که فقط دوز فیزیولوژیک استروژن یا فقط دوز فیزیولوژیک پروژسترون باعث کاهش IL-6 شد و هم‌چنین فقط دوز فارماکولوژیک استروژن باعث افزایش TNF-α می‌شود و دوز فیزیولوژیک آن فاقد اثر است. اثرات وابسته به دوز این هورمون‌ها بر روی آبشار حوادث بعد از TBI توسط مطالعات دیگران نیز تأیید شده است. دوز زیاد پروژسترون حجم آسیب به‌دنبال ایسکمی مغزی را کاهش داده (۳۹) در حالی که دوز اندک آن فاقد این اثر است (۴۰). پروژسترون خارجی دارای عمل نوروپروتکتیو وابسته به دوز و زمان در سکته مغزی تجربی است (۴۱). به‌دنبال تجویز دوز بالای پروژسترون جراحت مغزی تشدید شده (۴۲) در حالی که دوز کمتر آن دارای اثر نوروپروتکتیو است (۴۱). استروژن در غلظت زیاد بر میزان TGF-β اثر دارد در حالی که پروژسترون در غلظت کم روی میزان TGF-β اثر می‌گذارد (۴۳).

کاهش مقدار IL-1β مغزی توسط استروژن که در مطالعه حاضر مشاهده شد، هماهنگ با یک مطالعه دیگر است (۴۴) و عدم تأثیر پروژسترون بر روی میزان IL-1β توسط پژوهش دیگری نیز تأیید شده است (۴۵)؛ بنابراین کاهش IL-1β یکی از مکانیسم‌های واسطه برای عمل ضدالتهابی استروژن و بقیه اعمال نوروپروتکتیوی آن می‌باشد، اگرچه این مکانیسم برای عملکرد پروژسترون مطرح نمی‌باشد و احتمالاً پروژسترون از طریق مکانیسم‌های دیگر از قبیل عمل بر روی نفوذپذیری عروق، عمل آنتی‌اکسیدانی، کاهش ماتریکس متالوپروتئیناز، تغییرات در گیرنده گابا و یا کاهش NO و PGE_2 ناشی از IL-1β و یا کاهش گیرنده‌های IL-1β اثر ضد خیزی خود را اعمال نموده است (۱۴،۴۶،۴۷). البته غلظت بتا - استرادیول مغزی در گروه دوز فیزیولوژیک استروژن با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهد. هرچند این اختلاف در گروه دوز فارماکولوژیک استروژن معنی‌دار است و شاید یکی از دلایل اثر استروژن تزریقی در این گروه افزایش غلظت بتا – استرادیول مغزی باشد. تعدادی از مطالعات اثر افزایشی برای استروژن (۴۸) و اثر کاهشی برای پروژسترون (۲۰،۴۷) در ارتباط با میزان IL-1β بعد از TBI را مطرح کرده‌اند که دلایل احتمالی اختلاف نتایج آن‌ها با مطالعه

حاضر به‌علت تفاوت در نوع و شدت جراحت، دوز و زمان مصرف هورمون‌ها و هم‌چنین نوع حلال به‌کار برده شده و یا به‌علت مصرف تنهای استروژن و پروژسترون باشد (۴۹).

در مطالعه حاضر استروژن و پروژسترون در دوزهای فیزیولوژیک (اندک) باعث کاهش IL-6 در مغز شدند که این نتیجه هماهنگ با نتایج پژوهش‌های دیگر در ارتباط با اثر کاهشی استروژن (۵۰) و پروژسترون (۵۱) بر روی IL-6 می‌باشد. از این یافته نتیجه‌گیری می‌شود، که این اثر احتمالاً یکی از مکانیسم‌های ضدالتهابی دو هورمون جنسی در اثرات نوروپروتکتیو آن‌ها بعد از TBI است. البته مکانیسم‌های دیگر به غیر از کاهش IL-6 را نیز نباید از نظر دور داشت. غلظت هورمون بتا - استرادیول در مغز در گروه دوز فیزیولوژیک استروژن و هم‌چنین غلظت هورمون پروژسترون مغزی در گروه دوز فیزیولوژیک پروژسترون دارای اختلاف معنی‌دار با گروه تحت درمان با حلال نبود و این بدین معنی است که احتمالاً غلظت پایه در این گروه کافی برای پیدایش این اثر کاهشی است. اگرچه احتمالات دیگر، از قبیل تغییر در تعداد و پاسخ‌دهی گیرنده این هورمون‌ها بعد از TBI را نیز باید دخیل دانست (۵۲). در یکی از بررسی‌ها نتایجی خلاف نتایج مطالعه حاضر در مورد اثر استروژن و پروژسترون بر IL-6 گزارش شده است (۵۳) که دلایل اختلاف نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر همان مطالب قبلی بیان شده در پاراگراف قبلی است.

گروه دوز فارماکولوژیک استروژن که غلظت مغزی بتا – استرادیول در آن بیش از ۱/۵ برابر غلظت آن در گروه تحت درمان با دوز فیزیولوژیک بود، TNF-α مغزی را حدود ۱/۵ برابر افزایش داد، که این افزایش فقط در همین گروه مشاهده شد و در گروه‌های دیگر این اثر مشاهده نشد. افزایش TNF-α به‌وسیله استروژن و عدم تأثیر پروژسترون بر روی آن در مطالعات دیگر نیز گزارش شده‌است (۴۴،۴۵،۴۷). با این وجود در کنار اثر استروژن در کاهش IL-1β، اثر افزایشی آن بر روی TNF-α را نیز به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی دخیل در اثر ضدالتهابی استروژن می‌توان در نظر گرفت. تعدادی پژوهش که دارای نتایج مخالف با نتایج مطالعه حاضر می‌باشند، نیز وجود دارد (۵۰،۵۴) که دلایل احتمالی تفاوت در نتایج با یکدیگر در پاراگراف قبلی مطرح شد.

نتایج بخش دیگر پژوهش نشان دادند که نه تنها هر دو استروئید جنسی باعث افزایش TGF-β می‌شوند، بلکه هر دو دوز (فیزیولوژیک و فارماکولوژیک) این هورمون‌ها نیز این اثر را دارا می‌باشند. با توجه به این که اثرات ضد التهابی TGF-β بر اثرات التهاب‌زایی آن غالب است، بنابراین احتمالاً یکی از مکانیسم‌های ضد التهابی استروئیدهای جنسی، علاوه بر مکانیسم‌های دیگر، افزایش TGF-β است. تعدادی مطالعات اثر استروژن و پروژسترون را بر روی TGF-β گزارش نموده‌اند (۴۳،۴۷). این هورمون‌ها احتمالاً از طریق تغییر میزان IL-1β (۴۶)، تغییر در رهایش سیتوکین‌ها از یاخته‌های مغزی و سلول‌های خونی و جلوگیری از تخریب سد خونی – مغزی (۱۴) افزایش TGF-β را موجب شده‌اند.

در بخش دیگر این مطالعه با اندازه‌گیری نمره VCS مشخص گردید که یک ساعت بعد از تروما، دوزهای مختلف استروژن و پروژسترون توانایی افزایش نمره VCS را دارند، به عبارت دیگر اگر هدف، افزایش نمره VCS در همان ساعت اول بعد از TBI باشد، هم استروژن و هم پروژسترون در هر دو دوز مفید هستند. اما ۴ ساعت بعد از تروما تنها دوزهای کم استروژن و پروژسترون نمره VCS را افزایش دادند، بدین معنی که اثر دوز زیاد استروژن و پروژسترون با گذشت زمان ناپدید می‌شود. در ۲۴ ساعت بعد از تروما، اثر دوزهای فیزیولوژیک استروژن و پروژسترون و دوز فارماکولوژیک استروژن بر روی افزایش نمره VCS باقی مانده است. بنابراین در زمان‌های ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از تروما دوز فیزیولوژیک استروژن و پروژسترون، در همه این زمان‌ها برای افزایش نمره VCS مفید می‌باشد.

بر اساس نمره‌های VCS (GCS) ، جراحت تروماتیک مغز به ۳ گروه تقسیم می‌شود (۵۵): ضربه مغزی خفیف (GCS=۱۳-۱۵)، متوسط (GCS=۹-۱۲) و شدید (GCS=۳-۸). بنابراین نمره VCS بالاتر در TBI نشانه وضعیت بهتر است و یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادکه در ساعت اول بعد از ضربه مصرف هرکدام ازهورمون‌های تخمدانی در دوزهای کم و زیاد دارای این عمل مفید هستند. اما در طول زمان ۲۴ ساعت بعد از TBI اثر دوز کم استروژن و پروژسترون و دوز زیاد استروژن باقی می‌ماندکه نشان دهنده این است که اثر پروژسترون بر روی نمره VCS، مثل بسیاری از اثرات آن وابسته به دوز و زمان است (۴۱،۴۲). اما اثراستروژن هم در دوزکم و هم در دوز زیاد در افزایش نمره VCS در طول زمان وجود دارد.

با توجه به تغییرات غلظت هورمون‌های جنسی در مغز در۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی که غلظت استرادیول مغز درگروه دوز زیاد استروژن ۱/۸ برابر افزایش نشان می‌دهد ولی درگروه دوزکم استروژن و پروژسترون چنین افزایشی آشکار نیست، چنین نتیجه‌گیری می‌شودکه افزایش استروژن مغز در افزایش نمره VCS مؤثر نیست. با توجه به نتایج بررسی سیتوکین‌های مغزی در ۲۴ ساعت بعد از ضربه و نتایج VCS در ۲۴ ساعت بعد از ضربه، شاید بتوان گفت اثرات متفاوت دوزهای مختلف هورمون‌های جنسی بر روی نمره VCS در طول زمان از طریق تغییرات سیتوکین‌های مغزی وساطت می‌شودکه در این زمینه احتیاج به تحقیق بیشتری است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که هورمون‌های استروئیدی جنسی احتمالاً از طریق تغییر در میزان سیتوکین‌های مغزی (IL-1β، IL-6، TNF-α و TGF-β) حداقل قسمتی از ویژگی نوروپروتکتیو خود برای کاهش خیز مغزی و بهبود پیامدهای نورولوژیک را موجب می‌شوند. احتمالاً دوزهای فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن، از طریق کاهش IL-1β و یا افزایش TGF-β، دوز فارماکولوژیک استروژن از طریق افزایش TNF-α و همین طور دوز فیزیولوژیک استروژن از طریق کاهش IL-6 اثر ضد التهابی خود را اعمال می‌کنند. دوزهای فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون از طریق افزایش TGF-β و همین‌طور دوز فیزیولوژیک پروژسترون از طریق کاهش IL-6 در کنار مکانیسم‌های دیگر، کاهش خیزمغزی و بهبود پیامدهای نورولوژیک در ۲۴ ساعت بعد از TBI را موجب می‌شوند. این اثرات در مورد استروئیدهای جنسی به‌ویژه پروژسترون وابسته به دوز بود. این موضوع که این اثرات هورمون‌ها مستقیم یا غیرمستقیم اعمال شده و این که کدام نوع گیرنده (داخل سلولی یا غشایی) این اثرات را واسطه‌گری نموده است، احتیاج به پژوهش‌های بیشتر دارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مشترکی می‌باشد که در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان و مرکز تحقیقات فیزیولوژی اهواز تصویب شده و بدین وسیله از زحمات رؤسای دو مرکز و بقیه همکاران تشکر به عمل می‌آید. هم‌چنین از جناب آقای دکتر مشتاقی کاشانیان، آقای رجبی، سرکار خانم یزدان‌پناه، آقای قطبی، آقای بخشی و آقای مهدیزاده که در انجام پژوهش کمک نموده‌اند نیز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

The Role of Proinflammatory Cytokines in Mediation of Brain Antiedema Effect of Female Sex Steroids Following Traumatic Brain Injury

Soltani Z., M.Sc.[1], Khaksari Haddad M., Ph.D.[2*], Sarkaki A.R., Ph.D.[3], Keshavarzi Z., M.Sc.[4] , Esmaili F., M.Sc.[5], Jokar S., Ph.D.[6]

1. Ph.D. Student in Physiology, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Professor of Physiology, Physiology Research Center and Bam International Unit, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Associate Professor of Physiology, Physiology Research Center, Ahwaz University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran
4. Ph.D. Student in Physiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5. Instructor, Dept. of Physiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
6. Assistant Professor of Physiology, Physiology research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: khaksar38@yahoo.co.uk

(Received: 8 March 2010 Accepted: 8 Sep. 2010)

Abstract

Background & Aims: Release of proinflammatory cytokines after traumatic brain injury (TBI) is a major cause of brain edema. Previous studies demonstrated that sex steroids decrease brain edema induced by TBI. In this study changes of brain cytokines after the administration of estrogen and progesterone 24 hours after TBI were evaluated.

Materials and Methods: Female rats were divided into 7 groups. Groups 1 and 2 were considered as control and sham respectively and other 5 groups underwent bilateral ovariectomy and considered as vehicle, physiologic does of estrogen (E1), pharmacologic dose of estrogen (E2), physiologic dose of progesterone (P1) and pharmacologic dose of progesterone (P2). Vehicle and sexual steroid hormones were injected intraperitoneally 30 minutes after TBI. Moderate TBI was induced by Marmarou method. Neurologic scores (VCS) were evaluated immediately, 1 h, 4 h and 24 h after TBI. Brain level of IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF- estrogen and progesterone were measured 24 hours after TBI by ELISA method.

Results: E1 and E2 groups showed respectively 27.5% and 27% decrease in brain level of IL-1β compared to vehicle. Brain level of IL-1β increased in vehicle group compared to sham. E1 and P1 groups showed respectively 47% and 20.5% decrease of brain IL-6 level compared to vehicle. Brain Level of TNF-α increased 48.5% in E2 group compared to the vehicle group. Both estrogen and progesterone in physiologic and pharmacologic doses increased TGF-β, but the highest increase of TGF-β level was about 9.5 times and was observed in E1 group. Brain level of β-Estradiol increased 1.8 times in E2 group and progesterone increased 1.84 times in P2 group compared to the vehicle group. Veterinary coma scale (VCS) increased in E1, E2, P1 and P2 group at 1 hour after TBI, whereas, 4 h after TBI only in E1 and P1 and 24 h after TBI, in E1, E2 and P1 groups VCS, showed increase.

Conclusion: Neuroprotective effect of sex hormones in reducing cerebral edema is probably performed by decrease of brain level of IL-1β and IL-6 and increase of brain level of TNF-α and TGF-β after TBI.

Keywords: Brain injury, Estrogen, Progesterone, IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β

Journal of Kerman University of Medical Sciences، 2011; 18(2): 107-122

References

1. Marmarou A, Anderson RL, Ward JD, Choi SC, Young HF, Eisenberg HM, et al. Impact of instability and hypotension on outcome in patients with severe head trauma. *J Neurosurg* 1991; 75: S59-S66.
2. Donkin JJ, Nimmo AJ, Cernak I, Blumbergs PC, Vink R. Substance P is associated with the development of brain edema and functional deficits after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29(8):1388-98.
3. Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Pauser S, Vollmann W. Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir Suppl* 1997; 70:106-8.
4. Stahel PF, Shohami E, Younis FM, Kariya K, Otto VI, Lenzlinger PM, et al. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(2):369-80.
5. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):34-41.
6. Betz AL, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke* 1990;21(8):1199-204.
7. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood- brain barrier. *Prog Drug Res* 2003;61:39-78.
8. Rancan M, Otto VI, Hans VH, Gerlach I, Jork R, Trentz O, et al. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats. *J Neurosci Res* 2001; 63(5):438-46.
9. Morganti-Kossman MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, et al. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry* 1997; 2(2):133-6.
10. Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J Neurotrauma* 1994;11(5):447-72.
11. Bramlett HM, Furones-Alonso O, Lotocki G, Rodriguez-Paez A, Sanchez- Molano J, Keane RW. Sex differences in XIAP cleavage after traumatic brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 2009; 461(1): 49-53.
12. Young AB, Ott LG, Beard D, Dempsey RJ, Tibbs PA, McClain CJ. The acute- phase response of the brain-injured patient. *J Neurosurg* 1988; 69(3): 375-80.
13. Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 1993; 42(2): 177-85.
14. Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 2001; 24(1-3):169-81.
15. Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res* 1993; 607(1-2):333-6.

16. Ahmad molaie L, Khaksari M, Sepehri G, Dabiri S, Asadikaram G, Mahmodi M, et al. Comparison of the effects of progesterone, allopregnanolone and gender on supressing edema formation after traumatic brain injury. *J Kerman Univ Med Sci* 2007; 15(1): 47 [Persian].

17. Soltani Z, Khaksari M, Shahrokhi N, Nakhaei N, Shaibani V. Effect of Combined Administration of Estrogen and Progesterone on Brain Edema and Neurological Outcome after Traumatic Brain Injury in Female Rats. *Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism* 2009; 10(6): 629-38 [Persian].

18. Koerner IP, Zhang W, Cheng J, Parker S, Hurn PD, Alkayed NJ. Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia. *Front Biosci* 2008; 13: 2833-41.

19. Stein DG, Hoffman SW. Estrogen and progesterone as neuroprotective agents in the treatment of acute brain injuries. *Pediatr Rehabil* 2003; 6(1): 13-22.

20. He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2004; 189(2): 404-12.

21. Shahrokhi N, Khaksari M, Soltani Z, Mahmoodi M, N. N. The effect of sex steroid hormones on brain edema, intracranial pressure and neurologic outcome after traumatic brain injury. 2010 [Persian].

22. Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55(2): 127-38.

23. O'Connor CA, Cernak I, Vink R. Both estrogen and progesterone attenuate edema formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2005; 1062(1-2): 171-4.

24. Galani R, Hoffman SW, Stein DG. Effects of the duration of progesterone treatment on the resolution of cerebral edema induced by cortical contusions in rats. *Restor Neurol Neurosci* 2001; 18(4): 161-6.

25. Shahabinejad M, Khaksari M. Inspection of 17-beta estradiol effect on wound recovery in ovarectomized rats. *Journal of Semnan University of Medical Sciences* 2001; 3(1,2): 1-10 [Persian].

26. King DR, Cohn SM, Proctor KG. Changes in intracranial pressure, coagulation, and neurologic outcome after resuscitation from experimental traumatic brain injury with hetastarch. *Surgery* 2004; 136(2): 355-63.

27. Shiozaki T, Hayakata T, Tasaki O, Hosotubo H, Fuijita K, Mouri T, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early- phase severe traumatic brain injury. *Shock* 2005; 23(5): 406-10.

28. Lu KT, Wu CY, Yen HH, Peng JH, Wang CL, Yang YL. Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurol Res* 2007; 29(4): 404-9.

29. Jones NC, Prior MJ, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S. Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. *Eur J Neurosci* 2005; 22(1): 72-8.

30. Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A,

Danielsson E, et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1113: 173-7.

31. Kharfi A, Boucher A, Akoum A. Abnormal interleukin-1 receptor type II gene expression in the endometrium of women with endometriosis. *Biol Reprod* 2002; 66(2): 401-6.

32. Dinarello CA, Cannon JG, Mier JW, Bernheim HA, LoPreste G, Lynn DL, et al. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J Clin Invest* 1986; 77(6):1734-9.

33. Hans VH, Kossmann T, Joller H, Otto V, Morganti-Kossmann MC. Interleukin-6 and its soluble receptor in serum and cerebrospinal fluid after cerebral trauma. *Neuroreport* 1999; 10(2):409-12.

34. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(21): 10061-5.

35. Venetsanou K, Vlachos K, Moles A, Fragakis G, Fildissis G, Baltopoulos G. Hypolipoproteinemia and hyperinflammatory cytokines in serum of severe and moderate traumatic brain injury (TBI) patients. *Eur Cytokine Netw* 2007; 18(4): 206-9.

36. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998; 153(1):143-51.

37. Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994; 180(5): 1587-90.

38. Wang Y, Moges H, Bharucha Y, Symes A. Smad3 null mice display more rapid wound closure and reduced scar formation after a stab wound to the cerebral cortex. *Exp Neurol* 2007; 203(1):168-84.

39. Kumon Y, Kim SC, Tompkins P, Stevens A, Sakaki S, Loftus CM. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2000;92(5):848-52.

40. Chen J, Chopp M, Li Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci* 1999; 171(1): 24- 30.

41. Murphy SJ, Littleton-Kearney MT, Hurn PD. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(10): 1181-8.

42. Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Duckles SP. Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 2000; 31(5): 1173-8.

43. Hatthachote P, Gillespie JI. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. *Endocrinology* 1999; 140(6): 2533-40.

44. Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, et al. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* 2007; 132(3):982-93.

45. Jones NC, Constantin D, Prior MJ, Morris PG, Marsden CA, Murphy S. The

neuroprotective effect of progesterone after traumatic brain injury in male mice is independent of both the inflammatory response and growth factor expression. *Eur J Neurosci* 2005; 21(6):1547-54.

46. Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. Endocrine 2006; 29(2):217-31.

47. Gibson CL, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2005; 193(2): 522-30.

48. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Serioli B, Secchi ME, Villaggio B, et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 538-47.

49. Yuan K, Wing LY, Lin MT. Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. *J Periodontol* 2002; 73(7):701-8.

50. Jain SK, Kannan K, Prouty L, Jain SK. Progesterone, but not 17beta-estradiol, increases TNF-alpha secretion in U937 monocytes. *Cytokine* 2004; 26(3):102- 5.

51. Cutler SM, Cekic M, Miller DM, Wali B, VanLandingham JW, Stein DG. Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat. *J Neurotrauma* 2007; 24(9):1475-86.

52. Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1007: 89-100.

53. Crandall C, Palla S, Reboussin B, Hu P, Barrett-Connor E, Reuben D, et al. Cross-sectional association between markers of inflammation and serum sex steroid levels in the postmenopausal estrogen/progestin interventions trial. *J Womens Health (Larchmt)* 2006; 15(1):14-23.

54. Hrekova SP, Vodianyk MO, Chernyshov VP. Effect of progesterone and 17beta-estradiol on proinflammatory cytokine costimulatory proliferative activity. *Fiziol Zh* 2002; 48(4): 63-9.

55. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Erythrocyte indicators of oxidative changes in patients with graded traumatic head injury. *Neurol India* 2008; 56(1):31-5.