

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

زهرا سلطانی^۱، محمد خاکساری حداد^{۲*}، علیرضا سرکاسی^۳، زکریه کشاورزی^۴، فرزانه اسماعیلی^۵، سیاوش جوکار^۶

خلاصه

مقدمه: علت اصلی خیز مغزی به دنبال جراحی تروماتیک مغزی (TBI)، رهائش 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 به دنبال 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 به ترتیب کنترل و شم بودند و در بقیه حیوانات تخمدان به صورت 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 $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ و $TGF-\beta$ 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 به ترتیب ۲۷/۵٪ و ۲۷٪ کاهش در میزان مغزی $IL-1\beta$ نشان دادند. $IL-1\beta$ در گروه حلال در مقایسه با گروه شم، افزایش نشان داد. مقدار $IL-6$ مغزی در گروه‌های E_1 و P_1 به ترتیب ۴۷٪ و ۲۰/۵٪ در مقایسه با گروه حلال کاهش یافت. در گروه E_2 میزان مغزی $TNF-\alpha$ 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 $TGF-\beta$ 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 ، P_1 و P_2 نمرات نورولوژیک 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 $IL-1\beta$ و $IL-6$ و افزایش در میزان مغزی $TNF-\alpha$ و $TGF-\beta$ موجب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: TBI، استروژن، پروژسترون، $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $TGF-\beta$

- 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 دکتری 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

مقدمه

جراحی تروماتیک مغزی (TBI) منجر به ادم غالب، اما متغیر در بافت‌های مغزی می‌شود که از لحاظ بالینی به صورت افزایش فشار داخل جمجمه‌ای (ICP) تعریف می‌شود و این افزایش به عنوان 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 جراحی تروماتیک همراه با یک سری حوادث پیچیده سیتوتوکسیک و همچنین نشت عروقی به علت شکسته شدن سد خونی - مغزی (BBB) است (۳). تجمع لوکوسیت‌ها در داخل مغز بعد از تروما گزارش شده است که این امر باعث جراحی 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 به وسیله 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 جراحی ثانویه در مغز به دنبال TBI هستند که همراه با رهايش 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 فاکتور نکروز دهنده توموری نوع آلفا ($TNF-\alpha$)، اینترلوکین ۱ ($IL-1$)، اینترلوکین ۶ ($IL-6$) و فاکتور رشد توموری ($TGF-\beta$) (۹،۱۰) می‌شوند. علاوه بر این گزارش شده است که تولید سیتوکین‌های التهابی به خصوص $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ منجر به التهاب و مرگ نورونی به دنبال ایسکمی می‌شوند (۱۱). تغییر در غلظت‌های مغزی و سرمی سیتوکین‌های التهابی و همچنین $TGF-\beta$ در بیماران، به دنبال جراحی شدید

به سر در انسان و در موش صحرایی گزارش شده است (۱۲،۱۳).

مشخص شده است تشکیل خیز که به دنبال التهاب در سیستم عصبی مرکزی (CNS) رخ می‌دهد، نقش مهمی در تنظیم ترومای مغزی دارد، به طوری 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 به دنبال القای ضربه، خیز کم‌تری نسبت به حیوان‌های نر داشتند (۱۷-۱۵) و همچنین دیده شد که در حالت هیپرپرورژستینی 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 جراحی 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 خیز مغزی بعد از TBI در موش‌های صحرایی ماده می‌شود و از سوی دیگر بیان شده است که پروژسترون تولید سیتوکین‌های التهابی ($TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$) را بعد از تروما و ایسکمی مغزی کاهش داده (۲۲) و استروژن مرگ سلول را از طریق کاهش $TNF-\alpha$ موجب می‌شود و به عبارت 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 α -TNF و β -TGF 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 کا/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. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت 25 ± 2 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 ۷ تایی 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-بتاسترادیول 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 هم‌حجم استروژن یا پروژسترون ($0/33 \text{ ml/kg}$)، 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 $33/3 \mu\text{g/kg}$ 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 1 mg/kg بود (۲۴). گروه ۶، گروه دوز

فیزیولوژیک پروژسترون (P1) که مشابه با گروه ۴ بود، با این تفاوت که پروژسترون با دوز $1/1 \text{ mg/kg}$ مصرف شد (۲۳). گروه ۷، گروه دوز فارماکولوژیک پروژسترون (P2) که مشابه با گروه ۶، اما با دوز مصرفی پروژسترون 8 mg/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 (60 mg/kg) و رامپون (10 mg/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 ۱-۲ 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

به صورت نمره (۱۵-۳) بر اساس جدول ۱ که مجموع سه نمره: عمل حرکتی (۱-۸)، عمل چشمی (۱-۴) و عمل تنفسی (۱-۳) می باشد بیان می گردد (۲۶). هر چه این نمره بالاتر باشد پیامد نورولوژیک بهتر و هر چه پایین تر باشد پیامد نورولوژیک وخیم تر 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 گروه بندی حیوانات نداشت، اندازه گیری می شد.

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

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک با اندازه گیری V.C.S (Veterinary Coma Scale) انجام شد. پیامد نورولوژیک

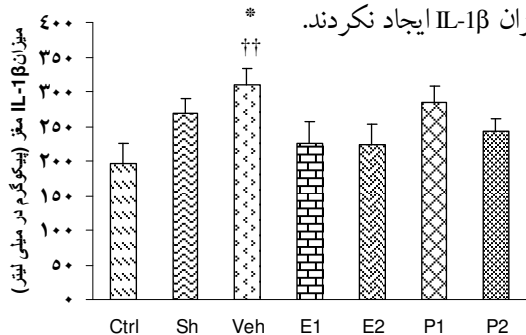
جدول ۱. نحوه نمره گذاری برای ارزیابی پیامدهای نورولوژیک در روش *veterinary coma scale*

نمره	متغیر
۸	طبیعی
۷	خواب آلودگی خفیف با حرکات خودبه خودی و هدف دار
۶	خواب آلودگی، قادر نبودن به ایستادن، اما حفظ خمیدگی سخت
۵	خواب آلودگی، عقب کشیدن در برابر نیشگون گرفتن، بلند کردن سرنسبت به محرکات بینایی، بدون خمیدگی سخت
۴	عقب کشیدن یا پا زدن در برابر نیشگون گرفتن
۳	پا زدن خودبه خودی
۲	وضعیت اکستانسیون (خودبه خودی یا در برابر محرکات)
۱	پاسخ ندادن به تحریکات
۴	طبیعی
۳	باز شدن در برابر تحریکات
۲	طبیعی بودن رفلکس های پلک
۱	پاسخ ندادن پلک به تحریکات
۳	طبیعی
۲	آتاکسی
۱	آپنه

توسط نیتروژن مایع منجمد می گردید. هموژنیزاسیون مغز توسط دستگاه هموژنایزر انجام می گرفت. به این صورت که ۵۰۰ میلی گرم از هر مغز با ۲ میلی لیتر بافر (pH=۷/۲)

روش اندازه گیری سیتوکین ها، استرادیول و پروژسترون در مغز موش های صحرایی ۲۴ ساعت بعد از ضربه با تیوپنتال (۵۰ mg/kg) بی هوش شده و سپس مغز از جمجمه خارج و

که میزان IL-1 β در گروه کنترل $28/7 \pm 196/6$ pg/ml بود، در گروه ترومای مغزی تحت درمان با حلال به میزان $24/4 \pm 309/6$ pg/ml افزایش داشت ($P < 0/01$). این میزان در گروه‌های ترومای تحت درمان با دوز فیزیولوژیک استروژن ($224/6 \pm 322/8$ pg/ml) یا دوز فارماکولوژیک استروژن ($223/6 \pm 301/1$ pg/ml) در مقایسه با گروه ترومایی تحت درمان با حلال کاهش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$)، اگر چه دوزهای فیزیولوژیک و خصوصاً فارماکولوژیک پروژسترون در مقایسه با گروه حلال کاهش در میزان IL-1 β ایجاد کردند، اما این کاهش معنی‌دار نبود. دوزهای مختلف استروژن نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در میزان IL-1 β ایجاد نکردند.



گروه

نمودار ۱. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان IL-1 β (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 به ترتیب گروه‌های دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن، P1 و P2 به ترتیب گروه‌های دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون. *: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 و E2 با گروه حلال ($P < 0/05$)، ††: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه کنترل ($P < 0/01$).

مقادیر مغزی IL-6 به دنبال TBI

همان‌طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود جراحی تروماتیک مغزی (TBI) باعث افزایش معنی‌دار در میزان IL-6 می‌شود، به طوری که این میزان در گروه ترومایی تحت درمان با حلال ($1073 \pm 46/1$ pg/ml) در مقایسه با گروه شم ($859/3 \pm 74/6$ pg/ml) و کنترل ($784/2 \pm 58/9$ pg/ml)

حاوی NaCl 150 mmol، 0.5% Triton 100-x، Tris 50 mmol کوکتل مهارکننده پروتئاز (Roche آلمان) مخلوط و محلول هموژنایز می‌شد. سپس با سانتریفوژ یخچال‌دار با دور 4000g در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و روشناور آن برای اندازه‌گیری سیتوکین‌ها، IL-1 β ، IL-6، TNF- α و TGF- β و هم‌چنین IL-1 β استرادیول و پروژسترون استفاده می‌شد. اندازه‌گیری با کیت‌های ELISA (BMS، آمریکا) مخصوص اندازه‌گیری IL-1 β ، IL-6، TNF- α و TGF- β استرادیول و پروژسترون در موش صحرایی انجام شد. به‌طور خلاصه نمونه‌های مورد نظر به چاهک‌هایی که حاوی آنتی‌بادی اولیه ضد IL-1 β ، IL-6، TNF- α و TGF- β استرادیول و پروژسترون بودند ریخته و پس از نیم ساعت محلول متوقف کننده به محیط اضافه می‌گردید. تغییر رنگ کروموژن در طیف نوری 450 nm خوانده می‌شد. مقادیر TNF- α ، IL-1 β و IL-6 و بتا-استرادیول مغز به صورت پیکوگرم در میلی‌لیتر از هموژنایز مغز و مقادیر TGF- β و پروژسترون مغز به صورت نانوگرم در میلی‌لیتر از هموژنایز مغز بیان گردید (۱۳).

آنالیز آماری داده‌ها

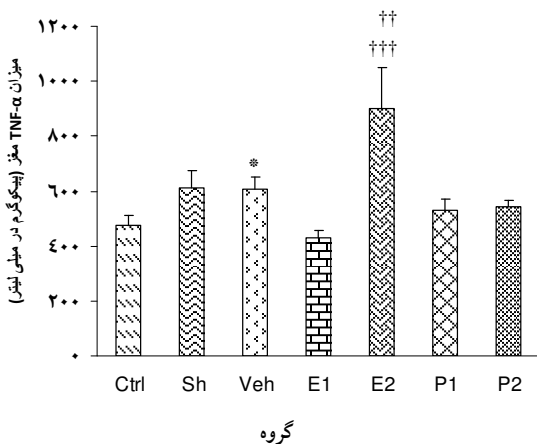
داده‌های کمی به دست آمده برای گروه‌های مختلف پس از آن که توزیع نرمال آن‌ها مشخص شد، توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و در صورت معنی‌دار شدن آزمون اولیه، برای پی‌بردن به اختلاف بین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین (Mean \pm SEM) بیان شد و نتایج با $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

مقادیر مغزی IL-1 β به دنبال TBI

همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود مقادیر مغزی IL-1 β در ۲۴ ساعت بعد از TBI افزایش پیدا کرد، به طوری

فارماکولوژیک استروژن $902/1 \pm 248/5$ pg/ml بود که در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی دار را نشان داد ($P < 0/05$)، اگرچه هیچ یک از گروه های دیگر دارای اختلاف معنی دار با گروه حلال نداشتند، اما اختلاف معنی دار بین دوز فارماکولوژیک استروژن با دوزهای فیزیولوژیک استروژن ($P < 0/001$)، $431/1 \pm 28/5$ pg/ml، فیزیولوژیک پروژسترون ($P < 0/01$)، $530/5 \pm 42$ pg/ml و فارماکولوژیک پروژسترون ($P < 0/01$) و $545/6 \pm 21/2$ pg/ml وجود داشت.



نمودار ۳. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان TNF-α

(pg/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش های

صحرائی فاقد تخمدان

معرفی گروه ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. * اختلاف معنی دار گروه E2 با گروه حلال

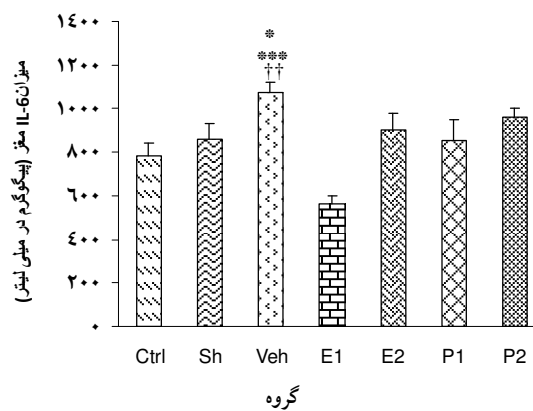
($P < 0/05$)، ††† اختلاف معنی دار گروه E2 با گروه های P1 و P2 ($P < 0/01$)، †††† اختلاف معنی دار گروه E2 با گروه های E1، P1 و P2 ($P < 0/001$).

اختلاف معنی دار گروه E2 با گروه E1 ($P < 0/001$).

مقادیر مغزی TGF-β به دنبال TBI

مقادیر TGF-β به عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی نیز اندازه گیری شد. همان طور که در نمودار ۴ دیده می شود مقادیر مغزی TGF-β بعد از جراحی تروماتیک مغزی در موش های صحرائی فاقد تخمدان تحت درمان با حلال ($0/8 \pm 0/2$ ng/ml) در مقایسه با گروه های شم ($5/3 \pm 0/5$ ng/ml) و کنترل ($5/2 \pm 0/9$ ng/ml) کاهش

افزایش معنی دار نشان می دهد ($P < 0/01$). بعد از درمان گروه ترومایی با دوز فیزیولوژیک استروژن میزان IL-6، $563/9 \pm 32/7$ pg/ml بود که در مقایسه با گروه ترومایی تحت درمان با حلال کاهش معنی داری نشان می دهد ($P < 0/001$)؛ هم چنین دوز فیزیولوژیک پروژسترون ($852/4 \pm 99/1$ pg/ml) نیز در مقایسه با گروه حلال میزان IL-6 را به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0/05$). هیچ یک از دوزهای فارماکولوژیک استروژن یا پروژسترون اثر مهاری معنی دار روی میزان IL-6 در مقایسه با حلال نداشتند.



نمودار ۲. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان IL-6

(pg/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش های

صحرائی فاقد تخمدان

معرفی گروه ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. * اختلاف معنی دار گروه P1 با گروه حلال

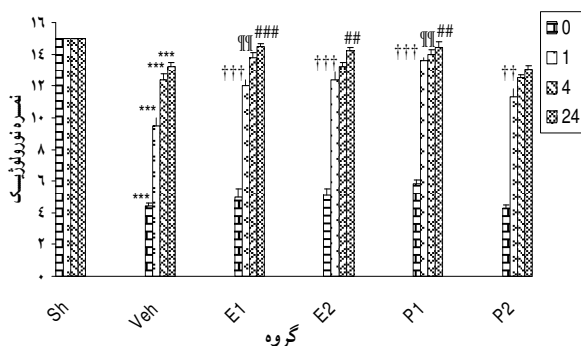
($P < 0/05$)، *** اختلاف معنی دار گروه E1 با گروه حلال ($P < 0/001$)، ††† اختلاف معنی دار گروه حلال با گروه های کنترل و شم ($P < 0/01$).

اختلاف معنی دار گروه حلال با گروه های کنترل و شم ($P < 0/01$).

مقادیر مغزی TNF-α به دنبال TBI

در نمودار ۳، مقادیر مغزی TNF-α در گروه های مختلف مطالعه نشان داده شده است، مقدار TNF-α در گروه شم، $609/8 \pm 63/6$ pg/ml بود که با گروه های ترومایی تحت درمان با حلال ($607/2 \pm 46/9$ pg/ml) و کنترل ($473/4 \pm 40/2$ pg/ml) دارای اختلاف معنی دار نیست. میزان TNF-α در گروه ترومایی تحت درمان با دوز

معنی دار ($P < 0/001$) نشان داد. میزان $TGF-\beta$ در گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک ($7/8 \pm 0/3 \text{ ng/ml}$) یا فارماکولوژیک استروژن ($6/5 \pm 1 \text{ ng/ml}$) و هم‌چنین گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک پروژسترون ($5/6 \pm 0/2 \text{ ng/ml}$) یا فارماکولوژیک پروژسترون ($4/5 \pm 0/8 \text{ ng/ml}$) در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی‌دار نشان دادند ($P < 0/001$). دوزهای مختلف استروژن و یا پروژسترون در این زمینه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نکردند.



نمودار ۵. اثر تجویز استروژن یا پروژسترون بر روی نمره

نورولوژیک (VCS) فوراً بعد از ضربه، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از

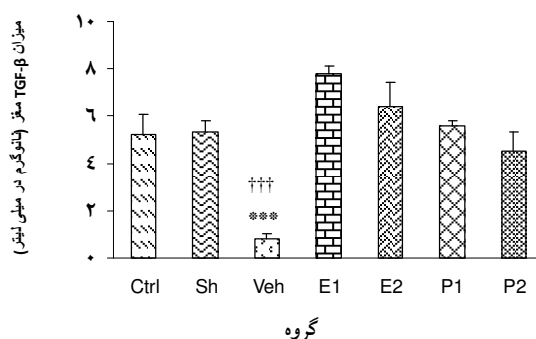
ضربه مغزی منتشر در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. ***: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه شم فوراً، یک، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه ($P < 0/001$). ††: اختلاف معنی‌دار گروه P2 با گروه حلال در یک ساعت بعد از ضربه ($P < 0/01$). †††: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1، E2 و P1 با گروه حلال در یک ساعت بعد از ضربه ($P < 0/001$). ††††: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 و P1 با گروه حلال در ۴ ساعت بعد از ضربه ($P < 0/01$). ###: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E2 و P1 با گروه حلال در ۲۴ ساعت بعد از ضربه ($P < 0/01$). ####: اختلاف معنی‌دار گروه E1 با گروه حلال در ۲۴ ساعت بعد از ضربه ($P < 0/001$).

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. مقدار ۱۷-بتا استرادیول در گروه تحت درمان با حلال $333/4 \pm 10/5 \text{ pg/ml}$ بود که تقریباً معادل با میزان ۱۷-بتا استرادیول در گروه‌های شم ($370/9 \pm 7/7 \text{ pg/ml}$) و کنترل ($347/5 \pm 8/1 \text{ pg/ml}$) مقدار ۱۷-بتا استرادیول در گروه

معنی دار ($P < 0/001$) نشان داد. میزان $TGF-\beta$ در گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک ($7/8 \pm 0/3 \text{ ng/ml}$) یا فارماکولوژیک استروژن ($6/5 \pm 1 \text{ ng/ml}$) و هم‌چنین گروه‌های تحت درمان با دوزهای فیزیولوژیک پروژسترون ($5/6 \pm 0/2 \text{ ng/ml}$) یا فارماکولوژیک پروژسترون ($4/5 \pm 0/8 \text{ ng/ml}$) در مقایسه با گروه حلال افزایش معنی‌دار نشان دادند ($P < 0/001$). دوزهای مختلف استروژن و یا پروژسترون در این زمینه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نکردند.



نمودار ۶. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان $TGF-\beta$

(ng/ml) در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های

صحرایی فاقد تخمدان

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. ***: اختلاف معنی‌دار گروه‌های E1 یا E2 با P1 یا P2 با گروه حلال ($P < 0/001$). †††: اختلاف معنی‌دار گروه حلال با گروه‌های کنترل و شم ($P < 0/001$).

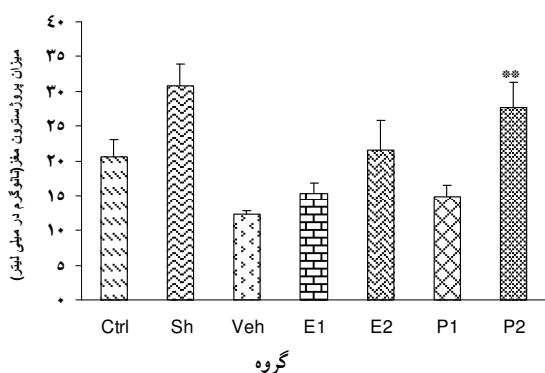
نتایج مربوط به اندازه‌گیری پیامد نورولوژیک

یک ساعت قبل از ضربه، نمره نورولوژیک در همه گروه‌ها ۱۵ بود (در نمودار نشان داده نشده است). در لحظه صفر، یعنی فوراً بعد از TBI نمره پیامد نورولوژیک در گروه شم (۱۵) بیشتر از گروه حلال ($4/4 \pm 0/2$) بود ($P < 0/001$). در یک ساعت بعد از TBI نمره پیامد نورولوژیک در گروه حلال ($9/5 \pm 0/5$) کمتر از گروه‌های شم (15)، E1 ($12 \pm 0/4$)، E2 ($13/6 \pm 0/2$)، P1 ($12/4 \pm 0/5$) و P2 ($13/6 \pm 0/2$) بود.

معنی‌دار با گروه ترومایی تحت درمان با حلال بیشترین مقدار بوده و افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال نشان می‌دهد ($P < 0/001$)، علاوه بر این بین گروه دوز فارماکولوژیک استروژن با بقیه گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0/001$).

تغییرات در مقادیر مغزی پروژسترون در گروه‌های مختلف در نمودار ۷ نمایش داده شده است. میزان پروژسترون در گروه شم $30/7 \pm 3/3$ ng/ml بود که اختلاف پروژسترون مغزی پروژسترون وجود داشت ($P < 0/001$).

میزان پروژسترون مغزی پروژسترون در گروه‌های مختلف در نمودار ۷ نمایش داده شده است. میزان پروژسترون در گروه شم $30/7 \pm 3/3$ ng/ml بود که اختلاف پروژسترون مغزی پروژسترون وجود داشت ($P < 0/001$).

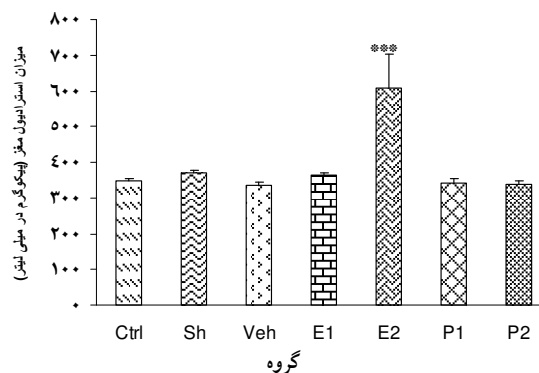


نمودار ۷. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان

پروژسترون ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های

صحرائی فاقد تخمدان

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. **: اختلاف معنی‌دار گروه P2 با گروه حلال ($P < 0/001$).



نمودار ۸. اثر تجویز استروژن و پروژسترون بر روی میزان بتا -

استرادیول ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی منتشر در موش‌های

صحرائی فاقد تخمدان

معرفی گروه‌ها: به نمودار ۱ مراجعه شود. **: اختلاف معنی‌دار گروه E2 با گروه حلال ($P < 0/001$).

آناتومیکی و عملکردی التهاب نورونی را موجب می‌شود (۲۹) که این عمل $IL-1\beta$ ممکن است با واسطه PGE_2 (۳۰)، NO (۳۱) و PLA_2 (۳۲) باشد. همچنین افزایش میزان $IL-1\beta$ بعد از TBI نیز ممکن است به علت 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 به دنبال TBI در انسان است (۳۳). بنابراین کاهش ساخت این سیتوکین توسط استروژن و پروژسترون هم‌زمان با افزایش بیان ژن و ساخت حداکثری

بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد که $IL-1\beta$ و $IL-6$ مغزی ۲۴ ساعت بعد از TBI افزایش می‌یابد، به طوری که اختلاف معنی‌دار بین مقادیر این دو سیتوکین در گروه TBI در مقایسه با شام وجود دارد. دوزهای فیزیولوژیک یا فارماکولوژیک استروژن باعث کاهش میزان $IL-1\beta$ بعد از جراحی می‌شوند. غلظت $IL-1\beta$ در بیماران با ICP بالاتر، در مقایسه با ICP کمتر، بیشتر است (۲۷). مهار تولید $IL-1\beta$ آسیب نورونی ناشی از TBI را مهار نموده (۲۸) و تجویز آتاگونست گیرنده $IL-1\beta$ به دنبال TBI، کاهش پاسخ‌های

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 به علت افزایش IL-1 β 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 مغزی TNF- α در ۲۴ ساعت بعد از TBI نمی‌شود، به طوری 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 این که 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 جراحی 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 جراحی 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-1 β و 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 به دنبال 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 سکنه مغزی تجربی است (۴۱). به دنبال تجویز دوز بالای پروژسترون جراحی 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-1 β مغزی توسط استروژن که در مطالعه حاضر مشاهده شد، هماهنگ با یک مطالعه دیگر است (۴۴) و عدم تأثیر پروژسترون بر روی میزان IL-1 β توسط پژوهش دیگری نیز تأیید شده است (۴۵)؛ بنابراین کاهش IL-1 β 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 PGE₂ ناشی از IL-1 β و یا کاهش گیرنده‌های IL-1 β اثر ضد خیزی خود را اعمال نموده است (۴۶، ۴۷، ۱۴). 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 (۴۷، ۲۰) در ارتباط با میزان IL-1 β بعد از TBI را مطرح کرده‌اند که دلایل احتمالی اختلاف نتایج آن‌ها با مطالعه

ضدالتهابی استروژن می‌تواند در نظر گرفت. تعدادی پژوهش که دارای نتایج مخالف با نتایج مطالعه حاضر می‌باشند، نیز وجود دارد (۵۴، ۵۰) 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 $TGF-\beta$ می‌شوند، بلکه هر دو دوز (فیزیولوژیک و فارماکولوژیک) این هورمون‌ها نیز این اثر را دارا می‌باشند. با توجه به این که اثرات ضدالتهابی $TGF-\beta$ بر اثرات التهاب‌زایی آن غالب است، بنابراین احتمالاً یکی از مکانیسم‌های ضدالتهابی استروئیدهای جنسی، علاوه بر مکانیسم‌های دیگر، افزایش $TGF-\beta$ است. تعدادی مطالعات اثر استروژن و پروژسترون را بر روی $TGF-\beta$ گزارش نموده‌اند (۴۷، ۴۳). این هورمون‌ها احتمالاً از طریق تغییر میزان $IL-1\beta$ (۴۶)، تغییر در ره‌ایش سیتوکین‌ها از یاخته‌های مغزی و سلول‌های خونی و جلوگیری از تخریب سد خونی - مغزی (۱۴) افزایش $TGF-\beta$ 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.

حاضر به علت تفاوت در نوع و شدت جراحت، دوز و زمان مصرف هورمون‌ها و همچنین نوع حلال به کار برده شده و یا به علت 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، $TNF-\alpha$ 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 $TNF-\alpha$ به وسیله استروژن و عدم تأثیر پروژسترون بر روی آن در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۴۴، ۴۵، ۴۷). با این وجود در کنار اثر استروژن در کاهش $IL-1\beta$ ، اثر افزایشی آن بر روی $TNF-\alpha$ را نیز به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی دخیل در اثر

میزان سیتوکین‌های مغزی ($\text{IL-1}\beta$ ، IL-6 ، $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{TGF-}\beta$) 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 $\text{IL-1}\beta$ و یا افزایش $\text{TGF-}\beta$ ، دوز فارماکولوژیک استروژن از طریق افزایش $\text{TNF-}\alpha$ و همین‌طور دوز فیزیولوژیک استروژن از طریق کاهش IL-6 اثر ضد التهابی خود را اعمال می‌کنند. دوزهای فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون از طریق افزایش $\text{TGF-}\beta$ و همین‌طور دوز فیزیولوژیک پروژسترون از طریق افزایش IL-6 در کنار مکانیسم‌های دیگر، کاهش خیز مغزی 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.

بر اساس نمره‌های VCS (GCS)، جراحی تروماتیک مغز به ۳ گروه تقسیم می‌شود (۵۵): ضربه مغزی خفیف ($\text{GCS}=13-15$)، متوسط ($\text{GCS}=9-12$) و شدید ($\text{GCS}=3-8$). بنابراین نمره VCS بالاتر در TBI نشانه وضعیت بهتر است و یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که در ساعت اول بعد از ضربه مصرف هر کدام از هورمون‌های 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 می‌ماند که نشان دهنده این است که اثر پروژسترون بر روی نمره VCS، مثل بسیاری از اثرات آن وابسته به دوز و زمان است (۴۲، ۴۱). اما اثر استروژن هم در دوز کم و هم در دوز زیاد در افزایش نمره VCS در طول زمان وجود دارد.

با توجه به تغییرات غلظت هورمون‌های جنسی در مغز در ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی که غلظت استرادیول مغز در گروه دوز زیاد استروژن ۱/۸ برابر افزایش نشان می‌دهد ولی در گروه دوز کم استروژن و پروژسترون چنین افزایشی آشکار نیست، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که 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 می‌شود که در این زمینه احتیاج به تحقیق بیشتری است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که هورمون‌های استروئیدی جنسی احتمالاً از طریق تغییر در

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 dose 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-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 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-1 β compared to vehicle. Brain level of IL-1 β 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-1 β and IL-6 and increase of brain level of TNF- α and TGF- β after TBI.

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

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-Kossmann 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 suppressing 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 ovariectomized 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, Fujita 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, Hum 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, Hum PD, Duckles SP. Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 2000; 31(5): 1173-8.
 43. Hatthachote P, Gillespie JL. 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, Vodianyuk 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.