

اثر محافظت نورونی استروئیدهای جنسی زنانه بعد از جراحت ترموماتیک مغزی در موش صحرایی: نقش سیتوکین‌های التهابی

علیرضا سرکاکی^۱، محمد خاکساری حداد^۲، زهرا سلطانی^۳، ذکیه کشاورزی^۴، نادر شاهرخی^۵، غلامرضا اسدی کرم^۶، رضا عباسی^۷

دریافت مقاله: ۸۹/۱/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۹/۳/۱۲ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۷

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات قبلی نشان دادند که استروژن و پروژسترون خیز مغزی بعد از ضربه مغزی را کاهش می‌دهند، هدف مطالعه حاضر، تعیین می‌کند آیا هورمون‌های تخدمانی اثر ضد خیزی خود را از طریق تغییر در میزان سیتوکین‌های پیش‌التهابی اعمال می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای - تجربی از ۹۸ موش صحرایی ماده فاقد تخدمان (به جز دو گروه اول) تحت گروه‌های کنترل، شم، حلال، مقدار کم استروژن (E_1)، مقدار زیاد استروژن (E_2)، مقدار کم پروژسترون (P_1) و مقدار زیاد پروژسترون (P_2) استفاده شد. حلال و استروئیدها نیم ساعت بعد از ضربه مغزی متوسط و منتشر ایجاد شده به روش مارمارو، به طریق داخل صفاقی تزریق شدند. سیتوکین‌های پیش‌التهابی و غلظت هورمون‌های تخدمانی در مغز، ۶ ساعت بعد از ضربه مغزی به وسیله ELISA اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: میزان IL-1 β ، توسط E_2 و P_1 به ترتیب به میزان ۸/۵۲٪ و ۷۹/۲٪ افزایش معنی‌دار پیدا کرد. P_2 ، مقادیر 6-IL و TNF- α را به ترتیب به میزان ۹/۴۵٪ و ۷۲٪ کاهش معنی‌دار داد. توسط TGF- β , E_1 به میزان ۳/۳۷ برابر افزایش معنی‌دار پیدا کرد. غلظت بتا-استرادیول در E_2 به میزان ۴/۵۸ برابر و غلظت پروژسترون در P_2 به میزان ۱/۵۶ برابر افزایش معنی‌دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: این نتایج پیشنهاد می‌کنند که احتمالاً هورمون‌های تخدمانی از طریق افزایش IL-1 β و TGF- β و کاهش IL-6 و TNF- α اثر ضد خیزی را در ضربه مغزی اعمال می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-1 β , TBI, هورمون‌های تخدمانی

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز
تلفن: ۰۶۱۱-۳۷۳۸۲۴۸، دورنگار: ۰۶۱۱-۳۳۶۱۵۴۴، پست الکترونیکی: sarkaki_a@yahoo.com

۲- استاد گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی گروه فیزیولوژی و مرکز آموزشی بین‌الملل به، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- دانشجوی دکترای گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۵- استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۶- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۷- پژوهش عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

(IL-6) و فاکتور نکروزیس توموری آلفا (TNF- α) التهاب را پیش می‌برند، در حالی که سیتوکین‌هایی از قبیل اینترلوکین نمره ۴ (IL-4) و اینترلوکین نمره ۱۰ (IL-10) پاسخ التهابی را در سیستم عصبی مرکزی مهار می‌کنند [۶]. افزایش IL-1 β و TNF- α در مایع مغزی نخاعی و بافت پارانشیم مغزی در ساعات بعد از ترومای مغزی گزارش شده است [۷]؛ افزایش این سیتوکین‌های التهابی به طور بارزی جراحت مغزی ناشی از ایسکمی یا ترومای را تشید می‌کند [۸]. تجویز داخل مغزی IL-1 β موجب خیز مغزی و به دنبال آن مرگ سلولی می‌شود [۹]، علاوه بر این، گزارش شده است که مرحله مزمن بهبودی، بستگی به افزایش در میزان میانجی‌های مهم برای ترمیم بافت از قبیل فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا (TGF- β) دارد [۵]. TGF- β یک نقش تنظیمی در فعل کردن سیتوکین‌ها در اندوتلیوم مغز داشته [۱۰] و از مهاجرت لکوسیت‌ها در سد خونی-مغزی جلوگیری می‌نماید [۱۱].

در مطالعات اخیر نشان داده شده است که استروژن و پروژستررون، خیز مغزی را کاهش داده و برگشت‌پذیری عملکردی بعد از جراحت تروماییک مغزی را تشید می‌نمایند [۱۲-۱۳]. از آن جایی که سیتوکین‌های پیش‌برنده التهابی از قبیل IL-1 β , IL-6, TNF- α و TGF- β تشکیل خیز مغزی و از دست دادن نورونی را واسطه می‌کنند [۱۴-۱۵]، فرض بر این شد که اعمال محافظت نورونی این استروئیدهای جنسی زنانه احتمالاً از طریق تضعیف تولید این سیتوکین‌ها اعمال می‌شود. با توجه به مطالب فوق که فرآیندهای بعد از ترومای به دو مرحله حاد و مزمن تقسیم شده و نقش سیتوکین‌ها در هر مرحله متفاوت می‌باشد، به عنوان مثال در جراحت طناب نخاعی، افزایش میزان سیتوکین‌ها در ۳۰ دقیقه بعد

مقدمه

بعد از جراحت تروماییک مغزی (Traumatic Brain Injury) و بعد از ایسکمی مغزی، التهاب داخل جمجمه‌ای رخ می‌دهد و این پاسخ التهابی نقش مهمی در فرآیندهای بهبودی زخم و همچنین در ایجاد آسیب ثانویه مغزی دارد [۱]. کوفتگی مغزی یکی از شکل‌های جراحت تروماییک مغزی است که غالباً همراه با آسیب‌های تأخیری نورولوژیکی و افزایش فشار داخل جمجمه‌ای است [۲]. مطالعات تجربی نشان دادند که کوفتگی مغزی از طریق ایجاد پاسخ التهابی داخل جمجمه‌ای باعث پیدایش جراحت ثانوی مغزی می‌شود [۳]. عوامل مختلف در مسیر التهاب دارای اثرات متفاوت بوده و همچنین این احتمال وجود دارد که مهار عمومی پاسخ التهابی، فرآیندهای ترمیم یا رژنراتیو را کاهش دهد [۱].

فرآیندهای بعد از جراحت، در سیستم عصبی مرکزی به دو مرحله تقسیم می‌شوند: مرحله جراحت حاد ابتدایی که به وسیله یک مرحله بهبودی ثانویه مزمن دنبال می‌شود [۴]. مرحله جراحت حاد به دو زیر مرحله به نام مرحله اولیه جراحت، که ناشی از اثرات ترومایی باشد و مرحله بعدی، جراحت پیشرفته که توسط رهایش عوامل شیمیایی و سیتوکین‌ها واسطه می‌شود، تقسیم می‌گردد [۴-۵]. ساخت سیتوکین‌های داخل مغزی در ناحیه اطراف آسیب، هم در مرحله ابتدایی و هم در مرحله ثانویه (تأخری) در انسان رخ می‌دهد. تنظیم موضعی سیتوکین‌های پیش‌برنده التهاب و ضد التهاب، اختلاف در استفاده از مداخلات فارماکولوژیکی را در درمان ایسکمی مغزی آشکار می‌کند. سیتوکین‌های معینی از قبیل اینترلوکین نمره یک بتا (IL-1 β), اینترلوکین نمره ۶

سیتوکین‌ها، β -استرادیول و پروژسترون مغزی، ۶ ساعت بعد از ضربه مغزی اندازه‌گیری شد.

گروه ۱، گروه کنترل: موش‌های صحرایی ماده طبیعی و سالم هستند. گروه ۲، گروه شم (sham): موش‌های صحرایی ماده‌ای که تخدمان‌های آنها برداشته شده بود، بیهوش شدند، جراحی‌های لازم روی آنها انجام شد و فقط زیر دستگاه ایجاد کننده ضربه مغزی قرار گرفتند. گروه ۳، گروه حلال: موش‌های صحرایی ماده فاقد تخدمان که هم حجم استروژن یا پروژسترون ($33/30$ میلی‌لیتر در کیلوگرم)، حلال آنها (روغن کنجد + بنزیل الکل) نیم ساعت [۱۸] بعد از ضربه مغزی به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد. گروه ۴، گروه مقدار کم یا فیزیولوژیک استروژن (E1): موش‌های صحرایی ماده فاقد تخدمان که $33/3$ میکروگرم در کیلوگرم استروژن [۱۸] به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به آنها تزریق شد. گروه ۵، گروه مقدار زیاد یا فارماکولوژیک استروژن (E2) مشابه با گروه ۴ هستند فقط مقدار استروژن 1 میلی‌گرم در کیلوگرم [۱۹] بود. گروه ۶، گروه مقدار کم یا فیزیولوژیک پروژسترون (P1): مشابه با گروه ۴ بود، با این تفاوت که پروژسترون با مقدار $1/7$ میلی‌گرم در کیلوگرم [۱۸] مصرف شد. گروه ۷، گروه مقدار زیاد یا فارماکولوژیک پروژسترون (P2): مشابه با گروه ۶، اما مقدار مصرفی پروژسترون 8 میلی‌گرم در کیلوگرم [۱۹] بود. استروژن (بنا استرادیول)، پروژسترون و حلال آنها از شرکت دارویی ابو ریحان (ایران) خریداری شد.

روش برداشتن تخدمان‌ها (اوارکتومی): موش‌های صحرایی ماده، با مخلوط کتامین (60 میلی‌گرم در کیلوگرم) و رامپون (10 میلی‌گرم در کیلوگرم) بی‌هوش شده و سپس حیوان به پشت خوابانده شده و موهای

از جراحت شروع شده و تا 24 ساعت ادامه دارد [۱۶] و یا سیتوکین‌ها در ساعت اول بعد از ترومای مغز تولید شده و در طی 24 ساعت به تدریج کاهش می‌یابند [۱۷] و از سوی دیگر، اثر مهاری پروژسترون بر روی سیتوکین‌های التهابی وابسته به زمان است [۱۷]، بنابراین هدف مطالعه حاضر تعیین اثر استروژن یا پروژسترون بر روی مقادیر مغزی سیتوکین‌های 1β , IL-6, TNF- α , IL-1 β و TGF- β در ساعت ششم بعد از جراحت تروماتیک مغزی در موش صحرایی ماده فاقد تخدمان بود که واسطه‌گری این سیتوکین‌ها را در عمل محافظت نورونی و عمل ضد خیزی این هورمون‌ها ارزیابی کند. تمامی آزمایش‌ها بر اساس مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های حیوانی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان (کا/ع ۱۹-۸۷) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای- تجربی، از 98 سر موش صحرایی (Rat) ماده از نژاد Albino NMARI با وزن $180-250$ گرم استفاده شد که این حیوان‌ها 3 ماهه بوده و قبل از باروری از موش‌های صحرایی نر جدا شدند. حیوان‌ها در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی کرمان نگهداری شدند، در ضمن آب و غذا آزادانه در اختیار آنها قرار گرفت.

98 حیوان به طور تصادفی به 7 گروه (تعداد در هر گروه 14) تقسیم شدند که هر گروه دارای دو زیر‌گروه بود، در یک زیر‌گروه نمره نورولوژیک (بلافاصله بعد از ضربه، یک ساعت بعد از ضربه، 4 ساعت بعد از ضربه و 24 ساعت بعد از ضربه) اندازه‌گیری شد و در زیر‌گروه دیگر

ارزیابی پیامدهای نورولوژیک: برای ارزیابی پیامدهای نورولوژیک از روش آ (V.C.S) [Veterinary Coma Scale] استفاده شد. پیامدهای نورولوژیک به صورت نمره (۱-۱۵) بر اساس جدول ۱ که مجموع سه نمره عمل حرکتی (۱-۸)، عمل چشمی (۱-۴) و عمل تنفسی (۱-۳) می‌باشد [۲۱]، گزارش شد، به طوری که 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، ۱، ۴ و ۲۴ ساعت بعد از آن ضربه اندازه‌گیری گردید [۲۲].

روش اندازه‌گیری سیتوکین‌ها، استرادیول و پروژسترون در بافت مغزی: موش‌های صحرایی ۶ ساعت بعد از ضربه با تیوبنتال (۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بی‌هوش شدن و سپس مغز از جمجمه خارج شد و توسط نیتروژن مایع منجمد گردید. هموژنیزاسیون مغز توسط دستگاه هموژنایزر انجام گرفت که بدین منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم از هر مغز با ۲ میلی‌لیتر بافر (pH=۷/۲) حاوی ۱۵۰ میلی‌مول Tris، نیم درصد ۱۰۰-x Triton میلی‌مول Nacl، کوکتل مهارکننده پروتئاز (Roche آلمان) مخلوط شد. محلول هموژنایز شده سپس با سانتریفوژ یخچالدار با دور ۴۰۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع شناور روی آن برای اندازه‌گیری سیتوکین‌ها، β -استرادیول و پروژسترون مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری با کیت‌های ELISA (BMS، آمریکا) مخصوص اندازه‌گیری β -Il-6، β -TGF- β و β -TNF- α و همچنین مخصوص اندازه‌گیری β -استرادیول و β -TGF- β و β -TNF- α نمونه‌های مورد نظر به چاهک‌هایی که حاوی آنتی‌بادی اوایله ضد β -TGF- β ، β -TNF- α ، β -Il-6 و β -استرادیول و

قسمت تحتانی شکم تراشیده و یک برش افقی به طول ۲ سانتی‌متر ایجاد شد. پوست، فاسیا و عضلات شکم باز شده، چربی‌ها و روده کنار زده شد تا رحم و لوله‌های رحمی مشاهده شوند. لوله رحم و پایه عروقی تخدمان با نخ کاتکوت ۴، در ناحیه پروگزیمال مسدود گردید و از ناحیه دیستال قطع شد و همین عمل در مورد تخدمان سمت دیگر بدن تکرار گردید. در انتهای ۱-۲ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی داخل شکم ریخته شد، عضلات و پوست به ترتیب با نخ کاتکوت و سیلک ۲ صفر به روش پیوسته بخیه گردید. محل زخم با محلول بتادین ضدغوفونی شد. حیوان‌ها تا ۲ ساعت تحت مراقبت ویرژه قرار گرفتند [۲۰]. هیچ یک از آنها حین عمل جراحی یا بعد از آن نمردند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی، انجام اوارکتومی حداقل دو هفته قبل از هر عملیات دیگری انجام شد.

روش القاء ضربه مغزی: روش ایجاد ضربه مغزی متوسط (Moderate) از نوع منتشر (Diffuse) و به روش مارمارو (Marmarou) بود که این روش شباهت زیادی به ضربات وارد شده به مغز انسان داشته و جراحت کامل مغز را شامل می‌شود [۱۲]. عمل دستگاه القاء ضربه مغزی (ساخت گروه فیزیولوژی کرمان) بدین صورت بود که وزنه ۲۵۰ گرمی از داخل ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲ متری به طور آزادانه بر روی سر حیوان بی‌هوش فرود می‌آمد، یک صفحه استیل به منظور پخش یکنواخت ضربه بر روی جمجمه قرار داشت، بعد از القاء ضربه مغزی، حیوان سریعاً به پمپ تنفسی (TSE Animal respirator compact، آلمان) وصل شد، پس از برقراری تنفس خود بخودی، حیوان از دستگاه ونتیلاسیون جدا و به قفس بازگردانده شد [۱۸].

۱ میلی لیتر از هموژنایز مغز و مقادیر TGF- β و پروژسترون
مغز به صورت نانوگرم در ۱ میلی لیتر از هموژنایز مغز بیان
گردید [۲۳].

پروژسترون بودند ریخته شد و پس از نیم ساعت محلول
متوقف کننده به محیط اضافه گردید. تغییر رنگ کروموزن
در طیف نوری ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. مقادیر IL-1 β ,
TNF- α , IL-6 و بتا-استرادیول مغز به صورت پیکوگرم در

جدول ۱- معیارهای پیامد نورولوژیک

متغیر	نمره	طبیعی
	۸	
	۷	خواب آلودگی خفیف با حرکات خودبخودی و هدفدار
	۶	خواب آلودگی، قادرنبودن به ایستادن، اما حفظ خمیدگی سخت
	۵	خواب آلودگی، عقب کشیدن در برابر نیشگون گرفتن، بلندکردن سر نسبت به حرکات بینایی، بدون خمیدگی سخت
عمل حرکتی	۴	عقب کشیدن یا پا زدن در برابر نیشگون گرفتن
	۳	پا زدن خودبخودی
	۲	وضعیت اکستانسیون (خودبخودی یا در برابر حرکات)
	۱	پاسخ ندادن به تحریکات
	۴	طبیعی
	۳	بازشدن در برابر تحریکات
عمل چشمی	۲	طبیعی بودن رفلکس‌های پلک
	۱	پاسخ ندادن پلک به تحریکات
	۳	طبیعی
	۲	عمل تنفسی آتاکسی
	۱	آپنه

۵۰۲/۸±۱۵۷ پیکوگرم در میلیلیتر) و کنترل ۷۳۱/۱±۴۰/۱ پیکوگرم در میلیلیتر) اختلاف معنی دار ندارد، اما مصرف مقدار فارماکولوژیک پروژسترون مقدار IL-6 مغزی (۳۴۰/۳±۵۲/۷ پیکوگرم در میلیلیتر) را در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال کاهش داده است مقایسه با گروه براین، مقادیر فیزیولوژیک $p<0/05$ ؛ علاوه بر این، مقادیر فیزیولوژیک ۵۹۳/۳±۹۳/۱ پیکوگرم در میلیلیتر) و فارماکولوژیک پروژسترون با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند ($p>0/05$) هیچ یک از گروههای دیگر یعنی مقادیر فیزیولوژیک ۴۸۲/۸±۱۶۷/۵ پیکوگرم در میلیلیتر) و فارماکولوژیک ۵۵۱/۹±۲۳/۶ پیکوگرم در میلیلیتر) استروژن با یکدیگر اختلاف معنی دار نداشتند.

کاهش مقدار TNF- α مغزی بعد از درمان با پروژسترون: مقدار TNF- α مغزی در ساعت ششم ترومای مغزی در گروه تحت درمان با حلال ۲۸۷/۲±۴۲/۶ پیکوگرم در میلیلیتر) در مقایسه با گروههای شم ۴۶۲/۱±۷۴/۴ پیکوگرم در میلیلیتر) و کنترل ۴۶۱/۳±۲۰/۸ پیکوگرم در میلیلیتر) کاهش معنی داری ($p<0/01$) را نشان داد. مصرف مقدار فارماکولوژیک پروژسترون ۸۰/۴±۱۰/۹ پیکوگرم در میلیلیتر) در مقایسه با گروههای تحت درمان با حلال یا مقدار فارماکولوژیک استروژن ۴۳۷/۴±۹۸/۳ پیکوگرم در میلیلیتر)، یا مقدار فیزیولوژیک پروژسترون ۴۰۵/۱±۵۷/۱ پیکوگرم در میلیلیتر) باعث کاهش معنی دار میزان TNF- α شد ($p<0/01$)، علاوه بر این، بین مقادیر فیزیولوژیک ۲۰۰/۲±۳۷/۹۶ پیکوگرم در میلیلیتر) و فارماکولوژیک استروژن اختلاف معنی دار وجود دارد ($p<0/01$)، بدین معنی که میزان α -TNF در گروه مقدار فیزیولوژیک کمتر از مقدار فارماکولوژیک است.

آنالیز آماری داده ها: داده های کمی به دست آمده برای گروههای مختلف توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شده و در صورت معنی دار شدن آزمون اولیه، برای پی بردن اختلاف بین گروهها آزمون LSD استفاده شد. همه داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بیان شدند و نتایج با $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

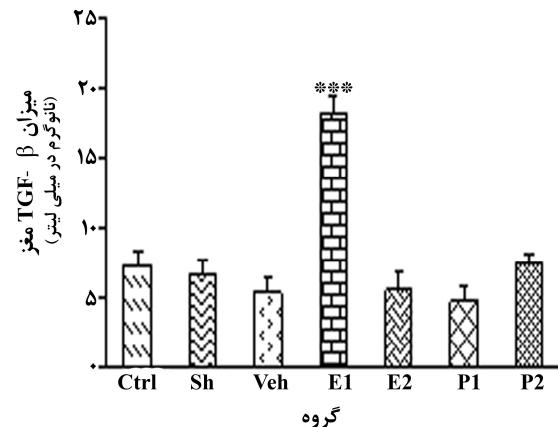
نتایج

افزایش میزان مغزی IL-1 β بعد از درمان با استروژن یا پروژسترون: مقدار IL-1 β در گروه ترومای مغزی تحت درمان با حلال ۱۷۸/۷±۲۲/۷ پیکوگرم در میلیلیتر) در مقایسه با گروههای شم ۳۳۴/۸±۴۰/۱ پیکوگرم در میلیلیتر) و کنترل ۳۴۷/۹±۲۳/۴ پیکوگرم در میلیلیتر) $p<0/001$. مقدار IL-1 β به دنبال مصرف مقدار فارماکولوژیک استروژن ۱۷/۸ ۲۷۲/۷±۱۷/۸ پیکوگرم در میلیلیتر) یا مقدار فیزیولوژیک پروژسترون ۳۱۹/۸±۲۷/۳ پیکوگرم در میلیلیتر) در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال افزایش معنی دار پیدا کرد؛ علاوه بر این، بین مقادیر فیزیولوژیک ۱۵۸/۵±۱۰/۲ پیکوگرم در میلیلیتر) و فارماکولوژیک ۲۷۲/۷±۱۷/۸ پیکوگرم در میلیلیتر) استروژن نیز اختلاف معنی دار وجود داشت ($p<0/01$). همین اختلاف بین مقادیر مختلف پروژسترون نیز مشاهده شد ($p<0/001$).

کاهش مقدار IL-6 مغزی بعد از درمان با پروژسترون: اگر چه به دنبال جراحت تروماتیک مغزی، میزان IL-6 در گروه ترومای مغزی تحت درمان با حلال ۶۲۹/۱±۲۸/۴ پیکوگرم در میلیلیتر) نسبت به گروههای شم

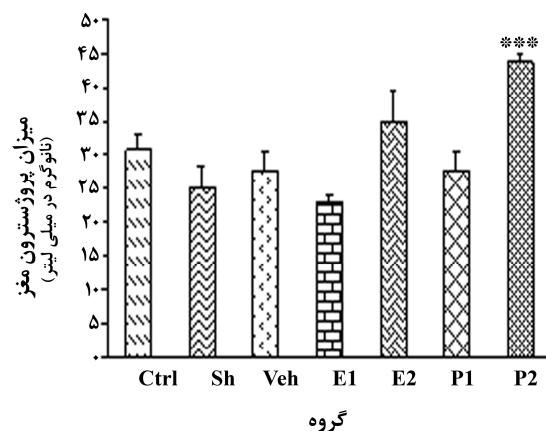
(۱۵) کمتر از گروه شم [۱۵] بود ($p < 0.001$). در یک ساعت بعد از جراحت تروماتیک مغزی نمره پیامد نورولوژیک در گروه حلال ($9/5 \pm 0.5$) کمتر از گروههای شم (12 ± 0.4 ، $p < 0.001$)، E1 (12 ± 0.4 ، $p < 0.001$)، E2 ($13/6 \pm 0.2$ ، $p < 0.001$) و P1 ($12/4 \pm 0.5$ ، $p < 0.001$) بود. در ۴ ساعت بعد از جراحت تروماتیک مغزی این نمره ($12/4 \pm 0.4$) در گروه حلال E1 ($12/4 \pm 0.4$) کمتر از گروههای شم ($12/4 \pm 0.1$ ، $p < 0.001$) و در این زمان نمره در گروههای E2 ($13/8 \pm 0.3$ ، $p < 0.001$) و P1 (14 ± 0.3) و در این ۱۲/۵±۰/۲ P2 و زمان نمره در گروههای E2 ($13/2 \pm 0.3$) و P2 ($13/2 \pm 0.3$) کمتر از گروه حلال ($13/2 \pm 0.3$) بود. در ۲۴ ساعت بعد از جراحت تروماتیک مغزی این نمره ($13/2 \pm 0.3$) در گروه حلال ($13/2 \pm 0.3$) کمتر از گروههای شم ($14/5 \pm 0.2$ ، $p < 0.001$)، E1 ($14/4 \pm 0.4$) و P1 (13 ± 0.3) بود. تغییرات در غلظت استروژن یا پروژسترون در بافت مغزی: غلظت استروژن در گروههای مختلف مطالعه در نمودار ۲ نمایش داده شده است. غلظت بتا-استرادیول در گروه شم $368/1 \pm 12/8$ پیکوگرم در میلی لیتر بود که بعد از ترومما (جراحت تروماتیک مغزی) غلظت آن در گروه تحت درمان با حلال به میزان $353/2 \pm 5/6$ پیکوگرم در میلی لیتر رسید که با یکدیگر و با گروه کنترل اختلاف معنی دار نداشت. مصرف مقدار فارماکولوژیک استروژن باعث افزایش معنی دار غلظت بتا-استرادیول مغزی $1619/7 \pm 484/9$ پیکوگرم در میلی لیتر در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال شد ($p < 0.001$).

افزایش میزان TGF- β مغزی بعد از درمان با استروژن: در نمودار ۱، تغییرات میزان TGF- β مغزی در گروههای مختلف مطالعه نشان داده شده است. اندازه گیری مقدار TGF- β مغزی نشان دهنده عدم تغییر میزان آن در گروه ترومای تحت درمان با حلال ($7/4 \pm 0.8$ نانوگرم در میلی لیتر) در مقایسه با گروههای شم ($6/6 \pm 1/1$ نانوگرم در میلی لیتر) و کنترل است. گروه تحت درمان با مقدار فیزیولوژیک استروژن ($18/2 \pm 1/1$ نانوگرم در میلی لیتر) باعث افزایش میزان TGF- β در مقایسه با گروه تحت درمان با حلال شده است ($p < 0.001$ ؛ همچنین میزان TGF- β در مقدار فیزیولوژیک به طور معنی داری بیشتر از بقیه گروهها می باشد ($p < 0.001$).

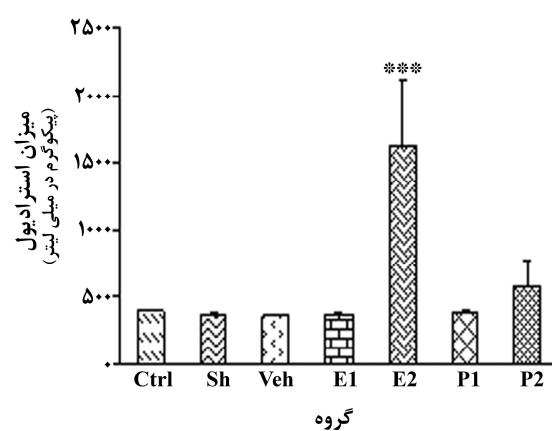


نمودار ۱- اثر مصرف استروژن و پروژسترون بر روی میزان TGF- β (نانوگرم در میلی لیتر) در ۶ ساعت بعد از ضربه مغزی متمرش در موش های صحرایی ماده ($n=2$). E1: مقدار فیزیولوژیک استروژن، E2: مقدار فارماکولوژیک استروژن، P1: مقدار فیزیولوژیک پروژسترون، P2: مقدار فارماکولوژیک پروژسترون. ***: اختلاف معنی دار گروه E1 با گروه حلال ($p < 0.001$).

نتایج مربوط به اندازه گیری پیامدهای نورولوژیک: یک ساعت قبل از ضربه، نمره نورولوژیک در همه گروهها بود. در لحظه صفر، یعنی فوراً بعد از جراحت تروماتیک مغزی نمره پیامد نورولوژیک در گروه حلال



نمودار ۱- اثر مصرف استروژن و پروژسترون بر روى ميزان پروژسترون (pg/ml) در ۶ ساعت بعد از ضربه مغزى متشر در موش های صحرایی ماده ($n=7$). E1: مقدار فيزيولوژیک استروژن، E2: مقدار فارماکولوژیک استروژن، P1: مقدار فيزيولوژیک پروژسترون، P2: مقدار فارماکولوژیک پروژسترون. ***: اختلاف معنی دار گروه P2 با گروه حلال و سایر گروه ها ($p<0.001$).



نمودار ۲- اثر مصرف استروژن و پروژسترون بر روى ميزان استرادیول (pg/ml) در ۶ ساعت بعد از ضربه مغزى متشر در موش های صحرایی ماده ($n=7$). E1: مقدار فيزيولوژیک استروژن، E2: مقدار فارماکولوژیک استروژن، P1: مقدار فيزيولوژیک پروژسترون، P2: مقدار فارماکولوژیک پروژسترون. ***: اختلاف معنی دار گروه E2 با گروه حلال و سایر گروه ها ($p<0.001$). علاوه بر این، غلظت بتا-استرادیول در این گروه از بقیه

گروه های تحت درمان با مقادیر مختلف پروژسترون یا مقدار فيزيولوژیک استروژن بیشتر بود ($p<0.001$). غلظت پروژسترون در بافت مغزی در گروه های مختلف در نمودار ۳ نشان داده شده است. غلظت پروژسترون در گروه شم ۲۵±۳/۳ نانوگرم در میلی لیتر بود، که بعد از تحت درمان قرار گرفتن گروه ترومایی با حلال، غلظت آن ۲۷/۹±۲/۵ نانوگرم در میلی لیتر شد که دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر و با گروه کنترل نمی باشد. گروه تحت درمان با مقدار فارماکولوژیک پروژسترون باعث افزایش غلظت پروژسترون بافت مغزی به میزان ۴۳/۶±۱/۴ نانوگرم در میلی لیتر شد که دارای اختلاف معنی داری با گروه تحت درمان با حلال است ($p<0.001$)؛ هم چنین غلظت پروژسترون در این گروه بیشتر از مقادیر فيزيولوژیک یا فارماکولوژیک استروژن و نیز مقدار فيزيولوژیک پروژسترون بود ($p<0.001$).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف مقدار فارماکولوژیک (زیاد) پروژسترون به دنبال جراحت تروماییک مغزی باعث کاهش میزان IL-6 و TNF- α در ۶ ساعت بعد از جراحت می شود. از آن جایی که جراحت تروماییک مغزی، منجر به افزایش میزان IL-6 و TNF- α مغزی در مرحله حاد جراحت (۶ ساعت بعد از جراحت) می شود، کاهش ساخت این دو سیتوکین در مراحل اولیه بعد از جراحت توسط پروژسترون، هم زمان با افزایش بیان ژن و ساخت حداکثری این دو سیتوکین در این زمان است [۱۷]. مصرف مقدار فیزیولوژیک پروژسترون یا مقدار فارماکولوژیک استروژن در مقایسه با حلال، باعث افزایش میزان IL-1 β می شود؛ علاوه بر این مصرف پروژسترون اثری روی میزان ساخت TGF- β نداشت، اما مصرف مقدار فیزیولوژیک استروژن باعث افزایش میزان TGF- β در زمان مراحل اولیه بعد از جراحت می شود. به نظر می رسد که

چندین ساز و کار احتمالی برای اثر ضدخیزی استروئیدهای جنسی مطرح است که یکی از این سازوکارها تغییر میزان مغزی IL-1 β -IL است. افزایش IL-1 β بعد از جراحت مغزی همانند آن چه که در مطالعه حاضر برای موش صحرایی مطرح شد، برای موش سوری بعد از ایسکمی مغزی [۲۸]، برای موش های صحرایی بعد از ایسکمی [۲۹]، بعد از آسیب های مغزی و بعد از جراحت تروماتیک مغزی [۳۰] نیز گزارش شده است.

اگر چه در مطالعه حاضر، میزان IL-1 β در گروه تحت درمان با حلال کاهش یافته است، اما استروژن و پروژسترون در مقایسه با حلال آن را افزایش داده اند که چند احتمال مطرح می شود: استروژن در مرحله اول جراحت (۶ ساعت بعد از تزریق) باعث افزایش و در مرحله های بعدی باعث کاهش می شود، یا شاید واقعاً این هورمون ها باعث افزایش سیتوکین های التهابی می شوند و التهاب زا هستند [۳۱]، همچنین شاید این هورمون ها در غلظت های به کار برد شده در این مطالعه مؤثر نبوده اند، همان طور که توسط مطالعات دیگران نیز گزارش شده است [۲۸-۳۲] و یا این که چون ۴۸ ساعت بعد از جراحت تروماتیک مغزی حداکثر غلظت IL-1 β ، به وجود می آید [۳۳] با توجه به زمان اندازه گیری، ۶ ساعت بعد از جراحت تروماتیک مغزی اثرات این هورمون نشان داده نشده است؛ بنابراین، اثرات محافظت نورونی این هورمون ها بر روی خیز مغزی احتمالاً از طریق سازوکارهای دیگر از قبیل عمل بر روی نفوذ پذیری سد خونی- مغزی، عمل آنتی اکسیدانی آن ها، کاهش ماتریکس متالوپروتئیناز نمره-۲، تغییرات در گیرنده های گابا و یا کاهش تولید نیتریک اکساید و پروستاگلاندین E₂ ناشی از IL-1 β ، محدود کردن نکروزیس و آپوپتوزیس سلولی و

مقدار فیزیولوژیک استروژن افزایش این سیتوکین را در زمانی موجب می شود که کاهش حداکثری برای آن بعد از جراحت تروماتیک مغزی وجود داشته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان گر اثرات وابسته به مقدار هورمون های استروئیدی جنسی بر روی میزان سیتوکین های مختلف در مرحله حاد جراحت می باشد، یعنی فقط مقدار فارماکولوژیک پروژسترون روی کاهش IL-6 و TNF- α اثر داشته و مقدار فیزیولوژیک آن فاقد اثر است، از سوی دیگر، فقط مقدار زیاد استروژن و یا مقدار اندک استروژن به ترتیب باعث افزایش IL-1 β و افزایش TGF- β می شوند.

نتایج این مطالعه در ارتباط با تغییر موقتی در میزان سیتوکین های IL-1 β ، IL-6، TNF- α و TGF- β به علت جراحت، هماهنگ با مطالعات انجام شده روی مدل های حیوانی و انسانی می باشد، به طوری که گزارش شده است، تغییر در میزان این سیتوکین ها در مدل های مختلف جراحت از قبیل ایسکمی مغزی قدامی [۲۳]، جراحت Fluid-Percussion [۲۳]، جراحت طباب نخاعی [۱۶]، کوفتگی مغزی در انسان [۲۴] و جراحت تروماتیک تجربی در مغز [۴-۵] معمولاً در ۳۰ دقیقه بعد از جراحت شروع شده و تا ۲۴ ساعت بعد از آن ادامه دارد؛ علاوه بر این تغییرات وابسته به مقدار توسط مطالعات دیگران نیز تأیید شده است: در موش صحرایی فقط مقدار زیاد و نه مقدار کم پروژسترون، حجم آسیب را به دنبال ایسکمی مغزی کاهش می دهد [۲۵]. پروژسترون دارای عمل محافظت نورونی وابسته به مقدار و زمان در سکته تجربی است [۲۶]. در مقدار بالای پروژسترون، جراحت مغزی تشدید شده [۲۷]، در حالی که مقدار کمتر آن دارای اثر محافظت نورونی است [۲۶].

همچنین توسط لکوسیت‌های فعال نشان داده شده است و باعث تضعیف التهاب مغزی می‌شود [۴۱]. در مطالعه حاضر، مقدار کم استروژن باعث افزایش شدید β -TGF باشد است که این نتیجه هماهنگ با نتیجه مطالعه دیگری است [۴۲]؛ بنابراین احتمالاً یکی از سازوکارهای ضدالتهابی استروژن علاوه بر سازوکارهای دیگر، افزایش β -TGF است. پروژسترون بر روی میزان β -TGF را نداشت. اما تعدادی پژوهش نیز اثر پروژسترون را روی β -TGF گزارش نموده‌اند [۲۸-۴۲]. استروژن احتمالاً از طریق سازوکارهای زیر افزایش β -TGF را موجب شده است: افزایش IL-1 β [۳۴]، تغییر در رهایش سیتوکین‌ها از نورون‌های مغزی و سلول‌های خونی و جلوگیری از تخریب سد خونی-مغزی [۴۳].

نتایج بخش دیگر این پژوهش نشان دادند که غلظت بتا-استرادیول مغز تنها در گروه مقدار زیاد استروژن در مقایسه با حلal افزایش پیدا کرد. احتمالاً اثر افزایشی این هورمون روی IL-1 β در مقایسه با مقدار اندک استروژن به علت افزایش غلظت آن در مغز می‌باشد و عدم تأثیر مقدار اندک استروژن و پروژسترون بر روی IL-1 β ، شاید به علت عدم افزایش غلظت بتا-استرادیول مغزی در این گروه‌ها باشد؛ از سوی دیگر در حالی که در گروه مقدار اندک، بتا-استرادیول مغزی افزایش پیدا نکرده است اما اثر افزایشی آن روی TGF- β مشاهده شد، این بدین معنی است که شاید افزایش غلظت بتا-استرادیول مغزی نقش منفی روی افزایش TGF- β داشته باشد. همچنین علی‌رغم این که غلظت مغزی بتا-استرادیول برای دو گروه یکسان نمی‌باشد و غلظت بتا-استرادیول در گروه مقدار زیاد، حداقل ۴ برابر مقدار کم است، اما عدم تأثیر آنها روی میزان‌های IL-6 و TNF- α یکسان است که این اثر

کاهش گیرنده‌های IL-1 β [۲۸، ۳۴-۳۵] اعمال شده است.

تعدادی از مطالعات، اثرات کاهشی استروژن [۳۶] و پروژسترون [۱۷-۲۸] را بر روی IL-1 β بعد از جراحت نشان داده‌اند که دلایل احتمالی اختلاف نتایج آن‌ها با مطالعه حاضر بستگی به نوع و شدت جراحت، مقدار مصرفی و زمان مصرف هورمون‌ها و همچنین نوع حلال به کار برده شده، دارد.

مقدار زیاد پروژسترون، میزان IL-6 و TNF- α را بعد از جراحت تروماتیک مغزی کاهش داده است که این نتیجه با نتایج مطالعات دیگران هماهنگ است [۳۰-۳۷]. پروژسترون احتمالاً از طریق کاهش این دو سیتوکین، التهاب و خیز مغزی را کاهش داده است و این که اثر پروژسترون بر روی IL-6 و TNF- α به مقدار مصرفی آن بستگی دارد؛ اگر چه دیگر سازوکارهای ضد التهابی برای این هورمون را که در فوق برای استروژن بیان شد، نباید از نظر دور داشت. تعدادی از پژوهش‌ها در مدل‌های دیگر جراحت، اثر کاهش پروژسترون روی IL-6 [۳۸] و TNF- α [۲۸-۳۶] را تأیید ننموده‌اند، که دلایل احتمالی این اختلاف مربوط به نوع، شدت جراحت و مقدار مصرفی پروژسترون می‌باشد. مطالعات دیگر نیز عدم تأثیر استروژن روی IL-6 [۳۸] و TNF- α [۳۲] را گزارش نموده‌اند؛ اگر چه اثر کاهشی استروژن بر روی این سیتوکین‌ها نیز گزارش شده است [۳۹] که دلایل احتمالی تفاوت نتایج این مطالعات با نتیجه مطالعه حاضر، مطالب مطرح شده در فوق است.

در آسیب‌های ناشی از جراحت تروماتیک مغزی، TGF- β باعث مهار تولید سیتوکین‌ها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود [۴۰] و تولید موضعی آن که در مغز و

که در ساعت اول بعد از ضربه مصرف هر کدام از هورمون‌های تخدمانی در مقدار کم و زیاد دارای این عمل مفید هستند. اما در طول زمان ۲۴ ساعت اثر مقدار کم استروژن و پروژسترون و مقدار زیاد استروژن باقی می‌ماند و نشان‌دهنده این است که اثر پروژسترون بر روی نمره نورولوژیک، مثل بسیاری از اثرات آن وابسته به مقدار و زمان است [۲۶-۲۷]. در حالی که اثر استروژن هم در مقدار کم و هم در مقدار زیاد برای افزایش نمره نورولوژیک در طول زمان، وجود دارد. شاید این اثرات متفاوت مقداری مختلف هورمون‌های جنسی بر روی نمره نورولوژیک در طول زمان، مربوط به تغییرات غلظت هورمون‌های جنسی در مغز در طول زمان باشد و با توجه به نتایج بررسی سیتوکین‌های مغزی در ۶ ساعت بعد از ضربه مغزی، شاید بتوان گفت اثرات متفاوت هورمون‌های جنسی زنانه بر روی نمره نورولوژیک در طول زمان از طریق تغییرات سیتوکین‌های مغزی واسطه می‌شود که در این زمینه احتیاج به پژوهش‌های بیشتری است.

نتیجه‌گیری

در مجموع پژوهش حاضر نشان داد که حداقل قسمتی از ویژگی حفاظت نورونی هورمون‌های استروئیدی جنسی در کاهش خیز مغزی که از نتایج مهم و فوری جراحت تروماتیک مغز است و هم چنین بهبودی پیامدهای نورولوژیک، احتمالاً از طریق تغییر در میزان سیتوکین‌های مغزی یعنی افزایش IL-1 β و TGF- β و کاهش IL-6 و TNF- α به انجام می‌رسد که این اثرات هورمون‌ها بستگی به مقدار مصرفی آن‌ها دارد. این اثرات ممکن است مستقیم یا غیرمستقیم باشد، یا اینکه ممکن است با واسطه گیرنده‌های داخل سلولی یا گیرنده‌های غشایی این استروئیدهای جنسی اعمال شود. جهت مشخص نمودن

یکسان بدون توجه به غلظت مغزی، توسط مطالعه دیگری که روی خیز مغزی ناشی از ایسکمی انجام شده، تأیید گردیده است [۳۴]. غلظت مغزی پروژسترون در گروه مقدار زیاد پروژسترون تقریباً ۱/۵ برابر غلظت آن در گروه‌های حلال و مقدار کم می‌باشد و شاید همین تفاوت غلظتی، علت اختلاف نتایج در گروه‌های پروژسترون در اثرگذاری روی IL-1 β ، IL-6 و TNF- α می‌باشد، یعنی افزایش غلظت مغزی پروژسترون برای کاهش IL-6 و TNF- α لازم است، در حالی که این افزایش برای اثرگذاری بر روی IL-1 β لازم نیست.

در بخش دیگر این مطالعه که نمره نورولوژیک اندازه‌گیری شد، مشخص گردید یک ساعت بعد از ترومما، هم استروژن و هم پروژسترون در مقدار کم و زیاد توانایی افزایش نمره نورولوژیک را در مقایسه با گروه حلال دارند. اما وقتی که نمره نورولوژیک ۴ ساعت بعد از ترومما اندازه‌گیری شد تنها، مقدار کم استروژن و پروژسترون نمره نورولوژیک را در مقایسه با حلال افزایش دادند. در ساعت بیست و چهارم بعد از ترومما، اثر مقدار کم استروژن و پروژسترون بر روی افزایش نمره نورولوژیک باقی‌مانده است و اثر مقدار زیاد استروژن بر روی افزایش نمره نورولوژیک، نیز در این زمان آشکار می‌شود؛ بنابراین، در زمان‌های ۱، ۴ و ۲۴ که نمره نورولوژیک اندازه‌گیری شده است مقدار فیزیولوژیک استروژن و پروژسترون، در همه این زمان‌ها برای افزایش نمره نورولوژیک مفید می‌باشد. از آن جایی که بر اساس نمره‌های نورولوژیک، جراحت تروماتیک مغز بر اساس نمره کسب شده به ۳ گروه خفیف، متوسط و شدید تقسیم می‌شود [۴۴]، که افزایش نمره نورولوژیک در بهبودی عملکردی بعد از جراحت تروماتیک مغز مفید خواهد بود و یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد

تحقیقات علوم اعصاب اهواز و کرمان تصویب شده است. بدین وسیله از خدمات رؤسای این مراکز 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 گوهرگزی نیز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مسیر اعمال اثرات هورمون‌های فوق نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل تلاش طرح تحقیقاتی می‌باشد که در مرکز

References

- [1] Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8(2): 101-5.
- [2] Unterberg A, Kiening K, Schmiedek P, Lanksch W. Long-term observations of intracranial pressure after severe head injury. The phenomenon of secondary rise of intracranial pressure. *Neurosurgery* 1993; 32(1): 17-24.
- [3] Holmin S, Schalling M, Hojeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J Neurosurg* 1997; 86(3): 493-504.
- [4] Morrison B, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J Neurotrauma* 1998; 15(11): 911-28.
- [5] McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 1998; 15(10):731-69.
- [6] Olsson T. Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 1995; 144: 245-68.
- [7] Ross SA, Halliday MI, Campbell GC, Byrnes DP, Rowlands BJ. The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br J Neurosurg* 1994; 8(4): 419-25.
- [8] Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *Eur J Neurosci* 1998; 10(3): 1188-95.
- [9] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg* 2000; 92(1): 108-20.

- [10] Dore-Duffy P, Balabanov R, Washington R, Swarnborg RH. Transforming growth factor beta 1 inhibits cytokine-induced CNS endothelial cell activation. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 22(3): 161-75.
- [11] Fee DB, Sewell DL, Andresen K, Jacques TJ, Piaskowski S, Barger BA, et al. Traumatic brain injury increases TGF beta RII expression on endothelial cells. *Brain Res* 2004; 1012(1-2): 52-9.
- [12] 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. [Farsi]
- [13] Shahrokh N, Khaksari M, Soltani Z, Nekhai N, Mahmodi M, Nemati A. The effect of sex steroid hormones on brain edema and intracranial pressure after experimental traumatic brain injury in rats. *J Semnan Univ Med Sci* 2008; 9(4): 263-72. [Farsi]
- [14] Patel HC, Boutin H, Allan SM. Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 39-47.
- [15] Raivich G, Liu ZQ, Kloss CU, Labow M, Bluethmann H, Bohatschek M. Cytotoxic potential of proinflammatory cytokines: combined deletion of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 prevents motoneuron cell death after facial axotomy in adult mouse. *Exp Neurol* 2002; 178(2): 186-93.
- [16] Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 1998; 152(1): 74-87.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Shahabinejad M, Khaksari M. Inspection of 17-beta estradiol effect on wound recovery in ovariectomized rats. *J Semnan Univ Med Sci* 2001; 3(1,2): 1-10. [Farsi]
- [21] Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 825: 179-93.
- [22] 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.
- [23] Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavalá 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.
- [24] Holmin S, Hojeberg B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci Lett* 2004; 369(2): 108-14.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Duckles SP. Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 2000; 31(5): 1173-8.
- [28] 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.
- [29] Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, Yamazaki A, Satoh M. Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 1992; 58(1): 390-2.
- [30] Chen G, Shi J, Jin W, Wang L, Xie W, Sun J, et al. Progesterone administration modulates TLRs/NF-kappaB signaling pathway in rat brain after cortical contusion. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38(1): 65-74.
- [31] Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Serioli B, Secchi ME, Villaggio B, et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1089: 538-47.
- [32] Lacut K, Oger E, Le Gal G, Blouch MT, Abgrall JF, Kerlan V, et al. Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein. *Thromb Haemost* 2003; 90(1): 124-31.
- [33] Maegele M, Sauerland S, Bouillon B, Schafer U, Trubel H, Riess P, et al. Differential immunoresponses following experimental traumatic brain injury, bone fracture and "two-hit"-combined neurotrauma. *Inflamm Res* 2007; 56(8): 318-23.
- [34] Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 2006; 29(2): 217-31.
- [35] Liu R, Wen Y, Perez E, Wang X, Day AL, Simpkins JW, et al. 17beta-Estradiol attenuates blood-brain

- barrier disruption induced by cerebral ischemia-reperfusion injury in female rats. *Brain Res* 2005; 1060(1-2): 55-61.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Jonsson D. The biological role of the female sex hormone estrogen in the periodontium--studies on human periodontal ligament cells. *Swed Dent J Suppl* 2007; 187: 11-54.
- [39] Jain SK, Kannan K, Prouty L, Jain SK. Progesterone, but not 17 beta-estradiol, increases TNF-alpha secretion in U937 monocytes. *Cytokine*, 2004; 26(3): 102-5.
- [40] Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994; 180(5): 1587-90.
- [41] Zhu Y, Roth-Eichhorn S, Braun N, Culmsee C, Rami A, Kriegstein J. The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 2000; 866(1-2): 286-98.
- [42] Hathachote 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.
- [43] 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.
- [44] Erythrocyte indicators of oxidative changes 44. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. in patients with graded traumatic head injury. *Neurol India* 2008; 56(1): 31-5.

Neuroprotection Effect of Female Sex Steroids after Traumatic Brain Injury in Rats: the Role of Inflammatory Cytokines

A.R. Sarkaki¹, M. Khaksari Haddad², Z. Soltani³, Z. Keshavarzi⁴, N. Shahrokhi⁵, G.R. Asadi Karam⁶ · R. Abbassi⁷

Received: 19/04/10

Sent for Revision: 02/06/10

Received Revised Manuscript: 29/09/10

Accepted: 26/12/10

Background and Objectives: Previous studies have demonstrated estrogen and progesterone decrease brain edema induced by TBI. The aim of the present study was to determine whether ovarian hormones decrease brain edema by change in concentrations of proinflammatory cytokines.

Materials and Methods: In this experimental study, 98 ovariectomized female rats (except groups 1 and 2) were divided into groups of control, sham, vehicle, low does of estrogen (E1), high dose of estrogen (E2), low dose of progesterone (P1) and high dose of progesterone (P2). Vehicle and sexual steroid hormones were injected intraperitoneally at 0.5 h after Moderate and diffuse TBI induced by Marmarou method. Brain level of cytokines and ovarian hormones were measured 6 h after TBI by ELISA method.

Results: Both E2 and P1 caused significant increase of 52.8% and 79.2% in brain level of IL-1 β . P2 significantly decreased the levels of IL-6 and TNF- α by 45.9% and 72% respectively. TGF- β level seem to be decreased by E1 up to 3.37 times significantly. Level of β -Estradiol increased 4.58 times in E2 group and progesterone increased 1.56 times in P2 group significantly.

Conclusion: This results suggested that ovarian hormones increased brain IL-1 β and TGF- β and decreased IL-6 and TNF- α , this may be one mechanism by which hormones reduce cerebral edema.

Key words: TBI, Ovarian hormones, IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β

Funding: This research was financially supported by Ahwaz Physiology Research Center and Kerman Neuroscience Research Center (KNRC).

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Vice Chancellor of Kerman University of Medical Sciences, approved the study (Ethical cod:EC/KNRC/87-19

How to cite this article: Sarkaki AR, Khaksari Haddad M, Soltani Z, Keshavarzi Z, Shahrokhi N, Asadi Karam GR, Abbassi R. Neuroprotection Effect of Female Sex Steroids after Traumatic Brain Injury in Rats: the Role of Inflammatory Cytokines. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2011; 10(1): 46-61. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Physiology, Physiology Research Center, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran
Corresponding Author, Tel: (0611) 3738248, Fax: (0611) 3361544, E-mail: sarkaki_a@yahoo.com

2- Prof., Dept. of Physiology, Physiology Research Center Dept. of Physiology and Bam International Unit, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3- MSc; Neuroscience Research Center of Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- PhD Student Dept. of Physiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5- Assistant Prof., Dept of Physiology, Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6- Associate Prof., Dept of Biochemical Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

7- General Physician, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran