

تغییرات ادم مغزی و پیامدهای نورولوژی بعد از ضربه‌ی مغزی تجربی با مصرف توأم استروژن و پروژسترون

زهرا سلطانی^۱، محمد خاکساری^۲، نادر شاه‌رخی^۱، نوذر نخعی^۱، وحید شیبانی^۱

(۱) مرکز تحقیقات علوم اعصاب و فیزیولوژی و (۲) مرکز تحقیقات علوم اعصاب و فیزیولوژی و مرکز بین‌المللی بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان؛ **نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول:** کرمان، بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه فیزیولوژی، دکتر محمد خاکساری؛ e-mail: khaksar38@yahoo.co.uk

چکیده

مقدمه: مطالعه‌های زیادی نشان داده‌اند که خیز (ادم) مغزی کنترل نشده علت بسیاری از ناتوانی‌ها و مرگ و میرها در ضربه‌ی مغزی است. مطالعه‌های قبلی اثر محافظت‌کنندگی مصرف تنهای استروژن و پروژسترون را در ضربه مغزی نشان داده‌اند. در این مطالعه اثر مصرف توأم استروژن و پروژسترون به دنبال ضربه‌ی مغزی منتشر بر خیز مغزی و پیامد نورولوژی آن در موش‌های صحرایی ماده بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** این پژوهش مداخله‌ای - تجربی در ۸ گروه موش صحرایی ماده انجام شد که گروه‌ها به ترتیب ۱- شاهد، ۲- شم، ۳- ترومای بدون تخمدان (TBI+OVX)، ۴- حلال، ۵- دوز فیزیولوژیک استروژن + دوز فیزیولوژیک پروژسترون (E1+P1)، ۶- دوز فیزیولوژیک استروژن + دوز فارماکولوژیک پروژسترون (E1+P2)، ۷- دوز فارماکولوژیک استروژن + دوز فیزیولوژیک پروژسترون (E2+P1) و ۸- دوز فارماکولوژیک استروژن + دوز فارماکولوژیک پروژسترون (E2+P2) تقسیم شدند. تزریق هورمون‌ها به صورت تک دوز و داخل صفاقی دو هفته بعد از اوارکتومی و نیم ساعت بعد از القای ضربه مغزی منتشر به روش مارمارو انجام شد. خیز مغزی به وسیله‌ی اندازه‌گیری محتوای آب مغزی و سلامت سد خونی - مغزی به وسیله‌ی میزان رنگ آبی ایوانز خارج عروقی و پیامدهای نورولوژی به وسیله‌ی نمره‌ی نورولوژی حیوانی تعیین شد. **یافته‌ها:** محتوای آب مغزی، در گروه ۸ در مقایسه با گروه حلال و گروه ۶، به ترتیب کاهش معنی‌دار ۲/۶۸٪ و ۲/۸۸٪ نشان داد و در گروه ۵ در مقایسه با گروه ۶، کاهش معنی‌دار ۲/۲۹٪ یافت. میزان رنگ آبی ایوانز در گروه‌های ۶ و ۷ در مقایسه با حلال، به ترتیب کاهش معنی‌دار ۲۱/۱٪ و ۱۴/۷٪ پیدا کرد. نمره‌ی نورولوژی یک ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی، در گروه ۵ در مقایسه با حلال و گروه ۳ به ترتیب افزایش معنی‌دار ۲/۵ و ۲ نشان داد. هم‌چنین در ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی، در همه گروه‌های تزریقی نمره‌ی نورولوژی در مقایسه با گروه ۳ افزایش معنی‌دار پیدا کرد و در ۲۴ ساعت بعد از ضربه، این نمره در گروه‌های ۷ و ۸ در مقایسه با حلال، افزایش معنی‌دار ۱/۲ را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که اثر مفید مصرف توأم استروژن و پروژسترون در کاهش خیز مغزی و بهبود پیامدهای نورولوژی، بستگی به دوزی از استروژن دارد که با پروژسترون مصرف می‌شود.

واژگان کلیدی: نمره‌ی نورولوژی، خیز مغزی، آسیب مغزی منتشر، محتوای آب مغز، آبی ایوانز، استروژن، پروژسترون

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱۱ - دریافت اصلاحیه: ۸۷/۷/۲۲ - پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۲۴

مقدمه

جراحی ضربه‌ی مغزی (TBI) منجر به مرگ و ناتوانی بسیاری از افراد می‌شود. هر سال حدود ۱/۵ میلیون نفر از مردم به خاطر این جراحی می‌میرند و چند میلیون نفر درمان اورژانسی دریافت می‌کنند. بیشتر این افراد (۹۰٪) در کشورهای با درآمد کم و متوسط قرار دارند.^۱ برخی از مطالعه‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که خیز مغزی غیرکنترل شده، علت بسیاری از ناتوانی‌ها و مرگ و میرهای همراه با TBI است. واکنش‌های التهابی که با آسیب مغزی، ضربه‌ی مغزی و تومورهای مغزی شروع می‌شوند، باعث آسیب به بافت مغزی شده^۲ و به طور عمده سبب مرگ نوروها در جایگاه آسیب و همچنین، آسیب‌های ثانویه‌ی عصبی در این نواحی می‌شوند.^۳ مطالعه‌ها نشان دادند که حیوان‌های ماده خیز مغزی کمتر^۴ و کوفتگی قشری کمتری^۵ در مقایسه با حیوان‌های نر داشتند. پژوهش‌های بعدی بر بررسی اثر پروژسترون متمرکز شدند، زیرا مشاهده شد در حالی که هیپرپروژستینمی در حیوان‌های ماده وجود دارد، خیز وجود ندارد.^۶ پژوهش‌های دیگر تأثیر مثبت پروژسترون را در حیوان‌های نر بر خیز مغزی و برگشت رفتارشناختی نشان دادند.^۷ همچنین، گزارش شد که غلظت سرمی پروژسترون رابطه‌ی معکوس با خیز مغزی به دنبال TBI دارد.^۸ گروس و همکاران نشان دادند که مفیدبودن پروژسترون بستگی به دوز مصرفی دارد.^۹ در مطالعه‌ای دیگر که توسط روف و همکاران انجام شد، نشان داده شد که پروژسترون در کاهش خیز مغزی بعد از TBI خیلی مؤثرتر از متیل‌پردنیزولون است.^{۱۰} در مطالعه‌ی قبلی گروه تحقیقاتی ما نیز، نشان داده شد که پروژسترون و همچنین متابولیت آن یعنی آلوپرگننولون در کاهش خیز مغزی مؤثر است.^{۱۱} در مجموع از ۶۵ مطالعه‌ای که در حیوان‌های مختلف توسط ۲۰ گروه تحقیقاتی انجام شده، مشخص شده است که پروژسترون در سیستم عصبی دارای تأثیر حفاظتی (نوروپروتکتیو) است.^{۱۲}

با توجه به یافته‌های بالا که نشان می‌دهند پروژسترون در جراحی مغزی مفید است، این احتمال داده شد که استروژن نیز ممکن است مفید باشد به همین دلیل، ناکامورا و همکاران تأثیر استروژن را بر خونریزی داخل مغزی در

موش‌های صحرایی بررسی کردند، آن‌ها دریافتند که موش‌های صحرایی ماده دارای خیز کمتری در مقایسه با نرها هستند.^{۱۱} دیگر پژوهشگران گزارش نمودند که استرادیول دارای اثر نوروپروتکتیو بعد از ایسکمی مغزی، در موش‌های صحرایی ماده است.^{۱۲} همچنین، یافته‌های مطالعه قبلی گروه تحقیقاتی ما نیز نشان داد که استروژن مانند پروژسترون باعث مهار خیز مغزی بعد از TBI در موش‌های صحرایی ماده می‌شود.^{۱۳} سازوکار اصلی که هورمون‌های استروئیدی تخمدان تأثیر نوروپروتکتیو خود را از طریق آن اعمال می‌کنند، جلوگیری از پیدایش التهاب است.^{۱۴} پروژسترون و استروژن باعث کاهش محتوای آب مغزی^{۱۵} در خیزهای وازوژنیک سیتوتوکسیک در حیوانات دچار TBI می‌شوند.^{۱۶،۱۷}

از آنجا که در مطالعه‌ی قبلی گروه ما مشخص شد مصرف استروژن به تنهایی و پروژسترون به تنهایی توانایی کاهش خیز مغزی و جلوگیری از آسیب به سد خونی مغزی (BBB)^{۱۸} را دارد،^{۱۹} این سؤال مطرح شد که اگر اثر نوروپروتکتیو هورمون‌های جنسی تخمدان به تنهایی وجود دارد، آیا در مصرف توأم آن‌ها نیز این تأثیر نوروپروتکتیو وجود دارد؟ همچنین، بعضی از مطالعه‌ها گزارش نموده‌اند که استروژن کمتر به تنهایی ترشح می‌شود و اثرات نوروپروتکتیو استروژن و پروژسترون معمولاً با هم مطرح می‌باشد،^{۲۰} علاوه بر این در مطالعه‌ای که در آنسفالیت تجربی انجام شده، نشان داده شده است که غلظت فیزیولوژیک پروژسترون اگر به تنهایی (بدون مصرف استروژن) مصرف شود، باعث افزایش فیلتراسیون لکوسیت‌های تک هسته‌ای در این بیماری و تشدید بیماری می‌شود، اما اگر استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی با هم مصرف شوند افزایش فیلتراسیون لکوسیت‌های تک‌هسته‌ای مهار شده و بهبود بیماری را به دنبال دارد.^{۲۱} در مطالعه‌ای دیگر که استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی مصرف شده بودند، مشاهده شد که به دنبال مصرف پروژسترون به تنهایی گیرنده‌های آلفای استروژن کاهش و گیرنده‌های TNF- α افزایش می‌یابد در حالی که با مصرف توأم استروژن با پروژسترون این اثر معکوس می‌شود.^{۲۲}

ii - Water content

iii - Blood Brain Barrier

i - Traumatic Brain Injury

داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد. گروه ۵، گروه دوز فیزیولوژیک استروژن و دوز فیزیولوژیک پروژسترون (E1+P1): موش‌های صحرایی ماده‌ی فاقد تخمدان بودند که ۳۳/۳ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استروژن^{۱۷} و ۱/۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پروژسترون^{۱۷} به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی به آنها تزریق شد. گروه ۶، گروه دوز فیزیولوژیک استروژن و دوز فارماکولوژیک پروژسترون (E1+P2): موش‌های صحرایی ماده‌ی فاقد تخمدان بودند که ۳۳/۳ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استروژن و ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پروژسترون^{۱۸} به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی به آنها تزریق شد. گروه ۷، گروه دوز فارماکولوژیک استروژن و دوز فیزیولوژیک پروژسترون (E2+P1): موش‌های صحرایی ماده‌ی فاقد تخمدان بودند که استروژن^{۱۸} ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و پروژسترون ۱/۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی به آنها تزریق شد. گروه ۸، گروه دوز فارماکولوژیک استروژن و دوز فارماکولوژیک پروژسترون (E2+P2): موش‌های صحرایی ماده‌ی فاقد تخمدان بودند که استروژن ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و پروژسترون ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از ضربه‌ی مغزی به آنها تزریق شد.

استروژن، پروژسترون و حلال آن‌ها از شرکت دارویی ابوریحان (ایران) و رنگ آبی ایوانز (E.B) از شرکت سیگمای انگلستان خریداری شد.

بعد از بیهوش کردن موش‌های صحرایی ماده، با مخلوط کتامین (۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) و رامپون (۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) حیوان به پشت خوابانده شده، موهای قسمت تحتانی شکم تراشیده شده و یک برش افقی به طول ۲ سانتی‌متر ایجاد شد. سپس پوست، فاسیا و عضلات شکم باز شد. چربی‌ها و روده کنار زده شد تا رحم و لوله‌های رحمی مشاهده شوند. لوله‌ی رحم و پایه‌ی عروقی تخمدان با نخ کاتکوت ۴ در ناحیه‌ی پروگزیمال مسدود و از ناحیه‌ی دیستال قطع شد و همین عمل در مورد تخمدان سمت دیگر بدن تکرار شد. در انتها ۲-۱ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی داخل شکم ریخته، عضلات و پوست به ترتیب با

با توجه به موارد فوق در این مطالعه سعی شد که تأثیر مصرف توأم استروژن و پروژسترون بر روی خیز مغزی ناشی از ترومای منتشر مغزی بررسی شود و نیز پیامدهای نورولوژی ناشی از این مصرف توأم، در موش‌های صحرایی ماده آزمایش شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی مداخله‌ای - تجربی، از ۱۱۲ سر موش صحرایی (Rat) ماده‌ی از نژاد Albino NMARI با وزن ۱۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها ۲ ماهه بوده، قبل از باروری از موش‌های صحرایی نر جدا شدند. حیوان‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و درجه‌ی حرارت ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی کرمان نگهداری شدند، در ضمن آب و غذا آزادانه در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

از آن‌جا که در مطالعه‌ی قبلی گروه تحقیقاتی ما مشخص شد که حیوان‌های ماده خیز کمتری نسبت به حیوان‌های نر دارند،^{۱۰} در این مطالعه نیز حیوان‌های ماده انتخاب شدند. حیوان‌ها به طور تصادفی به ۸ گروه ۱۴ تایی تقسیم شدند. همه‌ی گروه‌ها دارای دو زیر گروه بودند که در زیر گروه A: محتوای آب مغزی ۲۴ ساعت بعد از TBI، نمره نورولوژیک (بلافاصله بعد از ضربه، یک ساعت بعد از ضربه، ۴ ساعت بعد از ضربه و ۲۴ ساعت بعد از ضربه) و همچنین میزان استروژن و پروژسترون در سرم و بافت مغز اندازه‌گیری شد و در زیر گروه B: رنگ آبی ایوانز خارج عروقی ۵ ساعت پس از القای ضربه‌ی مغزی اندازه‌گیری شد.^{۱۷،۱۸}

گروه ۱، گروه شاهد (Control): موش‌های صحرایی ماده‌ای بودند که بدون هیچ مداخله‌ای شاخص‌های فوق در آن‌ها اندازه‌گیری شد. گروه ۲، گروه شام (Sham): موش‌های صحرایی ماده‌ای که تخمدان‌های آن‌ها برداشته شد، سپس بیهوش شدند و زیر دستگاه ایجادکننده‌ی ضربه‌ی مغزی قرار گرفتند. گروه ۳، گروه ترومای فاقد تخمدان (TBI+OVX): موش‌های صحرایی ماده‌ای بودند که تخمدان‌های آن‌ها برداشته شد. سپس، ضربه‌ی مغزی در آن‌ها اعمال شد. گروه ۴، گروه حلال (VEH): موش‌های صحرایی ماده‌ی فاقد تخمدان بودند که هم حجم استروژن و پروژسترون، حلال آن‌ها (روغن کنجد و بنزیل الکل) نیم‌ساعت^{۱۷} بعد از ضربه‌ی مغزی به صورت

نخ کاکتوس و سیلک ۲ صفر به روش پیوسته بخیه شد. محل زخم با محلول بتادین ضد عفونی شد. حیوان‌ها تا ۲ ساعت مورد مراقبت ویژه قرار گرفتند،^{۲۰} هیچ یک از آن‌ها حین عمل جراحی یا بعد از آن نمردند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی، انجام اواراکتومی حداقل دو هفته قبل از هر عملیات دیگری انجام شد.^{۲۱}

ایجاد ضربه‌ی مغزی متوسط^۱ از نوع منتشر^۲ و به روش مارمارو^۳ انجام شد. عمل دستگاه القای ضربه‌ی مغزی (ساخت گروه فیزیولوژی کرمان) به این صورت بود که وزنه‌ی ۲۵۰ گرمی از داخل ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲ متری به طور آزادانه روی سر حیوان بی‌هوش فرود می‌آمد. یک صفحه‌ی استیل به منظور پخش یکنواخت ضربه روی جمجمه قرار داشت. بعد از القای ضربه مغزی حیوان به سرعت به پمپ تنفسی (TSE Animal respirator compact، آلمان) وصل می‌شد. پس از برقراری تنفس خود به خودی، حیوان از دستگاه و نتیل‌اسیون جدا و به قفس باز گردانده می‌شد.^{۱۷}

برای ارزیابی سلامت سد خونی - مغزی، میزان رنگ آبی ایوانز (E.B content) خارج عروقی اندازه‌گیری شد: میزان نفوذپذیری عروق مغزی ۵ ساعت پس از القای ضربه‌ی مغزی با استفاده از رنگ آبی ایوانز خارج عروقی اندازه‌گیری شد (رنگ آبی ایوانز به پروتئین‌های سرم مانند آلبومین متصل و در شرایط تخریب سدخونی - مغزی در خارج از عروق مشاهده می‌شود). در ساعت چهارم بعد از القای ضربه‌ی مغزی، حیوان با اتر بیهوش و رنگ به میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از طریق ورید فمورال راست تزریق شد. یک ساعت پس از تزریق، مغز حیوان با محلول سرم فیزیولوژی ایزوتونیک شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد، مغز با سرعت خارج و در ۲۰ میلی‌لیتر محلول شامل استون و سولفات سدیم ریخته شد و برای مدت ۲۴ ساعت در دستگاه shaker (تکان‌دهنده) گذاشته شد، سپس محلول بالایی برداشته و با ۱ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید مخلوط شد. میزان جذب محلول آبی ایوانز در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Pharmacia biotech، آلمان) اندازه‌گیری و سپس میزان رنگ آبی ایوانز بر حسب میکروگرم در گرم بافت گزارش شد.^{۱۷}

برای اندازه‌گیری خیز مغزی از روش تعیین محتوای آب مغز استفاده شد: در پایان ۲۴ ساعت پس از القای ضربه‌ی مغزی و بعد از بیهوشی، بافت مغزی خارج شد. ابتدا وزن مرطوب مغز اندازه‌گیری و سپس به مدت ۴۸ ساعت در درجه‌ی حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در گرم خانه (Memmert، آلمان) گذاشته شد تا بافت خشک به دست آید و سپس توزین گردید و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان محتوای آب بافت مغز به صورت درصد (%) محاسبه شد.^{۲۲}

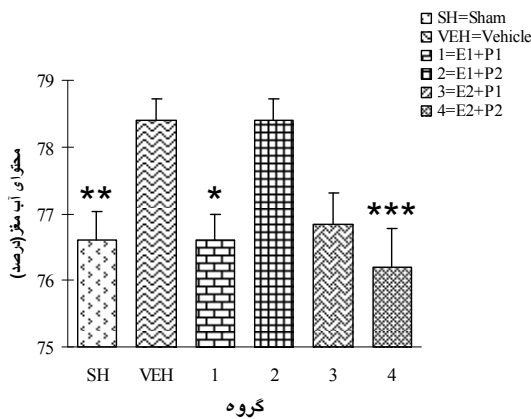
$$\text{وزن خشک بافت} - \text{وزن مرطوب بافت} \times 100 = \text{محتوای آب مغز (\%)} \\ \text{وزن مرطوب بافت}$$

جدول ۱- معیارهای نمره‌ی نورولوژی (V.C.S)

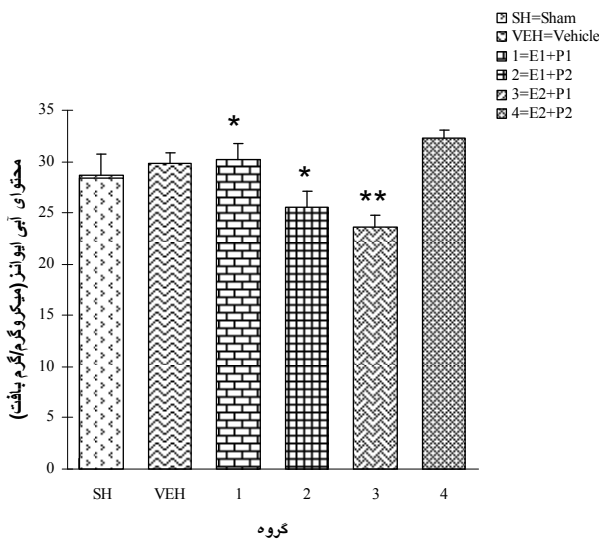
| نمره | متغیر | عمل |
|------|--|---------|
| ۸ | حرکت طبیعی | عمل |
| ۷ | خواب‌آلودگی خفیف با حرکات خود به خودی و هدفدار | حرکتی |
| ۶ | خواب‌آلودگی، قادر نبودن به ایستادن اما حفظ خمیدگی سخت | |
| ۵ | خواب‌آلودگی، عقب‌کشیدن در برابر نیشگون گرفتن، بلندکردن سر نسبت به محرک‌های بینایی، بدون خمیدگی سخت | |
| ۴ | عقب‌کشیدن یا پازدن در برابر نیشگون گرفتن | |
| ۳ | پا زدن خودبخودی | |
| ۲ | وضعیت اکستانسیون (خودبه خودی یا در برابر محرک‌ها) | |
| ۱ | پاسخ ندادن به تحریک | |
| ۴ | باز | عمل چشم |
| ۳ | بازشدن در برابر تحریک | |
| ۲ | طبیعی بودن رفلکس‌های پلک | |
| ۱ | پاسخ ندادن پلک به تحریک | |
| ۳ | طبیعی | تنفس |
| ۲ | آتاکسی | |
| ۱ | آپنه | |

i- Moderate
ii- Diffuse
iii- Marmarou

مشاهده می‌شود، محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در گروه حلال $29/87 \pm 1$ میکروگرم به ازای گرم است که توسط گروه‌های $E2+P1$ ($p < 0.01$)، $23/6 \pm 1/1$ میکروگرم به ازای گرم) و $E1+P2$ ($p < 0.05$)، $25/5 \pm 1/5$ میکروگرم به ازای گرم) به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است. همچنین، گروه $E2+P1$ دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) با گروه‌های $E1+P1$ و $E2+P2$ ($p < 0.01$) است. گروه $E1+P2$ نیز دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) با گروه $E2+P2$ ($22/3 \pm 0/7$) میکروگرم به ازای گرم) است.



نمودار ۱- اثر مصرف توأم استروژن و پروژسترون بر محتوای آب مغزی به دنبال ضربه‌ی مغزی در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان. * اختلاف معنی‌دار گروه $E1+P1$ با گروه $E1+P2$ ($P < 0.05$). ** اختلاف معنی‌دار گروه شم با گروه‌های $E1+P1$ و حلال ($P < 0.01$). *** اختلاف معنی‌دار گروه $E2+P2$ با گروه‌های $E1+P2$ و حلال ($P < 0.001$).



نمودار ۲- اثر مصرف توأم استروژن و پروژسترون بر محتوای آبی ایوانز به دنبال ضربه‌ی مغزی در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان. * اختلاف معنی‌دار گروه $E1+P1$ با گروه $E2+P1$ و گروه $E1+P2$ با گروه‌های $E2+P2$ و حلال ($P < 0.05$). ** اختلاف معنی‌دار گروه $E2+P1$ با گروه‌های حلال و $E2+P2$ ($P < 0.01$).

برای ارزیابی پیامدهای نورولوژی از روش V.C.S استفاده شد: پیامد نورولوژی بر اساس جدول ۱ به صورت نمره‌ی (۳-۱۵)، که مجموع سه نمره‌ی عمل حرکتی (۱-۸)، عمل چشمی (۱-۴) و عمل تنفسی (۱-۳) براساس معیار V.C.S است، بیان می‌شود.^{۱۸} هر چه این نمره بالاتر باشد پیامد نورولوژی بهتر و هر چه پایین‌تر باشد پیامد نورولوژی وخیم‌تر است. در این مطالعه این پیامد بلافاصله بعد از ضربه و ۴، ۱ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه اندازه‌گیری شد.

غلظت استروژن و پروژسترون سرم و بافت مغز با استفاده از روش الیزا (کیت BMS، آمریکا، حساسیت کیت استروژن $9/714$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و پروژسترون $0/045$ نانوگرم بر میلی‌گرم و و ویژگی این کیت‌ها بر اساس واکنش متقابل بود) در پایان ۲۴ ساعت، در همه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد.^{۱۳}

داده‌های کمی به دست آمده در گروه‌های مختلف توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه آنوا تجزیه و تحلیل و در صورت معنی‌دار بودن آزمون اولیه، برای پی بردن اختلاف بین گروه‌ها آزمون توکی استفاده شد. همه‌ی داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین بیان شد و یافته‌ها با $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

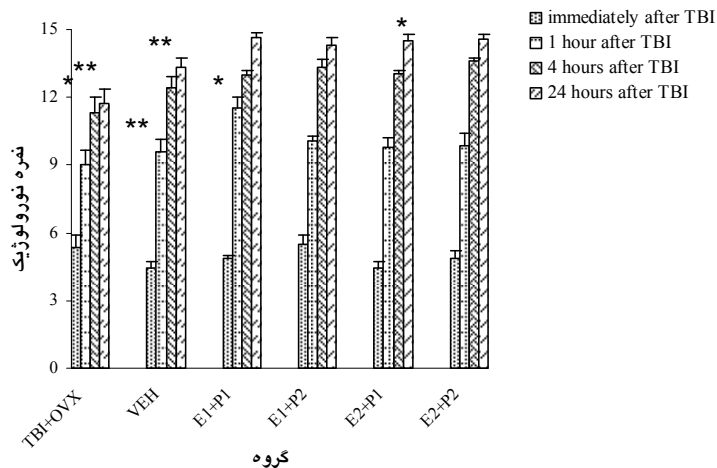
یافته‌ها

در نمودار ۱ میزان محتوای آب مغزی در گروه‌های شم، حلال و ۴ گروه آزمایش نشان داده شده است. محتوای آب مغز در گروه شم $29/87 \pm 1/1$ بود که دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) با گروه‌های حلال و گروه $E1+P2$ است. در گروهی که غلظت استروژن و پروژسترون فارماکولوژیک بود ($E2+P2$) محتوای آب مغزی، $25/5 \pm 1/5$ بود که دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.001$) با گروه‌های حلال و $E1+P2$ است اما دارای اختلاف معنی‌دار با گروه $E2+P1$ نیست. همچنین، محتوای آب مغزی در گروه $E1+P1$ ($23/6 \pm 1/1$) است که فقط اختلاف معنی‌دار با گروه $E1+P2$ دارد ($p < 0.05$).

محتوای رنگ آبی ایوانز در گروه‌های مختلف مطالعه در نمودار ۲، نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار

گروه E2+P1 در ۲۴ ساعت ($P < 0.05$)، ** اختلاف معنی‌دار بین گروه حلال با گروه‌های E1+P1 و E2+P2 به ترتیب در ساعت‌های ۱ و ۲۴ و بین گروه TBI+OVX با همه‌ی گروه‌ها در ۲۴ ساعت ($P < 0.01$).

در نمودار ۳ نمره‌های نورولوژی برای گروه‌های مختلف مطالعه نشان داده شده است. در زمان صفر (بلافاصله بعد از ایجاد TBI) میزان V.C.S در گروه TBI+OVX $5/33 \pm 0/55$ است که دارای اختلاف معنی‌دار با گروه حلال ($4/42 \pm 0/29$) و بقیه گروه‌ها نیست. در یک ساعت بعد از TBI، اگرچه میزان V.C.S در گروه‌های TBI+OVX ($9 \pm 0/68$) و حلال ($9/57 \pm 0/57$) افزایش پیدا کرده است، اما این افزایش در گروه E1+P1 ($11/5 \pm 0/44$) بیشتر از گروه‌های TBI+OVX ($p < 0.05$) و حلال ($p < 0.01$) می‌باشد.



نمودار ۳- اثر مصرف توأم استروژن و پروژسترون بر نمرات نورولوژیک به دنبال ضربه‌ی مغزی در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان. * اختلاف معنی‌دار بین گروه TBI+OVX با گروه E1+P1 در یک ساعت و بین گروه TBI+OVX با بقیه‌ی گروه‌ها در ۴ ساعت و گروه حلال با

جدول ۱- میزان غلظت‌های سرمی و مغزی هورمون‌های استروژن و پروژسترون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

| گروه هورمون | شاهد | شم | TBI+OVX | حلال | E1+P1 | E1+P2 | E2+P1 | E2+P2 |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|
| استروژن | | | | | | | | |
| سرم (پیکوگرم بر میلی‌لیتر) | $11/84 \pm 1/72$ | $9/46 \pm 0/91$ | $6/06 \pm 1/03$ | $6/28 \pm 0/63$ | $6/81 \pm 3/5$ | $16/24 \pm 5/2$ | $852/8 \pm 70/7$ | $477/39 \pm 78/3$ |
| مغز (پیکوگرم بر میلی‌لیتر) پروژسترون | $227/2 \pm 25/8$ | $245/11 \pm 25/8$ | $234/5 \pm 16/1$ | $249/6 \pm 7/2$ | $451/28 \pm 64/05$ | $267/7 \pm 10/7$ | $568/1 \pm 52/8$ | $487/5 \pm 36/7$ |
| سرم (نانوگرم بر میلی‌لیتر) | $15/44 \pm 5/41$ | $5/06 \pm 2/18$ | $6/19 \pm 1/9$ | $6/10 \pm 2/36$ | $16/72 \pm 1/7$ | $37/04 \pm 2/04$ | $18/38 \pm 3/3$ | $23/64 \pm 4/95$ |
| مغز (نانوگرم بر میلی‌لیتر) | $16/75 \pm 1/6$ | $17/95 \pm 4$ | $12/6 \pm 0/82$ | $14/17 \pm 0/37$ | $15/87 \pm 1/06$ | $17/68 \pm 2/26$ | $16/43 \pm 1/84$ | $19/7 \pm 2/3$ |

* اختلاف معنی‌دار E2+P1 با گروه‌های شاهد، شم، حلال، TBI+OVX، E1+P2، E1+P1 و E2+P2 با $p < 0.001$. † اختلاف معنی‌دار E2+P2 با گروه‌های شاهد، شم، حلال، TBI+OVX، E1+P2 و E1+P1 با $P < 0.001$; ‡ اختلاف معنی‌دار E2+P1 با گروه‌های شاهد، شم، حلال، TBI+OVX و E1+P1 با $P < 0.001$; § اختلاف معنی‌دار E2+P2 با گروه‌های شاهد و حلال با $P < 0.05$; ¶ اختلاف معنی‌دار E1+P2 با گروه‌های کنترل، شم، حلال E2+P1 و E1+P1 با $p < 0.01$.

E1+P1 $16 \pm 83\%$ E1+P2 $4 \pm 13/3$ و E2+P1 $13 \pm 0/13$ E2+P2 $13 \pm 0/13$ است؛ به علاوه هیچ یک از گروه‌های هورمونی فوق دارای اختلاف معنی‌دار با TBI-OVX نبودند. ۲۴ ساعت بعد از TBI میزان V.C.S در

هر چند این گروه اختلاف معنی‌دار با گروه TBI-OVX نداشت. ۴ ساعت بعد از TBI، نمره‌ی V.C.S در همه‌ی گروه‌های آزمایشی بیشتر ($p < 0.05$) از گروه TBI+OVX بود، به طوری که این میزان در گروه‌های

شرایطی مؤثر است که دوز فارماکولوژیک آن در کنار دوز فارماکولوژیک پروژسترون به صورت توأم مصرف شود. غلظت سرمی استروژن در ترکیب E2+P2 حدود ۲۹ برابر غلظت سرمی استروژن و غلظت پروژسترون ۳۶ برابر غلظت سرمی پروژسترون در E1+P2 بود. نکته‌ی جالب دیگر این است که وقتی هر دو دوز مصرفی در ترکیب، فیزیولوژیک باشند نیز اثر مهاری آن‌ها بر محتوای آب مغز آشکار می‌شود (کاهش ۲۹٪) و با گروه E1+P2 معنی‌دار می‌یابد. با توجه به این که در گروه‌هایی که دوز استروژن فارماکولوژیک است یا دوز فیزیولوژیک استروژن در کنار دوز فیزیولوژیک پروژسترون قرار می‌گیرد، اثر مهاری بر محتوای آب مغزی یا خیز وجود دارد، این احتمال مطرح می‌شود که شاید پروژسترون در دوز فارماکولوژیک، اثر استروژن در دوز فیزیولوژیک را مهار می‌نماید، شاهد برای این موضوع این است که غلظت سرمی پروژسترون در ترکیب E1+P2، ۲۲۱٪ بیشتر از غلظت سرمی پروژسترون در گروه E1+P1 است. استروژن چه در دوز فیزیولوژیک و چه در دوز فارماکولوژیک قادر به کاهش خیز است اما تعیین‌کننده‌ی بحرانی برای بروز اثر آن غلظت پروژسترونی است که به همراه آن مصرف می‌شود. این احتمال با درجه‌ی ضعیف‌تر نیز برای پروژسترون مطرح است، زیرا غلظت سرمی پروژسترون در گروه E1+P2 این احتمال را ضعیف نموده است.

یافته‌های موافق با مطالعه‌ی حاضر مبنی بر این که پروژسترون در غلظت‌های بالا اثرات متفاوت با غلظت‌های کم دارد توسط پژوهشگران دیگر بر انواع دیگر جراحی‌های سیستم عصبی بیان شده است: به عنوان مثال تضعیف صرع^{۲۴} و مهار جراحی ثانویه به هیپوکامپ^{۲۵} و همچنین افزایش فیلتراسیون یاخته‌های التهابی و مرگ سلولی توسط غلظت‌های فیزیولوژیک پروژسترون در غیاب استروژن و حذف این اثر هنگامی که استروژن و پروژسترون ترکیب می‌شوند.^{۱۵} مرگ سلولی ناشی از افزایش تولید TNF- α توسط استروژن کاهش یافته در حالی که پروژسترون آن را افزایش می‌دهد،^{۱۶} استروژن التهاب عروق مغزی را کاهش و پروژسترون آن را افزایش می‌دهد.^{۲۶} پروژسترون هنگامی که به تنهایی استفاده شود، گیرنده‌های TNF- α را افزایش داده، باعث وخیم‌تر شدن التهاب می‌گردد اما هنگامی که با استروژن همراه می‌شود، این اثر مخرب آن کاهش می‌یابد.^۲ سازوکارهای احتمالی زیر در اعمال اثر مضربروژسترون، از

گروه‌های هورمونی به افزایش خود ادامه داد به طوری که در همه‌ی گروه‌های بالا این میزان بیشتر از TBI+OVX (۱۱/۷۵±۰/۶۴) بود ($p<0/01$)، همچنین، گروه‌های E2+P1 (۱۴/۵±۰/۳۱) و E2+P2 (۱۴/۶±۰/۲۱) ($p<0/01$) دارای اختلاف معنی‌دار با گروه حلال (۱۳/۳۶±۰/۳۶) بودند. هیچ یک از گروه‌های فوق دارای اختلاف معنی‌دار با گروه TBI-OVX نبودند.

یافته‌های جدول ۱، نشان می‌دهد که غلظت استروژن مغز در گروه E2+P1 (۵۶۸/۱±۵۳/۸) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه‌های شاهد، TBI+OVX، شم، حلال (۳۴۹/۶±۷/۲) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و E1+P2 (۳۶۷/۷±۱۰/۷) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) افزایش معنی‌دار دارد ($p<0/001$). همچنین، غلظت استروژن مغز در گروه E2+P2 (۴۸۷/۵±۳۶/۷) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از گروه شاهد است ($p<0/05$). غلظت استروژن سرم نیز در E2+P1 (۸۵۲/۸±۷۰/۷) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از گروه‌های شاهد، TBI+OVX، شم، حلال، E2+P2، E1+P2 و E1+P1 است ($p<0/001$). علاوه بر این، غلظت استروژن سرم در گروه E2+P2 (۴۷۷/۳۹±۷۸/۳) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از گروه‌های شاهد، TBI+OVX، شم، حلال، E1+P2 و E1+P1 است ($p<0/001$). غلظت پروژسترون سرم در گروه E1+P2 (۳۷/۰۴±۲/۰۴) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از گروه‌های شاهد، TBI+OVX، شم، حلال، E2+P1 و E1+P1 ($p<0/01$) است.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، نشان داده شد که اگر دوز فارماکولوژیک استروژن به همراه دوز فارماکولوژیک پروژسترون (E2+P2) تجویز شود، محتوای آب مغزی به میزان ۶۸٪ کاهش می‌یابد به طوری که بعد از تروما محتوای آب مغزی در گروه TBI با گروه شم اختلاف معنی‌دار نداشت. از آنجا که ترکیب فوق (E2+P2) فقط در مقایسه با گروه E1+P2 محتوای آب مغزی را به میزان ۲/۸۸٪ کاهش معنی‌دار داد و با بقیه‌ی گروه‌های ترکیبی اختلاف نداشت، می‌توان نتیجه گرفت که استروژن فقط در

قبیل تغییر در گیرنده‌های $TNF-\alpha$ و تغییر در بیان ژن گیرنده استروژن ($ER\alpha$)^{۲۷}، توانایی پروژسترون برای تعدیل گیرنده‌های GABAA مطرح است.^{۲۸} سازوکار اعمال اثر مفید استروژن که با تأخیر ایجاد می‌شود از طریق گیرنده‌های ویژه‌ی هسته‌ای ($ER\alpha$) است. برخی از این اعمال شامل تولید پروتئین‌های ضدآپوپتیک، کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی از قبیل $TNF-\alpha$ و کاهش گیرنده‌های سیتوکین است، اگرچه بعضی از اعمال استروژن که با سرعت بروز می‌کنند ممکن است از طریق سازوکارهای مستقل از گیرنده کلاسیک آن ($ER\alpha$) باشد.^{۲۹}

البته یافته‌های مخالف با یافته‌های فوق نیز که نشانگر مفید بودن پروژسترون است در بعضی مطالعه‌ها بیان شده است از جمله کاهش سیتوکین‌های التهابی،^{۳۰} کاهش وقوع صرع در فازلوتئال که غلظت پروژسترون بالا است،^{۳۱} کاهش خیز بعد از TBI^{۵،۱۱} در همه‌ی مطالعه‌های تجربی مخالف ذکر شده، پروژسترون به صورت تنها به کار برده شده است.

در بخش دیگر از این پژوهش که نفوذپذیری BBB اندازه‌گیری شد، یافته‌های نشان دادند که محتوای رنگ آبی ایوانز خارج عروقی نیز توسط گروه‌های E2+P1 و E1+P2 به ترتیب ۲۱/۱٪ و ۱۴/۷٪ کاهش پیدا کرده است. یعنی این دو ترکیب توانسته از تخریب BBB جلوگیری کند، یعنی در شرایطی که هر دو دوز مصرفی در ترکیب فیزیولوژیک یا فارماکولوژیک باشند، اثر مهاري آن‌ها بر محتوای رنگ آبی ایوانز کاهش یافته یا حذف شده است، به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که مانند اثر استروژن بر محتوای آب مغزی، استروژن با دوز فارماکولوژیک فقط در صورتی مؤثر است که همراه با دوز فیزیولوژیک پروژسترون در ترکیب مصرف شود اما در صورتی که با دوز فارماکولوژیک پروژسترون مصرف شود اثر مفید آن بر مهار محتوای آبی ایوانز آشکار نمی‌شود؛ علاوه بر این، یافته‌ی جدیدی که در این مرحله از پژوهش وجود داشت این بود که اگر دوز فارماکولوژیک پروژسترون همراه با دوز فیزیولوژیک استروژن مصرف شود اثر مهاري آن بر BBB بروز خواهد کرد، به این معنا که پروژسترون بر محتوای آبی ایوانز اثر کرده، و اثر نوروپروتکتیو آن در حفاظت از BBB آشکار می‌شود. اگرچه غلظت سرمی استروژن در ترکیب E2+P1 بیشتر از ترکیب E1+P1 و حلال است و غلظت سرمی استروژن در گروه E2+P2 بیشتر از E1+P2 و حلال است، اما غلظت سرمی پروژسترون در گروه E1+P2 بیشتر از گروه E2+P2 نیست

همچنین، این اختلاف برای غلظت پروژسترون مغزی نیز بین این دو گروه مشاهده نمی‌شود. این شاید به این مفهوم باشد که تأثیر مشاهده شده برای ترکیب E1+P2 مربوط به افزایش غلظت پروژسترون نیست که دوباره نقش استروژن را بیشتر مطرح می‌سازد. از آن جا که استروژن مغزی فقط در گروه E2+P1 بیشتر از بقیه‌ی گروه‌ها و حلال است بنابراین شاید تعیین‌کننده‌ی بحرانی برای پیدایش این اثر، غلظت استروژن در مغز باشد.

یافته‌های موافق با مطالعه‌ی ما توسط پژوهشگران دیگر که استروژن یا پروژسترون را به تنهایی مصرف کرده بودند، نیز گزارش شده است: تجویز استروژن یا پروژسترون، محتوای رنگ آبی ایوانز را کاهش می‌دهد.^{۱۰،۱۷} سازوکاری که استروژن و پروژسترون نفوذپذیری BBB را کاهش داده و خیز بعد از TBI را کاهش می‌دهند ناشناخته است اما تعدادی سازوکار احتمالی مطرح شده است: ۱- مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ۲- ویژگی آنتی‌اکسیدان (رفتگر رادیکال‌های آزاد) هورمون‌های تخمدانی، ۳- اثر استروژن بر جریان خون مغزی از طریق تعدیل تشکیل NO، ۴- کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی و پروستاگلاندین‌ها و ۵- تنظیم بیان ژن کانال‌های آبی آکوپورین نمره‌ی ۴.

در بخش دیگر که نمره‌ی V.C.S اندازه‌گیری شد، مشخص شد که یک ساعت بعد از تروما فقط ترکیب E1+P1 توانایی افزایش نمره‌ی V.C.S را در مقایسه با گروه حلال و TBI + OVX دارد، به عبارت دیگر اگر هدف افزایش نمره‌ی V.C.S در همان ساعت اول بعد از TBI باشد، بهترین ترکیب E1+P1 است، زیرا با مصرف این ترکیب نمره‌ی V.C.S از ۴/۴۲ (زمان صفر) به ۱۱/۵ افزایش یافت. اما وقتی که V.C.S، ۴ ساعت بعد از تروما اندازه‌گیری شد همه‌ی گروه‌های ترکیبی نمره‌ی V.C.S را در مقایسه با گروه TBI+OVX به میزان ۱/۸-۲/۳ افزایش دادند به طوری که نمره‌ی مربوطه در مقایسه با زمان صفر به حدود ۱۳ می‌رسد که یک افزایش داخل گروهی مثبت را برای همه گروه‌ها نشان می‌دهد، اما هیچ یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌دار با گروه حلال نداشتند. این یافته‌ها معرف این است که اول همه‌ی گروه‌های ترکیبی به جز گروه E1+P1 بعد از گذشت زمان، تأثیر آن بر نمره‌ی V.C.S آشکار می‌شود و دوم نشان‌گر این است که شاید حلال خودش به تنهایی بعد از ۴ ساعت مشابه با هورمون‌ها اثر کرده است، اگرچه اثر آن کمتر از هورمون‌ها است. برای

مصرف ترکیبی هورمون‌های تخمدان دارای این عمل مفید هستند؛ به طوری که مقدار این نمره بلافاصله فوری بعد از ایجاد TBI معرف ضربه‌ی مغزی شدید ($V.C.S=5/3$) است. در طول زمان ۲۴ ساعت با مصرف ترکیبی این هورمون‌ها به حالت ضربه‌ی مغزی خفیف ($V.C.S=14/5$) در مقایسه با گروه‌های ترومایی بدون درمان که دارای ضربه‌ی مغزی متوسط هستند، درآمده است. به علت این که همان گروهی که در کاهش خیز مغزی و جلوگیری از آسیب به BBB مؤثر بوده در افزایش نمره‌ی $V.C.S$ نیز بیشترین اثر را داشته است. بنابراین احتمالاً سازوکارهایی که در کاهش خیز مغزی و سلامت BBB مطرح شده‌اند در این بخش از اثر نیز قابل طرح هستند.

در مجموع، پژوهش حاضر نشان داد که مصرف توأم استروژن با پروژسترون توانایی کاهش خیز مغزی و جلوگیری از آسیب سدخونی - مغزی را بعد از TBI دارد و همچنین برگشت عصبی را تسریع می‌کند؛ علاوه بر این مشخص شد که اگرچه اثر استروژن قوی‌تر از اثر پروژسترون است و رابطه‌ی بیشتری بین غلظت استروژن سرم و مغز و پیدایش اثر فوق وجود دارد، اما بروز اثر آن بستگی به غلظت پروژسترون همراه با آن دارد و بهترین پاسخ مربوط به ترکیبی است که دوز استروژن آن فارماکولوژیک و دوز پروژسترون آن فیزیولوژیک است. از آنجا که هماهنگی بین مطالعه‌های آزمایشگاهی و آزمایش‌های بالینی وجود دارد، ضرورت دارد که مطالعه‌ی تأثیر هورمون‌های استروئیدی تخمدان بر مغز ادامه پیدا کند، تا شاید یک روش درمانی مؤثرتر برای جلوگیری از عواقب جراحتهای مغزی به دست آید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل تلاش طرح تحقیقاتی است که در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تصویب شده است. از زحمات رئیس مرکز آقای دکتر شیبانی و بقیه‌ی همکاران تشکر به عمل می‌آید. همچنین، از سرکار خانم‌ها اسماعیلی، حبیبپور، یعقوبی، آقایان رجبی، بخشی، گوهرگزی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

اثبات موضوع جایگزینی حلال به جای هورمون‌ها و افزایش $V.C.S$ در ساعت چهارم بعد از TBI احتیاج به پژوهش‌های بیشتری است. در ساعت بیست و چهارم بعد از تروما، گروه‌هایی که دوز استروژن در آن‌ها فارماکولوژیک بود، $1/2$ نمره‌ی $V.C.S$ را افزایش دادند و نکته جالب توجه این است که محتوای آب مغزی در گروه $E2+P2$ که ۲۴ ساعت بعد از TBI اندازه‌گیری شد، دارای اختلاف معنی‌دار با گروه حلال بود و اثر مهاری گروه $E2+P1$ نیز بر کاهش خیز مغزی قابل ملاحظه بود این به این معنی است که شاید ارتباطی بین کاهش محتوای آب مغزی و نمره‌های $V.C.S$ وجود داشته باشد، به طوری که ترکیبی که محتوای آب مغزی را بیشتر کاهش داده بود، اثر بیشتری بر روی افزایش نمره‌ی $V.C.S$ داشت، این افزایش ($V.C.S=14/6$) به اندازه‌ای بود که اختلاف بین این گروه‌ها با حیوان‌های دچار TBI که تخمدان‌های آن‌ها برداشته نشده بود، وجود نداشت. گروه $E2+P1$ نه تنها محتوای آب مغزی را کاهش داده است، بلکه محتوای رنگ ایوانز را نیز در مقایسه با گروه $E2+P2$ کاهش داده، یعنی این ترکیب $E2+P1$ در ۲۴ ساعت بعد از تروما هم برای مهار خیز مغزی و هم جلوگیری از تخریب سدخونی - مغزی (BBB) و افزایش نمره‌ی نورولوژی مفید است. این یافته دوباره احتمال‌های قبلی را مطرح می‌کند که دوز استروژن در مقایسه با دوز پروژسترون تعیین‌کننده‌ی نمره‌های نورولوژی است، زیرا هم غلظت سرمی استروژن و هم غلظت مغزی آن در این زمان در هر دو گروه $E2+P1$ و $E2+P2$ بیشتر از گروه حلال است در حالی که غلظت سرمی و مغزی پروژسترون در دو گروه فوق اختلاف معنی‌دار با گروه حلال ندارند.

از آنجا که براساس نمره‌های $V.C.S$ (GCS) جراحتهای تروماتیک مغز (TBI) به ۳ گروه تقسیم‌بندی می‌شود: ^{۳۵} ضربه‌ی مغزی خفیف ($15-13$ GCS). متوسط ($12-9$ GCS) و شدید ($8-3$ GCS). بنابراین افزایش این نمره‌ها در TBI مفید خواهد بود و یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که

References

- MRC CRASH Trial Collaborators, Perel P, Arango M, Clayton T, Edwards P, Komolafe E, Poccock S, et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: practical prognostic models based on large cohort of international patients. *BMJ* 2008; 336: 425-9.
- Stein DG, Wright DW, Kellermann AL. Does progesterone have neuroprotective properties? *Ann Emerg Med* 2008; 51: 164-72.
- Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 2006; 29: 217-31.
- Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res* 1993; 607: 333-6.

5. Bramlett HM, Dietrich WD. Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma* 2001; 18: 891-900.
6. Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol* 1994; 129: 64-9.
7. Wright DW, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma* 2001; 18: 901-9.
8. Goss CW, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76: 231-42.
9. Roof RL, Fritts ME, Castro EA. Progesterone is more effective than methylprednisolone at reducing edema after cortical contusion in male rats[abstract]. *Soc Neurosci* 1996;1186. 26th Society for Neuroscience Meeting, Bethesda, MD, 1996
10. Ahmad molaei L, Khaksari M, Sepehri Gh, Dabiri Sh, Asadikaram Gh, Mahmoodi M, et al. Comparison of the Effects of Progesterone, Allopregnanolone and Gender on Suppressing Edema Formation after Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2008; 15: 47-59.
11. Nakamura T, Xi G, Keep RF, Wang M, Nagao S, Hoff JT, et al. Effects of endogenous and exogenous estrogen on intracerebral hemorrhage-induced brain damage in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2006; 96: 218-21.
12. Won CK, Kim MO, Koh PO. Estrogen modulates Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci* 2006; 68: 277-80.
13. Cutler SM, Vanlandingham JW, Stein DG. Tapered progesterone withdrawal promotes long-term recovery following brain trauma. *Exp Neurol* 2006; 200: 378-85.
14. Hoffman SW, He J, Stein DG. Allopregnanolone promotes functional recovery from TBI by reducing cerebral edema and neuronal death. *Acad Emerg Med* 2001; 8: 496-7.
15. Hoffman GE, Le WW, Murphy AZ, Koski CL. Divergent effects of ovarian steroids on neuronal survival during experimental allergic encephalitis in Lewis rats. *Exp Neurol* 2001; 171: 272-84.
16. Koski CL, Hila S, Hoffman GE. Regulation of cytokine-induced neuron death by ovarian hormones: involvement of antiapoptotic protein expression and c-JUN N-terminal kinase-mediated proapoptotic signaling. *Endocrinology* 2004; 145: 95-103.
17. 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: 171-4.
18. 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: 355-63.
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: 161-6.
20. Shahabi Nejad M, Khaksari M. Effect of 17 beta-estradiol on wound healing in ovariectomized rats. *Journal of Semnan University of Medical Sciences* 2002; 3: 1-10.
21. Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD, Koulen P, et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 1008: 147-54.
22. Koyama Y, Matsui S, Itoh S, Osakada M, Baba A, Matsuda T. The selective Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor attenuates brain edema after radiofrequency lesion in rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 489: 193-6.
23. Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology* 2001;142: 43-8.
24. Hoffman GE, Moore N, Fiskum G, Murphy AZ. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Exp Neurol* 2003; 182: 124-34.
25. Robertson CL, Puskar A, Hoffman GE, Murphy AZ, Saraswati M, Fiskum G. Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Exp Neurol* 2006; 197: 235-43.
26. Krause DN, Duckles SP, Pelligrino DA. Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. *J Appl Physiol* 2006; 101: 1252-61.
27. Formby B, Wiley TS. Progesterone inhibits growth and induces apoptosis in breast cancer cells: inverse effects on Bcl-2 and p53. *Ann Clin Lab Sci* 1998; 28: 360-9.
28. Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* 2002; 22: 1541-9.
29. Oren A, White LR, Aasly J. Apoptosis in neurones exposed to cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis or acute polyradiculoneuropathy. *J Neurol Sci* 2001;186: 31-6.
30. 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: 522-30.
31. Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blumcke I, Bidlingmaier F, et al. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 2001; 44: 141-53.
32. Duvdevani R, Roof RL, Fulop Z, Hoffman SW, Stein DG. Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role? *J Neurotrauma* 1995; 12: 65-75.
33. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 2000; 17: 367-88.
34. Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 1997; 31: 1-11.
35. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Erythrocyte indicators of oxidative changes in patients with graded traumatic head injury. *Neurol India* 2008; 56: 31-5.

Original Article

Effect of Combined Administration of Estrogen and Progesterone on Brain Edema and Neurological Outcome after Traumatic Brain Injury in Female Rats

Soltani Z, Khaksari M, Shahrokhi N, Nakhaei N, Shaibani V

Neuroscience and Physiology Research Centers, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R.Iran

e-mail: khaksar38@yahoo.co.uk

Abstract

Introduction: Many studies have shown uncontrolled brain edema to be the cause of disabilities and deaths following head trauma. Current data also suggests that a single administration of estrogen or progesterone can have neuroprotective effects on brain injury. In this study we investigated the combined effect of estrogen and progesterone on brain edema and neurological outcomes following traumatic brain injury (TBI) in female rats. **Materials and Methods:** This interventional-experimental study was performed on 8 groups of female rats as follows: 1- control, 2-Sham, 3-Ovarectomized trauma (TBI+OVX); 4-Vehicle; 5-Physiologic dose of estrogen + physiologic dose of progesterone (E1+P1), 6- physiologic dose of estrogen+pharmacologic dose of progesterone (E1+P2); 7-Pharmacologic dose of estrogen+physiologic dose of progesterone (E2+P1); and 8-Pharmacologic dose of estrogen+pharmacologic dose of progesterone (E2+P2). Hormones were injected i.p, half an hour after diffuse traumatic brain injury through marmarou model to 2 week old ovarectomized rats. Brain edema (via brain water content), blood-brain barrier permeability (via extravascular evans blue dye) and neurological outcome (via veterinary coma scale) were measured in this animals. **Results:** The results showed significance decreases of 2.68% and 2.88% in water content in group 8 compared to the vehicle group and group 6 respectively and a significant decrease of 2.29% in water content in group 5 compared to group 6. Evans blue level showed significant decreases of 14.7% and 21.1% in groups 6 and 7 compared to the vehicle group. Neurological scores showed a significant increases of 2.5 and 2 in group 5 compared to the vehicle group and group 3, 1 hour after TBI respectively; a significant increase was seen in all groups compared to group 3 at 4 and 24 hours after TBI. Scores showed a significant increase of 1.2 in groups 7 and 8 compared to the vehicle group at 24 hours following the TBI. **Conclusion:** Based on these results, it can be concluded that combined administration of estrogen and progesterone have beneficial effects on both the reduction of brain edema and the neurological outcomes, the improvement depending on what dose of estrogen is administered with progesterone.

Keywords: Neurologic score, Brain edema, Diffuse traumatic brain injury, Brain Water content, Evans blue, Estrogen, Progesterone