Neuroprotective Effects of Concomitant Use of Erythropoietin and Progesterone in Traumatic Brain Injury

Zahra Nourzad[1, 2], Homayon Khazali[1], Tahereh Ghadiri[2, 3], Sayed Mostafa Modarres Mousavi[2], Fariba Karimzadeh[4], Arezou Eshaghabadi[2], Hassan Hosseini Ravandi[2], Afsaneh Aghabarari[2], Ali Gorji[2, 5*]

[1]Department of Physiology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran.
[3]School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4]Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[5]Epilepsy Research Center, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany.

Article Info:

Received: 5 Apr 2014 *Accepted:* 5 May 2014

ABSTRACT

Introduction: Traumatic brain injuries may cause some neurological deficits, such as altered level of consciousness or coma, sensory-motor dysfunction, and seizure attacks. The neuroprotective effect of progesterone and erythropoietin has been shown in different types of brain injuries and cerebral ischemia. This study aims to evaluate the probable additional neuroprotective effects of progesterone and erythropoietin after brain injury. ***Materials and Methods:*** The effects of progesterone, erythropoietin or the combination of these substances were investigated in 54 male Wistar rats suffering from traumatic brain injury. The effects of drugs were investigated using Modified Neurological Severity Scores as well as counting the number of dark neurons (injured cells) in the hippocampal CA1 and CA3 areas. ***Results:*** Our data revealed that the scale of neurological deficits increased by co-application of progesterone and erythropoietin in brain-injured rats. Assessment of dark neurons did not show a significant decrease in the number of dark neurons after combined treatment compared to control groups. ***Conclusion:*** Our study showed that the combination therapy did not exhibit any synergistic effect and may worsen the outcome of traumatic brain injury.

Key words:

1. Brain Injuries
2. Progesterone
3. Erythropoietin
4. Neuroprotective Agents

*** *Corresponding Author:*** Ali Gorji

E-mail: *gorjial@uni-muenster.de*

اثرات محافظتی عصبی استفادهٔ همزمان از اریتروپویتین و پروژسترون در صدمهٔ مغزی ناشی از ضربه

زهرا نورزاد[۱،۲]، همایون خزعلی[۱]، طاهره قدیری[۲،۳]، سید مصطفی مدرس موسوی[۲]، فریبا کریم زاده[۴]، آرزو اسحق آبادی[۲]، حسن حسینی روندی[۲]، افسانه آقابراری[۲]، علی گرجی[۲،۵*]

[۱]گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
[۳]دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۴]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۵]مرکز تحقیقات صرع، دانشگاه مونستر، مونستر، آلمان.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۶ فروردین ۱۳۹۳
تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: آسیب‌های ناشی از ضربه‌های مغزی ممکن است موجب اختلالات عصبی مانند تغییر سطح هوشیاری یا کما، عملکرد غیرطبیعی سیستم حسی- حرکتی و حملات تشنجی گردد. اثرات محافظت عصبی پروژسترون و اریتروپویتین در انواع مختلف صدمات مغزی و ایسکمی مغزی نشان داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی احتمال افزایش اثرات محافظت عصبی پروژسترون و اریتروپویتین بعد از صدمات مغزی است. **مواد و روش‌ها:** اثرات پروژسترون، اریتروپویتین و یا ترکیبی از این مواد در ۵۴ موش صحرایی نر ویستار که متحمل ضربهٔ مغزی شده‌اند مورد بررسی قرار گرفت. در ارزیابی اثر داروها، از تست رفتاری MNSS (Modified Neurological Severity Score) و نیز شمارش تعداد نورون‌های تیره (سلول‌های آسیب دیده) در نواحی CA1 و CA3 هیپوکمپ استفاده شد. **یافته‌ها:** نتایج ما نشان داد که میزان نقص عصبی با استفادهٔ همزمان پروژسترون و اریتروپویتین، در موش‌های متحمل ضربهٔ مغزی افزایش داشت. ارزیابی نورون‌های تیره، کاهش معنی‌داری را در تعداد نورون‌های تیره بعد از به کارگیری همزمان پروژسترون و اریتروپویتین در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. **نتیجه‌گیری:** مطالعهٔ ما نشان داد که ترکیب آن‌ها هیچ اثر هم‌افزایی نشان نداد و ممکن است نتایج آسیب‌های ناشی از ضربه‌های مغزی را بدتر کند.

کلید واژه‌ها:
۱. ضربه‌های مغزی
۲. پروژسترون
۳. اریتروپویتین
۴. عوامل محافظت عصبی

* **نویسنده مسئول:** علی گرجی
آدرس الکترونیکی: *gorjial@uni-muenster.de*

مقدمه

ضربه‌های مغزی به عنوان ضربه یا تکان سر و یا جراحات نافذی که موجب اختلال در عملکرد مغز می‌شوند تعریف می‌گردند (۱). در جهان ضربه‌های مغزی رتبهٔ دوم مرگ و میر را دارا می‌باشند. آمارها نشان می‌دهند که ایران، در زمینهٔ بروز سوانح و تصادفات در زمرهٔ نخستین کشورهای جهان قرار دارد (۲).

پاتوفیزیولوژی ضربه‌های مغزی، پیچیده بوده و شامل یکسری مکانیسم‌های اولیه و ثانویه می‌باشد. آسیب اولیه شامل تغییراتی است که در لحظات نخست، به واسطهٔ صدمهٔ مکانیکی ناشی از ضربه بروز می‌کند. علاوه بر آن صدمهٔ مغزی با راه‌اندازی یکسری وقایع بیوشیمیایی و فیزیوپاتولوژیک سبب آسیب ثانویه‌ای می‌شود که می‌تواند ساعت‌ها، روزها و حتی ماه‌ها بعد از ضربهٔ اولیه بروز کرده و نهایتاً سبب مرگ نورونی اتوفاژی[1]، آپوپتوز[2] و نکروز[3] در محل وارد شدن ضربه شود. این الگوی آسیب‌پذیری موجب تغییرات بلند مدت رفتاری و شناختی می‌گردد (۳، ۴).

داروهای متعددی با هدف کاهش مرگ سلولی در صدمه‌های مغزی استفاده شده است که بعضی از این داروها مانند سیتیکولین، کورتیکواستروئیدها، باربیتورات‌ها اغلب بی‌تأثیر بوده (۵، ۶، ۷) و در این میان اثر بخشی داروهایی نظیر پروژسترون و اریتروپویتین به اثبات رسیده است (۸، ۹).

پروژسترون، نورواستروئیدی است که علاوه بر تخمدان‌های جنس مؤنث در مغز نیز ساخته شده و گیرندهٔ آن به طور گسترده در مغز توزیع شده است. اعمال کلاسیک پروژسترون از طریق گیرندهٔ آن اعمال می‌شود که مجموعهٔ پروژسترون و گیرندهٔ آن به عنوان فاکتور نسخه برداری در هسته عمل می‌کنند (۹).

به نظر می‌رسد اثرات محافظت نورونی[4] پروژسترون ناشی از تأثیر بر روی گیرنده‌های غیرکلاسیک علاوه بر گیرنده‌های کلاسیک باشد (۱۰). طبق مطالعات آزمایشگاهی و تعداد محدودی از مطالعات بالینی، اثرات محافظت نورونی پروژسترون در انواع مختلف صدمات مغزی و ایسکمی مغزی نشان داده شده است. گزارش شده که پروژسترون و متابولیت آن آلوپرگنالون[5]، اثر ناقل عصبی[6] مهاری گابا را تقویت می‌کنند و لذا احتمالاً می‌توانند نورون‌ها را از اثرات تخریبی ناشی از تحریک‌پذیری بیش از اندازهٔ ضربه‌های مغزی حفاظت نمایند (۱۱).

اریتروپویتین، گلیکوپروتئینی است که سبب بلوغ، تمایز و بقای سلول‌های پیش‌ساز خونی شده و به طور گسترده‌ای برای درمان کم‌خونی در بیماری‌های مزمن از آن استفاده می‌گردد. تولید آن ابتدا در کبد جنین و سپس در کلیهٔ بزرگسالان صورت می‌گیرد (۱۲). بیان اریتروپویتین و گیرندهٔ[7] آن در مغز موش در اواسط حاملگی به حداکثر رسیده و در اواخر آن کاهش می‌یابد (۱۳).

اگرچه سطوح پایینی از اریتروپویتین و گیرندهٔ آن در مغز افراد بزرگسال سالم وجود دارد اما بیان اریتروپویتین و گیرندهٔ آن در نورون و سلول‌های پیش‌ساز آن، سلول‌های گلیا و آندوتلیال در پاسخ به ضربه افزایش می‌یابد. بیان گیرنده و لیگاند آن در پاسخ به استرس ناشی از میزان اکسیژن، تنظیم گردیده و در پاسخ به ایسکمی و کمبود اکسیژن افزایش می‌یابد (۱۴). مکانیسم اثرات مفید این هورمون کاملاً شناخته شده نیست و به نظر می‌رسد که در یک روش هماهنگ، سیگنال‌های متعددی تولید مولکول‌های ایجادکنندهٔ صدمهٔ بافتی مانند گلوتامات را محدود می‌کنند (۱۵).

علی‌رغم تحقیقات گسترده در چند دههٔ اخیر، کماکان دارویی که بتواند به طور قطعی در مقابل اثرات تخریبی ضربه‌های مغزی از سلول‌های مغز محافظت کند، پیدا نشده است. با این وجود دو کاندید احتمالی که بتوانند این نقش را ایفا کنند پروژسترون و اریتروپویتین می‌باشند. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر ترکیبی این دو دارو در حفاظت سلولی پس از ضربهٔ مغزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

۵۴ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدودهٔ وزنی ۲۸۰-۲۲۰ گرم در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ساعت تاریکی)، رطوبت (۵۵-۵۰ درصد) و حرارت ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. همهٔ آزمایش‌ها بر طبق دستورالعمل برخورد با حیوانات آزمایشگاهی، تصویب شده توسط کمیتهٔ اخلاقی مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء تهران انجام شد.

حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه زیر تقسیم شدند: گروه سالم (بدون هیچ مداخله)، گروه ضربهٔ ۴ روزه و ضربهٔ ۱۴ روزه که به ترتیب ۴ یا ۱۴ روز پس از ضربه کشته شدند و هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه ضربهٔ ۴ روزه و پروژسترون، گروه ضربهٔ ۴ روزه و اریتروپویتین و گروه ضربهٔ ۴ روزه و پروژسترون و اریتروپویتین که به ترتیب تا سه روز پس از ضربه، روزانه mg/kg ۱۶ پروژسترون (شرکت سیگما)-(۱۶)، ۵۰۰۰ U/Kg اریتروپویتین (شرکت فرآورده‌های ترکیبی نوترکیب)-(۱۴) یا هر دو دارو را دریافت کرده و در روز چهارم کشته شدند. در سه گروه باقیمانده، پس از ضربه به سر، به مدت ۱۴ روز به صورت روزانه درمان با پروژسترون mg/kg ۱۶ یا اریتروپویتین ۵۰۰۰ U/Kg و یا هر دو دارو با هم انجام گردید. لازم به ذکر است در گروه‌هایی که تزریق دارو انجام شد در روز اول ۲ تزریق داشتند، به این ترتیب که یک ساعت و ۶ ساعت پس از ضربه تزریق انجام شد. در بقیهٔ روزهای گفته شده، یک تزریق انجام گردید.

[1] Autophagy
[2] Apoptosis
[3] Necrosis
[4] Neuroprotective
[5] Allopregnanolone
[6] Neurotransmitter
[7] Receptor

ایجاد صدمهٔ مغزی

حیوانات تحت بیهوشی عمیق با کلرال هیدرات ۳٪ (Sigma-Aldrich; 350 mg/kg) قرار گرفتند (۱۷). پس از تثبیت سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting Instruments, USA) جهت ایجاد ضربه، یک برش طولی[8] روی پوست سر ایجاد شد. سپس بافت‌های زیرجلدی کنار زده شده تا استخوان جمجمه در معرض دید قرارگیرد. محل القای ضربه در لوب آهیانه‌ای راست و بر اساس اطلس پاکسینوس، ۲/۳- نسبت به نقطهٔ برگما و ۲/۲ نسبت به درز[9] میانی مشخص گردید. علت انتخاب این محل قرار گرفتن هیپوکمپ در بخش زیرین آن می‌باشد.

القای ضربه با روش Modified Weight Drop Model انجام شد. حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت گردید. پس از تنظیم دستگاه و تعیین موقعیت بازوی رها شوندهٔ حاوی وزنه در بالای سر حیوان، با وارد کردن نیرو به بازوی دستگاه، وزنهٔ ۵۰۰ گرمی در موقعیت مورد نظر رها شد (تصویر ۱). در این روش قدیری و همکاران اظهار داشتند که در مجموع وضعیت‌های بافتی، رفتاری، نورولوژیکی و مولکولی که توسط این مدل در حیوانات ایجاد می‌شود، بسیار شباهت به ضربهٔ مغزی خفیف در انسان‌ها دارد. به طور کلی مزایای این روش در مقایسهٔ با مدل‌های پیشین القای ضربه شامل؛ القای ضربهٔ مغزی بدون استفاده از کرانیوتومی، توانایی تغییر شدت‌های القای ضربه، اندازه‌گیری دقیق نیروی القای ضربهٔ مغزی و ایجاد ضربهٔ مغزی کانونی بدون درگیری کل مغز می‌باشد. این مدل جدید القای ضربهٔ مغزی در حیوانات، مدلی مناسب جهت ارزیابی‌های پاتولوژیک و آزمایش درمان‌های جدید برای ضربهٔ مغزی خفیف می‌باشد (۱۸).

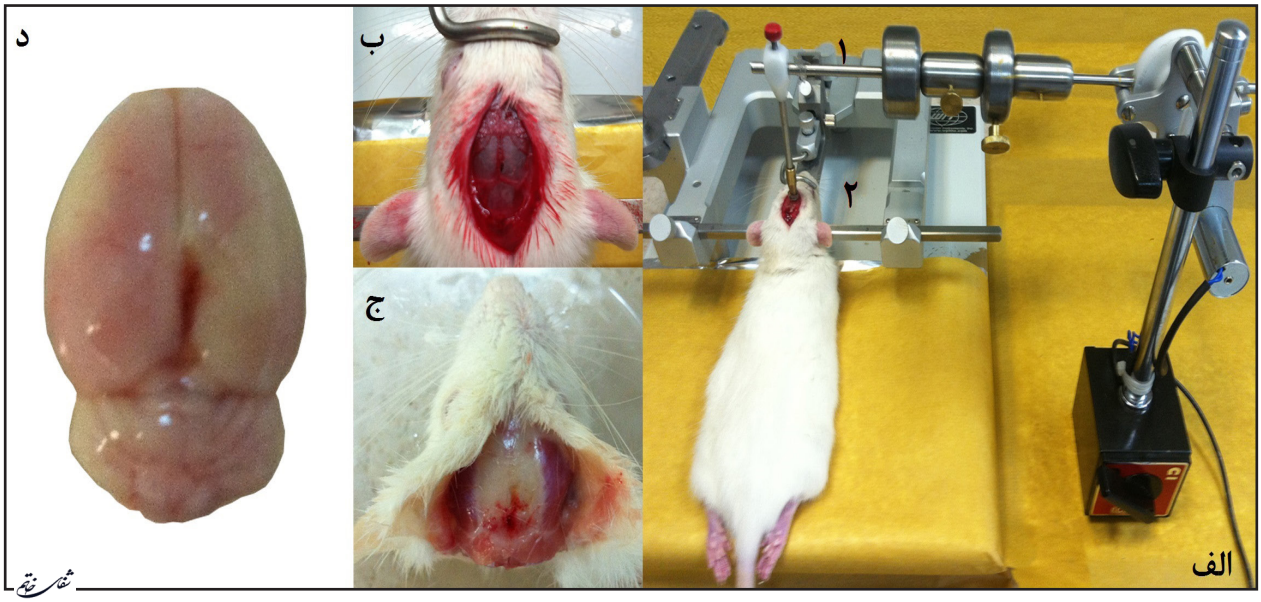
در واقع هر حیوان در گروه آزمایشی دارای ضربه، تغییر شکلی به میزان ۲ میلی‌متر در ناحیهٔ آهیانه‌ای راست جمجمه خواهد داشت. پس از احیای قلبی و تنفسی حیوان، محل برش بخیه و مجدداً ضد عفونی گردید و هر حیوان در قفس جداگانه نگهداری شد.

تست رفتاری Modified Neurological Severity Score (MNSS)

وضعیت نورولوژیک حیوان به وسیلهٔ مقیاس MNSS ارزیابی شد. این آزمایش بلافاصله قبل از ضربه و به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ضربهٔ مغزی در گروه ۴ روزه ارزیابی گردید. درگروه ۱۴ روزه علاوه بر زمان‌های گفته شده، در ۷ و ۱۴ روز پس از ضربه نیز ارزیابی صورت گرفت. این مقیاس در مجموع عملکرد حیوان را در بخش‌های حرکتی، حسی، تعادل و رفلکس‌ها بررسی کرده و نمره می‌دهد. ارزیابی بر اساس روش ذکر شده در جدول ۱ انجام شد (۲۰، ۱۹).

مطالعات بافتی

حیوانات هر گروه توسط کلرال هیدرات ۳٪ تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و بعد از پرفیوژن با حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین و در پی آن ۲۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدئید ۱٪، مغز آن‌ها خارج شد. مغزها پس از آماده‌سازی بافتی، با پارافین قالب‌گیری گردیدند و سپس برش‌های ۷ میکرونی عرضی[10] از هیپوکمپ تهیه و مقاطع با رنگ تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شدند (۲۱). عکس‌برداری از نمونه‌ها با میکروسکوپ مدل BX51 (Olympus, Japan) مجهز به عدسی ۴۰X صورت گرفت.



تصویر ۱- القای ضربه توسط Modified Weight Drop Model. الف) وضعیت دستگاه بعد از القای ضربهٔ مغزی؛ ۱- بازوی رها شوندهٔ حاوی وزنه. ۲- دستگاه استریوتاکس. ب) وضعیت جمجمه بعد از القای ضربه. ج) وضعیت جمجمه بعد از دورهٔ درمان و کشتن حیوان. د) نمونهٔ مغز بعد از القای ضربه و دورهٔ درمان.

[8] Sagital
[9] Suture
[10] Coronal

جدول ۱- معیار نمره‌دهی تست رفتاری MNSS (۱۹).

Modified Neurological Severity Scores (MNSS)			
آزمایش‌های حرکتی (مجموع امتیاز ۶)			
بلند کردن حیوان از ناحیهٔ دم (مجموع امتیاز=۳)	امتیاز	راه رفتن بر روی زمین (طبیعی=۰ ؛ حداکثر=۳)	امتیاز
جمع کردن اندام قدامی	۱	راه رفتن طبیعی	۰
جمع کردن اندام خلفی	۱	عدم توانایی در راه رفتن مستقیم	۱
چرخش سر بیش از ۱۰ درجه نسبت به محور عمودی به مدت ۳۰ ثانیه	۱	حرکت دورانی در یک جهت	۲
		افتادن به یک سمت	۳
آزمایش‌های حسی (حداکثر امتیاز ۲)			
عدم پاسخ به آزمایش بینایی و لامسه			۱
عدم پاسخ به آزمایش تعیین وضعیت (حساسیت عمقی؛ با فشار دادن پنجهٔ پا به لبهٔ میز ماهیچه‌های حرکتی تحریک می‌شود)			۲
آزمایش‌های حفظ تعادل (Beam balance tests) - (طبیعی=۰ ؛ حداکثر=۶)			
حفظ تعادل با وضعیت ثابت			۰
چنگ زدن (Grasps) به کنارهٔ میله			۱
بغل کردن میله و افتادن یک اندام از میله			۲
بغل کردن میله و افتادن دو اندام از میله یا چرخش روی میله بیشتر از ۶۰ ثانیه			۳
افتادن از میله با وجود تلاش در حفظ تعادل (بیشتر از ۴۰ ثانیه)			۴
افتادن از میله با وجود تلاش در حفظ تعادل (بیشتر از ۲۰ ثانیه)			۵
افتادن از میله بدون هیچ تلاشی برای حفظ تعادل یا افتادن پس از آویزان شدن از میله در کمتر از ۲۰ ثانیه			۶
فقدان رفلکس و حرکات غیرطبیعی (مجموع امتیاز ۴)			
عدم وجود رفلکس لالهٔ گوش (Pinna reflex؛ تکان دادن سر هنگام لمس مجرای شنوایی)			۱
عدم وجود رفلکس قرنیه (Corneal reflex؛ چشمک زدن هنگام لمس قرنیهٔ با نخ)			۱
عدم وجود رفلکس جهیدن (Startle reflex؛ پاسخ حرکتی و ترسیدن در پی ایجاد صدای کوتاه ناگهانی)			۱
تشنج (Seizures)، مایوکلونوس (Myocolonus)، مایودیستونی (Myodystony)			۱
❖ حداکثر امتیاز برای هر حیوان ۱۸ می‌باشد.			
تفسیر آزمایش MNSS: (ناتوانی شدید: ۱۸-۱۳، ناتوانی متوسط: ۱۲-۷، ناتوانی خفیف: ۶-۱)			

در این مطالعه به منظور شمارش نورون‌های تیره در واحد حجم از روش قاب فیزیکی شمارش استفاده شد. ده جفت از مقاطع بافتی تهیه شده از هر مغز انتخاب گردید. مقطع اول از هر جفت به عنوان مرجع و مقطع دوم برای مقایسه استفاده شد. از هر جفت برش بافتی حداقل ده تصویر میکروسکوپی به صورت تصادفی انتخاب گردید. با استفاده از قاب فیزیکی شمارش و قوانین شمارش سلول به طریق استریولوژی، شمارش نورون‌های تیره در هر تصویر انجام گردید. با روش استریولوژی و به کمک برنامهٔ نرم افزاری Neuron Count، تعداد نورون‌های تیره در واحد حجم نواحی CA1[11] و CA3[12] هیپوکمپ در نیمکرهٔ آسیب دیده[13] شمارش شد.

آنالیز آماری

تمامی مقادیر بر اساس Mean±SEM بیان گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) انجام گرفت و برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها در بررسی تست رفتاری MNSS از آزمون LSD و در بررسی تراکم عددی نورون‌های تیره از تست تعقیبی توکی (Tukey) استفاده شد. مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تست رفتاری MNSS

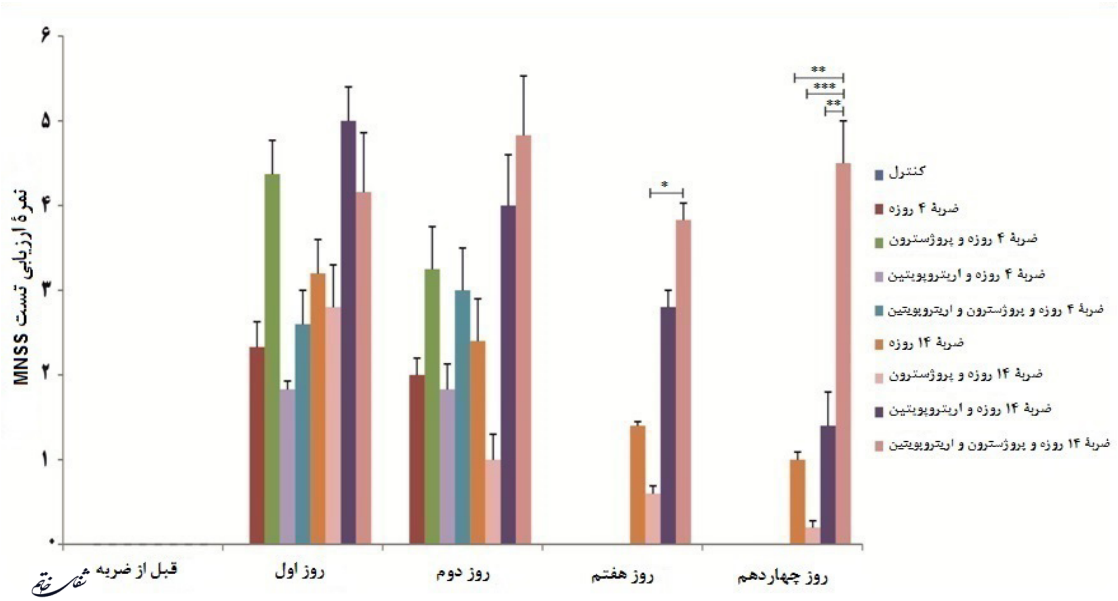
در گروه کنترل نمرهٔ نورولوژیک در مراحل مختلف آزمایش تفاوتی نداشت. اختلاف معنی‌داری در جهت افزایش نقص عصبی در گروه ترکیب پروژسترون و اریتروپویتین در مقایسه با گروه پروژسترون در روز هفتم دیده می‌شود ($P<0/05$). این اختلاف در روز چهاردهم بین گروه ترکیب پروژسترون و اریتروپویتین با گروه ضربه $P<0/001$، پروژسترون $P<0/0001$ و اریتروپویتین $P<0/001$ مشاهده می‌شود. در سایر موارد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (نمودار ۱).

[11] Cornu Ammonis 1
[12] Cornu Ammonis 3
[13] Ipsilateral

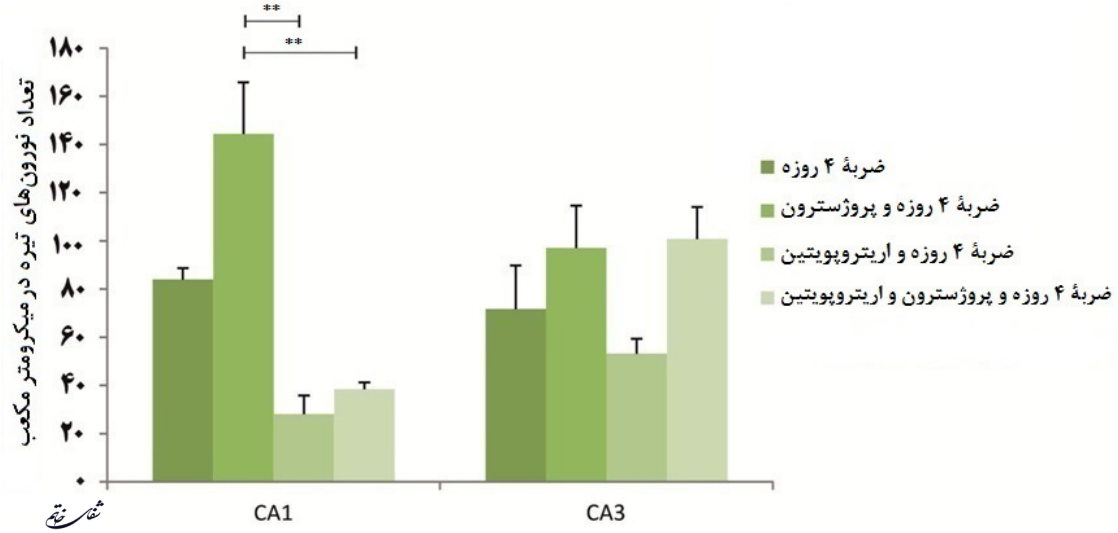
نتایج حاصل از محاسبهٔ تراکم عددی نورون‌های تیره

نورون‌های تیره به صورت سلول‌های چروکیده با سیتوپلاسم ائوزینوفیلی، هستهٔ پیکنوتیک و محیط اسفنجی شناسایی شدند (۲۴، ۲۳، ۲۲). در ناحیهٔ CA1 گروه‌های ۴ روزه، گروه پروژسترون (۲۱/۴۳±۱۴۴/۳۸) افزایش معنی‌داری را در تعداد نورون‌های تیره در مقایسه با گروه اریتروپویتین (۷/۷±۲۸/۱۷) و نیز با گروه پروژسترون و اریتروپویتین (۲/۸۳±۳۸/۴۴) نشان داد ($P<۰/۰۰۱$، نمودار ۲، تصویر ۲).

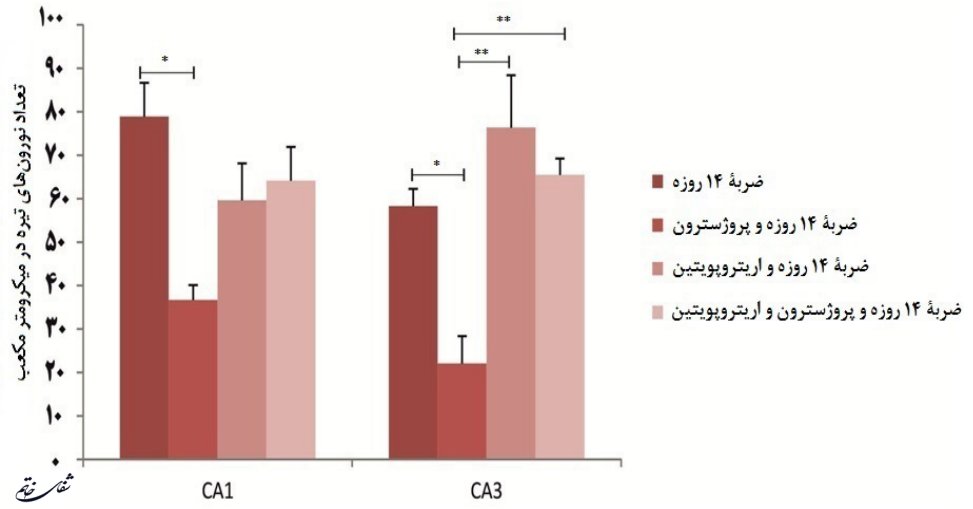
از طرفی در گروه ضربهٔ ۱۴ روزه با دریافت پروژسترون، کاهش معنی‌دار نورون‌های تیره در نواحی CA1 (۳/۴۶±۳۶/۶۶) و CA3 (۶/۲۶±۲۲/۱) نسبت به گروه ضربه مشخص گردید ($P<۰/۰۵$، نمودار ۳، تصویر ۳). همچنین در ناحیهٔ CA3، تعداد نورون‌های تیره درگروه پروژسترون (۶/۲۶±۲۲/۱) به ترتیب در مقایسه با گروه اریتروپویتین (۱۲±۷۶/۴۱) و گروه ترکیب پروژسترون و اریتروپویتین (۳/۷۴±۶۵/۵۴) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). با دریافت اریتروپویتین در گروه‌های ۴ و ۱۴ روزه، کاهش معنی‌داری در تعداد نورون‌های تیره نسبت به گروه ضربه مشاهده نگردید. همچنین کاهش معنی‌دار نورون‌های تیره با دریافت پروژسترون و اریتروپویتین نسبت به گروه ضربه مشاهده نشد.



نمودار ۱- نمرهٔ ارزیابی تست رفتاری MNSS در زمان‌های قبل از ضربه، روز اول و روز دوم پس از ضربه در همهٔ گروه‌ها و روز هفتم و چهاردهم پس از ضربه در گروه ۱۴ روزه. اختلاف معنی‌داری در جهت افزایش نقص عصبی در گروه ترکیب پروژسترون و اریتروپویتین در مقایسه با گروه پروژسترون در روز هفتم دیده می‌شود. این اختلاف در روز چهاردهم بین گروه ترکیب پروژسترون و اریتروپویتین با گروه‌های ضربه، پروژسترون و اریتروپویتین مشاهده می‌شود. *، ** و *** به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ معنی‌داری $P<۰/۰۵$، $P<۰/۰۰۱$ و $P<۰/۰۰۰۱$ می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SEM گزارش شده است.



نمودار ۲- مقایسهٔ تعداد نورون‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکمپ در گروه ۴ روزه. افزایش معنی‌دار تعداد نورون‌های تیره در ناحیهٔCA1 گروه پروژسترون در مقایسه با گروه اریتروپویتین و گروه اریتروپویتین و پروژسترون مشاهده می‌شود. ** نشان‌دهندهٔ معنی‌داری $P<۰/۰۰۱$ می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SEM گزارش شده است.



نمودار ۳- مقایسهٔ تعداد نورون‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکمپ در گروه ۱۴ روزه. کاهش معنی‌دار تعداد نورون‌های تیره در ناحیهٔ CA1 و CA3 گروه پروژسترون در مقایسه با گروه ضربه و نیز ضربه و پروژسترون و اریتروپویتین مشاهده می‌شود. همچنین کاهش معنی‌دار تعداد نورون‌های تیره در ناحیهٔ CA3 گروه پروژسترون در مقایسه با گروه اریتروپویتین مشاهده می‌شود. * و ** به ترتیب نشان‌دهندهٔ معناداری $P<0/05$ و $P<0/001$ می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SEM گزارش شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تحلیل نتایج تست رفتاری در موش‌های مورد مطالعه نشان داد که پروژسترون به تنهایی می‌تواند باعث بهبود نمرهٔ نورولوژیک و کاهش نقص عصبی پس از ضربهٔ مغزی شود. با این وجود اضافه‌کردن اریتروپویتین به پروژسترون، این اثر پیشگیری کنندهٔ پروژسترون را خنثی می‌کند.

بررسی اثر ترکیبی پروژسترون و اریتروپویتین بر روی تعداد سلول‌های تیره در هیپوکمپ پس از ضربهٔ مغزی، نشان می‌دهد که با آن که هر یک از این ترکیبات قادرند تعداد این سلول‌های صدمه دیده را به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهند ولی استفادهٔ توأم این دو با یکدیگر تعداد نورون‌های تیره را کاهش نمی‌دهد.

اثرات محافظت سلولی پروژسترون در تحقیقات آزمایشگاهی به اثبات رسیده (۲۵) و این دارو وارد بررسی‌های اولیهٔ مرحلهٔ بالینی شده است (۲۶). نقش اریتروپویتین نیز در محافظت از سلول‌های عصبی در آزمایش‌های حیوانی به خوبی نشان داده شده است (۲۷). آزمایش‌های بالینی فاز ۲ نیز اثر حفاظتی اریتروپویتین را در صدمات بافت عصبی نشان داده است (۱۲).

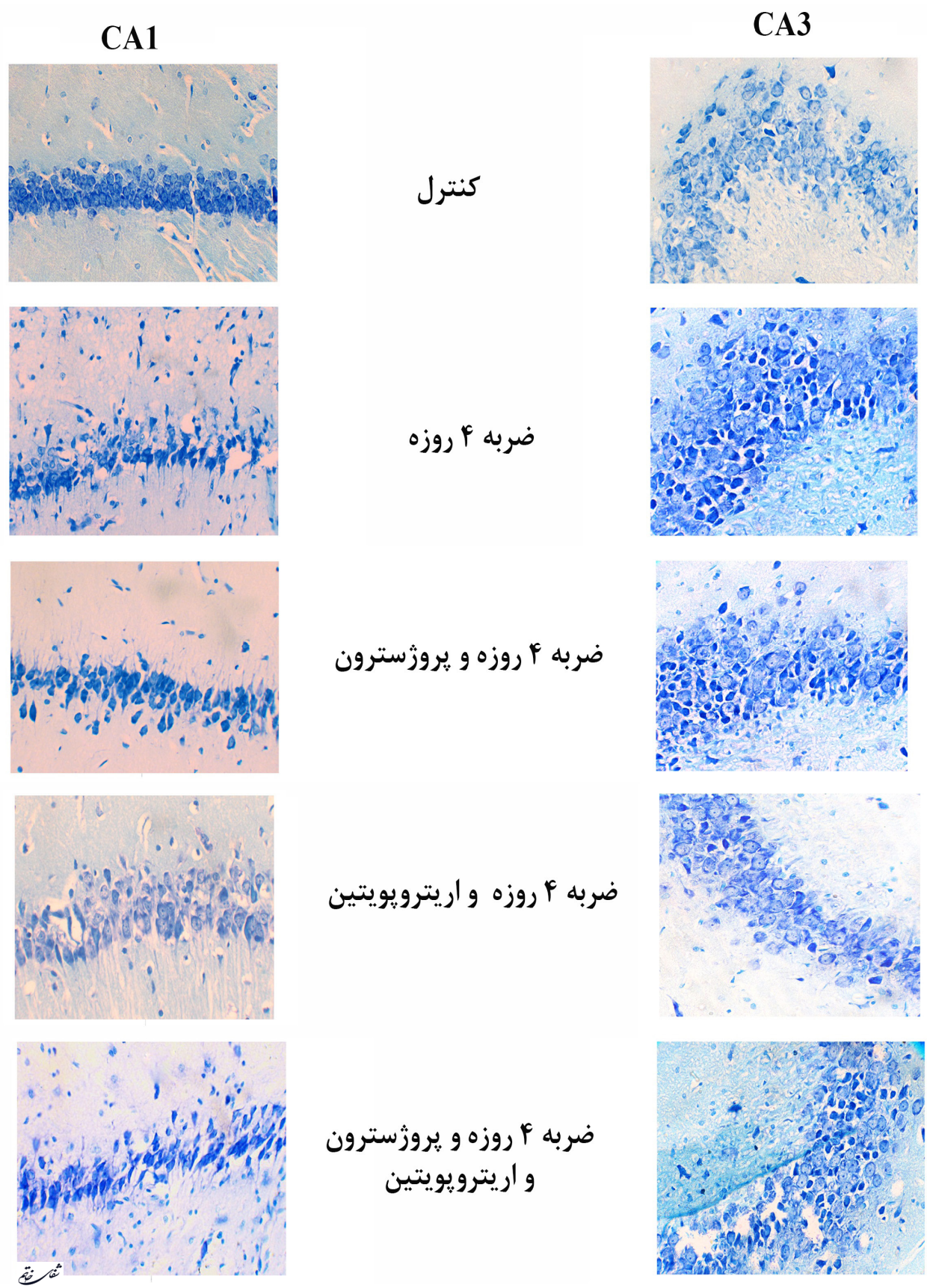
تحقیق ما نشان می‌دهد اگرچه هر دو ترکیب فوق به عنوان داروی محافظت‌کنندهٔ عصبی در انواع صدمه‌های نورونی شناخته می‌شوند ولی این دو دارو اثر هم‌افزایی[14] در محافظت از سلول‌های عصبی در مقابل صدمات بازی نمی‌کنند و تجویز توأم آن‌ها حالت آنتاگونیستی و یا خنثی کنندهٔ اثراتشان را نشان می‌دهد. نورواستروئیدهای طبیعی نظیر پروژسترون، تقویت‌کنندهٔ سیستم مهاری GABA[15] می‌باشند و از این طریق می‌توانند از سلول‌های عصبی در مقابل اثرات تخریبی سیستم تحریکی گلوتاماتی محافظت نمایند (۲۸). پروژسترون و اریتروپویتین هر یک به تنهایی خاصیت ضد التهابی، ضد آپوپتوزی و ضد دژنراسیون سلول عصبی دارند (۲۹، ۳۰).

بررسی اثرات اریتروپویتین بر روی سلول‌های گابائرژیک[16] پس از آسیب سلولی با کاینیک اسید[17] نشان داده است که اریتروپویتین باعث افزایش ساخته شدن گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷[18] شده و به طور وسیعی بر روی سلول‌های گابائرژیک ستون نخاعی تظاهر می‌نمایند (۳۰). این احتمال وجود دارد که تظاهر بسیار بالای اریتروپویتین در سطح سلول‌های گابائرژیک، شانس اثر پروژسترون را بر روی سلول‌های مزبور کاهش داده و نوعی تداخل اثر بین این دو منجر به کاهش اثر تقویتی هر دو دارو بر روی سیستم مهاری مغز گردد. استفاده از داروی گاباپنتین[19] که آنالوگ GABA می‌باشد (۳۱) همراه با اریتروپویتین باعث تداخل دارویی می‌شود.

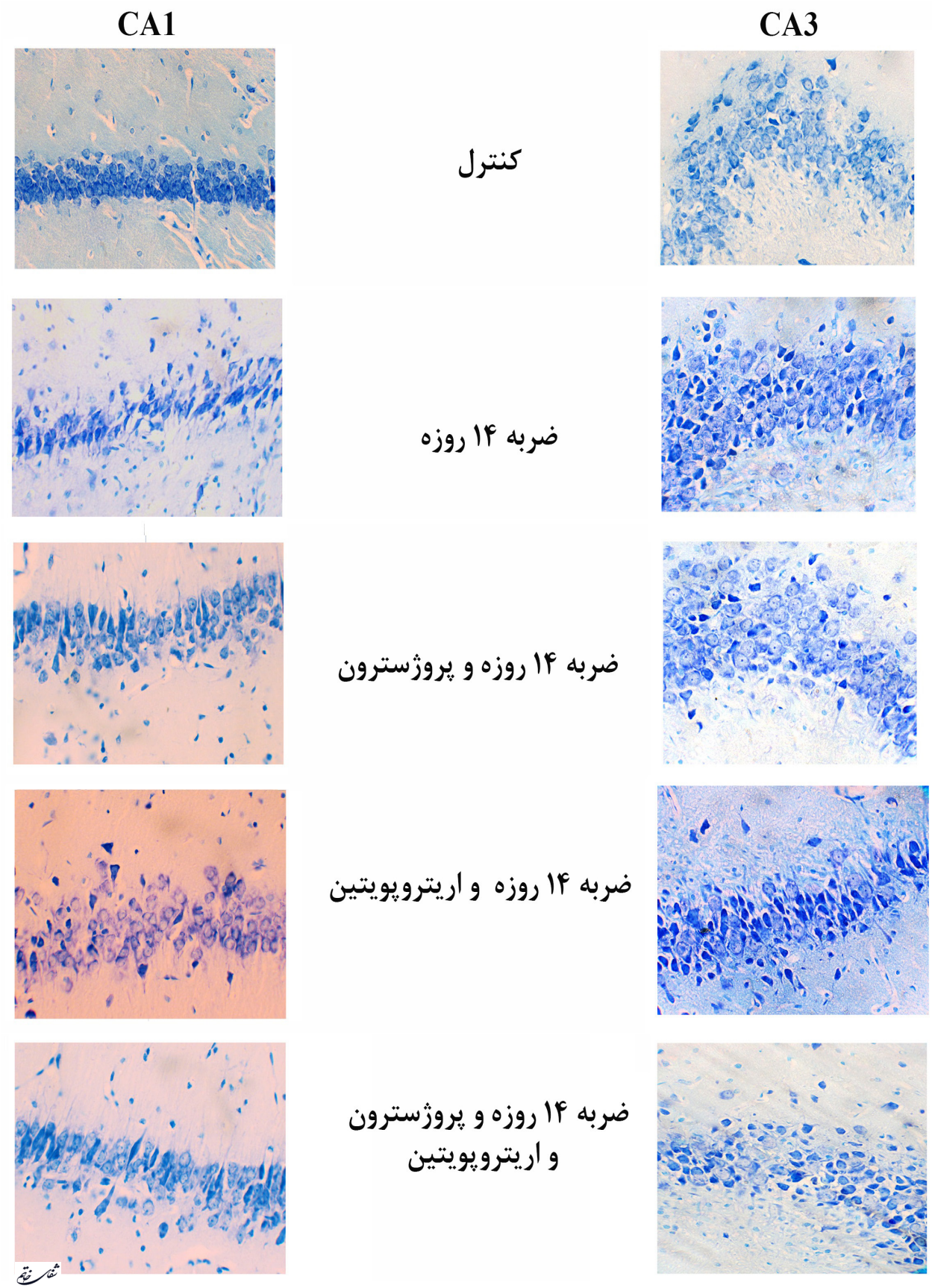
به علاوه مطالعات نشان داده است که استفاده از گاباپنتین در بیمارانی که به خاطر نوروپاتی محیطی، اریتروپویتین دریافت کرده‌اند موجب مهار اثرات مثبت اریتروپویتین و عدم بهبودی در نوروپاتی محیطی بیماران مبتلا به دیابت شده است (۳۲).

برخی تحقیقات انجام شده در سال‌های گذشته نیز مؤید اثر متناقض اریتروپویتین و پروژسترون در برابر بعضی از محرک‌های محیطی است. دگزامتازون می‌تواند با تحریک اریتروپویتین موجب اریتروپویزیس گردد. تجویز پروژسترون می‌تواند این اثر اریتروپویتین را خنثی کند (۳۳). از طرفی استفاده از استروئیدی مانند متیل پردنیزولون[20] به همراه اریتروپویتین در صدمات طناب نخاعی[21] پس از یک ماه، موجب خنثی شدن اثر اریتروپویتین در کاهش التهاب می‌گردد (۳۴).

[14] Synergic
[15] Gamma-aminobutyric acid
[16] GABAergic
[17] Kainic acid
[18] Glutamate decarboxylase 67
[19] Gabapentin
[20] Methylprednisolone
[21] Spinal cord injury



تصویر ۲- نمای میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰X) برش عرضی مغز موش صحرایی نر با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. در تصویر تأثیر پروژسترون، اریتروپویتین و تزریق همزمان پروژسترون و اریتروپویتین بر تعداد نورون‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکمپ گروه‌های ۴ روزه در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شده است.



تصویر ۳- نمای میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰X) برش عرضی مغز موش صحرایی نر با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. در تصویر تأثیر پروژسترون، اریتروپویتین و تزریق همزمان پروژسترون و اریتروپویتین بر تعداد نورون‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکمپ گروه‌های ۱۴ روزه در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شده است.

بنابراین احتمال دارد افزایش تعداد نورون‌های تیره با استفاده از ترکیب استروئیدی مانند پروژسترون همراه با اریتروپویتین در گروه ۱۴ روزه نسبت به گروه پروژسترون به دلیل یافتهٔ فوق باشد. سلول‌های عصبی تیره علاوه بر ضربه به سیستم عصبی در بیماری‌هایی نظیر صرع، کم‌خونی مغزی، افت شدید غلظت قند خون و تماس سلول‌های عصبی با اسید آمینه‌های تحریکی نیز ایجاد می‌شوند. با استفاده از داروهای مهارکنندهٔ سیستم تحریکی گلوتاماتی می‌توان از تشکیل سلول‌های عصبی تیره تا حد زیادی جلوگیری کرد که این نشان‌دهندهٔ ماهیت پاتولوژیک این یاخته‌ها می‌باشد (۲۳).

بررسی‌های ما در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که هم پروژسترون و هم اریتروپویتین در مناطق مختلف هیپوکمپ می‌توانند با افزایش فعالیت سیستم مهاری گابا و پیشگیری از اثر سمی سیستم تحریکی گلوتاماتی از سیر تخریبی سلول‌های تیره جلوگیری کنند. پروژسترون می‌تواند با جلوگیری از ادم سلولی نقش مهمی در تغییرات مکانیکی سلول‌های عصبی داشته باشد که این ویژگی نیز می‌تواند از صدمهٔ بیشتر به سلول‌های عصبی تیره جلوگیری کند (۳۵). تجویز همزمان پروژسترون و اریتروپویتین در عین حال فاقد این اثر پیشگیری کننده بوده و در مقایسه با گروه کنترل، تغییری در تعداد و ترکیب سلول‌های عصبی تیره ایجاد نکرده است. در این مطالعه نشان داده شد که بروز اثر هورمون استروژن به عنوان یک نورواستروئید در دوز فیزیولوژی و یا فارماکولوژی بر کاهش ادم مغزی[۲۲] به غلظت پروژسترونی بستگی دارد که به همراه آن استفاده می‌شود. به عبارت دیگر بهترین پاسخ جهت کاهش ادم مغزی مربوط به ترکیبی از دوز فارماکولوژی استروژن (۱ mg/kg) و دوز فیزیولوژی پروژسترون (۱/۷ mg/kg) می‌باشد (۳۶). این احتمال وجود دارد که پروژسترون با دوزی متفاوت، در ترکیب با اریتروپویتین نتیجهٔ متفاوتی را نشان دهد.

یافته‌های ما نشان داد در صورت ضربه به سیستم عصبی مرکزی و به خصوص مغز، تجویز همزمان این دو هورمون نه تنها باعث افزایش اثرات محافظت‌کنندهٔ سلول‌های عصبی نمی‌شود بلکه احتمالاً به دنبال تداخل اثرات آن‌ها، خاصیت محافظت سلولی هر کدام از آن‌ها را نیز کاهش می‌دهد. با این وجود باید به خاطر داشت که این آزمایش بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است و تطبیق کامل آن با سیستم عصبی انسان نیازمند آزمایش‌های بالینی دقیق‌تر می‌باشد. به علاوه آزمایش‌های آینده بایستی بر روی دوزهای متفاوت این دو دارو متمرکز شود چرا که با دوزهای پایین‌تر، این امکان وجود دارد که اثرات تداخلی آن‌ها کمتر شده و اثر حفاظت از سلول‌های صدمه دیده در آن‌ها افزایش یابد.

منابع

1. Blissitt PA. Care of the critically ill patient with penetrating head injury. Crit Care Nurs Clin North Am. 2006; 18(3): 321-32.

2. Aghakhani N, Azami M, Jasemi M, Khoshsima M, Eghtedar S, Rahbar N. Epidemiology of traumatic brain injury in urmia, Iran. Iran Red Crescent Med J. 2013; 15(2): 173.

3. Bigford GE, Alonso OF, Dietrich WD, Keane RW. A novel protein complex in membrane rafts linking the NR2B glutamate receptor and autophagyis disrupted following traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2009; 26(5): 703-20.

4. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. J Cereb Blood Flow Metab. 2004; 24(2): 133-50.

5. Clark W, Wechsler L, Sabounjian L, Schwiderski U. A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. Neurology. 2001; 57(9): 1595-602.

6. Alderson P, Roberts I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. Cochrane Database Syst Rev. 2005; 25(1).

7. Roberts I, Sydenham E. Barbiturates for acute traumatic brain injury. Cochrane Database Syst Rev. 2012; 12.

8. Brines M. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. Blood Purif. 2010; 29(2): 86-92.

9. Cekic M, Sayeed I, Stein DG. Combination treatment with progesterone and vitamin D hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. Front Neuroendocrinol. 2009; 30(2): 158-72.

10. Cooke PS, Nanjappa MK, Yang Z, Wang KK. Therapeutic effects of progesterone and its metabolites in traumatic brain injury may involve non-classical signaling mechanisms. Front Neurosci. 2013; 7: 108.

11. Akhondzadeh S, Stone T. Potentiation by neurosteroids of muscimol/adenosine interactions in rat hippocampus. Brain Res. 1995; 677(2): 311-8.

[22] Brain Edema

12. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. Eur J Haematol. 2007; 78(3): 183-205.

13. Masuda S, Chikuma M, Sasaki R. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. Brain Res. 1997; 746(1): 63-70.

14. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Neurorestorative treatments for traumatic brain injury. Discov Med. 2010; 10(54): 434-42.

15. Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Fodale V, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. Brain Res. 2007; 1182: 99-105.

16. Reddy DS, Gangisetty O, Briyal S. Disease-modifying activity of progesterone in the hippocampus kindling model of epileptogenesis. Neuropharmacology. 2010; 59(7): 573-81.

17. Oliveira LD, Oliveira RW, Futuro Neto Hde A, Nakamura-Palacios EM. The role of magnesium sulfate in prevention of seizures induced by pentylenetetrazole in rats. Arq Neuropsiquiatr. 2011; 69(2): 349-55.

18. Ghadiri T, Sharifzadeh M, Khodagholi F, Modarres Mousavi SM, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, et al. A novel traumatic brain injury model for induction of mild brain injury in rat. J Neurosci Methods. 2014; 233: 18-27.

19. Watanabe T, Okuda Y, Nonoguchi N, Zhao MZ, Kajimoto Y, Furutama D, et al. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2004; 24(11): 1205-13.

20. Aligholi H, Hassanzadeh G, Azari H, Rezayat SM, Mehr SE, Akbari M, et al. A new and safe method for stereotactically harvesting neural stem/progenitor cells from the adult rat subventricular zone. J Neurosci Methods. 2014; 225: 81-9.

21. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. Exp Neurol. 2012; 233(1): 438-46.

22. Cammermeyer, J. Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? Histochemistry. 1978; 56(2): 97-115.

23. Kherani, ZS, Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. Acta Neuropathol. 2008; 116(4): 447-52.

24. Jafarian M, Rahimi S, Behnam F, Hosseini M, Haghir H, Sadeghzadeh B, et al. The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. Neuroscience. 2010; 169(1): 388-94.

25. Groswasser Z, Cohen M, Keren O. Female TBI patients recover better than males. Brain Inj. 1998; 12(9): 805-8.

26. Wright DW, Hoffman SW, Virmani S, Stein DG. Effects of medroxyprogesterone acetate on cerebral oedema and spatial learning performance after traumatic brain injury in rats. Brain Inj. 2008; 22(2): 107-13.

27. Fan RE, Chang KW, Hsieh CJ, Wang XR, Lin CJ. LIBLINEAR: A library for large linear classification. JMLR. 2008; 9: 1871-4.

28. Xilouri M, Avlonitis N, Calogeropoulou T, Papazafiri P. Neuroprotective effects of steroid analogues on P19-N neurons. Neurochem Int. 2007; 50(4): 660-70.

29. Stein D. Progesterone in the treatment of acute traumatic brain injury: a clinical perspective and update. Neuroscience. 2011; 191: 101-6.

30. Yoo JY, Won YJ, Lee JH, Kim JU, Sung IY, Hwang SJ, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin posttreatment against kainate-induced excitotoxicity in mixed spinal cultures. J Neurosci Res. 2009; 87(1): 150-63.

31. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. Eur J Neurol. 2010; 17(9): 1113-88.

32. Hosseini-Zare MS, Dashti-Khavidaki S, Mahdavi-Mazdeh M, Ahmadi F, Akrami S. Peripheral neuropathy response to erythropoietin in type 2 diabetic patients with mild to moderate renal failure. Clin Neurol Neurosurg. 2012; 114(6): 663-7.

33. Golde DW, Bersch N, Cline M. Potentiation of erythropoiesis in vitro by dexamethasone. J Clin Invest. 1976; 57(1): 57-62.

34. Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, et al. Methylprednisolone neutralizesthe beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(45): 16379-84.

35. Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011; 39(1): 22-35.

36. Khaksari M, Soltani Z, Shahrokhi N, Moshtaghi G, Asadikaram G. The role of estrogen and progesterone, administered alone and in combination, in modulating cytokine concentration following traumatic brain injury. Can J Physiol Pharmacol. 2010; 89(1): 31-40.