

Effect of Nesfatin-1 on Permeability of Blood Brain Barrier, Neurological Score and Brain Edema after Traumatic Brain Injury in Male Rats: A Behavioral and Biochemical Study

Alireza Taghizadeh¹,
Forouzan Sadeghimahalli²,
Ali Siahposht-Khachaki³

¹ Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 30, 2022 ; Accepted December 4, 2022)

Abstract

Background and purpose: Traumatic brain injury (TBI) is one of the most complex diseases of the central nervous system (CNS). Nesfatin is an 82-amino acid effective polypeptide in CNS. In this study, we investigated the role of nesfatin in neuron protection in the process of diffuse concussion in rats and also its effect on the level of matrix metalloproteinase-9.

Materials and methods: In this experimental study, 56 Wistar rats were subjected to TBI by the Marmaru method. After 30 minutes, nesfatin was injected intraperitoneally at different doses, and repeated on second and third days. The results of Veterinary Coma Scale, beam walk and beam balance tests were recorded at Pre-TBI, immediately after TBI, 24, 48, and 72 hours after TBI. After 72 hours, CSF was collected from the cisterna magna and used for ELISA test to measure the matrix metalloproteinase-9.

Results: Intraperitoneal administration of nesfatin at 50 µg/kg and 10 µg/kg can reduce cerebral edema, destruction of the blood-brain barrier, and neurological and balance-motor scores ($P < 0.0001$) compared with the control group (Sham and Intact) ($P < 0.0001$). Nesfatin was not found effective at 20 µg/kg ($P > 0.05$).

Conclusion: Nesfatin has been able to affect the consequences of trauma and reduce brain edema, accelerate the improvement of blood-brain barrier and neurological and balance scores. Probably part of these neuroprotective effects is through reduction of MMP-9.

Keywords: nesfatin, neuroprotective, brain trauma, cerebral edema, blood-brain barrier, MMP-9

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (217): 1-15 (Persian).

Corresponding Author: Ali Siahposht-Khachaki - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: a.siahposht@mazums.ac.ir)

بررسی اثرات نسفاتین-1 روی نفوذپذیری سد خونی-مغزی، نمره نورولوژیکی و ادم مغزی به دنبال القای ترومای مغزی در موش صحرایی نر: یک مطالعه رفتاری و بیوشیمیایی

علیرضا تقی زاده¹
فروزان صادقی محلی²
علی سیاه پشت خاچکی³

چکیده

سابقه و هدف: آسیب مغزی ناشی از تروما (TBI) یکی از پیچیده‌ترین بیماری‌های شناخته شده در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. نسفاتین یک پلیپپتید 82-آمینو اسید است که بر سیستم عصبی مرکزی موثر است. در این پژوهش نقش محافظت نوروئی نسفاتین در فرایند ضربه مغزی منتشر در موش صحرایی و هم‌چنین تاثیر آن روی میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-9 (MMP-9) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 56 موش صحرایی نر نژاد ویستار به روش مارمارو تحت TBI قرار گرفتند و 30 دقیقه بعد نسفاتین با دوزهای مختلف به صورت داخل صفاقی تزریق و در روز دوم و سوم تکرار شد. در زمان‌های قبل از ضربه، بلافاصله پس از به هوش آمدن پس از القا ضربه، 24، 48 و 72 ساعت بعد از ضربه، Veterinary Coma Scale و تست‌های حرکتی و تعادلی Beam Walk و Beam Balance در رت‌ها ثبت شد. پس از 72 ساعت، CSF از سیسترنای مگنا جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش‌های الیزا برای بررسی ماتریکس متالوپروتئیناز-9 استفاده شد.

یافته‌ها: تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5 و 10 $\mu\text{g/kg}$ می‌تواند باعث کاهش ادم مغزی، تخریب سد خونی مغزی و نمرات عصبی و تعادلی حرکتی ($P<0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل (شش و سالم) شود ($P<0/001$). لازم به ذکر است که نسفاتین در دوز 20 $\mu\text{g/kg}$ مؤثر نبود ($P<0/05$).

استنتاج: نسفاتین توانسته است بر پیامدهای تروما تأثیر بگذارد و ادم مغزی را کاهش دهد، بهبود سد خونی مغزی و نمرات عصبی و تعادلی را تسریع بخشد. لازم به ذکر است احتمالاً بخشی از این اثرات محافظتی عصبی نسفاتین از طریق کاهش MMP-9 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نسفاتین، نوروپروتکتیو، ترومای مغزی، ادم مغزی، سد خونی-مغزی، MMP-9

مقدمه

و بهبودی بیماران، این مشکل همچنان یک بار سلامت جهانی و چالش سلامت عمومی در بین تمام سنین در همه کشورها بدون توجه به سطح درآمد بیمار می‌باشد (1).

علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات تروما و تلاش‌های مداوم مطالعات چندرشته‌ای مشترک برای مقابله با آسیب مغزی ناشی از تروما (Traumatic brain injury: TBI)

مؤلف مسئول: محلی علی سیاه پشت خاچکی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: a.siahposht@mazums.ac.ir

1. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1401/6/8 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/6/20 تاریخ تصویب: 1401/9/13

هر یک از انواع صدمه به سر ممکن است مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک مختلفی را باعث شوند. این مکانیسم‌ها و شدت صدمات سیستمیک، وسعت آسیب ثانویه مغزی را تعیین می‌کنند. آسیب ثانویه ساعت‌ها و حتی روزها پس از ضربه مغزی ایجاد می‌شود و شامل رهائش میانجی‌های عصبی، تولید رادیکال‌های آزاد، آسیب وابسته به یون کلسیم، فعال شدن ژن‌ها، اختلال در عملکرد میتوکندری و پاسخ‌های التهابی می‌باشد (3،2). نسفاتین-1، یک پلی پپتید 82-آمینو اسید است که بر روی کاهش اشتها در مغز موثر می‌باشد و از شکست پروتئولیتیکی Nucleobindin-2 ساخته شده و در سال 2006 در هیپوتالاموس موش صحرایی کشف شده است (4). این ماده به‌طور وسیع در مناطق مرکزی و محیطی سیستم عصبی توزیع می‌گردد (5). از سد خونی مغزی عبور می‌کند و از پروتئین G برای اعمال اثرات فیزیولوژیکی استفاده می‌کند، ولی گیرنده‌اش هنوز شناخته نشده است. مطالعه در رده سلول‌های عصبی نشان داد که نسفاتین-1 ممکن است از مسیر ورود Ca^{2+} به داخل سلول و یا مسیر سیگنالینگ MAPK به CREB فسفریله به جای مسیر PKA استفاده کند (6). برعکس، مطالعه دیگری پیشنهاد کرد که این فعالیت PKA با ورود کلسیم به داخل نورون‌ها در هیپوتالاموس مرتبط‌تر می‌باشد، بنابراین نظریه‌های مختلف برای مکانیسم عمل نسفاتین-1 وجود دارد که نیاز به پژوهش دارند (7). نسفاتین-1 علاوه بر اثرات اصلی کشف شده در سیستم هضم (از دست دادن اشتها، مهار تخلیه معده و ترشح اسید معده و تنظیم تحرک دستگاه گوارش)، عملکردهای مهم دیگری نیز دارد، بسیاری از آن‌ها مربوط به هموستاز انرژی، مانند مصرف انرژی و هموستاز گلوکز می‌باشند. هم‌چنین در افزایش فشارخون و ضربان قلب، پاسخ استرس، رفتار، خواب و تولید مثل نقش دارد (8). نسفاتین-1 می‌تواند به‌طور قابل توجهی اختلال حافظه ناشی از ایسکمیک - ریپرفیوژن مغزی را در سلول‌های هرمی در ناحیه CA1 هیپوکامپ با کاهش فعالیت کاسپاز-3

به عنوان یک پروتئین مرتبط با آپوپتوز و کاهش تعداد سلول‌های Iba-1 مثبت (یک فاکتور ایمنو هیستوشیمی برای فعالیت میکروگلیا) بهبود بخشد (9). نسفاتین-1 فعالیت الکتریکی سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را به صورت پس سیناپسی سرکوب می‌کند و دارای اثرات محافظتی مشابهی بر سلول‌های عصبی دوپامینی در شرایط درون‌تنی و نیز برون‌تنی می‌باشد، که بیانگر پتانسیل درمانی برای پارکینسون است (10). در ضمن در این مطالعه، مهارکننده PKA اثر نسفاتین-1 را مسدود نکرد، که نشان می‌دهد مسیر PKA در مکانیسم ضد آپوپتوزیک دخیل نیست. با این حال، در حال حاضر شواهد کافی برای حمایت از ارتباط بین پارکینسون و تغییرات سطح نسفاتین-1 وجود ندارد (11). اثر ضد التهابی نسفاتین-1 در مغز در مطالعات زیادی اثبات شده است. تجویز نسفاتین-1 به دنبال ترومای شدید مغزی سبب کاهش بیان ژن NFκB و غلظت $TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-1β به میزان قابل توجهی می‌شود، که نشان می‌دهد ممکن است پاسخ‌های التهابی وابسته به NFκB را سرکوب کند (12). علاوه بر این در آسیب حاد مغزی پس از خونریزی زیر عنکبوتیه نفوذ نوتروفیل و افزایش میزان سیتوکین‌های پیش التهاب نیز توسط درمان نسفاتین-1 مهار می‌شود (13). نسفاتین-1 در نورون‌های دوپامینرژیک مانع از آسیب و کلاپس غشای میتوکندری در اثر روتنون می‌گردد و عملکرد کمپلکس زنجیره تنفسی I را بهبود می‌بخشد، به‌طوری‌که پیش درمانی با نسفاتین-1 با اثر ضد آپوپتوتیک و بهبود عملکرد میتوکندری از سلول‌های عصبی دوپامینی در برابر نوروتوکسیسیتی ناشی از روتنون محافظت می‌کند (14). علاوه بر این، نسفاتین-1 مانع پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در ایسکمی مغزی افزایش می‌دهد. علاوه بر این، ظرفیت آنتی اکسیدانی نسفاتین-1 نیز در مدل‌های خونریزی زیر عنکبوتیه نشان داده شده است (15). مکانیسم‌های مولکولی اثرات محافظت عصبی نسفاتین-1 هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است و نیاز به بررسی و

ادم مغزی و نفوذپذیری سد خونی مغزی و میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-9 بعد از القای ترومای شدید مغزی به روش مارمارو بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از 56 سر موش صحرایی بالغ نر با وزن 200 تا 250 گرم از نژاد ویستار استفاده شد که در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و درجه حرارت 21 ± 2 سانتی گراد نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نیز نداشتند. این پژوهش طی مجوز شماره IR.MAZUMS.REC.1399.8457 کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گرفته است.

گروه‌بندی نمونه‌ها به شکل زیر صورت پذیرفت

1- گروه Intact: موش‌های صحرایی نر که تحت هیچ نوع مداخله‌ای قرار نگرفتند (19).

2- گروه sham: موش‌های صحرایی نر که فقط بیهوش شده و به‌طور کاذب تحت ضربه مغزی قرار گرفتند (19).

3- گروه ضربه مغزی (TBI): موش‌های صحرایی که بعد از بیهوشی تحت ضربه مغزی قرار گرفتند (19).

4- گروه حلال (TBI+Vehicle): به موش‌های صحرایی نر حلال دارو (سالین)، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی تزریق شد و در روزهای بعد (روز اول، دوم و سوم بعد از ضربه مغزی) تزریق دارو تکرار گردید (13،9).

5- گروه دوز $5 \mu\text{g/kg}$ (TBI+Nsf $5 \mu\text{g/kg}$): به موش‌های صحرایی دوز $5 \mu\text{g/kg}$ نسفاتین-1، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی با سرنگ همیتون به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شد و در روزهای بعد (روز اول، دوم و سوم بعد از ضربه مغزی) تکرار گردید (13،9).

6- گروه دوز $10 \mu\text{g/kg}$ (TBI+Nsf $10 \mu\text{g/kg}$): به موش‌های صحرایی دوز $10 \mu\text{g/kg}$ نسفاتین-1، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی با سرنگ همیتون به صورت IP تزریق شد و در روزهای بعد (روز اول، دوم و سوم

تحقیقات بیش‌تری دارد. ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix Metalloproteinase: MMPs) با یک خانواده بزرگی از اندوپتیداز وابسته به روی مرتبط است که اصولاً مسئول بازسازی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد و چندین نقش فیزیولوژیک مثل رشد، تکامل و ترمیم زخم دارد (16، 17). در زمان و شرایط پاتوفیزیولوژیک MMPs به شکل آنزیم پروتئولیتیک عمل کرده و ماتریکس خارج سلولی و پروتئین‌های اتصالات محکم سد خونی مغزی (Blood Brain Barrier: BBB) را تخریب می‌سازند و سبب ازهم گسیختگی BBB می‌شوند. آسیب BBB سبب نشت پروتئین‌های خون به داخل پارانشیم مغز شده و سبب خونریزی‌های ریز و ادم مغزی می‌گردد، بعلاوه MMPs فرایندهای فیزیولوژیک طبیعی مثل آنژیوژنز و نوروژنز را برهم می‌زنند و همچنین آن‌ها در فرایندهای التهاب و آبشارهای آپتوزیس نقش مهمی دارند. آن‌ها توسط آستروسیت‌ها، نورون‌ها، سلول‌های اپیتلیال، فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌ها ترشح می‌شوند (17). نسفاتین-1 سبب مهار اینترلوکین‌های التهاب‌زا و آپتوز می‌گردد، هم‌چنین بیان MMP-9 را کاهش می‌دهد و سبب کاهش MAPK و نسبت Bax/Bcl-2 می‌شود و به دلیل همین اثرات می‌توان از آن به‌عنوان درمان در شرایط التهابی استفاده کرد که التهاب عصبی نیز یکی از این موارد می‌باشد (18). بنابراین در مطالعه حاضر با توجه به مستندات و دلایل موجود یک بخش قابل بحث در مورد اثرات نوروپروتکتیو نسفاتین-1 وجود دارد که آیا واقعاً نسفاتین-1 دارای اثرات نوروپروتکتیو روی ضربه مغزی ناشی از تروما (TBI) به روش مارمارو است یا خیر؟ و اگر دارای اثرات محافظت نوروئی است با توجه به اینکه در اثر ترومای مغزی میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-9 افزایش می‌یابد، آیا این اثرات نوروپروتکتیو نسفاتین احتمال دارد از طریق ارتباط با ماتریکس متالوپروتئیناز-9 به انجام برسد یا خیر؟ لذا در مطالعه حاضر اثرات تزریق داخل صفاقی (IP) داروی نسفاتین روی نمرات نورولوژیکی،

بعد از ضربه مغزی) تزریق دارو تکرار گردید (13:9).

7- گروه دوز $20 \mu\text{g/kg}$ (TBI+Nfs $20 \mu\text{g/kg}$):

به موش های صحرایی دوز $20 \mu\text{g/kg}$ نسفاتین-1، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی با سرنگ همیلتون به صورت IP تزریق شد و در روزهای بعد (روز اول، دوم و سوم بعد از ضربه مغزی) تکرار گردید (13:9).

الف - روش آماده سازی، اعمال جراحی و روش ایجاد خیز مغزی

قبل از انجام عمل، بیهوشی حیوانات با استفاده از کتامین (50mg/kg) و زایلازین (10mg/kg) همراه با ایجاد بیدردی با کوکتل میدازولام (2mg/kg) بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی و مدت مدین ($0/1$ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) انجام گرفت (20). بلافاصله بعد از ضربه صفحه فلزی را از سر حیوان جدا کرده و پس از برقراری تنفس خود به خودی اتصال حیوان با دستگاه تهویه دستی را قطع کردیم. حیوان در این مرحله به قفس و حیوان خانه انتقال داده شد (21،22).

ب - روش اندازه گیری نفوذپذیری عروق یا روش سنجش سلامت سد خونی - مغزی

سنجش سلامت سد خونی - مغزی از طریق اندازه گیری میزان رنگ آبی ایوانز در خارج از عروق اندازه گیری شد. میزان نفوذپذیری عروق مغزی 4 ساعت پس از تروما با تزریق محلول آبی ایوانز (از طریق ورید ژوگولار به حیوان) اندازه گیری شد و میزان محلول آبی ایوانز را در طول موج 610nm اندازه گرفتیم (22).

ج - روش اندازه گیری محتوای آب مغز

میزان خیز مغزی با استفاده از محتوای آب مغزی اندازه گیری شد. محتوای آب مغز بعد از خارج کردن بافت مغز در پایان روز دوم پس از اعمال ضربه به سر و بعد از بیهوشی عمیق با تیوپنتال و اوتانازی اندازه گیری شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان آب بافت مغز به عنوان شاخص ادم محاسبه گردید (22).

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

د - ارزیابی پیامدهای نمرات نورولوژیک

پیامد نورولوژیک با استفاده از جدول Veterinary Coma Scale (VCS) که دارای 15 نمره (1-15) است ارزیابی شد، که از مجموع سه نمره اعمال حرکتی (1-8)، اعمال چشمی (1-4) و اعمال تنفسی (1-3) براساس معیار VCS، روز قبل از ضربه (Pre-TBI) و در روزهای ضربه مغزی (D0) روز اول (D1)، روز دوم (D2) و روز سوم (D3) بعد از ضربه مغزی اندازه گیری گردید (23).

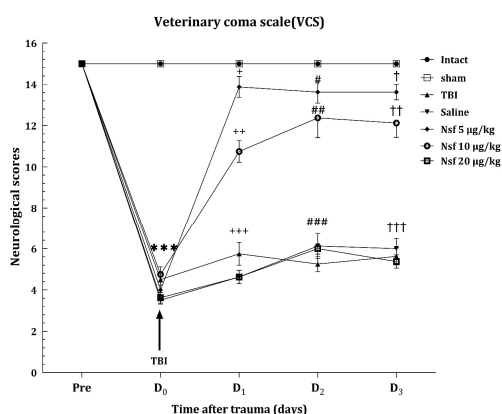
ر - ارزیابی عملکرد حرکتی (beam tasks)

عملکرد حرکتی، با استفاده از beam-walk (BW) و beam-balance (BB) ارزیابی شد، یک beam (میل) چوبی با پهنای کم (پهنای $1/5$ سانتی متر) و دارای ارتفاع (90 سانتی متر)، قرار گرفت و زمانی که موش صحرایی، برای حداکثر 60 ثانیه قرار روی beam مانند ثبت شده است. در تست BW، موش صحرایی با استفاده از پارادایم تقویت منفی، از نور و noise، فرار کرد و از beam با پهنای کم و دارای ارتفاع عبور کرد و به جعبه تاریک هدف در انتهای مقابل، وارد شد. میانگین نمره های روزانه برای هر نمونه، در آنالیز آماری وارد شده است (21،24).

ز - اندازه گیری ماتریکس متالوپروتئیناز-9 به روش ELISA در مایع CSF

این روش براساس واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی طراحی شده است. در این روش آنتی بادی پلی کلونال اولیه که مخصوص آنتی ژن گونه مورد نظر است، از قبل به دیواره چاهک های اندازه گیری، چسبیده است. در طی اولین مرحله آنکوباسیون، آنتی ژن از یک طرف به آنتی بادی اولیه به دام افتاده متصل می شود و از طرف دیگر به آنتی بادی ثانویه حاوی بیوتین متصل می گردد. پس از شستشو و خارج کردن آنزیم های باند نشده از

شده است. آنالیز آماری ANOVA repeated-measure و آزمون آماری two-way ANOVA و تست تعقیبی Tukey نشان داده است که ترومای مغزی سبب کاهش نمرات نورولوژیکی در گروه‌های سالین، TBI و دوزهای 5، 10 و 20 μg نسفاتین در زمان D0 شده است ($P<0/001$) و لیکن با تجویز دوزهای 5 و 10 $\mu\text{g/kg}$ نسفاتین به صورت داخل صفاقی میزان نمرات نورولوژیکی افزایش پیدا کرده و به گروه‌های Intact و Sham نزدیک شده است. اما در دوز 20 $\mu\text{g/kg}$ تغییرات صورت نگرفته، یعنی دوز 20 μg بر نمرات نورولوژیکی تاثیری نداشته است ($P>0/05$). در این نمودار مشهود است که 5 μg نسفاتین منجر به افزایش VCS به بیش‌ترین مقدار با کم‌ترین اختلاف در مقایسه با گروه Intact و Sham شده است ($P<0/001$).



نمودار شماره 1: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و 20 میکروگرم بر کیلوگرم بر روی نمرات نورولوژیکی بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.

- $P<0/001$ ***: اختلاف معنی‌داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20

از گروه Intact و sham در زمان D0

- $P<0/05$ +، $P<0/01$ ++ و $P<0/001$ +++: اختلاف معنی‌داری TBI،

Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D1

- $P<0/05$ #، $P<0/01$ ## و $P<0/001$ ###: اختلاف معنی‌داری TBI،

Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D2

- $P<0/05$ †، $P<0/01$ †† و $P<0/001$ †††: اختلاف معنی‌داری TBI،

Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D3

- داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.

در هر گروه 8 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

محیط، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه می‌گردد. این ماده پس از واکنش با آنزیم تولید رنگ می‌کند، که مرحله سوم انکوباسیون است. شدت رنگ به‌طور مستقیم با غلظت MMP-9 در نمونه مورد نظر بستگی دارد. واکنش به وسیله اضافه کردن اسید، خاتمه می‌یابد و جذب در 450 nm اندازه‌گیری می‌شود (25).

د- روش جمع‌آوری نمونه از سیستمنا مگنا

پیش از جمع‌آوری CSF ابتدا حیوان را با کتامین و زایلیزین بیهوش کرده، سر حیوان را در داخل استرنوتایکس فیکس کرده تا پاسخ Yes or No دیده شود. سپس موهای پشت گردن حیوان با یک قیچی تراشیده می‌شود و در تمام مدت آزمایش حیوان بیهوش می‌باشد. سر حیوان به میزان 45 درجه خم شده و سپس با استفاده از polyethylene tube نمره 10 و سرنگ همیلتون میزان 200 میکرولیتر از مایع CSF از ناحیه سیستمنا مگنا بین استخوان پس سری و اطلس گردنی گرفته شد، رنگ CSF قابل مشاهده بوده و باید دقت کرد که CSF با خون پر نشده باشد و در داخل اپندورف ریخته و سریعاً در نیتروژن مایع فیکس نمودیم (21).

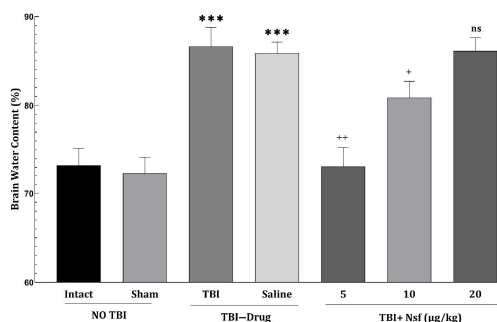
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری

جهت مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌های مورد آزمون در صورت رعایت مفروضات ابتدا برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آزمون repeated-measure ANOVA استفاده شد و سپس آزمون ANOVA یک‌طرفه در صورت نیاز از post test نیومن کولز و دوطرفه (Tukey post test) استفاده شد و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Prism8 GraphPad انجام گردید. در تمام موارد سطح معنی‌داری ($P<0/05$) در نظر گرفته شده است.

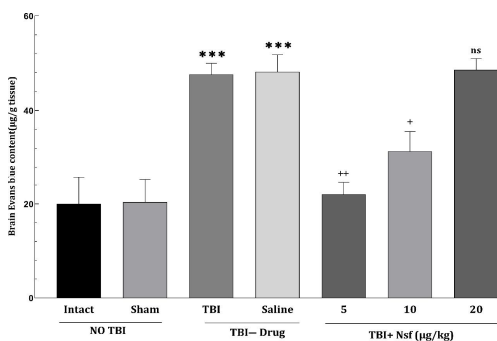
یافته‌ها

همان‌طور که در نمودار شماره 1 نشان داده شده نمرات نورولوژیکی قبل از ضربه، در زمان ضربه و روز اول، دوم و سوم پس از ضربه مغزی اندازه‌گیری و ثبت

ایوانز در مغز موش‌ها شده ($P < 0/001$) و نسفاتین در دوزهای 5 و 10 در دوز موثر ($5 \mu\text{g/kg}$) موجب کاهش میزان این شاخص یعنی کاهش میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی شده است ($P < 0/001$). ولی در دوز $20 \mu\text{g/kg}$ نسفاتین اختلاف معنی داری دیده نشده است یعنی دوز $20 \mu\text{g}$ نسفاتین اثری بر روی سلامت سد خونی مغزی نداشته است ($P > 0/05$).

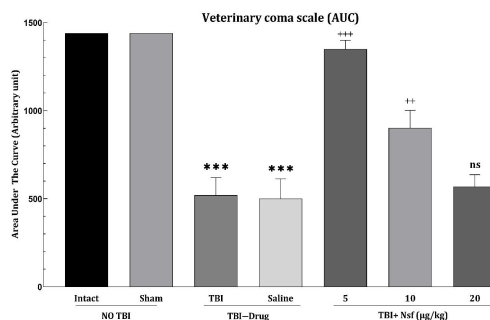


نمودار شماره 3: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و $20 \mu\text{g/kg}$ بر کیلوگرم وزن بدن بر میزان محتوای آب مغز بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.
 $P < 0.001$ *** اختلاف معنی دار گروه‌های TBI, Saline با گروه‌های Intact و Sham
 $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ به ترتیب تفاوت معنی دار گروه 5 Nsf و 10 Nsf با گروه‌های TBI و Saline
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.



نمودار شماره 4: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و $20 \mu\text{g/kg}$ بر میزان محتوای رنگ آبی ایوانز بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.
 $P < 0.001$ *** اختلاف معنی دار گروه‌های TBI, Saline با گروه‌های Intact و Sham

همان‌طور که در نمودار شماره 2 نشان داده شده است در گروه‌های Intact and sham بیشترین سطح زیر نمودار دیده شده است و در گروه‌های TBI و Saline و دوز $20 \mu\text{g}$ نسفاتین کمترین مقدار AUC دیده می‌شود، تجویز داخل صفاقی دوزهای 5 و $10 \mu\text{g}$ نسفاتین سبب افزایش معنی داری در در مقادیر AUC شده است ($P < 0/001$) ولیکن در دوز $20 \mu\text{g}$ این یافته‌ها معنی دار نشده و تاثیری نداشته است ($P > 0/05$).



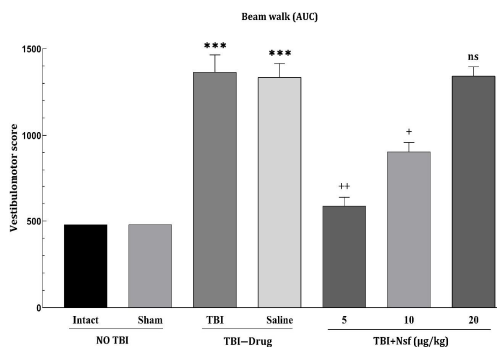
نمودار شماره 2: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و $20 \mu\text{g/kg}$ بر کیلوگرم بر مساحت سطح زیر نمودار نمرات نورولوژیکی بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.
 $P < 0.001$ *** اختلاف معنی دار گروه‌های TBI, Saline با گروه‌های Intact و Sham
 $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ به ترتیب تفاوت معنی دار گروه 5 Nsf و 10 Nsf با گروه‌های TBI و Saline
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

همان‌طور که در نمودار شماره 3 نشان داده شده است ضربه مغزی منجر به افزایش محتوای آب مغزی می‌شود و از سوی دیگر تزریق داخل فضای صفاقی نسفاتین در دوزهای 5 و $10 \mu\text{g}$ توانسته این مقدار افزایش آب مغزی را تا مقدار زیادی کاهش دهد ($P < 0/001$)، که در دوز $5 \mu\text{g}$ این یافته‌ها معنی دار تر بوده است، ولیکن در دوز $20 \mu\text{g}$ تاثیری بر میزان محتوای آب مغز نداشته است ($P > 0/05$).

همان‌طور که در نمودار شماره 4 نشان داده شده است ضربه مغزی موجب افزایش محتوای رنگ آبی

- $P < 0.001$ ***: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و sham در زمان D0
 - $P < 0.05$ +، $P < 0.01$ ++ و $P < 0.001$ +++: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و sham در زمان D1
 - $P < 0.05$ #، $P < 0.01$ ## و $P < 0.001$ ###: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و sham در زمان D2
 - $P < 0.05$ +، $P < 0.01$ ++ و $P < 0.001$ +++: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و sham در زمان D3
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

همان‌طور که در نمودار شماره 6 نشان داده شده است، در گروه‌های Intact and sham - کم‌ترین سطح زیر نمودار دیده شده است و در گروه‌های TBI و saline دوز $20 \mu\text{g}$ نسفاتین بیش‌ترین مقدار AUC دیده می‌شود. تجویز داخل صفاقی دوزهای 5 و $10 \mu\text{g}$ نسفاتین سبب کاهش معنی داری در مقادیر AUC شده است ($P < 0.001$) ولیکن در دوز $20 \mu\text{g}$ این یافته‌ها معنی دار نشده و تاثیری نداشته است ($P > 0.05$).

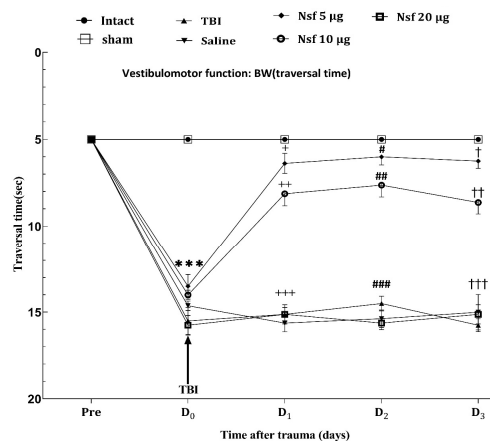


نمودار شماره 6: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و $20 \mu\text{g}$ بر کیلوگرم بر مساحت سطح زیر نمودار نمرات شاخص تعادلی - حرکتی beam walk بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.

- $P < 0.001$ ***: اختلاف معنی دار گروه‌های TBI، Saline با گروه‌های Sham و Intact
 - $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ به ترتیب تفاوت معنی دار گروه Nsf 5 و Nsf 10 با گروه‌های TBI و Saline
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

- $P < 0.01$ + و $P < 0.001$ ++ به ترتیب تفاوت معنی دار گروه Nsf 5 و Nsf 10 با گروه‌های TBI و Saline
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

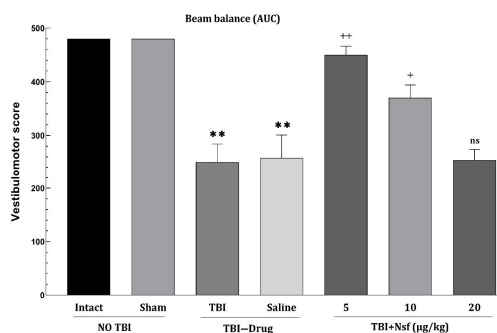
همان‌طور که در نمودار شماره 5 دیده می‌شود تجویز داخل صفاقی نسفاتین سبب کاهش معنی داری در مدت زمان عبور حیوان از روی beam می‌گردد این زمان در حیوان نرمال حدود 5 ثانیه است و به محض القای ضربه مغزی Traversal time شروع به افزایش کرده و در گروه‌های TBI و Saline به حدود 15 ثانیه می‌رسد، که این افزایش مدت زمان عبور از Beam در روز القای ضربه مغزی (D0) نسبت به گروه sham و Intact معنی دار شده است ($P < 0.001$). اما در روز اول تا سوم بعد از ضربه مغزی (D1-D3) تزریق نسفاتین با دوزهای 5 و $10 \mu\text{g/kg}$ بدن سبب کاهش زمان عبور از میله Beam در جهت نزدیک شدن به گروه‌های Intact و sham شده است، بطوری که با گذشت زمان این اختلاف معنی دار بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل Intact و sham کاهش می‌یابد ($P < 0.05$) ولی در دوز $20 \mu\text{g}$ اثری مشاهده نشده و بین این گروه و گروه‌های کنترل حلال (سالین) و TBI اختلافی وجود ندارد ($P > 0.05$).



نمودار شماره 5: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و $20 \mu\text{g}$ بر کیلوگرم بر روی نمرات شاخص تعادلی - حرکتی beam walk بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.

- $P < 0.001$ ***: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D0
- $P < 0.05$ †، $P < 0.01$ ++ و $P < 0.001$ +++: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D1
- $P < 0.05$ #، $P < 0.01$ ## و $P < 0.001$ ###: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D2
- $P < 0.05$ †، $P < 0.01$ ++ و $P < 0.001$ +++: اختلاف معنی داری TBI، Saline، Nsf 5، Nsf 10 و Nsf 20 از گروه Intact و sham در زمان D3
- داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

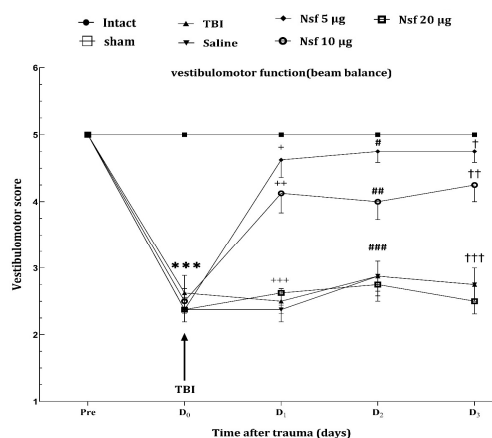
همان‌طور که در نمودار شماره 8 مشاهده می‌شود، در گروه‌های Intact and sham - بیش‌ترین سطح زیر نمودار وجود دارد و در گروه‌های TBI و saline و دوز 20 μg نسفاتین کم‌ترین مقدار AUC دیده می‌شود. تجویز داخل صفاقی دوزهای 5 و 10 μg نسفاتین سبب افزایش معنی داری در مقادیر AUC شده است ($P < 0/001$) ولیکن در دوز 20 μg این یافته‌ها معنی دار نشده و تاثیری نداشته است ($P > 0/05$).



نمودار شماره 8: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و 20 میکروگرم بر کیلوگرم بر مساحت سطح زیر نمودار نمرات شاخص تعادلی - حرکتی beam balance بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.

- $P < 0.001$ ***: اختلاف معنی دار گروه‌های TBI، Saline و Intact و Sham
- $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ به ترتیب تفاوت معنی دار گروه 5 Nsf و Saline با گروه‌های TBI و Intact
- داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

همان‌طور که در نمودار شماره 7 مشاهده می‌شود، تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوز 10 و مخصوصاً 5 μg سبب افزایش معنی داری در نمرات تعادلی - حرکتی روی میله beam می‌گردد. به محض القای ضربه مغزی Vestibulomotor score شروع به کاهش کرده و در گروه‌های TBI و سالین در روز القای ضربه مغزی (D0) نسبت به گروه sham و Intact معنی دار شده است ($P < 0/001$). اما در روز اول بعد از ضربه مغزی (D1) تزریق داروی با دوزهای 5 و 20 $\mu\text{g/kg}$ بدن سبب افزایش نمرات تعادلی - حرکتی در جهت نزدیک شدن به گروه‌های Intact و sham شده است، به‌طوری که با گذشت زمان این اختلاف معنی دار بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل Intact و sham کاهش می‌یابد ($P < 0/05$). ولیکن در همین روز اول (D1) پس از ضربه مغزی همان‌طور که مشاهده می‌گردد اختلاف بین گروه‌های نسفاتین با دوز 5 و 10 μg با گروه‌های کنترل حلال (سالین) و TBI روبه روند افزایشی گذاشته ($P < 0/001$)، که نشان‌دهنده وضعیت بهبودی در نمرات حرکتی - تعادلی می‌باشد، ولی در دوز 20 μg اثری مشاهده نشده و بین این گروه و گروه‌های کنترل حلال (سالین) و TBI اختلافی وجود ندارد ($P > 0/05$).

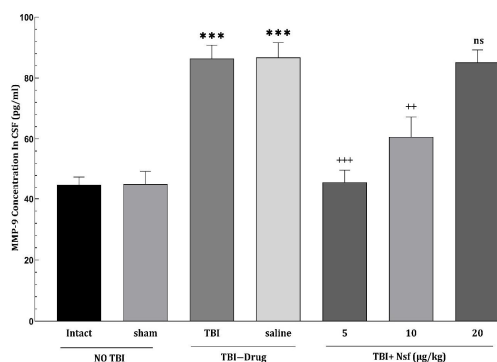


نمودار شماره 7: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و 20 میکروگرم بر کیلوگرم بر روی نمرات شاخص تعادلی - حرکتی beam balance (بر مدت زمان باقیماندن حیوان روی میله) بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر.

مغزی در موش صحرایی نر به صورت یک مطالعه رفتاری، بیوشیمیایی انجام شد. در این مطالعه، محتوای آب مغز موش‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی محتوای آب مغز موش‌ها نشان داد، علی‌رغم اینکه ضربه مغزی منجر به افزایش محتوای آب مغزی و به عبارت دیگر باعث ایجاد ادم مغزی می‌شود، داروی نسفاتین می‌تواند باعث کاهش میزان ادم مغزی در روز سوم پس از القای ضربه مغزی شود. در بررسی نتایج حاصل از مطالعه می‌توان دریافت محتوای آب مغزی در گروهی که نسفاتین با دوز $5 \mu\text{g/kg}$ دریافت کرده‌اند اختلاف معنی‌داری با گروه intact و sham ندارند. نسفاتین با دوز $10 \mu\text{g/kg}$ نیز توانسته باعث کاهش ادم مغزی در گروهی که این میزان از دارو را دریافت کرده‌اند شود، اما به وضوح میزان این کاهش ادم مغزی در گروه نسفاتین $5 \mu\text{g/kg}$ بیش‌تر بود و همچنین محتوای آب مغز در گروه $20 \mu\text{g/kg}$ با گروه TBI و سالی‌ن که هیچ دارویی دریافت نکرده‌اند، اختلاف معنی‌داری نداشت، که این نشان می‌دهد این دوز از دارو بر روی ادم مغزی تأثیرگذار نبوده است. نسفاتین-1، دارای خواص ضد آپوپتوتیک و ضد التهابی است، با مهار نفوذ نوتروفیل‌ها و انتشار واسطه‌های التهابی متعاقب آن، محافظت عصبی را در آسیب مغزی ناشی از هموراژی در موش‌ها اعمال می‌کند (13). در مطالعه ما نیز با بهبودی سد - خونی مغزی توانست با ادم مغزی مقابله کرده و اثرات محافظت نورونی را ایفا نماید. البته اثرات ضد التهابی در مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشد، ولیکن به نظر می‌رسد در روش جراحی مغزی تروماتیک نیز احتمالاً التهاب را کاهش خواهد داد.

در سال 2022، Tamer و همکارانش نشان دادند که تجویز دوزهای 0/3 و 1 و 3 میکروگرم به صورت داخل صفاقی نسفاتین باعث کاهش عوامل اکسیدانی (MDA) و افزایش عوامل آنتی‌اکسیدانی در بافت مغز شده و سبب بهبودی حافظه به دنبال القای تشنج گردید. بنابراین یافته‌های درمان نسفاتین-1 با مهار گونه‌های

همان‌طور که در نمودار شماره 10 نشان داده شده است تجویز دوزهای مختلف نسفاتین سبب کاهش معنی‌داری در میزان MMP-9 مایع CSF می‌گردد، به این صورت که با ایجاد ترومای مغزی میزان MMP-9 در مایع CSF به مقدار زیادی افزایش پیدا کرده است ($P<0/001$). همان‌طور که می‌دانیم این امر سبب افزایش نفوذپذیری سد خونی - مغزی می‌گردد. ولی در گروه درمان شده با نسفاتین 5 و $10 \mu\text{g/kg}$ میزان MMP-9 کاهش پیدا کرده است که نسبت به گروه کنترل (سالی‌ن) و TBI این اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<0/001$). در گروه درمان شده با نسفاتین 20 میکروگرم اختلاف معنی‌دار نبوده و کاهش در میزان MMP-9 مشاهده نمی‌گردد ($P>0/05$).



نمودار شماره 9: اثر تجویز داخل صفاقی نسفاتین در دوزهای 5، 10 و 20 میکروگرم بر کیلوگرم بر میزان MMP-9 در مایع CSF بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر.

- $P<0.001$ *** اختلاف معنی‌دار گروه‌های TBI, Saline با گروه‌های Sham و Intact
 - $P<0.05$ + و $P<0.01$ ++ به ترتیب تفاوت معنی‌دار گروه 5 Nsf و 10 Nsf با گروه‌های TBI و Saline
 - داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار نمایش داده شده است.
 در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی قرار دارد.

بحث

این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظت نورونی نسفاتین بر روی نمرات نورولوژیکی، سلامت سد خونی - مغزی و ادم مغزی به دنبال القای ترومای شدید

فعال نیتروژن و تنظیم ظرفیت آنتی اکسیدانی، محافظت عصبی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تشنج و اختلال عملکرد حافظه را فراهم می کند، که نشان دهنده پتانسیل آن در بهبودی حافظه و افزایش اثربخشی درمان های معمول ضد تشنج است (26).

در مطالعه حاضر نسفاتین اثرات نوروپروتکتیو خوبی بجای گذارده است و هرچند حافظه و یادگیری بررسی نشد، ولیکن باتوجه به اثرات بر روی سیستم تعادلی - حرکتی می تواند در دوره های طولانی مدت حافظه موثر باشد.

Tang و همکاران نشان دادند که تجویز دوزهای 10 و 20 میکروگرم نسفاتین به صورت داخل صفاقی سبب کاهش معنی داری در التهاب نورونی و آپوپتوزیس به دنبال آسیب مغزی هموراژیک می شود (16). همسو با مطالعه ما ادم مغزی نیز کاهش یافته و نمرات نورولوژیکی بهبود یافته است، ولیکن ما در دوز کم تر پاسخ گرفتیم که این شاید ناشی از نوع تروما باشد و نیاز به بررسی بیش تری دارد. سد خونی - مغزی مسئول تنظیم عملکرد سیستم عصبی مرکزی (CNS) از طریق تنظیم نقل و انتقالات سلولی و مولکولی بین خون و سیستم اعصاب مرکزی می باشد. اختلال در سد خونی - مغزی در بسیاری از بیماری های سیستم عصبی مرکزی و جراحات ها مانند آسیب، سکته مغزی، ادم و پاسخ های التهابی مشاهده می شود. اختلال در سد خونی - مغزی باعث افزایش حجم مغز به دلیل تسهیل در حرکت آب و پروتئین های پلاسما به CNS و در نتیجه ادم وازوژنیک می گردد (27). این سبب از هم گسیختگی در غلاف میلین شده و واکنش بیش از حد از آستروسیت ها و اختلال در عملکرد عصبی را به همراه دارد؛ بنابراین مداخلات دارویی در زمینه درمان این آسیب و از هم گسیختگی سد خونی - مغزی و به دنبال آن طیف وسیع از اختلالات نورولوژیکی ضروری به نظر می رسد (28). گلیال ها نقش مهمی در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی در مغز دارند و علاوه بر ایجاد یک سد نورونی در مغز، به عنوان واحدهای عملکردی نیز قابل توجه هستند. نقص در

سلول های گلیال سبب ورود ژنراسیون - اختلالات عصبی و شناختی و از دست دادن حافظه در فرد می شود (29). Jiang و همکاران در سال 2020 بیان کردند که تجویز نسفاتین با کاهش میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-9 سبب بهبودی استئوآرتریت می گردد (18). در سال 2018 مشخص شده است که به دنبال تروما بیان MMP-9 بعد از تروما افزایش پیدا کرده که در تشنج های ناشی از تروما بسیار موثر می باشد. سطح MMP-9 افزایش یافته مستقیماً با فرایندهای التهابی و ترمیم فیزیولوژیکی که در ناحیه آسیب دیده و ساختارهای اطراف مغز رخ می دهد، مرتبط است (30). در مطالعه حاضر نیز با تجویز نسفاتین میزان MMP-9 کاهش یافته و بهبودی در میزان یکپارچگی سد خونی مغزی ایجاد گردید، که در ترومای مغزی برای اولین بار گزارش شده است. در این مطالعه به جهت مطالعه بر روی میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی در گروه های مختلف مشخص شد که ضربه مغزی موجب افزایش محتوای رنگ آبی ایوانز در بافت خارج عروقی مغز موش ها (نشان دهنده افزایش میزان نفوذپذیری سد خونی مغزی) شده و نسفاتین در دوز 5 و 10 $\mu\text{g/kg}$ در کاهش میزان این شاخص مؤثر بوده و مقدار رنگ آبی ایوانز در این گروه ها با میزان این ماده در گروه های TBI و سالیین اختلاف معنی دار داشته و از سوی دیگر با میزان آن در گروه intact و sham اختلاف معنی داری ندارد. لازم به ذکر است دوز 5 $\mu\text{g/kg}$ نسفاتین نسبت به دوز 10 $\mu\text{g/kg}$ در مورد بهبود وضعیت نفوذپذیری سد خونی - مغزی مؤثر تر است. هم چنین دوز 20 $\mu\text{g/kg}$ در این مورد نیز مؤثر نبوده و گروهی که این میزان از دارو را دریافت کرده اند، محتوای رنگ آبی ایوانز در بافت مغز شان اختلاف معنی داری با گروه TBI و سالیین ندارد. در سال 2018 عرفانی و همکاران نشان دادند که به دنبال تجویز دوز 20 $\mu\text{g/kg}$ نسفاتین -1 در ایسکمی مغزی، کاهش فعالیت کاسپاز-3 و فعالیت میکروگلیا اتفاق می افتد و هم چنین بهبود اختلالات حافظه فضایی ناشی از ایسکمی مغز

روز سوم پس از ضربه بهبود چشمگیری در این زمینه نداشته‌اند و از سوی دیگر گروه‌های دریافت‌کننده نسفاتین در دوزهای 25 و 50 $\mu\text{g/kg}$ در روزهای پس از ضربه توانسته‌اند به سرعت خود را به گروه intact و sham نزدیک کنند و در روز سوم اختلاف معنی‌داری با این گروه‌ها نداشتند. در این مطالعه، نمره نورولوژیک موش‌های مورد مطالعه در گروه‌های مورد مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نمره نورولوژیک (VCS) در سه روز متوالی نشان داد گروهی که نسفاتین با دوز 5 و 10 $\mu\text{g/kg}$ دریافت کرده‌اند در تمامی زمان‌ها بالاترین نمره نورولوژیک را داشته‌اند، در روز سوم نمره نورولوژیک آن‌ها نسبت به سایر گروه‌ها نزدیک‌تر به گروه intact و sham بوده و همچنین روند افزایش VCS در این گروه سرعت بیش‌تری نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. نتایج کلی این مطالعه نشان داد تجویز داروی نسفاتین با دوزهای 5 و 50 $\mu\text{g/kg}$ موجب بهبودی نشانه‌های نورولوژیکی شامل بهبود وضعیت عملکرد حرکتی، بهبود وضعیت سد خونی-مغزی، ادم مغزی در موش‌هایی که تحت ضربه مغزی قرار گرفتند، شده است. در نتیجه این دارو می‌تواند اثرات محافظتی بر روی سلول‌های نورونی داشته باشد و همچنین احتمالاً در موارد بالینی آسیب مغزی ناشی از ضربه مؤثر باشد که این امر نیازمند مطالعات بیش‌تر است.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود وظیفه می‌دانند که از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت تامین بخش مالی این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. J Head Trauma Rehabil 2006; 21(5): 375-378.
2. Maas AI, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. Lancet Neurol 2017; 16(12): 987-1048.

3. Okie S. Traumatic brain injury in the war zone. *N Engl J Med* 2005; 352(20): 2043-2047.
4. Young LA, Rule GT, Bocchieri RT, Burns JM. Biophysical mechanisms of traumatic brain injuries. *Semin Neurol* 2015; 35(1): 5-11.
5. Xiong Y, Gu Q, Peterson P, Muizelaar JP, Lee C. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1997; 14(1): 23-34.
6. Singh IN, Sullivan PG, Deng Y, Mbye LH, Hall ED. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26(11): 1407-1418.
7. Clark RS, Bayir H, Chu CT, Alber SM, Kochanek PM, Watkins SC. Autophagy is increased in mice after traumatic brain injury and is detectable in human brain after trauma and critical illness. *Autophagy* 2008; 4(1): 88-90.
8. Oh S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443(7112): 709-712.
9. Prinz P, Scharner S, Friedrich T, Schalla M, Goebel-Stengel M, Rose M, et al. Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(1): 195-201.
10. Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, et al. Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. *PLoS One* 2012; 7(12): e50918.
11. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148(10): 5088-5094.
12. Dore R, Levata L, Lehnert H, Schulz C. Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *J Endocrinol* 2017; 232(1): R45-R65.
13. Erfani S, Moghimi A, Aboutaleb N, Khaksari M. Nesfatin-1 improve spatial memory impairment following transient global cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting microglial and caspase-3 activation. *J Mol Neurosci* 2018; 65(3): 377-384.
14. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2007; 30(5): 244-250.
15. Shen X-L, Song N, Du X-X, Li Y, Xie J-X, Jiang H. Nesfatin-1 protects dopaminergic neurons against MPP+/MPTP-induced neurotoxicity through the C-Raf-ERK1/2-dependent anti-apoptotic pathway. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1-13.
16. Tang C-H, Fu X-J, Xu X-L, Wei X-J, Pan H-S. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides* 2012; 36(1): 39-45.
17. Özsavcı D, Erşahin M, Şener A, Özakpinar ÖB, Toklu HZ, Akakın D, et al. The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery* 2011; 68(6): 1699-1708.
18. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495(1-2): 12-15.
19. Tan Z, Xu H, Shen X, Jiang H. Nesfatin-1 antagonized rotenone-induced neurotoxicity in MES23. 5 dopaminergic cells. *Peptides* 2015; 69: 109-114.

20. Erfani S, Moghimi A, Aboutaleb N, Khaksari M. Protective effects of Nesfatin-1 peptide on cerebral ischemia reperfusion injury via inhibition of neuronal cell death and enhancement of antioxidant defenses. *Metab Brain Dis* 2019; 34(1): 79-85.
21. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491-21494.
22. Rempe RG, Hartz AM, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016; 36(9): 1481-1507.
23. Jiang L, Xu K, Li J, Zhou X, Xu L, Wu Z, et al. Nesfatin-1 suppresses interleukin-1 β -induced inflammation, apoptosis, and cartilage matrix destruction in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in rats. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(2): 1760-1777.
24. Soltani Z, Shahrokhi N, Karamouzian S, Khaksari M, Mofid B, Nakhaee N, et al. Does progesterone improve outcome in diffuse axonal injury? *Brain Inj* 2017; 31(1): 16-23.
25. Soltani Z, Khaksari M, Jafari E, Iranpour M, Shahrokhi N. Is genistein neuroprotective in traumatic brain injury? *Physiol Behav* 2015; 152(Pt A): 26-31.
26. Kong X, Gong S, Su L, Li C, Kong Y. Neuroprotective effects of allicin on ischemia-reperfusion brain injury. *Oncotarget* 2017; 8(61): 104492-104507.
27. Shao J, Wu Q, Lv S-y, Zhou X-m, Zhang X-S, Wen L-l, et al. Allicin attenuates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Clin Neurosci* 2019; 63: 202-208.
28. Chakraborty N, Hammamieh R, Gautam A, Miller S-A, Condlin ML, Jett M, et al. TBI weight-drop model with variable impact heights differentially perturbs hippocampus-cerebellum specific transcriptomic profile. *Exp Neurol* 2021; 335: 113516.
29. 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* 2011; 89(1): 31-40.
30. Asl SZ, Khaksari M, Khachki AS, Shahrokhi N, Nourizade S. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury: laboratory investigation. *J Neurosurg* 2013; 119(2): 353-361.
31. Khachaki A, Haddad M, Shahrokhi N, Sepehri G. Effects of different phases of estrous cycle on brain edema and neurological outcomes after severe traumatic brain injury in female rats. *Koomesh* 2011; 13(1): Pe62-Pe72.
32. Khaksari M, Maghool F, Asadikaram G, Hajializadeh Z. Effects of sex steroid hormones on neuromedin S and neuromedin U2 receptor expression following experimental traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(10): 1080-1089.
33. Monaco CM, Mattiola VV, Folweiler KA, Tay JK, Yelleswarapu NK, Curatolo LM, et al. Environmental enrichment promotes robust functional and histological benefits in female rats after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 2013; 247: 410-418.
34. Colomba P, Fontana S, Salemi G, Barranca M, Lo Sicco C, Mazzola MA, et al. Identification of biomarkers in cerebrospinal fluid and serum of multiple sclerosis patients by immunoproteomics approach. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12): 23269-23282.
35. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya R, et al. A simple and rapid method to collect the

- cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods* 2009; 178(1): 116-119.
36. Pegg CC, He C, Stroink AR, Kattner KA, Wang CX. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods* 2010; 187(1): 8-12.
 37. Tamer SA, Koyuncuoğlu T, Köroğlu AK, Akakin D, Yüksel M, Yeğen BÇ. Nesfatin-1 ameliorates oxidative brain damage and memory impairment in rats induced with a single acute epileptic seizure. *Life Sci* 2022; 294: 120376.
 38. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem* 2016; 139: 91-114.
 39. Wang S, He H, Chen L, Zhang W, Zhang X, Chen J. Protective effects of salidroside in the MPTP/MPP+-induced model of Parkinson's disease through ROS-NO-related mitochondrion pathway. *Mol Neurobiol* 2015; 51(2): 718-728.
 40. Fakhri S, Yosifova Aneva I, Farzaei MH, Sobarzo-Sánchez E. The neuroprotective effects of astaxanthin: Therapeutic targets and clinical perspective. *Molecules* 2019; 24(14): 2640.
 41. Pijet B, Stefaniuk M, Kostrzevska-Ksiezzyk A, Tsilibary P-E, Tzinia A, Kaczmarek L. Elevation of MMP-9 levels promotes epileptogenesis after traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 2018; 55(12): 9294-9306.