

Neuroprotective Effects of Berberine After Severe Traumatic Brain Injury in Male Rats: The Role of IL-1 β and IL 10

Siavash Anbai¹,
Farzin Niazi²,
Ali Siahposht-Khachaki³,
Labkhand Sefidari⁴,
Davood Farzin⁵

¹ Resident in Neurosurgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² PhD Student in Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Departments of Physiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ General Practitioner, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

⁵ Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 4, 2021 ; Accepted December 5, 2021)

Abstract

Background and purpose: Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of death in young people. Berberine is a flavonoid rich in barberries and many traditional Iranian herbal remedies that could be used in treatment of neurodegenerative diseases. These properties make it a viable treatment for neurodegenerative diseases. Therefore, this study intended to investigate the neuroprotective activity of berberine in animal model of traumatic brain injury.

Materials and methods: Thirty minutes after induction of traumatic brain injury by Marmarou free fall method, Wistar rats received berberine (10, 20 and 50mg/kg i.p.). Cerebrospinal fluid (CSF) was collected from cisterna magna after behavioral tests to evaluate the levels of a proinflammatory cytokine (IL-1 β) and anti-inflammatory cytokine (IL-10).

Results: According to current results, TBI can cause decline in Veterinary coma scale, cerebral edema, Blood-Brain Barrier dysfunction, vesiculomotor impairment, and alteration of cytokines in favor of inflammation in CSF. Nevertheless, administration of berberine in 10 and 20mg/kg can attenuate these findings. Also, berberine (20 mg/kg) effectively increased IL-10 and decreased IL-1 β in CSF. All findings were more noticeable at 20mg/kg berberine ($P < 0.001$).

Conclusion: Our study showed that berberine had neuroprotective effects on the brain and was able to affect the consequences of brain trauma. Also, it is suggested that at least some of these neuroprotective effects are mediated by modulation in the path of inflammatory factors in the brain.

Keywords: berberine, traumatic brain injury, neuroprotection, neuroinflammation, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (204): 1-13 (Persian).

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

اثرات محافظت نوروپی بربرین بعد از القاء ضربه مغزی شدید در موش صحرایی نر: نقش $IL-1\beta$ و $IL-10$

سیاوش انبئی¹فرزین نیازی²علی سیاه پشت خاچکی³لبخند سفیداری⁴داود فرزین⁵

چکیده

سابقه و هدف: ترومای مغزی بیشترین عامل مرگ و میر در بین جوانان است. بربرین فلاونوئیدی است که در میوه زرشک و بسیاری از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی ایران به وفور یافت می‌گردد و می‌تواند برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده شود بنابراین در این مطالعه اثرات محافظت نوروپی بربرین بعد از القاء ترومای مغزی در موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نژاد ویستار دوزهای مختلفی از بربرین (10، 20، 40 میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت داخل صفاقی نیم ساعت بعد از القاء ضربه مغزی به روش مارمارو دریافت کردند. بعد از تست‌های رفتاری، مایع مغزی-نخاعی حیوانات جهت بررسی میزان سایتوکاین‌های التهابی و ضد التهابی $IL-1\beta$ و $IL-10$ به روش الایزا از ناحیه سیستمنا مگنا جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که ضربه مغزی ناشی از تروما سبب ادم مغزی و تخریب سد خونی مغزی و تغییرات در نمرات نورولوژیکی و تعادلی حیوان و افزایش چشم‌گیر $IL-1\beta$ و کاهش $IL-10$ شد تجویز بربرین در دوزهای 10 و 20 میلی گرم بر کیلوگرم توانست این اختلالات را نسبت به گروه کنترل برطرف کند، که در دوز 20 میلی گرم این تغییرات آشکارتر بوده است ($P < 0/001$).

استنتاج: نتایج نشان داد که بربرین دارای اثرات محافظت نوروپی در مغز بوده و بنابراین توانسته است روی پیامدهای ترومای مغزی اثر بگذارد و همچنین احتمال می‌رود که بخشی از این اثرات نوروپروتکتیو آن از طریق تعدیل در مسیر فاکتورهای التهابی مغز صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی: بربرین، ترومای مغزی، محافظت نوروپی، التهاب عصبی، موش صحرایی

مقدمه

تصادفات وسایل نقلیه و سقوط از علل شایع آسیب ترومایی مغزی (Traumatic Brain Injury) TBI است (1). آسیب اولیه به نیروی مکانیکی به کار برده شده بر روی مغز نسبت داده می‌شود، در حالی که آسیب‌های ثانویه

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

1. دستیار جراحی مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

2. دانشجوی دکتری تخصصی فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

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

4. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پردیس خودگردان رامسر، رامسر، ایران

5. استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/8/12 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/8/23 تاریخ تصویب: 1400/9/14

شامل آبشاری (Cascade) از حوادث عروقی، سلولی و شیمیایی از قبیل التهاب، استرس اکسیداتیو، آپوپتوزیس، نکروز و اتوفاژی می باشد (2). آسیب ثانویه به فاصله چند ساعت تا ماه ها بعد از ضربه ی اولیه به وقوع می پیوندد و باعث تغییرات نوروشیمیایی، متابولیک و سلولی می شود. به طور کل آسیب ثانویه شامل عدم تعادل و همئوستاز یونی، افزایش رهائش نوروترنسمیترها، اختلال در عملکرد میتو کندری¹، پراکسیداسیون لیپیدها (افزایش رادیکال های آزاد) و تخریب غشایی است (3-5). بربرین (Berberine:BBR) یک ترکیب طبیعی مشهور است که در گیاهانی چون زرشک و گیاهان تیره آلاله یافت می شود. بوت ه زرشک در اکثر جاها رویش دارد، بومی جنوب شرقی کانادا و شرق ایالات متحده آمریکا است و استفاده سنتی دارد (6) در ایران هم در قسمت شرقی و مرکزی ایران به وفور یافت می شود. جذب روده ای ضعیفی دارد و بلافاصله توسط کبد بعد از مصرف خوراکی متابولیزه می شود ولی می تواند در سد خونی مغزی نفوذ کند و برای برهم کنش با نورون ها در هیپو کمپ تجمع پیدا کند. به عنوان یک آلکالوئید آمینی به پروتئین های پلاسما متصل می گردد (7،8). بربرین دارای اثرات درمانی روی طیف وسیع از بیماری ها می باشد در درمان هیپرتروفی قلب (9)، در بیماری التهابی و عروقی (10)، مقاومت به انسولین (11)، هیپر لیپیدمیا (12)، سرطان پستان (13)، و غیره موثر می باشد. اما چیزی که نباید نادیده گرفته شود، اثرات درمانی بربرین روی بیماری های سیستم عصبی مرکزی می باشد از قبیل بیماری آلزایمر (14)، پارکینسون، سکت های ایسکمی مغزی (15،16) که نشان می دهد دارای اثرات ضد سمیت عصبی، ضد بیماری های روانی و شناختی و خصوصیات فارماکولوژیکی ضد بیماری های نورودژنراتیو می باشد. حتی در سیستم پاداشی مغز نیز BBR سبب مهار اثرات ریواری موفین، کوکائین و الکل شده است همه این مدارک نشان دهنده نقش محافظت نورونی BBR بر روی حافظه و یادگیری در ترومای مغزی منتشره می باشد که از طریق سرکوب

فاکتورهای التهابی، آنژیوژنز و آپوپتوز اعمال می شود (17). در ایسکمی مغزی BBR سبب محافظت نورونی از طریق مهار آپوپتوز و درکنار آن فعال کردن مسیرهای سیگنال دهی PI3K/Akt می گردد و این اثرات ضد آپوپتوزی BBR از طریق کاهش فعالیت میکرو گلیال ها و واکنش آسترو گلیوزیس به انجام می رسد که با ایجاد التهاب در مغز مرتبط هستند (18). به علاوه، BBR یک سرکوب کننده قوی التهاب عصبی می باشد که به شدت فعالیت NF- κ B را مهار می کند که احتمال می رود مسیر سیگنال دهی PI3K/PKB and MAPK(p38 and ERK1/2) را بلاک نماید (19). بربرین جراحات ایسکمیک مغزی را بعد از بستن شریان مغزی میانی کاهش می دهد که این اثر از طریق افزایش فعالیت سیگنال دهی Akt/GSK و کاهش بیان NF- κ B به وقوع می پیوندد و بنابراین هردو اثر آنتی آپوپتوز و ضد التهابی را دارا می باشد (20). BBR جراحات مغزی ناشی از تروما را به جای اثر نوروپروتکتیو مستقیم، به وسیله محدودیت تولید واسطه های التهابی از سلول های گلیال کاهش می دهد (21). از طریق تنظیم سایتوکاین های پیش التهابی و سایتوکاین های ضد التهاب BBR برای مقابله کردن با ایسکمی موضعی مغزی و جراحات های نورونی عملکرد نوروپروتکتشن خود را اعمال می نماید (22). علاوه بر کاهش بیان سایتوکاین های التهابی (TNF α , IL-1 β , IL-6) BBR سبب تنظیم کاهشی IFN- γ ، PS-or، iNOS و NO و COX-2 in BV-2 از طریق AMPK در سلول های میکرو گلیال می شود و از این طریق نسبت AMP/ATP (انرژی) سلول را مانیتور می نماید (23). اگر چه گزارش شده که بربرین شاید سبب افزایش IL-1 β و iNOS در رت های آلزایمری نیز شود (24). این نتیجه هم نشان می دهد که برای اثرات ضد التهابی بربرین جای بحث وجود دارد و باید کار بیش تری انجام شود. فعالیت مسیر PI3K/Akt و مسیر MAPK به همراه مهار بیان NF- κ B برای رفتارهای ضد التهابی BBR برای مقابله با تخریب نورونی ضروری هستند. سایتوکاین های التهاب زا نظیر

1. Mitochondrial Dysfunction

IL-1 β و iNOS توسط BBR برای کنترل پیشرفت التهاب تنظیم می‌شوند. با توجه به اینکه بربرین دارای اثرات محافظت نورونی (نوروپروتکتیو)، ضد التهابی، ضد آپوپتوز است، بنابراین در این مطالعه اثر محافظتی نورونی بربرین در فرایند ضربه مغزی منتشره به روش مارمارو از مسیر اینترلوکین‌ها مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای تجربی از 60 سر موش صحرایی بالغ نر با وزن 250 تا 300 گرم از نژاد ویستار استفاده شد که در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و درجه حرارت $2 \pm$ سانتی‌گراد نگهداری شدند و نیز محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. این مطالعه طی مجوز شماره IR.MAZUMS.RIB.REC.1398.029 کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران واحد پردیس خودگردان رامسر انجام گرفته است.

گروه‌بندی نمونه‌ها به شکل زیر صورت پذیرفت:

- 1- گروه Intact: موش‌های صحرایی نر که تحت هیچ نوع مداخله‌ای قرار نگرفتند (25). 2- گروه شام (sham): گروه کنترل که موش‌های صحرایی نر فقط بیهوش شده زیر دستگاه رفتند ولی ضربه مغزی نشدند (25، 26). 3- گروه ضربه مغزی (TBI): موش‌های صحرایی که بعد از بیهوشی تحت ضربه مغزی قرار گرفته‌اند (25، 26). 4- گروه حلال بربرین (TBI+Saline): به موش‌های صحرایی نر حلال بربرین (سالین)، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی تزریق شد (27، 28). 5- گروه دوز کم بربرین (TBI+10 mg/kg BBR) به موش‌های صحرایی دوز 10 mg/kg بربرین، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد (20، 28، 29). 6- گروه دوز متوسط بربرین (TBI+20 mg/kg BBR): به موش‌های صحرایی دوز

20 mg/kg بربرین، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به صورت (i.p) تزریق شد (20، 28، 29). 7- گروه دوز بالای بربرین (TBI+40 mg/kg BBR): به موش‌های صحرایی نر دوز 40 mg/kg بربرین، نیم ساعت بعد از ضربه مغزی به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد (20، 28، 29).

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 (2 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی) و مدت‌مدت (0/1 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) انجام گرفت (30). بعد از بیهوشی، کانول گذاری در نای آغاز شد و نای حیوان جهت کنترل تنفس و جلوگیری از هیپوکسی به پمپ تنفسی دستی (آموبگ) وصل شد. بعد از ایجاد برش در پوست سر و مشاهده جمجمه، ضربه 450 گرمی به سر حیوان (به روشی که توسط مارمارو و همکارانش توضیح داده شده است) وارد شد (31، 32).

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

جدا از تست رفتاری برای تمامی گروه‌ها (n=42) 4 تا 6 ساعت بعد از ضربه مغزی پس از انجام تزریق دارو یا حلال آن و همچنین در گروه‌های کنترل اندازه گیری نفوذ پذیری عروق یا سنجش سلامت سد خونی - مغزی انجام شد. به طوری که 20 mg/kg رنگ آبی ایوانز 2 درصد (1ml/kg) از طریق ورید ژوگولار با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد. پس از یک ساعت تزریق، توراکس حیوان تحت بیهوشی عمیق باز شده و یک سوزن داخل بطن چپ وارد کرده و با محلول سالین ایزوتونیک به مدت 20 دقیقه شستشو داده شد تا زمانی که محلول روشن از طریق گوشک دهلیز راست خارج شود سپس مغز را به سرعت به طور کامل خارج کرده،

قطعه قطعه کرده و پس از خرد کردن در 20 میلی لیتر محلول (14 میلی لیتر محلول استن + 6 میلی لیتر سولفات سدیم) ریخته و آن را به مدت 24 ساعت در دستگاه Shaker قرار داده و سپس 2 میلی لیتر محلول روئی را برداشته و با 2 میلی لیتر محلول تری کلرو اسید استیک مخلوط و به مدت 2 دقیقه با 2000 دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و میزان محلول آبی ایوانز در طول موج 610nm اندازه گیری شد (32،31).

ج- روش اندازه گیری محتوای آب مغز

میزان خیز مغزی با استفاده از محتوای آب مغزی و در نهایت با استفاده از فرمول زیر به عنوان شاخص ادم محاسبه شد (32،31).

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

د- ارزیابی پیامد های نمرات نورولوژیک (veterinary coma scale)

پیامد نورولوژیک با استفاده از جدول (VCS) که دارای 15 نمره می باشد (1-15) در 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 شد (32،31).

ارزیابی عملکرد حرکتی و تعادلی (beam tasks)

عملکرد حرکتی، با استفاده از beam-walk (BW) و beam-balance (BB) ارزیابی گردید، یک beam چوبی با قطر (پهنای 1/5 سانتی متر) و دارای ارتفاع (90 سانتی متر)، قرار گرفت و زمانی که موش صحرایی، برای حداکثر 60 ثانیه قرار روی بیم مانند ثبت شد. در تست BW، زمان سپری شده برای عبور از beam و فاصله طی شده ارزیابی شد. معیارهای نمره دهی برای فاصله طی شده، بر اساس 0 تا 5 بود که 0، ناتوانی برای حرکت کردن از نقطه شروع را نشان می داد، 1 تا 4،

به ترتیب مطابق با قطعات دیستال 60، 40، 20، یا 80 سانتی متری از نقطه شروع بود و 5، عبور از طول کامل beam (100 سانتی متر) و ورود به جعبه هدف را نشان می داد. موش های صحرایی طبیعی، beam task را بدون خطا (یعنی حفظ تعادل شان برای 60 ثانیه (BB) و عبور از beam (BW) در زمان 5 ثانیه انجام دادند. ارزیابی عملکرد پایه، در روز TBI انجام شد، تست های BB و BW، در روزهای 1 تا 5 بعد از آسیب انجام شد و شامل 3 trial در روز (60 ثانیه در هر trial)، برای هر task بود، میانگین نمره های روزانه برای هر نمونه، در آنالیز آماری وارد شد (32).



تصویر شماره 1: دستگاه beam task جهت ثبت فعالیت حرکتی - تعادلی

همان طور که دیده می شود حیوان از نور و صدا می گریزد و به داخل اتاقک تاریک مقابل بعد از طی مسافت 100 سانتی متری می رود.

روش جمع آوری نمونه از سیستمنا مگنا

72 ساعت بعد از ترومای مغزی ابتدا حیوان را بیهوش کرده، سر حیوان را در داخل استرنو توکس فیکس کرده تا پاسخ Yes or No دیده شد. سپس موهای پشت گردن حیوان با یک قیچی تراشیده شد و در تمام مدت آزمایش حیوان بیهوش می باشد. سر حیوان به میزان 45 درجه خم شده سپس با استفاده از polyethylene tube نمره 10 و سرنگ همپلتون میزان 200 میکرو لیتر از مایع CSF از ناحیه سیستمنا مگنا بین استخوان پس سری و اطلس گردنی جمع آوری شد و برای انجام آزمایشات الیزا مورد استفاده قرار گرفت (33،34).

نیومن کولز و در آزمون دوطرفه در صورت نیاز از post test یعنی Tukey استفاده شد و سطح معنی داری 0/05 در نظر گرفته شد و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8 انجام شد. همه داده ها با $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند.

یافته ها

داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است. همان طور که در نمودار شماره 1 مشاهده می شود ترومای شدید مغزی سبب کاهش در نمرات نورولوژیکی (VCS) در موش صحرایی نر گردیده است که این کاهش در نمرات نورولوژیکی در روز القاء ضربه مغزی D_0 نسبت به گروه sham و Intact به شدت معنی دار بوده است ($P < 0/001$). اما در روز اول تا سوم بعد از ضربه مغزی (D_1) تزریق داروی بربرین با دوزهای 10 و 20 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن سبب تغییر در این نمرات نورولوژیکی شده که سبب افزایش نمرات نورولوژیکی در جهت نزدیک شدن به گروه های Intact و sham شده است به طوری که با گذشت زمان این اختلاف معنی دار بین گروه های درمانی و گروه کنترل Intact و sham کاهش می یابد ($P < 0/05$). ولی در دوز 40 میلی گرم اثری مشاهده نشد و بین این گروه و گروه های کنترل حلال (سالین) و TBI اختلافی وجود مشاهده نگردید ($P > 0/05$). همچنین بین گروه های درمانی (دوز 10 و 20) بربرین با گروه های کنترل Saline و TBI در روزهای اول تا سوم بعد از ضربه مغزی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < 0/001$). در دوز 40 میلی گرم بربرین این اختلاف با گروه های کنترل saline و TBI مشاهده نشد ($P > 0/05$).

همان طور که در نمودار شماره 2 دیده می شود درمان با دوزهای مختلف بربرین (دوز 10 و 20) سبب کاهش معنی داری در میزان ادم ایجاد شده ناشی از ضربه مغزی شده است ($P < 0/001$). به طوری که محتوای آب مغز در

روش اندازه گیری اینترلوکین ها به روش ELISA در مایع CSF با استفاده از کیت الیزا خریداری شده از شرکت Mybiosource میزان IL-1 β (MBS2702038) و IL-10 (MBS2707969) در مایع CSF اندازه گیری شد. 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. ابتدا در چاهک های جداگانه استاندارد، کنترل و نمونه مورد نظر ریخته می شود، سیتو کین به آنتی بادی اولیه متصل می شود. سپس به کلیه این چاهک ها، آنتی بادی دوم که یک آنتی بادی پلی کلونال حاوی بیوتین است ریخته می شود، این آنتی بادی به آنتی ژن متصل به آنتی بادی اولیه متصل می شود. در طی اولین مرحله انکوباسیون، 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 آنتی بادی ثانویه اضافی، استرپتاویدین-HRP که آنزیم است به چاهک اضافه می شود. این ماده به آنتی بادی ثانویه حاوی بیوتین متصل می شود، از این زمان به بعد مرحله دوم انکوباسیون شروع می گردد. پس از شستشو و خارج کردن آنزیم های باند نشده از محیط، محلول سوبسترا به چاهک ها اضافه می گردد. این ماده پس از واکنش با آنزیم تولید رنگ می کند، که مرحله سوم انکوباسیون است. شدت رنگ به طور مستقیم با غلظت اینترلوکین ها در نمونه مورد نظر بستگی دارد. واکنش به وسیله اضافه کردن اسید، خاتمه می یابد و جذب در 450 nm اندازه گیری می شود (36,35).

روش های تجزیه و تحلیل داده ها (Data Analyses)

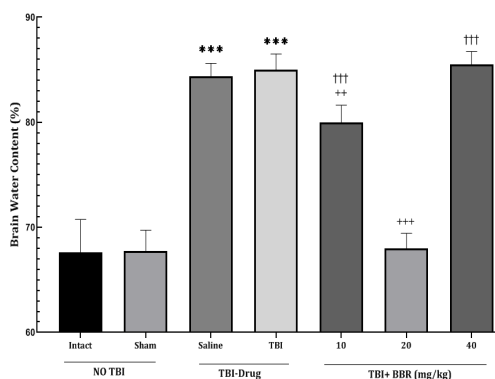
در مورد آزمون آماری چون توزیع داده ها نرمال بود برای بررسی اختلاف بین گروه ها از آزمون repeated-measure ANOVA استفاده شد سپس از آزمون ANOVA یک طرفه در صورت نیاز از post test

0/05 < P، 0/01 < P و 0/001 < P +++ اختلاف معنی دار گروه های TBI، Saline، BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D3)

0/05 < P و 0/01 < P \$\$\$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 20، BBR 10 با گروه های TBI و Saline در روز اول بعد از ضربه مغزی (D1)

0/05 < P و 0/01 < P && اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 با گروه های TBI و Saline در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D2)

0/05 < P و 0/01 < P €€ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 با گروه های TBI و Saline در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D3)



نمودار شماره 2: اثر تجویز داخل صفاقی برترین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم/کیلوگرم بر میزان محتوای آب مغز بعد از ترومای شدید مغزی در موش صحرایی نر

0/001 < P*** اختلاف معنی دار با گروه های Intact و Sham

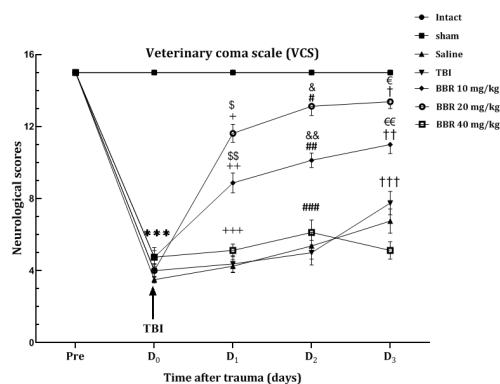
0/001 < P+++ تفاوت معنی دار با گروه های Intact و sham

0/01 < P++ و 0/001 < P+++ تفاوت معنی دار با گروه های TBI و Saline

داده ها بصورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است.

داده ها به صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است. همان طور که در نمودار شماره 3 دیده می شود برترین به صورت دوز پاسخ میزان رنگ ایوانز بلو در بافت مغز کاهش پیدا کرده و سد خونی مغزی تا حدودی بهبود یافته است بطوری که میزان رنگ آبی ایوانز در دوز 10 و 20 میلی گرم به ترتیب به مقدار 29/62±2/73 و 17/14±3/43 میکروگرم بر گرم بافت رسیده است و این اختلاف با گروه TBI و Saline

گروه درمان شده با دوز 10 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن برابر با 80±4/62 درصد گردیده و در گروه درمان شده با دوز 20 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اختلاف بیش تر بوده و میزان محتوای آب مغز به 68±4/03 درصد رسیده است که اهمیت این دارو را در تنظیم محتوای آب مغز نشان می دهد. در دوز 40 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اختلاف معنی داری با گروه های کنترل حلال (سالین) و TBI دیده نشده است (P>0/05) در حالی که همچنان محتوای آب مغز در این گروه بالا بوده (85/5±3/5 درصد) و با گروه کنترل Intact و sham اختلاف معنی داری را دارد (P<0/001). در گروه های درمانی، دوز 20 میلی گرم برترین با گروه های کنترل sham و Intact اختلاف معنی داری ندارد (P>0/05) ولیکن دوز 10 و 40 میلی گرم دارای اختلاف معنی داری با گروه های کنترل Intact و sham می باشند (P>0/001).



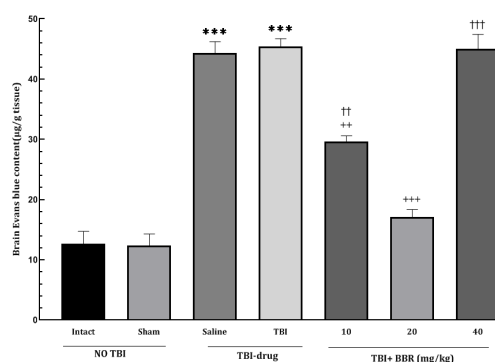
نمودار شماره 1: اثر تجویز داخل صفاقی برترین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان نمرات نورولوژیکی (VCS) در روزهای مختلف بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر.

0/001 < P*** اختلاف معنی دار گروه های TBI، Saline، BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز القاء ضربه مغزی (D0)

0/001 < P، 0/01 < P++ و 0/05 < P اختلاف معنی دار گروه های TBI، Saline، BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز اول بعد از ضربه مغزی (D1)

0/05 < P، 0/01 < P و 0/001 < P\$\$\$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، Saline، BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D2)

به شدت معنی دار می باشد ($P < 0/001$) ولی در دوز 40 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن بربرین اختلاف معنی دار نشده و دارو اثری بر میزان رنگ آبی ایوانز در این دوز نداشته است ($P > 0/05$). یافته ها نشان داد که در گروه های درمانی، دوز 20 میلی گرم بربرین با گروه های کنترل sham و Intact اختلاف معنی داری ندارد ($P > 0/05$) ولیکن دوز 10 و دوز 40 میلی گرم دارای اختلاف معنی داری با گروه های کنترل sham و Intact می باشند ($P > 0/001$). به نظر می آید که دوز موثر دوز 20 میلی گرم می باشد و در سلامت سد خونی - مغزی موثر تر بوده است.



نمودار شماره 3: اثر تجویز داخل صفاقی بربرین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم بر کیلو گرم بر میزان محتوای رنگ آبی ایوانز بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر.

$P < 0/001$ *** اختلاف معنی دار با گروه های Sham و Intact

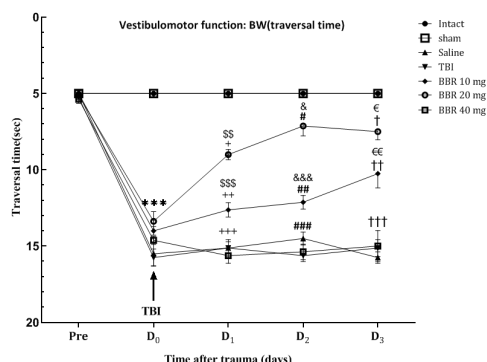
$P < 0/001$ ††† تفاوت معنی دار با گروه های sham و Intact

$P < 0/01$ ++ و $P < 0/001$ +++ تفاوت معنی دار با گروه های TBI و Saline

داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است. همان طور که در نمودار شماره 4 دیده می شود در روز اول بعد از ضربه مغزی (D_1) و دوم (D_2) و سوم (D_3) تزریق داروی بربرین با دوزهای 10 و 20 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن سبب کاهش زمان عبور از Beam در جهت نزدیک شدن به گروه های sham و Intact گردیده است ($P < 0/05$). ولی در دوز 40 میلی گرم اثری مشاهده نگردیده و بین این گروه و

گروه های کنترل حلال (سالین) و TBI اختلافی وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بین گروه های درمانی (دوز 10 و 20) بربرین با گروه های کنترل Saline و TBI در روزهای اول تا سوم بعد از ضربه مغزی اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/001$). در دوز 40 میلی گرم بربرین این اختلاف با گروه های کنترل Saline و TBI مشاهده نشده است ($P > 0/05$).

همان طور که در نمودار شماره 5 دیده می شود در روز اول (D_1) و دوم (D_2) و سوم (D_3) پس از ضربه مغزی به دنبال تجویز بربرین اختلاف بین گروه های درمانی با دوز 10 و 20 میلی گرم با گروه های کنترل حلال (سالین) و TBI رویه روند افزایشی گذاشته ($P < 0/001$) که نشان دهنده وضعیت بهبودی در نمرات حرکتی - تعادلی می باشد ولی در دوز 40 میلی گرم اثری مشاهده نگردیده و بین این گروه و گروه های کنترل حلال (سالین) و TBI اختلافی وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین بین گروه های درمانی (دوز 10 و 20) بربرین با گروه های کنترل Saline و TBI در روزهای اول تا سوم بعد از ضربه مغزی اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/001$). در دوز 40 میلی گرم بربرین این اختلاف با گروه های کنترل Saline و TBI مشاهده نشده است ($P > 0/05$).

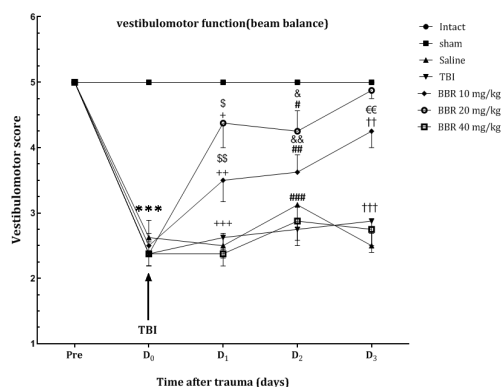


نمودار شماره 4: اثر تجویز داخل صفاقی بربرین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم بر کیلو گرم بر مدت زمان عبور از روی میله Beam (beam walk) در روزهای مختلف بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر

*** $P<0/001$ ، ** $P<0/01$ و * $P<0/05$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز اول بعد از ضربه مغزی (D_1)
 $P<0/05$ ، * $P<0/01$ و *** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D_2)
 $P<0/05$ ، * $P<0/01$ و *** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D_3)
 $P<0/05$ و * $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز اول بعد از ضربه مغزی (D_1)
 $P<0/05$ و * $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D_2)
 $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D_3)
 داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است.

همان طور که در نمودار شماره 6 (A,B) نشان داده شده است آنالیز آماری One-way ANOVA به همراه تست تعقیبی نیومن کولز نشان داده است که تجویز دوزهای مختلف بربرین سبب کاهش معنی داری در میزان اینترلوکین 1 بتا مایع CSF و افزایش اینترلوکین 10 گردیده است ($P<0/001$) در گروه درمان شده با بربرین 40 میلی گرم اختلاف معنی دار نبوده و کاهش در میزان $\text{IL-1}\beta$ و افزایشی در IL-10 مشاهده نشد ($P>0/05$). همچنین بین گروه های درمانی (دوز 10 و 40) بربرین با گروه های کنترل intact و sham در روزهای اول تا سوم بعد از ضربه مغزی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P<0/001$). در دوز 20 میلی گرم بربرین این اختلاف با گروه های کنترل intact و sham مشاهده نشد ($P>0/05$).

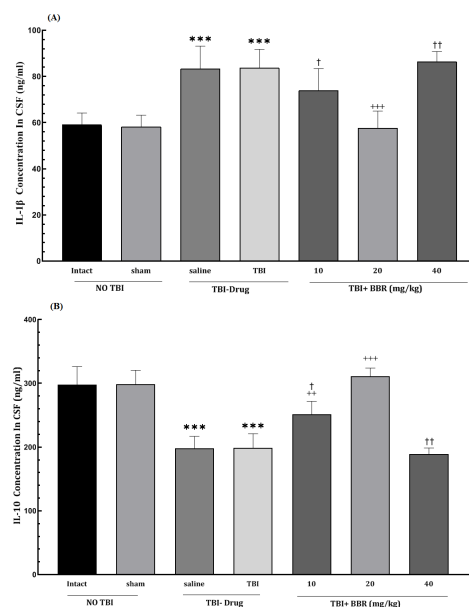
*** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز اول بعد از ضربه مغزی (D_1)
 $P<0/05$ ، * $P<0/01$ و *** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D_2)
 $P<0/05$ ، * $P<0/01$ و *** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D_3)
 $P<0/05$ و * $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز اول بعد از ضربه مغزی (D_1)
 $P<0/05$ و * $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز دوم بعد از ضربه مغزی (D_2)
 $P<0/05$ و * $P<0/01$ اختلاف معنی دار گروه های BBR 10، BBR 20 و BBR 40 با گروه های TBI و Saline در روز سوم بعد از ضربه مغزی (D_3)



نمودار شماره 5: اثر تجویز داخل صفاقی بربرین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم بر کیلوگرم بر مدت زمان باقیماندن حیوان روی میله beam (beam balance) در روزهای مختلف بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر.
 *** $P<0/001$ اختلاف معنی دار گروه های TBI، BBR 10، Saline، BBR 20 و BBR 40 با گروه های intact و sham در روز القاء ضربه مغزی (D_0)

این بازخورد مثبت آسیب می‌بیند (38,37). سایتوکاین‌های التهابی به واسطه مسیر آپوپتوز وابسته به گیرنده باعث فراخوانی و فعال شدن مولکول‌های آپوپتوتیک نظیر caspase-8 یا 10 می‌شود (40,39). بنابراین مهار سلول‌های گلیال و همچنین کاهش تولید واسطه‌های التهابی می‌تواند یک راهبرد درمانی برای جلوگیری از آسیب ناشی از تروما باشد. اگرچه داروهایی که التهاب را هدف می‌گیرند آزمایش شده‌اند اما هیچکدام تا کنون در مرحله کارآزمایی بالینی به‌طور چشمگیر موفق عمل نکردند (41). بربرین (Berberine) یک آلکالوئید ایزوکینولین (isoquinoline) است که در بسیاری از گیاهان دارویی که در شرق و ایران استفاده می‌گردد، یافت می‌شود. این مولکول اثرات درمانی مختلفی نظیر بیماری‌های متابولیک، سرطان، التهاب و عفونت‌های میکروبی دارد (15). تا به حال نشان داده شده است که بربرین توانایی سرکوب پاسخ التهابی میکروگلیاها را داراست (23,19) و باعث کاهش تولید واسطه‌های التهابی از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی toll-like receptor 4 (TLR4)-nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling می‌گردد (43,42). همچنین مطالعات بسیاری دلالت بر نقش محافظتی بربرین در آلزایمر و سکتة مغزی دارند (44-48). با این وجود مطالعات در زمینه نقش محافظتی بربرین، دوز و زمان تجویز آن مشخص نشده است. اگرچه این مطالعه به لحاظ طراحی با تمامی مطالعات قبلی متفاوت بود، اما با مطالعات قبلی هماهنگی داشت، همان‌طور که در مطالعه Chen و همکاران نشان داده شد بربرین با دوز 10 mg/kg به صورت تک دوز توانست ادم مغزی، اختلالات حرکتی و میزان IL-1 β را کاهش دهد (21).

در مطالعه Wang و همکاران بربرین IL-6 و TNF- α را کاهش داد (49). همچنین در مطالعه Huang و همکاران واسطه‌های التهابی با تجویز بربرین کاهش پیدا کرد (50). با توجه به این که نقش میکروگلیاها در التهاب ناشی از فاز ثانویه آسیب ناشی از ضربه مغزی بسیار مهم و کلیدی است در مطالعات قبلی نشان داده



نمودار شماره 6: اثر تجویز داخل صفاقی بربرین در دوزهای 10، 20 و 40 میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان IL-1 β (A) و IL-10 (B) موجود در مایع CSF بعد از ترومای مغزی در موش صحرایی نر *** $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه های Sham و Intact و + $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ اختلاف معنی‌دار با گروه های TBI و Saline و *** $P < 0.001$ و ** $P < 0.01$ اختلاف معنی‌دار با گروه های TBI و Saline داده ها به صورت Mean $\pm$ SEM نمایش داده شده است. در هر گروه 6 الی 8 سر موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است.

بحث

آسیب ناشی از ترومای مغزی (TBI) سبب آغاز سلسله ای از پروسه های التهابی در مغز می گردد که در نهایت به روند آسیب‌زایی، مرگ و اختلال در عملکرد و بهبود می‌افزاید. التهاب پس از TBI با فعال شدن آستروسیت‌ها، میکروگلیاها و انفیلتراسیون لوکوسیت‌های در گردش در محل آسیب ایجاد می گردد. سلول‌های گلیال فعال شده واسطه های التهابی نظیر سایتوکاین ها، کموکاین ها، آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) و آنزیم سیکلواکسیژناز-2 (COX-2) را ترشح می کنند. تولید بیش از حد این واسطه ها برای نورون های نزدیک به محل سمی است و به آنها آسیب می‌رساند، آسیب نورونی بار دیگر سبب افزایش فعالیت سلول‌های گلیال می گردد، سپس سایر نورون‌ها نیز در اثر

شد که برترین به واسطه مسیر سیگنالینگ TLR4/MyD88/NF-kB از فعالسازی میکروگلیاها جلوگیری می‌نماید، و در صورت عدم حضور میکروگلیاها تأثیری بر آسیب ناشی از تروما و التهاب ندارد (21). در مطالعه‌ای که توسط وزیری و همکاران بر روی ترمور ناشی از هارمالین انجام شد که با این مطالعه همراستا بوده به این نتیجه کلی رسیدند که برترین سبب بلوکه کردن گیرنده‌های گلو تاماتی NMDA و مهار آزادسازی گلو تاماتی گردیده است. همانطور که می‌دانیم ضربه مغزی سبب رهایش گلو تامات از نورونهای آسیب دیده و آستروسیت ها می‌گردد که افزایش گلو تامات در فضای سیناپسی سبب نورو توتوکسیسیتی و مرگ نورونی متعاقب آن می‌گردد که احتمال می‌رود بخشی از اثرات نوروپروتکتیو برترین علاوه بر التهاب همین مسئله باشد (51). اکثر مطالعات پیشین نشان دادند که دوز 10 mg/kg برترین موثر است در این مطالعه نیز بر همین امر صحه گذاشته شد اما دوز 20 mg/kg دارای اثرات قوی تری بود. این اختلاف میتواند ناشی از نوع حیوان مورد بررسی و مدل القای ضربه مغزی باشد. زیرا در روش مارمارو سطح بیش تری از مغز به نسبت روش CCL آسیب می‌بیند و لذا التهاب می‌تواند فراگیرتر باشد و به دوز بالاتری از دارو نیاز است. نکته جالب آنکه دوز 40 mg/kg تأثیری بر معیارهای آسیب ناشی از ضربه مغزی نداشت که می‌تواند ناشی از فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ خارج از التهاب و استرس اکسیداتیو باشد. همچنین که در مطالعات سم شناسی نشان داده شده است میزان LD50 برترین در موش های سوری 23 mg/kg و برترین سولفات در موش صحرایی

203 mg/kg است. البته با دوز 50 mg/kg دیسترس گوارشی شدیدی را در 40 درصد از موشهای صحرایی ایجاد نمود. دوزهای بالای برترین می‌تواند آنزیم های مهم نورونی مانند acetylcholinesterase (AChE), butyryl cholinesterase (BChE) و monoamine oxidase (MAO) را مهار نماید، لذا دلیل عدم اثربخشی برترین با دوز بالا میتواند مهار این آنزیم‌ها باشد (52). برترین دارای خواص هایپوگلاسمیک نیز می‌باشد (53)، اگرچه کنترل گلوکوز خون در آسیب های مغزی بر پیش آگهی بیماران بسیار موثر است، اما هایپوگلاسمی باعث بدتر شدن پیش آگهی می‌گردد (54). نورون‌ها در شرایط آسیب دچار اختلال در هموستاز متابولیکی خود می‌شوند و کاهش قند خون میتواند این شرایط را وخیم تر نماید (55). یکی از دلایل دیگر عدم کارکرد برترین با دوز بالا می‌تواند اثرات هایپوگلاسمیک آن باشد. در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد که برترین تک دوز بعد از القای ترومای مغزی شدید با دوزهای 10 و 20 میلی گرم بر کیلوگرم دارای اثرات مفید بر آسیب ناشی از ترومای مغزی شدید از طریق کاهش التهاب دارد. این اثر در دوز 20 میلی گرم بر کیلوگرم بارزتر بود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه آقای سیاوش انبی بوده و دارای کد طرح 5771 می‌باشد، لذا نویسندگان بر خود وظیفه می‌دانند که از دانشکده پردیس خودگردان رامسر جهت تامین بخش مالی این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992; 101(6): 1644-1555.
2. Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in

- surgical sepsis. *J Trauma* 1998; 44(5): 743-749.
3. Giannoni V, Chelazzi C, Villa G, De Gaudio AR. Organ dysfunction scores in ICU. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2013; 3(3): 89-96.
 4. Parrillo JE, Phillip Dellinger R. *Critical Care Medicine: Principles of Diagnosis and Management in the Adult* fifth edition. Elsevier 5th edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2018. p. 3000.
 5. Grissom CK, Brown SM, Kuttler KG, Boltax JP, Jones J, Jephson AR, et al. A modified sequential organ failure assessment score for critical care triage. *Disaster Med public Health Prep* 2010; 4(4): 277-284.
 6. Nelson JE, Cortez TB, Curtis JR, Lustbader DR, Mosenthal AC, Mulkerin C, et al. Integrating palliative care in the ICU: the nurse in a leading role. *J Hosp Palliat Nurs* 2011; 13(2): 89-94.
 7. Mohammadi H, Haghighi M. Survey relationship of mortality rate of hospitalized patients in ICU with different degrees of APACHE II. *Journal of Guilan Univ Med Sci* 2006; 15(59): 85-90 (Persian).
 8. Kelley MA, Manaker S, Finlay G. Predictive scoring systems in the intensive care unit. UpToDate Available at: URL: <http://www.uptodate.com/online/content/author.do>. 2015.
 9. Soleimani MA, Masoudi R, Bahrami N, Qorbani M, Sadeghi T. Predicting mortality rate of patients in critical care unit using APACHE-II index. *Journal of Gorgan Univ Med Sci* 2010; 11(4): 64-69 (Persian).
 10. Marino PL. *The ICU book*: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 11. Anami EH, Grion CM, Cardoso LT, Kauss IA, Thomazini MC, Zampa HB, et al. Serial evaluation of SOFA score in a Brazilian teaching hospital. *Intensive Crit Care Nurs* 2010; 26(2): 75-82.
 12. Antonelli M, Moreno R, Vincent JL, Sprung C, Mendoca A, Passariello M, et al. Application of SOFA score to trauma patients. *Intensive Care Med* 1999; 25(4): 389-394.
 13. Fink MP, Abraham E, Vincent J-L, Kochanek PM. Hyperbilirubinemia. *Textbook of critical care* 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 2,358.
 14. Williams JM, Greenslade JH, McKenzie JV, Chu KH, Brown AF, Paterson D, et al. A prospective registry of emergency department patients admitted with infection. *BMC Infect Dis* 2011; 11(1): 27.
 15. Gholipour Baradari A, Sharifi H, Firouzian A, Daneshiyan M, Aarabi M, Talebiyan Kiakolaye Y, et al. Comparison of proposed modified and original sequential organ failure assessment scores in predicting ICU mortality: A prospective, observational, follow-up study. *Scientifica (Cairo)* 2016; 2016: 7379325.
 16. Namendys-Silva SA, Silva-Medina MA, Vásquez-Barahona GM, Baltazar-Torres JA, Rivero-Sigarroa E, Fonseca-Lazcano JA, et al. Application of a modified sequential organ failure assessment score to critically ill patients. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(2): 186-193.
 17. Grissom CK, Brown SM, Kuttler KG, Boltax JP, Jones J, Jephson AR, et al. A modified sequential organ failure assessment score for critical care triage. *Disaster Med M public Health prep* 2010; 4(4): 277-284.
 18. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84(7): 920-935.
 19. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J,

- Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000; 32(4): 734-739.
20. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G-p, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80(1-2): 148-158.
21. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent J-L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *Jama* 2001; 286(14): 1754-1758.
22. Sinuff T, Adhikari NK, Cook DJ, Schünemann HJ, Griffith LE, Rocker G, et al. Mortality predictions in the intensive care unit: comparing physicians with scoring systems. *Crit Care Med* 2006; 34(3): 878-885.
23. Bota DP, Melot C, Ferreira FL, Ba VN, Vincent J-L. The multiple organ dysfunction score (MODS) versus the sequential organ failure assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive Care Med* 2002; 28(11): 1619-1624.
24. Vincent J-L, Sakr Y. SOFA so good for predicting long-term outcomes. *Resuscitation* 2012; 83(5): 537-538.
25. Ho KM, Lan NS. Combining quick Sequential Organ Failure Assessment with plasma lactate concentration is comparable to standard Sequential Organ Failure Assessment score in predicting mortality of patients with and without suspected infection. *J Crit Care* 2017; 38: 1-5.
26. Cabré L, Mancebo J, Solsona J, Saura P, Gich I, Blanch L, et al. Multicenter study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of Sequential Organ Failure Assessment scores in decision making. *Intensive Care Med* 2005; 31(7): 927-933.
27. Khwannimit B, Bhurayanontachai R, Vattanavanit V. Comparison of the performance of SOFA, qSOFA and SIRS for predicting mortality and organ failure among sepsis patients admitted to the intensive care unit in a middle-income country. *J Crit Care* 2018; 44: 156-160.
28. Askim Å, Moser F, Gustad LT, Stene H, Gundersen M, Åsvold BO, et al. Poor performance of quick-SOFA (qSOFA) score in predicting severe sepsis and mortality—a prospective study of patients admitted with infection to the emergency department. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2017; 25(1): 56.
29. Finkelsztejn EJ, Jones DS, Ma KC, Pabón MA, Delgado T, Nakahira K, et al. Comparison of qSOFA and SIRS for predicting adverse outcomes of patients with suspicion of sepsis outside the intensive care unit. *Crit care*. 2017; 21(1): 73.