**Physiology and Pharmacology**, 14(1),1-11
Spring 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

# Acute Administration of Estradiol Protects against Spinal Ischemic-Reperfusion Injury in Male Rabbits

**Leila Khalaj[1], Habibollah Peirovi[2], Fariba Khodagholi[1], Azadeh Abdi[1], Leila Dargahi[1], Fatemeh Mohagheghi[1] Abolhassan Ahmadiani[1*]**

*1. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*2. Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

**Received: 20 Jan 2010** **Accepted: 17 March 2010**

## Abstract

**Introduction:** Postoperative neurological deficit is the most devastating complication after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. Despite demonstrated neuroprotective effects of estradiol, its protective efficacy against spinal cord ischemia-reperfusion and underlying mechanisms are not yet elucidated.

**Methods:** Two groups, each of 10 New Zealand white male rabbits, were studied. Control group received sesame oil (vehicle) while the treatment group received 17-β-Estradiol Cypionate (1 mg/kg) dissolved in sesame oil, 30 minutes before abdominal aortic clamping for 18 minutes. A group of sham operated animals was also included, which consisted of 5 rabbits subjected to operative dissections without aortic occlusion. After 48 h reperfusion we investigated the efficacy of estradiol in attenuating the spinal cord ischemia-induced pathology through neurological, histopathological, and western blot assessments.

**Results:** The results showed that administration of estradiol 30 minutes before induction of spinal cord ischemia in rabbits improved functional outcome and prevented the worsening pattern of neurological function over 48 hours. Near to normal histopathological outcome of lumbar part of spinal cords in these animals confirmed neuroprotective effects of estradiol. Estradiol also reduced spinal cord Heat shock protein 70 and cleaved caspase-3 in this ischemic context.

**Conclusion:** Estradiol can be considered as a potential candidate to protect against spinal cord ischemia-reperfusion-induced paraplegia resulting from thoracoabdominal aortic aneurysm repairs.

**Key words:** Estradiol, Spinal cord ischemia-reperfusion, Heat shock protein 70, Cleaved caspase 3

[*] Corresponding author e-mail: aahmadiani@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۴ (۱)، ۱- ۱۰
بهار ۱۳۸۹

# محافظت نخاع در مقابل آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن توسط تجویز حاد استرادیول در خرگوشهای نر

لیلا خلج[۱]، حبیب اله پیروی[۲]، فریبا خداقلی[۱]، آزاده عبدی[۱]، لیلا درگاهی[۱]، فاطمه محققی[۱]، ابوالحسن احمدیانی[۱*]
۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات نانومدیسین و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۳۰ دی ۸۸ پذیرش: ۲۶ اسفند ۸۸

## چکیده

**مقدمه:** اختلال عملکرد نورولوژیک نظیر پاراپلژی از عوارض ناتوان کننده متعاقب جراحیهای آنوریسم آئورت توراکوابدومینال خصوصا با علت ایسکمی- ری پرفیوژن می باشد. علیرغم مطالعات بسیاری در ارتباط با اثرات نوروپروتکتیو استرادیول، کارائی حفاظتی این عامل علیه ایسکمی - ری پرفیوژن نخاعی و نیز مکانیزم های دخیل در آن، هنوز مورد تحقیق و مطالعه قرار نگرفته است.

**روش ها:** دو گروه، هر کدام شامل ۱۰ خرگوش سفید نیوزلندی نر مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه کنترل روغن کنجد (حلال) و گروه دیگر (درمان) ۱۷-بتا استرادیول با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم که در روغن کنجد حل شده بود، ۳۰ دقیقه قبل از بستن آئورت شکمی دریافت کردند. همچنین یک گروه شم (n =۵) تحت شرایط کاملاً یکسان با دو گروه نامبرده به استثنای دریافت دارو و حلال و نیز بستن رگ، در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت خونرسانی مجدد با بررسی های نورولوژیک، هیستوپاتولوژیک و وسترن بلات به مطالعه کارائی استرادیول در تخفیف پاتولوژی القاء شده توسط ایسکمی– ری پرفیوژن نخاعی پرداختیم.

**یافته ها:** نتایج این مطالعه نشان دادند که تجویز استرادیول ۳۰ دقیقه قبل از القای ایسکمی نخاعی در خرگوشهای نر ، سبب بهبود عملکرد نورولوژیک در آنها شده و از روند پیشرونده اختلالات عملکرد نورولوژیک در عرض ۴۸ ساعت مطالعه جلوگیری می نماید. نتایج هیستوپاتولوژیک نزدیک به نرمال بخش کمری نخاع این حیوانات، سبب تایید بیشتر اثرات نوروپروتکتیو استرادیول گشت. استرادیول همچنین ، موجب کاهش سطح پروتئین HSP70 و Caspase-3 فعال ، در بافت نخاع و در شرایط ایسکمی شد.

**نتیجه گیری:** بنابر نتایج این تحقیق، استرادیول را می توان به عنوان یک کاندیدای بالقوه جهت محافظت علیه فلج القاء شده توسط آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن نخاعی ناشی از جراحیهای آنوریسم آئورت توراکوابدومینال، لحاظ نمود.

**واژه‌های کلیدی:** استرادیول، ایسکمی-ری پرفیوژن نخاعی، HSP70، Cas-3 فعال

## مقدمه

جراحیهای آنوریسم آئورت توراکوابدومینال (thoracoabdominal)، مستلزم کلامپ (بستن) طولانی مدت آئورت جهت جلوگیری از خونریزی حین جراحی بوده که به اختلال در خونرسانی و القای ایسکمی در نواحی انتهایی نخاع انجامیده و عوارض مخرب و ناتوان کننده ای نظیر پاراپلژی (paraplegia) ( فلج) یا پاراپرزیس (paraparesis) [۴] با درصد شیوعی معادل ۴۰-۴٪ را در پی دارد [۳۴] .

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: aahmadiani@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

راهکارهای بسیاری نظیر شانتهای موقت، دریناژ مایع مغزی نخاعی و هایپوترمی [ ۴۵, ۴۳] و برخی راهکارهای فارماکولوژیک نظیر scavenger های رادیکال های آزاد [۴۶]، آنتاگونیست های گیرنده NMDA [۱۳] و وازودیلاتورها [۳۰]، جهت پیشگیری از عوارض ایسکمیک ناشی از این جراحیها، اتخاذ شده اند که اگر چه در سال های اخیر سبب کاهش میزان بروز فلج متعاقب جراحی گشته اند، اما این معضل هنوزبه طور کامل از میان نرفته [۱۴] و نیاز به مطالعات بیشتر به منظور معرفی فاکتورهای اصلی که در فلج القاء شده توسط ایسکمی نخاعی ، نقش کلیدی ایفا می کنند و نیز معرفی عاملی که به طور قوی قادر به محافظت نخاع در برابر شرایط ایسکمی باشد، همچنان وجود دارد .

سمیت سلولی [۲۳]، التهاب [۲]، تولید رادیکالهای آزاد [۲۱] و آپوپتوز [۲۳] همگی از اجزای مجموعه وقایع پیچیده پاتوفیزیولوژیک تحریک شده توسط آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن وارده بر سیستم اعصاب مرکزی هستند که منجر به مرگ سلولی می شوند [۹].

هیت شوک پروتئین ۷۰، عضوی قابل القاء از خانواده هیت شوک پروتئین ها که پروتئین های استرس نیز نامیده می شوند بوده و در پاسخ به انواع مختلف استرس نظیر ایسکمی [۱] افزایش می یابد. بیشتر مطالعات خبر از نقش حفاظتی القای هیت شوک پروتئین ۷۰ در ایسکمی مغزی می دهند [۱۵]. تحقیقات اخیر نشان داده اند که HSP70 ممکن است مستقیماً در مسیرهای مرگ سلولی نظیر آپوپتوز و نکروز مداخله نموده و همچنین ممکن است سبب تعدیل التهاب نیز گردد. [ ۱۶، ۴۱ و۴۷ ]. عقیده بر این است که سنجش سطح HSP70 می تواند شاخصی از استرس التهابی بافت عصبی متعاقب ایسکمی و نیز نشانگر شدت استرس [ ۱۵] باشد.

مرگ سلولی متعاقب ایسکمی ، شامل یک فاز حاد اولیه (عمدتاً مرگ نکروتیک) ناشی از سمیت سلولی بویژه به دلیل آسیب ایسکمیک و یک فاز تاخیری پیشرونده (عمدتاً مرگ آپوپتیک) ناشی از فعال شدن روند های التهاب و آپوپتوز بخصوص در فاز ری پرفیوژن می باشد [۹].Caspase-3، به عنوان عامل نهایی روند مرگ آپپتوز وابسته به کاسپاز می باشد، به طوریکه توسط فعال کردن دئوکسی ریبو نوکلئازها، موجب تکه تکه شدن DNA می شود. بنابراین مهارCaspase-3 می تواند سبب کاهش مرگ سلولی از نوع آپپتوز شود [۱۰].

با توجه به دخالت مسیرهای تخریبی متعددی که متعاقب آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن فعال می شوند، یک درمان بالقوه، باید شامل استفاده از یک عامل چند کاره و یا ترکیبی از چندین عامل، بویژه آنهایی که مسیرهای دخیل در مرگ سلولی را متاثر می سازند، باشد. استرادیول یکی از این عوامل چند کاره با خواص آنتی اکسیدان [۲۶]، ضد التهابی [۴۲] و آنتی اپوپتوتیک[۴۸] است که در مدل های مختلف بیماریهای CNS اثرات درمانی اعمال نموده و نیز قادر به تخفیف مرگ نورونی در مطالعات مختلف in vivo و in vitro بوده است [۱۸]. استرادیول اثرات پروتکتیو خود را از طریق متاثر ساختن مسیرها و مولکولهای مختلف، از جمله HSP70 [۳۱] و Caspase-3 [۱۹، ۳۶] که چنانچه عنوان شد از اجزای پروسه های فعال شده متعاقب آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن نیز هستند، اعمال می نماید. در قیاس با مطالعات متعدد و بسیاری که دلالت بر اثرات نوروپروتکتیو استرادیول در اختلالات مغزی دارند، گزارشات بسیار اندکی مبنی بر اثرات استرادیول در اختلالات نخاعی وجود دارند که تمرکز آنها هم عمدتاً بر آسیب تروماتیک نخاعی [۶، ۳۷] بوده و گزارشی که به بررسی اثرات استرادیول در شرایط ایسکمی نخاعی پرداخته باشد، در دسترس نیست.

نکته قابل توجه این که بر اساس مطالعات ثابت شده است که مغز و نخاعی که در معرض آسیب تروماتیک یکسان قرار می گیرند، واکنش های التهاب عصبی متفاوت از یکدیگر را بروز می دهند و اخیراً مشخص شده است که نخاع را نباید به سادگی به عنوان دنباله ای از مغز لحاظ کرد. حتی تفاوتهای نژادی و گونه ای در پاسخهای التهاب عصبی به آسیب های یکسان نخاعی گزارش شده اند [۱۲]. این واقعیت که نقش هر آنزیم یا مدیاتور درون زاد، باید در مدل های مختلف و مجزای آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد تا از تعمیم دادن به اشتباه نتایج یک آزمایش به دیگری جلوگیری شود، گاهی مورد غفلت قرار می گیرد [۳۳]. در مجموع، با توجه به فقدان مطالعه ای در رابطه با اثرات استرادیول دراختلالات ایسکمی نخاعی، در این مطالعه با کمک ارزیابی های رفتاری، هیستوپاتولوژیک و وسترن بلات به بررسی توانایی ۱۷- بتا- استرادیول در محافظت از نخاع در مقابل آسیب ایسکمی- ری پرفیوژن و آشکارسازی بیشتر مکانیزمهای احتمالی دخیل، بویژه اثرات استرادیول بر

HSP70 را به عنوان شاخصی از استرس بافت عصبی و نیز Caspase-3 فعال را به عنوان عضوی از پروسه مرگ سلولی آپوپتوتیک فعال شده در بافت نخاع کمری خرگوشهای تحت مطالعه ، مورد مطالعه قرار دادیم .

## مواد و روشها

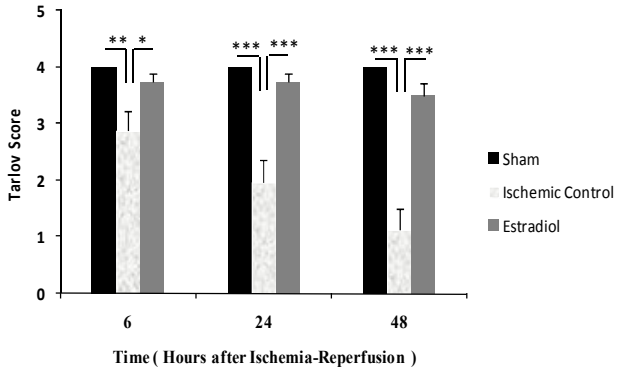
مطالعه حاضر پس از تایید هیات " اخلاق در تحقیق" مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید. تمام پروتکل های آزمایشی مطابق با دستور العمل های NIH در زمینه مراقبت و استفاده از حیوانات بودند. ۲۵ خرگوش سفید نر نژاد نیوزلند ۷-۶ ماهه با متوسط وزنی ۳-۲ کیلوگرم ( تهیه شده از انستیتو پاستور تهران، ایران ) جهت این مطالعه استفاده شدند. حیوانات در دمای متوسط $^{c}$ ۲۱ و با دسترسی آزاد به آب و غذا ( البته به استثنای ۱۲ ساعت قبل از جراحی که محروم از غذا بودند ) نگهداری می شدند . خرگوشها توسط یک دوز عضلانی از کتامین ( ۵۰ میلی گرم / کیلو گرم) و زایلازین ( ۱۰ میلی گرم / کیلو گرم ) بیهوش شده و در صورت لزوم کتامین را از طریق یک کاتتر وریدی در گوش به میزان ۱/۴ دوز اولیه، حین جراحی در یافت می کردند. حیوانات هوای اتاق را بدون کمک دستگاه تهویه (ونتیلاتور) استنشاق می کردند. دمای بدن آنها توسط یک پد جراحی گرماده در حدود $^{c}$ ۳۸ حفظ می شد. پس از آماده سازی مقدمات اولیه جراحی، حیوان را به پهلوی راست خوابانیده و برشی ۵ سانتی متر به موازات نخاع و از ناحیه زیر دنده ها در پهلوی چپ حیوان ایجاد می شد. دسترسی به آئورت ابدومینال از مسیر خلف صفاقی و در ناحیه تحت شریان کلیوی، تا فوق دو شاخگی ایلیاک، صورت می گرفت. هپارین (۲۵۰ واحد بین المللی / کیلوگرم) وریدی حدود ۵ دقیقه قبل از بستن آئورت شکمی تزریق شده و سپس آئورت شکمی در ناحیه ۱ سانتی متر پایین تر از شریان کلیوی چپ توسط یک کلامپ ( گیره) عروقی غیر آسیب رسان به مدت ۱۸ دقیقه مسدود می شد [۲۵]. در پایان این زمان گیره برداشته شده و برقراری جریان خون به صورت چشمی تایید می شد. سپس لایه های عضلات شکمی حیوان بخیه شده و پس از بهوش آمدن حیوانات به قفس های خود برگردانده می شدند [۷].

در گروه درمان (n=۱۰ )، ۱۷- بتا- استرادیول سیپیونات (۱ میلی گرم / کیلوگرم) ( تهیه شده از Sigma)، که در روغن کنجد به عنوان حلال حل شده بود، به صورت عضلانی و ۳۰ دقیقه قبل از بستن آئورت، تجویز می شد. دوز استرادیول بر اساس دوز مصرف شده این عامل در مطالعه ای بر روی ایسکمی قلبی خرگوشها [۱۷] انتخاب شد. به حیوانات گروه ایسکمیک کنترل (n=۱۰ )، روغن کنجد ( حلال) به صورت عضلانی و۳۰ دقیقه قبل از بستن آئورت تزریق می شد. حیوانات گروه شم (n=۵) تحت شرایط کاملاً یکسان با دو گروه نامبرده به استثنای دریافت دارو و حلال و نیز بستن رگ، قرار گرفتند.

عملکرد نورولوژیک حیوانات در زمانهای۴۸،۲۴،۶ ساعت پس از القای آسیب ایسکمی توسط فردی که هیچ گونه اطلاعی از گروههای آزمایش نداشت و بر اساس سیستم کمی کردن Tarlov (فاقد هیچگونه حرکتی در پاها: اسکور ۰، حرکات بسیار محدود در پاها: اسکور ۱، حرکت خوب در پاها اما عدم توانایی ایستادن روی پاها: اسکور ۲، قادر به ایستادن و راه رفتن روی پاها اما ناتوان در جهش نرمال: اسکور ۳، بهبود کامل: اسکور ۴) مورد ارزیابی قرار گرفت [۴۶].

پس از اتمام ارزیابی عملکرد نورولوژیک در زمان ۴۸ ساعت، حیوانات Euthanize (مرگ بی درد توسط کلروفرم) شدند و ناحیه L3-S1 از نخاع آنها سریعا استخراج شد. نواحی L3-L5 از نخاع در محلول پارافرمالدئید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مول/لیتر و در $^{c}$ ۴ به مدت ۲ هفته جهت فیکس شدن بافت نگهداری شد. مابقی بافت نخاع ابتدا در نیتروژن مایع فریز شده و سپس در $^{c}$ ۸۰- جهت بررسی های وسترن بلات نگهداری شد .

پس از پایان دوهفته زمان نگهداری بافت نخاع در پارافرمالدئید ۴٪ ، نمونه توسط برنامه مناسب در دستگاه Tissue processor پروسس شده و سپس در پارافین بلوک گیری شدند. برش هایی با ضخامت ۵μm از این بلوک ها تهیه و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. ارزیابی های هیستوپاتولوژیک توسط همکاری که اطلاعی از گروههای آزمایشی نداشت و با کمک میکروسکوپ نوری صورت گرفت. نورونهای حرکتی نرمال در شاخ قدامی نخاع ( در بخش قدامی خطی که از کانال مرکزی نخاع و به صورت عمود بر شکاف میانی قدامی می گذرد ) برای هر حیوان شمارش و میانگین آنها محاسبه شد. سلول هایی با سیتوپلاسم ائوزینوفیلی گسترده که




**شکل ۱**- تغییرات اسکور Tarlov در هر مقطع زمانی. تجویز استرادیول نه تنها موجب حفاظت عملکرد نورولوژیک حیوانات در قیاس با گروه ایسکمیک کنترل در هر مقطع زمانی گشت ، بلکه همچنین سبب پیشگیری از روند پیشرونده اختلال عملکرد نورولوژیک در عرض ۴۸ ساعت مطالعه حاضر شد. داده ها به صورت Mean±SEM ارائه شده اند. آنالیز آماری Mann-Witney U test (*P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001)

هسته و اجسام نیسل خود را از دست داده بودند به عنوان "سلولهای مرده" و سلولهایی که توزیع یکنواخت از اجزای بازوفیل سلولی نظیر اجسام نیسل را با حفظ هسته و ساختار سلول بروز می دادند به عنوان " سلول های زنده " لحاظ می شدند [۲۸].

جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین های HSP70 و Caspase-3، آنالیز وسترن بلات بر بخش کمری بافت نخاع حیوانات تحت مطالعه صورت گرفت. نمونه های بافتی در یک بافر لیز کننده (۰/۱مول/لیتر Nacl ، ۰/۰۱ مول/لیتر Tris-Hcl با PH=۷/۵ ، ۱ میلی مول/لیتر EDTA و کوکتیل مهار کننده های پروتئاز) هموژن شده و سپس بافت های هموژنه شده در ۴ °c و ۱۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوز شدند.

سوپرناتانت های حاصله به عنوان نمونه های حاوی کل پروتئین های سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظتهای پروتئینی هر نمونه مطابق روش برادفورد تعیین شدند [۳]. منحنی های استاندارد با آلبومین سرم گاوی رسم شدند. جهت الکتروفورز SDS-PAGE، نمونه های پروتئینی در °c ۱۰۰ و در محلول SDS ۲/۵ درصد و بتا-مرکاپتواتانول ۵٪ جوشانده شده و میزانی معادل ۶۰ میکروگرم از پروتئین کل هر نمونه بر روی ژل های پلی اکریلامید ۱۲/۵ درصد لود و الکتروفورزشدند. پروتئین های مجزا شده از روی ژل، توسط یک بافر انتقال شامل ۲۰ میلی مول/لیتر Tris-Hcl (PH=۷/۵)، ۱۵۰ میلی مول/لیتر گلایسین و متانول ۲۰٪ ، بر روی غشاهای نیتروسلولز (Porablot Macherey-Nagel Germany) منتقل شدند. پس از انتقال، غشا در محلول TBST (۲۰ میلی مول/لیتر Tris base با PH=7.6 ، ۱۳۷ میلی مول/لیتر Nacl ، 0.05٪ Tween20) حاوی ۲٪ شیر خشک بدون چربی جهت پیشگیری از اتصال آنتی بادی ها به نواحی غیر اختصاصی، غوطه ور شدند. سپس این غشاها در مجاورت با آنتی بادی اولیه در ۴ °c و به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. آنتی بادی های اولیه مصرفی عبارت بودند از:

1/1500 Mouse HSP70 monoclonal Ab (Strengen, C92F3A-5)

1/1000 Rabbit Caspase-3 polyclonal Ab (Calbiochem, 235412)

0/5 mg/ml Mouse β-actin monoclonal Ab (Biovision, 3598-100)

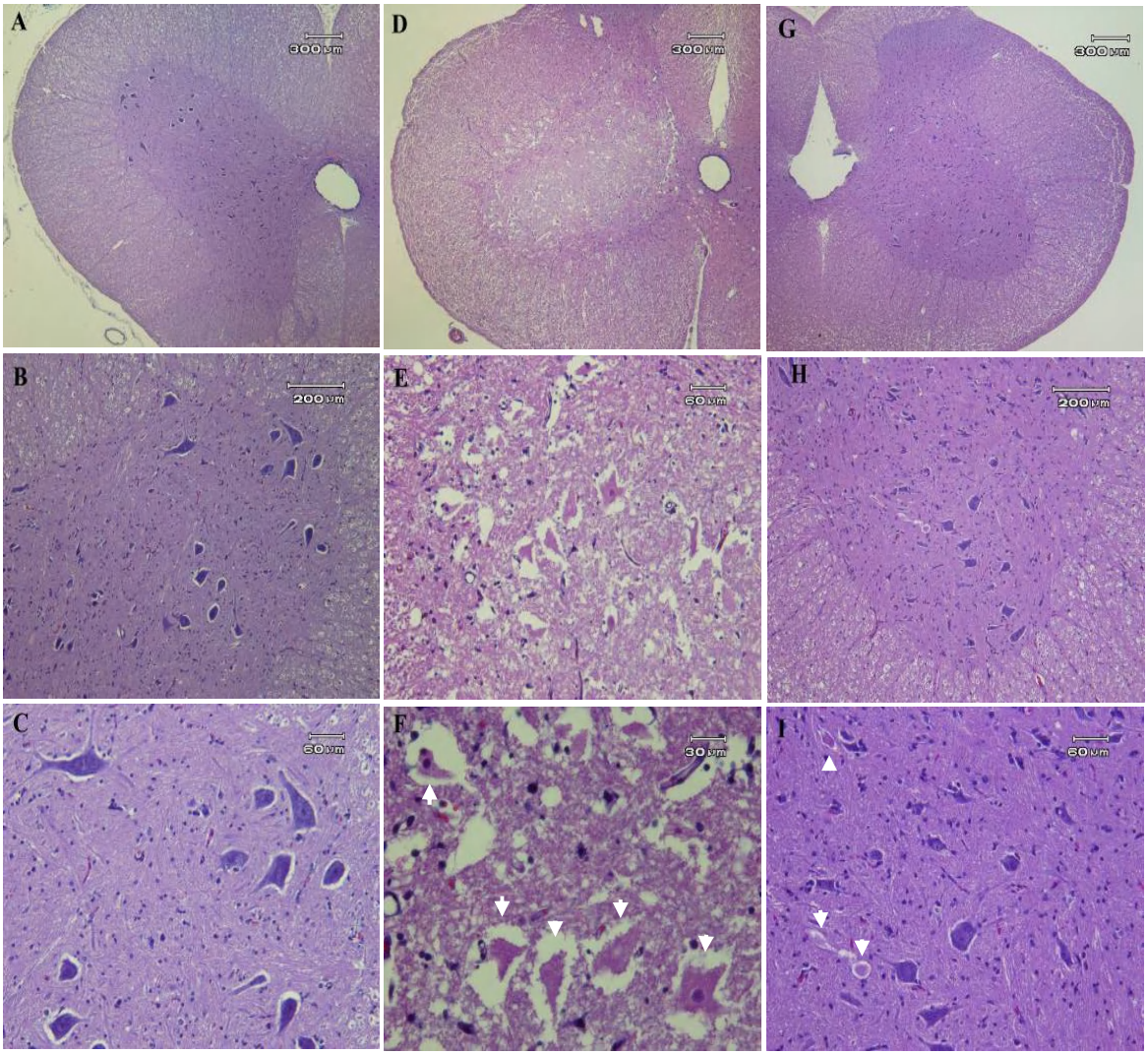
پس از شستشو با TBST ، غشاها با Ab های ثانویه دردمای اتاق و به مدت ۹۰ دقیقه مجاور شدند. آنتی بادی های ثانویه عبارت بودند از :

1/10000 Rabbit IgG-HRP-Linked Ab (Cell Signaling)

1/10000 Mouse IgG-HRP-Linked Ab (Cell signaling)

سپس غشاها مجدداً با TBST شسته شده و در نهایت باندهای پروتئینی بروی فیلم های عکاسی و با کمک کیت ECL (Amersham) ظاهر گشتند. پروتئین های HSP70، Caspase-3 و نیزبتا- اکتین (به عنوان کنترل) به ترتیب در نواحی ۷۰، ۱۷ و ۴۴ کیلو دالتون شناسایی شدند. فیلم ها اسکن شده و توسط نرم افزار Imag J کمی شدند.

تفاوت میان گروهها در آزمایشات وسترن بلات و هیستوپاتولوژیک توسط ANOVA یکطرفه و سپس Post hoc Tukey HSD و در آزمایشات نورولوژیک توسط Mann-Witney U test در SPSS 16.0، مورد بررسی قرار گرفتند. داده ها بصورت Mean ±SEM ارائه شده و P<0.05 از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

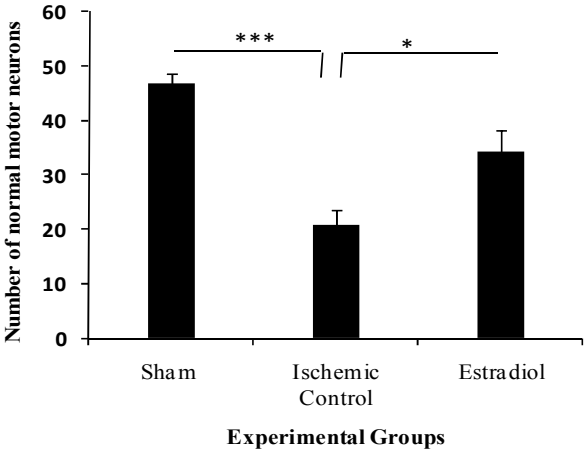



**شکل ۲-** یافته های هیستوپاتولوژیک شاخ قدامی بخش کمری نخاع که در زمان ۴۸ ساعت پس از القای ایسکمی استخراج و باهماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. (A-C بزرگنمائیهای مختلف از ظاهر نرمال نورونها در حیوانات گروه شم. D-F) مقطع کمری خرگوش فلجی در گروه ایسکمیک کنترل با پاراپلژی (Tarlov score= 0) که نشانگر بافت نکروتیک و تخریب شدید نورونها که به صورت تخریب نورونی ائورینوفیلیک گسترده و از دست رفتن اجسام نیسل (فلش ها) بارز است، می باشد. G-I) ظاهر تقریباً نرمال شاخ قدامی مقطع کمری نخاع خرگوشی در گروه استرادیول با عملکرد نورولوژیک نرمال(Tarlov score=4) یکپارچگی بافت نخاعی وهمچنین اکثر نورونهای حرکتی در مقابل آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن حفظ شده و تنها تعداد بسیار محدودی از نورونهای مرده در این مقطع قابل رویت هستند (فلش ها).

## یافته‌ها

شکل ۱ بیانگر نتایج ارزیابی نورولوژیک همه گروهها در زمانهای ۶ ،۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ایسکمی می باشند. خرگوشهای گروه شم هیچ گونه اختلال عملکرد نورولوژیک را در عرض ۴۸ ساعت مطالعه بروز ندادند. بهبود معنی داری در عملکرد حرکتی پاهای خرگوشهای دریافت کننده استرادیول در قیاس با حیوانات گروه ایسکمیک کنترل مشاهده شد. ( به ترتیب $P<0.05$ ،$P<0.001$ و $P<0.001$ برای هر مقطع زمانی). روند پیشرونده اختلال عملکرد نورولوژیک در عرض ۴۸ ساعت در گروه ایسکمیک کنترل بارز بوده در حالیکه استرادیول به صورت چشمگیری سبب پیشگیری از این الگوی تخریبی پیشرونده شد. هیچ علامتی از تخریب نخاعی در برش های رنگ آمیزی شده با هماتوکسین- ائوزین حیوانات گروه شم مشاهده نشد ( شکل ۲، A-C) .

در اکثر خرگوشهای گروه ایسکمیک کنترل، برش های هیستوپاتولوژیک حاکی از کاهش شدید تعداد نورونهای سالم و تخریب نورونی گسترده که واکوئلاسیون جسم خاکستری و تخریب نورونی ائوزینوفیک به همراه از دست رفتن اجسام نیسل و هسته در این نورونها رادر برداشت، بودند ( شکل ۲، D-F ).




**شکل ۳** – تعداد نورونهای حرکتی نرمال به طـور معنـی داری در گـروه ایسـکمیک کنترل در قیاس با گروه شم کاهش یافت و پیش درمانی با استرادیول سبب حفاظت قابل توجه نورونهای حرکتی نرمال در مقابل آسیب ایسکمیک گشت
(Mann-Witney U test , Tukey HSD; *p<0.05, ***p<0.001)

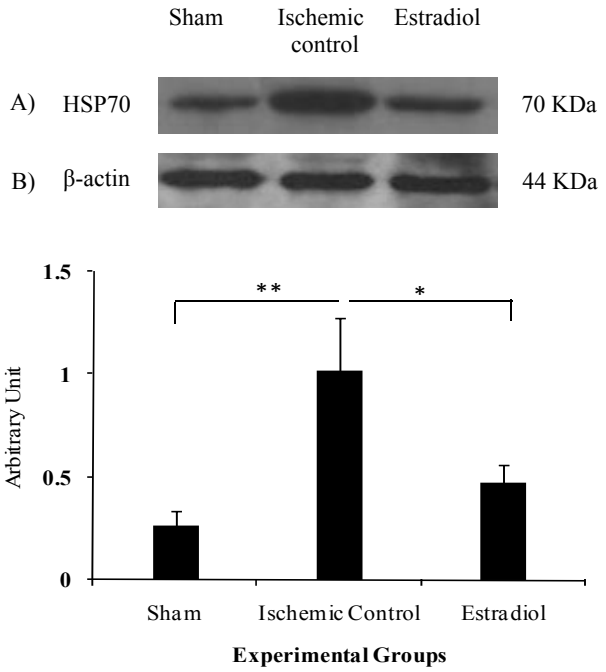
برش های نخاع خرگوشهای گیرنده اسـترادیول پـیش از آسـیب ایسکمیک، بهبود معنی داری را در ظاهر هیستوپاتولوژیک نشان می دادند ( شکل ۲، G-I ).

تعداد نورونهای حرکتی نرمال در شاخ قدامی نخاع حیوانـات گروه ایسمیک کنترل، کاهش قابل توجهی در قیاس با گروه شم داشت ( شکل ۳ ،P<0.001 ). استرادیول اگر نه به طور کامـل، اما تا حد معنی داری، سبب حفاظـت نورونهـای حرکتـی نرمـال حیوانات در قیاس با گروه ایسـکمیک کنتـرل گشـت (شـکل ۳، P<0.05 ). شکلهای ۴ و ۵ به ترتیب نتایج آنالیز وسـترن بـلات بیان پروتئین های Caspase-3, HSP70 فعال را ارائه میدهند.

آسیب ایسکمی- ریپرفیـوژن نخـاعی سـبب افـزایش بیـان پروتئین های HSP70, Caspase-3 فعال در گروه ایسـکمیک کنترل و در قیاس با گروه شـم گشـت (P<.0.01 ). در حالیکـه تجویز استرادیول، به کاهش معنی دار بیان ایـن پـروتئین هـا در قیاس با گروه ایسکمیک کنترل انجامید (P<0.05 ).

## بحث

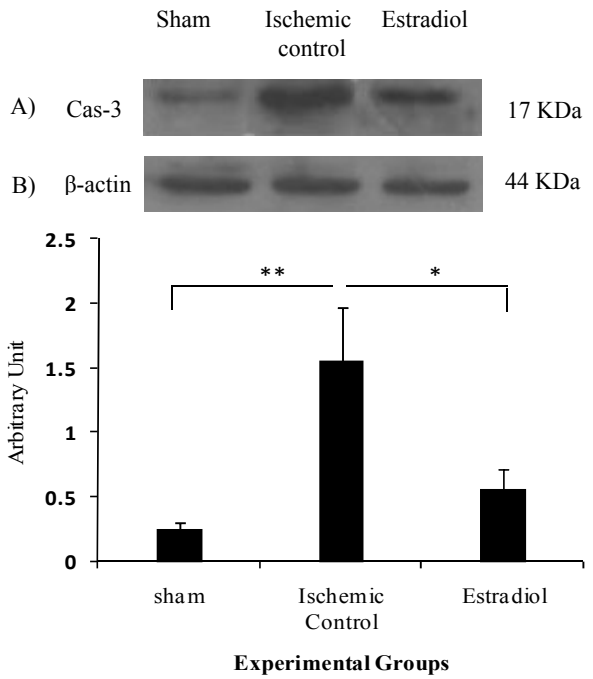
نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که تجویز ۱ میلی گرم / کیلو گرم ۱۷- بتا- استرادیول به خرگوشهای نر و قبل از القای آسیب ایسکمیک سبب حفاظت نخاع ایـن حیوانـات در مقابـل آسـیب ایسکمی-ریپرفیوژن می گردد که بهبود عملکـرد نورولوژیـک و




**شکل۴**- آنالیز وسترن بلات گروههای آزمـایش جهـت تعیـین اثـر اسـترادیول بـر HSP70 در بافت نخاع کمری استخراج شده در زمـان ۴۸ سـاعت پـس از آسـیب ایسکمی– ری پرفیوژن. A) باندهای ایمونوبلات HSP70 و بتا–اکتین مربوطـه در هر گروه آزمایش. B) دانسیته نسـبی (دانسـیته بانـد β-actin /دانسـیته بانـد HSP70) باندهای ایمونوبلات نیز ارائه شده اند. بارهـا نشـانگر SEM ± Mean می باشند، *p<0.05, **p<0.01; Oneway ANOVA.

نتایج هیستوپاتولوژیک نزدیک به نرمال حیوانات تحـت مطالعـه، موید این اثرحفاظتی بودند. تجویز اسـترادیول، همچنـین سـبب کاهش معنی دار سطح پروتئین های HSP70 ، Caspase-3 در نخاع های محافظت شده علیه آسیب ایسـکمی –ری پرفیـوژ ن گشت.

هیت شوک پروتئین ها مجموعه ای از پـروتئین هـا هسـتند که در سلولهایی که مجاور با انواع مختلفی از استرس نظیر تروما [۴] و ایسکمی[۳۹] می باشند، افزایش می یابند. HSP70 نیز یک ملکـول چـاپرون نـورونی اسـت کـه القـای آن در شـرایط ایسکمیک و التهابی نظیر افزایش سطحی از HSP70 که مـا در بافت نخاع حیوانات گروه ایسکمیک کنترل این مطالعه مشـاهده کـردیم، بـه اثبـات رسـیده اسـت[۸، ۳۵]. در واقـع گزارشـات محدودی در زمینه ارتباط میـان اسـترادیول و HSP70 در مغـز وجود دارد که این گزارشـات حتـی در نخـاع کمتـر مـی باشـند. درحالیکـه برخـی مطالعـات در قلـب اشـاره بـه اثـرات مهـاری استرادیول بر بیان پروتئین HSP70 دارند [۴۰]، اکثـر مطالعـات




**شکل۵–** آنالیز وسترن بلات گروههای آزمایش جهت تعیین اثر استرادیول بر Caspase-3 فعال در بافت نخاع کمری استخراج شده در زمان ۴۸ ساعت پس از آسیب ایسکمی– ریپرفیوژن. A) باندهای ایمونوبلات Caspase-3 و بتا–اکتین مربوطه در هر گروه آزمایش. تغییرات بیان جز ۱۷ کیلو دالتونی Caspase-3 فعال مورد ملاحظه قرار گرفته است. B ) دانسیته نسبی (دانسیته باند β-actin / دانسیته باند Caspase-3) باندهای ایمونوبلات نیز ارائه شده اند . بارها نشانگر Mean±SEM می باشند، Oneway ANOVA; $*p<0.05$, $**p<0.01$.

در CNS بـر القـای HSP70 در پاسـخ بـه اسـترادیول گـواهی می دهند [۴۸] عقیـده بـر ایـن اسـت کـه القـای هیـت شـوک پروتئینها از مکانیزم های مهم دخیل در حفاظت القاء شده علیـه ایسکمی و انواع آسیبهای دیگر مغزی توسط استرادیول می باشد [۲۲]. اثرات حفاظتی HSP70 را میتوان به پیشگیری از تخریب ساختار پروتئین ها، بازسازی مجدد پروتئین های تخریـب شـده، تعدیل التهاب و تداخل با مسیرهای مرگ سلولی نظیر آپوپتـوز و نکروز نسبت داد [۱۶، ۲۷ و ۴۱]. نکته جالب در مطالعه مـا ایـن بود که سطح HSP70 در بافت نخـاع حیوانـات دریافـت کننـده استرادیول قبل از القای ایسـکمی، در قیـاس بـا حیوانـات گـروه ایسکمیک کنترل، افزایش نیافت. این نتایج ظاهراً مشـابه نتـایج حاصله از مطالعه Nilsen و همکارانش در ۲۰۰۷ می باشد. آنهـا گزارش کردند که استرادیول از طریـق کـاهش رادیکالهـای آزاد اکسیژن نقش نوروپروتکتیو در مغز ایفا کرده و در نتیجه کـاهش کلـی وضـعیت اسـترس بـافتی، سـطح HSP70 در پاسـخ بـه استرادیول کاهش داشته است [۲۹]. در مطالعه ما نیز چنـین بـه نظر می رسد که استرادیول از طریق مسیرهای مختلف دیگـری سبب حفاظت نورونی و کاهش کلی وضعیت استرس بـافتی و در نتیجه کاهش سطح HSP70، بـه عنـوان نشـانگری از اسـترس سلولی و بافتی، در قیاس با گروه ایسکمیک کنترل گشته اسـت. قطعاً طراحی مطالعات دیگری جهت روشن ساختن مکانیزم های دیگر اثر استرادیول در این مـدل ایسـکمی مـورد نیـاز هسـتند. علیرغم عدم پاسخدهی مناسب بافت های خرگوش بـه بسـیاری از تستهای ردیابی کننده آپوپتوز [۵] در مطالعه حاضر مـا موفـق به اندازه گیری سطح پروتئین caspase-3 فعال به عنوان جزئی از اجزای مسیر فعـال شـده مـرگ سـلولی آپوپتوتیـک گشـتیم. پروتئین Caspase-3 فعـال بطـور معنـی داری در بافـت نخـاع حیوانات گروه ایسکمیک کنترل در قیاس با گـروه شـم افـزایش یافت. مطالعات نشان داده است کـه الگـوی تخریبـی پیشـرونده عملکرد نورولوژیک در طول زمان و متعاقب آسـیب ایسـکمی – ریپرفیوژن، در واقع ناشی از آسیب ثانویه نخاعی و مرگ نـورونی تاخیری بویژه در فاز ریپرفیوژن و غالبا به دلیـل سـمیت عصـبی ناشـی از التهـاب وآپوپتـوز مـی باشـد [۳۲، ۳۸]. در مطالعـه مـا استرادیول نه تنها سبب کاهش سطح caspase-3 فعال در نخاع گشت بلکه همچنـین بـه پیشـگیری ازآسـیب بـافتی و نـورونی گسترده و نیز الگوی تخریبی پیشرونده عملکـرد نورولوژیـک در این حیوانات در مقایسه با گروه ایسکمیک کنترل انجامیـد. ایـن نتـایج در راسـتای یافتـه هـای مطالعـاتی هسـتند کـه توانـایی استرادیول در کاهش caspase-3 و مرگ سلولی آپوپتوتیـک در ایسکمی مغزی [۲۰] و آسیب های تروماتیک نخاعی [۴۸] را به اثبات رسانده اند. در جمع بندی نهایی با استناد بـه یافتـه هـای رفتاری، هیستوپاتولوژیک و وسترن بلات این مطالعه، می تـوان استرادیول را کاندیدایی مناسب، با توانـایی پیشـگیری از آسـیب های ایسکمی– ری پرفیـوژن نخـاعی از طریـق متـاثر سـاختن مسیرهای مختلف دخیل، لحـاظ کـرده و آن را بـه عنـوان یـک عامل بالقوه محافظـت کننـده نـورونی بـا قابلیـت پیشـگیری از اختلال عملکرد نورولـوژیکی کـه پـس از جراحیهـای آنوریسـم آئورت توراکوابدومینال دیده می شود، معرفی نمود.

# References

[1] Abe K., Tanzi RE, Kogure K, Induction of HSP70 mRNA after transient ischemia in gerbil brain. ***Neurosci Lett*** 125 (1991) 166-8.

[2] Barone FC, Feuerestein GZ, Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 19 (1999) 819-834.

[3] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-254.

[4] Brown IR, Rush S, Ivy GO, induction of a heat shock gene at the site of tissue injury in the rat brain. ***Neuron*** 2 (1989) 1559-64.

[5] Cassada DC, Tribble CG, Laubach VE. Et alm, An adenosine A2A agonist, ATL-146e, reduces paralysis and apoptosis during rabbit spinal cord reperfusion. ***J Vasc Surg*** 34 (2001) 482-8.

[6] Chaovipoch P, Jelks KA, Gerhold LM, West EJ, Chongthammakun S, Floyd CL, 17-β-Estradiol is protective in spinal cord injury in post- and pre-menopausal rats. *J **Neurotrauma*** 23 (2006) 830-52.

[7] Chen S, Xiong L, Wang Q, Sang H, Zhu Z, Dong H, Lu Z, Tetramethylpyrazine attenuates spinal cord ischemic injury due to aortic cross-clamping in rabbits. ***BMC Neurol*** 17 (2002) 1-6.

[8] Cizkova D, Carmel JB, Yamamoto K, Kakinohana O, Sun D, Hart Rp, Marsala M, Characterization of spinal HSP72 induction and development of ischemic tolerance after spinal ischemia in rats. ***Exp Neurol*** 185 (2004) 97-108.

[9] De Haan P, Kalkman CJ, Jacobs MJHM, Pharmacologic neuroprotection in experimental spinal cord ischemia. ***J Neurosurg Anesthesiol*** 13 (2001) 3-12.

[10] Didenko VV, Ngo H, Minchew CL, Boudreaux DJ, Widmayer MA, Baskin DS, Caspase-3-dependent and -independent apoptosis in focal brain ischemia. ***Mol Med*** 8 (2002) 347-52.

[11] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA, Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. ***Trends Neurosci*** 22 (1999) 391-397.

[12] Donnelly DJ, Popovich PG, Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. ***Exp Neurol*** 209 (2008)

[13] Ehrlich M, Knolle E, Ciovica R. et al, Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model. J Thorac Cardiovasc Surg 117 (1999) 285-291.

[14] Gharagozloo F, Larson J, Dausmann MJ, Neville RF Jr, Gomes MN, Spinal cord protection during surgical procedures in the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: ***review of current techniques***. Chest 109 (1996) 799-809.

[15] Giffard RG, Han RUQ, Emery JF, Duan ML, Pittet JF, Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia- the complex roles of heat shock protein 70. ***Anesthesiology*** 109 (2008) 339-348.

[16] Giffard RG, Yenari MA many mechanisms for HSP70 protection from cerebral ischemia. J Neurosurg ***Anesthesiol*** 16 (2004) 53-61.

[17] Hale SL., Birnbaum Y, Kloner RA Estradiol, administered acutely, protects ischemic myocardium in both female and male rabbits.***J Cardiovasc Pharmacol Ther***. 2 (1997) 47-52.

[18] Hurn PD, Macrae IM, Estrogen as a neuroprotectant in stroke. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 20 (2000) 631-652.

[19] Jia J, Guan D, Zhu W, Alkayed NJ, Wang MM, Hua Z, Xu Y, Estrogen inhibits Fas-mediated apoptosis in experimental stroke. ***Exp Neurolog*** 215(2009) 48-52.

[20] Jover T, Tanaka H, Caldeone A, Oguro K, Bennett MVL, Etgen AM, Zukin RS, Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. ***J Neurosci*** 22(2002) 2115-2124.

[21] Lewen A, Matz P, Chan PH, Free radical pathway in CNS injury. ***J Neurotrauma*** 17 (2000) 871-890.

[22] Lu A, Ran RQ, Clark J, Reilly M, Nee A, Sharp FR, 17-β-Estradiol induces heat shock proteins in brain arteries and potentiates ischemic heat shock protein induction in glia and neurons. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 22(2002) 183-195.

[23] Marsala M, Sorkin LS, Yaksh TL, Transient spinal ischemia in rat: characterization of spinal cord blood flow, extracellular amino acid release, and concurrent stopathological damage. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 14(1994) 604-614.

[24] Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L,Waeber C, Hayman BT, Yuan J, Moskowitz MA, Fas

PM, Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. ***J Neurosci*** 23 (2003) 11420-11426.

[37] Ritz MF, Hausmann ON, Effect of 17-β-Estradiol on functional outcome and release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. ***Brain Res*** 1203 (2008) 177-188.

[38] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sudahiro M, Tabayashi K, Delayed and selective motor neuron death after transient spinal cord ischemia: A role of apoptosis? *J* ***Thorac Cardiovasc Surg*** 115 (1998a) 1310-1315.

[39] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K, Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. ***J Vasc Surg*** 27(1998b) 720-5.

[40] Shinohara T, Takahashi N, Ooie T, Ichinose M, Hara M, Yonemochi H, Saikawa T, Yoshimatsu H, Estrogen inhibits hyperthermia-induced expression of heat-shock protein 72 and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in female rat heart. ***J Mol Cell Cardiol*** 37 (2004) 1053-1061.

[41] Sun Y, Ouyang YB, Xu L, Chow AM, Anderson R, Hecker JG, Giffard RG, The carboxyl-terminal domain of inducible HSP70 protects from ischemic injury in vivo and in vitro. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 26 (2006) 937-50.

[42] Sunday L, Tran MM, Krause DN, Duckles SP, Estrogen and progesterons differentially modulate vascular proinflammatory factors. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 291(2006) E261-7.

[43] Svensson LG, Richards E, Coull A, Rogers G, Fimmel CJ, Hinder RA, Relationship of spinal cord blood flow to vascular anatomy during thoracic aortic cross-clamping and shunting. ***J Thorac Cardiovasc Surg*** 91(1986) 71-8.

[44] Svensson LG, New and future approaches for spinal cord protection. ***Semin Thorac Cardiovasc Surg*** 9 (1997) 206-2.

[45] Symbas PN, Pfaender LM, Drucker MH, Lester JL, Gravanis MB, Zacharopoulos L, Cross-clamping of the descending aorta. Hemodynamic and neurohumoral effects. ***J Thorac Cardiovasc Surg*** 85(1983) 300-5.

[46] Wisselink W, Money SR, Crockett DE, Nguyen JH, Becker MO, Farr GH, Hollier LH, Ischemia-reperfusion injury of the spinal cord: protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethylthiourea. ***J Vasc***

receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. ***J Neurosci*** 20 (2000) 6879-6887.

[25] Moore WM, Jr, Hollier LH, The influence of severity of spinal cord ischemia in the etiology of delayed-onset paraplegia. ***Ann Surg***. 213 (1991) 427–432.

[26] Moosmann B, Behl C, The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 96 (1999) 8867-8872.

[27] Mosser DD, Morimoto RI, Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. ***Oncogene*** 23(2004) 2907-2918.

[28] Mutch WAC, Graham MR, Halliday WC, Teskey JM, Thomson IR, Paraplegia following thoracic aortic cross-clamping in dogs. No difference in neurological outcome with a barbiturate versus isoflurane. ***Stroke*** 24 (1993) 1554-60.

[29] Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD, Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. ***J Neurosci*** 27(2007) 14069-14077.

[30] Ohtake H, Urayama H, Katada S, Tamura M, Kawasuji M, Watanabe Y, Prevention of spinal cord ischemia by selective intercostals arterial infusion of prostaglandin E1. ***J Vasc Surg*** 28(1998) 301-307.

[31] Olazabal UE, Pfaff DW, Mobbs CV, Sex differences in the regulation of heat shock protein 70 KDa and 90 KDa in the rat ventromedial hypothalamus by estrogen. ***Brain Res*** 596(1992) 311-314.

[32] Papakostas JC, Matsagas MI, Toumpoulis IK. Et al, evolution of spinal cord injury in a porcine model of prolonged aortic occlusion. ***J Surg Res*** 133(2006) 159-166.

[33] Parente L, Perretti M, Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases. Two enzymes in the spotlight. ***Biochem Pharmacol*** 65 (2003) 153-159.

[34] Peppelenbosch N, Cuypers PW, Vahl AC, Vermassen F, Buth J, Emergency endovascular treatment for ruptured abdominal aortic aneurysm and the risk of spinal cord ischemia. ***J Vasc Surg*** 42 (2005) 608-614.

[35] Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, Mestril R, Dillmann W, Weinstein PR, Sharp FR, Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. ***Ann Neurol*** 47(2000) 782-791.

[36] Rau SW, Dubal DB, Bottner M, Gerhold LM, Wise

***Surg*** 20 (1994) 444-491.

[47] Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG, Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. ***Ann N Y Acad Sci*. 1053**(2005) 74-83.

[48] Yune TY, Kim SJ, Lee SM, Lee YK, OH YJ, Kim YG, Markelonis GJ, OH TH, Systemic administration of 17-β-Estradiol reduces apoptpotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. ***J Neurotrauma*** 21 (2004) 293-306.