

بررسی و مقایسه اثر آلوپرگنولون، پروژسترون و جنسیت در مهار خیز مغزی ناشی از آسیب مغزی در موش‌های صحرایی

لیلا احمد مولایی^۱، دکتر محمد خاکساری^{۲*}، دکتر غلامرضا سپهری^۳، دکتر شهریار دبیری^۴، دکتر غلامرضا اسدی کرم^۵، دکتر مهدی محمودی^۵ و نادر شاهرخی^۱

خلاصه

مقدمه: خیز مغزی ناشی از تروما علت مرگ در چند روز اول پس از ضربه مغزی است. در این مطالعه علاوه بر تعیین نقش جنسیت در تشکیل خیز مغزی، اثرات پروژسترون و آلوپرگنولون بعد از القای ضربه مغزی منتشر بر روی تشکیل خیز مغزی در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است. روش: این پژوهش مداخله‌ای-تجربی بر روی ۱۲ گروه موش‌های صحرایی نر و ماده انجام شد. گروه‌های ۱ و ۲، به ترتیب شاهد ماده و نر، گروه‌های ۳ و ۴، به ترتیب ترومای نر و ماده، گروه ۵، حلال پروژسترون، گروه ۶، گروه شم ماده (اوارکتومی شده)، گروه ۷، شم ماده (بدون انجام اوارکتومی)، گروه ۸ شم نر، گروه‌های ۹ و ۱۰ به ترتیب دوزهای کم (۴ mg/kg) و زیاد (۸ mg/kg) پروژسترون، گروه ۱۱ آلوپرگنولون (۴ mg/kg) و گروه ۱۲ حلال آلوپرگنولون بودند. دو هفته بعد از اوارکتومی و ۱ ساعت بعد از القای ضربه مغزی منتشر به روش مارمارو، تزریق هورمون‌ها به صورت تک دوز و داخل صفاقی انجام شد. خیز مغزی به وسیله اندازه‌گیری محتوای آب مغزی و میزان رنگ آبی ایوانز خارج عروقی تعیین شد. یافته‌ها: محتوای آب مغزی و رنگ آبی ایوانز در موش‌های نر دچار تروما در مقایسه با شاهد به ترتیب افزایش معنی‌دار ۴۲/۲٪ و ۵۳/۳۲٪ برابری را نشان داد، در حالی که میزان رنگ آبی ایوانز در موش‌های ماده ترومایی در مقایسه با شاهد فقط افزایش معنی‌دار ۴/۶۸٪ برابر داشت. هم‌چنین محتوای آب مغز و میزان رنگ آبی ایوانز در گروه ترومای نر در مقایسه با ترومای ماده به ترتیب افزایش معنی‌دار ۲/۰۴٪ و ۱/۵۷٪ برابر نشان داد. بعد از تزریق دوزهای کم و زیاد پروژسترون در حیوان‌های ماده فاقد تخمدان، محتوای آب مغز به ترتیب به میزان ۲/۲۶٪ و ۲/۳۵٪ و میزان رنگ آبی ایوانز ۲/۵۵٪ و ۲/۹۸٪ برابر کاهش پیدا کرد. هم‌چنین بعد از تزریق آلوپرگنولون نیز محتوای آب مغز و رنگ آبی ایوانز به ترتیب ۲/۳۸٪ و ۱/۸۲٪ برابر کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه معرف این است که میزان تشکیل خیز مغزی بعد از تروما در حیوان‌های نر بیشتر از ماده می‌باشد. علاوه بر این پروژسترون و آلوپرگنولون هر دو موجب کاهش تشکیل خیز مغزی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: خیز مغزی، آسیب مغزی منتشر، آلوپرگنولون، پروژسترون، آب مغز، رنگ آبی ایوانز

- ۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی و مراکز تحقیقات علوم اعصاب و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- استاد فارماکولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
- ۴- استاد گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

* نویسنده مسؤول، آدرس: گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: khaksar38@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۸/۲۶ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۹/۷

مقدمه

سالانه تعداد زیادی از مردم در سراسر دنیا در معرض آسیب‌های مغزی متوسط (Moderate brain injury) تا شدید (Severe brain injury) قرار دارند. ضربات مغزی شایع‌ترین علت مرگ و ناتوانی در افراد جوان است. در آمریکا هر ساله حدود ۱/۶ میلیون نفر دچار آسیب‌های مغزی می‌شوند، که از این تعداد هر ساله حدود ۵۲۰۰۰۰ نفر می‌میرند و ۸۰۰۰۰ نفر دچار ناتوانی‌های دائم عصبی ناشی از ضربات مغزی شدید می‌شوند که بار مالی فراوانی را به دنبال دارد (۱). در کشور ما نیز ضربه مغزی یکی از شایع‌ترین علل منجر به فوت در حوادث می‌باشد. سالانه بیش از ۱۵۰۰۰ مورد مرگ مغزی در اثر سوانح و تصادفات در کشور ما رخ می‌دهد (۲). در این میان ایسکمی مغزی ناشی از خیز مغزی علت مرگ در چند روز اول پس از ضربه است. نتایج مطالعات بالینی نشان داده‌اند که مرگ و میر در این شرایط بیشتر به علت خیز مغزی است تا ایسکمی ناشی از خونریزی و به این دلیل مطالعات زیادی در ارتباط با کاهش خیز مغزی ناشی از ضربه به سر صورت گرفته است (۳). خیز مغزی ممکن است یک ساعت بعد از ضربه مغزی شروع شود و حتی تا هفت روز بعد از آسیب نیز ادامه داشته باشد (۴).

کاهش خیز مغزی عامل تعیین کننده و مؤثر در تسریع روند بهبودی در اختلالات حاد مغزی ناشی از ضربات و انفارکتوس مغزی می‌باشد و در واقع وخامت حال بیمار، به دلیل تجمع مایع درون مغز و به دنبال آن افزایش فشار داخل مغزی است. خیز مغزی برای اولین بار به صورت تجمع آب در مغز توصیف شد. این تجمع به صورت ترکیبی از خیز سلولی (Cellular edema) و خیز وازوژنیک (Vasogenic edema) و هم چنین افزایش محتوای خون پارانشیم مغزی است (۵). از سوی دیگر نشان داده شده است که بعد از آسیب مغزی (Traumatic brain injury) حیوان‌های ماده

اغلب بهبود رفتاری و شناختی بهتری نسبت به حیوانات نر داشته‌اند (۶). هم چنین مطالعات نشان داده‌اند که زنان آسیب‌پذیری کمتری نسبت به مردان در ارتباط با آسیب‌های مغزی حاد که همراه با ایسکمی (۷) نوروتروما (Neurotrauma) (۸)، هیپوکسی (۹) و مسمومیت ناشی از داروها بوده است، داشته‌اند. برخی مطالعات پروژسترون را به عنوان عامل تفاوت در دو جنس مطرح نموده‌اند، در حالی که مطالعات دیگر آلوپرگنولون را به عنوان عامل حفاظتی در جنس ماده و حتی قوی‌تر از پروژسترون گزارش نموده‌اند (۱۰). آلوپرگنولون، متابولیت احیاء شده پروژسترون است که به وسیله تخمدان، آدرنال و هم چنین مغز تولید می‌شود و گزارش شده است برخی از اثرات پروژسترون از طریق تبدیل آن به نورواستروئید آلوپرگنولون انجام می‌شود که به وسیله هیدرولازها و ردوکتازها صورت می‌گیرد (۱۱).

اگر چه تاکنون مطالعات اپیدمیولوژیک اندکی در مورد نقش جنسیت در آسیب‌های مغزی انجام شده اما Kraus و همکاران گزارش نموده‌اند که میزان مرگ و میر ناشی از آسیب‌های مغزی در زنان ۱/۲۸ برابر بیشتر از مردان است (۱۲). در حالی که در مطالعه‌ای دیگر هیچ تفاوت جنسی در حجم ناحیه انفارکتی مغز مشاهده نشده است (۱۳). علاوه بر این نشان داده شده است که بهبود رفتاری بعد از آسیب قشر حسی-حرکتی در جنس ماده علی‌رغم میزان بالای پروژسترون وجود ندارد (۱۴). در پژوهش Jones و همکاران که با تجویز پروژسترون بعد از آسیب مغزی موضعی انجام شده است، پروژسترون تأثیری بر کاهش خیز مغزی نداشته است (۱۵).

با توجه به مطالب فوق هنوز دقیقاً مشخص نشده است که آیا در پاسخ به ضربه مغزی، جنسیت و هورمون‌های جنسی نقش دارند یا خیر؟ ثانیاً عمده مطالعات انجام شده بر روی ایسکمی مغزی بوده تا خیز مغزی و تعداد اندکی مطالعه در ارتباط با جراحی

گروه ۳، گروه ترومای نر (T/m): حیوان‌های نر که فقط تحت ضربه مغزی قرار گرفتند.

گروه ۴، گروه ترومای ماده (T/f): حیوان‌های ماده که فقط تحت ضربه مغزی قرار گرفتند.

گروه ۵، گروه حلال پروژسترون (Veh1): حیوان‌های ماده که ۲ هفته بعد از اوارکتومی (۱۷)، تحت ضربه مغزی قرار گرفتند و یک ساعت بعد از ضربه (۱۰، ۱۶)، حلال (روغن کنجد و بنزیل الکل، هم حجم داروهای مصرفی) به صورت داخل صفاقی (i. p) تزریق شد و یک ساعت بعد از تزریق حلال، خون‌گیری انجام شد (۱۸).

گروه ۶، شم ماده (Sh/f): حیوان‌های ماده دست نخورده که تمام مراحل ضربه مغزی به غیر از القای ضربه مغزی در آنها انجام شد.

گروه ۷، شم ماده اوارکتومی (Sh/f): حیوان‌های ماده که دو هفته بعد از اوارکتومی (۱۷) تمام مراحل ضربه مغزی به غیر از القای ضربه مغزی در آنها انجام شد.

گروه ۸، شم نر (Sh/m): حیوان‌های نر که همه مراحل ضربه مغزی به غیر از القای ضربه مغزی روی آنها انجام شد.

گروه ۹، گروه دوز کم پروژسترون (LP) (۴mg/kg): حیوان‌های ماده که دو هفته بعد از اوارکتومی (۱۷) تحت ضربه مغزی قرار گرفتند و یک ساعت بعد از ضربه (۱۰، ۱۶) پروژسترون به میزان ۴ mg/kg (۱۲) به صورت i. p تزریق شد و یک ساعت بعد از تزریق هورمون، خون‌گیری انجام شد.

گروه ۱۰، گروه دوز زیاد پروژسترون (HP) (۸mg/kg): این گروه مشابه گروه ۹ است با این تفاوت که دوز مصرفی پروژسترون در آنها ۸mg/kg (۱۹) است.

گروه ۱۱، گروه ۴mg/kg آلوپرگنولون (Allo): این گروه نیز مشابه گروه ۹ است با این تفاوت که ۴mg/kg آلوپرگنولون (۱۰) به جای پروژسترون مصرف شد. گروه ۱۲، گروه حلال آلوپرگنولون (Veh2):

مغزی و خیز مغزی می‌باشد که این مطالعات هم مربوط به ایجاد خیز موضعی است و نه خیز منتشر مغزی. از طرفی گزارش‌های اندکی در مورد نقش آلوپرگنولون در بهبودی بعد از ضربات مغزی وجود دارد (۱۰). با توجه به موارد بیان شده فوق اهداف کلی مطالعه حاضر عبارتند از: ۱- آزمودن فرضیه تفاوت پاسخ جنس نر و ماده به آسیب مغزی از نوع مارمارو (جراحت مغزی منتشر) از طریق بررسی خیز و سلامت سدّ خونی- مغزی. ۲- بررسی نقش پروژسترون و آلوپرگنولون بر خیز ناشی از این جراحت مغزی در موش‌های صحرایی ماده.

روش بررسی

در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی، از ۱۲۰ سر موش صحرایی (Rat) نر (۲۵۰-۳۰۰gr) و ماده (۱۸۰-۲۵۰gr) از نژاد Albino-N mary استفاده شد. حیوان‌ها ۳ ماهه بوده و موش‌های ماده قبل از باروری از نرها جدا شدند. حیوان‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی کرمان نگهداری شده و آب و غذا آزادانه در اختیار آنها قرار داشت.

گروه‌های آزمایش

حیوان‌های ماده به طور تصادفی به ۹ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و حیوان‌های نر در ۳ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر قرار گرفتند. کلیه گروه‌ها دارای دو زیر گروه بودند که در یک زیر گروه محتوای آب مغزی ۲۴ ساعت و در زیر گروه دیگر رنگ آبی ایوانز خارج عروقی ۵ ساعت پس از القای ضربه مغزی اندازه‌گیری شد (۱۶).

گروه ۱، گروه شاهد ماده (Cf): عملیات اوارکتومی و ضربه مغزی در آنها انجام نشد. گروه ۲، گروه شاهد نر (C/m): عملیات ضربه مغزی در آنها انجام نشد.

۲۵۰ گرمی از داخل ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲ متری به طور آزادانه بر روی سر حیوان بی‌هوش فرود می‌آمد. یک صفحه استیل به منظور پخش یکنواخت ضربه بر روی جمجمه قرار داشت. بعد از القای ضربه مغزی حیوان سریعاً به پمپ تنفسی TSE Animal (compact respirator آلمان) وصل می‌شد. پس از برقراری تنفس خود بخودی، حیوان از دستگاه ونتیلاسیون جدا و به قفس بازگردانده می‌شد (۲۱).

برای ارزیابی وضعیت سلامت سدخونی-مغزی از روش اندازه‌گیری زیر استفاده شد:
تعیین میزان رنگ آبی ایوانز (E.B. content) خارج عروقی:

میزان نفوذپذیری عروق مغزی ۵ ساعت پس از القای ضربه مغزی با استفاده از رنگ آبی ایوانز خارج عروقی (رنگ آبی ایوانز به پروتئین‌های پلاسما از قبیل آلبومین متصل می‌شود و در شرایط تخریب سدخونی-مغزی در خارج از عروق مشاهده می‌شود) اندازه‌گیری می‌شد. بعد از القای ضربه مغزی در ساعت چهارم حیوان با اتر بی‌هوش و رنگ به میزان ۲۰ mg/kg از طریق ورید فمورال راست تزریق می‌شد (۱۶). یک ساعت پس از تزریق، مغز حیوان با انفوزیون داخل عروقی محلول سرم فیزیولوژیک ایزوتونیک شستشو داده می‌شد. در مرحله بعد مغز با سرعت خارج شده، در ۲۰ ml محلول شامل استن و سولفات سدیم قرار داده می‌شد و برای مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه shaker (تکان‌دهنده) گذاشته می‌شد. سپس محلول روئی برداشته و با ۱ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید مخلوط می‌گردید (۱۶). میزان جذب محلول آبی ایوانز در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Pharmacia biotech، آلمان) اندازه‌گیری شده و سپس مقدار آن بر حسب میکروگرم در ۱ گرم بافت گزارش می‌شد (۱۶، ۲۲).
برای اندازه‌گیری خیز مغزی از روش زیر استفاده شد:

حیوان‌های ماده که دو هفته بعد از اوارکتومی (۱۷) تحت ضربه مغزی قرار گرفتند و یک ساعت بعد از ضربه مغزی حلال آلوپرگنولون (آب مقطر) هم حجم آلوپرگنولون به صورت i.p تزریق شد و یک ساعت بعد از تزریق حلال، خون‌گیری صورت گرفت.
داروهای مصرفی:

پروژسترون و حلال آن از شرکت دارویی ابوریحان (ایران)، آلوپرگنولون از شرکت Fluka (آلمان) و رنگ آبی ایوانز (Evans blue) از شرکت Sigma انگلستان خریداری شده است.

روش انجام اوارکتومی (برداشتن دوطرفه تخمدان‌ها):
بعد از بی‌هوشی موش‌های صحرایی ماده با مخلوط کتامین (۶۰ mg/kg) و رامپون (۱۰ mg/kg) (۱۷)، حیوان به پشت خوابانده شده و موهای قسمت تحتانی شکم تراشیده و یک برش افقی به طول ۲ سانتی‌متر ایجاد شد. سپس پوست، فاسیا و عضلات شکم باز شده، چربی‌ها و روده کنار زده شده تا رحم و لوله‌های رحمی مشاهده شوند. لوله رحم و پایه عروقی تخمدان با نخ کاتکوت ۴ در ناحیه پروگزیمال مسدود گردید و از ناحیه دیستال قطع شد و همین عمل در مورد تخمدان سمت دیگر بدن تکرار شد. در انتها ۲-۱ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی داخل شکم ریخته شد و عضلات و پوست به ترتیب با نخ کاتکوت و سیلک ۰-۲ به روش پیوسته بخیه گردید. محل زخم با محلول بتادین ضد عفونی شد. حیوان‌ها تا ۲ ساعت تحت مراقبت ویژه قرار گرفتند (۲۰) و هیچ یک از آنها حین عمل جراحی یا بعد از آن نمردند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی، انجام اوارکتومی حداقل دو هفته قبل از هر عملیات دیگری انجام شد (۱۷).
روش القای ضربه مغزی:

روش ایجاد ضربه مغزی متوسط (Moderate) از نوع منتشر (diffuse) و به روش مارمارو (Marmarou) می‌باشد (۲۱). دستگاه القای ضربه مغزی (ساخت گروه فیزیولوژی کرمان) بدین صورت بود که، وزنه

اولیه، برای پی بردن به اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده شد. برای مقایسه میزان رنگ آبی ایوانز و غلظت پروژسترون سرم که منحنی توزیع آنها طبیعی نبود با استفاده از آزمون Kruskal Wallis تجزیه و تحلیل انجام شد. کلیه داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین (Mean \pm SEM) بیان شد و نتایج با $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج:

غلظت پروژسترون سرم:

جدول ۱، غلظت پروژسترون سرم در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. غلظت این هورمون در گروه‌های شم و حلال پروژسترون کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$, Kruskal Wallis) در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای اندک یا زیاد پروژسترون غلظت پروژسترون افزایش پیدا کرد که دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0/001$, Kruskal Wallis) با گروه‌های حلال و شم است.

تعیین محتوای آب مغز (Water content): در پایان ۲۴ ساعت پس از القای ضربه مغزی و بعد از بی‌هوشی بافت مغزی خارج می‌شد. ابتدا وزن بافت تر اندازه‌گیری شده و سپس به مدت ۷۲ ساعت در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه (Memmert، آلمان) گذاشته می‌شد، تا آب آن تبخیر و بافت خشک به دست آید و در نهایت با استفاده از فرمول میزان محتوای آب بافت مغز به صورت درصد (%) محاسبه می‌شد (۲۲).

روش اندازه‌گیری غلظت پروژسترون در سرم خون غلظت پروژسترون سرم با استفاده از روش ELIZA (کیت IBL، آلمان) در سرم خون حیوان‌های ماده گروه‌های کنترل، شم، حلال، دوز اندک و دوز زیاد پروژسترون اندازه‌گیری شد (۲۳). روش‌های آماری:

داده‌های به دست آمده برای گروه‌های مختلف توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و در صورت معنی‌دار شدن آزمون

جدول ۱: غلظت‌های سرمی هورمون پروژسترون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

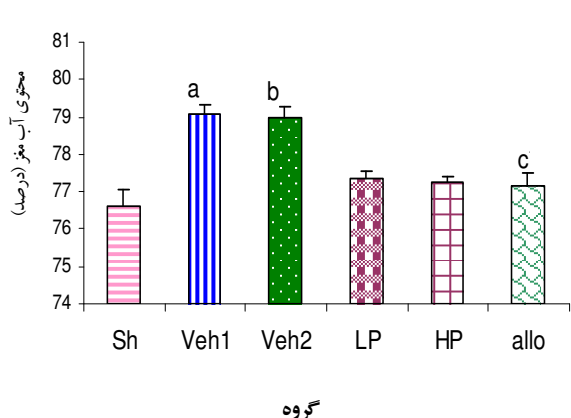
گروه	کنترل	حلال	شم	پروژسترون ۴ mg/kg	پروژسترون ۸mg/kg
غلظت پروژسترون ng/ml	۴۲/۷۴ \pm ۶/۲۶ ^a	۹/۸۹ \pm ۱/۶۱ ^b	۷/۹ \pm ۱/۴۶ ^c	۴۶/۱۵ \pm ۴/۱۴	۶۵/۴۳ \pm ۲/۴۹ ^d

a: اختلاف معنی‌دار با گروه‌های شم و حلال ($P < 0/001$)

b: اختلاف معنی‌دار با گروه‌های دوز اندک و زیاد پروژسترون ($P < 0/001$)

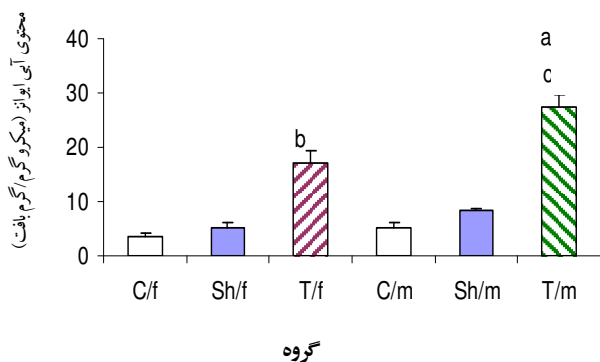
c: اختلاف معنی‌دار با گروه‌های دوز اندک و زیاد پروژسترون ($P < 0/001$)

d: اختلاف معنی‌دار با گروه دوز اندک پروژسترون ($P < 0/001$)



نمودار ۲: مقایسه اثر دوزهای مختلف پروژسترون و آلوپرگنتولون بر درصد محتوای آب مغز در حیوانات ماده فاقد تخمدان

Sh: گروه شام، Veh1: گروه حلال پروژسترون Veh2: گروه حلال آلوپرگنتولون، LP: گروه دوز اندک پروژسترون، HP: گروه دوز زیاد پروژسترون، allo: گروه آلوپرگنتولون. a: اختلاف معنی دار گروه حلال پروژسترون با گروه های شام یا دوز کم یا زیاد پروژسترون ($P < 0.001$), b: اختلاف معنی دار گروه حلال آلوپرگنتولون با گروه شام ($P < 0.001$), c: اختلاف معنی دار گروه حلال آلوپرگنتولون با گروه آلوپرگنتولون ($P < 0.001$)



نمودار ۳: مقایسه محتوای رنگ آبی ایوانز ($\mu\text{g/g tissue}$) در گروه های ترومای نر و ماده دست نخورده.

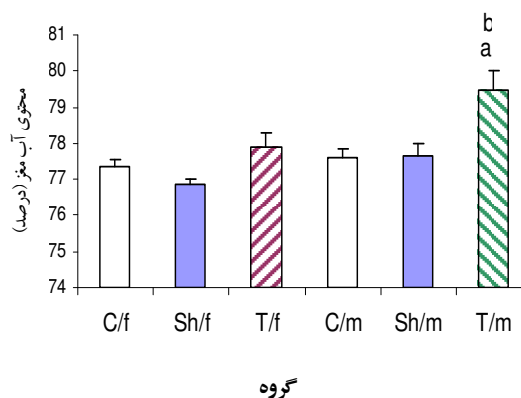
نامگذاری گروهها مطابق زیرنویس شکل ۱ می باشد. a: اختلاف معنی دار گروه ترومای نر با گروه های کنترل یا شام نر ($P < 0.001$), b: اختلاف معنی دار گروه ترومای ماده با گروه های کنترل یا شام ماده ($P < 0.001$) و c: اختلاف معنی دار گروه ترومای نر با گروه ترومای ماده ($P < 0.001$)

میزان رنگ آبی ایوانز:

در نمودار ۳، میزان رنگ آبی ایوانز در گروه ترومای نر $27/4 \pm 2/35 \mu\text{g/g tissue}$ است که در مقایسه با گروه شاهد نر ($5/15 \pm 0/9 \mu\text{g/g tissue}$) افزایش

محتوای آب مغز:

در نمودار ۱، محتوای آب مغز در گروه ترومای نر $79/5 \pm 0/5$ درصد است که در مقایسه با گروه شاهد ($77/6 \pm 0/25$) یا شام نر ($77/7 \pm 0/34$) افزایش پیدا کرده است و از لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.01$), اما این میزان در گروه ترومای ماده در مقایسه با گروه های شاهد یا شام ماده افزایش معنی دار نشان نداد. هم چنین اختلاف معنی دار در محتوای آب مغز بین گروه ترومای نر با گروه ترومای ماده مشاهده می شود ($P < 0.05$) Tukey test و ANOVA).



نمودار ۱: مقایسه درصد آب مغز در حیوانات ترومای نر و ماده دست نخورده

C/f: کنترل ماده، Sh/f: گروه شام ماده، T/f: ترومای ماده، C/m: کنترل نر، Sh/m: گروه شام نر، T/m: ترومای نر. a: اختلاف معنی دار گروه ترومای نر با گروه های کنترل یا شام نر ($P < 0.001$), b: اختلاف معنی دار گروه ترومای نر در مقایسه با گروه ترومای ماده ($P < 0.05$)

همان طور که در نمودار ۲ دیده می شود، با تزریق دوز اندک و زیاد پروژسترون، محتوای آب مغزی در حیوانات ماده فاقد تخمدان در مقایسه با گروه حلال پروژسترون کاهش معنی دار پیدا کرده است ($P < 0.001$). هم چنین این میزان در گروه دریافت کننده آلوپرگنتولون در مقایسه با گروه حلال آلوپرگنتولون کاهش معنی دار نشان می دهد ($P < 0.001$), Tukey test و ANOVA).

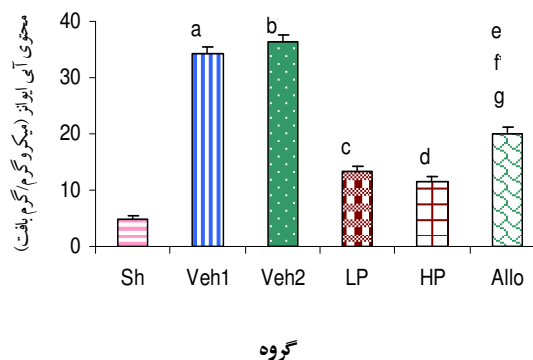
علاوه بر این اختلاف معنی دار در میزان رنگ آبی ایوانز بین گروه آلوپرگنتولون با گروه دوزهای اندک ($P < 0/05$) یا زیاد پروژسترون ($P < 0/01$)، (Kruskal Wallis) وجود دارد.

بحث

در این مطالعه علاوه بر تعیین اثر پروژسترون و آلوپرگنتولون نقش جنسیت نیز بر تشکیل خیز مغزی بعد از ضربه مغزی متوسط (moderate brain injury) در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده، مورد بررسی قرار گرفت.

در موش‌های ماده دست نخورده محتوای آب مغز حیوان‌های ترومایی در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار نشان نداد، در حالی که این میزان در موش‌های نر دست نخورده دچار تروما در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی دار در حد ۲/۴۲٪ را نشان داد؛ علاوه بر این آب بافت مغزی در گروه ترومایی نر نسبت به گروه ترومایی ماده افزایش معنی دار داشت. میزان رنگ آبی ایوانز نیز در حیوان‌های ترومایی نر در مقایسه با حیوان‌های شاهد افزایش معنی دار ۵/۳۲ برابر نشان داد، اگر چه این میزان در گروه ترومایی ماده در مقایسه با گروه شاهد فقط افزایش معنی دار ۴/۶۸ برابر را نشان داد، به طوری که میزان رنگ آبی ایوانز در گروه ترومایی نر افزایش معنی داری با گروه ترومایی ماده نشان می‌دهد. این نتایج نشان‌دهنده نقش جنسیت در میزان تشکیل خیز مغزی بعد از ضربه مغزی می‌باشد، که تأییدی بر مطالعات انجام شده قبلی است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Roof & Hall صورت گرفته، ۱۰۰٪ از موش‌های ماده بعد از آسیب مغزی زنده ماندند در حالی که این میزان برای جنس نر ۷۵٪ بود (۸). هم چنین گزارش‌هایی مبنی بر بیشتر بودن خیز مغزی بعد از آسیب مغزی در قشر medial frontal در جنس نر در مقایسه با جنس ماده وجود دارد (۲۴، ۲۵). در

معنی داری ($P < 0/001$ و Kruskal Wallis) نشان داد. هم چنین این میزان در گروه ترومایی ماده $17/9 \pm 2/17 \mu\text{g/g tissue}$ می‌باشد که در مقایسه با گروه شاهد ماده ($3/67 \pm 0/65 \mu\text{g/g tissue}$) افزایش معنی دار ($P < 0/001$) دارد. همان طور که مشاهده می‌شود این میزان در گروه ترومایی نر در مقایسه با گروه ترومایی ماده نیز افزایش معنی دار ($P < 0/001$ ، Kruskal Wallis) نشان می‌دهد.



نمودار ۴: مقایسه اثر دوزهای مختلف پروژسترون و آلوپرگنتولون بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز ($\mu\text{g/g tissue}$) در حیوان‌های ماده فاقد تخمدان.

نامگذاری گروه‌ها مطابق زیرنویس شکل ۲ می‌باشد. a: اختلاف معنی دار گروه حلال پروژسترون با گروه‌های شام، دوز اندک و زیاد پروژسترون ($P < 0/001$)، b: اختلاف معنی دار گروه حلال آلوپرگنتولون با گروه‌های شام و آلوپرگنتولون c، ($P < 0/001$) و d به ترتیب اختلاف معنی دار گروه‌های دوز اندک و زیاد پروژسترون در مقایسه با گروه شام (به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/01$)، e و f و g به ترتیب اختلاف معنی دار گروه آلوپرگنتولون در مقایسه با گروه شام ($P < 0/001$)، دوز زیاد ($P < 0/05$) و اندک ($P < 0/01$) پروژسترون.

نمودار ۴، نتایج اندازه‌گیری میزان رنگ آبی ایوانز در گروه‌های دریافت‌کننده دوز کم و دوز زیاد پروژسترون در حیوان‌های ماده فاقد تخمدان را نشان می‌دهد. هر دوی این گروه‌ها در مقایسه با گروه حلال پروژسترون کاهش معنی دار دارند ($P < 0/001$ ، Kruskal Wallis). هم چنین این میزان در گروه دریافت‌کننده آلوپرگنتولون نسبت به گروه حلال خود دارای کاهش معنی دار است ($P < 0/001$).

تزریق پروژسترون باعث افزایش معنی‌دار غلظت سرمی آن در حیوان‌های فاقد تخمدان در مقایسه با کنترل شده است، بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که کاهش محتوای آب مغز و رنگ آبی ایونز به علت افزایش غلظت سرمی پروژسترون بوده است. اثر مفید پروژسترون بر کاهش خیز مغزی توسط پژوهشگران دیگر نیز تأیید شده است، به طوری که در مطالعه‌ای گزارش شده است که بعد از ضربه مغزی محتوای آب بافت مغز و میزان رنگ آبی ایوانز در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده توسط پروژسترون کاهش پیدا می‌کند (۱۶). در بررسی دیگر که توسط Attella و همکاران انجام شد، موش‌هایی که دارای غلظت بالای پروژسترون در هنگام آسیب بودند، خیز و احتباس کمتری را نشان دادند (۲۹). هم چنین گزارش شده است که تجویز پروژسترون بعد از آسیب مغزی به صورت دوزهای مکرر محتوای آب بافت مغز را کاهش می‌دهد (۳۰). Grossman و همکاران گزارش نمودند که تجویز پروژسترون بعد از آسیب مغزی موجب کاهش تشکیل مواد التهابی، تشکیل خیز و تجمع آستروسیت‌های فعال و هم چنین افزایش تجمع ماکروفاژها و میکروگلیاهای فعال می‌شود (۳۰). کاهش خیز مغزی بعد از آسیب مغزی توسط Roof & Hall نیز گزارش شده است (۸). پروژسترون هم چنین، کاهش حجم نکروز و آسیب‌های ثانویه و بهبود عملکردهای رفتاری بعد از آسیب مغزی را نیز موجب شده است (۳۱).

اگرچه مطالعات فوق همگی دال بر مؤثر بودن پروژسترون در آسیب مغزی می‌باشد، اما در مطالعه دیگری گزارش شده است که در جنس ماده علی‌رغم میزان بالای پروژسترون دریافتی بعد از آسیب قشر حسی- حرکتی، بهبود رفتاری وجود نداشته است (۱۴). در پژوهش Jones و همکاران که با تجویز پروژسترون به صورت دوزهای مکرر بعد از آسیب مغزی انجام شده است، پروژسترون تأثیری بر کاهش

بررسی که توسط Grosswasser و همکاران انجام شده، زنان، بعد از آسیب مغزی بهبودی بهتری نسبت به مردان داشته‌اند (۲۶). در مطالعه دیگری مردان شدت خیز مغزی و آسیب بیشتری را نسبت به زنان نشان دادند (۲۵).

اگر چه مطالعات فوق همگی تأیید مطالعه حاضر می‌باشند، اما نتایج مخالف با نتایج مطالعه حاضر نیز وجود دارد. در یک مطالعه که در آن عوارض بعد از جراحی مغزی در انسان بررسی شده است، احتمال مرگ برای زنان نسبت به مردان $1/75$ برابر بیشتر بوده است (۱۲). در بررسی دیگری که توسط Farace و همکاران انجام شد، بهبودی بعد از ضربه مغزی در مردان در مقایسه با زنان بهتر صورت گرفته است (۲۷). دلایل احتمالی نتایج متفاوت مطالعات فوق در مقایسه با مطالعه حاضر عبارتند از:

۱- عدم در نظرگیری سن افراد در مقایسه بین زنان و مردان.

۲- عدم توجه به نوع آسیب مغزی در دو جنس

۳- به کارگیری شاخص‌های مختلف برای مقایسه بین شدت آسیب در زنان و مردان

دلایل احتمالی تفاوت خیز مغزی در دو جنس نر و ماده به شرح زیر می‌باشد:

۱- تفاوت در هورمون‌های جنسی آنها (۶).

۲- تفاوت در ساختار مغزی در دو جنس (۸).

۳- تفاوت در سیستم عروقی دو جنس (۲۸).

با توجه به این که یکی از دلایل احتمالی تفاوت در دو جنس اختلافات هورمونی است (۶)، در بخش دیگر این پژوهش اثر پروژسترون و آلوپرگنولون بر خیز مغزی در حیوان‌های ماده فاقد تخمدان بررسی شد. در مطالعه حاضر با تجویز دو دوز پروژسترون به صورت تک دوز، ۱ ساعت بعد از آسیب مغزی به ترتیب محتوای آب بافت مغزی $2/26\%$ و $2/35\%$ کاهش پیدا کرد و این کاهش برای رنگ آبی ایوانز به ترتیب $2/55$ و $2/98$ برابر بود. از سوی دیگر چون

است که آلوپرگنولون در کاهش عوارض بعد از آسیب‌های مغزی مؤثرتر از پروژسترون است. در مطالعه‌ای بیان شده است که هم پروژسترون و هم آلوپرگنولون در کاهش حجم ناحیه انفارکته (نکروزه) مؤثر بوده‌اند، اما آلوپرگنولون مؤثرتر عمل کرده است (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر هم آلوپرگنولون و هم پروژسترون موجب کاهش تولید خیز شده‌اند (۱۹).

مکانیسم(های) احتمالی که به وسیله آنها آلوپرگنولون اثرات محافظتی را اعمال می‌کند عبارتند از:

- ۱- اتصال به گیرنده $GABA_A$ و افزایش هیپریپولاریزاسیون (۳۵،۳۶)
 - ۲- کاهش تولید اینترلوکین ۱-بتا و $TNF\alpha$ (۲۶)
 - ۳- کاهش تولید کاسپایس-۳ (caspase-3) در ناحیه آسیب که جلوگیری از مرگ سلولی را موجب می‌شود و افزایش بیان ژن $bcl-2$ (۱۰)
 - ۴- کاهش تولید متابولیت‌های التهابی مانند $C3$ (۱۰)
 - ۵- کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی (۱۹)
- در مجموع بررسی حاضر نشان داد که اولاً جنسیت در میزان تشکیل خیز مغزی به دنبال ضربه مغزی نقش دارد، زیرا مشاهده شد که میزان خیز در گروه ترومای نر بیشتر از ترومای ماده می‌باشد، ثانیاً نشان داده شد که تخمدان‌ها در جنس ماده در پیدایش این تفاوت جنسیت نقش دارند به طوری که حذف تخمدان‌ها موجب حذف تفاوت در دو جنس گردید. ثالثاً پروژسترون و آلوپرگنولون هر دو بعد از تزریق تک دوز و ۱ ساعت بعد از آسیب مغزی اثرات محافظتی خود را در مورد کاهش خیز مغزی و حفاظت سدّ خونی-مغزی اعمال نمودند، به طوری که هم خروج پروتئین‌های عروقی در هنگام ضربه مغزی کاهش یافته و هم خروج آب به خارج از عروق کاهش پیدا کرده است، که این اثرات محافظتی در مجموع به صورت کاهش خیز مغزی بروز کرده است. در این

خیز مغزی نداشته است (۱۵). دلایل احتمالی تفاوت نتایج این دو مطالعه با مطالعه حاضر عبارتند از:

- ۱- تفاوت در زمان اندازه‌گیری خیز
 - ۲- تفاوت در روش ایجاد خیز مغزی و نوع آسیب مغزی
 - ۳- تفاوت در وسعت فوکال یا منتشر ضربه مغزی ایجاد شده
 - ۴- استفاده از حلال متفاوت
 - ۵- تفاوت دوز داروی مصرفی
 - ۶- تفاوت در زمان مصرف دارو
- مکانیسم(های) احتمالی که از طریق آنها پروژسترون خیز مغزی را کاهش داده و هم چنین باعث اختلاف در پاسخ‌دهی حیوان‌های نر و ماده می‌شوند، عبارتند از:
- ۱- اثر بر جریان خون مغز (۸)
 - ۲- پایداری غشاء و هومئوستازیس و در نهایت جلوگیری از مرگ سلولی (۸)
 - ۳- اثرات مهار بر سمیت تحریکی ناشی از گلوتامات (۳۲)
 - ۴- تقویت گیرنده‌های $GABA$ (۸)
 - ۵- مهار آپوپتوزیس (۳۳)

در مطالعه حاضر، هم چنین آلوپرگنولون به صورت تک دوز ۱ ساعت بعد از آسیب مغزی تزریق شد که محتوای آب بافت مغزی و رنگ آبی ایوانز را به ترتیب $2/38\%$ و $1/82$ برابر کاهش داد. این موضوع نیز قابل ذکر است که میزان رنگ آبی ایوانز در گروه‌های دوز اندک و زیاد پروژسترون در مقایسه با گروه آلوپرگنولون به ترتیب کاهش معنی‌دار $1/48$ و $1/73$ برابر را نشان داد.

مقایسه اثر پروژسترون و آلوپرگنولون نشان داد که اگرچه آلوپرگنولون در مهار خیز مغزی مؤثر می‌باشد، اما پروژسترون در این مهار یا استحکام سدّ خونی-مغزی مؤثرتر از آلوپرگنولون عمل کرده است. در حالی که در چند بررسی دیگر نشان داده شده

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی می‌باشد که در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تصویب شده و بدین وسیله از زحمات رئیس مرکز آقای دکتر وحید شیبانی و بقیه همکاران تشکر به عمل می‌آید. هم چنین از آقای دکتر غلامرضا مشتاقی کاشانیان به دلیل اندازه‌گیری غلظت هورمون‌ها و آقای بخشی مسئول حیوان‌خانه دانشکده پزشکی کرمان نیز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

اثر حفاظتی و کاهش خیز، پروژسترون و حتی آلوپرگنولون نقش داشته‌اند. به عبارت دیگر هورمون‌های جنسی زنانه می‌توانند در کاهش خیز مغزی مؤثر واقع شوند. برای تعیین مکانیسم اثر این دو هورمون در کاهش خیز مغزی مطالعات بیشتری لازم است.

Summary**Comparison of the Effects of Progesterone, Allopregnanolone and Gender on Suppressing Edema Formation after Traumatic Brain Injury in Rats**

Ahmad molaei L., M.Sc.¹, Khaksari M., Ph.D.², Sepehri Gh., Ph.D.³, Dabiri Sh., M.D.⁴, Asadikaram Gh., Ph.D.⁵, Mahmoodi M., Ph.D.⁵, Shahrokhi N., M.Sc.¹

1. Master of Physiology, Neuroscience Research Center and Physiology Research Center, 2. Professor of Physiology, Physiology Research Center, 3. Professor of Pharmacology, Neuroscience Research Center, 4. Professor of Pathology, Kerman University of medical Sciences, Kerman, Iran. 5. Associate Professor of Biochemistry, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Introduction: Brain edema is one of the most important causes of death within the first few days following head trauma. In this study we investigated the role of gender as well as the effects of progesterone and allopregnanolone one hour after diffuse traumatic brain injury on edema formation in rats.

Method: This interventional-experimental study was performed on 12 groups of female and male rats. They were divided into 12 groups as follows: 1 and 2: intact female and male rats, 3 and 4: trauma male and female rats, 5: vehicle of progesterone (benzyl alcohol with sesame oil), 6: sham (ovariectomized female rats: ovx), 7: sham (no ovx), 8: sham(male), 9 and 10: low dose (4mg/kg) and high dose (8mg/kg) of progesterone, 11: allopregnanolone and 12: vehicle of allopregnanolone (water). Hormones were injected i. p one hour after diffuse traumatic brain injury through Marmarou model.

Results: The results showed a significant increase of 5.32 times in Evans blue and 2.42% in water content in trauma male group comparing to control groups, while in female rats the difference was significant just for Evans blue (4.68 times). Evans blue and water content were also significantly greater in traumatic males than female rats (1.57 times and 2.04% respectively). After injection of low and high doses of progesterone, there was a significant decrease in water content (2.21% and 2.30%) and Evans blue content (2.55 and 2.98 times). Allopregnanolone significantly decreased these parameters (2.36% and 1.82 times respectively). Moreover, the injection of progesterone in both low and high doses increased the serum progesterone of female ovariectomized rats as compared to vehicle group.

Conclusion: Based on these results, it can be concluded that the rate of edema formation in traumatic male rats is higher compared to traumatic female rats. Moreover, both progesterone and allopregnanolone decrease edema formation in ovariectomized female rats.

Key words: Brain edema, Brain injury, Progesterone, Allopregnanolone, Brain water, Evans blue

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(1): 47-59

منابع

1. Sosin DM, Sniezek JE, Thurman DJ. Incidence of mild and moderate brain injury in the United States, 1991. *Brain Inj* 1996; 10(1): 47-54.
۲. گزارش سمینار مرگ مغزی و پیوند اعضا. چاپ اول، تهران، بنیاد امور بیماری‌های خاص، بهمن ۱۳۷۷، ص ۵۳-۳۴.
3. Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neuroscience* 2002; 9(2): 113-24.
4. Hellal F, Bonnefont-Rousselot D, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Verrecchina C. Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury. *Neurosci Lett* 2004; 357(1): 21-4.
5. Go KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg* 1997; 23: 47-142.
6. Slewa-Younan S, Green AM, Baguley IJ, Gurka JA, Marosszeky JE. Sex differences in injury severity and outcome measures after traumatic brain injury. *Arch phys Med Rehabil* 2004; 85(3): 376-9.
7. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Liu Y. Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22(1): 33-66.
8. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: Neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 2000; 17(5): 367-88
9. Saiyed M, Riker WK. Cholinergic and anticholinergic drug effects on survival during hypoxia: significant gender differences. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264(3): 1146-1153.
10. Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 2004; 123(2): 349-59.
11. Ottander U, Promaa IS, Bjurulf E, Skytt A, Backstorm T, Olofsson JI. Allopregnanolone and pregnanolone are produced by the human corpus luteum. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 239(1-2): 37-44.
12. Kraus JF, Peek-Asa C, McArthur D. The independent effect of gender on outcomes following traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2000; 8(1): e5.
13. Vergouwen MD, Anderson RE, Meyer FB. Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2000; 878(1-2): 88-97.
14. Grossman KJ, Stein DG. Does endogenous progesterone promote recovery of chronic sensorimotor deficit following contusion to the forelimb representation of the sensorimotor cortex. *Behav Brain Res* 2000; 116(2): 141-8.

15. Jones NC, Constantin D, Prior M, Morris PG, Marsden CA, Murphy S. The neuroprotective effect of progesterone after traumatic brain injury in male mice is independent of both the inflammatory response and growth factor expression. *Eur J Neurosci* 2005; 21(6): 1547-54.
 16. O'Conner CH, Cernak I, Vink R. Both estrogen and progesterone attenuates edma formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2005; 1062(1-2): 171-4.
 17. Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD, Kulen P, et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 1008(2): 147-54.
 18. Liu R, Wen y, Prez E, Wang X, Day AL, Simpkins JW, et al. 17 β -Estradiol attenuates blood-brain barrier disruption induced by cerebral ischemia-reperfusion injury in female rats. *Brain Res* 2005; 1060(1-2): 55-61.
 19. He J, Evans CO, Hoffman Sw, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2004; 189(2): 404-12.
۲۰. شمسی میمندی منظومه، تأثیر برداشتن غدد جنسی بر تفاوت جنسی آستانه درد حرارتی در موش صحرائی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره هشتم، سال، ۱۳۸۰، ص ۳۱-۲۶.
21. Marmarou A, Foda MA, Van Den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; 80(2): 291-300.
 22. khaksari M, Mahmoodi M, Shafaiee K, Asadi-Karam GR. Ascorbic acid improves prermeability in experimental-induced diabetic rat. *Iranian J Med Sci* 2005; 30(3): 18-133.
 23. Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinol* 2001; 142(1): 43-8.
 24. Roof RL, Duvdevani Braswell L, Stein DG. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol* 1994; 129(1): 64-9.
 25. Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res* 1993; 607(1-2): 333-6.
 26. Groswasser Z, Cohen M, Keren O. Female TBI patients recover better than males. *Brain Inj* 1998; 12(9): 805-8.
 27. Farace E, Alves WM. Do women fare worse: a metaanalysis of gender differences in outcome traumatic brain injury outcome. *J Neurosurg* 2000; 93(4): 539-45.
 28. Berry K, Wisniewski HM, Svarzbein L, Baez S. on the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci* 1975; 25(1): 75-92.
 29. Attella MJ, Nattinville A, Stein DG. Hormonal state affects recovery from frontal cortex lesions in adult female rats. *Behav Neural Biol* 1987; 48(3): 352-67.
 30. Grossman KJ, Goss CW, stein DJ. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat. *Brain Res* 2004; 1008(1): 29-39.

31. Goss CW, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76(2): 231-42.
32. Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17- β Estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death *in vitro*. *Biochem Res Commun* 1995; 216(2): 473-82.
33. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor Rh, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 1999; 19(7): 2455-63.
34. Iqbal S, Qingmin G, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone , a progesterone metabolite , is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Ann of Emerg Med* 2006; 47(4): 381-9.
35. Klatzkin RR, Morrow Al, Light KC, Pederson CA, Girdler SS. Histories of depression, allopregnanolone responses to stress, and premenstrual symptoms in women. *Biol Psychol* 2006; 71(1): 2-11.
36. Weiland S, Lan C, Mirasedegi S, Gee K. Anxiolytic activity of the progesterone metabolites 3 α -OH, 5 α -pregnan-3 α -ol-one. *Brain Res* 1991; 565: 263-8.