

## اثر محافظتی عصبی استرادیول و پروژسترون در برابر آسیب عصبی ناشی از هیپوکسی در شرایط آزمایشگاهی

زینب وحیدی نیا<sup>۱\*</sup>، ابوالفضل اعظمی تامه<sup>۱</sup>، جواد امینی مهابادی<sup>۱</sup>

۱- مرکز تحقیقات علوم تشریحی، بنیاد علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

زینب وحیدی نیا: z.vahidi1368@gmail.com

### چکیده

هدف: هیپوکسی باعث آسیب عصبی می شود و گزارش های قبلی نشان می دهند که ۱۷- $\beta$  استرادیول (E2) و پروژسترون (P) دارای اثرات محافظت کننده عصبی در برابر اختلالات عصبی هستند. با این حال، کمتر در مورد مکانیسم دارویی آن ها مطالعه شده است. در این مطالعه، اثرات و مکانیسم های محافظت عصبی E2 و P و ترکیبی از هر دو هورمون در برابر آسیب هیپوکسی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: مدل آسیب هیپوکسی با استفاده از هیپوکسی/اکسیژن رسانی مجدد (H/R) ایجاد شد. نورون های کورتیکال اولیه از کورتکس مغز جنین های موش ۱۲ روزه به دست آمده و کشت داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در معرض هیپوکسی قرار گرفتند و با E2، P و EP تحت درمان قرار گرفتند. ایمونوهیستوشیمی MAP2 برای تعیین نورون های کورتکس انجام شد. حیات سلولی با روش MTS و آسیب سلولی با روش انتشار LDH تأیید شد. پروپیدیوم یدید/هوخست برای ارزیابی مرگ نورون ها استفاده شد و وسترن بلات برای اندازه گیری بیان پروتئین کاسپاز ۳ انجام شد.

یافته ها: رنگ آمیزی MAP2 نشان داد که اکثر سلول های کشت شده، نورون هستند. هیپوکسی باعث کاهش حیات سلولی و افزایش مرگ نورون ها شد. علاوه بر این، بیان کاسپاز ۳ در گروه های هیپوکسی افزایش یافت. هورمون درمانی به طور قابل توجهی باعث افزایش حیات سلول ها و مهار مرگ نورون ها تحت هیپوکسی شد. برای روشن کردن مکانیسم احتمالی که توسط آن E2 و P اثر محافظتی خود را اعمال می کنند، کاسپاز ۳ با روش وسترن بلات بررسی شد. با این حال، تفاوت معنی داری در بیان کاسپاز ۳ بین گروه های مختلف مشاهده نشد.

نتیجه گیری: به طور کلی، ما نشان دادیم که E2 یا P یا درمان ترکیبی EP آسیب هیپوکسی را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می دهد. با این حال، هورمون درمانی هیچ تأثیری بر فعالیت کاسپاز نداشت.

واژه های کلیدی: هیپوکسی، ۱۷- $\beta$  استرادیول، پروژسترون، کاسپاز ۳، آپوپتوز سلولی



# Neuroprotective effect of estradiol and progesterone against hypoxia-induced neuronal damage in vitro

Zeinab Vahidinia<sup>1\*</sup> (Ph.D), Abolfazl Azami Tameh<sup>1</sup> (Ph.D), Javad Amini Mahabadi (Ph.D)

<sup>1</sup>- Anatomical Sciences Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Zeinab Vahidinia: z.vahidi1368@gmail.com

**Introduction:** Hypoxia induces neuronal injury and previous reports have indicated that 17 $\beta$ -estradiol (E2) and progesterone (P) have neuroprotective effects in neurological disorders and in particular under hypoxic conditions; however, little is known in regards to their pharmacological mechanism. In this study, we tried to evaluate the neuroprotective effects and mechanisms of E2, P, and a combination of both hormones against hypoxia injury using an in vitro model.

**Methods and Materials:** The hypoxia injury model was produced by hypoxia/reoxygenation (H/R). Primary cortical neurons were obtained from cerebral cortices of 12-day-old mouse embryos and cultured in vitro. Cortical neurons were exposed to hypoxia for 24 h and treated with E2, P and EP in same condition. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) immunostaining was performed to determine cortical neurons. Cell viability was detected by MTS assay and cell damage was validated by LDH release assay. Propidium iodide (PI)/hoechst (HO) was used to assess apoptosis rate of cortical neurons under H/R conditions. Western blot assay was carried out to measure the protein expression of cleaved caspase 3

**Results:** MAP2 immunostaining showed that most of the cultured cells were neurons. Exposure to hypoxia significantly reduced cell viability and increased neurons death. Moreover, expression levels of cleaved caspase3 was elevated in hypoxia induced groups. Hormone therapy significantly increased cell viability and reduced neurons death under hypoxia. Moreover, to elucidate a possible mechanism by which E2 and P exert their neuroprotective effect, we investigated the cleaved caspase3 using western blot assay. However, no significant differences were observed in the expression of cleaved caspase-3 between different groups.

**Conclusion:** Overall, we demonstrated that E2 or P or combined EP treatment alleviate hypoxia injury in vitro. However, hormone therapy had no effect on caspase activity. This study deepens our understanding of the mechanisms underlying hormone therapy-mediated neuroprotection.

**Keywords:** Hypoxia, 17 $\beta$ -estradiol, progesterone, Caspase 3, Cell apoptosis

