

Original Paper

Effect of β -estradiol on traumatic memory after post-traumatic stress disorder induced by modified single-prolonged stress model in male Rats

Mirshekar M (BSc)¹, Abrari K (PhD)^{*2}, Goudarzi I (PhD)², Rashidy-Pour A (PhD)³

¹MSc Candidate in Animal Physiology, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ²Assistant Professor, Department of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ³Professor, Department of Physiology, Research Center of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Post-traumatic stress disorder (PTSD) is an anxiety, which is induced by exposure to life-threatening trauma and produces memory dysfunctions. This study was done to evaluate the effect of β -estradiol on traumatic memory after post-traumatic stress disorder induced by modified single-prolonged stress model in male rats.

Materials and Methods: This experimental study was done on 70 male Wistar rats, weighted 200-250 grams. Initially 30 rats randomly allocated into control, shock and single prolonged stress accompanied shock (SPS&S). In SPS&S group immobilized for 2h, followed immediately with a 20 min forced swim conducted in a cylindrical filled with water. After recuperating for 15 min, animals anesthetized with ether. After 30 min recovery, stressed rats placed in the conditioned fear system (CFS). They received one 1mA, 4 second electric foot shock and remained in the chamber for another 60 second before being returned to their home cages. Shock group: Animals placed in CFS and only received the same shock as previous experiment. Naive group: Animals were removed from their home cages and exposed to chamber without receiving any foot shock. 1, 2 and 3 week later, animals in all groups were re-exposed to the shock chamber for 3 min, in order to examine conditioned fear response. In the second experiment rats were injected with β -estradiol (90 μ g/kg), one and two week after training. Data were analyzed using SPSS-16, ANOVA and LSD tests.

Results: SPS&S significantly induced freezing response (traumatic memory) compared with controls and shock groups ($P < 0.05$) following three weeks. This response significantly reduced due to repetitive injection of β -estradiol in rats ($P < 0.05$). After three weeks causes of enhanced freezing response (traumatic memory) compare with both, shock and sham groups ($P < 0.001$). β -estradiol significantly reduced this response in rats ($P < 0.001$).

Conclusion: β -estradiol's administration following PTSD induction by modified single-prolonged stress, significantly decreased the freezing response. Therefore, β -estradiol can prevent the formation of traumatic memory.

Keywords: PTSD, SPS&S, β -estradiol, traumatic memory

* Corresponding Author: Abrari K (PhD), E-mail: abrari@du.ac.ir

Received 14 December 2011

Revised 12 March 2012

Accepted 12 March 2012

اثر بتاسترادیول بر حافظه ترومایی ناشی از القای فشار روانی

پس از سانحه در موش صحرائی نر

مهدی میرشکار^۱، دکتر کتانه ابراری*^۲، دکتر ایران گودرزی^۳، دکتر علی رشیدی پور^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان. ۲- استادیار گروه زیست شناسی عمومی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان. ۳- استاد گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه، دانشگاه علوم پزشکی سمنان.

چکیده

زمینه و هدف: فشار روانی پس از سانحه (post-traumatic stress disorder: PTSD) نوعی عارضه روانی است که در پی مواجهه با سوانح شدید بروز می‌کند و منجر به بروز اختلالات حافظه می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین اثر بتاسترادیول بر حافظه ترومایی ناشی از القای فشار روانی (PTSD) پس از سانحه توسط القای تک استرس طولانی مدت به همراه شوک (SPS&S) در موش صحرائی نر انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۷۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. در آزمایش اول ۳۰ سر موش در سه گروه ۱۰ تایی کنترل، شوک و القای تک استرس طولانی مدت به همراه شوک (SPS&S) قرار گرفتند. گروه SPS&S دو ساعت در مقیدکننده نگهداری شدند و ۲۰ دقیقه برای شنای اجباری در آب قرار گرفتند و ۱۵ دقیقه بعد با اتر بیهوش شدند. حیوانات پس از ۳۰ دقیقه در دستگاه ترس شرطی (CFS) قرار گرفته و شوک الکتریکی یک میلی‌آمپری به مدت ۴ ثانیه دریافت کردند. در گروه شوک، حیوانات فقط شوک الکتریکی دریافت کردند. حیوانات گروه کنترل از محل نگهداری خارج و آزمایش شدند. حیوانات همه گروه‌ها، ۱، ۲ و ۳ هفته بعد، به مدت ۳ دقیقه بدون دریافت شوک در CFS قرار گرفتند و میزان بی‌حرکتی آنها (برحسب درصد) ثبت شد. در آزمایش دوم ۴۰ سر موش در ۴ گروه ۱۰ تایی (شم و روغن کنجد، شم و استرادیول، SPS&S و روغن کنجد، SPS&S و استرادیول) قرار گرفتند و تزریق زیرجلدی بتاسترادیول و روغن کنجد با دوز ۹۰ $\mu\text{g/kg}$ بلافاصله، یک و دو هفته پس از به‌کارگیری مدل SPS&S صورت گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های تک‌میلی حدافل تفاوت معنی‌دار (LSD)، آنالیز واریانس دوطرفه و تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: پس از سه هفته، مدل SPS&S منجر به افزایش معنی‌داری در میزان بی‌حرکتی (حافظه ترومایی) نسبت به گروه‌های دریافت کننده شوک الکتریکی و کنترل گردید ($P < 0/05$). این پاسخ در اثر تزریق مکرر بتاسترادیول کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تزریق مکرر بتاسترادیول با دوز ۹۰ $\mu\text{g/kg}$ میزان بی‌حرکتی ناشی از القای PTSD با استفاده از مدل SPS&S را کاهش می‌دهد و می‌تواند از شکل‌گیری حافظه ترومایی جلوگیری کند.

کلید واژه‌ها: فشار روانی پس از سانحه، مدل تلفیقی تک استرس طولانی مدت، بتاسترادیول، حافظه ترومایی، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: دکتر کتانه ابراری، پست الکترونیکی abrari@du.ac.ir

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی، کد پستی ۴۱۱۶۷-۳۶۷۱۶، تلفن و نامبر ۰۲۳۲-۵۲۴۷۱۲۴

وصول مقاله: ۹۰/۹/۲۳، اصلاح نهایی: ۹۰/۱۲/۲۱، پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱

مقدمه

این بیماری در جوامع بین‌المللی پس از جنگ ویتنام مورد توجه بسیاری قرار گرفت. در ایران نیز با عنوان موج انفجار بعد از جنگ تحمیلی عراق علیه ایران و بروز این اختلال در سربازان شرکت کننده در جنگ، شناخته شد (۱).

نواحی متعددی از مغز در اثر ابتلا به PTSD تخریب شده و موجب بروز علائم بیماری می‌گردند (۳، ۷). این بیماری همراه با تغییرات مورفولوژیکی و ساختاری در هیپوکامپ است. به طوری که حجم هیپوکامپ در بیماران مبتلا به PTSD نسبتاً کاهش می‌یابد

فشار روانی پس از سانحه (post-traumatic stress disorder) (PTSD) نوعی اختلال روانی است که افراد پس از مشاهده یا تجربه حوادثی دردناک از قبیل جنگ، بلایای طبیعی و تجاوز جنسی به آن مبتلا می‌شوند (۱-۳). علائم این بیماری شامل تداعی ذهنی، خواب‌های آشفته، بیش‌برانگیختگی، کابوس‌های شبانه، ترس، اجتناب از مکان‌های یادآوری کننده فشار روانی، گوش به‌زنگ بودن و پایداری تجربه ترومایی افراد است (۶-۲).

(۹و۸). به هر حال مکانیسمی که سبب آتروفی هیپوکامپ می شود؛ هنوز به طور کامل شناخته نشده است (۱۰).

شیوع بالا و پایداری حافظه ترومایی، بررسی اقدامات درمانی برای مهار PTSD را توجیه می کند (۱۱). از این رو محققین به دنبال مدل های حیوانی مناسبی هستند که علائم نزدیک با بیماری را ایجاد نمایند تا متعاقب آن اثرات درمانی داروها بررسی شود (۷و۱۱).

تک استرس طولانی مدت (single-prolonged stress: SPS) یکی از مدل های حیوانی رایج برای القای PTSD است (۱۴-۱۲). این مدل سبب تغییرات نورونی در هیپوکامپ به واسطه بیان پروتئین های آپوپتوزی و ژن ها می شود. در نهایت تغییرات رفتاری وابسته به هیپوکامپ رخ می دهد (۱۵). این مدل در طی چند سال گذشته دستخوش تغییراتی شده تا توان ارزیابی شاخص های بیشتری از بیماری را داشته باشد. Wang و همکاران مدل تلفیقی تک استرس طولانی مدت (SPS&S) که شامل القای تک استرس طولانی مدت و یک شوک الکتریکی (Shock) است را ارائه کردند. این مدل منجر به تشکیل حافظه ترومایی و رفتار اضطرابی، مشابه با آنچه که در بیماران مبتلا به PTSD است؛ می شود (۷).

استروئیدهای جنسی اثرات مستقیم و غیرمستقیم وسیعی بر فعالیت نورون ها دارند. نقش محافظتی آنها در جلوگیری از صدمات ناشی از ضربات مغزی، ایسکمی و استرس اکسیداتیو از دیرباز شناخته شده است (۱۶و۱۷). مطالعات کلینیکی و اپیدمیولوژیکی نشان می دهد که بتااسترادیول ممکن است در جلوگیری، کاهش و یا تاخیر در شروع بعضی بیماری ها از جمله آلزایمر و یا از آسیب های ناشی از ضربه و استرس به واسطه بهبود نقص های حافظه ای و شناختی نقش به سزایی داشته باشد (۱۶). این مطالعه به منظور تعیین اثر بتااسترادیول بر حافظه ترومایی ناشی از القای فشار روانی پس از سانحه توسط القای تک استرس طولانی مدت به همراه شوک الکتریکی در موش صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۷۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج در دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان طی سال ۱۳۸۹ انجام شد.

به منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتکل هلسینکی سال ۱۹۷۵ و دستور کار انجمن علوم اعصاب آمریکا انجام شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای آماده (به صورت پلت) نگهداری شدند. در همه گروه های آزمایشی حیوانات ۲ ساعت قبل از آموزش در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند.

از دستگاه ترس شرطی (conditioned fear system: CFS)

ساخت شرکت Nuldos هلند برای اعمال شوک الکتریکی و ارزیابی میزان حافظه ترومایی استفاده شد. این دستگاه شامل محفظه مکعب مستطیل شکل از جنس پلاستیک شفاف به ابعاد ۴۵×۴۵×۴۷ سانتی متر است. ثبت میزان بی حرکتی حیوان (حذف همه اعمال حرکتی به جز حرکات تنفسی) (freezing) با کمک دوربین به کار رفته در سقف این دستگاه انجام گرفت. افزایش میزان بی حرکتی نشان دهنده تشکیل حافظه ترومایی است. مدت زمان بی حرکتی حیوان نسبت به کل زمان قرارگیری در دستگاه، به صورت درصد توسط نرم افزار EthoVision-3 متصل به دستگاه محاسبه گردید.

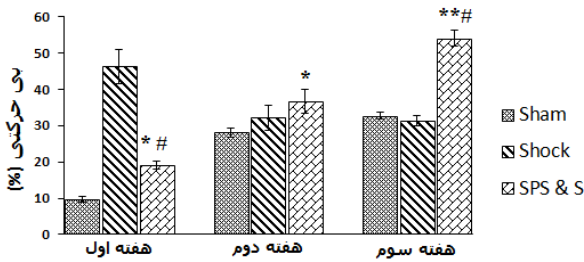
برای تعیین اثر بتااسترادیول بر القای PTSD با استفاده از مدل تلفیقی تک استرس طولانی مدت (SPS&S) دو آزمایش طراحی شد.

آزمایش اول: این آزمایش به منظور استفاده از مدل تلفیقی SPS&S و بررسی تشکیل حافظه ترومایی حیوان و مقایسه این پاسخ با گروه های کنترل و شوک (اثر شوک به تنهایی) انجام شد. نتایج آزمایش اول نشان دهنده زمان اثربخشی مدل و بروز علائم مرتبط با آن و نیز تعیین کننده زمان مناسب برای تعیین اثر بتااسترادیول در آزمایش دوم بود. بدین منظور ۳۰ سر موش به سه گروه ۱۰ تایی کنترل، شوک و القای تک استرس طولانی مدت به همراه شوک (SPS&S) تقسیم شدند.

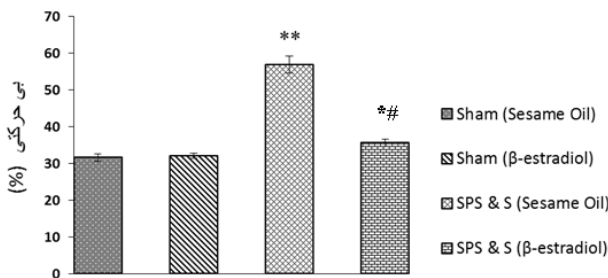
موش های گروه کنترل از محل نگهداری خارج و تنها برای ارزیابی میزان بی حرکتی در دستگاه CFS، بدون اعمال شوک الکتریکی قرار گرفتند. حیوانات گروه شوک به مدت ۲۶۰ ثانیه در دستگاه CFS قرار گرفتند. به طوری که پس از ۱۹۶ ثانیه یک شوک الکتریکی یک میلی آمپری به مدت ۴ ثانیه دریافت کردند و ۶۰ ثانیه بعد، از دستگاه خارج شدند (۷). موش های گروه تک استرس طولانی مدت و شوک الکتریکی در مرحله اول تحت سه نوع استرس قرارگیری در مقید کننده (Restrainer)، شنای اجباری و بی هوشی با دی اتیل اتر (Merck، آلمان) قرار گرفتند. سپس در مرحله دوم شوک الکتریکی در دستگاه CFS را تجربه نمودند. به این ترتیب که حیوانات به مدت ۲ ساعت در مقید کننده به صورت کاملاً بی حرکتی قرار داده شدند. تنفس حیوانات از طریق سوراخ های کوچک تعبیه شده در مقید کننده امکان پذیر بود. سپس بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه در ظرفی استوانه ای به ابعاد ۵۰×۲۴۰ میلی متر که دو سوم آن از آب پر شده بود؛ برای شنای اجباری قرار گرفتند. حیوانات ۱۵ دقیقه بعد با دی اتیل اتر بیهوش شدند (۱۴-۱۲). حیوانات ۳۰ دقیقه بعد برای القای شوک الکتریکی در دستگاه CFS قرار گرفتند (۷).

با توجه به مطالعات گذشته ارزیابی میزان بی حرکتی در همه گروه ها، یک، دو و سه هفته بعد از آزمایش انجام شد (۷و۱۲). بدین

نتایج مربوط به آزمایش دوم پس از سه هفته در نمودار ۲ ارائه شده است. در میزان بی حرکتی دو گروه SPS&S که بتاسترادیول و یا روغن کنجد را دریافت کردند تفاوت آماری معنی داری وجود داشت ($P < 0/008$). بین گروه SPS&S و گروه کنترل مربوطه، دریافت کننده بتاسترادیول، نیز اختلاف معنی دار بود ($P < 0/001$)؛ اما تفاوت آماری معنی داری بین دو گروه شم که بتاسترادیول یا روغن کنجد دریافت کردند؛ وجود نداشت.



نمودار ۱: میانگین و خطای استاندارد بی حرکتی (حافظه ترومایی) موش‌های صحرائی نر گروه‌های کنترل، شوک و SPS&S، یک، دو و سه هفته بعد از آزمایش هر گروه شامل ۸ تا ۱۰ سر موش بود. $P < 0/05 \times$ در مقایسه با گروه کنترل $P < 0/01 \times \times$ در مقایسه با گروه کنترل $P < 0/05 \#$ در مقایسه با گروه Shock



نمودار ۲: مقایسه میانگین و خطای استاندارد اثر تزریق مکرر بتاسترادیول بر حافظه ترومایی (بی حرکتی) سه هفته پس از القای PTSD هر گروه شامل ۸ تا ۱۰ سر موش بود. $P < 0/05 \times$ در مقایسه با گروه SPS&S (روغن کنجد) $P < 0/01 \times \times$ در مقایسه با گروه شم (روغن کنجد) $P < 0/05 \#$ در مقایسه با گروه شم (بتاسترادیول)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق بتاسترادیول با دوز ۹۰ μg/kg میزان بی حرکتی ناشی از القای PTSD با استفاده از مدل SPS&S را کاهش می‌دهد و می‌تواند از شکل‌گیری حافظه ترومایی جلوگیری کند.

در مطالعه ما نیز برای القای PTSD از مدل SPS&S استفاده شد و افزایش میزان بی حرکتی به عنوان یکی از مؤلفه‌های مرتبط با ترس (تشکیل حافظه ترومایی) به مدت سه هفته مورد توجه قرار گرفت

ترتیب که حیوانات ۳ دقیقه بدون دریافت شوک الکتریکی در دستگاه CFS قرار گرفتند و میزان بی حرکتی برحسب درصد اندازه‌گیری شد. القای PTSD منوط به افزایش معنی دار در میزان پاسخ در حیوانات گروه مدل SPS&S نسبت به حیوانات گروه شوک و کنترل بیان شد (۷).

آزمایش دوم: این آزمایش برای تعیین اثر بتاسترادیول بر تشکیل حافظه ترومایی ناشی از القای PTSD به واسطه به کارگیری مدل SPS&S انجام شد. به منظور تزریق زیرجلدی بتاسترادیول، این ماده در روغن کنجد حل شد. دوز ۹۰ μg/kg بر پایه گزارش‌های مربوط به استروژن درمانی در نظر گرفته شد (۱۸-۲۳).

در آزمایش دوم ۴۰ سر موش در ۴ گروه ۱۰ تایی (شم و روغن کنجد، شم و استرادیول، SPS&S و روغن کنجد، SPS&S استرادیول) قرار گرفتند. در هر یک از گروه‌ها بتاسترادیول (Sigma، امریکا) و روغن کنجد (Sigma، امریکا) به‌عنوان حلال آن تزریق شد. گروه دریافت کننده روغن کنجد به‌عنوان گروه شم در نظر گرفته شد. تزریق زیرجلدی بتاسترادیول و روغن کنجد با سرنگ همیتون و دوز ۹۰ μg/kg به آرامی بلافاصله، یک و دو هفته پس از به کارگیری مدل SPS&S صورت گرفت. حیوانات پس از طی سه هفته برای ثبت میزان بی حرکتی (حافظه ترومایی) به مدت ۳ دقیقه در دستگاه CFS قرار گرفتند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون تکمیلی حداقل تفاوت معنی دار (LSD) برای بررسی وجود تفاوت بین گروه‌های آزمایشی استفاده شد. بررسی پایداری اختلاف معنی دار بین گروهی توسط آزمون آماری تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر انجام شد. ملاک معنی دار بودن داده‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان بی حرکتی گروه SPS&S ($19/11 \pm 1/16$) و گروه شوک ($46/3 \pm 4/63$) از گروه کنترل ($9/77 \pm 0/7$) بیشتر (به ترتیب $P < 0/016$ و $P < 0/001$) بود. میزان بی حرکتی گروه شوک به‌طور معنی داری از گروه SPS&S بیشتر بود ($P < 0/01$).

در هفته دوم تفاوت آماری معنی داری در میزان بی حرکتی بین گروه SPS&S ($36/8 \pm 3/28$) و کنترل ($28/11 \pm 1/26$) وجود داشت ($P < 0/033$)؛ اما تفاوت آماری معنی داری بین گروه SPS&S و گروه شوک یافت نشد.

در هفته سوم افزایش معنی داری در میزان بی حرکتی گروه SPS&S ($54 \pm 2/27$) در مقایسه با گروه کنترل ($32/66 \pm 0/97$) و گروه شوک ($31/37 \pm 1/53$) مشاهده شد؛ اما تفاوت آماری معنی داری در میزان بی حرکتی دو گروه شوک و کنترل یافت نشد (نمودار یک).

استروژن قادر است از بروز بیماری‌های تخریب نورونی مثل آلزایمر و یا از آسیب‌های ناشی از ضربه و استرس جلوگیری کند (۱۷ و ۱۸). استروژن یک تنظیم کننده قوی عملکرد نورونی است که بر تکثیر، حیات و پلاستیسیته آنها موثر است. استروژن همانند یک عامل نوروتروفیک و محافظ نورون عمل می‌کند (۱۸ و ۱۹).

استروئیدها از طریق مکانیسم متعددی از جمله القای بیان ژن‌های ضد آپوپتوز، ثابت نگهداشتن هومئوستازی کلسیم داخل سلولی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سلولی، اثر بر سیستم‌های نوروترنسمیتری مختلف از قبیل گابا و اثر بر عوامل نوروتروفیک نقش محافظت نورونی خود را ایفا می‌کنند (۱۹ و ۲۴ و ۲۵). در مطالعه حاضر اثر محافظتی بتاسترادیول بررسی نشده است. لذا مطالعات بیشتری برای درک این مکانیسم ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق سه نوبته بتاسترادیول با دوز $90 \mu\text{g/kg}$ میزان بی‌حرکتی ناشی از القای PTSD با استفاده از مدل SPS&S را کاهش می‌دهد و می‌تواند از شکل‌گیری حافظه ترومایی جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای مهدی میرشکار برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان بود. بدین وسیله از دانشگاه دامغان و دانشگاه علوم پزشکی سمنان برای حمایت معنوی و مالی سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از جناب آقای دکتر سعید زواره عضو محترم هیأت علمی دانشگاه دامغان به خاطر همکاری در این تحقیق تشکر می‌نمایم.

References

- Ali-pour ME, Lorestan F. [Posttraumatic Stress Disorder]. 2nd. Tehran: Engineering and Institute of Medical Sciences, Veterans. 2008; pp: 1-27. [Persian]
- Sherin JE, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(3):263-78.
- Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, et al. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety—evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*. 2008 Dec;28(11):2299-309.
- Schipper HM. Sex hormones in stroke, chorea, and anticonvulsant therapy. *Semin Neurol*. 1988 Sep;8(3):181-6.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR*. 4th. Washington, DC: American Psychiatric Association. 2000.
- Adami P, König P, Vetter Z, Hausmann A, Conca A. Post-traumatic stress disorder and amygdala-hippocampectomy. *Acta Psychiatr Scand*. 2006 Apr;113(4):360-3.
- Wang W, Liu Y, Zheng H, Wang HN, Jin X, Chen YC, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neurosci Lett*. 2008 Aug;441(2):237-41.
- Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, et al. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*. 1997 Jun;48(6):1517-21.
- Wignall EL, Dickson JM, Vaughan P, Farrow TF, Wilkinson ID, Hunter MD, et al. Smaller hippocampal volume in patients with recent-onset posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2004 Dec;56(11):832-6.
- Li XM, Han F, Liu DJ, Shi YX. Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. *J Chem Neuroanat*. 2010 Nov;40(3):248-55.
- Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*. 2009;26(12):1110-7.

12. Antelman SM. Stressor-induced sensitization to subsequent stress. Implications for the development and treatment of clinical disorders, in sensitization in the nervous system. In: Kalivas PW, Barnes CD, Caldwell NJ (Ede). *Advances in Physiology*. Telford: Telford Press. 1988; pp: 227-56.
13. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*. 2003 Jun;289(23):3095-105.
14. Villarreal G, Petropoulos H, Hamilton DA, Rowland LM, Horan WP, Griego JA, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus and occipital white matter in PTSD: preliminary results. *Can J Psychiatry*. 2002 Sep;47(7):666-70.
15. Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, et al. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*. 2008 Dec;28(11):2299-309.
16. Paganini-Hill A. Estrogen replacement therapy and stroke. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38(3):223-42.
17. Gupta RR, Sen S, Diepenhorst LL, Rudick CN, Maren S. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain Res*. 2001 Jan;888(2):356-65.
18. Chang YJ, Yang CH, Liang YC, Yeh CM, Huang CC, Hsu KS. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear extinction in rats through estrogen receptor beta. *Hippocampus*. 2009 Nov;19(11):1142-50.
19. Wessa M, Flor H. Failure of extinction of fear responses in posttraumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. *Am J Psychiatry*. 2007 Nov;164(11):1684-92.
20. Dribben W, Nemmers B, Nardi A, Taylor G, Olney J, Farber N. Chronic but not acute estradiol treatment protects against the neurodegenerative effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Endocrine*. 2003 Jun;21(1):53-8.
21. Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology*. 2001 Jan;142(1):43-8.
22. Nuñez JL, McCarthy MM. Estradiol exacerbates hippocampal damage in a model of preterm infant brain injury. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2350-9.
23. Sales S, Ureshino RP, Pereira RT, Luna MS, Pires de Oliveira M, Yamanouye N, et al. Effects of 17beta-estradiol replacement on the apoptotic effects caused by ovariectomy in the rat hippocampus. *Life Sci*. 2010 May;86(21-22):832-8.
24. Morrell MJ. Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology*. 1999;53(4 Suppl 1):S42-8.
25. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 1992 Jul;12(7):2549-54.