

## Investigation of the Role of L-Arginine and L-NAME in Dorsal Hippocampus on Anxiety, Depression and Brain Level of BDNF after Stress in Male Mice

Atusa Mashhadi<sup>1</sup>, Hedayat Sahraei<sup>2</sup>, Gholam Hossein Meftahi<sup>\*3</sup>, Hengameh Alibeik<sup>4</sup>

<sup>1</sup> M.S.c in Animal Physiology, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0002-3626-6906.

<sup>2</sup> Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0001-9235-0013.

<sup>3</sup> Associate Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (Corresponding Author); Email, [hossein.meftahi@bmsu.ac.ir](mailto:hossein.meftahi@bmsu.ac.ir), [meftahi208@yahoo.com](mailto:meftahi208@yahoo.com), Tel; 02187554148, ORCID ID: 0000-0003-0665-186X.

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0002-8420-7118.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Nitric oxide is involved in response to stress-induced anxiety and depression in the dorsal hippocampus. In this study we investigated the effects of L-arginine and L-NAME in the dorsal hippocampus on anxiety, depression, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in stressed male NMRI mice.

**Materials and Methods:** Electric foot-shock stress (10 Hz, 40 mV for 60 seconds) was applied to animals for four consecutive days. Three doses of L-arginine or L-NAME (1, 5 and 10 µg/mouse) were injected bilaterally into the dorsal hippocampus five minutes before starting foot-shock stress. Anxiety and depression-like behaviors and brain BDNF levels were measured 24 hours after stress using an elevated plus maze, forced swim test, and ELISA, respectively.

**Results:** Injection of different doses of L-arginine and L-NAME before stress showed that the number of entries in the open arm decreased in elevated plus maze. The number of entries in the closed arm increased more in the stress group than that in the control group. Also, intra dorsal hippocampus injections of different doses of L-arginine and L-NAME before stress significantly decreased swimming time and increased floating and struggling time in the forced swim test compared to the control group. In addition, ELISA results showed that injections of different doses of L-arginine and L-NAME before stress had no significant effects on brain BDNF level.

**Conclusion:** Nitric oxide in the dorsal hippocampus may mediate the induced anxiety and depression behaviors by foot-shock stress.

**Keywords:** Stress; L-Arginine; L-NAME; Nitric oxide; Dorsal hippocampus

**Received:** Oct 11, 2021

**Accepted:** Oct 8, 2022

**How to cite the article:** Atusa Mashhadi, Hedayat Sahraei, Gholam Hossein Meftahi, Hengameh Alibeik. Investigation of the Role of L-Arginine and L-NAME in Dorsal Hippocampus on Anxiety, Depression and Brain Level of BDNF after Stress in Male Mice. *BJKU* 2022;27(5):41-57.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## بررسی نقش ال-آرژنین و ال-نیم در هیپوکمپ پستی بر اضطراب، افسردگی و میزان BDNF مغز به دنبال استرس در موش نر

آتوسا مهدی<sup>1</sup>، هدایت صحرائی<sup>2</sup>، غلام حسین مفتاحی<sup>3\*</sup>، هنگامه علی بیک<sup>4</sup>

1. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۲-۳۶۲۶-۶۹۰۶
2. استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، ۰۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۲۳۵-۰۰۱۳
3. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: hossein.meftahi@bmsu.ac.ir و ameftahi208@yahoo.com تلفن: ۰۲۱۸۷۵۵۴۱۴۸، کد ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۳-۰۶۶۵-۱۸۶۵
4. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، ۰۰۰۰۰۰۰۲-۸۴۲۰-۷۱۱۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** نیتریک اکساید در ناحیه هیپوکمپ پستی در پاسخ به فرآیندهای اضطراب و افسردگی به دنبال استرس درگیر است؛ لذا در این مطالعه، تأثیر ال-آرژنین و ال-نیم موجود در ناحیه هیپوکمپ پستی بر اضطراب، افسردگی و میزان فاکتور رشد مشتق شده از عروق مغز در موش های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استرس دیده مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** استرس شوک الکتریکی (10 هرتر، ولتاژ 40 میلی ولت به مدت 60 ثانیه) به کف پای حیوان به مدت 4 روز پشت سرهم اعمال شد. ال-آرژنین و ال-نیم در سه دوز 1، 5 و 10 میکروگرم/موش به صورت دوطرفه در ناحیه هیپوکمپ پستی پنج دقیقه قبل از شروع استرس شوک الکتریکی کف پا در هر روز تزریق شد. رفتارهای شبه-اضطراب، افسردگی و میزان فاکتور رشد مشتق شده از عروق مغز 24 ساعت بعد از آخرین روز استرس به ترتیب با استفاده از ماز بعلاوه مرتفع، تست شنای اجباری و الایزا اندازه گیری شد.

**یافته ها:** تزریق دوزهای مختلف ال-آرژنین و ال-نیم قبل از استرس در ماز بعلاوه مرتفع نشان داد که تعداد دفعات رفتن به بازوی باز کاهش می یابد. تعداد ورودی ها در بازوی بسته در گروه استرس نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. همچنین تزریق دوزهای مختلف ال-آرژنین و ال-نیم در هیپوکمپ پستی قبل از استرس در تست شنای اجباری سبب کاهش معنی دار زمان شنا کردن و افزایش زمان غوطه وری و تقلا کردن در گروه استرس نسبت به گروه کنترل شد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که تزریق دوزهای مختلف ال-آرژنین و ال-نیم قبل از استرس تأثیری معنی داری بر میزان فاکتور رشد-مشتق شده از عروق مغزی ندارد.

**نتیجه گیری:** نیتریک اکساید در ناحیه هیپوکمپ پستی احتمالاً واکنش های اضطرابی و افسردگی القا شده ناشی از استرس شوک الکتریکی را واسطه گری می کند.

**کلمات کلیدی:** استرس، ال-آرژنین، ال-نیم، نیتریک اکساید، هیپوکمپ پستی

وصول مقاله: 1400/7/19 اصلاحیه نهایی: 1401/6/28 پذیرش: 1401/7/16

## مقدمه

امروزه بیماری‌های مختلفی گریبانگیر جوامع مختلف است که می‌تواند به دلایل مختلفی ایجاد شود؛ اما بررسی‌ها نشان داده که استرس می‌تواند به عنوان پایه و اساس شروع خیلی از بیماری باشد (1). استرس، واکنش فرد نسبت به شرایط و موقعیت‌های جدید زندگی و تلاش برای سازگار شدن با این شرایط است. در واقع نه تنها استرس همواره دارای بار معنایی منفی نیست، بلکه در شرایط خاصی وجود آن برای زندگی سالم، ضروری و مفید است. آنچه که نامطلوب و مضر است استرس شدید و کنترل نشده است. استرس به دلیل اثر تخریبی که بر عملکرد مغز برجای می‌گذارد و نیز به دلیل زمینه‌سازی بروز انواع متعددی از بیماری‌ها (بیماری‌های وابسته به استرس) به عنوان مهم‌ترین عامل قابل پیش‌بینی و پیشگیری در بین تمامی عوامل زمینه‌ساز بیماری‌ها معرفی شده است (2).

بیماری‌های عصبی مرتبط با استرس مزمن می‌تواند توانایی فرد را در مدیریت اتفاقات مختلف زندگی مختل کند. در صورتی که استرس مزمن و غیرقابل کنترل باشد باعث بروز اختلالات عاطفی، اضطراب و افسردگی می‌شود (3). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که به دنبال اعمال استرس، تغییرات عصبی و هورمونی زیادی در بدن موجود زنده ایجاد می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از افزایش غلظت هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی (کورتیزول و کورتیکوسترون)، افزایش غلظت پلاسمایی کاتکولآمینها (آدرنالین و نورآدرنالین) و ترشح نوروپپتیدهایی نظیر وازوپرسین در خون که می‌توانند باعث بروز تغییر در خصوصیات الکتریکی، شکل‌پذیری سیناپسی و تغییر در ظرفیت تکثیری سلول‌ها در مغز شود (4). با توجه به اینکه استرس می‌تواند با ایجاد بیماری‌های مختلف زندگی افراد را در بعدهای مختلف تحت تأثیر قرار بدهد، به همین دلیل مدیریت استرس به منظور جلوگیری از عواقب زیان‌بار آن یکی از مهم‌ترین اهداف هر سیستم بهداشتی در دنیا است و با

استفاده از روش‌های مختلف مدیریت استرس می‌توان باعث کاهش استرس شد.

هیپوکمپ یکی از مهم‌ترین ساختارهای مغزی مرتبط با حافظه و یادگیری، اضطراب و افسردگی است که نقش مهمی در کمک به تصمیم‌گیری با تکیه بر حافظه بر عهده دارد (5). هیپوکمپ را می‌توان به دو بخش هیپوکمپ پشتی و هیپوکمپ شکمی تقسیم کرد که هر کدام در نوعی از حافظه دخالت دارند. در حالی که هیپوکمپ پشتی نقش ویژه‌ای در حافظه فضایی دارد، هیپوکمپ شکمی بیشتر در حافظه هیجانی دخالت دارد (6). از طرف دیگر، هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در فرآیند اضطراب و افسردگی دارد (7). از طرفی هیپوکامپ ارتباط گسترده‌ای با قسمت‌های مختلف مغز از جمله هیپوتالاموس، هسته رافه، لوکوس سرولئوس، بخش میانی قشر پیشانی، سپتوم و آمیگدال دارد و تمام نواحی فوق در رفتار اضطرابی دخیل هستند (8).

نیتریک اکساید (Nitric Oxide; NO) یک میانجی عصبی است که می‌تواند هم سلول‌پیش‌سیناپسی و هم سلول‌پس‌سیناپسی را تحت تأثیر قرار دهد. نیتریک اکساید با فعال کردن آنزیم گوانیلات سیکلاز باعث افزایش تولید گوانیلات منو فسفات حلقوی (cGMP) شده و این پیامبر ثانویه نیز مسئول بخشی از اثرات نیتریک اکساید است (9). از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که NO نقش مهمی را در شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکمپ بازی می‌کند (10). توانایی استرس در تغییر شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکمپ پشتی در بروز بیماری‌های مختلف در حیوان از جمله حرکت در محیط تازه، اضطراب، افسردگی و نیز تقلیل حافظه و یادگیری نقش اصلی را دارد (7). از سوی دیگر، با توجه به اینکه در اغلب نقاط مغز از جمله هیپوکمپ و بویژه هیپوکمپ پشتی، با القاء انواع مختلف آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتتاز (Nitric oxide synthases; NOS) باعث افزایش رها شدن نیتریک اکساید شده و از

رو در تحقیق حاضر به بررسی میزان BDNF در مغز نیز پرداخته شد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI با میانگین وزنی 20-25 گرم که از بخش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج ا...) تهیه شد، استفاده گردید. موش‌ها در یک محیط کنترل شده، در دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت  $50 \pm 5$  درصد و 12 ساعت روشنایی، 12 ساعت تاریکی قرار گرفتند. تمام موش‌ها به مدت یک هفته برای سازش با محیط به صورت جداگانه در حیوان‌خانه مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج ا...) نگهداری و با غذای استاندارد تغذیه شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (بسا کد اخلاق IR.BMSU.REC.1395.812) انجام شد.

حیوانات به صورت تصادفی به گروه‌های (گروه  $n=7$ ) به تفکیک زیر تقسیم شدند: 1. گروه کنترل که بدون هیچ تداخلی مورد بررسی قرار گرفتند. 2. گروه استرس که جراحی شده و کانول‌ها در داخل هیپوکمپ پستی قرار گرفتند و پس از سپری شدن دوره یک هفته‌ای ریکاوری سالیان به آن‌ها تزریق شد و پس از 5 دقیقه به آن‌ها استرس شوک الکتریکی کف پا وارد (به مدت 4 روز) و از روز پنجم تحت آزمایش‌های اضطراب و افسردگی قرار گرفتند. 3. گروه کنترل ال-آرژنین: ال-آرژنین در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش به صورت دوطرفه در ناحیه هیپوکمپ پستی تزریق می‌شد؛ ولی استرس دریافت نمی‌کرد (به مدت 4 روز). 4. گروه ال-آرژنین با استرس: ال-آرژنین در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش 5 دقیقه قبل از استرس به صورت دوطرفه در ناحیه هیپوکمپ پستی تزریق می‌شد (به مدت 4 روز). 5. گروه کنترل ال-نیم: ال-نیم در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش به صورت دوطرفه در

طریق این نوروترانسمیتر کار خود را القاء می‌کنند، به نظر می‌رسد که بررسی نقش نیتریک اکساید در بروز اثرات استرس در این بخش از مغز بتواند دیدگاه روشنی درباره اثرات استرس و میزان دخالت نیتریک اکساید در این زمینه ایجاد نماید. از طرفی آنزیم NOS عصبی در نواحی مختلف سیستم عصبی از جمله آمیگدال، هیپوکامپ و بخش پستی ماده خاکستری دور قنات سیلویوس بیان می‌شود. با توجه به اینکه این نواحی آناتومیکی در رفتارهای شبه اضطرابی دخیل می‌باشند، این احتمال مطرح می‌شود که نیتریک اکساید در کنترل رفتارهای شبه اضطرابی نقش داشته باشد (11). تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که استرس مزمن باعث افزایش بروز رفتارهای اضطرابی، کاهش حافظه و یادگیری فضایی و نیز افزایش افسردگی می‌شود (12). از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که نیتریک اکساید موجود در هیپوکمپ پستی باعث تقویت حافظه و یادگیری در حیوانات شده و باعث کاهش بروز رفتار اضطرابی در موش‌ها به دنبال تزریق نیکوتین می‌شود (13).

با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی مشخص شده است که هیپوکمپ پستی در تعدیل اثرات استرس نقش عمده‌ای دارد در این تحقیق بر آن شدیم تا با مهار و یا تحریک نیتریک اکسید (از طریق تزریق ال-آرژنین و ال-نیم) به عنوان یکی از میانجی‌های اصلی در هیپوکمپ پستی در شرایط استرس و بدون استرس، تغییرات رفتار در ماز مرتفع به عنوان یک نشانه بارز رفتار اضطرابی و زمان شنا کردن در تست شنای اجباری به عنوان یک نشانه از افسردگی در مغز موش‌های نر را مورد بررسی قرار دهیم. علاوه بر این شواهد پایه‌ای و کلینیکی نشان می‌دهند که اضطراب و افسردگی علاوه بر کاهش حجم مغز، با تغییرات ساختاری و نوروشیمیایی مختلفی که در سطوح نوروتروفین‌ها به ویژه فاکتور رشد مشتق شده از مغز (Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) رخ می‌دهد، وابسته است (14). از این

آن‌ها زمان دادیم تا با محیط آن آشنا شوند. سپس دستگاه الکتروشوک را روشن کرده و به مدت 100 ثانیه حیوانات را با ولتاژ 60 میلی ولت تحت استرس قرار دادیم. پس از پایان یافتن استرس، 30 دقیقه اضافه فرصت دادیم تا موش‌ها کمی آرام شده و از شوک ناشی از استرس خارج شوند. بعد از آن، حیوانات را به داخل جعبه نگه داری منتقل کردیم.

5 دقیقه قبل از شروع آزمایش‌ها، محلول ال-آرژنین و یا ال-نیم با استفاده از یک سرنگ همیلتون به حجم 0/1 میکرو لیتر/موش به داخل هیپوکمپ پستی تزریق شد. از روز پنجم آزمایش‌های رفتاری آغاز گردید.

تست ماز به علاوه‌ای مرتفع (Elevated Plus Maze; EPM) این آزمایش برای تعیین میزان اضطراب در موش‌های کوچک و بزرگ آزمایشگاهی طراحی شده است. برای آزمایش از یک ماز چوبی که در ارتفاع 50 سانتی متری از سطح زمین قرار دارد استفاده شد. این ماز از دو بازوی باز و دو بازوی بسته تشکیل شده است. عرض بازوها برای موش‌های کوچک، 5 سانتی متر است. طول بازوها برای موش‌های کوچک 30 سانتی متر است. بازوها در قسمت وسط با یک چهار راه  $10 \times 10$  سانتی متری به هم می‌رسند. در اطراف بازوی بسته، صفحاتی به طول 30 و عرض 15 سانتی متر قرار دارند. کل آزمون ماز مرتفع 5 دقیقه است. حیوان به طریقی بر روی ماز قرار داده می‌شود که به طرف بازوی بسته باشد. دو پارامتر در این تست ثبت گردید: تعداد ورود به بازوی بسته و تعداد ورود به بازوی باز. ملاک ورود قرار گرفتن اندام‌های جلویی و عقبی در آن قسمت بود.

تست شنای اجباری (Forced Swimming Test):

این آزمایش برای القاء افسردگی ناشی از استرس شدید در موش‌های کوچک و بزرگ آزمایشگاهی طراحی شده است. برای آزمایش از یک ظرف شیشه‌ای یا پلاستیکی گلاس روشن به ارتفاع 25-30 سانتی متر و قطر 12-30 سانتی متر که تا ارتفاع 8-15 سانتی متر از آب 25 درجه سانتی گراد پر شده بود استفاده گردید. حیوان از ارتفاع 20

ناحیه هیپوکمپ پستی تزریق می‌شد؛ ولی موش‌ها استرس دریافت نمی‌کرد. 6. گروه استرس ال-نیم: ال-نیم در دوزهای 1، 5 و 10 میکرو گرم/موش به صورت دوطرفه در ناحیه هیپوکمپ پستی 5 دقیقه قبل از استرس تزریق می‌شد (به مدت 4 روز).

جراحی

حیوانات ابتدا با تزریق کنامین (50 میلی گرم/کیلوگرم) و دیازپام (5 میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شده و سپس موی سر آن‌ها تراشیده و در داخل دستگاه استریوتاگس تحت عمل جراحی قرار گرفتند. دو عدد کانول در ناحیه هیپوکمپ پستی آن‌ها با استفاده از اطلس پاکسینوس موش قرار گرفت. این کانول‌ها با استفاده از آکریل دندانپزشکی و یک عدد پیچ عینک در جای خود محکم شدند. یک هفته بعد از ریکاوری، القای استرس به روش شوک الکتریکی کف پا و به صورت غیرقابل اجتناب در این حیوانات انجام گرفت. برای این منظور، در روز اول حیوانات را توزین کرده و آن‌ها را داخل دستگاه القاء استرس قرار دادیم. دستگاه القاء استرس از جنس پلکسی گلس است که از 9 بخش تشکیل شده است (ساخته شده توسط شرکت برج صنعت-تهران، ایران). هر بخش توسط سوراخ‌های کوچکی با بخش‌های دیگر در ارتباط است که امکان ارتباط بویایی و شنیداری حیوان با حیوانات درون بخش‌های دیگر را فراهم می‌آورد. دیواره‌های بخش‌های دستگاه القاء استرس شفاف بوده که امکان ارتباط دیداری حیوانات با هم را فراهم می‌کند. قسمت تحتانی دستگاه دارای میله‌هایی از جنس استیل است که مجموعه آن‌ها توسط سیمی به دستگاه مولد شوک الکتریکی یا همان الکتروشوک متصل است. دستگاه الکتروشوک، دستگاهی است که جریان الکتریکی را با ولتاژ 60 میلی ولت و فرکانس 10 هرتز تولید کرده و از طریق کابل رابطه به دستگاه القاء استرس منتقل می‌کند. مدت زمان استرس نیز توسط این دستگاه قابل تنظیم است. پس از آنکه حیوانات را در دستگاه قرار دادیم، 30 دقیقه به

غلظت BDNF توسط کیت مخصوص، به فریزر با دمای 80- درجه سانتی گراد منتقل شدند. سپس نمونه‌ها در محلول بافر فسفات سرد توسط دستگاه مخصوص (Shimifan محصول ایران) با دور 220، هموژنیزه شدند. بعد از آن نمونه‌های هموژنیزه شده به داخل اپندورف منتقل شدند و در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای 4 درجه سانتی گراد با دور 3000 و به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی این نمونه‌ها جدا شد و توسط کیت مخصوص تعیین غلظت BDNF، مورد بررسی و سنجش قرار گرفت. سطح BDNF مغز به روش الیزا یا استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش کوچک آزمایشگاهی (ساخت شرکت کازایو چین) طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت کیت 7/81 پیکوگرم در میلی لیتر و ضریب تغییرات 7/9 درصد بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز گردید. اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (-Two way ANOVA) و تست متعاقب توکی استفاده شد.  $P < 0/05$  به عنوان مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

اثر تجویز داخل هیپوکمپ پستی ال-آرژنین بر رفتار شبه-اضطرابی به دنبال استرس با استفاده از ماز مرتفع بعلاوه ای شکل:

تزریق ال-آرژنین به صورت دو طرفه در هیپوکمپ پستی پنج دقیقه قبل از استرس و هم چنین در شرایط بدون استرس انجام شد. نتایج نشان داد که تزریق ال-آرژنین در غلظت های 5 و 10 میکروگرم/موش در هیپوکمپ پستی در شرایط

سانتی متری سطح آب به ملایمت درون آب رها می‌شد. انجام حرکت به معنای تلاش و قطع حرکات دست و پای موش به عنوان ناامیدی (بی حرکت شدن) در نظر گرفته شد. کل آزمون شنای اجباری 6 دقیقه است. در دو دقیقه نخست که برای تطابق حیوان با شرایط موجود در نظر گرفته شده است، زمان بی حرکتی ثبت نمی‌شد. زمان بی حرکتی برای 4 دقیقه بعدی اندازه‌گیری می‌شد. در روز نخست آزمایش، حیوانات درون ظرف آب رها شده و 15 دقیقه بعد از آب خارج و پس از خشک شدن به محل‌های نگهداری بازگشت داده می‌شدند. در روز دوم، حیوانات درون ظرف آب رها شده، دو دقیقه نخست برای آن‌ها ثبت نمی‌شد و در 4 دقیقه بعد تمامی حرکات حیوانات ثبت و زمان بی حرکتی از کم کردن زمان حرکت از کل زمان (4 دقیقه) محاسبه می‌شد. سه نوع حرکت در حیوانات ثبت گردید: شنا کردن (Swimming)، کوشش کردن (Struggling) و غوطه‌وری (Floating) که اندازه‌گیری هر کدام به طور جداگانه انجام شد.

روش تزریق درون مغزی:

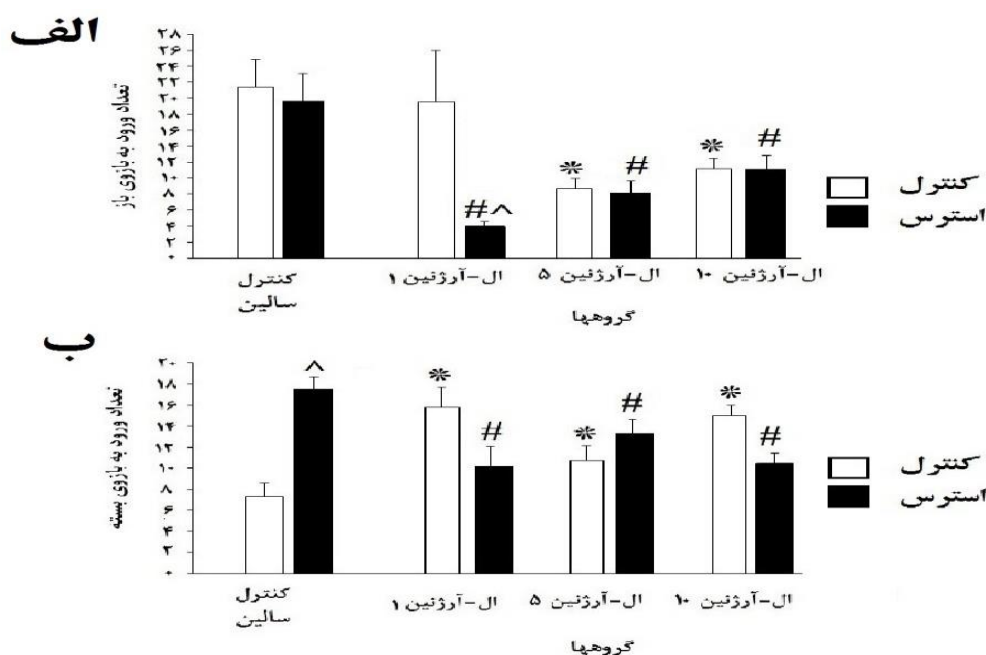
تزریق دارو به داخل نواحی کانول گذاری شده، از طریق یک کانول تزریق Gage 30 که توسط یک رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون وصل شده بود، صورت گرفت. در ابتدا لوله پلی اتیلنی و کانول تزریق از ال-آرژنین یا ال-نیم پر شد. هنگام تزریق حیوانات به آرامی با دست مهار شدند و سیم فولادی از داخل کانول راهنما خارج شد سپس کانول تزریق در کانول راهنما تعبیه و دارو به آرامی توسط سرنگ هامیلتون با حجم‌های معین به مدت 60 ثانیه تزریق شد، در طول تزریق حیوانات حرکت آزادانه داشتند. پس از اتمام تزریق کانول تزریق به مدت 60 ثانیه جهت انتشار دارو در محل باقی ماند سپس به آرامی خارج شد.

روش جداسازی و هموژنیزه مغز:

پس از انجام آزمون‌های رفتاری حیوانات بیهوش شدند و مغز آن‌ها خارج گردید، سپس بلافاصله مغز را داخل تانک نیتروژن قرار دادیم و بعد از آن، مغز تا زمان سنجش میزان

هیپوکمپ پستی در شرایط بدون استرس سبب افزایش معنی دار تعداد ورود حیوان به بازوی بسته در دوز های 1 (15/0±83/19)، 5 (10/1±71/45) و 10 (15/0±01/94) میکروگرم/موش نسبت به گروه کنترل (7/0±33/91) شد. از طرفی تزریق ال-آرژنین در ناحیه هیپوکمپ پستی در شرایط استرس سبب کاهش معنی دار تعداد ورود حیوان به بازوی بسته در دوز های 1 (11/2±02/03)، 5 (14/1±33/45) و 10 (11/0±28/96) میکروگرم/موش نسبت به گروه استرس (18/1±33/57) گردید (شکل 1-ب). آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل (Interaction) گروه (استرس) و دوز ها مختلف ال-آرژنین در تعداد ورود حیوان به بازوی بسته از نظر آماری معنی دار ( $P<0/05$ ) نبود.

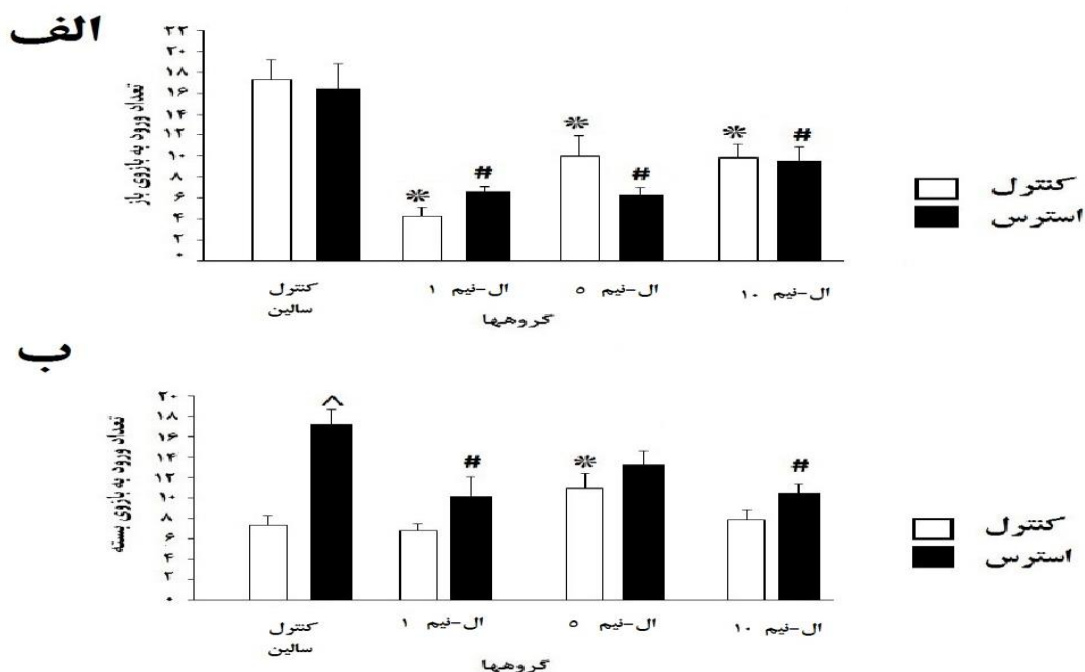
بدون استرس به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) تعداد ورود به بازوی باز را در مقایسه با گروه کنترل (21/33±3/3) کاهش داد (11/2±2/03, 8/1±6/3, 19/6±6/36) در ترتیب در گروه های 1، 5 و 10 میکروگرم/موش). نتایج حاصل از آزمون واریانس دو طرفه در مطالعه حاضر نشان داد که تزریق ال-آرژنین در غلظت های 1، 5 و 10 میکروگرم/موش در هیپوکمپ پستی در شرایط استرس به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) تعداد ورود به بازوی باز را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (10/5±1/28, 12/1±14/58, 11/1±33/30) به ترتیب در گروه های 1، 5 و 10 میکروگرم/موش (شکل 1-الف). از طرفی آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل (Interaction) گروه (استرس) و دوز ها از نظر آماری فقط در دوز 1 میکروگرم/موش معنی دار ( $P<0/05$ ) بود. علاوه بر این نتایج حاضر نشان داد که تزریق ال-آرژنین در ناحیه



شکل 1. اثرات تزریق دو طرفه ال-آرژنین در غلظت های 1، 5 و 10 میکروگرم/موش در ناحیه هیپوکمپ پستی در شرایط با و بدون استرس در تست ماز مرتفع بعلاوه ای شکل بر رفتارهای شبه-اضطرابی. الف) تعداد ورود به بازوی بسته (ب) تعداد ورود به بازوی بسته.  $P<0/05$  نشان دهنده تفاوت بین گروه های کنترل و استرس.  $P<0/05$  \*نسبت به گروه کنترل.  $P<0/05$  #نسبت به گروه استرس.  $P<0/05$  ^ نشان دهنده تفاوت بین گروه های کنترل و استرس.

ال-نیم سبب ایجاد رفتارهای اضطرابی در حیوانات گروه استرس نسبت به گروه‌های کنترل شد. نتایج نشان داد که تزریق دو طرفه ال-نیم در ناحیه هیپوکمپ پستی در شرایط بدون استرس فقط در دوز 5 میکروگرم/موش ( $11/1 \pm 03/39$ ) سبب افزایش معنی دار ( $P < 0/05$ ) تعداد ورود حیوان نسبت به گروه کنترل ( $7/12 \pm 0/97$ ) شد. همان‌طور که در شکل 2-ب مشاهده می‌شود تزریق ال-نیم در ناحیه هیپوکمپ پستی در شرایط استرس سبب کاهش معنی دار ( $P < 0/05$ ) تعداد ورود حیوان به بازوی بسته در دوز های 1 ( $12/02 \pm 0/8$ )، 5 ( $7/5 \pm 0/71$ ) و 10 ( $10/1 \pm 08/52$ ) میکروگرم/موش نسبت به گروه استرس ( $20/1 \pm 66/25$ ) گردید. آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل گروه (استرس) و دوزها مختلف ال-نیم در تعداد ورود حیوان به بازوی باز و بازوی بسته از نظر آماری معنی دار ( $P < 0/05$ ) نبود.

اثر تجویز داخل هیپوکمپ پستی ال-نیم بر رفتار شبه-اضطرابی به دنبال استرس با استفاده از ماز مرتفع بعلاوه ای شکل: تعداد ورود به بازوی باز در ماز مرتفع بعلاوه ای شکل در تمام گروه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنان که در شکل 2-الف نشان داده شده است موش هایی که به صورت دو طرفه در هیپوکمپ پستی ال-نیم را دریافت کرده بودند در دوز های 1 ( $11/02 \pm 2/03$ )، 5 ( $14/33 \pm 1/45$ ) و 10 ( $11/0 \pm 28/96$ ) میکروگرم/موش ( $18/33 \pm 1/57$ ) به طور معنی داری ( $P < 0/05$ ) تعداد ورود به بازوی باز نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. موش هایی که به صورت دو طرفه در هیپوکمپ پستی دوزهای مختلف ال-نیم را پنج دقیقه قبل از استرس دریافت کرده بودند، کاهش معناداری ( $P < 0/05$ ) را در ورود به بازوی باز نسبت به گروه کنترل ( $21/66 \pm 3/34$ ) نشان دادند؛ بنابراین تزریق



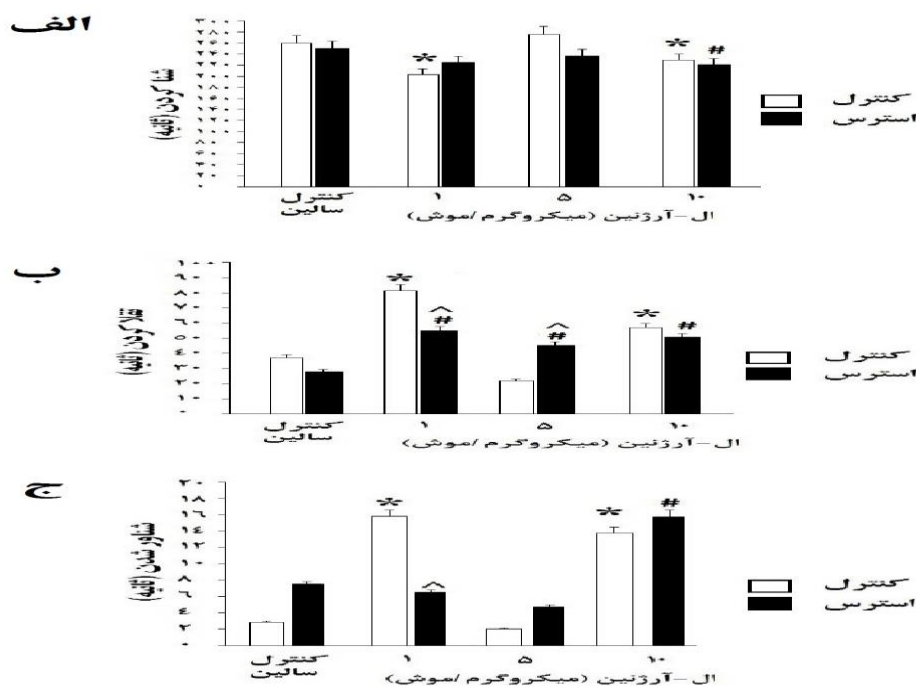
شکل 2. اثرات تزریق دو طرفه ال-نیم در غلظت های 1، 5 و 10 میکروگرم/موش در ناحیه هیپوکمپ پستی در شرایط با و بدون استرس در تست ماز مرتفع بعلاوه ای شکل بر رفتارهای شبه-اضطرابی. الف) تعداد ورود به بازوی باز. ب) تعداد ورود به بازوی بسته.

گروه  $n=7$ ،  $P<0/05$ \* نسبت به گروه کنترل.  $P<0/05$ # نسبت به گروه استرس.  $P<0/05$ ^ نشان دهنده تفاوت بین گروه های کنترل و استرس.

کرده بودند، فقط در دوز 10 ( $233/11\pm16/02$ ) میکرو گرم/موش کاهش معناداری ( $P<0/05$ ) را در مدت زمان شنا کردن نسبت به گروه کنترل ( $21/66\pm3/34$ ) نشان دادند. همچنین، نتایج نشان داد که تزریق دوطرفه با ال-آرژنین در هیپوکمپ پشتی پنج دقیقه قبل از استرس به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) در دوزهای 1 ( $55/3\pm7/2$ )، 5 ( $45/9\pm5/6$ ) و 10 ( $50/8\pm4/9$ ) میکرو گرم/موش مدت زمان تقلا کردن را نسبت به گروه کنترل ( $28/4\pm1/01$ ) افزایش می دهد. مدت زمان غوطه وری فقط در دوز 10 میکرو گرم/موش ( $16/06\pm2/1$ ) نسبت به گروه کنترل ( $7/6\pm0/6$ ) افزایش یافت؛ بنابراین به نظر می رسد تزریق دوز 10 میکرو گرم/موش 5 دقیقه قبل از استرس باعث شنای کمتر و تقلا و غوطه وری بیشتری در حیوانات در تست شنای اجباری می شود که نشان دهنده افسردگی بیشتر در آنها است. از طرفی آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل گروه (استرس) و دوزهای مختلف ال-آرژنین در تقلا کردن و شناور شدن در دوزهای 1 و 5 میکرو گرم/موش از نظر آماری معنی دار ( $P<0/05$ ) بود.

اثر تجویز داخل هیپوکمپ پشتی ال-آرژنین بر افسردگی در موش های تحت استرس در تست شنای اجباری: نتایج مطالعه حاضر در تست شنای اجباری نشان داد که تزریق دو طرفه ال-آرژنین در هیپوکمپ پشتی در غلظت های 1 ( $202/8\pm15/3$ ) و 10 ( $229/14\pm13/8$ ) میکرو گرم/موش در شرایط بدون استرس به طور معنی داری ( $P<0/05$ ) مدت زمان شنا کردن (swimming) را در مقایسه با گروه کنترل ( $260/56\pm16/3$ ) کاهش می دهد (شکل 3-الف). از طرفی تیمار با ال-آرژنین به طور قابل توجهی در دوزهای 1 ( $81/4\pm12/3$ ) و 10 ( $57/5\pm12/3$ ) میکرو گرم/موش مدت زمان تقلا کردن (struggling) را نسبت به گروه کنترل ( $37/15\pm2/3$ ) افزایش داد (شکل 3-ب). همچنین مدت زمان غوطه وری (floating) در دوزهای 1 ( $15/8\pm2/1$ ) و 10 ( $13/1\pm8/3$ ) میکرو گرم/موش نسبت به گروه کنترل ( $2/0\pm8/05$ ) افزایش یافت (شکل 3-ج)؛ بنابراین تزریق دوزهای 1 و 10 میکرو گرم/موش شنای کمتر و تقلا و غوطه وری بیشتری داشتند که نشان دهنده افسردگی بیشتر در آنها است.

حیوانانی که به صورت دو طرفه در هیپوکمپ پشتی دوزهای مختلف ال-آرژنین را پنج دقیقه قبل از استرس دریافت



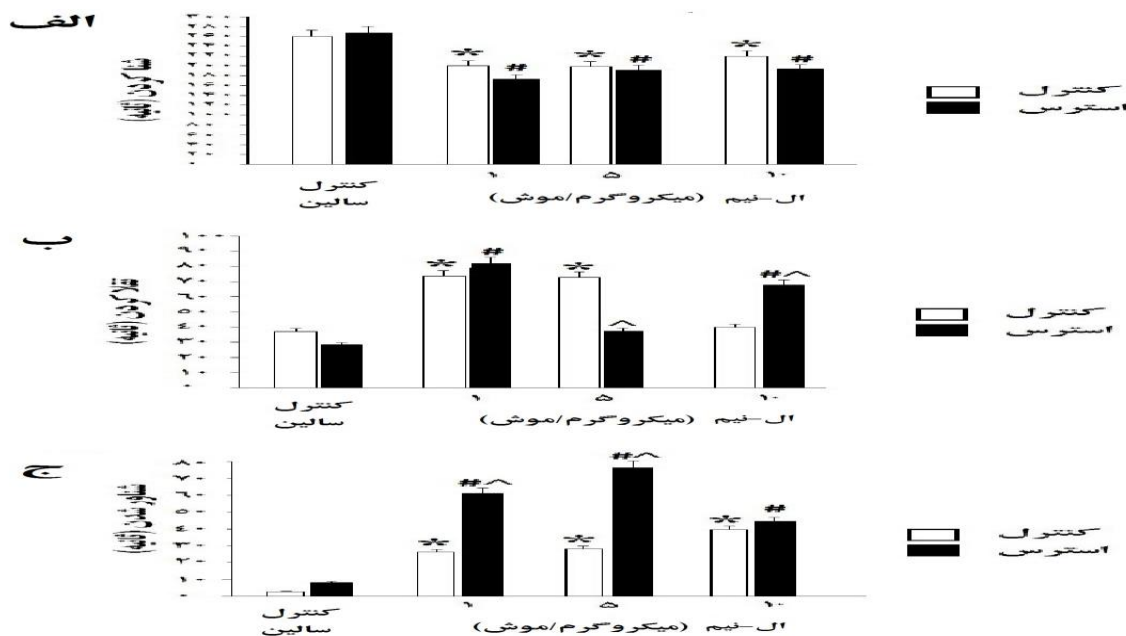
شکل 3: مقایسه میانگین مدت زمان شنا کردن (الف)، تقلا کردن (ب) و شناور شدن (ج) به دنبال تجویز داخل هیپوکمپ پستی ال-آرژنین در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش طی آزمون شنای اجباری در شرایط بدون استرس و استرس شوک الکتریکی کف پا در موش‌های نر. گروه n=7.  $P<0/05$  نسبت به گروه کنترل.  $P<0/05$  نسبت به گروه استرس.  $P<0/05$  نشان دهنده تفاوت بین گروه‌های کنترل و استرس.

اثر تجویز داخل هیپوکمپ پستی ال-نیم بر افسردگی در موش‌های تحت استرس در تست شنای اجباری: مطالعه آنالیز واریانس دو طرفه وجود اختلاف کاملاً معنی داری را بین گروه‌های کنترل و دوزهای مختلف ال-نیم در مدت زمان شنا کردن طی آزمون شنای اجباری نشان داد. در این آزمون مدت زمان شنا کردن حیوان در گروه‌های 1 (200/6±8/5)، 5 (199/9±7/2) و 10 (220/3±4/9) میکروگرم/موش ال-نیم به مراتب کمتر از گروه کنترل (260/11±6/9) می‌باشد ( $P<0/05$ ) (شکل 4-الف). همچنین بین گروه‌های دریافت کننده دوزهای 1 (73/9±4/8) و 5 (72/6±10/2) میکروگرم/موش ال-نیم با گروه کنترل (37/1±2/06) اختلاف معنی داری ( $P<0/05$ ) در تقلا کردن دیده می‌شود (شکل 4-ب). علاوه بر این مدت زمان شناور شدن (غوطه وری) نیز در گروه کنترل نسبت به گروه‌های دارویی به طور معنی داری کمتر بود ( $P<0/05$ ) (شکل 4-ج)؛ به عبارتی تیمار با ال-نیم در ناحیه هیپوکمپ پستی در هر سه دوز مختلف 1 (26/3±4/5)، 5 (28/6±4/1) و 10 (39/6±5/3) میکروگرم/موش باعث افزایش معنی‌داری در مدت زمان غوطه وری نسبت به گروه کنترل (2/8±0/3) شد. همان‌طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود نتایج حاضر از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق ال-نیم در هر سه دوز 1 (171/9±3/5)، 5 (189/11±5/3) و 10 (191/12±9/2) میکروگرم/موش در هیپوکمپ پستی در حیوانات تحت استرس سبب کاهش معنی‌دار ( $P<0/05$ ) شنا کردن نسبت به گروه کنترل (264/1±13/2) می‌شود. از طرفی مدت زمان تقلا کردن (81/6±10/1)، 1/3±37/4، 2/9±28/1 و 3/2±67/7 به ترتیب در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش و کنترل و شناور شدن (57/01±12/1)، 4/57±71/3، 9/41±41/6 و

اثر تجویز داخل هیپوکمپ پستی ال-نیم بر افسردگی در موش‌های تحت استرس در تست شنای اجباری: مطالعه آنالیز واریانس دو طرفه وجود اختلاف کاملاً معنی داری را بین گروه‌های کنترل و دوزهای مختلف ال-نیم در مدت زمان شنا کردن طی آزمون شنای اجباری نشان داد. در این آزمون مدت زمان شنا کردن حیوان در گروه‌های 1 (200/6±8/5)، 5 (199/9±7/2) و 10 (220/3±4/9) میکروگرم/موش ال-نیم به مراتب کمتر از گروه کنترل (260/11±6/9) می‌باشد ( $P<0/05$ ) (شکل 4-الف). همچنین بین گروه‌های دریافت کننده دوزهای 1 (73/9±4/8) و 5 (72/6±10/2) میکروگرم/موش ال-نیم با گروه کنترل (37/1±2/06) اختلاف معنی داری ( $P<0/05$ ) در تقلا کردن دیده می‌شود (شکل 4-ب). علاوه بر این مدت زمان شناور شدن (غوطه وری) نیز در گروه کنترل نسبت به گروه‌های دارویی به طور معنی داری

طرفی آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل گروه (استرس) و دوزها در تقلا کردن در دوزهای 5 و 10 میکروگرم/موش و در شناور شدن در دوزهای 1 و 5 میکروگرم/موش از نظر آماری معنی دار ( $P < 0/05$ ) بود.

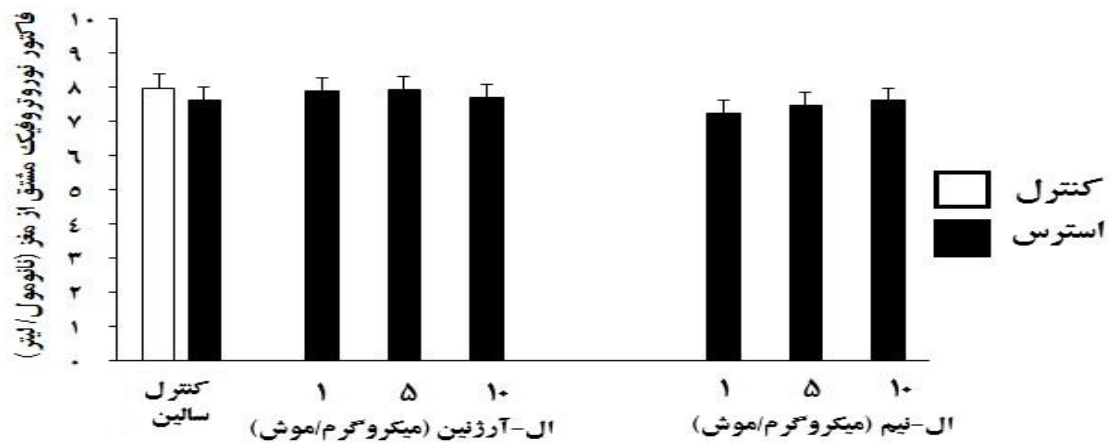
$7/0 \pm 6/9$  به ترتیب در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش و کنترل) را به طور معنی داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش داد؛ بنابراین نتایج نشان داد که تزریق داخل هیپوکمپ پشتی ال-نیم رفتارهای شبه-افسردگی را در حیوانات تحت استرس افزایش می دهد. از



شکل 4: مقایسه میانگین مدت زمان شنا کردن (الف)، تقلا کردن (ب) و شناور شدن (ج) به دنبال تجویز داخل هیپوکمپ پشتی ال-نیم در دوزهای 1، 5 و 10 میکروگرم/موش طی آزمون شنای اجباری در شرایط بدون استرس و استرس شوک الکتریکی کف پا در موش های نر. گروه  $n = 7$ ،  $P < 0/05$ \* نسبت به گروه کنترل.  $P < 0/05$ # نسبت به گروه استرس.  $P < 0/05$ ^ نشان دهنده تفاوت بین گروه های کنترل و استرس.

اندازه گیری شد. نتایج بررسی آماری نشان داد که میزان غلظت BDNF در گروه کنترل بیشتر از سایر گروهها بود؛ اما این افزایش در میزان غلظت BDNF از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ) (شکل 5).

اثر تجویز ال-آرژنین و ال-نیم بر تغییرات میزان BDNF: پس از اتمام آزمایشها، مغز موشها در گروههای مختلف خارج و در بافر فسفات سرد هموژنیزه شد و میزان غلظت BDNF آنها توسط کیت مخصوص و به روش الایزا



شکل 5. اثر تجویز ال-آرژنین و ال-نیم بر تغییرات میزان BDNF مغز در موش‌های استرس دیده. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود هیچ‌گونه تغییرات معنی‌داری در میزان غلظت BDNF مغز دیده نمی‌شود.

## بحث

تقلا کردن در دوز 1 میکروگرم/موش در بین گروه استرس و کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود. در حالی که دوز 5 میکروگرم/موش فقط در تقلا کردن در بین دو گروه متفاوت عمل کرده بود؛ اما دوز 5 میکروگرم/موش ال-نیم در تقلا کردن و شناور شدن بین گروه کنترل و استرس متفاوت عمل کرده است.

همسو با مطالعه حاضر، مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که انواع مختلفی از مدل‌های استرس از قبیل شوک الکتریکی، استرس بی‌حرکتی و یا استرس‌های اجتماعی سبب بروز رفتارهای شبه اضطرابی و شبه افسردگی در حیوانات می‌شود (15-17).

در این مطالعه نقش سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پستی بر رفتارهای اضطرابی و افسردگی به دنبال استرس مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ما نشان داد که تزریق ال-آرژنین یا ال-نیم به ناحیه هیپوکامپ پستی موش در استرس شوک الکتریکی کف‌پای باعث کاهش تعداد ورود به بازوی با ارتفاع و افزایش ورود به بازوی بسته در ماز بعلاوه مرتفع می‌شود. نتایج تعداد ورود به بازوی با ارتفاع داد که دوز 1 میکروگرم/موش ال-آرژنین در گروه استرس و

تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر نیتریک اکساید موجود در ناحیه هیپوکامپ پستی بر تغییرات رفتارهای افسردگی و اضطراب در موش‌های استرس دیده انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که استرس شوک الکتریکی به کف‌پای حیوان برای چهار روز پشت سر هم سبب افزایش ورود به بازوی بسته و نیز کاهش ورود به بازوی با ارتفاع شد. علاوه بر این، استرس شوک الکتریکی به کف‌پای حیوان، سبب کاهش معنی‌دار مدت زمان شنا کردن و افزایش غوطه‌وری و تقلا کردن در تست شنای اجباری گردید؛ بنابراین، نتایج حاصل از تست ماز مرتفع بعلاوه ای شکل نشان داد که استرس شوک الکتریکی به کف‌پای حیوان، توانسته است سبب ایجاد رفتارهای شبه-اضطرابی در حیوانات شود. همچنین، نتایج حاصل از تست شنای اجباری نشان داد استرس شوک الکتریکی به کف‌پای حیوان، توانسته است سبب ایجاد رفتارهای شبه-افسردگی در حیوانات شود. از طرفی آزمون واریانس دو طرفه نشان داد که اثر متقابل گروه و دوز‌های مختلف ال-آرژنین در

NOS است، باعث القاء اضطراب می‌شود (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که NO رهایش نورترانسسمیترهای مختلف از جمله دوپامین، گلوتامات، نوراپی نفرین، سروتونین، استیل کولین و گلوتامات را دچار تغییر میکند (۱۸). اگر چه NO می‌تواند رهایش گلوتامات را افزایش دهد؛ اما افزایش شدید تولید NO باعث مهار عملکرد گیرنده‌های NMDA می‌شود (۲۴). پاسخ افسردگی و اضطرابی یکسانی که توسط ال-آرژنین و ال-نیم در هیپوکامپ پستی موش مشاهده شده است، نشان دهنده نقش تعدیل کننده نیتریک اکساید در هیپوکامپ پستی در زمینه رفتار اضطرابی و افسردگی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که NO در هیپوکامپ پستی با سیستمهای نوروترانسسمتری مختلفی که در تعدیل اضطراب و افسردگی نقش دارند، برهمکنش دارد (۲۵)؛ به عبارتی می‌توان گفت علت پاسخ یکسانی که توسط ال-آرژنین و ال-نیم در زمینه رفتار اضطرابی و افسردگی در استرس رخ داده است، می‌تواند نقش تعدیل کننده NO در هیپوکامپ پستی در استرس و برهمکنش پیچیده بین نیتریک اکساید و نوروترانسسمیترهایی باشد که رفتار اضطرابی و افسردگی را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ بنابراین یک همگرایی کلی درباره دخالت مؤثر NO در زمان رفتارهای افسردگی و اضطرابی وجود دارد. بخش بعدی تحقیق ما نشان داد که میزان BDNF مغز در گروه‌های دریافت کننده ال-آرژنین و ال-نیم از گروه کنترل کمتر بود؛ البته این کاهش معنی دار نبود. BDNF فاکتور رشدی است که به بیومارکر افسردگی نیز شهرت دارد و کاهش آن در مغز و در پلاسما نیز قابل مشاهده است و به معنای وجود افسردگی است. همچنین کارآمدی داروهای ضد افسردگی را با تأثیر این داروها در تغییر غلظت

کنترل متفاوت عمل کرده است. این نتایج نشان دهنده این است که تزریق ال-آرژنین یا ال-نیم بصورت وابسته به دوز در هیپوکامپ پستی موش می‌تواند باعث القاء اضطراب می‌گردد. نتایج ما در این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که تزریق دوز های مختلف ال-آرژنین یا ال-نیم سبب افزایش رفتارهای افسردگی در تست شنای اجباری به دنبال استرس شوک الکتریکی کف پا می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند که فعال شدن گیرنده های-N (NMDA methyl-D-aspartate) باعث فعال شدن آنزیم NOS و افزایش تولید NO می‌گردد و خود NO نیز باعث رهایش نورترانسسمیترهای مختلف از جمله دوپامین، استیل کولین و گلوتامات می‌شود (۱۸). مطالعاتی نشان داده‌اند که تزریق سیستمیک یا تزریق درون بطنی ال-آرژنین رفتار شبه-اضطرابی را در ماز بعلاوه ای مرتفع تغییر می‌دهند (۱۹). همسو با مطالعه حاضر روحبخش و همکاران نشان داده‌اند که تزریق ال-آرژنین به ناحیه هیپوکامپ پستی در موش صحرایی باعث القاء اضطراب می‌شود (۲۰). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق ال-نیم به عنوان یک مهار کننده NOS، باعث القاء رفتارهای شبه-اضطرابی و افسردگی می‌گردد. نتایج ما همراستا با مطالعات دیگری است که نشان می‌دهند، تزریق سیستمیک مهار کننده NOS باعث القاء اضطراب در مدل ماز بعلاوه‌های شکل مرتفع می‌شود (۲۱). مطالعه دیگری نشان داد که تزریق سیستمیک ال-نیم نه تنها تأثیری بر پارامترهای اضطرابی در مدل ماز بعلاوه‌های شکل نداشت بلکه نتوانست مانع اثرات ضد اضطرابی لوزاران شود (۲۲). از طرفی نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهند تزریق درون صفاقی ان جی-نیترو ال-آرژنین که یک مهار کننده

رشته‌های عصبی در بیماری آلزایمر است (32). میراندا و همکاران پیشنهاد کردند که NO به طور مستقیم به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند؛ بنابراین در سلول‌های پستانداران از آسیب سلولی ایجاد شده به وسیله رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند با این حال، اثر محافظتی NO در محدوده مقادیر کم آن میانجی‌گری می‌شود (33). در این راستا الیونزا و همکاران نشان دادند که اثرات تخریبی استرس محدود کننده مزمن از طریق افزایش میزان NO در قشر مغز میانجی‌گری می‌شود و همچنین یافته‌ها حمایت کننده نقش مهارکننده‌های آنزیم NOS در حفاظت عصبی در موقعیت‌های استرس‌زا می‌باشند (34). در همین راستا مطالعات نشان می‌دهد که تولید بالای نیتریک اکساید در هیپوکمپ حیوانات در معرض استرس مزمن منجر به توقف نورون‌زایی می‌شود در حالی که در موش‌های فاقد ژن nNOS و تحت درمان با مهارکننده تولید نیتریک اکساید این اثر بر می‌گردد (35). در حمایت از این یافته‌ها پیشنهاد کرده‌اند که استرس محدود کننده تکراری باعث افزایش بیان نورون‌های nNOS در نواحی CA1, CA3 و هیپوکمپ و کورتکس انتورینال هیپوکمپ می‌شود و این نتایج نشان‌دهنده این است که هیپوکمپ پستی در تعدیل اثرات استرس شرکت می‌کند (36).

### نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر تأییدی بر نقش سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پستی است که می‌تواند در رفتارهای اضطرابی و افسردگی در حالت‌های طبیعی و استرس تأثیرگذار باشد. از طرفی نتایج نشان داد که تزریق ال-آرژنین و ال-نیم در هیپوکامپ پستی موش باعث القاء اضطراب و افسردگی در استرس شوک الکتریکی کف پا می‌گردد و این نقش تعدیل کننده

پلاسمایی BDNF می‌سنجند (26)؛ بنابراین نقش BDNF در سلامت مغز نقشی انکارناپذیر است. تحقیقات قبل نشان داده‌اند که استرس مزمن میزان BDNF را کاهش می‌دهد (27). مهم‌ترین عملکردهای BDNF شامل اثر تحریک رشد عصبی، محافظت عصبی و زنده ماندن عصب است. در حالی که NO به صورت نرمال به عنوان پیامبر عصبی فیزیولوژیکی عمل می‌کند، تولید اضافی NO آسیب مغزی را به دنبال دارد. NO به عنوان یک رادیکال آزاد به شدت واکنش‌پذیر است و حالت سمی را به وسیله آسیب زدن به آنزیم‌های متابولیکی مهم سبب می‌شود و همچنین از طریق تولید Peroxynitrate موجب اختلال در عملکرد فاکتور رشد عصب (Nerve Growth Factor; NGF) می‌شود. هرگونه اختلال در مسیر عملکردی NGF با بیماری‌های شناختی و آسیب غشاهای نورونی همراه است (28). از طرفی پیشنهاد شده است که NO تولید شده توسط nNOS (neuronal nitric oxides synthase) در دژنره شدن نورون‌ها نقش کلیدی داشته است (29). استرس تولید نیتریک اکساید را در نواحی مختل مغزی تغییر می‌دهد. برای مثال نشان داده شده است که استرس مزمن باعث افزایش بیان آنزیم‌های nNOS و iNOS (inducible nitric oxide synthase) در نئوکورتکس و هیپوکمپ و به دنبال آن اختلال عصبی در حیوانات می‌شود (30). همچنین گزارش شده است که NO می‌تواند در روند پیر شدن طبیعی و روندهای تحلیل عصبی دخالت داشته باشد. به همین دلیل بسیاری از محققین از وجود ارتباط میان سطح تولید NO در مغز و برخی اختلالات شناختی مثل بیماری آلزایمر خبر می‌دهند (31). همچنین در مطالعه‌ای دیگر آمده است که بیان هم‌زمان NOS و p12ras در نورون‌های هر می‌مسئول دژنره شدن

بدینوسیله از حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله تشکر و قدردانی می‌گردد. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (با کد اخلاق IR.BMSU.REC.1395.812) انجام شد. هیچ‌یک از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

NO در هیپوکامپ پستی در استرس ممکن است به دلیل برهمکنش پیچیده بین نیتریک اکساید و نوروترانسمیترهایی باشد که رفتارهای اضطرابی و افسردگی را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ بنابراین بررسی برهمکنش نیتریک اکساید با انواع نوروترانسمیترها در هیپوکامپ پستی در استرس نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

## تشکر و قدردانی

### منابع

1. Dhama K, Latheef SK, Dadar M, Samad HA, Munjal A, Khandia R, et al. Biomarkers in stress related diseases/disorders: diagnostic, prognostic, and therapeutic values. *Front Mol Biosci.* 2019;6:91.
2. McEwen BS, Akil H. Revisiting the stress concept: implications for affective disorders. *J Neurosci.* 2020;40(1):12-21.
3. Liao W, Liu Y, Wang L, Cai X, Xie H, Yi F, et al. Chronic mild stress-induced protein dysregulations correlated with susceptibility and resiliency to depression or anxiety revealed by quantitative proteomics of the rat prefrontal cortex. *Transl Psychiatry.* 2021;11(143):1-10.
4. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1353-63.
5. Cha J, Greenberg T, Song I, Blair Simpson H, Posner J, Mujica-Parodi LR. Abnormal hippocampal structure and function in clinical anxiety and comorbid depression. *Hippocampus.* 2016;26(5):545-53.
6. Kheirbek MA, Hen R. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. *Neuropsychopharmacol.* 2011;36(1):373.
7. Fournier NM, Duman RS. Illuminating hippocampal control of fear memory and anxiety. *Neuron.* 2013;77(5):803-6.
8. Maller JJ, Welton T, Middione M, Callaghan FM, Rosenfeld JV, Grieve SM. Revealing the hippocampal connectome through super-resolution 1150-direction diffusion MRI. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-3.
9. Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:190.
10. Bartus K, Pigott B, Garthwaite J. Cellular targets of nitric oxide in the hippocampus. *PLoS One.* 2013;8(2):e57292.
11. Roohbakhsh A, Moghaddam AH, Massoudi R, Zarrindast MR. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:223-29.
12. Lukasik KM, Waris O, Soveri A, Lehtonen M, Laine M. The relationship of anxiety and stress with working memory performance in a large non-depressed sample. *Front Psychol.* 2019;10:4.

13. Piri M, Nasehi M, Shahab Z, Zarrindast MR. The effects of nicotine on nitric oxide induced anxiogenic-like behaviors in the dorsal hippocampus. *Neurosci Lett*. 2012;528(2):93-8.
14. Jiang C, Salton SR. The role of neurotrophins in major depressive disorder. *Transl Neurosci*. 2013;1:46-58.
15. Bali A, Jaggi AS. Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. *Rev Neurosci*. 2015;26(6):655-77. ;
16. Faraji N, Shiravi A, Bahari Z, Shirvani H, Meftahi GH. Basolateral amygdala  $\alpha 1$ -adrenergic receptor suppression attenuates stress-induced anxiety-like behavior and spine morphology impairment on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroch J*. 2020;14(1):77-89. ;
17. Nazeri M, Ebrahimi A, Aghaei I, Ravandi SG, Shabani M. Psychological stress has a higher rate of developing addictive behaviors compared to physical stress in rat offspring. *EXCLI J*. 2017;16:903-913.
18. Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(8):1949-67.
19. Volke V, Soosaar A, Ko S, Bourin M, Männistö PT, Vasar E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacol*. 1997;131(4):399-405.
20. Roohbakhsh A, Moghaddam AH, Massoudi R, Zarrindast MR. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:223-29.
21. Pokk P, Vali M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*. 2002;26:241-47.
22. Aghaei I, Arjmand S, Yousefzadeh Chabok S, Tondar M, Shabani M. Nitric oxide pathway presumably does not contribute to antianxiety and memory retrieval effects of losartan. *Behav Pharmacol*. 2017;28(6):420-7.
23. Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*. 2001;22:1043-47.
24. Bergstrom HC, Darvesh AS, Berger SP. Inducible nitric oxide inhibitors block NMDA antagonist-stimulated motoric behaviors and medial prefrontal cortical glutamate efflux. *Front Pharmacol*. 2015;6:292.
25. Moreira FA, Molchanov ML, Guimaraes FS. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol (Berl)*. 2004;171:199-203.
26. Eero Castrén, Lisa M. Monteggia Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry*. 2021;90(2):128-136.
27. Miao Z, Wang Y, Sun Z. The relationships between stress, mental disorders, and epigenetic regulation of BDNF. *Inter J Mol Sci*. 2020;21(4):1375.
28. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
29. Liu C Liang MC, Soong TW. Nitric oxide, iron and neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2019;13:114.,

30. Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Bugajski A, Bugajski J. Chronic isolation stress affects subsequent crowding stress-induced brain nitric oxide synthase (NOS) isoforms and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis responses. *Neurotoxic Res.* 2019;36(3):523-39.
31. Dubey H, Gulati K, Ray A. Alzheimer's disease: A contextual link with nitric oxide synthase. *Curr Mol Med.* 2020;20(7):505-15.
32. Luth HJ, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T. Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res.* 2000;852(1):45-55.
33. Iranda KM, Espey MG, Wink DA. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J Inorganic Biochem* 2000;79(1-4):237-40.
34. Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem.* 2000;74(2):785-91.
35. Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem.* 2007;103(5):1843-54.
36. Echeverry MB, Guimaraes FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neurosci.* 2004;125(4):981-93.