

# بررسی غلظت نیتریک اکساید در طی سیکل استروس و تأثیر آن بر اضطراب در موش‌های صحرایی ماده

دکتر حمیدرضا صادقی پورودسری (استاد)\*، دکتر احمدرضا دهپور (استاد)\*\*، دکتر احمد رضا طاهری (استادیار)، نسرین فلاحی

(کارشناس)\*، محسن وثوقی (استادیار)\*\*\*

\* گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\* گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\* دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## چکیده

**مقدمه:** نیتریک اکساید به عنوان یک نوروترانسمیتر و نورومدولاتور در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک ایفاء نقش میکند و تاکنون عملکردهای متعددی بدان نسبت داده شده است هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر هورمون‌های استروئیدی آندوژن بر غلظت NO و میزان اضطراب بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از ۴۰ سر موش صحرایی ماده استفاده شد که با توجه به چهار مرحله سیکل جنسی این حیوانات برای هر گروه ده سر موش صحرایی سالم با سه سیکل جنسی طبیعی در نظر گرفته شد. بعد از گرفتن اسمیر واژینال و تعیین مراحل سیکل، آزمون اضطراب انجام شد. برای تعیین میزان نیتريت و نیترات از حیوانات خونگیری بعمل آمد.

**یافته‌ها و نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که میزان اضطراب در طول سیکل جنسی این حیوانات تحت تأثیر هورمون‌های استروئیدی آندوژن متغیر بوده و یکی از مکانیسم‌های عمده در ایفاء این تغییرات نیتریک اکساید می‌باشد.

## مقدمه

و افسردگی به میزان دو برابر آسیب پذیرترند و این آسیب‌پذیری در دوره‌هایی از عمر مانند بلوغ، قبل از عادت ماهیانه، قبل و بعد از یائسگی و در حین حاملگی و بعد از زایمان افزایش می‌یابد (۱،۲).

میزان شیوع اضطراب در زنان ۱۵/۵٪ و در مردان ۱۱/۱٪ می‌باشد و بدیهی است که اضطراب شانس ابتلا به افسردگی، اختلالات پانیک و سوءمصرف مواد را افزایش می‌دهد (۳).

با آن که مطالعات سایکوبیولوژی مربوط به جنس در آغاز راه خود می‌باشد اما جدیداً محققان و روان‌پزشکان در زمینه اختلالات اضطرابی به تفاوت‌های جنسی توجه بیشتری نشان می‌دهند. مطالعات آنان نشان می‌دهند که زنان در تمامی مراحل زندگی در مقایسه با مردان نسبت به اختلالات خلق، اضطراب

۲- تعداد ورود به بازوی باز به کل ورودی‌ها (B) (۷۸). این دو شاخص اصلی به روش مشاهده و سنجش و نمره دادن ثبت گردید و در انتها جهت سنجش غلظت نیتريت و نیترات سرم نمونه‌های خون گرفته شد و پس از جدا نمودن سرم با استفاده از روش رنگ سنجی و استفاده از معرف اسپیدی Griess (با شماره L050150 - ۰۰۴ - ۴۰۰ ساخت شرکت دارویی Alexies) و توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در محدوده جذب ۵۵۰ نانومتر غلظت نیتريت و نیترات مورد سنجش قرار گرفتند (۱۰،۹).

### روش تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه داده‌های آماری در چهار گروه مورد آزمایش، از آنالیز واریانس یک طرفه و از تست توکی (Tukey Test) به عنوان Post Test استفاده شد.

امروزه تغییرات رفتار، خلق و سطح اضطراب متعاقب وقایع بیولوژیک مانند بلوغ، حاملگی، یائسگی، عادت ماهیانه پدیدهای کاملاً شناخته شده است که می‌تواند مربوط به تغییر مقدار و یا نسبت هورمون‌های جنسی باشد (۶،۵،۴). برای پی بردن به نقش هورمون‌های جنسی در ایجاد اضطراب مدل‌های حیوانی رایج متکی بر حذف غدد جنسی و سپس تزریق هورمون‌های مربوطه می‌باشد لذا در این پژوهش مدل حیوانی جدیدی را معرفی می‌کنیم که نه تنها تخمدان‌ها حذف نشده‌اند بلکه با انجام آزمایش در چهار مرحله مختلف سیکل جنسی موش صحرایی (استروس) به نقش فیزیولوژیک هورمون‌های جنسی در ایجاد اضطراب و ارتباط آن با تغییرات نیتريت و نیترات (Nox) پی می‌بریم.

## مواد و روش‌ها

### یافته‌ها

نتایج پژوهش حاضر در هر یک از گروه‌های پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس دو بخش می‌باشد. در بخش نخست میزان نیتريت و نیترات در این چهار گروه اندازه‌گیری که در نمودار شماره (۱) به نمایش درآمده است. در بخش دوم شاخص‌های اضطراب در دو عنوان A و B که به ترتیب معرف مدت زمان ماندن در بازوی باز و تعداد ورود به بازوی باز می‌باشد در نمودار شماره ۲ و ۳ به نمایش درآمده است.

در بخش اول بالاترین میزان نیتريت و نیترات سرم در پرواستروس و کمترین میزان آن در مت استروس اندازه‌گیری گردید و این در حالی می‌باشد که استروژن در ساعات اولیه فاز پرواستروس در سطوح بالای خود و پروژسترون در سطوح کم خود می‌باشد.

و بر عکس در مت استروس غلظت استروژن در حد پایه و پروژسترون در سطح بالایی می‌باشد (۱۱،۱۲).

در بخش دوم مطالعه نتایج نشان می‌دهد که شاخص‌های رفتاری اضطراب یعنی تعداد رفتن به بازوی باز (B) و مدت

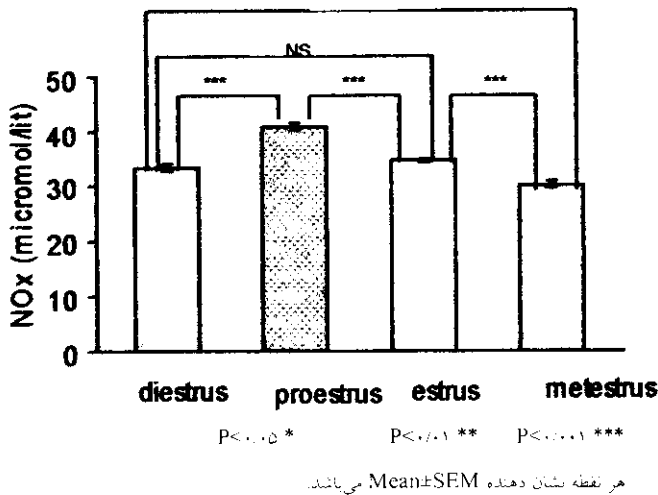
۴۰ سر موش صحرایی ماده از Sprague - Dawly با محدوده وزنی ۲۴۰ - ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیدند برای هر یک از چهار مرحله سیکل ده سر موش در نظر گرفته شد. موش‌هایی که دارای سیکل جنسی طبیعی بودند در مطالعه وارد شدند. این موش‌ها در حیوان‌خانه و در شرایط یکسان ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری گردیده و مطالعه در ساعت ۸-۷ صبح و در فصل تابستان انجام شد.

ابتدا از هر موش اسمیر واژن تهیه گردید و با کمک میکروسکوپ و مشاهده سلولهای مخاط واژن مرحله سیکل استروس را مشخص کردیم. سپس حیوان بر روی ماز بعلاوه‌ای شکل جهت سنجش میزان اضطراب قرار گرفت. لازم به ذکر است که این ماز دارای دو بازوی بدون دیواره و دو دیواره بسته روبروی هم به شکل صلیب می‌باشد.

این ماز از مدل‌های استاندارد و معتبر اندازه‌گیری اضطراب به شمار می‌رود. شاخص اصلی و عمده که در این ماز جهت سنجش به کار می‌رود عبارت است از:

مدت زمان ماندن در بازوی باز (A).

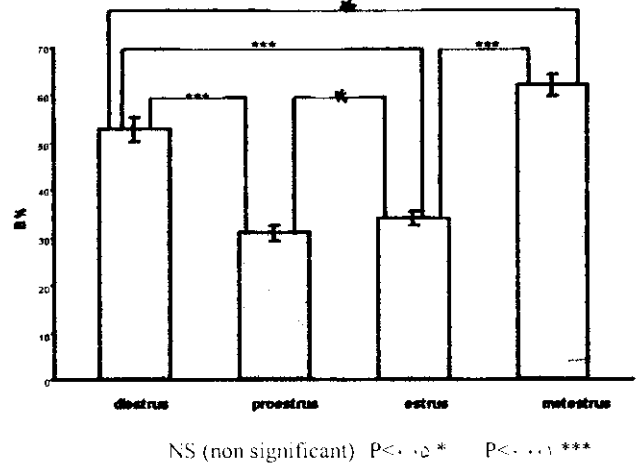
ماندن در آن (A) در مرحله پرواستروس کاهش و در مرحله استروس افزایش می‌یابد.



هر نقطه نشان دهنده Mean±SEM می‌باشد.

نمودار شماره ۳- تعداد ورود به بازوی باز نسبت به کل ورودی‌ها در طی

مراحل مختلف سیکل استروس در موش صحرایی ماده



هر نقطه نشان دهنده Mean±SEM می‌باشد.

نمودار شماره ۱- غلظت نیتریت و نیترات (NO<sub>x</sub>) در طی مراحل مختلف

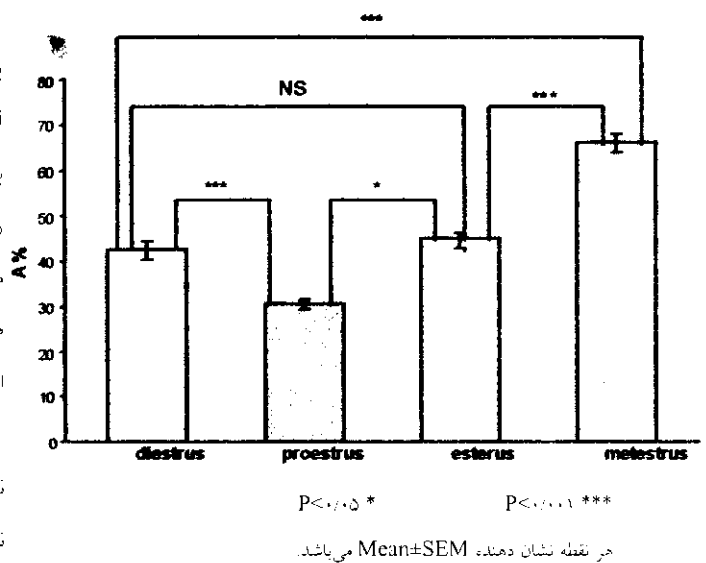
سیکل استروس

## بحث

نتایج حاصله از بررسی نمودار شماره (۱) نشان می‌دهد که بالاترین میزان NOx مربوط به مرحله پرواستروس بوده و از لحاظ زمانی هنگامی ایجاد می‌شود که استروژن سرمی در سطح بالای خود میباشد نتایج حاصله از این بخش از مطالعه در راستای مطالعاتی است که در پی تجویز استرادیول در عروق مختلفی از قبیل آئورت، کرونر و عروق مغز در موش‌های صحرایی ماده و در سرخرگ‌های نافی انسان تولید نیتریک اکساید افزایش می‌یابد (۱۵، ۱۴، ۱۳).

مطالعات سرمی زنان یائسه قبل و بعد از درمان با استروژن نیز نشان می‌دهد که استروژن درمانی موجب افزایش نیتریت و نیترات سرم در این زنان می‌شود (۱۶).

در پژوهش حاضر نیز تولید NO از الگوی ترشحی استرادیول پیروی میکند اما در مورد پروژسترون مطالعات چندی اثر آن را وابسته به بافت و متغیر دانسته اند (۱۶).



هر نقطه نشان دهنده Mean±SEM می‌باشد.

نمودار شماره ۲- درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز نسبت به کل

زمان آزمون در موش صحرایی ماده

مora در سال ۱۹۹۶ اذعان می‌کند که با تجوز تک دوز استرادیول به موش‌های صحرایی فاقد تخمدان اضطراب افزایش می‌یابد (۱۹). از سوی دیگر مطالعات اضطراب و رابطه آن با نیتریک اکساید نشان داده است که با مهار تولید نیتریک اکساید اضطراب کاهش و با افزایش تولید آن اضطراب افزایش می‌یابد (۲۱،۲۰) از بررسی مجموعه این مطالعات و مطالعه حاضر که حیوانات تحت اثر مقادیر فیزیولوژیک هورمونهای استروئیدی بوده اند. می‌توان گفت که مقادیر فیزیولوژیک هورمونهای استروئیدی با واسطه نیتریک اکساید سبب تغییر رفتار اضطرابی در موش‌های صحرایی می‌شوند. بنابراین تغییرات سرمی نیتریک اکساید در سندروم پیش از قاعدگی (PMS) نیز می‌تواند نقش داشته باشد. لذا مهار سنتز NOS می‌تواند در کاهش اختلالات قبل از قاعدگی مؤثر گردد.

در مطالعه‌ای مواجهه سرخرگهای نافی انسان با پروژسترون به صورت *in vitro* نشان داده است که پروژسترون اثرات استرادیول را در آزادسازی No به صورت وابسته به دوز کاهش داده است (۱۵).  
در مطالعه دیگر در زمینه اثر پروژسترون بر NOS در ماکروفاژها بدین نتیجه می‌رسند که پروژسترون از سنتز NOS در ماکروفاژهای Murine جلوگیری می‌کند (۱۷) از سویی دیگر نتایج بخش اولیه مطالعه نیز نشان می‌دهد که با افزایش استرادیول سرمی اضطراب در حیوان افزایش می‌یابد و با کاهش آن در مت استروس اضطراب کاهش می‌یابد. در این راستا Laconi (2001) اذعان می‌دارد که با تزریق پروژسترون در موشهای صحرایی که در مرحله استروس قرار دارند باعث کاهش اضطراب در آنها و افزایش میزان فعالیت در محیط‌های باز می‌شود (۱۸) در مورد اثر استروژن نیز بر اضطراب (۱۹۹۶)

## منابع

1. Shear MK. Anxiety disorders women: gender-related modulation of neurobiology and behavior. *Semin Reprod. Endocrinol.* 1997; Feb; 15 (11).

2. Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders. *J clin psychiatry* 1999; 60 Suppl 18: 4: 14-15.

3. Wein. Stock; LS. Gender differences in the presentation social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 1999; 60 Suppl 99: (9-13).

4. Bare slaun, chicoat, H. Schultz. Disorder and the emergence of sex differences in Major

depression. *J Gend Specific Med.* 1998; Dec (3): 33-9.

5. Pigott, TA. Anxiety disorders in women: *Psychiatry Clin North Am* 2003; sep 26 (3): 621-72.

6. Mcmanus, K. Tait, GR. Effect of ethylnyl estradiol on the panic response to the panicogenic agent pentagastrin affect disord. 2001. Oct: 66 (2-3) : 273-9.

7. Rodgers, RJ. Animal models of anxiety an ethological perspective. *Behave pharmacol.* 1997; 8 (477-690).

8. Pellows, chopin , P. File, SE. Validation of open : close arm entries in an elevated plus -

maze a measure of anxiety in the rat. Neuro sci methods. 1985 Aug : 14 (3): 149-67.

9. Burtis, CA, Ashwood , ER. Fundamental of clinical chemistry Philadelphia: W.B. Saunders Company 1996 : PP : 56-66.

10. Katrina M Miranda, Micheal, GESPEY. A rapid Simple Spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide : Biology and Chemistry v 015. No. 1.PP: 62-71 (2001).

11. Grinnell D. Alan ; Animal physiology principles and Adaptation 1982; Forth Edition.

12. Bennett, Leslie; The long and Evans monograph on the Estrus cycle in the rat. Endocrinology 1992; (6).

13. Yong. S, Bale, zhung L. Estrogen and NOs release in human coronary endothelium. J Cardio Vasc Pharmacol 2000; Aug, 36 (2) : 242-7.

14. Anne Maries, Mc Neill. estrogen Increases Endothelial nitric Oxide synthase via Estrogen receptors in rat cerebral Blood Vessels. Stroke: 2002, 33: 1685.

15. Duz, /Sunm, Wang B. The effect of sex hormones on Blood vessels. Zhongguo yixue ke xue yuan xue Bao 1999 (Aug) : 21 (4): 282-7.

16. Cicnilli E, Ignarro, I.g. Effect of short term transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide. Fertile Strill 1998. 69: 58-61.

17. L miller, Ew Alley. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. Journal of Leukocyte Biology vol 59 : (Issue 3 (442-450) 1996.

18. Loconi MR. Gastellers G. The anxiolytic effect of allopregnanolone is associated with Gonadal hormonal status in female Rate. Eur Pharmacol 2001 Apr : 6: 417 (1-2).

19. Mora. S. Dussabat, N: Diaz-Valiz G. Effect of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. Psychneuro Endocrinology 1996 : 21 (609-620).

20. Faria, MS. Muscrara, MN . Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus - maze test. Euro J Pharmacol. 1997. 323: 34-43.

21. Volk, KOKS, vasare. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in elevated plus - maze neuro report 1995 Jul 10 : 6 (10) : 1413-6.