



بررسی اثر مهار نیتریک اکساید بر میزان نورمتانفرین هیپوکامپی در شرایط استرس و بدون استرس در موش‌های صحرائی نر بالغ

هنا مولاھویزه^۱، هومن اسحق هارونی^{۱*}، حسین نجف زاده ورزی^۲، احمدعلی معاضدی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

^۲گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۲/۱۶ - پذیرش مقاله: ۹۳/۱۲/۶)

چکیده

زمینه: نیتریک اکساید (NO) در هیپوکامپ در تنظیم آزاد شدن نوروترانسمیترهایی از قبیل نوراپینفرین نقش دارد. نورمتانفرین متابولیت نوراپی نفرین می‌باشد که از طریق تأثیر آنزیم COMT بر نوراپی نفرین تولید می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که استرس‌های مختلف، آزاد شدن نوراپی نفرین و متابولیت‌های آن را افزایش می‌دهد. بنابراین در این مطالعه نقش NO در تنظیم آزاد شدن نوراپی نفرین و متابولیزه شدن آن در شرایط استرس و بدون استرس با استفاده از مهار کننده NO (L-NAME) بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، ۵۰ سر موش صحرائی بالغ به ۱۰ گروه تقسیم شدند. ۵ گروه تحت تأثیر استرس محدود کننده قرار گرفتند و ۵ گروه بدون استرس بودند که گروه‌ها شامل کنترل، سالین و دریافت کننده مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم L-NAME به صورت داخل صفاقی بودند. سی دقیقه پس از تزریق L-NAME، قسمت هیپوکامپ جدا گردید سپس هموژنایز و سانتریفوژ شد و میزان نورمتانفرین با استفاده از کیت الایزا اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در شرایط بدون استرس میزان نورمتانفرین در گروه دریافت کننده ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم L-NAME نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافته است اما در شرایط استرس میزان نورمتانفرین در همه گروه‌های دریافت کننده L-NAME نسبت به گروه‌های کنترل و سالین به طور معنی‌داری کاهش یافته است. مقایسه بین شرایط استرس و بدون استرس نشان داد که استرس به تنهایی باعث افزایش معنی‌داری در میزان نورمتانفرین گروه‌های کنترل و سالین شده است.

نتیجه‌گیری: به طور کلی اثر مهار تولید NO بر میزان نورمتانفرین در حضور و غیاب استرس نتایج متفاوتی نشان داد و احتمالاً L-NAME، اثرات افزایشی استرس بر میزان نورمتانفرین، از مسیر نیتریک اکساید را ممانعت می‌کند.

واژگان کلیدی: استرس، موش صحرائی، نورمتانفرین، نیتریک اکساید، هیپوکامپ

* اهواز، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

مقدمه

نیتریک اکساید (NO)^۱، مولکولی است که اثرات متعددی در بافت‌های مختلف دارد و در بخش‌های مختلف مغز از جمله هیپوکامپ، به وسیله گروهی از آنزیم‌ها که NOS^۲ نامیده می‌شوند تولید می‌شود (۱-۳).

NO، در سیستم عصبی مرکزی به‌عنوان نوروترانسمیتر و تعدیل‌کننده عصبی عمل می‌کند (۴). گیرنده‌های NMDA^۳ و نیتریک اکساید مسئول تنظیم آزاد شدن نوراپی نفرین هستند. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که درمان به‌وسیله دهنده‌های نیتریک اکساید آزاد شدن نوراپی نفرین در هیپوکامپ را تحریک می‌کند و مهار کننده‌های نیتریک اکساید سنتاز سطوح نوراپی نفرین را کاهش می‌دهند (۵ و ۶). استرس می‌تواند به عنوان واکنش مغز- بدن در مقابل محرک‌های منشأ گرفته از محیط خارجی مثل ترس یا عوامل داخلی که به‌عنوان عوامل مختل‌کننده هوموستازی فیزیولوژیکی و روانی شناخته می‌شوند تعریف شود (۷-۹). استرس باعث فعال سازی لوکوس سرولئوس و افزایش ترشح نوراپی نفرین و متابولیت‌های آن می‌شود (۱۰). نورمتانفرین متابولیت نوراپی نفرین می باشد که از طریق تأثیر آنزیم COMT^۴ بر نوراپی نفرین تولید می‌شود (۱۱). هیپوکامپ، هدف عمده مطالعاتی که بر روی عمل هورمون‌ها و تعدیل‌کننده‌های عصبی که در طول استرس از اندام‌های محیطی آزاد می‌شوند، می‌باشد (۹). هسته لوکوس سرلئوس به لایه‌های مختلف هیپوکامپ انشعاب می‌دهد که دلیلی برای نوراپی نفرین مشاهده شده در هیپوکامپ می‌باشد (۱۲).

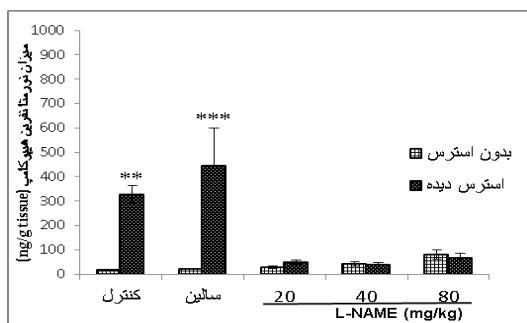
همچنین مشاهده شده که استرس محدود کننده باعث فعال‌سازی mRNA مربوط به نیتریک اکساید سنتاز نورونی در محور HPA^۵ در موش‌های صحرایی می‌گردد (۱۳ و ۱۴). بنابراین با توجه به اینکه NO، بر روی مونوآمین‌های مغز در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از قبیل استرس و اضطراب نقش تعدیل‌کنندگی دارد و در نظر گرفتن اینکه استرس باعث افزایش بیان آنزیم NOS می‌گردد و همچنین حساس بودن هیپوکامپ به شرایط استرس و عصب‌گیری نورآدرنژیک آن، در مطالعه حاضر، اثر مهار تولید نیتریک اکساید توسط L-NAME^۶ بر روی متابولیزه شدن نوراپی نفرین هیپوکامپ در شرایط بدون استرس و مقایسه آن با شرایط استرس محدود کننده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

برای این کار تحقیقاتی از ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز تکثیر حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز) در محدوده وزنی 250 ± 50 گرم استفاده گردید. موش‌ها به دو گروه اصلی استرس دیده شامل گروه‌های (تعداد ۵ سر موش در هر گروه) سالم، سالین و دریافت‌کننده (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) L-NAME و بدون استرس شامل گروه سالم، سالین و دریافت‌کننده (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) L-NAME تقسیم شدند (۱۵) و (۱۶). جهت ایجاد استرس موش‌ها به مدت یک ساعت در جعبه‌های محدود کننده قرار داده شدند. داروها (L-NAME تهیه شده از شرکت سیگما-آلدریچ) به‌صورت درون صفاقی تزریق شدند ۳۰ دقیقه بعد،

¹ Nitric oxide² Nitric oxide synthase³ N-methyl-D-aspartate⁴ Catechol-O-methyltransferase⁵ Hypothalamus-pituitary-adrenal⁶ NG-nitro-L-arginine methyl ester

معنی‌داری ($p < 0.05$) در همه گروه‌های دریافت‌کننده L-NAME در مقایسه با گروه کنترل و سالین نشان داد. در مجموع مقایسه نتایج گروه‌های استرس دیده با گروه‌های استرس ندیده نشان می‌دهد که تجویز L-NAME مانع از افزایش میزان نورمتانفرین هیپوکامپی در گروه‌های استرس دیده گردیده است. به عبارت دیگر استرس به تنهایی به‌طور معنی‌داری میزان نورمتانفرین را افزایش داده که مهار تولید NO توسط L-NAME مانع از این اثر استرس شده است. این اثر در نمودار ۱ به خوبی نشان داده شده است، به‌طوری که در گروه‌های استرس دیده و دریافت‌کننده L-NAME مقادیر نورمتانفرین اندازه‌گیری شده بسیار نزدیک به مقادیر اندازه‌گیری شده در موش‌های استرس ندیده است.



نمودار ۱) مقایسه میزان نورمتانفرین هیپوکامپ در گروه‌های بدون استرس و استرس دیده: ستون‌ها میانگین نورمتانفرین هیپوکامپ ($\pm$ SEM) را نشان می‌دهند ($p < 0.001$) و $p < 0.01$ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با شرایط بدون استرس می‌باشند.

بحث

اثر L-NAME بر میزان نورمتانفرین هیپوکامپی، در گروه‌های بدون استرس
نورمتانفرین متابولیت نوراپی نفرین می‌باشد که در مسیر متابولیسم شدن نوراپی نفرین به وسیله آنزیم COMT، تولید می‌شود. در مطالعه حاضر تجویز سالین و مقادیر ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم

موش‌ها آسان‌کشی شده و پس از درآوردن مغز، هیپوکامپ جدا شد و در محلول اسید فرمیک سرد قرار گرفت (۱۷) و پس از تعیین وزن، هموژنایز (شرکت میکرای آلمان) و سانتریفوژ شدن، عصاره هیپوکامپ جدا گردیده و میزان نورمتانفرین آن توسط کیت الایزا اختصاصی نورمتانفرین (ساخت شرکت LDN سوئد) اندازه‌گیری شد (۱۸).

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، IL، USA) ویرایش ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه (ANOVA) مورد بررسی آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌ها از پس آزمون LSD استفاده شد. در نمودار میانگین‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM نمایش داده شدند و در تمام آزمایشات انجام شده سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که "استرس" اثر معنی‌داری بر میزان نورمتانفرین دارد ($P = 0.000$)، $f(1, 64) = 17.32$. از طرف دیگر تجویز "دوزهای" مختلف L-NAME هم اثر معنی‌داری بر میزان نورمتانفرین هیپوکامپی نشان داد ($P = 0.002$)، $f(4) = 4.74$. تداخل "دوز و استرس" نیز بر میزان نورمتانفرین معنی‌دار بود [$f(4, 64) = 6.59$, $P = 0.000$]. در بررسی درون گروهی، در گروه استرس ندیده میزان نورمتانفرین هیپوکامپی گروه دریافت‌کننده L-NAME با مقدار ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم، افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل، سالین، L-NAME ۲۰ ($p < 0.001$) و L-NAME NAME ($p < 0.05$) نشان داد. در حالی که در گروه استرس دیده میزان نورمتانفرین هیپوکامپی کاهش

L-NAME، تأثیری بر مقدار این متابولیت در هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل نداشت اما با مقدار ۸۰ میلی گرم در هر کیلوگرم L-NAME، مقدار آن در هیپوکامپ افزایش معنی داری نسبت به سایر گروه های بدون استرس داشته است (نمودار ۱).

بنابراین افزایش این متابولیت بیانگر افزایش سوبسترای اولیه آن، نوراپی نفرین بوده است (۱۱). به طور کلی می توان گفت که فعالیت سیستم نیتریک اکساید در شرایط بدون استرس می تواند اثر مهار بر میزان نورمتانفرین داشته باشد. به عبارت دیگر، با وجود فعالیت نیتریک اکساید در شرایط پایه، فعالیت سیستم نورآدرنژیک در حد پایین نگه داشته می شود. پس می توان نتیجه گرفت که نیتریک اکساید در شرایط بدون استرس به عنوان یک مولکول درون زادی در جهت کاهش میزان نورمتانفرین عمل می کند. نتیجه مطالعه حاضر با نتایج برخی مطالعات همسو می باشد. به عنوان مثال مشاهده شده که در هیپوتالاموس قاعده ای SNP^۷ که آزاد کننده نیتریک اکساید می باشد، می تواند آزاد شدن نوراپی نفرین پایه و تحریک شده به وسیله پتاسیم را مهار کند. در حالی که اثر مهار بر هر دو مورد در حضور هموگلوبین از بین می رود و آزاد شدن نوراپی نفرین نیز در حضور L-NMMA^۸ مهار کننده رقابتی NOS افزایش می یابد. بنابراین آزاد شدن NO از نورون های نیتروژیک در هیپوتالاموس قاعده ای میانی به صورت In vitro یک عمل مهار تونیک بر روی آزاد شدن نوراپی نفرین دارد و باعث کاهش آن می شود و اثر تحریکی پتاسیم بر روی آزاد شدن کاتکول آمین ها را مهار می کند (۱۹). در حالی که نتایج برخی از مطالعات دیگر با نتیجه مطالعه حاضر متفاوت می باشند و نشان داده اند که به کار بردن

دهنده های NO باعث تحریک آزاد سازی نوراپی نفرین در هیپوکامپ شده و مهار کننده های NOS باعث کاهش سطوح آن می گردند (۵ و ۶). به عنوان مثال، SNAP، SNP^۹ و ترکیبات تیول از قبیل ال-سیستئین به صورت In vivo و In vitro باعث افزایش آزاد شدن نوراپی نفرین از برش های هیپوکامپی می شوند (۲۰). SNAP و SNP همچنین آزاد شدن پایه نورآدرنالین در سیناپتوزوم های قشری موش را افزایش می دهند (۲۱). مشاهده شده که SNAP و NO آزاد شدن نوراپی نفرین تحریک شده به وسیله پتاسیم و NMDA را از برش های هیپوکامپی و قشری افزایش می دهد و مهار کننده نیتریک اکساید اثری بر روی نوراپی نفرین آزاد شده نداشته است (۲۲).

اثر L-NAME بر میزان نورمتانفرین هیپوکامپی، در گروه های استرس دیده

در مطالعه حاضر با اعمال استرس محدود کننده میزان نورمتانفرین هیپوکامپ افزایش معنی داری در مقایسه با شرایط بدون استرس در گروه های کنترل و سالین داشته است (نمودار ۱). که بیانگر تأثیر استرس در افزایش تولید یا تجزیه نوراپی نفرین می باشد (۲۳) که نتیجه مطالعه حاضر با بسیاری از مطالعات انجام شده در ارتباط با تغییر نوراپی نفرین در شرایط استرس هم خوانی دارد به طوری که مقدار نوراپی نفرین در مطالعات محققین دیگر افزایش یافته بود. به عنوان مثال مشاهده شده که نورون های نوراپی نفرین در پاسخ به استرس دهنده های مختلف (صدا، استرس محدود کننده، هیپوگلاسمی و شنا) در موش های صحرایی و گربه ها فعال شده اند. مطالعات میکرو دیالیز به صورت In vivo، آزاد شدن نوراپی نفرین درون زاد

⁷ Sodium Nitroprusside

⁸ NG-monomethyl-L-arginine

⁹ S-nitroso-N-acetyl penicillamine

را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی که در معرض استرس محدود کننده یا استرس وارد کردن شوک متناوب به دم قرار گرفته بودند را نشان داد (۲۴). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که در اثر تحریک الکتریکی لوکوس سرلئوس فعالیت تیروزین هیدروکسیلاز، آنزیم محدود کننده سرعت در سنتز نوراپی نفرین، افزایش می‌یابد و نهایتاً باعث افزایش میزان نوراپی نفرین در قشر مغز و هیپوکامپ می‌شود (۲۵). فعالیت این آنزیم همچنین در پاسخ به استرس‌های شوک پا و صدا، افزایش می‌یابد و این افزایش به وسیله آنتاگونیست 10 CRF (آلفا هلیکال CRF) مهار می‌شود (۲۶) قسمت عمده نورون‌های نورآدرنژیک در لوکوس سرلئوس قرار دارند که انشعابات به تمام قسمت‌های قشر مخ و چندین ساختار از قبیل هیپوکامپ، آمیگدال، تالاموس و هیپوتالاموس می‌فرستند. قرار گرفتن در معرض استرس باعث افزایش آزاد شدن و بازگردش نورآدرنالین در قسمت‌هایی از مغز که انشعابات نورآدرنژیک دریافت می‌کنند می‌شود (۲۷). استرس محدود کننده مزمن باعث افزایش جبرانی سنتز سروتونین و نورآدرنالین می‌شود و این تغییرات ممکن است برای تطبیق با شرایط استرس ایجاد شده باشد (۲۸). استرس بی‌حرکتی باعث افزایش قابل توجهی در گردش کار نورآدرنالین در آمیگدال، هیپوکامپ، تالاموس و قشر مغز می‌شود (۲۹ و ۳۰). در این مطالعه با تجویز L-NAME، در شرایط استرس مقدار نورمتانفرین نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری یافت که در همه مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم L-NAME، این کاهش مشاهده شد (نمودار ۱).

این مطلب می‌رساند که نیتریک اکساید، احتمالاً بر فرآیند آزادسازی یا متابولیسم نوراپی نفرین در شرایط استرس تأثیر بیشتری دارد و L-NAME، با کاهش مقدار نیتریک اکساید، تأثیر استرس در افزایش میزان نورمتانفرین را کاهش داده و تعدیل کرده است. در اینجا دو نتیجه مهم قابل برداشت است اول اینکه استرس می‌تواند همزمان بر میزان فعالیت سیستم نوراپی نفرین و سیستم نیتریک اکساید اثر بگذارد و دوم اینکه فعالیت این دو سیستم نیز می‌تواند متأثر از یکدیگر باشد. از آنجا که مهار تولید نیتریک اکساید توانسته است جلوی افزایش نورمتانفرین را بگیرد، این احتمال به نظر می‌رسد که افزایش نورمتانفرین در اثر استرس از طریق مسیر نیتریک اکساید صورت گرفته باشد.

هرچند به‌طور کامل و دقیق نمی‌توان این نتیجه را به اثر سیستم نیتریک اکساید بر فعالیت سیستم نوراپی نفرین منسوب کرد چرا که نیتریک اکساید ممکن است از طریق تداخل با دیگر سیستم‌های نوروترانسمیتری مثل گلوتامات باعث افزایش نورمتانفرین شده باشد. که بررسی این احتمالات به مطالعه بیشتر نیاز دارد. بنابراین، نیتریک اکساید می‌تواند در فعالیت سیستم نوراپی نفرین هیپوکامپی دخالت داشته باشد که این دخالت در شرایط مختلف (استرس و بدون استرس) متفاوت می‌باشد.

برای قضاوت دقیق‌تر در مورد تأثیر L-NAME در شرایط استرس و بدون استرس بهتر است مقادیر سرمی و ادراری متابولیت‌های نوراپی نفرین نیز در مطالعه مشابه اندازه‌گیری شود. همچنین اندازه‌گیری نورمتانفرین در هسته‌های لوکوس سرلئوس و آمیگدال با توجه به نقش این هسته‌ها در استرس حائز اهمیت بوده و در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

¹⁰ corticotropin-releasing factor

نتیجه گیری

از آنجا که مهار تولید نیتریک اکساید در حضور و عدم حضور استرس، پاسخ‌های متفاوتی را ایجاد کرده است احتمالاً این ماده می‌تواند به عنوان یک میانجی کننده اثرات استرس، در تغییر میزان نورمتانفرین نقش دوگانه داشته باشد و احتمالاً L-NAME، اثرات

افزایشی استرس بر میزان نورمتانفرین، از مسیر نیتروژنیک را ممانعت می‌کند.

سپاس و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای تأمین اعتبار مالی تحقیق حاضر تشکر می‌شود.

References:

1. Arzumanyan V, Stankevicius E, Laukeviciene A, et al. [Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells]. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39: 535-541.
2. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 766-775.
3. Guix FX, Uribealago I, Coma M, et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005; 76: 126-152.
4. Ohkuma S, Katsura M. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 97-108.
5. Feldman S, Weidenfeld J. Involvement of endogenous glutamate in the stimulatory effect of norepinephrine and serotonin on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 43-53.
6. Lonart G, Wang J, Johnson KM. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1992; 220: 271-272.
7. Gulati K, Ray A, Masood A, et al. Involvement of nitric oxide (NO) in the regulation of stress susceptibility and adaptation in rats. *Indian J Exp Biol* 2006; 44: 809-815.
8. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 453-462.
9. Mora F, Segovia G, Del Arco A, et al. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res* 2012; 1476: 71-85.
10. Tsigos C, Chrousos G. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrine factors and stress* 2002; 53: 865-871.
11. Yamaya K, Nigawara K, Suzuki T, et al. [Plasmanormetanephine and metanephine levels and their relationship to norepinephrine and epinephrine]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1988; 64: 573-581.
12. O'Keef J, Nadell L. The Hippocampus as a cognitive map. Oxford university press: 1978: p. 103-140
13. de Oliveira RM, Aparecida Del Bel E, Mamede-Rosa ML, et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci Lett* 2000; 289: 123-126.
14. Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, et al. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res* 1996; 720: 159-171.
15. Khattab MM, El-Hadiyeh TM, Al-Shabanah OA, et al. Modification by L-NAME of codeine induced analgesia: possible role of nitric oxide. *Receptors Channels* 2004; 10: 139-145.
16. Pechánová O, Bernátová I, Babál P. Structural alterations in the heart after long-term L-NAME and D-NAME treatment. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18: 6-9.
17. Zhu KY, Fu Q, Leung KW, et al. The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously

- ously in ratbrains by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 737-742.
- 18.Wolthers BG, Kema IP, Volmer M, et al. Evaluation of urinary metanephrine and normetanephrine enzyme immunoassay (ELISA) kits by comparison with isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43: 114-120.
- 19.Seilicovich A, Lasaga M, Befumo M, et al. Nitric oxideinhibits the release of norepinephrine and dopamine from the medial basal hypothalamus of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11299-11302.
- 20.Satoh S, Kimura T, Toda M, et al. NO donors stimulate noradrenalinerelease from rat hippocampus in a calmodulin-dependent manner in the presence of L-cysteine. *J Cell Physiol* 1996; 169: 87-96.
- 21.Kiss JP. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull* 2000; 52: 459-466.
- 22.Stout AK, Woodward JJ. Differentialeffects of nitricoxidegas and nitricoxidedonors on depolarization-inducedrelease of [3H]norepinephrine from rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1367-1374.
- 23.Ladisich W, Steinhauff N, Matussek N. Chronic administration of electroconvulsive shock and norepinephrine metabolism in the rat brain. *Psychopharmacologia* 1969; 15: 296-304.
- 24.Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 235-272.
- 25.Shinba T, Ozawa N, Yoshii M, et al. Delayed increase of brain noradrenaline after acute footshock stress in rats. *Neurochem Res* 2010; 35: 412-417.
- 26.Melia KR, Duman RS. Involvement of corticotropin-releasingfactor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8382-8386.
- 27.Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, et al. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse* 1996; 23: 28-38.
- 28.Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, et al. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in ratbrain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem* 1988; 50: 1678-1681.
- 29.Ida Y, Tanaka M, Kohno Y, et al. Effects of age and stress on regional noradrenalinemetabolism in the rat brain. *Neurobiol Aging* 1982; 3: 233-236.
- 30.Tanaka T, Yokoo H, Mizoguchi K, et al. Noradrenaline release in the ratamygdala is increased by stress: studies with intracerebralmicrodialysis. *Brain Res* 1991; 544: 174-176.

Original Article

Assessment the effect of NO inhibition on hippocampal normetanephrine level in stress and non-stress conditions in adult male rats

H. Molahoveizeh¹, H. Eshagh Harooni^{1}, H. Najafzadeh varzi²,
AA. Moazedi¹*

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

² Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

(Received 5 May, 2014 Accepted 25 Feb, 2015)

Abstract

Background: Nitric oxide (NO) has a role in the regulation of neurotransmitters release such as norepinephrine, in the hippocampus. Normetanephrine (NMN) is a metabolite of norepinephrine created by action of catechol-O-methyl transferase (COMT) on norepinephrine. Several studies have shown that various stresses increased release of norepinephrine and its metabolites. Therefore in the present study, the role of Nitric oxide in regulation of norepinephrine release and its metabolism was investigated by administration of L-NAME (NO synthase inhibitor) in stressed and non-stressed rats.

Materials and Methods: For this purpose, 50 adult rats were divided into 10 groups, of which 5 groups were exposed to restraint stress while another 5 groups were without stress. These two set of groups included intact, saline and L-NAME (20, 40, 80 mg/kg). Thirty minutes after intraperitoneal injection of L-NAME, brains removed, the hippocampus dissected, weighed, homogenized and centrifuged then amount of NMN measured by ELISA kit.

Results: The results showed that in non-stressed condition amount of NMN were significantly increased in group that received L-NAME (80 mg/kg) in comparison with other groups but in stress condition, amount of NMN was significantly decreased in groups that received L-NAME (20,40,80 mg/kg), in comparison with control and saline groups. Comparison between stress and non-stressed groups showed that stress alone cause an increase in amount of NMN in control and saline groups.

Conclusion: In conclusion, NO synthesis inhibition produced opposite responses with respect to NMN amount in the presence or absence of stress, and probably L-NAME preventing the effect of stress on increasing NMN levels mediated by nitrergic pathway.

Key words: Hippocampus, Nitric oxide, Normetanephrine, rat, Stress

* Address for correspondence: Ahvaz, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, IRAN;
E mail: harooni@scu.ac.ir