

## **The effect of pre- and post-natal nitrate exposure on inhibitory avoidance memory in mice**

**Golfam L<sup>1</sup>, Heydari A<sup>2,3</sup>, Ardjmand A<sup>2,3\*</sup>**

1- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received: 2018/08/21 | Accepted: 2018/10/27

### **Abstract:**

**Background:** Nitric oxide (NO) is directly involved in mechanisms responsible for fetal neurogenesis and development. It has also been shown that NO can impair or improve learning and memory in different models. There is evidence that administration of nitrate can produce NO. This study aimed at examining the effect of pre- and post-natal nitrate exposure on inhibitory avoidance memory in mice and measuring the NO metabolites herein.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 28 pregnant mice were divided into 4 groups: 1) Control group (whose mothers received only drinking water during the pregnancy and post-natal), 2) Treatment Group (whose mothers received sodium nitrate (100 mg / l) in drinking water during the pregnancy and post-natal until the 6th and 11th day after birth). During a two-day session (training and test) the learning and memory of animals (30 days after receiving sodium nitrate) were studied in a step down apparatus. The latency time for coming down from the platform in the test day (S) was used as a criterion for memory. The nitrate oxide metabolites in brain tissue were measured by Miranda method. The nitrite to nitrate recovery and total nitrite measurements were performed using Griess reagents with a spectrophotometer.

**Results:** The oral administration of sodium nitrate (100 mg/L) during pregnancy and lactation until 11 days after birth improved the avoidance memory compared to the control group ( $P<0.05$ ). Also, sodium nitrate did not change the NO metabolites during those time periods.

**Conclusion:** The oral sodium nitrate in pregnancy and lactation period improves mice avoidance memory without an alteration in nitric oxide metabolites.

**Keywords:** Nitrate, Avoidance memory, Mice, Nitric oxide, Pregnancy, Lactation

\* Corresponding Author.

Email: ardjmand\_ab@kaums.ac.ir

Tel: 0098 315 562 1157

Fax: 0098 315 557 5058

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 22, No 6, Pages 581-588

Please cite this article as: Golfam L, Heydari A, Ardjmand A. The effect of pre- and post-natal nitrate exposure on inhibitory avoidance memory in mice. *Feyz* 2019; 22(6): 581-8.

# اثر مواجهه مزمن با نیترات در دوره بارداری و پس از تولد بر حافظه احترازی در موش سوری

لیلا گلفام<sup>۱</sup>، اذر حیدری<sup>۲</sup>، ابوالفضل ارجمند<sup>\*</sup><sup>۳</sup>

خلاصه:

سابقه و هدف: نیتریک اکساید به طور مستقیم در مکانیسم‌های مسئول نورون‌زایی و تکامل در جنبین دخیل است. همچنین، نیتریک اکساید در مدل‌های مختلف می‌تواند باعث تخریب و یا بهبود حافظه گردد. از طرف دیگر، گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند تجویز نیترات می‌تواند به تولید نیتریک اکساید منجر شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر مواجهه مزمن با نیترات در دوره بارداری و پس از آن بر حافظه احترازی در فرزندان موش‌های سوری است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۸ موش سوری نر به ۴ گروه زیر تقسیم‌بندی شدند: دو گروه کنترل و دو گروه آزمایش که نیترات سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) را در آب آشامیدنی در طول دوره بارداری و شیردهی تا ۶ روز و ۱۱ روز پس از تولد نوزادان دریافت کردند. یادگیری و حافظه حیوانات ۳۰ روز پس از آخرین دریافت نیترات سدیم در دستگاه Step down و طی ۲ روز (آموزش و آزمون) بررسی شد. اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز با استفاده از روش گریس انجام گردید.

نتایج: دریافت نیترات سدیم در طول دوره بارداری و شیردهی تا ۱۱ روز پس از تولد سبب بهبود حافظه احترازی نسبت به گروه کنترل در حیوانات گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین، دریافت نیترات سدیم در طول دوره بارداری و شیردهی و پس از تولد تا ۶ و ۱۱ روزگی تغییری در میزان متabolیت‌های نیتریک اکساید ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: دریافت نیترات سدیم در دوران بارداری و شیردهی سبب بهبود حافظه اجتنابی در موش سوری می‌شود.

واژگان کلیدی: نیترات، حافظه احترازی، موش سوری، نیتریک اکساید، بارداری، شیردهی

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۷، صفحات ۵۸۱-۵۸۸

## مقدمه

NO می‌تواند از طریق آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و یا از طریق نیترات موجود در مواد غذایی ساخته شود. مسیر اصلی سنتاز (NO) از اسید آمینه آرژنین است. در این روند NOS با اکسید نمودن یک گروه گوانیدین مربوط به آرژنین و تشکیل سیترولین، NO را تولید می‌کند [۱]. آنزیم NOS دارای سه ایزوفرم نیتریک اکساید سنتاز نورومنی NOS1 یا nNOS، نیتریک اکساید القابی eNOS یا iNOS و نیتریک اکساید اندوتیالی NOS2 یا NOS3 می‌باشد [۵]. مسیر دیگری نیز برای تولید NO شرح داده شده است که در آن نیترات و نیتریت به NO و سایر واسطه‌های فعال نیتروژن تبدیل می‌شوند. مسیر مذکور مستقل از NO سنتاز بوده و وابسته به احتباس آنیون‌های نیترات پلاسمما می‌باشد. نیتریک اکساید نیمه عمری در حدود یک ثانیه دارد و بلافتله پس از تولید به نیترات تبدیل می‌شود [۶]. نیترات با از دست دادن دو الکترون به وسیله باکتری‌های موجود در حفره دهان و دستگاه گوارش به نیتریت تبدیل می‌شود و نیتریت با استفاده از آنزیم‌هایی موجود در بدنه پستانداران و به خصوص در شرایط کمبود اکسیژن به نیتریک اکساید تبدیل می‌شود. NO تولید شده مجدداً به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود و این چرخه به طور مکرر ادامه می‌یابد [۷]. نیترات به طور طبیعی در گیاهان به عنوان ماده مغذی وجود دارد. وجود نیترات بالا در آب آشامیدنی نیز همواره عامل نگران-

نیتریک اکساید (NO) یک پیام‌رسان گازی ناپایدار است که برای اولین بار در عروق خونی به عنوان فاکتور شل‌کننده مشتق شده از اندوتیال شناسایی شد و در سال ۱۹۹۰ به عنوان اولین میانجی عصبی گازی معرفی شد [۱]. NO به صورت یک ملکول سیگنال‌کننده در مغز و سایر قسمت‌های بدن است که در عملکرد های متنوعی شامل: سمیت سلوکی، رشد، تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی، جریان خون و سلامت روانی، بهبود زخم، آسم و تومور دخالت دارد [۲،۳]. NO در سیستم عصبی مرکزی در رهایش میانجی‌های عصبی، شکل‌پذیری سیناپسی و تنظیم فعالیت الکتریکی نورومنی، همچنین در یادگیری و حافظه نقش ویژه‌ای دارد [۴].

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

## \* لشانی نویسنده مسئول:

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۱۵۵۵۷۵۰۵۸ دوڑنیس: ۰۹۱۹۴۸۲۹۷۰۷

پست الکترونیک: ardjmand\_ab@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۳۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۸/۵

قفس قرار داده شد. بعد از مشاهده پلاک بارداری، موش‌های ماده از موش‌های نر جدا شده، هر موش ماده باردار در یک قفس جدا نگهداری شد. موش‌ها به صورت تصادفی در گروه‌های دریافت کننده آب آشامیدنی یا دریافت کننده نیترات سدیم دسته‌بندی شدند. در این مطالعه فقط از موش‌های نر متولد شده جهت آزمایش‌های یادگیری و حافظه استفاده شد. این مطالعه با کد آزمایش IR.KAUMS.MENT.REC.1396.23 معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان ثبت گردید. همه مراحل آزمایش از مرحله تکثیر تا انجام آزمایش‌ها و درنهایت معلوم کردن حیوانات مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان صورت گرفت. حیوانات در ۴ گروه ۷ تابی به ترتیب زیر گروه‌بندی شدند: ۱- گروهی که مادران آن‌ها نیترات سدیم (۱۰۰ میلی گرم/لیتر) را در آب آشامیدنی در طول دوره بارداری و شیردهی تا ۱۱ روز پس از تولد نوزادان دریافت کردند؛ ۲- گروه کترول ۴۱ روزه که مادران فقط آب آشامیدنی در طول دوره بارداری و شیردهی و پس از تولد نوزادان دریافت کردند؛ ۳- گروهی که مادران آن‌ها نیترات سدیم (۱۰۰ میلی گرم/لیتر) را در آب آشامیدنی در طول دوره بارداری و شیردهی تا ۶ روز پس از تولد نوزادان دریافت کردند؛ و ۴- گروه کترول ۳۶ روزه که مادران فقط آب آشامیدنی در طول دوره بارداری و شیردهی و پس از تولد نوزادان دریافت کردند. به دلیل اینکه انجام آزمایشات یادگیری و حافظه تا روز ۲۱ پس از تولد امکان پذیر نمی‌باشد، این آزمایشات ۳۰ روز پس از آخرین دریافت مکمل نیترات انجام شد.

#### بررسی حافظه در دستگاه یادگیری اجتنابی

برای سنجش حافظه در حیوان از دستگاه Step down استفاده شد. این دستگاه شامل جعبه‌ای با ابعاد  $21 \times 21 \times 23$  سانتی-متر است که کف و دیواره‌هایی از جنس پلاکسی‌گلاس سفید داشته و در قسمت مرکزی دارای سکو می‌باشد. در کف دستگاه میله‌های فولادی به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۱ سانتی‌متر از هم قرار گرفته که به وسیله سیم رابط به دستگاه تحریک کننده (استیمولاوتور) متصل هستند. دستگاه استیمولاوتور شوک الکتریکی را باشدت جریان  $0.4$  میلی‌آمپر به مدت ۱۵ ثانیه از طریق میله‌های فلزی کف دستگاه به دست و پای حیوان اعمال می‌کند. آزمایشات حافظه به وسیله این دستگاه به مدت ۲ روز (روز اول، آموزش و روز دوم، آزمون) و به صورت زیر انجام می‌شود: در جلسه آموزش هر حیوان در ابتدا روی سکو قرار داده شده و نظر به تمایل غریزی حیوان در پایین

کننده و بحث برانگیزی بوده است. امروزه از نیتریت سدیم به عنوان یک نگهدارنده غذا، بهویژه در گوشت استفاده می‌شود [۸]. در گذشته، نیترات و نیتریت موجود در آب و محصولات غذایی به عنوان عوامل آسیب‌رسان در نظر گرفته می‌شدن [۹]، در حالی که مطالعات جدید حاکی از اثرات حفاظتی این ترکیبات در سیستم قلبی-عروقی [۱۰-۱۲]، کبدی [۱۳] و سیستم عصبی [۱۴] می‌باشد. نیتریک اکساید در فعالیت سیناپس‌های گاباائرژیک و گلوتاپتیک موثر بوده، و پس از فعل کردن گیرنده NMDA به عنوان یک پیک ثانویه ایفای نقش می‌کند. گابا و گلوتاپات دو میانجی عصبی موثر در فرآیند حافظه و یادگیری می‌باشند [۱۵]. مطالعات انجام شده نقش NO را در تنظیم نورونزایی در هپیوکامپ نشان می-دهند [۱۶]. نورونزایی فرآیندی است که طی آن سلول‌های عصبی جدید در طول رشد و نمو جنین تولید می‌شوند. برخی مطالعات نشان می‌دهند NO نورونزایی در مناطق تحت گرانولی و زیربطنی هپیوکامپ را افزایش می‌دهد، درحالی که مطالعات دیگر نقش منفی NO در نورونزایی را گزارش کرده‌اند [۱۷، ۱۸]. مطالعات انجام شده روی جنین موش نشان داده‌اند که در این دوره NO توسط سلول‌های جنینی ساخته می‌شود و این امر نقش مهمی در تکامل جنین به‌عهده دارد؛ به طوری که مهار تولید آن موجب اختلال در تکامل و جلوگیری از لانه‌گزینی جنین می‌گردد [۱۹]. با توجه به نقش اثبات شده NO در مطالعات به عنوان فاکتور گشادکننده عروق، پرسش این است که آیا نیترات موجود در رژیم غذایی به عنوان پیش‌ساز NO می‌تواند نقش مهمی در بهبود خونرسانی به مناطق مختلف مغز داشته و از این طریق باعث بهبود عملکرد مغزی بهویژه فرآیندهای حافظه و یادگیری گردد؟ در مجموع، با توجه به نقش NO در یادگیری و حافظه و رشد و تکامل سیستم عصبی و با درنظر گرفتن چرخه تبدیل نیترات و نیتریت به NO در بدن، برای پاسخ به سوال مطرح شده برآن شدیم که اثر پیش‌درمان با غلظت‌های پائین مکمل نیترات را در دوران بارداری و پس از تولد بر مدل یادگیری اجتنابی موش سوری مورد مطالعه قرار دهیم.

#### مواد و روش‌ها

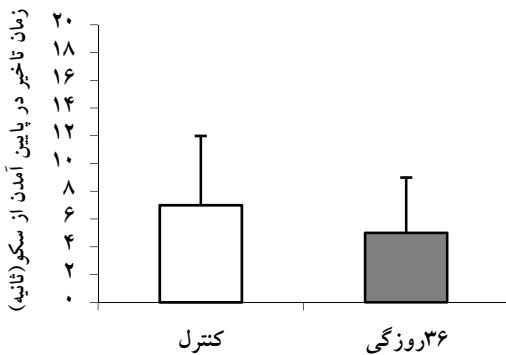
برای این مطالعه تجربی از موش‌های سوری با وزن تقریبی  $25-30$  گرم استفاده شد. کلیه حیوانات از حیوانخانه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شده و در قفس‌های مختلف و در دمای مناسب حیوانخانه و شرایط تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات در زمان آزمایش دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. برای جفت‌گیری هر موش سوری بالغ نر با دو موش سوری ماده به مدت ۲۴ ساعت در یک

آنالیز داده‌های متابولیت نیتریک اکساید و آزمون من-وینتی برای آنالیز داده‌های تست حافظه جهت مقایسه گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده شد. سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

حيوانات در طول دوره بارداری و پس از آن تا ۶ روزگی در یک گروه و در گروه دیگر تا ۱۱ روزگی نیترات سدیم را از طریق آب آشامیدنی دریافت کردند. سی روز پس از آخرین دریافت نیترات سدیم، آموژش حیوانات در دستگاه Step down صورت پذیرفت و در روز دوم آزمایش مرحله آزمون انجام شد. مدت زمان تاخیر حیوان در پایین آمدن از سکو ثبت گردید و با گروه شاهد مقایسه شد. نتایج حاصل به قرار زیر بود:

اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۶ روزگی بر حافظه احترازی  
شکل شماره ۱ اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۶ روزگی را بر حافظه احترازی در موش سوری نشان می‌دهد. آزمون آماری من-وینتی تفاوت معنی‌داری در زمان تاخیر پایین آمدن از سکو (ثانیه) بین گروه‌های شاهد و دریافت کننده نیترات سدیم تا ۶ روز پس از تولد (۳۶ روزگی) نشان نداد ( $P > 0.05$ ).



شکل شماره ۱- اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و ۶ روز پس از تولد (۳۶ روزگی) بر حافظه احترازی موش سوری  
(median±quartile, n=7)

اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۱۱ روزگی بر حافظه احترازی

شکل شماره ۲ اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۱۱ روزگی را بر حافظه احترازی در موش سوری نشان می‌دهد. آزمون آماری من-وینتی تفاوت

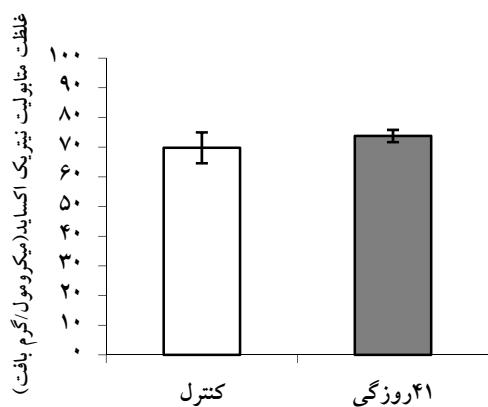
آمدن از سکو، هنگامی که موش از سکو پایین آمد، دست‌ها و پا-های خود را به طور کامل روی سیم‌های فلزی قرار داد، شوک الکتریکی با مشخصات فوق اعمال می‌شد. جلسه آزمون برای بررسی ماندگاری حافظه می‌باشد. آزمون ماندگاری حافظه نیز به-شیوه مشابهی انجام می‌گیرد، به استثنای اینکه هیچ شوکی اعمال نشده و فقط زمان تاخیر حیوان (بر حسب ثانیه) در پایین آمدن از سکو ثبت می‌شود. این زمان به عنوان شاخصی از یادگیری موش در مدل مذکور بوده که هرچه مدت آن طولانی‌تر باشد، به عنوان یادگیری موثرتر تلقی می‌شود [۲۰].

اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در مغز در پایان آزمایشات، مغز موش‌های سوری خارج شده و تا زمان انجام آزمایشات باقی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در مغز، ۰/۱ گرم بافت مغز در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات هموژنیزه شد. از روش Miranda و همکاران [۲۱] برای احیاء نیترات به نیتریت با استفاده از وانادیم کلراید (VCl3) و متعاقب آن سنجش نیتریت کل با استفاده از معرف گریس به روش طیف‌سنجی استفاده شد. به طور خلاصه وانادیم کلراید (۸۰ میلی‌گرم) در ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ مولار حل شده، سپس ۰/۱ درصد، وزنی-حجمی در آب مقطر و سولفانیل آمید در اسید کلریدریک ۵ درصد حل شدند. برای اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید ۱۰۰ میکرولیتر از سوپاپانسیون هموژنیزه باقی در معرض ۱۰۰ میکرولیتر وانادیم کلراید، ۵۰ میکرولیتر NEDD، و ۵۰ میکرولیتر سولفونامید قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، پروتئین‌ها با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر تری‌کلرو-استیک اسید ۱۰ درصد و سانتی‌فیوژ کردن ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. در مرحله بعد، جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتو متر خوانده شد. در نمونه‌های بلانک ۱۰۰ میکرولیتر سوپاپانسیون هموژنیزه باقی (همان حجم) با ۱۰۰ میکرولیتر وانادیم کلراید، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۵ درصد مجاورت داده شد [۲۲]. جذب نمونه‌های بلانک از نمونه‌های آزمایشی کم شده و با استفاده از منحنی استاندارد نیتریت، میزان متابولیت‌های نیتریک اکساید بر حسب میکرومول بر گرم بافت مغز محاسبه شد.

### بررسی آماری داده‌ها

نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و متعاقب آن تست Tuckey برای

اثر دریافت نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۱۱ روزگی بر سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز شکل شماره ۴ اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۱۱ روزگی را بر سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز موش سوری نشان می‌دهد. سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه‌های شاهد و ۴۱ روزه به ترتیب  $73.8 \pm 2.0$  و  $69.8 \pm 5.2$  میکرومول به ازای هر گرم بافت مغز بود و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده نیترات سدیم تا ۱۱ روزگی و شاهد نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

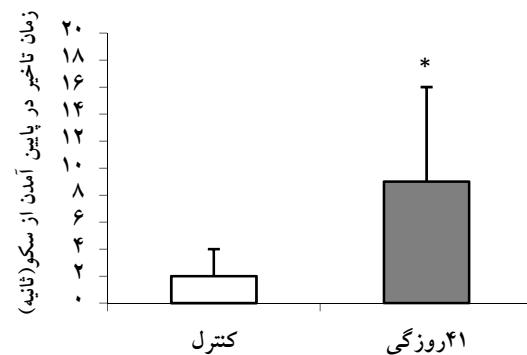


شکل شماره ۴- اثر دریافت نیترات سدیم در طول دوران بارداری و ۱۱ روز پس از تولد (۴۱ روزگی) بر متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز.  
(mean  $\pm$  SEM, n=7)

### بحث

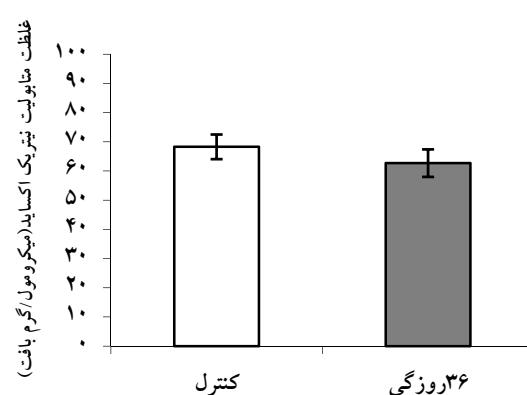
هدف مطالعه حاضر بررسی اثر مواجهه مزمن با نیترات در طول دوره بارداری و پس از تولد بر حافظه احترازی در موش سوری و سنجش متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز بود. نتایج حاصل بیان‌گر آن بود که دریافت نیترات در طول دوره ۲۱ روزه بارداری و ۱۱ روز پس از آن باعث بهبود حافظه و یادگیری اجتنابی در حیوانات می‌شود. تفاوتی بین گروه‌های دریافت کننده نیترات در طول دوره بارداری و پس از آن تا ۶ روزگی و کنترل مشاهده نگردید. مطالعات فراوانی در مورد نقش سیستم NO و تاثیر آن بر سیستم عصبی و حافظه و یادگیری انجام شده است. برخی مطالعات نقش مفید NO را در بهبود حافظه و یادگیری گزارش کرده‌اند [۲۳] و برخی دیگر آن را سبب تخریب حافظه می‌دانند [۲۴]. نتایج مطالعات گذشته نشان‌دهنده آن است که NO انواع مدل‌های مختلف یادگیری و حافظه از جمله یادگیری حرکتی، یادگیری اجتنابی غیرفعال و حافظه فضایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۵]. در مطالعه Harooni و همکاران نشان داده شد

معنی‌داری در زمان تاخیر پایین آمدن از سکو (ثانیه) بین گروه‌های شاهد و دریافت کننده نیترات سدیم تا ۱۱ روز پس از تولد (۴۱ روزگی) نشان داد ( $P < 0.05$ ).



شکل شماره ۲- اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و ۱۱ روز پس از تولد (۴۱ روزگی) بر حافظه احترازی موش سوری

\* در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0.05$  median  $\pm$  quartile, n=7)  
اثر دریافت نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۶ روزگی بر سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز شکل شماره ۳ اثر دریافت مزمن نیترات سدیم در طول دوران بارداری و پس از تولد تا ۶ روزگی را بر سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز موش سوری نشان می‌دهد. سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه شاهد و ۳۶ روزه به ترتیب  $62.7 \pm 4.7$  و  $68.3 \pm 4.2$  و میکرومول به ازای هر گرم از بافت مغز بود و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده نیترات سدیم تا ۶ روزگی و شاهد نشان نداد ( $P > 0.05$ ).



شکل شماره ۳- اثر دریافت نیترات سدیم در طول دوران بارداری و ۶ روز پس از تولد (۳۶ روزگی) بر متabolیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز.  
(mean  $\pm$  SEM, n=7)

سیناپس‌های گابائرژیک و گلوتاماترژیک وجود دارد و گیرنده NO عملکردی دارد که می‌تواند cGMP را پس از تحریک NO تولید کند [۱۵]. درواقع نیتریک اکساید در مغز روی فعالیتهای گلوتاماترژیک از جمله بر گیرندهای NMDA این سیستم تاثیرگذار می‌باشد [۳۳، ۳۲]. وجود گلوتامات نه تنها در پدیده شکل‌پذیری سیناپسی و تشکیل حافظه ضروری است، که در بسیاری از اختلالات نورولوژیک حاد و مزمن نیز مؤثر است. گلوتامات با دیپلاریزه شدن غشای پیش‌سیناپسی طی یک فرایند وابسته به کلسیم آزاد می‌شود و با فعال کردن گیرندهای خود در سلول‌های عصبی و گلیالی نقش خود را ایفا می‌کند. بنابراین، آزاد-سازی گلوتامات در فرآیند حافظه نقش داشته و سبب بهبود عملکرد آن می‌شود [۳۴]. نشان داده شده است که فعالیت گیرنده NMDA موجب تقویت تدریجی فرآیند یادگیری و ثبت حافظه می‌گردد [۳۵]. نظر به اینکه در مطالعات قبلی عنوان شده است که NO در طول یادگیری نقش مهمی در شکل‌گیری حافظه دارد [۲۳] و این مهم در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید، لذا این اثر می‌تواند به علت آزادسازی گلوتامات باشد. بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی جهت درک نقش نیتریک اکساید و اثرات آن بر سیستم گلوتامات و بهبود حافظه ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه ما، اگرچه میزان متabolیت-ها در گروه‌های دریافت کننده نیترات نسبت به گروه کنترل اختلاف زیادی نداشت، اما تغییر در سطح یادگیری و حافظه مشاهده گردید. این حالت مربوط به زمانی بود که ۱۰۰ میلی‌گرم نیترات سدیم به ازای هر لیتر آب آشامیدنی استفاده شد. این مهم نشان‌دهنده اثربخشی نیتریک اکساید و نیترات بر حافظه و یادگیری است. در این پژوهش دوزهای کمتری از نیترات سدیم استفاده شد؛ احتمالاً در مطالعات اینده با افزایش دوز مصرفی ممکن است شاهد تغییرات معنی‌دار در حافظه و یادگیری یا سطح متabolیت‌های نیتریک اکساید باشیم.

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که دریافت نیترات در طول دوره بارداری و ۱۱ روز پس از تولد بدون تغییر در متabolیت‌های نیتریک اکساید باعث بهبود حافظه و یادگیری اجتنابی در موش سوری می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مربوط پایان-نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی خانم لیلا گلفام مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به شماره ۹۶۰۸۰ می‌باشد.

که مهارگر NOS (L-NAME) موجب اختلال در حافظه کوتاه-مدت و بلندمدت می‌شود و این بیان‌گر وابستگی فرآیند حافظه و یادگیری به بیان NOS و مهارگر آن می‌باشد [۲۶]. در مطالعه Chien و همکاران نیز گزارش شده است که تجویز پیش‌سازهای تولید نیتریک اکساید سبب بهبود حافظه می‌گردد [۲۷] که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد. نتایج مطالعه دیگر که در آن حافظه و یادگیری موش‌های سوری در معرض دریافت مزمن نیتریت مورد بررسی قرار گرفت، نشان داد که دریافت مزمن نیتریت به کاهش حافظه و یادگیری در حیوانات منجر می‌گردد [۲۸]. در مطالعه Baratti و همکاران تزریق بعد از آموزش L-Arg (پیش‌ساز NO) توانست ثبت حافظه را تسهیل نموده، تخریب حافظه القاء شده با مهار کننده‌های آنزیم NOS را اصلاح Plech نموده و حافظه را به حالت عادی برگرداند [۲۹]. در مطالعه L-Arg با دوز ۵۰۰ nmoles/kg باعث افزایش زمان تاخیر در آزمون‌های یادگیری اجتنابی می‌گردد، در حالی که تزریق آن با دوزهای ۵۰ nmoles/kg و ۵ هیچ تاثیر مهمی ندارد [۳۰]؛ یافته حاصل از مطالعه مذکور نشان‌دهنده اثر وابسته به دوز NO است. این شواهد نتایج مطالعه حاضر را تایید می‌کند؛ همان‌طور که دوزهای بالاتر می‌توانند سبب بهبود حافظه شوند، افزایش مدت زمان دریافت نیز می‌تواند حافظه حیوان را تقویت کند، کما اینکه در مطالعه حاضر ما نشان دادیم که اثر نیتریک اکساید بر حافظه و یادگیری وابسته به زمان می‌باشد و هرچقدر زمان مواجهه بیشتر باشد، اثرات آن بالاتر و معنی‌دار است. لازم به ذکر است که با جستجوهای انجام گرفته در بانک‌های اطلاعات علمی، گزارشی مبنی بر اثرات نیتریک اکساید وابسته به زمان یافتن نشده است، بنابراین امکان مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین فراهم نبود. در مورد مکانسیم اثر نیتریک اکساید بر حافظه می‌توان گفت که نیتریک اکساید می‌تواند آزادسازی گلوتامات و دوپامین را از نورون‌های مجاور القا کند و بنابراین تسهیل سیناپسی را تحت تاثیر قرار دهد. در فرم یادگیری، مسیر سیگنال داخل سلولی NO شامل فعل شدن گیرنده گفت شده با گوانینیل سیکلаз می‌باشد. نتیجه عمل افزایش cGMP است که این افزایش باعث شروع آبشارهای فسفویلاسیون توسط پروتئین کینازها و درنتیجه فعل شدن فاکتورهای نسخه‌برداری می‌شود و از این طریق NO می‌تواند روی تشکیل حافظه نقش داشته باشد [۳۱]. Cserep و همکاران سیستم سیگنالینگ NO در هیپوکامپ موش سوری در روزهای اولیه پس از تولد را بررسی نموده‌اند؛ یافته‌های این مطالعه بیان‌گر آن است که nNOS به صورت پس‌سیناپسی در

**References:**

- [1] Ferraro G, Sardo P. Nitric oxide and brain hyperexcitability. *In Vivo* 2004; 18(3): 357-66.
- [2] Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 190.
- [3] Clements WT, Lee SR, Bloomer RJ. Nitrate ingestion: a review of the health and physical performance effects. *Nutrients* 2014; 6(11): 5224-64.
- [4] Jung J, Na C, Huh Y. Alterations in nitric oxide synthase in the aged CNS. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 718976
- [5] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2011; 33(7): 829-37.
- [6] Hezel MP, Liu M, Schiffer TA, Larsen FJ, Checa A, Wheelock CE, et al. Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. *Redox Biol* 2015; 5: 234-42.
- [7] Bryan NS, Ivy JL. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr Res* 2015; 35(8): 643-54.
- [8] Edition F. Guidelines for drinking-water quality. *WHO Chron* 2011; 38(4): 104-8.
- [9] Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, et al. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab* 2011; 13(2): 149-59.
- [10] Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(48): 19144-9.
- [11] Bryan NS, Garg H, Tang Y, Dugas T, Stokes K. Dietary Nitrite Prevents Hypercholesterolemic Microvascular Inflammation and Reverses Endothelial Dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: S110-S1.
- [12] Sindler AL, Fleenor BS, Calvert JW, Marshall KD, Zigler ML, Lefer DJ, et al. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging Cell* 2011; 10(3): 429-37.
- [13] Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jagamohan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 2005; 115(5): 1232-40.
- [14] Džoljić E, Grabatinić I, Kostić V. Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol* 2015; 30(3): 159-63.
- [15] Cserep C, Szőnyi A, Veres JM, Nemeth B, Szabadits E, De Vente J, et al. Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. *Cereb Cortex* 2011; 21(9): 2065-74.
- [16] Adachi M, Abe M, Sasaki T, Kato H, Kasahara J, Araki T. Role of inducible or neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metab Brain Dis* 2010; 25(4): 419-24.
- [17] Moreno-López B, Romero-Grimaldi C, Naval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C. Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J Neurosci* 2004; 24(1): 85-95.
- [18] Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, LaPointe M, et al. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol* 2001; 50(5): 602-11.
- [19] Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 2001; 75(6): 1163-71.
- [20] Ahmadi S, Alavi SS, Jadidi M, Ardjmand A. Exposure to GSM 900-MHz mobile radiation impaired inhibitory avoidance memory consolidation in rat: Involvements of opioidergic and nitrergic systems. *Brain Res* 2018; 1701: 36-45.
- [21] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5(1): 62-71.
- [22] Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, et al. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett* 2006; 166(1): 88-94.
- [23] Katzoff A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in Aplysia. *J Neurosci* 2002; 22(21): 9581-94.
- [24] Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56(3): 359-84.
- [25] Raoufi N, Piri M, Moshfegh A, Shahin MS. Nicotine improves ethanol-induced impairment of memory: possible involvement of nitric oxide in the dorsal hippocampus of mice. *Neuroscience* 2012; 219: 82-91.
- [26] Harooni HE, Naghdi N, Sepehri H, Rohani AH. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short-and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats. *Behav Brain Res* 2009; 201(1): 166-72.
- [27] Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY, Fu WM. Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. *Eur J Neurosci* 2005; 21(6): 1679-88.
- [28] Chen Y, Cui Z, Wang L, Liu H, Fan W, Deng J, et al. The impairment of learning and memory and synaptic loss in mouse after chronic nitrite exposure. *Environ Toxicol* 2016; 31(12): 1720-30.
- [29] Baratti CM, Boccia MM. Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance

- response in mice. *Behav Pharmacol* 1999; 10(8): 731-7.
- [30] Plech A, Klimkiewicz T, Maksym B. Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55(6): 987-92.
- [31] Bon CL, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2003; 23(5): 1941-8.
- [32] Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
- [33] East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 1991; 123(1): 17-9.
- [34] Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000; 130 (4S Suppl): 1007S-15S.
- [35] Jaffe K, Blanco ME. Involvement of amino acids, opioids, nitric oxide, and NMDA receptors in learning and memory consolidation in crickets. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 47(3): 493-6.