

بررسی نقش واسطه‌ای نیتریک اکساید (NO) در تاثیر هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر اضطراب در موش صحرایی ماده

محمد صوفی آبادی^{۱*} (M.Sc)، حمیدرضا صادقی پور^۱ (Ph.D)، علی‌رضا شعبان‌زاده^۱ (Ph.D)،
محمد رضا زرین دست^۲ (Ph.D)، احمد رضا دهپور^۲ (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

چکیده

سابقه و هدف: نیتریک اکساید (Nitric oxide) در کنترل بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک بدن شرکت دارد و نقش آن در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک در دست بررسی است. در بررسی حاضر نقش سیستم نیتروژیک در تاثیر هورمون‌های استروئیدی تخمدانی بر اضطراب در مدل ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (Elevated plus maze) می باشد.

مواد و روش‌ها: از موش‌های صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley با میانگین وزنی ۲۳۰-۱۷۰ گرم که همگی اواریکتومی شدند استفاده گردید. به موش‌ها استرادیول بنزوات به میزان ۱۰ mg/kg، سه ساعت قبل از آزمون یا پروژسترون به میزان ۲۵ mg/kg، شش ساعت قبل از آزمون و یا هر دو آنها به صورت زیرجلدی تزریق شدند. ۳۰ دقیقه قبل از تزریق این هورمون‌ها، L-Name به میزان ۶۰ mg/kg یا L-Arginine به میزان ۱۰۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تجویز گردید. سپس موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در ماز گذاشته شدند و شاخص‌های نشان‌دهنده اضطراب از طریق مشاهده، ارزیابی و ثبت گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق صفاقی L-Arginine سبب افزایش اضطراب در نمونه‌هایی که پروژسترون یا استرادیول و یا هر دو را دریافت کرده بودند گردید. از طرف دیگر، تزریق صفاقی L-Name موجب مهار اثر اضطراب‌زایی استرادیول گردید و اثر ضد اضطرابی پروژسترون را تقویت نمود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که هورمون‌های استروئیدی تخمدانی و سیستم نیتروژیک (NO) در فرایند اضطراب دخالت داشته و نیتریک اکساید به عنوان یک نوترانسمیتر اثرات هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر اضطراب را واسطه‌گری می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: استرادیول بنزوات، ماز بعلاوه‌ای شکل، پروژسترون، نیتریک اکساید، اضطراب.

مقدمه

شدت پاتولوژیک برخوردار باشد. اضطراب یکی از شایع‌ترین اختلالات روانی است و شیوع آن در طول زندگی زنان ۳۰/۵ و در مردان ۱۹/۲ درصد

اضطراب یک حالت ذهنی است که همه ما آن را بارها تجربه کرده‌ایم و می‌تواند از یک سطح طبیعی و یا از

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۲۳۴۵، فاکس: ۰۲۱-۶۴۱۹۴۸۴

شده است که پروژسترون موجب کاهش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و در نتیجه کاهش تولید نیتریک اکساید می شود [۱۳،۳،۲].

لذا با توجه به ماهیت مولکول نیتریک اکساید به عنوان یک نروترانسمیتر/نرومدولاتور در سیستم عصبی و نیز اثر تنظیمی هورمون‌های استروئیدی بر آن به نظر می رسد که احتمالاً بخشی از اثر هورمون‌های استروژن و پروژسترون در جنس ماده با واسطه رهایش نیتریک اکساید اعمال شود. بنابراین، با توجه به اهمیت نقش این دو سیستم در فرایند اضطراب و نیز خلاء تحقیقاتی موجود، هدف این مطالعه تعیین ارتباط این دو سیستم، با احتمال وجود نقش واسطه‌ای نیتریک اکساید در تاثیر هورمون‌های استروئیدی بر اضطراب، در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده می باشد.

مواد و روش‌ها

- ۱- حیوانات. در این تحقیق از ۱۲۰ موش صحرایی ماده (آلبینو) نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۳۰-۱۷۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۶تایی با سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی از ۰۷:۰۰ تا ۱۹:۰۰) و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و میزان آب و غذای کافی نگهداری شدند.
- ۲- روش جراحی. همه حیوانات تحت بیهوشی سبک با اتر و به روش استریل با انجام یک برش طولی در خط میانی شکم به طور دوطرفه اوارکتومی شدند. محل برش حد فاصل خطوط پستانی اول و دوم بود. با رؤیت جسم رحم یکی از شاخه‌های رحمی را به سمت انتها ادامه می دادیم تا تخمدان در دسترس قرار گیرد آنگاه با نخ بخیه از دو طرف گره می زدیم و تخمدان پس از چیدن، جدا و خارج می گردید. مشابه این عمل در سمت مقابل هم انجام می شد، سپس با دوختن شکم در دو لایه جداگانه، پوست با الکل ضد عفونی می شد. سپس ۱۴ روز به آنها فرصت داده شد تا ترومای جراحی برطرف گردد. آنگاه مورد آزمون قرار گرفتند.
- ۳- روش تزریق دارو. گروه‌های آزمون که به طور

است. اضطراب شدید می تواند یک بیماری کاملاً ناتوان کننده بوده و بر همه جنبه‌های زندگی تاثیر منفی بگذارد [۵].

یکی از عوامل مرتبط با اضطراب در جنس ماده تغییر سطح هورمون‌های درونزا بویژه استروئیدهای تخمدانی است. امروزه تغییرات رفتار، خلق و سطح اضطراب متعاقب وقایع بیولوژیک مانند بلوغ، حاملگی، یائسگی و در طول یک سیکل ماهیانه پدیده‌ای شناخته شده است که مربوط به تغییر سطوح و یا نسبت هورمون‌های جنسی هم می باشد [۸،۷،۱].

مطالعات متعدد دهه اخیر در مورد نقش هورمون‌های استروئیدی، بویژه استروژن و پروژسترون بر اضطراب در مدل‌های تجربی نشان می دهد که تغییرات سطح هورمون‌های تخمدانی در طول سیکل ماهیانه تاثیر معنی داری بر سطح اضطراب می گذارد و تجویز استرادیول به موش‌های اوارکتومی شده اضطراب را افزایش و بر عکس تجویز پروژسترون اضطراب را کاهش می دهد [۱۶،۷،۴].

نیتریک اکساید (Nitric oxide, NO) به عنوان یک ماده میانجی و تعدیل کننده در بسیاری از عملکردهای سیستم عصبی نقش دارد و این مولکول علاوه بر تاثیر بر سطح اضطراب در فرایند تشکیل حافظه، احساس جنسی، تهاجم و رفتار تغذیه‌ای نقش بسزایی دارد. مطالعات اخیر وجود آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) را در مناطق درگیر با رفتار اضطرابی مانند هیپوتالاموس، آمیگدال و هیپوکامپ نشان داده است. مهار این آنزیم و کاهش تولید نیتریک اکساید موجب کاهش سطح اضطراب و تحریک آن و افزایش تولید نیتریک اکساید باعث افزایش سطح اضطراب در مدل‌های تجربی می شود [۱۵،۱۲،۱۰].

در همین راستا، گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که بیان mRNA آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و میزان فعالیت آن می تواند توسط هورمون‌های استروئیدی تنظیم شود. استروژن موجب افزایش بیان این آنزیم و تولید نیتریک اکساید می شود. از سوی دیگر، در غالب مقالات گزارش

۱۰۰ × $\frac{\text{زمان ماندن در بازوهای باز}}{\text{زمان ماندن در بازوهای باز و بسته}}$ = مدت سپری شده در بازوی باز
شایان ذکر است که افزایش ورود به بازوهای باز و مدت سپری شده در آنها شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی می‌شود. همچنین قضاوت در مورد اختلاف معنی دار سطح اضطراب بدین صورت است که اگر همزمان هر دو شاخص (ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آنها) در یک راستا کاهش و یا افزایش یابد و حداقل یکی از آنها تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشته باشد، به عنوان تغییر معنی دار سطح اضطراب تلقی می‌شود [۱۶].

تجزیه و تحلیل داده‌ها. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان گردید. برای مقایسه آنها از روش غیرپارامتری Kurskal-Wallis استفاده شد. مقادیر $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

۱ - اثر استرادیول بنزوات در حضور و غیاب L-Arginine و L-Name بر فعالیت جستجوگرانه موش‌ها در ماز.

در مقایسه با گروه کنترل، استرادیول بنزوات (۱۰ mg/kg) موجب کاهش ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن شد (مقدار P به ترتیب کمتر از ۰/۰۵ و ۰/۰۱). پیش درمانی با (۶۰ mg/kg) L-Name، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق استرادیول موجب افزایش ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن شد که این اثر نسبت به گروه شم - جراحی معنی دار نبود، ولی در مقایسه با گروهی که تنها استرادیول دریافت کرده بودند معنی دار بود ($P < 0/001$). پیش درمانی با (۱۰۰ mg/kg) L-Arginine، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق استرادیول بیشترین کاهش را در ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن در مقایسه با گروه sham موجب شد ($P < 0/001$)، اما این اثر در مقایسه با گروهی که تنها استرادیول دریافت کرده بودند معنی دار نبود. در این گروه‌ها، تغییرات شاخص‌های مورد سنجش همواره در یک راستا بود (شکل ۱).

تصادفی انتخاب شدند عبارت بودند از:

۱- گروه‌هایی که فقط استرادیول بنزوات به میزان ۱۰ mg/kg سه ساعت قبل و یا پروژسترون به میزان ۲۵ mg/kg، ۶ ساعت قبل از آزمون و یا هر دو هورمون را به صورت زیر جلدی دریافت کردند.

۲- گروه‌هایی که به آنها ۳۰ دقیقه قبل از تزریق هورمون‌های مورد اشاره L-Arginine به میزان ۱۰۰ mg/kg یا L-Name به میزان ۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

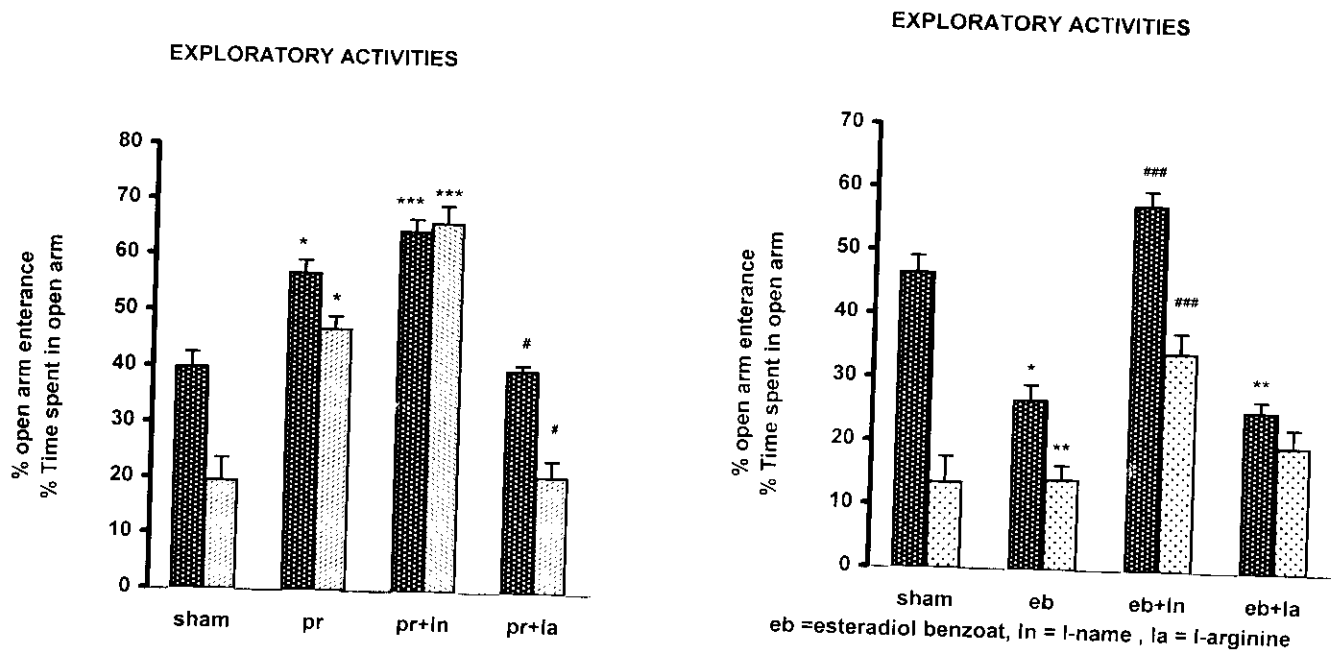
۳- گروه‌های کاذب (Sham) که به آنها حامل (سرم فیزیولوژیک به میزان ۰/۵ میلی لیتر + روغن ذرت به میزان ۰/۲ میلی لیتر) به صورت زیر جلدی تجویز شد.

۴- دستگاه ارزیابی سطح اضطراب. برای ارزیابی اضطراب از دستگاهی به نام، ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (Elavated plus-maze) که مدل استاندارد جهت ارزیابی سطح اضطراب در جوندگان است استفاده شد. این دستگاه از چوب ساخته شده و شامل دو بازوی باز (هر یک ۱۰×۵۰ سانتیمتر) و دو بازوی بسته (هر یک ۱۰×۱۰×۴۰×۵۰ سانتیمتر) و یک کفه مرکزی (۱۰×۱۰ سانتیمتر) است که بازوهای باز روبروی هم و بازوهای بسته هم روبروی یکدیگر قرار دارند و حدود ۵۰ سانتیمتر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرد. این مدل تجربی سنجش اضطراب غیر شرطی بوده و نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد.

۵- روش آزمایش. در صبح روز آزمون حیوانات به آزمایشگاه منتقل و داروهای مورد نظر تزریق می‌گردید. ۶ ساعت پس از تجویز پروژسترون و یا ۳ ساعت پس از تزریق استرادیول، هر موش به طور جداگانه، ۵ دقیقه قبل از آزمایش به اتاق کار منتقل و در جعبه‌ای به ابعاد ۱۰×۴۰×۳۰ سانتی متر قرار می‌گرفت تا فعالیت جستجوگرانه (Explorative activity) حیوان افزایش یابد. آنگاه به مدت ۵ دقیقه در ماز (قسمت کفه و رو به بازوی باز) قرار داده شده و فعالیت‌های جستجوگرانه زیر ثبت شد:

$$100 \times \frac{\text{تعداد ورود به بازوهای باز}}{\text{تعداد ورود به بازوهای باز و بسته}} = \text{ورود به بازوی باز}$$

در این گروه‌ها، تغییرات شاخص‌های مورد سنجش، همواره در یک راستا بود (شکل ۲).



pr = progesterone, ln = l-name, la = l-arginine

شکل ۲. مقایسه اثر پروژسترون (۲۵ mg/kg) بر ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن در حضور L-Name (۶۰ mg/kg) و L-Arginine (۱۰۰ mg/kg) و در غیاب آهلقظه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار می‌باشناختلاف معنی دار ($P < 0/05$) با گروه شم-جراحی، *** اختلاف معنی دار ($P < 0/001$) با گروه شم-جراحی، # اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) با گروه پروژسترون (pr).

۳ - اثر پروژسترون و استرادیول بنزوات در حضور و غیاب L-Arginine و L-Name بر فعالیت جستجوگرانه موش‌ها در ماز.

تزریق پروژسترون (۲۵ mg/kg)، ۶ ساعت قبل از آزمون و استرادیول بنزوات (۱۰ mg/kg)، ۳ ساعت قبل از آزمون موجب افزایش ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن شد ولی نسبت به گروه شم - جراحی معنی دار نبود. پیش‌درمانی با L-Name (۲۵ mg/kg)، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق پروژسترون موجب افزایش ورود و مدت سپری شده در بازوی باز گردید (به ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/01$) و پیش‌درمانی با (۱۰۰ mg/kg)

شکل ۱. مقایسه تاثیر استرادیول بنزوات (۱۰ mg/kg) بر ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن در حضور L-Name (۶۰ mg/kg) و L-Arginine (۱۰۰ mg/kg) و در غیاب آنها. هر نقطه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار می‌باشد؛ * اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) با گروه شم-جراحی، ** اختلاف معنی دار ($P < 0/01$) با گروه شم-جراحی، ### اختلاف معنی دار ($P < 0/001$) با گروه استرادیول بنزوات (eb).

۲ - اثر پروژسترون در حضور و غیاب L-Name و L-Arginine بر فعالیت جستجوگرانه موش‌ها در ماز. تزریق پروژسترون (۲۵ mg/kg)، ۶ ساعت قبل از آزمون موجب افزایش ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن شد ($P < 0/05$). پیش‌درمانی با (۶۰ mg/kg) L-Name، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق پروژسترون موجب افزایش بیشتر ورود و مدت زمان سپری شده در بازوی باز شد ($P < 0/001$) و پیش‌درمانی با (۶۰ mg/kg) L-Arginine (۱۰۰ mg/kg)، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق پروژسترون منجر به کاهش ورود به بازوی باز و مدت سپری شده در آن شد که نسبت به گروه شم - جراحی معنی دار نبود ولی در مقایسه با گروهی که تنها پروژسترون دریافت کرده بودند از اختلاف معنی داری برخوردار بود ($P < 0/01$).

می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز حاد استرادیول موجب کاهش ورود حیوانات به بازوی مدت سپری شده در آن شد که بیانگر افزایش اضطراب است و بر عکس تجویز حاد پروژسترون شاخص‌های مورد سنجش را افزایش بخشید که به منزله کاهش اضطراب می‌باشد. همچنین مشخص شد که بروز اثر افزایش دهنده اضطراب استرادیول، نیازی به پیش‌درمانی با پروژسترون نداشته و نیز اثر ضد اضطرابی پروژسترون هم بدون پیش‌درمانی با استرادیول ظهور می‌یابد. این نتایج منطبق با تجربیات حاصل از مطالعات انجام شده است [۱۶،۷،۴].

سطح اضطراب در گروهی که استرادیول و پروژسترون توأم در یافت کرده بودند تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت و به نظر می‌رسد که هر یک از این دو هورمون، اثرات مخالف یکدیگر را خنثی ساخته‌اند. این یافته هم در راستای نتایج مطالعات گذشته می‌باشد [۷،۱].

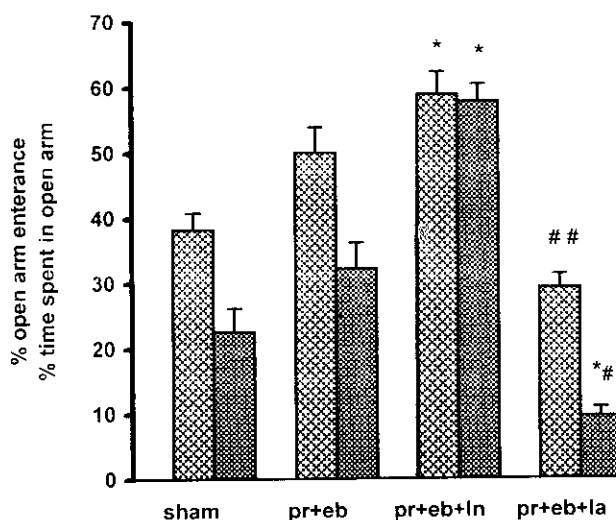
همانطوری که Volk و Yildiz نشان دادند با افزایش تولید نیتریک اکساید اضطراب افزایش و با مهار تولید آن اضطراب کاهش می‌یابد که این یافته‌ها منطبق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد [۱۵ و ۱۰].

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز از طریق تجویز L-Name اثر استرادیول بر اضطراب را مهار کرد و با تجویز L-Arginine بر شدت اضطراب افزوده شد، اما این افزایش تفاوت معنی‌داری با گروهی که استرادیول به تنهایی دریافت بودند، نداشت. بعلاوه تجویز L-Arginine و تحریک تولید نیتریک اکساید اثر کاهش دهنده اضطراب پروژسترون را مهار کرد ولی هنگامی که L-Name و پروژسترون توأم تجویز شد سطح اضطراب کاهش چشمگیری پیدا نمود. شایان ذکر است تاکنون در این زمینه تحقیق مشابهی صورت نگرفته است

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که نیتریک اکساید احتمالاً از جمله واسطه‌های عصبی است که در بروز رفتار اضطرابی ناشی از هورمون‌های استروئیدی دخالت دارد

L-Arginine، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق پروژسترون منجر به کاهش مدت سپری شده در بازوی مدت سپری شده در آن شد که بیانگر افزایش اضطراب است و بر عکس تجویز حاد پروژسترون شاخص‌های مورد سنجش را افزایش بخشید که به منزله کاهش اضطراب می‌باشد. همچنین مشخص شد که بروز اثر افزایش دهنده اضطراب استرادیول، نیازی به پیش‌درمانی با پروژسترون نداشته و نیز اثر ضد اضطرابی پروژسترون هم بدون پیش‌درمانی با استرادیول ظهور می‌یابد. این نتایج منطبق با تجربیات حاصل از مطالعات انجام شده است [۱۶،۷،۴].

EXPLORATORY ACTIVITIES



pr = progesterone, eb = esteradiol benzoat, ln =l-name, la =l-arginine

شکل ۳. مقایسه تاثیر پروژسترون (۲۵ mg/kg)، استرادیول بنزوآت (۱۰ mg/kg) در حضور و غیلب (۶۰ mg/kg) L-Name و L-Arginine (۱۰۰ mg/kg) بر ورود به بازوی مدت سپری شده در آن. هر نقطه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) با گروه شم-جراحی، # اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) با گروه pr+eb، ## اختلاف معنی‌دار ($P < 0/01$) با گروه pr+eb.

بحث

این مطالعه تاثیر هورمون‌های استروژن و پروژسترون و سیستم نیتریک اکساید را در ارتباط با مکانیسم اضطراب و نیز تاثیر پذیری سیستم نیتریک اکساید را از هورمون‌های استروئیدی تخمدانی مورد بررسی قرار

منابع

- و یا این که حداقل بخشی از اثرات هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر اضطراب در موش‌های صحرایی ماده از طریق رهایش نیتریک اکساید و فعال کردن سیستم نیتروژیک اعمال می‌گردد.
- سازوکار دقیق نحوه اثرگذاری این هورمون‌ها بر سیستم نیتروژیک هنوز به روشنی شناخته نشده است. دو مکانیسم احتمالی پیشنهاد شده است: نخست این که ممکن است هورمون‌های مذکور اثر تعدیلی مستقیمی بر نورون‌های حاوی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از جمله نورون‌های دارای گیرنده NMDA (که تحریک آنهاست نیتریک اکساید را افزایش می‌دهد) داشته باشند. در همین ارتباط مشخص شده است که مهار سیستم گلوتامینرژیک از طریق تجویز آنتاگونیست‌های رقابتی و غیررقابتی گیرنده‌های NMDA اضطراب را در مدل‌های تجربی کاهش می‌دهد [۶، ۱۴]. احتمال دوم آن است که تغییر فعالیت نیتریک اکساید سنتاز، با مکانیسم اثر تعدیلی هورمون‌های استروئیدی بر سیستم‌های نوروترانسمیتری دیگر مغز مانند GABA و 5HT صورت گرفته باشد [۴، ۱۶]. وجود ارتباط سیناپسی بین نورون‌های گاباژرژیک و نورون‌های گلوتامینرژیک در برخی از نقاط مختلف مغز مانند بخش پشتی هسته رافه این احتمال را تقویت می‌کند که اثر هورمون‌های استروئیدی بر نیتریک اکساید سنتاز با واسطه سیستم گاباژرژیک صورت می‌پذیرد. در همین زمینه ثابت شده است که استروژن موجب تضعیف و پروژسترون باعث تقویت انتقال عصبی گاباژرژیک در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. در انسان حدود ۸۰ درصد مسیرهای عصبی را دو سیستم گاباژرژیک و گلوتامینرژیک تشکیل می‌دهند و این دو سیستم در تنظیم سطح اضطراب با یکدیگر تعامل داشته و عملکرد این دو نقش مهمی در تعیین سطح اضطراب دارد [۴، ۱۰، ۱۱].
- به منظور شناخت دقیق‌تر مکانیسم‌های دخیل احتیاج به پژوهش‌های بیشتری می‌باشد.
- [1] Bitran, D. and Dowd, J.A., Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor, *Psychopharmacology*, 125 (1996) 65-73.
- [2] Cicinelli, E., Ignarro, L. and Schanouer, L.M., Effects of short-term transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide in post menopausal women, *Fertil. Steril.*, 69(1998) 58-61.
- [3] Cushing, B.S., Marhenk, S. and Meclar, P.A., Estradiol concentration and the regulation of locomotor activity, *Physiol. Behav.*, 58 (1995) 953-957.
- [4] Frank, A. and Bechaward, D., Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission (Analysis at behavioral and cellular and molecular levels, *Hormone Behav.*, 29(1995)131-140.
- [5] Kaplan, H.J. and Sandok, B.J., Synapsis of psychiatry, Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia, 1998, pp:582-628.
- [6] Montage, P. R., Gancayco, C.D. and Winn, M.J., Role of NO production in NMDA receptor mediated neurotransmitter release in cerebral cortex, *Science*, 263 (1994) 973-979.
- [7] Mora, S., Dussaubat, N. and Diazveliz, G., Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral of anxiety in female rats, *Psychoneuroendocrinology*, 22(1996) 609-620.
- [8] Pollk, B.D. and Rapkin, A.J., Menstrual cycle and social behavior in vervet monkeys, *Psychoneuroendocrinology*, 20 (1995)

- Neurol.,407 (1999) 207-227.
- [13] Wieser, F., Gruber, D.M. and Tschugguel, W., Progesterone and nitric oxide, *Zentrald. Gynakol.*,119 (1997) 12-16.
- [14] Wiley, I.L., Cristello, A.F. and Blaster, R.L., Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 294 (1995) 101-107.
- [15] Yeldiz, F., Ulock, G. and Erden, B., Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazol in the rat plus maze test, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 655 (2000) 199-202.
- [16] Zimemberg, B. and Favley, M.J., Sex differences in anxiety behavior in the rats: Role of gonadal hormones, *Physiol. Behav.*, 59 (1993) 1119-1124.
- 289-297.
- [9] Volk, R.M. and Nguyen, E., Possible involvement of nitric oxide in chlordiazpoxide induced anxiolysis in mice, *Life Sci.*,51 (1992) 255-260.
- [10] Volk, V., Scosaar, A. and Koks, S. S., 7-nitroindazol has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety , *Psychopharmacology*, 131 (1997) 399-405.
- [11] Wang, Q.P., Gnan, J.L. and Nakai, Y., Electerion microscopic syudy of GABAergic synaptic innervation of nitric oxide synpase immunoractive neurons in the dorsal raphe nucleus in the rat, *Synapse*, 25 (1997) 24-29.
- [12] Waremberg, M., Aderoy, D. and Jolivet, A., Nitric oxide synthase in the guinea preoptic area and hypothalamus, *J. Comp.*