

بررسی نقش ال-آرژنین بر حافظه فضایی موش صحرایی تخمدان برداری شده

The Effect of L-Arginine on Spatial Memory in Ovariectomized Rats

Fatemeh Saffarzadeh^{1,2}, Mohammad J. Eslamizade^{1,2},
Mahmoud Hosseini³

فاطمه صفارزاده^{۱،۲}، محمد جواد اسلامی زاده^{۱،۲}، سید محمود حسینی^۳

1. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.

2. Department of Neuroscience, School of Advanced Medical Technology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

۱. مرکز علوم تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.

۲. مرکز علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوریهای نوین، تهران، ایران.

۳. دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، مشهد، ایران.

چکیده

مقدمه: نیتریک اکساید به عنوان یک تنظیم کننده عصبی نقش مهمی را در عملکرد نورونی از جمله شکل پذیری نورونی و تقویت طولانی مدت سیناپسی ایفا می کند. این میانجی از ال-آرژنین توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ساخته می شود. هورمونهای تخمدانی نیز نقش مهمی را در سیستم عصبی اعمال می کنند و در فرآیندهای شناختی، یادگیری و حافظه نقش دارند. بررسی تاثیر ال-آرژنین سیستمیک بر حافظه فضایی موشهای تخمدان برداری شده هدف این پژوهش می باشد. **مواد و روش ها:** گروهی از موشها تخمدان برداری شدند و گروههای شاهد فقط تحت عمل جراحی بدون برداشتن تخمدانها قرار گرفتند. از هر دو گروه تعدادی به مدت ۵ روز و تعدادی به مدت ۸ هفته ال-آرژنین به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. به گروههای کنترل در طول این مدت سالیین تزریق می شد. در پایان، تست ماز آبی برای ۵ روز جهت بررسی حافظه فضایی از موشها به عمل آمد. طول مسافت و مدت زمان تاخیر در یافتن سکواندازه گیری شد. **یافته ها:** فاصله پیموده شده و زمان سپری شده جهت رسیدن به سکوی پنهان، در گروه تخمدان برداری شده با اختلاف معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین درمان کوتاه مدت با ال-آرژنین فاصله پیموده شده و زمان سپری شده برای رسیدن به سکو را در گروه تخمدان برداری شده کاهش داده است. **نتیجه گیری:** به نظر می رسد ال-آرژنین در کوتاه مدت باعث بهبود حافظه فضایی موشهای تخمدان برداری شده است.

اطلاعات مقاله

دریافت: ۵ مهر ۱۳۹۱

پذیرش: ۱ آبان ۱۳۹۱

کلیدواژه:

نیتریک اکساید،
شکل پذیری سیناپسی،
استروئید،
استروژن،
حافظه.

ABSTRACT

Article info:

Received: 26 Sept. 2012

Accepted: 22 Oct. 2012

Key words:

Nitric Oxide,
Synaptic plasticity,
Steroids,
Estrogen,
Memory.

Introduction Nitric oxide (NO), an important modulator of neuronal functions, is involved in synaptic plasticity and long-term potentiation (LTP). Ovarian hormones have important role on the central nervous system functions, especially learning, memory and cognitive ability. The present study was carried out to evaluate the effect of acute (A) and chronic (C) L-Arginine (L-Arg) administration on learning and memory in ovariectomized (OVX) rats. **Materials & Methods** Forty-eight female Wistar rats were grouped as: 1) Sham, 2) OVX, 3) Sham-LA-A, 4) OVX-LA-A, 5) Sham-LA-C, 6) OVX-LA-C. The animals of sham-L-Arg-A and OVX-L-Arg-A were acutely treated with 500 mg/kg of L-Arg for 5 days. Sham-L-Arg-C and OVX-L-Arg-C chronically received 500 mg/kg/day of L-Arg during 8 weeks before 5 test days. The animals in sham and OVX groups received 1 ml/kg saline instead of L-Arg. At the end of the experiment, the animals were tested in Morris water maze and the escape latency and traveled path to reach the platform were compared between groups. **Results** Results showed that the escape latency and traveled path in OVX group were significantly higher than in sham group ($p < 0.05$). The animals in OVX-L-Arg-A group had significantly lower traveled path length and escape latency compared to OVX group ($p < 0.001$). **Conclusion** This indicates that L-Arg has a role in Morris water maze tasks disturbances in OVX rats.

* Corresponding Author:

Fatemeh Saffarzadeh

E-mail: fsaffarzadeh@gmail.com

• نویسنده مسئول:

فاطمه صفارزاده

آدرس الکترونیکی: fsaffarzadeh@gmail.com

مقدمه

انجام شد، نشان دادند که در جوندگان بروز عناصر تولید کننده NOS ممکن است به دلیل تغییرات سریع مقادیر هورمونی که در طول چرخه هورمونی رخ می دهد دچار تغییر شود (۱۰). همچنین در دوران حاملگی متناسب با افزایش غلظت استرادیول پلاسما، میزان تولید NO بسیاری از بافت ها مانند مغز افزایش می یابد (۱۱). استروژن قادر است با القای بیان آنزیم NOS، تولید NO را در طی چند دقیقه افزایش دهد (۹). استروژن همچنین می تواند با کاهش آنیون پراکسیداز که از عوامل مهم تخریب NO است بر طول اثر آن بیفزاید. به علاوه استروژن قادر است که با فسفریلاسیون گیرنده های NMDA و افزایش کنداکتانس یون ها به ویژه کلسیم، تولید NO را در سیستم عصبی افزایش دهد (۱۲). در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر هورمون های جنسی و ال-آرژنین و تداخل این دو در حافظه فضایی رت می پردازیم.

مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۴۸ موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن 20 ± 200 گرم انجام شد. حیوانات در مرکز نگهداری حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای محیطی 1 ± 24 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آنها به گروه های تخمدان برداری شده (در طی عمل جراحی تخمدانها برداشته شدند) و شاهد (عمل جراحی شدند اما تخمدانها برداشته نشد) تقسیم بندی شدند. در طی ۸ هفته نگهداری در لانه حیوانات و طبق جدول شماره ۱ دارو درمانی به صورت داخل صفاقی انجام شد. تقسیم بندی گروهها بدین صورت بود: Sham (شاهد)، OVX (تخمدان برداری شده)، Sham-LA-A (موشهای شاهد که ال-آرژنین به مدت ۵ روز در طی یادگیری دریافت کردند)، OVX-LA-A (موشهای تخمدان برداری شده که ال-آرژنین به مدت ۵ روز در طی یادگیری دریافت کردند)، Sham-LA-C (موشهای شاهد که ال-آرژنین به مدت ۸ هفته قبل از یادگیری دریافت کردند)، OVX-LA-C (موشهای تخمدان برداری شده که ال-آرژنین را به مدت ۸ هفته قبل از یادگیری دریافت کردند). پس از ۸ هفته تست سنجش حافظه به مدت ۵ روز از آنها به عمل آمد. به منظور ارزیابی و اندازه گیری شاخص های یادگیری و حافظه فضایی

در جنس مونث، با افزایش سن علاوه بر کاهش قابل توجه در توانایی باروری که به دنبال کاهش هورمونهای جنسی رخ می دهد بسیاری از اندام های دیگر نیز دچار تغییر می گردند (۱). مغز از مهمترین اعضای بدن است که در اثر کمبود استروژن دچار تغییر می شود (۲). یکی از مشکلات مهم، اختلال در به یادآوری نام و یا دیگر اطلاعات مهم می باشد (۳). نقش استروژن در سیستم عصبی مرکزی مخصوصا بر یادگیری و حافظه به طور وسیعی مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵).

نیتریک اکساید (NO) یک رادیکال ناپایدار، با واکنش سریع و قابل انتشار است. NO توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) ساخته می شود. فعالسازی NOS منجر به تشکیل NO و سیتروولین از ال-آرژنین می شود. NO به عنوان یک پیک رتروگراد عمل کرده و عملکرد پایانه اکسونی را تنظیم می کند که نسبت به نورونی که از آن آزاد می شود در موقعیت پیش سیناپسی قرار گرفته است (۶، ۷). به نظر می رسد در انواعی از فعالیت های فیزیولوژیکی از قبیل تقویت بلند مدت سیناپسی (long-term potentiation)، حفاظت نورونی، تجزیه نورونی و تنظیم ترشح پپتیدرژیک نقش داشته باشد (۸).

شواهدی وجود دارد که هورمونهای جنسی و NO نیز با یکدیگر تداخل عمل دارند (۹، ۱۰). NO نقش مهمی در تولید مثل ایفا می کند (۹). در مغز، NO باعث رهایی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین از هیپوتالاموس می شود که از این طریق سبب کنترل رفتارهای جنسی زنانه و مردانه می شود (۱۰). نورونهای محتوی NO در سیستم عصبی مرکزی در مناطقی که در کنترل تولید مثل و رفتار جنسی درگیر است، به طور گسترده ای پراکنده شده اند. بروز NOS نورونی در جنس نر تحت تاثیر تستسترون و در جنس ماده تحت تاثیر استروژن است. علاوه بر این، NOS در موقعیت مشابهی با گیرنده های هورمون های گنادی قرار دارد (۱۰). در شرایط فیزیولوژیکی، جنس ماده در گونه های پستانداران در معرض تغییرات کوتاه مدت مقادیر هورمون های گنادی قرار می گیرد (مرحله استروس). مطالعات اخیر که در سیستم های هیپوتالاموسی و لیمبیک موش و موشهای صحرایی

جدول ۱. نحوه درمان گروهها حین و قبل از یادگیری

گروهها درمان	Sham	OVX	Sham-LA-C	Sham-LA-A	OVX-LA-C	OVX-LA-A
قبل از یادگیری (۸ هفته)	۱ ml/kg/day saline	۵۰۰ mg/kg/day L-arginine	۱ ml/kg/day saline	۵۰۰ mg/kg/day L-arginine	۱ ml/kg/day saline	۱ ml/kg/day saline
حین یادگیری (۵ روز)	۵۰۰ mg/kg/day L-arginine	۱ ml/kg/day saline	۵۰۰ mg/kg/day L-arginine	۱ ml/kg/day saline	۱ ml/kg/day saline	۱ ml/kg/day saline

که برداشتن تخمدان ممکن است هیچ اثری بر حافظه موش صحرایی نداشته باشد (۲۰، ۲۱). بعضی گزارش داده اند که حتی برداشتن تخمدان در طولانی مدت باعث بهبود در حافظه فضایی نیز می گردد (۲۲). البته اثر استروژن بر حافظه وابسته به چند پارامتر از قبیل غلظت استروژن و نوع رفتار مورد بررسی می باشد (۲۳). به عنوان مثال نشان داده شده است دوزهای بالای استروژن سبب اختلال در حافظه فضایی موشهای صحرایی می گردد در حالی که دوزهای پایین استروژن سبب تسهیل در حافظه فضایی می شود (۲۴، ۲۵).

در تمام مطالعات ذکر شده دستگاه ها و روش های متفاوتی برای بررسی حافظه مورد استفاده قرار گرفته اند که می تواند بر نتیجه مطالعات تاثیر گذار باشد (۲۶). سن حیوان و مدت زمان محروم بودن از هورمونهای تخمدانی هم از دیگر عوامل تاثیر گذار است (۲۶). مطالعه ما نشان داد که حذف هورمونهای تخمدانی به مدت هشت هفته حافظه فضایی موش صحرایی دو ماهه را دچار اختلال می کند. درمان با ال-آرژنین در طی پنج روز یادگیری تأثیری بر عملکرد موشهای دارای تخمدان نداشته است چرا که هیچ یک از شاخص های فاصله پیموده شده و زمان سپری شده را تحت تاثیر قرار نداده است. مجلسی و همکاران نیز در مطالعه ای نشان دادند که تزریق ال-آرژنین به داخل هیپوکامپ به تنهایی اثری بر روی شاخص های اندازه گیری شده در تست ماز آبی موریس نداشته است (۲۷). این در حالی است که درمان کوتاه مدت با ال-آرژنین فاصله پیموده شده و زمان سپری شده برای رسیدن به سکو را در موشهای تخمدان برداری شده کاهش داده است، به عبارت دیگر ال-آرژنین باعث بهبود حافظه فضایی موشهای بدون تخمدان شده است. به نظر می رسد ال-آرژنین اختلال حافظه ناشی از فقدان هورمون های جنسی را جبران کرده است. مطالعات دیگری نیز نشان داده است که تزریق سیستمیک ال-آرژنین سبب افزایش تولید NO در مغز موش می شود (۲۸) و بنابراین ال-آرژنین سبب بهبود در یادگیری و تثبیت آن می شود (۲۹). شواهد متعدد نشان می دهد که تولید NO با افزایش سن کاهش می یابد (۳۰). همینطور ترشح استروژن نیز با افزایش سن مخصوصا در طی دوره یائسگی کاهش می یابد (۱۳). از طرفی استروژن سبب القاء فعالیت NOS می گردد و استروژن درمانی در زنان یائسه سبب افزایش سطح نیتريت و نیترات سرم می شود (۳). با توجه به تداخل عمل استروژن با NO، شاید بتوان استدلال نمود که احتمالا با کاهش سطح استروژن میزان NO هم کاهش یافته است و درمان گروه های تخمدان برداری شده با ال-آرژنین، به عنوان پیش ساز NO، این عدم تعادل NO را جبران کرده و در نتیجه سبب بهبود اختلال حافظه می شود. اثرات مفید ال-آرژنین در سایر اختلالات عصبی ناشی از فقدان هورمونهای جنسی (۳۱) و همینطور اختلالات غیر عصبی (۳۲) می تواند موید این فرضیه باشد. به نظر می رسد که اثر ال-آرژنین بر عملکرد حافظه فضایی در حضور و عدم

موشهای صحرایی، ماز آبی موریس (Morris Water Maze) مورد استفاده قرار گرفت. یک میانگین عددی برای شاخصهای طول مسافت (path length) و مدت زمان تاخیر در یافتن سکو (latency) در طول ۵ روز به دست آمد که نشان دهنده عملکرد آن موش در شاخصهای مورد نظر در ۵ روز است.

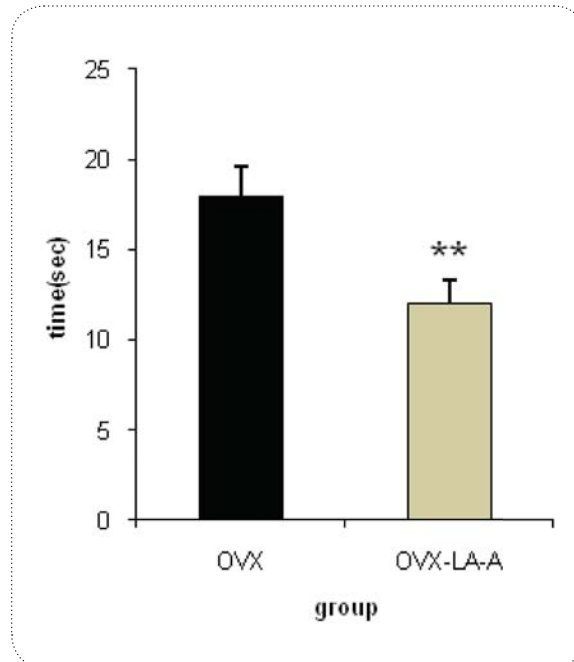
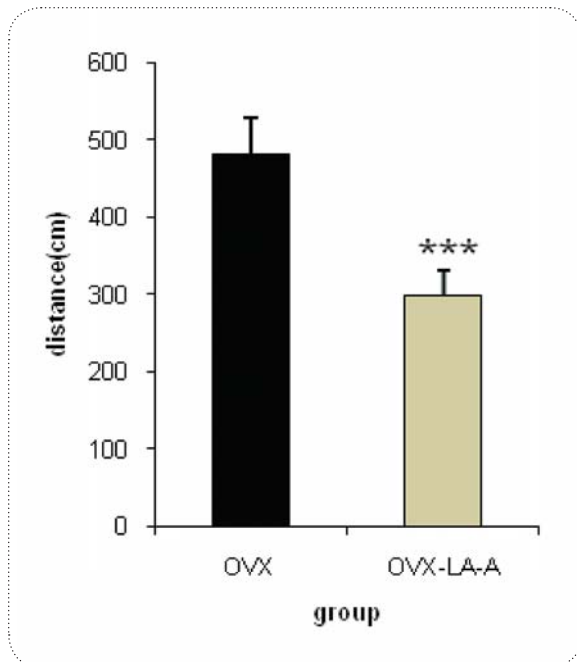
یافته ها

نتایج آماری آزمون تی- غیر زوجی (unpaired t-test) به دست آمده در این مطالعه حاکی از اختلال در حافظه فضایی موشهای تخمدان برداری شده در مقایسه با موشهای گروه شاهد می باشد. فاصله پیموده شده و زمان سپری شده جهت رسیدن به سکوی پنهان، در گروه تخمدان برداری شده با اختلاف معنی داری بیشتر از گروه شاهد می باشد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) - (تصویر ۱).

در درمان بلند و کوتاه مدت با ال-آرژنین، فاصله پیموده شده و زمان سپری شده جهت رسیدن به سکو در گروههای دارای تخمدان اختلاف معنی داری ندارند. همچنین درمان بلند مدت با ال-آرژنین در موشهای تخمدان برداری شده سبب اختلاف معنی داری در مقایسه با گروه تخمدان برداری شده بدون درمان با ال-آرژنین نشده است. اما درمان کوتاه مدت با ال-آرژنین فاصله پیموده شده و زمان سپری شده برای رسیدن به سکو را کاهش داده است (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.001$) - (تصویر ۲).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه جهت شبیه سازی یائسگی از موشهای تخمدان برداری شده استفاده شده است زیرا متداولترین مدل برای این منظور می باشد (۱۳). نتایج حاکی از افزایش معنی دار فاصله پیموده شده و زمان سپری شده جهت رسیدن به سکو در گروه تخمدان برداری شده در مقایسه با گروه شاهد می باشد و موید این مطلب است که برداشتن تخمدان می تواند سبب اختلال در حافظه فضایی گردد. Montairo و همکارانش نشان دادند که کمبود استروژن در موشهای تخمدان برداری شده باعث اختلال حافظه فضایی آنها در تست ماز آبی می شود (۱۴). در مطالعه ای نشان داده شد که هورمونهای تخمدانی سبب حفظ عملکرد حافظه در موشهای بالغ می شود (۱۵). بنابراین به نظر می رسد که هورمونهای جنسی برای عملکرد طبیعی حافظه در موشهای بالغ ضروری هستند. اگر چه بر خلاف این، برخی مطالعات گزارش داده اند که استروژن اثر منفی بر حافظه و یادگیری دارد (۱۶-۱۹). البته این پژوهشگران علت تفاوت در نتایج به دست آمده از تحقیق خود را مدت زمان آشنایی حیوان با ماز، مدت زمان یادگیری و تست، که طولانی تر از تحقیقات مشابه بود و همچنین کاهش استرس از طریق تزریق آرام بخش قبل از انجام تست می دانند. همچنین محققان دیگر نیز گزارش دادند



شماره ختم

تصویر ۲. مقادیر میانگین \pm خطای معیار فاصله پیموده شده و زمان سپری شده در پیدا نمودن سکو در گروه های OVX و OVX-LA-A. پس از هشت هفته در طی پنج روز ال-آرژنین ۵۰۰ mg/kg تزریق شده و پس از سی دقیقه، دو شاخص ذکر شده در طی پنج روز تست شدن در ماز آبی موریس محاسبه گردید. مقایسه آماری بین گروه های OVX و OVX-LA-A توسط آزمون تی - غیر زوجی (unpaired t-test) صورت گرفته است، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه OVX.

عنوان مثال در مواردی که تولید NO مهار شده است تجویز ال-آرژنین به صورت رقابتی توانسته است اثر مهاری تولید NO را متوقف کند (۶). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که درمان موش های تخمدان برداری شده با ال-آرژنین می تواند حافظه را بهبود بخشد اگر چه تجویز آن در موشهای دارای تخمدان اثری نداشت. بسیاری از محققین معتقدند که NO دارای اعمال بیولوژیکی دو جانبه از انتقال سیناپسی (Signal Transduction) تا مرگ سلولی باشد. به عنوان مثال در مواردی نشان داده شده است که افزایش تولید NO سبب ایجاد آسیب مغزی می شود (۳۴) و افزایش بیش از حد فعالیت گیرنده های گلوتاماتی به همراه ایسکمی و دیگر فرایندهای کشنده تحریکی (Excitotoxic) نیز در نتیجه آزاد سازی بیش از حد NO می تواند رخ دهد (۳۵، ۳۴). پیشنهاد شده است که NO اندوژن ممکن است در تنظیم نوروترنسمیترها و فعالیت هیپوکامپ مغز دخیل باشد (۳۶)، در حالیکه پیش ساز NO، ال-آرژنین می تواند اثرات متضادی داشته باشد (۳۷). نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که ال-آرژنین می تواند بر حافظه و یادگیری تاثیر داشته باشند، اگر چه این اثرات در حضور و عدم حضور تخمدان می تواند متفاوت باشد.

شواهد دیگری نشان می دهد افزایش غلظت NO به همراه رادیکال های اکسیژن سبب تشکیل اکسیدان قوی به نام Peroxynitrite می شود که می تواند واسطه عملکرد سمی NO

حضور هورمونهای تخمدانی متفاوت است چرا که درمان موشهای تخمدان برداری شده توانسته است شاخص های مورد بررسی را بهبود بخشد ولی در گروه شاهد چنین تاثیری نداشته است. علاوه بر مقایسه تاثیر ال-آرژنین در گروههای تخمدان برداری شده و شاهد نشان داد که فاصله پیموده شده برای رسیدن به سکو در گروه تخمدان برداری شده که ال-آرژنین طی پنج روز یادگیری دریافت کرده بودند از گروه شاهد درمان شده با ال-آرژنین کمتر بود. در مطالعه حاضر گروههای مورد مطالعه به مدت هشت هفته بعد از حذف تخمدان ها با ال-آرژنین درمان شده بودند ولی در ابتدای شروع دوره پنج روزه آزمون درمان با ال-آرژنین متوقف شده بود که می توان احتمال داد اثر ال-آرژنین در طی این پنج روز از بین رفته باشد. اگر چه مطالعات متعدد نشان داده است که NO نقش مهمی در ایجاد یادگیری و حافظه دارد (۲۹) و اینکه ال-آرژنین پیش ساز NO می باشد، نتایج بدست آمده در ارتباط با ال-آرژنین قابل بحث می باشد. یک احتمال در مورد اثر مشاهده شده می تواند تبدیل ال-آرژنین اگزوزن به آگماتین باشد. آگماتین یک مهار کننده آنزیم NOS است (۳۳). بنابراین این گونه تصور می شود که آگماتین سبب تعادل اثر ال-آرژنین می شود. نکته قابل توجه دیگر این که نیتریک اکساید در حالت طبیعی حداکثر اثر بخشی را بر حافظه دارد و تجویز ال-آرژنین نمی تواند این اثر بخشی را بیشتر کند ولی در صورتی که نقصانی در NO ایجاد شود درمان با ال-آرژنین می تواند موثر باشد. به

تزریق سیستمیک ال-آرژنین با تاثیر بر فشار خون شریانی و سطح گلوکز خون، باعث تغییر در توانایی حیوان در یادگیری می شوند (۴۱). اگر چه مکانیسم های نروترنسیمیتری نیز می تواند مطرح باشد چرا که تداخل اثر NO با میانجی هایی مثل گلوتامات (۲) و استیل کولین (۴۲) نشان داده شده است. اما بر اساس نتایج مطالعه حاضر نمی توان مکانیسم یا مکانیسم های دخیل در تغییر حافظه به وسیله NO را مشخص کرد و نیاز به مطالعات بیشتر و دقیق تر می باشد.

باشد (۳۸). بنابراین می توان این گونه مطرح کرد که تولید NO در غلظت های بیولوژیکی می تواند عامل مهمی در تشکیل حافظه فضایی باشد و NO پیش نیاز جهت تشکیل حافظه نیست بلکه نقش تنظیمی در تشکیل یادگیری و حافظه ایفا می کند (۳۹). سنتز NO محیطی برای حفظ تونوس وازودیلاتوری مهم است و مهار آن سبب هیپرتانسیون می شود (۳۲). علاوه بر این NO ممکن است به عنوان یک فاکتور مهم در تنظیم ترشح انسولین و گلوکاگون و در نتیجه قند خون نقش داشته باشد (۴۰). بنابراین

منابع

1. Cordoba-montoya DA, Carrer HF. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulator. *Front Neuroendocrinol.* 2000; 21(1): 1-56.
2. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Rev.* 1999; 20(3): 279-307.
3. McEwen BS. Estrogen action throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57: 357-384.
4. Daniel JM, Fader AJ, Spencer A, Dohanich GP. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav.* 1997; 32(3): 217-25.
5. Woolley CS. Estrogen mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav.* 1998; 34(2): 140-8.
6. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. *Psychopharmacol.* 1993; 112(4): 521-4.
7. Edwards TM, Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31(3): 413-25.
8. Bhardwaj A, Northington FJ, Ichord RN, Hanley DF, Traystman RJ, Koehler RC. Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats. *Stroke.* 1997; 28(4): 850-6.
9. Lopez-Jaramillo P, Teran E. Improvement in functions of the central nervous system by estrogen replacement therapy might be related with an increased nitric oxide production. *Endothelium.* 1999; 6(4): 263-6.
10. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Sica M, Gotti S, Martini M, Pinos H, et al. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neurosci.* 2006; 138(3): 987-95.
11. Winer CP, Tampion LP. Nitric oxide and pregnancy, *Seminars in Perinatology.* 1997; 21(4): 207-80.
12. Yildiz Akar F, Ulak G, Tanyeri P, Erden F, Utkan T, Gacar N. 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. *Pharmacology, Biochem Behav.* 2007; 87(4): 434-43.
13. Savonenko AV, Markowska AL. The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. *Neurosci.* 2003; 119(3): 821-30.
14. Monteiro SC, Matté C, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Vitamins E and C pretreatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. *Neurobiol Learn Mem.* 2005; 84(3): 192-9.
15. Ping SE, Trieu J, Wlodek ME, Barrett GL. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning. *J Neurosci Res.* 2008; 86(7): 1588-98.
16. Chesler EJ, Juraska JM. Acute administration of estrogen and progesterone impairs the acquisition of the spatial morris water maze in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 2000; 38(4): 234-42.
17. Fuger HN, Cuninghame SG, Rissman EF, Foster TC. Sex differences in the activational effect of ERalpha on spatial learning. *Horm Behav.* 1998; 34 (2): 163-70.
18. Fader AJ, Johnson PE, Dohanich GP. Estrogen improves working but not reference memory and prevents amnesic effects of scopolamine of a radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 62(4): 711-7.
19. Healy SD, Braham SR, Braithwaite VA. Spatial working memory in rats: no differences between the sexes. *Proceedings, Biological Sciences/The Royal Society.* 1999; 266 (1435): 2303-8.

20. Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 1994; 644(2): 305-12.
21. Iwasaki K, Hatip-Al-Khatib I, Egashira N, Akiyoshi Y, Arai T, Mishima K. Ovariectomy combined with amyloid beta (1-42) impairs memory by decreasing acetylcholine release and Alpha7nAChR expression without induction of apoptosis in the hippocampus CA1 neurons of rats. *Neurotox Res.* 2004; 6(4): 299-309.
22. Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Hunter CL, Price KL, Moore AB, Granholm AC. Ovarian hormones and cognition in the aged female rat: I. Long-term, but not short-term, ovariectomy enhances spatial performance. *Behav Neurosci.* 2003; 117(6): 1395-1406.
23. Davis DM, Jacobson TK, Aliakbari S, Mizumori SJ. Differential effects of estrogen on hippocampal and striatal-dependent learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2005; 84(2): 132-7.
24. Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 1998; 34(2): 149-162.
25. Holmes MM, Wide JK, Galea LA. Low levels of estradiol facilitate, whereas high levels of estradiol impair, working memory performance on the radial arm maze. *Behav Neurosci.* 2002; 116(5): 928-34.
26. Sato T, Teramoto T, Tanaka K, Ohnishi Y, Irifune M, Nishikawa T. Effects of ovariectomy and calcium deficiency on learning and memory of eight-arm radial maze in middle-aged female rats. *Behav Brain Res.* 2003; 142(1-2): 207-16.
27. Majlessi N, Choopani S, Bozorgmehr T, Azizi Z. Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. *Neurobiology of Learn Mem.* 2008; 90(2): 413-9.
28. Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos PJLM. Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem.* 1996; 66(4): 1683-90.
29. Plech A, Klimkiewicz T, Maksym B. Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol J Pharm.* 2003; 55(6): 987-92.
30. Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.* 2000; 25(9-10): 1315-41.
31. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, SchoWeld P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1996; 348 (9025): 429-32.