اثر مکامیلامین (آنتاگونیست گیرنده نیکوتینی) بر روی فراموشی القاءشده با هارمان در تست حافظه اجتنابی مهاری

محمد ناصحی [۱*](Ph.D)، مرتضی پیری [۲](Ph.D)، شهربانو شریفی [۳](M.Sc)، مریم‌السادات شاهین [۴](B.Sc)، محمدرضا زرین‌دست [۵](Ph.D)

۱- *دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی*

۲- *دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی*

۳- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی*

۴- *دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری، گروه زیست‌شناسی، باشگاه پژوهش‌گران جوان*

۵- *دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، گروه فارماکولوژی*

چکیده

سابقه و هدف: آلکالوئیدهای β-کربولین نظیر هارمان در مواد غذایی گیاهی معمولی (گندم، برنج، ذرت، جو، انگور و قارچ) یافت می‌شوند. این آلکالوئیدها دارای اثرات شناختی زیادی از جمله تغییر در حافظه کوتاه و بلندمدت می‌باشند. در این مطالعه اثر تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های نیکوتینی به ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القاءشده با هارمان در موش سوری مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: کانول‌گذاری دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی موش‌های سوری انجام شد. یک هفته بعد از کانول‌گذاری، موش‌ها در دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری مدل Step-down آموزش داده شدند. ۲۴ ساعت بعد از آموزش در روز آزمون تأخیر حیوانات در پایین آمدن از سکو به عنوان معیار حافظه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تزریق سیستمیک هارمان پیش از آموزش و پس از آموزش باعث القاء فراموشی می‌شود. تزریق دوزهای بالای مکامیلامین (۴ میکروگرم بر موش)، آنتاگونیست گیرنده‌های نیکوتینی، به هیپوکامپ پشتی قبل از آزمون باعث القاء فراموشی می‌شود. از طرف دیگر تزریق دوزهای غیر مؤثر مکامیلامین (۰/۵، ۱، ۲ میکروگرم بر موش) به هیپوکامپ پشتی قبل از آزمون به طور کامل فراموشی القاءشده با هارمان را اصلاح می‌نماید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما در این مطالعه نشان می‌دهد که یک برهم‌کنش پیچیده بین گیرنده‌های نیکوتینی هیپوکامپ پشتی و فراموشی القاءشده با هارمان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: هارمان، مکامیلامین، فراموشی، هیپوکامپ پشتی، موش سوری

مقدمه

بیماری آلکالوئید β-کربولین محتوی یک هسته ایندول و یک حلقه پیریدینی می‌باشد [۱]. تعدای از آلکالوئیدهای β-کربولین، نظیر ۱- متیل -β-کربولین (هارمان) و ۱- متیل -۷- متوکسی-۳ و ۴- دی هیدرو -β-کربولین (هارمالین) به طور طبیعی در غذای انسان وجود دارند. این ترکیبات در غذاهای گیاهی معمولی نظیر گندم، برنج، ذرت، جو، چاودار، انگور، سرکه و قارچ‌ها و هم‌چنین در ترکیبات استنشاقی مشتق از گیاهان، نظیر تنباکو یافت می‌شوند [۲]. این ترکیبات هم‌چنین در پلاسمای خون، قلب، کبد، کلیه و بافت‌های مغزی وجود دارند [۳-۵]. مقدار این ترکیبات در پلاسمای خون افراد سیگاری، الکلی، افراد معتاد به هروئین، در بیماران با

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۵۴۳۵۸۵ نمابر: ۰۲۳ ۲۴۲۲۹۹۶۳

Email: bionasehi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

لرزش ذاتی و بیماران پارکینسونی زیاد می‌باشد [۶]. به نظر می‌رسد این ترکیبات نقش اساسی در پاتوفیزیولوژی اختلالات مختلف سیستم عصبی مرکزی دارند. مدارک هم‌چنین نشان می‌دهند که تولید β-کربولین‌ها به روش آنزیمی صورت می‌گیرد و اگر پیش‌ساز آن‌ها در محیط فاقد آنزیم قرار گیرد، به هیچ عنوان این ترکیبات تولید نمی‌شوند [۷].

در مورد β-کربولین‌ها مطالعات رفتاری چندانی صورت نگرفته است. گزارشات پیشین نشان می‌دهند که گیاهان محتوی برخی از β-کربولین‌ها مانند هارمالا دارای اثرات توهم‌زا می‌باشند [۸]. گزارشاتی نیز مبنی بر بی‌اثر بودن هارمان بر شکل‌گیری حافظه کوتاه و بلندمدت وجود دارد، هر چند بیان شده که شاید هارمان بتواند بر روی حافظه غیر فضایی و غیر اجتنابی اثر بگذارد. از طرف دیگر گزارشاتی وجود دارد که هارمالین یادگیری حرکتی را تخریب می‌نماید [۹]. مطالعات الکتروفیزیولوژیکی هم‌چنین نشان می‌دهند که این آلکالوئیدها با فعال نمودن هسته‌های زیتونی تحتانی و مخچه باعث ایجاد لرزش می‌شوند [۱۰]. مطالعه اخیر ما مشخص نمود که هارمان تأثیر زیادی روی حافظه اجتنابی مهاری دارد و تزریق پس از آزمون هارمان به شدت حافظه اجتنابی مهاری را تخریب می‌نماید [۱۱].

β-کربولین‌ها اثرات رفتاری خود را از طریق برهم‌کنش با گیرنده‌ها و آنزیم‌های مختلف درگیر در تولید و حذف نورترانسمیترها اعمال می‌نمایند. گزارش شده که β-کربولین‌ها می‌توانند به گیرنده‌های بنزودیازپینی، ایمیدازولین، دوپامینی، کولینرژیک، سروتونینی و گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA وصل شوند و عمل‌کرد آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند [۱۲-۱۵]. از طرف دیگر این آلکالوئیدها آنزیم‌هایی نظیر مونوآمین اکسیداز A و B را مهار می‌نمایند و از این طریق نورترانسمیترهایی نظیر دوپامین را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۶]. مشخص شده است که تغییرات کوچک در ساختار β-کربولین‌ها می‌تواند تغییرات شدید در میل ترکیبی آن‌ها در اتصال به گیرنده‌ها ایجاد نماید. مطالعات *In vivo* نشان می‌دهد که تتراهیدرونوروهارمان تمایل زیادی به گیرنده‌های سروتونینی دارد و می‌تواند اثرات محرک‌های گیرنده‌های دوپامینی را بلوکه نماید [۱۷]، در حالی که هارمان، هارمین و هارمالین تمایل زیادی به گیرنده‌های کولینرژیک و گیرنده‌های اپیوئیدی دارند. به نظر می‌رسد تمایل متفاوت کربولین‌ها به گیرنده‌های مختلف به میزان اشباع حلقه و گروه‌هایی که روی حلقه قرار می‌گیرند بستگی دارد [۱۴].

مشخص شده که هیپوکامپ در یادگیری و حافظه نقش مهمی بر عهده دارد، هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهند که ورودی‌های کولینرژیک که از بخش میانی سپتوم و بازوی عمودی بخش مورب بروکا وارد هیپوکامپ می‌شوند به شدت اعمال شناختی را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۸]. به خوبی مشخص شده است که سیستم کولینرژیک نقش مهمی در تعدیل فعالیت نورونی دارد و انواع مختلف حافظه و یادگیری را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۰،۱۹]. مشخص شده است که مهارکننده‌های استیل‌کولین استراز که پایداری استیل‌کولین در فضای سیناپسی را افزایش می‌دهند باعث بهبود حافظه و یادگیری در مدل‌های مختلف یادگیری می‌شوند، در حالی‌که داروهای آنتی‌کولینرژیک حافظه و یادگیری را تخریب می‌نمایند [۲۰،۱۹]. مطالعات سلولی و الکتروفیزیولوژیکی نیز نشان می‌دهند که سیستم کولینرژیک تغییر شکل سیناپسی و تقویت درازمدت سیناپسی در نواحی مختلف مغز تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۱].

با توجه به این‌که هارمان در جیره غذایی ما وجود دارد و می‌تواند حافظه اجتنابی مهاری را تحت تأثیر قرار دهد و با در نظر گرفتن این‌که هیپوکامپ پشتی نقش مرکزی در طیف وسیعی از انواع حافظه و یادگیری دارد و گیرنده‌های نیکوتینی یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهند و خود می‌توانند تحت تأثیر β-کربولین‌ها قرار گیرند، در این مطالعه اثر مهار گیرنده‌های نیکوتینی توسط مکامیلامین بر روی حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است.

در این مطالعه با توجه به این‌که هارمان در جیره غذایی ما وجود دارد و می‌تواند سیستم کولینرژیک را در مغز تحت تأثیر

Archive of SID

www.SID.ir

قرار دهد، ما در این مطالعه اثر داروهای کولینرژیک را در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القاء شده با هارمان مورد بررسی قرار دادهایم.

مواد و روش‌ها

حیوان. در آزمایش‌ها از موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن تقریبی ۳۰–۲۲ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده، در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت. دمای حیوان‌خانه بین ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه تطبیق دهند. موش‌ها در گروه‌های ده تایی قرار داده می‌شدند و همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌شد. در تمام مراحل انجام آزمایشات اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مراعات شد.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری. دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری، مدل Step-down، جعبه چوبی به ابعاد (۴۰×۳۰×۳۰cm) می‌باشد. کف دستگاه دارای ۲۹ میله فولادی با قطر ۰/۳ سانتی‌متر و به فاصله ۱ سانتی‌متر از یک‌دیگر می‌باشد. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد (۴×۴×۴cm) در قسمت میانی کف دستگاه (روی میله‌های فلزی) قرار گرفته است، این میله‌ها به دستگاه تحریک‌کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام می‌شود.

داروها. در این تحقیق داروهای هارمان و مکامیلامین (سیگما، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. هر دو دارو بلافاصله قبل از تزریق در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند و pH نیکوتین بعد از حل شدن در سالین با اضافه نمودن سود ۰/۱درصد به محدوده خنثی (۷/۴) رسید.

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA۱). موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ mg/kg) بعلاوه زایلزین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول راهنما (۲۲G) به صورت دو طرفه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شدند. مختصات ناحیه CA۱ هیپوکامپ پشتی عبارت بود از : AP= ۲- ،ML= ۱/۶ ± ،V= ۱/۵- بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی، کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده می‌شد ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

آزمون‌های رفتاری. روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های کوچک آزمایشگاهی در دو روز متوالی انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه بوده، در روز دوم یا روز آزمون میزان حافظه حیوان‌های آموزش دیده بررسی می‌شود.

مرحله آموزش. در روش اجتنابی مهاری مدل Step-down ، هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می‌گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می‌شود. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند آن موش حذف می‌شود. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای مؤثر بر روی میله‌های فولادی به مدت ۱۵ثانیه شوک الکتریکی (۱هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ولت مستقیم) دریافت می‌شود. شوک توسط یک محرک به میله‌های فولادی انتقال داده می‌شود. مراحل آموزش در بین ساعت ۸ صبح الی ۲ بعد ازظهر انجام گرفت.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه. جلسه آزمون ۲۴ساعت بعد از آموزش با پروسه‌های مشابه آموزش انجام می‌شود به جز این‌که شوکی در این روز دریافت نمی‌گردد. مدت زمان توقف موش بر روی سکو به عنوان معیار حافظه در موش

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری می‌شود که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه می‌باشد.

تزریق درون مغزی دارو. برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۲۷G دندان‌پزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کت دان تیوب نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما ۲۲G قرار داده شده، در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق می‌شد. مجموع حجم تزریق درون مغزی به هر موش ۱ میکرولیتر است. در طول تزریق به حیوان اجازه داده می‌شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت‌شناسی. پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ درصد (۵/۰µl) به داخل هر کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده، محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار می‌گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده می‌شد. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. لازم به ذکر است از کل موش‌های به‌کار رفته در این مطالعه تقریباً ۸درصد موش‌های جراحی شده به دلایل مختلفی مانند جاگذاری اشتباه کانول‌ها، بسته شدن کانول‌ها و یا افتادن کانول‌ها از مطالعه کنار گذاشته شدند، بعد از حذف این موش‌ها به منظور این‌که تعداد اعضای گروه‌های مختلف تیماری برابر گردد موش‌های خارج شده از مطالعه با موش‌های جراحی شده جدید جایگزین گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری. در همه آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانه (Median) و چارک ثبت گردید. به علت تفاوت‌های خاص زیادی که در پاسخ‌های یادگیری حیوانات و هم‌چنین ظرفیت یادگیری هر حیوان وجود دارد، داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه ویژه داده‌های غیر پارامتریک یعنی آزمون کروسکال ـ والیس و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از آزمون من ـــ ویتنی استفاده گردید. در تمام ارزیابی‌های آماری، حداقل ۰/۰۵ >Pمعیار معنی‌دار بودن مقایسه بین گروه‌ها بود. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Sigma Plot استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده.

۱- آزمایش اول: اثر هارمان بر روی مراحل مختلف شکل‌گیری و به یادآوری حافظه اجتنابی مهاری

هشت گروه حیوان در این آزمایش به کار رفت که به دو دسته چهار گروهی تقسیم‌بندی شدند. چهار گروه اول پانزده دقیقه قبل از آموزش سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) یا مقادیر مختلف هارمان (۵ ، ۱۰، ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و چهار گروه بعدی بلافاصله بعد از آموزش سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) یا مقادیر مختلف هارمان (۵ ، ۱۰، ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

۲- آزمایش دوم: اثر مکامیلامین بر روی به یادآوری حافظه اجتنابی مهاری

در این آزمایش پنج گروه حیوان به‌کار رفت. گروه اول پانزده دقیقه قبل از آزمون سالین (۰/۵ میکرولیتر در هر طرف) و چهار گروه باقی‌مانده مقادیر مختلف مکامیلامین (۰/۵، ۱، ۲، ۴ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی داخل ناحیه هیپوکامپ پشتی دریافت داشتند.

۳- آزمایش سوم: اثر مکامیلامین بر روی حافظه تخریب‌شده با هارمان

در این آزمایش پنج گروه حیوان به‌کار رفت که هر کدام از آن‌ها دو تزریق دریافت داشتند. تزریق اول به صورت درون صفاقی در روز آموزش و تزریق دوم در روز آزمون و به داخل ناحیه هیپوکامپ پشتی انجام گرفت. در تزریق اول، گروه اول سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و چهار گروه باقی‌مانده دوز مؤثر هارمان (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را پانزده دقیقه قبل از آموزش دریافت کردند. در روز آزمون گروه اول و دوم سالین و سه گروه باقی‌مانده مقادیر دوزهای

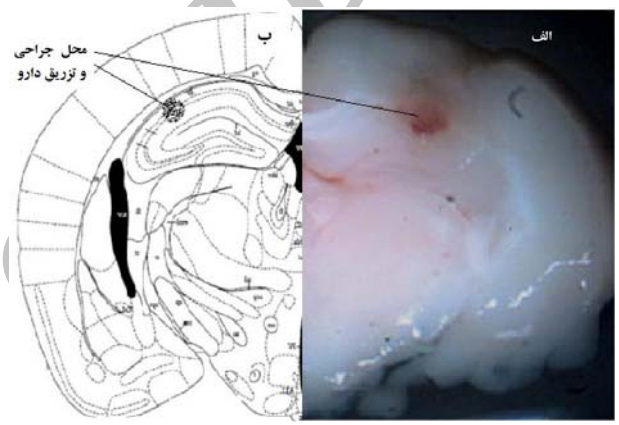
Archive of SID

www.SID.ir

غیر مؤثر مکامیلاین (۰/۵، ۱، ۲ میکرو گرم بر موش) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکامپ پشتی پنج دقیقه قبل از تست دریافت نمودند.

نتایج

مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی، نشان‌دهنده محل قرارگیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس است؛ البته لازم به ذکر است تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آن‌ها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در تجزیه‌وتحلیل آماری استفاده شدند (شکل ۱).



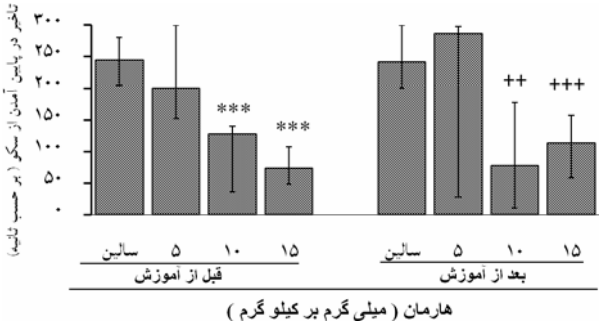
شکل ۱. مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 (الف) وشکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که محل ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (ب)

۱- آزمایش اول: اثر هارمان بر روی مراحل مختلف شکل‌گیری و به یادآوری حافظه اجتنابی مهاری

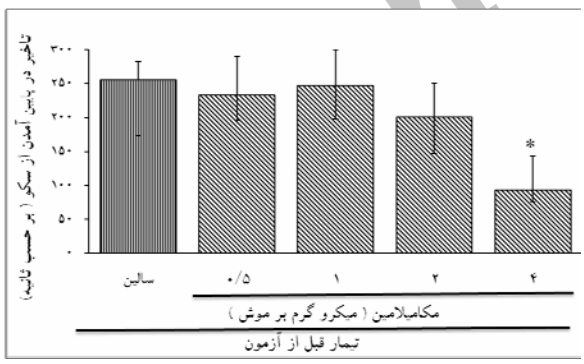
آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه کروسکال ــ والیس نشان داد که تزریق پیش از آموزش (P<۰/۰۰۱، H(۳) =۱۶/۵۶، ANOVA) یا پس از آموزش هارمان حافظه را تغییر می‌دهد (P<۰/۰۰۱، H(۳)=۱۴/۰۸، ANOVA). انجام آزمون مکمل من ــ ویتنی نشان داد که تزریق هارمان (۱۰، ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت پیش یا پس از آموزش تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد.

۲- آزمایش دوم: اثر مکامیلامین بر روی به یادآوری حافظه اجتنابی مهاری

آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه کروسکال ــ والیس نشان داد که تزریق پیش از آزمون مکامیلامین حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می‌دهد (P<۰/۰۱، H(۴)=۹/۴۱، ANOVA). انجام آزمون مکمل من ــ ویتنی نشان داد که تزریق پیش از آزمون دوز بالای مکامیلامین (۴ میکروگرم بر موش) تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را کاهش می‌دهد.



شکل ۲. اثر تزریق پیش از آموزش و پس از آموزش هارمان بر حافظه اجتنابی مهاری . ***P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین پیش از آموزش و +++P< ۰/۰۰۱، ++P< ۰/۰۱ در مقایسه با سالین پس از آموزش می‌باشد.



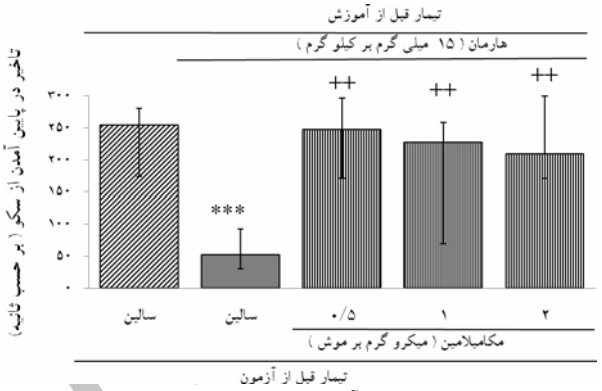
شکل ۳. اثر تزریق پیش از آزمون مکامیلامین بر حافظه اجتنابی مهاری. *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالین پیش از آزمون می‌باشد.

۳- آزمایش سوم: اثر مکامیلامین بر روی حافظه اجتنابی مهاری تخریب‌شده با هارمان

آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه کروسکال ــ والیس نشان داد که تزریق مکامیلامین در روز آزمون به

www.SID.ir

حیواناتی که در روز آموزش تحت تأثیر دوز مؤثر هارمان (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، به صورت معنی‌داری حافظه تخریب‌شده با هارمان را اصلاح می‌نماید ($P<0/01$، $H(3)=13/21$، ANOVA). آزمون مکمل من ـ ویتنی نشان داد که این اثر اصلاحی مکامیلامین در تمامی دوزهای به‌کار رفته مکامیلامین (۰/۵، ۱، ۲ میکروگرم بر موش) از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۴. اثر تزریق پیش از آزمون مکامیلامین بر روی حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان . $P<0/001$ *** در مقایسه با گروه سالین/سالین و پیش از آموزش و $P<0/01$ ++ در مقایسه باهارمان/سالین می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که تزریق سیستمیک هارمان قبل یا بعد از آموزش به یادآوری حافظه را ۲۴ ساعت بعد از آموزش و در روز آزمون کاهش می‌دهد. وقتی هارمان قبل از آموزش تزریق می‌شود، مرحله اکتساب و مراحل اولیه تثبیت حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در حالی‌که زمانی که تزریق دارو بلافاصله بعد از آموزش صورت می‌گیرد، مرحله تثبیت حافظه تحت تأثیر قرار می‌گیرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که هارمان مراحل شکل‌گیری حافظه یعنی مرحله اکتساب و تثبیت حافظه را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه تأییدکننده نتایج ما در مطالعه قبلی می‌باشد که نشان می‌دهد که تزریق پس از آموزش هارمان باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود [۱۱]. به غیر از مطالعه اخیر ما مطالعات چندانی در مورد اثر هارمان بر روی حافظه اجتنابی مهاری صورت نگرفته است، هر چند گزارشاتی وجود دارد که نشان‌دهنده این می‌باشند که هارمان می‌تواند باعث ایجاد توهم، سرخوشی و هیجان شود [۲۲]. گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد هارمان می‌تواند فعالیت حرکتی را با اثر بر روی هسته‌های زیتونی تحت تأثیر قرار دهد [۲۳].

یافته‌های ما در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق قبل از آزمون دوزهای بالای مکامیلامین، آنتاگونیست گیرنده‌های نیکوتینی، به داخل هیپوکامپ پشتی باعث کاهش به یادآوری حافظه در موش کوچک آزمایشگاهی می‌شود. نتایج ما در این مطالعه هم‌چنین نشان می‌دهد که با وجود این‌که تزریق مقادیر بالای مکامیلامین در روز آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش دارویی دریافت نکرده بودند باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود، ولی تزریق مقادیری از مکامیلامین که به تنهایی اثری بر روی حافظه نداشته‌اند، به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیر هارمان بوده‌اند باعث بهبود حافظه تخریب شده با هارمان روز آموزش می‌شود. به عبارت ساده‌تر مکامیلامین قادر است حافظه تخریب‌شده با هارمان را اصلاح نماید. با توجه به این‌که در این مطالعه مکامیلامین چند دقیقه قبل از آزمون تزریق شده است این احتمال وجود دارد که دارو مستقیماً روی حافظه اثر نکرده باشد و نتایج به‌دست آمده ناشی از اثر دارو بر روی فعالیت حرکتی و رفتار اضطرابی باشد که در این صورت نمی‌توان به صحت نتایج به‌دست آمده در مورد حافظه اجتنابی مهاری اعتماد نمود. برای رد این احتمال ما مطالعه موازی دیگری را انجام دادیم که اثر همین مقادیر مکامیلامین را بر روی رفتار جستجوگرانه، اضطرابی و فعالیت حرکتی نشان می‌داد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مکامیلامین در مقادیر به‌کار رفته در این مطالعه اثر معنی‌داری بر روی رفتار جستجوگرانه، اضطرابی و فعالیت حرکتی ندارد [۲۴]. بنابراین می‌توان اطمینان حاصل نمود که عامل مزاحمی روی داده‌های این مطالعه اثر نگذاشته است و مکامیلامین از طریق اثر بر فرآیند حافظه باعث بهبود حافظه اجتنابی تخریب‌شده با هارمان شده است.

Archive of
www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه هم‌سو با نتایج قبلی می‌باشد که نشان می‌دهد تزریق مکامیلامین به داخل ناحیه تگمنتوم شکمی باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری در موش صحرایی می‌شود [۲۵]. هر چند گزارشاتی هم وجود دارند که نشان می‌دهند با وجود این‌که مکامیلامین به خصوص در دوزهای بالا تمایل دارد، حافظه اجتنابی مهاری را تخریب نماید ولی بیان می‌دارند که این تخریب از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد [۲۶]. یافته‌های ما هم‌چنین در راستای گزارشاتی می‌باشند که بیان می‌دارند آگونیست‌های گیرنده‌های کولینرژیک باعث بهبود حافظه و آنتاگونیست‌های گیرنده‌های کولینرژیک باعث تخریب حافظه می‌گردند [۱۹،۲۰]. اهمیت گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در طیف وسیعی از اعمال فیزیولوژیکی مانند حافظه و یادگیری و اضطراب به اثبات رسیده است [۲۷]. مشخص شده است که گیرنده‌های پیش سیناپسی نیکوتین می‌توانند رهایش چندین میانجی عصبی از جمله استیل‌کولین، دوپامین و گلوتامات را تحت تأثیر قرار دهند. فعال شدن این گیرنده‌ها با نیکوتین باعث افزایش رهایش این نورترانسمیترها و مهار گیرنده‌های نیکوتینی با مکامیلامین باعث کاهش رهایش این نورترنسمیترها می‌شود [۲۸]. با توجه به اهمیت این نورترانسمیترها در فرآیند یادگیری و حافظه این احتمال وجود دارد که مکامیلامین به‌واسطه کاهش رهایش این نورترانسمیترها باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری شود.

از سوی دیگر نتایج ما در این مطالعه نشان می‌دهد که مکامیلامین حافظه تخریب‌شده با هارمان روز آموزش را اصلاح می‌نماید. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه هم‌سو با مطالعه قبلی ما می‌باشد که نشان می‌دهد که تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های D1 و D2 دوپامینی در روز آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تاثیر هارمان بوده‌اند، باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با هارمان می‌شود [۱۱]. با توجه به این مطالعه و با در نظر گرفتن این نکته که تزریق آنتاگونیست گیرنده نیکوتینی، یعنی مکامیلامین به واسطه اثر بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی نیکوتین رهایش دوپامین را کاهش داده و از شدت فعالیت گیرنده‌های D1 و D2 دوپامینی می‌کاهد [۲۹،۲۸]، این احتمال وجود دارد که مکامیلامین به مانند آنتاگونیست‌های گیرنده‌های D1 و D2 دوپامینی به واسطه کاستن از فعالیت سیستم دوپامینی باعث اصلاح حافظه اجتنابی مهاری تخریب‌شده با هارمان بشود. البته باید توجه داشت که درک دقیق مکانیسم اثر مکامیلامین بر روی حافظه اجتنابی مهاری تخریب‌شده با هارمان نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد. نتایج این مطالعه به هر حال نشان می‌دهد که بین هارمان و گیرنده‌های نیکوتینی هیپوکامپ پشتی برهم‌کنش وجود دارد. با توجه به گزارشاتی که نشان می‌دهد هارمان می‌تواند مستقیماً گیرنده‌های کولینرژیک را تحت تأثیر قرار دهد [۱۲-۱۵]، این احتمال مطرح می‌گردد که گیرنده‌های نیکوتینی مستقیماً با هارمان برهم‌کنش نشان می‌دهند. هر چند با توجه به اثر گیرنده‌های نیکوتینی بر روی رهایش دوپامین [۲۹،۲۸] و برهم‌کنش وسیع هارمان با سیستم دوپامینی [۱۶،۱۴] این احتمال نیز وجود دارد که مکامیلامین به واسطه اثر بر سیستم‌های دیگر نظیر سیستم دوپامینی باعث اصلاح حافظه اجتنابی تخریب‌شده با هارمان گردد.

یافته‌های ما نشان می‌دهد که علاوه بر این‌که هر دو داروی هارمان و مکامیلامین می‌توانند حافظه اجتنابی مهاری را تحت تأثیر قرار داده و تخریب نمایند، بلکه نشان می‌دهد که بین این دو دارو برهم‌کنش پیچیده‌ای نیز وجود دارد به گونه‌ای که دوزهای بی‌اثر مکامیلامین که به تنهایی روی حافظه اثر نکرده‌اند می‌توانند جلوی تخریب حافظه با هارمان را می گیرند. روشن شدن این نکته که مکامیلامین مستقیماً از طریق گیرنده‌های نیکوتینی پس‌سیناپسی باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با هارمان می‌شود یا مکامیلامین به واسطه اثر بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی نیکوتین و تحت تأثیر قرار دادن سیستم‌های دیگر نظیر سیستم دوپامینی حافظه تخریب‌شده با هارمان را اصلاح می‌نماید نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد.

تشکر و قدردانی

Archive of SID

www.SID.ir

بدین وسیله از زحمات پرسنل محترم پژوهشکده علوم شناختی (تهران ـ ایران) که ما را در انجام این پژوهش یاری دادند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

[1] Pfau W, Skog K. Exposure to beta-carbolines norharman and harman. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 802: 115-126.

[2] Adachi J, Mizoi Y, Naito T, Yamamoto K, Fujiwara S, Ninomiya I. Determination of beta-carbolines in foodstuffs by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr 1991; 538: 331-339.

[3] Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Muller WE, Wollert U. 1-Methyl-beta-carboline (harmane), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1980; 314: 97-100.

[4] May T, Greube A, Strauss S, Heineke D, Lehmann J, Rommelspacher H. Comparison of the in vitro binding characteristics of the beta-carbolines harman and norharman in rat brain and liver and in bovine adrenal medulla. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1994; 349: 308-317.

[5] Hudson AL, Gough R, Tyacke R, Lione L, Lalies M, Lewis J, et al. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. Ann N Y Acad Sci 1999; 881: 81-91.

[6] Spijkerman R, van den Eijnden R, van de Mheen D, Bongers I, Fekkes D. The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman. Eur Neuropsychopharmacol 2002; 12: 61-71.

[7] Rommelspacher H, May T, Susilo R. Beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals. Planta Med 1991; 57: S85-92.

[8] Freedland CS, Mansbach RS. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. Drug Alcohol Depend 1999; 54: 183-194.

[9] Welsh JP. Systemic harmaline blocks associative and motor learning by the actions of the inferior olive. Eur J Neurosci 1998; 10: 3307-3320.

[10] Mehta H, Saravanan KS, Mohanakumar KP. Serotonin synthesis inhibition in olivo-cerebellar system attenuates harmaline-induced tremor in Swiss albino mice. Behav Brain Res 2003; 145: 31-36.

[11] Nasehi M, Piri M, Nouri M, Farzin D, Nayer-Nouri T, Zarrindast MR. Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmane-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. Eur J Pharmacol 2010; 634: 77-83.

[12] Taylor DL, Silverman PB, Ho BT. Effects of 6-methoxytetrahydro-beta-carboline on 5-hydroxytryptamine binding in rat brain. J pharm pharmacol 1984; 36: 125-127.

[13] Pahkla R, Rago L, Callaway JJ, Airaksinen MM. Binding of pinoline on the 5-hydroxytryptamine transporter: competitive interaction with [3H] citalopram. Pharmacol toxicol 1997; 80: 122-126.

[14] Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, et al. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. Drug Alcohol Depend 2000; 60: 121-132.

[15] Squires PE, Hills CE, Rogers GJ, Garland P, Farley SR, Morgan NG. The putative imidazoline receptor agonist, harmane, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic beta-cells. Eur J Pharmacol 2004; 501: 31-39.

[16] Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. Biochem Biophys Res Commun 2005; 326: 378-386.

17] Davis PA, Baird-Lambert J, Taylor KM, Maclaren JA. Serotonergic activity of a novel tetrahydro-beta-carboline. Biochem Pharmacol 1979; 28: 1803-1806.

[18] Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. J Comp Neurol 1990; 293: 103-124.

[19] Degroot A, Parent MB. Infusions of physostigmine into the hippocampus or the entorhinal cortex attenuate avoidance retention deficits produced by intra-septal infusions of the GABA agonist muscimol. Brain Res 2001; 920: 10-18.

[20] Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. J Psychopharmacol 2002; 16: 313-319.

[21] Boyd TE, Trepel C, Racine RJ. Cholinergic modulation of neocortical long-term potentiation in the awake, freely moving rat. Brain Res 2000; 881: 28-36.

[22] Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Muller WE, Wollert U. Benzodiazepine antagonism by harmane and other beta-carbolines in vitro and in vivo. Eur J Pharmacol 1981; 70: 409-416.

[23] el Bahri L, Chemli R. Peganum harmala L: a poisonous plant of North Africa. Vet Hum Toxicol 1991; 33: 276-277.

[24] Piri M, Nasehi M, Shahin M, Zarrindast MR. The interaction between harmane and nicotinic receptors of dorsal hippocampus in a hole-board test of anxiety in mice. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences 2011; 14: 388-397. (Persian).

[25] Rezayof A, Darbandi N, Zarrindast MR. Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. Neurobiol Learn Mem 2008; 90: 255-260.

[26] Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR, Rassouli Y. Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. Neurobiol Learn Mem 2008; 89: 441-447.

[27] Janhunen S, Ahtee L. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. Neurosci Biobehav Rev 2007; 31: 287-314.

[28] Picciotto MR. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. Drug Alcohol Depend 1998; 51: 165-172.

[29] McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. Science 1995; 269: 1692-1696.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of mecamylamine (a nicotinic receptor antagonist) on harman induced-amnesia in an inhibitory avoidance test

Mohammad Nasehi (Ph.D)[*1], Morteza Piri (Ph.D)[2], Shahrbano Sharifi(M.Sc)[3], Maryam-sadat shahin (B.Sc)[4], Mohammad Reza Zarrindast (Ph.D)[5]

1 – Dept. of Biology, Islamic Azad University, Garmsar branch, Garmsasr, Iran

2 – Dept. of Biology, Islamic Azad University, Ardabil branch, Ardabil, Iran

3 - Dept. of Pharmacology And toxicology, Azad University, Pharmaceutical Science branch, Tehran, Iran

4 - Young Researchers Cloob, Islamic Azad University, Shahr-e-rey branch, Shahr-e-rey, Iran

5 – Dept. of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 18 Jul 2010 Accepted: 5 Mar 2011)

Introduction: β-carbolines alkaloids suchv as harmane have been found in common plant-derived foodstuffs (wheat, rice, corn, barley, grape and mushrooms). These alkaloids have many cognitive effects including alteration short and long term memory. In the present study, the effect of intra-CA1 injection of the nicotinic receptor antagonist mecamylamine on amnesia induced by harmane was examined in mice.

Materials and Methods: Mice were bilaterally implanted with chronic cannulae in the CA1 regions of the dorsal hippocampus. One week after cannulae implantation, mice were trained in a step-down type inhibitory avoidance task, and were tested 24 h after training to measure step-down latency as a scale of memory.

Results: Pre-training or post-training systemic injection of harmane induced amnesia. Pre-testing intra-dorsal hippocampus administration of the high dose of nicotinic receptor antagonist, mecamylamine (4 μg/mice) also induced amnesia. On the other hand, pre-test intra-CA1 injection of ineffective doses of mecamylamine (0.5, 1 and 2 μg/mice) fully restored harmane induced amnesia.

Conclusion: The present finding in this study indicated that a complex interaction exists between nicotinic receptor of dorsal hippocampus and amnesia induced by Harmane.

Keywords: Harmane, Mecamylamine, Amnesia, Dorsal hippocampus, Mice

* Corresponding author: Fax: +98 23 24229963 ; Tel: +98 9122543585
bionasehi@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir