مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۳۷/هفته اول تیر ماه ۱۳۹۰

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۵

نقش سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی در فراموشی القا شده با هارمان در آزمون حافظه‌ی اجتنابی مهاری

دکتر مرتضی پیری[۱]، دکتر محمد ناصحی[۲]، مژگان عبدالهیان[۳]، مریم السادات شاهین[۴]، دکتر محمد رضا زرین دست[۵]

خلاصه

مقدمه: آلکالوئیدهای بتا-کربولین نظیر هارمان در مواد غذایی گیاهی معمولی مانند گندم، برنج، ذرت، جو، انگور و قارچ یافت می‌شوند. این آلکالوئیدها دارای اثرات شناختی زیادی مانند تغییر در حافظه‌ی کوتاه و بلندمدت می‌باشند. در این مطالعه اثر تزریق آگونیست (ال- آرژنین) و آنتاگونیست (L-NAME) نیتریک اکساید به ناحیه‌ی هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القا شده با هارمان در موش سوری مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی از ۳۰۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استفاده شد. نمونه‌ها پس از بیهوشی در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند و کانول گذاری دو طرفه در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی انجام شد. یک هفته‌ی بعد از کانول گذاری، 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 اندازه گیری شد.

یافته‌ها: تزریق سیستمیک هارمان پیش از آموزش باعث القا فراموشی می‌شود. تزریق قبل از آزمون L- آرژنین (۸ میکروگرم بر موش) و L-NAME (۱۵ و ۱۰ میکروگرم بر موش) به هیپوکامپ پشتی به ترتیب باعث تقویت و اصلاح فراموشی القا شده با هارمان قبل از آموزش می‌شود، اما تزریق قبل از آموزش L- آرژنین یا L-NAME پنج دقیقه قبل از هارمان نمی‌تواند فراموشی القا شده با هارمان را مهار نماید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما در این مطالعه نشان می‌دهد، که یک برهم‌کنش پیچیده بین سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی و فراموشی القا شده با هارمان وجود دارد.

واژگان کلیدی: هارمان، آل ـ آرژنین، L-NAME، فراموشی، هیپوکامپ پشتی، موش سوری.

مقدمه

آلکالوئید بتا-کربولین محتوی یک هسته‌ی ایندول و یک حلقه‌ی پریدینی می‌باشد (۱). تعدای از آلکالوئیدهای بتاـکربولین، نظیر ۱- متیل بتا-کربولین (هارمان) و ۱- متیل ۷- متوکسی ۳ و ۴- دی هیدرو بتا-کربولین (هارمالین) به طور طبیعی در غذای انسان مانند گندم، برنج، ذرت، جو، انگور، قارچ و سرکه وجود دارند. همچنین این آلکالوئیدها در تنباکو که منشأ گیاهی دارد، وجود دارند (۲). این آلکالوئیدها به صورت درون‌زاد نیز در بدن تولید می‌شوند، مدارک موجود نشان می‌دهند که هارمان و نوروهارمان در اثر واکنش آنزیمی از آمینو اسید تریپتامین و استالدئید یا پیرویک اسید در بدن تولید می‌شوند (۳) و به طور طبیعی در بخش‌هایی از بدن مانند پلاسمای خون،

[۱] مربی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران.
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، سمنان، ایران.
[۳] دانشجوی دکتری داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.
[۴] کارشناس، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری، تهران، ایران.
[۵] استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی پیری
Email: biopiri@iauardabil.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

قلب، کلیه، کبد و بافت مغز وجود دارند (۲-۱). مقدار این ترکیبات در بدن افراد سیگاری، الکلی، افراد معتاد به هروئین و بیماران مبتلا به لرزش مانند بیماری پارکینسون، بسیار بیش از معمول می‌باشد و به نظر می‌رسد این ترکیبات نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی اختلالات مختلف سیستم عصبی مرکزی داشته باشند (۳).

در مورد بتا-کربولین‌ها مطالعات رفتاری چندانی صورت نگرفته است. گزارش‌های پیشین نشان می‌دهند که گیاهان محتوی برخی از بتا-کربولین‌ها مانند هارمالا دارای اثرات توهم‌زا می‌باشند (۴). گزارش‌هایی نیز مبنی بر بی اثر بودن هارمان بر شکل گیری حافظه‌ی کوتاه و بلند مدت وجود دارد، هر چند بیان شده که شاید هارمان بتواند بر روی حافظه‌ی غیرفضایی و غیر اجتنابی اثر گذارد. گزارش‌های نیز وجود دارد که نشان می‌دهد، هارمالین یادگیری حرکتی را تخریب می‌نماید (۵). مطالعه‌ی اخیر ما مشخص نمود که تزریق پس از آموزش هارمان به شدت حافظه‌ی اجتنابی مهاری را تخریب می‌نماید (۲). به نظر می‌رسد که بتا-کربولین ها اثرات رفتاری خود را از طریق بر هم‌کنش با گیرنده‌ها و آنزیم‌های مختلف درگیر در تولید و حذف نورترانسمیترها اعمال می‌نمایند. گزارش شده است که بتا-کربولین‌ها می‌توانند به گیرنده های بنزودیازپینی، ایمیدازولین، دوپامینی، کولینرژیک، سروتونینی و گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA وصل شوند و عملکرد آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۷-۶). از طرف دیگر این آلکالوئیدها آنزیم هایی نظیر مونوآمین اکسیداز A و B را مهار می‌نمایند و از این طریق نورترانسمیترهایی نظیر دوپامین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸). به نظر می‌رسد تمایل متفاوت کربولین‌ها به گیرنده‌های مختلف به میزان اشباع حلقه و گروه هایی که روی حلقه قرار می‌گیرند بستگی دارد (۶).

مشخص شده که هیپوکامپ در یادگیری و حافظه نقش مهمی بر عهده دارد. همچنین مطالعات نشان دادند که نیتریک اکساید به ویژه در هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارد. این میانجی عصبی گازی شکل به روش آنزیمی بعد از فعال شدن نیتریک اکساید سنتاز از ال- آرژنین ساخته می‌شود (۱۰-۹). مطالعات نشان داد که آنزیم نیتریک اکساید سنتاز بعد از فعال شدن گیرنده‌های NMDA فعال می‌شود و باعث افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد. از طرف دیگر خود نیتریک اکساید نیز بعد از تولید باعث افزایش رهایش دوپامین، استیل کولین و گلوتامات می‌شود (۹). نقش مهم نیتریک اکساید در اعمال فیزیولوژیک مختلفی مانند گشاد کنندگی رگی، تمایز عصبی، تقویت درازمدت سیناپسی LTP و تغییر شکل سیناپسی مشخص شده است (۱۱). همچنین مطالعات مشخص نموده اند که نیتریک اکساید انواع مختلف یادگیری و حافظه مانند یادگیری حرکتی، یادگیری اجتنابی غیرفعال و حافظه‌ی فضایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲، ۹).

تا کنون هیچ مطالعه‌ای در مورد بر هم‌کنش مستقیم بین بتا-کربولین ها با سیسم نیتریک اکساید چه در سطح سلولی و چه در سطح رفتاری انجام نگرفته است، بنابراین گزارشی نیز در مورد اثر بتا-کربولین بر روی سیستم نیتریک اکساید و بالعکس وجود ندارد. تنها شواهدی که می‌تواند حاکی از بر هم‌کنش بتا-کربولین با سیستم نیتریک‌اکساید باشد، اثرگذاری آن‌ها بر روی رفتارهای یکسان و سیستم‌های نورترانسمیتری مشابه

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که بتا-کربولین و سیستم نیتریک اکساید می‌توانند سطح نورترانسمیترهای مختلف مانند دوپامین، نوراپی‌نفرین، اپی‌نفرین، سروتونین، گابا و هیستامین را در فضای سیناپسی به واسطه ی تغییر سرعت تولید، تغییر میزان رهایش و یا تغییر سرعت حذفشان تحت تأثیر قرار دهند (۱۳، ۱۰، ۶). همچنین مطالعات پیشین آشکار نموده است که بتا-کربولین و نیتریک اکساید قدرت تأثیرگذاری بر روی حافظه و اضطراب را دارند (۱۴، ۱۱، ۹). همچنین شواهد موجود حاکی از این است که بتا-کربولین و نیتریک اکساید می‌توانند هر دو تحت تأثیر عواملی مانند الکل، نیکوتین و سیگار کشیدن تغییر یابند (۱۷-۱۵، ۹).

با توجه به اهمیت هیپوکامپ در فرایند حافظه و یادگیری و در نظر گرفتن این نکته که هارمان و نیتریک‌اکساید هر دو می‌توانند حافظه و یادگیری را تحت تأثیر قرار دهند و هر دو به عنوان تعدیل کننده‌های عصبی عمل می‌نمایند و می‌توانند رهایش طیف وسیعی از نورترانسمیترها را در سیستم عصبی تحت تأثیر قرار دهند. در این مطالعه برای اولین بار برهم‌کنش بین هارمان و سیستم نیتریک اکساید در زمینه ی حافظه ی اجتنابی مهاری در هیپوکامپ پشتی موش سوری مورد مطالعه قرار گرفت. توجه به حضور هارمان در جیره‌ی غذایی ما و بالا بودن غلظت آن در بدن افراد سیگاری، الکلی و بیماران مبتلا به پارکینسون اهمیت این تحقیق را دو چندان می‌کند.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی که در پژوهشکده‌ی علوم شناختی (تهران- ایران) انجام شد، از ۳۰۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۲ تا ۳۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه‌ی تحقیقاتی منتقل شدند و در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش ها قرار گرفت. دمای حیوان‌خانه بین ۳ ± ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه تطبیق دهند. موش ها در گروه‌های ده تایی قرار داده شدند و همه‌ی آزمایش‌ها در طول روز انجام شد. در تمام مراحل انجام آزمایشات اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مراعات شد.

به منظور جراحی و قرار دادن کانول در ناحیه ی هیپوکامپ پشتی، موش های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) به علاوه‌ی زایلزین (۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول راهنما (۲۲ G) به صورت دو طرفه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شدند (۱۸). مختصات ناحیه ی CA۱ هیپوکامپ پشتی عبارت بود از : AP = -۲ ، ML = ±۱/۶ و 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 شد ۵ تا ۷ روز دوره‌ی بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

برای تزریق دارو، پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن G ۲۷ دندان‌پزشکی که ۹

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌متر طول داشت و به کت‌دان تیوب نوزاد (شماره‌ی ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنمای G ۲۲ قرار داده شد. در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه تزریق شد. مجموع حجم تزریق درون مغزی به هر موش ۱ میکرولیتر بود. در طول تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند. در این تحقیق داروهای هارمان، ال ـ آرژنین پیش‌ساز نیتریک اکساید که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید و L-NAME مهار کننده‌ی نیتریک اکساید سنتاز که به عنوان آنتاگونیست نیتریک اکساید عمل می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. تمامی داروها از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد و همه‌ی داروها بلافاصله قبل از تزریق در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند. انتخاب دوز داروهای به کار رفته بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفت (۱۱، ۹، ۲).

برای سنجش حافظه از دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری، مدل Step-down، که یک جعبه‌ی چوبی به ابعاد ۴۰ × ۳۰ × ۳۰ سانتی‌متر بود و در کف آن ۲۹ میله‌ی فولادی با قطر ۰/۳ سانتی‌متر و به فاصله‌ی ۱ سانتی‌متر از یکدیگر وجود دارد و یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد ۴ × ۴ × ۴ سانتی‌متر در قسمت میانی کف آن (روی میله‌های فلزی) قرار گرفته است، استفاده شد. میله‌ها به دستگاه تحریک‌کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد شد. آزمایش‌ها در اتاق به نسبت تاریک و بدون سر و صدا انجام شد. روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های کوچک آزمایشگاهی در دو روز متوالی انجام گرفت. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه بود، در روز دوم یا روز آزمون میزان حافظه‌ی حیوان‌های آموزش دیده بررسی شد (۱۹، ۲). در روز آموزش هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار گرفت. مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت شد. هر موش که بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو می‌ماند، از مطالعه حذف شد. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای مؤثر بر روی میله‌های فولادی به مدت ۱۵ ثانیه شوک الکتریکی (۱ هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ ولت مستقیم) دریافت شد. شوک توسط یک محرک به میله‌های فولادی انتقال داده شد. جلسه‌ی آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش با فرایندهای مشابه آموزش انجام گرفت، به جز این که شوکی در این روز داده نشد. مدت زمان توقف موش بر روی سکو به عنوان معیار حافظه در موش اندازه گیری شد. حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف Cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه می‌باشد. تمامی آزمون‌های رفتاری به مانند مطالعات قبلی ما بین ساعت ۸ صبح الی ۲ بعد ازظهر انجام گرفت (۱۹، ۲)

پس از انجام آزمون حافظه به منظور پی بردن به صحت کانول گذاری انجام شده، حیوان‌ها توسط کلروفرم کشته شدند و بلافاصله رنگ متیلن بلوی ۱ درصد (۰/۵ میکرومول) به داخل هر کانول تزریق شد و مغز از درون جمجمه بیرون آورده شد و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده‌ی از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شد. محل ورود کانول به مغز به وسیله‌ی میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه‌ی مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد (۱۸). پس از کسب اطمینان از

Archive of SID
www.SID.ir

محل قرارگیری کانول ها در نواحی مورد نظر اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

در همه‌ی 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 یک طرفه ویژه‌ی داده‌های غیر پارامتریک یعنی آزمون Kruskal-Wallis و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده گردید. در تمام ارزیابی های آماری، $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Sigma Plot استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده

آزمایش اول: اثر هارمان بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. گروه اول نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و سه گروه باقی‌مانده مقادیر مختلف هارمان (۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را در روز اول و پانزده دقیقه قبل از آموزش به صورت درون صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد در روز آزمون تمامی گروه‌های فوق نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) را پانزده دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

آزمایش دوم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آزمون L-NAME به هیپوکامپ پشتی در حضور و غیاب هارمان روز آموزش روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

در این آزمایش دوازده گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلو گرم) یا هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی پانزده دقیقه قبل از آموزش دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد از آموزش در روز آزمون دوزهای مختلف L-NAME (۱۵، ۱۰، ۸، ۶، ۴ و صفر میکروگرم بر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون، به صورت درون مغزی در داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی دریافت کردند.

آزمایش سوم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آموزش L-NAME روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری در حضور هارمان روز آموزش.

در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. این گروه‌ها در روز آموزش بیست دقیقه قبل از آموزش مقادیر مختلف مختلف L-NAME (۱۵، ۱۰، ۸ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی دریافت کردند و پنج دقیقه بعد، یعنی پانزده دقیقه مانده به زمان آموزش، هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. تمامی گروه های فوق ۲۴ ساعت بعد و در روز آزمون نرمال سالین ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی، پانزده دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

آزمایش چهارم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آزمون L- آرژنین به هیپوکامپ پشتی در حضور و غیاب هارمان روز آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) یا هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی پانزده دقیقه قبل از آموزش دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد از آموزش در روز آزمون دوزهای مختلف L- آرژنین (۸، ۶، ۴ و صفر

Archive of SID
www.SID.ir

میکروگرم بر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی در داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی دریافت کردند.

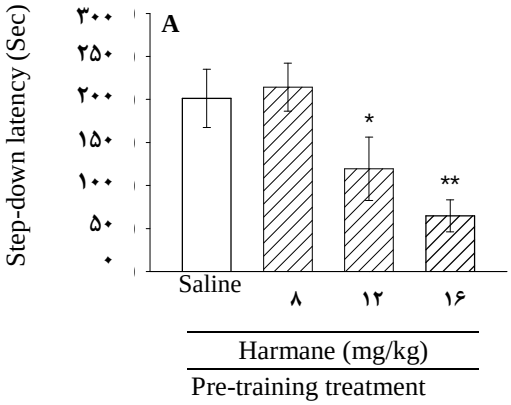
آزمایش پنجم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آموزش L- آرژنین همراه با هارمان بر حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها در روز آموزش بیست دقیقه قبل از آموزش مقادیر مختلف L-آرژنین (۸، ۶، ۴ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل ناحیه ی CA1 هیپوکامپ پشتی دریافت کردند و پنج دقیقه بعد یعنی پانزده دقیقه مانده به زمان آموزش، هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند و ۲۴ ساعت بعد در روز آزمون نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی، پانزده دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

یافته‌ها

آزمایش اول: اثر هارمان بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری

آزمون آماری Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق پیش از آموزش هارمان، حافظه را تغییر می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$، $H (۳) = ۲/۷۹$، ANOVA). انجام آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق درون صفاقی هارمان (۱۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت پیش از آموزش تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد (شکل ۱).

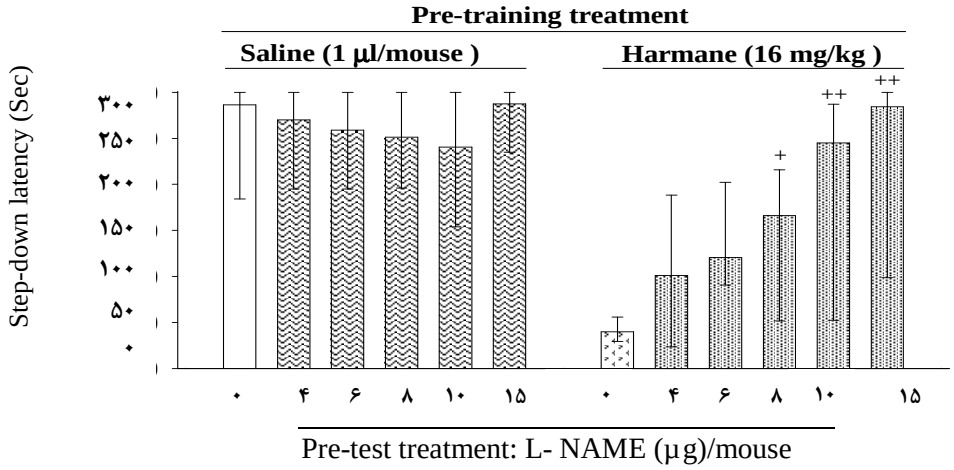


شکل ۱. اثر تزریق قبل از آموزش هارمان بر حافظه‌ی اجتنابی مهاری در مقایسه‌ی با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است. $P < ۰/۰۱$ **، $P < ۰/۰۵$ * در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین می‌باشد.

آزمایش دوم : اثر تزریق قبل از آزمون L-NAME به هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القا شده با هارمان روز آموزش.

آزمون آماری Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق پیش از آزمون L-NAME به صورت درون مغزی به داخل ناحیه ی CA1 هیپوکامپ پشتی به موش هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده بودند، اثری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری نداشت ($P > ۰/۰۵$، $H (۵) = ۰/۹۵$، ANOVA) (شکل ۲، سمت چپ). همچنین آزمون آماری Kruskal-Wallis و آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پیش از آزمون مقادیر مختلف L-NAME به صورت درون مغزی به داخل ناحیه ی CA1 هیپوکامپ پشتی در موش هایی که در روز آموزش تحت تأثیر هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، باعث بهبود حافظه ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان روز آموزش می‌شود ($P < ۰/۰۰۱$، $H (۵) = ۲۰/۱۷$، ANOVA) (شکل ۲، سمت راست).

Archive of SID
www.SID.ir



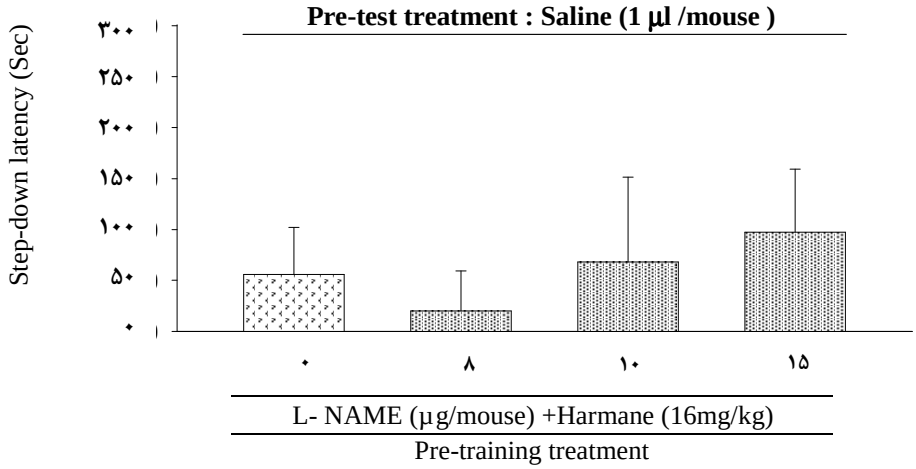
شکل ۲. اثر تزریق قبل از ازمون L-NAME در حضور و غیاب هارمان در روز اموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است. ۰/۰۱ > P++، ۰/۰۵ > P+ در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.

آزمایش سوم: اثر تزریق L-NAME و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

آزمون آماری Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق L-NAME به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی پنج دقیقه قبل از تزریق درون صفاقی هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش اثری بر روی تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاری با هارمان ندارد و قادر به مهار آن نیست (ANOVA، H (۳) = ۲/۷۸ ،P > ۰/۰۵) (شکل ۳).

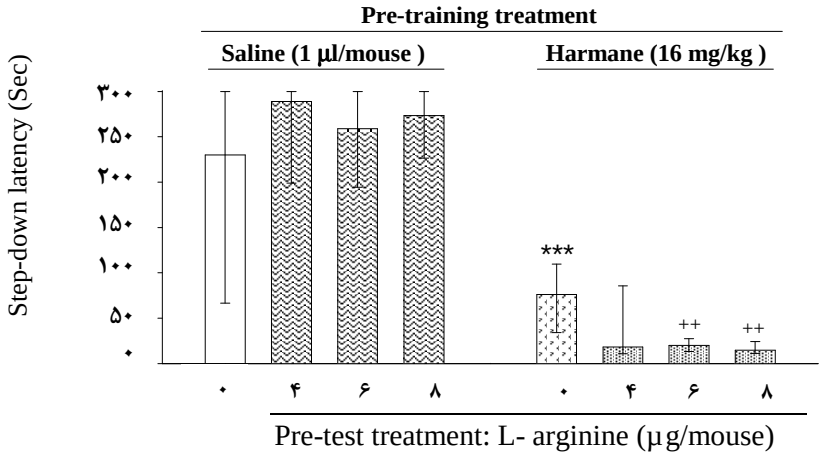
آزمایش چهارم: اثر تزریق قبل از آزمون ال-آرژنین به هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القا شده با هارمان روز آموزش.

آزمون Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق پیش از آزمون ال- آرژنین به صورت درون مغزی به داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی به تنهایی در دوز های به کار رفته اثری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری ندارد (P > ۰/۰۵، ANOVA ،H (۳) = ۱/۷۵) (شکل ۴، سمت چپ).



شکل ۳. اثر تزریق L-NAME پنج دقیقه قبل از هارمان در روز آموزش بر حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده با هارمان. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان ذکر شده است.

www.SID.ir

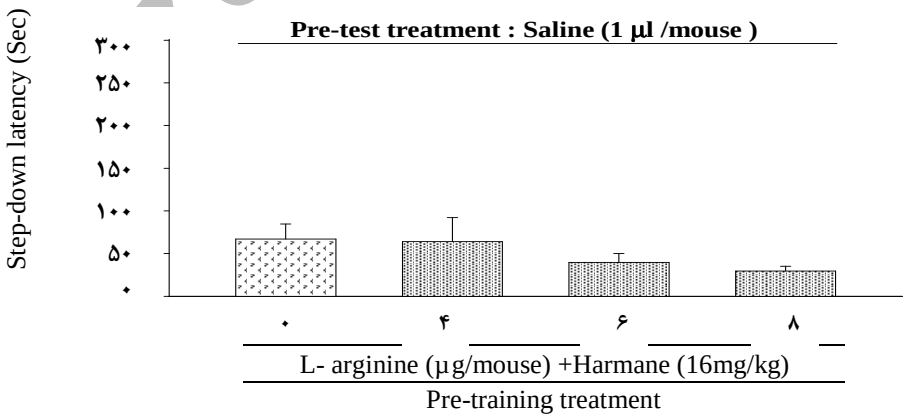


شکل ۴. اثر تزریق قبل از آزمون ال ـ آرژنین در حضور و غیاب هارمان روز آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان نشان داده شده است. ۰/۰۱ > P* در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی سالین و ۰/۰۱ > P++ در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.**

همچنین آزمون Kruskal-Wallis و آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پیش از آزمون ال ـ آرژنین (۸ و ۶ میکروگرم بر موش) به صورت درون مغزی به داخل ناحیه ی CA1 هیپوکامپ پشتی در موش هایی که در روز آموزش تحت تأثیر هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، تخریب حافظه‌ی القا شده با هارمان را تشدید می‌نماید ($P < 0/01$، $H (3) = 9/81$، ANOVA) (شکل ۴، سمت راست).

آزمایش پنجم: اثر تزریق ال‌ـ آرژنین و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

آزمون Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق ال‌ـ آرژنین به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی، پنج دقیقه قبل از تزریق درون صفاقی هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش اثری بر روی تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاری با هارمان ندارد و قادر به مهار یا تقویت تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاری توسط هارمان نیست ($P > 0/05$، $H (3) = 1/21$، ANOVA) (شکل ۵).



شکل ۵. اثر تزریق ال‌ـ آرژنین پنج دقیقه قبل از هارمان در روز آموزش بر حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده با هارمان. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است.

www.SID.ir
Archive of SID

بحث

نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که تزریق سیستمیک هارمان قبل از آموزش یادآوری حافظه را ۲۴ ساعت بعد از آموزش کاهش می‌دهد. با توجه به این که تزریق هارمان قبل از آموزش صورت گرفته است، اکتساب و مراحل اولیه‌ی تثبیت حافظه تحت تأثیر هارمان قرار گرفته‌اند. این نتیجه در راستای مطالعه‌ی قبلی ما بود که نشان داد تزریق پس از آموزش هارمان به صورت درون صفاقی به شدت حافظه‌ی اجتنابی مهاری را تخریب می‌نماید (۲). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که هارمان اثرات متنوعی مانند سرکوب فعالیت حرکتی و آتاکسی را در موش های صحرایی ایجاد می‌کند (۲۰). گزارش ها کمی در مورد اثرات هارمان بر روی حافظه وجود دارد، هرچند به کار بردن آن ممکن است باعث ایجاد توهم، سرخوشی و هیجان کند (۲). به نظر می‌رسد که هارمان شکل‌گیری حافظه‌ی کوتاه و بلند مدت را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد، هر چند ممکن است اثراتی را بر روی حافظه‌ی غیر فضایی و غیر اجتنابی بگذارد. از طرف دیگر گزارش های وجود دارد که هارمالین (یک آلکالوئید هارمالا) یادگیری حرکتی و حافظه‌ی اخباری را تخریب می‌نماید (۵). مطالعات پیشین مشخص نموده‌اند که بتاکربولین ها می‌توانند به گیرنده‌های سروتونینی، استیل کولینی و دوپامینی در مغز اتصال یابند (۲۱). همچنین این آلکالوئیدها به واسطه‌ی مهار آنزیم مونوآمین اکسیداز و کاهش برداشت مونوآمین ها از فضای سیناپسی، سطح نوراپی‌نفرین، دوپامین و سروتونین را در فضای سیناپسی افزایش می‌دهند (۲۲). با توجه به اهمیت نورترانسمیترها و گیرنده های دوپامینی، نوراپی نفرین و سروتونین در فرایند حافظه و یادگیری این احتمال وجود دارد، که هارمان از طریق اثر بر این نورترانسمیترها و گیرنده های آن‌ها حافظه‌ی اجتنابی مهاری را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان دادند که این آلکالوئیدها با فعال نمودن هسته های زیتونی تحتانی و مخچه باعث ایجاد لرزش می‌شوند (۲۳). اگرچه تاکنون نقش هسته های زیتونی در حافظه و یادگیری مشخص نشده است و باید مورد بررسی قرار گیرد (۲۴).

در بخش دوم این مطالعه بر هم‌کنش بین نیتریک اکساید و هارمان در زمینه‌ی حافظه‌ی اجتنابی مهاری مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور از L-NAME و ال- آرژنین استفاده شد، L-NAME مهارکننده‌ی آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز است که به عنوان آنتاگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید و ال- آرژنین پیش‌ساز نیتریک‌اکساید است که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید. نتایج ما در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق آگونیست و آنتاگونیست نیتریک اکساید قبل از آموزش یا قبل از آزمون به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی به تنهایی در دوزهای به کار رفته در این مطالعه اثری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری ندارد، اما تزریق قبل از آزمون آنتاگونیست نیتریک اکساید به موش هایی که در روز آموزش تحت تیمار با دوز مؤثر هارمان بودند، باعث بهبود حافظه‌ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان می‌شود. این مشاهده بیانگر این مطلب است که مهار سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی، یادآوری حافظه‌ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان را تسهیل می‌نماید و باعث بهبود حافظه می‌شود، در حالی که تزریق ال- آرژنین در روز آزمون تخریب حافظه‌ی القا شده با هارمان روز آموزش را تقویت می‌نماید. با وجود این که تزریق قبل از آزمون L-NAME قادر به اصلاح حافظه‌ی اجتنابی مهاری

Archive of SID
www.SID.ir

تخریب شده با هارمان می‌باشد ولی تزریق L-NAME یا ال- آرژنین در روز آموزش پنج دقیقه قبل از دوز مؤثر هارمان قادر به مهار تخریب حافظه‌ی القا شده با هارمان قبل از آموزش نمی‌باشد. این مشاهده ها نشان داد که با وجود این که سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی در بازخوانی و به یادآوری حافظه‌ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان دخیل می‌باشد، اما اثر هارمان بر روی فرایندهای اکتساب و تثبیت حافظه توسط سیستم نیتریک اکساید میانجی‌گری نمی‌شود. مطالعات پیشین نشان می‌دهند که نیتریک اکساید به عنوان یک پیامبر برگشتی (retrograde messenger) فرایند حافظه را در سیستم عصبی مرکزی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲-۱۱). نیتریک اکساید می‌تواند آزادسازی سایر نورترانسمیترها نظیر استیل کولین، گلوتامات و گاما آمینو بوتیریک اسید را تحت تأثیر قرار دهد و بخشی از اثرات نیتریک اکساید می‌تواند از این طریق اعمال گردد (۲۵). همچنین یافته های پیشین پیشنهاد کننده‌ی این موضوع می‌باشد که نیتریک اکساید می‌تواند به عنوان یک تعدیل‌کننده‌ی عصبی عمل نماید (۹). نقش تعدیل‌کننده‌ی نیتریک اکساید در زمینه‌ی اصلاح حافظه‌ی تخریب شده با لیتیوم و خود مصرفی (Self-administration) مورفین در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۲۶، ۱۲). شکل گیری حافظه یک فرایند پیچیده است که در آن میانجی‌های عصبی مختلف دخیل هستند. نیتریک اکساید یک میانجی عصبی گازی شکل است که بعد از فعال شدن گیرنده‌ی NMDA توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از ال- آرژنین ساخته می‌شود (۱۲، ۹). مطالعات نشان می‌دهند که نیتریک اکساید در تقویت دراز مدت سیناپسی، تغییر شکل سیناپسی و به تبع آن در حافظه و یادگیری نقش دارد. مدل های مختلف یادگیری از جمله یادگیری حرکتی، یادگیری اجتنابی غیرفعال و حافظه‌ی فضایی تحت تأثیر سیستم نیتریک‌اکساید قرار می‌گیرند (۱۲-۱۱، ۹). گزارش شده است که تزریق بعد از آموزش ال- آرژنین می‌تواند تثبیت حافظه را تسهیل و تخریب حافظه‌ی القا شده با مهار کننده‌های آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز را اصلاح نماید و به حالت عادی برگرداند (۲۷). فعال شدن گیرنده های آمینواسیدهای تحریکی، به ویژه گیرنده های NMDA باعث افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز می‌شود و از این طریق موجب ایجاد اثرات شناختی و غیر شناختی مختلف می‌شود. در حالی که مهار کننده های نیتریک اکساید سنتتاز مانند L-NAME می‌توانند بسیاری از اثرات میانجی‌گری شده با گیرنده های NMDA را مهار نمایند و باعث تخریب حافظه گردند (۱۰). با وجود گزارش‌های موجود در مورد اثرات مخرب L-NAME بر روی حافظه، نتایج ما در این مطالعه نشان داد که تزریق قبل از آزمون L-NAME باعث بهبود حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده با هارمان می‌شود. توضیحی که می‌توان برای بازگشت حافظه‌ی تخریب شده با هارمان تجویز شده در روز آموزش، توسط L-NAME روز آزمون ارائه نمود، این است که اثر داروهایی که در روز آزمون و قبل از آزمون حافظه به حیوان تزریق می‌شود، در تمامی شرایط یکسان نیست. در این حالت اثر دارو به شرایطی که طی آن اطلاعات ذخیره شده است بستگی دارد؛ به طوری که تزریق داروهایی که باعث تخریب حافظه در حیوانات با حافظه‌ی کامل می‌شود، به حیواناتی که پیش از آن حافظه‌ی آن‌ها با داروی دیگری تخریب شده است، ممکن است باعث تقویت حافظه گردد (۲۸). اگر

Archive of SID
www.SID.ir

برداشت فوق درست باشد، با توجه به اثر مخرب حافظه ای که برای L-NAME در اکثر مطالعات گزارش شده است (۱۰)، این احتمال وجود دارد که تزریق آن در روز آزمون به موش‌هایی که حافظه‌ی آن‌ها با تزریق هارمان در روز آموزش تخریب شده است باعث بهبود حافظه شود.

نتیجه‌گیری

تزریق پس از آموزش هارمان باعث تخریب حافظه ی اجتنابی مهاری می‌شود و فعال‌تر نمودن سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی با تزریق ال- آرژنین در روز آزمون باعث تقویت فراموشی القا شده با هارمان می‌شود، اما مهار سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی با تزریق مهار کننده ی نیتریک اکساید سنتاز باعث بازگشت حافظه‌ی تخریب شده با هارمان می‌شود. این مشاهدات نشان می‌دهد که سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی در به یادآوری حافظه‌ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان دخیل است.

References

1. Pfau W, Skog K. Exposure to beta-carbolines norharman and harman. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 802(1): 115-26.
2. 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(1-3): 77-83.
3. Spijkerman R, van den ER, van de MD, Bongers I, Fekkes D. The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman. Eur Neuropsychopharmacol 2002; 12(1): 61-71.
4. Freedland CS, Mansbach RS. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. Drug Alcohol Depend 1999; 54(3): 183-94.
5. Welsh JP. Systemic harmaline blocks associative and motor learning by the actions of the inferior olive. Eur J Neurosci 1998; 10(11): 3307-20.
6. 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(2): 121-32.
7. 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(1-3): 31-9.
8. 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(2): 378-86.
9. Piri M, Zarrindast MR. Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. Neuroscience 2011; 175: 154-61.
10. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Prog Neurobiol 2001; 64(1): 51-68.
11. Nasehi M, Piri M, Jamali-Raeufy N, Zarrindast MR. Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. Physiol Behav 2010; 100(4): 297-304.
12. Zarrindast MR, Shendy MM, Ahmadi S. Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. Behav Pharmacol 2007; 18(4): 289-95.
13. Riederer F, Luborzewski A, God R, Bringmann G, Scholz J, Feineis D, et al. Modification of tyrosine hydroxylase activity by chloral derived beta-carbolines in vitro. J Neurochem 2002; 81(4): 814-9.
14. Venault P, Chapouthier G. From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory. ScientificWorldJournal 2007; 7: 204-23.
15. Nadif R, Matran R, Maccario J, Bechet M, Le MN, Scheinmann P, et al. Passive and active smoking and exhaled nitric oxide levels according to asthma and atopy in adults. Ann Allergy Asthma Immunol 2010; 104(5): 385-93.
16. Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Ono E, Higashi A, Fukutomi Y, et al. Cutoff point of the fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) with the off-line method for diagnosing asthma and the

Archive of SID

www.SID.ir

effect of smoking on FeNO. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 2008; 46(5): 356-62.
17. Toda N, Toda H. Nitric oxide-mediated blood flow regulation as affected by smoking and nicotine. Eur J Pharmacol 2010; 649(1-3): 1-13..
18. Paxinos G, Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. London: Academic Press; 2001.
19. Zarrindast MR, Khalilzadeh A, Malekmohammadi N, Fazli-Tabaei S. Influence of morphine- or apomorphine-induced sensitization on histamine state-dependent learning in the step-down passive avoidance test. Behav Brain Res 2006; 171(1): 50-5.
20. el BL, Chemli R. Peganum harmala L: a poisonous plant of North Africa. Vet Hum Toxicol 1991; 33(3): 276-7.
21. Pawlik M, Rommelspacher H. Demonstration of a distinct class of high-affinity binding sites for [3H]norharman [(3H]beta-carboline) in the rat brain. Eur J Pharmacol 1988; 147(2): 163-71.
22. Rommelspacher H, May T, Salewski B. Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. Eur J Pharmacol 1994; 252(1): 51-9.
23. 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(1-2): 31-6.
24. Welsh JP, Harvey JA. Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. Eur J Neurosci 1998; 10(11): 3321-32.
25. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. Br J Pharmacol 2002; 135(5): 1079-95.
26. Zarrindast MR, Karami M, Sepehri H, Sahraei H. Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. Eur J Pharmacol 2002; 453(1): 81-9.
27. 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.
28. Yang Y, Cao J, Xiong W, Zhang J, Zhou Q, Wei H, et al. Both stress experience and age determine the impairment or enhancement effect of stress on spatial memory retrieval. J Endocrinol 2003; 178(1): 45-54.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 137, 1st week, July 2011 Received: 6.1.2011 Accepted: 14.4.2011

Involvement of Nitric Oxide System of Dorsal Hippocampus on Harman Induced-amnesia in the Passive Avoidance Test

Morteza Piri PhD[1], Mohammad Nasehi PhD[2], Mozhgan Abdolahiyan[3], Maryam-sadat Shahin[4], Mohammad Reza Zarrindast PhD[5]

Abstract

Background: β-carbolines alkaloids such as Harmane have been found in common plant-derived foodstuffs such as 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 nitric oxide agonist and antagonist on amnesia induced by Harmane was examined in mice.

Methods: In this experimental study 305 adult male NMRI mice were used. Mice were anaesthetized and cannulae implanted bilaterally in the CA1 regions of the dorsal hippocampus using stereotaxic method. One week after cannulae implantation, mice trained in a step-down type inhibitory avoidance task, and tested 24 h after training to measure step-down latency as a scale of memory.

Findings: Pre-training systemic injection of Harmane induced amnesia. Pre-test intra-dorsal hippocampal injection of L-arginine (8 µg/mouse) or L-NAME (10 and 15 µg/mouse) potentiate and reverse amnesia induced by pre-training Harmane, respectively, but pretraining injection of L-arginine or L-NAME 5 min before Harmane could not block Harmane amnesia.

Conclusion: The finding in this study indicated that exist complex interaction between nitric oxide system of dorsal hippocampus and amnesia induced by Harmane.

Keywords: Harmane, L-arginine, L-NAME, Amnesia, Dorsal hippocampus, Mice.

Archive of SID

[1] Instructor, Department of Biology, School of Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Semnan, Iran.
[3] Student of Pharmecy, Department of Pharmacology and Toxicology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[4] Department of Biology, School of Sciences, Young Researchers Club, Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[5] Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Morteza Piri PhD, Email: biopiri@iauardabil.ac.ir

www.SID.ir