

## نقش سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پستی در فراموشی القا شده با هارمان در آزمون حافظه‌ی اجتنابی مهارتی

دکتر مرتضی پیری<sup>۱</sup>، دکتر محمد ناصحی<sup>۲</sup>، مژگان عبدالهیان<sup>۳</sup>، مریم السادات شاهین<sup>۴</sup>،  
دکتر محمد رضا زرین دست<sup>۵</sup>

### 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 (آل- آرژنین) و آنتاگونیست (L-NAME) نیتریک اکساید به ناحیه‌ی هیپوکامپ پستی 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 پستی انجام شد. یک هفته‌ی بعد از کانول گذاری، موش‌ها در دستگاه یادگیری اجتنابی مهارتی 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-NAME - آرژنین (۸ میکروگرم بر موش) و L-NAME (۱۵ و ۱۰ میکروگرم بر موش) به هیپوکامپ پستی به ترتیب باعث تقویت و اصلاح فراموشی القا شده با هارمان قبل از آموزش می‌شود، اما تزریق قبل از آموزش L-NAME - 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 پستی و فراموشی القا شده با هارمان وجود دارد.

**واژگان کلیدی:** هارمان، آل - آرژنین، L-NAME، فراموشی، هیپوکامپ پستی، موش سوری.

### مقدمه

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،

آلکالوئید بتا-کربولین محتوی یک هسته‌ی ایندول و یک حلقه‌ی پریدینی می‌باشد (۱). تعدادی از آلکالوئیدهای بتا-کربولین، 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

<sup>۱</sup> مربی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، سمنان، ایران.

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> کارشناس، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری، تهران، ایران.

<sup>۵</sup> استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

می‌رسد تمایل متفاوت کربولین‌ها به گیرنده‌های مختلف به میزان اشباع حلقه و گروه‌هایی 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 (۹-۱۰). 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 نموده‌اند که نیتریک اکساید انواع مختلف یادگیری و حافظه مانند یادگیری حرکتی، یادگیری اجتنابی غیرفعال و حافظه‌ی فضایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۹، ۱۲).

تا کنون هیچ مطالعه‌ای در مورد برهم‌کنش مستقیم بین بتا-کربولین‌ها با سیستم 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 برهم‌کنش بتا-کربولین با سیستم نیتریک اکساید باشد، اثرگذاری آن‌ها بر روی رفتارهای یکسان و سیستم‌های نورترانسسمیتری مشابه

قلب، کلیه، کبد و بافت مغز وجود دارند (۱-۲). 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 بی‌اثر بودن هارمان بر شکل‌گیری حافظه‌ی کوتاه و بلند مدت وجود دارد، هر چند بیان شده که شاید هارمان بتواند بر روی حافظه‌ی غیرفضایی و غیراجتنابی 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 مهاري را تخریب می‌نماید (۲). به نظر می‌رسد که بتا-کربولین‌ها اثرات رفتاری خود را از طریق برهم‌کنش با گیرنده‌ها و آنزیم‌های مختلف درگیر در تولید و حذف نورترانسسمیترها اعمال می‌نمایند. گزارش شده است که بتا-کربولین‌ها می‌توانند به گیرنده‌های بنزودیازپینی، ایمیدازولین، دوپامینی، کولینرژیک، سروتونینی و گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA وصل شوند و عملکرد آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۶-۷). از طرف دیگر این آلکالوئیدها آنزیم‌هایی نظیر مونوآمین اکسیداز A و B را مهار می‌نمایند و از این طریق نورترانسسمیترهایی نظیر دوپامین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸). به نظر

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 موش‌ها قرار گرفت. دمای حیوان‌خانه بین  $22 \pm 3$  درجه‌ی 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 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 ناحیه‌ی هیپوکامپ پستی، موش‌های 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 استریوتاکی 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 ناحیه‌ی CA۱ هیپوکامپ پستی عبارت بود از:  $AP = -2$ ،  $ML = \pm 1/6$  و  $V = -1/5$ . 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 ۲۷ G دندان‌پزشکی که ۹

می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که بتا-کربولین و سیستم نیتریک اکساید می‌توانند سطح نورترانسmitterهای مختلف مانند دوپامین، نوراپی‌نفرین، اپی‌نفرین، سروتونین، گابا و هیستامین را در فضای سیناپسی به واسطه‌ی 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 نورترانسmitterها را در سیستم عصبی تحت تأثیر قرار دهند. در این مطالعه برای اولین بار برهم‌کنش بین هارمان و سیستم نیتریک اکساید در زمینه‌ی حافظه‌ی اجتنابی مهاری در هیپوکامپ پستی 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

میلی متر طول داشت و به کت‌دان تیوب نوزاد (شماره ی ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنمای ۲۲ G 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 - آرژنین پیش‌ساز نیتریک اکساید که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید و L-NAME مهار کننده ی 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 جعبه ی چوبی به ابعاد ۴۰ × ۳۰ × ۳۰ سانتی متر بود و در کف آن ۲۹ میلی‌ی فولادی با قطر ۰/۳ سانتی متر و به فاصله ی ۱ سانتی متر از یکدیگر وجود دارد و یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد ۴ × ۴ × ۴ سانتی متر 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. جلسه ی 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 از ظهر انجام گرفت (۱۹، ۲) پس از انجام آزمون حافظه به منظور پی بردن به صحت کانول گذاری انجام شده، حیوان‌ها توسط کلروفورم 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 استفاده ی از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شد. محل ورود کانول به مغز به وسیله ی میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه ی مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد (۱۸). پس از کسب اطمینان از

یا هارمان (۱۶ میلی گرم 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 ناحیه CA1 هیپوکامپ پشתי دریافت کردند.

*آزمایش سوم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آموزش L-NAME روی حافظه اجتنابی مهارى 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 L-NAME (۱۵، ۱۰، ۸ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل ناحیه CA1 هیپوکامپ پشתי دریافت کردند و پنج دقیقه بعد، یعنی پانزده دقیقه مانده به زمان آموزش، هارمان (۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. تمامی گروه‌های فوق ۲۴ ساعت بعد و در روز آزمون نرمال سالین (۱۰ میلی لیتر 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 پشתי در حضور و غیاب هارمان روز آموزش بر روی حافظه اجتنابی مهارى.*

در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها نرمال سالین (۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم) یا هارمان (۱۶ میلی گرم 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

محل قرارگیری کانول‌ها 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 ارزیابی‌های آماری،  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Sigma Plot استفاده شد.

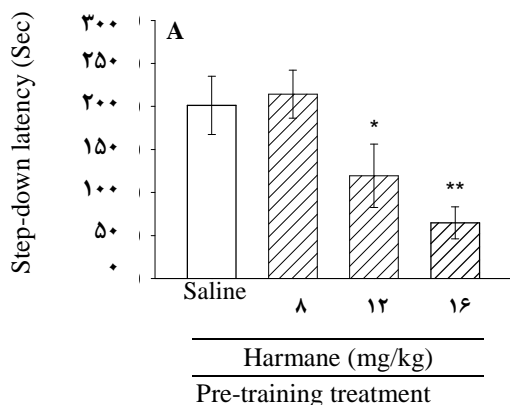
### تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده

*آزمایش اول: اثر هارمان بر روی حافظه اجتنابی مهارى.*

در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. گروه اول نرمال سالین (۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم) و سه گروه باقی مانده مقادیر مختلف هارمان (۸، ۱۲ و ۱۶ میلی گرم 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 میلی لیتر بر کیلوگرم) را پانزده دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

*آزمایش دوم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آزمون L-NAME به هیپوکامپ پشתי در حضور و غیاب هارمان روز آموزش بر روی حافظه اجتنابی مهارى.*

در این آزمایش دوازده گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها نرمال سالین (۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم)



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.  $*P < 0/05$ ,  $**P < 0/01$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین می‌باشد.

آزمایش دوم: اثر تزریق قبل از آزمون *L-NAME* به هیپوکامپ پستی 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 ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی به موش‌هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده بودند، اثری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری نداشت ( $P > 0/05$ ). 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 ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی در موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیر هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، باعث بهبود حافظه‌ی اجتنابی مهاری تخریب شده با هارمان روز آموزش می‌شود ( $ANOVA, H(5) = 20/17, P < 0/001$ ) (شکل ۲، سمت راست).

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

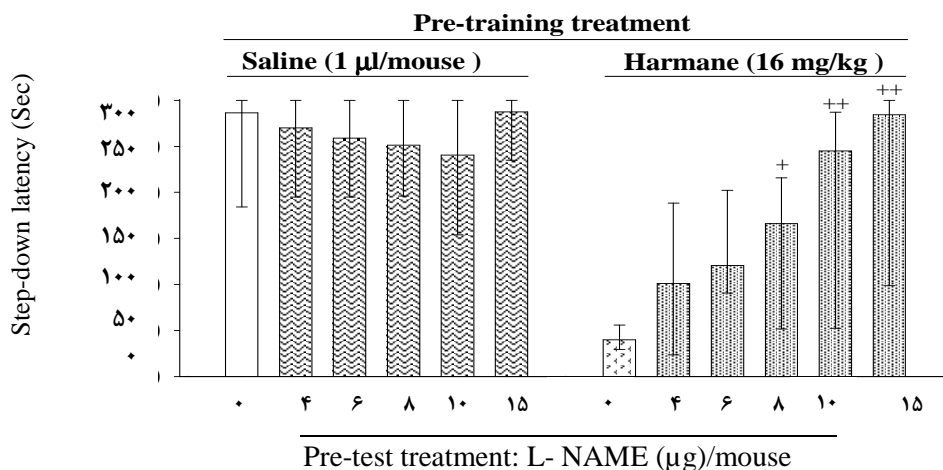
آزمایش پنجم: بررسی تأثیر تزریق قبل از آموزش *L-Arginine* همراه با هارمان بر حافظه‌ی اجتنابی مهاری.

در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها در روز آموزش بیست دقیقه قبل از آموزش مقادیر مختلف *L-Arginine* (۸، ۶، ۴ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی 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 ( $ANOVA, H(3) = 2/79, P < 0/001$ ). 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).



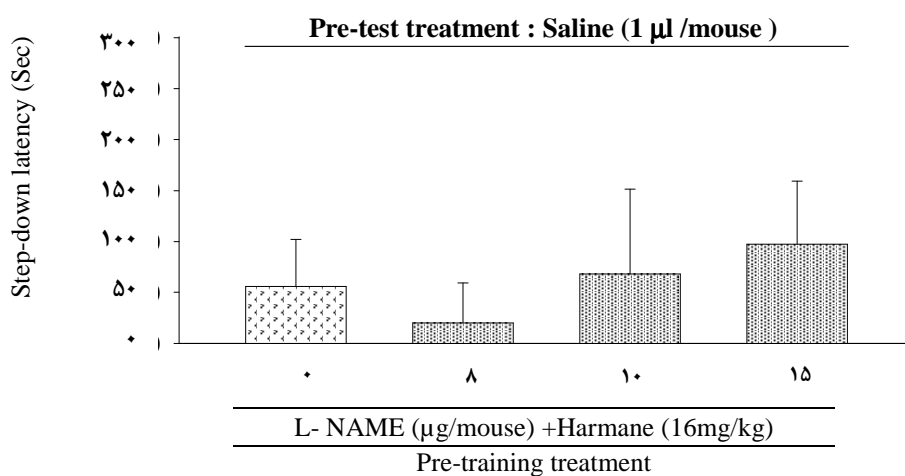
شکل ۲. اثر تزریق قبل از ازمون L-NAME در حضور و غیاب هارمان در روز آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارى. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است.  $P < 0.05$ ,  $++P < 0.01$  در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.

آزمایش سوم: اثر تزریق L-NAME و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارى. از ازمون آماری Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق L-NAME به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی پنج دقیقه قبل از تزریق درون صفاقی هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش اثری بر روی تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهارى با هارمان ندارد و قادر به مهار آن نیست (شکل ۳).  $(ANOVA, H(3) = 2/78, P > 0.05)$ .

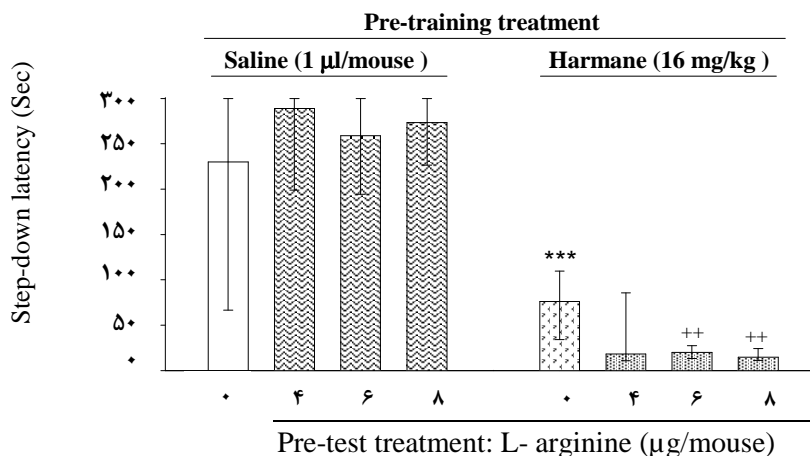
آزمایش چهارم: اثر تزریق L-NAME و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارى. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است.  $P > 0.05$  در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.

آزمایش سوم: اثر تزریق L-NAME و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارى. از ازمون آماری Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق L-NAME به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی پنج دقیقه قبل از تزریق درون صفاقی هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش اثری بر روی تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهارى با هارمان ندارد و قادر به مهار آن نیست (شکل ۳).  $(ANOVA, H(3) = 2/78, P > 0.05)$ .

آزمایش چهارم: اثر تزریق L-NAME و هارمان قبل از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارى. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان است.  $P > 0.05$  در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.



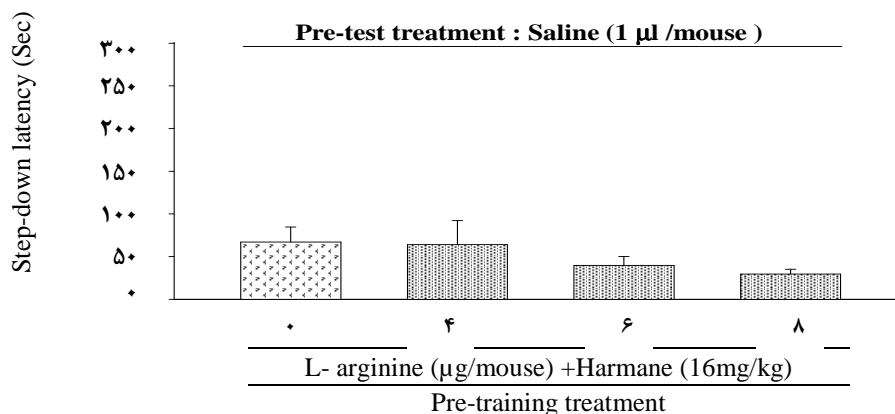
شکل ۳. اثر تزریق L-NAME پنج دقیقه قبل از هارمان در روز آموزش بر حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده با هارمان. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان ذکر شده است.



شکل ۴. اثر تزریق قبل از آزمون ال - آرژنین در حضور و غیاب هارمان روز آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاري. نتایج به صورت میانه و چارک برای ده سر حیوان نشان داده شده است.  $P < 0.01$  در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی سالین و  $P < 0.01$  در مقایسه‌ی با گروه دریافت کننده‌ی هارمان می‌باشد.

از آموزش بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاري. آزمون Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق ال - آرژنین به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی، پنج دقیقه قبل از تزریق درون صفاقی هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش اثری بر روی تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاري با هارمان ندارد و قادر به مهار یا تقویت تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاري توسط هارمان نیست (ANOVA,  $H(3) = 1/21$ ,  $P > 0.05$ ) (شکل ۵).

همچنین آزمون Kruskal-Wallis و آزمون کامل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پیش از آزمون ال - آرژنین (۸ و ۶ میکروگرم بر موش) به صورت درون مغزی به داخل ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی در موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیر هارمان (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، تخریب حافظه‌ی القا شده با هارمان را تشدید می‌نماید ( $P < 0.01$ ). (ANOVA,  $H(3) = 9/81$ ) (شکل ۴، سمت راست). آزمایش پنجم: اثر تزریق ال - آرژنین و هارمان قبل



شکل ۵. اثر تزریق ال - 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.



## 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 اولیه 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 مهارتی را تخریب می‌نماید (۲). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که هارمان اثرات متنوعی مانند سرکوب فعالیت حرکتی و آتاکسی را در موش‌های صحرایی ایجاد می‌کند (۲۰). گزارش‌ها 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 گزارش‌های وجود دارد که هارمالین (یک آلکالوئید هارمالا) یادگیری حرکتی و حافظه‌ی اخباری را تخریب می‌نماید (۵). مطالعات پیشین مشخص نموده‌اند که بتا-کربولین‌ها 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 مونوآمین‌ها از فضای سیناپسی، سطح نوراپی نفرین، دوپامین و سروتونین را در فضای سیناپسی افزایش می‌دهند (۲۲). با توجه به اهمیت نورترانسسمیترها و گیرنده‌های دوپامینی، نوراپی نفرین و سروتونین در فرایند حافظه و یادگیری این احتمال وجود دارد، که هارمان از طریق اثر بر این نورترانسسمیترها و گیرنده‌های

آن‌ها حافظه‌ی اجتنابی مهارتی را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان دادند که این آلکالوئیدها با فعال نمودن هسته‌های زیتونی تحتانی و مخچه باعث ایجاد لرزش می‌شوند (۲۳). اگرچه تاکنون نقش هسته‌های 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 مهارتی 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 نیتریک‌اکساید عمل می‌نماید و ال-آرژنین پیش‌ساز نیتریک‌اکساید است که به عنوان آگونیست نیتریک‌اکساید عمل می‌نماید. نتایج ما در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق آگونیست و آنتاگونیست نیتریک‌اکساید قبل از آموزش یا قبل از آزمون به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی به تنهایی در دوزهای به کار رفته در این مطالعه اثری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهارتی ندارد، اما تزریق قبل از آزمون آنتاگونیست نیتریک‌اکساید به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تیمار با دوز مؤثر هارمان بودند، باعث بهبود حافظه‌ی اجتنابی مهارتی تخریب شده با هارمان می‌شود. این مشاهده بیانگر این مطلب است که مهار سیستم نیتریک‌اکساید در هیپوکامپ پستی، یادآوری حافظه‌ی اجتنابی مهارتی 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 مهارتی

یادگیری نقش دارد. مدل های مختلف یادگیری از جمله یادگیری حرکتی، یادگیری اجتنابی غیرفعال و حافظه‌ی فضایی تحت تأثیر سیستم نیتریک اکساید 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 گیرنده‌های آمینواسیدهای تحریکی، به ویژه گیرنده‌های 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 کننده‌های نیتریک اکساید سنتتاز مانند L-NAME می‌توانند بسیاری از اثرات میانجی‌گری شده با گیرنده‌های 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

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 مشاهده‌ها نشان داد که با وجود این که سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پستی در بازخوانی و به یادآوری حافظه‌ی اجتنابی مهار 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 نورترانسسمیترها نظیر استیل کولین، گلو تامات و گاما آمینو بوتیریک اسید را تحت تأثیر قرار دهد و بخشی از اثرات نیتریک اکساید می‌تواند از این طریق اعمال گردد (۲۵). همچنین یافته‌های پیشین پیشنهاد کننده‌ی این موضوع می‌باشد که نیتریک اکساید می‌تواند به عنوان یک تعدیل کننده‌ی عصبی عمل نماید (۹). نقش تعدیل کننده‌ی نیتریک اکساید در زمینه‌ی اصلاح حافظه‌ی تخریب شده با لیتیموم 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 سنتتاز 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

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

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 حافظه ی آن‌ها با تزریق هارمان در روز آموزش تخریب شده است باعث بهبود حافظه شود.

### نتیجه گیری

تزریق پس از آموزش هارمان باعث تخریب حافظه ی اجتنابی مهاری می‌شود و فعال‌تر نمودن سیستم

### 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 harmaline-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<sub>2</sub>) and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) 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, harmaline, 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, Philipp 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

- effect of smoking on FeNO. *Nihon Kogyuki 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*. 2<sup>nd</sup> 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.

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

Morteza Piri PhD<sup>1</sup>, Mohammad Nasehi PhD<sup>2</sup>, Mozghan Abdolahiyan<sup>3</sup>,  
Maryam-sadat Shahin<sup>4</sup>, Mohammad Reza Zarrindast PhD<sup>5</sup>

### Abstract

**Background:**  $\beta$ -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  $\mu$ g/mouse) or L-NAME (10 and 15  $\mu$ g/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.

<sup>1</sup>Instructor, Department of Biology, School of Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Semnan, Iran.

<sup>3</sup>Student of Pharmecey, Department of Pharmacology and Toxicology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Department of Biology, School of Sciences, Young Researchers Club, Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>5</sup>Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Corresponding Author:** Morteza Piri PhD, Email: biopiri@iauardabil.ac.ir