بررسی اثر هارمان، نورهارمان و هارمین بر رفتار به خود پیچی (Writhing) شکمی القاء شده با اسید استیک در موش

*دکتر داود فرزین(Ph D)[1]- دکتر احسان موسوی(MD)[1]

*نویسنده مسئول: ساری، جاده دریا، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

پست الکترونیک: davoodfarzin@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۳/۱۰ تاریخ پذیرش:۸۹/۶/۱۷

چکیده

مقدمه: هارمان، نورهارمان و هارمین آلکالوئیدهای بتاکربولینی خانواده گیاه اسپند (پگانوم هارمالا، زیگوفیلاسه) هستند. آلکالوئیدهای بتاکربولینی به جایگاه بنزودیازپینی گیرنده‌های $GABA_A$ به عنوان آگونیست‌های معکوس متصل می‌شوند و مسیرهای اوپیوئیدی دستگاه عصبی مرکزی را تحریک می‌کنند. این آلکالوئیدها فعالیت آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز را نیز مهار می‌کنند. شاید بتاکربولین‌ها بتوانند درد به خودپیچی شکمی ناشی از تزریق داخل صفاقی اسید استیک در موش‌ها را کاهش دهند.

هدف: ارزیابی تجویز حاد هارمان، نورهارمان و هارمین بر پاسخ به خود پیچی شکمی ناشی از اسید استیک.

مواد و روش‌ها: همهٔ آزمایش‌ها بر موش‌های نر نژاد Balb/C (۲۰ الی ۲۵ گرم) با تزریق داخل صفاقی اسید استیک۰/۶ درصد برای ایجاد رفتار به خودپیچی شکمی در موش‌ها انجام شد. این رفتار به روش مشاهده به‌مدت ۳۰ دقیقه ثبت می‌شد. کاهش شمارش رفتار به خود پیچی شکمی با این داروها نشان‌دهنده اثر ضددرد بود. داروها در سمت‌های مخالف صفاق تزریق می‌شدند تا از هرگونه تداخل فیزیکی شیمیایی بین آنها جلوگیری شود.

نتایج: تزریق داخل صفاقی هارمان (۵ الی ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۶ الی ۹ موش در هر گروه)، نورهارمان (۵ الی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۸ الی ۹ موش در هر گروه) و هارمین (۱۰ و ۱۵میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۸ الی ۹ موش در هر گروه) به‌طور معنی‌دار رفتار به خودپیچی شکمی القاء شده توسط اسید استیک را کاهش داد. اثر مهاری هارمان، نورهارمان و هارمین توسط فلومازنیل (۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم، داخل صفاقی) آنتاگونیزه شد.

نتیجه‌گیری: اثر مهاری هارمان، نورهارمان و هارمین بر پاسخ به خودپیچی شکمی ممکن است از طریق مکانیسم‌های آگونیستی معکوس در سطح گیرنده‌های بنزودیازپینی واسطه‌گری شود.

کلید واژه‌ها: درد/کاربولین‌ها/ موش/ هارمین

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره نوزدهم شماره ۷۶، صفحات: ۳۷-۲۹

مقدمه

درد، به عنوان نوعی احساس ناخوشایند و تجربه حسی خاص تعریف می‌شود که غالباً بر اثر تحریک مستقیم محرکی دردناک یا واردآمدن نوعی آسیب به بدن ایجاد می‌شود. انسان‌ها به‌طور روزمره در اثر آسیب‌های وارده یا شرایط جسمی خاص خود این احساس را تجربه می‌کنند و گاهی نیز در اثر بیماری یا آسیب‌های جدی دچار درد می‌شوند(۱). ناخوشایندبودن و ناراحتی ناشی از درد لزوم درمان ضددرد را می‌طلبد. از داروهای ضددرد، مخدرها از قوی‌ترین و قدیمی‌ترین داروهای مورد استفاده هستند. مخدرهای سنتی، به‌طور عمده با تحریک گیرنده‌های خود در دستگاه عصبی مرکزی اثر ضددرد خود را اعمال می‌کنند. این داروها، به موازات آثار مطلوب، تأثیر جانبی ناخواسته و ناخوشایندی نیز به همراه دارند که تحمل و وابستگی از شایع‌ترین و مهم‌ترین آنها هستند. امروزه، پژوهش برای یافتن داروهای ضددرد جدید که علاوه بر دارابودن قدرت ضددرد قابل توجه از کمترین عوارض ناخواسته برخوردار باشند، از مهم‌ترین فعالیت‌ها در حوزه پزشکی و علوم مرتبط است. گیاه اسپند (Peganum Harmala) عضوی از خانوادهٔ زیگوفیلاسه است که در بسیاری از کشورهای شمال افریقا و خاورمیانه به‌طور گسترده می‌روید. در ترکیب این گیاه چند آلکالوئید وجود دارد که بیشتر در دانه‌ها و ریشه‌هایش یافت می‌شود. پنج مشتق آلکالوئیدی با ساختمان ایندول در این گیاه وجود دارد که به بتاکربولین‌ها معروفند. این آلکالوئیدها شامل هارمان، نورهارمان، هارمین، هارمالین و هارمالول هستند(۵-۲). هارمان و نور هارمان، به‌طور درون‌زا در دستگاه عصبی مرکزی، کبد، پلاکت، پلاسما و ادرار پستانداران وجود دارند

(۸-٦). متابولیت‌های بعضی از اوپیوئیدها نیز می‌توانند با تریپتامین و سروتونین متراکم شده و هارمان و نورهارمان تولید کنند(۹). هارمان و هارمین اثر مهاری بر نشانگان ترک اعتیاد ناشی از نالوکسون در رت‌های وابسته به مرفین دارند(۱۰). علاوه بر این، این ترکیب‌ها می‌توانند با اتصال به گیرنده‌های اوپیوئیدی، فعالیت آنها را تحریک کنند(۱۱). اثر محیطی بتاکربولین‌ها نیز بیشتر به علت مهار فعالیت سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز و همچنین مهار آزادسازی سایتوکین‌ها (TNF-α، $IL_{1\beta}$ و IL_8) از ماکروفاژهای صفاقی است که تظاهر می‌کند(۱۲) و به این ترتیب در این راستا، داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) پاسخ به خود پیچی شکمی را مهار می‌کنند(۱۲و ۱۳). نتایج مطالعات فوق، پیشنهاد کننده اثر ضد درد بتاکربولین‌ها است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش‌های تحت رفتار به خودپیچی شکمی (Abdominal Writhing Test) طراحی و اجرا شده‌است.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه از موش‌های سفید کوچک نر از نژاد Balb/C به وزن ۲۰ الی ۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور آمل خریداری شده و در قفس‌های پلاستیکی موجود در حیوانخانه دانشکده پزشکی ساری با میزان روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غذا و آب به‌طور مداوم، به‌جز در هنگام آزمایش در اختیار حیوان قرار می‌گرفت. از هر حیوان یک‌بار استفاده می‌شد. برای تعیین منحنی‌های دوز-پاسخ، حداقل ۳ الی ٤ گروه از حیوانات به‌عنوان مورد و یک گروه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. در هر گروه، ٦ الی ۹ سر موش قرار داده شدند.

تست به خودپیچی شکمی (Abdominal Writhing Test): تست به خود پیچی شکمی یکی از انواع استاندارد مدل‌های حیوانی برای ایجاد درد است. این تست نوعی مدل رفلکسی برای درد تونیک محسوب می‌شود. در این تست اسید رقیق شده که معمولا اسید استیک ۰/۶ درصد است، به داخل صفاق حیوان مورد آزمایش (موش یا رت) تزریق می‌شود. واکنشی که پس از تزریق به‌طور معمول در حیوان بروز می‌کند به نام Writing یا به‌خودپیچی شکمی شناخته می‌شود. طی این واکنش، موش به‌شدت ماهیچه‌های شکمی‌ش را منقبض کرده و پشت خود را به حالت خمیده در می‌آورد. در این وضعیت ممکن است حیوان بر روی پاهای جلویی خود حالت نیم‌نشسته گرفته در حالی که اندام‌های عقبی خود را به شدت کشیده نگاه می‌دارد. امکان دارد حیوان بر روی یکی از پهلوهای خود دراز بکشد یا مرتب از این پهلو به آن پهلو جابجا شود. این واکنش‌ها تا حدی مشابه حرکت‌ها و واکنش‌های فرد مبتلا به درد کولیکی شکم یا دیگر دردهای این ناحیه است(۱۴). در مطالعه ما، محلول اسید استیک ۰/٦ درصد به مقدار۱۰میلی‌لیتر/کیلوگرم داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شده سپس تعداد به‌خودپیچی‌های شکمی آنها را به مدت ۳۰ دقیقه ثبت شد. کاهش تعداد به‌خودپیچی‌های شکمی معادل اثر ضد درد بتاکربولین‌ها تلقی شد.

داروها: داروهای زیر در آزمایش:

هارمان هیدروکلراید(سیگما، امریکا)، هارمین هیدروکلراید (سیگما، امریکا)، نورهارمان هیدروکلراید(سیگما، امریکا)، فلومازنیل (سیگما، امریکا) و اسید استیک (مرک، آلمان)

فلومازنیل آنتاگونیست جایگاه گیرنده‌ای بنزودیازپینی و آگونیستی معکوس است که می‌تواند اثر بتاکربولین ها را آنتاگونیزه کند(۱۵و۱٦). داروها در سالین حل و با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم داخل صفاقی تزریق شدند. محل تزریق دارو، سمت مخالف تزریق اسید استیک بود. دوز داروها و زمان تجویز آنها همان دوز و زمان‌های تعیین شده مؤثر از نظر فارماکولوژی در مطالعات قبلی بود(۱۷-۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج با آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و متعاقب آن تست Newman-Keuls تجزیه و تحلیل آماری شد. تفاوت با $P<0.05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد. برای محاسبه ED_{50} بتاکربولین‌ها، از آنالیز رگرسیون داده‌های نموداری دوز- پاسخ بکار رفت. تمام داده‌ها با نرم‌افزار GRAPHPAD 5 تجزیه تحلیل آماری شدند.

نتایج

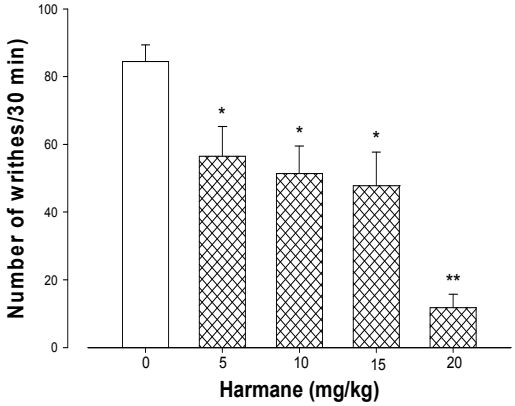
اثر هارمان بر رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده با اسید

استیک: تزریق داخل صفاقی هارمان(۵ الی ۲۰میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۳۰دقیقه قبل از تزریق اسیداستیک) به‌طور وابسته به دوز، رفتار به خودپیچی شکمی را کاهش داد [F (4.30)=13.01 , P<0.0001]. ED_{50} هارمان در کاهش پاسخ درد ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم محاسبه شد (شکل ۱).

اثرنورهارمان بر رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده با اسید استیک: تزریق داخل صفاقی نورهارمان (۵ الی ۱۵میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق اسیداستیک) به‌طور وابسته به دوز، رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده توسط استیک اسید را کاهش داد [F(3.29)= 8.694, P<0.0003]. ED_{50} نورهارمان در کاهش پاسخ درد ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم محاسبه شد(شکل ۲).

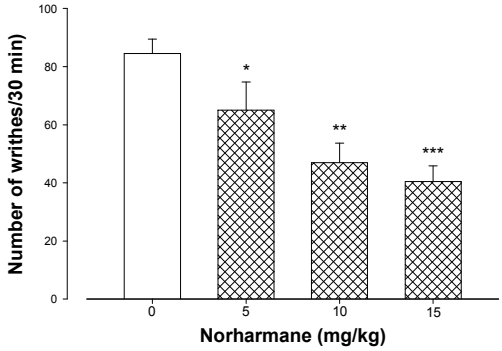
اثرهارمین بر رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده با اسید استیک: تزریق داخل صفاقی هارمین(۵ الی ۱۵میلی‌گرم/ کیلوگرم، ۳۰دقیقه قبل از تزریق اسیداستیک) به‌طور وابسته به دوز رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده توسط استیک اسید را کاهش داد. [F(3.30) = 6.484, P<0.0016] . ED_{50} در کاهش پاسخ درد ۷میلی‌گرم بر کیلوگرم محاسبه شد(شکل ۳).

اثر فلومازنیل بر پاسخ ضددردی هارمان، نورهارمان و هارمین: تزریق داخل صفاقی فلومازنیل (۲میلی‌گرم / کیلوگرم،۳۰ دقیقه قبل از تزریق استیک اسید)، به‌طور معنی‌دار اثر مهاری هارمان (۱۰میلی گرم بر کیلوگرم) = [F(4,28) 12.566, P<0.0001] (شکل ۴) ، نورهارمان(۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) [F(3 29) = 5.149, P<0.0056] (شکل۵) و هارمین (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) [F(3 29) = 3.752, P<0.0216]. (شکل ۶) را آنتاگونیزه کرد.



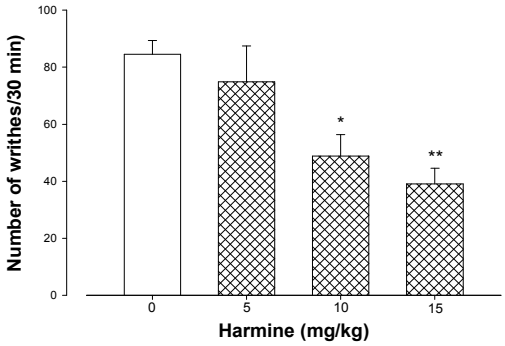
شکل۱: اثر هارمان بر رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده توسط استیک اسید در موش

هارمان(۵ الی ۲۰میلی‌گرم/ کیلوگرم) و سالین (۱۰ میلی‌لیتر/ کیلوگرم) به‌صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق استیک اسید تجویز و تعداد رفتار به خودپیچی شکمی به مدت۳۰ دقیقه ثبت شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین نشان داده‌شده‌است. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ الی ۹ موش بود.
***P<0.01, **P<0.001 تفاوت از گروه کنترل سالین را نشان می‌دهد.**



شکل۲: اثر نورهارمان بر رفتار به خودپیچی شکمی ایجاد شده توسط استیک اسید در موش

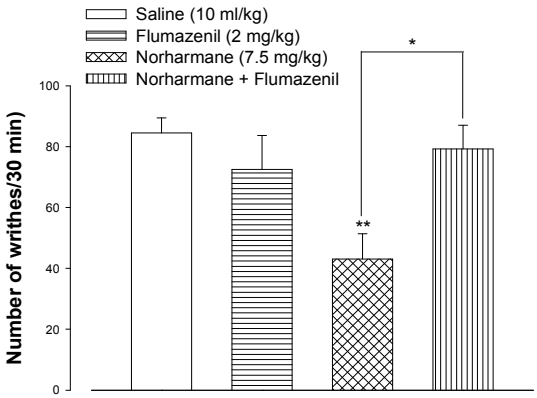
نورهارمان (۵ الی ۱۵میلی‌گرم/ کیلوگرم) و سالین (۱۰میلی‌لیتر/ کیلوگرم) به‌صورت داخل صفاقی ۳۰دقیقه قبل از تزریق استیک اسید تجویز و تعداد رفتار به خودپیچی شکمی به‌مدت ۳۰دقیقه ثبت شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین نشان‌داده‌شده‌است. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ الی ۹ موش بود.
***P < 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001 تفاوت از گروه کنترل سالین را نشان می‌دهد.**



شکل ۳: اثرهارمین بر رفتار خود پیچی شکمی ایجاد شده توسط استیک اسید در موش

هارمین (۵ الی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم) و سالین(۱۰ میلی‌لیتر/ کیلوگرم) به‌صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق استیک اسید تجویز و تعداد رفتار به خودپیچی شکمی به‌مدت ۳۰ دقیقه ثبت گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین بیان گردیده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ الی ۹ موش بود.

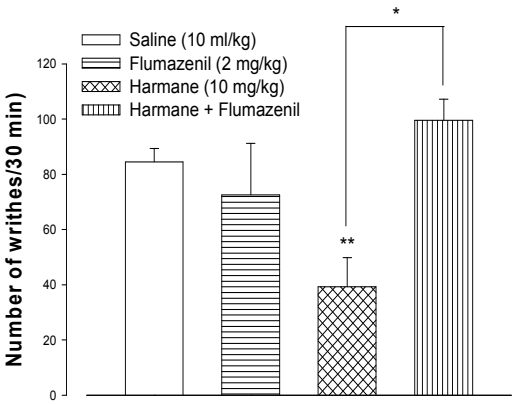
***P<0.05, **P<0.01 تفاوت از گروه کنترل سالین را نشان می‌دهد.**



شکل ۵: آنتاگونیسم فلومازنیل در پاسخ ضددردی نورهارمان

نورهارمان با دوز ۷/۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم (ED_{50})، فلومازنیل با دوز ۲میلی‌گرم/ کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰میلی لیتر/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده‌است. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی ۸ الی ۹ موش بود.

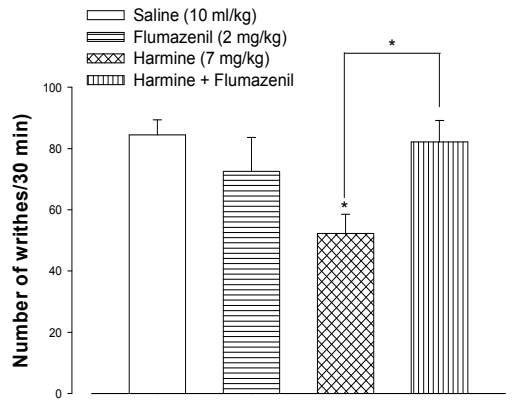
***P < 0.05 و **P < 0.01 تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.**



شکل ۴: آنتاگونیسم فلومازنیل در پاسخ ضددردی هارمان

هارمان با دوز ۱۰ میلی گرم/ کیلوگرم (ED_{50})، فلومازنیل با دوز ۲میلی‌گرم/ کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده‌است. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی ۶ الی ۹ موش بود.

***P < 0.01 و **P < 0.001 تفاوت از گروه کنترل سالین را نشان می‌دهد.**



شکل ۶: آنتاگونیسم فلومازنیل در پاسخ ضددردی هارمین

هارمین با دوز ۷ میلی‌گرم/ کیلوگرم (ED_{50})، فلومازنیل با دوز ۲میلی‌گرم/ کیلوگرم و سالین با حجم۱۰ میلی لیتر/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده‌شده‌است. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی ۸ الی ۹ موش بود.

***P < 0.05 تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.**

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر هارمان، نورهارمان و هارمین بر رفتار به خود پیچی شکمی القأ شده با اسید استیک در موش بررسی شد. نتایج به شرح ذیل بدست آمد:

الف) هارمان، نورهارمان و هارمین به‌طور معنی‌داری رفتار به خود پیچی شکمی القاء شده با اسید استیک را مهار می‌کنند.

ب) اثر مهاری هارمان، نورهارمان و هارمین به‌طور معنی‌دار بر پاسخ به‌خودپیچی‌شکمی توسط فلومازنیل آنتاگونیزه می‌شود.

تست رایتینگ یا به خود پیچی شکمی یکی از الگوهای استاندارد حیوانی ایجاد درد است(۱۴). تزریق داخل صفاقی اسید استیک با آسیب بافت محل تزریق، سطح پروستاگلاندین‌های E_2 و F_2 مایع صفاقی را افزایش می‌دهد. نتیجه این عمل، تحریک فعالیت گیرنده‌های موضعی پروستانوئیدی و فعال‌شدن روند التهاب و درد است. به همین دلیل داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) توانایی مهار پاسخ به خودپیچی‌شکمی را دارند(۱۲و۱۳). نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌است که بتاکربولین‌ها توانا مهار فعالیت سیکلواکسیژناز، لیپواکسیژناز و آزادسازی سیتوکین‌ها (TNF-α، $IL_{1\beta}$ و IL_8) از ماکروفاژهای صفاقی را دارند(۱۲). به این ترتیب، به‌نظر می‌رسد هارمان، نورهارمان و هارمین از این طریق قادر باشند پاسخ به خود پیچی‌شکمی القاء شده توسط اسید استیک را مهار کنند.

تجویز سیستمی بتاکربولین‌ها، الگوی رفتار ناشی از تحریک گیرنده‌های گابا–ارژیک را در قسمت‌های مختلف مغز بویژه آمیگدال، PAG (Periaqueductal gray matter)، و رافه پشتی تغییر می‌دهد (۱۸و۱۹). این تأثیر در تست‌های ارزیابی عملکرد ضددرد داروها تائید شده‌است. در مطالعه فاروق و همکاران، بتاکربولین ها به‌طور وابسته به دوز، درد حاصل از صفحه‌ی داغ و همچنین درد ناشی از تزریق فرمالین را در هر دو فاز اولیه و تاخیری در رت و موش کاهش دادند. درد فاز اولیه تست فرمالین، نتیجه تحریک مستقیم اعصاب گیرنده‌های درد است در حالی که فاز تأخیری این تست، نتیجه آسیب حاد بافتی و فرایند التهابی حاصل از آن است (۲۰). الگوی دو مرحله‌ای تست فرمالین که بازتاب دو فرایند آسیب‌شناختی متفاوت است، این امکان را فراهم می‌کند تا مکانیسم‌های احتمالی مختلف مؤثر در بی‌دردی شناخته شوند(۲۱). داروهایی که اثر ضددرد آن‌ها مکانیسم مرکزی دارد، بر هر دو فاز تست فرمالین تقریباً به یک میزان مؤثرند(۲۲) در صورتی‌که داروهای ضد درد محیطی بر فاز تاخیری این تست تأثیر می‌گذارند. این اثر باعث مهار درد حاصل از تولید و آزادسازی پروستاگلاندین‌ها طی فرایند التهابی می‌شود(۲۳). تأثیر بتاکربولین‌های گیاه اسپند در هر دو فاز تست فرمالین نشان‌دهنده خواص ضددرد مرکزی وضدالتهاب محیطی آن است(۲۰). نتایج این مطالعه، با یافته‌های مطالعه فاروق و همکاران همخوانی داشته و نشان می‌دهد که هارمان، نورهارمان و هارمین اثر ضددرد محیطی و مرکزی دارند. و به‌نظر می‌رسد اثر محیطی آنها از طریق اثر ضدالتهابی و اثر ضددرد مرکزی آنها از راه اثر آگونیستی معکوس در سطح گیرنده های $GABA_A$ واسطه‌گری شود زیرا این اثر یا تجویز فلومازنیل آنتاگونیزه شد. در حقیقت، بتاکربولین‌ها آگونیست‌های معکوس جایگاه بنزودیازپینی گیرنده‌های $GABA_A$ هستند و فلومازنیل قادر است عملکرد آنها را آنتاگونیزه کند(۱۴و۲۴). هارمان، نورهارمان و هارمین با تمایل بالا به جایگاه آگونیستی معکوس گیرنده‌های $GABA_A$ متصل می‌شوند و آثار متضادی نسبت به عملکرد بنزودیازپین‌ها ایجاد می‌کنند (۲۵و۲۶). گیرنده $GABA_A$ پنتامری شامل زیرواحدهای همسان است که بر حسب توالی اسیدهای آمینه به ۴ خانواده‌ی α، β، γ و δ تقسیم می‌شوند. درکل، ۱۴ زیر واحد مختلف در این چهار خانواده قابل تفکیک هستند. شش نوع زیر واحد α ($\alpha_{1\text{-}6}$)، سه نوع زیر واحد β ($\beta_{1\text{-}3}$)، سه نوع زیر واحد γ ($\gamma_{1\text{-}3}$) و دو نوع زیر واحد δ ($\delta_{1\text{-}2}$) شناخته شده‌اند. زیر واحدهای α، β و γ جایگاهی به نام جایگاه ω (امگا) می‌سازند که بنزودیازپین‌ها و بتاکربولین‌ها به آن متصل می‌شوند. بر حسب این‌که کدام زیر مجموعه از زیر واحد α در ساختمان جایگاه ω شرکت داشته باشد، سه جایگاه گیرنده‌ای مختلف BZ_1، BZ_2 و آگونیستی معکوس پدید می‌آید. ترکیب ساب‌یونیتی گیرنده‌های BZ_1 به‌صورت $\alpha_1\beta_x\gamma_2$، گیرنده‌های BZ_2 مشتمل بر $\alpha_2\beta_x\gamma_2$ $\alpha_3\beta_x\gamma_2$، $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ و جایگاه آگونیستی معکوس شامل $\alpha_4\beta x\gamma_2$ و $\alpha_6\beta x\gamma_2$ می‌باشد

(۲۴و۲۶). بنزودیازپین‌ها به جایگاه آگونیستی معکوس گیرنده‌های $GABA_A$ متصل نمی‌شوند ولی با اتصال به جایگاه‌های BZ_1، اثر ضداضطرابی- تسکینی و با اتصال به جایگاه‌های BZ_2، اثرات ضدتشنجی- شل‌کنندگی عضلانی بوجود می‌آورند. در مقابل، بتاکربولین‌ها تمایل زیادی برای اتصال به جایگاه‌های آگونیستی معکوس گیرنده‌های $GABA_A$ دارند و می‌توانند با تحریک این جایگاه، حالت‌های اضطرابی و ترس را ایجاد کنند(۳۱-۲۷). یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی برای اثر ضددرد آلکالوئیدهای بتاکربولینی، تاثیر آنها بر حالت عاطفی و ایجاد کم‌دردی (Hypoalgesia) ثانویه به حالت اضطرابی و ترس است (۳۲). حالت عاطفی منفی نظیر ترس، موجب کاهش احساس درد و به‌دنبال آن باعث کاهش و تضعیف فرایند یادگیری پس از آن می‌شود(۲۰و۳۳). برانگیختگی ترس با مکانیسم محدودکننده ورودی ایمپالس‌های درد به مراکز بالاتر عصبی، آستانه درد را افزایش می‌دهد. این اثر، میزان دردناکی یک محرک دردناک را در مدل‌های استاندارد درد کاهش می‌دهد(۳۵-۳۳). بتاکربولین‌ها از توانمندترین مواد اضطراب‌زا هستند و تجویز آنها موجب برانگیختگی احساس اضطراب شدید به همراه ترسی قوی می‌شود(۳۶). این آثار می‌تواند رفتار بلندکردن و لیسیدن پای آسیب دیده ناشی از تزریق داخل جلدی فرمالین را کاهش و زمان تاخیر لیسیدن پا در تست صفحه‌ی داغ و همچنین زمان تأخیر در تست عقب کشیدن دم را افزایش دهد(۲۰،۳۷و۳۸). به‌نظر راجرز و همکاران نیز بی‌دردی حاصل از جریان رفتار نزاع/ فرار، احتمالاً از راه آزادسازی یک لیگاند درون‌زای گیرنده‌های $GABA_A$ با عملکرد آگونیستی معکوس ناشی شود(۳۷). اثر آگونیستی معکوس این لیگاندها بر گیرنده‌های $GABA_A$ می‌تواند مسیرهای اوپیوئیدی CNS را تحریک کرده و بی‌دردی ایجاد کند. علاوه بر این، بتاکربولین‌ها خود نیز با تمایل بالا به گیرنده‌های اوپیوئیدی δ و μ متصل شده و فعالیت آنها را تحریک می‌کنند. این اثر با تزریق داخل صفاقی آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اوپیوئیدی آنتاگونیزه می‌شود (۱۱و۳۸). در مطالعه‌ی فاروق و همکاران، اثر ضددردی بتاکربولین‌های گیاه اسپند در فاز اولیه تست فرمالین وهمچنین در تست صفحه داغ توسط نالوکسان آنتاگونیزه شد(۲۰). در این مطالعه، نالوکسان موجب برگشت بخشی از آثار ضددرد عصاره‌ی گیاه اسپند در فاز نخست تست فرمالین شد اما بر فاز دوم تست اثر معنی‌دار نداشت. این مطالعه، پیشنهادکننده دخالت گیرنده‌های اوپیوئیدی در مکانیسم مرکزی اثرات ضددردی آلکالوئیدهای بتاکربولینی است(۳۹). در عین حال اثر گیرنده‌های اوپیوئیدی در خارج از دستگاه عصبی مرکزی نیز می‌تواند به عنوان بخشی از مکانیسم اعمال ضد دردی آلکالوئیدهای بتاکربولینی در نظر گرفته‌شود(۳۸). این مکانیسم احتمالی از نظر کاربرد بالینی اهمیت بسیار دارد؛ زیرا دست‌یابی به مسکن‌های اوپیوئیدی که قادر باشند با قدرت بالا در محیط عمل‌کرده و تأثیر منفی نداشته باشند، نظیر تحمل یا وابستگی ناشی از نداشتن تاثیر برگیرنده‌های مرکزی، هدف مهمی در پژوهش‌های حوزه درد محسوب می‌شود.

در مجموع از مطالعه ما چنین نتیجه‌گیری می‌توان کرد که اثر مهاری هارمان، نورهارمان و هارمین بر پاسخ درد القاء شده توسط اسید استیک در موش از طریق مکانیسم‌های آگونیستی معکوس در سطح گیرنده های $GABA_A$ اعمال می‌شود.

منابع

1. Rainville P. Brain Mechanisms of Pain Affect And Pain Modulation. Current Opinion In Neurobiology 2002; 12: 195-204.

2. Bahri L. Peganum Harmala L: A Poisonous Plant of North Africa. Vet Hum Toxicol 1991; 33: 276-277.

3. Buckholtz N. Neurobiology of Tetrahydro-ß-Carbolines. Life Sci 1980; 27: 893-903.

4. Wildmann J. Heterocycles as Physiological Ligands For The Benzodiazepine Receptor And For Other Binding Sites. Pharmacol Res 1989; 21: 673-682.

5. Bourke CA, Carigan MJ, Dixon RJ. Upper Motor Neuron Effects in Sheep Of Some Betacarboline Alkaloid Iddentified In Zygophyllaceous Plants. Aust Vet J 1990; 67 248-251.

6. Rommelspacher H, Bruning G, Susilo R, Nick M, Hill R. Pharmacology Of Harmane (1-Methyl-3,4-Dihydrobetacarboline). Eur J Pharmacol 1985; 109: 363-371.

7. Breyer-Pfaff U, Waiter G, Stevens I, Gaertner HJ, Mundle G, Mann K. Elevated Norharman Plasma

Levels In Alcoholic Patients And Controls Resulting From Tobacco Smoking. Life Sci 1996; 58 1425-1432.

8.Tse YHS, Mak IT, Dickens BF. Antioxidative Properties of Harmane And Betacarboline Alkaloids. Biochem Pharmacol 1991; 42: 459-464.

9.Taylor SG, Little HJ, Nutt DJ, Sellars NA. A Benzodiazepine Agonist And Contragonist Have Hypothermic Effects In Rodents. Neuropharmacol 1985; 24: 69 73.

10.Aricioglu-Kartal F, Kayir H, Uzbay IT. Effects of Harman And Harmine On Naloxone-Precipitated Withdrawal Syndrom In Morphine-Dependent Rats. Life Sci 2003; 73: 2363-2371.

11.Airaksinen MM. Binding Of Beta-Carbolines And Tetrahydroisoquinolines Bye Opiate Receptors Of The Delta Type. Pharmacol Toxicol 1984; 55: 380-385.

12.Dhara V, Suba T, Sen T Preliminary Studies On The Antiinflammatory And Analgesic Activity Of Methanolic Fraction Of The Root Extract Of Tragia Invulocrate. J Ethnopharmacol 2000; 72: 265-268.

13.Reibero RA. Involvement Of Resident Macrophages And Mastcells In Writhing Nociception Response Induced By Zymosan And Acetic Acid. Eur J Pharmacol 2000; 387: 307-313.

14. Gary JB. Animal Models Of Pain. In: Kruger L. Methods In Pain Research. New York, CRC Press, 2001: 378-425.

15. Farzin D, Mansouri N. Antidepressant-Like Effect Of Harmane And Other B-Carbolines In The Mouse Forced Swim Test. Eur Neurpsychopharmacol 2006; 16: 324-328.

16.Hoffman EJ, Warren EW. Flumazenil: A Benzodiazepine Antagonist. Clin Pharmcol 1993; 12: 641-656.

17. Farzin D, Attarzedeh M. Influence of Different Histamine Receptor Agonists on Apomorphine-Induced Licking Behavior in Rat. Eur J Pharmacol 2000; 404: 169-174.

18.Fanselow MS, Kim JJ. The Benzodiazepine Inverse Agonist DMCM as an Unconditional Stimulus for Fear-Induced Analgesia: Implication For The Role of GABA-A Receptors In Fear-Related Behavior. Behav. Neurosci 1992; 106: 336-344.

19. Maier SF, Busch CR Maswood RE, Watkins LR. The Dorsal Raphe Nucleus Is A Site Of Action Mediatingthe Behavioral Effectsof The Benzodiazepine Receptor Inverse Agonist DMCM. Behav Neurosci 1995; 109: 759-766.

20. Farouk L. Evaluation Of The Analgesic Effect Of Alkaloid Extract Of Peganum Hamala L.: Possible Mechanisms Involved. J Ethnopharmacol 2008; 115: 445-449.

21. Hunskaar HS, Hole K. The Formalin Test In Mice: Dissociation Between Inflammatory And None-Inflammatory Pain. Pain 1987; 30: 103-114.

22. Tjolsen A. The Formalin Test: An Evaluation Of Method. Pain 1992; 51: 5-17.

23. Shibata M. Modified Formalin Test: Charectristic Biphasic Pain Response. Pain 1989; 38: 346-352.

24.Charney DS, Mihic SJ, Harris RA. Hypnotics And Sedatives.In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (Editors). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed. New York, Mc Graw Hill 2006: 401-427.

25. Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug Intraction At GABA-A Receptors. Prog Neurobiol 2002; 67: 113-159.

26. Smith GB,Olsen WR. Functional Domains of GABA-A Receptors. Trends Pharmacol Sci 1995; 16: 162-168.

27. Hafely WE. Pharmacology of The Allosteric Modulation Of GABA-A Receptors By BZD-Receptor Ligands. In: Barnard EA, Costa E. Allosteric Modulation Of Aminoacid Receptors: Therapeutic Implications. Newyork; Raven Press 1989: 47 69.

28.Mehta AK و Ticku MK. An Update On GABA-A

Receptors. Brain Res Rev 1999; 29: 196-217.

29. Cowen PJ, Green AR, Nutt DJ. Ethyl Beta-Caboline Carboxylate Lowes Seizure Thershold and Antagonizes Flurazepam-Induced Sedation In Rats. Nature 1981; 290: 54-55.

30. Prado De Carvalho L, Greeksch G, Cavalheiro EA. Characterization Of Convultion Induced by Methyl Beta-Carboline-3-Carboxylate in Mice. Eur. J. Pharmacol 1984; 103: 287-293.

31. Venault P, Chapoutheir G, Simiand J. Enhancement Of Performance By Methyl Beta-Carboline-3-Carboxylate, In Learning and Memory Tasks. Brain Res Bull 1987; 19 365-370.

32. Sieve AN. Pain and Negative Affect: Evidence The Inverse Benzodiazepine Agonist DMCM Inhibits Pain and Learning In Rats. Psychopharmacol 2001; 153: 180-190.

33. Fanselow MS, Baackes MP. Conditioning Fear-Induced Opiate Analgesia on The Formalin Test: Evidence for Two Adversive Motivational Systems. Learn. Motiv 1982; 13: 200-221.

34. Chance WT. Autoanalgesia: Behaviorally Activated Antinociception. Eur J Pharmacol 1977; 44: 283-284.

35. Watkins LR, Cobelli DA, Mayer DJ. Classical Conditioning of Front Paw and Hind Paw Footshock Induced Analgesia: Naloxone Reversibility and Descending Pathways. Brain Res 1982; 243: 119-132.

36. Dorrow R, Horowski R, Paschalki G, Amin N, Braestrup C. Severe Anxiety Induced By FG 7142, A Beta-Carboline Ligand For Benzodiazpine Receptors. Lancet 1983; 8341: 98 99.

37. Rodgers RJ, Randall JI. Benzodiazepine Ligands, Nociception And 'Defeat' Analgesia. Psychopharmacol 1987; 91: 305-315.

38. Helmstetter FJ, Calcagnetti DJ, Fanselow MS. The Beta-Carboline DMCM Produces Hypoalgesia Aftercentral Adminstration. Psychobiology 1990; 18: 293-297.

39.Stein C, Shafer M, Machelska H. Why Is Morphine Not The Ultimate Analgesic And What Can Be Done To Improve It?. J Pain 2000; 1: 51-56.

Effects of Harmane, Norharmane and Harmine on Writhing Behavior Induced by Acetic Acid in Mice

*Farzin D.(Ph D)[1]- Mousavi E.(MD)[1]
***Corresponding Address:** Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, IRAN
E-mail: davoodfarzin@yahoo.com

Received: 31 May/2010 Accepted: 9/oct/2010

Abstract

Introduction: The β-carbolines harmane, harmine and norharmane are the members of Harmala's alkaloids group (Peganum harmala, Zygophillaceae). The β-carboline alkaloids adjoined to benzodiazepine site of the γ-aminobutyric acid type A ($GABA_A$). These alkaloids also inhibited cyclooxygenase and lipoxygenase activities. These findings showed that the β-carbolines should be able to reduce writhing nociceptio induced by acetic acid- in mice.

Objective: To assess the effects of acute treatment with harmane, norharmane and harmine on the writhing induced by acetic acid in mice.

Materials and Methods: The experiments were carried out on male BALB/C mice (20-25g). Intraperitoneal (I.p) injection of acetic acid (0.6%) was performed in order to cause writhing behavior. This behavior was recorded by direct observation for a 30-minutes period. Decrease of writhing count is indicative of an anti-no iception. In order to avoid the possibility of a physicochemical interaction between them, Drugs were administered on opposite sides of peritoned.

Results: Intraperitoneal (I.p) injection of Harmane (5-20mg/kg) on 6-9 mice, norharmane (5-15mg/kg) on 8-9 mice and harmine (10-15mg/kg) on 8-9 mice in per group decreased the writhing behavior significantly ($P<0.0001$, $P<0.0003$ and $P<0.0016$, respectively). The inhibitory effects of the mentioned drugs were antagonized by flumazenil (2 mg/kg)

Conclusion: Effects of harmane, norharmane and harmine on writhing response may be mediated through an inverse agonistic mechanism located in the benzodiazepine receptors.

Key words: Pain/ Carbolins/ Harmine/ Mouse

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 76, Pages: 29-37

1. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, IRAN