ORIGINAL ARTICLE

Effects of Harmane, Norharman and Harmine on the Hot–Plate and Formalin-Induced Nociceptions in Mice

Davood Farzin[1],
Pouneh Kalantari[2],
Hamed Zaer[2]

[1] Psychiatry & Behavioral Sciences Research Center, Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Pharmacology Student, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 2, 2011 ; Accepted February 8, 2012)

Abstract

Background and purpose: Harmane, norharmane and harmine are β-carboline members of the family of Harmala's alkaloids (*Peganum harmala,* Zygophillaceae). The β-carboline alkaloids bind to benzodiazepine site of the γ-aminobutyric acid type A ($GABA_A$) receptors as inverse agonists. This finding suggests that the harmane, norharmane and harmine might attenuate the hot-plate and formalin-induced nociceptions in mice. This study assessed the antinociceptive effects of harmane, norharmane and harmine in the mice used in hot-plate and formalin tests.

Materials and methods: The experiment was carried out on male BALB/C mice (20-25 g). In the hot-plate test, antinociceptive effects of drugs were assessed using a hot plate apparatus (Harvard, UK). The hot-plate temperature was thermostatically set at 52.5 ±5 °C. The latency to licking or kicking of the fore or hind paws was recorded at various times after drug injection. To avoid tissue damage a cut-off time of 45 seconds was imposed. In the formalin test, total time spent licking injected paw was recorded in 5 min intervals from 0-5 min (as early phase) and 15-50 min (as late phase) after injection of formalin. A decrease in the duration of the time spent licking indicated an antinociceptive response.

Results: In the hot-plate test i.p. injection of harmane (5-20 mg/kg, seven mice per group), norharmane (5-15 mg/kg, seven mice per group) and harmine (10 and 15 mg/kg, seven mice per group), led to a significant antinociceptive effect. The antinociceptive effects of harmane, norharmane and harmine were antagonized by flumazenil (2 mg/kg, i.p.) and naloxone (5mg/kg, i.p.). In the formalin test, i.p. injection of the doses of 2.5-5-10 mg/kg, harmane, norharmane and harmine resulted in a significant antinociceptive effect. The antinociceptive effects of harmane, norharmane and harmine were antagonized by flumazenil (5 mg/kg, i.p.).

Conclusion: The results suggest that the antinociceptive effects of harmane, norharmane and harmine may be mediated through an inverse agonistic mechanism located in the benzodiazepine receptors.

Key words: Hot plate test, formalin test, pain, harmane, norharmane, harmine, mouse

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(87): 87-95 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۸۷ فروردین سال ۱۳۹۱ (۹۵-۸۷)

اثر هارمان، نورهارمان و هارمین بر درد القاء شده با صفحه داغ و فرمالین در موش

داوود فرزین[۱]
پونه کلانتری[۲]
حامد زایر[۲]

چکیده

سابقه و هدف: هارمان، نورهارمان و هارمین اعضاء بتاکربولینی خانواده گیاه اسپند (پگانوم هارمالا، زیگوفیلاسه) می‌باشند. آلکالوئیدهای بتاکربولینی به عنوان آگونیست‌های معکوس به جایگاه بنزودیازپینی گیرنده‌های گاما آمینوبوتیریک اسید نوع A ($GABA_A$) متصل می‌شوند. این یافته، پیشنهاد می‌کند که هارمان، نورهارمان و هارمین می‌توانند درد ناشی از صفحه داغ و فرمالین را در موش‌ها کاهش دهند. در این مطالعه، اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش‌ها با استفاده از تست صفحه داغ و فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: همهٔ آزمایشات بر روی موش‌های نر از نژاد Balb/C (۲۰ الی ۲۵ گرم) انجام گرفت. اثر ضددردی داروها در تست صفحه داغ با استفاده از دستگاه صفحه داغ (هاروارد-انگلستان) مورد ارزیابی قرار گرفت. درجه حرارت صفحه داغ با ترموستات در دمای ۰/۵ ± ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. زمان عکس‌العمل لیسیدن یا لگد زدن پاهای جلو یا عقب حیوان در زمان‌های مختلف پس از تزریق داروها ثبت گردید. برای جلوگیری از آسیب بافتی یک زمان چهل و پنج ثانیه‌ای برای قطع آزمایش در نظر گرفته می‌شد. در تست فرمالین، کل زمان سپری شده برای لیسیدن پا در زمان های ۰ و ۵ دقیقه (به‌عنوان فاز اولیه) و هر ۵ دقیقه بین دقایق ۱۵ تا ۵۰ (به‌عنوان فاز تأخیری) پس از تزریق فرمالین ثبت گردید. کاهش مدت زمان لیسیدن پا نشان دهنده پاسخ ضد دردی بود.

یافته‌ها: در تست صفحه داغ، تزریق داخل صفاقی هارمان (۵ الی ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه)، نورهارمان (۵ الی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه) و هارمین (۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه) به‌طور معنی‌دار اثر ضد دردی اعمال نمود. اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین توسط فلومازنیل (۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم، داخل صفاقی) و نالوکسون (۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم، داخل صفاقی) آنتاگونیزه شد. در تست فرمالین، تزریق داخل صفاقی دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰میلی‌گرم/ کیلوگرم هارمان، نورهارمان و هارمین به‌طور معنی‌دار اثر ضددردی ایجاد کرد. اثر ضددردی هارمان، نورهارمان و هارمین توسط فلومازنیل (۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم، داخل صفاقی) آنتاگونیزه شد.

استنتاج: اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین ممکن است به صورت واسطه از طریق مکانیسم آگونیستی معکوس در سطح گیرنده‌های بنزودیازپینی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: تست صفحه داغ، تست فرمالین، درد، هارمان، نورهارمان، هارمین، موش

مقدمه

درد، به‌عنوان نوعی احساس ناخوشایند و تجربه حسی خاص تعریف می‌شود که غالباً در اثر تحریک مستقیم محرکی دردناک و یا در اثر وارد آمدن نوعی آسیب به بدن ایجاد می‌گردد. انسان‌ها به‌طور روزمره در

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱- ۸۶ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: داود فرزین- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: davoodfarzin@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات روان پزشکی و علوم رفتاری، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. دانشجوی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۰/۹/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۱۱/۱۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

اثر آسیب‌های وارد آمده و یا شرایط جسمی خاص خود، این احساس را تجربه می‌کنند و گاهی نیز، در اثر بیماری‌ها یا آسیب‌های جدی، دچار درد می‌شوند(۱). ناخوشایند بودن و ناراحتی ایجاد شده از درد، لزوم درمان ضد دردی را ایجاب می‌کند. در میان داروهای ضد درد، مخدرها از جمله قوی‌ترین و قدیمی‌ترین داروهای مورد استفاده می‌باشند. مخدرهای سنتی، به‌طور عمده با تحریک گیرنده‌های خود در سیستم عصبی مرکزی اثرات ضد دردی خود را اعمال می‌کنند. این داروها، به موازات اثرات مطلوب خود، اثرات جانبی ناخواسته و ناخوشایندی نیز به همراه دارند که تحمل و وابستگی از شایع‌ترین و مهم‌ترین آن‌ها هستند. امروزه، پژوهش برای یافتن داروهای ضد درد جدید که هم دارای قدرت ضد دردی قابل توجه بوده و هم از کمترین اثرات ناخواسته برخوردار باشند، از مهم‌ترین فعالیت‌ها در حوزه پزشکی و علوم مرتبط می‌باشد. گیاه اسپند (Peganum Harmala) عضوی از خانوادهٔ زیگوفیلاسه است. این گیاه در بسیاری از کشورهای شمال آفریقا و خاورمیانه به‌طور گسترده می روید. ترکیبات این گیاه عبارتند از چند آلکالوئید که بیشتر در دانه ها و ریشه‌ها یافت می‌شوند. پنج مشتق آلکالوئیدی با ساختمان ایندول در گیاه وجود دارند که به بتاکربولین‌ها معروف هستند. این آلکالوئیدها شامل هارمان، نورهارمان، هارمین، هارمالین و هارمالول می‌باشند(۵-۲). هارمان و نورهارمان، به‌طور درون زا در سیستم عصبی مرکزی، کبد، پلاکت، پلاسما و ادرار پستانداران وجود دارند(۸-۶). متابولیت‌های بعضی از اوپیوئیدها می‌توانند با تریپتامین و سروتونین متراکم شوند و هارمان و نورهارمان تولید کنند(۹). هارمان و هارمین اثر مهاری بر سندرم محرومیت القاء شده توسط نالوکسان در موش‌های وابسته به مرفین دارند و می‌توانند گیرنده‌های اوپیوئیدی را تحریک کنند(۱۱،۱۰).

تست صفحه داغ یکی از رایج‌ترین تست‌های کاربردی جهت بررسی حس درد و بی‌دردی در جوندگان و به خصوص موش ها می‌باشد. در این تست، پاسخ‌های حس درد موش‌ها بر روی یک صفحه داغ با دمای متغیر ۵۲ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری می‌شود. معمولاً تأخیر پاسخ‌های رفتاری از قبیل پرش، لگد زدن، تکان دادن پا و لیسیدن کف پا به عنوان یک معیار اندازه‌گیری حساسیت به درد در موش ها به کار برده شده است. در سال‌های اخیر، محققان هر یک از رفتارهای لیسیدن کف پا یا لگد زدن را به عنوان نقطه نهایی ارزیابی بی‌دردی به کار برده‌اند. این پاسخ‌ها تقریباً در همه حیوانات اتفاق می‌افتد. در دمای ۵۲ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد صفحه داغ، بی دردی حاصل از اوپیوئیدها و دیگر آنالژزیک‌های فارماکولوژیک غیر اوپیوئیدی به آسانی در تست صفحه داغ قابل تشخیص می‌باشد. بدین‌ترتیب که، از زمان قرارگیری حیوان برروی صفحه داغ، زمان نهفتگی (Latency) واکنش لیسیدن پا یا لگدزدن به روش مشاهده‌ای توسط تایمر دستگاه ثبت و از آن به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی درد یا بی‌دردی استفاده می‌شود. بنا به تعریف، افزایش Latency بیانگر اثر ضد دردی خواهد بود(۱۲).

این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش با استفاده از تست‌های صفحه داغ و فرمالین طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه Experimental از موش‌های سفید نر Balb/C به وزن ۲۰ الی ۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های پلاستیکی در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی با میزان روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. غذا و آب به‌طور مداوم به جز در هنگام آزمایشات در اختیار حیوان قرار می‌گرفت و از هر حیوان یک بار استفاده می‌شد. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

(هر دوز دارو یا کنترل)، ۶ یا ۷ سر موش بود.

در مطالعه حاضر، اثر ضددردی داروها با استفاده از دستگاه صفحه داغ هاروارد- انگلستان بررسی می‌شد. درجه حرارت صفحه داغ توسط ترموستات دستگاه در درجه حرارت ۰/۵ ± ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود. موش‌ها به‌صورت انفرادی بر روی صفحه داغ قرار داده می‌شدند و Latency لیسیدن یا لگد زدن پا در زمان های مختلف، قبل و پس از تزریق داروها ثبت می‌شد. برای جلوگیری از آسیب بافتی یک زمان چهل و پنج ثانیه‌ای برای قطع آزمایش حیوان در نظر گرفته می‌شد(۱۲).

اثر ضددردی داروها در تست فرمالین با استفاده از روش توصیف شده Hunskaar (۱۹۸۷) بررسی شد(۱۳). موش‌ها به‌صورت انفرادی به‌مدت نیم ساعت در سیلندرهای شیشه‌ای (ارتفاع ۲۵ و قطر ۲۰ سانتی‌متر) قرار داده می شدند تا به محیط عادت نمایند. سپس، فرمالین (۲۰ میکرولیتر فرمالدئید ۵ درصد) به کف پای راست و عقبی موش‌ها تزریق می‌گردید تا موش‌ها شروع به لیسیدن پا کنند. مدت زمان لیسیدن پا توسط هر موش در فواصل ۵ دقیقه‌ای به‌مدت ۵۰ دقیقه توسط یک کرونومتر ثبت می‌گردید. پیک فاز اولیه پاسخ دردناک، به‌طور طبیعی ۵ دقیقه و فاز تأخیری پاسخ دردناک ۱۵تا۵۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین ظاهر گردید. این دو فاز به ترتیب، بیان‌گر پاسخ درد تونیک و التهابی می‌باشد.

دراین تحقیق داروهای زیر مورداستفاده قرارگرفت: هارمان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، هارمین هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، نورهارمان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، فلومازنیل (سیگما، آمریکا). تمام داروها به‌جز فلومازنیل در سالین حل شدند. فلومازنیل ابتدا در یک قطره استیک اسید حل و سپس با سالین رقیق گردید. کنترل حامل در این مورد اسید استیک در سالین بود. داروها حل شده در سالین در حجم ۱۰ میلی‌لیتر/ کیلوگرم از راه داخل صفاقی تزریق می‌شدند. دوز و زمان تجویز داروها بر اساس مطالعات قبلی تنظیم شده بود(۱۶- ۱۴).

نتایج حاصل از آزمایشات با استفاده ازآنالیز مکرر واریانس (Repeated measures ANOVA) و متعاقب آن تست Newman-Keuls مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تفاوت با $p<0/05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار تلقی می‌شد. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GRAPHPAD PRISM 5 مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته ها

اثر هارمان بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ

هارمان با دوز ۵ الی ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency لیسیدن یا لگد زدن پای حیوان در صفحه داغ در حضور دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم هارمان افزایش یافت. حاکثر اثر ضددردی هارمان در دقیقه ۱۰ به‌دست آمد [$n=7$ mice/group، $p<0/0001$ ، $F(19،6) = 10/47$] (نمودار شماره ۱).

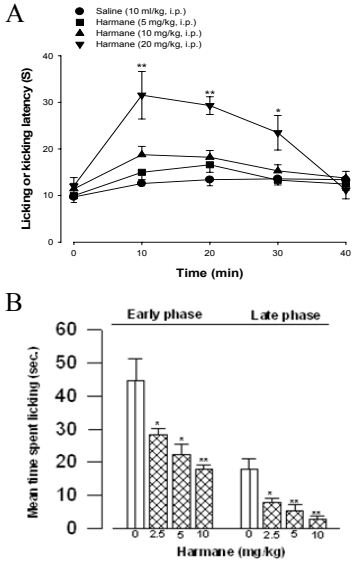
اثرهارمین بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ

تزریق داخل صفاقی دوزهای ۵ الی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم هارمین به‌طور وابسته به دوز Latency لیسیدن یا لگد زدن پای حیوان در صفحه داغ را افزایش داد [$n=7$ mice/group، $p<0/0001$ ، $F(19،6) = 32/04$] (نمودار شماره ۲).

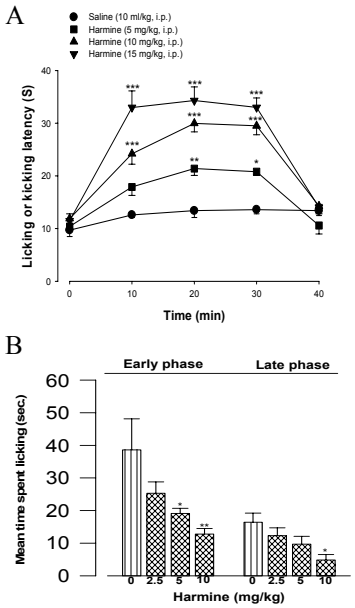
اثر نور هارمان بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ

تزریق داخل صفاقی دوزهای ۵ الی ۱۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم نورهارمان به‌طور وابسته به دوز Latency لیسیدن یا لگد زدن پای حیوان در صفحه داغ را افزایش داد [$n=7$ mice/group، $p<0/0001$ ، $F(19،6) = 53/55$] (نمودار شماره ۳).

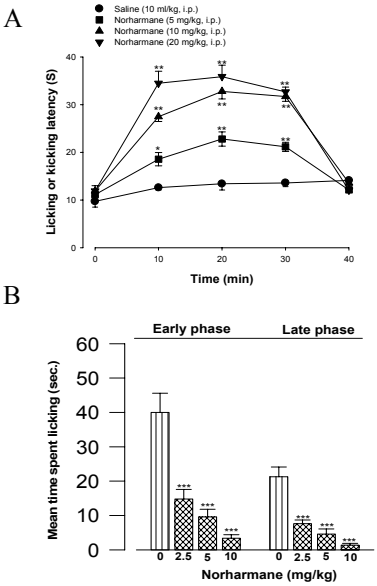
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]



نمودار شماره ۱: اثر هارمان بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ (A) و درد ناشی از تزریق فرمالین به کف پای موش(B). هارمان با دوز ۲/۵ تا ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency لیسیدن یا لگد زدن پا در روی صفحه داغ و مدت زمان لیسیدن پا در تست فرمالین در یک فاصله زمانی ۴۰ تا ۵۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. نتایج به صورت میانگین± خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.
*p<۰/۰۱ و **p<۰/۰۰۱ تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۲: اثر هارمین بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ (A) و درد ناشی از تزریق فرمالین به کف پای موش(B). هارمین با دوز ۲/۵ تا ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency لیسیدن یا لگد زدن پا در روی صفحه داغ و مدت زمان لیسیدن پا در تست فرمالین در یک فاصله زمانی ۴۰ تا ۵۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.
*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱ و ***p<۰/۰۰۱ تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.

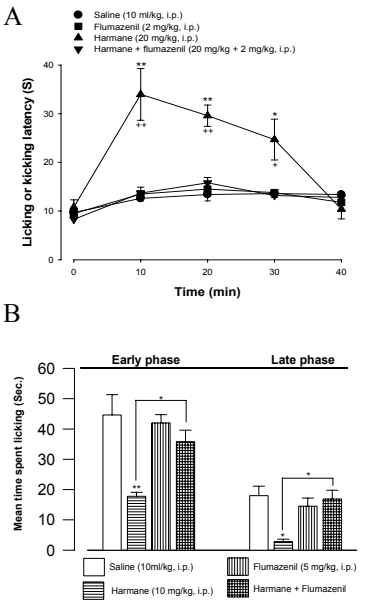


نمودار شماره ۳: اثر نورهارمان بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ (A) و درد ناشی از تزریق فرمالین به کف پای موش(B). نورهارمان با دوز ۲/۵ تا ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency لیسیدن یا لگدزدن پا در روی صفحه داغ و مدت زمان لیسیدن پا در تست فرمالین در یک فاصله زمانی ۴۰ تا ۵۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.
*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱ و ***p<۰/۰۰۱ تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.

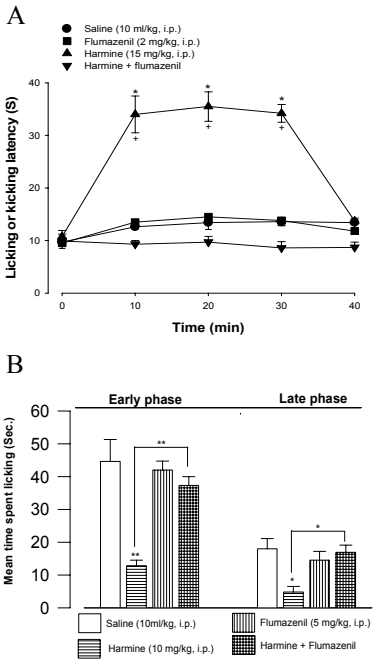
اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین

فلومازنیل (۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) به‌طور معنی‌داری اثر ضددردی هارمان (۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) [$F(۵،۱۹) = ۱۳/۰۹$ ، $p<۰/۰۰۰۱$ ،n= 6 mice/group] (نمودار شماره ۴)، نورهارمان (۱۵ میلی گرم/ کیلوگرم) [$F(۶،۱۹) = ۴۱$ ، $p<۰/۰۰۰۱$ ، n= 6 mice/group] (نمودار شماره ۵) و هارمین (۱۵ میلی گرم/ کیلوگرم) [$F(۵،۱۹) = ۳۵/۹۳$ ، $p<۰/۰۰۰۱$ ،n= ۶ mice/group] (نمودار شماره ۶) را آنتاگونیزه نمود.

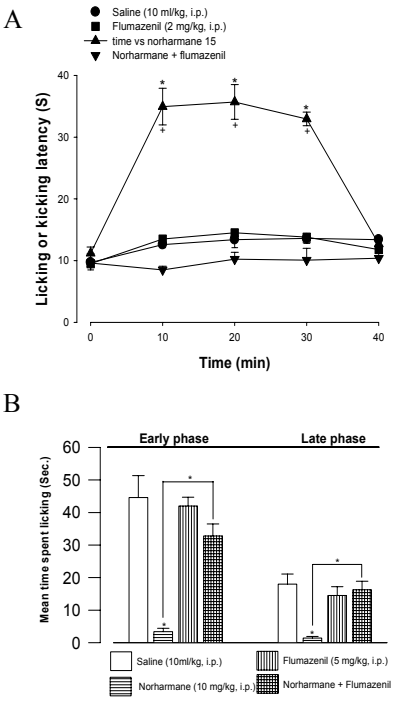
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]



نمودار شماره ۴: اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی هارمان در تست صفحه داغ (A) و تست فرمالین (B). فلومازنیل با دوز ۲ و ۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم، هارمان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.
p<۰/۰۱* و p<۰/۰۰۱** تفاوت از گروه کنترل سالین و p<۰/۰۱+ و p<۰/۰۰۱++ تفاوت از گروه هارمان+ فلومازنیل را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۵: اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی هارمین در تست صفحه داغ (A) و تست فرمالین(B). فلومازنیل با دوز ۲ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، هارمین با دوز ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.
p<۰/۰۱* و p<۰/۰۰۱** تفاوت از گروه کنترل سالین و p<۰/۰۰۱+ تفاوت از گروه هارمین+ فلومازنیل را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۶: اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی نورهارمان در تست صفحه داغ (A) و تست فرمالین (B). فلومازنیل با دوز ۲ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، نورهارمان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وسالین با حجم ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.
p<۰/۰۰۰۱* تفاوت از گروه کنترل سالین و p<۰/۰۰۰۱+ تفاوت از گروه نورهارمان+ فلومازنیل را نشان می‌دهد.

بحث

در این تحقیق اثرضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش‌ها با استفاده از تست صفحه داغ و فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

تحقیق نشان داد که هارمان، نورهارمان و هارمین به‌طور معنی‌داری Latency لگد زدن یا لیسیدن پای موش در تست صفحه داغ را افزایش و مدت زمان لیسیدن پای موش در فاز اولیه و فاز تأخیری تست فرمالین را کاهش دادند. که بیان‌گر اثر ضد دردی آن‌ها می‌باشد.

از طرفی دیگر مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در تست صفحه داغ و فرمالین به‌طور معنی‌داری توسط فلومازنیل آنتاگونیزه گردید.

نتایج فوق، پیشنهادکننده یک مکانیسم آگونیستی معکوس در سطح گیرنده‌های بنزودیازپینی است. تجویز سیستمیک بتاکربولین‌ها، الگوهای رفتاری مربوط به فعالیت گیرنده‌های گاباارژیک در قسمت‌های مختلف مغز، به ویژه آمیگدال و رافه پشتی را تغییر می‌دهد(۱۸،۱۷). این اثر در تست‌های مختلف ارزیابی عملکرد ضد دردی داروها مورد تأیید قرار گرفته است. در مطالعه Farouk، بتاکربولین‌های گیاه اسپند به‌طور وابسته به دوز در هر دو فاز اولیه و تأخیری تست فرمالین اثر ضد دردی ایجاد کردند. درد فاز اولیه تست فرمالین، نتیجه تحریک مستقیم اعصاب گیرنده‌های درد است در حالی‌که فاز تأخیری آن، نتیجه آسیب حاد بافتی و فرایند التهابی حاصل از آن می‌باشد(۱۹). الگوی دو مرحله‌ای تست فرمالین که بازتاب دو فرایند آسیب شناختی متفاوتی هستند، این امکان را فراهم می‌کند تا مکانیسم‌های مؤثر احتمالی در بی‌دردی روشن گردند(۲۰). داروهایی که اثرات ضد دردی آن‌ها مکانیسمی مرکزی دارد، تقریباً به یک میزان هر دو فاز تست فرمالین را تحت تأثیر قرار می‌دهند(۲۱). در صورتی‌که داروهای ضد درد که به صورت محیطی عمل می‌کنند، فاز تأخیری تست فرمالین را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهند. این اثر در برگیرنده مهار درد حاصل از تولید و آزادسازی پروستاگلاندین‌ها طی فرآیند التهابی می‌باشد(۲۲). اثرات بتاکربولین‌های گیاه اسپند در هر دو فاز تست فرمالین تأییدکننده اثرات مرکزی آن‌ها می‌باشد این اثر در تست صفحه داغ نیز تأیید شده است به‌طوری‌که در مطالعه Farouk، بتاکربولین‌های گیاه اسپند Latency لیسیدن پای موش را افزایش دادند(۱۹). نتایج مطالعه حاضر، به نوعی با مطالعه Farouk هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد هارمان، نورهارمان و هارمین واجد اثرات ضددردی مرکزی هستند. در این راستا، بنظر می‌رسد اثر ضددردی هارمان، نورهارمان و هارمین به طور واسطه از طریق اثر آگونیستی معکوس در سطح گیرنده‌های بنزودیازپینی انجام شود، زیرا این اثر توسط فلومازنیل آنتاگونیزه شد. هارمان، نورهارمان و هارمین آگونیست‌های معکوس جایگاه بنزودیازپینی گیرنده‌های $GABA_A$ هستند(۲۵-۲۳). گیرنده$GABA_A$، پنتامری مشتمل بر زیر واحدهای همسان است که بر حسب توالی اسیدهای آمینه به ۴ خانواده‌ی α، β، γ و δ تقسیم می‌شوند. در کل، ۱۴ زیر واحد مختلف در این چهار خانواده قابل تفکیک هستند. شش نوع زیر واحد α (α_{1-6})، سه نوع زیر واحد β (β_{1-3})، سه نوع زیر واحد γ (γ_{1-3}) و دو نوع زیر واحد δ (δ_{1-2}) شناخته شده‌اند. زیر واحدهای α، β و γ جایگاهی به نام جایگاه ω می‌سازنند که بنزودیازپین‌ها و بتاکربولین‌ها به آن متصل می‌شوند. بر اساس نوع زیر واحد α شرکت‌کننده در ساختمان جایگاه ω، سه جایگاه گیرنده‌ای BZ_1، BZ_2 و آگونیستی معکوس پدید می‌آید. ترکیب زیر واحدی گیرنده‌های BZ_1 به‌صورت $\alpha_1\beta_x\gamma_2$، گیرنده‌های BZ_2 مشتمل بر $\alpha_2\beta_x\gamma_2$، $\alpha_3\beta_x\gamma_2$ و $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ جایگاه آگونیستی معکوس شامل $\alpha_4\beta x\gamma_2$ و $\alpha_6\beta x\gamma_2$ می‌باشد(۲۵،۲۳). بنزودیازپین‌ها به جایگاه آگونیستی معکوس گیرنده‌های $GABA_A$ متصل نمی‌شوند ولی با اتصال به جایگاه‌های BZ_1، اثرات ضد اضطرابی و آرام‌بخشی و با اتصال به جایگاه‌های BZ_2، اثرات ضدتشنجی و شل‌کنندگی عضلانی را ایجاد می‌کنند. بر خلاف بنزودیازپین‌ها، بتاکربولین‌ها تمایل زیادی جهت اتصال به جایگاه‌های آگونیستی معکوس گیرنده‌های $GABA_A$ دارند و می‌توانند با تحریک این جایگاه، حالت‌های اضطرابی و ترس را ایجاد نمایند(۳۰-۲۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

از دیگر مکانیسم‌های پیشنهادی برای اثر ضددردی آلکالوئیدهای بتاکربولینی، ایجاد کم‌دردی[1] در حالات عاطفی، ثانویه به ایجاد اضطراب و ترس است(۳۱). حالات عاطفی منفی نظیر ترس، موجب کاهش احساس درد و به‌دنبال آن، موجب کاهش و تضعیف فرایند یادگیری متعاقب می‌شود(۲۳،۱۹). بر انگیختگی ترس از طریق محدودکردن ورودی ایمپالس‌های درد به مراکز بالاتر عصبی، آستانه درد را افزایش می‌دهد. این اثر، میزان دردناکی یک محرک دردناک در مدل‌های استاندارد درد را کاهش می‌دهد(۳۴،۳۳). در این راستا، بتاکربولین ها از توانمندترین مواد اضطراب زا هستند و تجویز آن‌ها موجب برانگیختگی احساس اضطراب شدید به همراه ترسی قوی می‌شود(۳۵). این اثر می‌تواند رفتار بلندکردن و لیسیدن پای آسیب دیده ناشی از تزریق داخل جلدی فرمالین را کاهش و زمان تأخیر لیسیدن پا در تست صفحه داغ و همچنین زمان تأخیر در تست عقب کشیدن دم را افزایش دهد(۱۹،۳۶،۳۷). مطالعات نشان داده است که بی دردی حاصل از رفتار نزاع یا فرار، احتمالاً از طریق آزادسازی یک لیگاند بتاکربولینی درون‌زا توسط گیرنده‌های $GABA_A$ با عملکرد آگونیستی معکوس ناشی می شود(۳۶). اثر آگونیستی معکوس این لیگاندهای بتاکربولینی برگیرنده‌های $GABA_A$ می‌تواند مسیرهای اوپیوئیدی CNS را تحریک و بی‌دردی ایجاد کند. علاوه بر این، بتاکربولین‌ها خود نیز با تمایل بالایی برای اتصال به گیرنده‌های اوپیوئیدی μ دادند و فعالیت آن‌ها را تحریک می‌کنند. این اثر با تزریق داخل صفاقی آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اوپیوئیدی نظیر نالوکسان آنتاگونیزه می‌گردد(۳۷،۱۱). در مطالعه Farouk نشان داده شده است که اثر ضد دردی بتاکربولین‌های گیاه اسپند توسط نالوکسان فقط در فاز اولیه تست فرمالین آنتاگونیزه می‌شود(۱۹). این مطالعه پیشنهاد کننده دخالت گیرنده‌های اوپیوئیدی در مکانیسم ضد دردی مرکزی آلکالوئیدهای بتاکربولینی است. این مکانیسم از نقطه نظر کاربرد بالینی حائز اهمیت بسیار است، زیرا دست یافتن به مسکن‌های اوپیوئیدی که فاقد اثرات منفی نظیر تحمل یا وابستگی باشند، هدف مهمی برای پژوهش‌های حوزه درد می‌باشد(۳۸).

در مجموع از مطالعه حاضر چنین نتیجه‌گیری می‌شود که اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش تست صفحه داغ و تست فرمالین به صورت واسطه از طریق مکانیسم‌های آگونیستی معکوس در سطح گیرنده‌های $GABA_A$ انجام می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران برای تصویب طرح تحقیقاتی این مقاله و اختصاص بودجه کمال تقدیر و تشکر را ابراز می‌داریم. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی پزشک عمومی خانم دکتر پونه کلانتری می باشد.

References

1. Rainville P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. Curr Opin Neurobiol 2002; 12(2): 195-204.
2. Bahri L. Peganum harmala L: a poisonous plant of north africa. Vet Hum Toxicol 1991; 33(3): 276-277.
3. Buckholtz N. Neurobiology of tetrahydro-ß-carbolines. Life Sci 1980; 27(11): 893-903.
4. Wildmann J. Heterocycles as physiological ligands for the benzodiazepine receptor and for other binding sites. Pharmacol Res 1989; 21(6): 673-682.

1- Hypoalgesia

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

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(7): 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(3): 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(17): 1425-1432.
8. Tse YHS, Mak IT, Dickens BF. Antioxidative properties of harmane and betacarboline alkaloids. Biochem Pharmacol 1991; 42(3): 459-464.
9. Taylor SG, Little HJ, Nutt DJ, Sellars NA. A benzodiazepine agonist and contragonist have hypothermic effects in rodents. Neuropharmacology 1985; 24(1): 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(18): 2363-2371.
11. Airaksinen MM. Binding of Beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines bye Opiate Receptors of the Delta Type. Pharmacol Toxicol 1984; 55(5): 380-385.
12. Gary JB. Animal Models of Pain. In: Kruger L. Methods in Pain Research. New York: CRC Press; 2001. p. 378-425.
13. Hunskaar HS, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and none-inflammatory Pain. Pain 1987; 30(1): 103-114.
14. Farzin D, Mansouri N. Antidepressant-like effect of harmane and other β-carbolines in the mouse forced swim test. Eur Neurpsychopharmacol 2006; 16(5): 324-328.
15. Farzin D, Attarzedeh M. Influence of different histamine receptor agonists on apomorphine-induced licking behavior in rat. Eur J Pharmacol 2000; 404(1-2): 169-174.
16. Hoffman EJ, Warren EW. Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. Clin Pharmcol 1993; 12(9): 641-656.
17. 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(2): 336-344.
18. 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(4): 759-766.
19. Farouk L. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of Peganum hamala L. : possible mechanisms involved. J Ethnopharmacol 2008; 115(3): 445-449.
20. Hunskaar HS, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and none-inflammatory Pain. Pain 1987; 30(1): 103-114.
21. Tjolsen A. The formalin test: An evaluation of method. Pain 1992; 51(1): 5-17.
22. Shibata M. Modified formalin test: charectristic biphasic pain response. Pain 1989; 38(3): 346-352.
23. Charney DS, Mihic SJ, Harris RA. Hypnotics and Sedatives. In: Brunton LL, Lazo JS,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

Parker KL. Editors. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: Mc Graw Hill; 2006. p 401-427.

24. Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug intraction at GABA-A receptors. Prog Neurobiol 2002; 67(2): 113-159.
25. Smith GB, Olsen WR. Functional domains of GABA-A receptors. Trends Pharmacol Sci 1995; 16(5): 162-168.
26. 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. p 47-69.
27. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABA-A receptors. Brain Res Rev 1999; 29(2-3): 196-217.
28. Cowen PJ, Green AR, Nutt DJ. Ethyl beta-caboline carboxylate lowes seizure thershold and antagonizes flurazepam-induced sedation in rats. Nature 1981; 290(5801): 54-55.
29. 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(3-4): 287-293.
30. 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(3): 365-370.
31. Sieve AN. Pain and negative affect: Evidence the inverse benzodiazepine agonist DMCM inhibits pain and learning in rats. Psychopharmacol 2001; 153(2): 180-190.
32. 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.
33. Chance WT. Autoanalgesia: behaviorally activated antinociception. Eur J Pharmacol 1977; 44(3): 283-284.
34. 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(1): 119-132.
35. 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; 2(8341): 98-99.
36. Rodgers RJ, Randall JI. Benzodiazepine ligands, nociception and 'Defeat' analgesia. Psychopharmacol 1987; 91(3): 305-315.
37. Helmstetter FJ, Calcagnetti DJ, Fanselow MS. The beta-carboline DMCM produces hypoalgesia aftercentral adminstration. Psychobiology 1990; 18: 293-297.
38. 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(Suppl 3): 51-56.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]