

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

Davood Farzin<sup>1</sup>,  
Pouneh Kalantari<sup>2</sup>,  
Hamed Zaer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Psychiatry & Behavioral Sciences Research Center, Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> 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  $\beta$ -carboline members of the family of Harmala's alkaloids (*Peganum harmala*, Zygophillaceae). The  $\beta$ -carboline alkaloids bind to benzodiazepine site of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) 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  $52.5 \pm 5$  °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

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

داوود فرزین<sup>۱</sup>پونه کلانتری<sup>۲</sup>حامد زایر<sup>۲</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** هارمان، نورهارمان و هارمین اعضای بتاکربولینی خانواده گیاه اسپند (پگانوم هارمالا، زیگوفیلاسه) می باشند. آلکالوئیدهای بتاکربولینی به عنوان آگونیست های معکوس به جایگاه بنزودیازپینی گیرنده های گاما آمینوبوتیریک اسید نوع A ( $GABA_A$ ) متصل می شوند. این یافته، پیشنهاد می کند که هارمان، نورهارمان و هارمین می توانند درد ناشی از صفحه داغ و فرمالین را در موش ها کاهش دهند. در این مطالعه، اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش ها با استفاده از تست صفحه داغ و فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** همه آزمایشات بر روی موش های نر از نژاد Balb/C (۲۰ الی ۲۵ گرم) انجام گرفت. اثر ضد دردی 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  $52/5 \pm 0/5$  درجه سانتی گراد تنظیم گردید. زمان عکس العمل لیسیدن یا لگد زدن پاهای جلو یا عقب حیوان در زمان های مختلف پس از تزریق داروها ثبت گردید. برای جلوگیری از آسیب بافتی یک زمان چهل و پنج ثانیه ای برای قطع آزمایش در نظر گرفته می شد. در تست فرمالین، کل زمان سپری شده برای لیسیدن پا در زمان های ۰ و ۵ دقیقه (به عنوان فاز اولیه) و هر ۵ دقیقه بین ۱۵ تا ۵۰ (به عنوان فاز تأخیری) پس از تزریق فرمالین ثبت گردید. کاهش مدت زمان لیسیدن پا نشان دهنده پاسخ ضد دردی بود.

**یافته ها:** در تست صفحه داغ، تزریق داخل صفاقی هارمان (۵ الی ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه)، نورهارمان (۵ الی ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه) و هارمین (۱۰ و ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم برای ۷ موش در هر گروه) به طور معنی دار اثر ضد دردی اعمال نمود. اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین توسط فلومازنیل (۲ میلی گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) و نالوکسون (۵ میلی گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) آنتاگونیزه شد. در تست فرمالین، تزریق داخل صفاقی دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم هارمان، نورهارمان و هارمین به طور معنی دار اثر ضد دردی ایجاد کرد. اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین توسط فلومازنیل (۵ میلی گرم/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 گیرنده های بنزودیازپینی انجام شود.

**واژه های کلیدی:** تست صفحه داغ، تست فرمالین، درد، هارمان، نورهارمان، هارمین، موش

### مقدمه

درد، به عنوان نوعی احساس ناخوشایند و تجربه حسی خاص تعریف می شود که غالباً در اثر تحریک مستقیم محرکی دردناک و یا در اثر وارد آمدن نوعی آسیب به بدن ایجاد می گردد. انسان ها به طور روزمره در

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

E-mail: davoodfarzin@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** داود فرزین - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

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

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 خانواده زیگوفیلایه است. این گیاه در بسیاری از کشورهای شمال آفریقا و خاورمیانه به‌طور گسترده می‌روید. ترکیبات این گیاه عبارتند از چند آلکالوئید که بیشتر در دانه‌ها 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 درون‌زا 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 مهار بر سندرم محرومیت القاء شده توسط نالوکسان در موش‌های وابسته به مرفین دارند و می‌توانند گیرنده‌های اوپیوئیدی را تحریک کنند (۱۰، ۱۱). تست صفحه داغ یکی از رایج‌ترین تست‌های

کاربردی جهت بررسی حس درد و بی‌دردی در جوندگان و به خصوص موش‌ها 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 موش‌ها 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، بی‌دردی حاصل از اوپیوئیدها و دیگر آنالژزیک‌های فارماکولوژیک غیر اوپیوئیدی به آسانی در تست صفحه داغ قابل تشخیص می‌باشد. بدین ترتیب که، از زمان قرارگیری حیوان بر روی صفحه داغ، زمان نهفتگی (*Latency*) واکنش لیسیدن پا یا لگد زدن به روش مشاهده‌ای توسط تایمر دستگاه ثبت و از آن به عنوان 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 روش‌ها

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  $23 \pm 2$  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

(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 می شد. درجه حرارت صفحه داغ توسط ترموستات دستگاه در درجه حرارت  $52/5 \pm 0/5$  درجه سانتی گراد تنظیم شده بود. موش ها به صورت انفرادی بر روی صفحه داغ قرار داده می شدند و Latency (لیسیدن یا لگد زدن پا در زمان های مختلف، قبل و پس از تزریق داروها ثبت می شد. برای جلوگیری از آسیب بافتی یک زمان چهل و پنج ثانیه ای برای قطع آزمایش حیوان در نظر گرفته می شد (۱۲).

اثر ضددردی داروها در تست فرمالین با استفاده از روش توصیف شده Hunskaar (۱۹۸۷) بررسی شد (۱۳). موش ها به صورت انفرادی به مدت نیم ساعت در سیلندرهای شیشه ای (ارتفاع ۲۵ و قطر ۲۰ سانتی متر) قرار داده می شدند تا به محیط عادت نمایند. سپس، فرمالین (۲۰ میکرولیتر فرمالدئید ۵ درصد) به کف پای راست و عقبی موش ها تزریق می گردید تا موش ها شروع به لیسیدن پا کنند. مدت زمان لیسیدن پا توسط هر موش در فواصل ۵ دقیقه ای به مدت ۵۰ دقیقه توسط یک کروномتر ثبت می گردید. پیک فاز اولیه پاسخ دردناک، به طور طبیعی ۵ دقیقه و فاز تأخیری پاسخ دردناک ۱۵ تا ۵۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین ظاهر گردید. این دو فاز به ترتیب، بیان گر پاسخ درد تونیک و التهابی می باشد.

در این تحقیق داروهای زیر مورد استفاده قرار گرفت: هارمان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، هارمین هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، نورهارمان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا)، فلومازینیل (سیگما، آمریکا). تمام داروها به جز فلومازینیل در سالیین حل شدند. فلومازینیل ابتدا در یک قطره استیک اسید حل و سپس با سالیین رقیق گردید. کنترل حامل در این مورد اسید استیک در سالیین بود. داروها حل شده در سالیین در حجم ۱۰ میلی لیتر / کیلو گرم از راه داخل صفاقی تزریق می شدند.

دوز و زمان تجویز داروها بر اساس مطالعات قبلی تنظیم شده بود (۱۶-۱۴).

نتایج حاصل از آزمایشات با استفاده از آنالیز 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 معنی دار تلقی می شد. تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار 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 / کیلو گرم به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency (لیسیدن یا لگد زدن پای حیوان در صفحه داغ در حضور دوز ۲۰ میلی گرم / کیلو گرم هارمان افزایش یافت. حاکثر اثر ضددردی هارمان در دقیقه ۱۰ به دست آمد [ $n = 7$  mice/group،  $p < 0/0001$ ،  $F(19,6) = 10/47$ ] (نمودار شماره ۱).

*اثر هارمین بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ*

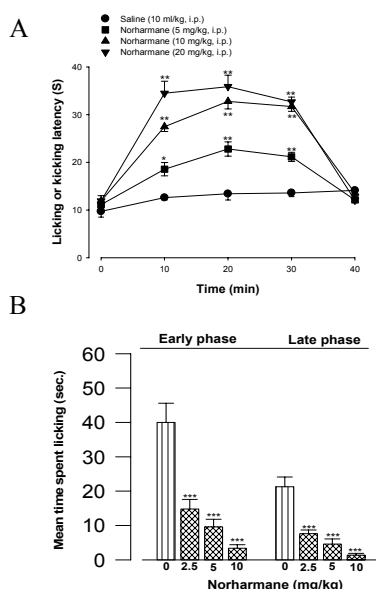
تزریق داخل صفاقی دوزهای ۵ الی ۱۵ میلی گرم / کیلو گرم هارمین به طور وابسته به دوز Latency (لیسیدن یا لگد زدن پای حیوان در صفحه داغ را افزایش داد [ $n = 7$  mice/group،  $p < 0/0001$ ،  $F(19,6) = 32/04$ ] (نمودار شماره ۲).

*اثر نور هارمان بر آستانه درد القاء شده با صفحه داغ*

تزریق داخل صفاقی دوزهای ۵ الی ۱۵ میلی گرم / کیلو گرم نورهارمان به طور 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).

فرمالین در یک فاصله زمانی ۴۰ تا ۵۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.

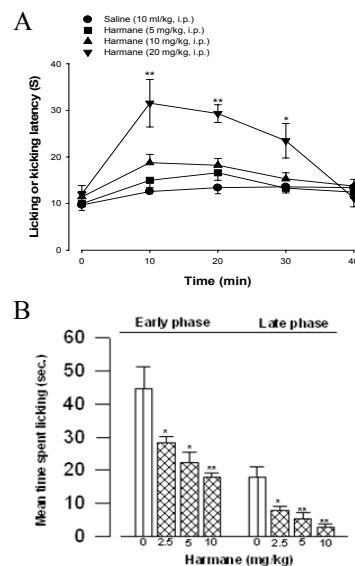
$p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.



**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 میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم به صورت 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  $\pm$  خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.

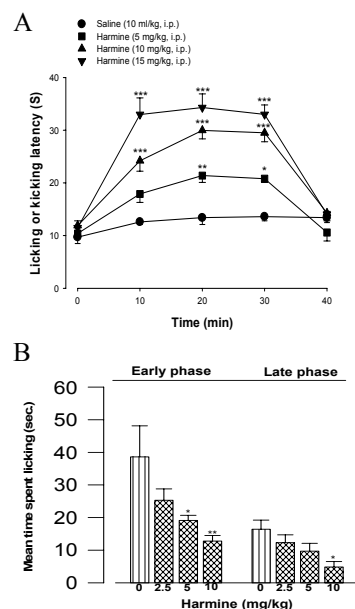
$p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.

اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین  
فلومازنیل (۲ میلی گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) به طور معنی داری اثر ضد دردی هارمان (۲۰ میلی گرم/کیلوگرم) [  $F(5,19) = 13.09$ ،  $p < 0.0001$ ،  $n = 6$  mice/group ] (نمودار شماره ۴)، نورهارمان (۱۵ میلی گرم/کیلوگرم) [  $F(6,19) = 41$ ،  $p < 0.0001$ ،  $n = 6$  mice/group ] (نمودار شماره ۵) و هارمین (۱۵ میلی گرم/کیلوگرم) [  $F(5,19) = 35.93$ ،  $p < 0.0001$ ،  $n = 6$  mice/group ] (نمودار شماره ۶) را آنتاگونیست نمود.



**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 میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم به صورت 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  $\pm$  خطای معیار نشان داده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ موش بود.

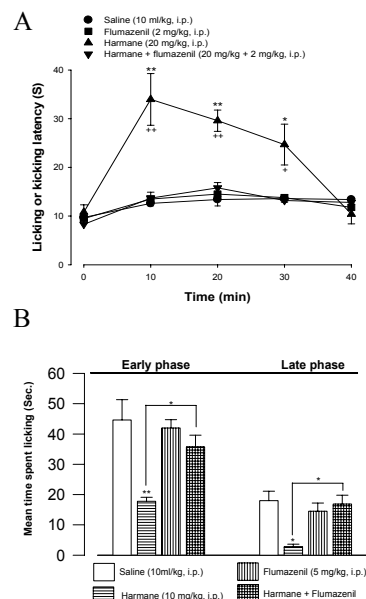
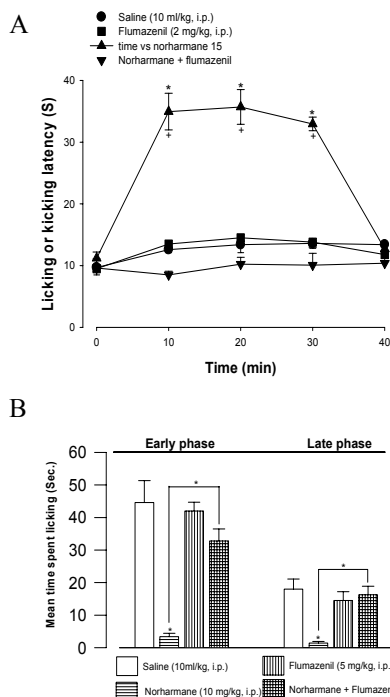
$p < 0.05$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل را نشان می‌دهد.



**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 میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. Latency لیسیدن یا لگد زدن پا در روی صفحه داغ و مدت زمان لیسیدن پا در تست

میلی گرم/کیلوگرم، هارمین با دوز ۱۰ و ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.

$p < 0.01$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل سالین و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه هارمین + فلومازنیل را نشان می دهد.

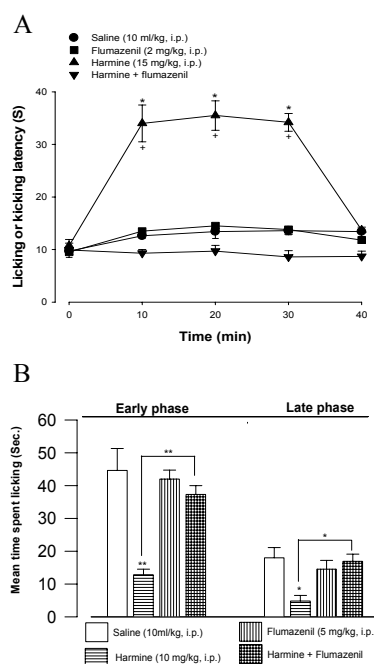


**نمودار شماره ۴:** اثر فلومازنیل بر پاسخ ضد دردی هارمان در تست صفحه داغ (A) و تست فرمالین (B). فلومازنیل با دوز ۲ و ۵ میلی گرم/کیلوگرم، هارمان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.

$p < 0.01$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل سالین و  $p < 0.001$  و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه هارمان + فلومازنیل را نشان می دهد.

**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 میلی گرم/کیلوگرم، نورهارمان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.

$p < 0.001$  تفاوت از گروه کنترل سالین و  $p < 0.001$  تفاوت از گروه نورهارمان + فلومازنیل را نشان می دهد.



**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 میلی گرم/کیلوگرم، هارمین با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم و سالین با حجم ۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم از طریق داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه تست صفحه داغ ۶ موش و تست فرمالین ۷ موش بود.

## بحث

در این تحقیق اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در موش ها با استفاده از تست صفحه داغ و فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این

تحقیق نشان داد که هارمان، نورهارمان و هارمین به طور معنی داری 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 بیان گر اثر ضد دردی آن‌ها می باشد.

از طرفی دیگر مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضد دردی هارمان، نورهارمان و هارمین در تست صفحه داغ و فرمالین به طور معنی داری 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 گابا<sub>A</sub>ریک در قسمت‌های مختلف مغز، به ویژه آمیگدال و رافه پستی را تغییر می دهد (۱۷، ۱۸).

این اثر در تست‌های مختلف ارزیابی عملکرد ضد دردی داروها مورد تأیید قرار گرفته است. در مطالعه Farouk، بتاکربولین‌های گیاه اسپند به طور 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 حالی که فاز تأخیری آن، نتیجه آسیب حاد بافتی و فرایند التهابی حاصل از آن می باشد (۱۹). الگوی دو مرحله‌ای تست فرمالین که بازتاب دو فرایند آسیب شناختی متفاوتی هستند، این امکان را فراهم می کند تا مکانیسم‌های مؤثر احتمالی در بی دردی 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 می دهند (۲۱). در صورتی که داروهای ضد درد که به صورت محیطی عمل می کنند، فاز تأخیری تست فرمالین را بیشتر تحت تأثیر قرار می دهند. این اثر در برگیرنده مهار درد حاصل از تولید و آزادسازی پروستاگلاندین‌ها طی فرآیند التهابی می باشد (۲۲). اثرات بتاکربولین‌های گیاه اسپند در هر دو فاز تست فرمالین تأییدکننده اثرات مرکزی آن‌ها می باشد این اثر در تست صفحه داغ نیز

تأیید شده است به طوری که در مطالعه Farouk، بتاکربولین‌های گیاه اسپند Latency لیسیدن پای موش را افزایش دادند (۱۹). نتایج مطالعه حاضر، به نوعی با مطالعه Farouk هم خوانی داشته و نشان می دهد هارمان، نورهارمان و هارمین واجد اثرات ضد دردی مرکزی هستند. در این راستا، بنظر می رسد اثر ضد دردی 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<sub>A</sub> هستند (۲۳-۲۵). گیرنده GABA<sub>A</sub>، پنتامری مشتمل بر زیر واحدهای همسان است که بر حسب توالی اسیدهای آمینه به ۴ خانواده  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  تقسیم می شوند. در کل، ۱۴ زیر واحد مختلف در این چهار خانواده قابل تفکیک هستند. شش نوع زیر واحد  $\alpha$  ( $\alpha_{1-6}$ )، سه نوع زیر واحد  $\beta$  ( $\beta_{1-3}$ )، سه نوع زیر واحد  $\gamma$  ( $\gamma_{1-3}$ ) و دو نوع زیر واحد  $\delta$  ( $\delta_{1-2}$ ) شناخته شده اند. زیر واحدهای  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  جایگاهی به نام جایگاه  $\omega$  می سازند که بنزودیازپین‌ها و بتاکربولین‌ها به آن متصل می شوند. بر اساس نوع زیر واحد  $\alpha$  شرکت کننده در ساختمان جایگاه  $\omega$ ، سه جایگاه گیرنده‌ای BZ<sub>1</sub>، BZ<sub>2</sub> و آگونیستی معکوس پدید می آید. ترکیب زیر واحدی گیرنده‌های BZ<sub>1</sub> به صورت  $\alpha_1\beta_x\gamma_2$ ، گیرنده‌های BZ<sub>2</sub> 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  $\alpha_6\beta_x\gamma_2$  می باشد (۲۵، ۲۳). بنزودیازپین‌ها به جایگاه آگونیستی معکوس گیرنده‌های GABA<sub>A</sub> متصل نمی شوند ولی با اتصال به جایگاه‌های BZ<sub>1</sub>، اثرات ضد اضطرابی و آرام بخشی و با اتصال به جایگاه‌های BZ<sub>2</sub>، اثرات ضد تشنجی و شل کنندگی عضلانی را ایجاد می کنند. بر خلاف بنزودیازپین‌ها، بتاکربولین‌ها تمایل زیادی جهت اتصال به جایگاه‌های آگونیستی معکوس گیرنده‌های GABA<sub>A</sub> دارند و می توانند با تحریک این جایگاه، حالت‌های اضطرابی و ترس را ایجاد نمایند (۲۶-۳۰).

از دیگر مکانیسم‌های پیشنهادی برای اثر ضد درد آکالوئیدهای بتاکربولینی، ایجاد کم‌دردی<sup>۱</sup> در حالات عاطفی، ثانویه به ایجاد اضطراب و ترس است (۳۱). حالات عاطفی منفی نظیر ترس، موجب کاهش احساس درد و به دنبال آن، موجب کاهش و تضعیف فرایند یادگیری متعاقب می‌شود (۲۳، ۱۹). بر انگیزش ترس از طریق محدود کردن 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، بتاکربولین‌ها از توانمندترین مواد اضطراب‌زا هستند و تجویز آن‌ها موجب برانگیختگی احساس اضطراب شدید به همراه ترسی قوی می‌شود (۳۵). این اثر می‌تواند رفتار بلند کردن 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 (۳۷، ۳۶، ۱۹). مطالعات نشان داده است که بی‌دردی حاصل از رفتار نزاع یا فرار، احتمالاً از طریق آزادسازی یک لیگاند بتاکربولینی درون‌زا توسط گیرنده‌های  $GABA_A$  با عملکرد آگونیستی معکوس ناشی می‌شود (۳۶). اثر آگونیستی معکوس این لیگاندهای بتاکربولینی بر گیرنده‌های  $GABA_A$  می‌تواند مسیرهای اوپیویدی CNS را تحریک و بی‌دردی ایجاد کند. علاوه بر این، بتاکربولین‌ها خود نیز با تمایل بالایی برای اتصال به

گیرنده‌های اوپیویدی  $\mu$  دادند و فعالیت آن‌ها را تحریک می‌کنند. این اثر با تزریق داخل صفاقی آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اوپیویدی نظیر نالوکسان آنتاگونیست می‌گردد (۳۷، ۱۱). در مطالعه Farouk نشان داده شده است که اثر ضد درد بتاکربولین‌های گیاه اسپند توسط نالوکسان فقط در فاز اولیه تست فرمالین آنتاگونیست می‌شود (۱۹). این مطالعه پیشنهاد کننده دخالت گیرنده‌های اوپیویدی در مکانیسم ضد درد مرکزی آکالوئیدهای بتاکربولینی است. این مکانیسم از نقطه نظر کاربرد بالینی حائز اهمیت بسیار است، زیرا دست یافتن به مسکن‌های اوپیویدی 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 درد 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

بدین وسیله 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 می‌باشد.

### 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- $\beta$ -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.

5. Bourke CA, Carigan MJ, Dixon RJ. Upper motor neuron effects in sheep of some betacarboline alkaloid identified in zygothylaceous 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 by 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  $\beta$ -carbolines in the mouse forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16(5): 324-328.
15. Farzin D, Attarzadeh 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 Pharmacol* 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 mediating the behavioral effects of 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: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38(3): 346-352.
23. 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. 11<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill; 2006. p 401-427.
24. Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug interaction 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-carboline carboxylate lowers seizure threshold and antagonizes flurazepam-induced sedation in rats. *Nature* 1981; 290(5801): 54-55.
  29. Prado de Carvalho L, Greeksch G, Cavalheiro EA. Characterization of convulsion 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 aversive 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 benzodiazepine receptors. *Lancet* 1983; 2(8341): 98-99.
  36. Rodgers RJ, Randall JJ. 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 administration. *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.