مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکي رفسنجان
دوره یازدهم، بهمن و اسفند ۱۳۹۱، ۵۵۶-۵۴۵

برهمکنش نیتریک‌اکساید و گیرنده‌های هیستامینی H1 هیپوکامپ پشتی در تست اضطراب ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع

مرتضی پیری[۱]، ملیحه عسگریان[۲]، مریم بنانج[۳]، مریم‌السادات شاهین[۴]، محمدرضا زرین‌دست[۵]

دریافت مقاله: ۹۰/۳/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۰/۶/۲۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۰/۸/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک‌اکساید و گیرنده‌های هیستامینی H1 رفتارهای شبه اضطرابی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر این، برهمکنش نیتریک‌اکساید و گیرنده‌های هیستامینی H1، در زمینه تعدیل برخی رفتارها اثبات شده است. این مطالعه برای ارزیابی برهمکنش بین پیریلامین، آنتاگونیست گیرنده‌های هیستامینی H1 و سیستم نیتریک‌اکساید در ناحیه CA1 مغز موش سوری با استفاده از تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۳۶ موش سوری نر نژاد NMRI با کتامین به علاوه زایلزین بی‌هوش شدند و دو کانول با استفاده از دستگاه استریوتاکسی در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی قرار داده شد. بعد از طی یک هفته دوره بهبودی، تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع برای سنجش رفتارهای شبه اضطرابی مورد استفاده قرار گرفت. از آزمون‌های آماری توصیفی و آنالیز واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید.

یافته‌ها: تزریق پیریلامین (۹ میکروگرم بر موش) به داخل ناحیه CA1 باعث القاء اضطراب شد. تزریق L- آرژنین (۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم بر موش) یا L-NAME (۵ و ۱۰ نانوگرم بر موش)، دو دقیقه قبل از دوز مؤثر پیریلامین اثر اضطراب‌زای پیریلامین را مهار نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده وجود یک برهمکنش پیچیده بین گیرنده‌های هیستامینی H1 و سیستم نیتریک‌اکساید است، که رفتار اضطرابی را در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی تحت تأثیر قرار می‌دهد. فعال یا مهار نمودن سیستم نیتریک‌اکساید پاسخ اضطرابی پیریلامین را در هیپوکامپ پشتی مهار می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: نیتریک‌اکساید، پیریلامین، گیرنده‌های هیستامینی H1، ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع، موش سوری

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران
تلفن: ۰۴۵۱-۷۷۲۸۰۲۶، دورنگار: ۰۴۵۱-۷۷۲۸۰۲۸، پست الکترونیکی: biopiri@yahoo.com
۲- کارشناسی ارشد گروه آموزشی زیست‌شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳- استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۴- کارشناس گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ایران
۵- استاد گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

هیستامین به طور گسترده در بخش‌های مختلف مغز پستانداران وجود دارد و به عنوان تعدیل‌کننده عصبی عمل می‌نماید. نورون‌های هیستامینرژیک از قسمت خلفی هیپوتالاموس منشأ می‌گیرند، بخش وسیعی از مغز و نخاع را عصب‌دهی می‌نمایند و می‌توانند رفتارهای مختلف نظیر رفتارهای اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهند. مطالعات نشان می‌دهند که هیستامین می‌تواند سیکل خواب و بیداری، هیجان و رفتارهای مرتبط با استرس را به واسطه گیرنده‌های H1، H2 و H3 هیستامینی تحت تأثیر قرار دهد [۱]. گیرنده‌های H1 و H2 به صورت پس‌سیناپسی قرار گرفته‌اند، در حالی که گیرنده H3 پیش‌سیناپسی می‌باشد که به عنوان اتورسپتور یا هترورسپتور عمل می‌نماید. تمامی گیرنده‌های هیستامینی، از نوع گیرنده‌های متابوتروپیک جفت شده با G پروتئین‌ها می‌باشند، اما از نظر پراکنش در مغز، ویژگی‌های فارماکولوژیکی و مسیر انتقال پیامی‌که در داخل سلول فعال می‌نمایند، با یکدیگر متفاوت هستند [۲]. گیرنده‌های هیستامینی H1 توسط یک ژن فاقد اینترون کد می‌شوند که به مقدار زیاد در قشر مخ، هیپوکامپ، آمیگدال، هیپوتالاموس و استریاتوم که همگی جزء مراکز تأثیرگذار روی رفتار اضطرابی می‌باشند، بیان می‌شوند. تحریک گیرنده هیستامینی H1 باعث فعال شدن فسفولیپاز C که در نهایت باعث افزایش کلسیم درون سلولی به واسطه رهایش کلسیم از ذخایر درون سلولی کلسیم و ورود کلسیم به واسطه باز شدن کانال‌های وابسته به ولتاژ کلسیم با پروتئین کیناز C و اینوزیتول تری‌فسفات می‌شود. فعال شدن گیرنده‌های H1 همچنین باعث القاء تولید آراشیدونیک اسید و نیتریک‌اکساید می‌شود که به عنوان پیامبر برگشتی عمل می‌نمایند و بعد از تولید در نورون‌های پس‌سیناپسی بر روی نورون‌های پیش‌سیناپسی اثر می‌کنند [۲]. بنابراین، تحریک یا مهار گیرنده‌های H1 هیستامینی به صورت همزمان تولید پیک‌های ثانویه در نورون‌های پیش و پس‌سیناپی را تغییر می‌دهد [۳].

از طرف دیگر، اثر نیتریک‌اکساید در فرآیند اضطراب نشان داده شده است [۴]. نیتریک‌اکساید هنگام فعال شدن نورون‌های محتوی نیتریک‌اکساید سنتاز از آل ـ آرژنین ساخته می‌شود و آنزیم سازنده آن در جسم سلولی، دندریت و اکسون نورون‌های بخش وسیعی از مغز به ویژه قشر مخ، هیپوکامپ، هیپوتالاموس و آمیگدال که همگی جزء ساختارهای تأثیرگذار روی رفتار اضطرابی می‌باشند، بیان می‌شود. مدارک زیادی وجود دارند که نشان‌دهنده نقش مهم نیتریک‌اکساید در میانجی‌گری رفتارهای اضطرابی در جوندگان هستند. مطالعات نشان می‌دهند که تزریق موضعی مهارکننده‌های نیتریک‌اکساید سنتاز به هسته‌های پشتی جانبی ماده خاکستری دور قنات سیلویوس [۵]، هسته‌های میانی آمیگدال [۶] و هسته‌های پشتی رافه به صورت معنی‌داری رفتار اضطرابی را کاهش می‌دهد در حالی که تزریق سیستمیک پیش‌سازهای نیتریک‌اکساید در موش بزرگ آزمایشگاهی باعث افزایش رفتار اضطرابی می‌شود [۷]. مطالعات همچنین نشان می‌دهند که قرار دادن جوندگان در ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع [۴] یا قرار دادن آنها در معرض گربه زنده [۸] محتوی نیتریک‌اکساید سنتاز را در نواحی از مغز که در رفتار اضطرابی تأثیر دارند، افزایش می‌دهد و با توجه به این که آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز با فعال شدن نورون‌های محتوی آن فعال می‌گردد، در این شرایط

استرس‌زا تولید نیتریک‌اکساید در نواحی از مغز که در رفتار اضطرابی دخیل می‌باشند، افزایش می‌یابد. نیتریک‌اکساید به عنوان یک تعدیل‌کننده عصبی عمل می‌نماید و آزادسازی طیف وسیعی از نورترانسمیترها نظیر استیل‌کولین، گلوتامات، گاما آمینوبوتیریک اسید و هیستامین را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۹] بخشی از اثرات نیتریک‌اکساید بر روی تغییر شکل سیناپسی، یادگیری، درک درد، پرخاشگری، اضطراب و افسردگی نیز مربوط به همین نقش تعدیل‌کننده نیتریک‌اکساید بر روی رفتار اضطرابی می‌باشد [۱۰]. در این میان اثر نیتریک‌اکساید بر روی رهایش هیستامین حائز اهمیت بیشتری است زیرا هیستامین یکی از نورترانسمیترهای مهم تأثیرگذار بر روی رفتار اضطرابی می‌باشد [۱۱].

با توجه به این که نیتریک‌اکساید سنتاز [۱۲] و گیرنده‌های هیستامینی H1 به مقدار زیاد در هیپوکامپ پشتی بیان می‌گردند و با در نظر گرفتن این نکته که گیرنده‌های هیستامینی H1 می‌توانند میزان تولید نیتریک‌اکساید را در مغز تحت تأثیر قرار دهند و خود نیتریک‌اکساید نیز رهایش هیستامین را به عنوان یک تعدیل‌کننده عصبی تحت تأثیر قرار می‌دهد، در این مطالعه برهمکنش گیرنده‌های هیستامینی H1 و سیستم نیتریک‌اکساید در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پشتی برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر سیستم نیتریک‌اکساید بر رفتار اضطرابی القاء شده با پیریلامین و مشخص نمودن علت این تأثیرات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت، از موش‌های کوچک آزمایشگاهی به وزن تقریبی ۲۵-۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول مدت آزمایش، آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای حیوانخانه بین ۳±۲۲ درجه 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 هشت‌تایی قرار داده شدند و هر حیوان فقط یک بار استفاده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام گرفت.

دستگاه تست اضطراب و نحوه انجام تست رفتاری: برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع استفاده شد. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت بعلاوه (+) است. ابعاد بازوی باز و بسته ۴۰×۷ است که در دو طرف و انتهای بازوی بسته دیوارهای به بلندی ۱۰ سانتی‌متر قرار دارد. ماز به وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی و رو به یک بازوی باز قرار می‌گرفتند.

در مدت پنج دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کرد، چهار پارامتر به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شد: تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می‌شد، تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می‌شد، مدت زمانی که حیوان در بازوی باز می‌ماند و مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته می‌ماند. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته، قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است. مدت زمان ماندن در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه شد. برای هر حیوان درصد ورود به بازوی باز

Open arm entries (OAE٪) و درصد زمان ماندن در بازوی باز Open arm time (OAT٪) به طریق زیر محاسبه گردید [۱۵-۱۳].

$$\text{درصد ورود به بازوی باز} = \left(\frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی بسته + تعداد ورود به بازوی باز}}\right)\times ۱۰۰$$

$$\text{درصد ماندن در بازوی باز} = \left(\frac{\text{مدت ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت ماندن در بازوی بسته + مدت ماندن در بازوی باز}}\right)\times ۱۰۰$$

افزایش معنی‌دار این دو پارامتر نشان‌دهنده کاهش اضطراب در این تست است. البته، عامل درصد ورود به بازوی باز (OAE٪) نسبت به فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز (OAT٪) در ثبت رفتارهای اضطرابی و ضداضطرابی حیوان دارای حساسیت کمتری است. مجموع دفعات ورود به بازوی باز و بسته در مدت پنج دقیقه نیز به عنوان نماد فعالیت حرکتی حیوان در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت [۱۵-۱۳].

داروها: داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از پیریلامین (آنتاگونیست گیرنده هیستامینی H1)، L ـ آرژنین و L-NAME که همگی از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردید. L ـ آرژنین پیش‌ساز نیتریک‌اکساید است که به عنوان آگونیست نیتریک‌اکساید عمل می‌کند و L-NAME مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتاز است که به عنوان آنتاگونیست نیتریک‌اکساید عمل می‌نماید. تمامی داروهای فوق، بلافاصله قبل از آزمایش در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند.

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA1): موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به علاوه زایلزین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی، حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. کانول‌های راهنما (G ۲۳) به صورت دو طرفه، یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شدند. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت بود از: AP=-۲، ML=+۱/۶، V= -۱/۵ [۱۶]. 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 دوره بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۳۰G دندان‌پزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کتدان تیوب نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما G ۲۳ قرار داده شده، در هر کانول، ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق می‌شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده می‌شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت‌شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم با تزریق رنگ متیلن‌بلو ۴٪ (۱ میکرولیتر) به داخل هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شد و درون فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شد و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر، اطلاعات حاصل از حیوان، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: در همه آزمایش‌ها، درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز به عنوان ملاک رفتار اضطرابی اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت حرکتی حیوان نیز به صورت همزمان اندازه‌گیری گردید. نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش، از روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مکمل LSD استفاده گردید. اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Sigma plot استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده

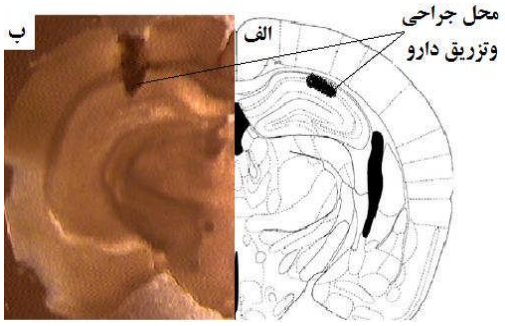
آزمایش اول: اثر پیریلامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی: در این آزمایش، چهار گروه حیوان به کار رفت. گروه اول سالین (۱ میکرولیتر بر موش) و سه گروه باقی‌مانده مقادیر مختلف پیریلامین (۹، ۶، ۳ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی دریافت کردند.

آزمایش دوم: اثر L ـ آرژنین در هیپوکامپ پشتی بر پاسخ اضطرابی القاء شده با پیریلامین: در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها، ۷ دقیقه مانده به آزمون اضطراب، مقدار مؤثر پیریلامین (۹ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی دریافت کردند و ۲ دقیقه بعد (۵ دقیقه مانده به آزمون اضطراب) مقادیر مختلف L ـ آرژنین (۱، ۰/۵، ۰/۱ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی دریافت کردند.

آزمایش سوم: اثر L-NAME در هیپوکامپ پشتی بر پاسخ اضطرابی القاء شده با پیریلامین: در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. تمامی‌گروه‌ها، ۷ دقیقه مانده به آزمون اضطراب، مقدار مؤثر پیریلامین (۹ میکروگرم بر موش) و ۲ دقیقه بعد (۵ دقیقه مانده به آزمون اضطراب) مقادیر مختلف NAME-L (۵۰، ۱۰، ۵ و ۰ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی دریافت کردند.

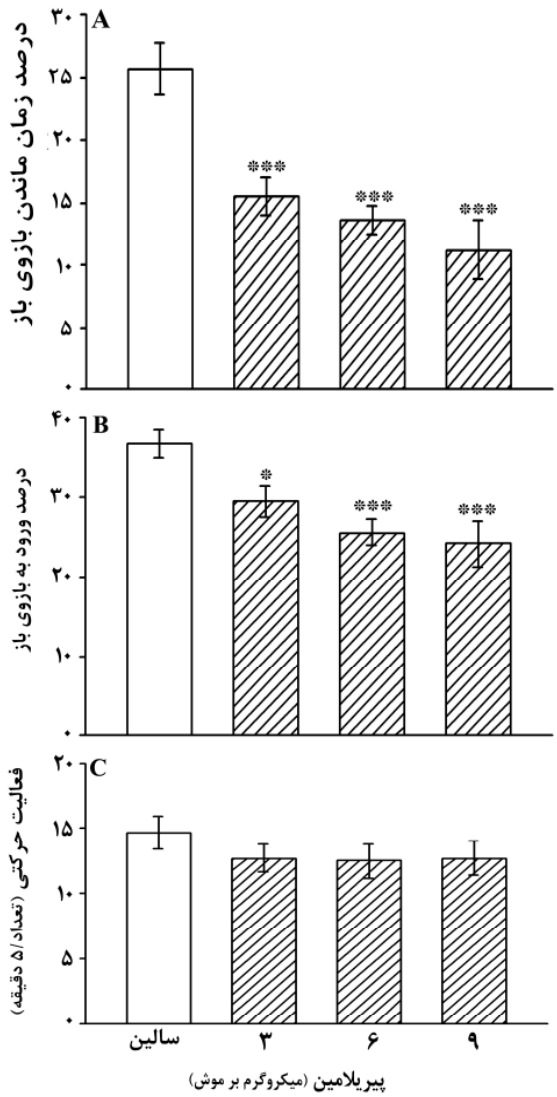
نتایج

شکل ۱ مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی که نشان‌دهنده محل قرارگیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس می‌باشد را نمایش می‌دهد. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



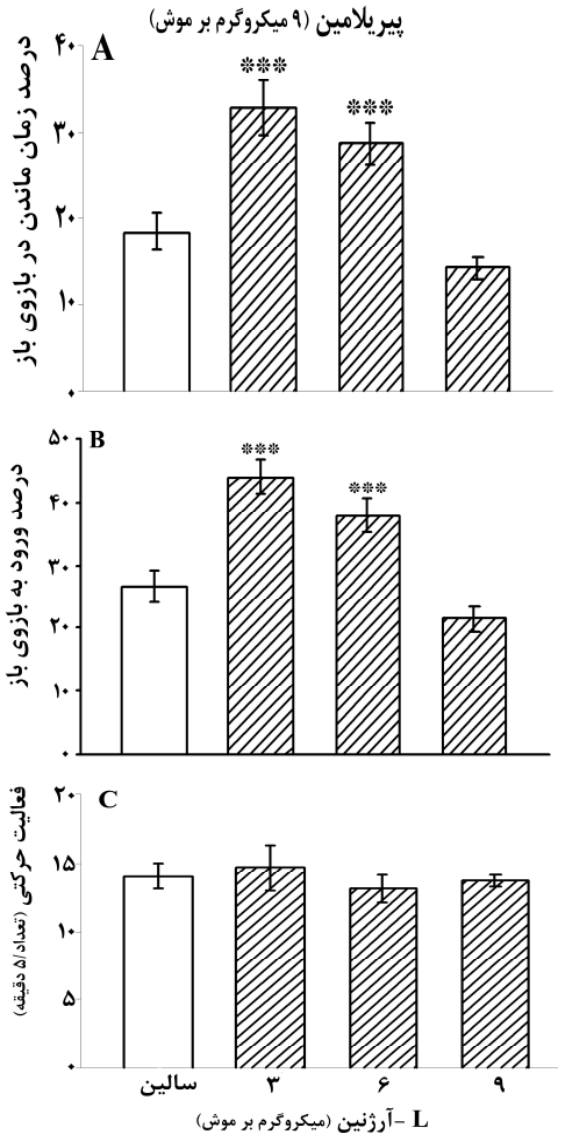
شکل ۱- شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (الف) و عکس مقطع بافتی مربوط به کانول‌گذاری در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی (ب).

آزمایش اول: اثر تزریق پیریلامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی: تزریق پیریلامین به ناحیه هیپوکامپ پشتی باعث کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز ($p<۰/۰۰۱$) و درصد ورود به بازوی باز ($p<۰/۰۰۱$) گردید، اما بر روی فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی‌داری نداشت (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر پیریلامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر رفتار اضطرابی و حرکتی. ***: p<۰/۰۰۱ و *: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

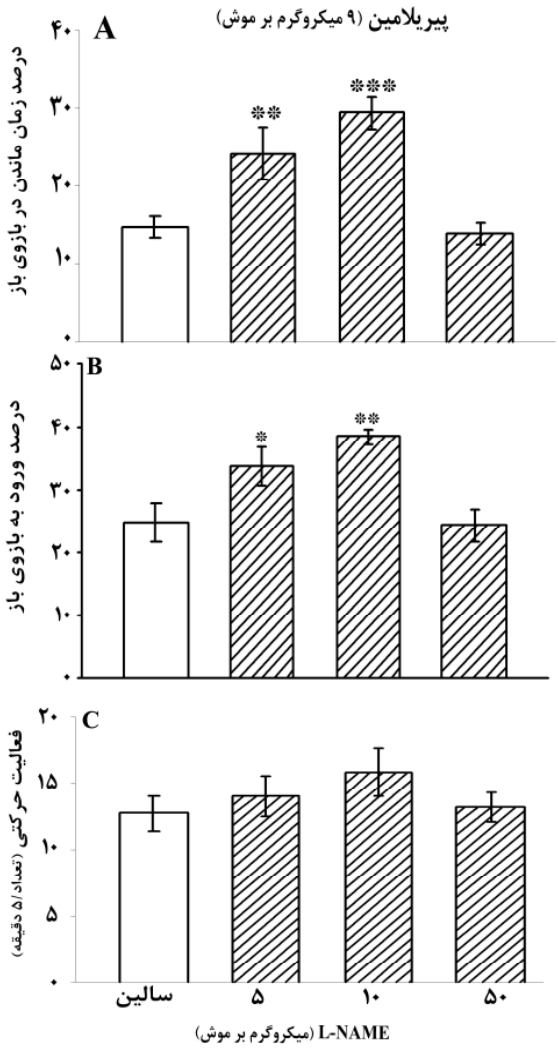
آزمایش دوم: اثر L ـ آرژنین در هیپوکامپ پشتی بر روی رفتار اضطرابی القاء شده با پیریلامین: تزریق L ـ آرژنین به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که تحت تأثیر دوز مؤثر پیریلامین بوده‌اند، باعث افزایش درصد زمان حضور در بازوی باز (p<۰/۰۰۱) و درصد ورود به بازوی باز (p<۰/۰۰۱) شد، بدون این که فعالیت حرکتی حیوان را به صورت معنی‌داری تغییر دهد.



نمودار ۲- اثر L ـ آرژنین پیش‌ساز نیتریک‌اکساید در ناحیه هیپوکامپ پشتی در حضور پیریلامین بر رفتار اضطرابی و حرکتی. ***: p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده پیریلامین / سالین می‌باشد.

آزمایش سوم: اثر L-NAME در هیپوکامپ پشتی بر روی رفتار اضطرابی القاء شده با پیریلامین: تزریق L-NAME به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که تحت‌تأثیر مقدار مؤثر پیریلامین بوده‌اند به صورت معنی‌داری درصد زمان حضور در بازوی باز (p<۰/۰۰۱) و درصد ورود به بازوی باز (p<۰/۰۰۱) را در مقایسه با گروهی که فقط پیریلامین

دریافت کرده‌اند، افزایش داده است، بدون این که فعالیت حرکتی حیوان را به صورت معنی‌داری تغییر دهد (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثر L-NAME (مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتاز) در ناحیه هیپوکامپ پشتی در حضور پیریلامین بر رفتار اضطرابی و حرکتی. ***: p< ۰/۰۰۱ ،**: ۰/۰۱>p و *: ۰/۰۵ >p در مقایسه با گروه پیریلامین / سالین می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، برهمکنش سیستم نیتریک‌اکساید و گیرنده‌هاي هیستامیني H1 هیپوکامپ پشتي در زمینه رفتار اضطرابي مورد بررسي قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان مي‌دهد که تزریق آنتاگونیست گیرنده هیستامیني H1، پیریلامین، به ناحیه هیپوکامپ پشتي بدون این که فعالیت حرکتي را تغییر دهد، باعث کاهش درصد حضور در بازوي باز و کاهش درصد ورود به بازوي باز مي‌شود. این مشاهدات نشان‌دهنده اضطراب‌زا بودن پیریلامین در هیپوکامپ پشتي مي‌باشد. نتایج این مطالعه با یافته‌هاي قبلي که نشان مي‌دهند تزریق پیریلامین به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتي باعث القاء اضطراب در تست صفحه سوراخ‌دار مي‌گردد، همسو است [۱۷]. نتایج برخي مطالعات نیز نشان‌دهنده اضطراب‌زا بودن پیریلامین مي‌باشد، به عنوان نمونه، گزارش شده است که تزریق درون بطني پیریلامین باعث القاء اضطراب در ماز بعلاوه‌اي شکل مرتفع مي‌گردد [۱۵]. با توجه به این که آنتاگونیست گیرنده‌هاي H1 باعث افزایش سطح استیل‌کولین در فضاي خارج سلولي هیپوکامپ مي‌شود و با در نظر داشتن نقش تعدیل‌کننده استیل‌کولین در زمینه رفتارهاي اضطرابي [۱۸]، این احتمال وجود دارد که مقادیر بالاي آنتاگونیست‌هاي گیرنده‌هاي H1 به واسطه تغییر سطح استیل‌کولین باعث القاء اضطراب شوند. همچنین با توجه به اهمیت نیتریک‌اکساید در کنترل رفتار اضطرابي [٤] و توجه به این نکته که گیرنده‌هاي هیستامیني H1 میزان تولید نیتریک‌اکساید را تحت تأثیر قرار مي‌دهند، این احتمال وجود دارد که مهار گیرنده‌هاي H1 به واسطه کاهش تولید نیتریک‌اکساید باعث القاء اضطراب گردد [۲]. البته باید توجه داشت که به غیر از گزارشاتي که بر اضطراب‌زا بودن پیریلامین دلالت دارند [۱۷]، گزارشاتي نیز نشان‌دهنده بي‌اثر بودن این ماده هیستامیني بر روي رفتار اضطرابي یا ضداضطراب بودن آن در نواحي دیگر مغز مي‌باشد [۱۹].

در بخش دوم این مطالعه برهمکنش سیستم نیتریک‌اکساید با گیرنده هیستاميني H1 در زمینه رفتار اضطرابي در هیپوکامپ پشتي موش سوري مورد بررسي قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که تزریق L ـ آرژنین یا L-NAME به ناحیه هیپوکامپ پشتي موش‌هایي که تحت تأثیر مقدار مؤثر پیریلامین بوده‌اند، درصد حضور در بازوي باز و درصد ورود به بازوي باز را در مقایسه با گروهي که فقط پیریلامین دریافت کرده‌اند افزایش مي‌دهد، بدون این که فعالیت حرکتي حیوان را تغییر دهد. این مشاهدات نشان مي‌دهد پیش‌سازهاي نیتریک‌اکساید و مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتاز در هیپوکامپ پشتي، جلوي اضطراب القاء شده با پیریلامین را مي‌گیرد. این یافته‌ها نشان‌دهنده وجود برهمکنش بین سیستم نیتریک‌اکساید و گیرنده‌هاي هیستاميني H1 در زمینه رفتار اضطرابي در هیپوکامپ پشتي مي‌باشد. شواهد موجود در سطح سلولي نشان مي‌دهد که نیتریک‌اکساید مي‌تواند رهایش هیستامین را تحت تأثیر قرار دهد [۱۱]، همچنین فعال شدن گیرنده‌هاي H1 هیستاميني به واسطه افزایش سطح پیک ثانویه cGMP و یون کلسیم در داخل سلول، آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز را فعال‌تر نموده و تولید نیتریک‌اکساید را افزایش مي‌دهد [۱]. با توجه به این که مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتاز که به عنوان آنتاگونیست نیتریک‌اکساید عمل مي‌نماید، مي‌تواند جلوي القاء اضطراب با پیریلامین را بگیرد، این احتمال مطرح مي‌شود که بخشي از اثرات اضطراب‌زاي پیریلامین از طریق نیتریک‌اکساید میانجي‌گري مي‌شود. در این مطالعه، آگونیست و آنتاگونیست نیتریک‌اکساید اثر یکساني بر روي اضطراب القاء شده با پیریلامین اعمال نموده‌اند. این پاسخ رفتاري پیچیده مي‌تواند به علل مختلفي ایجاد شود. تغییرات کم در شرایط عملکردي نورون‌هاي هدف و ترکیبات خارج سلولي بر روي پاسخ ایجاد شده با نیتریک‌اکساید اثر مي‌گذارد [۲۰]. اثر یکسان مشاهده شده همچنین مي‌تواند به دلیل نقش تعدیل‌کننده نیتریک‌اکساید بر روي رهایش نورترانسمیترهاي مختلف نظیر استیل‌کولین، گلوتامات، سروتونین، گاماآمینو بوتیریک اسید و هیستامین ایجاد گردد [۲۱, ۹]. در بسیاري از مطالعات نیز اثر دوگانه بعد از تزریق داروهایي که سیستم نیتریک‌اکساید را تحت تأثیر قرار مي‌دهند، گزارش شده است [۲۲]. هنگام تزریق سیستمیک یا موضعي مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتاز به داخل هسته‌هاي پشتي جانبي ماده خاکستري دور قنات سیلویوس یا بخش میاني آمیگدال، اثرات اضطراب‌زا [۱۲] یا ضداضطراب [٦] در دستگاه ماز بعلاوه‌اي شکل مرتفع گزارش شده است [۷].

این اثرات متضاد در دیگر آزمون‌هاي اضطراب نیز گزارش گردیده و فقط محدود به ماز بعلاوه‌اي شکل مرتفع نمي‌باشد [۲۳]. علت نتایج متناقضي که در مطالعات قبلي بدست آمده کاملاً مشخص نمي‌باشد، اما مي‌تواند نتیجه عواملی چون: نوع تست اضطرابي به کار رفته، شیوه بکار رفته براي انجام آزمایشات، نحوه تزریق دارو (درون صفاقي، زیر پوستي، درون بطني یا داخل هسته‌ها و نواحي مختلف مغزي، نوع حیوان بکار رفته در مطالعه و مقدار دارو باشد. با توجه به این که نیتریک‌اکساید به عنوان یک تعدیل‌کننده عصبي عمل مي‌نماید، مقدار داروهاي استفاده شده در نوع پاسخ ایجاد شده بسیار حائز اهمیت مي‌باشد [۲٤، ۲۱، ۱۲]. نتایج متناقض بدست آمده در مورد اثرات اضطرابي و ضداضطرابي نیتریک‌اکساید همچنین مي‌تواند

نتیجه برهمکنش پیچیده نیتریک‌اکساید با سیستم‌هاي نورترانسمیتري مختلف باشد [۲۵, ۲۱].

نتیجه‌گیري

یافته‌هاي مطالعه حاضر نشان مي‌دهد که تزریق پیریلامین در ناحیه هیپوکامپ پشتي اضطراب‌زا مي‌باشد و سیستم نیتریک‌اکساید این رفتار اضطرابي القاء شده با پیریلامین را مهار مي‌نماید. این یافته همسو با نقش تعدیل‌کننده نیتریک‌اکساید بر روي رفتار اضطرابي بوده و نشان‌دهنده وجود برهمکنش بین سیستم نیتریک‌اکساید و گیرنده‌هاي هیستامیني H1 در زمینه رفتار اضطرابي در هیپوکامپ پشتي مي‌باشد.

تشکر و قدرداني

بدین وسیله از مسئولین آزمایشگاه گروه فارماکولوژي دانشگاه علوم پزشکي تهران که در انجام این تحقیق یاري نمودند، تقدیر و تشکر مي‌گردد.

References

[1] Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The Physiology of Brain Histamine. *Prog Neurobiol* 2001; 63(6): 637-72.

[2] Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(2): 121-30.

[3] Dere E, De Souza-Silva MA, Spieler Re, Lin JS, Ohtsu H, Haas HL, et al. Changes in motoric, exploratory and emotional behaviours and neuronal acetylcholine content and 5-HT turnover in histidine decarboxylase-KO mice. *Eur J Neurosci* 2004; 20(4): 1051-8.

[4] Beijamini V, Guimaraes FS. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Res Bull* 2006; 69(4): 347-55.

[5] Aguiar DC, Guimaraes FS. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. *J Neurosci Res* 2009; 87(11): 2418-29.

[6] Forestiero D, Manfrim CM, Guimaraes FS,de Olivia RM. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 184(2): 166-72.

[7] De Oliveira RM, Del Bel EA, Guimaraes FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25(7-8): 679-85.

[8] Beijamini V, Guimaraes FS. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 2006; 170(1): 52-61.

[9] Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 2002; 135(5): 1079-95.

[10] Almeida RC, Felisbino CS,Lopez MG,Rodrigues AL,Gabilan NH. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav Brain Res* 2006; 168(2): 318-22.

[11] Philippu A, Prast H. Importance of histamine in modulatory processes, locomotion and memory. *Behav Brain Res* 2001; 124(2): 151-9.

[12] Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* 2001; 22(7): 1043-7.

[13] Rezayat M, Roohbakhsh A, Zarrindast MR, Massoudi R, Djahanguin B. Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiol Behav* 2005; 84(5): 775-82.

[14] Zarrindast MR, Moghadam AH, Rostami P, Roohbakhsh A. The effects of histaminergic agents in the central amygdala of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 2005; 16(8): 643-9.

[15] Zarrindast MR, Rostami P, Zarei M, Roohbakhsh A. Intracerebroventricular effects of histaminergic agents on morphine-induced anxiolysis in the elevated plus-maze in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97(5): 276-81.

[16] Paxinos G, Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd Ed. *Academic Press*. 2001.

[17] Zarrindast MR, Nasehi M, Piri M, Bina P. Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 94(3): 387-96.

[18] Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 2002; 949(1-2): 60-70.

[19] Yuzurihara M, Ikarashi Y, Ishige A, Sasaki H, Kuribara H, Maruyama Y. Effects of drugs acting as histamine releasers or

histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67(1): 145-50.

[20] Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. Brain Res Brain Res Rev 2000; 32(2-3): 476-509.

[21] Asgarian M, Piri M, Benanj M, Shahin MS. Zarin Dast MR. Role of nitric oxide system of dorsal hippocampus in the histamine-induced anxiogenic-like response. *Kowsar Medical Journal* 2011; 16(3): 137-43.

[22] Masood A, Banerjee B, Vijayan VK, Ray A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 458(1-2): 135-9.

[23] Ergun Y, Ergun UG. Prevention of pro-depressant effect of L-arginine in the forced swim test by NG-nitro-L-arginine and [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]. Eur J Pharmacol 2007; 554(2-3): p. 150-4.

[24] Piri M, Nasehi M, Zarrindast M.R. Influence of Intracerebral Administration of L-Arginine in Dorsal Hippocampus (CA1) on WIN55, 212-2 Induced State-Dependent Memory. *ZUMS Journal* 2010; 18(70): 10-21.

[25] Moreira FA, Molchanov ML, Guimaraes FS. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 171(2): 199-203.

Interaction Between Nitric Oxide and Histaminergic H1 Receptor of Dorsal Hippocampus in the Elevated Plus-Maze of Anxiety

M. Piri[1], M. Asgariyan[2], M. Bananej[3] M.S. Shahin[4], M.R. Zarrindast[5]

Received: 20/06/2011 Sent for Revision: 13/08/2011 Received Revised Manuscript: 16/11/2011 Accepted: 02/05/2012

Background and Objectives: Nitric oxide and histamine H1 receptors influence anxiety-like behaviors. Furthermore, interaction between nitric oxide and histamine H1 receptors has been demonstrated in the modulation of some behavior. The present study was designed to evaluate the interactions between pyrilamine, aH1 receptor antagonist and nitric oxide systems in the CA1 brain region of the mice using the plus-maze test.

Materials and Methods: In this experimental study, 136 adult male NMRI mice were anesthetized with ketamine and xylazine and two cannuale were inserted stereotaxically into the CA1 region of the dorsal hippocampus. After 1 week recovery, the elevated plus maze test was used to test the anxiety-like behaviors.

Results: Intra-CA1 injection of pyrilamine induced anxiety. Intra-CA1 injection L-arginine (0.1 and 0.5 µg/mouse) or L-NAME (5, 10 ng/mouse) 2 min after befor effective dose of pyrilamine (9 µg/mouse) inhibited anxiogenic effects of pyrilamine.

Conclusion: These results show that there are complex interactions between histamine H1 receptors and nitric oxide system that affect anxiety behaviors in the CA1 region of dorsal hippocampus. Activation or inhibition of nitric oxide system inhibits anxiogenic response of pyrilamine in the dorsal hippocampus.

Key words: Nitric Oxide, Pyrilamine, Histamine H1 Receptors, Elevated Plus Maze, Mouse

Funding: This research was funded by Tehran University of Medical Sciences.

Conflict interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tehran University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Piri M, Asgariyan M, Bananej M, Shahin MS, Zarrindast MR. Interaction Between Nitric Oxide and Histaminergic H1 Receptor of Dorsal Hippocampus in the Elevated Plus-Maze of Anxiety *J Rafsanjan Univ Med Scie* 2013; 11(5): 545-56. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran (Corresponding Author) Tel: (0451) 7728026, Fax:(0451) 7729826, E-mail: biopiri@ yahoo.com
2- MSc, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
3- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
4- BSc Dept. of Biology, Young Researchers Club , Islamic Azad University- Shahr-e-Rey Branch, Tehran, Iran
5- Prof., Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran