

Interaction between apomorphine and histaminergic system of mouse dorsal hippocampus in the elevated plus-maze test of anxiety

Ayazi E¹, Piri M^{2*}, Bananej M¹, Shahin M³, Zarrindast MR⁴

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University- Shahr-e-Rey Branch, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Pharmacology, Faculty of Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received November 21, 2010; Accepted April 10, 2011

Abstract:

Background: Histaminergic and dopaminergic systems influence anxiety-related behavior. Furthermore, interaction between histaminergic and dopaminergic receptors has been demonstrated in the modulation of some behaviors in the hippocampus. In the present study, the interaction between histaminergic and dopaminergic receptors of dorsal hippocampus in the anxiety-related behavior has been evaluated.

Materials and Methods: This experimental study was carried out on 140 male NMRI mice. Mice were anesthetized with intra-peritoneal injection of ketamine hydrochloride plus xylazine and then placed in a stereotaxic apparatus. Two cannulae were placed in the CA1 region of hippocampus. All animals were allowed to recover for one week before the beginning of the behavioral testing. The elevated plus-maze test was used to evaluate anxiety-related behaviors. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD test were done for the statistical analysis of the data. All experiments were conducted in accordance with institutional guidelines for animal care and use.

Results: Intra-CA1 injection of histamine (10 µg/mouse) or apomorphine (0.1 and 0.3 µg/mouse) 5 min before testing induced anxiety. Intra-CA1 injection of apomorphine (0.01 and 0.1 µg/mouse) 2 min before the effective dose of histamine (10 µg/mouse) inhibited the anxiogenic effects of histamine.

Conclusion: It seems that both histaminergic and dopaminergic system not only play a role in the modulation of anxiety in the dorsal hippocampus of mice but also demonstrate a complex interaction as well.

Keywords: Apomorphine, Dorsal hippocampus, Elevated plus-maze, Histamine, Mouse

* Corresponding Author.

Email: biopiri@iauardabil.ac.ir

Tel: 0098 912 254 3585

Fax: 0098 451 772 8029

Conflict of Interests: No

Fez, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Summer, 2011; Vol. 15, No 2, Pages 105-113.

Please cite this article as: Ayazi E, Piri M, Bananej M, Shahin M, Zarrindast MR. Interaction between apomorphine and histaminergic system of mouse dorsal hippocampus in the elevated plus-maze test of anxiety. *Fez* 2011; 15(2): 105-113.

برهمکنش آپومورفین و سیستم هیستامینرژیک هیپوکامپ پشته‌ی موش کوچک آزمایشگاهی در تست اضطراب ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع

الهام ایازی^۱، مرتضی پیری^{۲*}، مریم بنانج^۳، مریم السادات شاهین^۴، محمدرضا زرین دست^۵

خلاصه

سابقه و هدف: سیستم‌های هیستامینی و دوپامینی اضطراب را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به‌علاوه برهمکنش بین هیستامین و گیرنده‌های دوپامینی در زمینه تعدیل برخی رفتارها در هیپوکامپ اثبات شده است. در این مطالعه برهمکنش بین گیرنده‌های هیستامینی و دوپامینی در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پشته‌ی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی روی ۱۴۰ موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI انجام شد. موش‌های کوچک آزمایشگاهی با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید و زایلین بی‌هوش شده و سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول در ناحیه هیپوکامپ پشته‌ی قرار داده شد. به تمامی حیوانات قبل از شروع آزمون رفتاری برای بهبودی یک هفته فرصت داده شد. تست ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع برای سنجش رفتارهای اضطرابی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های مطالعه نشان دادند که تزریق هیستامین (۱۰ میکروگرم بر موش) یا آپومورفین (۰/۱ و ۰/۳ میکروگرم بر موش) پنج دقیقه قبل از آزمون به داخل ناحیه CA1 باعث القاء اضطراب گردیده و تزریق آپومورفین (۰/۱ و ۰/۳ میکروگرم بر موش)، دو دقیقه قبل از دوز مؤثر هیستامین (۱۰ میکروگرم بر موش) اثرات اضطراب‌زای هیستامین را مهار می‌نماید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد علاوه بر اینکه هر دو سیستم هیستامینرژیک و دوپامینرژیک در تعدیل اضطراب در هیپوکامپ پشته‌ی موش کوچک آزمایشگاهی نقش دارند، بلکه بین آنها یک برهمکنش پیچیده نیز وجود دارد.

واژگان کلیدی: آپومورفین، هیپوکامپ پشته‌ی، ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع، هیستامین، موش کوچک آزمایشگاهی

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۱۳-۱۰۵

مقدمه

اهمیت هیستامین در رفتار اضطرابی در مطالعات پیشین نشان داده شده است. نتایج اکثر مطالعات نشان دهنده این موضوع می‌باشد که در شرایط تنش‌زا افزایش تولید هیستامین در مغز باعث القاء اضطراب می‌شود، در حالی که تخریب مراکز تولید هیستامین در مغز باعث کاهش رفتار اضطرابی می‌گردد. مطالعات فارماکولوژیکی صورت گرفته نیز نشان می‌دهند که تزریق هیستامین به‌صورت سیستمیک یا به‌صورت درون مغزی به مراکز مآند

هیپوکامپ و آمیگدال باعث القاء اضطراب در مدل‌های حیوانی می‌شود. هیستامین اثرات خود را در سیستم عصبی از طریق گیرنده‌های H1، H2 و H3 اعمال می‌نماید. گیرنده‌های هیستامینی H1، از خانواده گیرنده‌های متصل شونده به G پروتئین-ها می‌باشند که فعال شدن آنها باعث تحریک فسفولیپاز C و همچنین افزایش cAMP می‌شود [۱]. تراکم بالایی از گیرنده‌های هیستامینی H1 در دستگاه لیمبیک به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ حضور دارند [۲]. گیرنده‌های H2 نیز جزء گیرنده‌های متصل شونده به G پروتئین‌ها می‌باشند که فعال شدن آنها باعث افزایش تولید cAMP می‌شود [۳]. گیرنده‌های H3 اتورسپتور بوده و ساخت و رهایش هیستامین را تنظیم می‌کنند [۴]. همچنین، هیستامین با اثر بر روی گیرنده‌های هیستامینی H3، یادگیری فضایی و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵]. فعال شدن گیرنده‌های هیستامینی H3 باعث کاهش ساخت و افزایش رهایش هیستامین گردیده و می‌تواند رفتارهای اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهد [۶]. از طرف دیگر شواهدی وجود دارد که نشان دهنده برهمکنش بین سیستم هیستامینرژیک و دوپامین می‌باشد. شواهد بیوشیمیایی و رفتاری در جوندگان نشان می‌دهند که مکانیسم‌های هیستامینرژیک در تعدیل فعالیت دوپامین در سیستم عصبی مرکزی

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

^۲ مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

^۴ کارشناس زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری

^۵ استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نشانی نویسنده مسوول:

اردبیل، میدان بسیج، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

تلفن: ۰۹۱۲ ۲۵۴۳۵۸۵ دورنویس: ۰۲۹ ۷۷۲۸۰۴۵۱

پست الکترونیک: biopiri@iauardabil.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۳۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۱/۲۱

دستگاه تست اضطراب و نحوه انجام تست رفتاری برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع استفاده شد. اساس این ارزیابی در این آزمون بر پایه دو گزینه طراحی شده است: یکی حس جستجوگرانه جوندگان، و دیگری احتراز از محیط‌های باز و روشن. در این روش حیوان بیشتر تمایل دارد وقت خود را در بازوهای بسته بگذراند. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت به علاوه (+) است. ابعاد بازوی باز و بسته 7×40 است که در دو طرف و انتهای بازوی بسته دیوارهایی به بلندی ۱۰ سانتی متر قرار دارند. برای جلوگیری از سقوط موش‌های صحرایی، در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه‌هایی به ارتفاع یک سانتی متر از جنس شیشه تعبیه شده است. ماز به وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۴۰ سانتی متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی و رو به یک بازوی باز قرار می‌گرفتند. نور مناسب به وسیله یک لامپ ۱۰۰ واتنی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی متری از مرکز ماز قرار داشت، تأمین می‌شد. 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 شده است. برای هر حیوان درصد ورود به بازوی باز (Open Arm Entries (% OAE)، درصد زمان ماندن در بازوی باز (Open Arm Times (% OAT) و فعالیت حرکتی حیوان به طریق زیر محاسبه شد.

$$100 \times \left(\frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی بسته} + \text{تعداد ورود به بازوی باز}} \right) = \text{درصد ورود به بازوی باز}$$

$$100 \times \left(\frac{\text{مدت ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت ماندن در بازوی بسته} + \text{مدت ماندن در بازوی باز}} \right) = \text{درصد ماندن در بازوی باز}$$

تعداد ورود به بازوی بسته + تعداد ورود به بازوی باز = فعالیت حرکتی حیوان

افزایش معنادار این دو پارامتر نشان دهنده کاهش اضطراب در این تست است. البته عامل در صد ورود به بازوی باز (OAE (% در نسبت به فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز (OAT (% در ثبت رفتارهای اضطرابی و ضد اضطرابی حیوان دارای حساسیت کمتری است.

داروها

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از هیستامین و آپومورفین که از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه

به‌ویژه در سیستم مزولیمبیک نقش مهمی بر عهده دارند [۸،۷]. مطالعات فارماکولوژیکی نیز نشان می‌دهند که آنتاگونیست‌های گیرنده‌های هیستامینی H1 با جذب دوپامین از فضای سیناپسی را مهار نموده و از این طریق باعث فعال‌تر شدن سیستم دوپامینی می‌شوند [۹]. در حالی که آزاد سازی دوپامین از برش‌های برداشته شده از استریاتوم توسط هیستامین مهار می‌گردد. مطالعات رفتاری نیز نشان داده‌اند که وابستگی روانی القاء شده با تزریق هیستامین یا پیریلامین به بخش میانی سپتوم با پیش تیمار با آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی D1 مهار می‌گردند. از طرف دیگر سیستم دوپامینی نیز می‌تواند عملکرد سیستم هیستامینی را تحت تاثیر قرار دهد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که دوپامین و آپومورفین آزاد سازی هیستامین از طریق گیرنده‌های دوپامینی D2 در هیپوتالاموس موش صحرایی را افزایش می‌دهند. مطالعات رفتاری نیز نشان می‌دهند که حساسیت القاء شده با آپومورفین بر روی فراموشی القاء شده با مورفین اثر نموده و باعث بهبود حافظه تخریب شده با هیستامین می‌شود. با توجه به اهمیت هیپوکامپ پستی و سیستم‌های دوپامینرژیک و هیستامینرژیک در زمینه رفتار اضطرابی و با در نظر داشتن این نکته که هیپوکامپ پستی ورودی‌های دوپامینرژیک و هیستامینرژیک را دریافت می‌کند و گیرنده‌های این دو سیستم در هیپوکامپ پستی بیان می‌شود [۱۱،۱۰،۲]. در این مطالعه برای اولین بار برهمکنش بین این دو سیستم در هیپوکامپ پستی موش کوچک آزمایشگاهی در زمینه رفتار اضطرابی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در پژوهشکده علوم شناختی (تهران - ایران) انجام گرفت، از موش‌های کوچک آزمایشگاهی به وزن تقریبی ۲۵-۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای حیوانخانه بین 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوانخانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها Handling می‌شدند. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در گروه هشت تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌گردید.

گردیدند. داروها بلافاصله قبل از انجام آزمایش‌ها در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند.

جراحی و کانول گذاری در ناحیه هیپوکامپ پستی (CA1) موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ mg/kg) و زایلین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. کانول‌های راهنما (۲۳ G) به صورت دو طرفه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس قرار داده شدند. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی عبارت بود از: $AP = +1/6$, $ML = -1/5$, $V = 12$. بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده می‌شد 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 ۳۰ G دندانپزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کت دان تیوب نوزاد متصل بود، در داخل کانول راهنما ۲۳ G 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. لازم به ذکر است که در آزمایش‌هایی که فقط یک دارو تزریق شده است (آزمایش یک و دو) تزریق دارو پنج دقیقه قبل از انجام آزمون اضطراب انجام شده است و در آزمایش سوم که دو دارو تزریق شده است، ابتدا هیستامین و دو دقیقه بعد آپومورفین تزریق شده و پنج دقیقه بعد تزریق دوم (تزریق آپومورفین) آزمون اضطراب به عمل آمده است. بافت شناسی

پس از کشتن حیوانات توسط کلروفورم، با تزریق رنگ متیلن بلو ۴ درصد (۱ μ l) به داخل هر دو کانول، مغز از درون مجسمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده، محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار می‌گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده می‌شد. 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. همچنین، میزان فعالیت حرکتی حیوان نیز به صورت همزمان اندازه‌گیری گردید. نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean \pm S.E.M) ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با بقیه گروه‌ها، از روش تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون مکمل LSD استفاده گردید و اختلاف در سطح $P < 0/05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Sigma Plot استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده

آزمایش اول: اثر هیستامین در هیپوکامپ پستی بر روی 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 هیستامین (۰/۵، ۵، ۱۰ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پستی دریافت کردند.

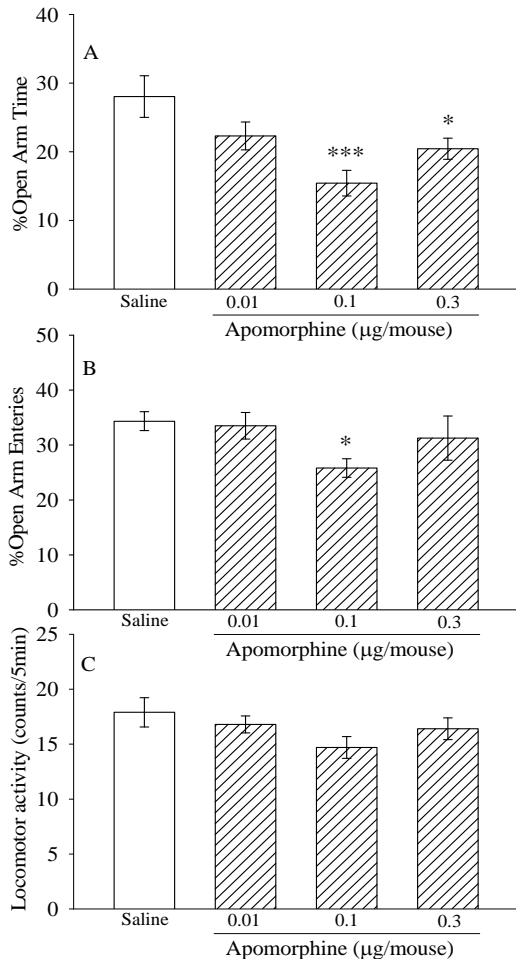
آزمایش دوم: اثر آپومورفین در هیپوکامپ پستی بر روی رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. گروه اول سالین (۱ میکرولیتر بر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون اضطراب و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف آپومورفین (۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۳ میکروگرم بر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون اضطراب به صورت درون مغزی (هیپوکامپ پستی) دریافت کردند.

آزمایش سوم: اثر آپومورفین در هیپوکامپ پستی بر روی رفتار اضطرابی القاء شده توسط هیستامین در موش کوچک آزمایشگاهی در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. تمامی گروه‌ها در مرحله اول مقدار مؤثر هیستامین را به صورت درون مغزی دریافت کردند و بعد از دو دقیقه سالین (۱ میکرو لیتر بر موش) یا مقادیر مختلف آپومورفین (۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۳ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی (هیپوکامپ پستی) دریافت کردند. پنج دقیقه بعد از تزریق دوم از تمامی حیوانات تست اضطراب به عمل آمد.

نتایج

آزمایش اول: اثر هیستامین در هیپوکامپ پستی بر روی رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف هیستامین به ناحیه هیپوکامپ پستی به صورت معنی‌داری

داد که کاهش درصد حضور در بازوی باز در دوزهای (۰/۳)، (۰/۱، ۰/۰۳ میکروگرم بر موش) و کاهش درصد ورود به بازوی باز در دوز (۰/۱ میکروگرم بر موش) از نظر آماری معنی دار می باشد. این نتایج نشان دهنده اضطرابزا بودن آپومورفین در ناحیه هیپوکامپ پشتی می باشد (نمودار شماره ۲).

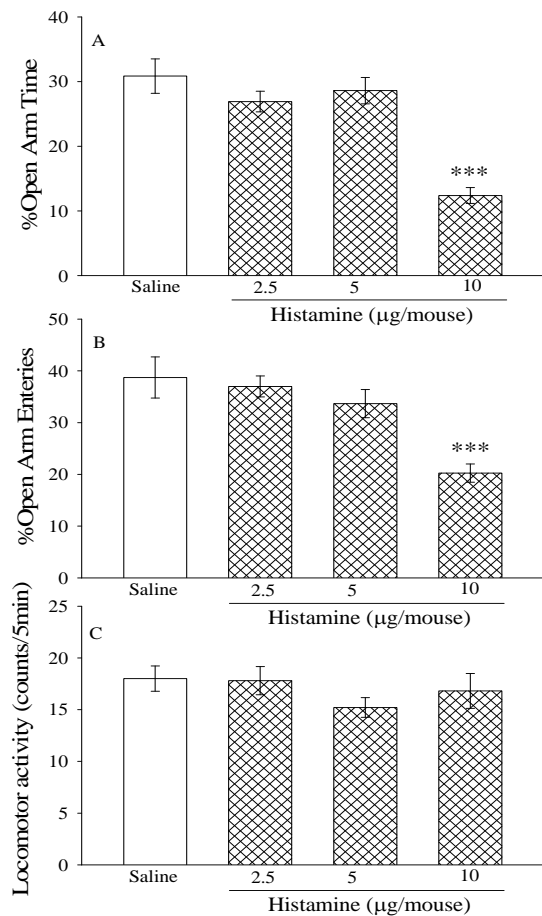


نمودار شماره ۲- اثر تزریق درون مغزی آپومورفین به ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی درصد حضور در بازوی باز، درصد ورود به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. $P < 0.001$ ، $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه سالیین می باشد.

آزمایش سوم: اثر آپومورفین در هیپوکامپ پشتی بر روی رفتار اضطرابی القاء شده توسط هیستامین در موش کوچک آزمایشگاهی

نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف آپومورفین به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش هایی که قبلا دوز مؤثر هیستامین را دریافت کرده اند، به صورت معنی دار درصد زمان حضور در بازوی باز $[F(28,3)=9/62, P<0/001]$ و درصد ورود به بازوی باز $[F(28,3)=13/56, P<0/001]$ را در مقایسه با گروهی که هیستامین را به تنهایی دریافت کرده اند

درصد زمان حضور در بازوی باز $[F(28,3)=9/61, P<0/001]$ و درصد ورود به بازوی باز $[F(28,3)=11/27, P<0/001]$ را کاهش داد، اما بر روی فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی داری ندارد $[F(28,3)=0/85, P>0/05]$. این نتایج نشان دهنده اضطرابزا بودن هیستامین می باشد. به علاوه، آزمون مکمل LSD نشان داد که کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز در دوز (۱۰ میکروگرم بر موش) از نظر آماری معنی دار می باشد (نمودار شماره ۱).



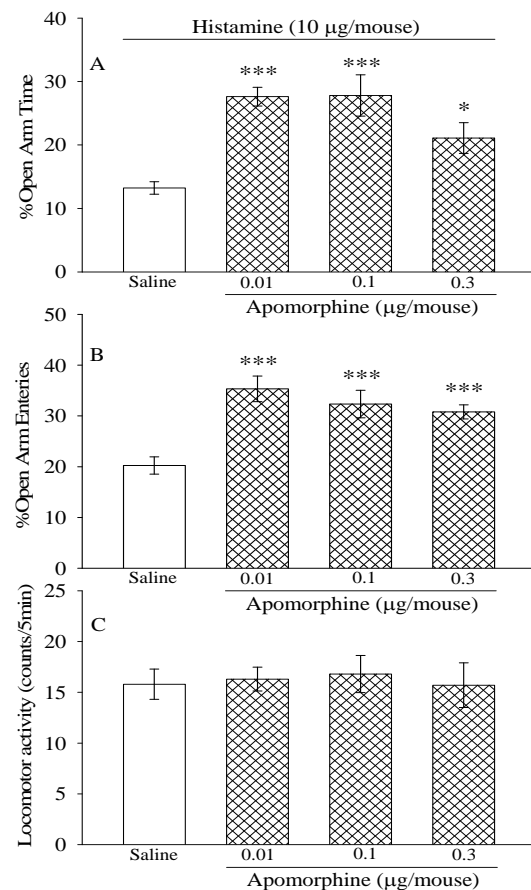
نمودار شماره ۱- اثر تزریق درون مغزی هیستامین به ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی درصد حضور در بازوی باز، درصد ورود به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه سالیین می باشد.

آزمایش دوم: اثر آپومورفین در هیپوکامپ پشتی بر روی رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی

نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف آپومورفین به ناحیه هیپوکامپ پشتی به صورت معنی داری درصد زمان حضور در بازوی باز $[F(28,3)=10/84, P<0/001]$ و درصد ورود به بازوی باز $[F(28,3)=6/27, P<0/001]$ را کاهش می دهد، اما بر روی فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی داری ندارد $[F(28,3)=1/15, P>0/05]$. به علاوه آزمون مکمل LSD نشان

به صورت معنی داری درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز را در موش های کوچک آزمایشگاهی کاهش می دهد، بدون اینکه بر روی فعالیت حرکتی تأثیر بگذارد. این نتایج حاکی از اضطراب زا بودن هیستامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی می باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه هم سو با مطالعه قبلی ما می باشد که با استفاده از دستگاه hole board صورت گرفته بود. نتایج این مطالعه نشان داده بود که تزریق هیستامین باعث کاهش رفتار جستجوگرانه و القاء اضطراب در موش های کوچک آزمایشگاهی می شود [۱۳]. نورون های هیستامینرژیک مغز از هسته tuberomammillaris، منشاء گرفته و بخش وسیعی از مغز و نخاع از جمله هیپوکامپ را عصب دهی می نمایند [۱۴]. هیستامین اثرات خود را از طریق گیرنده های H1، H2 و H3 اعمال می نماید. مطالعات انجام گرفته نشان دهنده اهمیت هیستامین در زمینه رفتار اضطرابی می باشد [۱۵]. به عنوان نمونه، برخی مطالعات نشان می دهند که تزریق هیستامین به بخش مرکزی آمیگدال و بخش شکمی هیپوکامپ باعث القاء اضطراب در تست ماز به علاوه ای شکل مرتفع می شود. همچنین، گزارش شده است که تزریق آگونیست اختصاصی گیرنده های هیستامینی H1 می تواند زمانی که حیوان در بخش روشن دستگاه تست اضطراب جعبه روشن/ تاریک می گذراند، را کاهش دهد. این یافته ها حاکی از اثر اضطراب زای هیستامین می باشد [۱۶-۱۸]. از طرف دیگر نشان داده شده است که استرس هایی که باعث القاء اضطراب می شوند، می توانند رهایش هیستامین از نورون های هیستامینرژیک را افزایش داده و مصرف داروهای ضد اضطراب مانند دیازپام، بنزودیازپین ها و بوسپیرون (آگونیست سروتونینی) سرعت turnover هیستامین در مغز موش صحرایی و موش کوچک آزمایشگاهی را کاهش می دهند [۱۹]. بر خلاف اکثر گزارش هایی که نشان می دهند فعال شدن سیستم هیستامینرژیک در مغز باعث القاء اضطراب و تخریب مراکز هیستامینرژیک باعث کاهش اضطراب می شود [۱۴]، گزارشی نیز وجود دارد که نشان می دهد هیستامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی موش صحرایی دارای اثرات ضد اضطرابی می باشد [۲۰]. هیستامین اثر خود را در هیپوکامپ پشتی به صورت مستقیم یا غیر مستقیم اعمال می نماید. نشان داده شده است که هیپوکامپ، ورودی های هیستامینرژیک را از هسته tuberomammillaris دریافت نموده و این ورودی ها اثرات تحریکی زیادی بر روی نورون های هیپوکامپ دارند. از طرف دیگر نورون های هیستامینرژیک می توانند به صورت غیر مستقیم از طریق نورون های کولینرژیک ناحیه سیتوم، عملکرد نورون های هیپوکامپ را تحت تأثیر قرار دهند [۲۱]. علاوه بر گزارشات فوق، برخی مطالعات نیز

افزایش می دهد، اما بر روی فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی داری ندارد [F(۲۸,۳)=۱/۰۸, P>۰/۰۵]. این نتایج نشان دهنده این مطلب می باشد که آپومورفین قادر به مهار اضطراب القاء شده با هیستامین است. به علاوه آزمون مکمل LSD نشان داد که افزایش درصد زمان حضور در بازوی باز و افزایش درصد ورود به بازوی باز در دوزهای (۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۳ میکروگرم بر موش) از نظر آماری معنی دار می باشد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳- اثر تزریق درون مغزی آپومورفین به ناحیه هیپوکامپ پشتی در حضور هیستامین بر روی درصد حضور در بازوی باز، درصد ورود به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. $P < 0.05$ *، $P < 0.001$ ***، در مقایسه با گروه سالین/ هیستامین می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر برهمکنش هیستامین و آپومورفین در هیپوکامپ پشتی در زمینه رفتار اضطرابی با استفاده از ماز به علاوه ای شکل مرتفع مورد بررسی قرار گرفت. ماز به علاوه ای شکل مرتفع یکی از دستگاه های پذیرفته شده برای بررسی رفتار اضطرابی در جوندگان می باشد، که با استفاده از آن می توان به اثرات اضطراب زا و اضطراب زدای داروهای پی برد. نتایج این پژوهش نشان می دهد که تزریق هیستامین به ناحیه هیپوکامپ پشتی

هیستامین با آپومورفین در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پستی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما در این مطالعه نشان داد که تزریق آپومورفین به موش‌هایی که تحت تأثیر دوز مؤثر هیستامین بوده‌اند، به‌صورت معنی‌داری از القاء اضطراب توسط هیستامین جلوگیری می‌کند. به‌عبارت ساده‌تر با وجود اینکه آپومورفین به‌تنهایی باعث القاء اضطراب می‌شود ولی وقتی همراه با هیستامین تزریق می‌گردد، باعث خنثی نمودن اثر اضطراب‌زای هیستامین می‌گردد. این یافته نشان‌دهنده برهمکنش سیستم دوپامینی با سیستم هیستامینی در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پستی می‌باشد. در برخی از مطالعات قبلی نیز برهمکنش این دو سیستم در زمینه رفتاری نشان داده شده است؛ به‌عنوان نمونه مشخص شده است که حساسیت القاء شده با آپومورفین بر روی فراموشی القاء شده با هیستامین اثر نموده و باعث بهبود حافظه تخریب شده با هیستامین می‌شود [۲۹]. همچنین، گزارش شده است که وابستگی روانی القاء شده با تزریق هیستامین یا پیریلامین به بخش میانی سبوتوم، با پیش تیمار با آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی D1 مهار می‌گردد [۳۰]. علت این برهمکنش‌ها اثر متقابل این دو سیستم بر یکدیگر می‌باشد. مدارک موجود نشان می‌دهند که هیستامین می‌تواند فعالیت دوپامینرژیک را که از ناحیه تگماتوم منشأ گرفته و هیپوکامپ را عصب دهی می‌نمایند تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات فارماکولوژیکی نیز نشان می‌دهند که هیستامین آزادسازی دوپامین از برش‌های برداشته شده از استریاتوم را مهار می‌نماید [۳۱]. در حالی که آنتاگونیست‌های گیرنده‌های هیستامینی H1 بازجذب دوپامین از فضای سیناپسی را مهار نموده و از این طریق باعث فعال‌تر شدن سیستم دوپامینی می‌شوند. این یافته‌ها می‌توانند به‌خوبی توجیه‌کننده نتایج به‌دست آمده در این مطالعه باشند، چرا که می‌توانند بیان‌گر این مسئله باشند که پیش تیمار با هیستامین میزان ره‌ایش دوپامین را کاهش داده و تزریق آپومورفین در دوزهای معمولی عملاً اثر هیستامین تزریق شده را به واسطه تقویت انتقال پیام‌های دوپامینرژیک خنثی می‌نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهند که علاوه بر اینکه سیستم دوپامینی و هیستامینی می‌توانند رفتار اضطرابی را در هیپوکامپ پستی تحت تأثیر قرار دهند، بلکه یک برهمکنش پیچیده بین این دو سیستم وجود دارد؛ به‌گونه‌ای که با وجود اضطراب‌زا بودن خود آپومورفین تزریق آن به موش‌هایی که قبلاً هیستامین دریافت کرده‌اند، باعث مهار اضطراب القاء شده توسط هیستامین می‌شود. به احتمال قوی علت اصلی پاسخ مشاهده شده

نشان می‌دهند که هیستامین با اثر بر روی گیرنده‌های هیستامینی H3 و به‌واسطه کاهش ساخت و افزایش ره‌ایش هیستامین می‌تواند رفتارهای اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهد [۶]. در آزمایش بعدی اثر تزریق آپومورفین (آگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های D1 و D2 دوپامینی) به هیپوکامپ پستی بر روی رفتار اضطرابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق آپومورفین به ناحیه هیپوکامپ پستی باعث کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز شده، بدون اینکه بر روی درصد ورود به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان اثری بگذارد. این نتایج حاکی از اثرات اضطراب‌زای آپومورفین در هیپوکامپ پستی می‌باشد. در راستای نتایج ما برخی از مطالعات پیشین نیز گزارش نموده‌اند اثر اضطراب‌زای آپومورفین توسط سولپیراید (آنتاگونیست گیرنده‌های D2) مهار شده اما آنتاگونیست گیرنده D1 اثری بر پاسخ اضطرابی القاء شده با آپومورفین ندارد [۲۲، ۲۳]. همچنین، مطالعات پیشین نشان می‌دهند که میزان ره‌ایش دوپامین در پی قرارگیری در معرض طیف وسیعی از استرس‌های حاد و مزمن افزایش می‌یابد [۲۴]. نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگماتوم شکمی، نواحی مختلف مغز مانند هسته آکومبوس، پالیدیوم شکمی و هیپوکامپ را عصب دهی می‌کنند [۲۵]. مشخص شده است که مسیرهای ورودی‌های دوپامینرژیک هیپوکامپ پستی می‌توانند رفتار اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهند [۲۶، ۲۷]. دوپامین اثرات خود را از طریق دو نوع گیرنده دوپامینی اعمال می‌نماید. گیرنده‌های گروه D1 که شامل گیرنده‌های D1 و D5 بوده و گیرنده‌های گروه D2 که شامل گیرنده‌های D2، D3 و D4 می‌باشد [۲۸]. مطالعات نشان می‌دهند که گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 در میانجی‌گری اضطراب نقش دارند [۲۶]. با وجود مشخص شدن اهمیت سیستم دوپامینی و گیرنده‌های دوپامینی در فرآیند اضطراب، مطالعات رفتاری انجام شده اثرات متضادی را برای سیستم دوپامینی گزارش نموده‌اند، به‌گونه‌ای که اثرات ضد اضطرابی و اضطراب‌زایی هر دو برای آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های دوپامینی گزارش شده‌اند. این اختلاف پاسخ مشاهده شده در مورد آپومورفین می‌تواند، به‌صورت اصلی نتیجه تفاوت در دوز دارو و محل تزریق دارو در مغز باشد، هر چند نباید عواملی مانند نوع حیوان به‌کار رفته و نوع تست اضطراب استفاده شده را نیز از نظر دور داشت. با توجه به اینکه هیپوکامپ پستی ورودی‌های دوپامینرژیک را از ناحیه تگماتوم شکمی و ورودی‌های هیستامینرژیک را از هسته tuberomammillaris دریافت می‌دارد و هر دو دسته این ورودی‌ها می‌توانند فعالیت نورون‌های هیپوکامپ و رفتار اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهند، در بخش آخر این مطالعه برهمکنش

هیپوکامپ پستی استفاده گردد، که نویسندگان این مقاله در ادامه این پژوهش برای روشن تر شدن ابعاد مختلف این برهمکنش پیچیده قصد انجام آن را دارند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین آزمایشگاه گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

کاهش رهایش دوپامین توسط هیستامین می‌باشد، به عبارت ساده‌تر تزریق اولیه هیستامین باعث کاهش رهایش دوپامین شده و این تضعیف سیستم دوپامینی توسط تزریق آگونیست غیراختصاصی دوپامین (آپومورفین) خنثی می‌گردد. همچنین، این یافته می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که بخشی از اثرات اضطراب‌زای هیستامین در هیپوکامپ پستی توسط سیستم دوپامینی میانجی‌گری می‌شود. با وجود نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد برای اظهار نظر قطعی‌تر در مورد برهمکنش بین این دو سیستم باید از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های اختصاصی دوپامینی به همراه هیستامین در

References:

- [1] Leurs R, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Ruat M, Schwartz JC. Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *J Neurochem* 1994; 62(2): 519-27.
- [2] Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 2001; 63(6): 637-72.
- [3] Traiffort E, Vizuet ML, Tardivel-Lacombe J, Souil E, Schwartz JC, Ruat M. The guinea pig histamine H2 receptor: gene cloning, tissue expression and chromosomal localization of its human counterpart. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211(2): 570-7.
- [4] Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302(5911): 832-7.
- [5] Rizk A, Curley J, Robertson J, Raber J. Anxiety and cognition in histamine H3 receptor-/- mice. *Eur J Neurosci* 2004; 19(7): 1992-6.
- [6] Imaizumi M, Onodera K. The behavioral and biochemical effects of thioperamide, a histamine H3-receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice. *Life Sci* 1993; 53(22): 1675-83.
- [7] Boix F, Sandor P, Nogueira PJ, Huston JP, Schwarting RK. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neuroscience* 1995; 64(4): 1045-55.
- [8] De Souza Silva MA, Mattern C, Hacker R, Nogueira PJ, Huston JP, Schwarting RK. Intranasal administration of the dopaminergic agonists L-DOPA, amphetamine, and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: a microdialysis study in the rat. *J Neurochem* 1997; 68(1): 233-9.
- [9] Suzuki T, Mori T, Tsuji M, Nomura M, Misawa M, Onodera K. Evaluation of the histamine H1-antagonist-induced place preference in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81(4): 332-8.
- [10] Goldsmith SK, Joyce JN. Dopamine D2 receptor expression in hippocampus and parahippocampal cortex of rat, cat, and human in relation to tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers. *Hippocampus* 1994; 4(3): 354-73.
- [11] Healy DJ, Meador-Woodruff JH. Dopamine receptor gene expression in hippocampus is differentially regulated by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Eur J Pharmacol* 1996; 306(1-3): 257-64.
- [12] Paxinos G, Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. Academic Press. 2001.
- [13] 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.
- [14] Frisch C, Hasenohrl RU, Krauth J, Huston JP. Anxiolytic-like behavior after lesion of the tuberomammillary nucleus E2-region. *Exp Brain Res* 1998; 119(2): 260-4.
- [15] 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.
- [16] Rostami P, Hajizadeh-Moghaddam A, Zarrindast MR. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. *Physiol Behav* 2006; 87(5): 891-6.
- [17] 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.
- [18] 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.

[19] Yamatodani A, Fukuda H, Wada H, Iwaeda T, Watanabe T. High performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples: cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry. *J Chromatogr* 1985; 344: 115-23.

[20] Zarrindast MR, Torabi M, Rostami P, Fazli-Tabaei S. The effects of histaminergic agents in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85(3): 500-6.

[21] Greene RW, Haas HL. Effects of histamine on dentate granule cells in vitro. *Neuroscience* 1990; 34(2): 299-303.

[22] Tseng KY, O'Donnell P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involves multiple signaling mechanisms. *J Neurosci* 2004; 24(22): 5131.

[23] Del Arco A, Mora F. Prefrontal cortex-nucleus accumbens interaction: in vivo modulation by dopamine and glutamate in the prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90(2): 226-35.

[24] Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci* 1996; 16(15): 4787-98.

[25] Wittmann BC, Schott BH, Guderian S, Frey

JU, Heinze HJ, Duzel E. Reward-related FMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. *Neuron* 2005; 45(3): 459-67.

[26] Adriani W, Felici A, Sargolini F, Roullet P, Usiello A, Oliverio A, et al. N-methyl-D-aspartate and dopamine receptor involvement in the modulation of locomotor activity and memory processes. *Exper Brain Res* 1998; 123(1): 52-9.

[27] Puglisi-Allegra S, Imperato A, Angelucci L, Cabib S. Acute stress induces time-dependent responses in dopamine mesolimbic system. *Brain Res* 1991; 554(1-2): 217-22.

[28] Sealfon SC, Olanow CW. Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci* 2000; 23(10 Suppl): S34-40.

[29] Zarrindast MR, Khalilzadeh A, Malek-mohammadi N, Fazli-Tabaei S. Influence of morphine- or apomorphine-induced sensitization on histamine state-dependent learning in the step-down passive avoidance test. *Behav Brain Res* 2006; 171(1): 50-5.

[30] Zarrindast MR, Moghimi M, Rostami P, Rezayof A. Histaminergic receptors of medial septum and conditioned place preference: D1 dopamine receptor mechanism. *Brain Res* 2006; 1109(1): 108-16.

[31] Prast H, Heistracher M, Philippu A. Modulation by dopamine receptors of the histamine release in the rat hypothalamus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347(3): 301-5.