

مقاله پژوهشی

تحریک عمقی مغز در ناحیه هیپوتالاموس کناری میزان گیرنده‌های دوپامینی را در قشر پیش‌پیشانی موش‌های صحرائی وابسته به مورفین تغییر می‌دهد

قربانگل اصحابی، مژده فتاحی، سید مرتضی کریمیان، اسماعیل ریاحی*

دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

پذیرش: ۱۶ آذر ۱۳۹۸

دریافت: ۱۲ آبان ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: هیپوتالاموس کناری ساختاری مهم در مدار پاداشی مغز است و مطالعات نشان داده‌اند که تحریک عمقی پرفرانس مغز در این ناحیه می‌تواند از ایجاد وابستگی روانی به مورفین در موش صحرائی جلوگیری کند. در این مطالعه تاثیر تحریک عمقی مغز در هیپوتالاموس کناری بر میزان گیرنده‌های دوپامینی قشر پیش‌پیشانی بررسی شده است.

روش‌ها: الکترودهای تحریکی به صورت دوطرفه در هیپوتالاموس کناری کار گذاشته شدند. موش‌ها در چهار گروه جای گرفتند: مورفین - تحریک عمقی پرفرانس، سالین - تحریک عمقی پرفرانس، مورفین - شام، سالین - شام. مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سالین در چهار روز تزریق شدند و پس از هر تزریق، تحریک عمقی مغز (پالس‌های مربعی با شدت ۱۵۰ میکروآمپر، پهنای ۱۰۰ میکروثانیه و فرکانس ۱۳۰ هرتز) یا تحریک شام به مدت ۳۰ دقیقه مطابق با گروه مربوطه انجام شد. یک روز پس از آخرین تزریق، قشر پیش‌پیشانی جدا شد و برای سنجش میزان گیرنده‌های دوپامینی و c-fos mRNA مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: درمان با مورفین میزان گیرنده‌های D1 را افزایش و گیرنده‌های D2 را کاهش داد و بر گیرنده‌های D3، D4 و D5 تاثیر معنی‌داری نداشت. تحریک عمقی مغز در گروه دریافت کننده مورفین توانست از افزایش گیرنده‌های D1 جلوگیری کند، گیرنده‌های D5 را کاهش دهد، و گیرنده‌های D2 و D3 را افزایش دهد ولی بر گیرنده‌های D4 تاثیری نداشت. مورفین بیان c-fos mRNA را کاهش داد و تحریک عمقی مغز توانست این اثر را برگرداند.

نتیجه‌گیری: تحریک عمقی پرفرانس مغز در هیپوتالاموس کناری می‌تواند سیستم دوپامینی مغز را بویژه در قشر پیش‌پیشانی دستخوش تغییر نماید.

واژه‌های کلیدی: تحریک عمقی مغز، گیرنده‌های دوپامینی، مورفین، موش صحرائی، هیپوتالاموس کناری

مقدمه

بیش‌فعالی مسیر پاداشی مغز در اثر برخی مواد و پیامدهای آسیب‌زای آن یکی از نگرانی‌های عمده سلامت در جهان می‌باشد. به تازگی، تحریک عمقی پرفرانس مغز^۱ به عنوان یک مداخله نوپدید برای درمان اختلالات عصبی-روانی مقاوم به درمان مانند اختلالات کنترل تکانشی و اعتیاد پیشنهاد شده است [۱]. هر چند مکانیسم درمانی DBS در بیش‌فعالی مدار پاداش هنوز مشخص نیست، اما چندین ناحیه از مغز به عنوان هدف بالقوه درمان با DBS برای اختلال سوء

مصرف مواد پیشنهاد شده‌اند [۲].

هیپوتالاموس کناری^۲ پاره‌ای از رفتارهای مرتبط با پاداش را کنترل می‌نماید. تحریک این ناحیه می‌تواند نورون‌های دوپامینی ناحیه تگمنتال شکمی^۳ را فعال نموده و باعث رهایش دوپامین در هسته آکومبنس^۴ شود. هر دوی این نواحی در پاداش و اعتیاد نقش دارند [۳]. افزون بر این، هیپوتالاموس کناری با بسیاری از هسته‌های دیگر مانند هابنولای کناری،

² Lateral hypothalamus (LH)

³ Ventral tegmental area (VTA)

⁴ Nucleus accumbens (NAc)

¹ High-frequency deep brain stimulation (HF-DBS)

گرم در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلکسی گلاس نگهداری شدند. چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی از ۷ صبح تا ۷ عصر) و دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ حفظ شد و حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. همه آزمایش‌ها و مداخلات انجام شده مطابق با دستورالعمل وزارتخانه‌ای کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده است و از سوی کارگروه اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران بررسی و مورد تایید قرار گرفت (IR.TUMS.MEDICINE.REC.1396.2636).

جراحی و تحریک عمقی مغز

موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوط کنامین و زایلازین (به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن) بیهوش و در دستگاه استریوتاکسی (Stoelting, USA) جای داده شدند. الکترودهای دوقطبی از جنس فولاد زنگ‌نزن با پوشش پرفلوروالکوکسی آلکان (A-M Systems, USA) و با قطر برهنه ۱۲۷ میکرومتر به صورت دو طرفه در هیپوتالاموس کناری کار گذاشته شدند. مختصات این ناحیه بر اساس اطلس پاکسینوس ۱/۸ میلیتر پشت برگما، ۲ میلیتر در اطراف خط وسط، و ۸/۲ میلیتر زیر سطح جمجمه بوده است. الکترودها با پیچ‌های ظریف کار گذاشته در استخوان جمجمه و سیمان اکریل دندانپزشکی در محل خود محکم شدند. موش‌ها پس از جراحی به مدت ۲۴ ساعت به صورت جداگانه و سپس به صورت گروهی در قفس‌های خود نگهداری شدند تا دوره بهبودی ۵ روزه را بگذرانند [۱۱].

برای تحریک عمقی مغز پالس‌های الکتریکی (جریان مستقیم) مربعی تک فازی با بلندای ۱۵۰ میکروآمپر، پهنای ۱۰۰ میکروثانیه و فرکانس ۱۳۰ هرتز توسط دو استیمولاتور جریان-پایه (Science Beam, Iran) از راه دو کابل پهن چهاررشته‌ای متصل به الکترودهای کار گذاشته شده در مغز به هیپوتالاموس کناری هر دو طرف داده شد [۱۱]. این الگوی تحریک مشابه الگوهای استفاده شده در پژوهش‌های حیوانی و نیز در انسان می‌باشد [۱۳]. موش‌ها DBS را در چهار روز پی‌درپی هر بار به مدت ۳۰ دقیقه دریافت نمودند. در گروه‌های شم کابل‌ها به الکترودها متصل شدند ولی هیچ گونه تحریکی داده نشد.

طراحی آزمایش‌ها

موش‌ها پس از دوره بهبودی به صورت تصادفی به چهار

پالیدوم شکمی، آمیگدال، هیپوکمپ، و قشر پیش‌پیشانی ارتباط دارد [۴]. فعال شدن گیرنده‌های اوبیوتیدی باعث افزایش سرعت فایرینگ نورون‌های دوپامینی VTA از راه مهار نورون‌های بینابینی گابایی می‌شود [۵]. بنابراین، با در نظر گرفتن ارتباطات ساختاری و عملکردی LH و VTA، تحریک LH می‌تواند با تغییر فعالیت سیستم دوپامینی موجب تداخل در مکانیسم‌های مسوول اعتیاد به مورفین گردد.

گیرنده‌های دوپامینی دو نوع هستند: شبه D1 (شامل گیرنده‌های D1 و D5) و شبه D2 (شامل گیرنده‌های D2، D3 و D4) [۶]. دوپامین یک میانجی شناخته شده در مغز پستانداران است که در مدار پاداش، انگیزش، و کنترل حرکت درگیر است. هر دو دسته گیرنده‌های دوپامینی به فراوانی در قشر پیش‌پیشانی یافت می‌شوند. افزون بر این، گیرنده‌های D1 و D3 بویژه در تغییرات رفتاری ناشی از مواد مورد سوء مصرف درگیر هستند. آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده D1 فعالیت حرکتی ناشی از مصرف مواد، شرطی شدن مکانی و رفتار جستجوی هروئین را تعدیل می‌کنند. همچنین لیگاند‌های گیرنده D3 اثرات مورفین مانند خودتجویزی، بیش‌فعالی، و شرطی شدن مکانی ناشی از آن را تغییر می‌دهند [۷]. بعلاوه، فعالیت سیستم دوپامینی با بیان ژن c-fos در قشر پیش‌پیشانی همراه بوده است که شکل‌پذیری نورونی ناشی از محرک‌های پاداشی را تقویت می‌نماید [۸].

نورون‌های دوپامینی مدار پاداش در هنگام مواجهه با مورفین فعال شده و تمایل به سوءمصرف مواد را افزایش می‌دهند [۹]. ولی پیشنهاد شده است که فعال شدن انواع مختلف گیرنده‌های دوپامینی می‌تواند نتایج ناهمسویی بر رفتارهای مرتبط با پاداش داشته باشد [۱۰]. ما در مطالعه گذشته خود نشان دادیم که DBS پرفرکانس در LH تأثیری پیشگیرانه و کاهشی بر ایجاد پاداش مورفینی در مدل‌گرایش به مکان شرطی دارد [۱۱]. اکنون و با توجه به نقش پراهمیت قشر پیش‌پیشانی در رفتار جستجوی مواد [۱۲]، در مطالعه پیش رو به بررسی تأثیر DBS پرفرکانس در LH بر میزان بیان گیرنده‌های دوپامینی در این ناحیه پرداختیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۳۰ تا ۲۵۰

گروه ۸ تایی تقسیم شدند: سالین-شم، مورفین-شم، سالین-DBS و مورفین-DBS. گروه‌های شم در چهار روز پی‌درپی سالین یا مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن) را با تزریق زیرپوستی دریافت نمودند ولی با وجود وصل نمودن سیم‌ها به سر DBS دریافت نکردند. گروه‌های DBS در چهار روز سالین یا مورفین را به همراه DBS (به مدت ۳۰ دقیقه) دریافت کردند. در مطالعه قبلی نشان داده شد که این الگوی تزریق مورفین می‌تواند وابستگی روانی به مورفین را در مدل گریش به مکان شرطی ایجاد نماید [۱۱]. موش‌ها یک روز پس از آخرین تزریق سالین یا مورفین، با کتامین و زایلازین بیهوش شدند و سر آن‌ها با گیوتین جدا شد. مغز بی‌درنگ درآورده شد و قشر پیش‌پیشانی جدا و در نیتروژن مایع قرار داده شد تا از تخریب پروتئین‌ها و mRNA جلوگیری شود. پس از ۲۴ ساعت همه نمونه‌ها به فریزر -80°C منتقل و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در آنجا نگهداری شدند. از هر گروه مغز چهار موش برای آزمایشات وسترن بلات و مغز چهار موش دیگر برای آزمایشات PCR استفاده شد.

Real-time PCR

RNA تام نمونه‌های قشر پیش‌پیشانی با استفاده از کیت RNAeasy lipid tissue mini kit و مطابق با دستورالعمل سازنده (Qiagen, USA) استخراج شد. مقدار و درجه خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد. همچنین یکپارچگی RNA با روش الکتروفورز ژل آگاروز (۰.۸٪ agarose; Gibco/BRL) بررسی شد. سپس ساخت cDNA از RNA استخراج شده با استفاده از کیت PrimeScript First-Strand (Takara, Japan) انجام شد. یک میکروگرم از RNA تام در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به cDNA رونویسی معکوس گردید. آنگاه ۲ میکرولیتر cDNA میکرولیتر پرایمر c-fos یا اکتین بتا (Qiagen primer bank) و SYBR Green Master Mix (Takara, Japan) مطابق با روش پیشنهادی سازنده در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با هم مخلوط شدند و با استفاده از سیستم StepOnePlus Real-time PCR (Applied Biosystems) هدف real-time PCR قرار گرفتند. دمای همتابی c-fos در 60°C تنظیم شد. اختصاصی بودن فرآورده‌های PCR برای هر ژن با مشاهده یک قله در منحنی ذوب و نیز آشکارسازی در ژل آگاروز ۲٪ تایید شد. توالی پرایمرها و اندازه آن‌ها در جدول ۱ گزارش شده است.

بررسی آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین^۹ گزارش شد. داده‌های وسترن بلات (تعداد ۴ نمونه) با آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون پیگیری توکی^{۱۰} در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ آنالیز شد. داده‌های بیان ژن (تعداد ۴ نمونه) با نرم‌افزار Relative Expression نسخه ۲ آنالیز شد. این نرم‌افزار تفاوت در بیان نسبی ژن در نمونه را نسبت به گروه کنترل تعیین می‌کند. p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شده است.

^۹ Standard error of mean (SEM)

^{۱۰} Tukey post hoc

گروه ۸ تایی تقسیم شدند: سالین-شم، مورفین-شم، سالین-DBS و مورفین-DBS. گروه‌های شم در چهار روز پی‌درپی سالین یا مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن) را با تزریق زیرپوستی دریافت نمودند ولی با وجود وصل نمودن سیم‌ها به سر DBS دریافت نکردند. گروه‌های DBS در چهار روز سالین یا مورفین را به همراه DBS (به مدت ۳۰ دقیقه) دریافت کردند. در مطالعه قبلی نشان داده شد که این الگوی تزریق مورفین می‌تواند وابستگی روانی به مورفین را در مدل گریش به مکان شرطی ایجاد نماید [۱۱]. موش‌ها یک روز پس از آخرین تزریق سالین یا مورفین، با کتامین و زایلازین بیهوش شدند و سر آن‌ها با گیوتین جدا شد. مغز بی‌درنگ درآورده شد و قشر پیش‌پیشانی جدا و در نیتروژن مایع قرار داده شد تا از تخریب پروتئین‌ها و mRNA جلوگیری شود. پس از ۲۴ ساعت همه نمونه‌ها به فریزر -80°C منتقل و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در آنجا نگهداری شدند. از هر گروه مغز چهار موش برای آزمایشات وسترن بلات و مغز چهار موش دیگر برای آزمایشات PCR استفاده شد.

سنجش پروتئین با روش وسترن بلات

نمونه‌های بافتی قشر پیش‌پیشانی در بافر RIPA محتوی مهارگرهای پروتئازها له و هم‌زده شدند. نمونه‌های همگن شده با شتاب $12000 \times g$ در دمای 4°C سانتریفوژ شدند. محتوای پروتئینی تام رومانده^۵ با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد مرجع تعیین گردید. سپس ۶۰ میکروگرم از پروتئین تام هر نمونه با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات^۶ جداسازی و به روی کاغذ پلی‌وینیلیدن دی‌فلوراید^۷ برده شدند. آنگاه کاغذ آغشته به پروتئین‌ها ابتدا در محلول ۱ در ۱۰۰۰ آنتی‌بادی اولیه برای گیرنده‌های دوپامینی D1, D2, D3, D4 یا D5 (Cell Signaling, USA) و سپس در محلول ۱ در ۳۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه (Cell Signaling, USA) خوابانده شد. پس از سه بار شستشوی کاغذ با بافر تریس توئین دار^۸ و اکشن ایمنی پروتئین‌ها با روش نورتابی شیمیایی افزوده با استفاده از کیت

^۵ Supernatant

^۶ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

^۷ Polyvinylidene difluoride

^۸ Tris-buffered saline and Tween 20 (TBST)

جدول ۱- توالی و اندازه پرایمرهای c-fos و β -actin

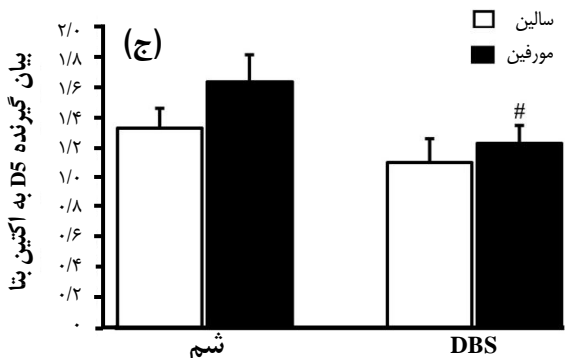
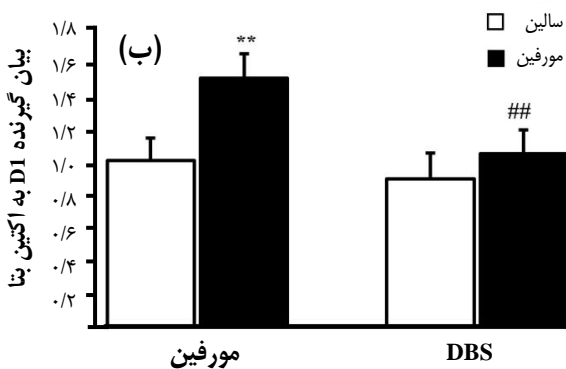
نام پرایمر	نوع توالی	توالی (5'→3')	اندازه توالی (bp)
c-fos	پیشرو	GGCAAAGTAGAGCAGCTATCTCTCT	۱۰۶
	وارونه	TCAGCTCCCTCCTCCGATTC	
Beta-actin	پیشرو	GATATCGCTGCGCTCGTC	۲۰۲

یافته‌ها

تأثیر مورفین و DBS بر میزان گیرنده‌های شبه D1
قشر پیش‌پیشانی

شکل ۱ الف یک نمونه از بلات‌های گیرنده‌های دوپامینی شبه D1 را در بافت قشر پیش‌پیشانی نشان می‌دهد. آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بیان گیرنده D1 نشان داد که یک تفاوت آماری معنادار کلی بین گروه‌ها وجود دارد [F(۳,۲۸) = ۱/۸۷, $p < ۰/۰۵$]. همانگونه که در شکل ۱ ب پیداست تزریق مورفین (۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن) برای چهار روز پیاپی در مقایسه با تزریق سالین میزان پروتئین گیرنده‌های D1 را افزایش داده است ($p < ۰/۰۱$). اعمال DBS در هیپوتالاموس کناری باعث کاهش بیان این گیرنده نسبت به گروه مورفین-شم ($p < ۰/۰۱$) و رسیدن آن به سطح موجود در گروه سالین-شم شده است ($p < ۰/۰۵$). آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بیان گیرنده D5 نیز نشان داد که یک تفاوت آماری معنادار کلی بین گروه‌ها وجود دارد [F(۳,۲۸) = ۰/۹۶, $p < ۰/۰۵$]. شکل ۱ ج نشان می‌دهد که مورفین میزان پروتئین گیرنده‌های D5 را تغییر نداد ($p < ۰/۰۵$), ولی به کار بردن DBS در موش‌های دریافت کننده مورفین باعث کاهش معنی‌دار میزان پروتئین گیرنده‌های D5 نسبت به گروه مورفین تنها ($p < ۰/۰۵$) و نزدیک‌تر شدن بیشتر آن به گروه‌های سالینی شده است ($p < ۰/۰۵$).

گفتنی است که به کار بردن DBS به همراه تزریق سالین باعث تغییری در گیرنده‌های شبه D1 نشده است. بنابراین مورفین تمایل به افزایش گیرنده‌های شبه D1 در قشر پیش‌پیشانی داشته است و افزودن DBS آن را به سطح طبیعی برگرداند.

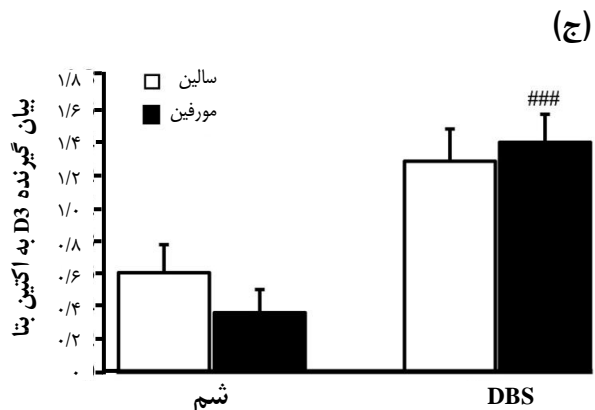
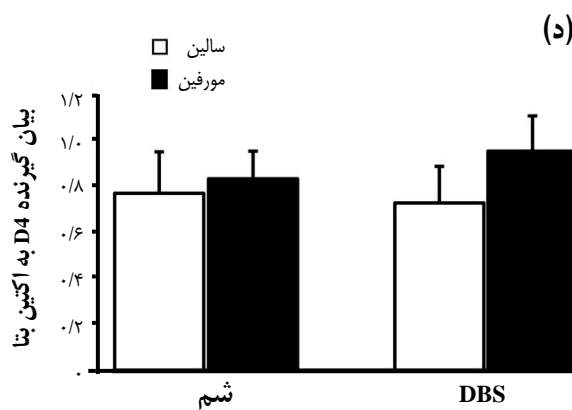
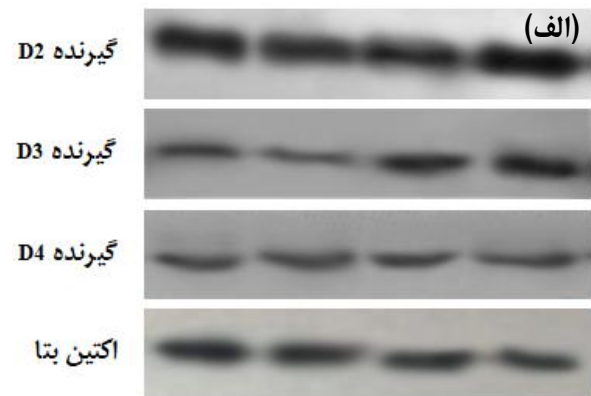
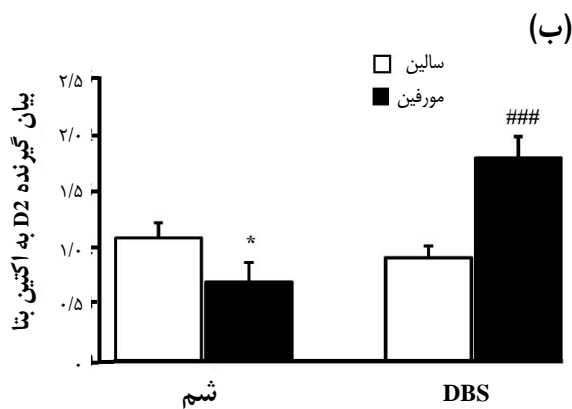


شکل ۱- سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی شبه D1 (D1 و D5). نمونه بلات‌ها (الف) و نمایش داده‌های مربوط به نسبت دانسیته گیرنده D1 به دانسیته اکتین بتا (ب) و نسبت دانسیته گیرنده D5 به دانسیته اکتین بتا (ج) در قشر پیش‌پیشانی. سنجش دانسیته با نرم افزار ImageJ انجام و به صورت واحد اختیاری (arbitrary unit) گزارش شد. ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm خطای معیار می‌باشند (تعداد ۴ نمونه). **: $p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه سالین-شم؛ # و ###: به ترتیب $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه مورفین-شم.

واریانس داده‌های مربوط به بیان گیرنده D3 نشان داد که یک تفاوت آماری معنادار کلی بین گروه‌ها وجود دارد [$p < 0/05$ ، $F(3,28) = 1/01$]. شکل ۲ج نشان می‌دهد که مورفین سطح پروتئین گیرنده‌های D3 را نسبت گروه سالین تغییر نداد ($p < 0/05$). از طرفی، همراه کردن DBS با تزریق مورفین و سالین باعث افزایش چشمگیر در هر دو گروه شده است ($p < 0/001$). از طرفی، آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بیان گیرنده D4 نشان داد که تفاوت آماری معنادار کلی بین گروه‌ها وجود ندارد [$F(3,28) = 0/83$ ، $p < 0/05$]. شکل ۲د نشان می‌دهد که هیچ یک از مداخلات یاد شده تاثیری بر میزان پروتئین گیرنده D4 در نمونه‌های بافتی قشر پیش‌پیشانی نداشته است ($p < 0/05$). بنابراین، در مقایسه با دادن مورفین به تنهایی، به کار بردن همزمان DBS میزان گیرنده‌های D2 و D3 را افزایش داده است.

تاثیر مورفین و DBS بر میزان گیرنده‌های شبه D2 قشر پیش‌پیشانی

شکل ۲الف یک نمونه از بلات‌های گیرنده‌های دوپامینی شبه D2 را در قشر پیش‌پیشانی نشان می‌دهد. آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بیان گیرنده D2 نشان داد که یک تفاوت آماری معنادار کلی بین گروه‌ها وجود دارد [$F(3,28) = 1/66$ ، $p < 0/05$]. همانگونه که در شکل ۲ب پیداست تزریق مورفین (۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن) در چهار روز باعث کاهش پروتئین گیرنده‌های دوپامینی D2 در بافت قشر پیش‌پیشانی نسبت گروه دریافت کننده سالین شده است ($p < 0/05$). به کار بردن همزمان DBS اما باعث افزایش چشمگیر پروتئین این گیرنده نسبت به گروه مورفین تنها ($p < 0/001$) و حتی به بیش از میزان طبیعی آن در گروه دریافت کننده سالین شده است ($p < 0/01$). همچنین، آنالیز



شکل ۲ - سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی شبه D2 (D2، D3، D4) نمونه بلات‌ها (الف) و نمایش داده‌های مربوط به نسبت دانسیته D2R به دانسیته اکتین بتا (ب)، نسبت دانسیته D3R به اکتین بتا (ج)، و نسبت دانسیته D4R به اکتین بتا (د) در قشر پیش‌پیشانی. سنجش دانسیته با نرم افزار ImageJ انجام و به صورت واحد اختیاری (arbitrary unit) گزارش شد. ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm خطای معیار می‌باشند (تعداد ۴ نمونه). *؛ $p < 0/05$ در مقایسه با گروه سالیین - شم؛ ###؛ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه مورفین - شم.

تاثیر مورفین و DBS بر بیان ژن c-fos در قشر پیش‌پیشانی

جدول ۲ سطح mRNA ژن c-fos را در قشر پیش‌پیشانی نشان می‌دهد. تجویز مورفین mRNA ژن c-fos را در مقایسه با گروه سالین کاهش داده است ($p < 0.01$). به کار بردن DBS باعث افزایش mRNA این ژن در هر دو گروه دریافت دارنده مورفین و سالین شد ($p < 0.01$).

بحث

دوپامین رفتارهای هیجانی و انگیزشی را از راه مسیر دوپامینی مزولیمبیک مغز تنظیم می‌کند. تغییر در انتقال عصبی در مسیر مزولیمبیک پاسخ‌های رفتاری به بسیاری از محرک‌های محیطی مرتبط با پاداش را تعدیل می‌کند. داروهای روانگردان، مواد مورد سوء مصرف، و پاداش‌های طبیعی مانند غذا می‌توانند باعث تغییرات سیناپسی اساسی در مسیر دوپامینی مزولیمبیک شوند [۱۰]. برای مثال نشان داده شده است که تحریک الکتریکی پاداش‌آور در LH و نیز تقویت این پاسخ توسط مورفین در موش‌های بدون گیرنده D2 کاهش می‌یابد [۱۴]. افزون بر این، نشان داده شده است که در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده مورفین سطح گلوتامات در هسته آکومبیس و پالیدوم شکمی افزایش و سطح گابا در این نواحی و نیز در ناحیه تگمنتال شکمی کاهش می‌یابد که گویای افزایش انتقال عصبی تحریکی در این نواحی است. به کار بردن DBS در هسته آکومبیس یک طرف در موش‌های مورفینی سطح گلوتامات را در هر سه ناحیه کاهش و سطح گابا را افزایش می‌دهد. بنابراین DBS در هسته آکومبیس می‌تواند بیش‌فعالی انتقال عصبی تحریکی در مسیر دوپامینی مزولیمبیک را مهار نماید [۱۵].

در این راستا یافته‌های مطالعه ما نشان داد که DBS در هیپوتالاموس تمایل به کاهش گیرنده‌های دوپامینی شبه D1 در قشر پیش‌پیشانی در موش‌های دریافت‌کننده مورفین و بازگرداندن آن به سطح طبیعی داشت. این یافته با گزارش قبلی در موش‌های وابسته به کوکائین همخوانی دارد [۱۶]. چنین پنداشته می‌شود که گیرنده‌های شبه D1 در بازگشت به مصرف مواد درگیر است [۱۷]. بنابراین، یافته مطالعه پیشین ما که گویای تاثیر پیشگیرانه DBS بر ایجاد پاداش مورفینی بوده است احتمالاً توسط تنظیم کاهشی گیرنده‌های شبه D1 میانجیگری شده است. همچنین، مورفین تمایل به کاهش گیرنده‌های D2 داشته است، در حالی که DBS این گیرنده‌ها و نیز گیرنده‌های D3 را افزایش داده است. بنابراین به نظر می‌رسد ایجاد وابستگی به مورفین با کاهش گیرنده‌های D2 در قشر پیش‌پیشانی همراه است و احتمالاً DBS با افزایش سطح این گیرنده‌ها و نیز گیرنده‌های D3 از ایجاد وابستگی جلوگیری می‌نماید.

یک مطالعه قبلاً نشان داده است که پس از فاز وابستگی، زمانی که دیگر مواد در دسترس نیستند، یک فعال‌کننده پیام‌رسانی پروتئین G^{۱۳}- در قشر پیش‌پیشانی افزایش می‌یابد و منجر به محدود ساختن پیام‌رسانی گیرنده D2 و افزایش پیام‌رسانی گیرنده D1 در این ناحیه می‌شود [۱۸]. این تغییرات در پیام‌رسانی گیرنده‌های دوپامینی در قشر پیش‌پیشانی باعث افزایش پاسخ نورون‌های این ناحیه به نشانه‌های (cue) مرتبط با مواد می‌شود [۱۹]. این گزارش تایید می‌نماید که DBS احتمالاً از راه جلوگیری از چنین تغییراتی در گیرنده‌های دوپامینی از ایجاد وابستگی به مورفین پیشگیری می‌کند.

مطالعه ما همچنین نشان داد که بیان c-fos mRNA در قشر پیش‌پیشانی در پی اعمال DBS در هیپوتالاموس کناری افزایش می‌یابد. این یافته با گزارش دیگری که گویای افزایش در میزان c-fos در ناحیه اینفرالیمبیک پیش‌پیشانی پس از دادن DBS در استریاتوم شکمی بوده است شباهت دارد [۱۳]. بنابراین کاهش بیان این ژن با تجویز مورفین و سپس افزایش آن با انجام DBS شاید نمایانگر یکی دیگر از مکانیسم‌های عمل DBS در جلوگیری از ایجاد پاداش مورفینی باشد.

جدول ۲- سطح بیان c-fos mRNA در قشر پیش‌پیشانی

ارزش p	سطح بیان c-fos (چند برابر تغییر mRNA)	گروه‌ها
-	1.00 ± 0.0	سالین-شم
* 0.01	0.50 ± 0.19	مورفین-شم
-	1.73 ± 0.13	سالین-DBS
# 0.001	1.24 ± 0.16	مورفین-DBS

* $p < 0.05$ در مقایسه با گروه سالین-شم و # $p < 0.05$ در مقایسه با گروه مورفین-شم.

¹¹ Activator of G protein signaling 3

نتیجه گیری

روی هم رفته، این یافته‌ها نشان می‌دهند که انجام DBS پرفرکانس در ناحیه هیپوتالاموس کناری تغییراتی در سطح گیرنده‌های دوپامینی شبه D1 و شبه D2 و نیز فعالیت نورون‌ها در قشر پیش‌پیشانی ایجاد می‌کند. این تغییرات شاید توجیه‌گر تاثیر DBS در محدود ساختن ویژگی‌های اعتیادی مورفین باشند.

سیاسگزاری

نویسندگان از تامین سرمایه لازم برای انجام این کار توسط

دانشگاه علوم پزشکی تهران (شماره طرح ۹۶-۰۱-۳۰-۳۴۳۹۲) قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ا.ر.: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ف.: انجام مطالعه و نمونه گیری بافتی؛ س.م.ک.: آنالیز آماری؛ ق.ا.: انجام وسترن بلات و سنجش بیان ژن و نگارش مقاله.

فهرست منابع

- [1] Kuhn J, Moller M, Muller U, Bogerts B, Mann K, Grundler TO Deep brain stimulation for the treatment of addiction. *Addiction* 106 (2011) 1536-1537.
- [2] Evans MC, Clark VW, Manning PJ, De Ridder D, Reynolds JN, Optimizing deep brain stimulation of the nucleus accumbens in a reward preference rat model. *Neuromodulation* 18 (2015) 531-540.
- [3] Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moonman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA, Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res* 1314 (2010) 74-90.
- [4] Herkenham M, Nauta WJ, Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol* 173 (1977) 123-146.
- [5] Johnson SW, North RA, Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12 (1992) 483-488.
- [6] Gingrich JA, Caron MG, Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16 (1993) 299-321.
- [7] Wang YP, Wei SG, Zhu YS, Zhao B, Xun X, Lai JH, Dopamine receptor D1 but not D3 essential for morphine-induced conditioned responses. *Genet Mol Res* 14 (2015) 180-189.
- [8] Beninger RJ, Dopamine and incentive learning: a framework for considering antipsychotic medication effects. *Neurotox Res* 10 (2006) 199-209.
- [9] Diana M, The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry* 2 (2011) 64.
- [10] Baik JH, Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* 7 (2013) 152.
- [11] Fattahi M, Ashabi G, Karimian SM, Riahi E, Preventing morphine reinforcement with high-frequency deep brain stimulation of the lateral hypothalamic area. *Addict Biol* 24 (2019) 685-695.
- [12] Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD, Unbalanced neuronal circuits in addiction. *Curr Opin Neurobiol* 23 (2013) 639-648.
- [13] Martinez-Rivera FJ, Rodriguez-Romaguera J, Lloret-Torres ME, Do Monte FH, Quirk GJ, Barreto-Estrada JL, Bidirectional modulation of extinction of drug seeking by deep brain stimulation of the ventral striatum. *Biol Psychiatry* 80 (2016) 682-690.
- [14] Elmer GI, Pieper JO, Levy J, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK, Wise RA, Brain stimulation and morphine reward deficits in dopamine D2 receptor-deficient
- [15] Yan N, Chen N, Zhu H, Zhang J, Sim M, Ma Y, Wang W, High-frequency stimulation of nucleus accumbens changes in dopaminergic reward circuit. *PLoS One* 8 (2013) e79318.
- [16] Creed M, Pascoli VJ, Luscher C, Addiction therapy. Refining deep brain stimulation to emulate optogenetic treatment of synaptic pathology. *Science* 347 (2015) 659-664.
- [17] Zhu F, Yan CX, Wen YC, Wang J, Bi J, Zhao YL, Wei L, Gao CG, Jia W, Li SB, Dopamine D1 receptor gene variation modulates opioid dependence risk by affecting transition to addiction. *PLoS One* 8 (2013) e70805.
- [18] Kalivas PW, Volkow N, Seamans J, Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45 (2005) 647-650.
- [19] Van Den Oever MC, Spijker S, Smit AB, De Vries TJ, Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neurosci Biobehav Rev* 35 (2010) 276-284.

Research paper

Deep brain stimulation of the lateral hypothalamic area alters dopamine receptors in the prefrontal cortex of morphine-dependent ratsGhorbangol Ashabi, Mojdeh Fattahi, Seyed Morteza Karimian, Esmail Riahi^{1*}*Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 5 September 2019

Accepted: 7 October 2019

Abstract

Background and aims: The lateral hypothalamus (LH) is a main component of the brain's reward circuit. Previous studies have shown that high-frequency deep brain stimulation (DBS) of the LH prevents morphine-induced place preference in rats. In the present study we evaluated the effect of intra-LH DBS on the levels of dopamine receptors in the prefrontal cortex.

Methods: Electrodes were implanted into the LH bilaterally. Rats were allocated to four different groups: morphine-DBS, saline-DBS, morphine-sham, and saline-sham. Morphine (5mg/kg.sc) and saline were given in four consecutive days immediately followed by DBS (130 Hz pulse repetition frequency, 150 μ A pulse amplitude, and 100 μ s pulse width) or sham-DBS for 30 min corresponding to the experimental group. One day after the last injection rats were sacrificed and the prefrontal cortex was dissected for assaying dopamine receptors and c-fos mRNA expression.

Results: Morphine increased D1 receptor, decreased D2 receptor, and had no effect on D3, D4, and D5 receptors. DBS in morphine-treated rats prevented the elevation of D1 receptor, increased D2 and D3 receptors, decreased D5 receptor, and had no effect on D4 receptors. Morphine decreased c-fos mRNA levels in the prefrontal cortex and DBS increased it.

Conclusion: DBS of LH influenced the brain's dopaminergic system particularly in the prefrontal cortex.

Keywords: Deep brain stimulation; Dopamine receptors; Morphine; Rat; Lateral hypothalamus

Please cite this article as follows:

Ashabi G, Fattahi M, Kariminia SM, Riahi E, Deep brain stimulation of the lateral hypothalamic area alters dopamine receptors in the prefrontal cortex of morphine-dependent rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 124-131.

*Corresponding author: riahi@tums.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-0994-1195)