Physiology and Pharmacology, 18 (1), 36-46

Spring 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Lateral hypothalamus chemical stimulation-induced antinociception was attenuated by injection of dopamine D1 and D2 receptor antagonists in the ventral tegmental area

Marzieh Moradi[1], Mohammad Reza Yazdian[1], Abbas Haghparast[2, 3*]

1. Dept. of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Neurobiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 19 Jan 2014 **Accepted: 28 Jan 2014**

Abstract

Introduction: Stimulation or inactivation of the lateral hypothalamus (LH) produces antinociception. Studies showed a role for the ventral tegmental area (VTA) in the antinociception induced by LH chemical stimulation through the orexinergic receptors. In this study, we assessed the role of intra-VTA dopamine D1 and D2 receptors in antinociceptive effects of cholinergic agonist, carbachol, microinjected into the LH in the tail-flick test.

Methods: Rats were unilaterally implanted with two separate cannulae into the VTA and LH. Intra-VTA infusions of selective D1 receptor antagonist SCH-23390 (0.125, 0.25, 1 and 4 µg/0.3 µl saline) and selective D2 receptor antagonist sulpiride (0.125, 0.25, 1 and 4 µg/0.3 µl DMSO) 2 min before microinjection of carbachol (125 nmol/rat; effective dose) into the LH was done. The antinociceptive effects of different doses of these antagonists were measured using a tail-flick analgesiometer, and represented as maximal possible effect (%MPE) at 5, 15, 30, 45 and 60 min after administration.

Results: The results showed that intra-VTA administration of D1 and D2 dopamine receptors antagonists could significantly prevent the development of LH stimulation-induced antinociception. Administration of maximum doses of SCH-23390 and Sulpiride (4 µg) didn't affect the nociceptive behaviors in acute model of pain.

Conclusion: Thus dopamine receptors in the VTA play a modulating role in carbachol-induced analgesia within the LH, in acute model of pain. It is supposed that there is an interaction between VTA dopaminergic and orexinergic systems in pain modulation.

Key words: Pain, Lateral Hypothalamus, Ventral tegmental area, Dopamine D1 receptors, Dopamine D2 receptors

* Corresponding author e-mail: Haghparast@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (۱)، ۳۶-۴۶
بهار ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بیدردی حاصل از تحریک شیمیایی هیپوتالاموس جانبی با تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 در ناحیه تگمنتوم شکمی کاهش یافت

مرضیه مرادی[۱]، محمدرضا یزدیان[۱]، عباس حق پرست[۲،۳*]
۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم
۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. مرکز تحقیقات نوروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۲۹ خرداد ۹۳ پذیرش: ۸ بهمن ۹۲

چکیده

مقدمه: تحریک یا غیرفعال سازی هیپوتالاموس جانبی (LH) باعث القای بی‌دردی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) در بی‌دردی القایی توسط تحریک شیمیایی LH، از طریق گیرنده‌های اورکسینی نقش دارد. در این مطالعه نقش گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 ناحیه VTA بر اثرات بی‌دردی آگونیست گیرنده کولینرژیکی، کارباکول، تزریق شده در LH در آزمون پس کشیدن دم بررسی شده است.

روش ها: موش بزرگ آزمایشگاهی توسط دو کانول جداگانه به درون نواحی LH و VTA یکطرفه کانول گذاری شدند. آنتاگونیست انتخابی گیرنده D1، SCH-23390 (۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۱ و ۴ µg در ۰/۳µl سالین) و گیرنده D2، Sulpiride (۰/۲۵، ۱ و ۴ µg در ۰/۳ µl DMSO) در ناحیه VTA دو دقیقه قبل از تزریق کاربـاکول (nmol ۱۲۵؛ دوز موثر) در LH تزریق شد و اثرات آنها با استفاده از آزمون پس کشیدن دم و دستگاه مربوطه اندازه گیری شد و به صورت درصد حداکثر اثر ممکن (MPE٪) در فواصل زمانی ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه‌ای به مدت ۶۰ دقیقه بررسی شد.

یافته ها: نتایج نشان دادند که اثرات بی‌دردی حاصل از تحریک LH، به واسطه تزریق آنتاگونیست‌های D1 و D2 در ناحیه VTA به صورت معنی‌داری متوقف شـدند. تزریق حداکثر دوز این داروها به تنهایی در این ناحیه نتوانست تأثیری بر رفتار درد حیوان ایجاد کند.

نتیجه گیری: بنابراین گیرنده دوپامینی موجود در ناحیه VTA در تعدیل پاسخ بی‌دردی حاصل از تحریک LH در مدل درد حاد نقش دارند. لذا به نظر می‌رسد که برهم کنشی بین سیستم دوپامینرژیک و اورکسینرژیک در ناحیه VTA در تعدیل درد وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: درد، هیپوتالاموس جانبی، ناحیه تگمنتوم شکمی، گیرنده‌های دوپامینی D1، گیرنده‌های دوپامینی D2، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

برخی مطالعات گذشته نشان داده‌انـد کـه تحریـک ناحیـه هیپوتالاموس جانبی (LH) سبب ایجاد بی‌دردی مـی‌شـود کـه ایـن بـی‌دردی از طریـق ناحیـه تگمنتـوم شـکمی و هسـته اکومبنس صورت مـی‌گیـرد [۲۲] و همچنـین برخـی دیگـر از مطالعات نشان داده‌اند که غیرفعال‌سازی کوتاه مدت این ناحیه با لیدوکائین بی‌دردی ایجاد می‌کند که توسـط هسـته لوکـوس سرلئوس میانجی‌گـری مـی‌شـود [۲۴]. تحریـک الکتریکـی و تزریق مورفین و یا گلوتامات به درون LH سبب مهار رفلکـس نخاعی پس کشیدن دم [۱] و انتقال پیام درد می‌شود [۶، ۲۲]. اخیراً مطالعاتی در رابطه با مکانیسم اثرات بی‌دردی LH انجـام شـده اسـت. بـه نظـر مـی‌رسـد بـی‌دردی ناشـی از تحریـک

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Haghparast@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

هیپوتالاموس جانبی بواسطه هسته‌های ساقه مغزی باشد [۲۲, ۲۴]. ناحیه LH محل اصلی تجمع نورون‌های اورکسینرژیک است [۱۵, ۱۹, ۲۲]. مطالعات نشان داده‌اند که اورکسین و گیرنده‌های آن در تمام مسیر درد پراکنده هستند و اثرات بی‌دردی دارند [۵, ۱۵, ۱۹, ۲۲]. این نورون‌ها به میزان زیادی با ساختارهای غنی از دوپامین نظیر ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) و هسته اکومبنس (NAc) ارتباط دارند [۲۳, ۲۵, ۲۶]. و گیرنده‌های اورکسینی بصورت گسترده‌ای در ناحیه VTA و NAc بیان می‌شوند [۱۱, ۲۱, ۲۳, ۲۵].

ناحیه VTA ورودی اورکسینی عظیمی از LH دریافت می‌کند [۷, ۲۱, ۲۳] و مشخص شده است که هر دو نوع گیرنده اورکسینی توسط نورون‌های دوپامینرژیک و غیردوپامینرژیک ناحیه VTA بیان می‌شوند [۱۲, ۲۱]. این اورکسین با فعال کردن نورون‌های ناحیه VTA باعث تقویت اعصاب دوپامینی آن شده که در نهایت سبب افزایش رهاسازی دوپامین در سطح NAc و PFC می‌شود [۲۳]. به همین دلیل تحقیقات پیشین ناحیه VTA را به مرکزی مهم برای ایفای نقش اورکسین در مسیر پاداش و درد تبدیل کرده است [۳, ۴]. شواهد نشان می‌دهند که نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه VTA فعالیت مناطق مختلف مغزی مرتبط با درد شامل نخاع، PAG و عقده‌های قاعده‌ای مغز را تنظیم و تعدیل می‌کنند [۸, ۹]. مطالعات مختلف نشان داده است که نورون‌های دوپامینرژیک در مسیر VTA-NAc در تنظیم درد نقش دارند و همچنین آزاد شدن دوپامین در سیستم مزولیمبیک سبب مهار درد می‌شود که شامل بی‌دردی ناشی از اوپیوئیدها و بی‌دردی ناشی از استرس و محرک دردزا می‌باشد [۲, ۱۳]. اخیراً نشان داده شده است که نورون‌های دوپامینرژیک سیستم مزولیمبیک به میزان قابل توجهی در اثرات بی‌دردی آمفتامین و آگونیست‌های دوپامینی دیگر، شرکت می‌کنند [۱۸]. نورون‌های دوپامینی ناحیه VTA به ویژه در بی‌دردی القا شده با مورفین نقش دارند که این اثر ممکن است از طریق افزایش دوپامین در نواحی که از VTA پروجکشن دریافت می‌کنند مانند کورتکس پیش پیشانی میانی، NAc و استریاتوم میانی صورت بگیرد [۱۰]. انتقال دهنده‌های عصبی دوپامینی نقش‌های متفاوتی را در تنظیم بی‌دردی در آزمون‌های تونیک و التهابی ایفا می‌کنند [۱۶].

مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که فعالیت گیرنده‌های دوپامینی رفتارهای درد را در حیوانات و انسان کاهش می‌دهند. تزریق محیطی و داخل بطنی اگونیست‌های انتخابی گیرنده‌های D1 و D2 نظیر آپومورفین رفتارهای درد در آزمون‌های درد مثل فرمالین، آزمون پس کشیدن دم و صفحه داغ را در موش کاهش می‌دهد که این اثرات بی‌دردی با تزریق آنتاگونیست‌های انتخابی این گیرنده‌ها کاملاً از بین می‌رود [۱۴, ۱۸] و همچنین تزریق فوق نخاعی آپومورفین و فعال شدن گیرنده‌های دوپامین در استریاتوم و یا جسم سیاه سبب ایجاد بی‌دردی می‌شود [۹, ۲۰].

با توجه به اینکه ناحیه تگمنتوم شکمی جز مدار پردازش درد در CNS است، تزریق کارباکول در هیپوتالاموس جانبی درد را کاهش می‌دهد و این که هیپوتالاموس جانبی با این ناحیه از طریق پروجکشن های اورکسینی در ارتباط است و آگونیست این گیرنده‌ها سبب رهاسازی دوپامین در این ناحیه می‌شود، لذا هدف این مطالعه ارزیابی نقش گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 در ناحیه تگمنتوم شکمی بر پاسخ‌های بی‌دردی القا شده با تحریک شیمیایی هیپوتالاموس جانبی توسط کارباکول در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی با استفاده از آزمون پس کشیدن دم به عنوان یک مدل حیوانی جهت القای درد حاد بوده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۹۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۸۰– ۲۳۰ گرم استفاده شد. حیوانات تحت شرایط مناسب درجه حرارت ۱±۲۲ درجه سانتیگراد و دوره روشنایی–تاریکی (دوره روشنایی ۷–۱۹) ۱۲ ساعته در دسته‌های چهارتائی نگهداری شده و آب و غذا به مقدار کافی در دسترسشان قرار می‌گرفت. همه آزمایشات طی مجوز شماره ۲۳–۸۰ کمیته اخلاق و پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام می‌شد.

عمل جراحی کانول گذاری. در روز جراحی حیوانات با کتامین (۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین (۱۰میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) بصورت داخل صفاقی بیهوش و بلافاصله در دستگاه استریوتاکس

(Stoelting, USA) ثابت می‌شدند. جهت کانول گذاری در نواحی فوق، مختصات ناحیه VTA نسبت به برگما: قدامی- خلفی ۹/۴-، جانبی ۰/۸± و عمق ۸/۳ و همچنین ناحیه LH، نسبت به برگما: قدامی- خلفی ۵/۲-، جانبی۱/۶ ± و عمق ۸/۶ (اندازه کانول راهنما در هر دو هسته ۱۲ میلیمتر و ۱ میلیمتر بالاتر از محل اصلی تزریق قرار می‌گرفت) بر اساس اطلس پاکسینوس-واتسون تعیین و علامتگذاری می‌شد [۱۷]. دوره بهبودی (Recovery) یک هفته در نظر گرفته شده و در طول این دوره حیوانات بصورت روزانه handle می‌شدند. این شیوه بدین منظور انجام می‌شد که استرس موش‌ها در روز تزریق کاهش یابد و بالطبع اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های درد دچار خطا نشوند.

تزریق درون هسته‌ای دارو. جهت تزریق مواد در گروه‌های مورد آزمایش از سرسوزن‌های دندانپزشکی G30 متصل به لوله پلی اتیلن شماره ۲۰ با استفاده از سرنگ هامیلتون با حجم یک میکرولیتر استفاده می‌شد. کانول‌های تزریق قبل از انجام آزمایشات از نظر وجود انسداد یا نشتی مورد بررسی و تأیید قرار می‌گرفتند. طول کانولی که برای تزریق درون هسته‌ای LH و VTA استفاده می‌شد، یک میلیمتر بیشتر از طول کانول راهنما بود (۱۳ میلیمتر). دارو و مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات کاربا‌کول آگونیست گیرنده استیل کولین (Tocris, UK)، سولپراید آنتاگونیست گیرنده D2 (Tocris, UK)، SCH-23390 آنتاگونیست گیرنده D1 (Sigma-Aldrich, Germany) بوده که پس از حل شدن در حلال‌های مخصوص خود (کاربا‌کول و SCH-23390 در محلول نرمال سالین و سولپراید در DMSO) بلافاصله قبل از کاربرد، تهیه می‌شدند. تزریق دارو در LH و VTA به ترتیب با حجم ۰/۵ و ۰/۳ میکرولیتر و در زمان ۶۰ ثانیه انجام می‌شد که پس از اتمام تزریق به مدت ۶۰ ثانیه نیز سرنگ تزریق در محل باقی می‌ماند تا جذب و انتشار دارو به طور کامل صورت گیرد. زمان انجام آزمون‌ها در ساعت مشخصی از روز بین فاصله زمانی ۱۰ صبح تا ۴ بعد از ظهر بود.

آزمون درد حاد. آستانه درد حاد بوسیله دستگاه درد سنجی پس کشیدن دم، (Harvard; USA) اندازه گیری می‌شد. این دستگاه دارای یک منبع نورانی بوده و نور بصورت متمرکز با شدت‌های متفاوت بر روی دم موش در فاصله‌های ۳ تا ۵ سانتیمتری از انتهای دم به حیوان تابانده می‌شد. شدت نور در حدود ۴۵٪ تنظیم می‌شد بطوری که در این شدت نور زمان تأخیر پایه در آزمون پس کشیدن دم (Tail-Flick test) در محدوده زمانی ۲-۴ ثانیه قرار می‌گرفت. اگر در هر زمان حیوان به هر دلیل در محدوده ۱۰ ثانیه (نقطه cut-off) دم خود را حرکت نمی‌داد، بلافاصله دم حیوان را برای جلوگیری از آسیب از منبع نورانی دور می‌کردیم [۱۰]. زمان پس کشیدن دم (ثانیه) بصورت داده‌های خام یا درصد حداکثر اثر ممکن (MPE٪) بیان و از فرمول زیر محاسبه می‌شد:

$$\%\ \text{MPE} = \frac{\text{Post-drug latency (sec)} - \text{Baseline latency (sec)}}{\text{Cut-off value (sec)} - \text{Baseline latency (sec)}} \times 100$$

که در این آزمون میزان تأخیر پس کشیدن دم بعد از تزریق آنتاگونیست‌های دوپامین به داخل VTA و بلافاصله پس از آن تزریق کاربا‌کول به LH در فاصله‌های زمانی (۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) ثبت می‌شد. برای ارزیابی و محاسبه میزان حساسیت حیوانات به محرک دردزا، زمان پس کشیدن دم به عنوان آستانه درد نیم تا یک ساعت قبل از دارو درمانی اندازه گیری می‌شد.

گروه‌های کنترلی شامل گروه Intact که موش‌هایی دست نخورده بوده و عمل جراحی (کانول گذاری) نشدند، گروه Sham-operated که موش‌هایی اند که کانول‌های راهنما در مغز آنها جاگذاری شده ولیکن هیچ دارو و یا حلالی دریافت نکردند و گروه Vehicles موش‌هایی که جراحی شده و حلال دارو (سالین/DMSO) را دریافت کردند.

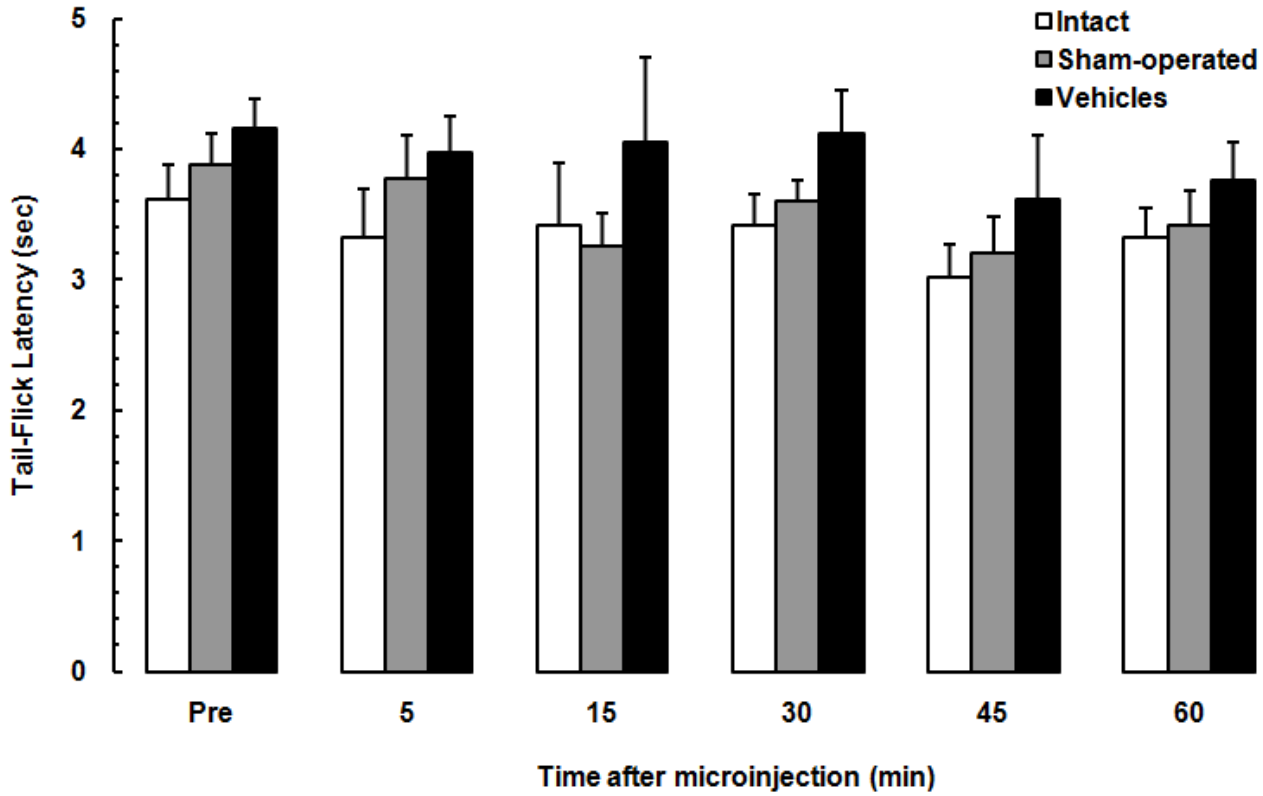
جهت بررسی اثر دوزهای متفاوت آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D1 بر بی‌دردی ناشی از تزریق کاربا‌کول در LH، ۴ گروه موش در هر گروه ۶-۸ عدد به صورت یکطرفه جراحی می‌شدند و بعد از گذراندن دوره‌ی بهبود در روز تست دوزهای ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۱ و ۴ میکروگرم SCH23390، در ۰/۳ میکرولیتر سالین در ناحیه تگمنتوم شکمی دریافت می‌کردند و بلافاصله دوز موثر کاربا‌کول (۱۲۵ نانومول) در هیپوتالاموس جانبی تزریق می‌شد و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در فواصل زمانی ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ آزمون پس کشیدن دم روی آنها انجام می‌شد. یک گروه دیگر نیز سالین در VTA و کاربا‌کول

در هیپوتالاموس جانبی دریافت می‌کردند. علاوه بر آن گروهی نیز دریافت کننده سالین در LH و ۴ میکروگرم SCH23390 در VTA بودند.

به منظور ارزیابی اثرات دوزهای مختلف آنتاگونیست دوپامینی D2 بر بی‌دردی ناشی از تحریک LH، ۳ گروه موش به صورت یکطرفه جراحی می‌شدند و بعد از گذراندن دوره‌ی بهبود در روز تست حیوانات دوزهای ۰/۲۵، ۱ و ۴ میکروگرم Sulpiride، در ۰/۳ میکرولیتر DMSO در ناحیه تگمنتوم شکمی و بلافاصله دوز موثر کارباکول در هیپوتالاموس جانبی دریافت می‌کردند و سپس در زمان‌های ذکر شده تحت آزمون پس کشیدن دم قرار می‌گرفتند. یک گروه نیز DMSO در VTA و کارباکول در هیپوتالاموس جانبی دریافت می‌کردند. علاوه بر آن گروهی دریافت کننده سالین در LH و دوز موثر ۴ میکروگرم Sulpiride در VTA بودند.

روش‌های آماری. در مطالعه حاضر، داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد (Mean ± SEM) نشان داده شده است. در آزمون پس کشیدن دم جهت مقایسه تأخیر پس کشیدن دم و درصد حداکثر اثر ممکن (MPE٪) در فواصلی زمانی ثبت شده از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد و در صورت معنی‌داری از پس آزمون Bonferroni جهت مقایسه تمام گروه‌ها با یکدیگر استفاده گردید. سطح معنی‌داری در تمام موارد کمتر از ۰/۰۵ (P<0.05) در نظر گرفته شد.

تأییدیه بافتی. پس از پایان آزمایش‌ها، حیوانات با استفاده از کتامین و زایلزین عمیقاً بیهوش شده و سپس با نرمال سالین و محلول فرمالین ۱۰٪ از طریق قلب پرفیوژن می‌شدند. در مرحله بعد سر حیوان از بدن جدا و مغز به محلول فرمالین ۱۰٪ منتقل می‌شد که بعد از گذشت ۳ روز و سفت شدن کامل بافت مغز، برش‌های کورونال به ضخامت ۳۰۰ میکرو متری توسط ویبرواسلایس از محل کانول ها تهیه می‌شد (شکل ۱). لازم به ذکر است که تنها برش‌هایی که محل قرارگیری کانول‌های راهنما در نواحی مورد نظر بود و

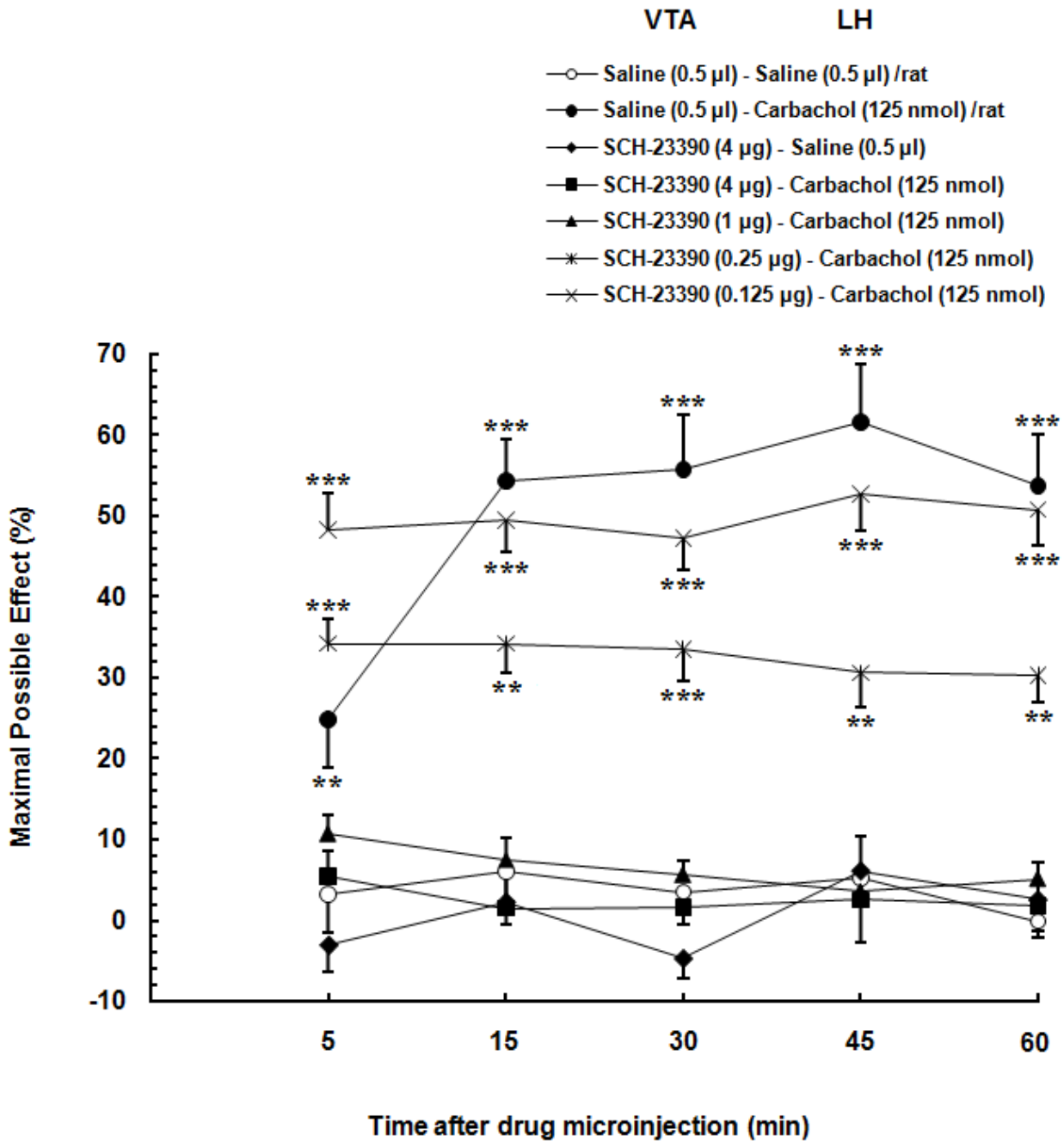


شکل ۱- آزمون پس کشیدن دم در گروه‌های کنترلی نشان داده شده در فواصل زمانی ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه ای. هر نقطه Mean ± SEM را برای ۵ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نشان می‌دهد. گروه Vehicles در واقع گروهی است که سالین در LH و DMSO در VTA دریافت کردند. همان طور که در شکل آشکار است آزمون پس کشیدن دم در گروه های کنترل تفاوت معنی داری نشان نمی دهد.

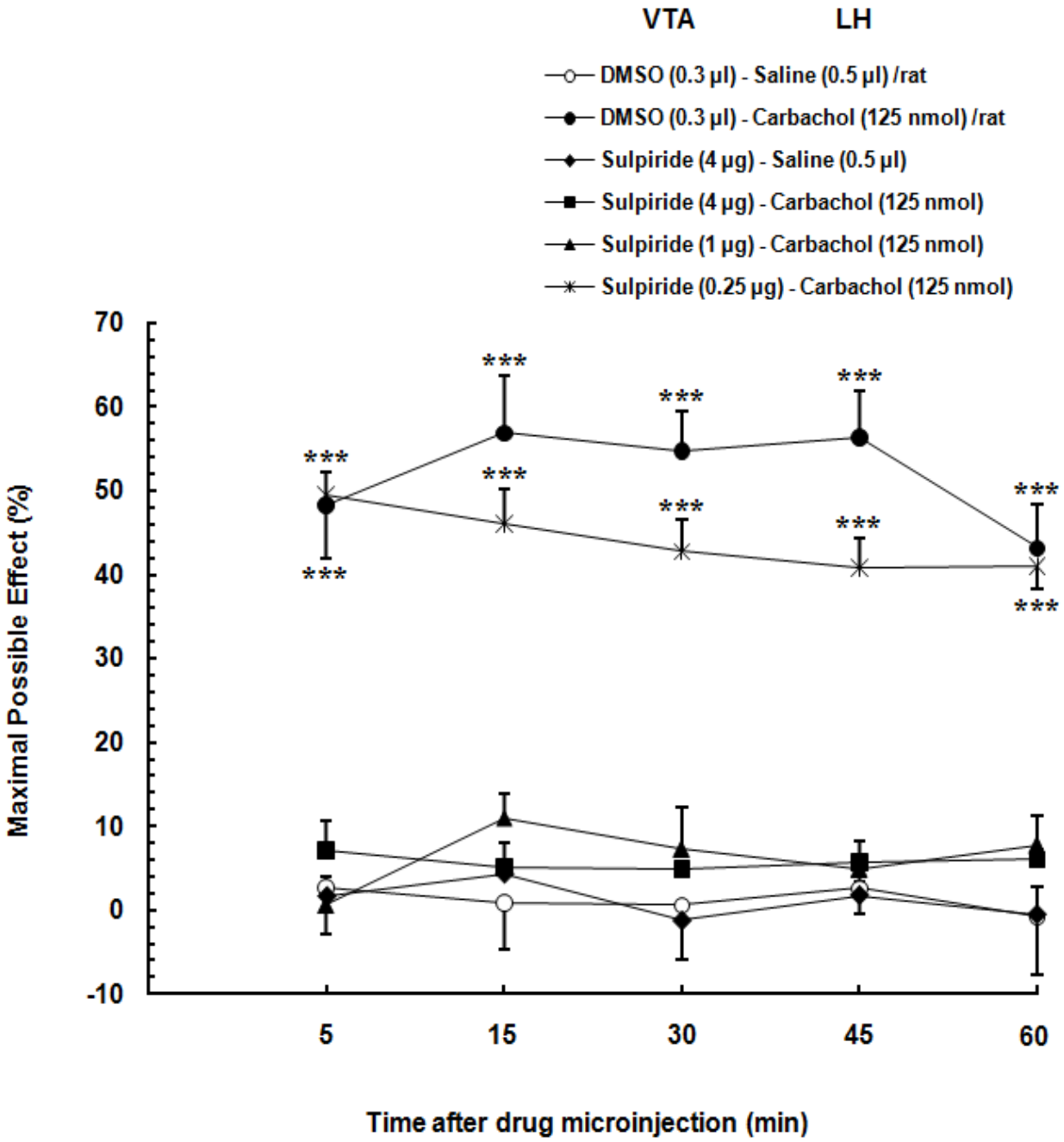
توسط اطلس پاکسینوس- واتسون ۲۰۰۷ [۱۷] تأیید می‌شد، در مراحل بعدی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار می‌گرفتند.

یافته ها

در این آزمایشات کلیه حیوانات مورد آزمایش با گروه سالین یا DMSO و گروه کنترل کاربـاکول بـه عنـوان گـروه کنترل مقایسه شدند. لازم بـه توضـیح اسـت کـه بـرای همـه گروه‌های آزمونی و تک تک موش‌ها تسـت پـس کشـیدن دم بین ۳۰ تا ۶۰ دقیقه قبل از تزریق داروها با عنوان زمان تـأخیر پایـه (Baseline Tail-Flick Latency) انجـام مـی‌شـد. میانگین زمان تأخیر پایـه در آزمـون پـس کشـیدن دم در ایـن



شکل۲- بررسی اثر تزریق دوزهای مختلف آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D1 در ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) بر بی دردی حاصل از تحریک شیمیایی هیپوتالاموس جانبی (LH). نمودار درصد حداکثر اثر ممکن (MPE%) دوزهای مختلف این آنتاگونیست در فواصل زمانی ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق دارو. هر نقطه Mean ± SEM را برای ۶-۸ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نشان می‌دهد. P<۰/۰۱** و P<۰/۰۰۱ *** در مقایسه با گروه کنترل (سالین/سالین) است.



شکل ۳- بررسی اثر تزریق دوزهای مختلف آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D2 در ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) بر بی دردی حاصل از تحریک شیمیایی هیپوتالاموس جانبی (LH). نمودار درصد حداکثر اثر ممکن (MPE%) دوزهای مختلف این آنتاگونیست در فواصل زمانی ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق دارو. هر نقطه Mean ± SEM را برای ۶-۸ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نشان می‌دهد.
P<۰/۰۰۱ *** در مقایسه با گروه کنترل (سالین/DMSO) است.

مطالعه در گروه دست نخورده (Intact)، ۳/۵۱±۰/۳۷ ثانیه بود.

در آزمایش گروه‌های کنترلی زمان تأخیر در پس کشیدن دم (TFL) و درصد حداکثر اثر ممکن (%MPE) حیوانات گروه‌های کنترلی مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز واریانس دوطرفه و پس آزمون Bonferroni نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در زمان تأخیر پس کشیدن دم بین گروه‌های سالم، جراحی، سالین و DMSO (Vehicles) در تمامی زمان‌های مورد آزمایش با یکدیگر وجود ندارد (شکل۲). متوسط TFL پایه در گروه Vehicles (حلال‌ها) ۳/۲۳±۰/۳۴ ثانیه در ۲ بار آزمایش بود.

[Treatment Effect: F (2, 60) = 0.8212, P =0.4448;

Time Main Effect: F (4, 60) = 0.6337, P= 0.6404; Interaction Treatment×Time: F (8, 60) = 0.5729, P = 0.796]

در گروه دریافت کننده آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D1 در ناحیه تگمنتوم شکمی و کارباکول در هیپوتالاموس جانبی، چهار دوز SCH-23390، در VTA تزریق و پس از آن بلافاصله تزریق کارباکول (۱۲۵ نانومول) در LH صورت گرفته و در طی یک ساعت تحت آزمون پس کشیدن دم قرار گرفتند. آنالیز واریانس دو طرفه و متعاقب آن پس آزمون Bonferroni (شکل ۲) در این گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را در آزمون پس کشیدن دم با یکدیگر نشان می‌دهد.

[Treatment Effect: F (6, 210) = 37.53,P < 0.0001; Time Main Effect: F (4, 210) =0.4508, P=0.7718; Interaction Treatment×Time: F(24,210) = 0.4928, P = 0.9788]

این آنتاگونیست به صورت وابسته به دوز توانست اثر بی‌دردی کارباکول در LH را کاهش دهد. دوزهای ۱ و ۴ میکروگرم SCH-23390 به صورت معنی‌داری در تمامی فواصل زمانی ثبت شده سبب کاهش اثر بی‌دردی کارباکول در LH شدند و همان طور که در شکل مشاهده می‌شود هیچگونه اختلافی با گروه کنترل حلال (سالین/سالین) نشان ندادند. این در حالی بود که دوزهای کمتر (۰/۱۲۵ و ۰/۲۵میکروگرم) این آنتاگونیست نتوانستند اثر بی دردی ناشی از کارباکول را تغییر دهند. تزریق حداکثر دوز SCH-23390 (۴ میکروگرم) به درون VTA، به تنهایی نیز زمان پس کشیدن دم و یا %MPEs محاسبه شده را در مقایسه با گروه کنترل حلال (سالین/سالین) تغییر نداد، پس تزریق به تنهایی این دارو نتوانست اثرات بی‌دردی یا پردردی اعمال کند.

در گروه دریافت کننده آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D2 در ناحیه تگمنتوم شکمی و کارباکول در هیپوتالاموس جانبی، دوزهای مختلف آنتاگونیست این گیرنده درون VTA تزریق شدند و پس از آن بلافاصله تزریق کارباکول (۱۲۵ نانومول) در LH صورت گرفت. نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم و آنالیز واریانس دو طرفه و متعاقب آن پس آزمون Bonferroni نشان داد که تفاوت معنی‌داری برای %MPEs محاسبه شده در میان گروه‌های آزمونی دوزهای ۱ و ۴ میکروگرم Sulpiride و گروه کنترل کارباکول وجود دارد (شکل۳) و این دوزها پاسخ بی‌دردی حاصل از تزریق کارباکول را کاملاً کاهش دادند و در واقع هیچگونه اختلافی با گروه کنترل حلال (DMSO/سالین) نشان ندادند.

[Treatment Effect: F (5, 175) = 132.2, P<0.0001; Time Main Effect: F (4, 175)= 0.7854, P=0.5361; Interaction Treatment×Time: F(20,175) = 0.5651, P=0.932]

همچنین در مورد دوز ۰/۲۵ میکروگرم می‌توان گفت که در واقع بر بی‌دردی ناشی از کارباکول حداقل در موش‌های ما بی اثر بوده است. تزریق حداکثر دوز Sulpiride به تنهایی درون VTA تغییری در سطح پایه زمان پس کشیدن دم (TLFs) و %MPEs در مقایسه با گروه کنترل (سالین/DMSO)، ایجاد نکرد که نشان می‌دهد این دارو به تنهایی اثرات بی‌دردی یا پردردی ندارد.

بحث

یافته‌های اصلی این پژوهش عبارتند از: (۱) تزریق آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D1، SCH23390، به درون ناحیه VTA به طور وابسته به دوز بی‌دردی القا شده با کارباکول را بلوکه می‌کند، لازم بذکر است که تزریق SCH-233909 به تنهایی هیچ تأثیری بر درد ایجاد شده در حیوان در مقایسه با گروه حلال نداشت. (۲) تزریق آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D2، Sulpiride، به درون ناحیه VTA بی‌دردی القا شده با کارباکول را بلوکه می‌کند، همچنین تزریق Sulpiride در ناحیه تگمنتوم شکمی به تنهایی تأثیری بر رفتارهای درد حیوان در مقایسه با گروه حلال نداشت.

نتایج ما نشان دهنده نقشی برای گیرنده‌های دوپامینی D1 در نواحی VTA در بی‌دردی حاصل از تحریک شیمیایی LH در آزمون حاد می‌باشند که در این راستا مطالعاتی با نتایج متفاوت بدست آمده است. مطالعه در آزمایشگاه ما در سال ۲۰۱۲ نشان داد که تزریق آنتاگونیست گیرنده D1 در هسته اکومبنس، بی‌دردی القا شده با WIN55,212-2، آگونیست گیرنده کانابینوئیدی، در ناحیه قاعده جانبی آمیگدال (BLA) را در آزمون فرمالین مهار می‌کند اما در آزمون پس کشیدن دم

این مهار صورت نگرفت [۱۰] که این موضوع با یافته‌های ما در تناقض بود زیرا SCH-23390 توانست اثرات بی‌دردی را در ناحیه VTA در مدل درد حاد مهار کند. این تناقض می‌تواند به علت تفاوت برهم کنش سیستم‌های اورکسینی و کانابینوئیدی با سیستم دوپامینی و یا تفاوت در توزیع گیرنده های فوق و همچنین نقش هسته‌های مورد مطالعه در تعدیل دردهای حاد و التهابی مزمن باشد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که نورون‌های دوپامینرژیک سیستم مزولیمبیک به میزان قابل توجهی در اثرات بی‌دردی آمفتامین و مورفین و آگونیست‌های دوپامینی دیگر شرکت می‌کنند [۱۸] و تخریب ناحیه VTA و جسم سیاه و یا استریاتوم با ۶- هیدروکسی دوپامین سبب افزایش پاسخ‌های دردزا در حیوان می‌شود [۱۳] که یافته‌های ما تا حدودی نتایج برگرفته از آزمایشات قبلی را تایید می‌کند. علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر SCH23390 در NAc توانست بی‌دردی حاصل از تزریق آنالوگ SP، DiMe-C7، به درون ناحیه VTA را کاهش دهد [۲]. این موضوع با یافته‌های ما هم‌راستا است. پس می‌توان گفت که در نتایج مربوط به گیرنده D1 در درد حاد، گیرنده D1 موجود در نواحی VTA در تعدیل درد ناشی از تحریک هیپوتالاموس جانبی نقش دارد.

ما در این مطالعه همچنین نشان دادیم که تزریق Sulpiride به عنوان آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D2، ، به درون VTA بی‌دردی القا شده با تحریک هیپوتالاموس جانبی را بلوک می‌کند که نشان دهنده نقش این گیرنده در بی‌دردی حاصل از کارباکول است. در راستای نتایج ما، حق پرست و همکارانش در بخش دیگری از مطالعه خود در سال ۲۰۱۲ دریافتند که تزریق Sulpiride به درون NAc از پاسخ‌های بی‌دردی ناشی از تزریق آگونیست گیرنده کانابینوئیدی در BLA در آزمون فرمالین و پس کشیدن دم جلوگیری می‌کند [۱۰]. علاوه بر این، بی‌دردی ناشی از کوکائین به فعال شدن گیرنده D2 بستگی دارد. Altier و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که آنتاگونیست گیرنده D2 از بی‌دردی القا شده توسط ماده p، مورفین و آمفتامین در درد التهابی مزمن جلوگیری می‌کند [۲]. همچنین Magnusson و Fisher در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد کردند که گیرنده D2 و نه گیرنده D1 در استریاتوم پشتی جانبی در تعدیل درد مزمن نقش دارد. در تایید این نظر تزریق آگونیست انتخابی گیرنده D2 به صورت محیطی اثرات بی‌دردی ایجاد کرد و در مقابل تزریق محیطی و یا درون استریاتومی آگونیست D1 در پاسخ‌های درد بی اثر بود [۹, ۱۳]. از سوی دیگر تزریق SCH23390 و Sulpiride به تنهایی درون ناحیه VTA نتوانست تغییر قابل ملاحظه‌ای را در مدل درد حاد ایجاد کند. این نتیجه پیشنهاد می‌کند که در شرایط عادی، گیرنده D1 و D2 موجود در VTA، در تعدیل درد حاد اهمیت چندانی ندارند و تحریک نورون‌های اورکسینرژیک در ناحیه هیپوتالاموس جانبی به وسیله کارباکول است که سبب آزاد شدن دوپامین و فعال شدن این گیرنده‌ها در VTA می‌شود؛ که این نتایج با نتایج مطالعه صورت گرفته در آزمایشگاه ما در سال ۲۰۱۲ هم‌خوانی دارد. حق پرست و همکارانش (۲۰۱۲) در مطالعه خود نیز نشان دادند که تزریق این آنتاگونیست‌ها به تنهایی درون هسته اکومبنس نتوانستند تغییری در رفتارهای مربوط به درد در مدل درد حاد و التهابی ایجاد کنند [۱۰]. بنابراین یافته‌های ما در این تحقیق پیشنهاد می‌کند که گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 در ناحیه تگمنتوم شکمی در بی‌دردی ناشی از تزریق کارباکول در هیپوتالاموس جانبی در مدل درد حاد دخیل می‌باشند. این احتمال وجود دارد که مسیرهای اورکسینرژیک از هیپوتالاموس جانبی و منتهی به ناحیه VTA بتوانند نورون‌های دوپامینرژیک موجود در این ناحیه را تحت تأثیر قرار دهند و در اثرات بی‌دردی سهیم باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت و همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر فرشته معتمدی ریاست مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید که بدینوسیله از ایشان و کلیه پرسنل آن مرکز سپاسگزاری می‌شود.

References

[1] Aimone L, Gebhart G, Spinal monoamine mediation of stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus. ***Brain Res*** 403 (1987) 290-300.

[2] Altier N, Stewart J, Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance p or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. ***J Pharmacol Exp Ther*** 285 (1998) 208-215.

[3] Aston-Jones G, Smith R J, Moorman D E, Richardson K A, Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. ***Neuropharmacology*** 56 (2009) 112-121.

[4] Aston-Jones G, Smith R, Sartor G, Moorman D E, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson K A, Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. ***Brain Res*** 1314 (2010) 74-90.

[5] Azhdari Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, Erami E, Khakpay R, Azizi H, Rohampour K, Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-a decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. ***J Pain*** 12 (2011) 280-287.

[6] Carstens E, Fraunhoffer M, Suberg S N, Inhibition of spinal dorsal horn neuronal responses to noxious skin heating by lateral hypothalamic stimulation in the cat. ***J Neurophysiol*** 50 (1983) 192-204.

[7] Fadel J, Deutch A, Anatomical substrates of orexin–dopamine interactions: Lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. ***Neuroscience*** 111 (2002) 379-387.

[8] Hagelberg N, Jaaskelainen S K, Martikainen I K, Mansikka H, Forssell H, Scheinin H, Hietala J, Pertovaara A, Striatal dopamine d2 receptors in modulation of pain in humans: A review. ***Eur J Pharmacol*** 500 (2004) 187-192.

[9] Hagelberg N, Martikainen I K, Mansikka H, Hinkka S, Någren K, Hietala J, Scheinin H, Pertovaara A, Dopamine d2 receptor binding in the human brain is associated with the response to painful stimulation and pain modulatory capacity. ***Pain*** 99 (2002) 273-279.

[10] Haghparast A, Ghalandari-Shamami M, Hassanpour-Ezatti M, Blockade of d1/d2 dopamine receptors within the nucleus accumbens attenuated the antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist in the basolateral amygdala. ***Brain Res*** 1471 (2012) 23-32.

[11] Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, Aston-Jones G, Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. ***Behav Brain Res*** 183 (2007) 43-51.

[12] Korotkova T M, Sergeeva O A, Eriksson K S, Haas H L, Brown R E, Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. ***J Neurosci*** 23 (2003) 7-11.

[13] Magnusson J E, Fisher K, The involvement of dopamine in nociception: The role of D1 and D2 receptors in the dorsolateral striatum. ***Brain Res*** 855 (2000) 260-266.

[14] Munro G, Dopamine D1 and D2 receptor agonism enhances antinociception mediated by the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in the rat formalin test. ***Eur J Pharmacol*** 575 (2007) 66-74.

[15] Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K, Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. ***Brain Res*** 827 (1999) 243-260.

[16] Patyal R, Woo EY, Borgland SL, Local hypocretin-1 modulates terminal dopamine concentration in the nucleus accumbens shell. ***Front Behav Neurosci*** 6 (2012).

[17] Paxinos G, Watson C, ***The rat brain in stereotaxic coordinates***: Elsevier Academic Press, San Diego, 2007.

[18] Pelissier T, Laurido C, Hernandez A, Constandil L, Eschalier A, Biphasic effect of apomorphine on rat nociception and effect of dopamine d2 receptor antagonists. ***Eur J Pharmacol*** 546 (2006) 40-47.

[19] Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff T S, Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. ***J Neurosci*** 18 (1998) 9996-10015.

[20] Roychowdhury SM, Heinricher MM, Effects of iontophoretically applied serotonin on three classes of physiologically characterized putative pain modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of lightly anesthetized rats. ***Neurosci Lett*** 226 (1997) 136-138.

[21] Sadeghi S, Reisi Z, Azhdari-Zarmehri H, Haghparast A, Involvement of orexin-1 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in antinociception induced by lateral hypothalamus

stimulation in rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 105 (2013) 193-198.

[22] Safari M-S, Haghparast A, Semnanian S, Effect of lidocaine administration at the nucleus locus coeruleus level on lateral hypothalamus-induced antinociception in the rat. ***Pharmacol Biochem Behav*** 92 (2009) 629-634.

[23] Sharf R, Sarhan M, Dileone RJ, Role of orexin/hypocretin in dependence and addiction. ***Brain Res*** 1314 (2010) 130-138.

[24] Tasker R, Choiniere M, Libman S, Melzack R, Analgesia produced by injection of lidocaine into the lateral hypothalamus. ***J Pain*** 31 (1987) 237-248.

[25] Taslimi Z, Arezoomandan R, Omranifard A, Ghalandari-Shamami M, Riahi E, Vafaei A A, Rashidy-Pour A, Haghparast A, Orexin a in the ventral tegmental area induces conditioned place preference in a dose-dependent manner: Involvement of d1/d2 receptors in the nucleus accumbens. ***Peptides*** 37 (2012) 225-232.

[26] Taslimi Z, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M, Safari M-S, Chemical stimulation of the lateral hypothalamus induces conditioned place preference in rats: Involvement of ox1 and cb1 receptors in the ventral tegmental area. ***Behav Brain Res*** 217 (2011) 41-46.