

Effect of Morphine-Sensitization in D2 Receptor Gene Expression in the Mice Brain in the Absence and Presence of Lithium Chloride

Hoda Mehregan, M.Sc.¹, Majid Sadeghzadeh, Ph.D.^{1*}, Mohammad Reza Zarrindast, Ph.D.², Kayhan Azadmanesh, Ph.D.³, Ali Jahanshahi, M.Sc.⁴, Hadi Shirzad, M.Sc.⁵, Mojtaba Saadati, Ph.D.⁵

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4. Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Biological Research Center, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 175-14115, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 22/Apr/2010, Accepted: 12/Sep/2010

Abstract

Objective: In this study we have investigated the changes in D2 receptor expression level in morphine-sensitized mice, in the absence and presence of lithium chloride (LiCl). The result would pave the way to comprehend and confront this complicated event.

Materials and Methods: Male NMRI mice, weighing 20-25g, were used in this study. They were divided into six groups. The first group received 0.9% saline as the control group and the other group was treated with morphine sulphate (30 mg/kg). LiCl (5 and 10 mg/kg treatments) was separately performed in two other groups. The final two groups were simultaneously treated with morphine sulphate (30 mg/kg) and LiCl (5 mg/kg) in one group and morphine sulphate (30 mg/kg) accompanied by LiCl (10 mg/kg) in the other group. All injections were performed intraperitoneally and once daily. After a five day wash-out, mice were decapitated and the brain regions which included the striatum, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus were extracted. Using relative Real-Time polymerase chain reaction (PCR), the expression levels of the long (D2L) and short (D2S) isoforms of the D2 receptor were investigated.

Results: Morphine treatment leads to a significant increase ($p < 0.05$) in D2S levels in the striatum and PFC but has no effect on D2L levels in the examined regions. In the group receiving LiCl 5mg/kg, the D2L levels showed a significant augmentation in PFC and the hippocampus ($p < 0.05$) as well as the striatum ($p < 0.001$). The D2S levels in the same group, significantly increased in the PFC ($p < 0.05$) and striatum ($p < 0.001$). LiCl at a dose of 10 mg/kg did not alter the expression of either isoforms in any region. While simultaneous administration of morphine and LiCl (10 mg/kg) resulted in a marked increase in D2S levels in the striatum ($p < 0.001$) and PFC ($p < 0.05$), morphine administration along with LiCl (5mg/kg) was ineffective on the expression levels of D2L and D2S isoforms when compared to the control group.

Conclusion: Morphine sensitization leads to an increase in D2S receptor expression and is affected by lithium in a dose-dependent manner where the lower dose inhibits and higher dose to enhances this effect. It is assumed that sensitization-induced changes in the transcript level are more regulated by dopamine transmission rather than by the direct effect of morphine and/or lithium on gene expression.

Keywords: Morphine Sensitization, D2 Receptor, Lithium Chloride, Real-Time PCR, Gene Expression

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 395-404

تأثیر حساسیت به مورفین بر تغییرات بیان ژن گیرنده D2 دوپامین در مغز موش‌های سوری در نبود و حضور لیتیم کلراید

هدی مهرگان ^۱، M.Sc.؛ مجید صادقی‌زاده ^{۱*}، Ph.D.؛ محمدرضا زرین‌دست ^۲، Ph.D.؛ کیهان آزادمنش ^۳، Ph.D.؛ علی جهانشاهی ^۴، M.Sc.؛ هادی شیرزاد ^۵، M.Sc.؛ مجتبی سعادت ^۵، Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۲. دانشگاه تهران، دانشکده علوم پزشکی، گروه فارماکولوژی، تهران، ایران
۳. انسیتو پاستور ایران، بخش هیپاتیت و ایدز، تهران، ایران
۴. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، تهران، ایران
۵. دانشگاه امام حسین، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵-۱۷۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
پست الکترونیک: Email: sadeghama@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۲، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۲۱

چکیده

*** هدف:** بررسی تغییر بیان گیرنده D2 دوپامین در موش‌های حساس به مورفین در نبود و حضور لیتیم کلراید
*** مواد و روش‌ها:** در این طرح از موش‌های سوری نر (NMRI) با وزنی معادل ۲۵-۲۰ گرم که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده شد. حیوانات به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه اول به عنوان گروه کنترل، سالی ۰/۹ درصد و گروه دیگر مورفین سولفات ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. دو گروه دیگر، یکی به طور جداگانه با لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دیگری با لیتیم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند. دو گروه باقی‌مانده به طور هم‌زمان با مورفین سولفات ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (در یک گروه) و مورفین ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لیتیم کلراید ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (در گروه دیگر) تحت تیمار قرار گرفتند. تیمار در هر یک از گروه‌ها در ۳ روز متوالی به صورت داخل صفاقی و یک بار در روز انجام شد و پس از ۵ روز از آخرین تیمار، از هیپوکامپ، استریاتوم و کورتکس پر فرونتال (Prefrontal Cortex; PFC) نمونه‌برداری و بیان ایزوفرم کوتاه (D2 Short; D2S) و بلند (D2 Long; D2L) گیرنده توسط Real-Time PCR نسبی بررسی شد.

*** یافته‌ها:** تیمار با مورفین باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) رونوشت D2S در استریاتوم و PFC می‌شود ولی بر بیان D2L در هیچ یک از نواحی، تأثیر معنی‌داری ندارد. در گروه دریافت‌کننده لیتیم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سطح بیان ژن D2L افزایش معنی‌داری در نواحی هیپوکامپ و PFC ($p < 0.05$) و هم‌چنین استریاتوم ($p < 0.001$) نشان می‌دهد. سطح بیان D2S در همین گروه، با افزایش معنی‌داری در نواحی استریاتوم ($p < 0.001$) و PFC ($p < 0.05$) همراه است. در گروه تیمار شده با لیتیم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن هیچ یک از دو ایزوفرم مشاهده نمی‌شود. در حالی که تیمار هم‌زمان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با افزایش معنی‌داری در رونوشت D2S در استریاتوم ($p < 0.001$) و PFC ($p < 0.05$) همراه است، تیمار هم‌زمان مورفین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم لیتیم کلراید در مقایسه با گروه کنترل (سالی)، بر بیان ایزوفرم‌ها تأثیری ندارد.

*** نتیجه‌گیری:** حساسیت به مورفین با افزایش بیان D2S همراه است که در حضور دوز کمتری از لیتیم مهار و در حضور دوز بالاتر تقویت می‌شود. با توجه به این امر، تصور می‌شود که تغییر بیان گیرنده D2 در حضور مورفین یا همراه با لیتیم عمدتاً متأثر از تغییر در انتقال دوپامین است تا اینکه به‌طور مستقیم توسط لیتیم و یا مورفین کنترل شود.

*** کلیدواژگان:** حساسیت به مورفین، گیرنده D2 دوپامین، لیتیم کلراید، Real-Time PCR، بیان ژن

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۹۵-۴۰۴

مقدمه

مصرف مداوم و متناوب داروهای اعتیادآور نظیر اپیات‌ها و محرک‌های روانی (Psycho Stimulant) باعث افزایش فعالیت‌های حرکتی (Locomotor Sensitization) می‌شود؛ این پدیده که از آن تحت عنوان "حساسیت رفتاری" (Behavioral sensitization) نام برده می‌شود، زمینه‌ساز جنبه‌های خاصی از اعتیاد است. تصور می‌شود که حساسیت رفتاری به‌علت تطابقت نورونی سیستم عصبی و ناشی از مصرف مداوم دارو است که آن را به تدریج و به احتمال برای همیشه به دارو حساس می‌کند (۱). پروسه ایجاد حساسیت رفتاری به سه مرحله: گسترش (Initiation/Development Phase)، گذر

مصرف متناوب دارو مرحله گسترش، دوره متعاقب آخرین تزریق مرحله گذر و زمان طولانی پس از قطع مصرف مرحله بیان خواننده می‌شود. این سه مرحله از حساسیت، وقایع مجزایی هستند که با مکانیسم‌های متفاوتی در ارتباط هستند (۲). مطالعات نشان می‌دهد که دوپامین و گیرنده‌های آن به‌خصوص گیرنده‌های D1 و D2 در کسب و بیان این پدیده نقش مهمی دارند و تیمار با آنتاگونیست‌های این گیرنده‌ها باعث مهار آن می‌شود (۳-۵). در میان انبوه آزمایش‌های انجام شده، به منظور یافتن ماده‌ای جهت کاهش اثرات مختلف ناشی از مصرف مواد، لیتیم به علت تداخلی که با عملکرد مورفین نشان می‌دهد، از

موش سوری شامل هیپوکامپ، استریاتوم و کورتکس پر فرونتال (Prefrontal Cortex; PFC) بررسی می‌شود. نواحی مورد نظر از جمله مناطقی هستند که به عنوان بخشی از سیستم دوپامینی مغز ژن گیرنده دوپامینی، بیان و نقش آنها در موارد مختلفی نظیر افزایش فعالیت حرکتی پس از مصرف مواد، یادگیری و حافظه کوتاه مدت شناخته شده است. با توجه به موارد مذکور، تصور می‌شود که بیان ژن گیرنده D2 دوپامین در پاسخ به تغییرات حاصل از حساسیت القا شده توسط مورفین می‌تواند در سیستم دوپامینژیک تغییر کند و لیتیم به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم، با تأثیر بر بیان ژن مذکور و با تغییر الگوی بیانی آن در جلوگیری از ایجاد حساسیت نقش ایفا نماید.

مواد و روش‌ها

داروها

داروهای مورد استفاده در این مطالعه، شامل سولفات مورفین (تماد) و لیتیم کلراید Merk بوده که تمامی آنها پیش از آزمایش در سالین ۰/۹ درصد و در حجم نهایی ۱۰ میلی لیتر بر کیلو گرم حل شدند. تمامی تزریقات به صورت داخل صفاقی و به مدت ۳ روز انجام شد.

حیوانات

در این طرح از موش‌های سوری نر (NMRI) با وزنی معادل ۲۵-۲۰ گرم که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری و در گروه‌های ۸ تایی در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق حیوانات ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و میزان نور بر مبنای چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، مطابق با مصوبه کمیته اخلاق و پژوهش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران تنظیم شد. حیوانات در تمام مدت نگهداری به استثنای زمان آزمایش، آب و غذای مخصوص در اختیار داشتند و تمامی مراحل کار طبق دستورالعمل نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

حیوانات به ۶ گروه، هر یک شامل ۸ موش تقسیم شدند: گروه اول سالین ۰/۹ درصد، گروه دوم مورفین ۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم، گروه سوم لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلو گرم، گروه چهارم لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم دریافت کردند. گروه پنجم به طور هم‌زمان و بلافاصله با مورفین ۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم و لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلو گرم و گروه ششم نیز به طور هم‌زمان با مورفین ۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم و لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم مورد تیمار قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فعالیت حرکتی (Locomotor Activity)

۵ روز پس از آخرین تیمار، گروهی از حیواناتی که به تنهایی مورفین ۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم دریافت کرده بودند، به طور تصادفی انتخاب شده و به منظور بررسی حساسیت ایجاد شده، مجدد تحت تیمار با دوز مشابهی از مورفین قرار گرفتند (۲۴). حیوانات پس از تیمار، در یک ستون استوانه‌ای قرار گرفتند که کف آن با دو خط متقاطع به ۴ قسمت تقسیم شده بود و هر بار گذر کامل از هر یک از ۴ خط به منزله یک بار حرکت در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه به منظور انطباق با محیط، شمارش حرکت حیوان آغاز و به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. یک گروه از حیوانات که قبل با سالین تیمار شده بودند نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند (۲۵).

استخراج RNA و ساخت cDNA

پس از ۵ روز از آخرین تیمار، نمونه برداری از نواحی مغزی مورد

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و مطالعات حیوانی، آن را به عنوان دارویی که می‌تواند در درمان اعتیاد کارگشا باشد، پیشنهاد داده است (۶). لیتیم، علائم ناشی از ترک مصرف مورفین در موش‌های وابسته به آن را مهار می‌کند (۷)، خودتحریکی (Self-Stimulation) تسهیل شده توسط مورفین را کاهش می‌دهد (۸)، تسکین درد (Analgesia) القا شده توسط مورفین را دستخوش تغییر می‌سازد (۹، ۱۰) و بر بیش‌فعالی (Hyperactivity) القا شده توسط مورفین تأثیر می‌گذارد (۱۱). مصرف لیتیم می‌تواند علائم ترک القا شده توسط نالوکسان در موش‌های صحرایی معتاد به مورفین را کاهش دهد (۱۲). برخی مطالعات بیوشیمیایی نیز نشان داده‌اند که لیتیم می‌تواند بیوسنتز و رهاسازی اپیویدهای درون‌زاد را افزایش دهد و باعث کاهش تعداد نواحی اتصال اپیویدها و اتصال آنتاگونیست‌های گیرنده اپیویدی (۱۳) و افزایش بیان گیرنده‌های μ اپیویدی در مغز موش صحرایی شود (۱۴). لیتیم هم‌چنین می‌تواند فعالیت آدنیلیل سیکلاز و سطح cAMP را - که هر دو طی مصرف نالوکسان و یا ترک سریع مصرف مورفین افزایش می‌یابند - کاهش دهد (۱۵). در حالی که مکانیسم دقیق عملکرد لیتیم به خوبی شناخته شده نیست اما مشاهدات، حاکی از آن است که تنظیم بیان ژن یکی از مکانیسم‌های بالقوه‌ای است که لیتیم از طریق آن اثرات درمانی خود را اعمال می‌کند. شواهد بسیاری حاکی از آن است که لیتیم در دوزهای موثر درمانی، قادر به تنظیم بیان ژن‌های بسیاری در مغز انسان و مدل‌های کشت سلولی است (۱۶، ۱۷). بر طبق یک مطالعه، تیمار موش‌های صحرایی با لیتیم منجر به افزایش سطح رونوشت گیرنده D2 دوپامین در استریاتوم و هسته آکومبنس (Nucleus Accumbens; NAc) می‌شود (۱۸). مطالعات هم‌چنین نشان می‌دهد که مهار گلیکوژن سنتاز کیناز (Glycogen Synthase Kinase; GSK) در پاسخ به لیتیم، نقش مهمی در کاهش رفتارهای حرکتی افزایش یافته مرتبط با دوپامین در موش‌های فاقد انتقال دهنده دوپامین (Dopamine Transporter; DAT) و یا موش‌های تیپ وحشی تیمار شده با آمفامین دارد و با بیش‌فعالی حرکتی وابسته به دوپامین مقابله می‌کند (۱۹).

گیرنده D2 دوپامینی (Dopamine Receptor D2; DRD2) اولین گیرنده دوپامینی است که شناخته شد و با ۲۰ برابر گرانش بیشتر به دوپامین، نسبت به سایر گیرنده‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار است و فعالیت حرکتی را کنترل می‌کند (۲۰). مطالعات نشان می‌دهد که گیرنده‌های D2 نقش مستقیم و بسیار مهمی در تنظیم میزان دوپامین ناشی از مورفین و کوکائین دارند (۲۱). ژن این گیرنده حاوی ۸ اینترون است و پردازش متناوب (Alternative Splicing) از رونوشت آن دو ایزوفرم پروتئینی کوتاه (D2S) و بلند (D2L) تولید می‌کند که در ۸۷ جفت باز با یکدیگر تفاوت دارند (۲۲). فرم بلند D2 با ۴۴۴ اسید آمینه، وزنی معادل ۵۰ کیلو دالتون دارد و بر روی غشای پس‌سیناپسی واقع است و برداشت دوپامین و باز کردن کانال‌های Ca^{+2} را تنظیم می‌کند؛ فرم کوتاه متشکل از ۴۱۵ اسید آمینه، به صورت اتورسپتور عمل کرده و تنظیم فعالیت تیروزین هیدروکسیلاز را بر عهده دارد. این دو ایزوفرم به جز حضور ۲۹ اسید آمینه در حلقه درون‌سلولی سوم فرم بلند، به طور کامل با یکدیگر مشابه هستند (۲۳).

با توجه به افزایش میزان دوپامین ناشی از حساسیت القا شده توسط مورفین و تأکید مطالعات متعدد بر اثرگذاری لیتیم بر سیستم دوپامینژیک و نقش آن در جلوگیری از اثرات مختلف ناشی از مصرف مورفین، در این طرح بیان ژن گیرنده D2 ابتدا در حضور مورفین و سپس همراه با لیتیم در سه ناحیه از مغز

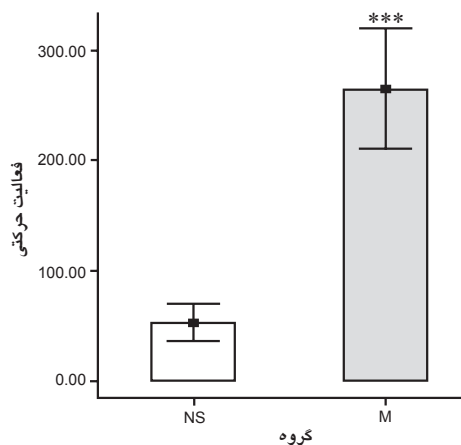
آنالیز بیان ژن

پس از بررسی منحنی ذوب محصولات و هضم آنزیمی محصولات تکثیر یافته به منظور حصول اطمینان از صحت عملکرد پرایمرهای طراحی شده، آزمایش بر نمونه‌ها انجام و بیان ژن در گروه‌های مورد آزمایش توسط تکنیک Real-time PCR (Relative Real-Time PCR)، محاسبه و با گروه کنترل (سالین) مقایسه شد. در هر آزمایش انجام شده، از دو نمونه کنترل مثبت و منفی جهت سهولت و دقت در تعیین Ct استفاده شد. داده‌های نهایی توسط نرم‌افزار SPSS 14 مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی بیان ژن، هر یک از گروه‌های دریافت کننده مورفین، لیتیم ۵ میلی گرم بر کیلوگرم و لیتیم ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم ابتدا به طور جداگانه نسبت به گروه کنترل (سالین) مقایسه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون یک طرفه ANOVA و آزمون Tukey صورت گرفت. در مرحله بعد به منظور بررسی تداخل عملکرد لیتیم و مورفین از آزمون دوطرفه ANOVA و آزمون Tukey استفاده شد.

یافته‌ها

اندازه‌گیری فعالیت حرکتی

بررسی میزان فعالیت حرکتی در دو گروه آزمایشی، با استفاده از آزمون T (شکل ۱)، در گروهی که از قبل با مورفین تیمار شده بودند نسبت به گروه کنترل سالین، افزایش معنی‌دار ($p < 0.001$) را نشان می‌دهد که این به معنای القای حساسیت است.



شکل ۱: افزایش فعالیت حرکتی ناشی از حساسیت به مورفین با استفاده از آزمون T. یک گروه از حیوانات (M) به مدت ۳ روز مورفین ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه دیگر (NS) سالین دریافت کردند. پس از ۵ روز هر دو گروه با مورفین ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند و فعالیت حرکتی آن‌ها در ۲۰ دقیقه شمارش شد. *** نشان دهنده ($p < 0.001$) است. داده‌ها بر اساس میانگین \pm خطای معیار میانگین (SEM) برای ۱۶ موش در هر گروه، نشان داده شده است.

بررسی کارایی واکنش PCR و رسم منحنی استاندارد

به این منظور، رقت‌های متوالی ۱/۴، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ از مخلوط cDNA حاصل از هر سه ناحیه برای پرایمرهای گیرنده D2 دوپامین و رقت‌های متوالی ۱، ۱/۴ و ۱/۱۶ برای پرایمر β -actin به میزان ۴۰ سیکل تکثیر شدند و نمودار Ct در مقابل غلظت رسم و شب نمودار جهت محاسبه بازدهی تکثیر (Amplification Efficiency) مورد استفاده قرار گرفت. رسم منحنی استاندارد نشان داد که هر دو فاکتور E و R^2 برای ژن D2L برابر با ۰/۹۹ و

نظر شامل استریاتوم، هیپوکامپ و کورتکس پرفرونتال انجام شد. پیش از هر بار نمونه‌برداری، کلیه وسایل اتوکلاو و در حین کار نیز با الکل شعله‌ور شده سپس مورد استفاده قرار گرفت. پس از بیهوشی خفیف حیوان توسط CO_2 ، سر حیوان به سرعت قطع و پس از باز کردن پوست سر از ناحیه پشت، استخوان جمجمه شکسته و مغز حیوان خارج و به مدت ۳۰ ثانیه در محلول رینگر و بر روی یخ، قرار می‌گرفت تا بافت مغز برای نمونه‌برداری آماده شود. پس از این مرحله، مغز به سرعت برش داده شده و از ۳ ناحیه مغز شامل: استریاتوم، پری‌فرونتال کورتکس (PFC) و هیپوکامپ نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جداسازی از مغز، به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفته و تا زمان استخراج RNA در فریزر $-80^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل با استفاده از محلول RNX (سیناژن)، استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر ارزیابی شد. ۱ میکروگرم از RNA کل، جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی با آنزیم DNase I (Fermentas) به مدت ۳۰ دقیقه در $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد تیمار و سپس برای تهیه cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (Fermentas) و الیگومرهای (Fermentas) dT به عنوان پرایمر، مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر

ژن کدکننده گیرنده دوپامین، حاوی ۱۸ اگزون است؛ از پردازش متناوب mRNA گیرنده دوپامین دو ایزوفرم بلند (D2L) و کوتاه (D2S) ایجاد می‌شود که فرم بلند دارای تمامی اگزون‌ها و فرم کوتاه فاقد اگزون ۵ است. با توجه به این امر، به جهت تکثیر افتراقی هر دو نوع گیرنده، از پرایمرهایی استفاده شد که از قبل به همین منظور طراحی شده و در بررسی بیان ژن در مغز موش‌های حساس به آمفتامین توسط گیوردانو و همکاران مورد استفاده قرار گرفته بود (۲۶). پرایمر جهت تکثیر

D2L (5' AACTGTACCCACCCTGAGGA 3')

به ناحیه‌ای درون اگزون ۵ و پرایمر

Forward D2S (5' CACCACTCAAGGATGCTGCCCG 3')

به ناحیه اتصال اگزون ۴ و ۶ متصل می‌شود؛ پرایمر

Reverse (5' GTTGCTATGTAGACCGTG 3')

نیز که درون ناحیه‌ای در اگزون ۶ طراحی شده قابلیت اتصال به هر دو نوع گیرنده را داراست. β -actin نیز به عنوان کنترل داخلی، با توالی (5' GAAATCGTGCGTGACATCAAAG 3')

برای پرایمر Forward و توالی

(5' TGTAGTTTCATGGATGCCACAG 3')

برای پرایمر Reverse، مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر قطعه موردنظر

آزمایش‌های qPCR بر نمونه‌های موردنظر در دستگاه Corbet Rotorgene Research, Australia 65H0 و با استفاده از کیت Quantifast SYBRGreen PCR محصول شرکت کیاژن انجام شد. فعال‌سازی اولیه آنزیم به مدت ۵ دقیقه در $95^\circ C$ درجه سانتی‌گراد، و اسرشت‌سازی (Denaturation) به مدت ۱۰ ثانیه در $95^\circ C$ درجه سانتی‌گراد، اتصال / طولیل‌سازی (Annealing/extension) به مدت ۳۰ ثانیه در $60^\circ C$ درجه سانتی‌گراد انجام و برای ۳۵-۴۰ چرخه تکرار شد.

بررسی بیان ژن D2S و D2L در حضور مورفین

بررسی نتایج در گروه‌های دریافت کننده مورفین نشان می‌دهد که سطح رونوشت D2L در هر سه ناحیه مورد بررسی (استریاتوم، هیپوکامپ و PFC) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارد، درحالی که سطح رونوشت D2S در نواحی استریاتوم و PFC با افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) همراه است (شکل‌های ۳-۵).

بررسی بیان ژن D2S و D2L در حضور لیتیم کلراید

میانگین سطح بیان ژن D2L افزایش معنی‌دار را میان گروه دریافت کننده لیتیم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل در نواحی هیپوکامپ و PFC ($p < 0.05$) و هم‌چنین استریاتوم ($p < 0.01$) نشان می‌دهد در حالی که در گروه‌های تیمار شده با لیتیم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اختلاف معنی‌دار در هیچ‌یک از نواحی مورد آزمایش مشاهده نمی‌شود (شکل‌های ۳A-۵A).

میانگین سطح بیان D2S در گروه تیمار شده با لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل سالین (NS)، با افزایش معنی‌دار در نواحی استریاتوم ($p < 0.01$) و PFC ($p < 0.05$) همراه است. تغییر معنی‌دار در میزان بیان ژن D2S در گروه تیمار شده با لیتیم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه کنترل (NS) مشاهده نمی‌شود (شکل‌های ۳B-۵B).

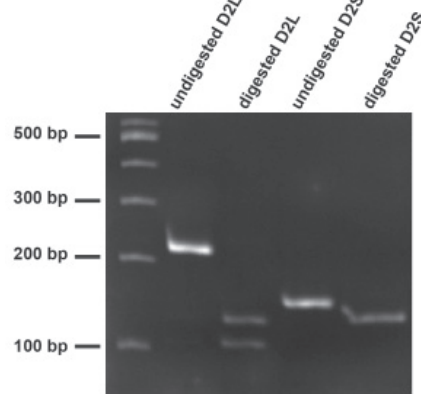
بررسی تداخل (Interaction) عملکرد لیتیم و مورفین

به منظور بررسی تداخل عملکرد لیتیم و مورفین بر بیان ژن گروه‌های کنترل (سالین)، لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لیتیم کلراید ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در یک گروه و گروه‌های «مورفین»، «مورفین + لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم» و «مورفین + لیتیم کلراید ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم» در گروه دوم قرار گرفتند.

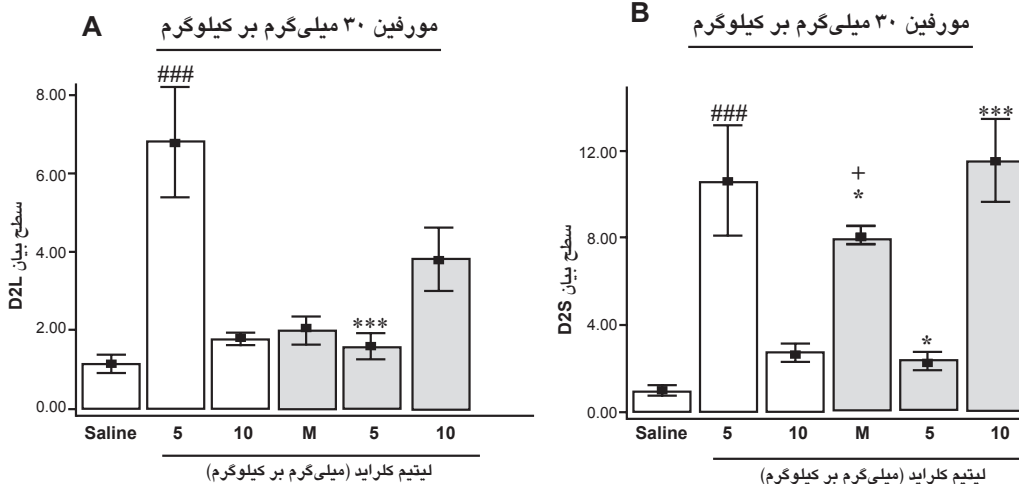
برای ژن‌های D2S و β -actin به طور مشابه به ترتیب برابر با ۱ و ۰٫۹۹ می‌باشد. جهت حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر و عدم حضور محصولات غیراختصاصی، در پایان کار بررسی منحنی ذوب از دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتیگراد برای هر سه نوع محصول تکثیر شده رسم شده و حضور تنها یک پیک، دال بر تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر بود.

تایید محصولات تکثیر یافته توسط هضم آنزیمی

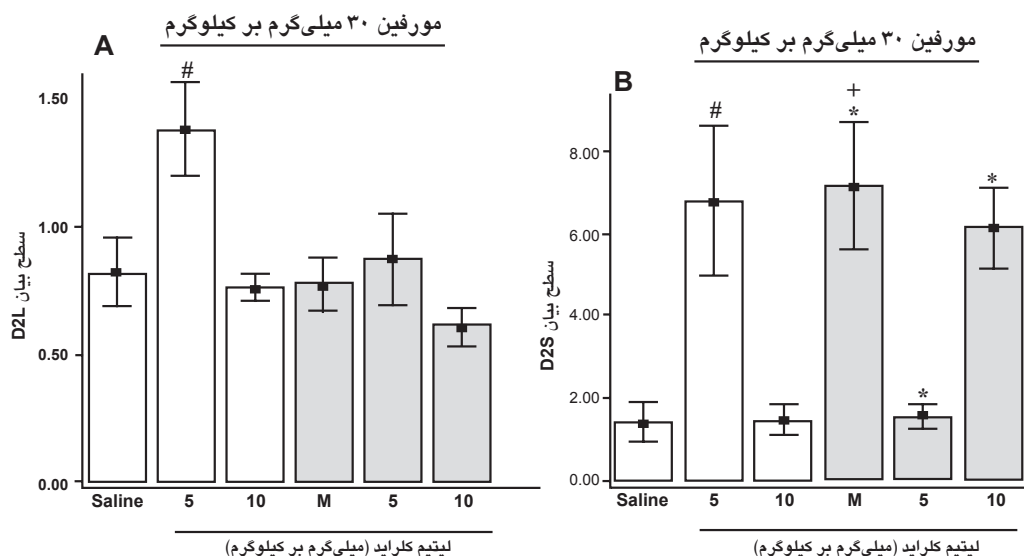
پس از تکثیر رونوشت‌های D2S و D2L به منظور تایید صحت قطعات تکثیر یافته، از هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم SmaI استفاده شد. مکان شناسایی این آنزیم توالی GAGCTC می‌باشد. هضم آنزیمی D2L با طول ۲۲۸ bp، دو قطعه به طول ۱۲۶ و ۱۰۲ جفت باز و هضم آنزیمی D2S با طول ۱۵۵ bp قطعاتی به طول ۱۱۶ و ۳۹ جفت باز ایجاد می‌کند (شکل ۲).



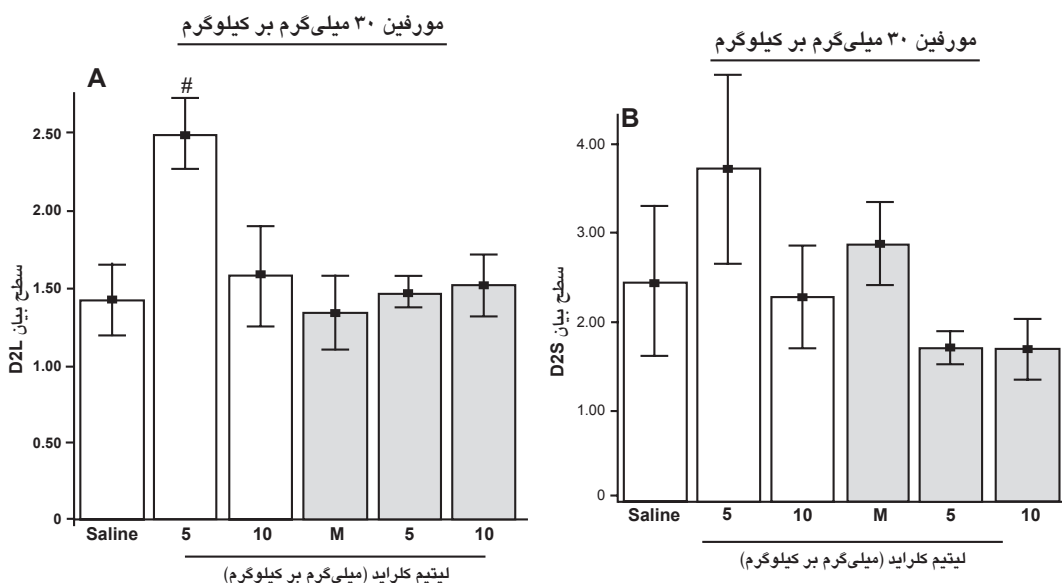
شکل ۲: نتایج هضم آنزیمی؛ محصول تکثیر شده D2L دو قطعه به طول‌های ۱۲۶ و ۱۰۲ جفت باز و محصول D2S قطعاتی به طول ۱۱۶ و ۳۹ جفت باز تولید می‌کند که قطعه دوم به علت کوچک بودن قابل مشاهده نیست.



شکل ۳: در استریاتوم، مقایسه میانگین سطح بیان در گروه تیمار شده با مورفین (M) با گروه کنترل سالین برای D2S معنی‌دار ($p < 0.05$) است. مقایسه میانگین سطح بیان در گروه تیمار شده با لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۵) با گروه کنترل سالین برای هر دو ایزوفرم (A و B) معنی‌دار ($p < 0.01$) است. بررسی تداخل عملکرد لیتیم و مورفین نیز برای هر دو ایزوفرم معنی‌دار است ($p < 0.05$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.0001$). داده‌ها بر اساس میانگین \pm خطای معیار میانگین (SEM) برای ۸ موش در هر گروه، بیان شده است.



شکل ۴: در پری فرونتال کورتکس (PFC)، مقایسه میانگین سطح بیان در گروه تیمار شده با مورفین (M) با گروه کنترل سالین برای D2S معنی‌دار ($p < 0.05$) است. در مقایسه گروه تیمار شده با لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۵) با گروه کنترل سالین (NS) تغییر میانگین سطح بیان برای هر دو ایزوفرم (A) D2L و (B) D2S معنی‌دار ($p < 0.05$) است. بررسی تداخل عملکرد لیتیم و مورفین تنها برای ایزوفرم D2S معنی‌دار است ($p < 0.05$). داده‌ها بر اساس میانگین \pm خطای معیار میانگین (SEM) برای ۸ موش در هر گروه، بیان شده است.



شکل ۵: در هیپوکامپ، مقایسه میانگین سطح بیان در گروه تیمار شده با مورفین (M) با گروه کنترل سالین برای هیچ یک از دو ایزوفرم معنی‌دار نیست تغییر میانگین سطح بیان پس از تیمار با لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۵) در مقایسه با گروه کنترل سالین برای ایزوفرم D2L معنی‌دار ($p < 0.05$) است. تداخل عملکرد لیتیم و مورفین تغییر معنی‌داری در هیچ یک از گروه‌ها را نشان نمی‌دهد. داده‌ها بر اساس میانگین \pm خطای معیار میانگین (SEM) ۸ موش در هر گروه، نشان داده شده است.

کیلوگرم» در مقایسه با گروه لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌شود؛ تداخل عملکرد در این ناحیه معنی‌دار است ($p < 0.01$) [F(۲، ۴۲)=۱۵/۲] (شکل ۳A).

نتایج به دست آمده نشان داد که در استریاتوم، تیمار هم‌زمان مورفین و لیتیم به طرز معنی‌دار سبب کاهش سطح رونوشت ایزوفرم D2L در گروه «مورفین + لیتیم کلراید ۵ میلی‌گرم بر

رها سازی دوپامین نقش اصلی در این تنظیم بر عهده دارد (۲۱). پیش از این نیز اسپنگل و همکاران (۲۷) و نستبای و همکاران (۲۸) طی یک بررسی نشان دادند که حساسیت به داروهای اپیویدی با افزایش حساسیت انتهای پیش سیناپسی دوپامین در آکومبسن همراه است. اگرچه تصور عموم بر آن است که تطابقت نوری حاصل از مصرف مکرر دارو منجر به بیان حساسیت رفتاری می شود، اما توجه به این نکته ضروری است که برخی از تاثیرات ناشی از دارو به طور مستقیم واسطه بیان حساسیت نیست بلکه برخی تغییرات ممکن است بر روی حساسیت بی اثر بوده و برخی دیگر نتیجه پاسخی جبرانی در راستای کاهش حساسیت داشته باشند (۲۹). با توجه به این یافته ها به نظر می رسد که افزایش سطح رونوشت اتوگیرنده D2S در استریاتوم و PFC یک پاسخ جبرانی در برابر افزایش میزان دوپامین ناشی از حساسیت به مورفین بوده باشد.

گیرنده های دوپامین، همانند سایر پروتئین های (GPCR) G-protein Coupled Receptor در معرض مکانیسم های تنظیمی متعددی هستند که می تواند به طور مثبت یا منفی بیان و فعالیت آن ها را تنظیم کند. مطالعه بر روی گیرنده D2 نشان داده است که تنظیم این گیرنده به شدت وابسته به فعال سازی آن توسط آگونیست است و می تواند به نتایج متفاوتی نظیر: از بین رفتن حساسیت (Desensitization) عملکردی، درونی شدن (Internaliza-tion) گیرنده، تنظیم کاهشی (Down Regulation) یا افزایشی (Up Regulation) منجر شود (۳۰).

پروتئین کیناز C (PKC) یک آنزیم تنظیمی کلیدی است که عملکرد نورو نهای پیش و پس سیناپسی، رها سازی نوروترنسمیتر و تنظیم گیرنده را واسطه می کند. مطالعات متعددی نشان می دهد که PKC های مختلفی در CNS، در بسیاری از پاسخ های تطابق عصبی (Neuroadaptation) به مورفین دخیل هستند (۳۱). نتایج یک بررسی نشان می دهد که PKC فعال شده توسط پیامبر ثانویه، گیرنده D2 را در چندین ناحیه درون ۲ دایم از سومین حلقه درون سلولی فسفریله می کند و این عمل منجر به از بین رفتن حساسیت و درونی شدن گیرنده توسط β -ارستین (β -Arrestin) می شود. نتیجه یک مطالعه نیز نشان می دهد که میزان PKC فسفریله شده در پی حساسیت به مورفین در لیمبیک مغز جلویی (Limbic Forebrain) افزایش می یابد (۳۲). بنابراین به نظر می رسد که پاسخ گیرنده پس سیناپسی D2L به افزایش دوپامین ناشی از حساسیت به مورفین، به صورت تغییرات عملکردی و انتقال گیرنده است تا اینکه با تغییر در سطح بیان ژن همراه باشد.

در مرحله دوم کار، بیان ژن در حضور مورفین به همراه دو دوز متفاوت از لیتیم کلراید بررسی شد. اما پیش از آن، نحوه عملکرد لیتیم بر بیان ژن در دو گروه کنترل که لیتیم کلراید را به تنهایی دریافت کرده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت، مطالعه ما نشان داد که تیمار ۵ میلی گرم بر کیلوگرم با افزایش میزان رونوشت هر دو نوع ایزوفرم در هر سه ناحیه همراه است که این تغییر در مورد D2L در تمام نواحی مورد مطالعه و در مورد D2S در نواحی استریاتوم و PFC معنی دار است ($p < 0.05$). این نتیجه مطابق با یافته های وسی لوسکا - زیدزیکا و ودزونی (۱۸) و کامدا و همکاران (۳۳) است که نشان دادند بیان گیرنده دوپامین در اثر تیمار با لیتیم افزایش می یابد.

ناحیه پروموتوری گیرنده D2 دارای یک توالی حفاظت شده برای اتصال (Activator protein a; AP-a) است (۳۴). مطالعات صورت گرفته بر روی لیتیم و عملکرد ملکولی آن نشان می دهد که تیمار با

در همین ناحیه، سطح رونوشت D2S در گروه «مورفین + لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلوگرم» در مقایسه با گروه لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به طرز معنی دار کاهش یافته است؛ بیان D2S در گروه «مورفین + لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم» در مقایسه با گروه لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم و هم چنین گروه مورفین نسبت به گروه سالین، با افزایش معنی دار همراه است؛ بنابراین تداخل عملکرد در این ناحیه نیز معنی دار است (شکل ۳B).

در ناحیه PFC سطح رونوشت D2L تغییر معنی دار در هیچ یک از گروه ها نشان داده نمی شود و تداخل عملکرد در این ناحیه معنی دار نیست [$F(2, 42) = 1.7$ ($p < 0.05$) (شکل ۴A)]. در همین ناحیه، افزایش معنی دار سطح رونوشت D2S ($p < 0.05$) در مقایسه گروه مورفین با گروه سالین و هم چنین گروه «مورفین + لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم» با گروه لیتیم کلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده می شود. بیان D2S در گروه «مورفین + لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلوگرم» در مقایسه با گروه لیتیم کلراید ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به طرز معنی دار ($p > 0.05$) کاهش یافته است. بنابراین تداخل عملکرد هم زمان مورفین و لیتیم در این ناحیه و برای ژن مذکور معنی دار است [$F(2, 42) = 25.3$ ($p < 0.05$) (شکل ۴B)]. سطح بیان ژن در هیپوکامپ، تغییر معنی دار در هیچ یک از گروه ها نشان نمی دهد؛ تداخل عملکرد در این ناحیه برای هیچ یک از دو ایزوفرم [$F(2, 45) = 3$ ($p < 0.05$) (D2L) ($F(2, 45) = 1.94$ ($p < 0.05$)) (D2S)] معنی دار نیست (شکل ۵).

بحث

در مطالعه حاضر، بیان گیرنده D2 دوپامین با استفاده از پرایمرهایی که به طور جداگانه هر دو ایزوفرم را شناسایی و تکثیر می کنند، بررسی شد. پردازش متناوب از پیش ساز mRNA این گیرنده، دو نوع ایزوفرم کوتاه (D2S) و بلند (D2L) تولید می کند که به جز حضور ۲۹ اسید آمینه در حلقه سوم درون سلولی به طور کامل با یکدیگر مشابه هستند (۲۲). هر دو ایزوفرم از طریق اتصال به G پروتئین های حساس به سم پرتوسیسی (Pertussis Toxin-Sensitive G Proteins) که باعث کاهش فعالیت آدنیلات سیکلاز می شود عمل می کنند. مطالعات نشان می دهد که گیرنده های D2L و D2S به پروتئین های Gi متفاوتی متصل می شوند که به احتمال به دلیل تفاوت ساختاری آن ها است (۲۳).

در مرحله اول کار، بیان گیرنده ها در حضور مورفین بررسی شد. مطالعه ما نشان داد که بیان D2L در هر سه ناحیه مورد بررسی (استریاتوم، PFC و هیپوکامپ) نسبت به گروه کنترل تغییر معنی دار ندارد در حالی که بیان D2S در دو ناحیه استریاتوم و PFC به طور معنی دار ($p < 0.05$) با افزایش همراه است. مطالعه فرانسوا و همکاران نشان می دهد که که گیرنده های D2 نقش مستقیم و بسیار مهمی در تنظیم میزان دوپامین ناشی از مورفین و کوکائین دارد. طی بررسی بر روی موش های knock-out برای D2L نشان داده شد که این گیرنده نقشی در کنترل میزان دوپامین ندارد. یافته های این مطالعه حاکی از آن است که اتوگیرنده D2S - که توسط دوپامین خارج سلولی فعال می شود - با مهار سنتز و

می‌شود. چنانچه این امر در مورد تیمار انجام شده صادق باشد، به نظر می‌رسد که لیتیم در دوز پایین تر به شیوه‌ای مشابه، با افزایش دوپامین ناشی از حساسیت به مورفین مقابله کرده و میزان بیان ژن اتوگیرنده D2S دچار تغییر نمی‌شود؛ این امر در حالی است که تیمار با لیتیم کلراید ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدون تاثیر بر میزان انتقال دوپامینی، به مورفین اجازه عمل می‌دهد و با پاسخ جبرانی مغز (افزایش میزان اتوگیرنده) مواجه می‌شود.

در کل، نتایج حاصل از این طرح نشان می‌دهد که حساسیت القا شده توسط مورفین، با افزایش در سطح رونوشت ایزوفرم D2S در نواحی استریاتوم و PFC همراه است و این افزایش در حضور دوز کمتری از لیتیم (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مهار و در حضور دوز بالاتر آن (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقویت می‌شود.

عدم مشاهده تغییر سطح رونوشت در ناحیه هیپوکامپ، شاید به دلیل درگیر بودن سایر میانجی‌های عصبی و گیرنده‌ها در این ناحیه باشد. در هر صورت، با توجه به پیچیده بودن نوروبیولوژی مغز و مکانیسم‌های نورونی درگیر در پدیده اعتیاد و اطلاعات اندکی که در رابطه با حساسیت به مورفین در سطح ملکولی در دسترس است که آن هم بیشتر بر نواحی مزولیمبیک (شامل VTA و NAC) متمرکز است، اعلام نظر قطعی در مورد چگونگی رخدادهای واقع شده بسیار دشوار است و به تحقیقات حساب شده و بی‌شماری در این زمینه نیازمند است.

از جمله سایر تحقیقات تکمیلی در این زمینه می‌توان به بررسی گیرنده D2L و D2S در سطح پروتئین نظیر وسترن بلات، بررسی تغییرات احتمالی اعمال شده ناشی از حساسیت به مورفین در سایر گیرنده‌های دوپامینی، بررسی انتقال دوپامین در نواحی بررسی شده به منظور تایید و یا رد فرضیه داده شده، بررسی سطح پروتئین GRK و یا سایر هدف‌های مهم فرودست گیرنده دوپامین، بررسی سایر تنظیم کننده‌های سطح دوپامین سیناپسی نظیر DAT، TH و غیره و در نهایت بررسی میزان گرایش و فعالیت گیرنده دوپامین به لیگاند در حضور لیتیم کلراید، اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

در حال حاضر، تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و ملکولی با گسترش دامنه اطلاعات راجع به ریشه‌یابی و نوروبیولوژی پدیده اعتیاد و کشف راهکارهای جدید درمانی، می‌تواند در کاهش این معضل اجتماعی نقش چشم‌گیری ایفا نماید. این سطح از بررسی‌ها می‌تواند دیدگاهی جامع از تاثیرات ژنتیکی، اهداف بیولوژیکی داروها و آن دسته از مسیرهای انتقال پیام که منجر به راه‌اندازی فرایندهای انطباق نورونی و به تعاقب آن پیامدهایی، نظیر استفاده غیر قابل کنترل از مواد، ترک، و سوسه مصرف و برگشت می‌شوند، فراهم آورد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از ستاد مبارزه با مواد مخدر که با حمایت مالی از این طرح، ما را در انجام آن یاری رساندند.

References

- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993; 18(3): 247-291.
- Richtand NM. Behavioral sensitization, alternative

لیتیم منجر به افزایش بیان و یا فعالیت بسیاری از فاکتورهای رونویسی، از جمله AP-1 می‌شود (۳۵، ۳۶). امروزه مشخص شده است که فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی در سلول‌های یوکاریوتی، نقش مهمی در راه‌اندازی بیان ژن دارد. بر طبق یک مطالعه انجام شده، فعالیت تنظیمی گیرنده D2 توسط AP-1 ناشی از فسفریلاسیون در نواحی متفاوت C-jun است که برخی از این نواحی سوبسترای آنزیم GSK-3 است (۳۷). مطالعات نشان می‌دهد که لیتیم با مهار GSK-3، باعث افزایش فعالیت اتصال این فاکتور به DNA می‌شود (۱۶).

در گروه دیگر، بیان ژن پس از تیمار با لیتیم کلراید ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بررسی شد. نتایج حاکی از آن است که تیمار صورت گرفته، اثری بر بیان ژن هیچ یک از دو ایزوفرم نداشت، به نظر می‌رسد افزایش دوز با تاثیری متفاوت، و یا فعال کردن مسیری جبرانی، با مهار عمل لیتیم در افزایش بیان ژن گیرنده D2 دوپامینی همراه است. مطالعات نشان می‌دهد که تیمار مزمن با لیتیم منجر به کاهش فعالیت اتصال AP-1 می‌شود؛ این عمل دوگانه لیتیم منجر به فرضیه‌ای شده است که بیان می‌دارد لیتیم قادر است توازن میان تنظیم کننده‌های منفی و مثبت بیان ژن را برقرار کند و از این طریق پایداری و بقای عملکرد آن‌ها را به صورت بهینه تنظیم نماید (۳۸).

در مرحله سوم کار، بیان ژن در حضور مورفین به همراه لیتیم بررسی شد. به منظور بررسی تداخل لیتیم در عملکرد مورفین از آزمون دوطرفه ANOVA استفاده شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که در استریاتوم سطح رونوشت D2L در تیمار هم‌زمان لیتیم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مورفین با کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار صرف با لیتیم همراه است و سطح رونوشت حاصل، نسبت به گروه کنترل سالین بدون تغییر باقی می‌ماند این امر در حالی است که تیمار جداگانه با لیتیم و مورفین با افزایش معنی‌دار همراه است. مشابه همین قضیه در مورد D2S نیز مصداق دارد. سطح رونوشت D2S در تیمار هم‌زمان لیتیم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مورفین با کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار لیتیم بدون مورفین همراه است. عکس قضیه در مورد لیتیم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده می‌شود؛ در حالی که تیمار با لیتیم به تنهایی اثری بر بیان ژن ندارد ولی در حضور مورفین سطح رونوشت ژن با افزایش معنی‌دار همراه است. آنالیز آماری نیز نشان می‌دهد که تداخل عمل لیتیم و مورفین در استریاتوم بر بیان ژن هر دو ایزوفرم معنی‌دار است. در PFC، میزان بیان D2L تغییر معنی‌دار را نشان نمی‌دهد ولی سطح رونوشت D2S مشابه با آنچه که در استریاتوم اتفاق می‌افتد، دچار تغییر می‌شود و آنالیز آماری تداخل را معنی‌دار نشان می‌دهد. در هیپوکامپ تداخل عمل در هیچ یک از دو ایزوفرم مشاهده نمی‌شود. با توجه به نتایج فوق، تصور می‌شود که در کل تغییر در سطح رونوشت گیرنده D2 در حضور مورفین به تنهایی و یا به همراه لیتیم متأثر از تغییر در انتقال دوپامین است تا اینکه به‌طور مستقیم توسط لیتیم و یا مورفین کنترل شود. مطالعه انجام شده توسط وسی‌لوسکا-زیدزیکا (۳۹) حاکی از آن است که تیمار با لیتیم سبب کاهش انتقال دوپامین در سیستم دوپامینریک splicing, and d3 dopamine receptor-mediated inhibitory function. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31(11): 2368-2375.

3. Kuribara H. Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation

- by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol.* 1995; 275(3): 251-258.
4. Serrano A, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. Effects of DA D1 and D2 antagonists on the sensitisation to the motor effects of morphine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26(7-8): 1263-1271.
 5. Jeziorski M, White FJ. Dopamine receptor antagonists prevent expression, but not development, of morphine sensitization. *Eur J Pharmacol* 1995; 275(3): 235-244.
 6. Abrahamson JR. Use of lithium to control drug abuse. *Am J Psychiatry.* 1983; 140(9): 1256.
 7. Dehpour AR, Farsam H, Azizabadi-Farahani M. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome and the development of physical dependence by lithium in mice. *Neuropharmacology.* 1995; 34(1): 115-121.
 8. Liebman JM, Segal DS. Lithium differentially antagonises self-stimulation facilitated by morphine and (+)-amphetamine. *Nature*, 1976; 260(5547): 161-163.
 9. Dehpour AR, Farsam H, Azizabadi-Farahani M. The effect of lithium on morphine-induced analgesia in mice. *Gen Pharmacol.* 1994; 25(8): 1635-1641.
 10. Johnston IN, Westbrook RF. Inhibition of morphine analgesia by lithium: role of peripheral and central opioid receptors. *Behav Brain Res.* 2004; 151(1-2): 151-158.
 11. Carroll BJ, Sharp PT. Ruidium and lithium: opposite effects on amine-mediated excitement. *Science.* 1971; 172(990): 1355-1357.
 12. You ZD, Li JH, Song CY, Lu CL, He C. Oxytocin mediates the inhibitory action of acute lithium on the morphine dependence in rats. *Neurosci Res.* 2001; 41(2): 143-150.
 13. O'Donnell KC, Gould TD. The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31(6): 932-962.
 14. de Gandarias JM, Acebes I, Echevarría E, Vegas L, Abecia LC, Casis L. Lithium alters mu-opioid receptor expression in the rat brain. *Neurosci Lett.* 2000. 279(1): 9-12.
 15. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72(8): 3092-3096.
 16. Ikononov OC, Manji HK. Molecular mechanisms underlying mood stabilization in manic-depressive illness: the phenotype challenge. *Am J Psychiatry.* 1999; 156(10): 1506-1514.
 17. Li PP. Transcriptional mechanisms of lithium action: therapeutic implications. *Clinical Neuroscience Research.* 2004; 4: 271-280.
 18. Dziedzicka-Wasylewska M, Wedzony K. The effect of prolonged administration of lithium on the level of dopamine D2 receptor mRNA in the rat striatum and nucleus accumbens. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1996; 56(1): 29-34.
 19. Bozzi, Y, Borrelli E. Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it? *Trends Neurosci.* 2006; 29(3): 167-174.
 20. Rani M, Kanungo MS. Expression of D2 dopamine receptor in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344(3): 981-986.
 21. Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E. Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci.* 2002; 22(8): 3293-3301.
 22. Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature.* 1989; 342(6252): 926-929.
 23. Lindgren N, Usiello A, Gojny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, et al. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 4305-4309.
 24. Zarrindast MR, Fazli-Tabaei S, Ahmadi S, Yahyavi SH. Effect of lithium on morphine state dependent memory of passive avoidance in mice. *J Physio Behav.* 2006; 87: 409-415.
 25. Sahraei H, Faghieh-Monzavi Z, Fatemi SM, Pashaei-Rad S, Salimi SH, Kamalinejad M. Effect of papaver rhoeas Extract on the acquisition and expression of morphine-induced behavioral sensitization in mice. *Phytother Res.* 2006; 20: 737-741.
 26. Giordano TP 3rd, Satpute SS, Striessnig J, Kosofsky BE, Rajadhyaksha AM. Up-regulation of dopamine D(2) L mRNA levels in the ventral tegmental area and dorsal striatum of amphetamine-sensitized C57BL/6 mice: role of Ca(v)1.3 L-type Ca(2+) channels. *J Neurochem.* 2006; 99(4): 1197-1206.
 27. Spanagel R, Almeida OF, Shippenberg TS. Long lasting changes in morphine-induced mesolimbic dopamine release after chronic morphine exposure. *Synapse.* 1993; 14(3): 243-245.
 28. Nestby P, Vanderschuren LJ, De Vries TJ, Hogenboom F, Wardeh G, Mulder AH, et al. Ethanol, like psychostimulants and morphine, causes long-lasting hyperactivity of dopamine and acetylcholine neurons of rat nucleus accumbens: possible role in behavioural sensitization. *Psychopharmacology (Berl).* 1997; 133(1): 69-76.
 29. Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2000; 151(2-3): 99-120.
 30. Sibley DR, Neve KA. The Dopamine Receptors. In: Neve KA, Neve RL (eds). *Totowa, NJ, US: Humana Press Inc;* 1997; 383-424.
 31. Namkung Y, Sibley DR. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem.* 2004; 279(47): 49533-49541.
 32. Narita M, Mizuo K, Shibasaki M, Narita M, Suzuki T. Up-regulation of the G(q/11alpha) protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience.* 2002; 111(1): 127-132.
 33. Kameda K, Miura J, Suzuki K, Kusumi I, Tanaka T, Koyama T. Effects of lithium on dopamine D2 receptor expression in the rat brain striatum. *J Neural Transm.* 2001; 108(3): 321-334.
 34. Valdenaire O, Vernier P, Maus M, Dumas Milne Edwards JB, Mallet J. Transcription of the rat dopamine-D2-receptor gene from two promoters. *Eur J Biochem.*

- 1994; 220(2): 577-584.
35. Yuan PX, Chen G, Huang LD, Manji HK. Lithium stimulates gene expression through the AP-1 transcription factor pathway. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 58(1-2): 225-230.
36. Ozaki N , Chuang DM. Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *J Neurochem*. 1997; 69(6): 2336-2344.
37. Wang J, Miller JC, Friedhoff AJ. Differential regulation of D2 receptor gene expression by transcription factor AP-1 in cultured cells. *J Neurosci Res*. 1997; 50(1): 23-31.
38. Jope RS. A bimodal model of the mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry*. 1999; 4(1): 21-25.
39. Dziedzicka-Wasylewska M, Maćkowiak M, Fijat K, Wedzony K. Adaptive changes in the rat dopaminergic transmission following repeated lithium administration. *J Neural Transm*. 1996; 103(7): 765-767.
-