مقاله پژوهشی اصیل

نقش گیرنده‌های موسکارینی ناحیه تگمنتوم شکمی، در اکتساب ترجیح مکان شرطی‌شده ناشی از مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

فرزانه نظری سرنجه
دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

دکترآمنه رضایوف[1]
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران

یاسمن رسولی
دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

دکترمحمدرضا زرین‌دست
گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

هدف: ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) مرکز اصلی پاداش است. در این تحقیق، اثرات تزریق آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی به ناحیه VTA، بر ترجیح مکان شرطی‌شده ناشی از مورفین بررسی شد. **روش:** کانول‌گذاری موش‌های بزرگ آزمایشگاهی به صورت دوطرفه در ناحیه VTA و با استفاده از دستگاه استریوتاکسی صورت گرفت. کلیه حیوانات جراحی‌شده به‌مدت یک هفته قبل از القای ترجیح مکان شرطی‌شده (CPP) دورهٔ بهبودی را گذراندند. CPP به روش بدون سوگیری و به صورت یک برنامه پنج روزه در سه مرحله اجرا شد: مرحله پیش‌شرطی‌سازی یا آشنایی، مرحله شرطی‌سازی و مرحله آزمون. **یافته‌ها:** تیمارهای شرطی‌سازی با مقادیر مختلف سولفات مورفین توانست به صورت وابسته به مقدار، CPP معنی‌داری ایجاد کند. تزریق مقادیر مختلف فیزوستیگمین (مهارکنندهٔ کولین استراز) همراه با یک دوز بی‌اثر مورفین به داخل VTA توانست در یک روش وابسته به مقدار، اکتساب CPP را افزایش دهد. تزریق آتروپین، آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی، به داخل VTA توانست هم ترجیح مکان شرطی‌شده به‌وسیله دوز بالای مورفین و هم پاسخ تقویتی القاشده به‌وسیله فیزوستیگمین را مهار نماید. تزریق فیزوستیگمین داخل VTA به‌تنهایی تنفر مکانی معنی‌داری القا نمود، درحالی که آتروپین چنین اثری نداشت. مقادیر بالای فیزوستیگمین یا آتروپین به‌تنهایی و همچنین تزریق همزمان آتروپین و فیزوستیگمین در ترکیب با یک مقدار بی‌اثر مورفین باعث کاهش فعالیت حرکتی گردید. **نتیجه‌گیری:** گیرنده‌های موسکارینی ناحیه تگمنتوم شکمی در القای اثرات پاداشی مورفین نقش بسزایی دارند.

کلید واژه‌ها: *مورفین، فیزوستیگمین، آتروپین، ترجیح مکان شرطی‌شده، ناحیه تگمنتوم شکمی*

مقدمه

بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که سیستم دوپامینی مزولیمبیک در بروز اثرات پاداشی مشتقات تریاک، از جمله مورفین، نقش مهمی به عهده دارد (مانزاندو[2]، آگویلار[3]، رودریگویز- آریاس[4] و مینارو[5]، ۲۰۰۱؛ اولمستید[6] و فرانکلین[7]، ۱۹۹۷ الف و ب). مورفین با حذف اثر مهاری اینترنورون‌های گابائرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی[8] (VTA)، نورون‌های دوپامینی این ناحیه را تحریک می‌کند و به‌این وسیله سبب افزایش انتقال دوپامین به هستهٔ اکومبنس و در نتیجه بروز اثرات پاداشی خود می‌شود (مک براید[9]،

۱ - نشانی تماس: تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی.
Email: rezayof@khayam.ut.ac.ir

2- Manzanedo
3- Aguilar
4- Rodriguez-arias
5 - Minarro
6- Olmstead
7- Franklin
8- ventral tegmental area
9- McBride

مورفی[1] و ایکیموتو[2]، ۱۹۹۹؛ میلر[3]، فارستر[4]، یئومنز[5] و بلاها[6]، ۲۰۰۵). اما به نظر می‌رسد که این مسیر دوپامینی تنها مسیر درگیر در اثرات پاداشی مشتقات تریاک نیست. VTA از هسته‌های تگمنتوم پدونکولوپونتین[7] و پشتی - جانبی[8] ورودی‌های کولینرژیکی دریافت می‌کند که مستقیم و غیرمستقیم فعالیت نورون‌های دوپامینی و در نتیجه فعالیت سیستم پاداشی مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهد (میلر و بلاها، ۲۰۰۵؛ میلر و همکاران، ۲۰۰۵). در نتیجه تنظیم کولینرژیکی آزادشدن دوپامین در تحریک پاداشی مغز بسیار ضروری است (یئومنز و باپتیستا[9]، ۱۹۹۷؛ یئومنز، فارستر و بلاها، ۲۰۰۱). استیل کولین نقش مهمی در کنترل رفتارهای وابسته به پاداش، تغذیه و مهارت‌های حرکتی دارد (گریلنر[10]، بونسی[11]، سونسون[12]، برناردی[13] و مرکوری[14]، ۱۹۹۹؛ دی کیارا[15]، ۲۰۰۰). این ناقل عصبی از طریق اتصال به دو زیرنوع اصلی از گیرنده‌های غشایی، یعنی گیرنده‌های موسکارینی و گیرنده‌های نیکوتینی (که از ترکیب پنج زیرواحد از زیرواحدهای α_{10} - α_2 و β_4 - β_2 ایجاد می‌شوند) اثر خود را اعمال می‌کند (وولتورتون[16]، پیدوپلیکو[17]، بروید[18]و دنی[19]، ۲۰۰۳). مشخص شده است که VTA دارای مقادیر بالایی از آنزیم سازندهٔ استیل کولین، یعنی استیل کولین ترانسفراز و آنزیم غیرفعال‌کنندهٔ آن، یعنی استیل کولین استراز می‌باشد (گرین‌فیلد[20]، ۱۹۹۱). اگرچه به گیرنده‌های موسکارینی ناحیه VTA توجه کمی شده، حضور آنها در VTA اثبات شده است (وینر[21]، لوی[22] و بران[23]، ۱۹۹۰).

تحریک گیرنده‌های موسکارینی که روی نورون‌های دوپامینی VTA قرارگرفته‌اند، باعث آزاد شدن دوپامین در هستهٔ اکومبنس می‌شود (گرونیر[24]، پری[25] و راسموسن[26]، ۲۰۰۰) و این آزادسازی نقش مهمی در فعالیت سیستم پاداش دارد (یئومنز و باپتیستا، ۱۹۹۷). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ترجیح مکان شرطی‌شده[27] (CPP) روش مناسبی برای ارزیابی وابستگی روانی و عوامل مغزی مؤثر بر آن می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مورفین باعث تولید CPP می‌شود (زرین‌دست و همکاران، ۲۰۰۴؛ زرین‌دست، فتاحی، رستمی و رضایوف، ۲۰۰۵؛ رضایوف، رضوی، حائری روحانی، رسولی و زرین‌دست، ۲۰۰۷) و پیشنهاد کرده‌اند که سیستم‌های ناقل عصبی متعددی در بیان CPP مورفین نقش دارند. استیل‌کولین در VTA از طریق اثر بر گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی، سبب دپولاریزاسیون نورون‌های دوپامینی می‌شود (یئومنز، ۱۹۹۵؛ پیدوپلیکو، دی‌بیاسی[28]، ویلیامز[29] و دنی، ۱۹۹۷)، بنابراین بین مشتقات تریاک و سیستم کولینرژیک در VTA برهم‌کنش وجود دارد (واکر[30]، مک‌گلین[31]، گری[32]، راگوزینو[33] و گلد[34]، ۱۹۹۱؛ زرین‌دست و جمشیدزاده، ۱۹۹۲). مطالعه دیگری نیز نقش سیستم کولینرژیک ناحیه هیپوکامپ پشتی را در CPP مورفین تأیید نموده است (رضایوف، ذات‌علی، حائری روحانی و زرین‌دست، ۲۰۰۶). علیرغم اثبات نقش سیستم کولینرژیک در رفتارهای وابسته به پاداش و نقش مهم ناحیه VTA در فرآیند پاداش، تاکنون دربارهٔ ارتباط سیستم کولینرژیک و اپیوئیدرژیک ناحیه VTA در بروز اثرات پاداشی مشتقات تریاک تحقیقی نشده است. مطالعه حاضر با تحریک و مهار گیرنده‌های موسکارینی ناحیه VTA به‌وسیله فیزوستیگمین و آتروپین، نقش این گیرنده‌ها را در چگونگی القای CPP ناشی از مورفین بررسی کرده است.

روش

در این تحقیق از موش بزرگ آزمایشگاهی[35] نر نژاد ویستار[36] به وزن تقریبی ۳۰۰-۲۴۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌بود، استفاده گردید. یک هفته قبل از شروع آزمایش، حیوانات به حیوانخانه دارای دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد و دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی شش صبح) منتقل و به‌صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری شدند. هرگروه آزمایشی،

1- Murphy
2- Ikemoto
3- Miller
4 - Forster
5- Yeomans
6 - Blaha
7- pedunculopontine
8 - laterodorsal
9- Baptista
10 - Grillner
11- Bonci
12 - Svensson
13- Bernardi
14 - Mercuri
15- Di Chiara
16- Wooltorton
17- Pidoplichko
18- Broid
19- Dani
20- Greenfield
21- Weiner
22 - Levey
23- Brann
24- Gronier
25- Perry
26- Rasmussen
27- Conditioned Place Preference
28 - DeBiasi
29- Wiliams
30- Walker
31- McGlynn
32 - Grey
33- Ragozzino
34 - Gold
35- rat
36- Wistar

هشت حیوان داشت و هر حیوان فقط یک‌بار آزمایش می‌شد. تمام آزمایش‌ها نیز در زمان معینی از روز انجام می‌گرفت. برای انجام آزمایش‌های این تحقیق از مواد و داروهای زیر استفاده شد: کتامین هیدروکلراید و زایلزین مخلوط شده که به‌عنوان داروی بیهوشی و به‌صورت درون صفاقی تزریق می‌شد؛ سولفات مورفین؛ فیزوستیگمین به‌عنوان آگونیست گیرنده‌های موسکارینی؛ آتروپین به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی.

به‌منظور جراحی و کانول‌گذاری، ابتدا حیوان وزن و سپس با تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) و زایلزین (۴ mg/kg) بیهوش می‌شد. آن‌گاه با استفاده از دستگاه استریوتاکسی و مختصات ناحیه VTA بر اساس اطلس [از برگما۵/۸ mm- =قدامی- خلفی (AP)؛ از خط وسط ۰/۹ mm± = میانی – جانبی (ML)؛ از سطح جمجمه ۸ mm = خلفی- شکمی(DV)]. کلیه حیوانات در ناحیه VTA کانول‌گذاری شدند. حیوانات جراحی شده به‌مدت یک هفته قبل از CPP دوره بهبودی را گذراندند. دستگاه ترجیح مکان شرطی‌شده (CPP) سه قسمتی و از جنس چوب و بر اساس طرح کار و وایت ساخته شده بود. روش ترجیح مکان شرطی‌شده بر اساس طرح بدون سوگیری و بر پایه روش دفونسکا[1] و همکاران (۱۹۹۵) طراحی شده بود. این روش یک برنامه پنج روزه با سه مرحله مشخص می‌باشد که عبارتند از: مرحله پیش از شرطی‌سازی، مرحله شرطی‌سازی و مرحله آزمون (رضایوف و همکاران، ۲۰۰۶).

مراحل آزمایش‌ها

۱- آزمایش اول، منحنی مقدار-پاسخ برای CPP مورفین: برای به‌دست آوردن منحنی مقدار-پاسخ، مقادیر مختلف سولفات مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ mg/kg) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. چهار گروه از حیوانات در طی مرحله شرطی‌سازی به تناوب مورفین و سالین دریافت کردند. به گروه پنجم نیز به عنوان گروه شاهد، در طی مرحله شرطی‌سازی فقط سالین تزریق شد. در طی مرحله آزمون، فعالیت حرکتی هر پنج گروه ارزیابی گردید.

۲- آزمایش دوم، اثر فیزوستیگمین (آگونیست گیرنده موسکارینی) همراه مورفین یا بدون آن بر اکتساب CPP: ابتدا توانایی فیزوستیگمین در القای CPP، بدون حضور مورفین ارزیابی شد. به‌این ترتیب که در طی مرحله شرطی‌سازی ابتدا به سه گروه از حیوانات مقادیر مختلف فیزوستیگمین (۰/۵، ۲/۵ و ۵ µg/rat) به‌صورت داخل VTA و بلافاصله بعد از آن سالین (۱ ml/kg) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. یک گروه نیز به‌عنوان شاهد ابتدا یک تزریق درون VTA سالین (۱ µl/rat) و بلافاصله بعد از آن تزریق زیرجلدی سالین (۱ ml/kg) دریافت کرد. همه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، بدون هیچ‌گونه تزریقی وارد مرحله آزمون شدند و طی این مرحله فعالیت حرکتی آنها نیز مورد سنجش قرار گرفت. چهار گروه دیگر از حیوانات در طی مرحله شرطی‌سازی ابتدا به‌صورت داخل VTA سالین (۱ µl/rat) یا فیزوستیگمین (۰/۵، ۲/۵ و ۵ µg/rat) و سپس تزریق زیرجلدی مورفین (۰/۵ mg/kg) دریافت کردند و به این ترتیب اثر فیزوستیگمین بر اکتساب CPP مورفین ارزیابی شد. کلیه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق در مرحله آزمون قرار گرفتند. در این مرحله فعالیت حرکتی آنها نیز اندازه‌گیری شد.

۳- آزمایش سوم، اثر آتروپین (آنتاگونیست گیرندهٔ موسکارینی) همراه مورفین یا بدون آن بر اکتساب CPP: برای ارزیابی اثر آتروپین بر اکتساب CPP مورفین، قبل از تزریق زیرجلدی مورفین و در طی مرحله شرطی‌سازی، به چهار گروه از حیوانات مقادیر مختلف آتروپین (۱، ۲ و ۴ µg/rat) یا سالین (۱ µl/rat) به‌صورت درون VTA تزریق شد. سه گروه از حیوانات نیز ابتدا تزریق آتروپین (۱، ۲ و ۴ µg/rat) به داخل VTA و سپس تزریق زیرجلدی سالین (۱ ml/kg) دریافت کردند. یک گروه نیز به‌عنوان گروه شاهد، سالین درون مغزی (۱ µl/rat) همراه با سالین زیرجلدی (۱ ml/rat) دریافت کرد. در طی مرحله آزمون، فعالیت حرکتی همه گروه‌ها ارزیابی شد.

۴- آزمایش چهارم، اثر آتروپین بر واکنش فیزوستیگمین در طی CPP مورفین: پنج گروه از حیوانات یک تزریق داخل VTA سالین (۱ µl/rat) یا مقادیر مختلف آتروپین(۲، ۴ و ۸ µg/rat) را دریافت کردند و پس از پنج دقیقه به آنها سالین (۱ µl/rat) یا فیزوستیگمین (۵ µg/rat) به صورت درون VTA تزریق شد. در طی مرحله

1- DeFonseca

شرطی‌سازی، حیوانات به‌صورت زیرجلدی مورفین (۰/۵ mg/rat) یا سالین (۱ ml/kg) دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، همه گروه‌ها وارد مرحله آزمون شدند و فعالیت حرکتی آنها نیز اندازه‌گیری شد.

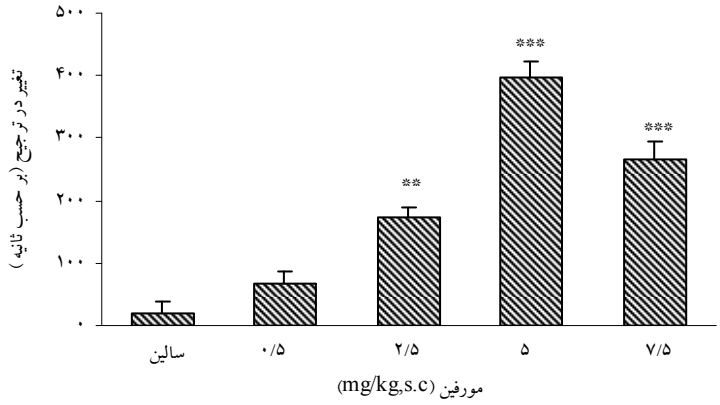
تحلیل آماری

در تمام آزمایش‌ها داده‌ها (نمرات شرطی‌شدن و فعالیت حرکتی) به‌صورت میانگین و خطای معیار میانگین ثبت شد. برای تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی، روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه و به دنبال آن آزمون توکی به‌کار رفت و اختلاف $p<۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با نرم افزارهای SPSS و INSTAT انجام شد.

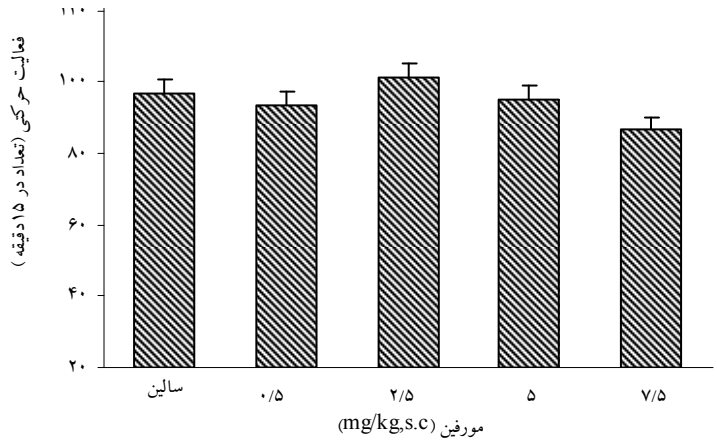
یافته‌ها

۱- آزمایش اول؛ منحنی مقدار- پاسخ برای CPP مورفین: شکل ۱- الف CPP ناشی از تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف مورفین را در حیواناتی که ناحیه تگمنتوم شکمی آنها کانول گذاری شده بود، نشان می‌دهد. آزمون آماری ANOVA یک طرفه نشان داد که نسبت به گروه شاهد (سالین)، مورفین به‌صورت وابسته به مقدار سبب القای CPP شد [$F(۴و۳۵) = ۵۱/۷$ $p<۰/۰۰۰۱$]. مقادیر مختلف مورفین (۲/۵، ۵ و ۷/۵ mg/kg) CPP معنی‌داری ایجاد کرد و بیشترین پاسخ با ۵ mg/kg مورفین مشاهده شد. شکل (۱- ب) نشان می‌دهد که در مرحله آزمون، فعالیت حرکتی حیواناتی که در مرحله شرطی‌سازی مقادیر مختلفی از مورفین دریافت کرده بودند، نسبت به گروه سالین تفاوت معنی‌داری نداشت.

الف:



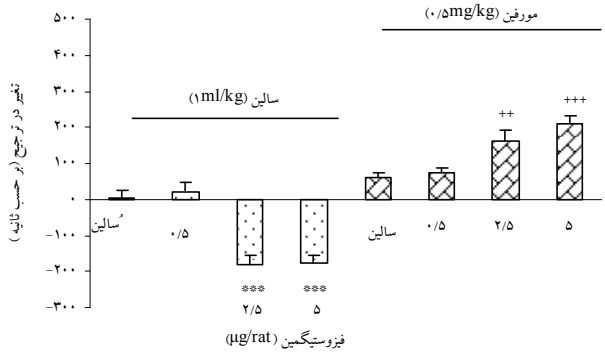
ب:



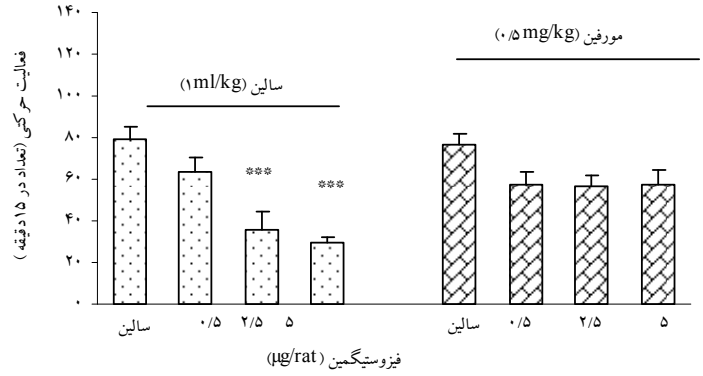
شکل ۱- *الف) ترجیح مکان شرطی‌شده (CPP) ناشی از مورفین. ب) اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین بر فعالیت حرکتی. $p<۰/۰۰۱$*** و $p<۰/۰۱$** در مقایسه با گروه شاهد.*

۲- آزمایش دوم؛ اثر فیزوستیگمین (آگونیست گیرنده موسکارینی) همراه مورفین یا بدون آن بر اکتساب CPP: شکل(۲- الف) تأثیر تزریق دوطرفه مقادیر مختلف فیزوستیگمین(۰/۵، ۲/۵ و۵ µg/rat) یا سالین همراه یا بدون مورفین به درون ناحیه VTA را بر اکتساب CPP نشان می‌دهد. آزمون ANOVA دوطرفه وجود تداخل بین فیزوستیگمین و مورفین را در اکتساب CPP نشان داد [مقایسه داخل گروهی: اثر تیمار: $p<۰/۰۰۰۱$ ،$F(۱ و ۵۶)=۱۷۶/۹$ ؛ اثر مقدار: $p<۰/۰۵$ ،$F(۳ و ۵۶)=۲/۸$؛ و تداخل تیمار× مقدار: $p<۰/۰۰۰۱$ ،$F(۳ و ۵۶)=۳۲/۷$] . به‌علاوه تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق فیزوستیگمین (۲/۵ و ۵ µg/rat) به‌تنهایی سبب تنفر مکانی شرطی‌شده[1] می‌شود [$p<۰/۰۰۰۱$ ،۳۱/۳ = $F(۳ و ۲۸)$]، اما مصرف مقدار زیاد فیزوستیگمین (۲/۵ و ۵ µg/rat) اکتساب CPP به‌وسیله مورفین (۰/۵ mg/kg) را تقویت می‌کند. همچنین شکل ۲- ب تاثیر تزریق دوطرفه فیزوستیگمین را در روز آزمون بر فعالیت حرکتی نشان می‌دهد. آزمون آماری واریانس دوطرفه، اثر معنی‌دار تیمار [$p<۰/۰۵$ ،$F(۱ و ۵۶)=۴/۴$]، مقدار [$p<۰/۰۰۰۱$ ،$F(۳ و ۵۶)=۱۱/۷$] و تداخل تیمار× مقدار [$p<۰/۰۵$ ،$F(۳ و ۵۶)=۳/۲$] را نشان داد. همچنین آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق مقادیر زیاد فیزوستیگمین (۲/۵ و ۵ µg/rat) به‌تنهایی باعث کاهش فعالیت حرکتی می‌شود [$p<۰/۰۰۰۱$ ،$F(۳ و ۲۸)=۱۲/۶$]، ولی همراه با مورفین (۰/۵ mg/kg) تاثیری بر فعالیت حرکتی ندارد.

الف:



ب:

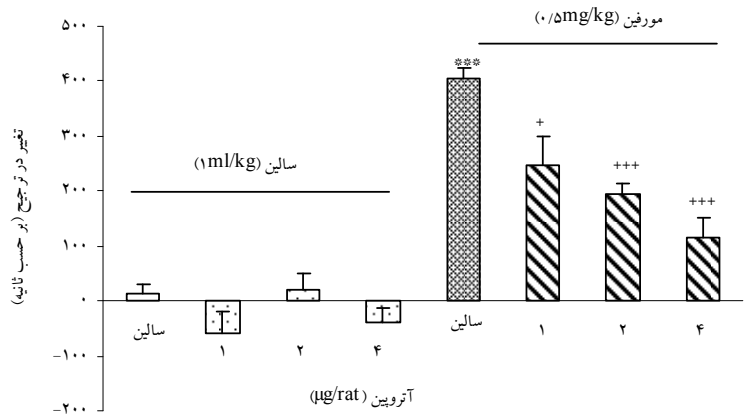


شکل ۲–*الف) اثرات تزریق دوطرفه فیزوستیگمین به داخل VTA به‌تنهایی و همراه با مورفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی‌شده . ب)- اثرات تزریق دوطرفه فیزوستیگمین (در غیاب یا حضور مورفین) به داخل ناحیه VTA بر فعالیت حرکتی در روز. $p<۰/۰۰۱$***در مقایسه با گروه کنترل سالین/ سالین؛ $p<۰/۰۰۱$+++ و $p<۰/۰۱$++ در مقایسه با گروه کنترل مورفین/ سالین.*

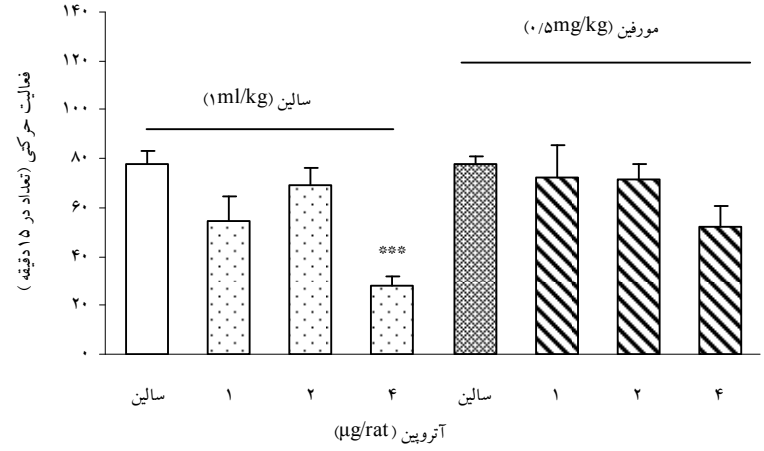
1- conditioned place aversion

۳- آزمایش سوم؛ اثر آتروپین (آنتاگونیست گیرنده موسکارینی) همراه یا بدون مورفین بر اکتساب CPP: شکل ۳- الف اثرات تزریق دوطرفه مقادیر مختلف آتروپین (۱، ۲ و ۴ µg/rat) یا سالین (۱ µl/rat) را به درون ناحیه VTA همراه یا بدون مورفین بر اکتساب CPP نشان می‌دهد. آزمون تحلیل واریانس دوطرفه وجود تداخل معنی‌دار بین مورفین و آتروپین را بر اکتساب CPP نشان داد [مقایسه داخل گروهی: اثر تیمار $p<۰/۰۰۱$، $F(۱و۵۶)=۱۴۳/۸$؛ اثرمقدار: $p<۰/۰۰۱$، $F(۳و۵۶)=۱۰/۹$؛ تداخل تیمار× مقدار: $p<۰/۰۰۰۱$، $F(۳و۵۶)=۷/۳$]. همچنین آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان دادکه تزریق مقادیر مختلف آتروپین به‌تنهایی درون VTA قادر به القای CPP نمی‌باشد. به‌علاوه مصرف آتروپین همراه با مورفین توانست CPP القاشده به‌وسیله مورفین را در یک روش وابسته به مقدار مهار نماید [$p<۰/۰۰۰۱$، $F(۳و۲۸)=۱۳/۸$]. شکل ۳- ب نیز اثر تزریق آتروپین را بر فعالیت حرکتی در روز آزمون نشان می‌دهد. آزمون تحلیل واریانس دوطرفه تأثیر معنی‌دار مقدار را نشان داد [$p<۰/۰۰۱$، $F(۳و۵۶)=۷/۴$]. نتایج برای تیمار و تداخل تیمار× مقدار تأثیر معنی‌داری نشان نداد. همچنین آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که مصرف بیشترین مقدار آتروپین (۴ µg/rat) به‌تنهایی فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد [$p<۰/۰۰۱$، $F(۳و۲۸)=۷/۴$]، اما همراه با مورفین(۵ mg/kg) بر فعالیت حرکتی اثری ندارد.

الف:



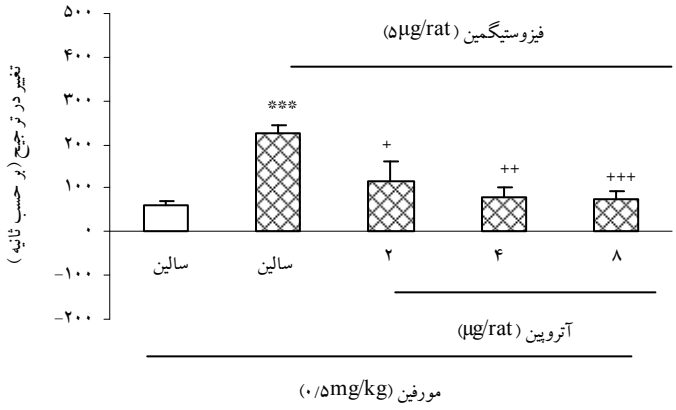
ب:



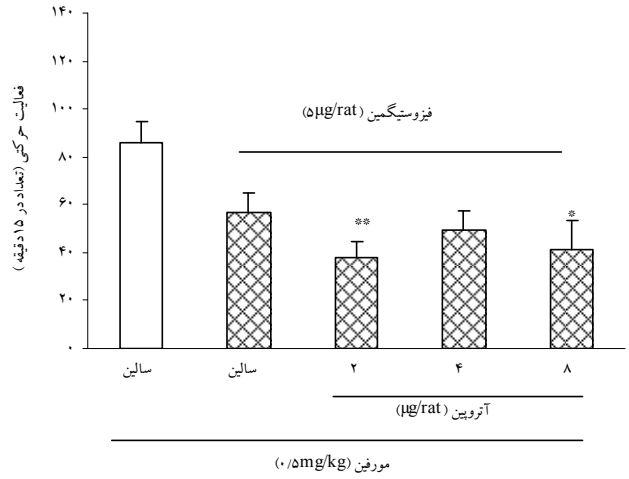
شکل ۳-*الف) اثر تزریق دوطرفه آتروپین به VTA به‌تنهایی و همراه با مورفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی‌شده. ب): اثرات تزریق دوطرفه آتروپین در غیاب یا حضور مورفین (۵ mg/kg) به ناحیه VTA بر فعالیت حرکتی در روز آزمون. $p<۰/۰۰۱$*** در مقایسه با گروه شاهد سالین/سالین؛ $p<۰/۰۰۱$+++ و $p<۰/۰۵$+ در مقایسه با گروه شاهد مورفین/ سالین.*

۴- آزمایش چهارم؛ اثرآتروپین بر واکنش فیزوستیگمین در طی CPP مورفین: شکل ۴- الف اثر تزریق درون VTA آتروپین (۲، ۴ و ۸ µg/rat) را بر ترجیح مکانی القاشده به‌وسیله مورفین (۰/۵ mg/kg) در ترکیب با فیزوستیگمین (۵ µg/rat) نشان می‌دهد. تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که آتروپین پاسخ تقویتی القاشده به‌وسیله فیزوستیگمین در ترکیب با مورفین را تغییر می‌دهد. نتایج حاکی از آن بود که آتروپین اثر فیزوستیگمین بر پاسخ مورفین را مهار می‌کند. شکل ۴- ب نیز برهم‌کنش آتروپین و فیزوستیگمین را بر فعالیت حرکتی، در روز آزمون در طی شرطی‌سازی سه روزه با مورفین نشان می‌دهد. تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق دوطرفه آتروپین (۲، ۴ و ۸ µg/rat) قبل از فیزوستیگمین(۵ µg/rat)، همراه با مورفین (۰/۵ mg/kg) فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد [$F(۴ و ۳۵) = ۴/۷$ ،$p < ۰/۰۱$].

الف:



ب:



شکل ٤- *الف) اثرات تزریق دوطرفه آتروپین قبل از تزریق فیزوستیگمین به داخل VTA در حضور مورفین (۰/۵mg/kg) بر اکتساب CPP. ب) اثرات برهم‌کنش آتروپین و فیزوستیگمین بر فعالیت حرکتی در روز آزمون. ۰/۰۵>p*، ۰/۰۱>p**، ۰/۰۰۱>p*** در مقایسه با گروه شاهد سالین/مورفین؛ ۰/۰۰۱>p+++، ۰/۰۱>p++، ۰/۰۵>p+ در مقایسه با گروه شاهد سالین/فیزوستیگمین/مورفین.*

بحث

در مطالعه حاضر تزریق مقادیر مختلف مورفین (۷/۵ mg/kg – ۰/۵) توانست به‌صورت وابسته به مقدار، CPP معنی‌داری در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی تولید نماید. این یافته‌ها همخوان با مطالعات قبلی (اولمستید و فرانکلین، ۱۹۹۷ الف، ب)، نشان می‌دهد که مورفین اثرات پاداشی خود را از طریق یادگیری ارتباطی با محیطی که این اثرات درآن رخ داده است، القا می‌نماید. در تحقیق حاضر نشان داده شد که مقادیر به‌کار رفته مورفین نتوانست فعالیت حرکتی را در مقایسه با گروه شاهد در طی مرحله آزمون تغییر دهد. بسیاری از شواهد بیان می‌کند که فعال شدن سیستم دوپامینی مزولیمبیک برای بیان ترجیح مکان شرطی‌شده ضروری است (مک‌براید و همکاران، ۱۹۹۹؛ مانزاندو و همکاران، ۲۰۰۱). با وجود این، شواهد دیگر مؤید آن است که سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری و جایگاه‌های مغزی، گرچه ممکن است خود اثرات پاداشی نداشته باشند، اما از طریق دخالت در فرآیندهایی که برای بیان CPP ضروری می‌باشند، می‌توانند بر پاداش مورفین تأثیر بگذارند (اولمستید و فرانکلین، ۱۹۹۷ الف، ب). در تحقیق حاضر نقش گیرنده‌های موسکارینی VTA بر CPP مورفین بررسی شد.

مطالعهٔ حاضر نشان داد که تحریک گیرنده‌های موسکارینی VTA به‌وسیله فیزوستیگمین (مهارکنندهٔ آنزیم کولین استراز) در ترکیب با یک مقدار بی‌اثر مورفین (۰/۵ mg/kg) به‌صورت وابسته به مقدار، CPP معنی‌داری القا می‌نماید. این اثر فیزوستیگمین مطابق با مطالعاتی است که نشان داده‌اند تزریق ترکیبی مورفین و فیزوستیگمین اثرات ضد درد مشتقات تریاک را افزایش می‌دهد (بیلین[1] و همکاران، ۱۹۹۷). به‌علاوه مشخص شده است که آثار پاداشی مورفین که درCPP اندازه‌گیری می‌شود، در موش‌های فاقد گیرنده‌های M_5 موسکارینی کاهش می‌یابد (باسیل[2] و همکاران، ۲۰۰۲). گرونیر و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که تحریک گیرنده‌های موسکارینی VTA سبب شلیک عصبی نورون‌های دوپامینی در VTA و متعاقب آن افزایش دوپامین در VTA، هستهٔ اکومبنس و قشر پیشانی می‌شود. بنابراین به احتمال قوی تزریق فیزوستیگمین به VTA از طریق مکانیسم گفته شده، خواص دوپامینی مورفین را در هستهٔ اکومبنس افزایش می‌دهد. همچنین تحقیق حاضر نشان داد که تزریق دوطرفهٔ آتروپین به داخل VTA در یک روش وابسته به مقدار از ترجیح مکانی القاشده به‌وسیله مورفین (۵ mg/kg) ممانعت می‌کند. ضمناً مشاهده شد که آتروپین اثر تقویتی فیزوستیگمین را بر پاسخ مورفین مهار می‌کند. در این راستا مطالعات قبلی نشان داده است که تزریق آتروپین به VTA سبب مهار خودتحریکی وکاهش ولع غذایی (رادا[3]، مارک[4]، یئومنز و هوبل[5]، ۲۰۰۰) و همچنین مهار پاداش خودتحریکی مغز می‌گردد (یئومنز و باپتیستا، ۱۹۹۷). مهار گیرنده‌های موسکارینی VTA اثرات تحریکی مورفین بر انتقال دوپامینی مزواکومبنس و نیگرواستریاتال را کاهش می‌دهد (میلر و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج مؤید آن است که گیرنده‌های موسکارینی VTA درCPP مورفین نقش دارند. ضمن این که تزریق بیشترین مقدار فیزوستیگمین به داخل VTA، به‌تنهایی تنفر مکانی شرطی‌شده را القا می‌نماید، در حالی که در ترکیب با مورفین فاقد چنین اثری است. گریلنر و همکاران (۱۹۹۹) بیان کردند که موسکارین، کاربا‌کول و فیزوستیگمین پتانسیل سیناپسی تحریکی در نورون‌های دوپامینی VTA و بخش متراکم جسم سیاه را کاهش می‌دهد. به احتمال قوی این اثر مهاری ناشی از فعال شدن گیرنده‌های موسکارینی پیش سیناپسی M_3 می‌باشد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گیرنده‌های موسکارینی اثرات پس‌سیناپسی مستقیم روی نورون‌ها دارند و بنابراین می‌توانند انتقال سیناپسی را در قسمت‌های مختلف مغز از طریق عمل بر گیرنده‌های مختلف یا از طریق مهار پیش‌سیناپسی تنظیم کنند (هسو[6]، هوانگ[7] و گین[8]، ۱۹۹۵). ازطرفی مطالعهٔ ما نشان داد که تزریق بالاترین مقدار فیزوستیگمین یا آتروپین به‌تنهایی در داخل VTA فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استدلال کرد که اثر مقدار بالای فیزوستیگمین بر تولید CPP ممکن است به‌دلیل تأثیر دارو بر حرکت باشد. تزریق ترکیب آتروپین و فیزوستیگمین به داخل VTA همراه با مورفین سبب کاهش فعالیت حرکتی در طی فاز آزمون گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال دارد که کاهش فعالیت حرکتی به‌وسیله

1-Beilin
2-Basile
3- Rada
4- Mark
5- Hoebel
6- Hsu
7- Huang
8 - Gean

داروها در طی فاز آزمون، از القای ترجیح مکان شرطی‌شده به‌وسیله مورفین ممانعت کند.

بنابراین به نظر می‌رسد که گیرنده‌های موسکارینی ناحیه تگمنتوم شکمی در القای اثرات پاداشی مورفین نقش بسزایی ایفا می‌کنند.

سپاسگزاری

از زحمات فراوان مسؤولان آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران، به خصوص سرکار خانم لادن دلفی سپاسگزاری می‌گردد.

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۶/۱۴؛ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۱۰

منابع

Basile, A. S., Fedorova, I., Zapata, A., Liu, X., Shippenberg, T., & Duttaroy, A. (2002). Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99,* 11452–11457.

Beilin, B., Nemirovsky, A. Y., Zeidel, A., Maibord, E., Zelman, V., & Katz, R. L. (1997). Systemic physostigmine increases the antinociceptive effect of spinal morphine. *Pain, 70*, 217–221.

Carr, G. D., & White, N. M. (1983). Canditioned placed preference from intraaccumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sciences, 33,* 2551-2557.

De Fonseca, F. R. D., Rubio, P., Martin-Caldon, J. L., Caine, S. B., Koob, G. F., & Navarro, M. (1995). The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *European Journal of Pharmacology, 274,* 47-55.

Di Chiara, G. (2000). Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology, 393,* 295-314.

Greenfield, S. A. (1991). A non-cholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the rat brain: From neuronal secretion to the generation of movement. *Cellular and Molecullar Neurobiology, 11,*55 -77.

Grillner, P., Bonci, A., Svensson, T. H., Bernardi, G., & Mercuri, N. B., (1999). Presynaptic muscarinic (M3) receptors reduce excitatory transmission in dopamine neurons of the rat mesencephalon. *Neuroscience, 91,* 557-565.

Gronier, B., Perry, K. W., & Rasmussen, K. (2000). Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology, 147,* 347-355.

Hsu, K. S., Huang, C. C., & Gean, P. W. (1995). Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M3 receptors in the rat striatum. *Neurosience Letters, 197,* 141-144.

Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Rodriguez-arias, M., & Minarro, J. (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioural Brain Research, 121,* 189-197.

McBride, W. J., Murphy, J. M., & Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: Intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural Brain Research, 101,* 129-152.

Miller, A, D., & Blaha, C. D. (2005). Midbrain muscarinic receptor mechanisms underlying regulation of mesoaccumbens and nigrostriatal dopaminergic transmission in the rat. *European Journal of Neuroscience, 21,* 1837-1846.

Miller, A, D., Forster, G. L., Yeomans, J. S., & Blaha, C. D. (2005). Midbrain muscarinic receptors modulate morphine-induced accumbal and striatal dopamine efflux in the rat. *Neuroscience, 136,* 531-538.

Olmstead, M. C., & Franklin, B. J. (1997a). The development of a conditioned place preference to morphine: Effects of lesions of various CNS sites. *Behavioral Neurosience, 111,* 1313-1323.

Olmstead, M. C., & Franklin, B. J. (1997b). The development of a conditioned place preference to morphine: Effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral Neuroscience, 111,* 1324-1334.

Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., & Dani, J. A., (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature, 390,* 401- 404.

Rada, P. V., Mark, G. P., Yeomans, J. J., & Hoebel, B. G., (2000). Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 65,* 375-379.

Rezayof, A., Zatali, H., Haeri-Rohani, A., & Zarrindast M. R. (2006). Dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors are involved in mediating morphine reward. *Behavioural Brain Research, 166,* 281-290.

Rezayof, A., Razavi, S., Haeri-Rohani, A., Rassouli, Y., & Zarrindast, M. R., (2007). GABA(A) receptors of hippocampal CA1 regions are involved in the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *European Neuropsychopharmacology.*

Walker, D. L., McGlynn, T., Grey, C., Ragozzino, M., & Gold, P. E. (1991). Naloxone modulates the behavioral effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology, 105,* 57– 62.

Weiner, D. M., Levey, A. I., & Brann, M. R. (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptors mRNAs in rat basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87,* 7050-7054.

Wooltorton, J. R., Pidoplichko, V. I., Broide, R. S., & Dani, J. A. (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *Journal of Neuroscience, 23,* 3176-3185.

Yeomans, J. (1995). Electrically evoked behaviors: Axons and synapses mapped with collision tests. *Behavioral Brain Research, 67,* 121-132.

Yeomans, J., & Baptista, M. (1997). Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brain-stimulation reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 57,* 915-921.

Yeomans, J., Forster, G., & Blaha, C. (2001). M5 muscarinic receptors are needed for slow activation of dopamine neurons and for rewarding brain stimulation. *Life Science, 68,* 2449-2456.

Zarrindast, M. R., & Jamshidzadeh, A. (1992). Inhibitory effect of morphine on yawning induced by cholinoceptor and dopamine D2 receptor activation in rats. *British Journal of Pharmacology, 105,* 675-678.

Zarrindast, M. R., Lahiji, P., Shafaghi, B., & Sadegh, M. (1998). Effects of GABAergic drugs on physostigmine-induced improvement in memory acquisition of passive avoidance learning in mice. *General Pharmacology: The Vascular System, 31,* 81- 86.

Zarrindast, M. R., Ahmadi, S., Haeri-Rohani, A., Rezayof, A., Jafari, M. R., & Jafari-Sabet, M. (2004). GABA(A) receptors in the basolateral amygdala are involved in mediating morphine reward. *Brain Research, 1006,* 49-58.

Zarrindast, M. R., Fattahi, Z., Rostami, P., & Rezayof, A. (2005). Role of the cholinergic system in the rat basolateral amygdala on morphine-induced conditioned place preference. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 82,* 1-10.