

بررسی اثر تحریک الکتریکی ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) بر اعتیاد به مورفین در رت

**

*

چکیده:

زمینه و هدف: ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA = Ventral Tegmental Area) در مزسفال در دو طرف خط وسط و در عمق ۹ میلی متری از سطح استخوان پس سری قرار داشته و در مراحل شکل گیری اعتیاد دخالت دارد. در این مطالعه تحریک الکتریکی این ناحیه و تأثیرش بر روند اعتیاد به مورفین مورد بررسی قرار گرفته است. روش مطالعه: در یک مطالعه مداخله ای، خود تزریقی داخل وریدی برای یافتن میزان اعتیاد بکار گرفته شد. ۲۴ رت ویستار به سه گروه sham یا سالین (بدون تحریک و دریافت نرمال سالین)، گروه کنترل یا مورفین (بدون تحریک و دریافت مورفین) و گروه case یا مورفین + تحریک (تحریک الکتریکی به میزان $25 \mu A$ = جریان 100 Hz = فرکانس و $0/14$ میلی ثانیه، پانزده دقیقه قبل از خود تزریقی مورفین و به مدت ده دقیقه) تقسیم شدند.

نتایج: فقط در گروه مورفین اعتیاد حاصل شد ولی میزان خود تزریقی مورفین در گروه مورفین + تحریک نسبت به گروه مورفین بسیار کمتر بود که نشان دهنده عدم اعتیاد گروه مورفین + تحریک می باشد. نتیجه گیری: تحریک الکتریکی VTA از افزایش میزان پدال های زده شده جهت دریافت مورفین جلوگیری کرده و بنابراین اثرات پاداشی داشته و موجب آزاد شدن دوپامین در هسته اکومبسنس شده است و می توان گفت که اثر تحریکی نرون های دوپامینی بعد از تحریک این ناحیه بیشتر بوده و غلبه بر تحریک نرون های گابارژیک مهار کننده نرون های دوپامینی و همچنین تحریک ترمینال نرون های اوران تحریکی و یا مهار به VTA دارد.

واژه های کلیدی: اعتیاد، VTA، مورفین.

مقدمه:

یا به صورت اوران های گابارژیک می باشند که از نواحی دیگر مغز وارد آن می شوند. نرون های گابارژیک کنترل پر قدرتی را روی فعالیت نرون های دوپامینرژیک اعمال می کنند (۱). همچنین مشخص شده است که پروجکشن های نرون های دوپامینرژیک و گلو تاماژیک از هسته VTA به هسته اکومبسنس صورت می گیرد (۴، ۹).

از نظر آناتومیکی هسته تگمنتوم شکمی (VTA) در مزسفال در دو طرف خط وسط و در عمق ۹ میلی متری از سطح استخوان پس سری قرار دارد (۷) (نمودار شماره ۴). این ناحیه شامل ۷۰ درصد نرون های دوپامینرژیک و ۳۰ درصد گابارژیک می باشد که نرون های گابارژیک به صورت اینترنرون ها در VTA و

*استادیار گروه فیزیولوژی - دانشگاه های علوم پزشکی اصفهان و شهرکرد: رحمتیه - دانشکده پزشکی - گروه فیزیولوژی - تلفن: ۳۳۳۵۶۵۴.

** دانشجوی کارشناسی ارشد - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

۰۳۸۱، (مؤلف مسئول).

*** استادیار گروه فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

VTA به عنوان یکی از منابع مهم دوپامینرژیک مغز در مراحل شکل گیری اعتیاد دخالت دارد. همچنین تحریک الکتریکی این ناحیه در پردازش اطلاعات مربوط به درد و کنترل پاسخ های حرکتی مؤثر است (۸). نرون های گلوتامینرژیک در VTA دارای گیرنده هایی از نوع NMDA (N-methyle-D-Aspartate) و غیر NMDA می باشند که تحریک هر دوی آنها سرعت تخلیه دوپامین در نواحی هدف را افزایش می دهد (۵). به خاطر وجود گیرنده های اپیوئیدی μ و δ در VTA تزریق آگونیست این گیرنده ها باعث افزایش آزاد شدن دوپامین در هسته اکومبوس و نواحی دیگر می شود. در صورتی که تزریق آگونیست κ (گیرنده اوپیوئیدی دیگر) به این هسته باعث کاهش آزاد شدن دوپامین در اکومبوس شده است (۲، ۳).

بر اساس گزارشات موجود تحریک الکتریکی VTA برای مطالعه درد، کنترل پاسخ های حرکتی، ایجاد بیماری های روانی و تاثیر محرک های بینایی انجام شده است. اما اثر تحریک الکتریکی بر روند اعتیاد انجام نشده و ما در این مطالعه در صدد تحریک الکتریکی این ناحیه و یافتن تاثیرش بر روند اعتیاد به مورفین در مدل حیوانی (rat) می باشیم.

مواد و روشها:

متد خود تزریقی:

یکی از روش های بررسی اعتیاد در مدل های حیوانی است. در این روش از قفس مخصوصی که در دو دیواره مقابل هم دو پدال دارد استفاده می شود. یکی از پدال ها فعال بوده و با فشار آن مورفین از طریق کانول وارد ورید حیوان می شود. پدال دوم غیر فعال است یعنی با فشار دادن آن چیزی در اختیار حیوان قرار نمی گیرد.

جهت ایجاد اعتیاد در چهار روز اول آزمایش موش ها با ۱۲ ساعت گرسنگی داخل قفس قرار می گیرند و با فشار پدال فعال غذا و مورفین دریافت می کنند. در طی این چهار روز به تدریج گرسنگی کاهش و نهایتاً در روز پنجم حذف می شود و حیوانات پدال فعال را صرفاً جهت دریافت مورفین فشار می دهند. طول دوره خود تزریقی ۱۱ روز بود و در هر روز هر حیوان به مدت دو ساعت در قفس خود تزریقی قرار می گرفت. آزمایشات، در شب که رت ها فعالند، انجام می گرفت. زمان و تعداد پدال های زده شده فعال و غیر فعال توسط یک برنامه کامپیوتری (که در این آزمایشگاه تهیه شده است) ثبت می شد.

جراحی:

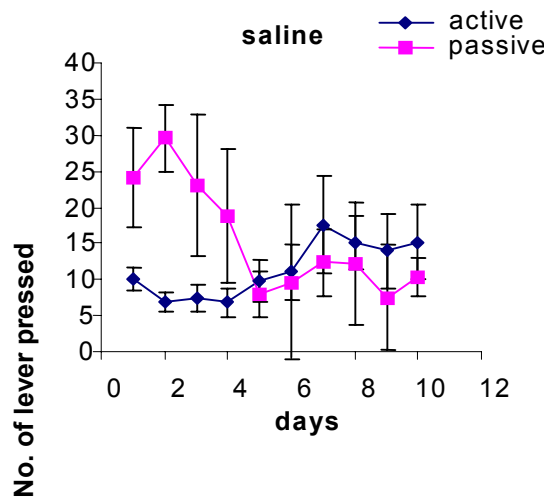
حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۵۰ mg/kg) بی هوش شده و پوست جلوی گردن باز شده و در ورید ژوگولار سمت راست یک کانول قرار داده می شد و با نخ جراحی سیلک کانول به عضلات گردن فیکس شده و سر دیگر آن را از زیر پوست عبور داده از پشت سر خارج می شد. برای جلوگیری از ایجاد لخته، کانول از هیپارین (۵ iu/ml) محلول در نرمال سالین پر بود. به علاوه جهت جلوگیری از عفونت جنتامایسین (۶ mg/kg) و سفازولین (۱۲۰ mg/kg) به صورت زیر جلدی به مدت ۴ روز تزریق می شد. در یکی از گروه ها (مورفین + تحریک الکتریکی) علاوه بر کارهای فوق یک میله باریک استیل با طول فعال $500 \mu\text{m}$ را بوسیله دستگاه استریو تاکس با مختصات (ML = ۰/۵mm, PV = ۸/۳ mm, AP = ۵ mm) به داخل هسته VTA فرستاده و با اکریل دندانپزشکی فیکس می کردیم.

از تعداد پدال های زده شده در هر روز و در هر گروه، میانگین و انحراف معیار محاسبه و بر حسب زمان رسم شد. تعداد پدال های فعال و غیر فعال روزهای پنجم تا یازدهم در هر گروه و بین گروهها با استفاده از repeated measures ANOVA مقایسه قرار گرفت. داده های روزهای ۴-۱ چون غذا هم دریافت می کردند ارزش علمی ندارند.

نتایج:

مقایسه میانگین تعداد پدال های فعال و غیر فعال در گروه سالیین نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین آنها وجود ندارد (نمودار شماره ۱).

با توجه به این که در این گروه عمل جراحی کانول گذاری در ورید انجام شده و با زدن پدال فعال، نرمال سالیین دریافت می کردند. بنابراین نتیجه فوق بیانگر این است که صرف انجام عمل جراحی یا قرار دادن کانول در ورید ژوگولار و همچنین دریافت



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد فشار دادن پدال های فعال و غیر فعال. در طول مدت ده روز در گروه سالیین دریافت سالیین و عدم تحریکی الکتریکی اختلاف معنی دار نیست.

سپس حیوانات به مدت سه روز برای بهبودی در قفس های جدا نگهداری می شدند.

گروههای آزمایشی:

در این تحقیق از رت های نژاد ویستار ۲۷۰ گرم به بالا استفاده شد. رت ها به سه گروه ۸ تائی تقسیم شدند:

۱- گروه سالیین یا Sham (جراحی، بدون تحریک و دریافت ۰/۲ ml نرمال سالیین با فشار دادن هر پدال فعال).

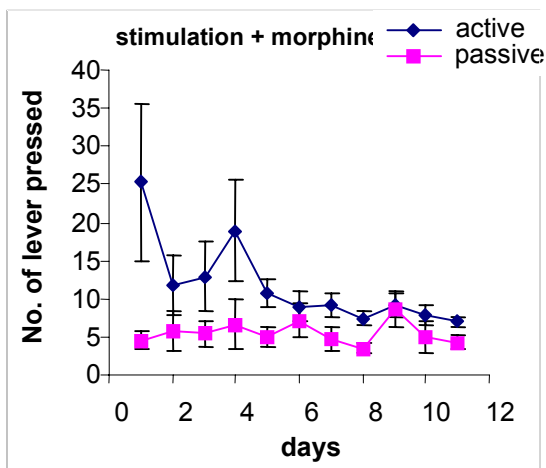
۲- گروه مورفین یا کنترل (جراحی، بدون تحریک و دریافت ۰/۲ ml مورفین با فشار دادن هر پدال فعال).

۳- گروه مورفین + تحریک یا Case (جراحی، تحریک الکتریکی VTA و دریافت ۰/۲ ml مورفین با فشار دادن هر پدال فعال). در این گروه تحریک الکتریکی (۲۵ μ A=جریان، ۱۰۰ Hz=فرکانس و پریود=۰/۱۴ میلی ثانیه) پانزده دقیقه قبل از خود تزریقی و به مدت ده دقیقه اعمال می شد که در این ده دقیقه به ازای هر ۴ ثانیه یک ثانیه تحریک وارد می شد.

بافت شناسی:

بعد از اتمام آزمایش با پرفیوژن داخل قلبی نرمال سالیین و سپس ۱۰۰ میلی لیتر فرمالین، مغز حیوان را فیکس کرده و پس از درآوردن، آن را به مدت ۲-۳ روز در محلول فرمالین و سپس به مدت یک روز در محلول فرمالین و سوکروز قرار می دادیم. سپس با میکروتوم برش های انجمادی از آن تهیه و با کرزیل ویولت رنگ آمیزی کرده و زیر میکروسکوپ مشاهده می شد و با مقایسه با اطلس Paxinos (V) محل الکترود مشخص می شد و چنانچه خارج از VTA بود داده های آن، مورد استفاده قرار می گرفت.

آنالیز داده ها:

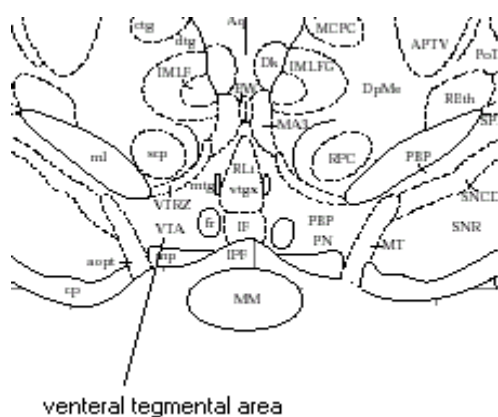


نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین تعداد فشار دادن پدال های فعال و غیر فعال در طول مدت یازده روز در گروه مورفین + تحریک (دریافت مورفین و تحریک الکتریکی).

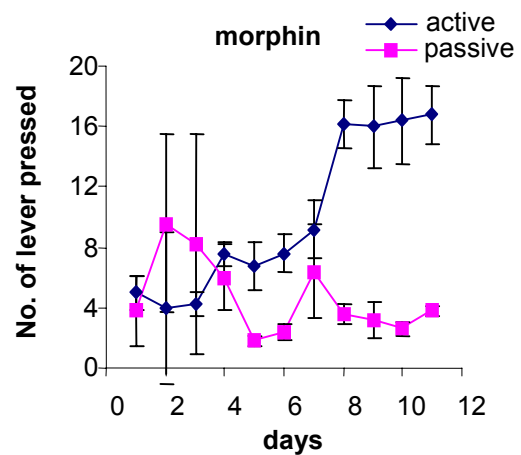
است. این دو یافته نشانگر عدم اعتیاد رت های گروه مورفین + تحریک است. در نمودار شماره ۴ موقعیت VTA در برش بافتی مغز میانی مشاهده می شود.

بحث:

در این تحقیق اثر تحریک الکتریکی ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) بر روند اعتیاد به مورفین



نمودار شماره ۴: نمودار ناحیه مورد تحریک (VTA)



نمودار شماره ۲: گروه مورفین (دریافت مورفین وبدون تحریک الکتریکی): اختلاف میانگین تعداد فشار دادن پدال های فعال و غیر فعال در طول مدت ۵ تا ۱۱ روز معنی دار است ($P < 0.001$).

نرمال سالیین منجر به تفاوت در تعداد پدال های زده شده فعال و غیر فعال نمی شود.

در گروه مورفین (نمودار شماره ۲) فشار دادن پدال فعال همراه با دریافت مورفین بود و نمودار مقایسه میانگین تعداد پدال های فعال و غیر فعال در این گروه افزایش تدریجی تعداد پدال های فعال از روز پنجم به بعد را نشان می دهد. این افزایش تعداد پدال های فعال تا روز هشتم ادامه داشته و از آن به بعد تغییر چندانی نمی کند و تعداد پدال ها در روزهای آخر آزمایش به یک حالت کفه می رسد. این روند نشانگر معتاد شدن رت هاست. اختلاف میانگین پدال های فعال و غیر فعال و همچنین افزایش یافتن پدال های فعال معنی دار بود ($P < 0.001$).

چنانچه در نمودار شماره ۳ مشاهده می شود، در گروه مورفین + تحریک تعداد پدال های فعال روند کاهشی دارد که بر خلاف گروه مورفین است. همچنین تعداد پدال های فعال و غیر فعال تفاوت معنی داری نداشتند که این هم مخالف گروه مورفین

پاداشی باعث می شد که در حین تحریک الکتریکی رت ها آرام باشند. بنابر این ایجاد لذت کافی توسط تحریک موجب شده که حیوان نیازی به لذت بیشتر از مورفین نداشته باشد.

با توجه به تنوع نرونی از نظر پروجکشن های آوران و وبران و همچنین نوع نوروترانسمیتر، مشخص شدن اینکه کدام نرون ها و به چه نسبتی در تحریک الکتریکی VTA تحریک می شوند کمک زیادی به توجیه مکانیسم اثر این تحریک در افزایش آزاد شدن دوپامین و اثرات پاداشی ناشی از آن و نهایتاً کاهش تعداد فشار دادن پدال فعال خواهد کرد. آوران های گلو تاماترژیک به ناحیه نگمنتوم شکمی عمدتاً از Prefrontal cortex منشأ گرفته و موجب افزایش فعالیت نرون های دوپامینی در VTA شده و نهایتاً منجر به آزاد شدن دوپامین در هسته اکومبنس می شوند (۷). گلو تامات آزاد شده در VTA از طریق رسپتورهای NMDA و غیر NMDA فرکانس تخلیه نرون های دوپامینی را در این ناحیه افزایش می دهند (۱۱). در تحریک الکتریکی VTA اگر ترمینال نرون های گلو تاماترژیک تحریک شوند، گلو تامات آزاد می شود و این گلو تامات منجر به تحریک نرون های دوپامینی شده و با آزاد شدن دوپامین در NAC (Nucleus accumbens)، اثرات پاداشی ایجاد می شود. اما بیشترین آوران های گلو تاماترژیک به VTA روی نرون های غیر دوپامینی (احتمالاً گابارژیک) سیناپس می دهند (۱۰) و این گابارژیک ها به هسته اکومبنس پروجکشن داده و با اینترنرون های کولینرژیک در این ناحیه سیناپس می دهند و آنها را مهار می کنند و باعث برداشته شدن اثر تحریکی استیل کولین از روی نرون های با اندازه متوسط در این ناحیه می شوند (۱۰). این توالی وقایع احتمال اینکه تحریک الکتریکی این ناحیه

مورد بررسی قرار گرفت. در گروه سالیین که جراحی و کانول گذاری انجام گرفته بود و حیوان با فشردن پدال فعال سالیین دریافت می کرد تفاوت معنی داری بین پدال های فعال و غیر فعال دیده نشد (نمودار شماره ۱). این امر، عدم تأثیر جراحی و تزریق را بر پدال زدن تایید می کند.

در گروه مورفین، زدن پدال های فعال و طبعاً دریافت مورفین رونند افزایشی داشته که نشانگر افزایش نیاز و وابستگی به مورفین است. به بیان دیگر حیوان معتاد شده است. البته در مدل های حیوانی اعتیاد به سطح ماکزیموم که رسید ثابت می ماند (نمودار شماره ۲). اثرات پاداشی و لذت آور مورفین موجب تقویت نیاز به مورفین تا حد اعتیاد کامل می شود (۸) و باعث می شود حیوان پدال فعال را که همراه با دریافت مورفین بوده بیشتر از پدال غیر فعال فشار دهد.

در گروه سوم تحریک الکتریکی VTA قبل از قرار گرفتن در قفس خود تزریقی، باعث شده که تعداد پدال های زده شده جهت خود تزریقی مورفین در طی یازده روز آزمایش تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشته باشد. یعنی از اعتیاد حیوان جلوگیری کرده است (نمودار شماره ۳).

با توجه به نتایج فوق سؤال مهم این است که چرا تحریک الکتریکی VTA از اعتیاد جلوگیری کرده است. آیا تحریک الکتریکی و آزاد شدن دوپامین ناشی از آن را می توان معادل مصرف مورفین به حساب آورد. اساساً آزاد شدن دوپامین در ترمینال نرون های دوپامینرژیک مزولیمبیک یک پروسه وابسته به ایمپالس های عصبی می باشد. تحریک VTA چه بصورت الکتریکی و یا بوسیله دارو باعث افزایش آزاد شدن دوپامین در هسته اکومبنس (NAC) شده و اثرات پاداشی به همراه دارد (۵) و احتمالاً همین اثرات

از طریق رلیز گلو تامات اثرات پاداشی را اعمال کند زیر سؤال می برد.

در تحریک الکتریکی VTA احتمالاً هر دو نوع نرون های دوپامینرژیک و گابارژیک تحریک می شوند اما به احتمال زیاد تحریک نرون های دوپامینرژیک مزولیمبیک برتری دارد نسبت به تحریک انواع دیگر نرون ها زیرا: اولاً تعداد نرون های گابارژیک تقریباً یک سوم نرون های دوپامینرژیک می باشد. ثانیاً از آنجایی که در صورت تحریک نرون های گابارژیک، نوروترانسمیتر مهاری گابا ترشح شده و نرون های دوپامینی را مهار می کند و باعث کاهش رلیز دوپامین در ترمینال این نرون ها در NAC می شود که این بر خلاف اثرات پاداشی ناشی از رلیز دوپامین می باشد. بنابراین احتمال اینکه تحریک الکتریکی نرون های گابارژیک در VTA اثرات پاداشی بدنبال داشته و باعث کاهش در تعداد پدال ها شود نیز منتفی می شود. تقریباً دو سوم نرون های موجود در VTA دوپامینی بوده و بیشترین پروجکشن های دوپامینی از VTA به NAC می روند (۶) و این مسیرهای دوپامینرژیک نقش اصلی را در اثر تقویت کنندگی ناشی از تحریک الکتریکی دارند.

بنابراین تحریک الکتریکی VTA آزاد شدن

دوپامین را همانند تحریک ناشی از مصرف مورفین در NAC افزایش می دهد. چون تحریکات وارده قبل از عمل خود تزریقی صورت گرفته است بنابر این اثرات پاداشی ناشی از افزایش دوپامین در NAC متعاقب تحریک الکتریکی در VTA نیاز به مورفین را برای ایجاد همین اثرات کاهش می دهد. در نتیجه حیوان تمایلی برای زدن پدال و دریافت مورفین از خود نشان نمی دهد.

بنابراین به احتمال قوی مکانیسم اصلی که تحریک الکتریکی VTA از افزایش میزان پدال های زده شده جهت دریافت مورفین جلوگیری کرده و بنابراین اثرات پاداشی داشته است آزاد شدن دوپامین در هسته اکومبنس می باشد و می توان گفت که اثر تحریکی نرون های دوپامینی بر اثرات ناشی از تحریک پایانه های گلو تامینرژیک و تحریک نورون های گابارژیک غلبه دارد.

یک نتیجه کاربردی احتمالی این تحقیق این است که نشاط، می تواند موجب کاهش اعتیاد شود. چون VTA یک هسته پاداشی (نشاط آور) است و تحریک آن از اعتیاد جلوگیری کرده است.

تشکر و قدردانی:

از زحمات کادر مجله کمال تشکر را دارد.

References:

1. Akli H. Endogenous opioid: biology and function. *Neurosci*, 7: 223-55, 1984.
2. Bozarth M.; Wise R. Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, 224: 516-17, 1984.
3. Devin DP.; Leone P. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamin release. *J Pharmacol Exp Ther*, 266: 1236-46, 1993.

4. Grunetal Gmb H. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamin systems. *Porg Neurobiol*, 63: 230-41, 2001.
5. Huibert D. Long- term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotin. *Neuron*, 27: 349-435, 2000.
6. Paul A.; Melissa A.; Darren M. Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature*, 67-72, 1999.
7. Paxinos G.; Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: From Accademic Press. NewYork: USA, 28-31, 1998.
8. Robert A.; Magali D. Effects of bidirectional interactin between ventral tegmental rewarding and hindbrain aversive stimulation in the rat. *Brain Res*, 688: 15-20, 1999.
9. Roy A.; Wise R. Drug-activation of the brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend*, 51: 13-22, 1998.
10. Sesack SR.; Pickel VM. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol*, 320(2): 145-60, 1992.
11. Suaud-Chagny MF.; Chergui K.; Chouvet G.; Gonon F. Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local *in vivo* application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neurosci*, 49(1): 63-72, 1992.