

اثر تزریق استیل کولین به ناحیه‌ی تگمنتال شکمی بر پاسخ‌های قلبی و عروقی موش بزرگ آزمایشگاهی بیهوشی

نیما حیدری اورنجقی^۱، دکتر مهین گنج‌خانی^۲

نویسنده‌ی مسئول: گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان ghanjkhani@zums.ac.ir

دریافت: ۹۵/۳/۳۱ پذیرش: ۹۵/۶/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: ناحیه‌ی تگمنتال شکمی قسمتی از ساختار مزولیمبیک است که علاوه بر اثرات آن در انگیزش، خلق و خوی، شناخت، اسکیزوفرنی، اعتیاد و پارکینسون در تنظیم سیستم قلبی عروقی نیز نقش دارد. حضور آوران‌های کولینرژیک در این ناحیه به اثبات رسیده است اما در مورد نقش آن‌ها در تنظیم قلب و عروق اطلاعات زیادی موجود نمی‌باشد. این مطالعه به منظور یافتن نقش سیستم کولینرژیک این ناحیه بر فشار متوسط شریانی و ضربان قلب به وسیله‌ی ریز تزریق دوزهای متفاوت استیل کولین در این نقطه، بر روی موش‌های تحت بیهوشی با یورتان انجام شد.

روش بررسی: در این بررسی از ۵۰ موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده گردید. استیل کولین به حجم ۱۰۰ نانولیترا با استفاده از جراحی استریوتاکسی به ناحیه تگمنتال شکمی به صورت یک طرفه، ریز تزریق گردید. ضربان قلب و فشار متوسط شریانی به‌طور مستقیم قبل و در طول آزمایشات، توسط سیستم پاورلب ثبت گردید. جهت مقایسه‌ی میانگین تغییرات در فشار متوسط شریانی و ضربان قلب از آزمون *paired t-test* و تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: ریز تزریق چهار دوز استیل کولین (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ نانومول در ۱۰۰ نانولیترا) سبب کاهش میانگین فشار متوسط شریانی و ضربان قلب وابسته به دوز گردید. البته دوز ۲۰ نانومول استیل کولین با کاهش ۳۰/۶۱ میلی‌متر جیوه فشار شریانی و کاهش ۱۴ ضربان قلب در دقیقه، بهترین پاسخ فیزیولوژیک بر پاسخ‌های قلبی عروقی را ایجاد نمود. تزریق همان حجم از نرمال سالین تغییر معناداری در میانگین فشار متوسط شریانی و ضربان قلب ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی برای اولین بار نشان داد ریز تزریق استیل کولین در ناحیه تگمنتال شکمی اثرات تضعیف‌کنندگی بر پاسخ‌های قلبی عروقی دارد.

واژگان کلیدی: ناحیه تگمنتال شکمی، استیل کولین، فشار متوسط شریانی، ضربان قلب، موش بزرگ آزمایشگاهی

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۲- دکترای فیزیولوژی، دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

مقدمه

نواحی زیادی در مغز با فعالیت قلبی عروقی وجود دارد که برخی مستقیم و تعدادی دیگر به طور غیر مستقیم به نخاع پروجکت می کنند. یکی از این نواحی، هسته تگمنتال شکمی (Ventral tegmental area (VTA می باشد. این هسته قسمتی از سیستم مزولیمبیک است که در بخش میانی شکمی مغز میانی قرار گرفته و نقش های فیزیولوژیک مهمی در زمینه های انگیزش، خلق و خوی، شناخت و رفتارهای حرکتی دارد. همچنین در اسکیزوفرنی، اعتیاد و پارکینسون نیز تاثیر آن نشان داده شده است (۱ و ۲). مطالعات اخیر نشان می دهد که این هسته در پاسخ های قلبی-عروقی نیز نقش بسزایی دارد (۳). هسته تگمنتال شکمی شامل ۷۵ تا ۸۵ درصد نورون های دوپامینرژیک و ۱۵ تا ۲۵ درصد نورون های گابا ارژیک می باشد (۴ و ۵) که آوران های کولینرژیک، گلوتاماترژیک و گابا ارژیک را دریافت می کند (۶). نورون های گابا این هسته شامل اینتر نورون های داخل هسته ای (۴) و یا ورودی از سایر هسته ها از جمله هسته آکومبنس (۷) و پالیدوم شکمی (۸) است. نورون های گابا به صورت تونیک فعالیت نورون های دوپامینرژیک را کنترل می کنند (۹). مطالعات پیشین بیان گیرنده های نیکوتینی و موسکارینی در نورون های گابا ارژیک و دوپامینرژیک هسته تگمنتال شکمی را نشان داده اند (۱۰ و ۶). گیرنده های کولینرژیک رهاسازی نوروترانسمیتر گابا را در هسته تگمنتال شکمی کنترل می کنند. با توجه به حضور آوران های کولینرژیک و وجود گیرنده های نیکوتینی و موسکارینی بر روی نورون های گابا ارژیک و دوپامینرژیک این هسته و ناشناخته بودن نقش فیزیولوژیک آنها، مطالعه کنونی جهت مشخص نمودن نقش سیستم کولینرژیک این ناحیه در فشار خون و ضربان قلب با روش ریزتزریق دوزهای متفاوت استیل کولین در این هسته انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، بعد از تصویب طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار سه ماهه در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، در ۵ گروه مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و با دسترسی کامل به آب و غذای مناسب مطابق با راهنمای موسسه ملی سلامت نگهداری شدند. به طور کلی نحوه نگهداری، بیهوشی و در نهایت از بین بردن حیوانات براساس پروتکل های کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام می شد، به طوری که آزار و اذیتی را متحمل نشوند. داروی استیل کولین از شرکت سیگما آلدریج تهیه گردید و از نرمال سالین به عنوان حلال آن استفاده شد. حیوانات با یورتان $1/4$ گرم بر کیلوگرم و دوز ننگه دارنده $0/7$ گرم بر کیلوگرم، هر ۱ تا ۲ ساعت در صورت لزوم به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. نای حیوان کانول گذاری شده و اکسیژن رسانی جهت پایداری قلب و عروق انجام گردید. به منظور ثبت فشار متوسط شریانی و ضربان قلب، شریان رانی (Femoral) سمت چپ با قرار دادن کاتتر پلی اتیلن حاوی سالین هپارینه و ورید رانی نیز جهت تزریق سرم و تعادل مایعات، کانول گذاری گردید. فشار متوسط شریانی توسط ترانسدویسر فشار (AD instrument; Australia) و ضربان قلب متصل به کاردیوگراف پاورلب (AD instrument, model ML786, Australia) به صورت پیوسته در تمام مدت آزمایش ثبت می شد. در تمام مدت دمای بدن حیوان به وسیله کنترل کننده دما در محدوده 37 ± 1 درجه سانتی گراد حفظ شد. سپس حیوانات تحت جراحی استریوتاکسیک (۱۱) با دستگاه استریوتاکس (Stolting USA) قرار گرفتند و به کمک اطلس پاکسینوس (۱۲) موقعیت هسته تگمنتال شکمی نسبت به برگما مشخص

فشار متوسط شریانی و ضربان قلب گروه‌های دوز - پاسخ با گروه کنترل از آزمون One-way ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. میانگین تغییرات فشار متوسط شریانی و ضربان قلب در فاصله‌های زمانی پس از تزریق با آزمون تی زوج، با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و GraphPad (Prism) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر P value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان شاخص معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

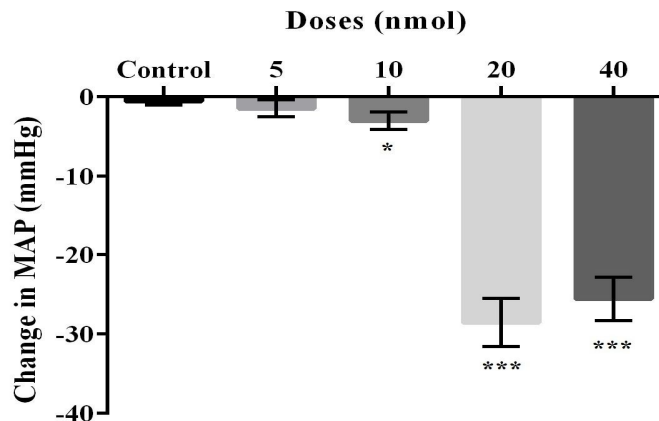
اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین در هسته VTA بر فشار متوسط شریانی: نمودار ۱ اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین در هسته VTA بر فشار متوسط شریانی را نشان می‌دهد. تزریق نرمال سالیین به این هسته اثری روی فشار متوسط شریانی نداشت. تزریق استیل کولین با دوز ۵ نانو مول باعث کاهش اندکی در فشار متوسط شریانی شد ($\Delta = 2$ - میلی متر جیوه) که در مقایسه با فشار متوسط شریانی قبل از تزریق معنادار نبود. تزریق استیل کولین با دوز ۱۰ نانومول در مقایسه با فشار متوسط شریانی قبل از تزریق باعث کاهش معناداری در فشار متوسط شریانی شد ($\Delta = 4$ - میلی متر جیوه) ($P=0/025$). تزریق استیل کولین با دوز ۲۰ نانومول موجب کاهش بسیار معنادار در فشار متوسط شریانی ($\Delta = 29$ - میلی متر جیوه) در مقایسه با فشار متوسط شریانی قبل از تزریق گردید ($P=0/001$). تزریق استیل کولین با دوز ۴۰ نانومول نیز باعث کاهش معناداری در فشار متوسط شریانی شد ($P=0/001$). با وجود اینکه دوز ۴۰ دو برابر دوز ۲۰ بود ولی کاهش فشار متوسط شریانی ناشی از دوز ۲۰ بیشتر بود. یعنی در این بررسی، استیل کولین در دوز ۲۰ نانومول بیشترین تاثیر را بر گیرنده‌های کولینرژیک واقع در هسته VTA بر کاهش فشار متوسط شریانی اعمال کرده است.

گردید (AP: 4.6-5.2 , midline: 0.7-1.3 , ventral: 8.2-8.4) و توسط دریل، سوراخی در استخوان آهیانه ایجاد شد. تزریق داخل هسته‌ای استیل کولین در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانومول یا نرمال سالیین توسط یک میکرو پیپت شیشه‌ای که با دستگاه پولر کشیده شده و به قطر داخلی ۳۵ تا ۴۵ میکرومتر می‌رسید، انجام گردید. حجم استیل کولین یا نرمال سالیین تزریقی به این هسته در تمام تزریقات ۱۰۰ نانولیترا بود که با مشاهده مستقیم حرکت حباب هوا و سطح مایع کنترل گردید. پس از اتمام آزمایشات موش‌ها با دوز بیشتری از یورتان به‌طور عمیق بیهوش شده و تحت ترانس کاردیال قرار گرفتند. به این ترتیب که سینه حیوان باز شده و یک آنژیوتک شماره ۱۶ وارد بطن چپ قلب یا آئورت گردید و دهلیز راست هم با تیغ جراحی برش داده شد، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالیین و پس از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۴ درصد رقیق شده با سالیین از بطن چپ جریان یافته و از دهلیز راست خارج گشت. پس از انجام این مراحل مغز حیوان خارج و در فرمالین ۱۰ درصد حداقل به مدت یک روز نگهداری می‌شد. مغزها توسط دستگاه فریز میکروتوم به اسلایس‌های با قطر ۵۰ میکرون برش داده شده و روی لام‌های آل لایزینه، فیکس گردیده و در نهایت به‌منظور مشخص شدن محل دقیق تزریق، تحت رنگ آمیزی کریزل و یوله قرار گرفتند (شکل ۱).

معیار ورود و خروج نمونه‌ها:

معیارهای ورود: وزن بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، سلامت حیوان
معیارهای خروج: وجود آنومالی‌های استخوان جمجمه، عدم موفقیت در کانول گذاری داخل شریان یا ورید، تزریق خارج از هسته تگمنتال شکمی با توجه به برش‌های باف شناسی، فشار شریان کمتر و بیشتر از حد طبیعی.

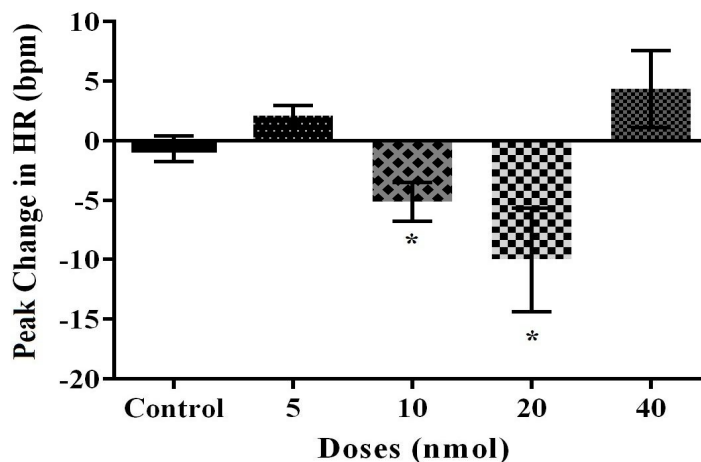
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: میانگین تغییرات فشار متوسط شریانی و میانگین تغییرات ضربان قلب به همراه standard error در excel محاسبه شد. جهت آنالیز تغییرات



نمودار ۱. مقایسه‌ی اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین با نرمال سالین (گروه کنترل) در هسته VTA بر فشار متوسط شریانی. $P < 0.05$, $P < 0.001$ و داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده‌اند. آنالیز با آزمون آماری *One-way ANOVA* انجام شده است.

در دقیقه) که در مقایسه با ضربان قلب قبل از تزریق معنادار بود ($P=0.014$). تزریق استیل کولین با دوز ۲۰ نانومول باعث کاهش معنادار ضربان قلب در مقایسه با قبل از تزریق شد ($\Delta = -10$ ضربان در دقیقه) ($P=0.020$). تزریق استیل کولین با دوز ۴۰ نانومول باعث افزایش اندکی در ضربان قلب شد ($\Delta = +4$ ضربان در دقیقه) که در مقایسه با ضربان قلب قبل از تزریق معنادار نبود ($P=0.100$).

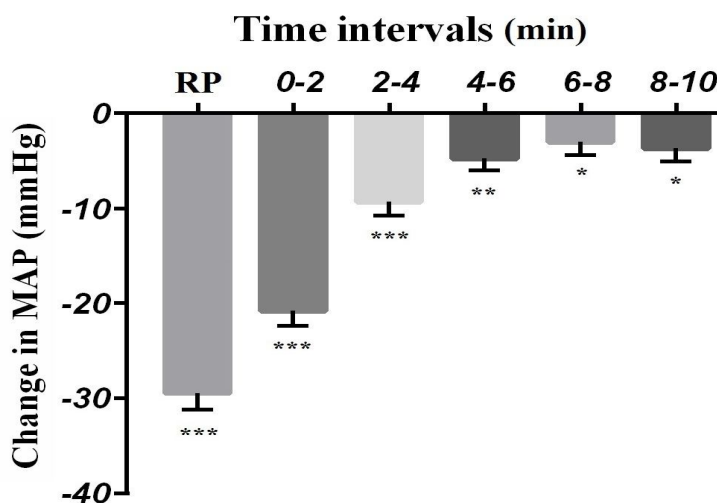
اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین در هسته VTA بر ضربان قلب: نمودار ۲ اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین در هسته VTA بر ضربان قلب را نشان می‌دهد. تزریق نرمال سالین به این هسته اثری روی ضربان قلب نداشت. تزریق استیل کولین با دوز ۵ نانومول باعث افزایش اندکی در ضربان قلب شد ($\Delta = 3$ ضربان در دقیقه) که در مقایسه با ضربان قلب قبل از تزریق معنادار نبود. تزریق استیل کولین با دوز ۱۰ نانومول باعث کاهش در ضربان قلب شد ($\Delta = -6$ ضربان



نمودار ۲. مقایسه‌ی اثر تزریق دوزهای مختلف استیل کولین با نرمال سالین (گروه کنترل) در هسته VTA بر ضربان قلب. $P < 0.05$. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده‌اند. آنالیز با آزمون آماری *One-way ANOVA* انجام شده است.

افت فشار متوسط شریانی در این نقطه بود (۲۹ میلی متر جیوه) که با فشار متوسط شریانی قبل از تزریق معنادار بود ($P=0/001$). افت فشار متوسط شریانی در فواصل زمانی دو دقیقه اول (۲۱ میلی متر جیوه) و دوم (۹ میلی متر جیوه) بسیار معنادار بود ($P=0/001$). همچنین افت فشار متوسط شریانی در فواصل زمانی دو دقیقه سوم (۵ میلی متر جیوه)، ($P=0/001$)، چهارم (۳ میلی متر جیوه $P=0/037$) و پنجم (۴ میلی متر جیوه، $P=0/011$) نیز معنادار بود.

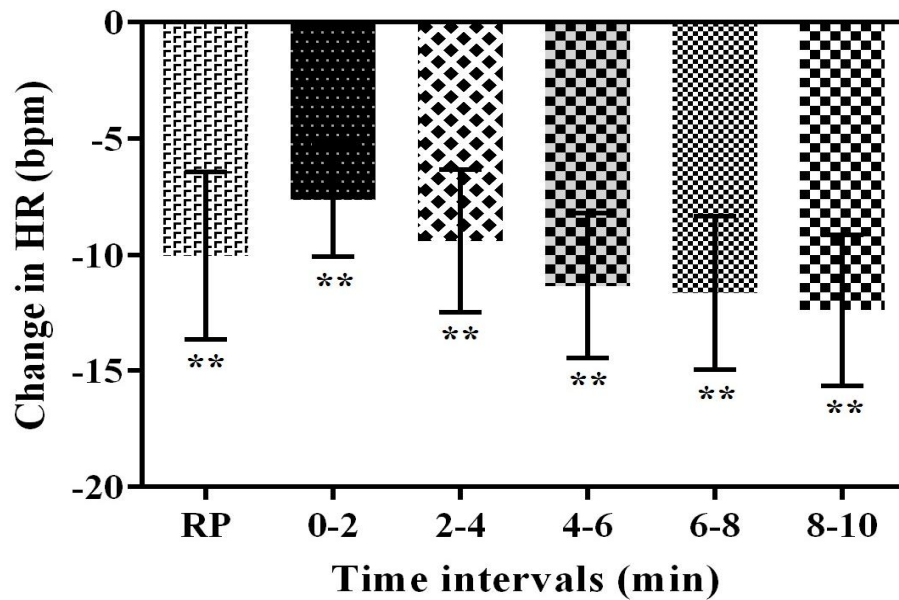
اثر تزریق استیل کولین ۲۰ نانومول در هسته VTA بر فشار متوسط شریانی در زمان پیک پاسخ و فاصله‌های زمانی دو دقیقه‌ای پس از تزریق: با توجه به شکل ۲ بلافاصله بعد از تزریق استیل کولین ۲۰ نانومول در هسته VTA فشار متوسط شریانی افت می‌کند. حداکثر افت فشار متوسط شریانی چند ثانیه پس از تزریق رخ می‌دهد که پیک پاسخ (Reaction Peak = RP) نامیده می‌شود. آنالیز آماری paired t-test نشان می‌دهد که با توجه به نمودار ۳ بیشترین



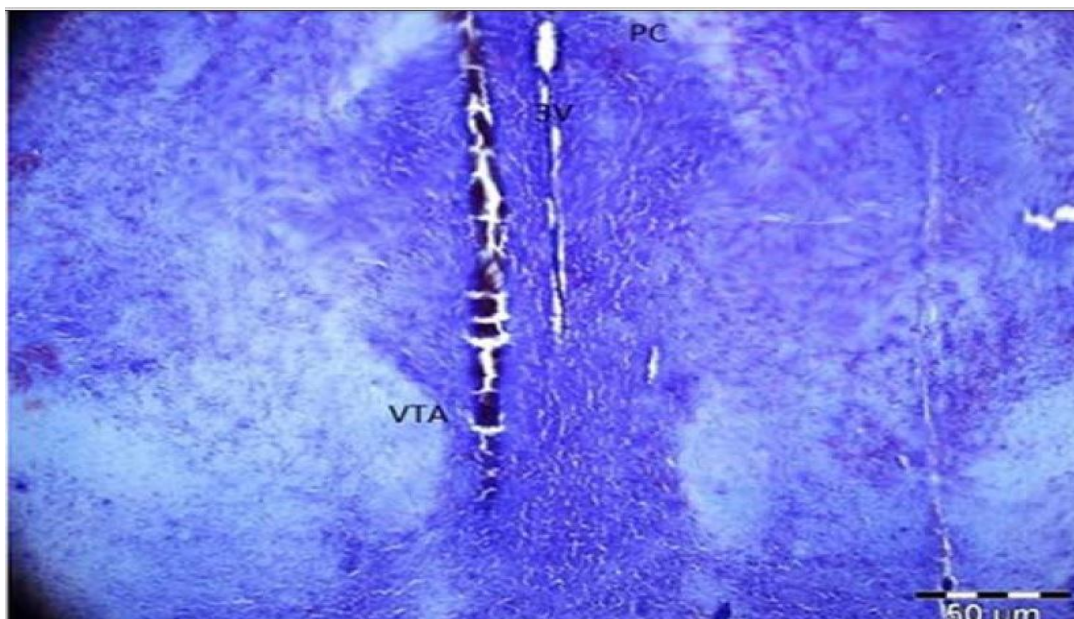
نمودار ۳. اثر تزریق استیل کولین ۲۰ نانومول در هسته VTA بر فشار متوسط شریانی در زمان پیک پاسخ (RP) و فاصله‌های زمانی دو دقیقه‌ای پس از تزریق. مقایسه‌ها با فشار متوسط شریانی قبل از تزریق استیل کولین انجام شده‌اند. $P < 0/05$ ، * $P < 0/01$ ، *** $P < 0/001$ داده‌ها به صورت $Mean + SEM$ نشان داده شده‌اند. آنالیز با آزمون آماری paired t-test انجام شده است.

(۱۰- ضربان در دقیقه، $P=0/001$)، فواصل زمانی دو دقیقه‌ای اول (۸- ضربان در دقیقه، $P=0/004$)، دوم (۹- ضربان در دقیقه $P=0/004$)، سوم (۱۱- ضربان در دقیقه $P=0/001$)، چهارم (۱۲- ضربان در دقیقه $P=0/001$) و پنجم (۱۲- ضربان در دقیقه $P=0/001$) معنادار بود.

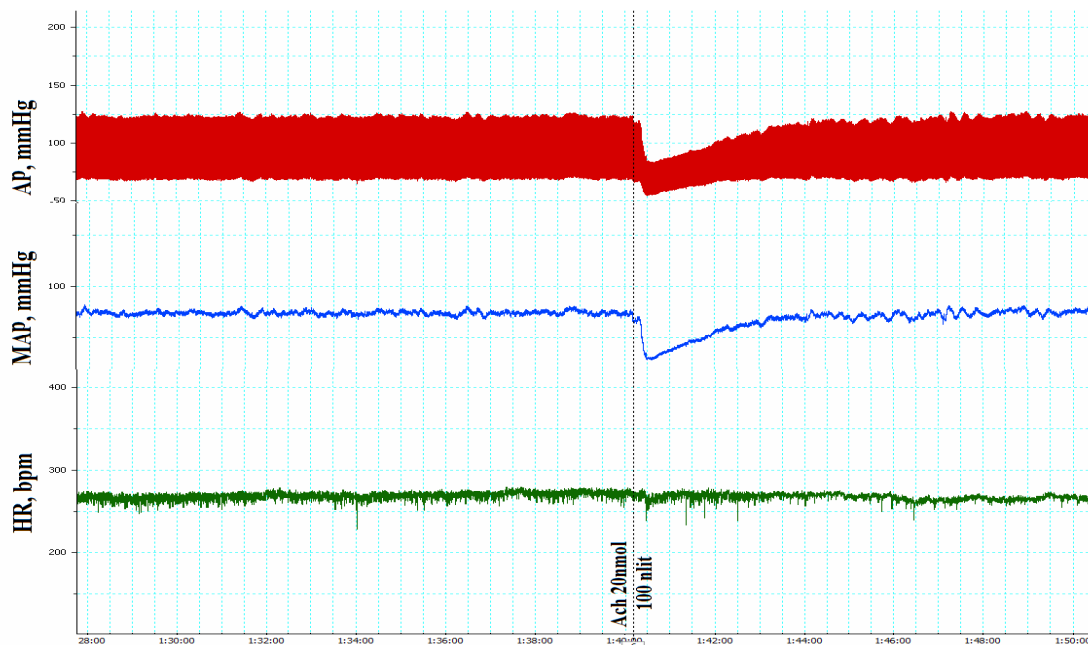
اثر تزریق استیل کولین ۲۰ نانومول در هسته VTA بر ضربان قلب در زمان پیک پاسخ (Reaction Peak = RP) و فاصله‌های زمانی دو دقیقه‌ای پس از تزریق: با توجه به نمودار ۴ ضربان قلب در زمان پیک پاسخ و فاصله‌های زمانی دو دقیقه‌ای پس از تزریق استیل کولین کاهش معناداری داشت. با توجه به داده‌ها، افت ضربان قلب در زمان پیک پاسخ



نمودار ۴. اثر تزریق استیل کولین ۲۰ نانومول در هسته VTA بر ضربان قلب در زمان پیک پاسخ (RP) و فاصله‌های زمانی دو دقیقه‌ای پس از تزریق. مقایسه‌ها با ضربان قلب قبل از تزریق استیل کولین انجام شده‌اند. $P < 0.01$ و داده‌ها به صورت $Mean + SEM$ نشان داده شده‌اند. آنالیز با آزمون آماری *paired t-test* انجام شده است.



شکل ۱. برش کرونال مغز از ناحیه ورود نوک میکروپپت. رنگ آمیزی کرزیل ویوله



شکل ۲. نمونه‌ای از ثبت فشار خون، فشار متوسط شریانی و ضربان قلب در برنامه LabChart. نقطه چین زمان تزریق استیل کولین را نشان می‌دهد.

بحث

افزایش ضربان قلب در دوز ۴۰ احتمال دارد سیستم بارورفلکس نیز فعال شده باشد تا از افت بیشتر فشار خون جلوگیری به عمل آید. با توجه به نمودارهای ۳ و ۴ بیشترین اثر در کاهش فشار متوسط شریانی و ضربان قلب در دو دقیقه اول مشاهده گردید و پیک پاسخ در ثانیه‌های چهارم تا هشتم پس از تزریق استیل کولین در هسته VTA بود. هسته VTA قسمتی از سیستم مزولیمبیک است که در بخش میانی شکمی مغز میانی قرار گرفته و نقش‌های فیزیولوژیک مهمی در زمینه انگیزش، خلق و خوی، شناخت و رفتارهای حرکتی دارد. همچنین در اسکیزوفرنی، اعتیاد و پارکینسون نیز تاثیر آن نشان داده شده است (۱ و ۲). اما نقش VTA در کنترل قلب و فشار متوسط شریانی نیز توجه محققین را به خود جلب نموده است، این هسته شامل ۷۵ تا ۸۵ درصد نورون‌های دوپامینرژیک و ۱۵ تا ۲۵ درصد نورون‌های گابا ارژیک می‌باشد که آوران‌های کولینرژیک، گلوتامینرژیک و

مطابق نتایج تحقیق کنونی با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ تزریق نرمال سالین به‌عنوان حلال به هسته VTA اثری روی فشار متوسط شریانی و ضربان قلب نداشت. این یافته نشان دهنده این موضوع است که فشاری که با حجم ۱۰۰ نانولیتتر در VTA ایجاد می‌شود نمی‌تواند این هسته را در رابطه با فشار شریانی و ضربان قلب تحریک یا مهار کند. در این تحقیق ما برای اولین بار نشان دادیم که تزریق استیل کولین باعث افت فشار خون و ضربان قلب می‌شود که این نتیجه احتمال درگیری گیرنده‌های کولینرژیک این هسته را در تنظیم دستگاه قلبی عروقی بیان می‌کند. با وجود اینکه دوز ۴۰ دو برابر دوز ۲۰ بود ولی کاهش فشار خون ناشی از دوز ۲۰ بیشتر و چشمگیرتر بود که با توجه به این یافته احتمالاً استیل کولین در دوز ۲۰ بیشترین تاثیر را بر عملکرد فیزیولوژیک گیرنده‌های کولینرژیک واقع در هسته VTA بر کاهش فشار خون و ضربان قلب اعمال می‌کند. با توجه به

گیرنده‌های شبه موسکارینی نوع ۳ (M3) در نورون‌های گابا ارژیک VTA توسط مطالعات ایمونوهیستوشیمی تایید شده است. در مطالعه‌ی بررسی عمل نورون‌های کولینرژیک در VTA، نشان داده شد که استیل کولین، فرکانس خود بخودی جریان پس سیناپسی مهاري (IPSC) نورون‌های گابا ارژیک را در این هسته افزایش می‌دهد و نیز فعالسازی انتخابی گیرنده‌های موسکارینی بر نورون‌های گابا ارژیک موجب افزایش سرعت شلیک این نورون‌ها در VTA می‌شود. نهایتاً نتایج تحقیق فوق نشان داد که نورون‌های گابا ارژیک VTA می‌توانند به صورت مستقیم از طریق گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین تنظیم شوند (۳۳ و ۶). در ادامه‌ی این تحقیقات ما برای اولین بار نشان دادیم که تزریق Ach به VTA باعث تضعیف سیستم قلبی عروقی، افت فشارمتموسط شریانی و ضربان قلب می‌شود که نشان دهنده‌ی نقش مهم گیرنده‌های کولینرژیک موجود در VTA در تنظیم سیستم قلبی عروقی می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فعال شدن گیرنده‌های کولینرژیک موجود در VTA باعث کاهش فشارمتموسط شریانی و ضربان قلب می‌شود و با توجه به نقش آن در تنظیم سیستم قلبی عروقی بنابراین پیشنهاد می‌شود مکانیسم‌های عمل این گیرنده‌ها و ویژگی نورون‌های VTA پس از تزریق Ach با مطالعات الکتروفیزیولوژی در رابطه با سیستم قلبی و عروقی مشخص شود.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شد که ریز تزریق استیل کولین در ناحیه تگمتال شکمی اثرات تضعیفی بر پاسخ‌های قلبی عروقی دارد.

گابا ارژیک را دریافت می‌کند (۱۶-۱۳ و ۶). مطالعات پیشین بیان گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی در نورون‌های گابا ارژیک و دوپامینرژیک هسته تگمتال شکمی را نشان داده‌اند (۱۰ و ۶). استیل کولین می‌تواند از طریق گیرنده‌های یونوتروپیک نیکوتینی یا گیرنده‌های موسکارینی متصل به G پروتئین عمل کند. مطالعات پیشین با استفاده از RT-PCR بیان زیرواحدهای متنوع گیرنده نیکوتینی (۱۷ و ۱۸) و موسکارینی (۲۰ و ۱۹) روی نورون‌های گابا ارژیک و دوپامینرژیک VTA را نشان داده‌اند. همچنین بیان زیر واحدهای گیرنده‌های نیکوتینی مختلف در نورون‌های گابا ارژیک ($\alpha 3, \alpha 4, \beta 2, \beta 3$) و نورون‌های دوپامینرژیک ($\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \beta 2, \beta 3, \beta 4$) هسته‌ی تگمتال شکمی را با روش RT-PCR نشان داده‌اند (۶). از پنج گیرنده‌ی نیکوتینی فقط mRNA گیرنده‌های $\mu 3$ و $\mu 5$ در هسته‌ی تگمتال شکمی یافت شده اند ولی وجود گیرنده‌های $\mu 2$ تا $\mu 5$ از طریق روش ایمونولابینگ و بایندینگ نیز گزارش شده است (۲۱). فعال سازی گیرنده‌های کولینرژیک توسط آگونیست‌های کولینرژیکی در مناطق تگمتال شکمی موش‌های صحرایی زنده منجر به افزایش سرعت شلیک نورون‌های دوپامینی و همچنین افزایش غلظت دوپامین در مناطق پروجکت شده با آن گردید (۲۵-۲۲). گیرنده‌های کولینرژیک ره‌ایش گابا را در چندین ساختار CNS از جمله VTA کنترل می‌کنند (۲۸-۲۶). مطالعات الکتروفیزیولوژی نشان دادند که گیرنده‌های GABA_B در VTA نورون‌های دوپامینرژیک را هیپرپلاریزه می‌کنند (۲۹). شواهد دیگری نیز وجود دارند که نورون‌های دوپامینی تحت مهار تونیک آوران‌های گابا ارژیک هستند (۳۲-۳۰). حضور

58-63.

2- Kalivas PW. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral

References

1- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. 1997; 3; 278:

- tegmental area. *Brain Res Rev.* 1993; 18: 75-113.
- 3- Yeganeh F, Ranjbar A, Hatam M, Nasimi A. Mechanism of the cardiovascular effects of the GABAA receptors of the ventral tegmental area of the rat brain. *Neuro Sci Lett.* 2015; 23; 600: 193-8.
- 4- Bayer VE, Pickel VM. GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Research.* 1991; 13; 559: 44-55.
- 5- Alberico SL, Cassell MD, Narayanan NS. The vulnerable ventral tegmental area in parkinson's disease. *Basal Ganglia.* 2015; 1; 5: 51-5.
- 6- Michel FJ, Robillard JM, Trudeau LE. Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through muscarinic receptors. *J Physiol-London.* 2004; 15; 556: 429-45.
- 7- Waddington JL, Cross AJ. Neurochemical changes following kainic acid lesions of the nucleus accumbens: implications for a GABAergic accumbal-ventral tegmental pathway. *Life sciences.* 1978; 22: 1011-4.
- 8- Xiao C, Zhou C, Li K, Ye JH. Presynaptic GABAA receptors facilitate GABAergic transmission to dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of young rats. *The Journal of physiology.* 2007; 1; 580: 731-43.
- 9- Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, et al. Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *cell.* 2015; 30; 162: 622-34.
- 10- Johnson SW, North RA. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol.* 1992; 450: 455-68.
- 11- Azhdari-Zarmehri H, Rahmani A, Puzesh S, Erami E, Emamjomeh M. Assessing the effect of lidocaine injection into the nucleus paragigantocellularis lateralis on formalin test and hot plate test induced nociceptive behaviors in rats. *J Zanzan Univ Med Sci.* 2013; 21: 10-29.
- 12- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinate. Philadelphia: Elsevier. 2015; 2015; 1: 120. Epub 2005. en.
- 13- Olson VG, Nestler EJ. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse.* 2007; 61: 87-95.
- 14- Clarke PB, Hommer DW, Pert A, Skirboll LR. Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience.* 1987; 23: 1011-9.
- 15- Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G, Svensson TH. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect.* 1993; 39: 25-11.
- 16- Walaas I, Fonnum F. Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience.* 1980; 5: 72-63.

- 17- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neuro Science*. 2001; 1; 21: 1452-63.
- 18- Charpantier E, Barneoud P, Moser P, Besnard F, Sgard F. Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport*. 1998; 14; 9: 3097-101.
- 19- Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G. Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience Lett*. 1990; 3; 114: 154-9.
- 20- Weiner DM, Levey AI, Brann MR. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87: 7050-4.
- 21- Michel FJ, Robillard JM, Trudeau LE. Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through muscarinic receptors. *J Physiol*. 2004; 15; 556: 429-45.
- 22- Blaha CD, Winn P. Modulation of dopamine efflux in the striatum following cholinergic stimulation of the substantia nigra in intact and pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned rats. *J Neuro Science*. 1993; 13: 1035-44.
- 23- Imperato A, Mulas A, Di Chiara G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Europ J Pharmacol*. 1986; 16; 132: 337-8.
- 24- Gronier B, Rasmussen K. Activation of midbrain presumed dopaminergic neurones by muscarinic cholinergic receptors: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Br J Pharmacol*. 1998; 124: 455-64.
- 25- Gronier B, Perry KW, Rasmussen K. Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology*. 2000; 147: 347-55.
- 26- Grillner P, Berretta N, Bernardi G, Svensson TH, Mercuri NB. Muscarinic receptors depress GABAergic synaptic transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*. 2000; 96: 299-307.
- 27- Erhardt S, Schwieler L, Engberg G. Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse*. 2002; 15; 43: 227-37.
- 28- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*. 2002; 14; 33: 905-19.
- 29- Lacey MG. Neurotransmitter receptors and ionic conductances regulating the activity of neurones in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Progress Brain Res*. 1993; 99: 251-76.
- 30- Westerink BH, Kwint HF, deVries JB. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the

rat brain. *J Neuroscience*. 1996; 15; 16: 2605-11.

31- Bourdy R, Barrot M. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends In Neurosciences*. 2012; 35: 681-90.

32- Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Zhou TC. Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neuroscience*. 2012; 10; 32: 14094-101.

33- Michel FJ, Fortin GD, Martel P, Yeomans J, Trudeau LE. M3-like muscarinic receptors mediate Ca²⁺ influx in rat mesencephalic GABAergic neurones through a protein kinase C-dependent mechanism. *Neuropharmacology*. 2005; 48: 796-809.

Role of Acetylcholine Microinjection into the Ventral Tegmental Area on the Cardiovascular Response in Anesthetized Rats

Heidari Oranjaghi N¹, Ganjkhani M¹

¹Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Ganjkhani M. Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: ghanjkhani@zums.ac.ir

Received: 20 Jun 2016 **Accepted:** 21 Sep 2016

Background and Objective: The Ventral Tegmental Area is a part of the mesolimbic structure. In addition to its role in motivation, mood, cognition, schizophrenia, addiction and Parkinson's disease, it is involved in the regulation of the cardiovascular system. The presence of cholinergic afferent fibers in the VTA has been demonstrated but there is no specific information about its role in cardiovascular regulation. This study was performed to determine the possible role of the cholinergic system on mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) by microinjection of different doses of acetylcholine into the VTA of urethane anesthetized rats.

Materials and Methods: Experiments were performed on 50 male Wistar rats (250–300 g). Acetylcholine was microinjected into the VTA in volumes of 100 nl using a stereotaxic system. Blood pressure and heart rate were recorded before and throughout each experiment by power lab system. The average changes in the mean arterial pressure and heart rate at different intervals, were compared using paired t-test and one-way ANOVA.

Results: Acetylcholine microinjections in VTA (Ach 5, 10, 20 and 40 nmol/100 nl) caused a dose related decrease in mean arterial pressure. The best physiological response was elicited by Ach 20 nmol/100 nl that decreased both mean arterial pressure and heart rate (MAP:-30.61 mmHg and HR:-14beats/min). Microinjection of the same volume of saline produced no significant changes in either MAP or HR.

Conclusion: We showed for the first time that, microinjection of acetylcholine into the VTA evokes a depressive cardiovascular response.

Keywords: *Ventral tegmental area, Acetylcholine, Blood pressure, Heart rate*