

## Burst Firing of the Ventral Tegmental Area Neurons through Bicuculline-Induced GABA-A Receptor Blockade

Fereshteh Tale<sup>1</sup>, Firouz Ghaderi Pakdel<sup>1,2\*</sup>, Parviz Shahabi<sup>3</sup>, Somayyeh Naderi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Neurophysiology Research Center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>3</sup>Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>4</sup>Danesh Pey Hadi Co, Urmia Health Technology Development Center, Research and Technology Vice Chancellor, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

### Article Info:

Received: 14 Dec 2015

Accepted: 23 Jan 2016

## ABSTRACT

**Introduction:** Ventral Tegmental Area (VTA), as a major source of dopaminergic (DA) neurons, has crucial roles in the vital and pathologic conditions, such as drug dependence and depression. The receptors on the VTA-DA neurons with different density and diversity have modulatory effects on their target tissues, such as the cerebral cortex. The aim of the present study was to study the effect of GABA-A receptor blockade on the VTA-DA neuronal firing pattern. **Materials and Methods:** Male Wistar rats (~200 gr) were randomly allocated in 8 groups with equal substitutive numbers (control, sham, and treatments). The VTA-DA neuronal firing patterns (simple-tonic or burst firing) were acquisitioned under urethane anesthesia and stereotaxic approach. Bicuculline as a GABA-A receptor antagonist were infused microiontophoretically intracerebroventricularly (5, 25, 50, 500, 1000, and 2500 ngr) and peri-injection neuronal firing were captured for burst firing detection. **Results:** The simple-tonic spiking of the VTA-DA neurons in the pre-injection period was about 5.78 spikes/sec overall with stable firing. Bicuculline microinjection dose-dependently modulated burst firing pattern. The abovementioned amounts of Bicuculline induced 5.2, 10.4, 23.4, 28.8, 35.9, 36.17 percent of neurons to fire burst with duration of 5.2, 8.7, 24.45, 29.87, 40.56, and 50.34 minutes, respectively. The post injection simple-tonic firing rates were also dose-dependently elevated from 8 to 358 percent of the pre-injection levels. **Conclusion:** The results showed that GABA-A receptors on the VTA-DA neurons can have regulatory roles on their firing patterns. The external GABAergic afferents or internal interneurons that mediate GABA modulation on the VTA-DA neurons can interfere in the efferent functions of the VTA-DA neurons.

### Key words:

1. Ventral Tegmental Area
2. Dopaminergic Neurons
3. Neurons

\*Corresponding Author: Firouz Ghaderi Pakdel

E-mail: info@fgpakdel.com

# شلیک انفجاری نورون‌های ناحیه تگمنتوم شکمی از طریق مهار گیرنده GABA-A القاء شده با بیکوکولین

فرشته طالع<sup>۱</sup>، فیروز قادری پاکدل<sup>۱،۲\*</sup>، پرویز شهبابی<sup>۳</sup>، سمیه نادری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۲</sup>مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup>مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۴</sup>شرکت دانش پی هادی، مرکز رشد فناوری‌های سلامت ارومیه، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

## اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۳ بهمن ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲۳ آذر ۱۳۹۴

## چکیده

**مقدمه:** ناحیه تگمنتوم شکمی، به‌عنوان یک منبع اصلی از نورون‌های دوپامینرژیک نقش‌های بسیار مهمی در حالت‌های حیاتی و پاتولوژیک از قبیل وابستگی دارویی و افسردگی دارند. گیرنده‌های روی نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی با تراکم و تنوع مختلف دارای اثرات تعدیل کننده بر روی بافت‌های هدف‌شان مانند قشر مخ می‌باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر انسداد گیرنده GABA-A روی الگوی شلیک نورونی دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی بود. **مواد و روش‌ها:** موش‌های صحرایی ویستار نر (تقریباً ۲۰۰ گرم) به طور تصادفی در هشت گروه با تعداد قابل جایگزین برابر (کنترل، شم و درمان‌ها) تقسیم شدند. الگوهای شلیک نورونی دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی (ساده -تونیک یا شلیک انفجاری) تحت بیهوشی اورتان و روش استریوتاکسیک به دست آمده بودند. بیکوکولین به‌عنوان یک آنتاگونیست گیرنده GABA-A به کمک روش میکروایونتوفورز داخل بطن مغزی (۵، ۲۵، ۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ نانوگرم) تزریق گردید و به‌منظور تشخیص فعالیت‌های انفجاری نورونی به دنبال تزریق دارو، فعالیت‌های نورونی ثبت گردید. **یافته‌ها:** وضعیت ساده -تونیک از نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی در دوره پیش جراحی به طور کلی حدود ۵/۷۸ اسپایک در ثانیه با شلیک پایدار بود. تزریق وابسته به دوز بیکوکولین، الگوی شلیک انفجاری را تعدیل کرده بود. مقدارهای ذکر شده فوق از بیکوکولین به ترتیب منجر به القاء شلیک انفجاری ۵/۲، ۱۰/۴، ۲۳/۴، ۲۸/۸، ۳۵/۹ و ۳۶/۱۷ درصد از نورون‌ها با دوره زمانی ۵/۲، ۸/۷، ۲۰/۴۵، ۲۹/۸۷، ۴۰/۵۶ و ۵۰/۳۴ دقیقه گردید. میزان شلیک ساده -تونیک همچنین پس از تزریق نسبت به سطوح پیش تزریق به صورت وابسته به دوز از ۸ تا ۳۵۸ درصد افزایش داشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که گیرنده‌های GABA-A روی نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی می‌توانند نقش‌های تنظیمی روی الگوهای شلیک خودشان داشته باشند. آوران گابائریک خارجی یا اینترنورون‌های داخلی که تنظیم گابا روی نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی را میانجیگری می‌کنند، می‌توانند در عملکرد وبران نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی دخالت کنند.

## کلید واژه‌ها:

۱. ناحیه تگمنتوم شکمی
۲. نورون‌های دوپامینرژیک
۳. نورون‌ها

\*نویسنده مسئول: فیروز قادری پاکدل

آدرس الکترونیکی: info@fgpakdel.com

## مقدمه

ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA)<sup>۱</sup> به عنوان یکی از کانون‌های اصلی نورون‌های دوپامینرژیک بوده و با توجه به مشارکت آن در سیستم لیمبیک<sup>۲</sup> و نیز مدار پاداش<sup>۳</sup>، نقش مهمی در رفتارهای انگیزشی<sup>۴</sup>، فرایند وابستگی<sup>۵</sup> به مواد و اعتیاد<sup>۶</sup> و نیز بیماری‌های روانی<sup>۷</sup> بازی می‌کند (۱-۴). ترکیب نورونی VTA عمدتاً شامل نورون‌های دوپامینرژیک<sup>۸</sup> حدود ۶۵٪، نورون‌های ترشح کننده گاما آمینوبوتیریک اسید یا نورون‌های گابارژیک<sup>۹</sup> حدود ۳۰٪ و نورون‌های گلوتاماترژیک<sup>۱۰</sup> حدود ۵٪ می‌باشد (۵-۸). نورون‌های دوپامینرژیک این قسمت از مغز تحت نام گروه A10 به مناطقی همانند هسته اکومبنس<sup>۱۱</sup>، آمیگدال، هیپوکامپ و قشر جلوپیشانی<sup>۱۲</sup> آکسون‌هایی را ارسال کرده و دستگاه دوپامینی مزوکورتیکولیمبیک<sup>۱۳</sup> را می‌سازد (۹). گروه مهمی از نورون‌های گابارژیک VTA در بخشی از آن تجمع دارند که RMTg<sup>۱۴</sup> نامیده می‌شوند. این ناحیه که به قسمت دمی VTA (tVTA)<sup>۱۵</sup> نیز مشهور است، در وساطت رفتارهای پاداش برای بقاء موجود، اهمیت فراوانی دارد (۱۰، ۱۱).

نورون‌های گابارژیک این ناحیه و سایر نواحی VTA اینترنورون‌هایی هستند که در عملکرد آن‌ها تفاوت چندانی تشخیص داده نشده ولی به نظر می‌رسد در بیشتر موارد این نورون‌ها به صورت اینترنورون قادر هستند فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA را تنظیم نمایند. تحریک این نورون‌ها باعث تشدید رفتار اجتنابی و قطع تداوم رفتار پاداش می‌گردد (۱۲، ۱۳). اگرچه ورودی گابارژیک روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA وجود دارد (۱۴-۱۶)؛ ولی نورون‌های گابارژیک درون VTA نقش مهمی در کنترل عملکرد نورون‌های دوپامینرژیک آن داشته و اثرات فارماکولوژیک برخی داروها و احتمالاً اثرات فیزیولوژیک برخی مسیرها و ناقلین عصبی<sup>۱۶</sup> در تغییر میزان دوپامین ترشحی VTA، به تنظیم ناشی از آن‌ها مربوط می‌شود. این نورون‌ها دارای پاسخ متفاوتی به مواد و داروهای محرک و یا وابسته کننده می‌باشند (۱۷).

یکی از ویژگی‌های مهم نورون‌های دوپامینرژیک VTA، تغییر فعالیت نورونی بسته به محرک وارد شده می‌باشد (۱۸). در هنگام ورود محرک غیرقابل پیش‌بینی پاداشی<sup>۱۷</sup> به دنبال تکرار محرک‌های خنثی که بیانگر نزدیک شدن

رخداد پاداش است، فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA به صورت فزایک تغییر پیدا می‌کند (۱۹، ۲۰). در یک نگاه عمومی نورون‌های دوپامینرژیک VTA دارای دو نوع الگوی فعالیت نورونی شامل فعالیت نورونی منظم<sup>۱۸</sup> یا پیش‌آهنگی<sup>۱۹</sup> و فعالیت نورونی انفجاری<sup>۲۰</sup> می‌باشند (۲۱، ۲۲). تغییر الگوی فعالیت نورونی از فعالیت منظم یا ساده -تونیک<sup>۲۱</sup> به انفجاری در طیف وسیعی از شرایط همانند شرایط محرومیت و بیماری اسکیزوفرنی می‌تواند تغییر یابد (۲۳). تغییر الگوی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA موجب رهايش مقادير بیشتری از دوپامین در نورون‌های هدف در مناطق مختلف مغز شده و به نظر می‌رسد این تغییر فعالیت ضمن برجسته ساختن محرک‌های وارده و ایجاد درک مناسب از محرک، موجب ایجاد نوعی یادگیری برای مغز نسبت به پیام‌ها و محرک‌های وارده می‌شود (۲۴).

ثبات‌های الکتروفیزیولوژیک خارج سلولی از نورون‌های دوپامینرژیک VTA نشان داده است که این نورون‌ها توسط آوران‌های گابارژیک و نیز نورون‌های گابارژیک درون VTA مهار می‌شوند (۲۵). کاهش ترشح GABA<sup>۲۶</sup> در روی گیرنده‌های پس‌سیناپسی نورون‌های دوپامینرژیک VTA یکی از مهمترین عوامل اصلی تحریک‌پذیری آن‌ها بوده و در جوار ترشح مداوم گابا این نورون‌ها وارد یک دوره کاهش فعالیت می‌گردند (۲۶). احتمالاً گیرنده‌های گابا و گلوتامات در روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA در طی تکرار الگوهای خاص از فعالیت‌های نورون‌های گابارژیک روی آن‌ها، نورون‌های دوپامینرژیک را دچار نوعی شکل‌پذیری سیناپسی یا پلاستیسیتی کرده (۲) و با توجه به اینکه گیرنده‌های GABA-A در روی نورون‌های دوپامینرژیک از تراکم بسیار مناسبی برخوردار هستند، بسیاری از عملکردهای نورون‌های دوپامینرژیک از طریق گیرنده‌های GABA-A در سیناپس‌های دندریتی یا روی جسم سلولی نورون‌های دوپامینرژیک VTA وساطت می‌شود (۲۷، ۲۸).

تجویز درون VTA موزیمول<sup>۲۳</sup> به عنوان آگونیست و بیکوکولین<sup>۲۴</sup> به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های GABA-A در حیواناتی که قبلاً تحت تیمار دارویی نبودند، موجب بروز اثرات تقویت<sup>۲۵</sup> و پاداش<sup>۲۶</sup> در حیوانات شده است. اثرات پاداش با به کار بردن آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی

<sup>1</sup> Ventral tegmental area

<sup>2</sup> Limbic system

<sup>3</sup> Reward system

<sup>4</sup> Motivated behaviors

<sup>5</sup> Drug dependence

<sup>6</sup> Addiction

<sup>7</sup> Neuropsychiatric illnesses

<sup>8</sup> Dopaminergic

<sup>9</sup> GABAergic

<sup>10</sup> Glutamatergic

<sup>11</sup> Nucleus accumbens

<sup>12</sup> Prefrontal cortex

<sup>13</sup> Dopamine mesocorticolimbic

<sup>14</sup> Rostromedial tegmental nucleus

<sup>15</sup> Tail of the ventral tegmental area

<sup>16</sup> Neurotransmitters

<sup>17</sup> Unpredicted reward

<sup>18</sup> Regular

<sup>19</sup> Pacemaker

<sup>20</sup> Burst

<sup>21</sup> Simple-tonic

<sup>22</sup> gamma-Aminobutyric acid

<sup>23</sup> Muscimol

<sup>24</sup> Bicuculline

<sup>25</sup> Reinforcing

<sup>26</sup> Rewarding

رعایت شد. اجرای کدهای اخلاقی ارائه شده توسط کمیته مزبور ضمن توصیف به محققین، مورد پایش مداوم قرار می‌گرفت. ۴۰ سر موش صحرایی نر سالم نژاد ویستار با میانگین وزنی  $20 \pm 220$  گرم استفاده شد. حیوانات در محل شرکت دانش پی هادی (به‌عنوان شرکت دانش‌بنیان دانشگاه علوم پزشکی ارومیه) تحت شرایط مناسب دمایی ( $2 \pm 23$  درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده و در طول مدت نگهداری دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. نور محل نگهداری حیوانات شامل دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ۸ صبح) بوده و رطوبت آن تابع رطوبت محیط بوده است. حیوانات به صورت ۴ سر موش در یک قفس متوسط از جنس پلی‌کربنات نگهداری می‌شدند.

حیوانات به ۸ گروه ۵ سری و قابل جایگزینی تقسیم شده و در شیوه تقسیم‌بندی هیچ نوع دخالتی وجود نداشته است. گروه‌های حیوانی شامل یک گروه کنترل، یک گروه شاهد یا شم و ۶ گروه تیمار دارویی بوده است. گروه کنترل برای مشخص کردن ثبات شرایط آزمایشگاهی در ثبت‌های الکتروفیزیولوژیک، گروه شم یا دریافت کننده حامل دارو (سرم فیزیولوژیک نرمال) برای مشخص کردن اثر حامل دارو استفاده شده است. ۶ گروه تیمار شامل گروه‌های دریافت کننده مقادیر بیکوکولین (به ترتیب ۵، ۲۵، ۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ نانوگرم، داخل بطن مغزی) بوده‌اند. بیکوکولین با سرعت ۲ میکرولیتر در دقیقه و در حجم مساوی ۱۰ میکرولیتر برای تمامی حیوانات تزریق می‌شد. محل تزریق در بطن همسو (بطن سمت راست) بوده و مطابق اطلس از مختصات صفحه شماره ۴۱ چاپ ششم اطلس پاکسینوس با  $mm -0.96 = Bregma$  و با مختصات  $ML = 2 mm$  و  $DV = 4 mm$  استفاده شده و نوک الکتروود تزریق در موقعیت مذکور قرار می‌گرفت. جهت جلوگیری از نشت مایع مغزی -نخاعی از چسب بیولوژیک استفاده می‌گردید.

در این تحقیق چون حیوانات بلافاصله بعد از انجام آزمایش‌ها کشته می‌شدند، کاشت الکتروود تزریق به صورت موقت و با استفاده از هولدر دستگاه جراحی استریوتاکسیک صورت می‌گرفت. بعد از اتمام آزمایش‌ها مقدار ۲ میکرولیتر محلول رنگ پونتامین در بطن تزریق می‌شد تا اطمینان کافی در برش‌های بافتی حاصل گردد.

برای ثبت از نورون‌های دوپامینرژیک VTA، حیوانات پس از وزن شدن و با تزریق داخل صفاقی<sup>۲۷</sup> داروی بیهوشی اورتان (Urethane, Sigma-Aldrich, USA) با دوز ۱/۲ گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن حیوان،

یا آگونیست گیرنده‌های GABA-B مهار شده ولی اثرات تقویتی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. نتایج این تحقیق بیانگر دخالت دو طرف گیرنده‌های گابا روی فرایند پاداش از طریق نورون‌های دوپامینی و غیردوپامینی می‌باشد (۳۱-۲۹). به نظر می‌رسد این اثرات نوعی تناقض ناشی از عملکرد گیرنده‌های گابا در روی نورون‌های دوپامینرژیک و غیردوپامینرژیک در هسته VTA باشد. احتمالاً موزیمول موجب مهار نورون‌های گابارژیک VTA از طریق مکانیسم حذف مهار<sup>۲۹</sup> و اثر حذف مهار نورون‌های گابارژیک روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA می‌باشد (۳۱).

تفسیر اثرات آنتاگونیست گیرنده گابا روی ایجاد پاداش وابسته به آنتاگونیست دوپامین یا غیروابسته به آن، هنوز در پرده ابهام است و به نظر می‌رسد بخشی از فرایند، به تغییر فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA برمی‌گردد. در مطالعه Kodangattil و همکاران نشان داده شده است که علی‌رغم مشارکت گیرنده‌های گلوتاماتی در بروز شکل‌پذیری‌های سیناپسی در VTA، نقش گیرنده‌های گابا در بروز این شکل‌پذیری وابسته به زمان اسپایک (STDP)<sup>۲۸</sup> اهمیت فراوانی دارد (۳۲). همچنین مطالعه Schweimer و همکاران روی موش‌های knockout نشان داده است که تغییر گیرنده‌های  $^{29}NMDA$  گلوتاماتی موجب بروز شلیک‌های انفجاری<sup>۳۰</sup> در نورون‌های دوپامینرژیک VTA می‌گردد (۳۳). وجود نورون‌های دوپامینرژیک با فعالیت انفجاری در VTA در برخی مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است (۳۴). ونگ<sup>۳۱</sup> و همکاران نشان داده‌اند که فعالیت انفجاری در نورون‌های دوپامینرژیک VTA می‌تواند توسط برخی عوامل شیمیایی همانند ترکیبات گلوتاماتی کنترل گردند (۳۵).

با توجه به اینکه تغییر الگوی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک از حالت ساده -تونیک به حالت انفجاری می‌تواند موجب بروز اثرات ویژه‌ای در رفتارهای کنترل شونده توسط VTA گردد، در این تحقیق برای نشان دادن نقش گیرنده‌های گابا در روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA، آنتاگونیست گیرنده‌های GABA-A، بیکوکولین به صورت داخل بطن مغزی (ICV)<sup>۳۲</sup> و با مقادیر مختلف تزریق شد و الگوی فعالیت نورونی قبل و بعد از تزریق برای مشخص کردن بروز فعالیت‌های انفجاری نورون‌های دوپامینرژیک استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

کلیه روش‌های به کار برده شده و شرایط نگهداری حیوانات طبق اصول مورد تأیید کمیته‌های اخلاق در پژوهش‌های زیستی پزشکی کشور و دانشگاه علوم پزشکی ارومیه بوده و موازین مربوط به حقوق حیوانات

<sup>27</sup> Disinhibition

<sup>28</sup> Spike timing-dependent plasticity

<sup>29</sup> N-methyl-D-aspartate receptor

<sup>30</sup> Burst firings

<sup>31</sup> Wang

<sup>32</sup> Intracerebroventricular

<sup>33</sup> Intraperitoneal injection

برای ثبت فعالیت‌های نورونی الکترودهای شیشه‌ای از جنس بوروسیلیکات (A-M System, USA) استفاده می‌شد. الکتروده مناسب ثبت از طریق کشیدن الکترودهای شیشه‌ای تهیه می‌شدند. مقاومت الکترودها حدود  $5 \pm 2$  مگا اهم بود. الکتروده تهیه شده از محلول ۰/۵ مولار استات سدیم (Sigma-Aldrich, USA) حاوی ۰/۲ پونتامین اسکای بلو (Puntamine Sky Blue, Santacruz) پر شده و به دقت حباب‌گیری می‌شدند. نوک الکتروده با توجه به شاخص‌های استریوتاکسیک به سمت VTA هدایت شده و در محل هسته با استفاده از جابجایی میکرومتری، ثبت از فعالیت‌های نورونی به واسطه آمپلی‌فایر ثبت خارج سلولی (Electromodule 3111) صورت می‌گرفت. سیگنال‌های اخذ شده ۵۰۰۰۰ برابر تقویت و تحت تأثیر فیلتر باندپس (۳۰۰-۳۰۰۰ Hz) قرار می‌گرفتند.

ثبت‌های صورت گرفته ضمن بررسی برخط<sup>۳۸</sup> به صورت غیربرخط<sup>۳۹</sup> توسط دو آنالیز کننده مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفتند. نرم‌افزار Igor Pro (Wavemetrics, USA) ورژن ۶/۳ جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات نورونی و استخراج اطلاعات مربوط به نرخ<sup>۴۰</sup> شلیک نورون‌ها و سایر موارد استفاده شده است. در داده‌های ثبت شده بر اساس شاخص‌های از قبل مشخص شده مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک، این دسته از نورون‌ها مورد استخراج قرار گرفته و سپس فعالیت نورونی با وضعیت ساده -تونیک<sup>۴۱</sup> و انفجاری در نورون‌های ثبت شده استخراج می‌گردید. از جنبه الکتروفیزیولوژیک نورون‌های دوپامینرژیک دارای اسپایک‌های دو فازی (+/-) یا سه فازی (+/-/+) با طول زمانی یا دوره تناوب بیش از ۲/۵ هزارم ثانیه و نرخ شلیک کمتر از ۱۰ اسپایک در ثانیه می‌باشند (۳۹-۴۲).

ثبتات در فواصل بین اسپایک‌ها (ISI)<sup>۴۲</sup> که نشان دهنده وضعیت ساده -تونیک بوده و در نورون‌های دوپامینرژیک به طور برخط با استفاده از روش موج بیز (Window discrimination) بررسی و محاسبه گردیده و به طور غیربرخط با استفاده از نرم‌افزار Igor Pro و XOP -که ویژه این نرم‌افزار است- ارزیابی گردید. پارامتر ISI در قالب هیستوگرام نسبت به زمان (ISITH)<sup>۴۳</sup> در طول دوره فعالیت هر نورون ثبت شده و مورد ارزیابی قرار می‌گرفت (۴۳). شاخص ارزیابی فعالیت انفجاری در نورون‌های دوپامینرژیک از قاعده رایج در مطالعات قبلی تبعیت می‌کرد.

به طور خلاصه بر حسب مطالعات قبلی در هنگام تبدیل فعالیت نورون از شلیک ساده -تونیک به فعالیت انفجاری ابتدا یک دوره خاموشی بین آخرین اسپایک ساده وجود داشته و معمولاً در هر فعالیت انفجاری،

بیهوش شده و پس از مستقر شدن در دستگاه جراحی استریوتاکسیک (Steolting, USA)، تحت جراحی استریوتاکسیک قرار می‌گرفتند. تلاش می‌شد ثبت‌های لازم در مدت زمان ۳ ساعت پس از بیهوشی اخذ گردد. روند بیهوشی کنترل شده و در صورت نیاز دوز یا دوزهای کمکی<sup>۴۴</sup> برای برقراری سطح بیهوشی مناسب در حیوانات تزریق می‌گردید (۳۶). جراحی حیوانات تحت شرایط استریل و رعایت کلیه موازین اخلاقی صورت گرفته و شاخص‌های استریوتاکسیک پس از کنار زدن پوست روی کاسه سر مشخص و مختصات استریوتاکسیک آن‌ها محاسبه می‌گردید. بر اساس شاخص‌های اطلس جراحی‌های استریوتاکسیک واتسون و پاکسینوس مختصات ورود به هسته VTA با توجه به وزن و مختصات Bregma و محور بین گوش‌ها<sup>۴۵</sup> محاسبه می‌گردید. شاخص مناسب و استاندارد اطلس مذکور برای ورود به هسته VTA به صورت  $DV=1/6$  mm,  $AP=-6/84$  mm از سطح تراز برگمایی (BZZ)<sup>۴۶</sup> و  $ML=0/5$  mm می‌باشد. با توجه به شاخص‌های استریوتاکسیک اندازه‌گیری شده در سطح مجموعه هر حیوان مقادیر متناسب محاسبه و برای رسیدن به VTA مورد استفاده قرار می‌گرفت (۳۷).

در هر ثبت ضمن رعایت نکات آناتومیک جراحی استریوتاکسیک، شواهد الکتروفیزیولوژیک فعالیت نورونی در نهایت شواهد بافتی ناشی از برش مقاطع تثبیت شده با دقت بازبینی شده و نمونه‌های ثبت شده خط‌آمیز وارد آنالیز نمی‌گردید. برای مشخص شدن نوک الکتروده پس از اتمام آزمایش‌ها جریان ایونتوفوریک به میزان ۵۰ میکروآمپر و با بار منفی به مدت ۱۰ دقیقه در الکتروده ثبت وارد می‌شد. مقادیر بسیار کم از رنگ پونتامین از الکتروده خارج و در فضای اطراف نوک آن رسوب می‌کرد. در مقاطع اخذ شده این نقطه محل نوک الکتروده محسوب می‌شد. تصویر محل مشخص شده روی صفحه ترسیمی اطلس همپوشان می‌گردید. در صورت خارج بودن محل رسوب از VTA داده‌های آن ثبت مورد استفاده قرار نمی‌گرفت.

در این تحقیق از روش ثبت تک نورون یا ثبت تک واحدی<sup>۴۷</sup> برای اخذ فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک استفاده می‌گردید. به طور خلاصه الکتروده شیشه‌ای مناسبی تهیه و بر اساس مختصات اطلس جراحی استریوتاکسیک به طرف VTA هدایت و فعالیت اسپایک خارج سلولی نورون یا نورون‌ها اخذ می‌شدند. در این نوع از ثبت‌های الکتروفیزیولوژیک بخش اسپایک خارج سلولی ناشی از پتانسیل عمل، ثبت و بر اساس الگوی استاندارد تفکیک و به واحدهای نورونی منتسب می‌گردد (۳۸).

<sup>34</sup> Booster

<sup>35</sup> Interaural axis

<sup>36</sup> Bregma zero-zero

<sup>37</sup> Single neuron recording

<sup>38</sup> On-line

<sup>39</sup> Off-line

<sup>40</sup> Rate

<sup>41</sup> Simple-tonic mode

<sup>42</sup> Inter spike interval

<sup>43</sup> Inter spike interval time histogram

وضعیت انفجاری با استفاده از آزمون Wilcoxon signed rank مشخص شد و دوره فعالیت انفجاری استخراج گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌های بین گروهی و درون گروهی تغییرات وابسته به مقدار بوپروپیون در تبدیل وضعیت ساده -تونیک به وضعیت انفجاری از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری برای کلیه داده‌ها معادل  $P < 0.05$  در نظر گرفته شده است. در ارزیابی تغییر فعالیت ساده -تونیک هر نورون در قبل و بعد از تزریق و مراحل تغییر افزایش یا کاهشی بعد از تغییر و برگشت به فعالیت ساده -تونیک نسبت به قبل از تزریق، از آزمون Friedman به‌عنوان آزمون جایگزین پارامتریک repeated-measured one-way ANOVA استفاده شد. از نرم‌افزار Origin pro نسخه ۹ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

#### یافته‌ها

در این تحقیق نورون‌های دوپامینرژیک بر اساس شاخص‌های الکتروفیزیولوژیک بیان شده در مقالات از ثبت‌های انجام شده جدا می‌گردیدند. شاخص‌های اصلی برای جدایی این نورون‌ها شامل: طول زمان اسپایک بیش از ۲/۵ هزارم ثانیه، وجود حالت دو فازی یا سه فازی با فاز مثبت در قسمت اول، فرکانس شلیک کم (بین ۴ الی ۱۰ بار در ثانیه) مشخص و جدا می‌شدند. به طور خلاصه در این تحقیق میزان شلیک نورون‌های دوپامینرژیک در ثبت‌های اخذ شده  $5/78 \pm 1/1$  شلیک در ثانیه بوده است. تعداد ۲۳۰ نورون دوپامینرژیک که بعد از تزریق بیکوکولین دچار تغییر فعالیت از وضعیت ساده -تونیک به انفجاری شدند، جدا گشته و فعالیت آن‌ها نسبت به مقدار تزریقی بیکوکولین مشخص گردید. فواصل زمانی بین اسپایک‌های دوره‌های فعالیت تونیک و انفجاری برای نورون‌ها مشخص می‌گردید.

برای ارزیابی روایی و پایایی داده‌های اخذ شده و به‌منظور مشخص کردن پایداری ثبت‌های الکتروفیزیولوژیک، داده‌های مربوط به گروه‌های کنترل و شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. پایداری ثبت با توجه به ثبت‌های گروه کنترل مورد تأیید قرار گرفته و برای مشخص شدن اثر حجم حامل دارو در گروه‌های شاهد مقادیر فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک قبل و بعد از تزریق حامل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### الف) الگوی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک در گروه شاهد

الگوی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک در موش‌های گروه شاهد یا شم قبل از تزریق حامل دارو (۱۰ دقیقه)، حین تزریق (۵ دقیقه) و بعد از اتمام تزریق حامل دارو ثبت می‌شد. ثبت بعد از تزریق به طور

حداقل دو اسپایک با فاصله بین اسپایک‌ها کمتر یا مساوی ۸۰ هزارم ثانیه بود. معمولاً هنگامی فعالیت انفجاری خاتمه یافته تلقی می‌شود که بین آخرین اسپایک شلیک انفجاری و شروع وضعیت ساده -تونیک یا اولین اسپایک انفجاری بعدی فاصله زمانی بیش از ۱۶۰ هزارم ثانیه رخ می‌دهد. این قاعده را شاخص ms ۸۰/۱۶۰ می‌نامند. درون هر قطار اسپایک انفجاری تعداد اسپایک‌های رخ داده، ISI اسپایک‌ها، دامنه اسپایک‌ها نسبت به آخرین اسپایک تونیک و تغییرپذیری<sup>۴۴</sup> آن‌ها به روش‌های آماری مشخص می‌گردید (۴۴). تغییرات الگوی شلیک نورون‌های ثبت شده در وضعیت شلیک تونیک و ساده نسبت به شلیک انفجاری از نظر فواصل اسپایک برای جدایی نوع فعالیت مورد بررسی قرار گرفت. در نورون‌های ثبت شده که دارای هر دو فعالیت بوده‌اند محاسبه مقادیر ISI با توجه به مراحل ثبت در زمان‌های تثبیت فعالیت دوگانه توسط نرم‌افزار مشخص گردیده و محاسبات مورد نظر انجام گردید. فعالیت ساده -تونیک و فعالیت انفجاری ناشی از تزریق بیکوکولین به صورت داخل بطن مغزی در نورون‌های دوپامینرژیک آغاز می‌شد.

در این گروه از تحقیقات به طور مرسوم از نمایش هیستوگرام ستونی برای نمایش داده‌ها استفاده می‌شود. برای ترسیم هیستوگرام معمولاً تعداد اسپایک نورون نسبت به دوره‌های مختلف به همراه تجزیه و تحلیل آن کافی است که به PSTH<sup>۴۵</sup> می‌گویند. در خصوص تغییرات الگوی فعالیت نورونی ضمن ارزشمندی PSTH از هیستوگرام ستونی فواصل بین اسپایک‌ها استفاده می‌شود. به نمودار هیستوگرام ISI اصطلاحاً ISITH نیز می‌گویند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصله شامل میزان فعالیت در واحد زمان و نیز تغییرات فواصل زمانی بین اسپایک‌ها از طریق آزمون‌های آماری مناسب انجام گردید. برای ISI در هر نورون مقدار ضریب تغییرات (CV)<sup>۴۶</sup> در فعالیت‌های ساده -تونیک و نیز انفجاری به صورت درصد فعالیت پایه، قبل از تزریق محاسبه می‌گردید. برای به دست آوردن ضریب تغییرات وضعیت نورون‌ها، مقادیر نرخ شلیک و نیز ISI ابتدا با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این آزمون همانند آزمون one-way analysis of variance یا one-way ANOVA بوده و موارد اختلاف در قبل از تزریق، بعد از تزریق و نیز افزایش یا کاهش و تغییر الگوی فعالیت را در حالت کلی بیان می‌کرد. برای مشخص شدن نقاط اختلاف آماری، آزمون Mann-Whitney U برای مقادیر PSTH و ISITH مورد استفاده قرار گرفت. برای اخذ تغییر الگوی فعالیت نورون و استحصال فعالیت‌های انفجاری متعاقب آزمون Kruskal-Wallis از آزمون Wilcoxon signed rank استفاده شد. زمان حضور

<sup>44</sup> Variability

<sup>45</sup> Peri-stimulus time histogram

<sup>46</sup> Coefficient of variation

نورون دوپامینرژیک آورده شده است.

نورون‌های دوپامینرژیک ثبت شده در تحقیق حاضر از بین ثبت‌هایی انتخاب شده‌اند که دارای شرایط ثبت پایدار بوده و نرخ شلیک نورون‌ها به راحتی موجب تفکیک آن‌ها به نورون‌های واحد و جداگانه می‌گردید. این نورون‌ها معمولاً دارای نرخ شلیک کمتر از ۱۰ بوده و عملاً نرخ شلیک آن‌ها در حوالی ۵ شلیک در ثانیه بوده است. در تصویر ۳ نمونه‌ای از ثبت صورت گرفته آورده شده است. فعالیت نورونی در گروه‌های ثبت شده تا زمان برگشت به فعالیت قبل از تزریق ادامه می‌یافت. نمونه‌ای از فعالیت ساده -تونیک و انفجاری در نورون‌های مذکور قبل و بعد از تزریق بیکوکولین در تصویر ۴ آورده شده است.

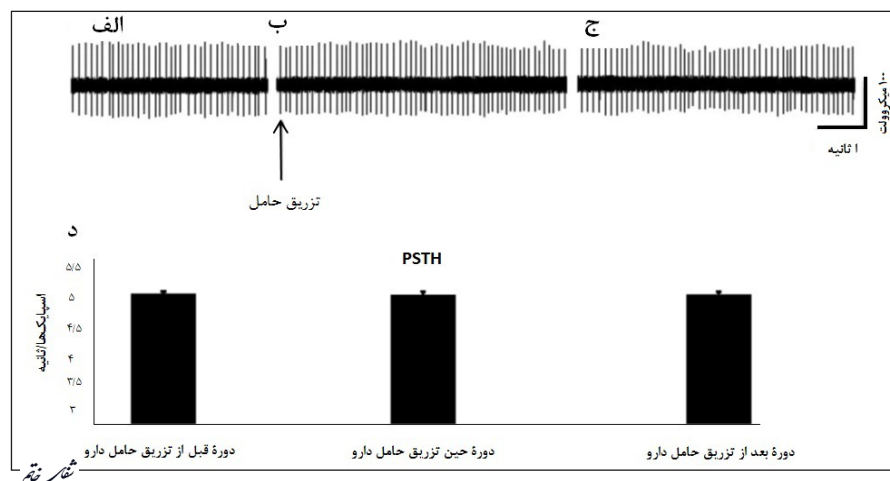
### ج) تغییرات نرخ تولید اسپایک انفجاری در نورون‌های دوپامینرژیک

در این پروژه بیکوکولین به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های GABA-A به صورت داخل بطن مغزی تزریق می‌گردید. بیکوکولین در مقادیر ۵، ۲۵، ۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ نانوگرم در حجم ۱۰ میکرولیتر و در مدت

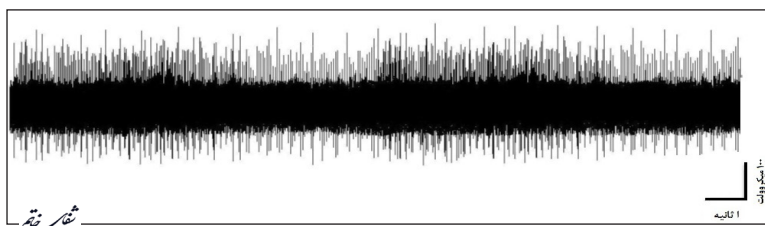
متوسط تا ۲ ساعت ادامه یافته و مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفتند. در بین ثبت‌های صورت گرفته تغییر الگوی فعالیت نورونی از ساده -تونیک به حالت انفجاری مشاهده نشد. میانگین فعالیت نورونی در این دسته از نورون‌ها  $2/05 \pm 4/96$  اسپایک در ثانیه بوده است. در ثبت از گروه شش نورون‌های دوپامینرژیک ثبت شده از نظر میزان فعالیت نورونی در قبل، حین و بعد از تزریق مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین داده‌های سه دوره مذکور در هر نورون بوده است. در تصویر ۱ نمونه‌ای از ثبت‌های اخذ شده از نورون‌های دوپامینرژیک در گروه شاهد آورده شده است. همچنان‌که مشاهده می‌شود شلیک نورون‌های ثبت شده در سه دوره مذکور تفاوت معنی‌داری نسبت به هم ندارند.

### ب) الگوی فعالیت تک نورون در تولید فعالیت انفجاری

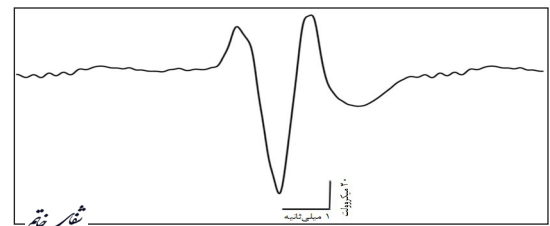
در ثبت‌های انجام گرفته نورون‌هایی با الگوی شلیک ساده -تونیک انتخاب می‌شدند. این نورون‌ها معمولاً بر اساس شکل اسپایک و نیز الگوی فرکانسی تخلیه از بقیه نورون‌ها جدا می‌شدند. در تصویر ۲ تصویر تیپیک



**تصویر ۱-** نمونه‌ای از ثبت انجام شده از نورون‌های دوپامینرژیک هسته VTA در گروه موش‌های شاهد یا شش. در بخش الف قسمتی از ثبت یک نورون تیپیک دوپامینرژیک قبل از تزریق حامل دارو آورده شده است. در قسمت ب در حین و بعد از تزریق حامل دارو فعالیت نورون نشان داده شده است. در قسمت ج بعد از گذشت ۱/۵ ساعت از تزریق حامل دارو ثبت فعالیت نورون نشان داده شده است. در قسمت د مقادیر شلیک نورون مذکور در سه دوره مذکور به صورت هیستوگرام نشان داده شده است. در خصوص این نورون قبل از تزریق میزان فعالیت نورون  $0/38 \pm 5/1$  اسپایک در ثانیه، در حین تزریق  $0/72 \pm 5/1$  اسپایک در ثانیه، و بعد از تزریق  $0/34 \pm 5/1$  اسپایک در ثانیه بوده است. آنالیز آماری داده‌های حاصل بین سه دوره مذکور با استفاده از تست آماری one-way repeated measured ANOVA بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین داده‌های سه دوره مذکور بوده است.



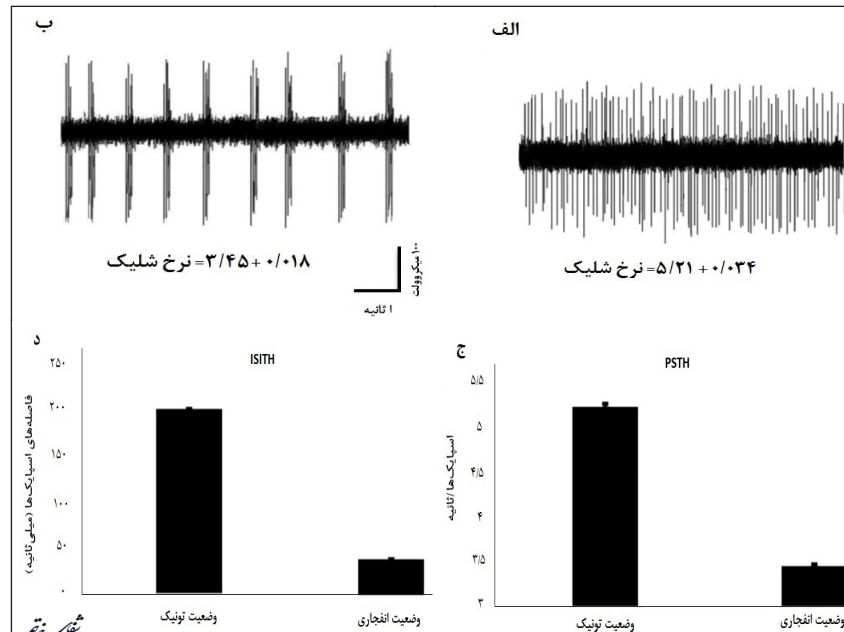
**تصویر ۳-** نمونه‌ای از ثبت انجام شده از نورون‌های دوپامینرژیک هسته VTA. اسپایک‌ها به صورت غیر برخط و هم به صورت برخط بررسی و جدا می‌شدند.



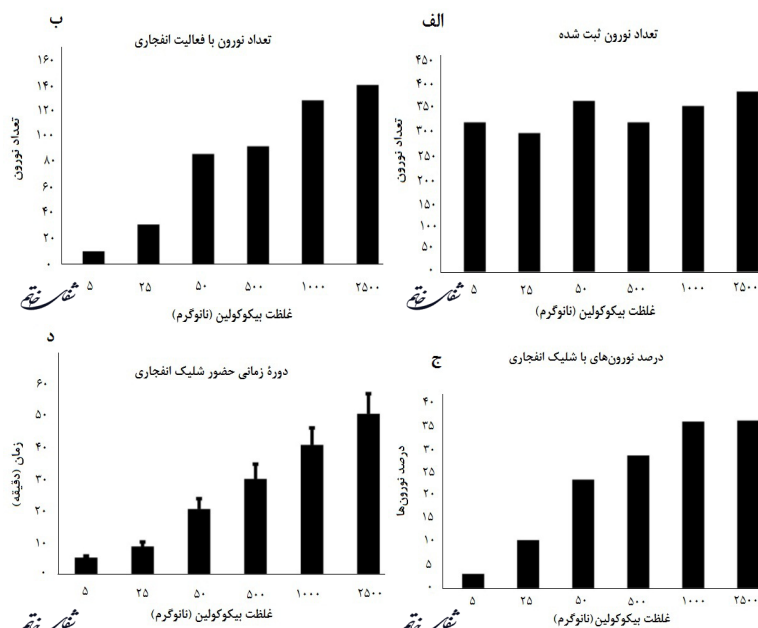
**تصویر ۲-** تصویر تیپیک از اسپایک خارج سلولی ثبت شده از هسته VTA. شاخص زیر تصویر در محور افقی نشان دهنده زمان (یک هزارم ثانیه) و در محور عمودی نشان دهنده دامنه (۲۰ میکروولت) می‌باشد. تصویر اسپایک جدا شده از نورون‌های دوپامینرژیک بیانگر این است که طول زمانی نورون‌های ثبت شده بیشتر از ۲/۵ هزارم ثانیه بوده و اکثر آن‌ها دارای وضعیت سه فازی می‌باشد.

انفجاری در ثبت بوده است. میزان تغییر فعالیت نورون‌ها بعد از برگشت نیز مورد آنالیز قرار می‌گرفت. در نمودار ۱ میزان فعالیت وضعیت نورون‌های ثبت شده در غلظت‌های مختلف آورده شده است. همچنان‌که در نمودار نیز مشخص است؛ در غلظت ۵ نانوگرم از ۳۲۱ نورون ثبت شده تعداد ۱۰ (۵/۲ درصد) نورون پس از تزریق بیکوکولین فعالیت انفجاری نشان داده‌اند و زمان

زمان ۵ دقیقه به درون بطن راست مغز تزریق می‌شد. به مدت ۲۰ دقیقه قبل از تزریق و پس از رسیدن نورون به فعالیت پایدار، ثبت پایه از فعالیت ساده و تونیک نورون‌ها انجام می‌شد. در حین تزریق ثبت ادامه داشته و تا زمان برگشت نورون به فعالیت قبل از تزریق ثبت ادامه پیدا می‌کرد. مبنای برگشت فعالیت نورون به حالت وضعیت ساده -تونیک، عدم وجود اسپایک‌های



**تصویر ۳-** نمونه‌ای از تغییر فعالیت یک واحد نورونی دوپامینرژیک در ناحیه VTA ناشی از تزریق بیکوکولین (۱ میکروگرم) در بطن مغزی. الف) تصویر وضعیت ساده و تونیک نورون قبل از تزریق بیکوکولین ب) تصویر فعالیت وضعیت انفجاری همان نورون ۱۰ دقیقه پس از تزریق بیکوکولین در بطن مغزی. توجه داشته باشید که فرکانس شلیک نورون کمتر شده است ج) منحنی هیستوگرام زمانی نرخ شلیک نورون (PSTH) به صورت فرکانس شلیک قبل (۵/۲۱ ± ۰/۰۳۴ شلیک در ثانیه) و بعد از (۳/۴۵ ± ۰/۰۱۸ شلیک در ثانیه) تزریق بیکوکولین در بطن مغز د) منحنی هیستوگرام فواصل زمانی بین اسپایک‌ها در قبل (۱۹۸/۷۸ ± ۱۰/۶۷ هزارم ثانیه) و بعد از تزریق بیکوکولین (۳۸/۶۷ ± ۵/۵۶ هزارم ثانیه) در بطن مغز.



**نمودار ۱-** تغییرات الگوی فعالیت وضعیت انفجاری در نورون‌های ثبت شده در غلظت‌های مختلف بیکوکولین (الف) تعداد نورون‌های دوپامینرژیک ثبت شده در غلظت‌های مختلف ب) تعداد نورون‌های ثبت شده با فعالیت انفجاری در غلظت‌های مختلف ج) درصد نورون‌هایی که از کل نورون‌ها فعالیت انفجاری را نشان دادند د) زمان حضور فعالیت انفجاری در نورون‌های ثبت شده به دقیقه در نورون‌های ثبت شده با فعالیت انفجاری.

## بحث و نتیجه گیری

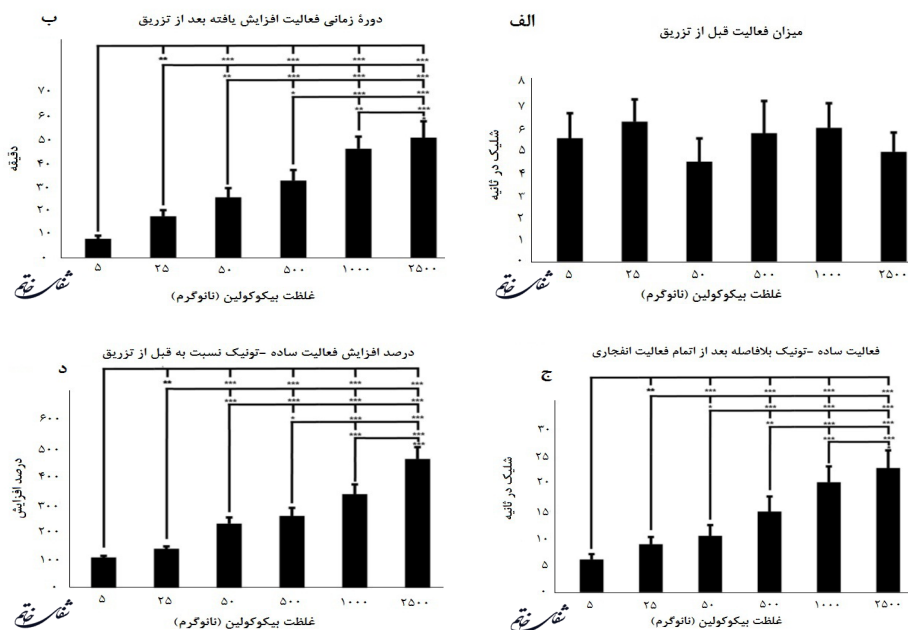
همچنان که در نتایج مشخص شده است بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست گیرنده های آلفای گابا با مهار کردن این گیرنده ها در روی نورون های دوپامینرژیک VTA توانست فعالیت ساده و منظم آن ها را به هم زده و در درصد مناسبی از آن ها با غلظت های زیاد، موجب تبدیل فعالیت مداوم و ساده -تونیک به فعالیت انفجاری گردد. با توجه به نتایج حاصل نشان داده شده است که میزان اسپایک دهی انفجاری با غلظت بیکوکولین افزایش یافته و در غلظت های کم تولید آن کاهش معنی داری دارد. به این ترتیب مهار گیرنده های GABA-A که روی نورون های دوپامینرژیک مستقر هستند موجب بروز تغییرات شدیدی در خصلت الکتروفیزیولوژیک نورون های ناحیه تگمنتوم شکمی شده و در ایجاد الگوی عملکردی نورون های آن مؤثر باشد.

نورون های دوپامینرژیک VTA دارای شلیک نورونی تونیک و یا گاهی به صورت نامنظم با فرکانس کم و در حدود ۳ الی ۸ شلیک در ثانیه می باشند. مطالعات اولیه بیانگر وجود گروه هایی از نورون ها با فعالیت های مختلف در VTA بوده است. چهار گروه نورونی شامل نورون های هیپرلاریزه بدون شلیک<sup>۴۷</sup>، نورون های با شلیک واحد<sup>۴۸</sup>، نورون های با شلیک انفجاری و نورون های دپلاریزه غیرفعال<sup>۴۹</sup>، از تقسیم بندی های مهم این نورون ها

طی شده حدود  $0.5 \pm 0.2$  دقیقه بوده است. این ارقام به ترتیب برای غلظت ۲۵ نانوگرم ۳۱ نورون از ۲۹۸ نورون ( $10.4\%$  درصد) با زمان  $1.4 \pm 0.8$  دقیقه، برای غلظت ۵۰ نانوگرم، ۸۶ نورون از ۳۶۷ نورون ( $23.4\%$  درصد) با زمان  $2.04 \pm 0.23$  دقیقه، برای غلظت ۵۰۰ نانوگرم ۹۲ نورون از ۳۲۱ نورون ( $28.67\%$  درصد) با زمان  $4.67 \pm 0.29$  دقیقه، برای غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم، ۱۲۸ نورون از ۳۵۶ نورون ( $35.96\%$  درصد) با زمان  $5.34 \pm 0.56$  دقیقه و برای غلظت ۲۵۰۰ نانوگرم ۱۴۰ نورون از ۳۸۷ نورون ( $36.17\%$  درصد) با زمان  $6.3 \pm 0.34$  دقیقه بوده است.

## د) افزایش فعالیت ساده -تونیک نورون های دوپامینرژیک پس از قطع تولید شلیک انفجاری

پس از اتمام تولید فعالیت های انفجاری در نورون های دوپامینرژیک، ثبت های ساده -تونیک تا زمان برگشت فعالیت نورون به قبل از تزریق ادامه پیدا می کرد. نکته بسیار جالب، افزایش فعالیت ساده -تونیک به صورت وابسته به مقدار در گروه های دریافت کننده بیکوکولین بوده است. از جنبه درصد افزایش فعالیت نسبت به قبل از تزریق بیکوکولین بر حسب مقادیر ۵، ۲۵، ۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ نانوگرم به ترتیب ۸، ۳۸، ۱۲۸، ۱۵۵، ۲۳۳ و ۳۵۸ درصد با دوره های زمانی به ترتیب ۸، ۱۷، ۲۵، ۳۲، ۴۶ و ۵۰ دقیقه بوده است. در نمودار ۲ تغییرات و نیز تفاوت های آماری بین مقادیر اخذ شده آورده شده است.



**نمودار ۲- تغییرات مقادیر فعالیت ساده -تونیک بعد از اتمام فعالیت انفجاری نسبت به غلظت های مختلف بیکوکولین (الف) مقادیر فعالیت نورون های دوپامینرژیک در ثبت های اخذ شده (اسپایک در ثانیه) (ب) مقادیر دوره زمانی فعالیت ساده -تونیک افزایش یافته (ج) میزان فعالیت افزایش یافته به صورت شلیک در هر ثانیه بعد از اتمام فعالیت انفجاری (د) درصد تغییرات فعالیت ساده -تونیک در هر غلظت نسبت به دوره قبل از تزریق. مقادیر تفاوت با سطوح معنی داری آماری برای  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نشان داده شده است. برای ارزیابی تفاوت های قبل و بعد از تزریق از آزمون Friedman استفاده شده است.**

<sup>47</sup> Hyperpolarized, non-firing

<sup>48</sup> Single spike firing

<sup>49</sup> Depolarization inactivation

ترکیبات دیگر همانند کلوزاپین<sup>۵۲</sup> به عنوان یک داروی ضد روانپریشی اثرات خود را از طریق گیرنده‌های گلوتامات انجام می‌دهد.

در کارهای کلینیکی نشان داده شده است که کاپنورنیک اسید به عنوان آنتاگونیست گیرنده گلوتامات در ناحیه گلیسین گیرنده NMDA و همچنین آنتاگونیست گیرنده نیکوتینی<sup>۵۳</sup> alpha7 اثرات تحریکی کلوزاپین را معکوس کرده و به یک اثر مهاري تبدیل می‌کند. مطالعه Schwiler و همکاران روی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA با استفاده از ثبت فعالیت‌های نورون‌های مذکور نشان دادند که تزریق داخل وریدی کلوزاپین به صورت داخل وریدی (۱/۲۵ تا ۱۰ میلی گرم به ازاء هر کیلو وزن) افزایش معنی داری در فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک ایجاد کرده و نیز موجب فعالیت انفجاری در این نورون‌ها می‌شود.

اثرات تحریکی مذکور با تجویز آنتاگونیست گیرنده NMDA گلوتامات، MK 801 متوقف می‌شود. این در حالی است که تجویز پیش تیماری آنتاگونیست مکان گلیسینی گیرنده NMDA گلوتامات یعنی L-701,324 موجب می‌شود اثرات کلوزاپین روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA به میزان ضعیفی به اثرات مهاري تبدیل شده و کاهش در شلیک نورون‌ها و نیز کاهش تولید فعالیت انفجاری صورت گیرد. پیش تیمار با آنتاگونیست گیرنده<sup>۵۴</sup> alpha7 با MLA موجب تغییر فعالیت تحریکی نورون‌های دوپامینرژیک VTA نگردید. به نظر می‌رسد کلوزاپین اثرات تحریکی خود روی نورون‌های دوپامینرژیک را از طریق ناحیه گلیسین گیرنده‌های گلوتامات انجام داده و احتمالاً اثرات گلیسین را مهار می‌کند (۵۳). البته سیستم گلوتاماتی به عنوان سیستم تعدیل کننده فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA تحت تأثیر سایر مسیرهای پیام‌رسانی<sup>۵۵</sup> داخل نورون‌ها نیز قرار می‌گیرد. مهار فعالیت مسیر آزنیمی سیکلوآکسیژناز که موجب افزایش معنی‌دار کاپنوریک اسید نورون‌های مذکور شده و اثرات این مسیر نیز از طریق سیستم گلوتاماتی تعدیل می‌شود (۵۴).

پاسخ نورون‌های دوپامینرژیک VTA به برخی از داروها و ترکیبات غیردوپامینی نیز از طریق نه تنها تغییر تعداد فعالیت نورونی بلکه از طریق تغییر الگوی فعالیت صورت می‌گیرد. مطالعه Lejeune و همکاران نشان داده است که نورون‌های دوپامینرژیک VTA دارای پاسخ انفجاری به لیگاند گیرنده‌های سروتونینی از نوع 5-HT1A یعنی فلزینوکسان<sup>۵۶</sup> و S-15535 و WAY 100,635 می‌باشند. فلزینوکسان که آگونیستی با تمایل بالای گیرنده‌های 5-HT1A پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی می‌باشد قادر است شلیک نورون‌های سروتونرژیک هسته رافه<sup>۵۷</sup> پستی

می‌باشد (۴۵). تغییر وضعیت نورونی در موش‌های آزمایشگاهی بزرگ، اولین بار نسبت به ورود محرک حسی و یا رخداد حرکت در حیوان در جهت رسیدن به هدف خاص مشخص شده است (۴۶). الگوی شلیک انفجاری نورون‌های دوپامینرژیک در موش‌های آزمایشگاهی به هنگام حرکات کوچک سبیل‌های آن‌ها و نیز بوکشیدن در محیط‌های جدید نیز رخ داده و نیز به هنگام جابجایی عمده سبیل‌های حیوان نیز رخ می‌دهد و این نوع الگوی شلیک نورونی در هنگام توجه و چرخش سر حیوان به محرک‌های شنوایی به طور گذرا رخ می‌دهد (۴۷).

شواهد الکتروفیزیولوژیک در ثبت‌های نورون‌های VTA در حیوانات بیهوش شده با کلرال هیدرات<sup>۵۸</sup> بیانگر وجود احتمال شلیک انفجاری بیشتر در نورون‌های دوپامینرژیک آن نسبت به سایر نواحی مغزی حاوی این دسته از نورون‌ها همانند جسم سیاه می‌باشد (۴۸). تغییر الگوی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA می‌تواند تحت تأثیر ماده بیهوش کننده نیز قرار گیرند. تجویز کلرال هیدرات به صورت پیش درمان و پس درمان در گرهبه‌هایی با حرکت آزاد نشان داده است که در این حیوانات فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA افزایش پیدا می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که در نورون‌های دوپامینرژیک VTA نه تنها در هنگام ورود تحریکات حسی بلکه در جوار برخی ترکیبات نیز فعالیت انفجاری در آن‌ها القاء می‌گردد (۴۹).

تغییر وضعیت نورونی در نورون‌های VTA در جوار برخی ترکیبات و داروها در برخی مطالعات دیگر نیز مشخص شده است. به کارگیری موضعی کاپنورنات<sup>۵۹</sup> به صورت تزریق تحت فشار یا ایونتوفورتیک به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های گلوتامات موجب مهار شلیک انفجاری نورون‌های VTA و تبدیل آن به وضعیت ساده می‌گردد. به نظر می‌رسد بستن کانال‌های وابسته به گلوتامات موجب بروز حذف شلیک انفجاری می‌گردد. احتمالاً نورون‌های آوران تحریکی و یا اینترنورون‌های تحریکی موضعی با ترشح گلوتامات موجب برقراری جریان کلسیمی به درون سلول شده و در مرحله‌ای از فعالیت نورون‌های VTA با تغییر فاز عملکردی موجب تغییر فرایندهای تحت کنترل آن خواهند شد. شاید تغییر فاز الکتروفیزیولوژیک نورون‌های VTA عامل مهمی برای توصیف برخی یافته‌های متفاوت و یا متناقض در توصیف کنترل‌های نورون‌های این هسته باشند (۵۰). این نوع تغییر فعالیت در هنگام مهار هیدروکسیلاز کاپنورنات در حیوانات آزمایشگاه نیز مشاهده می‌گردد (۵۱، ۵۲). تغییر فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک به حضور داروها و ترکیبات اتصال شونده روی گیرنده‌های گلوتامات نه تنها موجب تعدیل پاسخ این نورون به ترکیبات مؤثر روی گیرنده‌های گلوتامات است، بلکه برخی داروها و

<sup>۵۰</sup> Chloral hydrate

<sup>۵۱</sup> Kynurenic

<sup>۵۲</sup> Clozapine

<sup>۵۳</sup> Signaling

<sup>۵۴</sup> Flesinoxan

<sup>۵۵</sup> Dorsal raphe nucleus

داده و الگوی فعالیت را کمتر منظم می‌کرد. احتمالاً اثر ایدازوکسان از طریق مهار گیرنده‌های پیش‌سیناپسی آلفا-۲ ایجاد شده و با به کار بردن پرازوسین از بین می‌رفت. به نظر می‌رسد آوران‌های آدرنژیک از طریق گیرنده‌های نورآدرنژیک مستقر در نورون‌های دوپامینرژیک موجب تعدیل فعالیت این نورون‌ها می‌گردد. گیرنده‌های آلفا-۱ روی این نورون‌ها به صورت تحریکی موجب تنظیم الگوی فعالیت نورون‌ها شده و گیرنده‌های پیش‌سیناپسی آدرنژیک نیز از طریق مهار ره‌ایش ناقلین عصبی موجب کاهش فعالیت این نورون‌ها می‌گردد (۵۶).

در خصوص تأثیر سیستم گاباژیک در تعدیل و یا تنظیم فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک به‌ویژه نورون‌های دوپامینرژیک VTA به صورت ثبت خارج سلولی مطالعه کمتری صورت گرفته است. مطالعه Erhardt و همکاران روی فعالیت انفجاری نورون‌های VTA نشان داده است که نه تنها گیرنده‌های ناقلین عصبی تحریکی بلکه گیرنده‌های گابا نیز در کنترل فعالیت این دسته از نورون‌ها مشارکت می‌کنند. مطالعه آن‌ها نشان داده است که تجویز سیستمیک آگونیست گیرنده بتای گابا موجب تعدیل فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA شده است. تجویز باکلوفن<sup>۶۰</sup> به‌عنوان آگونیست گیرنده GABA-B به صورت وابسته به دوز فعالیت ساده -تونیک نورون‌های دوپامینرژیک و نیز فعالیت انفجاری این نورون‌ها را کاهش داد. افزایش در منظم شدن فعالیت‌های نورون‌ها مشاهده شد. اثرات باکلوفن توسط آنتاگونیست گیرنده GABA-B با نام CGP 35348 کاملاً متوقف شد. تجویز به تنهایی CGP 35348 به صورت داخل وریدی همانند اثر موضعی، توانست موجب ایجاد فعالیت انفجاری در نورون‌های دوپامینرژیک شود (۵۷).

نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه ماده سیاه تحت تأثیر تجویز داخل وریدی آگونیست گیرنده GABA-B یا باکلوفن در دوز کمتر (۱ تا ۱۶ میلی گرم به ازاء هر کیلو وزن بدن) فعالیت نورون‌ها را تنظیم کرده و فعالیت انفجاری را کاهش داده ولی در دوزهای بیشتر (۱۶ تا ۳۲ میلی گرم به ازاء هر کیلو وزن بدن) فعالیت عادی نورون نیز کاهش یافت. به کارگیری میکروایونتوفورتیک باکلوفن موجب تنظیم فعالیت نورون و کاهش فعالیت انفجاری می‌گردد. ترکیب CGP 35348 (۲۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن، وریدی) به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده GABA-B موجب توقف عملکرد تنظیمی و یا مهار فعالیت انفجاری باکلوفن گردید. ترکیب موزیمول به‌عنوان آگونیست گیرنده GABA-A اثرات متفاوتی روی فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک گذاشته و موجب افزایش میزان فعالیت نورون به همراه نامنظم شدن آن گردید (۵۸).

یا DRN را مهار کند. عملکرد مهاری فلزینوکسان توسط ترکیب WAY 100,635 (آنتاگونیست گیرنده‌های پیش و پس‌سیناپسی 5-HT<sub>1A</sub>) متوقف می‌شود. البته ترکیب S-15535 که به صورت یک آگونیست و آگونیست نسبی روی گیرنده‌ها به ترتیب پیش و پس‌سیناپسی اثر می‌کند، همانند فلزینوکسان موجب مهار شلیک نورون‌های هسته رافه پشتی متوقف شونده توسط ترکیب WAY 100,635 می‌شود.

برخلاف اثرات مذکور ترکیبات فوق روی نورون‌های هسته رافه پشتی، ترکیبات فلزینوکسان و S-15535 به صورت وابسته به مقدار و به حالت مونوفازیک<sup>۵۶</sup> فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA را افزایش می‌دهند. البته در این تحریک نورون‌های مذکور حالت شلیک ساده خود را به شلیک انفجاری تبدیل می‌کنند. اثرات فلزینوکسان و ترکیب S-15535 روی شلیک نورون‌های دوپامینرژیک VTA توسط ترکیب WAY 100,635 متوقف می‌گردد. به نظر می‌رسد نورون‌های دوپامینرژیک VTA در بروز اثرات ضد افسردگی داروهای سرتونرژیک با افزایش فعالیت و یا تغییر فعالیت از حالت وضعیت ساده به اسپایکینگ وضعیت انفجاری مشارکت دارند (۵۵).

تزیق کاینورات به صورت موضعی در درون هسته VTA به صورت ایونتوفورتیک و یا تحت فشار موجب انسداد گیرنده‌های اسیدآمینۀ تحریکی گلوامات شده و از این طریق توانست موجب توقف فعالیت انفجاری در نورون‌های دوپامینرژیک VTA شده درحالی که فرکانس فعالیت‌های تونیک -ساده را کمی افزایش داد. به نظر می‌رسد آوران‌های حاوی ناقلین عصبی تحریکی به طور مستقیم موجب تنظیم فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA گشته و به طور دینامیک، ورودی‌های تحریکی موجب تنظیم فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA نسبت به بسیاری از شرایط حاکم بر این هسته می‌گردند (۵۰).

مطالعه Grenhoff و Svensson نیز نشان داده است که نه تنها گیرنده‌های اسیدهای آمینۀ تحریکی بلکه گیرنده‌های دیگر یا آوران‌های دیگر نیز قادر به تنظیم فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشند. در تحقیق مذکور فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA به صورت ثبت خارج سلولی مورد بررسی قرار گرفته است؛ درحالی که تزیق سیستمیک آنتاگونیست‌های آدرنژیک شامل پرازوسین<sup>۵۷</sup> به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا-۱ و ایدازوکسان<sup>۵۸</sup> به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا-۲ صورت می‌گرفت. پرازوسین به صورت وابسته به دوز موجب کاهش فعالیت انفجاری نورون‌های دوپامینرژیک شده و موجب منظم شدن شلیک‌های نورونی می‌شد که با پیش تیمار با رزپین<sup>۵۹</sup> از بین می‌رفتند. ایدازوکسان تعداد شلیک‌ها و نیز رخداد فعالیت انفجاری را افزایش

<sup>56</sup> Monophasically

<sup>57</sup> Prazosin

<sup>58</sup> Idazoxan

<sup>59</sup> Reserpine

<sup>60</sup> Baclofen

آوران‌های گاباژیک می‌توانند برای مدت مدیدی تولید اسپایک‌های انفجاری را از دست داده و شاید گیرنده‌های گابا بتوانند یک مسیر تنظیمی تعدیلی مناسبی برای این نورون‌ها باشند.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از داده‌های استخراجی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم فرشته طالع می‌باشد. پایان‌نامه مذکور با حمایت کامل مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی استان آذربایجان غربی (ارومیه) تحت قرارداد شماره ۱۶۴۷ انجام شده است. نویسندگان مقاله از کلیه حمایت‌های مالی مذکور تشکر و قدردانی می‌نمایند. کلیه فرایندهای تحقیق در محل شرکت دانش پی هادی به‌عنوان شرکت دانش‌بنیان دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام شده است. نویسندگان مقاله را مطالعه کرده و عدم وجود تعارض منافع خود را اعلام می‌نمایند. حق انتشار به صورت آزاد برای مجله انتشار دهنده محفوظ می‌باشد.

به نظر می‌رسد اثر فعال یا غیرفعال شدن گیرنده‌های گابا روی نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه VTA می‌تواند قدری متفاوت باشد. با توجه به اینکه اثر گیرنده‌های GABA-A در روی نورون‌های دوپامینرژیک یک حالت تنظیمی و تعدیلی می‌تواند داشته باشد به نظر می‌رسد یافته‌های این پژوهش تا حدودی به نقش تنظیمی گیرنده‌های GABA-A اشاره داشته است. همچنان‌که در این پژوهش مشخص گردید، مهار گیرنده‌های GABA-A به وسیله بیکوکولین به طور معنی‌داری توانسته است موجب بروز اسپایک‌های انفجاری در نورون‌های تحت مطالعه گردد. در واقع نورون‌های ثبت شده دارای فعالیت انفجاری نبوده و در حالت شلیک منظم ساده -تونیک قرار داشتند. این نورون‌ها تحت تأثیر مستقیم بیکوکولین تحریک شده و قادر شدند پاسخ‌های انفجاری از خود نشان دهند. رفتارهای تغییریافته نورونی و افزایش فعالیت نورون‌ها پس از برطرف شدن اثرات بیکوکولین نیز مؤید این موضوع می‌باشد که این نورون‌های تحت تأثیر

### منابع

1. Anakwenze CP, Coronado-Interis E, Aung M, Jolly PE. A theory-based intervention to improve breast cancer awareness and screening in jamaica. *prevention science: the official journal of the society for prevention research*. 2015; 16(4): 578-85.
2. Luscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011; 69(4): 650-63.
3. Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry. Biol Psychiatry*. 2006; 59(12): 1151-9.
4. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews Neuroscience*. 2004; 5(6): 483-94.
5. Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol*. 2006; 577(Pt 3): 907-24.
6. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*. 2008; 152(4): 1024-31.
7. Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*. 1982; 9(1-6): 321-53.
8. Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TH, Morales M. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci*. 2011; 31(23): 8476-90.
9. Albanese A, Minciacchi D. Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol*. 1983; 216(4): 406-20.
10. Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW. Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience*. 2010; 168(2): 463-76.
11. Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol*. 2009; 513(6): 566-96.
12. Tan KR, Yvon C, Turiault M, Mirzabekov JJ, Doehner J, Labouèbe G, et al. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*. 2012; 73(6): 1173-83.
13. van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, Stuber GD. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron*. 2012; 73(6): 1184-94.
14. Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, et al. Circuit architecture of

VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *Cell*. 2015; 162(3): 622-34.

15. Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, et al. Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci*. 2012; 32(50): 18035-46.

16. Zahm DS, Cheng AY, Lee TJ, Ghobadi CW, Schwartz ZM, Geisler S, et al. Inputs to the midbrain dopaminergic complex in the rat, with emphasis on extended amygdala-recipient sectors. *J Comp Neurol*. 2011; 519(16): 3159-88.

17. Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, et al. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(8): 1677-91.

18. Schultz W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 1997; 7(2): 191-7.

19. Schultz W, Dayan P, Montague PR. A neural substrate of prediction and reward. *Science*. 1997; 275(5306): 1593-9.

20. Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 1998; 80(1): 1-27.

21. Cooper DC. The significance of action potential bursting in the brain reward circuit. *Neurochem Int*. 2002; 41(5): 333-40.

22. Komendantov AO, Komendantova OG, Johnson SW, Canavier CC. A modeling study suggests complementary roles for GABAA and NMDA receptors and the SK channel in regulating the firing pattern in midbrain dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 2004; 91(1): 346-57.

23. Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*. 2000; 95(2): 119-28.

24. Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*. 2002; 36(2): 241-63.

25. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci*. 2007; 30(5): 220-7.

26. Melis M, Pillolla G, Perra S, Colombo G, Muntoni AL, Pistis M. Electrophysiological properties of dopamine neurons in the ventral tegmental area of

Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 201(4): 471-81.

27. Heikkinen AE, Moykkynen TP, Korpi ER. Long-lasting modulation of glutamatergic transmission in VTA dopamine neurons after a single dose of benzodiazepine agonists. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34(2): 290-8.

28. Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*. 2003; 37(4): 577-82.

29. Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ. Self-infusion of GABA(A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. *Behav Neurosci*. 1997; 111(2): 369-80.

30. Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ. Regional differences within the rat ventral tegmental area for muscimol self-infusions. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 61(1): 87-92.

31. Laviolette SR, van der Kooy D. GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *Eur J Neurosci*. 2001; 13(5): 1009-15.

32. Kodangattil JN, Dacher M, Authement ME, Nugent FS. Spike timing-dependent plasticity at GABAergic synapses in the ventral tegmental area. *J Physiol*. 2013; 591(19): 4699-710.

33. Schweimer JV, Coullon GS, Betts JF, Burnet PW, Engle SJ, Brandon NJ, et al. Increased burst-firing of ventral tegmental area dopaminergic neurons in D-amino acid oxidase knockout mice in vivo. *Eur J Neurosci*. 2014; 40(7): 2999-3009.

34. Li W, Doyon WM, Dani JA. Quantitative unit classification of ventral tegmental area neurons in vivo. *J Neurophysiol*. 2012; 107(10): 2808-20.

35. Wang SS, Wei CL, Liu ZQ, Ren W. The influence of L-glutamate and carbachol on burst firing of dopaminergic neurons in ventral tegmental area. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*. 2011; 63(1): 25-30.

36. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems Part 1: General considerations. *Experientia*. 1986; 42(2): 109-14.

37. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press. 2007.

38. Pinault D. The Juxtacellular Recording-Labeling Technique. *Neuromethods*. 2010; 54: 41-75.
39. White FJ, Wang RY. Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor subsensitivity following chronic D-amphetamine treatment. *Brain Res*. 1984; 309(2): 283-92.
40. Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*. 2002; 33(6): 905-19.
41. Marinelli M, Cooper DC, Baker LK, White FJ. Impulse activity of midbrain dopamine neurons modulates drug-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003; 168(1-2): 84-98.
42. Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP. Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science*. 2004; 303(5666): 2040-2.
43. Hyland BI, Reynolds JNJ, Hay J, Perk CG, Miller R. Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience*. 2002; 114(2): 475-92.
44. Shi WX. Slow oscillatory firing: a major firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurophysiol*. 2005; 94(5): 3516-22.
45. Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*. 1984; 4(11): 2866-76.
46. Miller JD, Sanghera MK, German DC. Mesencephalic dopaminergic unit activity in the behaviorally conditioned rat. *Life Sci*. 1981; 29(12): 1255-63.
47. Freeman AS, Bunney BS. Activity of A9 and A10 dopaminergic neurons in unrestrained rats: further characterization and effects of apomorphine and cholecystokinin. *Brain Res*. 1987; 405(1): 46-55.
48. Grenhoff J, Ugedo L, Svensson TH. Firing patterns of midbrain dopamine neurons: differences between A9 and A10 cells. *Acta Physiol Scand*. 1988; 134(1): 127-32.
49. Steinfels GF, Heym J, Jacobs BL. Single unit activity of dopaminergic neurons in freely moving rats. *Life Sci*. 1981; 29(14): 1435-42.
50. Charlety PJ, Grenhoff J, Chergui K, De la Chapelle B, Buda M, Svensson TH, et al. Burst firing of mesencephalic dopamine neurons is inhibited by somatodendritic application of kynurenate. *Acta Physiol Scand*. 1991; 142(1): 105-12.
51. Erhardt S, Engberg G. Increased phasic activity of dopaminergic neurones in the rat ventral tegmental area following pharmacologically elevated levels of endogenous kynurenic acid. *Acta Physiol Scand*. 2002; 175(1): 45-53.
52. Linderholm KR, Alm MT, Larsson MK, Olsson SK, Gojny M, Hajos M, et al. Inhibition of kynurenine aminotransferase II reduces activity of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology*. 2016; 102: 42-7.
53. Schwieler L, Engberg G, Erhardt S. Clozapine modulates midbrain dopamine neuron firing via interaction with the NMDA receptor complex. *Synapse*. 2004; 52(2): 114-22.
54. Schwieler L, Linderholm KR, Nilsson-Todd LK, Erhardt S, Engberg G. Clozapine interacts with the glycine site of the NMDA receptor: electrophysiological studies of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. *Life Sci*. 2008; 83(5-6): 170-5.
55. Lejeune F, Millan MJ. Induction of burst firing in ventral tegmental area dopaminergic neurons by activation of serotonin (5-HT)1A receptors: WAY 100,635-reversible actions of the highly selective ligands, flesinoxan and S 15535. *Synapse*. 1998; 30(2): 172-80.
56. Grenhoff J, Svensson TH. Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol*. 1993; 233(1): 79-84.
57. Erhardt S, Mathe JM, Chergui K, Engberg G, Svensson TH. GABA(B) receptor-mediated modulation of the firing pattern of ventral tegmental area dopamine neurons in vivo. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2002; 365(3): 173-80.
58. Engberg G, Kling-Petersen T, Nissbrandt H. GABAB-receptor activation alters the firing pattern of dopamine neurons in the rat substantia nigra. *Synapse*. 1993; 15(3): 229-38.