

The effect of 5-HT₃ receptor agonist of the ventral hippocampus on amnesia induced by ethanol in mice

Asadi Motlagh M¹, Pakpour B^{1*}, Navaian M²

1- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2018/02/10 | Accepted: 2018/07/4

Abstract:

Background: The aim of this study was to investigate the effect of 5-HT₃ receptor agonist in the CA1 hippocampus area on demolition of ethanol-induced memory.

Materials and Methods: This study was conducted on 96 NMRI mice. Ethanol was injected intraperitoneally, while 5-HT₃ receptor agonist (MCHL) was injected intra-CA1. To assess the memory, a single-trial step-down passive avoidance apparatus was used.

Results: Results showed that pre-training injection of ethanol (1mg/kg), and MCHL (0.5 ng/mouse) decreased a passive avoidance memory in the adult mice. Also, a non-effective dose of MCHL (0.005 ng/mouse) with a non-effective dose of ethanol (0.01mg/kg) induced amnesia. Also, the results showed that injection of different doses of MCHL (0.5, 0.05, and 0.005 ng/mouse) combined with an effective dose of ethanol (1mg/kg) could retrieve damaged memory by ethanol.

Conclusion: Findings of this study showed that the CA1 region of the hippocampus has an important role in amnesia induced by serotonin and serotonin CA1 5-HT₃ receptor agonists have interaction with ethanol.

Keywords: 5-HT₃, Ethanol, Passive avoidance memory, Hippocampus, Mice

* Corresponding Author.

Email: b_pakpour@yahoo.com

Tel: 0098 912 375 5440

Fax: 0098 218 860 0184

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2018; Vol. 22, No 3, Pages 239-247

Please cite this article as: Asadi Motlagh M, Pakpour B, Navaian M. The effect of 5-HT₃ receptor agonist of the ventral hippocampus on amnesia induced by ethanol in mice. *Feyz* 2018; 22(3): 239-47.

اثر آگونیست گیرنده 5-HT₃ هیپوکامپ جانبی بر فراموشی ناشی از اتانول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی

معصومه اسدی مطلق^۱، بهاره پاکپور^{۲*}، مجید نوائیان^۳

خلاصه:

سابقه وهدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر آگونیست گیرنده 5-HT₃ در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر تخریب حافظه القا شده به وسیله اتانول است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۹۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استفاده گردید. اتانول به روش درون‌صفافی و آگونیست گیرنده 5-HT₃ (MCHL) در ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق شد. برای بررسی حافظه اجتنابی مهاری از دستگاه Step-Down یک‌طرفه استفاده شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان دادند که تزریق پیش از آموزش اتانول (۱ mg/kg) و MCHL (۰/۵ ng/mouse) باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. همچنین، تزریق دوز غیر موثر MCHL (۰/۰۰۵ ng/mouse) همراه با دوز غیر موثر اتانول (۰/۰۱ mg/kg) منجر به تخریب حافظه می‌شود. به علاوه، مشاهده شد که تزریق دوزهای مختلف MCHL (۰/۰۰۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵ ng/mouse) همراه با دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) منجر به بازگشت حافظه تخریب شده توسط اتانول می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه قویا نشان می‌دهد که ناحیه CA1 هیپوکامپ نقش مهمی در فراموشی ناشی از سروتونین داشته و آگونیست گیرنده‌های 5-HT₃ سروتونینی این ناحیه با اتانول تداخل عمل دارند.

واژگان کلیدی: 5-HT₃، اتانول، حافظه اجتنابی مهاری، هیپوکامپ، موش‌های کوچک آزمایشگاهی

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۷، صفحات ۲۴۷-۲۳۹

مقدمه

مطالعات نشان می‌دهد که اتانول بخش زیادی از اثر مخرب خود بر حافظه را از طریق اثر روی هیپوکامپ پستی اعمال می‌نماید؛ این اثر به قدری زیاد می‌باشد که حتی مصرف کوتاه مدت اتانول باعث تغییر نوروفیزیولوژیکی هیپوکامپ می‌شود. شواهد موجود نشان می‌دهند که اتانول اثرات خود روی سیستم عصبی را با تاثیر مستقیم یا غیرمستقیمی که روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف به ویژه استیل کولین، دوپامین، گابا، گلوتامات و نورو-ترانسمیترهای آمینواسیدی می‌گذارد، اعمال می‌نماید [۳]. با وجود تاثیرگذاری اتانول روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف، به نظر می‌رسد که تاثیر اتانول بر سیستم کولینرژیک، به ویژه در ناحیه هیپوکامپ، در میانجی‌گری اثرات مخرب اتانول روی حافظه نقش کلیدی‌تری دارد [۵]. شواهد موجود نشان می‌دهد که اتانول می‌تواند رهایش استیل کولین را در هیپوکامپ و قشر مخ کاهش دهد [۶]. با توجه به اینکه داروهایی که سیستم کولینرژیک را در مغز تقویت می‌نمایند، باعث تسهیل حافظه شده و بالعکس موادی که سیستم کولینرژیک را تضعیف می‌نمایند، نظیر آنتاگونیست‌های گیرنده‌های کولینرژیک یا مواد کاهنده رهایش استیل کولین، باعث تخریب حافظه می‌گردند، می‌توان انتظار داشت بخش اعظمی از اثرات مخرب اتانول بر حافظه با کاهش رهایش اتانول به ویژه در نواحی کلیدی موثر بر تثبیت حافظه نظیر هیپوکامپ بروز نماید. یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترها در سیستم عصبی مرکزی

حافظه و یادگیری ارتباط تنگاتنگی باهم دارند. یادگیری را تغییرات سازشی در رفتار می‌دانند که در اثر کسب دانش از محیط اطراف به دست می‌آید و حافظه را توانایی ذخیره و جمع-آوری اطلاعات تعریف می‌کنند [۱]. ورودی‌های حسی و ارتباطی از قشر مخ به هیپوکامپ و پاراهیپوکامپ سیستم لیمبیک در زمینه حافظه و یادگیری اهمیت زیادی دارند [۳، ۲]. شواهد زیادی در مورد برهم‌کنش اتانول و گیرنده‌های سروتونرژیک در سطح سلولی و مولکولی وجود دارد، ولی علی‌رغم وجود این شواهد برهم‌کنش اتانول و گیرنده‌های سروتونرژیک در زمینه رفتاری چندان مورد توجه و بررسی قرار نگرفته است [۴].

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد یادگار امام خمینی (ره)، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر ری، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

دوره‌نویس: ۰۲۱۴۴۶۰۰۱۸۴

تلفن: ۰۹۱۲۳۷۵۵۴۴۰

پست الکترونیک: b_pakpour@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱

شده و در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای حیوانخانه ۲۲±۳ درجه سانتی‌گراد بود. به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد تا خود را با شرایط حیوانخانه وفق داده و در طول آن هفته هر روز حیوان‌ها Handling می‌شدند تا در موقع آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آنها وجود نداشته باشد. هر حیوان فقط یکبار استفاده می‌شد و حیوانات در گروه‌های ۸ تایی قرار داده شدند. تمام آزمایش‌ها در زمان معینی از روز (ساعت ۸-۱۴) انجام می‌گرفت.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهارتی (غیرفعال):

جعبه چوبی به ابعاد ۴۰×۳۰×۳۰ cm می‌باشد که در کف آن ۲۹ میله فولادی به قطر ۰/۳ سانتی‌متر و به فاصله ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار دارند. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد ۴×۴×۴ cm در قسمت میانی کف دستگاه (روی میله‌های فلزی) قرار می‌گیرد. این میله‌ها به دستگاه تحریک کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق آن‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام شد.

داروها:

هر دو داروی MCHL (Tocris, UK)، آگونست گیرنده 5-HT₃ و اتانول (داروپخش، ایران) بلافاصله قبل از انجام آزمایش‌ها در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد استریل حل می‌شدند.

جراحی و کانول گذاری در ناحیه هیپوکامپ پستی (CA1):

موش‌های کوچک آزمایشگاهی ابتدا توسط کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به علاوه زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (Woerden, The Netherlands) بیهوش شده و سپس در دستگاه استریوتاکس قرار داده شدند. دو کانول راهنما (اندازه ۲۲ گیج) یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۱۳) قرار داده شد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ جانبی AP=-۲، V=-۱/۵ و ML=±۱/۶ بود. بعد از قرار دادن کانول راهنما در مختصات مورد نظر، با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون‌مغزی دارو داخل کانول‌ها، به حیوان ۵-۷ روز استراحت داده می‌شد تا استرس و تخریب بافتی احتمالی که توسط جراحی صورت گرفته است، از بین برود و حیوان به حالت عادی خود برگردد [۲۸].

سروتونین (5-hydroxy tryptamine; 5-HT) است که از تریتوفان مشتق شده و در دستگاه گوارش، پلاکت‌ها و در سیستم اعصاب مرکزی یافت می‌شود [۶]. این میانجی به هورمون شادی نیز معروف است و بر حوصله [۷] و خلق‌وخو، رفتارهای جنسی [۸]، اشتها، خواب [۹]، حافظه [۱۰، ۱۱]، احساس و اضطراب [۱۲]، دمای بدن [۱۳]، حرکت [۱۴، ۱۵]، انقباض عضلات، عملکرد سیستم‌های قلبی-عروقی و غدد درون‌ریز [۱۶] و جذب آب [۱۷] تاثیر دارد. تقریباً ۸۰ درصد سروتونین کل بدن انسان در سلول‌های انتروکرومافین روده وجود داشته [۱۸] و بقیه آن در نورون‌های سروتونرژیک CNS ساخته می‌شود [۱۸، ۴]. اجسام سلولی نورون‌های تولید کننده 5-HT به‌طور اساسی در هسته رافه قرار گرفته‌اند و آکسون آنها در بیشتر مناطق مختلف مغزی همانند هیپوکامپ، آمیگدال و هیپوتالاموس مشخص شده است [۱۸]. تمام خانواده‌های گیرنده‌های 5-HT بیان قابل توجهی در هیپوکامپ دارند [۱۸]. گیرنده‌های سروتونینی به ۷ خانواده 5-HT₁₋₇ طبقه‌بندی می‌شوند [۱۹، ۲۰]. در میان این گیرنده‌ها 5-HT₃ تنها گیرنده متصل به کانال یونی است که با فعالیت آن منجر به نفوذ کلسیم و سدیم می‌شود [۱۹، ۲۰]. 5-HT به‌عنوان یک عامل موثر از طریق مسیرهای کو-لینرژیک در انتقال اطلاعات نقش دارد [۲۱، ۲۲]. آگونست و آنتاگونست گیرنده 5-HT₃ موجب تخریب حافظه شده و از طرف دیگر بعضی تحقیقات تقویت حافظه را به‌وسیله آنتاگونست 5-HT₃ [۲۳] و بعضی دیگر بی‌تاثیر بودن آن را بر حافظه نشان داده‌اند [۲۴، ۲۵]. اثر سروتونین بر حافظه به‌خوبی مشخص نشده و از تحقیقات انجام شده در این زمینه نتایج متناقضی حاصل شده است [۲۶، ۲۷]. باتوجه به برهم‌کنش اتانول و گیرنده‌های سروتونرژیک در زمینه حافظه و یادگیری و در نظر گرفتن این موضوع که اتانول و سروتونین هر دو قادر به تخریب حافظه می‌باشند، در این مطالعه برای اولین بار تاثیر سروتونین روی حافظه تخریب شده توسط اتانول بررسی شده است. باتوجه به اینکه مطالعات انجام شده نشان داده است که اتانول به‌واسطه اثر بر سیستم‌های گابااژژیک، گلوتاماترژیک و کولینرژیک باعث اختلال در LTP و تخریب حافظه می‌گردد و سیستم سروتونینی نیز از طریق همین سیستم روی حافظه و یادگیری موثر است، شاید بتوان بین این دو سیستم رابطه رفتاری پیدا کرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن تقریبی ۲۲-۳۰ گرم) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل

آزمون‌های رفتاری:

روش یادگیری احترازی غیرفعال مدل Step-down روشی مورد قبول برای بررسی حافظه درازمدت در موش‌های کوچک آزمایشگاهی می‌باشد. در این روش، بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعدازظهر انجام می‌شود. روز اول روز آموزش دادن (Training Day) حیوان‌ها در دستگاه می‌باشد و در روز دوم یا روز آزمون (Testing Day)، میزان حافظه حیوان‌های آموزش دیده بررسی می‌شود.

مرحله آموزش:

در روز آموزش هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می‌گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می‌شود. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند، از مطالعه حذف می‌شود. بلافاصله پس از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای آن روی میله‌های فولادی، شوک الکتریکی به مدت ۱۵ ثانیه (۱ هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ میلی‌ولت مستقیم) به حیوان داده می‌شود. لازم به ذکر است که در یادگیری اجتنابی مهارت مدل Step-down حیوان در روز آموزش فقط یک‌بار در داخل دستگاه یادگیری اجتنابی قرار گرفته و فقط یک مرحله آموزش را دریافت می‌کرد.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه:

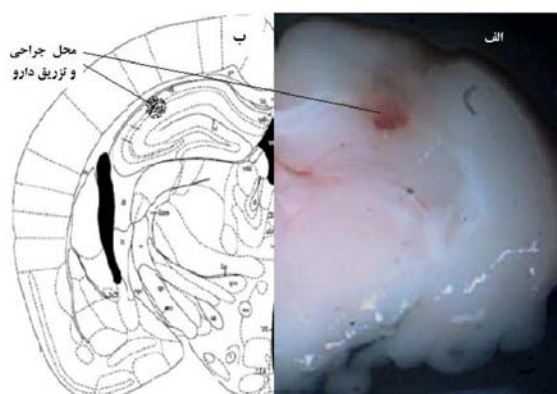
جلسه آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش با روندی مشابه آموزش انجام می‌شود؛ با این تفاوت که حیوان مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی‌کند. مدت زمان توقف موش روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه‌گیری می‌شود. حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان Cut-off) برابر ۳۰۰ ثانیه می‌باشد که به عنوان حافظه کامل در نظر گرفته می‌شود [۲۹].

تزریق درون‌مغزی دارو:

برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن اندازه ۲۷ دندان‌پزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به infant cat down tube (شماره ۴) و سرنگ همیلتون ۱ میکرولیتری متصل بود، در داخل کانل راهنما قرار داده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت تزریق ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد. در حین تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت شناسی:

پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱ درصد داخل هر کانول تزریق شد. سپس، مغز از درون جمجمه خارج گردیده و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده از اطلس پاکسینوس استفاده می‌شد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- عکس مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 (الف) و شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (ب).

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده:

آزمایش شماره ۱: بررسی تاثیر تزریق قبل از آموزش MCHL بر حافظه اجتنابی مهارتی (نمودار Dose response):
گروه اول (شم): پنج دقیقه قبل از آموزش مقدار ۱ nl/mouse سالین را به صورت درون هیپوکامپی دریافت کردند؛ گروه‌های دوم، سوم و چهارم: پنج دقیقه قبل از آموزش مقدار ۰/۵ ng/mouse MCHL، ۰/۰۵، ۰/۰۵ را به صورت درون-هیپوکامپی دریافت کردند.

آزمایش شماره ۲: بررسی تاثیر تزریق قبل از آزمون اتانول روی حافظه اجتنابی مهارتی (نمودار Dose response):
گروه اول (شم): سی دقیقه قبل از آزمون مقدار ۱ mg/ml سالین را به صورت درون صفاقی دریافت کردند؛ گروه-های دوم، سوم و چهارم: سی دقیقه قبل از آزمون مقدار ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ اتانول را به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

کرده و ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دوزهای مختلف اتانول (mg/kg) ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ را به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

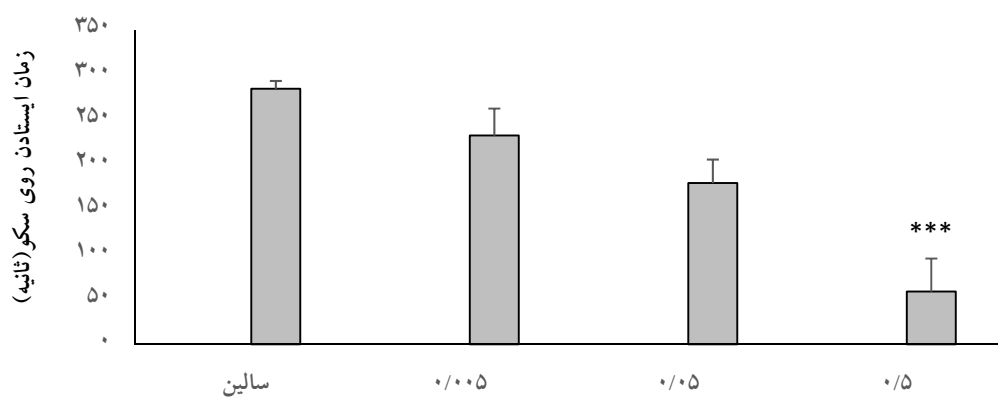
تجزیه و تحلیل آماری:

در همه آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد ثبت گردید. داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون Tukey آنالیز شدند. در تمام ارزیابی‌های آماری $P < 0/05$ معیار معنی‌دار بودن مقایسه بین گروه‌ها بود. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

۱- بررسی اثر تزریق قبل از آموزش آگونیست گیرنده 5-HT₃ در پاسخ اجتنابی مهار:

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق قبل از آموزش MCHL حافظه اجتنابی مهار را تغییر می‌دهد [$F(3/28)=11/61, P<0/05$]. آنالیز مکمل توکی نیز نشان داد که تزریق قبل از آموزش ۰/۰۰۵ ng/mouse MCHL تأخیر در پایین آمدن از سکو یا میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد (نمودار شماره ۱).



MCHL(ng/mouse) تزریق قبل از آموزش

نمودار شماره ۱- بررسی اثر تزریق قبل از آموزش آگونیست گیرنده 5-HT₃ در پاسخ اجتنابی مهار

هر ستون نمایانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است. $P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

۲- بررسی اثر تزریق قبل از آزمون اتانول در پاسخ اجتنابی مهار:

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق قبل از آزمون اتانول تأخیر در پایین آمدن از سکو یا میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد (نمودار شماره ۲).

آزمایش شماره ۳: بررسی تاثیر تزریق درون‌هیپوکامپی قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL و تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) روی حافظه اجتنابی مهار:

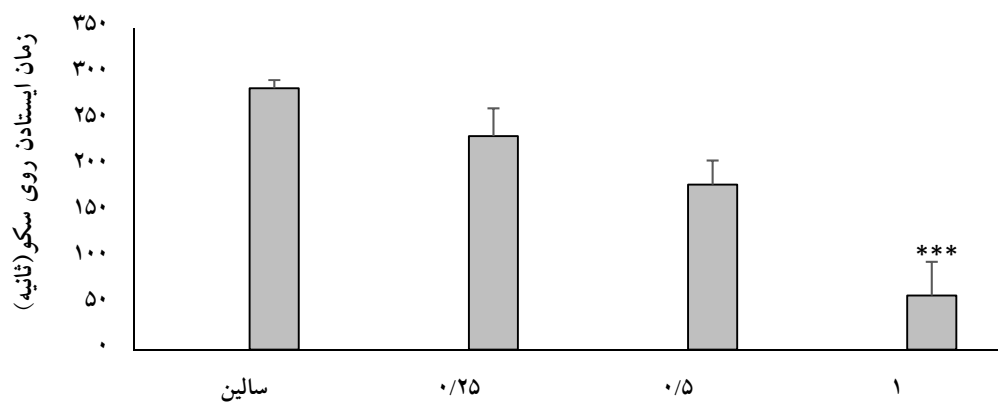
گروه اول: پنج دقیقه قبل از آموزش سالین (۱ μ l/mouse) را به صورت درون‌هیپوکامپی دریافت کرده و ۳۰ دقیقه قبل از آزمون مقدار ۱ mg/kg اتانول را به صورت درون صفاقی دریافت کردند؛ گروه‌های دوم، سوم و چهارم: پنج دقیقه قبل از آموزش MCHL ۰/۵، ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ ng/mouse را به صورت درون‌هیپوکامپی دریافت کرده و ۳۰ دقیقه قبل از آزمون مقدار ۱ mg/kg اتانول را به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

آزمایش شماره ۴: بررسی تاثیر تزریق درون‌هیپوکامپی قبل از آموزش دوز غیر موثر MCHL (۰/۰۰۵ ng/mouse) و تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوزهای مختلف اتانول روی حافظه اجتنابی مهار:

گروه اول: پنج دقیقه قبل از آموزش MCHL (۰/۰۰۵ ng/mouse) را به صورت درون‌هیپوکامپی دریافت کرده و ۳۰ دقیقه قبل از آزمون مقدار ۱ mg/kg اتانول را به صورت درون صفاقی دریافت کردند؛ گروه دوم: پنج دقیقه قبل از آموزش MCHL ۰/۰۰۵ ng/mouse را به صورت درون‌هیپوکامپی دریافت

۲- بررسی اثر تزریق قبل از آزمون اتانول در پاسخ اجتنابی مهار:

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق قبل از آزمون اتانول حافظه اجتنابی مهار را تغییر می‌دهد [$P < 0/05$].

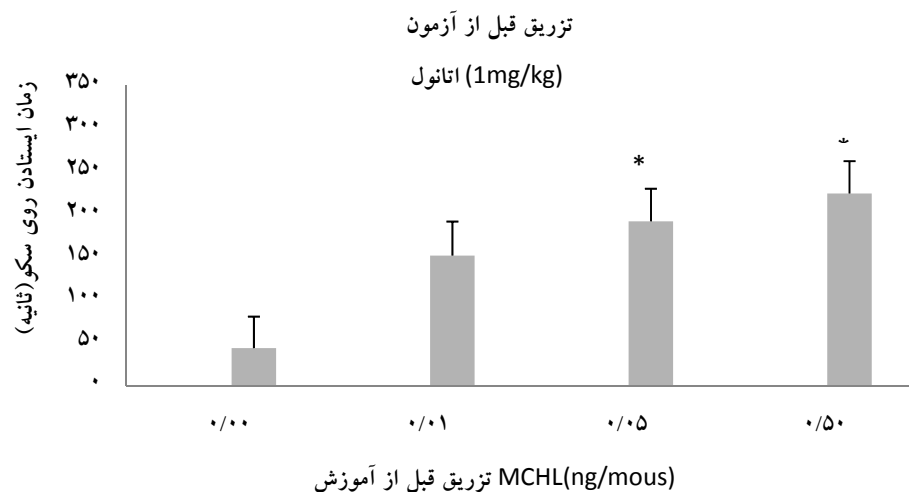


اتانول (mg/kg) تزریق قبل از آموزش

نمودار شماره ۲- بررسی اثر تزریق قبل از آزمون اتانول در پاسخ اجتنابی مهاري هر ستون نمایانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است. $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه سالین می باشد.

۳- بررسی اثر تزریق درون صفاقی قبل از آزمون هم زمان دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) و تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) هم زمان با تزریق پنج دقیقه قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL باعث بازگشت حافظه اجتنابی توكی نشان داد که دوزهای غیر موثر MCHL باعث بازگشت حافظه اجتنابی تخریب شده توسط اتانول در روز آزمون می شوند (نمودار شماره ۳).

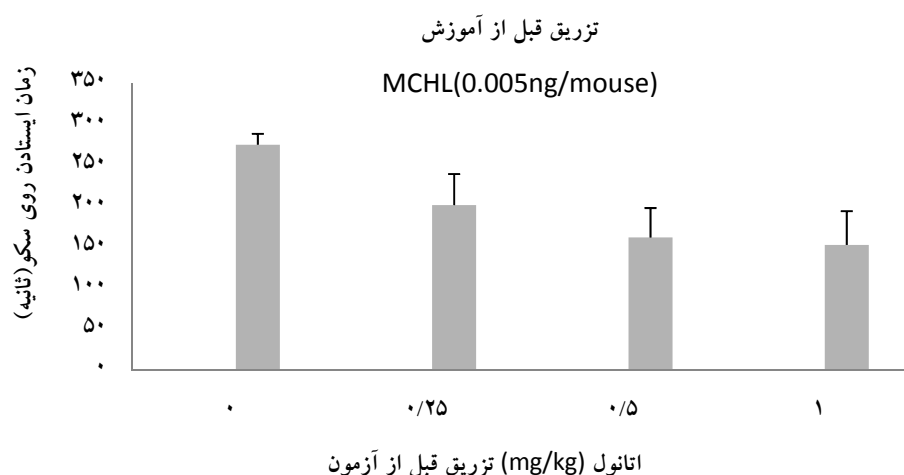
۳- بررسی اثر تزریق درون صفاقی قبل از آزمون هم زمان دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) و تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) هم زمان با تزریق پنج دقیقه قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL باعث بازگشت حافظه اجتنابی توكی نشان داد که دوزهای غیر موثر MCHL باعث بازگشت حافظه اجتنابی تخریب شده توسط اتانول در روز آزمون می شوند (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳- بررسی اثر تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوز موثر اتانول (۱ mg/kg) هم زمان با تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش دوزهای مختلف MCHL (۰/۰۰۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵ ng/mouse). هر ستون نمایانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است. $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه سالین می باشد.

۰/۰۰۵) باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری در روز آزمون می- شود [F(۳/۲۸=۲/۶۸, $P<0/05$]. آنالیز مکمل توکی نیز نشان داد که تزریق همزمان دوز غیرموثر MCHL و دوزهای غیرموثر اتانول منجر به تخریب حافظه اجتنابی در روز آزمون شده که البته این تخریب معنی دار نمی باشد (نمودار شماره ۴).

۴- بررسی اثر تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش دوز غیرموثر MCHL همزمان با تزریق درون صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دوزهای متفاوت اتانول بر پاسخ اجتنابی مهاری: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق درون صفاقی قبل از آزمون دوزهای متفاوت اتانول (۱ mg/kg, ۰/۵, ۰/۲۵) همزمان با تزریق قبل از آموزش دوز غیرموثر MCHL (ng/mouse)



نمودار شماره ۴- بررسی اثر تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش همزمان دوز غیر موثر MCHL با تزریق درون صفاقی سی دقیقه قبل از آزمون دوزهای متفاوت اتانول (۱ mg/kg, ۰/۵, ۰/۲۵) در پاسخ اجتنابی مهاری. هر ستون نمایانگر میانگین $\pm$ خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است.

است که اتانول رهایش استیل کولین در هیپوکامپ را کاهش داده و باعث تخریب حافظه می شود [۵]. نکته جالب تر اینکه اتانول علاوه بر اینکه یک اثر مستقیم روی نورون های کولینرژیک مدار سیتو - هیپوکامپ داشته و باعث کاهش رهایش استیل کولین می- شود، می تواند به واسطه تقویت پیام های گابارژیک به صورت غیر- مستقیم نیز روی نورون های کولینرژیک مدار سیتو-هیپوکامپ اثر کرده و باعث کاهش رهایش استیل کولین در هیپوکامپ گردد [۵]. از طرف دیگر گفته شد که سیستم سروتونین نیز از مسیرهای کولینرژیک و گلوتاماترژیک عمل می کند [۲۳]. گیرنده های 5-HT_3 بر حافظه عاطفی و کاری تاثیر می گذارند. فعال سازی این گیرنده- ها بیان ژن های گیرنده پروتئینی خوشه ای GABA در آمیگدال را تغییر می دهد و پس از آن در هیپوکامپ موجب حذف یا کاهش ترس حاصل از عوامل زمینه ای می گردد و ممکن است موجب حذف خاطرات وحشتناک گردد [۳۰]. این نشان می دهد اختلالات احتمالی در انتقال دهنده عصبی GABA موجب اثرات مفید ناشی از گیرنده 5-HT_3 در حافظه گردد. گیرنده های 5-HT_3 مغز هم روی نواحی پیش سیناپسی و هم پس سیناپسی قرار دارند [۵].

بحث

در این مطالعه تاثیر تزریق دوطرفه آگونیست گیرنده 5-HT_3 در هیپوکامپ جانبی بر فراموشی القا شده توسط اتانول در موش های کوچک آزمایشگاهی بررسی شد. شواهد موجود نشان می دهد که اتانول باعث تخریب حافظه و یادگیری در جوندگان و انسان می شود [۴]. مطالعات نشان می دهد که اتانول بخش زیادی از اثر مخرب خود بر حافظه را از طریق اثر بر هیپوکامپ پستی اعمال می نماید. اثر اتانول روی هیپوکامپ به قدری زیاد می باشد که حتی مصرف کوتاه مدت اتانول باعث تغییر نورفیزیولوژی هیپوکامپ می شود. شواهد موجود نشان می دهد که اتانول اثرات خود بر سیستم عصبی را با تاثیر مستقیم یا غیرمستقیمی که روی سیستم های نورترانسمیتری مختلف به ویژه استیل کولین، دوپامین و نورترانسمیتری های آمینواسیدی می گذارد، اعمال می نماید [۲۳]. با وجود تاثیرگذاری اتانول بر سیستم های نورترانسمیتری مختلف، به- نظر می رسد که تاثیر اتانول روی سیستم کولینرژیک به ویژه در هیپوکامپ در میانجی گری اثرات مخرب اتانول روی حافظه نقش کلیدی دارد [۴]. در همین راستا مطالعات تجربی نشان دهنده این

به تخریب حافظه در موش می‌شوند. شاید دلیل این تقویت یکی بودن سیستم‌های نوروترانسمیتری باشد که این دو از طریق آنها عمل می‌نمایند؛ یعنی هر دو باعث مهار آزاد سازی استیل کولین و یا باعث آزاد سازی GABA می‌شوند و در نتیجه با وجودی که هر دو دوز غیرموثر هستند اثر یکدیگر را تقویت کرده و باعث تخریب حافظه می‌شوند. با توجه به مطالعات انجام شده که در بالا به آنها اشاره شد و از آنجایی که مصرف اتانول منجر به آزاد سازی سروتونین در مغز می‌شود، شاید بتوان این گونه نیز پیشنهاد کرد که تزریق دوز غیرموثر اتانول منجر به آزاد سازی سروتونین در مغز موش‌ها شده و اثر متقابل این دو منجر به تخریب حافظه شده است. در بخش دیگری از این مطالعه مشاهده شد که تزریق دوزهای مختلف سروتونین همراه با دوز موثر اتانول منجر به بازگشت حافظه تخریب شده توسط اتانول می‌شود. این بازگشت حافظه به‌خصوص در دوزهای غیرموثر آگونیست سروتونین (0.05 ، 0.05 ng/mouse) بیشتر مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد دوز موثر سروتونین همراه با دوز موثر اتانول باهم به‌صورت یک دوز غیرموثر عمل کرده و درواقع منجر به تخریب حافظه در روز آزمون نمی‌شوند و یا به‌عبارت دیگر منجر به بازگشت حافظه اجتنابی مهاري ایجاد شده توسط هریک از این دو می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ گیرنده‌های سروتونینی و اتانولی وجود دارند که می‌توانند اثر یکدیگر را تقویت کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر خود را از کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، سرکار خانم دکتر جعفری، اعلام می‌داریم.

References:

- [1] Balfour DJ, Wright AE, Benwell ME, Birrell CE. The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. *Behav Brain Res* 2000; 113(1-2): 73-83.
- [2] Azami NS, Piri M, Oryan S, Jahanshahi M, Babapour V, Zarrindast MR. Involvement of dorsal hippocampal alpha-adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93(4): 455-62.
- [3] Schummers J, Browning MD. Evidence for a role for GABA (A) and NMDA receptors in ethanol

آگونیست $5-HT_3$ (MCHL) از طریق تأثیر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی منجر به تخریب حافظه می‌شود. در حالی که آنتاگونیست آن ($y-25130$) از طریق گیرنده‌های پس‌سیناپسی عمل کرده و منجر به تخریب حافظه می‌شود [31]. افزایش فعالیت گیرنده $5-HT_2$ ناشی از مصرف زیاد الکل است که ممکن است به سندروم ترک الکل منجر شود و به‌دنبال آن الگوهای رفتاری که پس از ترک مصرف الکل پدید می‌آید، رخ دهد. به‌عنوان مثال، الکی‌ها اغلب با افزایش سطح اضطراب پس از آخرین مصرف روبه‌رو هستند. این نشانه ترک ممکن است به‌علت افزایش فعالیت‌های گیرنده‌های $5-HT_2$ باشد؛ چراکه در مدل‌های حیوانی با مصرف الکل و مواد مخدری که موجب توقف فعالیت این گیرنده‌ها می‌شود رفتارهای اضطرابی کاهش می‌یابند [31]. اتانول با سیستم سروتونرژیک ارتباط بسیار نزدیکی دارد به‌طوری‌که مصرف حاد اتانول بر تولیدات سیناپسی سروتونین تأثیر می‌گذارد. در انسان پس از یک‌بار نوشیدن الکل سروتونین در خون و ادرار بالا می‌رود که این نشان دهنده آزاد شدن سروتونین از سیستم عصبی است [31]. در مدل حیوانی نیز قرار گرفتن در معرض اتانول به‌صورت حاد سطح سروتونین را در مغز بالا می‌برد که نشان‌دهنده آزاد سازی سروتونین از آکسون نورون‌های سروتونرژیک است [32]. گیرنده‌های سروتونینی که اتانول روی آن‌ها تأثیر می‌گذارد عبارتند از: $5-HT_{1a}$, $5-HT_{1b}$, $5HT_2$, $5-HT_3$. در معرض قرارگرفتن حاد اتانول باعث افزایش سیگنال‌های الکتریکی تولید شده توسط نورون‌های سروتونرژیک می‌شود که بر گیرنده‌های $5-HT_3$ تأثیر می‌گذارد [33]. با توجه به آزمایشات انجام یافته در تحقیق حاضر وقتی دوز غیر موثر آگونیست $5HT_3$ (MCHL) به هیپوکامپ موش تزریق می‌شود و همزمان با آن دوز غیر موثر اتانول به صورت درون صفاقی به موش تزریق می‌شود حافظه اجتنابی مهاري تخریب می‌شود. از آنجایی که این دو سیستم از نظر مکانیسم عمل مشابه هم هستند، اثر یکدیگر را تقویت کرده و منجر

inhibition of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 94(1-2): 9-14.

[4] Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR, Ras-souli Y. Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89(4): 441-7.

[5] Henn C, Loffelholz K, Klein J. Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357(6): 640-7.

- [6] Roth BL. The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics: Springer Science & Business Media; 2008.
- [7] Meeter M, Talamini L, Schmitt JA, Riedel WJ. Effects of 5-HT on memory and the hippocampus: model and data. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(4): 712-20.
- [8] Rudissaar R, Pruus K, Skrebuhova T, Allikmets L, Matto V. Modulatory role of 5-HT 3 receptors in mediation of apomorphine-induced aggressive behaviour in male rats. *Behav Brain Res* 1999; 106(1): 91-6.
- [9] Senthilvelan M, Ravindran R, Samson J, Devi RS. Serotonin turnover in different duration of sleep recovery in discrete regions of young rat brain after 24h REM sleep deprivation. *Brain Develop* 2006; 28(8): 526-8.
- [10] Egashira N, Yano A, Ishigami N, Mishima K, Iwasaki K, Fujioka M, et al. Investigation of mechanisms mediating 8-OH-DPAT-induced impairment of spatial memory: involvement of 5-HT 1A receptors in the dorsal hippocampus in rats. *Brain Res* 2006; 1069(1): 54-62.
- [11] Gonzalez R, Chávez-Pascacio K, Meneses A. Role of 5-HT 5A receptors in the consolidation of memory. *Behav Brain Res* 2013; 252: 246-51.
- [12] Chegini HR, Nasehi M, Zarrindast MR. Differential role of the basolateral amygdala 5-HT₃ and 5-HT₄ serotonin receptors upon ACPA-induced anxiolytic-like behaviors and emotional memory deficit in mice. *Behav Brain Res* 2014; 261: 114-26.
- [13] Naumenko VS, Kondaurova EM, Popova NK. Central 5-HT 3 receptor-induced hypothermia in mice: interstrain differences and comparison with hypothermia mediated via 5-HT 1A receptor. *Neurosci Lett* 2009; 465(1): 50-4.
- [14] van Hooft JA, Yakel JL. 5-HT 3 receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(4): 160-57.
- [15] Charnay Y, Léger L. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 2010; 12(4): 471-87.
- [16] Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 2008; 195(1): 198-213.
- [17] Castro L, De Castro-e-Silva E, Lima A, Souza F, Maldonado I, Macedo D, et al. Central 5-HT 4 receptors and drinking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66(2): 443-8.
- [18] Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G. Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 823493.
- [19] Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W. The neuronal 5-HT 3 receptor network after 20 years of research—evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2007; 560(1): 1-8.
- [20] Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46(2): 157-203.
- [21] Fakhfour G, Rahimian R, Ghia JE, Khan WI, Dehpour AR. Impact of 5-HT 3 receptor antagonists on peripheral and central diseases. *Drug Discov Today* 2012; 17(13-14): 741-7.
- [22] Buhot MC, Wolff M, Segu L. S. 15.03 Serotonergic receptor subtypes in cognition. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: S135-S6.
- [23] Cassel JC. Experimental Studies on the Role of Serotonin in Learning and Memory Functions. *Handbook Behav Neurosci* 2010; 21: 429-47.
- [24] Meneses A. Do serotonin 1–7 receptors modulate short and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 87(4): 561-72.
- [25] Meneses A. Stimulation of 5-HT 1A, 5-HT 1B, 5-HT 2A/2C, 5-HT 3 and 5-HT 4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short-and long-term memory. *Behav Brain Res* 2007; 184(1): 81-90.
- [26] Manuel-Apolinar L, Rocha L, Pascoe D, Castillo E, Castillo C, Meneses A. Modifications of 5-HT 4 receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res* 2005; 1042(1): 73-81.
- [27] Petkov VD, Belcheva S, Konstantinova E, Kehayov R. Participation of different 5-HT receptors in the memory process in rats and its modulation by the serotonin depletor p-chlorophenylalanine. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1995; 55(4): 243-52.
- [28] Yousefi B, Farjad M, Nasehi M, Zarrindast MR. Involvement of the CA1 GABA A receptors in ACPA-induced impairment of spatial and non-spatial novelty detection in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2013; 100: 32-40.
- [29] Eisch AJ, Barrot M, Schach CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13): 7579-84.
- [30] Ron D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist* 2004; 10(4): 325-36.
- [31] Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felsöci M. Serotonin receptors—from molecular biology to clinical applications. *Physiological Res* 2011; 60(1): 15.
- [32] Lal H, Prather PL, Rezazadeh SM. Alcoholism. *Clin Exp Res* 1993; 17(2): 411-7.
- [33] Nasehi M, Yavari SA, Zarrindast MR. Synergistic effects between CA1 mu opioid and dopamine D1-like receptors in impaired passive avoidance performance induced by hepatic encephalopathy in mice. *Psychopharmacology* 2013; 227(3): 553-66.