Physiology and Pharmacology, 17 (4), 437-448
Winter 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effects of systemic and intra-prefrontal cortex administrations of ethanol on spatial working memory in male rats

Narjes Lotfi Ghadikolai, Masoud Fereidoni*, Ali Moghimi

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 15 Oct 2013 **Accepted: 13 Jan 2014**

Abstract

Introduction: Ethanol can induce a wide spectrum of neurophysiological effects via interaction with multiple neurotransmitter systems and disruption of the balances between inhibitory and excitatory neurotransmitters. Prefrontal cortex is involved in cognitive process including working memory and is sensitive to ethanol. Present study investigates the effects of intraperitoneal (i.p.) administration of multiple doses of ethanol and intra-prefrontal cortex (i.c.) administration of ethanol on spatial working memory performance.

Methods: Adults male wistar rats (200-250g) were used. Rats in various groups received saline (i.p.), saline (i.c.), ethanol (10%, 20% and 30%, i.p.) and ethanol (30%, i.c.). Surgery for intra-prefrontal cortex cannulation was performed for i.c. administrations. The spatial working memory was assessed 15 and 30 minutes after i.p and 5 minutes after i.c. injections at first, second, and third day using the 8-shape maze apparatus.

Results: Ethanol (10%, i.p.) had no significant effects, but 15 and 30 min after administrations of ethanol (20%, i.p.) ($P<0.05$), and 15 min after administration of ethanol (30%, i.p.) ($P<0.001$), spatial working memory performance decreased significantly. Only i.c. administration of ethanol 30% at the first day, diminished working memory performance ($P<0.001$).

Conclusion: Because working memory was impaired in both intraperitoneal and intra-prefrontal cortex administration, therefore probably a part of spatial working memory deficits is related to effects of ethanol on prefrontal cortex and disruption of neuronal circuits involved in working memory in this region.

Key words: Ethanol, Spatial working memory, Prefrontal cortex, 8-Shape maze

* Corresponding author e-mail: fereidoni@um.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (٤)، ٤٣٧ – ٤٤٨
زمستان ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثرات تجویز سیستمیک و درون قشر پیش‌پیشانی اتانول بر حافظه کاری فضایی در موش صحرایی نر

نرجس لطفی قادیکلایی، مسعود فریدونی*، علی مقیمی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

دریافت: ۲۳ مهر ۹۲ پذیرش: ۲۳ دی ۹۲

چکیده

مقدمه: اتانول می‌تواند طیف وسیعی از اثرات نوروفیزیولوژیک را از طریق تداخل با عمل چندین سیستم نوروترانسمیتری و اختلال در تعادل میانجی‌های مهاری و تحریکی، القاء نماید. قشر پیش‌پیشانی در اعمال شناختی من جمله حافظه کاری نقش داشته به علاوه به اتانول حساس است. این مطالعه اثرات تجویز داخل صفاقی (i.p) دوزهای مختلف اتانول و تجویز درون قشر پیش‌پیشانی (i.c) اتانول را بر عملکرد حافظه کاری فضایی در موش صحرایی بررسی می‌نماید.

روش ها: موش‌های صحرایی نر بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) نژاد ویستار در گروه‌های دریافت کننده سالین (i.p)، سالین (i.c)، اتانول (۳۰٪ و ۲۰٪، ۱۰٪، i.p) و اتانول (۳۰٪، i.c) بکار گرفته شدند. برای تجویز i.c، جراحی و کانول‌گذاری در قشر پیش‌پیشانی انجام شد. حافظه کاری فضایی با استفاده از دستگاه ماز 8، ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تجویزهای i.p و ۵ دقیقه پس از تجویزهای i.c در روز اول و همچنین روزهای دوم و سوم تجویزهای i.c، ارزیابی شد.

یافته ها: اتانول (۱۰٪، i.p) فاقد اثر معنی‌داری بود اما عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان، ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تجویز اتانول (۲۰٪، $P<0.05$) (i.p) و ۱۵ دقیقه پس از تجویز اتانول (۳۰٪، $p<0.001$) (i.p)، کاهش یافت. تجویز i.c اتانول۳۰٪ فقط در روز اول موجب کاهش عملکرد حافظه کاری فضایی شد ($P<0.001$).

نتیجه گیری: از آنجائیکه اختلال عملکرد حافظه کاری فضایی هم در تجویز (i.p) و هم درون مغزی (i.c) اتانول مشاهده شد، بنابراین بخشی از این اختلال احتمالاً مربوط به اثر اتانول در ناحیه قشر پیش‌پیشانی و اختلال در مدارهای نورونی دخیل در حافظه کاری موجود در این ناحیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، حافظه کاری فضایی، قشر پیش‌پیشانی، دستگاه ماز 8

مقدمه

حافظه کاری یک نوع حافظه کوتاه مدت ویژه برای نگهداری موقت اطلاعات به شکل تصویری فعال، در چشم ذهن است که حتی پس از ایجاد وقفه در ورودی‌های حسی برای مدتی باقی می‌ماند تا جهت زمان‌بندی و برنامه‌ریزی یک فعالیت حرکتی یا شناختی، از آن به عنوان نقاط مرجع استفاده شود [۴]. یک شبکه نورونی در شکل‌گیری این حافظه دخیل است؛ در این شبکه نورونی قشر پیش‌پیشانی، قشر آهیانه‌ای خلفی، قشر گیجگاهی میانی از جمله هیپوکامپ و دیگر نواحی قشری و ساختارهای زیر قشری جهت تشکیل حافظه کاری فضایی با یکدیگر مرتبط می‌باشند [۱، ۲۸]. حافظه کاری بویژه نوع فضایی آن به زمان‌بندی شلیک سلول‌های عصبی در قشر پیش‌پیشانی مرتبط شده است [۸، ۱۰] در حالیکه سایر انواع حافظه به تغییرات سیناپسی بین نورون‌های شبکه‌های عصبی مرتبط می‌گردد [۸، ۳۱]. به نظر می‌رسد قشر پیش‌پیشانی برای دسترسی به حافظه کاری از اهمیت زیادی برخوردار باشد [۱۵]. بنابراین عواملی که قادر باشند بر عملکرد نورون‌های قشر پیش‌پیشانی تأثیرگذار باشند احتمالاً بر عملکرد حافظه

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: fereidoni@um.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

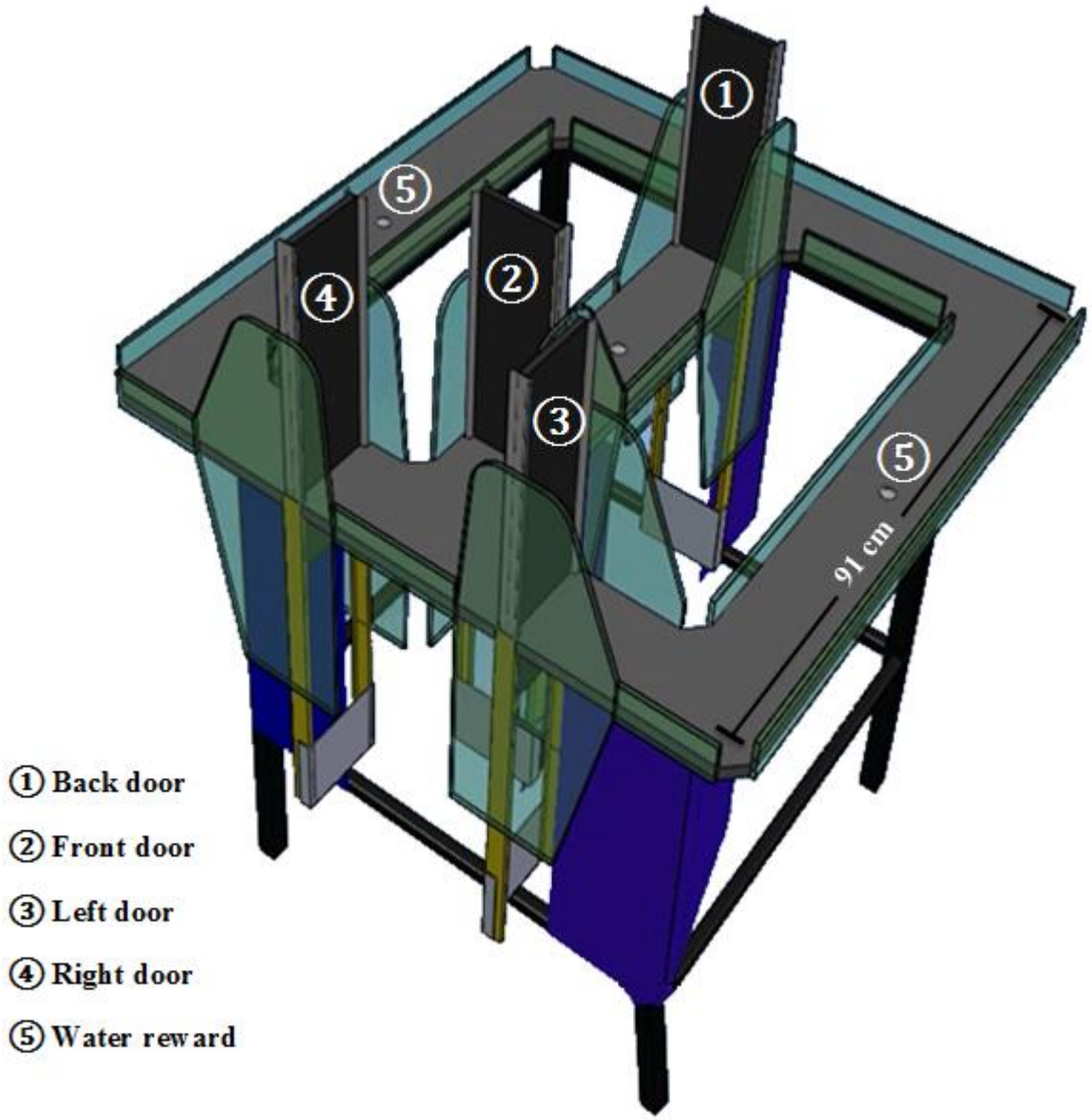
کاری نیز مؤثر باشند. برای بررسی حافظه کاری مرتبط با قشر پیش‌پیشانی در جوندگان از عملکردهای تأخیری متوالی DAT (Delayed Alternation Tasks) در ماز T یا ماز شعاعی و یا ماز 8 شکل (که از این به بعد در مقاله ماز 8 نامیده می‌شود) استفاده می‌گردد [۲۴].

الکل طی برهم‌کنش با سیستم انتقال‌دهنده‌های عصبی مختلف از جمله گابا، گلوتامات، دوپامین و سروتونین عملکرد طبیعی مغز را تغییر می‌دهد و سبب برهم خوردن تعادل بین انتقال‌دهنده‌های عصبی تحریکی و مهاری در مغز می‌شود [۱۷]. مصرف کوتاه مدت اتانول رهایی انتقال‌دهنده‌های عصبی از نورون را تغییر داده و عملکرد پروتئین‌های غشای عصبی از جمله گیرنده‌ها و کانال‌های یونی را مختل می‌سازد [۳۳]. تقریباً تمامی عملکردهای شناختی مغز تحت اثرات مضر الکل قرار می‌گیرند، خصوصاً الکل اثرات جدی بر پردازش اطلاعات و حافظه بخصوص حافظه کوتاه مدت و حافظه کاری دارد [۶]. مطالعات نشان داده است که مصرف حاد اتانول سبب اختلال در انواع یادگیری و شکل‌گیری حافظه در انسان و مدل‌های حیوانی می‌گردد [۱۶] همچنین بر عملکرد وظایف درگیر در حافظه کوتاه مدت در جوندگان و انسان تأثیر می‌گذارد [۷]. مطالعات حاکی از آن است که اتانول از طریق واکنش با نواحی مشخصی از مغز از جمله هیپوکامپ موجب اختلال در انواع خاصی از یادگیری و حافظه می‌گردد [۲۳]. اختلال عملکردهای اجرایی مثل برنامه‌ریزی و حافظه کاری نیز در مصرف حاد اتانول مشاهده شده است [۱۹]. اتانول فعالیت مداوم نورون‌های قشر پیش‌پیشانی را مهار می‌کند. نقص در عملکردهای شناختی که بوسیله نورون‌های موجود در قشر پیش‌پیشانی حمایت می‌شوند، در مواجهه با الکل حاد و مزمن مشاهده شده است [۳۲]. حافظه کاری بواسطه مصرف حاد و مزمن الکل تغییر نشان داده که این تغییر را به هیپوکامپ و قشر پیش‌پیشانی نسبت می‌دهند که نیازمند تحقیقات بیشتری است [۲۷].

از آنجایی که نقش قشر پیش‌پیشانی در عملکردهای شناختی از جمله حافظه کاری تأیید شده است [۱] و با توجه به اینکه نقص عملکرد وظایف حافظه کاری فضایی مرتبط با هیپوکامپ در مصرف مزمن اتانول [۲۷] و اختلال عملکردهای شناختی مرتبط با قشر پیش‌پیشانی در مواجهه با اتانول حاد و مزمن مشاهده شده است [۳۲]، بنابراین این فرض قابل طرح است که مصرف حاد اتانول احتمالاً موجب نقص حافظه کاری فضایی مرتبط با قشر پیش‌پیشانی بشود. جهت بررسی این فرضیه ابتدا تجویز داخل صفاقی اتانول و سپس تجویز درون مغزی اتانول در قشر پیش‌پیشانی صورت گرفت، به دنبال آن جهت ارزیابی حافظه کاری فضایی، دستگاه ماز اتوماتیک 8 بکار گرفته شد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. محیط نگهداری حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۲±۲ °C، به دور از هرگونه سر و صدا و آلودگی صوتی بود و به غیر از مواقع آزمایش، آب و غذا به مقدار کافی در دسترس آن‌ها قرار داشت. حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها، داخل قفس همراه با دسترسی به آب و غذا، روزانه به مدت ۲ ساعت در فضای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند تا با محیط آن آشنا شوند. تکثیر و پرورش حیوانات در حیوان‌خانه و انجام تمامی مراحل آزمایش-ها در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد و مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی موجود در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی [۳۵] انجام گرفت. حیوانات بصورت تصادفی در ۱۰ گروه، هر کدام شامل هفت سر موش قرار گرفتند. گروه‌های حیوانات عبارت بودند از: گروه دریافت کننده سالین بصورت داخل صفاقی (i.p)، گروه دریافت کننده سالین بصورت درون مغزی (i.c)، دو گروه دریافت کننده دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۱۰٪ (i.p)، دو گروه دریافت کننده دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۲۰٪ (i.p)، گروه دریافت کننده دوز ۳ g/kg از اتانول ۲۰٪ (i.p)، گروه دریافت کننده دوز ۳ g/kg از اتانول ۳۰٪ (i.p)، گروه دریافت کننده دوز ۵ g/kg از اتانول ۳۰٪ (i.p) و گروه دریافت کننده ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ (i.c). لازم به ذکر است که در تجویز درون مغزی، غلظت معادل با مؤثرترین دوز بدست آمده طی تجویزهای داخل صفاقی (دوز ۳ g/kg از اتانول ۳۰٪) مورد استفاده قرار گرفت. از آنجائیکه اتانول قابلیت انحلال در چربی دارد، ابتدا



شکل ۱– طرحی از دستگاه اتوماتیک ماز 8 .

فاصله زمانی بین تجویز داخل صفاقی تا آزمون رفتاری در ماز 8 باید سنجیده می‌شد، بدین منظور آزمون رفتاری در ماز 8 در دو گروه دریافت کننده دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۱۰٪ و دو گروه دریافت کننده دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۲۰٪ هر یک با فواصل زمانی ۱۵ دقیقه و ۳۰ دقیقه بررسی گردیدند و بر اساس نتایج حاصل از آن‌ها برای سایر گروه‌ها مدت زمان ۱۵ دقیقه انتخاب شد.

برای محاسبه حجم الکل تجویز شده بصورت داخل صفاقی در گروه‌های مختلف با فرض اینکه حجم ۱ گرم از محلول اتانول برابر با ۱ میلی‌لیتر باشد، به عنوان مثال در یک موش ۲۰۰ گرمی دریافت کننده دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۱۰٪، ۰/۳ میلی‌لیتر حجم تجویز شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

حجم تجویز داخل صفاقی = وزن موش × ۱/۵ g/kg = $\frac{\text{۱/۵ گرم} \times \text{۲۰۰ گرم}}{\text{۱۰۰۰ گرم}}$ = ۰/۳ گرم معادل ۰/۳ میلی‌لیتر

سایر دوزهای بکار برده شده نیز مشابه با فرمول بالا محاسبه شدند.

جهت تجویز درون مغزی، قشر پیش‌پیشانی موش‌های صحرایی بصورت دوطرفه کانول گذاری شد. بدین منظور حیوانات با تجویز داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) بی‌هوش شدند. موهای سر حیوان تراشیده شد و حیوان در دستگاه استریوتاکس قرار گرفت. پوست سر شکافته و سطح استخوان جمجمه کاملاً تمیز شد. بر طبق اطلس پاکسینوس- واتسون مختصات ناحیه تجویز (در قشر پیش‌پیشانی) بصورت AP=3.2 mm (قدامی خلفی: ۳/۲ میلیمتر از برگما به سمت قدامی)، L=±0.8 mm (میانی جانبی: ۰/۸ میلیمتر به سمت چپ یا راست برگما) و V=3.5 mm (پشتی شکمی: ۳/۵ میلیمتر از سطح جمجمه به سمت عمق) بر سطح جمجمه مشخص گردید. سپس دوکانول راهنما، تهیه شده از سرسوزن‌های شماره ۲۲ (بصورت دوطرفه) ۰/۵ mm بالاتر از مکان تجویز قرار گرفتند. سپس اطراف این کانول‌ها و کل سطح جمجمه با سیمان دندان پزشکی پوشانده شد و به منظور جلوگیری از مسدود شدن کانول‌ها، سرسوزن شماره ۳۰ در آن‌ها قرار داده شد. پس از سپری شدن یک هفته دوره بهبودی، حیوان برای تجویز درون مغزی، به آرامی با دست نگه داشته شد و سرسوزن ۳۰ از درون کانول راهنما خارج گردید و با سوزن تجویز که طول آن ۰/۵ میلیمتر بیشتر از کانول راهنما بود، جایگزین گردید. سوزن تجویز توسط یک رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون (۵ µl) وصل شد و طی مدت زمان ۱۲۰ ثانیه به آرامی حجمی معادل ۰/۶ µl از سالین یا داروی مورد نظر به درون قشر پیش‌پیشانی حیوان تجویز شد [۱۸]. برای اطمینان از جذب کامل دارو به داخل بافت مغزی، ۶۰ ثانیه دیگر هم در نظر گرفته شد و ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی، حیوان برای انجام آزمایش‌های رفتاری مربوط به حافظه کاری (Working Memory) در دستگاه ماز 8 قرار گرفت، این تجویز درون مغزی در حیوان یک روز و دو روز بعد از اولین روز تجویز نیز تکرار و هر بار آزمون رفتاری در دستگاه ماز 8 انجام شد.

دستگاه ماز 8 مشابه با نمونه‌های بکار گرفته شده در تحقیقات مربوط به حافظه کاری [۲۰] و طراحی و مشاوره نویسندگان این مقاله توسط شرکت نوآوران صنایع آموزشی ساخته شد. این دستگاه به شکل یک مربع روباز با یک راهروی مرکزی که لبه راهروی جلویی را به لبه راهروی عقبی متصل می کند و دو راهروی طرفی در سمت راست و چپ است و مسیر حرکت در آن به شکل 8 می‌باشد. ماز دارای چهار درب آکریلیک سیاه است که با عمل سنسورهایی که عبور حیوان را حس می کنند پایین رفته و به حیوان اجازه عبور می دهند، و یا اینکه بالا رفته و از عبور حیوان جلوگیری می کنند. در این ماز، از آب به عنوان پاداش استفاده می‌شود (شکل ۱). در این پژوهش به منظور آشنایی حیوانات با فضای دستگاه ماز 8 حیوانات به مدت ۱۵ تا ۱۹ روز در این دستگاه قرار گرفتند. در خصوص اصول کار دستگاه ماز 8 لازم به ذکر است که روش کلی برای ارزیابی حافظه کاری توسط این دستگاه، اجرای تناوبی یک رفتار با تأخیر است. در این دستگاه حیوان در هر بار بعد از اعمال تأخیر زمانی مشخص بایستی انتخابی متفاوت با انتخاب قبلی داشته باشد یعنی حیوان برای دریافت پاداش باید بعد از یک تأخیر زمانی و باز شدن هر سه درب جلویی، راست و چپ، انتخاب متفاوتی از انتخاب قبلی خود داشته باشد. قبل از این آزمون مدت زمان آب خوردن حیوان به حدود ۳۰ الی ۶۰ دقیقه در روز محدود گردید [۲۰]. بررسی حافظه کاری توسط دستگاه ماز 8 شامل سه مرحله خوگیری (Habituation)، شکل‌دهی (Shaping) و آزمون اصلی (Test) می‌باشد. مرحله خوگیری برای آشنایی حیوان با شرایط دستگاه ماز 8 و صداهایی که در حین کار با دستگاه (از جمله صدای باز و بسته شدن درب‌ها) ایجاد می‌شود و شناسایی محل پاداش آب در کف راهروهای دستگاه، طراحی شده است. در این مرحله دستگاه طوری برنامه‌ریزی می‌شود که درب‌ها بصورت تصادفی باز و بسته - شوند و آب نیز برای پاداش بطور تصادفی درون هر یک از ظرف‌های آب تعبیه شده در سه راهرو پمپ گردد [۲۰]. در این پژوهش حیوان به مدت ۵ تا ۷ روز، روزانه حدود ۴۰ دقیقه در این مرحله قرار گرفت. در مرحله شکل‌دهی، حیوان چگونگی عملکرد در ماز 8 را آموزش می‌بیند. بدین ترتیب که پس از اعمال تأخیر زمانی مشخص در راهروی مرکزی، تنها درب جلویی و یکی از درب‌های طرفی (راست یا چپ) باز می‌شود و حیوان فقط یک راه برای انتخاب دارد. حیوان در هر بار

انتخاب با عمل سنسورهایی که در انتهای بازوهای طرفی و در قسمت مرکزی نصب شده‌اند، آب را برای پاداش در هر یک از راهروهای طرفی (چپ یا راست) و راهروی مرکزی دریافت می‌کند. هنگامی که حیوان بعد از عبور از راهروی طرفی (چپ یا راست) به قسمت لبه پشتی ماز رسید، می‌تواند یا وارد راهروی مرکزی شود (مسیر صحیح دریافت پاداش آب در راهروی مرکزی) و یا اینکه به مسیر خود ادامه دهد و از طریق راهروی پشتی وارد راهروی طرفی سمت مقابل گردد. این مسیر، خطای لبه پشتی (Back Edge Error) نامیده می‌شود. در صورت بروز این خطا، حیوان بعد از ورود به قسمت مرکزی پاداش آب دریافت نمی‌کند. در این پژوهش حیوان روزی یک بار با اعمال تأخیر ۳ ثانیه در راهروی مرکزی تا زمانی که توانست تعداد ۴۰ دور را در مدت زمان۳۰ دقیقه با تعداد ۳ تا ۴ خطای لبه پشتی (≤۱۰٪) انجام دهد، در دستگاه ماز 8 قرار گرفت، مرحله شکل‌دهی در حیوان حدود ۴ تا ۶ روز به طول انجامید [۲۰]. پس از آن حیوان وارد مرحله آزمون اصلی گردید. در مرحله آزمون اصلی حیوان یاد گرفته است که بر طبق اصول کلی ماز عمل کند. در این پژوهش، مرحله آزمون نیز یک بار در روز با تأخیر ۳ ثانیه‌ای در راهروی مرکزی تا زمانی که حیوان بتواند تعداد ۴۰ دور را در مدت زمان ۳۰ دقیقه با تعداد ۳ تا ۴ خطای پشتی (≤۱۰٪) انجام دهد، ظرف ۴ تا ۶ روز صورت گرفت.

در دستگاه ماز 8، تعداد دورها، تعداد انتخاب‌های درست، تعداد انتخاب های نادرست (انتخاب های متوالی یک بازو) هر دور و مدت زمان در هر مرحله بر روی صفحه نمایشگری که به دستگاه متصل است، ثبت می‌گردد [۲۰].

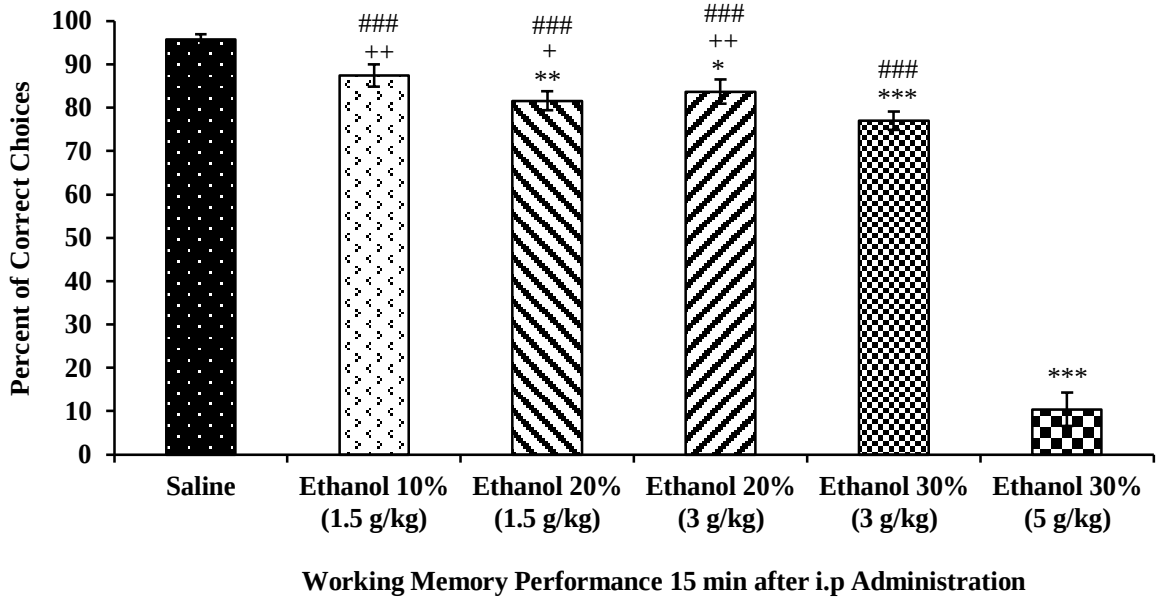
یک روز پس از اتمام مرحله آزمون اصلی در دستگاه ماز 8، تجویزهای داخل صفاقی و جراحی جهت تجویزهای درون مغزی در گروه‌های مختلف انجام گردید. سپس ۱۵ یا ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی و ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی، مرحله آزمون برای هر موش انجام گرفت.

جهت تجزیه و تحلیل آماری، درصد پاسخ‌های صحیح برای هر موش شامل تعداد انتخاب‌های صحیح تقسیم بر تعداد کل انتخاب‌ها ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید؛ این درصد به عنوان داده عملکردی حافظه کاری حیوان در هر جلسه آزمون در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده و توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 5 به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس میانگین داده‌های گروه‌ها با استفاده از آزمون تی Tukey مقایسه و $P<0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 بر روی نمودار ترسیم شدند.

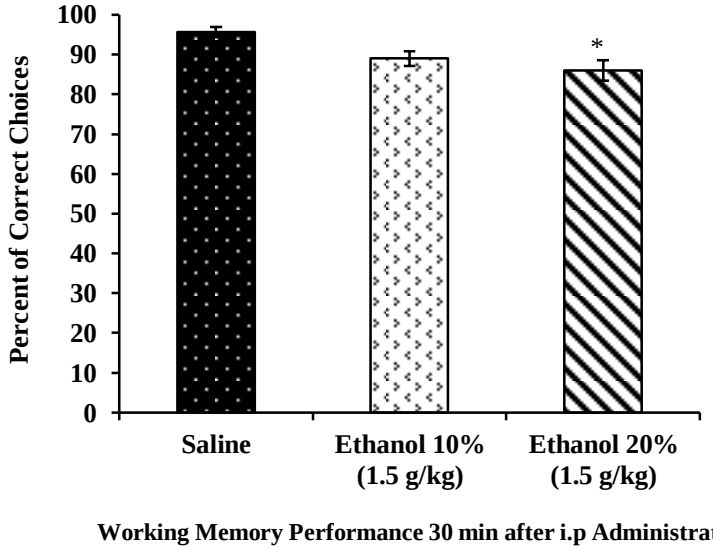
یافته ها

با توجه به شکل ۲، نتایج حاصل از سنجش حافظه کاری توسط ماز 8، ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین نشان داد که تجویز داخل صفاقی این دوز از اتانول ۱۰٪، اثر معنی‌داری بر عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان نداشت. در حالیکه نتایج، ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ و دوز g/kg ۳ از اتانول ۲۰٪، در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین حاکی از آن بود که تجویز این دوزهای اتانول ۲۰٪ منجر به کاهش معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان گردید ($P<0.01$ و $P<0.05$). همچنین نتایج مؤید کاهش معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۳ از اتانول ۳۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین طی سنجش حافظه کاری در ماز 8 بود ($P<0.001$). از طرفی عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۵ از اتانول ۳۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین کاهش چشمگیری یافت بطوریکه در این دوز از اتانول ۳۰٪، علائم مستی مانند بی‌حالی، گیجی، تلوتلو خوردن، خواب آلودگی، فراموشی و اختلالات حرکتی در حیوان مشاهده گردید ($P<0.001$). همچنین نتایج مؤید کاهش معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان در اثر تجویز داخل صفاقی دوزهای افزایشی اتانول نسبت به یکدیگر بودند [$F(5, 36) = 150.1$]، (شکل ۲).

از طرفی با توجه به شکل ۳، نتایج بیانگر آن بود که عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین، طی سنجش حافظه کاری توسط



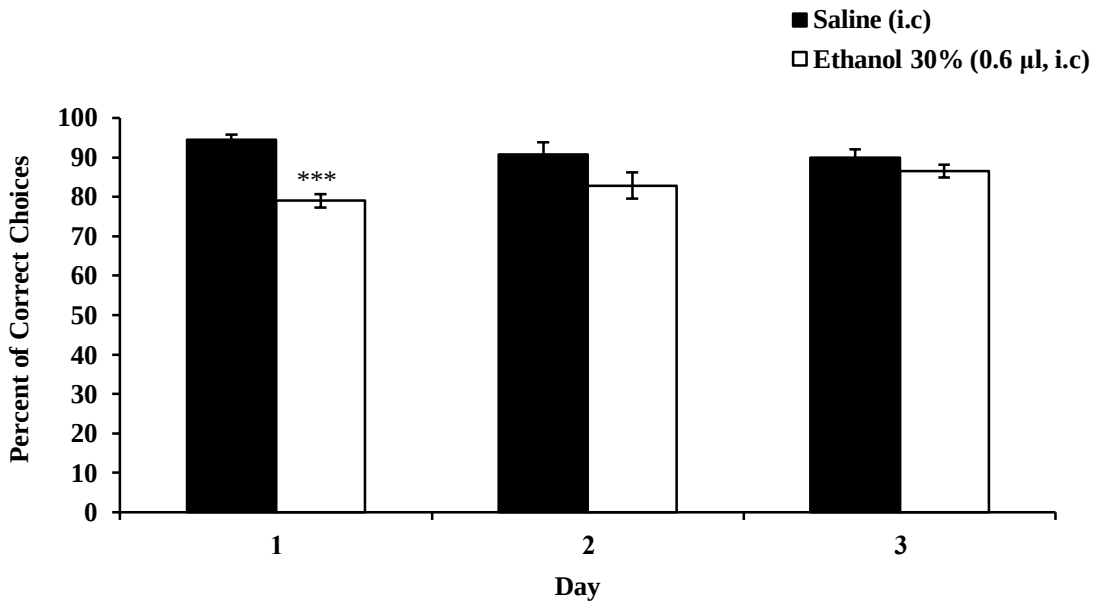
شکل ۲- عملکرد حافظه کاری فضایی ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف از اتانول ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪، طی آزمون رفتاری در ماز 8. نتایج نشان داد، عملکرد حافظه کاری فضایی در حیوان، ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای g/kg ۳ و ۱/۵ از اتانول ۲۰٪ و g/kg ۵ و ۳ از اتانول ۳۰٪، در مقایسه با سالین کاهش معنی‌داری یافت. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (n=7) و (P<0.001***، P<0.01** و P<0.05* در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p)، P<0.01++ و P<0.05+ در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز g/kg ۳ از اتانول ۳۰٪ و P<0.001### در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز g/kg ۵ از اتانول ۳۰٪).



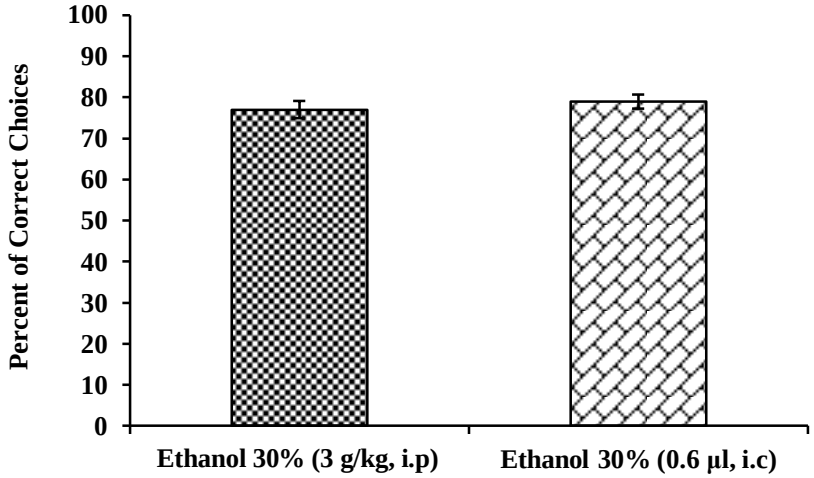
شکل ۳- عملکرد حافظه کاری فضایی ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ و ۲۰٪، طی آزمون رفتاری در ماز 8. نتایج نشان داد عملکرد حافظه کاری فضایی در حیوان، ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۲۰٪ در مقایسه با سالین کاهش معنی‌داری یافت. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (n=7) و (P<0.05* در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p)).

ماز8 تغییر معنی‌داری نداشت. اما کاهش معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان، ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۲۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین مشاهده گردید (P<0.05)، (شکل ۳).

با توجه به نتایج حاصل از شکل ۲، مؤثرترین دوز اتانول، دوز g/kg ۳ از اتانول ۳۰٪ طی تجویزهای داخل صفاقی بود که این دوز انتخاب و برای تجویز درون مغزی در قشر پیش پیشانی معادل سازی شد. همچنین عملکرد حافظه کاری



شکل ٤- عملکرد حافظه کاری فضایی، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪، طی آزمون رفتاری در ماز 8 در روزهای اول تا سوم. نتایج نشان داد عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان در روز اول، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ در قشر پیش‌پیشانی در مقایسه با سالین کاهش معنی‌داری یافت. تغییرات عملکرد حافظه کاری در مقایسه با سالین در روزهای دوم و سوم فاقد معنی بود. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (n=7) و (***P<0.001 در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.c)).



شکل ٥- عملکرد حافظه کاری فضایی ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۳ g/kg از اتانول ۳۰٪ و ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی غلظت معادل آن از اتانول ۳۰٪ (۰/۶ µl)، طی آزمون رفتاری در ماز 8. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری فضایی بین دو گروه وجود ندارد. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (n=7).

فضایی حیوان در ماز 8 طی سه روز، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ در قشر پیش‌پیشانی در مقایسه با تجویز درون مغزی سالین، در روز اول کاهش معنی‌داری یافت (P<0.001)، اما در روزهای دوم و سوم تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۴).

اما نتایج حاصل از سنجش حافظه کاری توسط ماز 8، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ در قشر پیش پیشانی در روز اول، در مقایسه با سنجش حافظه کاری ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۳ g/kg از اتانول ۳۰٪ مؤید اختلاف معنی‌داری بین اثرات کاهشی این دو نوع تجویز (داخل صفاقی و درون مغزی) در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان نبود (شکل ۵).

بحث

تجویز حاد اتانول موجب اختلال وابسته به دوز در عملکرد

برخی از وظایف شناختی مرتبط با هیپوکامپ از جمله یادگیری فضایی می‌شود، در نتیجه اتانول بواسطه تغییر مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت نورونی در هیپوکامپ و ساختارهای مرتبط بر یادگیری و حافظه تأثیر می‌گذارد [۲۹]. در این رابطه، با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات وسیعی که در مورد بررسی اثرات اتانول بر حافظه انجام گرفته است چنین بر می‌آید که تجویز حاد سیستمیک دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ در موش صحرایی، موجب اختلال حافظه فضایی در آزمایشات با Morris Water Maze می‌شود [۲].

همچنین مطالعات نشان دادند اتانول قادر است حافظه کاری فضایی مرتبط با هیپوکامپ را نیز در موش سوری و موش صحرایی مختل کند [۲۹]. در این تحقیق، یافته‌ها حاکی از اثر مشابه دوزهای g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ و ۲۰٪ و در هر دو زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی بر عملکرد حافظه کاری فضایی بود (شکل ۲ و ۳). آنچنان‌که کاهش وابسته به زمان در عملکرد حافظه کاری پس از گذشت ۱۵ دقیقه نسبت به ۳۰ دقیقه مشاهده نشد، بنابراین احتمال دارد غلظت اتانول خون در این بازه زمانی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه‌ای تغییر زیادی نداشته باشد چرا که اتانول به دلیل خاصیت انحلال پذیری (محلول در آب و چربی) به سرعت از غشاهای زیستی از جمله سد خونی- مغزی عبور می‌کند و بر اندام‌های مختلف و فرآیندهای زیستی در بدن تأثیر می‌گذارد [۱۹]. بنابراین با توجه به عدم مشاهده اختلاف اثر بر عملکرد حافظه کاری در بازه زمانی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه برای گروه‌های بعدی زمان سنجش حافظه کاری ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی اتانول انتخاب گردید.

در این پژوهش تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۳ از اتانول ۲۰٪ و نیز ۳۰٪ در مقایسه با سالین سبب کاهش معنی‌داری در عملکرد حافظه کاری شد ($P<0.05$ و $P<0.001$)، (شکل ۲). همچنین به دلیل مشاهده کاهش معنی‌دار در عملکرد حافظه کاری حیوان پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۳ از اتانول ۳۰٪ در مقایسه با سایر گروه‌های دریافت کننده اتانول (شکل ۲)، این دوز اتانول برای تجویز درون مغزی در قشر پیش‌پیشانی انتخاب و معادل سازی شد و به دلیل مشاهده اختلالات رفتاری و حرکتی شدید طی تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۵ از اتانول ۳۰٪، این دوز برای تجویز درون مغزی مورد استفاده قرار نگرفت (شکل ۲). با توجه به اینکه اثرات الکل بر مغز و رفتار به غلظت الکل خون بستگی دارد، دوزهای کم الکل اثرات تحریک کننده و دوزهای بالاتر اثرات سرکوب کننده دارند [۱۹]. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد که دوز g/kg ۳ از اتانول ۲۰٪ و ۳۰٪ اثرات سرکوب کننده معنی‌داری بر عملکرد حافظه کاری فضایی دارد.

نظر به ایجاد اختلال در حافظه فضایی و یا حافظه کاری که با روش‌های مرتبط با هیپوکمپ طی تجویز اتانول ۱۰٪ مشاهده شده‌اند [۲] و عدم بروز تغییرات معنی‌دار برای همین میزان اتانول در عملکرد حافظه کاری فضایی طی سنجش با ماز 8 (شکل ۲ و ۳) و در عین حال بروز اختلال در حافظه کاری فضایی متناسب با افزایش میزان اتانول در پژوهش حاضر (شکل ۲ و ۳) این احتمال را بر می‌انگیزد که حداقل بخشی از اثرات اتانول بویژه در مقادیر بیشتر از اتانول ۱۰٪ شاید از طریق تأثیر بر مدارات نورونی دخیل در حافظه مثلاً در قشر پیش‌پیشانی صورت گرفته باشد لذا تجویز اتانول مستقیماً در مغز و قشر پیش‌پیشانی، ناحیه‌ای که نقش بسیار مهمی در حافظه کاری فضایی دارد [۱۵]، برای بررسی احتمال مطروحه در فوق صورت گرفت. شواهد نوروسایکولوژی و نوروفیزیولوژی نشان می‌دهد که قشر پیش‌پیشانی تحت تأثیر مصرف حاد و مزمن الکل قرار می‌گیرد [۱۴] و عملکردهای شناختی که توسط نورون‌های موجود در قشر پیش پیشانی وساطت می‌شود، در مواجهه با الکل حاد و مزمن مختل می‌گردد [۱۴، ۳۲]. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز درون مغزی قشر پیش پیشانی µl ۰/۶ از اتانول ۳۰٪ در مقایسه با سالین در روز اول، موجب کاهش چشمگیری در عملکرد حافظه کاری فضایی شد ($P<0.001$)، در روزهای بعد ادامه تجویز اتانول در مقایسه با سالین اثر قابل ملاحظه‌ای بر حافظه کاری فضایی نداشت (شکل ۴). عملکردهای پیچیده مغز مانند حافظه، هوشیاری و یادگیری بوسیله سیستم انتقال‌دهنده‌های عصبی و تعدیل‌کننده‌های عصبی متعدد که هماهنگ با یکدیگر عمل می‌کنند، کنترل می‌گردد [۲۶]. همچنین مطالعات جانوری نشان داده‌اند که مصرف حاد و مزمن اتانول با اثرات مستقیم و غیر مستقیم بر غلظت انتقال‌دهنده‌های عصبی مختلف در مغز از جمله سروتونین، دوپامین، استیل کولین، نورآدرنالین، گابا و اپیوئیدهای درون‌زاد بر

فرآیندهای یادگیری و حافظه اثر می‌گذارد [۲۲]. و نقش سیستم کولینرژیک قشر پیش‌پیشانی در حافظه کاری تأکید شده است [۲۲] و نشان داده شده که تجویز حاد سیستمیک اتانول اثر دو مرحله‌ای وابسته به دوز بر رهایی استیل کولین در قشر پیش‌پیشانی و هیپوکامپ موش صحرایی دارد بطوریکه دوز کم اتانول موجب افزایش درحالیکه دوز بالاتر موجب کاهش رهایی استیل کولین در این نواحی می‌شود [۳۰]. نقش دوپامین بر عملکردهای شناختی قشر پیش‌پیشانی از جمله حافظه‌کاری پذیرفته شده است [۲۴] بطوریکه یک رابطه U شکل معکوس بین میزان دوپامین و بازه حافظه کاری وجود دارد و اختلال در عملکرد حافظه کاری زمانیکه فعالیت دوپامینرژیک کم یا زیاد باشد، رخ می‌دهد [۱۱]. الکل موجب افزایش رهایی دوپامین در لوب پیشانی و Nucleus accumbens می‌شود [۳]. نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده است که تغییر در انتقال‌دهنده عصبی گابا بر عملکرد قشر پیش‌پیشانی تأثیر می‌گذارد [۲۴]. مصرف حاد اتانول عملکرد مهاری انتقال‌دهنده عصبی گابا را تقویت می‌کند [۵]. اتانول نورون‌های گاباارژیک را در نواحی خاصی از مغز که در رفتارهای انگیزشی نقش دارند از جمله قشر پیش پیشانی میانی و آمیگدال فعال می‌کند [۱۲]. مصرف حاد اتانول عملکرد گیرنده‌های سیستم گلوتاماترژیک هیپوکامپ را مهار می‌کند [۲]. مسدود کننده‌های گیرنده‌های AMPA و NMDA قشر پیش‌پیشانی هر دو موجب اختلال در عملکرد حافظه کاری می‌شوند [۲۵]. اختلال عملکرد گلوتاماترژیک و گاباارژیک قشر پیش‌پیشانی بر عملکرد حافظه کاری اثر می‌گذارد، درواقع عملکرد صحیح حافظه کاری نیازمند تعادل دقیق این دو انتقال‌دهنده عصبی در قشر پیش‌پیشانی می‌باشد [۹، ۳۴]. سروتونین بر عملکردهای مغز از جمله یادگیری و حافظه تأثیر می‌گذارد [۱۳]. مصرف حاد اتانول عملکرد سیناپسی سروتونین را تغییر می‌دهد [۱۹]. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف حاد اتانول موجب افزایش میزان سروتونین در مغز انسان و حیوان می‌شود. عملکردهای شناختی مرتبط با قشر پیش‌پیشانی به تغییرات انتقال‌دهنده‌های دوپامینرژیک و سروتونرژیک حساس می‌باشد [۱۳]. با توجه به اینکه نقش سیستم کولینرژیک، دوپامینررژیک، گلوتاماترژیک، گاباارژیک و سروتونرژیک قشر پیش‌پیشانی در حافظه کاری اثبات شده است و از آنجایی که این انتقال‌دهنده‌های عصبی مهم‌ترین هدف اتانول در مغز می‌باشند؛ بنابراین می‌توان پیشنهاد داد که احتمالاً بخشی از کاهش عملکرد حافظه کاری فضایی در نتیجه تجویز حاد اتانول در پژوهش حاضر از طریق سرکوب سیستم کولینرژیک، افزایش فعالیت انتقال‌دهنده‌های دوپامینرژیک، تداخل با مسیرهای گاباارژیک و افزایش سروتونین در مدار قشر پیش‌پیشانی میانجی‌گری می‌شود به هر حال خوبست تداخل الکل با این سیستم‌های نوروترنسمیتری با استفاده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌ها و اثر آن‌ها روی حافظه کاری در سیستم عصبی مرکزی منجمله قشر پیش‌پیشانی، نیز در ادامه تحقیقات مد نظر قرار بگیرد. با این حال خوبست این احتمال در نظر گرفته شود که اختلال حافظه کاری ناشی از تجویز داخل قشر پیش پیشانی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ در روز اول (شکل ۴) ممکن است در نتیجه تخریب سلول‌های عصبی ناشی از تجویز اتانول رخ داده باشد، نظر به اینکه تجویز داخل قشر پیش پیشانی اتانول در مقایسه با سالین در روزهای دوم و سوم اختلال قابل ملاحظه‌ای در حافظه کاری پدید نیاورد (شکل ۴)، نه فقط می‌توان احتمال فوق را کم در نظر گرفت بلکه احتمالاً باید برای روزهای بعد سراغ تحقیق بر روی مکانیسم‌های جبرانی احتمالی رفت که توانسته‌اند جلوی ایجاد اختلال ناشی از تجویز اتانول را هم بگیرند، این نیز نیازمند تحقیق بیشتر است.

در کل در این پژوهش کاهش عملکرد حافظه کاری فضایی هم در تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف اتانول و هم تجویز درون مغزی اتانول در قشر پیش‌پیشانی مشاهده شد و با توجه به شکل ۵ از آنجا که تفاوت معنی‌داری بین اثرات کاهشی این دو نوع تجویز در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان نبود (شکل ۵)، در نتیجه احتمالاً بخشی از اختلال حافظه کاری فضایی در نتیجه تجویز حاد الکل، احتمالاً با تغییرات نوروشیمیایی قشر پیش‌پیشانی مرتبط می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه مصوب دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است. بدینوسیله از آن سازمان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

[1] Asselen M, Kessels RP, Neggers SF, Kappelle LJ, Frijns CJ, Postma A, Brain areas involved in spatial working memory. ***Neuropsychologia*** 44 (2006) 1185-1194.

[2] Boulouard M, Lelong V, Daoust M, Naassila M, Chronic ethanol consumption induces tolerance to the spatial memory impairing effects of acute ethanol administration in rats. ***Behav Brain Res*** 136 (2002) 239-246.

[3] Bowirrat A, Oscare-Berman M, Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and reward deficiency syndrome. ***Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*** 132B (2005) 29-37.

[4] Courtney SM, Petit L, Haxby JV, Ungerleider LG, The role of prefrontal cortex in working memory: examining the contents of consciousness. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*** 353 (1998) 1819-1828.

[5] Crego A, Rodriguez-Holguín S, Parada M, Mota N, Corral M, Cadaveira F, Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task. ***Drug Alcohol Depend*** 109 (2010) 45-56.

[6] Hindmarch I, Kerr JS, Sherwood N, The effects of alcohol and other drugs on psychomotor performance and cognitive function. ***Alcohol Alcohol*** 26 (1991) 71-79.

[7] Jang MH, Shin MC, Lee TH, Kim YP, Jung SB, Shin DH, Kim H, Kim SS, Kim EH, Kim CJ, Alcohol and nicotine administration inhibits serotonin synthesis and tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of young rats. ***Neurosci Lett*** 329 (2002) 141-144.

[8] Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. ***Principles of Neural Science*** United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2013.

[9] Karlsgodt KH, Bachman P, Winkler AM, Bearden CE, Glahn DC, Genetic influence on the working memory circuitry: Behavior, structure, function and extensions to illness. ***Behav Brain Res*** 225 (2011) 610-622.

[10] Kesner RP, Hunt ME, Williams JM, Long JM, Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. ***Cereb Cortex*** 6 (1996) 311-318.

[11] Khan ZU, Muly EC, Molecular mechanisms of working memory. ***Behav Brain Res*** 219 (2011) 329-341.

[12] Leriche M, Méndez M, Zimmer L, Bérod A, Acute ethanol induces Fos in GABAergic and non-GABAergic forebrain neurons: a double-labeling study in the medial prefrontal cortex and extended amygdale. ***Neuroscience*** 153 (2008) 259-267.

[13] Lovinger DM, Serotonin's role in alcohol's effects on the brain. ***Alcohol Health Res World*** 21 (1997) 114-120.

[14] Lyvers M, Tobias-Webb J, Effects of acute alcohol consumption on executive cognitive functioning in naturalistic settings. ***Addict Behav*** 35 (2010) 1021-1028.

[15] McNab F, Klingberg T, Prefrontal cortex and basal ganglia control access to working memory. ***Nat Neurosci*** 11 (2008) 103-107.

[16] Moulton PL, Petros TV, Apostal KJ, Park RV, Ronning EA, King BM, Penland JG, Alcohol-induced impairment and enhancement of memory: A test of the interference theory. ***Physiol Behav*** 85 (2005) 240-245.

[17] Mukherjee S, Das SK, Vaidyanathan K, Vasudevan DM, Consequences of alcohol consumption on neurotransmitters -an overview. ***Curr Neurovasc Res*** 5 (2008) 266-272.

[18] Olsen CM, Duvauchelle CL, Intra-prefrontal cortex injections of SCH 23390 influence nucleus accumbens dopamine levels 24 h post-infusion. ***Brain Res*** 922 (2001) 80-6.

[19] Oscar-Berman M, Marinković K, Alcohol: Effects on neurobehavioral functions and the brain. ***Neuropsychol Rev*** 17 (2007) 239-257.

[20] Pedigo SF, Song EY, Jung MW, Kim JJ, A computer vision-based automated Figure-8 maze for working memory test in rodents. ***J Neurosci Methods*** 156 (2006) 10-16.

[21] Pohorecky LA, Brick J, Pharmacology of ethanol. ***Pharmacol Ther*** 36 (1988) 335-427.

[22] Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR, Rassouli Y, Ethanol state-dependent memory: Involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. ***Neurobiol Learn Mem*** 89 (2008) 441-447.

[23] Rezayof A, Motevasseli T, Rassouli Y, Zarrindast MR, Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. ***Life Sci*** 80 (2007) 285-292.

[24] Rodrigues LC, Conti CL, Nakamura-Palacios EM Clozapine. SCH 23390 prevent the spatial working memory disruption induced by Δ9-THC administration into the medial prefrontal cortex. ***Brain Res*** 1382 (2011) 230-237.

[25] Romanides AJ, Duffy P, Kalivas PW, Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. ***Neuroscience*** 92 (1999) 97-106.

[26] Santín LJ, Rubio S, Begega A, Arias JL, Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks. ***Alcohol*** 20 (2000) 149-159.

[27] Saults JS, Cowan N, Sher KJ, Moreno MV, Differential effects of alcohol on working memory: distinguishing multiple processes. ***Exp Clin Psychopharmacol*** 15 (2007) 576-587.

[28] Shojaee A, Taherianfard M, Sharifi M, Can ovariectomy and learning affect prefrontal cortex GABAAα1 receptor distribution in passive avoidance model in rats? ***Physiol Pharmacol*** 16 (2012) 319-27.

[29] Silvers JM, Tokunaga S, Berry RB, White AM, Matthews DB, Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. ***Brain Res Brain Res Rev*** 43 (2003) 275-284.

[30] Stancampiano R, Carta M, Cocco S, Curreli R, Rossetti ZL, Fadda F, Biphasic effects of ethanol on acetylcholine release in the rat prefrontal cortex. ***Brain Res*** 997 (2004) 128-132.

[31] Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Morris RG, The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*** 369 (2013) 20130288.

[32] Tu Y, Kroener S, Abernathy K, Lapish C, Seamans J, Chandler LJ, Woodward JJ, Ethanol inhibits persistent activity in prefrontal cortical neurons. ***J Neurosci*** 27 (2007) 4765-4775.

[33] Valenzuela CF, Alcohol and Neurotransmitter Interactions. ***Alcohol Health Res World*** 21 (1997) 144-148.

[34] Yoon T, Okada J, Jung MW, Kim JJ, Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. ***Learn Mem*** 15 (2008) 97-105.

[35] Zimmermann M, Ethical consideration in relation to pain in animal experimentation. ***Acta Physiol Scand Suppl*** 554 (1986) 221-233.