



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

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

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

پذیرش: ۲۳ دی ۹۲

دریافت: ۲۳ مهر ۹۲

چکیده

مقدمه: اتانول می‌تواند طیف وسیعی از اثرات نوروفیزیولوژیک را از طریق تداخل با عمل چندین سیستم نوروترانسمیتری و اختلال در تعادل میانجی‌های مهارتی 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 صحرائی بررسی می‌نماید.
روش‌ها: موش‌های صحرائی نر بالغ (۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم) نژاد ویستار در گروه‌های دریافت‌کننده سالین (i.p)، سالین (i.c)، اتانول (۳۰٪، 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 ۸، 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.
یافته‌ها: اتانول (۱۰٪، i.p) فاقد اثر معنی‌داری بود اما عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان، ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تجویز اتانول (۲۰٪، i.p) ($P < 0.05$) و ۱۵ دقیقه پس از تجویز اتانول (۳۰٪، i.p) ($p < 0.001$)، کاهش یافت. تجویز i.c اتانول ۳۰٪ فقط در روز اول موجب کاهش عملکرد حافظه کاری فضایی شد ($P < 0.001$).
نتیجه‌گیری: 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 ۸

مقدمه

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

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

feridoni@um.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

مزمّن 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.

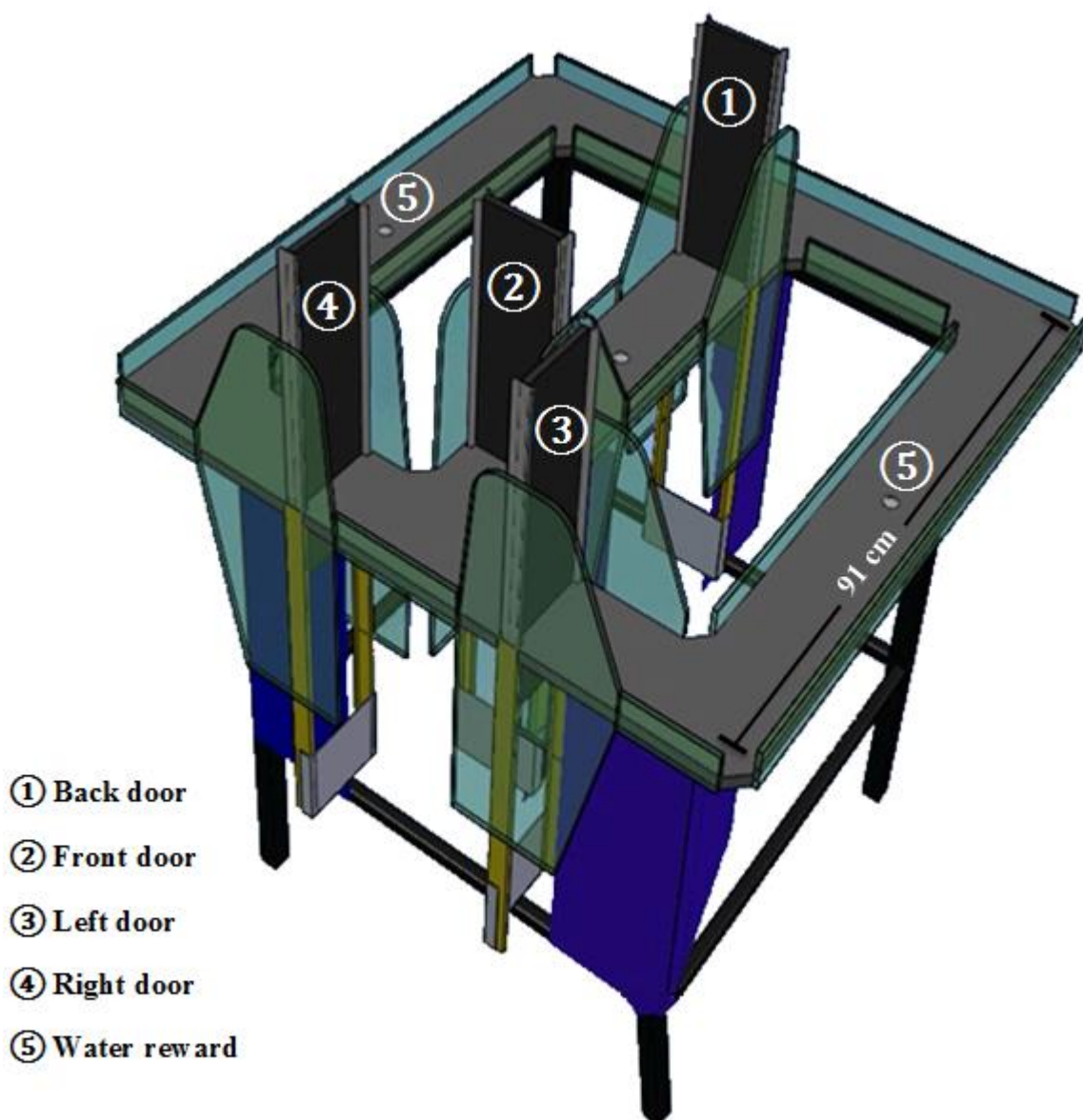
مواد و روش ها

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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، 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 آزمایش‌ها 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 $1/5 \text{ g/kg}$ از اتانول ۱۰٪ (i.p.)، دو گروه دریافت کننده دوز $1/5 \text{ g/kg}$ از اتانول ۲۰٪ (i.p.)، گروه دریافت کننده دوز 3 g/kg از اتانول ۲۰٪ (i.p.)، گروه دریافت کننده دوز 3 g/kg از اتانول ۳۰٪ (i.p.)، گروه دریافت کننده دوز 5 g/kg از اتانول ۳۰٪ (i.p.) و گروه دریافت کننده $0.6 \mu\text{l}$ 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 3 g/kg از اتانول ۳۰٪) مورد استفاده قرار گرفت. از آنجائیکه اتانول قابلیت انحلال در چربی دارد، ابتدا

کاری نیز مؤثر باشد. 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 مهارتی 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 مزمّن مشاهده شده است [۳۲]. حافظه کاری بواسطه مصرف حاد و مزمّن 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 مزمّن اتانول [۲۷] و اختلال عملکردهای شناختی مرتبط با قشر پیش‌پیشانی در مواجهه با اتانول حاد و



شکل ۱- طرحی از دستگاه اتوماتیک ماز 8.

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:

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.

$$0.3 \text{ g} \times 0.3 \text{ ml/g} = \frac{1.5 \text{ g} \times 200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} = 0.3 \text{ ml} \times 0.3 \text{ g/kg} = \text{وزن موش} \times 0.3 \text{ g/kg} = \text{حجم تجویز داخل صفاقی}$$

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 ۸ می باشد. ماز دارای چهار درب آکرلیک 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 می شود (شکل ۱). در این پژوهش به منظور آشنایی حیوانات با فضای دستگاه ماز ۸ حیوانات به مدت ۱۵ تا ۱۹ روز در این دستگاه قرار گرفتند. در خصوص اصول کار دستگاه ماز ۸ 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 ۸ شامل سه مرحله خوگیری (Habituation)، شکل دهی (Shaping) و آزمون اصلی (Test) می باشد. مرحله خوگیری برای آشنایی حیوان با شرایط دستگاه ماز ۸ و صداهایی که در حین کار با دستگاه (از جمله صدای باز و بسته شدن دربها) ایجاد می شود و شناسایی محل پاداش آب در کف راهروهای دستگاه، طراحی شده است. در این مرحله دستگاه طوری برنامه ریزی می شود که دربها بصورت تصادفی باز و بسته شوند و آب نیز برای پاداش بطور تصادفی درون هر یک از ظرف های 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 شکل دهی، حیوان چگونگی عملکرد در ماز ۸ را آموزش می بیند. بدین ترتیب که پس از اعمال تأخیر زمانی مشخص در راهروی مرکزی، تنها درب جلویی و یکی از درب های طرفی (راست یا چپ) باز می شود و حیوان فقط یک راه برای انتخاب دارد. حیوان در هر بار

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

جهت تجویز درون مغزی، قشر پیش پیشانی موش های صحرایی بصورت دوطرفه کانول گذاری شد. بدین منظور حیوانات با تجویز داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بی هوش 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 پیش پیشانی) بصورت $AP=3.2 \text{ mm}$ (قدامی خلفی: $3/2$ میلی متر از برگما به سمت قدامی)، $L=\pm 0.8 \text{ mm}$ (میانی جانبی: $0/8$ میلی متر به سمت چپ یا راست برگما) و $V=3.5 \text{ mm}$ (پشتی شکمی: $3/5$ میلی متر از سطح جمجمه به سمت عمق) بر سطح جمجمه مشخص گردید. سپس دو کانول راهنما، تهیه شده از سرسوزن های شماره ۲۲ (بصورت دوطرفه) $0/5 \text{ mm}$ بالاتر از مکان تجویز قرار گرفتند. سپس اطراف این کانول ها و کل سطح جمجمه با سیمان دندان پزشکی پوشانده شد و به منظور جلوگیری از مسدود شدن کانول ها، سرسوزن شماره ۳۰ در آن ها 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 خارج گردید و با سوزن تجویز که طول آن $0/5$ میلی متر بیشتر از کانول راهنما بود، جایگزین گردید. سوزن تجویز توسط یک رابط پلی اتیلنی به سرنگ هاملتون ($5 \mu\text{l}$) وصل شد و طی مدت زمان 120 ثانیه به آرامی حجمی معادل $0/6 \mu\text{l}$ از سالین یا داروی مورد نظر به درون قشر پیش پیشانی حیوان تجویز شد [۱۸]. برای اطمینان از جذب کامل دارو به داخل بافت مغزی، 60 ثانیه دیگر هم در نظر گرفته شد و 5 دقیقه پس از تجویز درون مغزی، حیوان برای انجام آزمایش های رفتاری مربوط به حافظه کاری (Working Memory) در دستگاه ماز ۸ 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 ۸ انجام شد.

دستگاه ماز ۸ مشابه با نمونه های بکار گرفته شده در تحقیقات مربوط به حافظه کاری [۲۰] و طراحی و مشاوره

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.

یافته‌ها

با توجه به شکل ۲، نتایج حاصل از سنجش حافظه کاری توسط ماز ۸، 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 ۸ 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 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)].

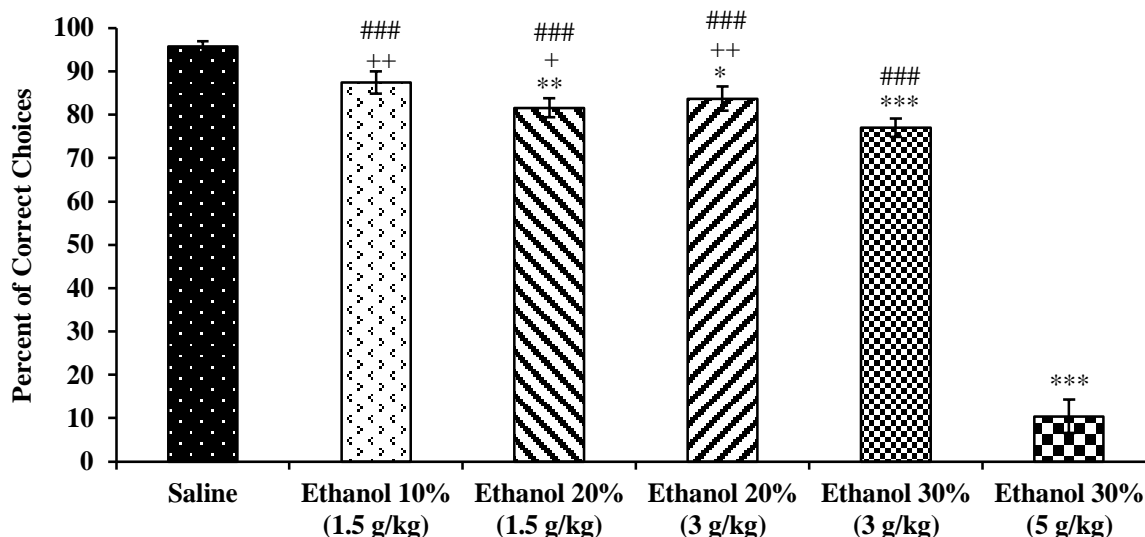
از طرفی با توجه به شکل ۳، نتایج بیانگر آن بود که عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز g/kg ۱/۵ از اتانول ۱۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالین، طی سنجش حافظه کاری توسط

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 پستی 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 پستی وارد راهروی طرفی سمت مقابل گردد. این مسیر، خطای لبه پستی (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 زمان ۳۰ دقیقه با تعداد ۳ تا ۴ خطای لبه پستی ($\geq 10\%$) انجام دهد، در دستگاه ماز ۸ 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 پستی ($\geq 10\%$) انجام دهد، ظرف ۴ تا ۶ روز صورت گرفت.

در دستگاه ماز ۸، تعداد دورها، تعداد انتخاب‌های درست، تعداد انتخاب‌های نادرست (انتخاب‌های متوالی یک بازو) هر دور و مدت زمان در هر مرحله بر روی صفحه نمایشگری که به دستگاه متصل است، ثبت می‌گردد [۲۰].

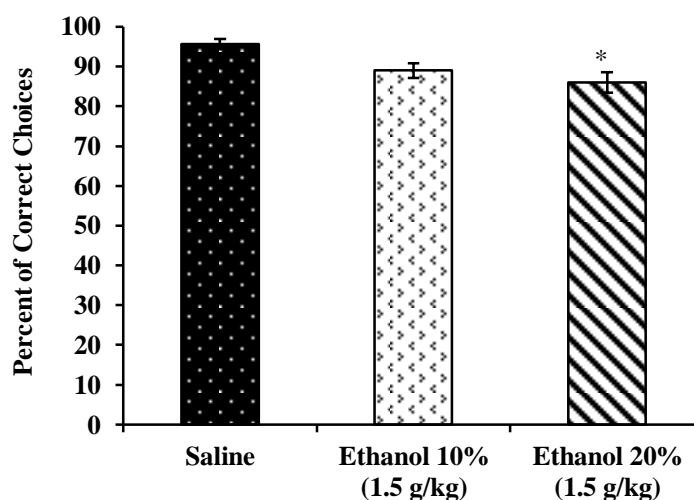
یک روز پس از اتمام مرحله آزمون اصلی در دستگاه ماز ۸، تجویزهای داخل صفاقی و جراحی جهت تجویزهای درون مغزی در گروه‌های مختلف انجام گردید. سپس ۱۵ یا ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی و ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی، مرحله آزمون برای هر موش انجام گرفت.

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 $mean \pm SEM$ ارائه شده



Working Memory Performance 15 min after i.p Administration

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 ۸. نتایج نشان داد، عملکرد حافظه کاری فضایی در حیوان، ۱۵ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای ۳ g/kg و ۱/۵ از اتانول ۲۰٪ و ۵ g/kg و ۳ از اتانول ۳۰٪، در مقایسه با سالیین کاهش معنی داری 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 سالیین (i.p)، $P<0.01$ و $P<0.05$ در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز ۳ g/kg از اتانول ۳۰٪ و $P<0.001$ در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز ۵ g/kg از اتانول ۳۰٪.

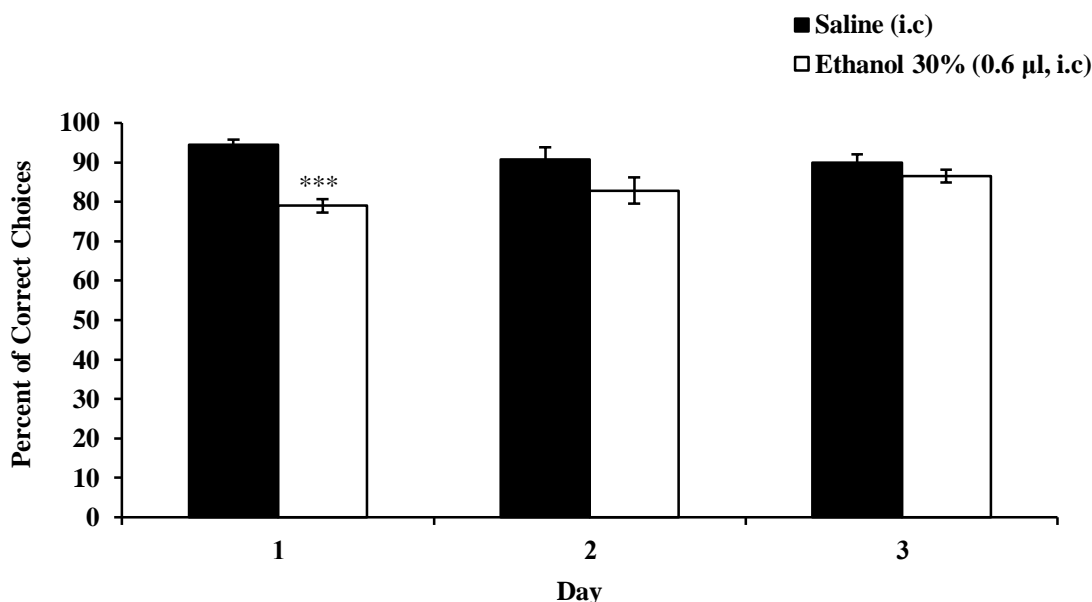


Working Memory Performance 30 min after i.p Administration

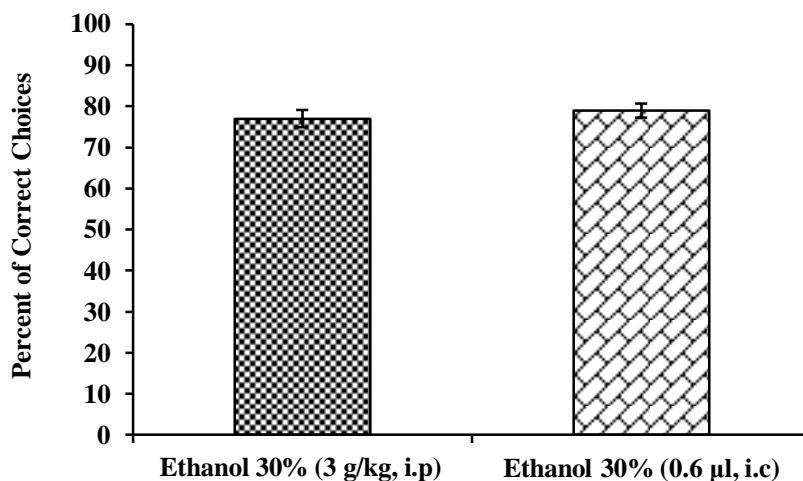
شکل ۳- عملکرد حافظه کاری فضایی ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۱۰٪ و ۲۰٪ طی آزمون رفتاری در ماز ۸. نتایج نشان داد عملکرد حافظه کاری فضایی در حیوان، ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۲۰٪ در مقایسه با سالیین کاهش معنی داری یافت. داده‌ها به صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (n=7) و $P<0.05$ در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.p).

با توجه به نتایج حاصل از شکل ۲، مؤثرترین دوز اتانول، دوز ۳ g/kg 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

ماز ۸ تغییر معنی داری نداشت. اما کاهش معنی داری در عملکرد حافظه کاری فضایی حیوان، ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۱/۵ g/kg از اتانول ۲۰٪ در مقایسه با تجویز داخل صفاقی سالیین مشاهده گردید ($P<0.05$)، (شکل ۳).



شکل ۴- عملکرد حافظه کاری فضایی، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ طی آزمون رفتاری در ماز ۸ 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 سالیین کاهش معنی‌داری یافت. تغییرات عملکرد حافظه کاری در مقایسه با سالیین 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 سالیین (i.c).



شکل ۵- 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 ۸. 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 ۸ 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 سالیین، در روز اول کاهش معنی‌داری یافت (P<0.001)، اما در روزهای دوم و سوم تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴).

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

اما نتایج حاصل از سنجش حافظه کاری توسط ماز ۸، ۵ دقیقه پس از تجویز درون مغزی ۰/۶ µl از اتانول ۳۰٪ در قشر پیش‌پیشانی در روز اول، در مقایسه با سنجش حافظه کاری ۳۰٪

۳۰٪ در روز اول، در مقایسه با سنجش حافظه کاری ۳۰٪

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 ۳ g/kg از اتانول ۲۰٪ و ۳۰٪ اثرات سرکوب کننده معنی داری بر عملکرد حافظه کاری فضایی دارد.

نظر به ایجاد اختلال در حافظه فضایی و یا حافظه کاری که با روش‌های مرتبط با هیپوکامپ طی تجویز اتانول ۱۰٪ مشاهده شده‌اند [۲] و عدم بروز تغییرات معنی دار برای همین میزان اتانول در عملکرد حافظه کاری فضایی طی سنجش با ماز ۸ (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 نوروهای موجود در قشر پیش‌پیشانی 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 پیش‌پیشانی ۰/۶ μl 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 انتقال-دهنده‌های 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 انتقال-دهنده‌های عصبی مختلف در مغز از جمله سروتونین، دوپامین، استیل کولین، نورآدرنالین، گابا و اپیوئیدهای درون‌زاد بر

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 ۱/۵ g/kg 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 ۱/۵ g/kg 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). آنچنان که 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 ۳ g/kg از اتانول ۲۰٪ و نیز ۳۰٪ در مقایسه با سالین سبب کاهش معنی داری در عملکرد حافظه کاری شد ($P < 0.05$ و $P < 0.001$)، (شکل ۲). همچنین به دلیل مشاهده کاهش معنی دار در عملکرد حافظه کاری حیوان پس از تجویز داخل صفاقی دوز ۳ g/kg 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 ۵ g/kg از اتانول ۳۰٪، این دوز برای تجویز درون

است و از آنجایی که این انتقال دهنده‌های 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 انتقال دهنده‌های دوپامینرژیک، تداخل با مسیرهای گابارژیک 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 پیش‌پیشانی $0.6 \mu\text{l}$ 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 پیش‌پیشانی 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.

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 صحرائی 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 حافظه کاری 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 انتقال دهنده عصبی گابا بر عملکرد قشر پیش‌پیشانی تأثیر می‌گذارد [۲۴]. مصرف حاد اتانول عملکرد مهارتی انتقال دهنده عصبی گابا را تقویت می‌کند [۵]. اتانول نورون‌های گابارژیک را در نواحی خاصی از مغز که در رفتارهای انگیزشی نقش دارند از جمله قشر پیش‌پیشانی 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 گابارژیک قشر پیش‌پیشانی بر عملکرد حافظه کاری اثر می‌گذارد، درواقع عملکرد صحیح حافظه کاری نیازمند تعادل دقیق این دو انتقال دهنده 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 انتقال دهنده‌های دوپامینرژیک و سروتونرژیک حساس می‌باشد [۱۳]. با توجه به اینکه نقش سیستم کولینرژیک، دوپامینرژیک، گلوتاماترژیک، گابارژیک و سروتونرژیک قشر پیش‌پیشانی در حافظه کاری اثبات شده

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, Béroud 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, Apostol 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] Rezaïof 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] Rezaïof 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 Δ^9 -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] Sauls 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 GABA α 1 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, Duzskiewicz 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.