

بررسی نقش گیرنده سروتونرژیک $5-HT_4$ ناحیه CA3 هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرایی در مدل ماز بعلاوه شکل مرتفع

امین چاروسایی^{۱*} و هاب باباپور^۱ محمدرضا زرین‌دست^۲ محمد ناصحی^۳

(۱) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) مرکز ملی مطالعات اعتیاد ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

(۳) مرکز تحقیقات علوم شناختی و اعصاب، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ فروردین ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۶ تیر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد گیرنده‌های سروتونرژیک هیپوکمپ نقش بسیار مهمی در شکل‌گیری حافظه هیجانی دارند، لذا لازم است نقش تمامی گیرنده‌های سروتونرژیک هیپوکمپ در شکل‌گیری حافظه هیجانی به صورت مجزا و با استفاده از مدل‌های رفتاری مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش گیرنده سروتونرژیک $5-HT_4$ ناحیه CA3 هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرایی بود. **روش کار:** ۱۰۲ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به ۱۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. به کمک دستگاه استریوتاکسی دو کانول راهنما در نواحی هیپوکمپ شکمی چپ و راست قرار داده شد. در زمان آزمون رفتاری و پس از تزریق سالین، آگونیست و/یا آنتاگونیست گیرنده $5-HT_4$ ، از دستگاه ماز بعلاوه شکل مرتفع برای سنجش حافظه هیجانی استفاده شد. **نتایج:** تزریق پیش از آزمون آگونیست گیرنده $5-HT_4$ (۱/۲ $\mu\text{g}/\text{rat}$) و آنتاگونیست گیرنده $5-HT_4$ (۱/۲ $\mu\text{g}/\text{rat}$) (RS۶۷۳۳۳) و آنتاگونیست گیرنده $5-HT_4$ (۱/۲ $\mu\text{g}/\text{rat}$) (RS۲۳۵۹۷) در ناحیه CA3 هیپوکمپ شکمی، هر دو باعث افزایش OAT% و OAE% شدند، در حالی که تنها RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ باعث کاهش معنی‌دار CAE شد که نشان دهنده اختلال در شکل‌گیری حافظه است. همچنین تزریق دوز مشابه از هر دو دارو (۱/۲ $\mu\text{g}/\text{rat}$) بیش از آزمون مجدد، باعث افزایش OAT% و OAE% شد که نشان دهنده ممانعت از به یادآوری حافظه شکل گرفته در روز نخست است. **نتیجه‌گیری نهایی:** یافته‌ها نشان داد که در زمان مواجهه با شرایط استرس‌زا و بروز هیجان‌ات، گیرنده سروتونرژیک $5-HT_4$ ناحیه CA3 هیپوکمپ نقش مهمی در روند شکل‌گیری و به یادآوری حافظه دارد.

واژه‌های کلیدی: گیرنده $5-HT_4$ ، هیپوکمپ شکمی، موش صحرایی، حافظه هیجانی، ماز بعلاوه شکل مرتفع

مقدمه

هیپوکمپ شکمی می‌فرستند (۱۰، ۵)، و ثابت شده است که آکسون‌های سروتونرژیک بیشترین تراکم را در ناحیه CA3 هیپوکمپ دارند، در حالیکه به ترتیب در نواحی شکنج دنداندار و CA1 با تراکم کمتری دیده می‌شوند (۹، ۱۳).

گیرنده‌های سروتونرژیک بر اساس ویژگی‌های فارماکولوژیک، توالی اسیدهای آمینه، سازماندهی ژنی و مسیرهای جفت شدن با پیامبر ثانویه به هفت گروه اصلی ($5-HT_1$ - 7) تقسیم‌بندی می‌شوند (۴). تاکنون مشخص شده که گیرنده‌های $5-HT_{1A}$ ، $5-HT_{1B}$ ، $5-HT_2$ ، $5-HT_3$ ، $5-HT_4$ و $5-HT_5$ نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارند (۴). از بین گیرنده‌های سروتونرژیک، گیرنده $5-HT_4$ در تمام نواحی هیپوکمپ بیان می‌شود، اعتقاد بر این است که گیرنده $5-HT_4$ نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت گیرنده $5-HT_4$ باعث بهبود عملکرد شناختی در شماری از آزمون‌های رفتاری می‌شود (۳). در آزمون احترازی غیرفعال (Passive avoidance)، تزریق پس از آموزش آنتاگونیست‌های گیرنده $5-HT_4$ (SDZ۲۰۵۵۵۷ و GR۱۲۵۴۸۷) باعث بروز فراموشی در موش شده است، در حالیکه آگونیست‌های گیرنده $5-HT_4$ (BIMU ۱ و BIMU ۸) از بروز فراموشی جلوگیری کرده‌اند (۸). همچنین

حافظه‌ای که به واسطه برانگیزش هیجان‌ات شکل می‌گیرد معمولاً بهتر از حافظه وقایع معمولی به خاطر می‌آید (۷). این پدیده می‌تواند در به یادآوری منابع بالقوه خطر و پرهیز از آن‌ها مفید باشد. مطالعات علوم اعصاب نشان داده‌اند که اثر هیجان‌ات بر حافظه در پی فعالیت و تعامل آمیگدال و هیپوکمپ رخ می‌دهد (۲۸، ۲۵، ۳۰). هیپوکمپ یکی از ساختارهای مهم مغز و بخشی از سیستم لیمبیک است که به همراه ساختارهای مجاور خود یعنی آمیگدال و قشر انتوریال نقش اساسی در سطح هوشیاری، مسیریابی، حافظه فضایی و حافظه وقایعی دارند (۳۱). همچنین شواهد گسترده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد هیپوکمپ نقش بسیار مهمی در ذخیره حافظه مربوط به رویدادهای هیجانی دارد (۲۳، ۶)، و حالت‌های هیجانی مثل ترس و حالت احتراز می‌توانند با تقویت و یا تضعیف شکل‌گیری حافظه تنظیم شوند (۱۴).

پیشنهاد شده است که نوروترنسمیترهایی نظیر نوراپی نفرین و سروتونین در کدگذاری حافظه هیجانی دخالت دارند (۱۸). جسم سلولی نورون‌های سروتونرژیک به طور عمده در هسته رافه، واقع در ساقه مغز، قرار دارند و آکسون‌های خود را تقریباً به تمام نواحی مغز و بخصوص



نظر به حجم ۰/۳ ml در هر طرف و در طی مدت ۶۰ ثانیه تزریق شد، تا در طی این مدت، محلول دارویی به خوبی در بافت ناحیه CA۳ منتشر شده و از بازگشت دارو به بیرون از کانول جلوگیری شود. در طول زمان تزریق به حیوان اجازه داده می‌شد تا آزادانه روی میز کار حرکت کند، این کار استرس زمان تزریق را به حداقل می‌رساند (۲۲).

دستگاه ماز بعلاوه شکل مرتفع و روش انجام آزمون رفتاری: از جمله دستگاه‌هایی که برای سنجش حافظه هیجانی استفاده می‌شود ماز بعلاوه شکل مرتفع است (۲). دستگاه EPM از جنس چوب و دارای چهار بازو و به شکل بعلاوه (+) است. ابعاد بازوهای باز و بسته ۵۰×۱۰ cm است که به یک محدوده مرکزی ۱۰×۱۰ cm متصل‌اند. در دو طرف و انتهای بازوهای بسته دیوارهایی به ارتفاع ۴۰ cm قرار دارند. برای جلوگیری از سقوط موش‌ها از بالای ماز، در دو طرف و انتهای بازوهای باز لبه‌هایی به ارتفاع ۱ cm قرار دارند. ماز به وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ cm از سطح زمین قرار می‌گیرد. محل قرارگیری ماز اتاقی مجزا و عایق صدا است که روشنایی آن به وسیله یک لامپ ۶۰ w که در ارتفاع ۱۲۰ cm از مرکز ماز قرار دارد، تأمین می‌شود (۱). در طی آزمون هر موش در مرکز ماز و رو به یکی از بازوهای باز قرار داده شده و در مدت زمان پنج دقیقه‌ای که حیوان به طور آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کرد چهار پارامتر؛ تعداد ورود به بازوهای باز (Open arms entry; OAE)، تعداد ورود به بازوهای بسته (Close arms entry; CAE)، مدت زمان حضور حیوان در بازوهای باز (Open arms time; OAT) و مدت زمان حضور حیوان در بازوهای بسته (Close arms time; CAT)، به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شد. ورود به هر بازو زمانی ثبت می‌شد که هر چهار پای حیوان وارد بازوی مذکور شود. سپس برای هر حیوان درصد زمان حضور در بازوی باز (OAT%) و درصد ورود به بازوی باز (OAE%) به کمک فرمول‌های زیر محاسبه می‌شد:

$$\%OAT = OAT / (OAT + CAE) \times 100$$

$$\%OAE = OAE / (OAE + CAE) \times 100$$

افزایش معنی‌دار این دو پارامتر نشان دهنده تخریب حافظه هیجانی موش‌ها می‌باشد. در این تحقیق جهت بررسی حافظه هیجانی، تمامی آزمون‌های رفتاری به صورت آزمون/آزمون مجدد انجام شد. جهت بررسی اثرات داروها بر فرآیند کسب حافظه، تزریق پیش از آزمون (روز اول) صورت گرفت (۲۶) و جهت بررسی اثرات داروها بر روند به یادآوری خاطرات، تزریق پیش از آزمون مجدد (روز دوم) انجام شد (۲۷).

بافت شناسی: برای بررسی صحت کانول‌گذاری و تزریق پس از هر آزمایش، موش‌ها به وسیله محلول دی‌اتیل‌اتر عمیقاً بیهوش شده و در هر دو ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی مقدار ۰/۳ ml محلول متیلن‌بلو ۱٪ تزریق شد. سپس به کمک گیوتین سر موش‌ها جدا شده و مغز آن‌ها از داخل جمجمه خارج می‌شد و به سرعت به یک ظرف درب‌دار محتوی محلول فرمالین بافری ۱۰٪ منتقل می‌شد. پس از گذشت پنج روز به

نشان داده شده است که تزریق پیش از آزمون RS۶۷۳۳۳ و RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ به ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی موش، هر دو باعث تخریب حافظه در مدل رفتاری صفحه سوراخ‌دار (Hole board) شده‌اند (۲۱).

با در نظر گرفتن شواهد فوق، و جهت مطالعه نقش برانگیختگی هیجانانگیز شرایط اضطراب‌زا بر حافظه موش‌های صحرایی؛ هدف از این تحقیق بررسی نقش گیرنده سروتونرژیک ۵-HT-۵ ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی در کسب و به یادآوری حافظه در مدل رفتاری ماز بعلاوه شکل مرتفع (Elevated plus-maze; EPM) می‌باشد.

مواد و روش کار

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن تقریبی ۲۴۰-۲۲۰ gr استفاده شد. موش‌ها از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (تهران-ایران) خریداری شدند. اتاق حیوانات دارای شرایط محیطی استاندارد (دمای کنترل شده ۲۲±۲ °C و رطوبت ۴۵-۵۵٪) و دوره‌های ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی (روشنایی از ساعت هفت صبح) بود. غذای فشرده شده مخصوص موش صحرایی و آب تصفیه شده شهر در تمام مدت نگهداری، بجز زمان جراحی و به هنگام آزمون رفتاری، در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت.

داروها: داروهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند عبارت بودند از، RS۶۷۳۳۳ (آگونیست انتخابی گیرنده ۵-HT-۵) و RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ (آنتاگونیست انتخابی گیرنده ۵-HT-۵) ساخت شرکت تاکریس (Tocris Bioscience, Bristol, UK). هر دو دارو قبل از استفاده در هر آزمایش، در سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ استریل حل می‌شدند (۲۰).

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی: در ابتدا هر موش وزن شده و با تزریق درون صفاقی کت‌امین هیدروکلراید (mg/kg ۵۰) و زایلین (۴ mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می‌شد. سپس بر اساس اطلس Paxinos و Watson در سال ۲۰۰۹، دو کانول با گیج (Gauge) ۲۲ به طول ۱۳ cm به صورت دو طرفه و ۱ mm بالاتر از محل تزریق قرار داده می‌شد (۲۴). مختصات ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی عبارت است از: AP=-۴/۵، MI=±۵/۲ و DV=-۷/۶. کانول‌ها به کمک سیمان دندانپزشکی در جای خود محکم شده و جهت جلوگیری از انسداد کانول‌ها دو سیم استریل مسی در داخل آن‌ها قرار داده می‌شد. بعد از اتمام جراحی، پنج تا هفت روز به حیوان استراحت داده می‌شد تا استرس و آسیب بافتی احتمالی ناشی از جراحی بر طرف شود.

تزریق درون مغزی دارو: تزریق درون مغزی دارو به وسیله میکروسرنج همیلتون با حجم ۲ μl انجام شد. میکروسرنج به کمک یک کت‌دان تیوب نمره چهار به سرسوزن دندانپزشکی گیج ۲۷ به طول ۱۴ mm (۱ mm بلندتر از کانول راهنما) متصل شد تا ۱ mm فاصله بین انتهای کانول راهنما و ناحیه CA۳ جبران شود. در زمان تزریق، محلول دارویی مورد



کمک دستگاه ویبرواسلایس (Campden, Vibroslice MAV۵۲, Instrument, UK) برش‌های مغزی به ضخامت ۳۰ μm تهیه شده و محل عبور کانول‌ها و ناحیه تزریق دارو به کمک میکروسکوپ بیناکولار و مطابقت با تصویر مربوط به ناحیه CA₃ در اطلس استریوتاکسی Paxinos و Watson مورد بررسی قرار می‌گرفت.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: در این پژوهش چهار آزمایش انجام شد.

آزمایش (۱) بررسی اثر تزریق پیش از آزمون RS۶۷۳۳۳ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر شکل‌گیری حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: چهار گروه موش در این آزمایش استفاده شد. گروه اول سالیین و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف RS۶۷۳۳۳ (۱/۲ و ۰/۱۲ و ۰/۱۲ μg/rat) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکمپ شکمی دریافت کردند. پنج دقیقه پس از تزریق از موش‌ها تست حافظه به عمل آمد و ۲۴ ساعت بعد تست حافظه بدون تزریق دارو تکرار شد.

آزمایش (۲) بررسی اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS۶۷۳۳۳ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر به یادآوری حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: چهار گروه موش در این آزمایش استفاده شد. گروه اول سالیین و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف RS۶۷۳۳۳ (۱/۲ و ۰/۱۲ و ۰/۱۲ μg/rat) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکمپ شکمی دریافت کردند. روز اول آزمون رفتاری انجام شد تا حافظه هیجانی شکل بگیرد. ۲۴ ساعت بعد مقادیر مختلف دارو تزریق شده و پنج دقیقه پس از تزریق از موش‌ها تست حافظه به عمل آمد.

آزمایش (۳) بررسی اثر تزریق پیش از آزمون RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر شکل‌گیری حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: چهار گروه موش در این آزمایش استفاده شد. گروه اول سالیین و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ (۱/۲ و ۰/۱۲ و ۰/۱۲ μg/rat) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکمپ شکمی دریافت کردند. پنج دقیقه پس از تزریق از موش‌ها تست حافظه به عمل آمد و ۲۴ ساعت بعد تست حافظه بدون تزریق دارو تکرار شد.

آزمایش (۴) بررسی اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر به یادآوری حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: چهار گروه موش در این آزمایش استفاده شد. گروه اول سالیین و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ (۱/۲ و ۰/۱۲ و ۰/۱۲ μg/rat) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکمپ شکمی دریافت کردند. روز اول آزمون رفتاری انجام شد تا حافظه هیجانی شکل بگیرد. ۲۴ ساعت بعد مقادیر مختلف دارو تزریق شده و پنج دقیقه پس از تزریق از موش‌ها تست حافظه به عمل آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. با استفاده از تست کولموگوروف-اسمیرنوف

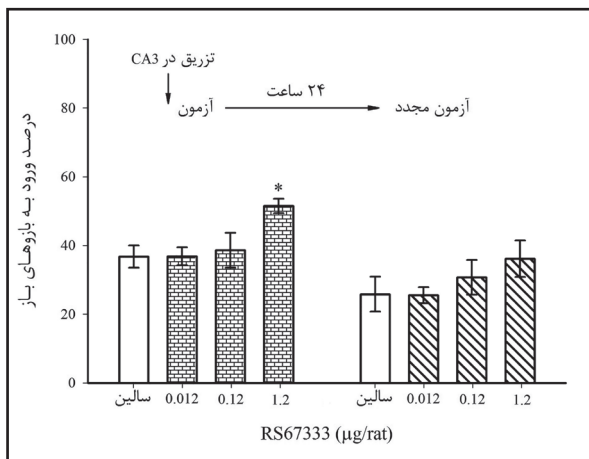
نتایج

اثرات تزریق پیش از آزمون RS۶۷۳۳۳ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: تجزیه و تحلیل آماری نتایج این آزمایش به کمک آنالیز واریانس اندازه‌گیری مکرر نشان داد که تزریق پیش از آزمون RS۶۷۳۳۳ باعث افزایش معنی‌دار OAT% {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۲/۹۱, P > ۰/۰۵$; بین گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۳۴/۷, p \leq ۰/۰۰۱$ }، OAE% {تصویر ۱} و {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۸/۲, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۰/۳۶, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۳/۴۷, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {تصویر ۲} شده است ولی تغییر معنی‌داری در CAE {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۰/۳, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۴/۰۲, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۱/۹۶, p > ۰/۰۵$ } ایجاد نکرده است.

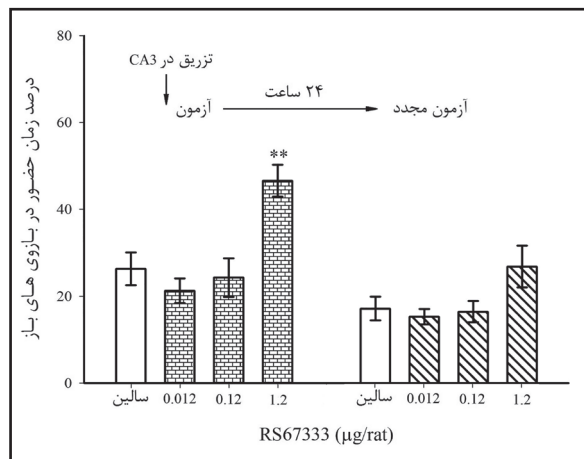
اثرات تزریق پیش از آزمون مجدد RS۶۷۳۳۳ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: تجزیه و تحلیل آماری نتایج این آزمایش به کمک آنالیز واریانس اندازه‌گیری مکرر نشان داد که تزریق پیش از آزمون مجدد RS۶۷۳۳۳ باعث افزایش معنی‌دار OAT% {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۳/۴۸, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۱/۹۹, p > ۰/۰۵$ }، {تصویر ۳} و OAE% {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۲/۵۸, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۶/۲۳, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۱/۶, p > ۰/۰۵$ }، {تصویر ۴} شده است ولی تغییر معنی‌داری در CAE {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۰/۳۶, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۲/۰۴, p > ۰/۰۵$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۱/۱۵, p > ۰/۰۵$ } ایجاد نکرده است.

اثرات تزریق پیش از آزمون RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ در ناحیه CA₃ هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرایی: تجزیه و تحلیل آماری نتایج این آزمایش به کمک آنالیز واریانس اندازه‌گیری مکرر نشان داد که تزریق پیش از آزمون RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ باعث افزایش معنی‌دار OAT% {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۲۰/۴۹, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۲۰/۴۹, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {تصویر ۱}، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۴۶/۰۸, p \leq ۰/۰۰۱$ }، {درون گروهی: $F(۳, ۲۴) = ۱۶/۰۸, p \leq ۰/۰۰۱$ }

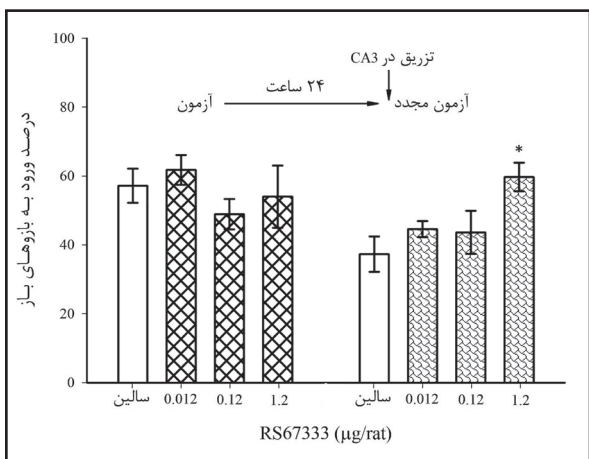




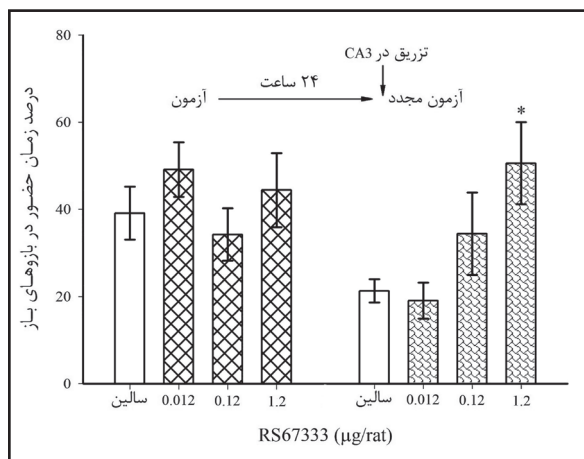
تصویر ۲. اثر تزریق پیش از آزمون RS67333 در ناحیه CA3 بر OAE%*. $p \leq 0.05$. نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالیین روز آزمون (روز اول) می‌باشد.



تصویر ۱. اثر تزریق پیش از آزمون RS67333 در ناحیه CA3 بر OAT%*. $p \leq 0.01$. نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالیین روز آزمون (روز اول) می‌باشد.



تصویر ۴. اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS67333 در ناحیه CA3 بر OAE%*. $p \leq 0.05$. نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالیین روز آزمون مجدد (روز دوم) می‌باشد.



تصویر ۳. اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS67333 در ناحیه CA3 بر OAT%*. $p \leq 0.05$. نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالیین روز آزمون مجدد (روز دوم) می‌باشد.

۴/۱۹ = F(۳، ۲۴) (تصویر ۸) شده است ولی تغییر معنی‌داری در CAE
 {دریون گروهی: $p > 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 0.24$; بین گروهی: $p < 0.01$ };
 ۷/۸۲ = F(۱، ۲۴) {دریون گروهی: $p > 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 2.75$ }; ایجاد
 نکرده است.

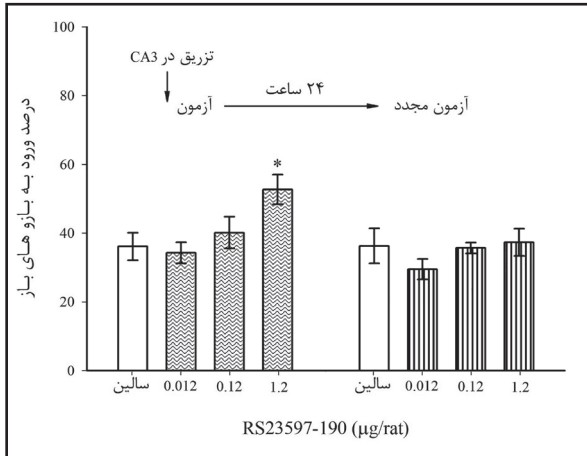
بحث

نتایج آزمایش دو و چهار نشان داد که به ترتیب تزریق پیش از آزمون
 مجدد RS67333 و RS23597-۱۹۰ به ناحیه CA3 هیپوکمپ شکمی
 باعث افزایش معنی‌دار OAT و OAE% نسبت به روز آزمون شده
 است، که نشان‌دهنده اختلال در به یادآوری خاطرات ناشی از تزریق این
 داروهاست. در تزریق پیش از آزمون RS67333 و RS23597-۱۹۰ به
 ترتیب در آزمایش‌های یک و سه نیز هر دو دارو باعث اختلال در کسب
 حافظه شده‌اند، در حالیکه تنها RS23597-۱۹۰ بطور معنی‌دار باعث
 کاهش فعالیت حرکتی رت‌ها شده است و RS67333 تغییری در فعالیت

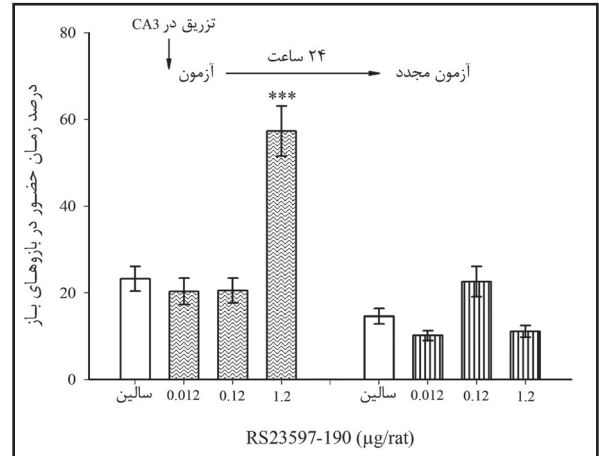
۳/۲۴ = F(۳، ۲۴) و OAE% (تصویر ۵) {دریون گروهی: $p > 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 1.53$ };
 بین گروهی: $p < 0.05$; $F(۱، ۲۴) = 5.26$ }; {دریون گروهی: $p < 0.05$ };
 ۳/۸۸ = F(۳، ۲۴) (تصویر ۶)، و کاهش معنی‌دار CAE {دریون گروهی:
 بین گروهی: $p < 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 6.24$ }; بین گروهی: $p < 0.05$; $F(۱، ۲۴) = 11.47$ };
 بین دریون گروهی: $p > 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 0.99$ }. نسبت به سالیین روز آزمون
 شده است.

اثرات تزریق پیش از آزمون مجدد RS23597-۱۹۰ در ناحیه CA3
 هیپوکمپ شکمی بر حافظه هیجانی موش‌های صحرائی: تجزیه و تحلیل
 آماری نتایج این آزمایش به کمک آنالیز واریانس اندازه‌گیری مکرر نشان
 داد که تزریق پیش از آزمون مجدد RS23597-۱۹۰ باعث افزایش معنی‌دار
 OAT% {دریون گروهی: $p < 0.01$; $F(۳، ۲۴) = 2.14$ }; بین گروهی:
 بین دریون گروهی: $p > 0.05$; $F(۱، ۲۴) = 0.9$ }; $F(۳، ۲۴) = 3.65$ };
 {تصویر ۷} OAE% {دریون گروهی: $p < 0.05$; $F(۳، ۲۴) = 6.05$ };
 بین دریون گروهی: $p < 0.05$; $F(۱، ۲۴) = 0.51$ }; $p > 0.05$ };

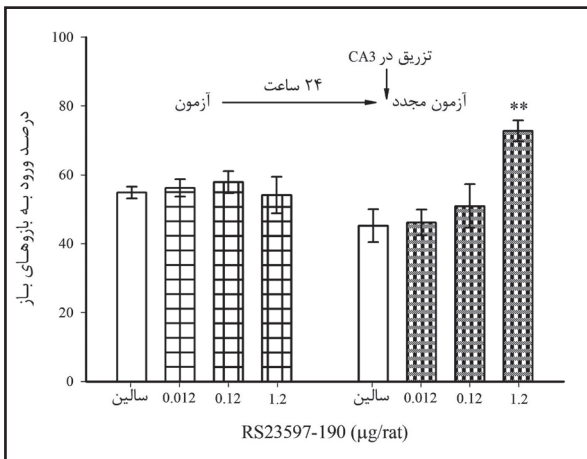




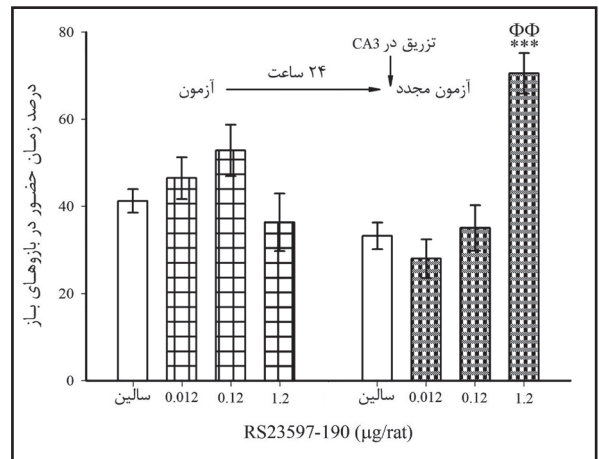
تصویر ۶. اثر تزریق پیش از آزمون RS23597-190 در ناحیه CA۳ بر %OAE. * $p \leq 0.05$ نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالین روز آزمون (روز اول) می‌باشند.



تصویر ۵. اثر تزریق پیش از آزمون RS23597-190 در ناحیه CA۳ بر %OAT. *** $p \leq 0.001$ نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالین روز آزمون (روز اول) می‌باشند.



تصویر ۸. اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS23597-190 در ناحیه CA۳ بر %OAT. ** $p \geq 0.01$ نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالین روز آزمون مجدد (روز دوم) می‌باشد.



تصویر ۷. اثر تزریق پیش از آزمون مجدد RS23597-190 در ناحیه CA۳ بر %OAT. *** $p \leq 0.001$ نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالین روز آزمون مجدد (روز دوم) و $\Phi\Phi$ $p \leq 0.01$ سطح اختلاف معنی‌دار نسبت به سالین روز آزمون (روز اول) می‌باشد.

سطح فعالیت حرکتی حیوان تأثیری ندارد (۲۰).

شواهد نشان می‌دهند که تزریق سیستمیک آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده ۵-HT_۳ نیز در تنظیم حافظه نقش دارند. در مطالعه‌ای، تزریق درون صفاقی RS۶۷۳۳۳ باعث تسهیل هر دو حافظه کوتاه مدت و بلند مدت شده است (۱۷). همچنین در مطالعه‌ای دیگر تزریق درون صفاقی SDZ۲۰۵۵۵۷ و GR۱۲۵۴۸۷ (آنتاگونیست‌های گیرنده ۵-HT_۳) باعث اختلال در حافظه اخترازی غیرفعال شده‌اند (۸).

گیرنده‌های ۵-HT_۳ در نواحی از مغز نظیر؛ هیپوکمپ، آمیگدال و عقده‌های قاعده‌ای قرار دارند (۱۹)، که تمرکز این گیرنده‌ها در این نواحی، با شواهدی که حاکی از اهمیت نقش آن‌ها در تنظیم حافظه است همخوانی دارد (۱۶، ۱۱). اثرات سودمند فعالیت گیرنده ۵-HT_۳ ممکن است به واسطه انتشار استیل‌کولین در قشر مخ تسهیل شود. فرآیند دیگری که منسوب به گیرنده ۵-HT_۳ است مربوط به متابولیسم پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید می‌باشد. در واقع گیرنده‌های ۵-HT_۳ باعث افزایش ساخت SAAPα

حرکتی ایجاد نکرده است.

در مطالعه‌ای که پیشتر نقش گیرنده ۵-HT_۳ را در فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار داده است، نشان داده شده که RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ باعث کاهش فعالیت حرکتی موش‌ها می‌شود، که این نتایج با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. اما بر خلاف نتایج مطالعه مذکور که نشان داده است ۵-HT_۳-MeOT (آگونیست گیرنده ۵-HT_۳) باعث افزایش فعالیت حرکتی شده است، آگونیست مورد استفاده در این پژوهش یعنی RS۶۷۳۳۳ تغییر در فعالیت حرکتی ایجاد نکرده است (۲۹).

Nasehi و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که در مدل رفتاری صفحه سوراخ‌دار، تزریق پیش از آزمون RS۶۷۳۳۳ و RS۲۳۵۹۷-۱۹۰ به ناحیه CA۳ هیپوکمپ شکمی موش، هر دو باعث تخریب حافظه شده‌اند، در حالیکه تغییری در فعالیت حرکتی حیوان ایجاد نکردند (۲۱). Nasehi همچنین نشان داد که تزریق پیش از آزمون این دو دارو به ناحیه CA۱ هیپوکمپ پستی باعث اختلال در کسب حافظه در موش می‌شود، ولی بر



References

- Ahmadi, H., Nasehi, M., Rostami, P., Zarrindast, M.R. (2013) Involvement of the nucleus accumbens shell dopaminergic system in prelimbic NMDA-induced anxiolytic-like behaviors. *Neuropharmacology*. 71: 112-123.
- Bertoglio, L.J., Joca, S.R.L., Guimarães, F.S. (2006) Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res*. 175: 183-188.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., Dumuis, A. (2004) 5-HT₄ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 3: 39-51.
- Buhot, M.C., Wolff, M., Segu, L. (2004) Serotonin. In: *From messengers to molecules: Memories are made of these*. Riedel, G., Platt, B. (eds.). (1st ed.) Springer Science & Business Media. New York, NY USA. p. 125-142.
- Charnay, Y., Léger, L. (2010) Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci*. 12: 471-487.
- Chegini, H.R., Nasehi, M., Zarrindast, M.R. (2014) 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*. 261: 114-126.
- Christianson, S.A. (1992) Remembering emotional events: Potential mechanisms. In: *The Handbook of Emotion and Memory: Research and Theory*. Christianson, S.A.(ed.). (1st ed.) Lawrence Erlbaum Associates. Hillsdale, NJ, USA. p. 307-340.
- Galeotti, N., Ghelardini, C., Bartolini, A. (1998) Role of 5-HT₄ receptors in the mouse passive avoidance test. *J Pharmacol Exp Ther*. 286: 1115-1121.
- Hensler, J.G. (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 30: 203-214.
- Lechin, F., van der Dijs, B., Lechin, M.E. (2002) *Neurocircuitry and Neuroautonomic Disorders: Reviews and Therapeutic Strategies*. (1st ed.) Karger Medical and Scientific Publishers. Basel, Switzerland. p. 3-4.

می‌شوند، که یک پپتید محافظ نوروئی (Neuroprotective peptide) است و رشد نورون‌ها و افزایش عملکرد حافظه را تسهیل می‌کند و همچنین از مسمومیت سلولی ناشی از انتقال عصبی بیش از اندازه در سیستم گلوتاماترژیک که باعث تضعیف رفتار شناختی می‌گردد جلوگیری می‌کند (۱۲).

در پژوهش حاضر RS۶۷۳۳۳ و RS۲۳۵۹۷-۱۹۰، هر دو باعث تخریب حافظه شده‌اند. اثرات همسوی این دو دارو در تعدادی از مطالعات پیشین نیز مشاهده شده است (۲۱، ۱۵). گیرنده‌های ۵-HT_۴ علاوه بر فعالیت طبیعی خود، یک فعالیت ساختاری مستقل از لیگاند نیز دارند، حتی اگر این عملکرد در سطح محدودی باشد. این فعالیت تفاوت بین انتظارات و مشاهدات اثرات ناشی از عملکرد آگونیست و آنتاگونیست گیرنده ۵-HT_۴ را توضیح می‌دهد. در این شرایط انتظار می‌رود برخی آگونیست‌ها اثرات نسبتاً آرام و یا آنتاگونیستی مربوط به میزان فعالیت مستقل از لیگاند از خود نشان دهند (۲۱).

یافته‌های این تحقیق نشان داد که آگونیست و آنتاگونیست گیرنده ۵-HT_۴ هر دو باعث اختلال در روند شکل‌گیری و به یادآوری حافظه شده‌اند. اثرات مشابه آگونیست و آنتاگونیست این گیرنده احتمالاً در نتیجه فعالیت مستقل از لیگاند آگونیست آن است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای وحید صبوری و سایر همکاران ایشان در پژوهش‌کنده علوم شناختی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌نماییم.

- Lezoualc'h, F., Berthouze, M. (2006) 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors as targets for drug discovery for dementia. In: *The Serotonin Receptors. From Molecular Pharmacology to Human Therapeutic*. Roth, B.L.(ed.). (1st ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA. p. 459-479.
- Lezoualc'h, F., Robert, S.J. (2003) The serotonin 5-HT₄ receptor and the amyloid precursor protein processing. *Exp Gerontol*. 38: 159-166.
- Mamounas, L.A., Mullen, C.A., O'hearn, E., Molliver, M.E. (1991) Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: Morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J Comp Neurol*. 314: 558-586.
- McGaugh, J.L. (2004) Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical



- comment on Biedenkapp and Rudy (2004) *Behav Neurosci.* 5: 1140-1142.
15. Mendez-David, I., David, D.J., Darcet, F., Wu, M.V., Kerdine-Römer, S., Gardier, A.M., Hen, R. (2014) Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology.* 39: 1366-1378.
 16. Meneses, A. (2003) A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT₁ to 5-HT₇ receptor subtypes function on a Pavlovian/instrumental autoshaped memory. *Learn Memory.* 10: 363-372.
 17. Meneses, A. (2007) 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.* 184: 81-90.
 18. Meneses, A., Liy-Salmeron, G. (2012) Serotonin and emotion, learning and memory. *Rev Neurosci.* 23: 543-553.
 19. Mengod, G., Vilaró, M.T., Cortés, R., López-Giménez, J.F., Raurich, A., Palacios, J.M. (2006) Chemical neuroanatomy of 5-HT receptor subtypes in the mammalian brain. In: *The Serotonin Receptors. From Molecular Pharmacology to Human Therapeutic.* Roth, B.L. (ed.). (1st ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA. p. 319-364.
 20. Nasehi, M. (2014) The modulatory effect of CA1 5HT₄ receptors on memory acquisition deficit induced by harmaline. *JPS.* 5: 61-71.
 21. Nasehi, M., Kafi, F., Khakpai, F., Zarrindast, M.R. (2015) Involvement of the serotonergic system of the ventral hippocampus (CA3) on amnesia induced by ACPA in mice. *Behav Brain Res.* 286: 356-363.
 22. Naseri, M.H., Hesami-Tackallou, S., Torabi-Nami, M., Zarrindast, M.R., Nasehi, M. (2014) Involvement of the CA1 GABAA receptors in MK-801-induced anxiolytic-like effects: an isobologram analysis. *Behav Pharmacol.* 25: 197-205.
 23. Pavlides, C., Watanabe, Y., McEwen, B.S. (1993) Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus.* 3: 183-192.
 24. Paxinos, G., Watson, C. (2009) *The rat brain in stereotaxic coordinate.* (1st ed.) Elsevier, academic Press. San Diego, CA, USA. p. 113.
 25. Richardson, M.P., Strange, B.A., Dolan, R.J. (2004) Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. *Nat Neurosci.* 7: 278-285.
 26. Stern, C., Carobrez, A., Bertoglio, L. (2008) Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Be.* 90: 545-550.
 27. Stern, C., Do Monte, F., Gazarini, L., Carobrez, A., Bertoglio, L. (2010) Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze re-test. *Neuroscience.* 170: 214-222.
 28. Strange, B., Dolan, R. (2004) β -Adrenergic modulation of emotional memory-evoked human amygdala and hippocampal responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 11454-11458.
 29. Takahashi, H., Takada, Y., Urano, T., Takada, A. (2002) 5-HT₄ receptors in the hippocampus modulate rat locomotor activity. *Hippocampus.* 12: 304-310.
 30. Tsoory, M., Vouimba, R., Akirav, I., Kavushansky, A., Avital, A., Richter-Levin, G. (2007) Amygdala modulation of memory-related processes in the hippocampus: potential relevance to PTSD. *Prog Brain Res.* 167: 35-51.
 31. Xiong, H. (2008) Hippocampus and spatial memory. In: *Neuroimmune Pharmacology.* Ikezu, T. and Gendelman, H. (eds.). (1st ed.) Springer Science & Business Media. New York, NY, USA. p. 55-64.



The Role of Ventral Hippocampal (CA3) 5-HT₄ Receptor in Rats Emotional Memory in Elevated Plus-Maze Task

Charousaei, A.^{1*}, Babapour, V.¹, Zarrindast, M. R.², Nasehi, M.³

¹Division of Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

²Iranian National Center for Addiction Studies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received 9 April 2018, Accepted 17 July 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Many studies have demonstrated the important role of hippocampal serotonergic receptors in the emotional memory formation. Therefore, it is necessary to investigate the possible role of hippocampal serotonergic receptors in emotional memory formation in several animal model tasks. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the possible role of ventral hippocampal (CA3) 5-HT₄ receptors in emotional memory formation of rats in elevated plus-maze task. **METHODS:** 102 male Wistar rats were divided to 16 groups (n=7), randomly. Two guide cannulae were implanted bilaterally, into the left and right hippocampi, using stereotaxic apparatus. At the test time and following the injections of saline, 5-HT₄ receptor's agonist and/or antagonist, the elevated plus-maze was used for evaluation of the emotional memory. **RESULTS:** A pre-test intra-CA3 injection of competitive agonist (RS67333; 1.2 µg/rat) and competitive antagonist (RS23597-190; 1.2 µg/rat) of 5-HT₄ receptor, increased OAT% and OAE% by themselves while only the RS23597-190 decreased the closed arm entries, indicating that these drugs impaired the memory formation. Also, a pre-retest intra-CA3 injection of RS67333 and RS23597-190 (1.2 µg/rat) increased OAT% and OAE% by themselves, indicating that these drugs prevented the recall of the memories that formed on first day. **CONCLUSIONS:** The results revealed that the hippocampal 5-HT₄ serotonergic receptor have an important role in memory formation and memory recall, at the time of emotional arousal and stressful situations.

Keyword: 5-HT₄ receptor, Ventral hippocampus, Rat, Emotional memory, Elevated plus-maze

Figure Legends and Table Captions

- Graph 1.** The effect of pre-test intra-CA3 injection of RS67333 on OAT%. **p<0.01 compared with saline-treated (1st day) rats.
- Graph 2.** The effect of pre-test intra-CA3 injection of RS67333 on OAE%. *p<0.05 compared with saline-treated (1st day) rats.
- Graph 3.** The effect of pre-retest intra-CA3 injection of RS67333 on OAT%. *p<0.05 compared with saline-treated (2nd day) rats.
- Graph 4.** The effect of pre-retest intra-CA3 injection of RS67333 on OAE%. *p<0.05 compared with saline-treated (2nd day) rats.
- Graph 5.** The effect of pre-test intra-CA3 injection of RS23597-190 on OAT%. ***p<0.001 compared with saline-treated (1st day) rats.
- Graph 6.** The effect of pre-test intra-CA3 injection of RS23597-190 on OAE%. *p<0.05 compared with saline-treated (1st day) rats.
- Graph 7.** The effect of pre-retest intra-CA3 injection of RS23597-190 on OAT%. ***p<0.001 compared with saline-treated (2nd day), and **p<0.01 compared with saline-treated (1st day) rats.
- Graph 8.** The effect of pre-retest intra-CA3 injection of RS23597-190 on OAE%. **p<0.01 compared with saline-treated (2nd day) rats.

*Corresponding author's email: aminz55@yahoo.com, Tel: 026-34208318, Fax: 021-66933222

