

Effects of Ethanol Preconditioning on Pentylentetrazole-induced Memory Impairment and Expression of NMDA Receptor NR1 Subunit mRNA in Rat

Azam Alinaghypour¹, Marziyeh Tavassoli¹, Elahe Seyed Hosseini², Abolfazl Ardjmand^{3*}

1.M.Sc Student in Medical Physiology, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

2.Ph.D Student in Reproductive Biology, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

3.Associate Professor, Ph.D of Neuroscience, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Received: 19 Jul 2017, Accepted: 2 Aug 2017

Abstract

Background: Neuronal damage following seizures and epilepsy is one of the main causes of disabilities and mortality worldwide. In recent years, preconditioning has been introduced as a novel strategy for the prevention of brain damage. Preconditioning is a phenomenon in which a minor noxious stimulus protects from a subsequent more severe insult. The aim of present study was to examine the effect of ethanol (Eth) preconditioning on pentylentetrazole (PTZ)-induced impairment memory in the inhibitory avoidance model.

Material and Methods: This study was carried out on 45 adult male Wistar rats (180-200 g). Animals were assigned into five groups: Control, Eth 0.25, Eth 0.5, PTZ and Eth (0.5) +PTZ (n=9, for all groups). Eth-preconditioning was induced 6 days before the injection of PTZ. The animals were tested in a single trial step-through inhibitory test in two sessions (train and test). Then locomotor activity of rats was recorded in the open-field apparatus and NR1 mRNA expression in the hippocampus was measured by real-time PCR technique.

Results: One-way ANOVA revealed that the Ethanol preconditioning did not impair inhibitory memory. Further, post-test analyses showed that Ethanol preconditioning significantly prevented from PTZ-induced memory impairment, and increased NR1 subunit mRNA expression in PTZ-induced memory impairment group. In addition, one-way ANOVA for the locomotor activity showed no significant difference between the groups.

Conclusion: Our results showed that a pre-conditioning treatment with Ethanol (0.5g/kg/day), 6 days before PTZ-induced memory impairment may provide a kind of neuroprotection in rats.

Keywords: Epilepsy, Ethanol, Inhibitory avoidance Memory, Preconditioning, Pentylentetrazole, Seizure

*Corresponding Author:

Address: Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Email: ardjmand_ab@kaums.ac.ir

اثر پیش شرطی سازی با اتانول بر اختلال حافظه ناشی از پنتیلین تترازول و بیان mRNA زیر واحد NR1 گیرنده NMDA در موش بزرگ آزمایشگاهی

اعظم علی فقی پور^۱، مرضیه توسلی^۱، الهه سادات سید حسینی^۲، ابوالفضل ارجمند^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. دانشجوی دکتری بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. دانشیار، دکتری علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۲۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: آسیب های نورونی به دنبال تشنج و صرع یکی از علل اصلی مرگ و میر و ناتوانی در سراسر جهان است. در سال های اخیر، پیش شرطی سازی به عنوان یک راهکار درمانی برای پیش گیری از این آسیب ها مطرح شده است. پیش شرطی سازی پدیده ای است که در آن یک محرک آسیب رسان ضعیف، سبب محافظت در برابر محرک آسیب رسان قوی تر بعدی می شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر پیش شرطی سازی اتانول بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از پنتیلین تترازول بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۴۵ موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم در ۵ گروه ۹ تایی شامل کنترل، Eth ۰/۲۵، Eth ۰/۵، PTZ، و گروه Eth (0.5)+PTZ قرار گرفتند. پیش شرطی سازی اتانول به مدت ۶ روز قبل از تخریب حافظه با PTZ ایجاد شد. سپس حیوانات در دستگاه یادگیری اجتنابی طی ۲ روز آموزش و آزمون بررسی شدند. فعالیت حرکتی حیوانات در دستگاه open field ثبت شد و بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 در هیپوکامپ با تکنیک Real-time PCR اندازه گیری شد.

یافته ها: آزمون آماری آنوای یک طرفه نشان داد پیش شرطی سازی اتانول حافظه اجتنابی حیوان را تخریب نکرد. همچنین آزمون تعقیبی نشان داد که پیش شرطی سازی اتانول به طور معناداری از تخریب حافظه توسط PTZ جلوگیری کرد و سبب افزایش بیان mRNA زیر واحد NR1 در حیوانات دریافت کننده PTZ شد. فعالیت حرکتی حیوانات گروه های مختلف تفاوت معناداری نداشت.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پیش شرطی سازی اتانول با دوز روزانه ۰/۵ گرم بر کیلوگرم شش روز قبل از اختلال حافظه اجتنابی ناشی از PTZ سبب نوعی محافظت نورونی در حیوان می شود.

واژگان کلیدی: صرع، اتانول، حافظه اجتنابی، پیش شرطی سازی، پنتیلین تترازول، تشنج

*نویسنده مسئول: ایران، کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

Email: ardjmand_ab@kaums.ac.ir

مقدمه

از دیدگاه نوروبیولوژی صرع نوعی بی نظمی مزمن عملکرد عصبی است که در نتیجه تخلیه همزمان بیش از حد سلول های مغزی ایجاد می شود. تخمین زده می شود که حدود ۵۰ میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا هستند (۱). شمار بزرگی از مبتلایان به صرع از کاهش یادگیری، ضعف در حافظه و اختلالات رفتاری رنج می برند. آثار منفی این بیماری کیفیت زندگی را کاهش داده و باعث کاهش حافظه بلند مدت و کوتاه مدت می شود (۲). از طرفی مشاهده شده است که نه تنها بیماری صرع اختلالات شناختی ایجاد می کند، بلکه داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری نیز می تواند دسته ی دیگری از اختلالات شناختی را سبب شود (۳). در مطالعه حاضر برای ایجاد مدل تشنج از پنتیلن تترازول (PTZ) استفاده شد. PTZ ترکیبی است که در ایجاد مدل تشنج به کار برده می شود و در ارزیابی فرایندهای دخیل در صرع و اثرات داروهای ضد تشنج حائز اهمیت بوده و قابلیت تخریب حافظه دارد (۴). در دهه های گذشته استراتژی های امیدوار کننده متفاوتی برای درمان بیماران با آسیب های حاد مغزی ناشی از صرع نشان شده است. یکی از این روش ها، «پیش شرطی سازی» است که به عنوان نوعی روش القا کننده تحمل در بهبود اختلالات ناشی از صرع مطرح می باشد. واژه پیش شرطی سازی اولین بار توسط جانوف معرفی شد. بر اساس این فرضیه هر محرکی که توانایی آسیب به بافت یا ارگانسمی را داشته باشد، زمانی که با مقادیری کمتر از حد آسیب زار بر بافت اعمال شود، مکانیسم های محافظتی اندوژنیک را فعال می کند و نوعی تحمل در بافت ایجاد می کند (۵). عوامل آسیب رسان زیادی از جمله ایسکمی، ترکیبات دارویی، تغییرات دما (هایپوترمی، هایپوترمی)، هایپوکسی و ترکیبات توکسیک از جمله اتانول توانایی ایجاد پیش شرطی در بافت دارند (۶). در این حقیقت که سوء مصرف اتانول سبب مشکلات وسیعی از جمله اختلال در عملکرد نورونی و آسیب مغزی می شود شکی نیست و اتانول با اثر بر بافت هیپوکامپ (قسمتی از مغز که نقش

حیاتی در روند شناخت و درک دارد)، می تواند پردازش اطلاعات را مختل کند (۷). با این وجود، مشخص شده است که اتانول در مقادیر پایین تا متوسط محافظت کننده بافت قلبی، کاهنده شیوع و شدت سکتی و آسیب میوکارداست (۸) و از طریق ایجاد پیش شرطی سازی در شرایط ایسکمیک باعث محافظت نورونی می شود (۹). مشخص شده است که اتانول با دوز کم، حتی بعد آسیب نورونی به دنبال سکتی مغزی سبب محافظت نورونی می شود (۱۰). اما اثرات دوز کم تا متوسط اتانول بر مدل های حافظه و یادگیری به خوبی مشخص نشده است. در این مطالعه از مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال (IA) استفاده شد. در این مدل یادگیری، به دلیل وجود یک محرک آسیب رسان، حیوان از رفتاری غریزی خود اجتناب می کند (۱۱). از نظر مکانیسم ملکولی حافظه و یادگیری، گیرنده ان-متیل-دی آسپاراتات (N-methyl-D-aspartate (NMDA)) نقش حیاتی در فرایندهای شناختی پستانداران بالاخص تشکیل حافظه و یادگیری دارد. نقش گیرنده های NMDA به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در القای محافظت نورونی به وسیله آنتاگونیست های غیر رقابتی این گیرنده مانند کتامین و یا MK-801 ثابت شده است (۵) هم چنین مشاهده شده است که پیش شرطی سازی اتانول با دخالت گیرنده NMDA همراه است (۱۲). ساختمان این گیرنده متشکل از دو زیر واحد NR1 و NR2 است که نواحی مختلف مغز پستانداران یافت می شود. به طور معمول زیر واحد NR1 محل اتصال کوآگنیست گلابسین و NR2 محل اتصال گلو تامات است (۱۳) و اتصال کالمادولین به زیر واحد NR1 عملکرد این گیرنده را تنظیم می کند (۱۴) که دلالت بر اهمیت این زیر واحد در عملکرد گیرنده NMDA دارد. نظر به اهمیت حافظه و مدارهای نوروبیولوژیکی دخیل در آن، بر آن شدیم که اثرات پیش شرطی سازی اتانول را بر اختلال حافظه ناشی از پنتیلن تترازول، در مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال همراه سنجنش بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 گیرنده NMDA و

فعالیت حرکتی حیوان به عنوان معیار قابل اعتماد برای ارزیابی میزان آسیب نورونی در مغز (۱۵)، توضیح دهیم.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این تحقیق، ۴۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد Wistar با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم و با سن حدودی ۲ تا ۳ ماه استفاده شد. کلیه حیوانات از حیوانخانه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شده و در دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته و در قفس های مخصوص به صورت گروه های چهار تایی نگهداری شدند. حیوانات به صورت آزادانه به جز هنگام آزمایش های رفتاری، به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. هر حیوان یک بار مورد آزمایش قرار گرفت و تمامی مطالعات رفتاری در محدوده ساعت های ۱۵-۸ انجام شد. همه مراحل آزمایش از مرحله تکثیر تا انجام آزمایشات و در نهایت معدوم کردن آن ها مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان و با کد اخلاق IR.KAUMS.REC.1395.83 صورت گرفت.

ترکیبات مورد استفاده و نحوه آماده سازی

ترکیبات مورد استفاده در مطالعه حاضر شامل اتانول و PTZ بود که به صورت داخل صفاقی تزریق شدند.

اتانول ۹۹/۶ درصد (جهان اتانول طب راک، ایران): طبق محاسبه جرم حجمی اتانول، هر ۱/۲۶ میلی لیتر اتانول حاوی ۱ گرم اتانول است که برای آماده سازی ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم اتانول، به ترتیب ۰/۳ و ۰/۶ میلی لیتر اتانول ۹۹/۶ درصد با ۰/۷ و ۰/۴ میلی لیتر سالین ۰/۹ درصد ترکیب می شد و حجم تزریق ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم بود. (تاکریس، آلمان): پس از توزین ۶۰ میلی گرم از PTZ در یک میلی لیتر سالین ۰/۹ درصد حل می شد و حجم تزریق ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم بود.

گروه ها و روند آزمایش

تعداد ۴۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی در ۵ گروه ۹ تایی تقسیم شدند. ۱- کنترل، ۲- Eth 0.25، ۳- گروه

Eth 0.5، ۴- PTZ، ۵- گروه Eth(0.5)+PTZ.

حیوانات گروه کنترل و PTZ به مدت شش روز و هر روز یک نوبت سالی ن تزریقی دریافت کردند. حیوانات گروه Eth 0.25 و Eth 0.5 به ترتیب اتانول با دوز ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم همانند گروه کنترل دریافت کردند و به این ترتیب با اتانول پیش شرطی شدند. حیوانات گروه Eth+PTZ هم مانند گروه Eth 0.5 با اتانول ۰/۵ گرم بر کیلوگرم پیش شرطی شدند.

حیوانات مورد مطالعه در دستگاه یادگیری اجتنابی به مدت دو روز (روز آموزش و روز آزمون) به فاصله ۲۴ ساعت مورد آموزش و آزمون قرار گرفتند. حیوانات گروه PTZ و Eth+PTZ در روز آزمون ۴۵ دقیقه قبل از انجام آزمایش PTZ با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند و دچار تشنج شدند.

برای تعیین شدت تشنج، تغییرات رفتاری حیوان تا ۳۰ دقیقه بعد از تزریق ارزیابی شد و بر اساس مقیاس Becker به مراحل تشنج حیوان نمره دهی شد (مرحله صفر = بدون پاسخ، مرحله یک = انقباض کلونیک عضلات گوش ها، صورت و راست شدن دم، مرحله دو = حرکات تشنجی سر حیوان به بالا و پایین و حرکات ریتمیک دست ها، مرحله سه = انقباضات میوکلونیک بدن، مرحله چهار = تشنجات کلونیک عمومی و چرخیدن روی پهلو، مرحله پنج = تشنجات عمومی با بسط تونیک و حالت تشنجی). حیواناتی که حداقل به مرحله ۳ تشنج رسیدند، وارد مطالعه شدند (۴). پس از بررسی حافظه اجتنابی، فعالیت حرکتی حیوانات در دستگاه (Open Maze Router, Iran) Field به مدت ۵ دقیقه به ثبت رسید. در پایان مطالعات رفتاری، حیوانات با گاز دی اتیل اتر به صورت عمیق بیهوش شدند و سر آنها توسط گیوتین جدا شد. بافت هیپوکامپ به سرعت خارج شد و در 80°C برای بررسی بیان نسبی mRNA زیر واحد NRI فریز شد.

مطالعات رفتاری

در این پژوهش حیوانات، یک هفته قبل از انجام مطالعات رفتاری در اتاق مشخص حیوانخانه نگهداری می شدند و در طی این مدت به منظور کم کردن استرس در حین آزمایش و سازش با دستگاه های مورد استفاده، هر روز به میزان ۵ دقیقه عمل Handling روی آن ها انجام می شد.

بررسی حافظه در دستگاه یادگیری اجتنابی

برای سنجش حافظه در حیوان از دستگاه یادگیری اجتنابی (shuttle یا step trough, Iran) box استفاده شد. این دستگاه متشکل از دو محفظه تاریک و روشن است که توسط یک درب گیوتینی واقع در دیواره میانی، از یکدیگر جدا می شود. در کف دستگاه میله های فولادی قرار دارد و توسط یک کابل ارتباطی به استیمولاتور متصل است. استیمولاتور ۱ میلی آمپر جریان الکتریکی به مدت ۳ ثانیه و فرکانس ۵۰ هرتز، در این میله ها ایجاد می کند و موجب وارد شدن شوک الکتریکی به دست و پای حیوان می گردد. یادگیری اجتنابی غیر فعال (مهارتی) به روش step-through برای بررسی حافظه طولانی مدت حیوان، در دو روز پشت سر هم انجام می گردد. در روز اول یا روز آموزش، حیوان پس از عادت کردن به دستگاه در محفظه روشن قرار می گیرد و به دلیل رفتار غریزی خود پس از عبور درب گیوتینی به محفظه تاریک می رود. سپس درب گیوتینی بسته و به دست و پای حیوان شوک الکتریکی وارد می شود. دریافت شوک الکتریکی سبب شکل گیری یادگیری اجتنابی (اجتناب از یک رفتار غریزی) است. در روز دوم یا آزمون برای بررسی حافظه، حیوان را در محفظه روشن قرار می گیرد و زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک بر حسب ثانیه به عنوان ملاک برای شکل گیری حافظه ثبت می شود. در این مطالعه در صورت عدم ورود حیوان به محفظه تاریک پس از گذشت ۳۰۰ ثانیه آزمایش متوقف می شد.

بررسی فعالیت حرکتی با دستگاه Open Field

فعالیت حرکتی حیوان در روز آزمون و بعد از بررسی حافظه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه open field

ثبت شد. این دستگاه از یک سطح ۷۲×۷۲ سانتیمتری با دیواره ای به ارتفاع ۳۶ سانتیمتر در اطراف تشکیل شده و کف دستگاه توسط خطوطی به ۱۶ مربع ۱۸×۱۸ سانتیمتری تقسیم شده است. در این مطالعه حیوان در یکی از چهار مربع مرکزی رها شده و مسافت طی شده توسط حیوان بر حسب سانتیمتر (cm) توسط نرم افزار Hindsight مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت.

اندازه گیری بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 گیرنده

NMDA

الف) استخراج RNA

کل RNA هیپوکامپ با استفاده از RNeasy kit (SinaClon, Iran) استخراج و غلظت آن با استفاده از Nano Drop ND 3300 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) سنجیده شد و برای روند های بعدی در 80°C - فریز شد.

ب) واکنش نسخه برداری معکوس (cDNA Synthesis)

سنتر cDNA بر طبق دستور العمل Prim Script TM RT (TAKARA, ژاپن) reagent kit در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آماده و با استفاده از آغازگرهای الیگو dT و راندوم هگزامر (Random Hexamer) صورت گرفت. واکنش نسخه برداری معکوس در دمای 37°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان آنزیم نسخه بردار معکوس در شرایط دمایی 85°C درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه غیر فعال شد. سپس مخلوط رونویسی در دمای 20°C - فریز شد.

ج) بررسی بیان ژن های NR1 و HPRT با استفاده از روش Real-Time PCR

واکنش پلیمرز زنجیره ای کمی با استفاده از SYBR Premix Ex Taq (TAKARA, ژاپن) و TM II و آغازگرهای اختصاصی ژن های NR1 و HPRT انجام گرفت. نام و توالی آغازگر های مورد استفاده در جدول ۱ خلاصه شده است. توالی رونوشت ژن های مورد نظر از پایگاه اینترنتی

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب، هر مرحله تکثیر کامل توسط یک مرحله تفکیک که شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود، ادامه یافت. کارایی تکثیر ژن های هدف و مرجع پس از انجام هر Real-Time PCR با استفاده از نرم افزار Real-Time PCR تعیین و تخمین تغییر بیان ژن ها با استفاده از تجزیه و تحلیل داده های حاصل از Real-Time PCR بر اساس چرخه آستانه به دست آمده برای ژن های هدف و مرجع و محاسبه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

www.ncbi.nlm.nih.gov و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مستقیم (Forward Primer) و معکوس (Reverse Primer) توسط نرم افزار، Primer Express 3 طراحی شد.

مخلوط واکنشی Real-Time PCR مطابق دستورالعمل کیت مذکور تهیه شد. واکنش Real-Time PCR در ۴۰ چرخه اجرا و مراحل دمایی و زمانی برای واسرشتگی اولیه، واسرشتگی و اتصال و گسترش به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی گراد، ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۴ ثانیه بهینه شد. به منظور

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

Gene	طول	توالی
NR1	263 bp	F: 5'-AGTGAACGGAATGATGGGCGA-3'
		R: 5'-ACTGAAGCGGTCCAGCAGGTA-3'
HPRT	235 bp	F: 5'-GCTCGAGATGTCATCAAGGAGA-3'
		F: 5'-TCAGCGCTTAATGTAATCCAGC-3'

تحلیل آماری

پس از بررسی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای آنالیز داده هایی که توزیع نرمال داشتند، از آزمون پارامتری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و برای داده ها با توزیع غیر نرمال آزمون غیر پارامتری کروسکال-والیس انجام شد.

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ در سطح معنی داری $p < 0.05$ انجام شد.

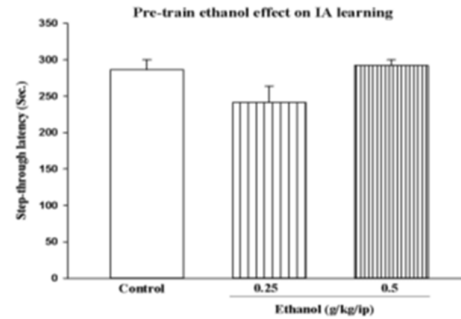
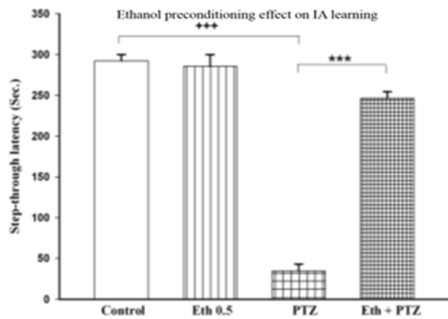
یافته ها

در این مطالعه ۴۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی مورد استفاده، به پنج گروه تقسیم شد. وضعیت حافظه، فعالیت حرکتی حیوان و تغییرات بیان نسبی mRNA NR1 هیپوکامپ در گروه های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به قرار زیر است:

اثر پیش شرطی سازی اتانول بر یادگیری اجتنابی

اثر پیش شرطی سازی ناشی از اتانول با دوز های ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم بر یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک (ملاک وجود حافظه) با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه، تفاوت معناداری را بین گروه کنترل با گروه های مختلف اتانول Eth 0.25 و Eth 0.5 نشان نداد.

هم چنین زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک بین دو گروه مختلف اتانول Eth 0.25 و Eth 0.5 تفاوت معناداری نداشت ($F(2,24)=1.625$)، به همین دلیل در ادامه مطالعات رفتاری از یکی از این دو دوز (۰/۵ گرم بر کیلوگرم) استفاده شد.



شکل ۲. بررسی اثر پیش شرطی سازی اتانول بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از PTZ. پیش شرطی سازی اتانول مانع ایجاد اختلال حافظه اجتنابی ناشی از تشنج القا شده با PTZ شد. $p < 0.001$ و $p < 0.001$ به ترتیب نشان دهنده مقایسه بین گروه کنترل با گروه PTZ و گروه Eth+ PTZ با گروه PTZ می باشد. داده ها به صورت Mean±SE حاصل از زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک برحسب ثانیه (Sec) در دستگاه یادگیری اجتنابی محاسبه شده است (n=9).

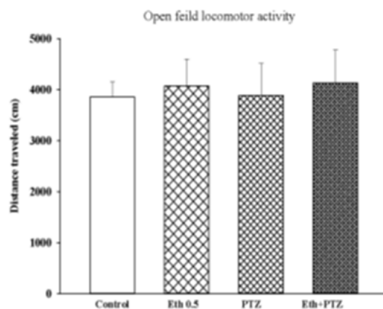
شکل ۱. اثر پیش شرطی سازی اتانول بر زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک در دستگاه یادگیری اجتنابی در سه گروه کنترل، ۰/۲۵ گرم بر کیلوگرم Eth و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم Eth. پیش شرطی سازی با دوزهای مختلف به کار رفته اتانول در مدل یادگیری اجتنابی باعث تخریب حافظه حیوان نشد (p>۰/۰۵). داده ها به صورت Mean±SE حاصل از زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک برحسب ثانیه (Sec) در دستگاه یادگیری اجتنابی محاسبه شده است (n=9).

نتایج فعالیت حرکتی حیوان

بررسی فعالیت حرکتی حیوانات در دستگاه open field در گروه های مختلف در روز آزمون در شکل ۳ نشان داده شده است. آنالیز مسافت طی شده توسط حیوان بر حسب سانتی متر با آزمون واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف معنی داری از نظر مسافت طی شده توسط حیوان در گروه های کنترل، گروه Eth 0.5، گروه PTZ و گروه Eth+ PTZ در دستگاه open field وجود نداشت (F(3,32)=0.26).

اثر پیش شرطی سازی اتانول بر اختلال حافظه ناشی از PTZ اثر پیش شرطی سازی ناشی از اتانول با دوز ۰/۵ گرم بر کیلوگرم بر اختلال حافظه ناشی از PTZ در موش بزرگ آزمایشگاهی در شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج آزمون تعقیبی کروسکال والیس برای بررسی زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک نشان داد که PTZ، چهل و پنج دقیقه قبل از تست در روز آزمون سبب کاهش معنی دار زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک در مقایسه با گروه کنترل شد (p < ۰/۰۰۱)، $H(3) = ۲۸/۳۵$.



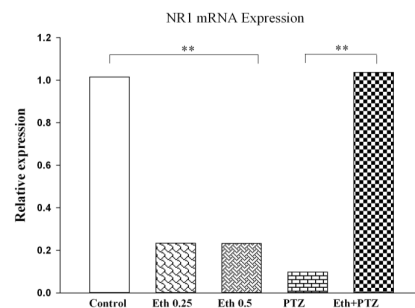
هم چنین مقایسه زمان تاخیر ورود حیوان در گروه PTZ با گروه Eth+ PTZ نشان داد تاخیر زمان ورود حیوان به محفظه تاریک در گروه Eth+ PTZ به طوری معنی داری نسبت به گروه PTZ افزایش یافت (p<۰/۰۰۱) و تفاوت زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک در گروه Eth+ PTZ در مقایسه با کنترل معنی دار نبود.

شکل ۳. بررسی فعالیت حرکتی حیوانات در دستگاه open field در گروه های مختلف در روز آزمون. فعالیت حرکتی حیوان در گروه های مورد مطالعه تفاوت معنی داری نداشت (p>۰/۰۵). داده ها به صورت Mean±SE حاصل از مسافت طی شده بر حسب سانتی متر (cm) در دستگاه open feild محاسبه شده است (n=9).

یادگیری اجتنابی با بررسی فعالیت حرکتی و بیان نسبی NR1 mRNA در موش بزرگ آزمایشگاهی بود. نتایج نشان دادند که پیش شرطی سازی اتانول، تاثیری مبنی بر اختلال در یادگیری و حافظه و فعالیت حرکتی حیوان نداشت و PTZ قادر به تخریب حافظه در حیوانات پیش شرطی شده با اتانول نبود و بیان نسبی mRNA زیرواحد NR1 در این گروه (Eth+ PTZ) افزایش داشت.

تاثیر پیش شرطی سازی اتانول بر یادگیری اجتنابی مشخص شده است که اثرات داروها از جمله اتانول بر حافظه و یادگیری وابسته به دوز می باشد. در واقع اتانول با دوزهای بالا سبب تخریب یادگیری و حافظه در حیوان می شود (۱۶) در حالیکه سطوح کم آن قادر به تخریب حافظه نیست (۱۷). در این مطالعه برای ایجاد پیش شرطی سازی اتانول از دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم استفاده شد. در مطالعه حاضر اتانول با دوز بکار رفته، سبب تخریب حافظه اجتنابی حیوان نشد (زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک در گروه های اتانول در مقایسه با گروه کنترل تفاوتی نداشت)، چرا که دوزهای بکار رفته اتانول در این مطالعه پایین تر از مقادیری هستند که سبب اثرات حاد و معمول اتانول می شود. و اثر تخریب کنندگی اتانول بر حافظه و یادگیری ناشی از دوزهایی بالاتر از دوز مورد استفاده در مطالعه حاضر می باشد. مطالعه نوویر و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که دوز کم و متوسط اتانول سبب تخریب حافظه فضایی در موش های آزمایشگاهی نمی شود (۱۷). در مطالعه ای دیگر توسط ملچور و همکاران در سال ۱۹۹۳ مشاهده شد که دوز خیلی کم اتانول در تاخیر زمان ورود حیوان به محفظه تاریک در شاتل باکس اثری ندارد و سبب تخریب حافظه حیوان نمی شود (۱۸). که این شواهد نتایج حاصل از مطالعه حاضر را تایید می کنند. از طرفی در مطالعه گیونس در سال ۱۹۹۵ مشاهده شد که حتی دوز خیلی کم اتانول، سبب تخریب حافظه فضایی در حیوان می شود (۱۹). که علت تفاوت این نتایج با مطالعه حاضر می تواند بخاطر در نظر گرفتن دوزهایی بالاتر از مقادیر بکار رفته در مطالعه حاضر به عنوان

نتایج تغییرات بیان نسبی mRNA زیرواحد NR1 گیرنده NMDA تغییرات بیان نسبی NR1 mRNA در گروه های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. آنالیز داده های حاصل از تکنیک Real-time PCR با روش 2- $\Delta\Delta Ct$ نشان داد نسبت بیان NR1 mRNA به بیان HPRT mRNA در هر دو گروه Eth 0.5 و Eth 0.25 نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت هم چنین نسبت بیان NR1 mRNA به بیان HPRT mRNA در گروه PTZ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داشت ($F(4,29) = 3.728, p < 0.01$) و مشاهده شد که نسبت بیان NR1 mRNA به بیان HPRT mRNA در گروه Eth+ PTZ نسبت به گروه PTZ به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.01$) این افزایش به اندازه ای بود که نسبت بیان mRNA زیرواحد NR1 به بیان mRNA HPRT در گروه Eth+ PTZ در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.



شکل ۴. تغییرات بیان نسبی mRNA زیرواحد NR1 گیرنده NMDA در گروه های مختلف در تکنیک Real-time PCR. پیش شرطی سازی اتانول باعث افزایش بیان نسبی mRNA زیرواحد NR1 گیرنده NMDA در حیوانات تخریب حافظه شده با PTZ شد ($p < 0.01$). داده ها به صورت نسبت بیان mRNA زیرواحد NR1 به بیان HPRT mRNA در هر گروه محاسبه شده است ($n=6-7$).

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر پیش شرطی سازی اتانول بر اختلال حافظه ناشی از PTZ در مدل

دوز خیلی کم اتانول باشد. چرا که در مطالعه مذکور هم اتانول با دوز های ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم قدرت تخریب حافظه حیوان را نداشت و تنها دوز های ۰/۷۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم اتانول به صورت وابسته به دوز در حافظه اختلال ایجاد کردند.

تاثیر پیش شرطی سازی اتانول بر اختلال حافظه ناشی از PTZ

در مطالعه حاضر برای تخریب حافظه به دنبال تشنج از تک دوز PTZ استفاده شد. اثر تخریب کنندگی تک دوز PTZ بر حافظه و یادگیری با ایجاد تشنج قبلا به اثبات رسیده بود که در مطالعه حاضر نیز این اثر در گروه PTZ دیده شد (۴). با این وجود PTZ نتوانست حافظه را در حیوانات پیش شرطی شده با اتانول تخریب کند. به نظر میرسد اتانول در دوز های کم تا متوسط سبب پیش گیری از آسیب های شناختی می شود. مطالعه ریز و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی ۱۶۲۴ نفر از ساکنین کالیفورنیا نیز موید این فرضیه است (۲۰). در مطالعه وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات محافظت نورونی پیش شرطی سازی اتانول پس از ایسکمی/ریپرفیوژن مشاهده شد که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می کند (۹). همچنین اثرات محافظتی پیش شرطی سازی اتانول در بافت های دیگر بدن هم مانند کلیه مشاهده شده است (۲۱). از طرفی بر اساس اطلاعات به دست آمده توسط محققین مطالعه ای مبنی بر اثر تخریب کننده پیش شرطی سازی اتانول بر حافظه و یادگیری یافت نشد. مطالعات نشان می دهد که اتانول به عنوان داروی سرکوب کننده سیستم عصبی با اثر بر فعالیت گیرنده های آیونوتروپیک کانال های کلسیمی و کلری، سبب افزایش آستانه تشنج در حیوان می شود (۲۲) و شاید به این علت می تواند با جلوگیری از پیشرفت تشنج از اختلال حافظه به دنبال آن جلوگیری کند. این اثرات اتانول ممکن است ناشی از افزایش فعالیت گابارژیکی با تحریک گیرنده GABA باشد (۲۳). اتانول کانال های یونی متعددی را تحت تاثیر قرار می دهد اما ارتباط بین اثرات آن روی کانال های یونی مختلف و اثرات رفتاری آن به طور واضحی مشخص نشده است. مطالعات حیوانی و انسانی متعدد حدس

می زنند که اثرات طولانی مدت و فوری اتانول روی سیستم عصبی مرکزی متفاوت و متضاد هستند و تجویز کوتاه مدت اتانول اثرات آنتی ایپی لپتیک دارد (۲۴).

تاثیر پیش شرطی سازی اتانول بر فعالیت حرکتی حیوان در این مطالعه برای بررسی تاثیر پیش شرطی سازی اتانول بر فعالیت حرکتی حیوان مسافت طی شده در دستگاه open field مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد، پیش شرطی سازی اتانول با دوز کم تاثیری بر فعالیت حرکتی حیوان نداشت. مشخص شده است که دوز های بالای اتانول با تضعیف سیستم عصبی مرکزی، بر فعالیت حرکتی حیوان اثر مهاری دارد (۲۵). از آنجایی که اختلال در فعالیت حرکتی حیوان یک معیار با ارزش برای ارزیابی آسیب نورونی ناشی از اتانول است (۱۵)، شاید بتوان گفت اتانول با دوز مورد استفاده در این مطالعه سبب آسیب نورونی چشم گیری نشده است و علاوه بر اثرات اتانول با دوز بالا بر فعالیت حرکتی حیوان، در مطالعه حاضر تفاوت مسافت طی شده توسط گروه پیش شرطی شده با اتانول با گروه کنترل معنی دار نشد. در مطالعه وانگ و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ نشان داده شد که فعالیت حرکتی حیوان در گروه پیش شرطی شده با اتانول در مقایسه با گروه کنترل تفاوتی نداشت (۹) که تأیید کننده نتایج مطالعه حاضر است. اما در مطالعه نوویر و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشاهده شد که اتانول با دوز کم سبب افزایش فعالیت حرکتی حیوان در روتارود می شود و دوز کم اتانول بر فعالیت حرکتی حیوان اثر تحریکی دارد (۱۷). که با نتیجه مطالعه حاضر تناقض دارد البته دوز استفاده شده در مطالعه مذکور بالاتر از دوز به کار رفته در مطالعه حاضر می باشد.

تاثیر پیش شرطی سازی اتانول بر بیان نسبی زیر واحد NR1 گیرنده NMDA

مشاهده شده است که پیش شرطی سازی اتانول با دخالت گیرنده NMDA اثرات محافظت نورونی دارد (۱۲). در مطالعه حاضر برای بررسی اثر پیش شرطی سازی اتانول بر بیان نسبی زیر واحد NR1 از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. آنالیز داده های حاصل از این

است (۲۷). در مطالعه نونا و همکاران در سال ۲۰۱۴ مشاهده شد که دوز کم اتانول، بیان mRNA زیر واحد NR1 را در ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می دهد، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۸). در مطالعه ای دیگر توسط فیلیپ و همکاران مشاهده شده است که مصرف مزمن اتانول نیز سبب کاهش بیان نسبی زیر واحد NR1 در کورتکس موش شده و بعد از تجویز PTZ بیان نسبی زیر واحدهای NMDA تغییری نمی کند (۲۹). تغییرات بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 می تواند اثرات متعددی بر ویژگی های فارماکولوژیک گیرنده NMDA داشته باشد و تغییرات ناشی از اثرات اتانول بر گیرنده NMDA و تغییرات رفتاری متعاقب آن بسیار پیچیده است و تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می گیرد (۳۰) که نیازمند مطالعات دقیق تر در سطوح سیگنالینگ سلولی است.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که تزریق روزانه ۰/۵ گرم بر کیلوگرم اتانول به مدت شش روز مانع ایجاد اختلال حافظه اجتنابی ناشی از تشنج القا شده با PTZ می شود که با افزایش بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 در بافت هیپوکامپ همراه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان «بررسی اثر پیش شرطی سازی رژیم مایع اتانول بر اختلال حافظه و یادگیری ناشی از پنتیلن تترازول و بیان زیر واحد NR1 گیرنده NMDA گلو تامات در موش بزرگ آزمایشگاهی» مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان در سال ۹۵ با شماره ۹۵۸۳ و کد اخلاقی IR.KAUMS.REC.1395.83 می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. بدین وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در گردآوری این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند، کمال سپاس گزاری را دارند.

تکنیک نشان داد که بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 در هر یک از گروه های اتانول نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. با توجه به نقش گیرنده NMDA در حافظه و یادگیری حیوان انتظار می رفت که کاهش بیان این زیر واحد به شکل اختلال در حافظه حیوان بروز کند اما اثری از اختلال حافظه در مطالعات رفتاری مشاهده نشد. این تغییرات می تواند به دلیل وجود فاصله زمانی بین بیان mRNA سنتز پروتئین و تظاهرات رفتاری باشد. بدین معنی که به دنبال کاهش بیان mRNA زیر واحد NR1 با دوز های مورد استفاده این پژوهش، در مدت پیش شرطی سازی هنوز تغییرات سنتز پروتئین و تظاهرات رفتاری که نشان دهنده اختلال حافظه باشد، رخ نداده است. همچنین بیان mRNA زیر واحد NR1 در گروه PTZ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در گروه PTZ کاهش بیان نسبی این زیر واحد همانند مدل های مختلف تشنج قابل پیش بینی بود (۲۶) و به شکل تخریب حافظه مشاهده شد. با وجودیکه بیان نسبی زیر واحد NR1 در هر یک از گروه های اتانول و PTZ به تنهایی کاهش نشان داد، در گروه Eth+PTZ بیان نسبی mRNA زیر واحد NR1 افزایش داشت. این نتیجه با بهبود حافظه و یادگیری حیوانات در مطالعات رفتاری این گروه هماهنگی داشت. به نظر میرسد احتمالاً اتانول با اثر مهار بر گیرنده NMDA از سمیت ناشی از تحریک بیش از حد ایجاد شده به واسطه تشنج به دنبال PTZ جلوگیری می کند و باعث پیش گیری از تخریب حافظه در حیوانات دریافت کننده PTZ می شود ولی مکانیسم های دخیل در آن نیازمند بررسی های بیشتری در روند سیگنالینگ داخل سلولی با سنجش سطوح NMDA، CREB و GABA است. در مطالعه میشل و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشاهده شد که بیان mRNA زیر واحد NR1 در پیش شرطی سازی اتانول افزایش می یابد. این افزایش در محیط کشت با استفاده از مقدار ۳۰ میلی مول اتانول دیده شد در حالیکه در مطالعه حاضر مقدار اتانول تزریقی برای هر حیوان در روز، ۰/۲۵ یا ۰/۵ گرم بر کیلوگرم معادل ۵ یا ۱۰ میلی مول اتانول در روز بوده

NADPH oxidase activation. *Journal of neurochemistry*. 2013;126(1):113-21.

11. Walker DW, Freund G. Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiology & behavior*. 1971;7(5):773-8.

12. Mitchell RM, Tajuddin N, Campbell EM, Neafsey EJ, Collins MA. Ethanol preconditioning of rat cerebellar cultures targets NMDA receptors to the synapse and enhances peroxiredoxin 2 expression. *Brain Research*. 2016;1642:163-9.

13. Tajima N, Karakas E, Grant T, Simorowski N, Diaz-Avalos R, Grigorieff N, et al. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature*. 2016;534(7605):63-8.

14. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Haganir RL. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*. 1996;84(5):745-55.

15. Pardo M, Betz AJ, San Miguel N, López-Cruz L, Salamone JD, Correa M. Acetate as an active metabolite of ethanol: studies of locomotion, loss of righting reflex, and anxiety in rodents. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2013;7.

16. Abadi THN, Vaghef L, Babri S, Mahmood-Alilo M, Beirami M. Effects of different exercise protocols on ethanol-induced spatial memory impairment in adult male rats. *Alcohol*. 2013;47:۱۶-۳۰۹:(۴)

17. Novier A, Van Skike CE, Chin VS, Diaz-Granados JL, Matthews DB. Low and moderate doses of acute ethanol do not impair spatial cognition but facilitate accelerating rotarod performance in adolescent and adult rats. *Neuroscience letters*. 201. ۴۲-۳۸:(۱)۵۱۲;۲

18. Melchior C, Glasky A, Ritzmann R. A low dose of ethanol impairs working memory in mice in a win-shift foraging paradigm. *Alcohol*. 1993;10(6):491-3.

19. Givens B. Low doses of ethanol impair spatial working memory and reduce hippocampal theta activity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1995;19(3):763-7.

20. Reas ET, Laughlin GA, Kritiz-Silverstein D, Barrett-Connor E, McEvoy LK. Moderate, regular alcohol consumption is associated with

منابع

1. Engel J. *Seizures and epilepsy*: Oxford University Press; 2013.

2. Jung A-r, Park C-h, seo Choi Y, Yoo JH, Lee HW. Functional Brain Connectivity and Memory Impairment in Temporal Lobe Epilepsy (S22. 004). *Neurology*. 2016;86(16 Supplement):S22. 004.

3. Gaitatzis A, Sander JW. The long-term safety of antiepileptic drugs. *CNS drugs*. 2013;27(6):435-55.

4. Aniol VA, Ivanova-Dyatlova AY, Keren O, Guekht AB, Sarne Y, Gulyaeva NV. A single pentylenetetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats. *Epilepsy & Behavior*. 2013;26(2):196-202.

5. Leandra CC, Carla IT, Carina RB. The role of NMDA receptors in the development of brain resistance through pre-and postconditioning. *Aging and disease*. 2014;5(6. ۴۱-۴۳۰:(

6. Stetler RA, Leak RK, Gan Y, Li P, Zhang F, Hu X, et al. Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: paradigms and clinical significance. *Progress in neurobiology*. 2014;114:58-83.

7. Oscar-Berman M, Marinković K. Alcohol : effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychology review*. 2007;17(3):239-57.

8. Guiraud A, De Lorgeril M, Boucher F, Berthonneche C, Rakotovo A, De Leiris J. Cardioprotective effect of chronic low dose ethanol drinking: insights into the concept of ethanol preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36(4):561-6.

9. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Kalogeris TJ, Miller DK, Sun GY, et al. Ethanol preconditioning protects against ischemia/reperfusion-induced brain damage : role of NADPH oxidase-derived ROS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43(7):1048-60.

10. Kochanski R, Peng C, Higashida T, Geng X, Hüttemann M, Guthikonda M, et al. Neuroprotection conferred by post-ischemia ethanol therapy in experimental stroke: an inhibitory effect on hyperglycolysis and

- higher cognitive function in older, community-dwelling adults. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*. 2016;3(2).
21. Yuan Q, Hong S, Han S, Zeng L, Liu F, Ding G, et al. Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress. *PLoS One*. 2011;6(10):e25811.
22. Hillbom M, Pieninkeroinen I, Leone M. Seizures in alcohol-dependent patients. *CNS drugs*. 2003; 17(14):1013-30.
23. Zorumski CF, Mennerick S, Izumi Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol*. 2014; 48(1):1-17.
24. Gordon E, Devinsky O. Alcohol and marijuana: effects on epilepsy and use by patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2001; 42(10):1266-72.
25. Aragon C, Pesold C, Amit Z. Ethanol-induced motor activity in normal and acatalasemic mice. *Alcohol*. 1992;9(3):207-11.
26. Ghasemi M, Schachter SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy & Behavior*. 2011;22(4):617-40.
27. Mitchell RM, Neafsey EJ, Collins MA. Essential involvement of the NMDA receptor in ethanol preconditioning-dependent neuroprotection from amyloid- β in vitro. *Journal of neurochemistry*. 2009;111(2):580-8.
28. Nona CN, Li R, Nobrega JN. Altered NMDA receptor subunit gene expression in brains of mice showing high vs. low sensitization to ethanol. *Behavioural Brain Research*. 2014;260:58-66.
29. Hardy PA, Chen W, Wilce PA. Chronic ethanol exposure and withdrawal influence NMDA receptor subunit and splice variant mRNA expression in the rat cerebral cortex. *Brain Research*. 1999;819(1-2):33-9.
30. den Hartog CR, Gilstrap M, Eaton B, Lench DH, Mulholland PJ, Homanics GE, et al. Effects of Repeated Ethanol Exposures on NMDA Receptor Expression and Locomotor Sensitization in Mice Expressing Ethanol Resistant NMDA Receptors. *Frontiers in Neuroscience*. 2017; 11