

مقاله تحقیقی

بررسی اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده TRPV₁ در ناحیه CA₁ هیپوکامپ بر رفتارهای شبه-اضطرابی موش‌های صحرایی نر

الهام حکیمی‌زاده^۱، شهربانو عریان^۲، علی روحبخش^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲. استاد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۳. استادیار فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی، رفسنجان، ایران

* **مسئول مکاتبات:** دکتر علی روحبخش، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی، تلفن: ۰۳۹۱-۸۲۲۶۹۲۷ فاکس: ۰۳۹۱-۸۲۲۰۰۷۲، پست الکترونیکی: aroohbakhsh@rums.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲

چکیده

مطالعات کمی به بررسی دخالت گیرنده‌های نوع ۱ وانیلوئیدی (TRPV₁, Transient Receptor Potential Vanilloid type 1) در تعدیل اضطراب پرداخته‌اند. این گیرنده علاوه بر گرما، پروتون‌ها و وانیلوئیدها، به برخی لیگاندهای غیراختصاصی درون‌زا مانند آناندامید نیز پاسخ می‌دهد. در مطالعه حاضر، اثر تحریک و مهار گیرنده‌های TRPV₁ در ناحیه هیپوکامپ خلفی (CA₁) موش‌های صحرایی نر بر رفتار اضطرابی آن‌ها ارزیابی گردید. در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. گروه‌ها هفت‌تایی بودند. داروهای تزریقی، شامل capsaicin، (آگونیست گیرنده TRPV₁) و AMG9810 (آنتاگونیست گیرنده TRPV₁) بودند. تزریق در ناحیه هیپوکامپ خلفی (CA₁) موش‌های صحرایی صورت گرفت و سپس در مدل رفتاری اضطراب، ماز بعلاوه‌ای شکل (Elevated plus-maze)، رفتارهای شبه اضطرابی به مدت ۵ دقیقه ثبت شد. تزریق capsaicin در غلظت‌های ۰/۰۰۳ و ۰/۰۳ میکروگرم/رت صورت گرفت. درصد زمان ورود به بازوی باز در غلظت‌های ۰/۰۰۳ و ۰/۰۳ میکروگرم/رت و درصد دفعات ورود حیوان‌ها به بازوی باز در غلظت ۰/۰۰۳ میکروگرم/رت کاهش یافت و تغییر معنی‌داری نیز در فعالیت حرکتی صورت نگرفت. یافته حاضر نشان‌دهنده اثر اضطراب‌زای این دارو است. همچنین تزریق AMG9810 در غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت صورت گرفت که به دنبال آن، درصد زمان ورود به بازوی باز در غلظت‌های ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت بدون تغییر در درصد دفعات ورود به بازوی باز، افزایش یافت. فعالیت حرکتی نیز در غلظت‌های ۰/۰۰۳ میکروگرم/رت افزایش یافت. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثر شبه ضد اضطرابی این دارو در غلظت‌های ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت است. مطالعه حاضر نشان داد که گیرنده‌های TRPV₁ واقع در ناحیه هیپوکامپ خلفی، در تعدیل اضطراب در موش‌های صحرایی نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: ماز بعلاوه‌ای شکل، گیرنده‌های وانیلوئیدی، هیپوکامپ خلفی

مقدمه

اضطراب به عنوان انگیزش و احساس طبیعی تلقی شده و جزء سازشی از پاسخ استرسی حاد تحت شرایطی است که انسجام فردی را تهدید می‌کند. به هر حال، اگر اضطراب در شدت مناسب نباشد یا با هر نوع خطر حاد همراه نباشد، یک پاسخ غیرسازشی است یا حتی می‌تواند یک بیماری روانی باشد. از دیرباز، اضطراب و ترس از جمله مباحث مهم روان-شناختی و پزشکی بوده و همواره برای کنترل اضطراب، راه‌حل‌ها و نیز داروهای مختلفی با مکانیسم‌های اثر متفاوت ارائه شده است. درک بهتر مکانیسم‌های دخیل در این بیماری، ما را به سمت یافتن داروهای جدیدتر و درمان مؤثرتر آن هدایت می‌کند. مکانیسم‌های مختلفی به نظر می‌رسد در تنظیم وضعیت‌های اضطرابی دخالت داشته باشند که در پاسخ احساسی مناسب به وقایع وحشتناک و ناراحت‌کننده تأثیرگذار است. علاوه بر سیستم‌های گابا آرژیک، سروتونرژیک و نورآدرنرژیک، سایر میانجی‌های عصبی و تعدیل‌کننده‌ها هم در پاسخ‌های اضطرابی درگیرند (۱،۲). یکی از این سیستم‌های مداخله‌کننده که مدت طولانی از شناسایی آن نمی‌گذرد، دسته جدیدی از گیرنده‌ها موسوم به گیرنده‌های (Receptor Potential Vanilloid) TRPV و Transient است که تاکنون ۶ نوع از آن‌ها شناسایی شده‌اند (۳) و در این بین، گیرنده TRPV₁ از همه بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است. این گیرنده، توسط محرک‌های آسیب‌رسان، گرما، پروتون‌ها (pH < ۵/۹) و بسیاری از محصولات طبیعی مثل capsaicin فلفل فعال می‌شود (۴). هنوز لیگاند درون‌زای فعال‌کننده گیرنده TRPV₁ مشخص نشده است، اما یک کاندید احتمالی، آنانداماید است (۵،۶). آنانداماید ابتدا به عنوان یک آگونیست درون‌زا برای گیرنده کانابینوئیدی CB₁ توصیف شد (۷). در این خصوص، مطالعاتی نیز انجام گرفته است که نشان می‌دهد آنانداماید، برخی اثرات خود را از طریق تحریک گیرنده‌های TRPV₁ انجام می‌دهد. به عنوان مثال، مشخص شده است که این گیرنده‌ها در تغییر فعالیت حرکتی ناشی از آنانداماید در موش‌ها دخالت دارند (۸) و یا اثر افزایش‌دهنده ترشح

اسید معده ناشی از آنانداماید به وسیله آنتاگونیست TRPV₁ مهار شده است (۹). TRPV₁ تنها در نورون‌های حسی یافت نمی‌شوند، بلکه در هسته‌های مرکزی مختلفی که شامل هیپوتالاموس و عقده‌های قاعده‌ای، هیپوکامپ و مخچه می‌باشند، هم یافت می‌شوند (۱۰). مراکز مهمی از مغز تاکنون شناخته شده است که در تعدیل اضطراب نقش دارند که هیپوکامپ از جمله مهم‌ترین آن‌ها است. اثرات بارز ضد اضطراب در مدل‌های حیوانی بعد از ایجاد تخریب در ناحیه هیپوکامپ مشاهده شده است (۱۱). از آن جایی که اثر گیرنده‌های TRPV₁ در ناحیه CA₁ مغز در تعدیل اضطراب نامعلوم است، بر آن شدیم که اثر گیرنده‌های TRPV₁ در بروز و یا کاهش اضطراب را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد

داروهای مورد استفاده شامل capsaicin (آگونیست گیرنده‌های TRPV₁) و AMG9810 (آنتاگونیست گیرنده‌های TRPV₁) است. این داروها از شرکت Tocris (انگلستان) تهیه شدند. داروی AMG9810، در دی متیل سولفوکسید ۱۰۰٪ (DMSO) و capsaicin، در ترکیبی از تونین ۸۰، اتانول و سالیین به نسبت (۱:۱:۸) حل شد.

حیوانات مورد مطالعه

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. موش‌ها در گروه‌های هفت‌تایی در قفس‌های جداگانه نگهداری شد. درجه حرارت اتاق پرورش حیوانات، ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد و تنظیم نور، بر مبنای سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. غذای مخصوص موش و آب کافی در تمام مدت نگهداری، به جز زمان آزمایش، در اختیار حیوانات قرار داشت. موش‌ها هر روز به مدت چند دقیقه نوازش می‌شدند تا به تدریج به شخص آزمایش‌کننده، عادت کنند و ترس و اضطراب آن‌ها در هنگام آزمایش کاهش یابد.

روش‌ها

روش جراحی، تزریق و ارزیابی محل تزریق

موش‌ها با تزریق داخل صفاقی محلول کتامین سولفات ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلازین ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیهوش و بعد از کوتاه کردن موهای ناحیه سر، در دستگاه استرئوتاکس (مدل Stoelting) ثابت می‌شدند. بعد از شکاف پوست ناحیه سر و مشخص نمودن ناحیه Bregma، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۲)، کانول راهنمای شماره ۲۳ در ناحیه CA₁ هیپوکامپ خلفی راست قرار می‌گرفت. مختصات مورد استفاده جهت جراحی به این شرح است: قدامی - خلفی (AP): ۳/۳ - میلی‌متر، سمت راست (ML): ۱/۸ + میلی‌متر و عمق از سطح جمجمه (V): ۱/۸ میلی‌متر. در این مرحله، برای ثابت ماندن کانول از سیمان دندان - پزشکی (مونومر + آکریل صورتی) استفاده شده و نهایتاً در درون کانول، سیم نازک ارتودونسی برای جلوگیری از گرفتگی آن گذاشته می‌شد. پس از پنج روز فرصت برای بهبودی داروهای مورد استفاده به حجم ۰/۵ میکرولیتر در فاصله زمانی یک دقیقه توسط سرنگ هامپلتون با واسطه لوله پلی‌اتیلنی و کانول شماره ۳۰ که درون کانول راهنما قرار می‌گرفت، تزریق می‌شد. در پایان مطالعه با تزریق ۰/۵ میکرولیتر از محلول متیلن بلو یک درصد، محل تزریق، شناسایی و تایید می‌شد.

تست رفتاری

برای سنجش اضطراب، از مدل رفتاری شناخته شده ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع (Elevated Plus-maze) استفاده شد. این ارزیابی، بر اساس مدلی که توسط Pellow و همکارانش ارائه شده صورت گرفت (۱۳). در این روش، موش‌ها بر اساس ترس ذاتی از ورود به فضای باز و مرتفع، کمتر وارد این فضا می‌شوند. داروهای ضد اضطراب، باعث کاهش ترس و اضطراب موش‌ها شده و احتمال ورود به این فضا را افزایش می‌دهد. این ابزار، از جنس چوب و دارای ۴ بازو به شکل علامت مثبت (+) است. ابعاد راهروی باز، ۱۰×۵

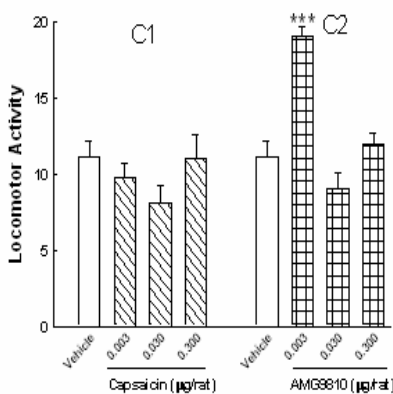
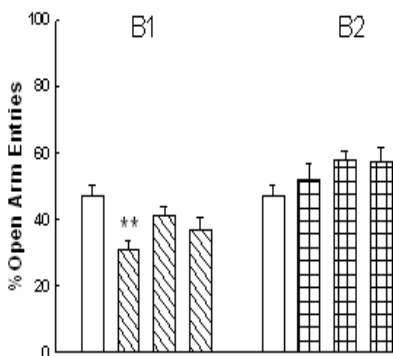
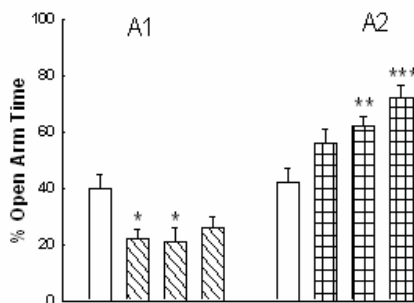
سانتی‌متر بوده و در دو طرف و انتهای راهروی بسته دیواره‌ای به بلندی ۴۰ سانتی‌متر وجود دارد. برای جلوگیری از افتادن موش‌ها در دو طرف و انتهای راهروی باز، لبه‌ای به ارتفاع ۱ سانتی‌متر از جنس شیشه نصب می‌شود. چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شوند. این مجموعه، توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی باز قرار داده شده، به نحوی که رو به یک بازوی باز قرار گیرند. نور مناسب بایستی در تمام آزمایش‌ها و به میزان ثابتی فراهم گردد. رت‌ها به مدت ۵ دقیقه اجازه داشتند تا در بازوهای باز و بسته حرکت کنند. در این مدت، تعداد دفعات ورود به بازوی باز، تعداد دفعات ورود به بازوی بسته و زمان سپری شده در هر کدام از بازوها ثبت گردید. درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (%Open) (Arm Time: %OAT) و درصد ورود به بازوی باز (%Open Arm entries: %OAE) به عنوان فاکتورهای استاندارد ارزیابی اضطراب (۱۴) به این شکل محاسبه شدند: %OAT: زمان ورود به بازوی باز تقسیم بر زمان ورود به کل بازوها × ۱۰۰، %OAE: دفعات ورود به بازوی باز تقسیم بر کل دفعات ورود به بازوها × ۱۰۰. در این مطالعه کل دفعات ورود به بازوها به عنوان معیاری از فعالیت حرکتی در نظر گرفته شد (۱۵). افزایش معنی‌دار این پارامترها به معنی کاهش معنی‌دار اضطراب در حیوان است. البته فاکتور %OAE نسبت به فاکتور %OAT دارای حساسیت کمتری در ثبت رفتار اضطرابی و یا ضد اضطرابی حیوان است (۱۶).

گروه‌های مورد مطالعه

آزمایش یک: بررسی اثر آگونیست TRPV₁ بر اضطراب

در این آزمایش، به سه گروه از رت‌ها غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت از داروی capsaicin تزریق شد. به گروهی دیگر از حیوانات، غلظت ۰/۵ میکرولیتر/رت حلال به عنوان گروه کنترل تزریق شد.

۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت
 [F(۳,۲۴)=۱۰/۳۳, P < ۰/۰۰۱] (نمودار ۱، A2)
 افزایش دهد که نشان‌دهنده اثرات ضداضطرابی این دارو است. این دارو، فعالیت حرکتی موش‌ها را در غلظت ۰/۰۳ میکروگرم/رت نیز افزایش داد [F(۳,۲۴)=۲۵/۲۸ P < ۰/۰۰۱] (نمودار ۱، C2). علاوه بر آن مشخص گردید که دارو در غلظت‌های به کار رفته، تأثیری بر %OAE حیوان نداشته است [F(۳,۲۴)=۱/۹۱, P > ۰/۰۵] (نمودار ۱، B2).



نمودار ۱ - بررسی اثر تزریق داروهای capsaicin و AMG9810 در ناحیه CA₁ هیپوکامپ خلفی بر فاکتورهای %OAT، %OAE و فعالیت حرکتی. نتایج به صورت Mean±SEM بیان شده است. گروه‌ها ۷ تایی هستند. ★: P<0.05, ★★: P<0.01 و ★★★: P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل است.

آزمایش دو: بررسی اثر آنتاگونیست TRPV₁ بر اضطراب

در این آزمایش، به سه گروه از رت‌ها، غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت از داروی AMG9810 تزریق شد. به گروهی دیگر از حیوانات، غلظت ۰/۵ میکرولیتر/رت از حلال دارو به عنوان گروه کنترل تزریق شد.

روش آماری

محاسبات از طریق انجام روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) به کمک نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. بعد از یک F معنی‌دار، آنالیز به کمک Tukey Post-hoc ادامه یافت. از لحاظ آماری، P<۰/۰۵ معنی‌دار فرض شد.

نتایج

اثر آگونیست گیرنده TRPV₁ بر رفتارهای شبه اضطراب

تزریق داروی capsaicin در غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت در ناحیه هیپوکامپ خلفی موش‌های صحرایی نشان داد که این دارو توانسته است فاکتور %OAT را در غلظت‌های ۰/۰۰۳ و ۰/۰۳ میکروگرم/رت، [F(۳,۲۴)=۴/۲۰, P<۰/۰۵] (نمودار ۱، A1) و فاکتور %OAE را در غلظت میکروگرم/رت ۰/۰۰۳ [F(۳,۲۴)=۵/۷۰ P<۰/۰۱] (نمودار ۱، B1) کاهش دهد که نشان‌دهنده اثرات اضطراب‌زای این دارو است. علاوه بر آن مشخص گردید که دارو در غلظت‌های به کار رفته، تأثیری بر فعالیت حرکتی حیوان نداشته است [F(۳,۲۴)=۱/۴۴ P>۰/۰۵] (نمودار ۱، C1).

اثر آنتاگونیست گیرنده TRPV₁ بر رفتارهای شبه اضطراب

تزریق AMG9810 در غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۳ و ۰/۳ میکروگرم/رت در ناحیه هیپوکامپ خلفی موش‌های صحرایی نشان داد که این دارو توانسته است فاکتور %OAT را در غلظت‌های

بحث

اضطراب، پاسخ یک موجود به یک عامل تهدید-کننده احتمالی است که می‌تواند هومئوستاز موجود را دچار اختلال نماید (۱۷). از آن جایی که تشابهات زیادی بین علائم بالینی اضطراب در انسان و رفتار اضطرابی حیوانات وجود دارد، از مدل‌های حیوانی برای مطالعه اختلالات اضطرابی استفاده می‌شود. بهره‌گیری از مدل‌های تجربی اضطراب، راهی است که ما را با عوامل بیولوژیک اختلالات اضطرابی، بیشتر آشنا می‌سازد. علاوه بر آن، شناخت عوامل بیولوژیک و محیطی مؤثر بر اضطراب حاد و مزمن، می‌تواند به کشف و بررسی ترکیبات دارویی جدید که اثر ضد اضطرابی قوی با عوارض جانبی کمتر داشته باشند، کمک کند. تاکنون مطالعات چندانی به منظور ارزیابی اثر آگونیست و آنتاگونیست‌های گیرنده TRPV₁ بر رفتارهای شبه اضطرابی انجام نشده است.

در مطالعه حاضر، به دنبال تزریق capsaicin در ناحیه CA₁ هیپوکامپ خلفی، اثرات شبه اضطرابی معنی‌داری در غلظت‌های پایین مشاهده گردید. با توجه به دارو capsaicin آگونیست TRPV₁ است به احتمال زیاد، گیرنده TRPV₁ عامل بروز اثرات شبه اضطرابی مشاهده شده در مورد این دارو است. درگیر بودن گیرنده TRPV₁ در رفتار اضطرابی، اخیراً توسط Kasckow و همکارانش (۱۸) گزارش شده است. شواهدی را در مورد اثر اضطراب‌زای آگونیست‌های وانیلوئیدی مثل olvanil در ماز بعلاوه‌ای شکل ارائه کردند.

Rubino و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۸ به دنبال تزریق capsaicin به قشر پیش‌پیشانی، رفتارهای شبه اضطرابی را در موش‌های مواجه شده با ماز بعلاوه‌ای شکل مشاهده کردند (۱۹). در مطالعه حاضر، تزریق غلظت بالای capsaicin (0.3 μg/rat) در ناحیه CA₁، هیچ تغییر معنی‌داری را در رفتار حیوان ایجاد نکرد. حساسیت‌زدایی سریع گیرنده‌های TRPV₁ ممکن است، توضیح احتمالی برای این یافته باشد. قبلاً در برخی مطالعات، حساسیت‌زدایی گیرنده‌های TRPV₁ به دنبال تزریق غلظت بالای capsaicin

گزارش شده است و همین یافته، دلیلی برای اثبات اثرات ضد درد capsaicin پس از پردردی اولیه، است (۲۰). این یافته می‌تواند نشان‌دهنده این مسأله باشد که گیرنده‌های TRPV₁ ممکن است نقش تنظیمی در کنترل حالات اضطرابی در سیستم عصبی مرکزی داشته باشند. از سویی برخی شواهد نشان می‌دهند که گیرنده‌های TRPV₁ با سیستم‌های دوپامینی، اندوکابینوئیدی و سروتونینی مغز که هر سه در تعدیل اضطراب نقش مهمی بر عهده دارند، دارای تداخل عملکرد هستند. در همین راستا در مطالعه‌ای نشان داده شد که بیان سیستم اندوکابینوئیدی و TRPV₁ در چند ناحیه از مغز موش‌های فاقد گیرنده دوپامینی نوع ۳ (D3) به‌طور اساسی تغییر کرده و می‌توان گفت که این تغییرات ممکن است در حساسیت کمتر موش‌های ترانس ژن شده به تعدادی از محرک‌های اضطراب‌زا نقش داشته باشند (۲۱). از سوی دیگر، بین گیرنده‌های کابینوئیدی و TRPV₁ در نورون‌ها هر دو نوع تداخل هم‌افزایی و مهارتی گزارش شده است (۵). افزون بر این، برخی مطالعات، ایجاد پردردی ناشی از سروتونین را در ارتباط با عملکرد گیرنده‌های TRPV₁ گزارش کرده‌اند. به طوری که تحریک گیرنده‌های سروتونینی نخاع، آزادسازی ماده P القا-شده توسط capsaicin در شاخ پشتی نخاع موش را تقویت می‌کند (۲۲) و سروتونین، عملکرد TRPV₁ را در نورون‌های حسی کولون موش افزایش می‌دهد (۲۳). از این رو به نظر می‌رسد سایر نوروترانسمیترها نیز احتمالاً در فعالیت گیرنده‌های TRPV₁ در تعدیل اضطراب دخالت می‌کنند که خود نیاز به بررسی بیشتری دارد.

ادامه آزمایش ما همچنین نشان داد که تزریق AMG9810 در ناحیه CA₁ هیپوکامپ، پاسخ شبه اضطرابی را القاء می‌کند. آنتاگونیست گیرنده TRPV₁ (AMG9810) که ما در این مطالعه استفاده کردیم، در مقایسه با آنتاگونیست قدیمی گیرنده‌های TRPV₁ یعنی capsazepine، دارای اثر اختصاصی‌تر و قدرت بیشتری است. در تایید یافته ما، Terzian و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ به دنبال تزریق capsazepine به ماده خاکستری دور

آنتاگونیست آن، (AMG9810) ایجاد کرد. این امر بدان معنی است که گیرنده‌های TRPV₁ نقش مهمی در تنظیم رفتارهای شبه‌اضطرابی دارند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و مسئولین محترم صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

قناتی خلفی، اثرات شبه‌ضداضطرابی را در ماز بعلاوه‌ای شکل مشاهده کردند (۲۴). در همین راستا santos و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۸، اثرات مشابهی را در هیپوکامپ شکمی مشاهده کردند (۲۵). بر این اساس، به احتمال زیاد، گیرنده TRPV₁ عامل بروز اثرات ضداضطرابی مشاهده شده بعد از تجویز AMG9810 است.

بنابراین، نتایج مطالعه دلالت بر آن دارد که تزریق capsaicin (آگونیست گیرنده‌های TRPV₁) به ناحیه CA₁ اثر اضطراب‌زا برخلاف اثر ضداضطراب

منابع مورد استفاده

- Sandford, J. J., Argyropoulos, S. V., Nutt, D. J., 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther* 88: 197-212.
- Millan, M. J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70: 83-244.
- Colbert, H. A., Smith, T. L., Bargmann, C. I., 1997. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17: 8259-8269.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.
- Di Marzo, V., Lastres-Becker, I., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Milone, A., Davis, J. B., Fernandez-Ruiz, J. J., 2001. Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol* 420: 123-131.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E. D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- De Lago, E., de Miguel, R., Lastres-Becker, I., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J., 2004. Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Res* 1007: 152-159.
- Minowa, S., Ishihara, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Murayama, T., 2005. Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain. *Brain Res* 1039: 75-83.
- Ameri, A., 1999. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-348.
- Deacon, R. M., Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., 2002. Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci* 116: 494-497.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-167.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 297-303.
- Rezayat, M., Roohbakhsh, A., Zarrindast, M. R., Massoudi, R., Djahanguiri, B., 2005. Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiol Behav* 84: 775-782.
- Zarrindast, M. R., Farahvash, H., 1994. Effects of GABA-ergic drugs on penile erection induced by apomorphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 115: 249-253.

17. Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 125: 141-149.
18. Kasckow, J. W., Mulchahey, J. J., Geracioti, T. D., 2004. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 291-295.
19. Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Vigano, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., Parolaro, D., 2008. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18: 1292-1301.
20. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci* 100: 8002-8006.
21. Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G. M., Drago, F., Di Marzo, V., 2009. Altered responses of dopamine D3 receptor null mice to excitotoxic or anxiogenic stimuli: Possible involvement of the endocannabinoid and endovanilloid systems. *Neurobiol Dis* 36: 70-80.
22. Bertelsen, A. K., Afrah, A. W., Gustafsson, H., Tjolsen, A., Hole, K., Stiller, C. O., 2003. Stimulation of spinal 5-HT (2A/2C) receptors potentiates the capsaicin-induced in vivo release of substance P-like immunoreactivity in the rat dorsal horn. *Brain Res* 987: 10-16.
23. Sugiura, T., Bielefeldt, K., Gebhart, G. F., 2004. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci* 24: 9521-9530.
24. Terzian, A. L., Aguiar, D. C., Guimaraes, F. S., Moreira, F. A., 2009. Modulation of anxiety-like behaviour by transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 19: 188-195.
25. Santos, C. J., Stern, C. A., Bertoglio, L. J., 2008. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. *Behav Pharmacol* 19: 357-360.