



دانشگاه خوارزمی

دانشکده علوم زیستی

بررسی اثر سیستم گلوتاماترژیک ناحیه ی CA1 هیپوکامپ بر فراموشی القا شده توسط هارمان در موش

کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI

Involvement of glutamatergic system of CA1 on harmane induced-amnesia in the step-down passive avoidance test

استاد راهنما

دکتر شهربانو عریان

دکتر محمد رضا زرین دست

استاد مشاور:

دکتر محمد ناصحی

نگارش :

سارا اخلاقی پور رامهرمی

۱۳۹۱

چکیده

آلکالوئیدهای β -کربولین نظیر هارمان در مواد غذایی گیاهی معمولی (گندم، برنج، ذرت، جو، انگور و قارچ) و در مواد مشتق شده از گیاهانی نظیر توتون یافت می شوند. این آلکالوئیدها دارای اثرات شناختی زیادی از جمله تغییر در حافظه کوتاه مدت و بلند مدت و اثرات توهم زا می باشند. در این مطالعه نقش سیستم گلوتاماترژیک در هیپوکامپ پستی بر روی اثرات هارمان بر حافظه اجتنابی مهاری مورد مطالعه قرار گرفته است. موشهای کوچک آزمایشگاهی با تزریق درون صفاقی کتامین هیدرو کلراید بعلاوه زایلازین بیهوش شدند و سپس در دستگاه استرئوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول به صورت دو طرفه، یک میلی متر بالاتر از (CA1) هیپوکامپ پستی قرار داده شد. به تمامی حیوانات قبل از شروع آزمونهای رفتاری برای بهبودی یک هفته فرصت داده شد. دستگاه یادگیری اجتنابی مدل step-down برای سنجش حافظه ی دراز مدت در موشهای سوری نر بالغ استفاده شد. در این مطالعه اثرات آگونیست هاو آنتاگونیست های گیرنده گلوتاماتی NMDA بر فراموشی ناشی از هارمان در موش کوچک آزمایشگاهی بررسی گردید. تجویز هارمان (12 mg/kg) به صورت درون صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از آموزش، باعث کاهش حافظه شد. ازطرف دیگر تجویز داخل CA1 آگونیست گیرنده NMDA یعنی (0.02 μ g/mice) NMDA و همچنین آنتاگونیست گیرنده NMDA یعنی (0.125 μ g/mice) AP7، ۵ دقیقه قبل از آموزش به تنهایی بر روی به یادآوری حافظه تاثیری نداشت. نتایج نشان می دهند که بین هارمان و دوز بی اثر آگونیست و آنتاگونیست های گیرنده های NMDA برهمکنش وجود دارد. تزریق (0.02 μ g/mice) NMDA و (0.125 AP7 (μ g/mice)، ۵ دقیقه بعد از تزریق هارمان باعث برگشت فراموشی ناشی از هارمان می شود. این

یافته ها نشان دهنده این می باشند که سیستم گلوتاماترژیک هیپوکامپ پستی نقش تعدیل کننده ای بر روی فراموشی القاء شده توسط هارمان دارد.

کلمات کلیدی: هارمان ، سیستم گلوتاماترژیک ، گیرنده NMDA ، حافظه ، یادگیری اجتنابی

مهاری ، موش کوچک آزمایشگاهی

فهرست مطالب :

صفحات :

چکیده

کلمات کلیدی

عنوان

فصل اول: مقدمه

- ۱.۱ - یادگیری و حافظه ۲
- ۱.۲ - انواع حافظه ۳
- ۱.۲.۱ - حافظه بیانی ۳
- ۱.۱.۲.۱ - مراحل شکل گیری حافظه بیانی ۳
- ۱.۲.۲ - حافظه غیر بیانی ۵
- ۱.۳ - انواع حافظه براساس مدت زمان ۶
- ۱.۳.۱ - حافظه کوتاه مدت ۶
- ۱.۳.۲ - حافظه طولانی مدت ۷
- ۱.۴ - نقش قسمت های خاص مغز در پردازش حافظه ۷
- ۱.۴.۱ - نقش هیپوکامپ در حافظه ۸
- ۱.۵ - نوروانوتومی هیپوکامپ ۱۲
- ۱.۶ - خروجی ها و ورودی های هیپوکامپ ۱۴
- ۱.۷ - ناحیه ی CA1 هیپوکامپ ۱۵
- ۱.۸ - هیپوکامپ و یادگیری ۱۶
- ۱.۸.۱ - مکانیسم مولکولی تشکیل حافظه در هیپوکامپ ۱۷

۱۷ مکانیسم LTP در ناحیه ی CA1
۱۸ مکانیسم LTD در ناحیه ی CA1
۱۸ نقش شکل پذیری سیناپسی در تشکیل حافظه
۲۰ آزمون حافظه
۲۰ سیستم های نوروترانسمیتری دخیل در یادگیری و حافظه
۲۱ گلوتامات
۲۲ متابولیسم گلوتامات
۲۵ گیرنده های گلوتامات
۲۶ گیرنده های یونوتروپیک گلوتامات
۲۹ گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات
۳۰ رهایش گلوتامات
۳۲ ناقلین گلوتامات
۳۳ تنظیم عملکردی گیرنده های NMDA
۳۴ بررسی نقش گلوتامات در حافظه و یادگیری
۳۵ مسیر انتقال پیام گلوتاماتی
۳۶ گلوتامات و تکوین نورونی
۳۶ پراکندگی گیرنده های NMDA در مغز
۳۷ هارمان
۴۰ اثرات هارمان بر حافظه

۲. ۲۱. ۱ - اثرات هارمان بر مونوآمین اکسیدازها..... ۴۱

فصل دوم: مواد و روشها

- ۲.۱- حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری آنها..... ۴۵
- ۲.۲- وسایل و دستگاههای مورد نیاز..... ۴۶
- ۲.۳- مواد و داروهای مورد استفاده..... ۴۷
- ۲.۴- روش جراحی حیوانات با دستگاه استرئوتکسی..... ۴۸
- ۲.۶- دستگاه سنجش حافظه..... ۵۴
- ۲.۶.۱- جلسه آموزش..... ۵۶
- ۲.۶.۲- جلسه آزمون و ارزیابی حافظه..... ۵۶
- ۲.۷- روش حل کردن و مصرف داروها..... ۵۷
- ۲.۸- تیمارهای دارویی..... ۵۸
- ۲.۸.۱- آزمایش های انجام شده..... ۵۸
- ۲.۸.۲- تهیه برش های مغزی جهت تأیید صحت جراحی مغز و محل تزریق دارو..... ۵۹
- ۲.۹- تجزیه و تحلیل آماری..... ۵۹

فصل سوم: نتایج

۳.۱- نتایج بافت شناسی مغز..... ۶۲

۳.۲- نتایج آنالیز آماری آزمایشات..... ۶۴

۳.۲.۱- بررسی اثر NMDA بر حافظه اجتنابی مهارى..... ۶۴

۳.۲.۲- بررسی اثر AP7 بر حافظه اجتنابی مهارى..... ۶۶

۳.۲.۳- بررسی اثر هارمان بر حافظه اجتنابی مهارى..... ۶۶

۳.۲.۴- بررسی اثر NMDA بر فراموشى ناشى از

هارمان..... ۶۶

۳.۲.۵- بررسی اثر AP7 بر فراموشى ناشى از هارمان..... ۶۶

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴.۱- بحث و نتیجه گیری..... ۶۹-۷۹

۴.۲- پیشنهادات..... ۷۹

منابع..... ۸۰-۸۴

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۶۵	نمودار ۳.۱: تزریق درون مغزی دوزهای مختلف NMDA و AP7.....
	نمودار ۳.۲: تزریق درون مغزی دوز بی اثر NMDA و AP7 ، ۵ دقیقه قبل از آموزش همراه با
۶۷	دوزهای ۴،۸،۱۲ هارمان.....

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

فصل اول: کلیات

- شکل ۱.۱: شمای ظاهری هیپوکامپ..... ۱۳
- شکل ۱.۲: نواحی مختلف تشکیلات هیپوکامپ..... ۱۴
- شکل ۱.۳: آوران ها و وابران های هیپوکامپ..... ۱۵
- شکل ۱.۴: ساختمان شیمیایی گلوتامات..... ۲۱
- شکل ۱.۵: چرخه گلوتامات گلوتامین..... ۲۵
- شکل ۱.۶: گیرنده NMDA..... ۲۹
- شکل ۱.۷: مدلی از سیناپس های گلوتاماترژیک در ناحیه ی CA1..... ۳۲
- شکل ۱.۸: انتقال گلوتامات در سیناپس های گلوتاماترژیک..... ۳۳

فصل دوم: مواد و روشها

- شکل ۲.۱: دستگاه استرئوتاکس..... ۵۰
- شکل ۲.۲: نحوه قرارگیری سرجانور در دستگاه استرئوتاکسی..... ۵۱
- شکل ۲.۳: تعیین محل نقطه برگما..... ۵۱

- شکل ۲.۴ : علامت گذاری مختصات ناحیه CA1 ۵۲
- شکل ۲.۵ : سوراخ کردن نقاط مورد نظر با مته ۵۲
- شکل ۲.۶ : قرارگیری کانول بر محل مورد نظر ۵۳
- شکل ۲.۷ : مرحله تثبیت کانول روی جمجمه ۵۳
- شکل ۲.۸-a- دستگاه Step-down ۵۵
- شکل ۲.۸-b- دستگاه Step-down ۵۵
- شکل ۲.۹ : تصویر شماتیک جلسه آموزش و آزمون ۵۷

فصل سوم : نتایج

- شکل ۳.۱ : دستگاه ویبرواسلایس و نرم افزار Motic Image ۶۲
- شکل ۳.۲ : تطابق محل جراحی با اطلس پاکسینوس ۶۳

فصل اول : مقدمه

مقدمه ای بر حافظه

۱.۱- حافظه

یادگیری و حافظه ارتباط تنگاتنگی با هم دارند، حافظه در واقع یک تغییر رفتاری است که به وسیله تجربه حاصل می شود و یادگیری به فرآیندی اطلاق می شود که توسط آن دانش ها و اطلاعات جدید کسب شده، و منجر به ذخیره حافظه می شود. حافظه قابلیت ذخیره کردن اطلاعات و به یادآوری آن ها در مواقع نیاز است و یادگیری و حافظه سازش مادام العمر مدارهای نورونی مغز با محیط است که جانوران را قادر به پاسخگویی به محرکهایی که از پیش تجربه شده اند می سازد (Cotman and Lynch 1989).

بر طبق این تعاریف انواع مختلفی از حافظه وجود دارد نوعی از حافظه که در ارتباط با وقایع و حقایق است و منجر به هوشیاری فرد می شود، حافظه بیانی نامیده میشود. نوع دیگر حافظه، حافظه غیر بیانی است این نوع از حافظه با هوشیاری و آگاهی در ارتباط نیست. این دو نوع حافظه در ارتباط با یکدیگر نیستند بیمارانی وجود دارند که حافظه بیانی آنها تخریب شده اما حافظه غیر بیانی آنها حفظ شده است. بنابراین باور بر این است که مکانیسم های جدایی برای تشکیل هر کدام از انواع حافظه وجود دارد و همچنین نواحی مختلفی از مغز برای تشکیل هر کدام از انواع حافظه درگیر است (Okano, Hirano et al. 2000).

۱.۲ انواع حافظه

از نقطه نظر فیزیولوژیک حافظه شامل دو نوع حافظه بنامهای حافظه بیانی^۱ و حافظه غیر بیانی^۲ می باشد.

۱.۲.۱ حافظه بیانی

حافظه بیانی^۳ یا حافظه شناختی^۴ در ارتباط با دانش حقیقی اشخاص، مکانها و اشیاء و آنچه که این حقایق معنی می دهد، می باشد. این نوع حافظه برای حفظ و نگهداری وابسته به هیپوکامپ و بخشهای دیگر لوبهای گیجگاهی میانی^۵ می باشد و در ارتباط با آگاهی و هوشیاری است (Okano, Hirano et al. 2000)

حافظه بیانی خود به سه نوع تقسیم می شود:

الف) حافظه وقایع^۶ که حافظه ی مربوط به وقایع و تجارب شخصی است.

ب) حافظه معنایی^۷ که حافظه ی در ارتباط با حقایق مانند کلمات، قواعد و زبان است.

ج) حافظه عملی^۸

۱.۲.۱.۱ - مراحل شکل گیری حافظه بیانی

حافظه بیانی در طی چهار مرحله شکل می گیرد:

الف) به رمز درآوردن^۹

¹ -Explicit Memory
² -Implicit Memory
³ -Declarative M.
⁴ -Recognition M.
⁵ -Medial temporal lobe
⁶ -Episodic M.
⁷ -Semantic M.
⁸ Working memory
⁹ -Encoding

به رمز درآوردن شامل فرآیندهایی است که در طی آنها اطلاعاتی که جدیداً یاد گرفته شده، در اولین برخورد مورد توجه و رسیدگی قرار می گیرند و پردازش می شوند. گستردگی و ماهیت این مرحله برای تعیین میزان به یادآوری اطلاعات یادگرفته شده در زمانهای آینده مهم است.

(ب) تثبیت^{۱۰}

تثبیت به فرآیندهایی گفته می شود که اطلاعاتی را که جدیداً ذخیره شده و هنوز قابل تغییر هستند، تغییر می دهد تا آنها را برای ذخیره در دراز مدت پایدار سازد. تثبیت شامل بیان ژنها و سنتز پروتئین های جدیدی است که موجب تغییرات ساختمانی می شوند و ذخیره حافظه را مدتهای طولانی پایدار می کنند.

(ج) ذخیره سازی^{۱۱}

ذخیره سازی به مکانیسم ها و جایگاههایی اشاره می کند که بوسیله آنها حافظه در طی زمانها نگهداری می شود. یکی از ویژگیهای حافظه دراز مدت این است که تقریباً نامحدود به نظر می رسد. در حالیکه حافظه کوتاه مدت عملی یا در حال کار، خیلی محدود است.

(د) به یادآوری^{۱۲}

به یادآوری به فرآیندهایی گفته می شود که به اطلاعات ذخیره شده اجازه می دهد تا به یاد آورده شوند و مورد استفاده قرار گیرند. به یادآوری شامل فراخواندن انواع مختلفی از اطلاعات که در جایگاههای ذخیره ای مختلف ذخیره شده اند و جمع کردن آنها با هم است (Okano, Hirano et al. 2000).

¹⁰-Consolidation

¹¹-Storage

¹²-Retrieval

۱.۲.۲ - حافظه غیر بیانی^{۱۳}

حافظه غیربیانی و یا حافظه رفلکسی بر خلاف حافظه بیانی نه بطور مستقیم به فرآیندهای آگاهانه وابسته است و نه برای به یادآوری به یک جستجوی آگاهانه حافظه نیازمنداست. این نوع حافظه به آرامی و در طی تکرار آموزش های زیادی ایجاد می شود و به طور عمده نه بوسیله کلمات، بلکه بوسیله عملکرد بیان می شود (Okano, Hirano et al. 2000). حافظه آشکار برای حفظ و نگهداریش، حداقل در بیشتر موارد، نیاز به پردازش در هیپوکامپ ندارد و شامل مهارتها^{۱۴}، عاداتها^{۱۵} و رفلکسهای شرطی^{۱۶} شده می باشد. مثالهایی از حافظه غیر بیانی شامل مهارتهای ادراکی و حرکتی و یادگیری انواع خاصی از روشها و قواعد است.

اشکال مختلف حافظه غیر بیانی از طریق اشکال مختلف یادگیری بدست می آیند. ونواحی مختلف مغزی را شامل می شوند. برای مثال تصور می شود حافظه کسب شده از طریق شرطی شدن ترس، که یک ترکیب هیجانی دارد، آمیگدال را شامل شود. حافظه بدست آمده از طریق شرطی شدن عامل نیازمند استراتوم و مخچه است. حافظه بدست آمده از طریق شرطی شدن کلاسیک، حساس کردن وعادت (سه فرم ساده یادگیری) شامل تغییراتی در سیستمهای حسی و حرکتی درگیر در یادگیری است (Kandel 2000).

¹³ Nondeclarative M.

¹⁴ skill

¹⁵ habits

¹⁶ Conditioned reflexes

۱.۳- انواع حافظه بر اساس مدت زمان

۱.۳.۱- حافظه کوتاه مدت

حافظه کوتاه مدت به فرآیندهای حافظه‌های که اطلاعات را بطور موقتی تا زمان فراموشی یا تا زمان ضمیمه شدن به حافظه دراز مدت پایدار نگهداری می‌کند، اطلاق می‌شود و ثانیه‌ها تا ساعت‌ها دوام می‌آورد (Squire 1999).

روانشناسان حافظه کوتاه مدت را به دو جزء اصلی تقسیم می‌کنند که عبارتند از:

حافظه فوری^{۱۷} و حافظه در حال کار یا عملی^{۱۸}.

الف) حافظه فوری

حافظه فوری به آنچه که از لحظه شروع دریافت اطلاعات می‌تواند بطور فعال در مغز نگهداری شود، اطلاق می‌شود. حافظه فوری اطلاعاتی است که تمرکز توجه روی آنهاست و جریان همزمان تفکر را اشغال می‌کند. ظرفیت حافظه فوری کاملاً محدود است و تا حدود ۳۰ ثانیه نیز باقی می‌ماند (Cotman and Lynch 1989).

ب) حافظه عملی

حافظه فوری در زمان و محتوا می‌تواند بوسیله تمرین و تکرار بطور فعال، گسترش یابد که به آن حافظه عملی یا در حال کار می‌گویند و ممکن است برای دقایقی و حتی ساعتها دوام آورد (Squire 1999).

¹⁷-Immediate memory.

¹⁸-Working memory.

۱.۳.۲- حافظه دراز مدت

حافظه دراز مدت دارای اطلاعات نامحدودی است. بین حافظه کوتاه مدت و دراز مدت مرز مشخصی وجود ندارد ولی همین که حافظه کوتاه مدت به دراز مدت تبدیل شود برای مدت طولانی دوام می آورد (Squire 1999).

میانجی های سیناپسی تحریکی در هیپوکامپ از طریق گیرنده های گلوتامات اثر می نمایند. یون های Na^+ که از گیرنده های AMPA گلوتامات عبور می نمایند باعث ایجاد پاسخ EPSP در سیناپس دستجات شافر با سلول های هر می CA1 می شوند. علاوه بر آن نورون های CA1 دارای گیرنده های پس سیناپسی NMDA نیز هستند. این گیرنده ها زمانی که گلوتامات به گیرنده متصل شود و غشا پس سیناپسی دپلاریزه شود باعث عبور یون Ca^{+2} می شوند. مدارک قابل توجهی این افزایش Ca^{+2} را با تشکیل LTP مرتبط می دانند افزایش Ca^{+2} باعث فعال شدن دو پروتئین کیناز می شود ۱- پروتئین کیناز C ۲- کلسیم - کالمودولین وابسته به پروتئین کیناز II. این افزایش کینازها از دو طریق باعث شکل گیری LTP می شوند.

- ۱- افزایش مقدار گیرنده های AMPA غشا پس سیناپسی .
- ۲- افزایش میزان میانجی های عصبی نورون های پیش سیناپسی (Gluck and Myers 1997).

۱.۴- نقش قسمت های خاص مغز در فرآیند حافظه

دو ناحیه از مغز که در حافظه نقش مهمی دارند عبارتند از:

۱- آمیگدال

۲- هیپوکامپ

۱.۴.۱ - نقش هیپوکامپ در حافظه

در ۱۹۵۰ بیماری به علت حملات شدید صرع به وسیله حذف دو طرفه ی لوب میانی گیجگاهی مورد معالجه قرار گرفت. جراحی به صورت موفقیت آمیزی باعث تضعیف حملات ناگهانی صرع شد اما فرد بعد از جراحی دچار فراموشی عمیق شد (Scoville and Milner 1957).

با حذف هیپوکامپ فرد دچار فراموشی پیش گرا^{۱۹} شد به این صورت که توانایی کسب خاطرات جدید از وقایع ، مکان ها و.. را از دست داد. علاوه بر این فرد به طور نسبی دچار فراموشی پس گرا^{۲۰} (فراموش کردن خاطرات و وقایع گذشته) نیز شد (Scoville and Milner 1957).

برای مثال فرد خاطرات جدید تر خود از وقایعی که اخیرا برای او اتفاق افتاده بود (برای مثال در ماه ها و سال های قبل از جراحی) را فراموش کرد ولی به نظر میرسید که وقایعی که حدود ۱۱ سال پیش از جراحی برای او رخ داده بود را به خاطر می آورد. این مشاهدات قاطع اولین شواهد برای دخالت هیپوکامپ در تثبیت حافظه ی طولانی مدت بودند (Corkin 2002).

بررسی های دیگر در بیمارانی که دچار آسیب هیپوکامپ شده بودند فراموشی پسگرا در همین سطح را نشان دادند. به نظر می رسد که درجه ی فراموشی عموماً با وسعت آسیب هیپوکامپ در ارتباط است (Wang, Hu et al. 2006).

برای مثال آسیب محدود شده به ناحیه ی CA1 هیپوکامپ منجر به فراموشی پس گرای محدودتری می شوند حال آنکه در بیمارانی با آسیب هیپوکامپ وسیع تر شدت فراموشی بیشتر است (Zola-Morgan, Squire et al. 1986).

بنابراین گفته می شود که هیپوکامپ و ساختارهای وابسته به آن به صورت فعال در پردازش و تثبیت حافظه تا هفته ها ، ماهها و سال ها بعد از تشکیل ابتدایی حافظه درگیر هستند.

¹⁹ Anterograde

²⁰ Retrograde

تحقیقات در چندین دهه گذشته نشان داده اند که تخریب ساختارهای هیپوکامپی به صورت تدریجی روی خاطرات جدید تاثیر می گذارد در حالی که آسیب نئوکورتکس روی خاطرات دورتر تاثیر می گذارد (Squire and Alvarez 1995; Frankland and Bontempi 2005).
بنابر این توافق عمومی این است که هیپوکامپ یک نقش محدود شونده توسط زمان در تثبیت حافظه ی ناپایدار جدید به حافظه ی پایدار طولانی مدت بازی میکند (Zola-Morgan, Squire et al. 1986).

به محض تثبیت حافظه ی وابسته به هیپوکامپ این خاطرات سرانجام بدون دخالت قابل توجه هیپوکامپ در کورتکس ذخیره می شوند.
علت اهمیت زیاد هیپوکامپ در کمک به اندوزش حافظه های جدید مغز احتمالاً در این است که هیپوکامپ یکی از مهمترین مسیرهای خروجی نواحی پاداش و تنبیه دستگاه لیمبیک می باشد.
محرکهای حسی یا افکاری که باعث درد یا بیزاری می شوند مراکز تنبیه^{۲۱} لیمبیک را تحریک می نمایند. مجموعه تمام این ها زمینه خلقی و انگیزش شخص را ایجاد می کند. از جمله این انگیزه ها، نیروی محرک در مغز برای به خاطر آوردن تجارب و افکار خوشایند یا ناخوشایند است. ثابت شده است که هیپوکامپ و به میزان کمتر، هسته های پشتی میانی تالاموس (دیگر ساختمان لیمبیک) اهمیت خاصی در تصمیم گیری درباره این موضوع دارند که کدامیک از افکار ما براساس پاداش یا تنبیه به حدی هستند که ارزش ثبت شدن در حافظه را دارند. هسته های تالاموسی که با سیستم لیمبیک ارتباط دارند فیبرهایی به قسمت میان شکمی کورتکس پری فرونتال (قسمتی از کورتکس که در زیر ناحیه جلدی مغز چین خورده است) می فرستد. تخریب این ناحیه حافظه

²¹ Punishment area