

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه :

جهت دریافت دکترای عمومی داروسازی

موضوع :

بررسی اثرات دوره زمانی (time course) یادگیری
بر بیان پروتئین های VChT و COX-2 با مدل
Morris Water Maze

استاد راهنما :

جناب آقای دکتر محمد شریف زاده

مرا اطلاعات آراک علمی بزرگ
تسبیح برکن

نگارش :

سکینه محمدی عراقی

۱۳۸۶ / ۱۶ / ۳

شماره پایان نامه : ۴۶۷۲

سال تحصیلی : ۸۶-۱۳۸۵

۹۰۵۸۰

بعد از حمد فداوند که سپاس را بهای نعماتش فرموده
و پناهگاه بلایایش و وسیلهٔ بهشت جاویدانش و موجب فوزی
امسانش، درود و سلام بر پیامبرش می‌فرستم که رسول رحمت است
و رهبر تمام رهبران ملت و مشعل فروزان امت و پر خاندانش که
چراغهای فروزانند و امتها را پاسدار، نشانه‌های روشن دینند و معیار
فضل و فضیلت.

از فداوند بزرگ طلب توفیق و برکناری از لغزش می‌کنم و نیز از او
می‌خواهم مرا در این راه یاری دهد و از فطای فکر پیش از فطای
زبان و از لغزش سفن پیش از لغزش قدم ایمن دارد. به او پناه
می‌برم که او مرا کفایت می‌کند و نیکو نهبان و کفایت کننده تنها
اوست.

این رساله را با تشکر و سپاس بی پایان از زحمات استاد بزرگوارم جناب آقای

دکتر شریف‌زاده، تقدیم می‌کنم به

گوهر گرانبهای زندگیم،

مادر عزیزم،

که بیانم برای سپاس از تمام فویبها، دلسوزیها و مهربانیهایش قاصر است،

نازینی که نه درخور تقدیر بلکه در فور ستایش است؛ او که همواره تکیه گاهی

ممکن و پشتوانه ای استوار برایم بوده و از هیچ کوششی در راه موفقیتم دریغ

نورزیده است.

تقدیم به

روح پاک پدرم

که نیک می‌دانم جایگاه ابدیش، رفیع و آسمانی است.

تقدیم به

همسر مهربانم

که تشویق‌ها و حمایت‌هایش مشکلات به ثمر رسیدن

این تحقیق را بر من آسان نمود.

و تقدیم به بهار زندگی ام مریم

تقدیم به

خواهران و برادرانم که از صمیم قلب دوستشان داریم.

تقدیم به

خانواده بزرگوار همسرم به پاس تمام مهربانیهایشان.

تقدیم به

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد شریف‌زاده که همواره در این مسیر از
راهنمایی‌های صادقانه ایشان بهره جستیم، از صبوری‌هایشان درس گرفتیم و با
دلگرمی هاشان امیدوارتر حرکت کردیم.

تقدیم به

دوست فوج سرکار خانم دکتر سمیه شیران به پاس مهربانی‌هایش.

و با تشکر از جناب آقای کاظمی و جناب آقای اکبری، به خاطر کمک‌های

بی دریغشان.

فهرست مطالب

| صفحه | عنوان |
|------|--|
| ۱ | چکیده..... |
| ۳ | فصل اول : کلیات و مروری بر مطالعات انجام شده |
| ۴ | ۱-۱- مقدمه..... |
| ۶ | ۲-۱- یادگیری و حافظه (Learning & Memory)..... |
| ۶ | ۱-۲-۱- انواع حافظه..... |
| ۸ | ۲-۲-۱- مراحل تشکیل حافظه..... |
| ۹ | ۳-۲-۱- آناتومی یادگیری و حافظه..... |
| ۱۰ | ۴-۲-۱- میانجی های عصبی درگیر در حافظه و یادگیری..... |
| ۱۱ | ۳-۱- هیپوکامپ..... |
| ۱۴ | ۱-۳-۱- ناحیه CA ₁ |
| ۱۵ | ۲-۳-۱- میانجی های عصبی ناحیه CA ₁ |
| ۱۶ | ۳-۳-۱- ارتباط هیپوکامپ با یادگیری و حافظه..... |

- ۱۶-۳-۱- هیپوکامپ و حافظه فضایی (Spatial Memory) ۱۶
- ۱۷-۳-۱- مکانیسم های مولکولی تشکیل حافظه در هیپوکامپ ۱۷
- ۱۷-۳-۱- شکل پذیری یا انعطاف سیناپسی ۱۷
- ۱۸-۳-۱- LTP و حافظه ۱۸
- ۱۸-۳-۱- مکانیسم تشکیل LTP و حافظه ۱۸
- ۲۱-۳-۱- مکانیسم LTD در هیپوکامپ ۲۱
- ۲۲-۱-۴- سیستم کولینرژیک ۲۲
- ۲۲-۱-۴-۱- استیل کولین (Ach) ۲۲
- ۲۳-۱-۴-۲- مسیرهای سیستم کولینرژیک در CNS ۲۳
- ۲۵-۱-۴-۳- گیرنده های سیستم کولینرژیک ۲۵
- ۲۶-۱-۴-۴- گیرنده های کولینرژیک و ارتباط آنها با حافظه ۲۶
- ۲۷-۱-۴-۵- سیستم کولینرژیک هیپوکامپ و نقش آن در حافظه ۲۷
- ۲۸-۱-۴-۶- مارکرهای کولینرژیک (VAcHt و ChAT) ۲۸
- ۳۰-۱-۵- عملکرد آنزیم سیکلواکسیژناز در CNS ۳۰
- ۳۰-۱-۵-۱- آنزیم سیکلواکسیژناز، انواع و عملکرد ۳۰
- ۳۲-۱-۵-۲- توزیع آنزیم سیکلواکسیژناز در مغز ۳۲
- ۳۳-۱-۵-۳- تنظیم بیان آنزیم سیکلواکسیژناز در مغز ۳۳
- ۳۵-۱-۵-۴- نقش آنزیم سیکلواکسیژناز و متابولیت هایش در پلاستیسیته نورونی ۳۵
- ۳۶-۱-۵-۵- آنزیم سیکلواکسیژناز و بیماری های نورولوژیکی ۳۶

| | |
|---------|--|
| ۳۸..... | ۶-۱- روشهای عملی مطالعه یادگیری و حافظه فضایی |
| ۴۱..... | ۷-۱- ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) |
| ۴۲..... | ۱-۷-۱- روشهای ایمونوهیستوشیمی |
| ۴۳..... | ۲-۷-۱- ایمونوهیستوشیمی بافتهای منجمد شناور |
| ۴۳..... | ۳-۷-۱- مزایا و معایب روش (IHC) بافتهای منجمد شده |
| ۴۴..... | ۴-۷-۱- رقیق کردن آنتی بادی |
| ۴۵..... | فصل دوم: روش کار |
| ۴۶..... | ۱-۲- مطالعات رفتاری |
| ۴۶..... | ۲-۱-۱- حیوانات |
| ۴۶..... | ۲-۱-۲- سیستم ماز آبی موریس |
| ۴۸..... | ۳-۱-۲- روش کار با ماز آبی موریس |
| ۵۰..... | ۲-۲- مطالعات ایمونوهیستوشیمی |
| ۵۰..... | ۱-۲-۲- مواد مورد استفاده در رنگ آمیزی بافت های منجمد شده |
| ۵۳..... | ۲-۲-۲- روش ساخت و شرایط نگهداری محلولهای مورد نیاز |
| ۵۴..... | ۳-۲-۲- پرفیوژن قلبی |
| ۵۵..... | ۴-۲-۲- فریز کردن مغزها |
| ۵۶..... | ۵-۲-۲- برش گرفتن از مغزها |
| ۵۷..... | ۶-۲-۲- پروتکل ایمونوهیستوشیمی |

۶۱.....Subbed های لام های ۷-۲-۲

۶۱..... VACHT و COX-2 immunostaining کمی نحوه اندازه گیری ۸-۲-۲

۶۳..... آنالیز آماری ۳-۲

۶۴..... فصل سوم : نتایج

۷۶..... فصل چهارم: بحث

۸۴..... اختصارات

۸۶..... مراجع

فهرست اشکال

| صفحه | عنوان |
|---------|---|
| ۱۲..... | شکل ۱-۱- شمایی از تشکیلات هیپوکامپ، شکنج دنداننه ای و قشر انتورینال..... |
| ۱۵..... | شکل ۲-۱- ناحیه CA ₁ و سایر نواحی تشکیلات هیپوکامپی..... |
| | شکل ۳-۱- مدلی برای نشان دادن ایجاد LTP و LTD در هیپوکامپ توسط یون کلسیم، تحریک با |
| ۲۲..... | فرکانس بالا (HFC) تحریک با فرکانس پایین (LFC)..... |
| ۲۴..... | شکل ۴-۱- مسیرهای استیل کولین در مغز..... |
| ۳۹..... | شکل ۵-۱- شمایی از دستگاه Morris Water Maze..... |
| ۳۹..... | شکل ۶-۱- مقایسه نحوه حرکت موشهای صحرایی در روز اول و چهار آموزش..... |
| ۴۸..... | شکل ۱-۲- اجزا تشکیل دهنده MWM..... |
| ۴۹..... | شکل ۲-۲- نحوه اتصال فرستنده نور مادون قرمز به موش..... |
| ۵۴..... | شکل ۳-۲- نمایی از پرفیوژن قلبی موش صحرایی..... |
| ۵۶..... | شکل ۴-۲- نمایی از Mold Cube..... |
| ۵۷..... | شکل ۵-۲- نمایی از دستگاه Cryomicrotom..... |

شکل ۲-۶- نمایی از لام های رنگ آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی در دو ناحیه MSA و

هیپوکامپ.....۶۲

شکل ۳-۱- بررسی مسیر پیموده شده توسط حیوان در گروه کنترل (A) (Visible) ، یک روزه

(B) و چهار روزه (C).....۶۹

شکل ۳-۲- رنگ آمیزی برش های حاوی ناحیه MSA با آنتی بادی VChT در حیوانات گروه

کنترل (A) (no train) ، حیواناتی که به مدت یک روز (B) و چهار روز (C) در دستگاه MWM

آموزش دیده اند.....۷۱

شکل ۳-۳- رنگ آمیزی برش های حاوی ناحیه CA₁ هیپوکامپ با آنتی بادی VChT در گروه

کنترل (A) و حیواناتی که به مدت یک روز (B) و به مدت چهار روز (C) در دستگاه MWM

آموزش دیده اند.....۷۳

شکل ۳-۴- رنگ آمیزی برش های حاوی ناحیه CA₁ هیپوکامپ با آنتی بادی COX-2 در گروه

کنترل (A) و حیواناتی که به مدت یک روز (B) و چهار روز (C) آموزش دیده اند.....۷۵

فهرست نمودارها

| صفحه | عنوان |
|---------|---|
| ۶۷..... | نمودار ۱-۳- مقایسه اثر time course آموزش بر زمان لازم (A) و مسافت طی شده (B) جهت یافتن سکوی پنهان و سرعت شنای حیوان (C) در ماز آبی موریس |
| ۷۰..... | نمودار ۲-۳- مقایسه اثر time course آموزش بر بیان پروتئین VChT در ناحیه MSA با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در گروههای یک روزه و چهار روزه در مقایسه با گروه کنترل |
| ۷۲..... | نمودار ۳-۳- مقایسه اثر time course آموزش بر بیان پروتئین VChT در ناحیه CA ₁ هیپوکامپ با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در گروههای یک روزه و چهار روزه در مقایسه با گروه کنترل |
| ۷۴..... | نمودار ۴-۳- مقایسه اثر time course آموزش بر بیان پروتئین COX-2 در ناحیه CA ₁ هیپوکامپ با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در گروههای یک روزه و چهار روزه در مقایسه با گروه کنترل |

چکیده

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که پروتئین های سیستم کولینرژیک و COX-2 در مکانیسم های مربوط به حافظه نقش دارند. در این تحقیق به بررسی اثر دوره زمانی آموزش (time course training) بر بیان ژنهای VACHT و COX-2 پرداختیم. در این مطالعه موشهای صحرایی در دو گروه یک روزه و چهار روزه که هر روز شامل یک بلاک و هر بلاک شامل چهار تجربه بود در دستگاه Morris Water Maze آموزش دیدند. گروه کنترل در آزمون رفتاری یک گروه از حیواناتی بودند که در دستگاه MWM با وجود سکوی آشکار شنا کردند. نتایج حاصل از آزمونهای رفتاری نشان دهنده کاهش معنی دار زمان لازم و مسافت طی شده جهت یافتن سکوی پنهان در گروه چهار روزه نسبت به گروه یک روزه است. ولی تغییری در سرعت شنای حیوانات ایجاد نشده است. بلافاصله بعد از آخرین تجربه در روز آموزش، موشها را بیهوش کرده و از طریق بطن چپ قلب پرفیوژن بافتی جهت تثبیت بافت مغز روی آنها انجام گرفت، سپس سر موشها جدا شده و مغز آنها خارج گردید. برشهایی با ضخامت $50 \mu\text{m}$ از مغزها تهیه شد و مرحله ایمونوهیستوشیمی روی آنها انجام گرفت تا میزان بیان ژنهای VACHT و COX-2 در آنها بررسی شود. در آزمون سلولی، گروه کنترل، گروهی از حیوانات بودند که آموزش ندیده بودند (no train).

نتایج حاصل از آزمایشات ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده افزایش چگالی نوروهای حاوی VACHT و همچنین افزایش بیان COX-2 در ساعات و روز اول آموزش نسبت به گروه کنترل و نسبت به روز چهارم است.