



دانشگاه شهید بهشتی  
دانشکده علوم - گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم جانوری  
گرایش فیزیولوژی

موضوع:

مطالعه الکتروانسفالوگرافیک و تغییرات مورفولوژیک  
نورون های حاوی نیتریک اکسید کورتکس مغز موش صحرائی  
پس از محرومیت از خواب متناقض (REM)

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر ژیلایلا بهزادی

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر هما مناهجی

نگارش:

وحید عزیزی

۱۴۳۳۷

سال تحصیلی ۷۸-۱۳۷۷

## به نام خداوند پاک

سپاس می‌گویم و ستایش می‌کنم خداوند را که به من توفیق انجام این پروژه تحقیقاتی را عطا فرمود. پیش از هر چیز بر خود لازم می‌دانم که از زحمات گرانسنگ استاد بزرگووارم، دانشمند فرزانه و محقق فرهیخته کشور عزیزمان سرکار خانم دکتر زیلا بهزادی که راهنمایی اینجانب را در انجام این پروژه عهده‌دار بوده‌اند قدردانی بعمل آورم و این مهم را یادآور شوم که ایشان در ساحت پیدای علم بی‌هیچ دریغی گرانبهارترین اندوخته‌های علمی و تجربی خویش را با مهر و شفقت و سعه صدر در آمیخته و در اختیار این شاگرد منصب کم مایه خود قرار داده‌اند. همچنین راهنمایی‌ها و محبت‌های خالصانه دوست و استاد عزیزم جناب آقای دکتر وحید شیبانی را سپاس می‌گویم و زحمات سرکار خانم دکتر هما مناهجی که مشاوره این پروژه را بر عهده داشته‌اند را ارج می‌نهم.

مراتب تشکر خود را نسبت به جناب آقای دکتر سیدنا معاون محترم دانشکده علوم، جناب آقای دکتر ریاحی رییس محترم دپارتمان بیولوژی و سرکار خانم دکتر فرشته معتمدی ریاست محترم دپارتمان فیزیولوژی دانشکده پزشکی و جناب آقای محمدزاده و جناب آقای جعفری معاونین محترم دپارتمان بیولوژی ابراز می‌دارم.

از تمامی اساتید بزرگواری که از انوار تابناک علمشان بهره برده‌ام به ویژه سرکار خانم دکتر مریم شمس لاهیجانی، سرکار خانم دکتر فرشته افتخار، سرکار خانم دکتر یمیله مالک، سرکار خانم دکتر پروین رستمی، جناب آقای دکتر مسعود شیدایی و جناب آقای دکتر همایون خزعلی تشکر و قدردانی می‌کنم. همچنین از اعضاء هیئت علمی دپارتمان فیزیولوژی دانشکده پزشکی به ویژه سرکار خانم دکتر مهیار جان احمدی تشکر بعمل می‌آید.

از همفکری‌ها و محبت‌های دوستان ارجمندم جناب آقای فرهاد ذوقی، جناب آقای حسن رجیبی مهام، جناب آقای دکتر مهرداد روغنی، سرکار خانم فرناز نیکبخت و جناب آقای شهرام ضرابیان و جناب آقای امیر قاموسی سپاسگزاری می‌کنم.

تشویق‌ها و مساعدت‌های مشفقانه همکلاسیه‌های عزیز دوران تحصیلم آقای محسن هادی و خانم‌ها بهناز بیات، مهوش سیفعلی، طیبه شمسی، سهیلا فرخی و طویلی میرزاپور موجب امتنان قلبی اینجانب است.

در خاتمه از تمامی کارکنان دانشکده علوم، دپارتمان بیولوژی و دپارتمان فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صمیمانه تشکر می‌کنم.

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
الف	چکیده فارسی
ج	چکیده انگلیسی
۱	مقدمه
۴	فصل اول - مروری بر اطلاعات موجود
۵	بخش اول - مشخصات پلی گرافیک خواب و بیداری
۸	فیلوژنی خواب REM
۱۰	مکانیسم خواب REM
۱۶	مفهوم REM Latency و اهمیت بیولوژیک آن
۱۸	بخش دوم - تکنیک هیستوشیمیایی ND
۱۹	اعمال NO
	جفت شدن گیرنده‌های ان متیل - دی - اسپاراتات (NMDA) با نیتریک اکسید سنتاز
۲۳	(NOS)
۲۷	کولوکالیزاسیون نورونهای NADPH-diaphorase (ND) با سایر ساختارهای نورونی
۳۱	فصل دوم - مواد، وسایل و روشها
۳۲	مواد، وسایل و روشها
۳۲	۱- بخش الکتروفیزیولوژی
۳۷	آنالیز امواج

۴۱	..... بخش نوروهیستوشیمیایی
۴۱	..... روش نشان دادن نورونهای دارای NADPH-diaphorase (ND Positive cells)
۴۴	..... روشهای آماری
۴۵	..... فصل سوم - نتایج
۴۶	..... نتایج مطالعات الکتروانسفالوگرافی (EEG)
۵۴	..... نتایج مطالعات نور و هیستوشیمیایی
۶۴	..... فصل چهارم - بحث و نتیجه گیری
۶۵	..... مقدمه بحث
۶۵	..... بحث مطالعات الکتروانسفالوگرافی (EEG)
۶۸	..... بحث مطالعات نوروهیستوشیمی
۷۴	..... نتیجه گیری
۷۵	..... پیشنهادات
۷۶	..... منابع

## خلاصه

محرومیت از خواب یک استراتژی بالقوه سودمند برای مطالعه عمل خواب می باشد. دستاوردهای متعدد نشان می دهند که تولید ناهمزمانی الکتروانسفالوگرام (EEG) قشری، حاصل مشارکت فعالیت گروههای متعدد نورونی است. تغییرات EEG قشری طی خواب REM و محرومیت از خواب REM ممکن است روی فعالیت آنزیمها و مکانیسمهای سنتز آنها اثر بگذارد. در سالهای اخیر اهمیت بیولوژیک ارتباط بین نیتریک اکسید (NO) و فیزیولوژی خواب روشن شده است. دستاوردهای قبلی نشان می دهند که NO ممکن است در تنظیم الگوی خواب - بیداری ایفای نقش بکند. NADPH - diaphorase (ND) آنزیم اکسیداتیو لازم در سنتز NO، طی واکنش هیستو شیمیایی تبدیل نمک محلول تترازولیوم به یک واکنش غیر قابل انحلال آبی ارغوانی رنگ مشخص می شود و این واکنش هیستو شیمیایی به طور اختصاصی جمعیتهایی از نورونهای مغزی را نشان دار می کند.

به منظور بررسی اثرات محرومیت از خواب متناقض (PSD) روی الگوی خواب شش رأس موش صحرایی نر (۲۵۰ - ۲۰۰ گرم) تحت ۴۸ ساعت PSD قرار گرفتند. در این مطالعه الکترودهای ثبت به طور استریوتاکسیک روی مغز موشهایی که با مخلوط کتامین/رومپان بیهوش شده بودند مستقر شدند. پس از گذشت یک هفته از تشنج جراحی ثبت پایه از فعالیتهای EEG/EMG طی سه روز متوالی (ساعت ۱۵ - ۱۱) به عمل آمد. سپس موشها به روش دیسک روی آب از خواب REM محروم شدند و بعد سه مرحله چهار ساعتی ثبت پس از PSD از آنها گرفته شد.

بعد از PSD، الگوی خواب با امواج آهسته در مقایسه با ثبت پایه تغییر نمی کند اما الگوی خواب REM میزان ۱۴۹/۹٪ افزایش در زمان کل، ۴۸/۷٪ کاهش معنی دار در زمان تأخیر REM و ۵۳٪ افزایش در فرکانس پریودهای REM نشان می دهد. در بخشی دیگر مراحل خواب به سه دوره ۸۰ دقیقه ای تقسیم شدند. خواب REM در موشهای محروم از خواب به طور کمی در هر ۸۰

دقیقه متوالی کاهش می‌یابد. به تعبیر دیگر افزایش تجمعی در ارزش فرکانس دوره‌ها به مقدار ۱۷۸٪ ( $P < 0.01$ ) در ۸۰ دقیقه اول و ۶۸٪ ( $p < 0.05$ ) در ۸۰ دقیقه دوم از حد پایه تجاوز می‌کند ولی در آخر این ارزش تقریباً با سطح پایه برابر می‌شود. این اطلاعات نشان می‌دهند که مغز قادر به جبران اثرات محرومیت از خواب متناقض می‌باشد.

در مطالعات نوروهیستوشیمیایی از مغز موش‌های نر گروه کنترل ( $n=6$ ) و PSD ( $n=6$ ) پس از بیهوشی و پرفیوژن با پارافرمالدئید (۴٪) در بافر فسفات (۰/۱M) مقاطع ۵۰ میکرومتری تهیه شد و پس از واکنش ND و شستشو، برای مطالعات میکروسکوپی آماده شدند. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد که تعداد نورون‌های  $ND^+$  در کورتکس پری فرونتال میانی ( $p < 0.05$ ; ۳۵٪) و آهیانه ( $p < 0.01$ ; ۲۰٪) در گروه PSD به طور معنی داری افزایش یافته است. برخی نورون‌های  $ND^+$  موش‌های گروه PSD دچار بی‌نظمی و پیچاپیچ شدن در زوائد خود شدند. همچنین تجمع بیشتری از نورون‌های  $ND^+$  در کنار رگ‌های کورتکس در گروه PSD مشاهده شد که خود می‌تواند نشانه‌ای بردخالتهای احتمالی NO در کنترل جریان خون مغزی در مغز موش‌های محروم از خواب REM باشد. افزایش تعداد نورون‌های  $ND^+$  نشان می‌دهد که آنزیم NADPH-d و به دنبال آن نیتریک اکسید تولید شده احتمالاً با اثرات تخریبی ناشی از بیخوابی بر روی فعالیت الکتروفیزیولوژیک نورون‌های کورتکس مقابله می‌کند.

## **Summary:**

Sleep deprivation is a potentially useful strategy for studying the function of sleep. Several evidence indicate that the production of cortical desynchronization is a function of the combined activity of several neuronal groups. Cortical EEG changes during REM sleep and its deprivation may effect on enzymes activity and their synthetic mechanisems. In recent years, biological imprtance of relationship between nitric oxide (NO) and sleep physiology has been cleared. Previous findings indicate that NO may play a role in the regulation of sleep-wake pattern.

NADPH-diaphorase (ND) is a oxidative enzyme that can be detected by a colored histochemical reaction using a water-soluble tetrazolium salt which is transformed into an insoluble blue formazan reaction product and this histochemical reaction specifically labels populations of neurons throughout the brain.

To investigate the paradoxical sleep deprivation (PSD) effects on sleep pattern, six experimental male rats (200-250mg) under go 48hr PSD. In this study recording electrodes were implanted stereotaxically on rat brain under ketamine / Rompum anesthesia. Following one week post surgery convulsiveness baseline EEG/EMG activity roccording was obtained in 3 successive days (11-15p.m). Then they were subjected to PSD using platform method and 3 times sleep states roccording were collected during 4hr each day.

After PSD, the pattern of SWS does not change comparing to baseline but REM pattern shows 149.9% increase in its total duration with a significant decreasing in latency (48.7%) and increasing of 53% REM episode frequency.



Sleep states were scored to three 80 min periods. REM in PSD rats decrease about 50% quantitatively in each consecutive three 80 minutes. In the other word the cumulative increment in episode frequency value exceeded the baseline 178% ( $p < 0.01$ ) in first 80 min and 68% ( $p < 0.05$ ) in second period. At end the value is almost equal to baseline. These data indicate that the brain is able to compensate the effects of PSD.

In neurohistochemical studies male control rats ( $n=6$ ) and PSD rats ( $n=6$ ) were anesthetized and perfused with paraformaldehyde (4%) in PBS (0.1M). Then brain serial sections, 50  $\mu$  thickness, were stained (ND reaction) and washed and mounted for microscopic examination. Our data indicate that the number of ND<sup>+</sup> neurons in the medial prefrontal (35%,  $P < 0.05$ ) and parietal (20%,  $P < 0.01$ ) cortex of PSD rats was significantly increased. Some ND<sup>+</sup> neurons were tortuous and irregular in PSD group. We also observed more ND<sup>+</sup> neurons around the cortical vessels of PSD rats. This can be an argument for the possible involvement of NO in the control of cerebral blood flow in the brain during PSD. Increased number of ND<sup>+</sup> neurons indicate that NADPH-d and its associated production of NO may serve against neurodegenerative effects of PSD on the electrophysiological activity of cortical neurons.

## Abbreviations

$\beta$ - NADPH.....	$\beta$ - Nicotine amide adenine dinucleotide phosphate.
EDRF.....	Endothelium - derived relaxing factor
EEG.....	Electroencephalogram
EMG.....	Electromyogram
LG.....	Lateral geniculate
LISA.....	Large irregular slow activity
LS.....	Lateral septum
LTP.....	Long term potentiation
NADPH - d.....	NADPH - diaphorase
NBT.....	Nitroblue tetrazolium
7 - NI.....	7 - Nitro indazole
NMDA.....	n - methyl - D - aspartate
NO.....	nitric oxide
NOS.....	nitric oxide synthase
PGO.....	Pontine - geniculate - occipital
PS.....	Pradoxical Sleep
PSD.....	pradoxical sleep deprivation
REM.....	Rapid eye movement
SWS.....	slow wave sleep
W.....	wakefulness

## مقدمه

فعالیت امواج آهسته EEG حاصل فعالیت‌های شدید و ناگهانی همزمان شده در نورونهای کورتکس مغز و تالاموس می‌باشد (۵). امواج تتا، EEG و EMG که مداوماً ثبت می‌شوند مراحل مختلف خواب - بیداری را معین می‌سازند (۴۵). به خصوص فعالیت امواج آلفا که طی خواب ظاهر می‌شود عموماً برای بازتاب پروسه‌های تهییج و تغییر به سمت مرحله بیداری مورد توجه می‌باشد (۲۲ و ۴۴). خواب که حالت پایه‌ای در سیستم عصبی مرکزی است به وسیله اثرات متقابل فعال بین مکانیسم‌های عصبی - هورمونی تنظیم می‌شود. برای نشان دادن این مکانیسم‌ها، از راه‌های مختلف آزمایشی (تجربی) استفاده می‌شود و در حقیقت بحث‌های گسترده‌ای که کدامیک مهم‌تر هستند وجود دارد اما اکنون مشخص شده که هر دو عامل در تنظیم پدیده خواب لازم هستند. آنالیز طیفی امواج که به طور جداگانه روی EEG مراحل مختلف هوشیاری انجام شده برای نشان دادن EEG‌های غیر طبیعی و همچنین تعیین شدت (تراکم) خواب استفاده می‌شود (۲۸).

محرومیت از خواب یک استراتژی بالقوه سودمند برای مطالعه عمل خواب می‌باشد (۴۵). محرومیت از خواب REM با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌ها به طور مستقیم یا غیر مستقیم نقش معنی‌داری را در تغییرات EEG کورتیکال طی خواب REM ایفا می‌کند (۵۴ و ۵۹). پس از محرومیت از خواب و یا در شروع پرلود استراحت در rat و یا طی وقوع NREMS ابتدائی القاء شده توسط عفونت، فعالیت امواج دلتا EEG افزایش می‌یابد (۲۸). افزایش فعالیت‌های حسی و حرکتی که توسط محرومیت از خواب REM القاء شده است می‌تواند به دلیل عدم مهار نورونهای کورتیکال باشد (۹).

بر پایه دستاوردهای متعدد پیشنهاد می‌شود که تولید ناهمزمانی EEG قشری، حاصل مشارکت فعالیت گروههای متعدد نرونی است. Dzoljic (1996) با استفاده از مهارکننده NOS مغزی (7-NI) و بهره‌مندی از ثبت EEG مشاهده کرد که میزان SWS و خواب REM در روندی وابسته به دوز کاهش می‌یابد، او کاهش فعالیت نوروئهای دخیل در آغاز و تداوم خواب طبیعی را به دلیل کاهش در آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی نظیر ال - گلوتامات، ال - آسپارتات و نورآدرنالین که با مقدار NO ارتباط دارد نسبت داد. تصور بر این است که NO بدواً به صورت یک محرک درونی بیداری عمل می‌کند و به طور غیر مستقیم بر الگوی خواب اثر می‌گذارد (۱۵). با استفاده از مهارکننده‌های NOS فعالیت امواج EEG کاهش می‌یابد. لذا پیشنهاد می‌شود که NO در حفظ شدت خواب دخیل بوده و سیستم NO-ارژیک برای تنظیم خواب طبیعی مورد احتیاج باشد (۲۸).

تمرکز ایزو فرم مغزی NOS در ساختارهای مغزی بیانگر اعمال نقش گسترده NO در CNS است. اطلاعات فراوانی در مورد پراکندگی، تنظیم و استعداد عملی نوروئهای ND در دست است. مشخص شده که NO در پلاستی سیتی سیناپسی، شکل‌گیری حافظه و تنظیم خواب و ریتمهای چرخه‌ای دخالت دارد (۳). فعالیت بالای NOS طی شب، با این عقیده که حوادث آبشاری (cascade) در خواب با دخالت NO صورت می‌گیرد سازگار است.

مشاهده شده که تزریق مواد بالابرنده فشار خون سطح تحریک را بالا برده و تغییرات هماهنگی را در قدرت امواج طیفی EEG در rat القا می‌کند (۲۸). کاهش در دامنه الکتروکورتیکوگرام و مراحل خواب که با افزایش در تأخیر (latency) خواب همراه است

را به سرکوب مرکزی القا شده توسط مواد بلوک کننده سنتز NO نسبت می دهند (۱۵)  
برعکس تزریق پیش ماده NO یعنی L-Arg تحریکات رفتاری همراه با  
الکتروکورتیکوگرام ناهمزمان شده و اسپایکهای با ولتاژ بالا را القاء می کند (۱۴). در  
مجموع تغییرات چرخه‌ای در سطوح پایه فعالیت NOS با این نظریه که مکانیسمهای  
متأثر از NO در تنظیم خواب دخالت دارند در توافق است (۲۸).

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات محرومیت از خواب REM بر چرخه خواب -  
بیداری و مطالعه تغییرات به وجود آمده در این چرخه می باشد، همچنین به دلیل  
دخالت نورونهای حاوی NO در ریتمهای چرخه‌ای و پراکندگی وسیع نورونهای  
NADPH-d در ساختمانهای کورتیکال مغز بر آن شدیم تا اثرات محرومیت از خواب  
متناقض را در نواحی مختلف کورتکس از دیدگاه نوروهیستولوژیک (مورفولوژی و  
مورفومتری) بر سلولهای ND<sup>+</sup> مورد ارزیابی قرار دهیم.

# فصل اول

مروری بر اطلاعات موجود

## بخش اول

### مشخصات پلی‌گرافیک خواب و بیداری

در پستانداران سه حالت مختلف بیداری (Wakefulness)، خواب با امواج آهسته (Slow Wave Sleep) و خواب متناقض (paradoxical) یا خواب REM از طریق ثبت پلی‌گرافیک مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته‌اند.

در بیداری فعالیت EEG که از کورتکس ثبت می‌شود بسیار سریع بوده و امواج دارای آمپلی‌تود پائین و فرکانس بالا می‌باشند. این مشخصات نشانگر وجود یک ناهمزمانی (Desynchronization) در فعالیت نورونهای قشری است و از نظر رفتاری موجود به تحریکات محیطی پاسخ می‌دهد و چشمها باز و دارای حرکت می‌باشند. با شروع خواب با امواج آهسته موجود حالت استراحت به خود می‌گیرد، تنوس ماهیچه‌ای کاهش می‌یابد و EEG به صورت امواج با آمپلی‌تود بالا و فرکانس کم به نحوی که تشکیل دوکهای خواب (Sleep spindle) را می‌دهند ظاهر می‌شود، در این مرحله از خواب یک همزمانی (Synchronization) در فعالیت نورونهای قشری وجود دارد (۳۰ و ۴۰).

در سال ۱۹۵۷، William Dement رابطه بین حرکات سریع چشم را با ناهمزمانی در EEG در دوره‌ای از خواب بیان کرد و این مرحله فعال خواب را REMS (Rapid Eye Movement Sleep) نامید. در خواب متناقض، EEG ناهمزمان شده و ولتاژ پائین و الگوی فعالیتی سریع، شبیه مرحله بیداری را نشان می‌دهد (۳۰). آتونی (و به تعبیر بهتر هیپوتونی بسیار شدید) عضلاتی سر و گردن و حرکات سریع چشمها با حضور توام EEG قشری ناهمزمان، مشخصه عملی خواب REM می‌باشد.