

صلى الله عليه وسلم



رشته زیست شناسی - گرایش فیزیولوژی جانوری  
پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

عنوان :

بررسی عملکرد های رفتاری، شناختی و تغییرات میکروآناتومیک سیستم لیمبیک و  
مخچه، در مدل حیوانی بیماری اوتیسم، القاء شده با والپروئیک اسید

اساتید راهنما :

دکتر علی مقیمی

دکتر سید محمود حسینی

استاد مشاور :

دکتر ناصر مهدوی شهری

نگارش :

هانیه نیک فرجام

خرداد ۱۳۹۱

## تقدیر و تشکر

با تشکر و قدردانی فراوان از استاد عزیز و ارجمندم، جناب آقای دکتر علی مقیمی که حمایت ها و کمک های بی دریغ و همیشگی ایشان در طول پروژه، مشوق بنده و مسبب پیشرفت طرح بود.

تشکر و سپاس فراوان از استاد عزیز و گرامی ام، جناب آقای دکتر سید محمود حسینی که از مساعدت و راهنمایی های بی شائبه و همیشگی اشان در تمام طول اجرای این پروژه بهره مند شدم.

قدردانی کثیر از استاد عزیز و گرانقدرم، جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری که راهنمایی های سودمند و بی پایان ایشان، همواره مشوق و هدایت گر اینجانب بوده اند.

با سپاس و تقدیر بی پایان از اساتید بزرگوار و ارجمندم جناب آقای دکتر مرتضی بهنام رسولی و جناب آقای دکتر سعید نیازمند که افتخار داوری این پروژه را به اینجانب دادند.

با تشکر و قدردانی ویژه و فراوان از زحمات بی شائبه ی دوست بسیار عزیزم، سرکار خانم فرزانه وفائی، به پاس همه ی تلاش ها و یاری هایش در تمام طول اجرای این پروژه.

همچنین از دوستان و همکاران بسیار عزیزم، سرکار خانم ها معصومه شاکه نیا، سیمین افشار، زهره عباسی، ساره عطائی، سارا ازغدی، جناب آقای دکتر علی اکبر حداد و جناب آقای مسعود ناصری، به پاس تمامی یاری ها و همکاری های بی دریغ اشان در طول اجرای این پروژه، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و با تقدیر بی پایان از همکاری های مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، مؤسسه آوا (مرکز تخصصی آموزشی- توانبخشی کودکان اوتیسم مشهد)، مرکز تحقیقات زیست فناوری دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ارم.

تقدیم به:

همسر عزیز و مهربانم

به پاس همه ی خوبی ها، صبوری ها، عشق و ایثارش

## فهرست مطالب

| صفحه | عنوان  |
|------|--|
| ۱    | مقدمه .....  |
|      | <b>فصل اول: کلیات</b>                                |
| ۳    | بخش اول: معرفی بیماری اوتیسم .....                   |
| ۳    | ۱-۱ معرفی اختلالات تکاملی عصبی .....                 |
| ۳    | ۱-۱-۱ تعریف .....                                    |
| ۳    | ۱-۱-۲ تقسیم بندی .....                               |
| ۴    | ۱-۱-۳ اتیولوژی .....                                 |
| ۵    | ۱-۱-۴ درمان .....                                    |
| ۵    | ۲-۱ معرفی طیف اختلالات اوتیسم .....                  |
| ۶    | ۱-۲-۱ تشخیص ASD .....                                |
| ۷    | ۳-۱ تعریف بیماری اوتیسم (در خود ماندگی) .....        |
| ۷    | ۴-۱ تاریخچه بیماری اوتیسم .....                      |
| ۹    | ۵-۱ طیف اختلالات اوتیسم شامل موارد زیر می شود .....  |
| ۹    | ۱-۵-۱ اختلال اتیستیک .....                           |
| ۹    | ۲-۵-۱ سندرم آسپرگر .....                             |
| ۱۱   | ۳-۵-۱ اختلال فروپاشی کودکی .....                     |
| ۱۱   | ۴-۵-۱ اختلال تکاملی فراگیر غیر طبقه بندی شده .....   |
| ۱۲   | ۵-۵-۱ سندرم رت .....                                 |
| ۱۳   | ۶-۱ شیوع و اپیدمیولوژی اوتیسم .....                  |
| ۱۳   | ۷-۱ مشکلات و علائم رفتاری - حسی رایج در اوتیسم ..... |

|    |   |
|----|---|
| ۱۴ | ۱-۷-۱ حساسیت به برخی محرکات حسی .....             |
| ۱۴ | ۲-۷-۱ عقب ماندگی ذهنی .....                       |
| ۱۴ | ۳-۷-۱ تشنج و صرع .....                            |
| ۱۵ | ۴-۷-۱ مشکلات خواب .....                           |
| ۱۶ | ۵-۷-۱ تمایل به خوردن مواد غیر خوراکی .....        |
| ۱۶ | ۶-۷-۱ تونوس عضلانی ضعیف .....                     |
| ۱۶ | ۷-۷-۱ مشکلات و اختلالات گوارشی .....              |
| ۱۷ | ۸-۷-۱ حساسیت های غذائی .....                      |
| ۱۷ | ۹-۷-۱ درد .....                                   |
| ۱۷ | ۱۰-۷-۱ اختلالات خلقی و عصبی .....                 |
| ۱۹ | ۸-۱ ضرورت و اهمیت تحقیق درباره اوتیسم .....       |
| ۲۰ | بخش دوم: اتیولوژی بیماری اوتیسم .....             |
| ۲۳ | ۹-۱ نقش ژن ها .....                               |
| ۲۳ | ۱-۹-۱ نقش کروموزوم X .....                        |
| ۲۳ | ۲-۹-۱ ژن HOX1 .....                               |
| ۲۳ | ۳-۹-۱ ژن های رسپتور های GABA .....                |
| ۲۴ | ۴-۹-۱ ژن ناقل سروتونین .....                      |
| ۲۴ | ۵-۹-۱ ژن Reelin .....                             |
| ۲۵ | ۱۰-۱ نقش فاکتور های محیطی .....                   |
| ۲۷ | ۱-۱۰-۱ مکانیسم عمل والپروئیک اسید .....           |
| ۲۹ | ۱۱-۱ اوتیسم و مارکر های زیستی .....               |
| ۳۰ | ۱-۱۱-۱ التهاب .....                               |
| ۳۰ | ۱-۱۱-۱-۱ سیتوکاین ها .....                        |
| ۳۰ | ۲-۱۱-۱-۱ نئوپترین ها .....                        |
| ۳۱ | ۲-۱۱-۱ استرس اکسیداتیو .....                      |
| ۳۱ | ۱-۲-۱۱-۱ تغییرات در آنزیم های آنتی اکسیدانت ..... |
| ۳۱ | ۲-۲-۱۱-۱ افزایش میزان نیتریک اکسید (NO) .....     |
| ۳۲ | ۳-۲-۱۱-۱ افزایش میزان xanthine oxidase .....      |

- ۱-۱۱-۲-۴ متابولیسم غیر طبیعی آهن و مس ..... ۳۲
- ۱-۱۱-۳-۱ نقص یا آسیب میتوکندریائی ..... ۳۲
- ۱-۱۱-۴-۱ میزان آمونیاک در خون ..... ۳۳
- ۱-۱۱-۵-۱ بیومارکر های گوارشی ..... ۳۳
- ۱-۱۱-۶-۱ نوروترانسمیتر ها ..... ۳۳
- ۱-۱۱-۶-۱ اختلال در میانجی سروتونین ..... ۳۳
- ۱-۱۱-۶-۱ الف سروتونین در خون ..... ۳۴
- ۱-۱۱-۶-۱ ب سروتونین در مایع مغزی- نخاعی ..... ۳۴
- ۱-۱۱-۶-۱ ج مطالعات ژنتیکی ..... ۳۴
- ۱-۱۱-۶-۲ اختلال در میانجی دوپامین ..... ۳۴
- ۱-۱۱-۶-۳ اختلال در میانجی نورآدرنالین ..... ۳۵
- ۱-۱۱-۶-۴ اختلال در میانجی استیل کولین ..... ۳۵
- ۱-۱۱-۶-۵ اختلال در سیستم اپیوئید های درون زاد ..... ۳۵
- ۱-۱۱-۶-۶ اختلال در میانجی گلوتامات ..... ۳۶
- ۱-۱۱-۶-۷ اختلال در میانجی گابا ..... ۳۶
- ۱-۱۱-۷ اختلال در هورمون اکسی توسین ..... ۳۸
- ۱-۱۱-۸ نقش جنسیت و هورمون های جنسی ..... ۳۸
- بخش سوم: پاتوفیزیولوژی بیماری اوتیسم (اختلالات ساختاری و نورونی در قسمت های مختلف مغز) ..... ۳۹
- ۱-۱۱-۹ اختلالات مغزی ..... ۳۹
- ۱-۱۱-۹-۱ اندازه ی مغز ..... ۳۹
- ۱-۱۱-۹-۲ مخچه ..... ۳۹
- ۱-۱۱-۹-۳ آمیگدال ..... ۴۰
- ۱-۱۱-۹-۴ هیپوکامپ ..... ۴۰
- ۱-۱۱-۹-۵ لوب پیشانی ..... ۴۱
- ۱-۱۱-۹-۶ جسم پینه ای ..... ۴۱
- بخش چهارم: ارتباط اوتیسم با قدرت حافظه، نبوغ و استعداد ..... ۴۴
- ۱-۱۲ سندرم نبوغ در اوتیسم ..... ۴۵
- ۱-۱۳ یافته های استریولوژیک ..... ۴۶

|   |    |
|---|----|
| بخش پنجم: مطالعات حیوانی (مدل ها و یافته های حیوانی درباره ی اوتیسم).....           | ۴۶ |
| ۱-۱۴ مدل های حیوانی بیماری اوتیسم.....  | ۴۶ |
| ۱-۱۴-۱ انواع مدل های حیوانی.....  | ۴۹ |
| ۱-۱۴-۱-۱ حیوانات موتانت.....  | ۴۹ |
| ۱-۱۴-۲ مدل های تقلید کننده اثرات فاکتورهای محیطی.....                               | ۴۹ |
| ۱-۱۴-۳ مدل های تخریبی.....  | ۴۹ |
| ۱-۱۴-۴ مدل های حیوانی در Zebra fish و Drosophila.....                               | ۴۹ |
| ۱-۱۴-۵ مدل های سلولی.....   | ۴۹ |
| ۱-۱۵ والپروئیک اسید (VPA).....  | ۵۰ |
| ۱-۱۵-۱ میزان گابا.....  | ۵۱ |
| ۱-۱۵-۲ کانال های یونی.....  | ۵۱ |
| ۱-۱۶ اختلال دو قطبی.....  | ۵۲ |
| ۱-۱۷ بیماری آلزایمر.....  | ۵۲ |
| ۱-۱۸ یافته های بدست آمده از مطالعات حیوانی اوتیسم.....                              | ۵۷ |
| ۱-۱۸-۱ پنجره ی زمانی برای تجویز والپروئیک اسید، به جهت القاء مدل حیوانی اوتیسم..... | ۵۷ |
| ۱-۱۸-۲ ژن ها در مدل های حیوانی اوتیسم.....  | ۵۸ |
| ۱-۱۸-۳ تغییر مورفولوژی نورون های قشر حرکتی، در مدل VPA اوتیسم.....                  | ۵۸ |
| ۱-۱۸-۴ اختلال سیستم سروتونرژیک در مدل حیوانی اوتیسم.....                            | ۵۹ |
| ۱-۱۸-۵ اختلال سیستم دوپامینرژیک در مدل حیوانی اوتیسم.....                           | ۶۰ |
| ۱-۱۸-۶ اختلال سیستم انکفالینرژیک در مدل حیوانی اوتیسم.....                          | ۶۰ |
| ۱-۱۸-۷ اختلال سیستم گلوتاماترژیک در مدل حیوانی اوتیسم.....                          | ۶۱ |
| ۱-۱۸-۸ اختلال سیستم گابارژیک در اوتیسم.....   | ۶۲ |
| ۱-۱۸-۸ اختلال اکسی توسین در مدل حیوانی اوتیسم.....                                  | ۶۳ |

## فصل دوم: مواد و روش ها

|                         |    |
|-------------------------|----|
| بخش اول: القاء مدل..... | ۶۴ |
| ۱-۲ حیوانات.....        | ۶۴ |
| ۱-۱-۲ جفتگیری.....      | ۶۴ |
| ۲-۲ روش پاپ اسمیر.....  | ۶۵ |



|    |   |
|----|---|
| ۶۵ | ۳-۲ تجویز والپروئیک اسید                  |
| ۶۶ | ۴-۲ بررسی نوزادان در زمان تولد            |
| ۶۶ | ۵-۲-۲ تست های رفتاری ارزیابی مدل          |
| ۶۶ | ۱-۵-۲-۲ تست Social Interaction            |
| ۶۸ | ۲-۵-۲-۲ تست Y-Maze                        |
| ۶۹ | ۳-۵-۲ تست Elevated Plus Maze              |
| ۷۰ | ۴-۵-۲ تست Hot Plate                       |
| ۷۱ | ۵-۵-۲ تست Open field                      |
| ۷۲ | ۶-۲ تست های حرکتی                         |
| ۷۲ | ۱-۶-۲ تست Rotarod                         |
| ۷۳ | ۲-۶-۲ تست Beam Walking                    |
| ۷۴ | ۷-۲ تست های شناختی                        |
| ۷۴ | ۱-۷-۲ تست Morris Water Maze               |
| ۷۵ | ۲-۷-۲ تست Shuttle Box                     |
| ۷۷ | بخش دوم: بافت شناسی                       |
| ۷۷ | ۸-۲ پرفیوژن ترانس کاردیالی                |
| ۷۸ | ۹-۲ تثبیت بافت، رنگ آمیزی و عکس برداری    |
| ۷۸ | ۱-۹-۲ ثابت کردن بافت ها                   |
| ۷۸ | ۲-۹-۲ مرحله ی گردش بافت                   |
| ۷۸ | ۳-۹-۲ آبگیری                              |
| ۷۸ | ۴-۹-۲ الکل گیری و شفاف کردن               |
| ۷۹ | ۵-۹-۲ آغشتگی با پارافین                   |
| ۷۹ | ۶-۹-۲ قالب گیری                           |
| ۷۹ | ۷-۹-۲ برش برداری                          |
| ۸۰ | ۸-۹-۲ رنگ آمیزی                           |
| ۸۰ | ۹-۹-۲ مونتاژ کردن یا چسباندن لامل روی لام |
| ۸۰ | ۱۰-۹-۲ مطالعات میکروسکوپی و تصویر برداری  |
| ۸۰ | ۱۱-۹-۲ مرحله عکس برداری                   |

- بخش سوم: استریولوژی ..... ۸۱
- ۱۰-۲ شمارش سلول های پورکینز به روش توتال ..... ۸۱
- ۱۱-۲ مرحله تعیین تراکم سلولی در هیپوکامپ و آمیگدال ..... ۸۲
- ۱۲-۲ محاسبات آماری ..... ۸۲

### فصل سوم: نتایج

- بخش اول: تست های رفتاری ..... ۸۳
- ۱-۳ تست های ارزیابی مدل (تأیید مدل شدن اوتیسم در رت ها) ..... ۸۳
- ۱-۱-۳ کاهش میزان رفتار ها و برهم کنش های اجتماعی ..... ۸۳
- ۲-۱-۳ افزایش میزان رفتار های تکراری ..... ۸۵
- ۳-۱-۳ افزایش میزان ترس و اضطراب ..... ۸۶
- ۴-۱-۳ کاهش میزان حساسیت به درد حرارتی ..... ۸۷
- ۵-۱-۳ کاهش میزان رفتارهای جستجوگری ..... ۸۸
- ۲-۳ تغییرات تکاملی ناشی از تجویز والپروئیک اسید طی بارداری ..... ۸۹
- ۳-۳ تغییرات مورفولوژیکی ناشی از تجویز والپروئیک اسید طی بارداری ..... ۹۱
- بخش دوم: تست های حرکتی ..... ۹۲
- ۴-۳ ارزیابی فعالیت های حرکتی ..... ۹۲
- ۱-۴-۳ کاهش میزان یادگیری حرکتی ..... ۹۲
- ۲-۴-۳ کاهش میزان تعادل و یادگیری حرکتی ..... ۹۳
- بخش سوم: تست های شناختی ..... ۹۵
- ۵-۳ ارزیابی عملکرد حافظه ..... ۹۵
- ۱-۵-۳ افزایش حافظه فضائی ..... ۹۵
- ۲-۵-۳ افزایش حافظه اجتنابی پاسیو یا مبتنی بر ترس ..... ۹۹
- بخش چهارم: آزمایشات بافت شناسی ..... ۱۰۳
- ۶-۳ بررسی های استریولوژیک مخچه، هیپوکامپ و آمیگدال ..... ۱۰۳
- ۱-۶-۳ کاهش تعداد سلول های پورکینز مخچه ..... ۱۰۳
- ۲-۶-۳ افزایش تراکم سلولی در پنج ناحیه ی مختلف هیپوکامپ ..... ۱۰۵
- ۳-۶-۳ افزایش تراکم سلولی در آمیگدال ..... ۱۰۹

## فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

- ۱-۴ بحث و نتیجه گیری ..... ۱۱۱
- ۲-۴ علت انجام تست های رفتاری، هم در دوره ی نوزادی و هم طی بلوغ ..... ۱۱۱
- ۳-۴ اختلالات رفتاری ..... ۱۱۲
- ۴-۴ اثر جنسیت و سن ..... ۱۱۲
- ۵-۴ تأخیر در بلوغ با VPA ..... ۱۱۳
- ۶-۴ اختلالات مورفولوژیکی ..... ۱۱۴
- ۷-۴ تست های رفتاری ارزیابی مدل ..... ۱۱۵
- ۱-۷-۴ رفتار های اجتماعی ..... ۱۱۵
- ۲-۷-۴ رفتار های تکراری ..... ۱۱۵
- ۳-۷-۴ اضطراب ..... ۱۱۵
- ۱-۳-۷-۴ رابطه ی اضطراب با آمیگدال در افراد مبتلا به اوتیسم ..... ۱۱۶
- ۱-۳-۷-۴ الف پاتولوژی آمیگدال در اوتیسم : فرضیه ی کاهش عملکرد یا افزایش فعالیت ؟ ..... ۱۱۶
- ۴-۷-۴ تحمل به درد ..... ۱۱۹
- ۵-۷-۴ رفتار های جستجوگری ..... ۱۱۹
- ۸-۴ اختلالات مغزی ..... ۱۲۰
- ۱-۸-۴ تغییرات میکروآناتومیک در بافت مخچه ..... ۱۲۰
- ۱-۱-۸-۴ مکانیسم های ژنتیکی پیشنهادی جهت توجیه تغییرات نوروآناتومیک مخچه در اوتیسم ..... ۱۲۱
- ۹-۴ اختلالات حرکتی ..... ۱۲۴
- ۱۰-۴ تغییرات شناختی (حافظه و یادگیری) ..... ۱۲۵
- ۱-۱۰-۴ حافظه ی اجتنابی (مبتنی بر ترس) ..... ۱۲۷
- ۲-۱۰-۴ حافظه ی فضائی ..... ۱۲۷
- ۱۱-۴ تغییرات میکروآناتومیک در آمیگدال ..... ۱۲۸
- ۱۲-۴ تغییرات میکروآناتومیک در هیپوکامپ ..... ۱۳۰
- ۱۳-۴ ارتباط تغییرات میکروآناتومیک مغز با تغییرات رفتاری و حرکتی در اوتیسم ..... ۱۳۲
- ۱۴-۴ ارائه ی فرضیه ی جدید درباره ی نقش هیپوکامپ در اوتیسم (فرضیه ی افزایش عملکرد) ..... ۱۳۳
- ۱۵-۴ مکانیسم های اپی ژنتیکی پیشنهادی جهت توجیه تغییرات شناختی و میکروآناتومیک سیستم لیمبیک ..... ۱۳۴
- ۱-۱۵-۴ القاء نوروزنز با VPA ..... ۱۳۴

|          |   |
|----------|---|
| ۱۳۷..... | ۴-۱۵-۱-۱ القاء نوروزنز در مغز اتیستیک توسط ژن ها یا مسیرهای سیگنالینگ مختلفی، تقویت می شود..... |
| ۱۳۷..... | ۴-۱۵-۱-۱ الف فرضیه ی افزایش BDNF و القاء نوروزنز در سیستم لیمبیک .....                          |
| ۱۴۳..... | ۴-۱۵-۱-۱ ب فرضیه ی فعالیت سیگنالینگ wnt/ $\beta$ -catenin و القاء نوروزنز در سیستم لیمبیک.....  |
| ۱۴۴..... | ۴-۱۵-۱-۱ ج فرضیه ی فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK و القاء نوروزنز در سیستم لیمبیک.....               |
| ۱۴۶..... | ۴-۱۵-۲ کاهش میزان آپوپتوز سلولی توسط VPA.....   |
| ۱۴۹..... | پیشنهادات .....   |
| ۱۵۱..... | فهرست منابع .....   |

## فهرست اشکال

| صفحه | عنوان   |
|------|---|
| ۵    | تصویر ۱-۱. عوامل مشترک مسبب بروز اوتیسم و سایر اختلالات تکاملی عصبی                             |
| ۹    | تصویر ۱-۲. تصاویر محققین برجسته در زمینه بیماری اوتیسم  |
| ۱۲   | تصویر ۱-۳. تقسیم بندی طیف اختلالات اوتیسم   |
| ۱۸   | تصویر ۱-۴. هزینه های اقتصادی در جوامعی که اوتیسم و سایر اختلالات، در آنها شیوع بیشتری دارند     |
| ۲۱   | تصویر ۱-۵. نحوه ی اثر فاکتور های ژنتیکی و محیطی در ایجاد علائم اتیستیک                          |
| ۲۲   | تصویر ۱-۶. انواع فاکتور های اتیولوژیک پیش و پس از تولد که در بروز طیف اختلالات اوتیسم، دخیل اند |
| ۲۴   | تصویر ۱-۷. نمونه هائی از ژن های دخیل در طیف اختلالات اوتیسم                                     |
| ۲۵   | تصویر ۱-۸. نمونه هائی از ژن های دخیل در طیف اختلالات اوتیسم                                     |
| ۲۶   | تصویر ۱-۹. فرمول ساختاری والپروئیک اسید   |
| ۳۷   | تصویر ۱-۱۰. بیومارکر های مختلف درگیر در بیماری اوتیسم   |
| ۴۰   | تصویر ۱-۱۱. پاتوفیزیولوژی مخچه در اوتیسم  |
| ۴۳   | تصویر ۱-۱۲. قسمت هائی از مغز که در بیماری اوتیسم درگیرند  |
| ۵۱   | تصویر ۱-۱۳. مکانیسم عمل والپروئیک اسید و مهار آنزیم های تجزیه کننده ی گابا توسط VPA             |
| ۵۶   | تصویر ۱-۱۴. عوامل محیطی که طی بارداری می توانند با تغییرات اپی ژنتیکی، منجر به بروز اوتیسم شوند |
| ۶۴   | تصویر ۲-۱. مرکز نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد                           |
| ۶۵   | تصویر ۲-۲. تزریق داخل صفاقی والپروئیک اسید به رت ماده ی باردار در اواسط روز ۱۲ بارداری          |
| ۶۶   | تصویر ۲-۳. نوزادان تازه به دنیا آمده و بالغ رت های نژاد ویستار                                  |
| ۶۷   | تصویر ۲-۴. تست ارزیابی رفتار های اجتماعی (Social Interaction Test)                              |
| ۶۸   | تصویر ۲-۵. تست ارزیابی رفتارهای تکراری (Y-Maze Test)  |
| ۶۹   | تصویر ۲-۶. تست ارزیابی میزان اضطراب و استرس (Elevated Plus Maze)                                |

- تصویر ۲-۷. تست ارزیابی میزان حساسیت به درد حرارتی (Hot Plate Test) ..... ۷۰
- تصویر ۲-۸. تست ارزیابی فعالیت های جستجوگری (Open field Test) ..... ۷۱
- تصویر ۲-۹. تست ارزیابی فعالیت های حرکتی (Rotating rod Test) ..... ۷۲
- تصویر ۲-۱۰. تست ارزیابی فعالیت های حرکتی (Beam Walking Test) ..... ۷۳
- تصویر ۲-۱۱. تست ارزیابی حافظه فضائی (Morris Water Maze) ..... ۷۵
- تصویر ۲-۱۲. تست ارزیابی حافظه مبتنی بر ترس (Passive avoidance test) ..... ۷۶
- تصویر ۲-۱۳. مطالعات میکروسکوپی با استفاده از میکروسوپ نوری (Olympus BH<sub>2</sub>) ..... ۸۱
- تصویر ۳-۱. ناهنجاری های مادرزادی دیده شده در ناحیه ی دم رت های مدل VPA اوتیسم ..... ۹۰
- تصویر ۳-۲. مقایسه ی تعداد سلول های پورکینژ مخچه، زیر میکروسکوپ در گروه های VPA و کنترل ..... ۱:۵
- تصویر ۳-۳. تصاویر میکروسکوپی از برش های ناحیه ی CA2 هیپوکامپ در گروه های VPA و کنترل ..... ۱۰۸
- تصویر ۳-۴. تصاویر میکروسکوپی از برش های ناحیه ی CA3 هیپوکامپ در گروه های VPA و کنترل ..... ۱۰۸
- تصویر ۳-۵. تصاویر میکروسکوپی از برش های ژيروس دندانیه ای هیپوکامپ در گروه های VPA و کنترل ..... ۱۰۹

## فهرست نمودار ها

عنوان

صفحه

- نمودار ۳-۱. نتایج تست ارزیابی برهم کنش های اجتماعی در رت های گروه VPA و کنترل، طی ۳۰ روزگی ..... ۸۴
- نمودار ۳-۲. نتایج تست ارزیابی برهم کنش های اجتماعی در رت های VPA و کنترل، طی ۶۰ روزگی ..... ۸۵
- نمودار ۳-۳. نتایج تست ارزیابی رفتار های تکراری در رت های VPA و کنترل ..... ۸۶
- نمودار ۳-۴. نتایج تست ارزیابی میزان اضطراب در رت های VPA و کنترل ..... ۸۷
- نمودار ۳-۵. نتایج تست حساسیت به درد حرارتی در رت های VPA و کنترل ..... ۸۸
- نمودار ۳-۶. نتایج تست ارزیابی رفتار های جستجوگری، در رت های VPA و کنترل ..... ۸۹
- نمودار ۳-۷. تأخیر در باز کردن چشم ها در رت های VPA، نسبت به گروه کنترل ..... ۹۰
- نمودار ۳-۸. ناهنجاری دم در رت های گروه VPA ..... ۹۱
- نمودار ۳-۹. مقایسه ی میزان یادگیری حرکتی در رت های VPA و کنترل ..... ۹۳
- نمودار ۳-۱۰. مقایسه ی مدت زمان پیمودن مسیر بر روی میله در رت های VPA و کنترل ..... ۹۴
- نمودار ۳-۱۱. مقایسه ی سرعت راه رفتن بر روی میله در رت های VPA و کنترل ..... ۹۴
- نمودار ۳-۱۲. نتایج حاصل از مسافت شنا کردن، طی چهار روز یادگیری و پروب در رت های VPA و کنترل ..... ۹۶
- نمودار ۳-۱۳. نتایج حاصل از تأخیر تا رسیدن به سکو، طی چهار روز یادگیری در رت های VPA و کنترل ..... ۹۷
- نمودار ۳-۱۴. نتایج حاصل از مدت زمان شنا در ربع های استخر، طی تست پروب در رت های VPA و کنترل ..... ۹۸
- نمودار ۳-۱۵. نتایج حاصل از تعداد دفعات عبور از ربع های استخر، طی تست پروب در رت های VPA و کنترل ..... ۹۹
- نمودار ۳-۱۶. مقایسه تأخیر معنی دار در ورود به محفظه تاریک در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۲
- نمودار ۳-۱۷. مقایسه مدت زمان نهایی باقی ماندن در محفظه تاریک در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۲
- نمودار ۳-۱۸. مقایسه تعداد دفعات ورود به محفظه تاریک در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۳
- نمودار ۳-۱۹. مقایسه ی تعداد سلول های پورکینژ نیمکره ی راست و چپ، در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۴
- نمودار ۳-۲۰. مقایسه ی تراکم سلولی نواحی مختلف هیپوکامپ در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۷
- نمودار ۳-۲۱. مقایسه تراکم سلولی در هیپوکامپ سمت راست با هیپوکامپ چپ در رت های VPA و کنترل ..... ۱۰۷
- نمودار ۳-۲۲. مقایسه ی تراکم سلولی آمیگدال در رت های VPA و کنترل ..... ۱۱۰
- نمودار ۳-۲۳. مقایسه تراکم سلولی در آمیگدال سمت راست با آمیگدال چپ در رت های VPA و کنترل ..... ۱۱۰

## چکیده

اوتیسم، یک اختلال تکاملی عصبی است که توسط مجموعه ای از علائم رفتاری از جمله نقص در روابط اجتماعی، کلامی و طیفی از علایق و فعالیت های محدود، مشخص می گردد. متأسفانه امروزه، اتیولوژی این بیماری، کماکان ناشناخته باقی مانده است. لذا انجام مطالعات حیوانی، به شناخت بیشتر اساس نوروبیولوژیکی این بیماری کمک می نماید. طی بررسی حاضر، عملکردهای رفتاری، حرکتی، شناختی و تغییرات میکروآناتومیک سیستم لیمبیک و مخچه در نوزادان رت های مدل اوتیسم، توسط تجویز والپروئیک اسید (VPA) طی بارداری، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. یافته های حاصل از این پژوهش، کمک بیشتری به شناخت مکانیسم های نوروبیولوژیکی درگیر در این بیماری می نمایند. طی این مطالعه، یکبار تجویز درون صفاقی والپروئیک اسید به رت های ماده ی بارداری، طی اواسط روز دوازدهم بارداری (ED 12.5)، یعنی زمان تکامل جنینی لوله ی عصبی، سبب ایجاد اختلالات رفتاری شامل کاهش میزان برهم کنش های اجتماعی، افزایش رفتار های تکراری، افزایش آستانه ی تحمل به درد، افزایش میزان اضطراب و ترس، کاهش میزان رفتار های جستجوگری و نیز کاهش قدرت تعادل و یادگیری حرکتی در نوزادان این رت ها، طی تست های رفتاری مربوطه در ۳۰ و ۶۰ روزگی گردید. همچنین، افزایش عملکرد حافظه ی فضائی و حافظه ی مبتنی بر ترس نیز در تست های شناختی مربوطه، طی ۳۵ و ۶۰ روزگی مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج هیستولوژیکی حاصل از این مطالعه، نشان دهنده ی کاهش معنی دار تعداد سلول های پورکینز مخچه در رت های گروه VPA و از طرفی افزایش معنی دار در تراکم سلولی نواحی مختلف هیپوکامپ و آمیگدال این رت ها در ۶۷ روزگی، نسبت به رت های گروه کنترل (دریافت کننده ی فسفات بافر سالین)، بودند. یافته های این پژوهش، فراهم کننده ی شواهد بیشتری جهت تأیید اعتبار مدل VPA اوتیسم و نیز پیشنهاد کننده ی افزایش عملکرد حافظه، احتمالاً در نتیجه ی تغییرات میکروآناتومیک سیستم لیمبیک مغز در این مدل حیوانی اوتیسم می باشد.

**کلمات کلیدی:** اوتیسم، والپروئیک اسید، حافظه، هیپوکامپ، آمیگدال، تراکم سلولی



## مقدمه

اوتیسم یک اختلال تکاملی عصبی است که با علائمی از قبیل نقص در برقراری روابط اجتماعی، کلامی و غیر کلامی و نیز انجام الگوهای رفتاری کلیشه وار و تکراری، مشخص می شود. امروزه، همچنان اتیولوژی بیماری اوتیسم، نا شناخته باقی مانده و تا به حال نیز درمان قطعی برای آن یافت نشده است. از طرفی، شیوع اوتیسم در حال حاضر، ۱ از هر ۱۱۰ کودک تخمین زده شده و روز به روز نیز بر میزان آن افزوده می شود. از این رو، انجام مطالعات انسانی و حیوانی بیشتر، به جهت شناخت و فهم بهتر اتیولوژی و نوروبیولوژی این اختلال عصبی-روانی و متعاقباً یافتن روش های درمانی مؤثر، مفید خواهند بود. مطالعات اخیر نشان داده اند که قرار گرفتن در معرض والپروئیک اسید (VPA)، داروی ضد تشنجی که به منظور درمان صرع، اختلال دو قطبی و طیف وسیعی از سایر بیماری ها استفاده می شود، می تواند طی دوران بارداری، منجر به افزایش ریسک ابتلا به طیف اختلالات اوتیسم گردد. لذا یکبار تجویز VPA به رت های ماده ی بارداری، سبب بروز علائم اصلی مشابه اوتیسم انسانی در نوزادان این رت ها می شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که قرار گرفتن رت های ماده ی بارداری نژاد ویستار در معرض یکبار تجویز VPA با دوز 500 mg/kg، سبب ایجاد اختلالات رفتاری مرتبط با اوتیسم، مانند کاهش میزان برهم کنش های اجتماعی، افزایش رفتار های تکراری، افزایش میزان اضطراب و ترس، افزایش آستانه ی تحمل به درد و کاهش رفتارهای جستجوگری در تست های رفتاری مربوطه می گردد. لذا این بررسی نیز همانند مطالعات حیوانی پیشین، از اعتبار مدل حیوانی اوتیسم توسط تجویز VPA در اوسط روز دوازدهم بارداری (۱۲/۵)، حمایت می کند. همچنین یافته های این پژوهش نشان دادند که علاوه بر مشکلات رفتاری، اختلالات حرکتی نیز مانند کاهش قدرت تعادل و یادگیری حرکتی، طی تست های روتارود و راه رفتن شعاعی، در رت های گروه VPA نسبت به گروه کنترل (دریافت کننده ی فسفات بافر سالین = PBS)، دیده می شوند. از طرف دیگر، عملکرد دو نوع حافظه، شامل حافظه ی فضائی و حافظه ی مبتنی بر ترس که به ترتیب وابسته به هیپوکامپ و آمیگدال می باشند نیز طی این پژوهش، مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج، نشان دهنده ی افزایش معنی دار قدرت این دو نوع حافظه در رت های گروه VPA، نسبت به گروه کنترل بودند. در ادامه، یافته های هیستولوژیکی حاصل از این مطالعه، نشان دهنده ی کاهش تعداد سلول های پورکینژ مخچه در رت های گروه VPA، نسبت به گروه کنترل بودند. این نتایج، حمایت کننده ی یافته های حاصل از مطالعات

نوروپاتولوژیکی انسانی و حیوانی پیشین در ارتباط با نقص عملکرد مخچه در اوتیسم می باشند. به نظر می رسد که افزایش رفتارهای تکراری در تست ماز Y- شکل و نیز اختلالات حرکتی طی تست های روتارود و راه رفتن شعاعی که در بررسی حاضر، دیده شده اند نیز احتمالاً با کاهش تعداد این سلول ها در مخچه ی رت های مدل VPA اوتیسم، ارتباط دارند. در پایان، آنالیزهای استریولوژیکی حاصل از این مطالعه، برای اولین بار نشان دهنده ی افزایش معنی دار میزان تراکم سلولی در سیستم لیمبیک (آمیگدال و هیپوکامپ)، در رت های گروه VPA، نسبت به گروه کنترل بودند. این نتایج، پیشنهاد می کنند که افزایش تراکم سلولی در نواحی لیمبیک مذکور، می تواند ناشی از افزایش تعداد نوروها، احتمالاً به علت افزایش نوروژنز یا کاهش آپوپتوز سلولی باشد که توسط تأثیرات اپی ژنتیکی VPA، طی بارداری القا می شوند. همچنین این تغییرات افزایشی در تعداد سلول ها، احتمالاً مسئول افزایش اندازه یا حجم مغز و ساختارهای لیمبیک در افراد اتیستیک، نسبت به افراد سالم نیز می باشند. به دنبال این انعطاف پذیری سلولی در نواحی لیمبیک مذکور، احتمالاً عملکرد این نواحی مغزی نیز افزایش یافته و لذا بالاتر بودن قدرت حافظه های وابسته به این دو نوع ساختار لیمبیکی در تست های شناختی مربوطه نیز ممکن است ناشی از این افزایش عملکرد باشند. نتایج حاصل از این پژوهش، پیشنهاد می کنند که اختلالات حرکتی و رفتاری ناشی از اوتیسم، احتمالاً با کاهش تعداد سلول های پورکینز و لذا نقص عملکرد مخچه، مرتبطند و از طرفی، افزایش قدرت حافظه های وابسته به آمیگدال و هیپوکامپ نیز با افزایش تراکم سلولی و بنابراین افزایش احتمالی در عملکرد این دو نوع ساختار لیمبیکی، ارتباط دارند. همچنین ممکن است این نوع تغییرات میکروآناتومیک، یکی از خصوصیات اصلی در اکثر افراد مبتلا به اوتیسم باشد. به طور کلی، یافته های حاصل از این پژوهش، کمک بیشتری به شناخت مکانیسم های نوروبیولوژیکی درگیر در این بیماری می نمایند. همچنین نتایج بررسی حاضر، پیشنهاد می کنند که روش های درمانی مؤثر، باید در جهت بهبود عملکرد مخچه و در عین حال، حفظ قدرت حافظه ی ناشی از تغییرات سلولی در سیستم لیمبیک این افراد، گسترش پیدا کنند.



# کلیات

## بخش اول: معرفی بیماری اوتیسم

### ۱-۱ معرفی اختلالات تکاملی عصبی<sup>۱</sup>

در ابتدا، پیش از تعریف بیماری اوتیسم<sup>۲</sup> (درخود ماندگی)، به این دلیل که این بیماری یک اختلال تکاملی عصبی است، نیاز به تعریفی از اختلالات تکاملی عصبی و معرفی آنها می باشد.

#### ۱-۱-۱ تعریف

اختلالات تکاملی عصبی، به معنی اختلال در رشد و تکامل مغز و سیستم عصبی می باشند. در واقع، نوعی اختلال در عملکرد مغز که بر روی احساسات و عواطف، توانایی های یادگیری و حافظه تأثیر می گذارد. گاهی اوقات این واژه به اشتباه، انحصاراً برای اوتیسم، یا طیف اختلالات اوتیسم<sup>۳</sup> به کار می رود (۱).

#### ۱-۱-۲ تقسیم بندی

در واقع این نوع اختلالات عصبی، به این دلیل تکاملی به حساب می آیند که از همان دوران نوزادی یا کودکی بروز می کنند. این اختلالات، شامل اوتیسم و طیف اختلالات اوتیسم و نیز ضربه های مغزی، مثل آسیب های مادرزادی که منجر به فلج مغزی می شوند، اختلالات اجتماعی و کلامی، همچنین اختلالات ژنتیکی از قبیل سندرم X شکننده<sup>۴</sup> و سندرم داون<sup>۵</sup> می باشند. البته عقب ماندگی ذهنی<sup>۶</sup>، اختلال بیش فعالی همراه با نقص توجه<sup>۷</sup>، خوانش پریشی<sup>۸</sup>، دیس پراکسی<sup>۹</sup>، میکروسفالی، سندرم تورت<sup>۱۰</sup>، سندرم داون، صرع<sup>۱۱</sup>، فنیل کتونوری، سندرم جنینی الکل، سندرم X شکننده، سندرم رت<sup>۱۲</sup>، تریزومی ۱۸، توپروس اسکروزیس و غیره نیز جزء اختلالات تکاملی عصبی به شمار می آیند. کودکان مبتلا به این نوع اختلالات، درجات مختلفی از مشکلات کلامی، رفتاری، حرکتی و شناختی را نشان می دهند (۱).

<sup>1</sup> Neurodevelopmental disorders

<sup>2</sup> Autism

<sup>3</sup> Autism spectrum disorders

<sup>4</sup> Fragile-X Syndrome

<sup>5</sup> Down Syndrome

<sup>6</sup> Mental Retardation

<sup>7</sup> Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder

<sup>8</sup> Dyslexia

<sup>9</sup> Dyspraxia

<sup>10</sup> Tourette Syndrome

<sup>11</sup> Epilepsy

<sup>12</sup> Rett's Syndrome