بسم الله الرّحمن الرّحيم

١٤٩٦٤٤

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی (PhD) رشته فیزیولوژی انسانی

عنوان:

بررسی نقش سیستم سروتونینی هسته رافه خلفی (DRN) بر پلاستیسیتی وابسته به تجربه در قشر حسی اولیه موش صحرایی نر

توسط: حمید شیخکانلوی میلان

استاد راهنما: دکتر وحید شیبانی

اساتید مشاور: دکتر سعید اسماعیلی ماهانی- دکتر علی شمسی زاده راویزی

سال تحصیلی: ۱۳۸۸-۱۳۸۹

۱۳۸۹/۱۰/۱۴

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
IRANDOC
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

۱۴۹۶۴۲

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

تاریخ:.....
شماره:.....
پیوست:.....

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دکتری تخصصی (Ph.D)

****

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای **حمید شیخکانلوی میلان** دانشجوی دکتری تخصصی(Ph.D)رشته فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان:. **نقش سیستم سروتونینی هسته رافه خلفی (DRN)برپلاستیسیتی وابسته به تجربه در قشر حسی اولیه موش صحرائی نر** درساعت ۹روز چهارشنبه مورخ ۸۹/۵/۶ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از :

سمت	نام و نام خانوادگی	امضاء
الف: استاد (ان) راهنمای پژوهشی	جناب آقای دکتر وحید شیبانی	
ب: استاد (ان) مشاور	۱- جناب آقای دکتر سعید اسماعیلی ماهانی ۲- جناب آقای دکتر علی شمسی زاده	
ب: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر غلامرضا سپهری	
ج: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر سید جواد میر نجفی زاده	
چ: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر مهدی عباسی نژاد	
ح: نماینده تحصیلات تکمیلی (ناظر)	آقای دکتر مجید فصیحی هرندی	۸۹/۵/۶

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی با درجه ....عالی.....و نمره.....۱۹/۳..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی

تشکر و قدردانی:

بر خود واجب می دانم از استاد، جناب آقای دکتر شیبانی که زحمت راهنمائی پایان نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر و امتنان خود را اعلام بدارم.

از آقایان دکتر سعید اسماعیلی ماهانی و دکتر علی شمسی زاده راویزی که در امر مشاوره پایان نامه کمک ام نمودند، متشکرم.

از آقایان آفرینش و کائدی که مرا در انجام کار های آزمایشگاهی یاری نمودند، سپاسگزارم.

از اساتید ارجمند آقای دکتر سپهری، آقای دکتر نجفی پور و آقای دکتر خاکساری که در طول دوره و دوستان هم کلاسی ام آقای دکتر شاهرخی و آقای دکتر جوکار متشکرم.

چکیده

مقدمه و هدف: قشر مغز عمده ترین وظیفه اش پردازش اطلاعات در مغز و ایجاد ویژگیهای بی نظیر می باشد. یکی از مهمترین ویژگی های قشر مغز، شکل پذیری وابسته به تجربه[1] بوده که به معنی تغییر در پاسخ نورونهای قشر به دنبال تغییر در محیط و تغییر در اطلاعات حسی (تغییر ورودی قشر) است. این پدیده نه تنها در طی تکوین و تکامل مغز جنینی جوندگان بلکه در تمام دوران زندگی در قشر دیده می‌شود. سیستمهای نوروترانسمیتری گوناگونی نقش عمده ای را در پلاستیستی قشری ایفا می کنند. اخیراً توجه زیادی به نقش میانجی های منوآمینی در رشد مغز معطوف شده است که در این میان نقش میانجی سروتونینی و هسته آزاد کننده شان (بخصوص هسته های سجافی) بیشتر مورد بررسی و تحقیق واقع شده است. در این پژوهش اثر تحریک الکتریکی هسته سجافی خلفی (DRN) بر خواص پاسخی نورون ها و نیز تعیین میزان تغییر دانسیته گیرنده های سروتونینی $5\text{-}HT_{2A}$ به عنوان فراوان ترین گیرنده سروتونینی در لایه چهار قشر بارل متعاقب ایجاد پلاستیسیتی (شکل پذیری) وابسته به تجربه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: چهار گروه از موشهای صحرائی نر برای هر کدام از بخش های تحریک الکتریکی DRN و بررسی تغییرات دانسیته گیرنده $5\text{-}HT_{2A}$ به شرح ذیل انتخاب شدند:

۱- گروه کنترل

۲- گروه P0 (که از روز اول تولد همه ویسکر[2] (سبیل) های سمت چپ بجز ویسکر D2 به مدت ۶۰ روز چیده شدند)

۳- گروه P4 (که از روز چهارم بعد از تولد همه ویسکر های سمت چپ بجز ویسکر D2 به مدت ۶۰ روز چیده شدند)

۴- گروه P7 (که از روز هفتم بعد از تولد همه ویسکر های سمت چپ بجز ویسکر D2 به مدت ۶۰ روز چیده شدند)

بعد از ده روز اجازه رشد مجدد، برای انجام ثبت خارج سلولی حیوانات ابتدا با یورتان (با دوز ۱/۲ گرم در کیلوگرم) بیهوش و در دستگاه استریوتاکس قرار گرفتند. برای ثبت خارج سلولی از میکروالکترود فلزی تنگستن استفاده شد. محل قرارگیری میکروالکترود با استفاده از نقشه سوماتوتوپیکی ویسکر و با استفاده از محرک مکانیکی اعمال شده به ویسکر های سمت مقابل، در بارل D2 سمت راست قشر تعیین گردید. برای تحریک مکانیکی ویسکر ها از الگوی دو تائی خم نمودن ویسکر های اصلی و کناری با هم (ویسکر کناری ۲۰ میلی ثانیه قبل از ویسکر اصلی جابجا شد) و یا جابجائی تنهائی آنها استفاده شد. تحریک الکتریکی DRN در فواصل زمانی صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی ثانیه قبل از جابجایی ویسکر اصلی انجام شد. بزرگی پاسخهای ON و OFF، زمان تأخیر پاسخ و CTR (شاخصی از مهار جانبی) با ثبت اسپایک های تک واحدی نورونی از لایه چهار بارل D2 مورد بررسی واقع شدند. در آزمایشات گروههای مولکولی بررسی میزان تغییر در بیان پروتئین گیرنده $5\text{-}HT_{2A}$ با استفاده از آزمایش مولکولی ایمنوبلات صورت گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که محرومیت حسی طولانی مدت (به مدت ۶۰ روز) سبب افزایش بزرگی پاسخ ON نورونها در گروههای P0 و

[1] Experience dependent Plasticity
[2] whisker

P7 متعاقب تحریک مکانیکی ویسکر اصلی گردید. در صورتیکه کاهش پاسخ ON به تحریک ویسکر کناری فقط در گروه P0 و در مورد پاسخ OFF در گروههای P0 و P7 به سطح معنی داری رسید.

زمان تأخیر پاسخ های ON و OFF به جابجایی مکانیکی ویسکر اصلی تغییر معنی داری نداشت در صورتیکه زمان تأخیر پاسخ های ON و OFF به جابجایی ویسکر کناری نیز افزایش معنی داری را نشان داد.

در خصوص شاخص CTR پاسخهای ON و OFF ، فقط در گروه P0 افزایش شاخص نسبت به گروه کنترل معنی دار بود.

مقایسه بزرگی پاسخ ON به جابجایی ویسکر اصلی قبل و بعد از تحریک الکتریکی هسته DRN حاکی از آن است که فقط در زمان صفر میلی ثانیه در گروه کنترل و در زمان ۵۰ و ۱۰۰ میلی ثانیه در گروه P0 افزایش معنی دار است. در صورتی که در مورد پاسخ OFF این افزایش در زمانهای ۴۰۰ در گروه کنترل، ۱۰۰ و ۲۰۰ در گروه P0 و زمان ۲۰۰ میلی ثانیه در گروه P7 مشاهده گردید. تحریک الکتریکی DRN اثر معنی داری بر بزرگی پاسخ به جابجایی مکانیکی ویسکر کناری و بر زمان تأخیر پاسخ نورونها به جابجایی مکانیکی ویسکر اصلی و کناری نداشت. تحریک الکتریکی هسته DRN باعث کاهش معنی داری در شاخص CTR پاسخ ON در زمانهای صفر و ۸۰۰ میلی ثانیه در گروه P4 گردید. همچنین نتایج ما نشان داد اختلاف معنی داری که در بزرگی پاسخ نورونها به جابجایی مکانیکی ویسکر اصلی از قبل از تحریک الکتریکی DRN در اثر محرومیت حسی در گروههای P0 و P7 وجود داشت در اثر تحریک الکتریکی DRN از بین رفت. در مورد CTR پاسخ OFF نیز اختلاف معنی داری که قبل از تحریک الکتریکی هسته در گروه P0 نسبت به کنترل داشت، بعد از تحریک الکتریکی هسته DRN (بجز در زمان ۸۰۰ میلی ثانیه) از بین رفت. اندازه گیری بیان پروتئین گیرنده سروتونینی 5-HT_{2A} نشان داد که میزان کاهش بیان پروتئین این گیرنده در گروههای مختلف نسبت به گروه کنترل به سطح معنی داری نرسید.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می دهند که تحریک الکتریکی هسته سجافی خلفی می تواند متعاقب محرومیت حسی طولانی مدت، سبب تغییر در بعضی از ویژگی های پاسخ نورونها گردد. و به نظر می رسد این تعدیلات ناشی از تغییر در بیان گیرنده 5-HT_{2A} نباشد و احتمالاً به خاطر تداخل عمل گیرنده های متفاوت سروتونینی بر روی نورون های مختلف لایه چهار قشر بارل باشد.

کلید واژه ها: سیستم سروتونین، هسته رافه (سجافی) خلفی، قشر بارل، محرومیت حسی، تحریک الکتریکی

فهرست مندرجات:

چکیده ..... الف

فهرست جداول ..... و

فهرست نمودار ها ..... ح

فصل اول: مقدمه و اهداف ۱

۱-۱) مقدمه ۲

۱-۲) بیان مسئله واهمیت موضوع ۲

۱-۳) هدف اصلی ۴

۱-۴) اهداف جزئی ۵

۱-۵) فرضیات یا سوالات پژوهش ۵

فصل دوم: بررسی متون ۶

۲-۱) بررسی رفتار و حس ویسکر ها ۷

شکل ۲-۱: الگوی ساختاری و عملکرد گوناگون ویسکر های جوندگان ۹

۲-۲) مسیر سیگنالینگ حسی از ویسکر تا قشر ۹

۲-۳) سازمان بندی آناتومیکی و عملکردی قشر بارل ۱۲

۲-۴) رشد و پلاستیسیتی قشر بارل ۱۴

۲-۵) پلاستیسیتی در دوره های مختلف سنی ۱۶

۲-۶) دوره اولیه نوزادی ۱۶

۲-۷) پلاستیسیتی در نوجوانی ۱۷

۲-۸) پلاستیسیتی در دوره بلوغ ۱۷

۲-۹) اثر مداخلات موضعی قشر بر پلاستیسیتی ۱۸

۲-۱۰) تضعیف پاسخهای حسی ۱۸

۲-۱۱) تسهیل پاسخ ها در بارل نگه داشته شده ۱۸

۲-۱۲) مکانیسم های ایجاد پلاستیسیتی ۱۹

۲-۱۲-۱) CaMKII ۱۹

۲-۱۲-۲) CREB ۱۹

۲-۱۳) سیستم نورومدولاتوری کورتکس و نقش شان در پلاستیسیتی قشر ۲۰

۲-۱۳-۱) سروتونین ۲۰

فصل سوم: مواد و روشها ۲۳

۳-۱) فهرست موادو وسایل ۲۴
۳-۱-۱) فهرست مواد مصرف شده و منبع سازنده آنها ۲۴
۳-۱-۲) فهرست وسایل مورد استفاده ۲۵
۳-۲) حیوانات ۲۵
۳-۲-۱) گروههای آزمایش در بخش الکتروفیزیولوژی ۲۶
الف: گروه کنترل (گروه بدون محرومیت حسی) ۲۶
ب: گروههای محروم حسی (پلاستیسیته) همراه با تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی ۲۶
ج: گروههای آزمایش در مطالعات ملکولی ۲۷
۳-۳) روش انجام آزمایش ها ۲۷
۳-۳-۱- آزمایش الکتروفیزیولوژیک ۲۷
۳-۳-۲) روش جابجایی مکانیکی ویسکرها: ۲۹
۳-۳-۳) تحریک هسته رافه خلفی: ۳۰
۳-۳-۴) آزمایشات ملکولی: ۳۱
۳-۳-۴-۱) ارزیابی بیان پروتئین ژن گیرنده $5\text{-}HT_{2A}$: ۳۱
۳-۳-۴-۲) اندازه گیری کل پروتئین ۳۱
۳-۳-۴-۳) آزمایش ایمنو بلات: ۳۲
۳-۳-۴-۴) الکتروفورز نمونه ها در ژل پلی آکریل آمید: ۳۲
۳-۴) روش های رنگ آمیزی ۳۴
۳-۴-۱) روش رنگ آمیزی سیتوکروم اکسیداز ۳۴
۳-۴-۲) روش رنگ آمیزی نیسل ۳۶
۳-۵) تجزیه تحلیل داده ها ۳۷
۳-۶) آزمونهای آماری ۳۷
فصل چهارم: یافته ها ۳۸
۴-۱) اثر محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ ON و OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر های اصلی و کناری ۳۹
شکل ۴-۱: بررسی اثر محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ اولیه و ثانویه (ON & OFF) نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر های اصلی (PW) و کناری (AW) ۴۰
۴-۲) اثر محرومیت حسی بر زمان تأخیر شروع پاسخ ON و OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل در جابجایی ویسکر های اصلی و کناری ۴۱
۴-۳) اثر محرومیت حسی بر CTR پاسخ ON و OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۴۳
۴-۴) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۴۵
۴-۵) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر کناری در گروههای کنترل P0، P4 و P7 ..... ۴۷

۴-۶) مقایسه درون گروهی وبین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر زمان تأخیر شروع پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی و کناری در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۴۹

۴-۷) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر CTR پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۵۱

۴-۸) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی در گروههای کنترل P0، P4 و P7 ..... ۵۳

۴-۹) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر کناری در گروههای کنترل P0، P4 و P7 ..... ۵۵

۴-۱۰) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر زمان تأخیر شروع پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی و کناری در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۵۷

۴-۱۱) مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر CTR، محاسبه شده برای پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۵۹

۴-۱۲) مقایسه میزان بیان پروتئین گیرنده $5\text{-}HT_{2A}$ متعاقب محرومیت حسی در لایه چهار قشر بارل در گروههای کنترل، P0، P4 و P7 ..... ۶۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۶۳

بخش الکتروفیزیولوژی ۶۴

۵-۱ اثر محرومیت حسی بر ویژگی های پاسخی نورون های لایه چهار قشر بارل ۶۴

۵-۲ اثر تحریک الکتریکی هسته سجافی خلفی بر ویژگی های پاسخی نورونهای لایه چهار قشر بارل ۶۷

بخش مولکولی ۶۹

۵-۳ تعیین میزان بیان و دانسیته پروتئین گیرنده های سروتونینی $5\text{-}HT_{2A}$ ۶۹

نتیجه گیری: ۷۱

پیشنهاد ها: ۷۲

منابع: ۷۳

Summary ۸۴

فهرست جداول:

جدول ۱-۴: مقایسه درون گروهی وبین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر زمان تأخیر شروع پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی و کناری ۵۰

جدول ۲-۴: مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر زمان تأخیر شروع پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی و کناری ۵۸

فهرست نمودار ها:

شکل ۱-۲: الگوی ساختاری و عملکرد گوناگون ویسکر های جوندگان ۹

شکل ۲-۲ : مسیر اولیه سیگنالینگ از ویسکر تا کورتکس ۱۰

شکل ۳-۲ : ساختار آناتومیک آکسون و دندریت نورونهای تحریکی لایه های ۲، ۳ و ۴ و بارل لایه ۴ ..... ۱۳

شکل ۱-۳ : محدوده مربوط به قشر بارل بعد از برداشتن استخوان جمجمه ۲۸

شکل ۲-۳ : نمونه ای از یک نورون ایزوله شده لایه چهار قشر بارل ۲۹

شکل ۳-۳ : نمایی از بساط ثبت خارج سلولی از ناحیه بارل و جابجایی ویسکر ها توسط بلندگو و لوله شیشه ای متصل به آن ۳۰

شکل ۴-۳ : برش عرضی از ناحیه قشر حسی پیکری اولیه در موش صحرایی ۳۵

شکل ۵-۳ : محل ضایعه مربوط به هسته سجافی خلفی (DRN) ۳۶

شکل ۱-۴: بررسی اثر محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ اولیه و ثانویه (ON & OFF) نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر های اصلی (PW) و کناری (AW) ۴۰

شکل ۲-۴: بررسی اثر محرومیت حسی بر زمان شروع تأخیر اولیه و ثانویه (ON & OFF) نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر های اصلی (PW) و کناری (AW) ۴۲

شکل ۳-۴: بررسی اثر محرومیت حسی بر CTR پاسخ ON (A) و OFF (B) نورونهای لایه چهار قشر بارل ۴۴

شکل ۴-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی ۴۶

شکل ۵-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر کناری ۴۸

شکل ۶-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر CTR پاسخ ON نورونهای لایه چهار قشر بارل ۵۲

شکل ۷-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر اصلی ۵۴

شکل ۸-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر بزرگی پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل به جابجایی ویسکر کناری ۵۶

شکل ۹-۴: بررسی مقایسه درون گروهی و بین گروهی اثر تحریک الکتریکی هسته DRN متعاقب محرومیت حسی بر CTR پاسخ OFF نورونهای لایه چهار قشر بارل ۶۰

شکل ۱۰-۴: بررسی میزان بیان پروتئین گیرنده $5\text{-}HT_{2A}$ متعاقب محرومیت حسی در لایه چهار قشر بارل ۶۲

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱) مقدمه

قشر بارل[1] ناحیه وسیعی از قشر حسی پیکری مغز جوندگان را به خود اختصاص داده است. این ناحیه محل دریافت ورودی اطلاعات حسی از گیرنده های مکانیکی مربوط به ویسکر های روی صورت حیوان می‌باشد. به طور کلی یک ارتباط آناتومیک- فیزیولوژیک برجسته ای بین گیرنده های حسی محیطی واقع در محل فولیکول ویسکر و قشر بشکه‌ای وجود دارد. یکی از مهمترین ویژگی های قشر مغز، شکل پذیری وابسته به تجربه[2] می باشد که به معنی تغییر در پاسخ نورونها ی ثبت شده از قشر به دنبال تغییر در محیط و تغییر در اطلاعات حسی (تغییر ورودی قشر) می باشد. این پدیده نه تنها در طی تکوین و تکامل مغز جنینی (جوندگان) وجود دارد بلکه در تمام دوران زندگی در قشر دیده می‌شود. به طور کلی سیستمهای نوروترانسمیتری نقش عمده ای در پلاستیستی قشری ایفا می کنند. تعداد این میانجی های عصبی در قشر مغز فراوان اند و اخیراً توجه زیادی به نقش میانجی های منوآمینی در رشد مغز معطوف شده است. در مورد سروتونین مطالعات گسترده ای در بی مهره گانی مثل آپلیزیا و نقش آن در متناسب سازی[3] ارتباطات سیناپسی انجام شده است. این یافته ها نشان می دهند که سروتونین ممکن است اثرات مورفولوژیکی یا نوروتروفیکی بر نورونهای خاص داشته باشند و می تواند نقش عمده ای در تنظیم عملکرد سیستم اعصاب مرکزی مثل پردازش اطلاعات حسی بر عهده بگیرد. یکی از نواحی اصلی در ترشح و ارسال نورونها سروتونرژیک به نواحی دیگر مغز، هسته رافه خلفی می باشد. تحریک هسته رافه خلفی بر ویژگی های پاسخی نورونها در موشهای دست نخورده (فاقد محرومیت حسی) اثر دارد و سبب تعدیل در پردازش اطلاعات حسی مربوط به ویسکر ها در کورتکس بارل موشهای صحرائی می گردد. در این کار پژوهشی متعاقب ایجاد پلاستیسیتی[4] (شکل پذیری) وابسته به تجربه در قشر بارل بر ویژگی های پاسخی نورونهای قشر بارل کورتکس و نیز تغییر در میزان بیان گیرنده سروتونینی $5\text{-}HT_{2A}$ به عنوان فراوان ترین گیرنده سروتونینی در لایه چهار قشر بارل مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۱) بیان مسئله واهمیت موضوع

قشر بارل ناحیه وسیعی از قشر حسی پیکری مغز جوندگان را به خود اختصاص داده است. این ناحیه محل دریافت اطلاعات ورودی حسی از گیرنده های مکانیکی مربوط به ویسکر های روی صورت حیوان می‌باشد. ویسکرها، اندام های حسی بوده و در کنترل تعادل، جهت یابی، یادگیری فضایی و غیره نقش مهمی دارند (Bialy & Beck, 1993; Kyriazi *et al.*, 1998). به طور کلی یک ارتباط آناتومیک- فیزیولوژیک برجسته ای بین گیرنده های حسی محیطی واقع در محل فولیکول ویسکر و قشر بشکه‌ای وجود دارد.

[1] Barrel Cortex
[2] Experience dependent Plasticity
[3] fine tuning
[4] Plasticity

یکی از مهمترین ویژگی های قشر مغز، شکل پذیری وابسته به تجربه می باشد. این پدیده نه تنها در طی تکوین و تکامل مغز جنینی وجود دارد بلکه در تمام دوران زندگی در قشر دیده می‌شود. خاصیت شکل پذیری وابسته به تجربه، امکان یادگیری و تغییر رفتارهای جدید را امکان‌پذیر می‌سازد. به دلیل اهمیت این پدیده، مطالعات زیادی برای فهمیدن مکانیسم عمل و عوامل مؤثر بر آن انجام شده است (Glazewski & Fox, 1996). شکل پذیری در دوره های گوناگون سنی در قشر بارل بررسی شده است (Fox, 2002). این دوره ها شامل دوره بعد از جنینی، دوره پیش از بلوغ و دوره بلوغ می باشد. شکل پذیری در مغز دارای یک دوره بحرانی القاء بوده که بعد از این دوره، شکل پذیری قابل توجهی در قشر بارل مشاهده نمی شود. لذا بیشتر مطالعات انجام گرفته بر روی عوامل و مکانیسمهای مؤثر در پلاستیستی سیناپسی مربوط به پس از دوره جنینی می باشد. دوره بحرانی در جوندگان که در آن پلاستیستی وابسته به تجربه توسط تغییر در ورودی های حسی محیطی (محرومیت حسی) صورت می گیرد معمولاً بر اساس تحقیقات انجام شده تا روز چهارم بعد از تولد است ولی در برخی از مطالعات دیگر تا اواخر هفته اول بعد از تولد نیز گزارش شده است (Fox, 2002; Galineau *et al.*, 2004).

شمسی زاده و همکاران مشخص نمودند که محرومیت حسی از ورودی های محیطی (باقی گذاشتن یک ویسکر و کندن سایر ویسکرها) طی روزهای بعد از تولد باعث تغییر در میدان دریافتی نورونهای بارلهای مربوطه می شود. همچنین آنها مشخص نمودند که میدان دریافتی مهاری با دوره بحرانی چندان تغییری نمی کند ولی تغییر در دوره بحرانی بیشتر بر روی میدان های دریافتی تحریکی اثر می گذارد (Shamsizadeh *et al.*, 2007).

سیستمهای نوروترانسمیتری مختلف نقش عمده ای در پلاستیستی قشری ایفا می کنند. مشخص شده که سیستم سروتونرژیک به عنوان یکی از سیستم های تنظیم کننده نقش مهمی در تنظیم عملکرد سیستم اعصاب مرکزی بر عهده دارد. عصب دهی قشری سروتونین از دو هسته سجافی[1] در ساقه مغز ناشی می شود که هسته سجافی خلفی[2] با فیبر های نازک و هسته سجافی میانی[3] با فیبرهای ضخیم قشر کورتکس را عصب دهی می کنند و در این میان تعداد فیبرهای نازک در قشر بیشتر از نوع ضخیم می باشد (Azmitia & Segal, 1978; Kosofsky & Molliver, 1987; Gu, 2002). آورانهای سروتونرژیک منشعب از هسته سجافی خلفی از روز ۱۵ و ۱۶ جنینی شروع به عصب رسانی به قشر می کنند (Turlejski *et al.*, 1997). بطور کلّی تکامل سیستم سروتونرژیکی مغز در طی سه مرحله انجام می شود: در مرحله اول، افزایش غلظت سروتونین بین روز اول تولد تا روز ۱۴ بعد از تولد در اجسام سلولی و روز ۲۱ بعد از تولد در ترمینالهای عصبی به اوج خود می رسد و در مرحله دوم – در روز ۲۱ بعد از تولد در هسته های سجافی و روز ۲۸ بعد از تولد در نواحی عصب دهی شده – غلظت سروتونین تا سطح بالغین کاهش می یابد و مرحله سوم شامل ایجاد یک سطح کفه است که تا روز ۷۰ بعد از تولد ادامه می یابد (D'Amato *et al.*, 1987; Bruning *et al.*, 1997; Galineau *et al.*, 2004). نقش نروتروفیک سروتونین در مسیر های حسی – پیکری مغز پستانداران به روش فارماکولوژیکی و تخلیه سروتونین[4] بررسی شده است و مشاهده گردیده

[1] Raphe Nuclei
[2] Dorsal raphe nucleus (DRN)
[3] Median raphe nucleus (MRN)
[4] 5-HT Depletion

است که تجویز سیستمیک تعدادی از این مواد تخلیه کننده سروتونین باعث تغییر آناتومیک در الگوی قشر بشکه ای در جوندگان می شود و بیشتر به صورت تأخیر در رشد الگوی قشر بشکه ای بروز می نمایند (Blue *et al.*, 1988; Bennett-Clarke *et al.*, 1994; Turlejski *et al.*, 1997; Persico *et al.*, 2000).

شیبانی و همکاران نشان دادند که تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی خصوصیات پاسخی نورونهای قشر بارل را تغییر می دهد و سبب تعدیل در پردازش اطلاعات حسی مربوط به ویسکر ها در کورتکس بارل موشهای صحرائی می گردد. این اثر می تواند احتمالاً به طور مستقیم از طریق آزاد سازی سروتونین در قشر مغز و یا به طور غیر مستقیم از طریق اثر بر مسیرهای عصبی مربوطه از قبیل هسته تری ژمینال و یا تالاموس صورت پذیرد (Sheibani & Farazifard, 2006).

اکثر زیر گونه گیرنده های سروتونین در نئوکورتکس وجود دارند ولی توزیع لایه ای این گیرنده ها در قشر بسته به گونه های حیوانی فرق می کند (Gu, 2002; Sheibani & Farazifard, 2006). طبق شواهد تحقیقاتی، معلوم شده است که در نواحی بارل و بخصوص در لایه های ۲، ۳، ۴ و ۵ بیشترین نوع گیرنده سروتونینی بیان شونده، از نوع 5-HT_{2A} می باشد که اکثراً بر روی قسمت پروگزیمال دندریت های نورونهای هرمی و تا حدودی بر روی نورونهای واسطه متمرکز هستند (Willins *et al.*, 1997; Jakab & Goldman-Rakic, 1998; Gu, 2002). جهت بررسی دقیق تر روندهای مولکولی در ناحیه بارل متعاقب ایجاد محرومیت حسی در دوره های رشد و نمو در موشها، لازم است اثر پلاستیسیته بر روی بیان پروتئین گیرنده های سروتونینی در ناحیه بارل بررسی گردد.

با توجه به اینکه اطلاعاتی در مورد نقش سیستم سروتونرژیک هسته سجافی خلفی در ایجاد شکل پذیری سیناپسی وابسته به تجربه (در موشهای بالغ بدون محرومیت حسی) در قشر حسی پیکری اولیه و اثرات آن بر دوره های بحرانی این شکل پذیری وجود ندارد، و از سوی دیگر تحریک الکتریکی DRN در موشهای بالغ بدون محرومیت حسی سبب تغییر خصوصیات پاسخ نورونهای قشر بارل در پاسخ به خم نمودن ویسکرها می شود و همچنین نقش مهمی که سیستم نروترانسمیتری سروتونرژیک در تغییر الگوی آناتومیک قشر بارل در حین دوره بحرانی جنینی بر عهده دارد، مطالعه حاضر در راستای بررسی نقش عملکردی این سیستم بر الگوی پاسخ نورونهای قشر بارل متعاقب ایجاد پلاستیسیته وابسته به تجربه طراحی شده است. بنابراین در این مطالعه؛ به بررسی اثر تحریک الکتریکی متعاقب ایجاد پلاستیسیته وابسته به تجربه بر ویژگیهای پاسخی نورونهای قشر بارل موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفته است. در گروه های جداگانه به بررسی اثر محرومیت حسی بر بیان پروتئین گیرنده 5-HT_{2A} پرداخته شده است.

۳-۱) هدف اصلی

تعیین نقش سیستم سروتونینی هسته رافه خلفی بر پلاستیسیتی وابسته به تجربه در قشر حسی اولیه موش صحرائی نر

۴-۱) اهداف جزئی

۱- تعیین اثر تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) بر ویژگی پاسخی نورونهای قشر بارل در پاسخ به خم نمودن ویسکر اصلی (D_2) در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) از طریق محاسبه بزرگی و زمان تأخیر[1] پاسخ نورون.

۲- تعیین اثر تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) بر ویژگی پاسخی نورونهای قشر بارل در پاسخ به خم نمودن ویسکر کناری در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) از طریق محاسبه بزرگی و زمان تأخیر پاسخ نورون.

۳- تعیین اثر تحریک هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) بر روی انتگراسیون پاسخ بارل ها به تحریک همزمان دو ویسکر[2] (اصلی و کناری، D_1) در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) از طریق محاسبه CTR.

۴- تعیین میزان تغییر در بیان پروتئین های گیرنده 5-HT_{2A} در قشر بارل در گروههای مختلف کنترل و plucking (P_o، P_4 وP_7) نورون.

۵-۱) فرضیات یا سوالات پژوهش

۱- بزرگی و زمان تأخیر پاسخ نورونها متعاقب تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) در پاسخ به خم نمودن ویسکر اصلی (D_2) در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) تغییر می کند.

۲- بزرگی و زمان تأخیر پاسخ نورونها متعاقب تحریک الکتریکی هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) در پاسخ به خم نمودن ویسکر کناری (D_1) در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) تغییر می کند.

۳- تحریک هسته رافه خلفی (در فواصل زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از جابجائی مکانیکی ویسکر اصلی) بر انتگراسیون پاسخ بارل ها به تحریک همزمان دو ویسکر (ویسکر کناری، D_1 در فاصله زمانی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ هزارم ثانیه قبل از ویسکر اصلی تحریک می شود) در گروههای مختلف plucking (P_o، P_4 وP_7) از طریق محاسبه نسبت CTR اثر دارد.

۴- میزان بیان پروتئین های گیرنده 5-HT_{2A} در قشر بارل در گروههای مختلف کنترل و plucking (P_o، P_4 وP_7) تغییر می یابد.

---

[1] Latency
[2] paired whisker stimulation

فصل دوم: بررسی متون

کورتکس مغز به طور یقین یکی از پیچیده ترین ساختمانهایی است که تابحال شناخته شده است. قشر مغز عمده ترین وظیفه اش پردازش اطلاعات در مغز و ایجاد خیلی از توانمندیهای بی نظیر می باشد. یکی از شاهکار های قشر مغز، پلاستیسیتی سیناپسی است که نه تنها در حین رشد بلکه در تمام دوران زندگی فرد وجود دارد. پلاستیسیتی کورتکس باعث می شود که رفتار فرد با تجربه اش در سازگاری باشد، وظایف جدیدی کسب گردد و حوادث قبلی به خاطر سپرده شود و اشیاء شناسائی گردند.

بیشترین پیشرفت مربوط به پلاستیسیتی قشری در سالهای اخیر رخ داده است که عمدتاً توسط مطالعه بر روی قشر بینائی و هیپوکامپ می باشد. با تحقیقات صورت گرفته بر روی قشر بینائی مشخص شده است که خواص میدان پذیرندگی[1] وابسته به تجربه می باشد (Wiesel & Hubel, 1965)، که در این کارزار مسیر های آوران در طول رشد برای مکان یابی در کورتکس با هم رقابت می کنند (Hubel *et al.*, 1977) و مضاف بر اینها، پلاستیسیتی دارای یک دوره بحرانی نیز می باشد (Hubel *et al.*, 1977).

هدف نوروفیزیولوژی مدرن متمرکز بر این است که اصول پایه نورونی رفتار در سطح شبکه نورونی، سلولی و مولکولی شناخته بشود. در این راستا جوندگان به عنوان مدل آزمایشی در نظر گرفته شده اند که رفتاری پیچیده و مورد علاقه را میسر می سازند و سبب می شوند عمده مداخلات مولکولی و ژنتیکی از طریق شان صورت بگیرد. با توجه به پیشرفت های تکنولوژیکی اخیر در مطالعه نوروفیزیولوژی سلولی و مولکولی جوندگان، می توان شبکه های ژنتیکی و نورونی را بهتر مورد بررسی و تحقیق قرار داد.

برای ادغام اطلاعات در کلیه سطوح تحقیق، نیاز به یک سیستم شناخته شده برای تحلیل اطلاعات کمی می باشد. قشر بارل جوندگان و مسیر های سیگنالینگ[2] منتهی به آن، دارای جوانب متنوعی است که از هم مهمتر، نقشه به وضوح تعریف شده آناتومیکی آن می باشد که بر اساس عملکرد اش به کار گرفته می شود. مطالعه بر روی این مسیر حسی (قشر بارل) می تواند نهایتاً منجر به فهم بهتر سطوح مولکولی فعالیت نورونها و ارتباطات سیناپسی شان که منجر به درک حسی از رفتارها می شود، گردد.

۱-۲) بررسی رفتار و حس ویسکر ها

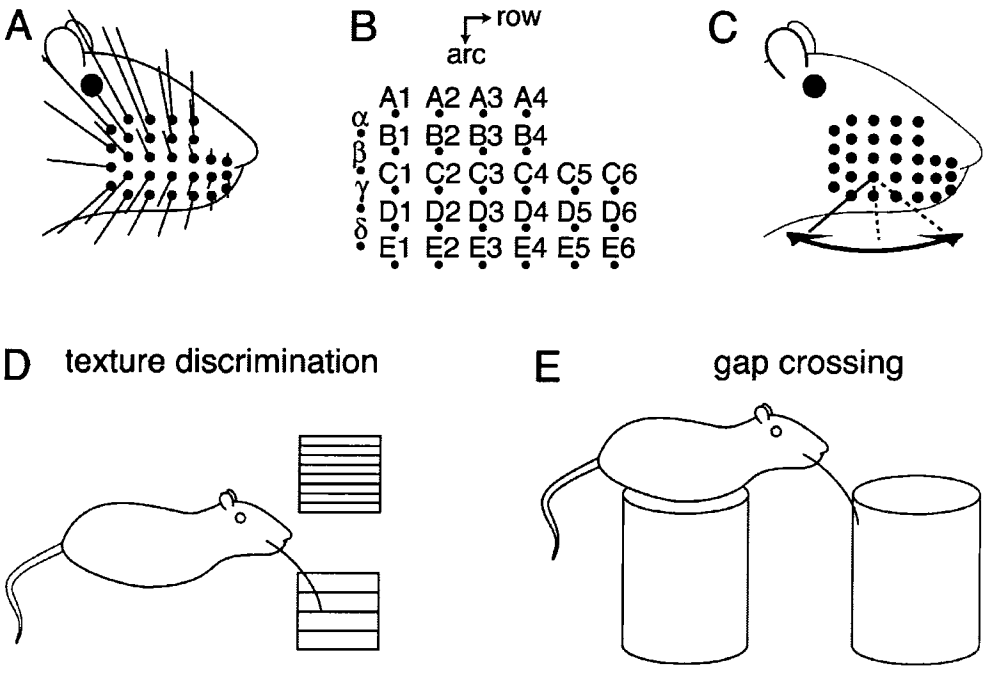
جوندگان به عنوان حیوانات شب زی در تونل های زیر زمینی زندگی می کنند و تحت شرایط گوناگونی از طبیعت، آنها باید اطلاعات مربوط به اطراف شان را بدون استفاده از حس بینائی انجام بدهند و به همین خاطر است که جوندگان از ردیفی از اندامهای حسی تحت عنوان ویسکر ها بر روی پوزه شان برخوردارند (شکل 1-A). این ویسکر ها از مو های قابل انعطافی تشکیل شده اند و پایه هاشان توسط ترمینال های حسی- عصبی احاطه شده اند و بدین گونه حرکت ویسکر ها را تشخیص و تحلیل می کنند. ویسکر ها در یک الگوی فوق العاده منظمی ترتیب دهی شده اند که به این صورت می توان تک تک ویسکر ها را از همدیگر تشخیص داد (شکل 1-B). خلفی ترین ویسکر ها طول چند سانتی متری دارند در حالیکه ویسکر های قدامی تر که در نزدیک لب ها قرار دارند دارای طول چند میلی متری می باشند.

[1] Receptive field
[2] Signaling pathways

ویسکر های مختلف به طور یقین اعمال گوناگونی را بر عهده دارند برای مثال، ویسکر های قدامی در جمع آوری و تشخیص اطلاعات مربوط به قوام اشیاء نزدیک به دهان نقش دارند در صورتیکه ویسکر های خلفی تر و بزرگ تر اطلاعات فضایی مربوط به مکان اشیاء در اطراف سر را بر عهده دارند (Brecht *et al.*, 1997). صرف نظر از نوع استفاده ای که از هر کدام از ویسکر ها می شود، بدست آوردن اطلاعات حسی در اغلب موارد به یک روند فوق العاده فعال نیازمند می باشد که حرکات سر و خود ویسکر ها در آن دخیل می باشند (Berg & Kleinfeld, 2003). وقتی که جونده نزدیک یک شیء مورد نظر می شود به طور ریتمیک ویسکر های خلفی خود را عقب و جلو می کند (شکل 1-C) و با فرکانس ۱۰Hz که تحت عنوان رفتار whisking نامیده می شود، تکان می دهد (Welker, 1964). این روند (تکان دادن ویسکر ها در اطراف یک شیء) باعث بیشتر شدن حساسیت می شود، همانطور که ما نوک انگشتان مان را دور یک شیء به حرکت در می آوریم تا قوام اش را تشخیص بدهیم در صورتیکه انگشتان ساکن این احساس را موجب نمی شوند. کنترل عصبی عمل تکان دادن ویسکر ها و اثرات اش بر مسیر های حسی مورد مطالعه زیاد واقع شده است. به نظر می آید که عمل whisking توسط مولد های الگوی مرکزی واقع در ساقه مغز کنترل می شوند (Gao *et al.*, 2001) که باعث تنظیم نورون های حرکتی عصب سه قلوی صورتی می شوند که خود عصب دهی عضلات ویسکر ها را بر عهده دارد. علاوه بر اینها، این مسیر تحت تأثیر مراکز عالی تر مثل قشر حرکتی نیز می باشد (Miyashita *et al.*, 1994) که احتمالاً به حرکات پیچیده ویسکر کمک می کنند تا جمع آوری فعال اطلاعات حسی از اشیاء تماس گیرنده میسر تر گردد. در اثر حرکات ویسکر ها فعالیت پتانسیل های عمل قشری افزایش می یابد که حتی در حین رفتار whisking که هیچ گونه اتصال شیء با ویسکر وجود ندارد، اتفاق می افتد (Fee *et al.*, 1997). لذا فعالیت عصبی مرتبط با تشخیص قوام یا مکان شیء از ادغام فعالیت تولید شده توسط عمل whisking پدید می آید.

تابحال تعدادی از اعمال جهت مطالعه رفتار های کمیتی و کیفی وابسته به ویسکر مورد استفاده قرار گرفته اند که در این راستا Simons & Carvel (Carvell & Simons, 1990) موشها را طوری تربیت می کردند که با استفاده از ویسکر ها قوام های مختلف از همدیگر تمییز داده بشوند (شکل 1-D). این گونه اندازه گیری های سایکو- فیزیکی دلالت بر حساسیت مقایسه ای در نوک انگشتان پریمات ها نیز دارد. نوع دیگری از فعالیت رفتاری که اولین بار توسط Hudson & Masterton (Hutson & Masterton, 1986) توصیف شد، مطالعه بر روی تخمین فاصله است (شکل 1-E).

با توجه به رفتار های مختلف وابسته به ویسکر، روند بعدی، ارتباط رفتار ها با فعالیت مغز و مداخلات ژنتیکی می باشد. آزمایشات در سطوح مولکولی و سلولی کمک فراوانی به تحلیل مسیر های حسی- پیکری کرده است.



شکل ۱-۲: الگوی ساختاری و عملکرد گوناگون ویسکر های جوندگان (Petersen, 2003).

۲-۲) مسیر سیگنالینگ حسی از ویسکر تا قشر

جوانب مهم مسیر سیگنالینگ حسی از ویسکر تا کورتکس (شکل ۲) هم در سطوح آناتومیکی و هم عملکردی بررسی شده است. فولیکول های موئی ویسکر توسط ترمینالهای عصب اینفرااوربیتال نورونهای حسی تری ژمینال احاطه شده اند. هر کدام از فولیکولهای مویی توسط ۲۰۰-۵۰۰ عصب حسی عصب دهی شده اند که این خود بستگی به ناحیه ویسکر در درون پَد[1] ویسکری دارد که در این بین ویسکر های بزرگ خلفی بیشترین عصب دهی متراکم را دارند (Welker & Van der Loos, 1986).

[1] Pad