

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی پزشکی

عنوان پایان نامه :

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی دانه رازیانه (*Foeniculum Vulgare*)

بر حافظه، یادگیری، رفتار شبه اضطرابی و تعیین بیان ژن

BDNF در هیپو کمپ رتهای اوارکتومی شده

نگارش :

بهروز نورانبخش

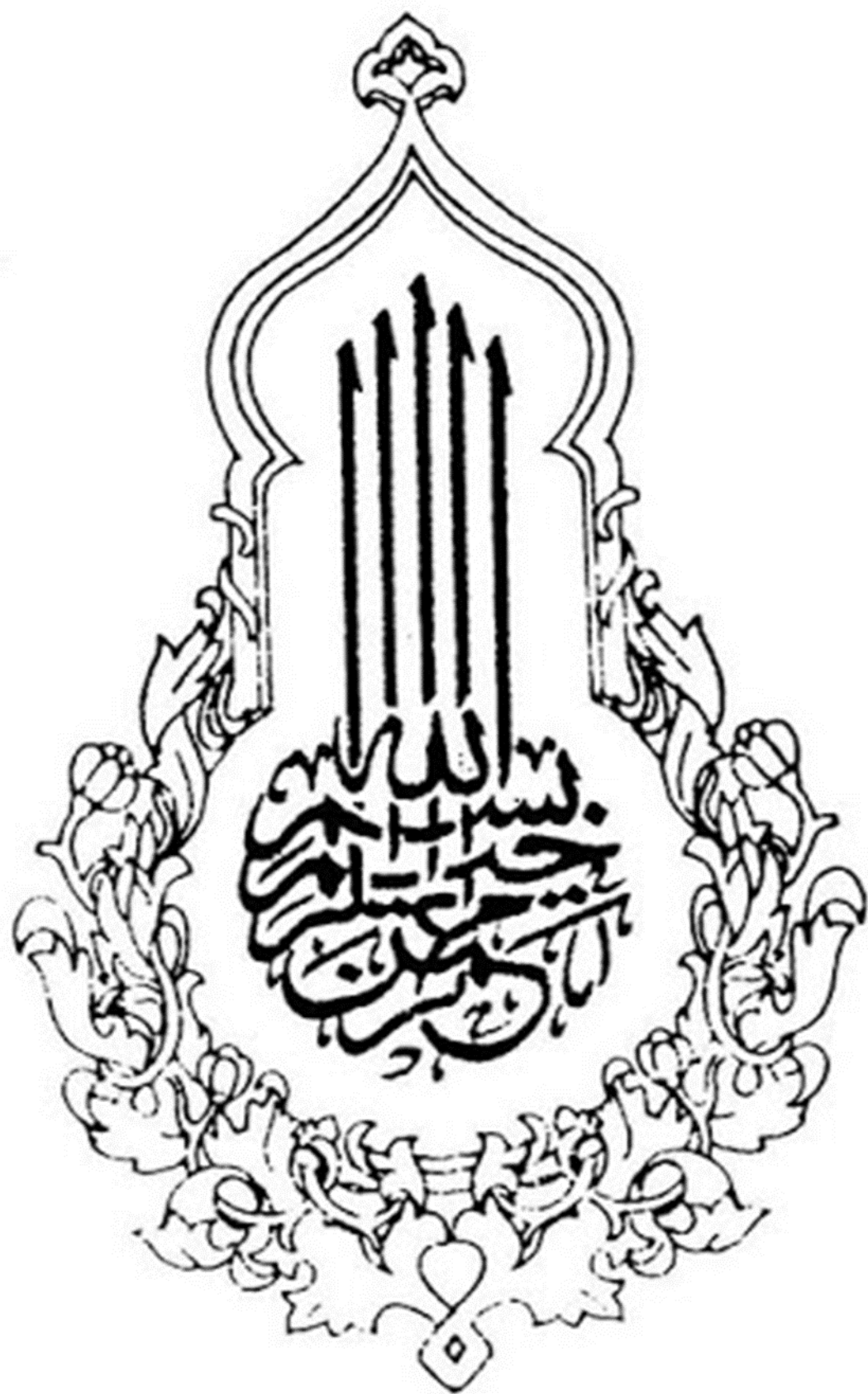
اساتید رهنما :

دکتر علی عابدی - دکتر حکیمه سعادت

استاد مشاور: دکتر محمد امانی

آبان ۱۳۹۹

شماره پایان نامه : ۵۵-



تقدیم

سپاس بر خداوند حکیم و بزرگ و تکامل بخش که این امکان را بر من حقیر فراهم کرد تا بتوانم ذره ای از علم پزشکی را درحیطه دنیای بیکران فیزیولوژی پزشکی بیاموزم چگونه سجده شکر را بر زمین زخم که این چنین مهربانانه مرا در شرایط سخت و ویژه یاری کرد.

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد به شماره ۰۵۵ ثبت شده در واحد پژوهشی دانشکده پزشکی می باشد که پس از تصویب معاونت تحقیقات و فن اوری در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده به انجام رسید.

آنها به روان پاک پدر مردی با پشتکار بسیار بالا مسئولیت پذیر و تلاشگر به مهربانی بی قید و شرط مادر، به صبوری و شکیبایی بی حد و اندازه، همسر به مسئولیت پذیری فرزندان به تلاشهای علمی، بدون منت اساتید این دانشکده بویژه زحمات طاقت فرسای گروه فیزیولوژی و نگرشهای فهیم مدیر گروه فیزیولوژی و در نهایت دو نفر از عزیزان بزرگوار و صبور اساتید راهنما جناب آقای دکتر علی عابدی و سرکار خانم دکتر حکیمه سعادت که در طول پروژه تا انتها با راهنمایی ها و نگرشهای علمی اینجانب را راهنمایی و کمک نموده اند تقدیم میدارم.

تقدیر و تشکر

در پایان بدین وسیله از همکاریها و از زحمات بیدریغ سرکار خانم دهقانی در پروژه همچنین آقایان شادمان اداک و نادری پوروسرکار خانم یعقوبی و نیز از زحمات مسئول محترم آزمایشگاه های دانشکده آقای خانزاده و مسئول محترم آزمایشگاه مرکزی سرکار خانم دکتر حسین زاده و کارشناس محترم آزمایشگاه فیزیولوژی سرکار خانم سید برقی و تمامی عزیزان این دانشکده تشکر و قدردانی می کنم.

فهرست مطالب

چکیده	۱
فصل اول : مقدمه	
۱-۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق	۷
۱-۲- اهداف و فرضیات طرح	۱۰
۱-۲-۱- اهداف کلی طرح	۱۰
۱-۲-۲- اهداف اختصاصی طرح	۱۱
۱-۲-۳- اهداف کاربردی	۱۱
۱-۲-۴- فرضیات	۱۱
۱-۳- تعریف واژه ها	۱۲
۱-۱-۳- یادگیری (Learning)	۱۲
۱-۳-۱-۱- یادگیری اجتنابی	۱۲
۱-۳-۲- حافظه (Memory)	۱۲
۱-۲-۳-۱- حافظه ناخودآگاه (Implicit or Non Declarative)	۱۳
۲-۲-۳-۱- حافظه خودآگاه (ExplicitorDeclarative)	۱۳
۳-۳-۱- هیپوکمپ (Hippocampus)	۱۴
۱-۳-۴- گیاه رازیانه (Foeniculum Vulgare)	۱۴
۱-۳-۵- عصاره (Extract)	۱۵
۱-۳-۶- هورمون های جنسی تخمدانی	۱۵
۷-۳-۱- اوار کتومی	۱۶

۱۶ ۱-۳-۸- مرحله پرواستروس
۱۶ ۱-۳-۹- مرحله استروس
۱۶ ۱-۳-۱۰- مراحل دی استروس و مت استروس
	فصل دوم: بررسی متون
۱۸ ۱-۲- یادگیری
۱۸ ۲-۱-۱- انواع یادگیری
۱۸ ۲-۱-۱-۱- یادگیری ارتباطی
۱۸ ۲-۱-۱-۲- یادگیری غیر ارتباطی
۱۸ ۲-۲- انواع حافظه
۱۹ ۲-۲-۱- حافظه صریح (Declarative)
۱۹ ۲-۲-۲- حافظه ضمنی (Implicit)
۲۰ ۲-۲-۳- حافظه شروع کننده
۲۰ ۲-۲-۴- حافظه اجرایی
۲۱ ۲-۲-۵- حافظه کاری
۲۱ ۲-۳- اصول عصبی حافظه
۲۲ ۲-۴- شکل پذیری سیناپس و یادگیری
۲۲ ۲-۵- عادت کردن
۲۳ ۲-۶- حساس شدن
۲۶ ۷-۲- نوروزنزیس
۲۶ ۸-۲- یادگیر ارتباطی رفلکس های شرطی
۲۷ ۹-۲- حافظه ی کاری
۲۷ ۱۰-۲- حافظه طولانی مدت
۲۸ ۱۱-۲- حافظه و هیپوکامپ

۲۹ ۱۲-۲- آناتومی هیپوکامپ
۳۳ ۱۳-۲- هیپوکامپ و لوب گیجگاهی میانی
۳۵ ۱۴-۲- مدار سیناپسی هیپوکامپ
۳۸ ۱۵-۲- مدل‌های حیوانی
۳۸ ۱-۱۵-۲- مازهای حیوانات
۳۸ ۲-۱۵-۲- موریس ماز و اتر
۳۹ ۱۶-۲- هیپوکامپ و پلاستیسیته (plasticity) سیناپسی
۴۳ ۱۷-۲- عوامل نروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) دخیل حافظه و پلاستیسیته سیناپسی
۴۴ ۱۸-۲- هورمون‌های جنسی
۴۵ ۱-۱۸-۲- هورمون‌های تولید مثلی زنانه و اعمال شناختی
۴۵ ۱۹-۲- گیاهان دارویی
۴۷ ۲-۲۰- استفاده از رازیانه در طب سنتی
۴۸ ۱-۲۰-۲- ساختار شیمیایی رازیانه
۴۸ ۲-۲۰-۲- ترکیبات فیتوشیمیایی رازیانه
۴۹ ۲-۲۱- خواص دارویی رازیانه
۵۰ ۱-۲۰-۲- فعالیت آنتی‌باکتریال
۵۰ ۲-۲۰-۲- فعالیت ضد قارچی
۵۱ ۳-۲۰-۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی
۵۱ ۴-۲۰-۲- فعالیت ضدالتهابی
۵۱ ۵-۲۰-۲- فعالیت ضد اضطراب
۵۲ ۶-۲۰-۲- اثر محافظتی معده
۵۲ ۷-۲۰-۲- فعالیت استروژنی
۵۳ ۸-۲۰-۲- فعالیت قلبی عروقی و چربی

۵۴ ۲-۲۰-۹- فعالیت ضد دیابت
۵۴ ۲-۲۰-۱۰- فعالیت ضد سرطانی
۵۵ ۲-۲۰-۱۱- فعالیت محافظتی کبدی
۵۵ ۲-۲۰-۱۲- فعالیت محافظتی حافظه
۵۶ ۲-۲۱- اثرات جانبی رازیانه
	فصل سوم : مواد و روش کار
۵۴ ۳-۱- نوع مطالعه در این تحقیق
۵۴ ۳-۲- مکان و زمان انجام مطالعه
۵۴ ۳-۳- ملاحظات اخلاقی
۵۵ ۳-۴- گروه های مورد مطالعه
۵۵ ۳-۵- معیار ورود
۵۵ ۳-۶- معیار خروج
۵۵ ۳-۷- مواد مورد استفاده در این تحقیق
۵۷ ۳-۸- تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق
۵۸ ۳-۹- روش گردآوری اطلاعات
۵۹ ۳-۱۰- گروه بندی حیوانات و روش انجام آزمایش
۶۰ ۳-۱۱- جراحی جهت خارج نمودن بافت تخمدان (اوارکتومی)
۶۱ ۳-۱۲- نحوه ایجاد آسیب
۶۱ ۳-۱۳- تهیه نمونه گیاهی
۶۱ ۳-۱۳-۱- تهیه عصاره دانه رازیانه
۶۳ ۳-۱۴- روش اجرایی آزمون حافظه و یادگیری احترازی غیر فعال :
۶۵ ۳-۱۵- تست Open field
۶۵ ۳-۱۶- روش RT-PCR جهت بررسی بیان ژن BDNF

۶۶ RNA استخراج ۳-۱۶-۱
۶۸ تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ ۳-۱۶-۲
۶۸ سنتز cDNA از RNA استخراج شده ۳-۱۶-۳
۷۰ پروتکل واکنش PCR ۳-۱۶-۴
۷۰ آماده‌سازی نمونه‌ها ۳-۱۶-۵
۷۱ Liqht cycler دستگاه برنامه دستگاه ۳-۱۶-۶
۷۲ الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۳-۱۶-۷
۷۳ روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری ۱۷-۳
	فصل چهارم : نتایج
۷۷ ارزیابی وزن رت‌ها ۱-۴
۷۷ وزن هفته اول ۱-۱-۴
۷۷ وزن هفته دوم ۲-۱-۴
۷۸ وزن هفته سوم ۳-۱-۴
۷۸ وزن هفته چهارم ۴-۱-۴
۷۸ وزن هفته پنجم ۵-۱-۴
۷۹ وزن هفته ششم ۶-۱-۴
۷۹ وزن هفته هفتم ۷-۱-۴
۷۹ وزن هفته هشتم ۸-۱-۴
۸۱ ارزیابی وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف ۲-۴
۸۱ گروه کنترل ۱-۲-۴
۸۲ گروه شم جراحی ۲-۲-۴
۸۳ گروه رازیانه (FV) ۳-۲-۴
۸۳ گروه ۱۷ بتا استرادیول ۴-۲-۴

- ۸۴ ۵-۲-۴ گروه دریافت کننده DMSO
- ۸۵ ۶-۲-۴ گروه کنترل سالم
- ۸۶ ۳-۴ ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی در Open Field
- ۸۶ ۱-۳-۴ ارزیابی تعداد Rearing در گروههای مختلف
- ۸۷ ۴-۳-۲ ارزیابی تعداد Grooming در گروههای مختلف
- ۸۸ ۴-۳-۳ ارزیابی تعداد دفعات ورود به ناحیه مرکزی در گروههای مختلف
- ۸۹ ۴-۳-۴ ارزیابی زمان سپری شده در ناحیه مرکزی در گروههای مختلف
- ۹۰ ۴-۳-۵ ارزیابی تعداد مدفوع در گروههای مختلف
- ۹۲ ۴-۴ ارزیابی یادگیری و حافظه اجتنابی غیر فعال در Shuttle Box
- ۹۲ ۴-۱-۴ ارزیابی زمان تاخیر برای ورود به منطقه تاریک (STL) در گروههای مختلف
- ۹۳ ۴-۲-۴ ارزیابی زمان سپری در ناحیه تاریک در گروههای مختلف
- ۹۴ ۴-۴-۳ ارزیابی تعداد ورود به منطقه تاریک در گروههای مختلف
- ۹۵ ۴-۵ ارزیابی میزان بیان mRNA BDNF در گروه های مختلف توسط PCR

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

- ۹۸ ۱-۵ تاثیر رازیانه بر وزن رتهای اوارکتومی
- ۱۰۰ ۲-۵ استروژن
- ۱۰۶ ۳-۵ نقش هیپوکمپ در یادگیری
- ۱۰۸ ۴-۵ تاثیر رازیانه بر BDNF
- ۱۱۰ ۵-۵ تنظیم استروژنی اعمال عصبی
- ۱۱۳ ۶-۵ تنظیم خارهای دندریتی توسط BDNF
- ۱۱۴ ۷-۵ نتیجه گیری
- ۱۱۵ ۸-۵ پیشنهادات

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- تقسیم بندی حافظه صریح و ضمنی. اشکال مختلفی از حافظه را می توان به صورت صریح (اخباری) یا ضمنی (غیر اخباری) دسته بندی کرد. حافظه صریح تا حد زیادیه هیپوکامپ وابسته است و حافظه ضمنی به مدارهای striatal بستگی دارد (۳۵)..... ۲۰
- شکل ۲-۲- مدل شماتیک القاء فاز زودرس تقویت طولانی مدت (LTP) در هیپوکامپ (۳۵)..... ۲۴
- شکل ۳-۲- هیپوکامپ و لایه های آن (۶۸)..... ۳۱
- شکل ۴-۲- مسیر های ورودی و خروجی هیپوکامپ (۷۰)..... ۳۲
- شکل ۵-۲- (a) مدار پایه ی هیپوکامپ چوندگان (b) مدار سه سیناپسه تحریکی (Entorhinal cortex EC-CA1-CA3-DG-EC)) با فلشهای ممتد نشان داده شده است در حالیکه فلشهای نقطه دار نشان دهنده ورودیهایی است که فعالیت هر ناحیه از هیپوکامپ را تنظیم می کند (۸۵)..... ۳۷
- شکل ۶-۲- مدلی برای القاء فاز اولیه از LTP (۳۵)..... ۴۲
- شکل ۷-۲- مدلی برای فاز تاخیری LTP..... ۴۳
- شکل ۸-۲- مکانیسم شماتیک برای ساخت BDNF..... ۴۴
- شکل ۹-۲- نمایی از گیاه (چپ) و دانه رازیانه (راست)..... ۴۸
- شکل ۱-۳- تزریق داخل صفاقی..... ۶۰
- شکل ۲-۳- برداشتن تخمدان ها..... ۶۱
- شکل ۳-۳- عصاره گیری رازیانه توسط کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)..... ۶۳
- شکل ۴-۳- shuttle box..... ۶۴
- شکل ۱-۵- بیان ژن BDNF پس از درمان با استرادیول در رتهای اوارکتومی شده. A: واکنش ایمنی BDNF در مقطع کروئال از هیپوکامپ پستی در یک رت اوارکتومی شده. B: همان واکنش پس از تزریق استرادیول که نشان دهنده بیشترین بیان ژن BDNF می باشد (۱۹۰). MF: mossy fibers: DG. dentate gyrus, ۱۱۱
- شکل ۲-۵- مکانیسمهای شماتیک برای استروژن و افزایش BDNF در افزایش حافظه و خارهای دندریتی. .. ۱۱۲

فهرست جداول

جدول ۳-۱- جدول مرحله اول سنتز CDNA	۶۹
جدول ۳-۲- جدول مرحله دوم سنتز	۶۹
جدول ۳-۳- جدول ترکیبات واکنش PCR برای ژن GAPDH	۷۰
جدول ۳-۴- جدول تهیه ترکیبات واکنش PCR برای ژن BDNF	۷۱
جدول ۳-۵- جدول وضعیت برنامه دستگاه Liht cyclor برای ژن GAPDH	۷۱
جدول ۳-۶- جدول وضعیت برنامه دستگاه Liht cyclor برای ژن BDNF	۷۲
جدول ۳-۷- جدول متغیرهای مطالعه	۷۴

فهرست نمودارها

- نمودار ۴-۱- وزن رت ها برای گروه کنترل در مدت هشت هفته ۸۱
- نمودار ۴-۲- وزن رت ها برای گروه شم جراحی در مدت هشت هفته ۸۲
- نمودار ۳-۴- ارزیابی وزن رت ها برای گروه رازیانہ ۸۳
- نمودار ۴-۴- ارزیابی وزن رت ها برای گروه ۱۷ بتا استرادیول ۸۴
- نمودار ۴-۵- وزن رت ها برای گروه DMSO در مدت هشت هفته ۸۵
- نمودار ۴-۶- وزن رت ها برای گروه DMSO در مدت هشت هفته ۸۶
- نمودار ۴-۷- : تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد Rearing در رتہای اوارکتومی شدہ
(F(5,42)=9.273 , p<0.001) ۸۷
- نمودار ۴-۸- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد Grooming در رتہای اوارکتومی شدہ
(F(5,42)=0.596, p=0.6) ۸۸
- نمودار ۴-۹- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد دفعات ورود بہ ناحیہ مرکزی در Open Field در
گروهہای مختلف در رتہای اوارکتومی شدہ ۸۹
- نمودار ۴-۱۰- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر زمان سپری شدہ در ناحیہ مرکزی Open Field در رتہای
اوارکتومی شدہ ۹۰
- نمودار ۴-۱۱- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد مدفوع در رتہای اوارکتومی شدہ ۹۱
- نمودار ۴-۱۲- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد STL در رتہای اوارکتومی شدہ ۹۲
- نمودار ۴-۱۳- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد زمان سپری در ناحیہ تاریک در رتہای اوارکتومی شدہ
..... ۹۳
- نمودار ۴-۱۴- تاثیر عصاره هیدروالکلی رازیانہ بر تعداد زمان ورود بہ ناحیہ تاریک در رتہای اوارکتومی شدہ ۹۴
- نمودار ۴-۱۵- تاثیر عصاره هیدروالکلی دانہ رازیانہ بر میزان بیان mRNA BDNF در هیپوکمپ رتہای
اوارکتومی شدہ ۹۵

نمودار ۱۶-۴- تاثیر عصاره هیدروالکلی دانه رازیانه بر میزان بیان mRNA BDNF در هیپوکمپ رتهای

اوارکتومی شده ۹۶

چکیده

زمینه: نزدیک به ۵۰٪ از جمعیت انسانی رازنان تشکیل می دهد. یائسگی یک دوره از زندگی زنان می باشد که در آن سطح استروژن پلاسما کاهش می یابد. در این دوره زنان مستعد استئوپروزیس و کاهش حافظه و فراموشی هستند بطوریکه حساس شده و دچار گرگرفتگی میشوند و چون استفاده از استروژن صنعتی دارای عوارض جانبی می باشد، داروهای گیاهی دارای استروژن بهترین گزینه می باشند. بسیاری از گیاهان دارویی بومی ایران دارای خواص دارویی هستند. گیاه رازیانه هزاران سال است که بعنوان ماده استروژنی مورد استفاده قرار می گیرد.

هدف: با توجه به اهمیت یائسگی و اثرات آن بر زندگی زنان یائسه و نیز با عنایت به اثرات عمیق و ثابت شده هورمونهای جنسی بویژه استروژن در اختلالات شناختی دوره یائسگی در جنس ماده و وجود مطالعاتی در مورد اثرات استروژن بر پیشگیری از اختلالات شناختی ناشی از یائسگی مطالعه حاضر طراحی گردید تا اثرات دانه رازیانه بر حافظه و میزانیان ژن BDNF در هیپوکامپ موشهای صحرایی ماده فاقد تخمدان بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش ها: ۴۸ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگ داوولی و بالغ ۳ ماهه پس از تطابق به محیط در قفس های مخصوص تحت شرایط محیطی و در حرارت مطلوب ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و چرخه روشنایی ۱۲ ساعته و همچنین مقدار کافی از غذا و آب نگهداری شدند. رتھا با وزن تقریبی ۲۲۰-۱۸۰ گرم در ۶ گروه ۸ تایی بطور تصادفی تقسیم شدند. گروه کنترل سالم هیچ دارویی دریافت نکرد، گروه کنترل اوارکتومی شده، به گروه شم حلال دی متیل سولفوکساید (۵٪) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید، گروه شم جراحی (بدون برداشتم تخمدان) گروه B۱۷ استرادیول (۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم - به صورت داخل صفاقی - دو ماه)، گروه عصاره هیدروالکلی دانه رازیانه (با دوز ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم - به صورت داخل صفاقی - دو ماه). پس از دو ماه تیمار،

تست‌های رفتاری یادگیری و حافظه از جمله Open Field و Shuttle Box انجام و پس از اتمام آزمایشات رت‌ها بیهوش و هیپوکامپ آنان جهت بیان ژن BDNF خارج شد.

یافته ها : تزریق عصاره رازیانه و استرادیول به موش‌های صحرایی ماده در طول دوماه سبب کاهش استرس رت‌ها نسبت به بقیه گروه‌ها گردید. همچنین، افزایش حافظه و یادگیری در دوگروه رازیانه و استرادیول (بخصوص گروه رازیانه) بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالا بود. این عصاره باعث افزایش بیان ژن BDNF در هیپوکامپ گروه رازیانه نسبت به سایر گروه‌ها گردید.

نتیجه گیری : یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروآلکلی رازیانه در کاهش استرس و نیز در افزایش بیان ژن BDNF و پروتئین‌هایی مربوط به تشکیل سیناپسی در هیپوکامپ باعث بهبود یادگیری مکانی و عملکرد حافظه در رت‌های اوارکتومی می‌گردد. این امر نشان‌دهنده تاثیرات مثبت دانه رازیانه بر حافظه و یادگیری می‌باشد.

کلمات کلیدی : رازیانه، اوارکتومی، حافظه و یادگیری، هیپوکامپ، BDNF، موش صحرایی ماده

فهرست علائم اختصاری:

ALT: Alanine aminotransferase

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AST: aspartate aminotransferase

BDNF :brain-derived neurotrophic factor

CA: Cornu Ammonis

Ca⁺⁺: Calcium

CaMKII: CaM kinase II

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

CS: conditional-stimulus (US)

DG :dentate gyrus

ER :estrogen receptor

ERE: estrogen response element

ERE: Estrogen –sensitive Response Element

ER α :estrogen receptor alpha

ER β :estrogen receptor beta

FSH: Follicle-stimulating hormone

FV: Foeniculum Vulgare

GABA: Gamma aminobutyric acid

Glur2: Glutamate receptor 2

GSH: Glutathione

H.M: Henry Gustav Molaison

HDL: High-density lipoprotein

LH: Luteinizing hormone

LPP: Lateral perforant path

LTD: long-term depression

LTP: long-term potentiation

MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7

MDA: Malondialdehyde

MRI: Magnetic Resonance Imaging

mRNA: Messenger Ribonucleic acid

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

NF-kb: Nuclear Factor

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor

NO: Nitric Oxide

Ovx :ovariectomized

PET: Positron-Emission Tomography

PFC: prefrontal cortex

TNF: Tumor Necrosis

TrKA: tyrosine kinase receptor A

TrKB: tyrosine kinase receptor B

US: unconditional-stimulus

VMN :ventromedial hypothalamic nucleus