Archive of SID

الگوی آورانهای ناحیه سپتوم میانی در موش صحرایی

هاشم حقدوست‌یزدی، کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر پریچهر پاسبخش، استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر ژیلا بهزادی، استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Pattern Of Afferents To The Medial Septal Area In The Rat

ABSTRACT

The medial septal area (MSA) provides the major cholinergic projection to the hippocampus which is critical for function of the memory. Different brain areas through the MSA modulates septohippocampal functions. This study was designed to determin origins of inputs to this area.

For this purpose, stereotaxic injections of one microliter HRP (25 percent, Sigma) by Hamilton syringe to to the medial septal area were performed in 8 rats. Following brain tissue fixation, sectioning and enzyme histochemical reaction, the labeled neurons were detected microscopically. Retrogradely labeled perikarya observed ipsilaterally in diagonal band of Broca, lateral septum, hippocampus, subfornical area and ventral pallidum in the telencephalon, lateral preoptic area, lateral hipothalamicarea/tuber cinereum, posterior hypothalamus, submammillothalamic, supramammillary and lateral mammillary nuclei in the diencephalons, ventral tegmental area, interpeduncular nucleus, central grey area and locus coeruleus and also bilaterally in raphe nuclei of the brain stem regions.

Based on this results, in addition to learning processes, MSA through its connections with subfornical and lateral hypothalamic area can also support the physiological mechanisms for dipsogenic, electrolytic, and pressor responses in living animals.

Key words: Medial septal area, afferents, HRP, Rat.

چکیده

ناحیه سپتوم میانی (Medial Septal Area) منبع اصلی ورودیهای کولینرژیک به هیپوکامپ بوده و نقش مهمی در فرآیندهای حافظه دارا می‌باشد. نواحی مختلف مغز از طریق این ناحیه اعمال سیستم سپتوهیپوکامپ را تعدیل می‌نمایند. هدف از این مطالعه تعیین منشا آورانها به ناحیه سپتوم میانی می‌باشد.

بدین منظور، مقدار یک میکرولیتر Horse Radish Peroxidase =HRP (۲۵ درصد، سیگما) بوسیله جراحی استرئوتاکسیک و با کمک سرنگ هامیلتون به ناحیه سپتوم میانی در هشت موش صحرایی تزریق گردید. بافت مغز پس از فیکس شدن مقطع‌گیری شده و واکنش هیستوشیمیایی برای مشاهده سلولهای نشاندار شده انجام یافت.

با مطالعه میکروسکوپی اجسام سلولی که به طریقه رتروگراد نشاندار شده‌بودند بصورت یکطرفه در باند دیاگونال بروکا، سپتوم جانبی، هیپوکامپ، ناحیه ساب فورنیکال و پالیدوم شکمی در تلانسفال، ناحیه پره‌اپتیک جانبی، ناحیه هیپوتالاموس جانبی توبرسینورم، هیپوتالاموس خلفی، هسته‌های ساب مامیلوتالامیک سوپرامامیلاری و پستانی جانبی در دیانسفال، ناحیه تگمنتال شکمی، هسته اینترپدانکولار، ناحیه خاکستری مرکزی و لوکوس سرلئوس و بصورت دو طرفه در هسته‌های رافه در ساقه مغز مشاهده شدند.

بر اساس نتایج بدست آمده، ناحیه سپتوم میانی علاوه بر فرآیندهای یادگیری از طریق ارتباط با نواحی ساب‌فورنیکال و هیپوتالاموس جانبی می‌تواند در مکانیسم‌های فیزیولوژیک مربوط به پاسخ تشنگی، الکترولیتیک و فشار درون عروقی نیز در جانوران دخالت داشته‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ناحیه سپتال یا سپتوم، مجموعه‌ای از هسته‌ها و دسته‌های فیبری می‌باشد که در میان شاخهای قدامی بطن‌های جانبی، زیر بخش میانی و قدامی کورپوس کالوزوم بین دو نیمکره و در قسمت پشتی بخش میانی رابط قدامی قرار می‌گیرد. این ناحیه خود به ٤ بخش جانبی، میانی، خلفی و شکمی تقسیم می‌شود. این قسمت می‌تواند به دو بخش پشتی هسته سپتوم میانی Medial Septum (MS) و بخش شکمی هسته دیاگونال باند بروکا Diagonal Band of Broca (DBB) تقسیم شود و خود DBB به یک بازوی عمودی پشتی Vertical limb (VDB) of Diagonal Band و یک بازوی افقی شکمی Horizontal limb of the Diagonal Band (HDB) تقسیم می‌شود.

بخش میانی سپتوم اهمیت زیادی در یادگیری و حافظه دارا می‌باشد. آسیب‌های این ناحیه نقص‌های جدی در حافظه فضایی ایجاد کرده و سبب حذف ریتم هیپوکامپی می‌شود(۱).

در همین راستا ارتباط گسترده‌ای بین سپتوم میانی و تشکیلات هیپوکامپ وجود دارد بطوریکه این ناحیه بیشترین عصب رسانی به هیپوکامپ را در میان هسته‌های زیر قشری دارا بوده(۱) و عصب‌دهی کولینرژیک اصلی به هیپوکامپ را تشکیل می‌دهد. پروژکت‌ها از سپتوم میانی به هیپوکامپ ۷۰ درصد گاباارژیک و ۳۰ درصد کولینرژیک می‌باشند(۲) و گفته می‌شود که پلاستیسیته سیناپسی در هیپوکامپ که یک مکانیسم فرضی برای ذخیره حافظه است را تعدیل می‌نمایند(۳). همچنین آتروفی و از بین رفتن نورونهای کولینرژیک این سیستم در پاتوژنز بیماری آلزایمر گزارش شده‌است(٤).

بررسی و شناخت ارتباطات این ناحیه با دیگر نواحی مغز اهمیت ویژه و بسزایی دارد. در این میان گرچه بر روی ارتباطات وابرانی سپتوم میانی بویژه مدار سپتوهیپوکامپ تحقیقات بسیاری صورت گرفته ولی در ارتباط با منابع آورانی این ناحیه اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. گزارش‌هایی در رابطه با ارتباط آورانی از هسته‌های رافه (۵)، هیپوتالاموس خلفی(٦)، ناحیه سوپرامامیلاری (۷) و تشکیلات هیپوکامپ (۸) به ناحیه سپتوم میانی ارائه شده‌است. از آنجا که اعمال فرایندهای فیزیولوژیک سپتوم میانی بر نقاط ارتباطی آن، تحت نفوذ و تنظیم آورانهای این ناحیه می‌باشد، در این مطالعه با استفاده از تکنیک ردیابی رتروگراد HRP بررسی کاملی بر روی منشاء آورانها به ناحیه سپتوم میانی به عمل آمده است. همچنین با دقت بر جایگاه و مورفولوژی سلولهای پروژکت‌کننده به این ناحیه، مقایسه کمی و کیفی این آورانها نیز ارائه می‌شود.

روش و مواد

این پژوهش بر روی ۱۲ موش صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley به وزن ۲۸۰gr-۲۲۰ انجام گرفت. موشها با ترکیبی از کتامین (۱۰۰mg/kg) و گزیلازین (۵mg/kg) بصورت داخل صفاقی بیهوش شده و سپس با استفاده از جراحی استریوتاکسی و توسط سرنگ هامیلتون مقدار یک میکرولیتر HRP تیپ VI(۵۰۰۰ واحدی-سیگما) با غلظت ۲۵-۲۰ درصد به ناحیه سپتوم میانی بر اساس مختصات بدست آمده از اطلس پاکسینوز و واتسون تزریق گردید. پس از آن سرنگ در مکان خود به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه باقی ماند تا از پخش شدن HRP جلوگیری شود. ۷۲-٤۸ ساعت پس از تزریق، مجددا موشها عمیقا بیهوش شده و توسط ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتر سالین ۰/۹ درصد، ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو حاوی گلوتار الدئید ۲۵/ ۱ درصد و پارافرما آلدئید ۱ درصد در بافر فسفات M ۰/۱ (٤/ PH=۷) و ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول ساکارز ۱۰-۵ درصد در بافر فسفات M۰/۱ پرفیوز شدند. سپس مغز را از جمجمه خارج کرده و ۲٤ ساعت در داخل محلول فیکساتیو قرار دادیم. مغز را به ۲ تا ۳ بلوک تقسیم کرده و توسط دستگاه وبیراتوم برشهای ۷۰ میکرومتری از آنها تهیه می‌شد. برشها بصورت یک در میان انتخاب و بر روی آنها واکنش هیستوشیمیایی با استفاده از تترامتیل بنزیدین (سیگما، TMB) و سدیم نیتروفری سیانید (سیگما) انجام گرفته و توسط ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد آب‌اکسیژنه، آنزیم HRP آشکار گردید. پس از آن برشها بر روی لامهای ژلاتینه سوار شده و پس از خشک شدن، برای ایجاد کنتراست بین بافت زمینه و سلولهای حاوی HRP، رنگ‌آمیزی قرمز خنثی بر روی آنها انجام گرفت و سپس آب‌گیری و لامل‌گذاری شدند. کلیه نمونه‌ها با کمک میکروسکوپ نوری مطالعه و با استفاده از اطلس پاکسینوز و واتسون سلولهای

www.SID.ir

Archive of SID

نشاندار شده در نقاط مختلف مغز جلویی و ساقه مغز تعیین محل و شمارش گردیدند.

نتایج

محل تزریق: از ۱۲ موش که تزریق ردیاب به ناحیه سپتوم میانی آنها صورت گرفته‌بود، در ۸ موش محل تزریق مناسب و در بخش میانی سپتوم قرار داشت. در این موشها کانون تزریق در هسته MS و بازوی عمودی باند دیاگونال Vertical Limb of the Diagonal Band (VDB) قرار داشت(شکل ۲- تصویر A).

تزریق ردیاب منجر به نشاندار شدن نورونها در نواحی مختلف مغز گردید که در مقاطع قدامی به خلفی (شکل ۱) نشان داده‌شده‌است. نورونهای نشاندار به ترتیب در نقاط مختلف مغز به شرح زیر قرار داشتند.

I تلانسفال: هسته‌های موجود در این ناحیه از مغز ۳۴ درصد از کل سلولهای نشاندار شده را شامل می‌شدند، ۱۷ درصد از این سلولها در بازوی افقی باند دیاگونال (HDB) مشاهده شد (شکل ۳). این سلولها از بخش‌های سری تا نواحی دمی HDB پراکنده بودند و بیشترین تراکم آنها در قسمت‌های میانی هسته مشاهده شد. در این ناحیه نورونها پررنگ و به شکل‌های هرمی، دوکی شکل و گلابی شکل بوده و نوریت‌های نشاندار شده در این نورونها بخوبی قابل تشخیص می‌باشند.

در بخش خلفی تشکیلات هیپوکامپ در نواحی CA1 و CA2 شاخ‌آمون و سابیکولوم، تعداد قابل ملاحظه‌ای (حدود ۱۳ درصد) نورون نشاندار شده مشاهده گردید. این نورونها در قسمت پشتی بخش خلفی تشکیلات بویژه در مرز CA1 با سابیکولوم متمرکز بوده و به سمت بخش‌های شکمی (از جمله CA2) از تراکم آنها به مقدار زیادی کاسته می‌شود. لایه پیرامیدال میزبان اصلی سلولها بود ولی تعداد اندکی سلول در لایه‌های غیر پیرامیدال بویژه لایه Stratum oriens نیز نشاندار شده‌بودند. این سلولها ظاهری کم‌رنگ و هرمی شکل داشتند.

در ناحیه تلانسفال همچنین تعداد کمی سلول در ناحیه ساب فورنیکال Subfornical Organ (SFO) و پالیدوم شکمی Ventral Palidum (VP)حاوی گرانولهای HRP مشاهده شدند. در SFO سلولها بیضی شکل بودند. در VP سلولهای نشاندار گلابی شکل و پررنگ بوده و در بخش شکمی نسبت به HDB قرار داشتند.

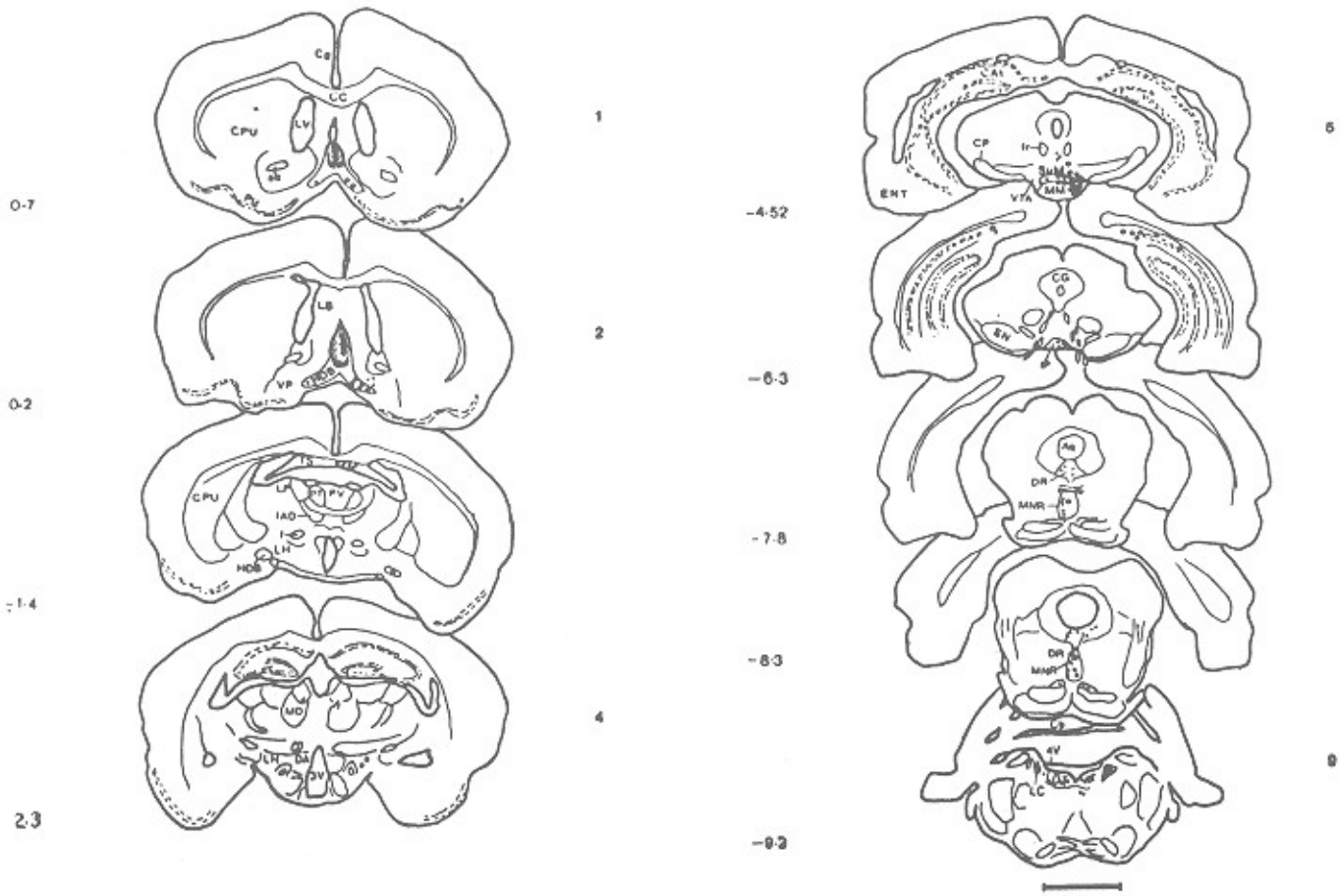
II-دیانسفال: در میان هسته‌های فراوانی که در این قسمت از مغز وجود دارد تنها در معدودی از هسته‌های هیپوتالاموس سلولها نشاندار شده‌بودند. هسته‌های ساب مامیلوتالامیک Submammilothalamic Nucleus (SMT)، سوپرامامیلاری Supramammilary Nucleus (SuM) و پستانی جانبی (LM) Lateral Mammilary area از جمله این هسته‌ها بودند که با حدود ۳۸ درصد از کل سلولهای نشاندار تشکیل منطقه‌ای را می‌دهند که بیشترین آوران را به سپتوم میانی می‌فرستد (نمودار MC در شکل ۳). در این منطقه بیشترین نورون نشاندار شده در ناحیه سوپرامامیلاری بویژه در بخش میانی آن قرار داشتند. در این قسمت نورونها در بخش پشتی و جانبی نسبت به پدانکل پستانی قرار می‌گرفتند. این نورونها عموما گلابی شکل و دوکی شکل بودند و دو تا سه نوریت نشاندار شده در آنها بخوبی تشخیص داده‌می‌شد. شدت رنگ در این سلولها بالا بوده و کنتراست قابل توجهی با بافت زمینه داشتند(شکل ۲ تصویر B و C).

در کنار این هسته‌ها، ناحیه پره‌اپتیک جانبی (LPO) Latreal Preoptic Area، ناحیه هیپوتالاموس جانبی و توبرسینوروم و هیپوتالاموس خلفی نیز نورونهای با گرانولهای HRP را دارا بودند. در هیپوتالاموس جانبی (LH) Lateral Hypothalamic area سلولهای دوکی شکل نشاندار شده در نواحی شکمی مستقر بوده و کم‌رنگ بودند.

III-ساقه مغز: در ساقه مغز، ناحیه نگمنتال شکمی (VTA) Ventral Tegmental Area ۳ درصد، هسته‌های رافه ۷ درصد، هسته‌های نگمنتال ۲/۵ درصد ولوکوس سرلئوس ۷ درصد از سلولهای نشاندار شده را دارا بودند. همچنین تعداد کمی سلول نشاندار شده در هسته اینترپدانکولار Interpeduncular nucleus (IP) و نواحی خاکستری اطراف قنات سیلویوس Central Grey (CG) مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. تصاویر ترسیمی(۹-۱) از برشهای کورونال مغز که توزیع توپوگرافیک نورونهای نشاندار شده را در نواحی مختلف تلانسفال، دیانسفال و ساقه مغز متعاقب تزریق HRP به سپتوم میانی نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲ محل تزریق را نشان می‌دهند. ناحیه تیره کانون تزریق را نشان می‌دهد. ناحیه هاشورزده اطراف منطقه تیره نمایانگر گسترش ردیاب می‌باشد. دایره‌های توپر نشان‌دهنده شمار نورونهای نشاندار می‌باشند.

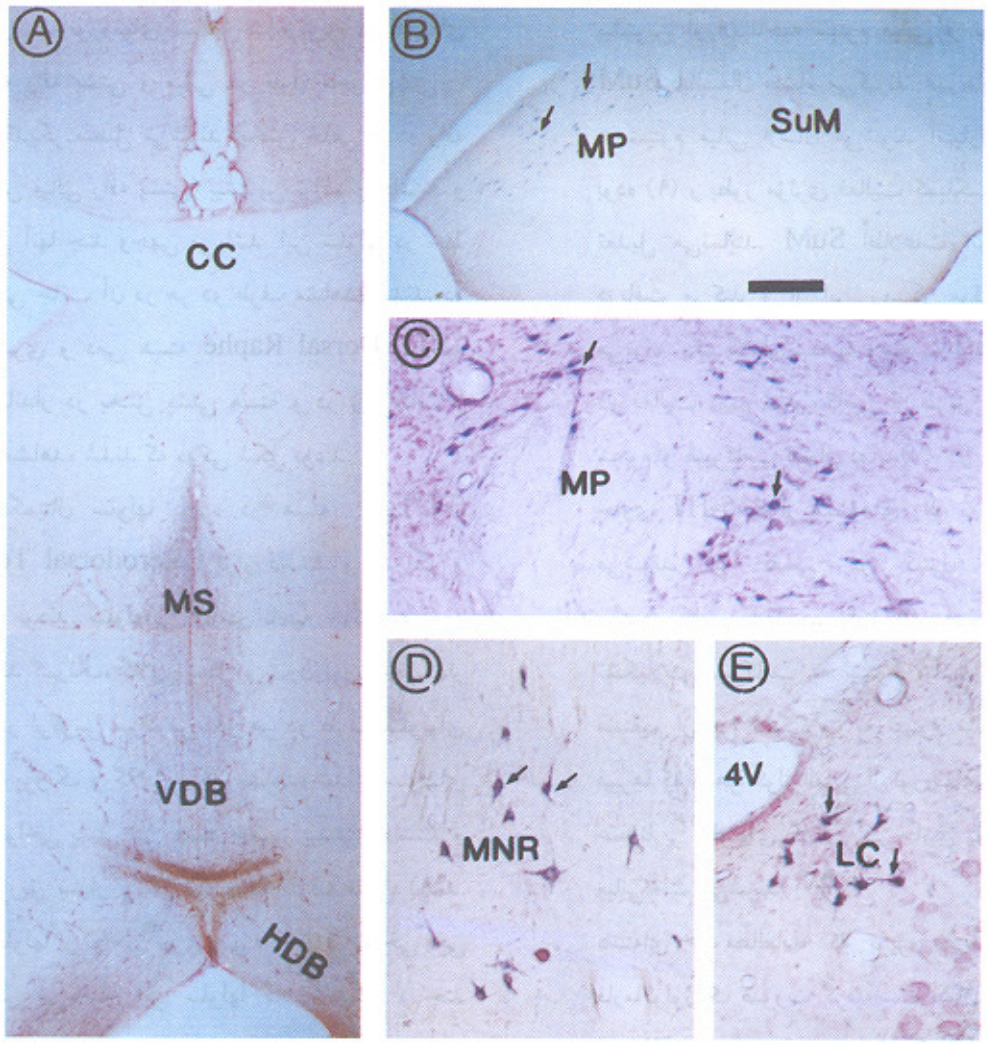
نشان‌دهنده ۱۰ نورون

نشان‌دهنده ۱ نورون

خط مقیاس ۲/۵ میلی‌متر

www.SID.ir

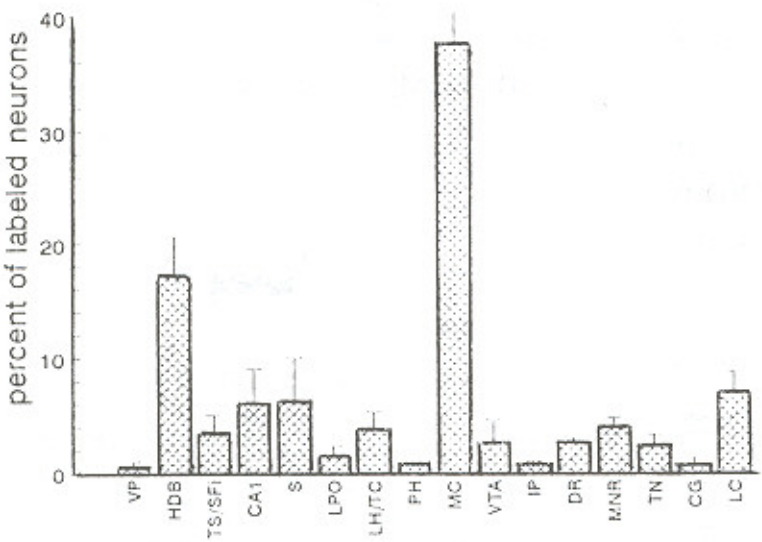
Archive of SID



شکل ۲. تصویر A محل تزریق را نشان می‌دهد. تصویر B و C نورونهای نشاندار شده(پیکانها) در هسته SuM با درشتنمایی کم (B) و درشتنمایی زیاد (C) نشان می‌دهند. تصویر D نورونهای نشاندار شده را در هسته میانی رافه نشان می‌دهد و تصویر E نورونهای نشاندار شده در لوکوس سرلئوس را نشان می‌دهد.

خط مقیاس در A و B=۲۵۵ میکرون

در C و D و E=۶۲/۷ میکرون



شکل ۳. هیستوگرام، توزیع نورونهای نشاندار شده در هسته‌ها و نواحی مختلف تلانسفال، دیاسفال و ساقه مغز را متعاقب تزریق HRP به سپتوم میانی نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

در هسته‌های رافه نورونهای نشاندار شده بویژه در ناحیه‌ای که دو هسته رافه پشتی و میانی در طول محور پشتی- شکمی به یکدیگر متصل می‌شوند (بخش خلفی هسته رافه میانی و بخش میانی رافه پشتی) بیشترین تراکم را داشتند و جسم سلولی آنها چند وجهی می‌باشد. این سلولها در خط وسط و اندکی جانب آن در هر دو طرف مشاهده شدند. در بخش‌های سری و دمی هسته Dorsal Raphe (DR)، سلولهای نشاندار در بخش پشتی هسته و در زیر قنات و بطن چهارم مشاهده شدند که دوکی شکل بودند.

در ناحیه تگمنتال سلولها بویژه در هسته (LDTg) Laterodorsal Tegmenal قرار داشتند و کم‌رنگ و بیضی شکل بودند. سلولهایی که در ناحیه خاکستری مغز مشاهده شدند کم‌رنگ، گلابی شکل و بدون نوریت نشاندار شده‌بودند. در لوکوس سرلئوس، در هر دو طرف سلولهای نشاندار شده پررنگ و گلابی شکل مشاهده شدند. سلولهای نشاندار در نواحی پشتی این هسته حضور بیشتری داشتند و در طرف تزریق بسیار بیشتر نسبت به طرف مقابل بودند. تعداد این سلولها از نواحی سری هسته به طرف نواحی دمی هسته افزایش می‌یافت. این سلولها گلابی شکل و چند وجهی بودند. در بسیاری از آنها نوریت‌های نشاندار شده قابل تشخیص بود و نهایتا پررنگترین سلولهای نشاندار مشاهده شده در هر موش بودند(شکل ۲ تصویر E).

تنها ٦/٦ درصد از نورونهای نشاندار شده در طرف مقابل تزریق مشاهده شد. از این میان، هسته‌های رافه ٦٢ درصد، هسته‌های تگمنتال ۱۳ درصد، لوکوس سرلئوس ۵/۵ درصد این نورونها را شامل شده و تعداد اندکی در HDB, SuM, VTA قرار داشتند.

بحث

در حال حاضر اطلاعات ما درباره عملکرد ناحیه سپتوم میانی بیشتر در ارتباط با نقشی که این ناحیه در تنظیم مکانیسم‌های هیپوکامپی حافظه کاری و فضایی دارا است می‌باشد. بیشتر ورودیها به ناحیه سپتوم میانی از نواحی مختلف مغز نقش تنظیم و تعدیل این عمل ناحیه سپتوم میانی را به عهده دارند. مطالعه ما نشان داده است که بیشترین آوران ناحیه سپتوم میانی از نواحی پستانی بویژه SuM دیانسفال منشاء می‌گیرند. فیبرهایی که از این ناحیه به سپتوم میانی ارسال می‌شوند آسپارتات، گلوتامانرژیک بوده (۹) و بطور مؤثری فعالیت کمپلکس سپتوهیپوکامپ را تعدیل می‌نمایند. SuM اطلاعات اتونومیک وسیعی را دریافت می‌کند و از این رو در موقعیتی قرار دارد که می‌تواند یک کنترل بسته به وضعیت (state-dependent) در فعالیت ریتم تتاهیپوکامپی از طریق پروژکت مستقیم به سپتوم و هیپوکامپ اعمال نماید(۷). در همین راستا فیبرهای حاوی 5-HT که از هسته‌های رافه به سپتوم میانی ارسال می‌شوند نیز نقشی در کنترل فعالیت الکتریکی سپتوهیپوکامپ ایفا می‌نمایند(۵). همچنین پروژکت‌ها از تشکیلات هیپوکامپ به سپتوم میانی تشکیل یک فیدبک مستقیم از این تشکیلات به سپتوم میانی را می‌دهند. این فیبرها که ظاهرا کولترالهایی از نورونهای غیر هرمی می‌باشند عمدتا بر سلولهای گاباارژیک حاوی پاروالبومین در سپتوم میانی ختم می‌شوند(۱۰).

دسته‌ای از مطالعات که بویژه با استفاده از روشهای فارماکولوژیک صورت گرفته‌است نشان داده‌اند که برخی از ارتباطات ناحیه سپتوم میانی با دیگر نواحی مغز در ارتباط با اعمال به غیر از حافظه و یادگیری می‌باشند. در این مطالعات عنوان شده است که ارتباط بین SFO و سپتوم میانی و همچنین پروژکت‌ها از LH-TC به سپتوم میانی در ارتباط با تنظیم پاسخ‌های فشاری عروق، دفع سدیم و پتاسیم و القاء تشنگی می‌باشد(۱۱، ۱۲، ۱۳).

در این مطالعه یک ارتباط وسیع درون ناحیه‌ای از بازوی افقی باند دیاگونال به بخش‌های پشتی‌تر سپتوم میانی (MS/VDB) و همچنین از بخش‌های دیگر سپتوم (TS/Sfi) به سپتوم میانی نشان داده شده که شایان توجه می‌باشد.

در مجموع اگرچه بیشتر ارتباطات شرح داده شده در این تحقیق توسط دیگر محققین بصورت پراکنده گزارش شده‌اند ولی بررسی‌های کمی به عمل آمده و ارائه سهم نسبی هر کدام از نواحی مغز در پروژکت به سپتوم میانی در این مطالعه، تصویر دقیق‌تر و کاملتری از ارتباطات آورانی این بخش از ناحیه سپتال ارائه می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Mizumori S J Y, Ward K E, Lavoie A M. Medial septal modulation of entorhinal single unit activity in anesthetized and freely moving rats. Brain Res 1992; 570: 188-197.

2. Gorman L K, Pang K., Frick K M, Givens B, Olten DS. Acetylcholine release in the hippocampus: effects of cholinergic and GABA ergic compounds in the medial septal area. Neurosci Lett 1994; 166(2): 109-202.

3. Paxinos G. The rat nervous system. Academic press, Second Edition 1994:7-20.

4. Ganong W F. Review of medical psysiology, 19 th Ed, Appleton and Lange, 1999: 263-71.

5. Kohler C, Chan-Palay V, Steinbusch H. The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. J Comp Neurol 1982; 209:91-111.

6. Vertes R P, Crane A M, Colom L V, Bland B H. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. J Comp Neurol 1995; 359(1): 90-116.

7. Borhegye Z, Freund T F. Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. Brain Res Bul 1998; 46(5): 453-459.

8. Gaykema R P A, Vander Kuil J, Hersh L B, Luiten P G M. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-duagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin combined with immunohestochemistry of choline acetyltransferase. Neurosci 1991; 43(2/3): 349-360.

9. Leranth C, Kiss J. A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. J Neurosci 1996; 16(23): 7699-710.

10. Toth K, Borhegyi Z. Freund T F. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. J. Neurosci 1993; 13(9): 3712-3724.

11. Callera J C, Saad W A, Camargo L A, Renzi A, De-luca-junior LA, Menani J V. Role of adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by the cholinergic activation of the medial septal area in rats. Neurosci Lett 1994; 167(1-2): 153-5.

12. Colomari D S, Haibara A S, Camargo L A, Saad WA, Renzi A, DE-luca junior L A, Minani J V. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin 2 and cholinergic activation into the subfornical organ in rats., Brain Res Bul 1994; 33(3): 249-54.

13. Haibara A S, Camargo L A, Saad W A, Renzi A, De-luca-Junior L A, Menani J V. Lesions of the lateral hypothalamus impair the pressor response to clonidine injected into the medial septal area of conscious rats. Braz J Med Biol Res 1992; 25(8): 857-60.

www.SID.ir