بررسی مورفولوژیک هسته سوپراکیاسماتیک هیپوتالاموس مغز در موشهای صحرایی نر: مطالعه به روش گلژی و ایمونوهیستوشیمی

دکترمحمدحسین نویان اشرف [۱] -دکتر ژیلا بهزادی [۲] -دکتر احمدعلی‌قنبری [۳] - روح‌اله گازر [۴] -ملک مسعود انصار [۵]

خلاصه :

یک جفت هسته سوپراکیاسماتیک در هیپوتالاموس قدامی مغز بوجودآورنده ریتم های زیست شناختی هستند.این ریتم ها بصورت چرخه ای طی حیات شبانه روزی پستانداران رخ میدهند.یکی از راههای شناخت چگونگی ایجاد و تداوم این ریتمها بررسی میکروآناتومی این هسته ها و ارتباط آنها با سایرنقاط مغز می باشد. در این پژوهش ،مورفولوژی نورونهای هسته های سوپراکیاسماتیک به روش گلژی و نیز مورفولوژی و انتشار نورونها و رشته ها ی عصبی حامل آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز بعنوان شاخصی برای سیستم کاتکول آمینرژیک به روش ایمونوهیستوشیمی در درون و اطراف این هسته ها در مغز ۳۰ موش صحرایی نر مورد بررسی بافت شناسی قرارگرفته است.

نتایج این بررسی نشانگر وجود حداقل ۵ نوع نورون مختلف در این هسته و نیز وجود سلولها و فیبرهای حاوی تیروزین هیدروکسیلاز در درون و اطراف آن در موشهای صحرایی بالغ است .

اهمیت شکلهای مختلف نورونی و وجود سلولها و رشته های کاتکولامینرژیک در هسته سوپراکیاسماتیک از نظر تاثیر آنها در عملکرد این ساعت مغز مورد بررسی قرارگرفته است .

کلید واژه ها:تیروزین هیدروکسیلاز/ساعت بیولوژیکی /هسته سوپراکیاسماتیک

مقدمه :

هسته سوپراکیاسماتیک (Suprachiasmatic Nucleus,SCN) ،جایگاه ایجاد ریتم های حیاتی،در هیپوتالاموس قدامی تحتانی بالای کیاسمای اپتیک و در دو طرف بطن سوم مغزی قرارگرفته است(۲).

این هسته مسئول بروز ریتمیک انواع مختلفی از پدیده های فیزیولوژیک و رفتاریست که منطبق با چرخه شبانه روزی صورت می گیرند.نقش این هسته و آناتومی داخلی آن در بوجودآوردن طیف وسیعی از اعمال فیزیولوژیک در بررسی های متعددی مورد پژوهش قرارگرفته است (۹-۶و۲).درک هرچه بهتر سازماندهی داخلی این هسته و ارتباطات بین

۱ -استادیار گروه کالبدشناسی - دانشکده پزشکی -دانشگاه علوم پزشکی گیلان

۲-دانشیار گروه فیزیولوژی -دانشکده پزشکی -دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۳-استادیار گروه کالبدشناسی -دانشکده پزشکی -دانشگاه علوم پزشکی گیلان

۴و۵ -مربی گروه کالبدشناسی - دانشکده پزشکی -دانشگاه علوم پزشکی گیلان

سلولهای آن ازاهمیت فراوانی برخورداراست (۹).
هسته سوپراکیاسماتیک نسبت به بقیه مناطق موجود در مغز دارای نورونهای کوچکتری است .به نظر میرسد که نورونهادر این هسته بنحوی به زیر گروهها ی اختصاصی تقسیم شده و هر گروه ترکیبات شیمیایی خاصی را جهت عمل خود بکار می گیرند(۶).متجاوز از ۲۵نوع مواد فعال کننده عصبی (Neuroactive) در این هسته شناسایی شده اند(۸)،در حالیکه نقش آنها در فیزیولوژی این هسته به درستی شناخته نشده است .
Van Den Pol در سال ۱۹۸۰شکل های سیتولوژیک مختلفی از سلولهای این هسته را معرفی نمود(۷).مطالعات فوق نشانگر ارتباط مهم بین مورفولوژی و عمل در این هسته به منظور ایجاد و تداوم ریتم های حیاتی است .
با توجه به اهمیت شناخت ساختارهای نورونی سازنده ریتم های مذکور و تاثیر واسطه های شیمیایی و فراورده های نورونی (از قبیل کاتکولامین ها)برعملکرد ساعت بیولوژیک،در این پژوهش به بررسی مورفولوژی سلولهای هسته سوپراکیاسماتیک(بارنگ آمیزی گلژی)و همچنین نحوه‌قرارگرفتن سلولهاو رشته های عصبی حامل آنزیم تیروزین‌هیدروکسیلاز(TH) دردرون هسته وناحیه‌اطراف آن (Peri-SCN region)درموشهای‌صحرایی‌نر، پرداخته‌ایم.

مواد و روشها:

در این تحقیق از ۳۰ موش صحرایی نر جوان بالغ (۱۸۰تا۲۲۰گرم)استفاده شد. موش ها از حصارک رازی کرج تهیه شدند.حیوانات در شرایط نور و تاریکی (۱۲:۱۲)و با تامین آب و غذا نگهداری گردیدند. پس از بیهوشی با تزریق داخل صفاقی دوز بالای پنتو باربیتال سدیم (50mg/kg) ،حیوانات به روش پرفوزیون از طریق آئورت صعودی بانرمال سالین‌پرفیوزشده و پس ازآن فیکساسیون با محلول های فیکساتیوی‌که‌ترکیب شیمیایی آنهابه تناسب نوع رنگ آمیزی متفاوت بوده است به شرح زیر صورت گرفت .

محلول فیکساسیون و رنگ آمیزی گلژی :
در اجرای این عمل از دونوع محلول فیکساتیو الف :(شامل پارافرمالدئید،گلوتارآلدئید در بافر ۰/۲M)و ب:(متشکل از بی کرومات پتاسیم ،کلرال هیدرات و فرمالین در آب مقطر)استفاده شد.پس از تزریق محلول فیکساتیو ،مغز حیوانات بلافاصله از جمجمه خارج و در محلول پس فیکس (Post fixative) بمدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید،برش های مغز بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول بی کرومات پتاسیم رنگ آمیز ی و سپس به محلول نیترات نقره برای ۴۸ تا ۷۲ ساعت منتقل شدند. متعاقب آبگیری و قالب گیری در پارافین به کمک میکروتوم Leitz مقاطعی کرونال به ضخامت ۷۵تا ۸۰میکرومتر از محدوده هیپوتالاموس قدامی تهیه و جهت مطالعه میکروسکوپی ،عکسبرداری و رسم توسط کامرا لوسیدا استفاده شدند.

محلول فیکساسیون و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز:
فیکساسیون با محلولی متشکل از پارافرمالدئید ۴ درصد،گلوتارآلدئید ۰/۵.درصد و اسید پیکریک ۰/۲ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۴ انجام گرفت ،آنگاه مغز حیوان از جمجمه خارج گردیده و بمدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محلول پس فیکس نگهداری شد.سپس توسط ویبراتوم مقاطعی کورونال به ضخامت ۳۵میکرومتر از ناحیه محاذی هیپوتالامو س قدامی مغز موشها تهیه گردید.

واکنش ایمونوهیستوشیمی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز:
بطور خلاصه در محلول آنتی بادی اول (Chemicon)که به نسبت ۱:۱۰۰۰ در فسفات بافرسالین رقیق شده بود و متعاقبا"در محلول آنتی بادی دوم از نوع Biotinilated goat anti-rabbit IgG(Vector)که به نسبت ۱:۵۰ رقیق شده بود،انجام شد.پس از شستشو در

فسفات بافر سالین(PBS) مقاطع در کیت ABC(Vectastain) بمدت ۴۵ دقیقه‌قرار گرفته و آنگاه سلولهای نشاندار شده در محلولی از DAB+H2O2 در بافر فسفات آشکار شدند.در نهایت بعد از شستشو ،این مقاطع روی لامهای آغشته شده به ژلاتین و کروم آلوم منتقل سپس آبگیری و لامل گذاری شده و مورد مطالعه میکروسکوپی ،عکسبرداری و رسم توسط کامرالوسیدا قرار گرفتند.

نتایج :

در رنگ آمیزی گلژی ،مورفولوژی نورونها و زوائد آنها در هسته سوپراکیاسماتیک که متعاقب رسوب املاح نقره در آنها آشکار شده بودند توسط میکروسکوپ نوری بررسی و باکامرالوسیدا ترسیم گردید(شکل ۱).در نتیجه نورونهایی با مورفولوژیهای مختلف به شرح زیر شناسایی شدند:

۱- بعضی از نورونها دوکی شکل (دوقطبی)بوده و دارای دو دندریت اولیه هستند که از دو انتهای مخالف پریکاریون خارج می گردند(شکل A,C -۱) .ممکن است دندریت این سلولها غیر منشعب و یا دارای انشعابات اندکی باشند.خار دندریتی معمولاً وجود ندارد و یا بسیار اندک است .

۲- در نوع دوم از نورونهای مشاهده شده ،خارها روی دندریت ها و گاهی روی اجسام سلولی دیده می شوند (شکل B -1) .دندریت این نورونها برخلاف نوع ذکر شده در بالا پس از خروج از پریکاریون مسیر خود را تغییر داده و در جهات مختلف گسترش می یابند.

۳- نورونهایی با اجسام مدور که دندریتهایشان دارای خارهایی با اندازه های مختلف است (شکل D-۱).

۴- نوع چهارم از نورونها،دارای تنها یک دندریت اولیه هستند.تنه دندریت اولیه ضخیم بوده و در مسیرش به چندین دندریت ثانویه تقسیم می شود(F-1)

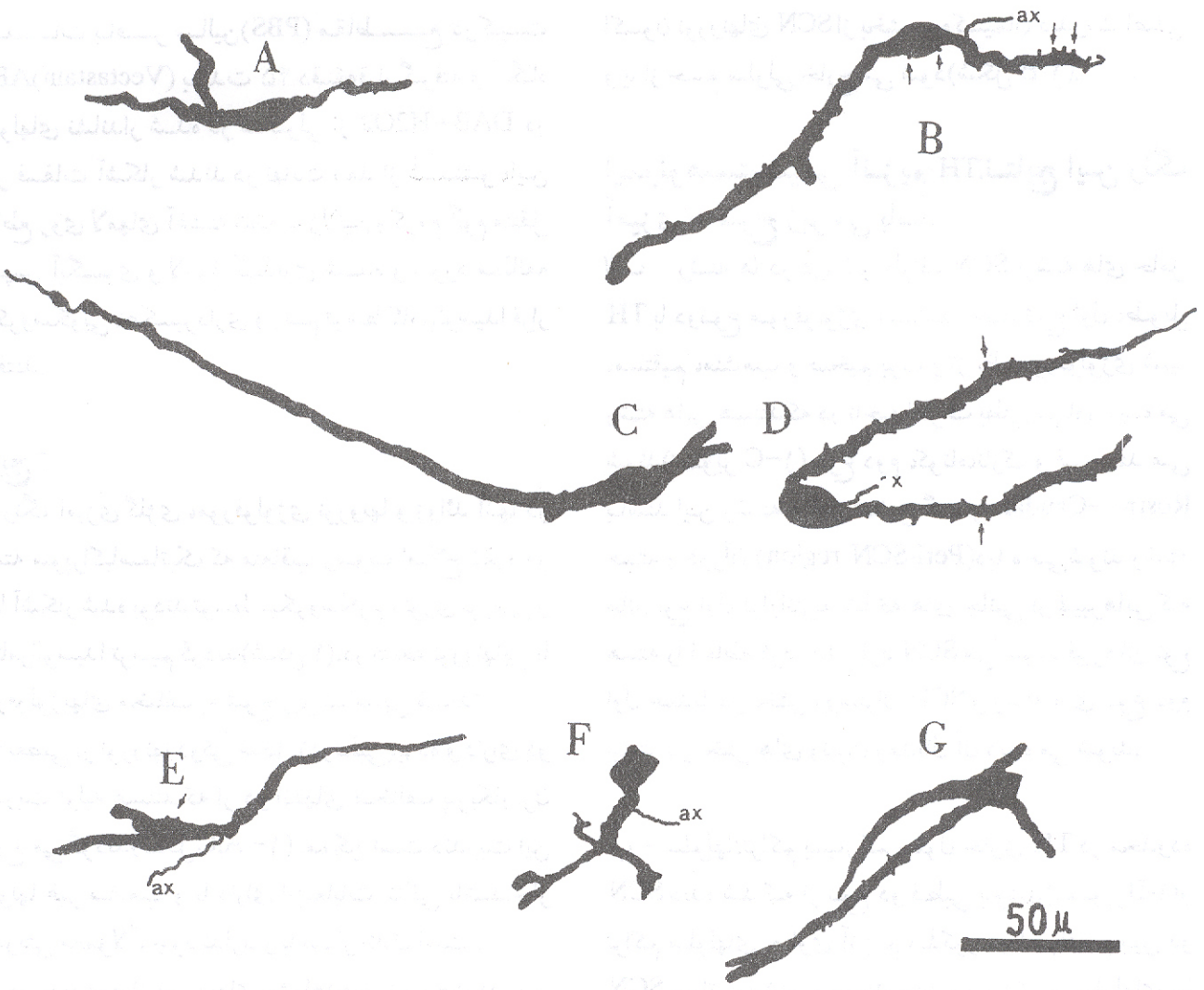
۵- نورونهای چند قطبی که دندریتهای اولیه بطور شعاعی از آنها خارج می شوند(شکل G-۱). دندریت این نورونها دارای خار می باشد.

اکسون نورونهای SCN از بخش پروکسیمال دندریت اصلی و یا از جسم سلولی خارج می شود(شکل E-۱).

ایمونوهیستوشیمی آنزیم TH:نتایج این رنگ آمیزی به شرح زیر می باشد:

الف - رشته ها: در درون و اطراف SCN ،رشته های حامل TH با دونوع مورفولوژی مشاهده شد.نوع اول ،طویل ،مستقیم ،منشعب و ضخیم بوده و از نظر مورفولوژی شبیه رشته هایی هستند که در ناحیه اطراف بطنی مجاور دیده می شوند(تصویر C-۱) .نوع دوم ،کوتاه،نازک و فنر مانند می باشند.این رشته هادر تمامی گستره Rostro -Caudal هسته و دورآن (Peri-SCN region)دیده می‌شوند رشته های نوع اول فراوانترند.شاخه های جانبی از فیبرهایی که هسته را احاطه کرده اند وارد SCN می شوند.فیبرهای نوع اول عمدتاً در بخش روسترال SCN و رشته های نوع دوم بیشتر در بخش های ونترال ومدیال آن دیده می شوند.

ب - سلولها: تراکم بسیار کم سلول حاوی TH در محدوده SCN دیده شد که از نوع دو قطبی بودند(تصویر B-۱)و تراکم سلولهای حاوی آنزیم مذکور در اطراف و بین دو SCN بمراتب بیشتر میباشند.بیشترین تراکم از سلولهای با واکنش قوی بین دو هسته واقعند.در هر دو گروه در درون SCN با واکنش یکنواختی روبرو شدیم .از نظر مورفولوژی، نورون های دور هسته از نوع دو قطبی و کوچک بوده و دندریتهای بعضی از آنها موازی و یا عمود بر بطن سوم مغزی می باشد.دندریت بعضی از این نورونها بدرون هسته امتداد می یابند.



شکل ۱- رنگ آمیزی گلژی هسته سوپراکیاسماتیک هیپوتالاموس قدامی مغز موش صحرایی

A= نورون دوقطبی ساده .دندریت از دو انتهای جسم سلولی خارج شده و خار دندریتی موجود نیست و یا بسیار کم است (نورون شماره ۱)

B=نورون دوقطبی نوع دوم .خار بر روی اجسام سلولی و زواید دندریتی دیده می شود.اکسون این نورون از بخش پروکسیمال دندریت اولیه (پیکان)خارج شده است (نورون شماره ۲)

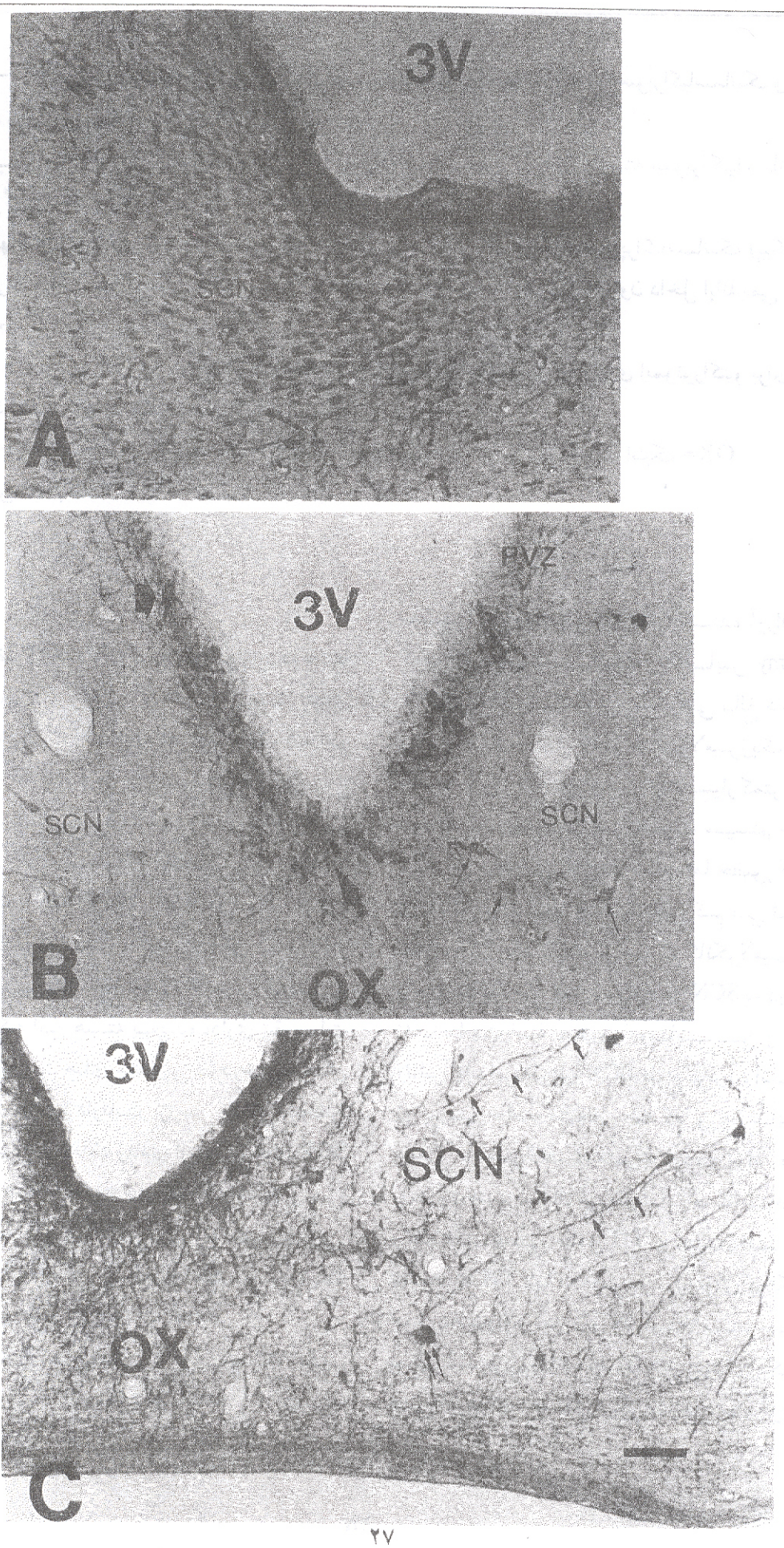
C=یک نورون دو قطبی که محورش عمود بر محور پشتی -شکمی بطن سوم است .

D=نورون خاردار. جسم سلولی تقریبا"مدور بوده و دندریت آن دارای خارهایی بطول مختلف است (نورون شماره ۳)

E=نورون دوکی شکل که اکسون آن بطور مشخصی از قسمت پروکسیمال یکی از دندریت ها خارج می شود .

F=نورون نوع چهارم .این نورونها دارای فقط یک دندریت اصلی هستند.

G=نورون چند قطبی .دندریتها بطور شعاعی از پریکاریون منشعب می شوند.


3V
SCN
A
PVZ
3V
SCN
SCN
B
OX
3V
SCN
OX
C

تصویر ۱- واکنش ایمونوهیستوشیمیایی برای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در هسته سوپراکیاسماتیک و ناحیه مجاور آن در موش صحرایی

A=ترکیب واکنش ایمونوهیستوشیمی برای TH با رنگ آمیزی نیسل .موقعیت هسته سوپرا کیاسماتیک و نحوه قرارگیری رشته های حامل TH (پیکان) در اطراف آن مشخص شده است .

B=نورونهای ایمونوراکتیو برای TH در ناحیه دور بطنی ،درون و اطراف هسته سوپراکیاسماتیک (پیکانهای نازک)و در ناحیه بین دو SCN (پیکان ضخیم)نشان داده شده‌اند.پیکان پهن یک نورون داخل اپاندیمی حامل THدر ناحیه دور بطنی رانشان می دهد.

C=رشته های حامل TH در درون SCN (پیکانها)دیده می شوند.همچنین نورونهای ایمونوراکتیو برای TH در درون کیاسمای اپتیک مشاهده می گردند.(پیکان دوبل).

بطن سوم=3V،هسته سوپراکیاسماتیک= SCN و ناحیه دور بطنی =PVZ،کیاسمای اپتیک =OX

خط مقیاس :62.5 μm

بحث :

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نورونهای موجود در هسته سوپرا کیاسماتیک با مورفولوژی متفاوت در بخش های مختلف این هسته پراکنده اند.تنوع ظاهری مشاهده شده در رنگ آمیزی گلژی این هسته می تواند بسادگی حاصل تنوع زیست شناختی در شکل سلولها باشد، و یا اینکه هریک از این نورونها دارای عمل فیزیولوژی اختصاصی و متمایز از دیگری باشند.VAN DEN POL در سال ۱۹۸۰ پنج‌شکل مورفولوژیک مختلف نورون های موجود در SCN را معرفی نمود(۷). مطالعه SCN در رنگ آمیزی گلژی نشان داد که این هسته پیچیده ،داری تقسیمات مختلفی است که نورون های متفاوتی با درختچه های دندریتی ساده در آن وجود دارند.در بررسی حاضر مشخص شد که درختچه دندریتی تعداد زیادی از نورون های SCN محدود به درون هسته بوده و با یکدیگر سیناپس می دهند.این مسئله امکان وجود مدارهای موضعی نورونی (Local microcircuits) که فیزیولوژی ساعت بیولوژیک مغز را بوجود می آورندخاطر نشان می سازد.

نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی جهت آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (TH) نشان داد که هسته سوپراکیاسماتیک دریافت کننده آوران های کاته کولامینی‌است.براساس آزمایش Jacomy و SCN Bosler(1995) در موش صحرایی بالغ دارای سلولها و رشته ها ی حامل TH (کاتکولامینرژیک)است که در مقایسه با روزهای اول پس از تولد بسیار کمتر است (۳).این نتیجه می تواند نشانگر اهمیت سیستم حامل TH در درتکامل ساعت بیولوژیک باشد، اما حضور کاتکولامین ها در SCN بالغ هر چند بمقدار کم می تواند نشانگر تاثیرپذیری ساعت مغز از سیستم کاتکولامینی باشد.منشاء و نوع کاتکولامین های موجود در SCN به درستی شناخته نشده است اما حضور دوپامین و نوراپی‌نفرین وتاثیرآنهابرفیزیولوژی SCNمطرح گردیده است (۲و۱).

در بررسی حاضر مشخص شد که نورون های حامل TH عمدتا" در محیط هسته متمرکز بوده و زوائد دندریتی خود را بدرون هسته ارسال می دارند.این مسئله در مورد بعضی از رشته های عصبی حامل TH نیز صادق است .باید توجه داشت که TH تنها منحصر به نورونهای کاتکولامینرژیک نمی‌باشد(۵)،و در نورون های سایر سیستم های نوروترنسمیتری (مانند نورون های پپتیدرژیک)نیز یافت می شود(۱).از سوی دیگر مشاهده یک آنزیم در نورون،

صرفا"نشان دهنده رها شدن فراورده آن بصورت یک نوروترانسمیتر نمی باشد(۴).به هر صورت با توجه به تماس بین سلولهای فوق و نورون های SCN ،ممکن است آنها بنحوی فعالیت نورونی در SCN را تنظیم و یا تعدیل نمایند. اگرچه این پرسش که ویژگی نوروشیمیایی نورونها ورشته های حاوی TH چیست تاکنون بی پاسخ مانده است ،اما با توجه به فعالیت دائمی و یا موقتی TH در دستگاه عصبی مرکزی(۱۰)ودرسیستم های غیرکاته کولامینی بنظرمی رسد این آنزیم دارای اعمال متنوعی غیرازعمل کلاسیک شناخته شده برای آن باشدکه درمورد SCN موضوعی درخورتوجه است.

منابع :

1)Beltramo M,Calas A,ChernigoVskaya E,etal.Postnatal Development of the Suprachiasmatic Nucleus in the Rat ,Morphofunctional Charachteristics and time Course of tyrosine Hydroxylase Immunopositive Fibers.Neurosci 1994:63(2):603-610.

2)Inouye SIT,Shibata.Neurochemical organization of Circadian Rhythm in the suprachiasmatic Nacleus.Neurosci Res 1994:20(2):109-30.

3)Jacomy H ,Bosler O.Catecholaminergic Innervation of the Suprachiasmatic Nucleus in the Adult Rat:Ultrastructural Relationships with Neurons Contalining Vasoactive intestinal Peptide or Vasopressin.Cell Tiss Res 1995:280:87-96.

4)Leshin LS,Kraeling RR,Kineman RD,etal.Immunohistochemical Distribution of Catecholamine Synthetizing Neurons in the Hypothalamus and Pituitary Gland of Pigs: tyrosine Hydroxylase and Dopamine-beta-Hydroxylase.J Comp Neurol 1996:364:151-168.

5)Okamura H,Kitahama K,Mons N,etal.L-dopa-Immunoreactive Neurons in the Rat hypothalamic Tuberal Region.Neurosci Lett 1988:95:42-46.

6)Reuss S.Components and Connections of the Circadian Timing System.Cell Tiss Res 1996:285:353-378.

7)Van Den Pol A.The Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus of Rat:Intrinsic anatomy. J Comp neurol 1980:191:661-702.

8)Van Den Pol A,Tsujimoto K L.Neurotransmitters of the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus:Immunocytochemical analysis of 25 Neuronal Antigens.Neurosci 1985:15:1049-1086.

9)Van Den Pol A.The Suprachias Matic Nucleus:Morphological and Cytochemical Substrates for Cellular interaction .In :Klein DC,etal.Suprachiasmatic Nucleus:the Minds Clock.New york:oxford univ press,1991.

10)Young III W S,Warden M,Mezey E.TyroSien hydroxylase mRNA is Increased by Hyperosmotic Stimuli in the Paraventricular and Supraoptic Nuclei.Neuroendocrinol 1987:46:439-444.

The Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus of Rat:A Golgi and Tyrosine Hydroxylase Immunohistochemical Study

Noyan Ashraf M.H,PhD,
Behzadi G,PhD,
Glanbari A.A., PhD,
Gazour R.,
Ansar M.M.

ABSTRACT:

The hypothalamic suprachiasmatic nuclei(SCN),located in the anterior basal forebrain are responsible for important biological rhythms in physiology and behaviour in mammals. Mechanisms underlying these rhythm production is one of the most exciting fields in biology and medicine.One possible way to achieve this goal,is to find out more details about the microanatomy of the nuclei and their connections with other regions in the central nervous system.

In this study ,morphology of the neurons located in the SCN were determined using a Golgi impregnation method.An immunohistochemical technique for catecholamine synthesis rate limiting enzyme,i.e.tyrosine hydroxylase(TH),was also used to study the morohology and distribution of TH positive neurons and fibers in the SCN and the periSCN region of the brain of young male albino rats.

Our results according to golgi staining showed that there are at least 5 morphologically discussed neurons in the SCN .Immunoreactive TH-positive neurons and fibers were also detected in and around the nuclei.

Possible importance of different neuronal subtypes for function of the SCN were disscused and it was also emphasized that the adult SCN is under the influence of the catecholaminergic system that could affect its pacemaker function.

keyWords:Biological clocks\Suprachiasmatic Nucleus\Tyrosine Hydroxylase