مقاله تحقیقی

وجود نورونهای سیناپتوفیزین مثبت در کپسولهای خارجی و منتهایی مغز انسان

حسین حقیر .M.D., Ph.D*، یوسف صادقی .M.D., Ph.D**، احمد حسینی .Ph.D**، پرویز مهرآئین .M.D***

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد

** گروه علوم تشریح دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی

*** گروه نوروپاتولوژی دانشگاه مونیخ آلمان

تاریخ وصول: آذر ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۸۲

چکیده

هدف: کپسولهای خارجی و منتهایی مغز، بخشی از ماده سفید نیمکره‌ها هستند و طبق معلومات کلاسیک باید فاقد جسم سلولی نورونها باشند. این تحقیق به منظور جستجوی نورونها در این ناحیه از مغز انسان و تعیین عملکردی بودن یا سرگردان بودن این نورونها طراحی شده است.

مواد و روشها: ده مغز انسان بالغ و سالم به نسبت مساوی از هر دو جنس پس از تثبیت مناسب در فرمالین ۴ درصد طی مراحل آماده سازی به‌صورت سریال در جهت کورونال با ضخامت ۱۵μm برش زده شد. این مقاطع بافتی توسط روش Klüver-Barrera و روش ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس کپسولهای خارجی و منتهایی در مقاطع رنگ‌آمیزی شده برای جستجو و تأیید وجود یا عدم وجود نورونها در این بخش از ماده سفید با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته‌ها: در کپسول خارجی، نورونهایی با اندازه کوچک تا متوسط مشاهده شدند. این نورونها دارای اشکال کروی، بیضوی، دوکی، چند وجهی و هرمی بودند و به‌صورت پراکنده در لابه‌لای رشته‌های عصبی ظریف یا به‌صورت زنجیره وار به دنبال یکدیگر قرار داشتند. محور طولی نورونهای دوکی شکل موازی رشته‌های عصبی کپسول خارجی بود. زایده رأسی نورونهای هرمی که به سمت بالا حرکت می‌کرد با فاصله کوتاهی از جسم سلولی ناپدید می‌شد. محتوای نورونی کپسول خارجی ضمن نزدیک شدن به سمت خارج (به سمت کلاستروم) و پایین این کپسول افزایش می‌یافت. این نورونها به شدت سیناپتوفیزین مثبت بودند. نورونهای موجود در کپسول منتهایی بیشتر دوکی شکل بودند و محور طولی آنها به موازات رشته‌های عمودی این کپسول قرار داشت. این نورونها نیز در لابه لای رشته‌های عصبی پراکنده بوده یا به‌صورت زنجیره وار پشت سر یکدیگر قرار داشتند. نورونهای کپسول منتهایی به شدت سیناپتوفیزین مثبت بودند. هیچ گونه تجمع نورونی (مانند پل‌ها یا جزایر سلولی) در این دو کپسول مشاهده نشد. مرز بین کلاستروم با این دو کپسول و مرز بین کپسول منتهایی با قشر جزیره به وضوح و شفافیت مرز بین کپسول خارجی با پوتامن نبود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه وجود نورونهای سیناپتوفیزین مثبت را در کپسولهای خارجی و منتهایی (به عنوان بخشی از ماده سفید) مغز انسان برای اولین بار اثبات می‌کند. این نورونها ممکن است دارای ارتباطات و عملکردی مشابه نورونهای کلاستروم یا قشر جزیره باشند.

واژه‌های کلیدی: نورون، سیناپتوفیزین، کپسول خارجی، کپسول منتهایی، مغز انسان

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، گروه علوم‌تشریح
صندوق پستی ۳۸۷۵-۹۱۳۷۵ Email:drhaghir@yahoo.com

مقدمه

ماده سفید نیمکره‌های مغز شامل رشته‌های عصبی میلین دار و بدون میلین و سلولهای نوروگلی است [۱و۲]. طبق معلومات کلاسیک، ماده سفید حاوی جسم سلولی نورونی (نورونها) نیست [۲]. کپسولهای خارجی[1] و منتهایی[2] بخشی از ماده سفید مغز هستند که توسط کلاستروم از یکدیگر جدا می‌شوند [۳]. کپسول خارجی، ورقه نازکی از ماده سفید مغز است که بین پوتامن و کلاستروم قرار دارد و کپسول منتهایی، ورقه نازکی از ماده سفید مغز است که بین کلاستروم و قشر جزیره واقع شده است (۸-۴). بنابراین انتظار نمی‌رود در این دو کپسول، به عنوان بخشی از ماده سفید مغز، نورونی مشاهده شود. با این حال، Burakowska [۹] وجود نورونها را در کپسول منتهایی مغز سگ گزارش کرد. با وجود جستجوی فراوان، نویسندگان نتوانستند مقاله یا مقالات دیگری را در تأیید وجود نورونها در کپسول منتهایی سایر حیوانات یا انسان بیابند. به علاوه، هیچ مقاله‌ای وجود نورونها را در کپسول خارجی مغز حیوانات یا انسان گزارش نکرده است.

نویسندگان با توجه به علاقه‌ای که به تحقیق در ساختمان کپسولهای خارجی و منتهایی مغز انسان دارند (۸-۴)، بر آن شدند تا وجود یا عدم وجود نورونها را در این دو بخش از ماده سفید مغز انسان بررسی کنند.

مواد و روشها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی است. تعداد ۱۰ مغز انسان بالغ و سالم، بدون هیچ گونه پاتولوژی مغزی برای این تحقیق انتخاب شدند. تمامی مغزها از دپارتمان نوروپاتولوژی دانشگاه مونیخ (آلمان) تهیه شد. پنج مغز متعلق به زنانی بود که به هنگام فوت بین ۳۵ تا ۵۶ سال (متوسط ۴۳/۴ سال) سن داشتند. پنج مغز دیگر، از آن مردانی بود که در هنگام فوت بین ۳۲ تا ۶۰ سال (متوسط ۴۳ سال) سن داشتند.

این مغزها حداکثر ۱۲ ساعت پس از مرگ از درون جمجمه خارج شد. سپس درون ظرفی محتوی ۵-۴ لیتر فرمالین ۴ درصد به مدت دو هفته نگهداری شد. محلول فرمالین این ظرف پس از گذشت ۲۴ ساعت با محلول فرمالین ۴ درصد تازه جایگزین شد. به منظور حفظ شکل طبیعی مغز در هنگام تثبیت[3]، مغز توسط نخی که از زیر شریان بازیلار عبور داده می‌شد، درون ظرف فرمالین به‌صورت معلق قرار گرفت. پس از دو هفته که تثبیت نسبی مغز، حاصل شد، تمامی آنها در جهت کورونال و به‌کمک یک ماکروتوم با ضخامت ۲ سانتی متر برش زده شدند. از برشهای به دست آمده فقط برشهایی انتخاب شدند که حاوی کپسولهای خارجی و منتهایی بودند. این برش‌ها مجدداً برای یک هفته دیگر در محلول فرمالین ۴ درصد قرار گرفتند تا تثبیت کامل شود. سپس این برشها در الکل ۷۰ درجه به مدت یک هفته و در الکل ۹۶ درجه به مدت یک هفته دیگر قرار داده شدند. برشها بعداً مراحل آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی به پارافین را طی کردند و در نهایت درون بلوک‌های پارافینی، که حاوی هر دو نیمکره مغزی بود، قالب‌گیری شدند. این بلوک‌های پارافینی به‌صورت سریال با ضخامت ۱۵μm در جهت کورونال و به کمک یک میکروتوم Tetrander (ساخت کارخانه Jung, Heidelberg، آلمان) برش داده شدند. این نوع میکروتوم قادر به تهیه برشهای میکروسکوپی دو نیمکره‌ای مغز انسان است. از هر ۴۰ برش، دو برش متوالی بر روی لامهای میکروسکوپی بزرگ منتقل شد. جفت برش اول به‌صورت تصادفی از میان بیست جفت برش اول انتخاب گردید. از هر جفت برش منتقل شده روی لامهای میکروسکوپی بزرگ، برش اول با روش Klüver-Barrera و برش دوم با روش ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین رنگ‌آمیزی شدند. در روش رنگ‌آمیزی Klüver-Barrera [۱۰] جسم سلولی به رنگ بنفش و غلاف میلین به رنگ آبی درمی‌آید. این روش هر چند برای تعیین شکل جسم سلولی بسیار سودمند است، اما برای نورونها اختصاصی نیست. سیناپتوفیزین یک گلیکوپروتئین غشایی است که فقط در غشای وزیکول پیش سیناپسی یافت می‌شود. بنابراین روش ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین نه تنها برای نورونها اختصاصی است، بلکه نشان‌دهنده عملکردی بودن و ارتباطات سیناپسی نورون نیز هست [۱۱و۱۲].

1. External capsule
2. Extreme capsule
3. Fixation

نـورونهایی راکـه بـه آنـتی سـیناپتوفیزین واکـنش نشـان مـی‌دهند، نـورونهای سـیناپتوفیزین مـثبت مـی‌گویند. در ایـن تـحقیق، آنـتی بـادی مـونوکلونال مـوش (IgG_1) بـر عـلیه سیناپتوفیزین (Clone SY38) مـوجود در وزیکـولهای پـیش سـیناپسی اسـتفاده شـد. ایـن آنـتی سـیناپتوفیزین از شـرکت BIOTREND Chemikalien GmbH (آلمان) تهیه شد. این آنتی‌بادی با سیناپتوفیزین I وزیکولهای پیش سیناپسی نورونها در مغز و نخاع انسان، گاو، رت و موش واکنش نشان می‌دهد. برای برشهای بافتی آغشته به پارافین این آنتی‌بادی بـا غـلظت ۱$\mu g/ml$ به‌کار می‌رود. انکوباسیون در حرارت اتاق بـه مـدت بیش از یک ساعت توصیه می‌شود. استفاده از پروتئاز پیش از آنتی بادی[1] ضرورت ندارد.

یافته‌ها

کپسولهای خارجی و منتهایی در هر دو نیمکره توسط روش Klüver-Barrera به منظور یافتن و تـعیین شکـل نـورونها و توسط روش ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین به منظور تأیید قطعی وجود نورونها بررسی شدند. در کپسول خارجـی، نورونهایی بـا انـدازه کـوچک تـا مـتوسط تـوسط رنگ‌آمـیزی Klüver-Barrera مشاهده شـدند. ایـن نـورونها دارای اشکـال کروی، بیضوی، دوکی، چند وجهی و هرمی بودند (شکـلهای ۱و۲). گاهی این نورونها در لابه لای رشته‌های ظریف عصبی پراکنده بـودند و زمـانی زنـجیره وار پشت سـر یکـدیگر قـرار می‌گرفتند (شکل ۳). محور طولی نورونهای دوکـی شکـل بـه موازات رشته‌های عصبی کپسول خـارجـی قـرار داشت. زایـدهٔ رأسی نورونهای هرمی که به سمت بالا می‌رود، کمی پس از دور شدن از جسم سلولی ناپدید می‌شد (شکل ۲). محتوای نورونی کپسول خارجی با نزدیک شدن بـه سـمت خـارج (بـه سـمت کلاستروم) و پایین کپسول افزایش می‌یافت. ایـن نـورونها بـه شدت سیناپتوفیزین مثبت بودند (شکل ۳).

در کپسول منتهایی، نورونهایی با اندازه کوچک تا متوسط توسط رنگ‌آمیزی Klüver-Barrera مشاهده شدند (شکل ۴). هر چند نورونهایی با اشکال دوکی، بـیضوی، چـند وجـهی و هرمی در کپسول منتهایی وجود داشتند، ولی اکثر نورونهای این کپسول را نورونهای دوکی شکل تشکیل می‌دادنـد کـه مـحور طولی‌شان موازی رشته‌های عصبی عمودی کـپسول مـنتهایی بود. نورونهای کپسول منتهایی یا در لابه لای رشته‌های عصبی ظریف پراکنده بودند یـا زنـجیره وار پشت سـر یکـدیگر قـرار داشتند. نورونهای کپسول منتهایی به شدت سیناپتوفیزین مثبت بودند (شکل ۵).

هر چند هر دو کپسول حاوی نورونهای متعددی بودند ولی هیچ گونه تجمع نورونی (مانند پل‌ها یا جزایر سلولی) در این دو کپسول مشاهده نشد.

مرز بین کپسول منتهایی و قشر جزیره نسبت به مـرز بـین کپسول منتهایی و پـوتامن وضـوح کـمتری داشت (شکـلهای ۶،۷و۸). مرز واضح و دقیقی بین کلاستروم و هـیچ یک از دو کپسول خارجی و منتهایی وجود نداشت (شکل‌های ۷و۸).

بحث

این نتایج نشان داد که در تمام مغزهای مورد مطالعه، در هر دو نیمکره مـغزی و در هـر دو جـنس، نـورونهای کـوچک تـا متوسطی با شکلهای گوناگون در کپسولهای خارجی و منتهایی مغز انسان وجود دارد. این نورونها در کپسول خارجی در نزدیکی کلاستروم و در کپسول منتهایی در نزدیکی کـلاستروم و قشـر جزیره مـتعدد تـر بـوده و مـوجب عـدم وضـوح در مـرز بـین کلاستروم با این دو کپسول و نیز مرز بین قشر جزیره و کپسول منتهایی می‌شوند. به علاوه، نورونهای هر دو کپسول خارجی و منتهایی به شدت سیناپتوفیزین مثبت هستند.

نویسندگان با وجود جستجوی فراوان نتوانسـتند مـقاله‌ای بیابند که در آن از وجود نورونها در ماده سفید مغز انسان گزارشی وجود داشته باشد. بدین جهت می‌توان این مـقاله را نـخستین گزارش در زمینه وجود نورونها در ماده سفید مغز انسان و بـه ویژه در کپسولهای خارجی و منتهایی آن دانست. پیش از ایـن تنها Burakowska [۹] گزارشـی مـبنی بـر وجـود نـورونها در کـپسول مـنتهایی مـغز سگ بـه کـمک رنگ‌آمـیزی Klüver-Barrera ارائه کرده بود.

یکی از مـفیدترین و بـا ارزش‌تـرین نشـانگرهای نـورونی،

1. Protease pre-treatment

سیناپتوفیزین است [۱۲]. سیناپتوفیزین یک پروتئین اینتگرال غشایی است که تنها در غشای وزیکول‌های سیناپسی و غشای پیش سیناپسی یافت می‌شود [۱۱و۱۲]. بنابراین وقتی سلولی سیناپتوفیزین مثبت باشد، بدان معنی است که نه تنها این سلول حتماً نورون است بلکه به دلیل ارتباطات سیناپتیک با سایر نورونها، حتماً نورونی عملکردی است. از آنجا که نورونهای یافت شده در کپسولهای خارجی و منتهایی به شدت سیناپتوفیزین مثبت بودند، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این نورونها عملکردی و دارای ارتباطات سیناپتیک وسیع هستند. در حال حاضر در مورد ارتباطات و عملکرد این نورونها اطلاعاتی در دست نیست. با این حال، از آنجا که این نورونها در نزدیکی کلاستروم و قشر جزیره متعددتر می‌باشند، ممکن است ارتباطات و عملکرد آنها مشابه نورونهای کلاستروم و قشر جزیره باشد، هر چند ارتباطات و عملکرد نورونهای کلاستروم نیز در مغز انسان چندان آشکار نیست [۱۳].

تفسیر اهمیت وجود این نورونها و عملکرد آنها نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. این پژوهش نخستین گام را در فرایند شناسایی کامل ساختمان و عمل این نورونها برداشته است. خوشبختانه اکنون با روشهای ردیابی پیشرفته امکان تعقیب زواید سلولی این نورونها به‌صورت رترو- و آنتروگراد در مغز انسان وجود دارد [۱۴و۱۵]. ردیابی رشته‌های منشاء گرفته از این نورونها و کشف ارتباطات آنها گام بعدی در شناسایی بهتر این نورونهاست.

تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح پژوهشی مصوب شماره ۳۳۸۹ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت مالی طرح، از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به خاطر اعطای فرصت مطالعاتی به نویسنده اول مقاله و از کارکنان دپارتمان نوروپاتولوژی دانشگاه مونیخ (آلمان) برای کمک در تهیه نمونه‌ها صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. **Young B, Heath JW.** Weater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas, 3rd ed. Churchill Livingstone. Edinburgh. 2000, p 134
2. **Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** Basic Histology, 9th ed. Appleton & Lange. Stanfrod, 1998, pp 164-165
3. **Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH.** Gray's Anatomy, 38th ed. Churchill Livingstone. New York, 1995, p 1189

۴. **حقیر حسین، صادقی یوسف، مهرآئین پرویز.** بررسی رشته‌های عصبی کپسول خارجی مغز انسان. پژوهنده. ۱۳۷۹؛ سال پنجم (شماره ۲): صفحات ۱۴۴-۱۳۵

۵. **حقیر حسین، صادقی یوسف، مهرآئین پرویز، حسینی احمد.** تعقیب رشته‌های عصبی کپسول منتهایی مغز انسان. حکیم. ۱۳۷۹؛ سال سوم (شماره ۴): صفحات ۳۵۳-۳۴۴

۶. **حقیر حسین، صادقی یوسف، مهرآئین پرویز، حسینی احمد.** تعقیب رشته‌های عصبی میلین‌دار کپسول خارجی مغز انسان به روش هیستولوژیک. یاخته. ۱۳۸۰؛ سال سوم (شماره ۹): صفحات ۳۱-۳۷

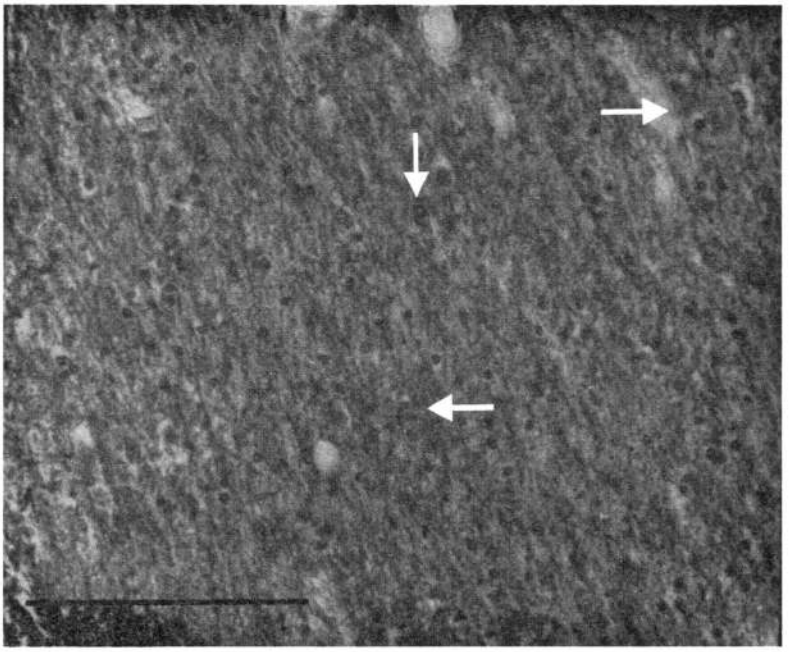
۷. **حقیر حسین، صادقی یوسف، حسینی احمد، مهرآئین پرویز.** بررسی هیستولوژیک رشته‌های عصبی میلین‌دار کپسول انتهایی مغز انسان. یاخته. ۱۳۸۰؛ سال سوم (شماره ۱۰): صفحات ۸۸-۸۳

8. **Haghir H, Sadeghi Y, Hosseini A, Mehraein P.** A histological comparison of myelinated nerve fibers between the external and exreme capsules in human brain. Yakhteh. 2001; 11: 123-130
9. **Burakowska J.** Extreme capsule in the dog: Myeloarchitectonics. Acta Biol Exper (Warsaw) 1966; 26(2): 123-133
10. **Klüver H, Barrera E.** A method for combined staining of cells and fibers in the nervous system. J Neuropathol Exp Neurol. 1953; 12: 400-403
11. **Wiedenmann B, Franke WW.** Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. cell. 1985; 41: 107-12٤
12. **Sternberg SS.** Histology for pathologists, 2nd ed. Lippincot-Raven, Philadelphia. 1997, p 252

13. **Morys J, Berdel B, Maciejewska B, Sadowski M, Sidorowicz M, Kowianska J, Narkiewiz O.** Division of human claustrum according to its architectonics and morphometric parameters. Folia Morphol (Warsz). 1996; 55(2): 69-82

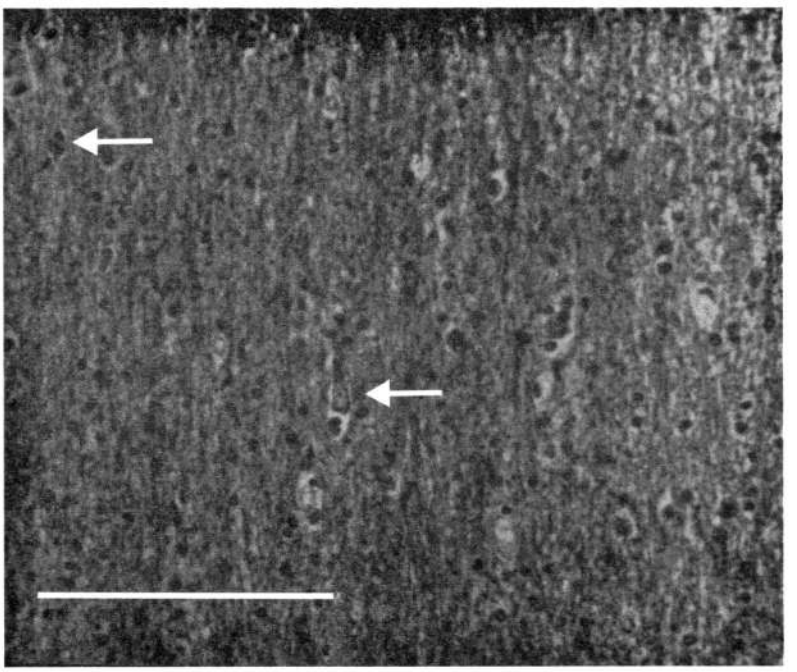
14. **Dai J, Swaab DF, Van der Vliet J, Buijs RM.** Postmortem tracing reveals the organization of hypothalamic projections of the suprachiasmatic nucleus in the human brain. J Comp Neurol. 1998; 400: 87-102

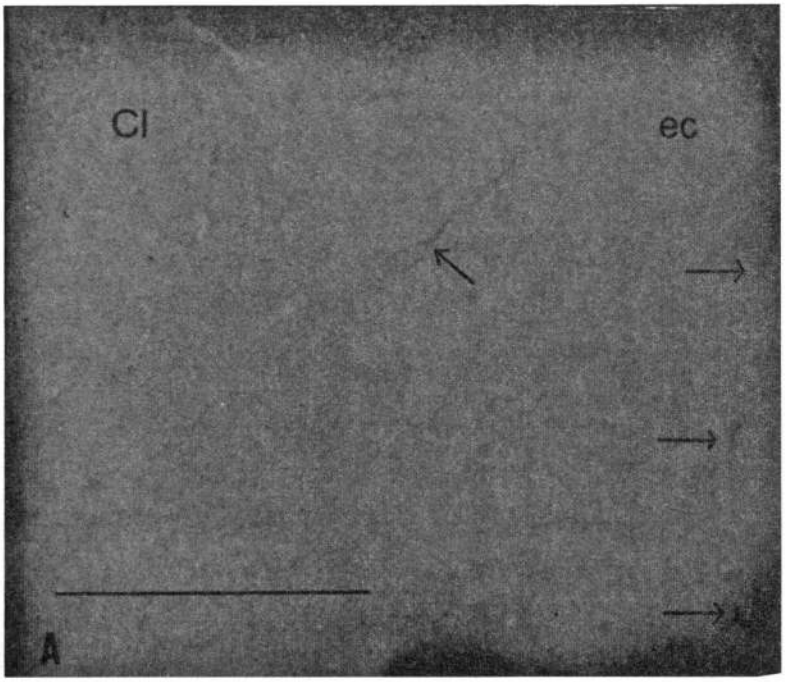
15. **Dai J, Van der Vliet J, Swaab DF, Buijs RM.** Postmortem anterograde tracing of intrahypothalamic ojections of the human dorsomedial nucleus of the hypothalamus. J Comp Neurol. 1998; 401: 16-33.



شکل ۱. نمای میکروسکوپی کپسول خارجی مغز انسان در برش کورونال؛ تعدادی نورون کروی و بیضوی در لابه لای رشته‌های عصبی ظریف مشاهده می‌شود (پیکان‌ها). رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۱۲۵μm

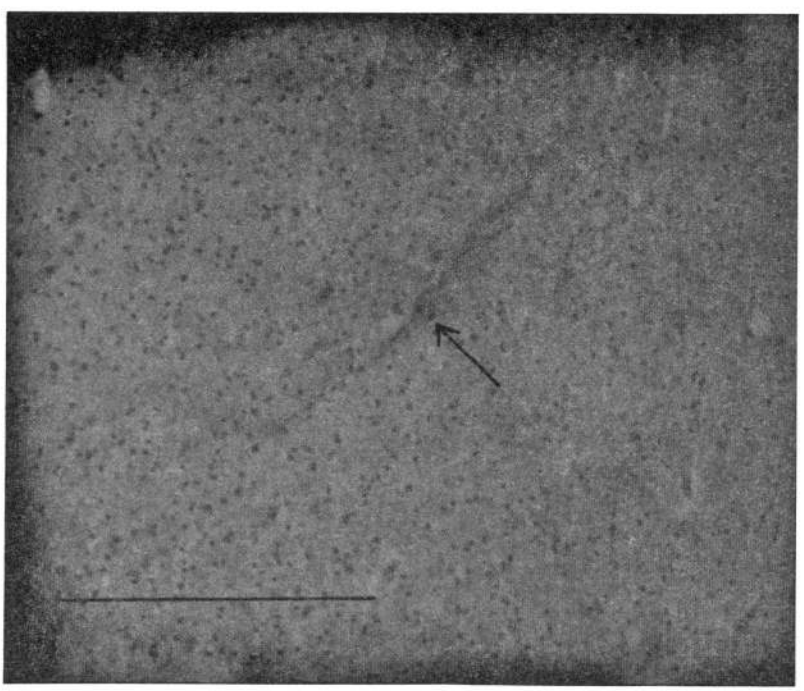
شکل ۲. نمای میکروسکوپی کپسول خارجی مغز انسان در برش کورونال؛ یک نورون هرمی متوسط (پیکان ضخیم) و یک نورون دوکی شکل کوچک (پیکان نازک) مشاهده می‌شوند. رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۱۲۵μm

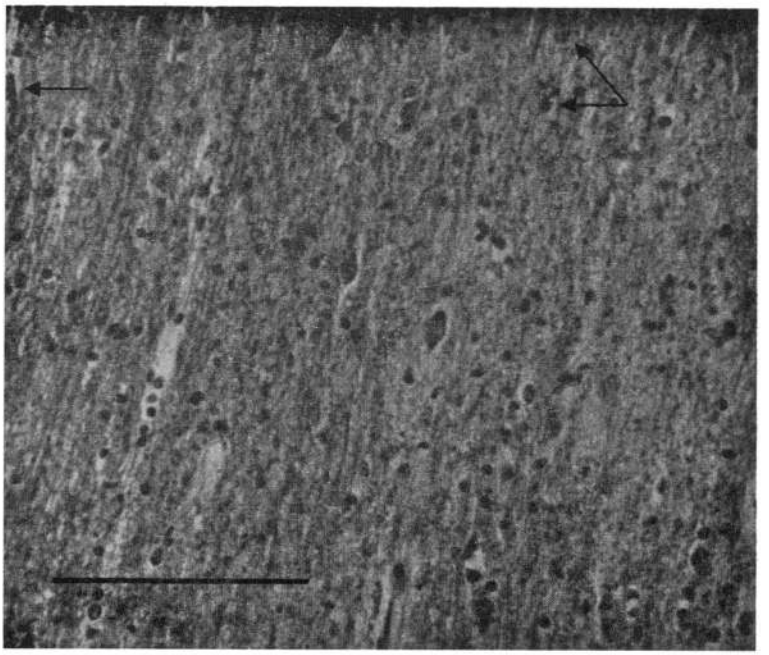




شکل ۳A. نمای میکروسکوپی بخش پشتی کپسول خارجی (ec) و بخش پشتی کلاستروم (Cl) مغز انسان در برش کورونال؛ نواحی قهوه‌ای رنگ مناطق سیناپتوفیزین مثبت هستند. همانطور که انتظار می‌رود کلاستروم کاملاً سیناپتوفیزین مثبت است. در کپسول خارجی، که دارای زمینه‌ای سیناپتوفیزین منفی است، لکه‌ها یا خطوط سیناپتوفیزین مثبتی مشاهده می‌شود (پیکان‌ها). رنگ‌آمیزی: ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین، بار: ۲μm

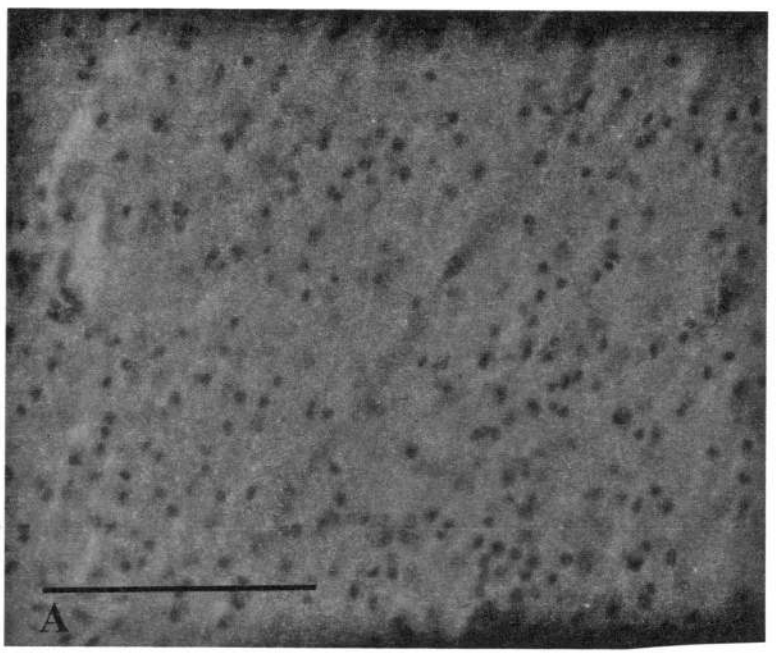
شکل ۳B. یکی از خطوط سیناپتوفیزین مثبت در شکل ۳A با بزرگنمایی بیشتر مشاهده می‌شود. این خط (پیکان) از سه نورون سیناپتوفیزین مثبت که با زواید سیناپتوفیزین مثبت خود زنجیره وار پشت سر یکدیگر قرار گرفته‌اند، تشکیل شده است. رنگ‌آمیزی: ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین، بار: ۲۵۰μm

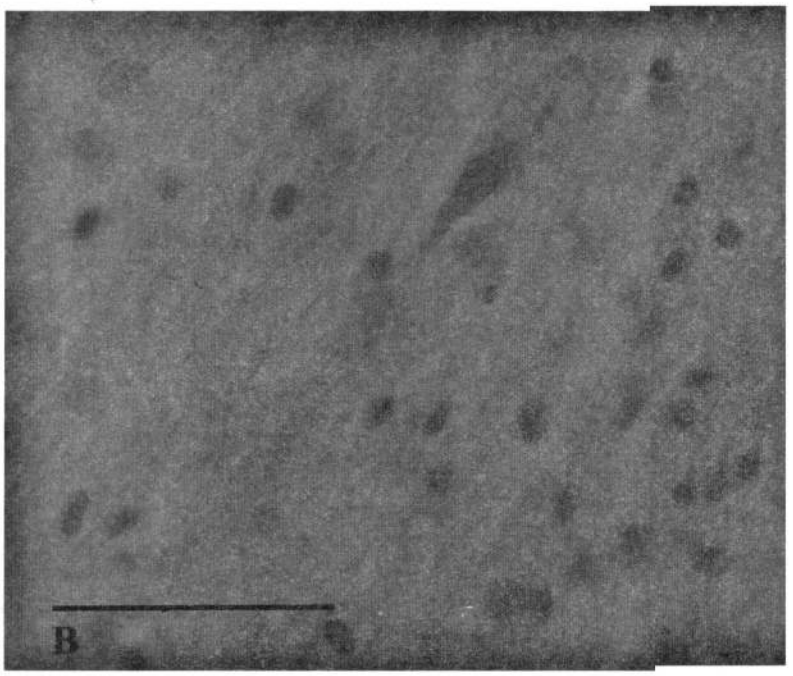




شکل ۴. نمای میکروسکوپی کپسول منتهایی مغز انسان در برش کورونال؛ تعدادی نورون دوکی شکل و بیضوی کوچک تا متوسط در میان رشته‌های عصبی ظریف مشاهده می‌شوند (پیکان‌ها). رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۱۲۵μm

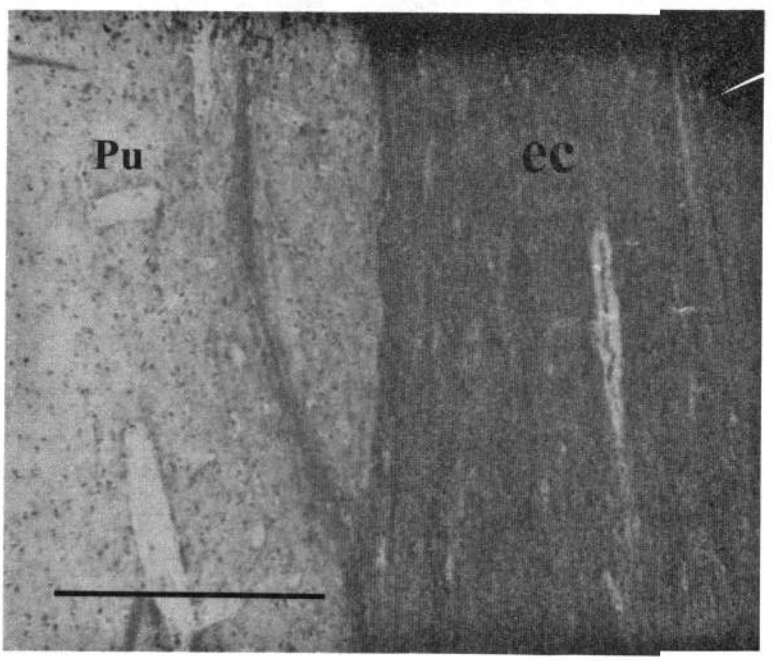
شکل ۵A. یک نورون سیناپتوفیزین مثبت در کپسول منتهایی مغز انسان. زواید آکسونی و دندریتی این نورون نیز در فاصله کوتاهی از جسم سلولی، سیناپتوفیزین مثبت هستند. رنگ‌آمیزی: ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین، بار: ۱۲۵μm

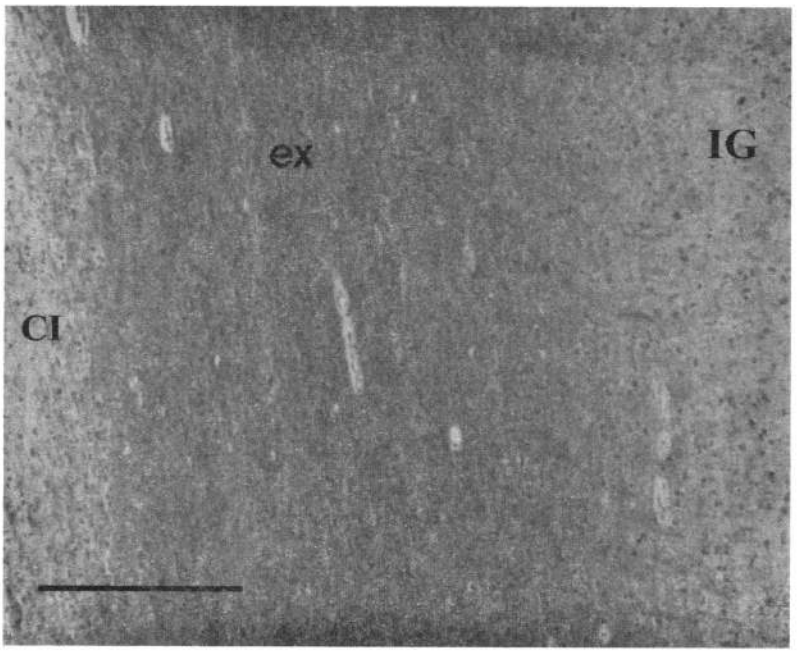




شکل 5B. همان نورون شکل 5A با بزرگنمایی بیشتر. رنگ‌آمیزی: ایمونوهیستوشیمی برای سیناپتوفیزین، بار: ۵۰μm

شکل ۶. نمای میکروسکوپی کپسول خارجی (ec) و پوتامن (Pu) مغز انسان در برش کورونال؛ مرز واضح و شفاف بین پوتامن و کپسول خارجی قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۵۰۰μm





شکل ۷. نمای میکروسکوپی کپسول منتهایی (ex)، قشر جزیره (IG) و کلاستروم (Cl) مغز انسان در برش کورونال؛ مرز نامشخص و غیر شفاف بین قشر جزیره با کپسول منتهایی و بین کلاستروم با این کپسول قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۲۵۰μm

شکل ۸. نمای میکروسکوپی کپسول خارجی (ec)، کپسول منتهایی (ex)، قشر جزیره (IG)، پوتامن (Pu) و بخش پشتی کلاستروم (Cl) مغز انسان در برش کورونال؛ مرز واضح و شفاف بین پوتامن با کپسول خارجی در مقایسه با مرزهای نامشخص و غیر شفاف بین قشر جزیره با کپسول منتهایی و کلاستروم با هر دو کپسول خارجی و منتهایی مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: Klüver-Barrera، بار: ۲μm