

# الگوی آورانه‌های ناحیه سیتوم میانی در موش صحرایی

هاشم حدوست‌بزدی، کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران  
دکتر پریچهر یاسبخش، استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران  
دکتر زیلا 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 determine origins of inputs to this area.

For this purpose, stereotaxic injections of one microliter HRP (25 percent, Sigma) by Hamilton syringe 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 hypothalamic area/tuber cinereum, posterior hypothalamus, submammillothalamic, supramammillary and lateral mammillary nuclei in the diencephalon, 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 سیتوم 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 سیتوهیپوکامپ را تعدیل می‌نمایند. هدف از این مطالعه تعیین منشأ آورانه‌ها به ناحیه سیتوم میانی می‌باشد.

بدین منظور، مقدار یک میکرولیتر Horse Radish Peroxidase (HRP= ۲۵ درصد، سیگما) بوسیله جراحی استرونوآکسیک و با کمک سرنگ هامیلتون به ناحیه سیتوم 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 شده بودند بصورت یکطرفه در باند دیاگونال بروکا، سیتوم جانبی، هیپوکامپ، ناحیه ساب فورنیکال و پالیدوم شکمی در تالانسفال، ناحیه پره اپتیک جانبی، ناحیه هیپوتالاموس جانبی نوبرسینورم، هیپوتالاموس خلفی، هسته‌های ساب مامیلوتالامیک سوپرامامیلاری و پستانی جانبی در دیانسفال، ناحیه تگمتال شکمی، هسته اینترپاندانولار، ناحیه خاکستری مرکزی و لوکوس سرلئوس و بصورت دو طرفه در هسته‌های رافه در ساقه مغز مشاهده شدند.

بر اساس نتایج بدست آمده، ناحیه سیتوم 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.

## 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 ۴ بخش جانبی، میانی، خلفی و شکمی تقسیم می‌شود. این قسمت می‌تواند به دو بخش پشتی هسته سپتوم میانی (MS) Medial Septum و بخش شکمی هسته دیاگونال باند بروکا (DBB) Diagonal Band of Broca تقسیم شود و خود DBB به یک بازوی عمودی پشتی (VDB) Vertical limb of Diagonal Band و یک بازوی افقی شکمی (HDB) Horizontal limb of the Diagonal Band 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 رشم 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 گاباژژیک 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 پاتوزنز بیماری آلزایمر گزارش شده‌است (۴).

بررسی و شناخت ارتباطات این ناحیه با دیگر نواحی مغز اهمیت ویژه و بسزایی دارد. در این میان گرچه بر روی ارتباطات وایرانی 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 (۶)، ناحیه سویرامامیلاری (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 منشأ 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 ۲۸۰-۲۲۰ gr انجام گرفت. موشها با ترکیبی از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و گزیزلین (۵ mg/kg) بصورت داخل صفاقی بیهوش شده و سپس با استفاده از جراحی استریوتاکسی و توسط سرنگ هامپلتون 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. ۷۲-۴۸ ساعت پس از تزریق، مجدداً موشها عمیقاً بیهوش شده و توسط ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتر سالین ۰/۹ درصد، ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو حاوی گلوتار آلدئید ۲/۵ درصد و پارافرما آلدئید ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۱ M (۴/ PH=۷) و ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول ساکارز ۱۰-۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ M پرفیوز شدند. سپس مغز را از جمجمه خارج کرده و ۲۴ ساعت در داخل محلول فیکساتیو قرار دادیم. مغز را به ۲ تا ۳ بلوک تقسیم کرده و توسط دستگاه ویراتوم برشهای ۷۰ میکرومتری از آنها تهیه می‌شد. برشها بصورت یک در میان انتخاب و بر روی آنها واکنش هیستوشیمیایی با استفاده از تترامیل 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 زلاتینه 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

(VP) Ventral Palidum (حایوی 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 محدودی از هسته‌های هیپوتالاموس سلولها نشاندار شده بودند. هسته‌های ساب مامیلوتالامیک Submammillothalamic Nucleus (SMT)، سوپرامامیلاری Supramammillary Nucleus (SuM) و پستانی جانبی (LM) Lateral Mammillary (SuM) area از جمله این هسته‌ها بودند که با حدود ۳۸ درصد از کل سلولهای نشاندار تشکیل منطقه‌ای را می‌دهند که بیشترین اوران را به سیتوم میانی می‌فرستد (نمودار MC در شکل ۳). در این منطقه بیشترین نوروون نشاندار شده در ناحیه سوپرامامیلاری بویژه در بخش میانی آن قرار داشتند. در این قسمت نوروونها در بخش پشتی و جانبی نسبت به پدانکل پستانی قرار می‌گرفتند. این نوروونها عموماً گلابی شکل و دوکی شکل بودند و دو تا سه نورت نشاندار شده در آنها بخوبی تشخیص داده می‌شد. شدت رنگ در این سلولها بالا بوده و کتراست 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 نوروونهای 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 نگمتال شکمی (VTA) Ventral Tegmental Area ۳ درصد، هسته‌های رافه ۷ درصد، هسته‌های نگمتال ۲/۵ درصد ولوکوس سرلئوس ۷ درصد از سلولهای نشاندار شده را دارا بودند. همچنین تعداد کمی سلول نشاندار شده در هسته ایتربدانکولار (IP) Interpeduncular nucleus و نواحی خاکستری اطراف قنات سیلویوس (Central Grey) (CG) مشاهده شد.

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

## نتایج

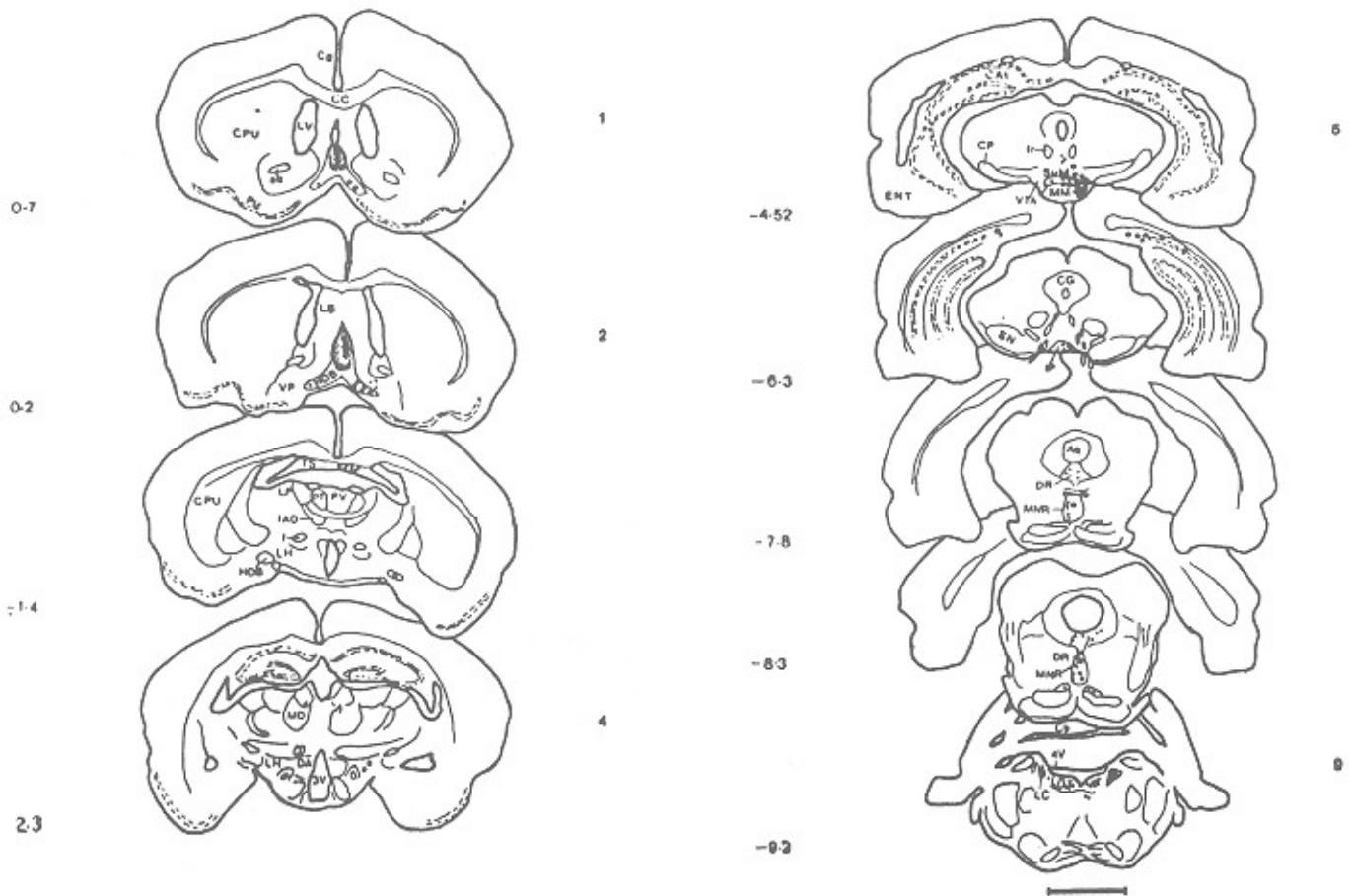
**محل تزریق:** از ۱۲ موش که تزریق ردیاب به ناحیه سیتوم میانی آنها صورت گرفته بود، در ۸ موش محل تزریق مناسب و در بخش میانی سیتوم قرار داشت. در این موشها کانون تزریق در هسته MS و بازوی عمودی باند دیاگونال Vertical Limb of the Diagonal Band (VDB) قرار داشت (شکل ۲- تصویر A).

تزریق ردیاب منجر به نشاندار شدن نوروونها در نواحی مختلف مغز گردید که در مقاطع قدامی به خلفی (شکل ۱) نشان داده شده است. نوروونهای 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 نوروونها پررنگ و به شکل‌های هرمی، دوکی شکل و گلابی شکل بوده و نورت‌های نشاندار شده در این نوروونها بخوبی قابل تشخیص می‌باشند.

در بخش خلفی تشکیلات هیپوکامپ در نواحی CA1 و CA2 شاخ‌آمون و ساییکولوم، تعداد قابل ملاحظه‌ای (حدود ۱۳ درصد) نوروون نشاندار شده مشاهده گردید. این نوروونها در قسمت پشتی بخش خلفی تشکیلات بویژه در مرز CA1 با ساییکولوم 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 شده بودند. این سلولها ظاهری کم‌رنگ و هرمی شکل داشتند.

در ناحیه تلانسفال همچنین تعداد کمی سلول در ناحیه ساب فورنیکال (SFO) Subfornical Organ و پالیدوم شکمی

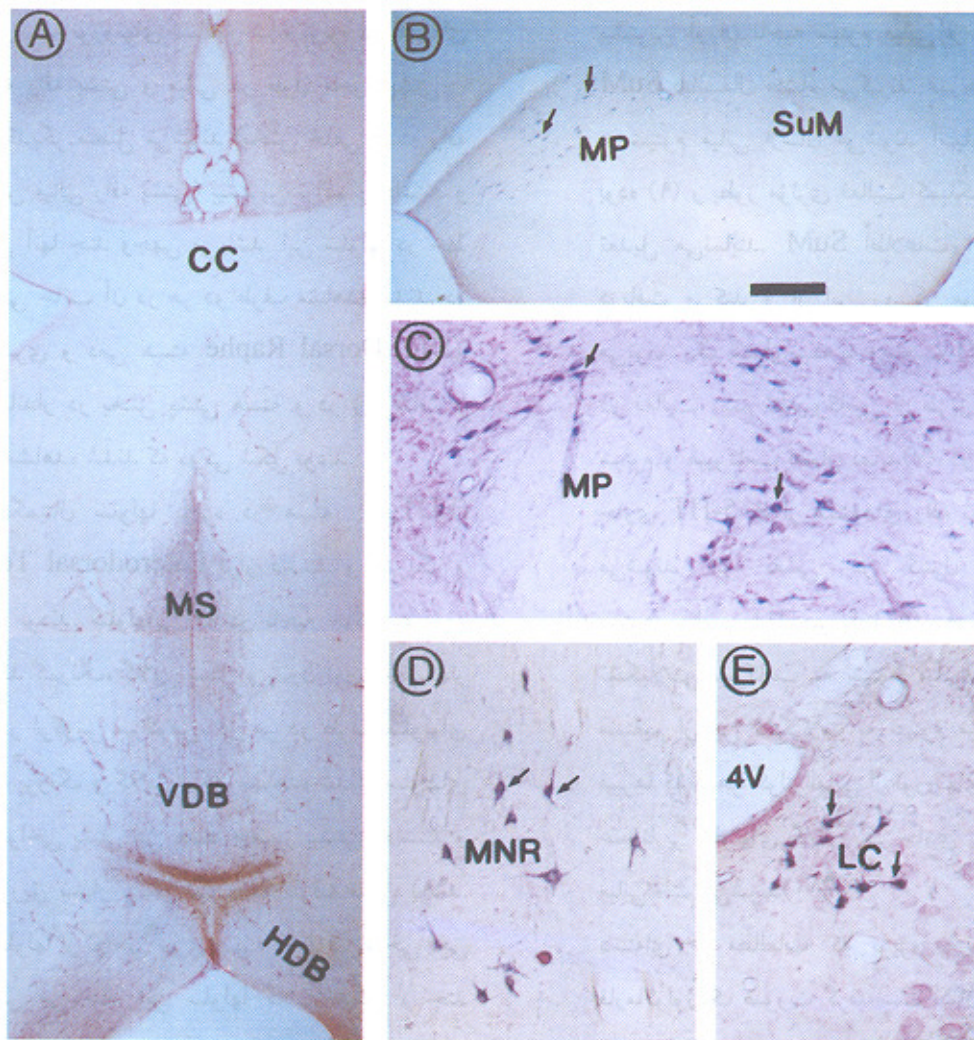


شکل ۱. تصاویر ترسیمی (۱-۹) از برشهای کورونال مغز که توزیع توپوگرافیک نورونهای نشاندار شده را در نواحی مختلف تالانسفال، دیانسفال و ساقه مغز متعاقب تزریق HRP به سیپتوم میانی نشان می‌دهند. تصاویر ۱ و ۲ محل تزریق را نشان می‌دهند. ناحیه تیره کانون تزریق را نشان می‌دهد. ناحیه هاشورزده اطراف منطقه تیره نمایانگر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

نشان‌دهنده ۱۰ نورو

نشان‌دهنده ۱ نورو

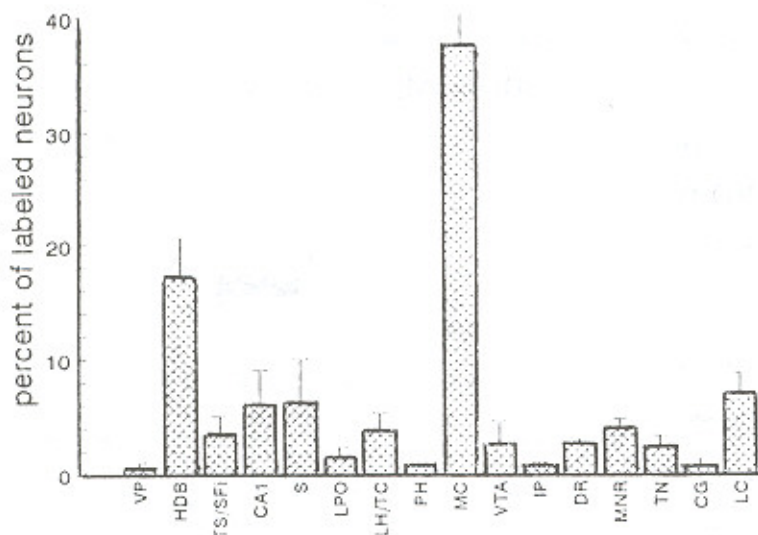
خط مقیاس ۲/۵ میلی‌متر



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 تالانسمال، دیاسفال و ساقه مغز را متعاقب تزریق HRP به سپتوم میانی نشان می‌دهد.

بیشترین آوران ناحیه سپتوم میانی از نواحی پستانی بویژه SuM دیانسفال منشاء می‌گیرند. فیبرهایی که از این ناحیه به سپتوم میانی ارسال می‌شوند آسپاراتات، گلوتاماترژیک بوده (۹) و بطور مؤثری فعالیت کمپلکس سیتوهیوکامپ 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 تاهیبوکامپی 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 سیتوهیوکامپ 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 ظاهراً کولترانهایی از نورونهای غیر هرمی می‌باشند عمدتاً بر سلولهای گاباارژیک حاوی پاروالومین 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 لقاء تشنگی می‌باشد (۱۱، ۱۲، ۱۳).

در این مطالعه یک ارتباط وسیع درون ناحیه‌ای از بازوی افقی باند دیاگونال به بخش‌های پستی‌تر 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 سیتال ارائه می‌دهند.

در هسته‌های رافه نورونهای نشاندار شده بویژه در ناحیه‌ای که دو هسته رافه پستی و میانی در طول محور پستی-شکمی به یکدیگر متصل می‌شوند (بخش خلفی هسته رافه میانی و بخش میانی رافه پستی) 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 (DR) Dorsal Raphe، سلولهای نشاندار در بخش پستی هسته و در زیر قنات و بطن چهارم مشاهده شدند که دوکی شکل بودند.

در ناحیه تگمنتال سلولها بویژه در هسته (LDTg) Laterodorsal Tegmental قرار داشتند و کم‌رنگ و بیضی شکل بودند. سلولهایی که در ناحیه خاکستری مغز مشاهده شدند کم‌رنگ، گلابی شکل و بدون نوریت نشاندار شده بودند. در لوکوس سرلئوس، در هر دو طرف سلولهای نشاندار شده پررنگ و گلابی شکل مشاهده شدند. سلولهای نشاندار در نواحی پستی 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 نهایتاً پررنگترین سلولهای نشاندار مشاهده شده در هر موش بودند (شکل ۲ تصویر E).

تنها ۶/۶ درصد از نورونهای نشاندار شده در طرف مقابل تزریق مشاهده شد. از این میان، هسته‌های رافه ۶۲ درصد، هسته‌های نگمنتال 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

## 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 immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neurosci* 1991; 43( 2/3): 349-360.
9. Leranath 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.