مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۱۸ ، شماره ۴ ، صفحه ۷۴

مقالات مروری

REVIEW ARTICLES

مطالعه انتقال دهنده‌های عصبی مغز با استفاده از روشهای مورفو - فونکسیونل

دکتر ژیلا بهزادی*، دکتر ابوالفضل ابراهیمی*

خلاصه

در این مقاله برخی امکانات مرفولوژیک شرح داده می‌شود که کاربرد آنها نه تنها امکان نشان دادن مسیرهای انتقال دهنده عصبی (نوروترانسمیتری) در سیستم عصبی را میسر می‌سازد، بلکه می‌توان به فیزیولوژی و کار این مواد در سیستم عصبی دست یافت. هیستوشیمی آنزیمی از روشهای هیستوشیمیایی است که با رنگ‌آمیزی بافت عصبی، به منظور نشاندادن وجود آنزیم در بافت عصبی به کار می‌رود. ایمونوسیتوهیستوشیمی (Immunocyto-histochemistry) با به کار بردن پادتن به دست آمده در مقابل نوروترانسمیترها و پپتیدها، امکان نشان دادن آنها در یک ساختمان از سیستم عصبی و یا حتی در سطح سلول را داریم. هیبریداسیون درون بافتی (In situ hybridization) پیشرفتهای اخیر در بیولوژی ملکولی به شناخت و جدا کردن ژن‌هائی که برای ساختن نوروترانسمیترها کدگذاری می‌شوند، انجامید. برای تشخیص گیرنده‌های نوروترانسمیترها در بافت عصبی از لیگاندهای رادیواکتیو استفاده می‌شود. و بالاخره می‌توان با ترکیب روشهای فوق و متدهای دیگر محتویات نوروشیمیائی و گیرنده‌های آنها در رابطه با mRNA نورون‌ها - که برای ساختن آنها بکار می‌رود - را نشان داد. اگرچه هر یک از این روشهای نوین محدودیتهای خاص خود را دارند ولی کاربرد آنها امکان درك سیتوفیزیولوژی نورونها را در ارتباط با محتویات شیمیائی درون سلولی در وضعیت طبیعی و یا پاتولوژیک امکانپذیر می‌سازد.

* اعضای هیات علمی گروه آناتومی دانشکده پزشکی (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

مـقدمـه

نوروترانسمیترها و نوروپپتیدها در واقع از روشهای مطالعه‌شان جدایی‌ناپذیرند. روشهای مطالعه و تشخیص آنها را می‌توان در دو محور بزرگ تقسیم کرد: بیوشیمی و مورفولوژی، که البته داده‌های زیست‌شناختی ملکولی هم به آنها اضافه شده است. اگر تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمی جهت شناخت نوروترانسمیترهائی چون استیل‌کولین، گابا، سروتونین، کاته‌کول‌آمین‌ها و پپتیدهائی مانند TRH و LURH و آندورفین‌ها گامهای نخستین را برداشت ولی بعدا" اطلاعات و نتایج مورفولوژیک، برداشتهای فیزیولوژیک آنها را غنی و پربار ساخت. زمانی کوتاه پس از شناخت ترکیب شیمیائی نوروترانسمیترهاو پپتیدهای مغز و به دست آوردن پادتن‌ها در مقابل ملکولهای آنها، کاربردشان تحت عنوان روشهای ایمونوسیتوشیمی و هیستوشیمی توانست این مواد را در سطح سلولی وارگانل‌های درون یاخته‌ای در بافت عصبی نشان دهد. به علاوه به علت حساسیت زیاد روشهای یاد شده، این شیوه‌ها جهت کشف انواع مواد پیوسته در نواحی مختلف اعصاب مغزی و محیطی پیش می‌رود؛ در حالی که، حضور بسیار اندك آنها را به روشهای بیوشیمیائی نمی‌توان نشانداد. با این همه در میان شیوه‌های بیوشیمی و مورفولوژی به طور دائم یک جدل منطقی وجود دارد که سبب می‌شود هر یک از این دو روش به تناوب در رأس قرار گرفته، برای دیگری راهی به طرف شناخت شیمیائی و جایگاه سلولی نوروترانسمیترها و پپتیدها در مغز باز کرد.

البته باید تاکید کرد که در ابتدا بوسیله روشهای بیوشیمی پادگن‌ها و ترکیب شیمیائی آنزیم‌ها و دیگر مواد داخل نورونی نشان داده شد، ولی روشهای مورفولژیک در پی اطلاعات بیوشیمیایی کسب شده نقش رهبری را به دست آورد و حضور مواد شیمیائی را در داخل سلولهای اعصاب مرکزی و محیطی تعیین کرد و حتی در سالهای اخیر با نشاندادن همجواری درون سلولی نوروترانسمیترها و پپتیدها و اینکه آیا ممکن است آنها، از یک ژن یا بیشتر، در یک نورون تولید شوند برداشتهای نوینی را در توجیه نحوه کار آنها به طور طبیعی و یا پاتولوژیک پیش آورد.

در اینجا با توضیح کاربرد مهمترین و متداول‌ترین روشهای مورفولوژیک، این نتیجه به دست می‌آید که توسط این روشها، نه تنهاساختار نوروآناتومیک سیستم‌های نوروترانسمیتری مرکزی را تعیین می‌کنیم، که به نحوه کار و عملکرد آنها نیز پی برده می‌شود. آنچه سبب شد که برای این نوشتار عنوان " روشهای مورفو-فونکسیونل " انتخاب شود، در زیر آمده است:

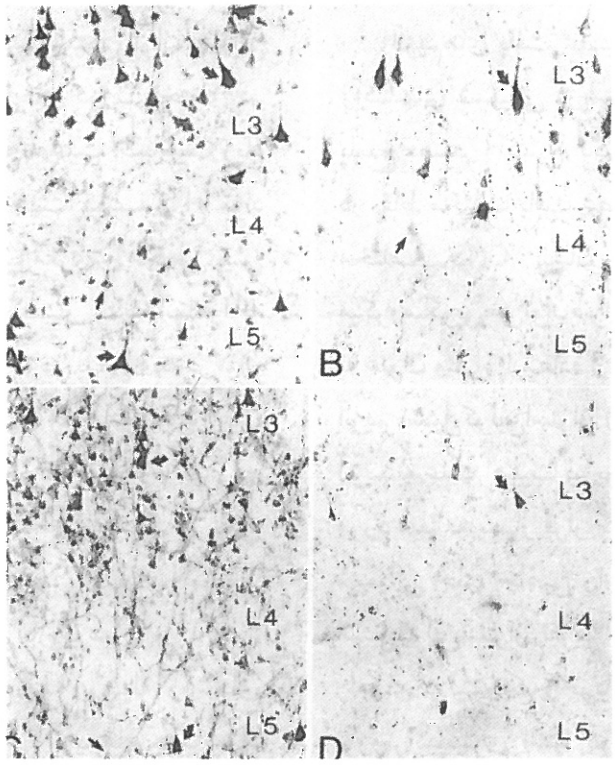
۱) هیستوشیمی آنزیمی بافت عصبی

آنزیم‌های بافت عصبی قادرند که به طور انتخابی به واکنشهای شیمیائی در سطح بافت زنده یا پس از مرگ پاسخ دهند. واکنش رنگی و غیریکنواخت آنزیم انتخابی در نقاط مختلف بافت عصبی مقدار آنزیم را در هسته‌های مختلف CNS نشان می‌دهد و توسط مطالعه میکروسکوپی می‌توان آنرا به طور کمی و کیفی آنالیز کرد. به عنوان مثال، استفاده از روش فوق در شناخت عملکرد آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AchE) را شرح می‌دهیم. این آنزیم به علت اهمیت فیزیولوژیک و پاتولوژیک آن امروزه مورد مطالعه بسیار قرار گرفته، در تاریخچه نوروآناتومی شیمیائی جای خاصی را به خود اختصاص داده است. استیل‌کولین‌استراز تقریبا" در تمام نقاط مغز بخصوص راههای کولینرژیک وجود دارد و با هیدرولیز سریع به کار نوروترانسمیتری استیل‌کولین در سطح سیناپسی خاتمه می‌دهد. بعلاوه این آنزیم در سلولهای Cholinoceptive که لزوما" کولینرژیک نیستند، نیز وجود دارد. عملکرد آن در برخی موارد شناخته شده، در

بعضی جهات هنوز در پرده ابهام است. اگرچه به احتمال بسیار این آنزیم توسط یک ژن ساخته می‌شود ولی در شکلهای ملکولی متفاوت با خواص یونی و هیدروفیلیک متغیر دیده می‌شود. این آنزیم نه تنها در هیدرولیز استیل‌کولین ار می‌رود بلکه در فرآیندهایی مانند تنظیم تمایز، مورفوژنز و شکل‌پذیری نورونی شرکت می‌کند (۸). اکسون‌های حاوی این آنزیم بیشتر از نرونهای Basal forebrain سرچشمه می‌گیرند و تمام نقاط نئوکورتکس را پوشش می‌دهند (۹).

با به دست آوردن این اطلاعات توسط روش هیستوشیمی آنزیمی، مسیولم (Mesulam) و همکارانش از بخش نورولوژی دانشگاه هاروارد با استفاده از همین روش، وضعیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز بافت مغز انسان طبیعی و بیمار آلزهایمری را بررسی کردند (۱۱). همان طور که می‌دانیم در بیماری آلزهایمر فعالیت AchE در قشر مغز به شدت از بین می‌رود و تغییرات استحاله‌ای در هسته قاعده‌ای ماینرت (basalis maynert Nucleus) و فیبرهای ورودی از آن به کورتکس ایجاد می‌شود؛ در نتیجه، نورونهای هرمی قشر مغز نیز از بین می‌روند (۱ و ۵).

مقایسه وضعیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز در نورونهای کورتکس فرد طبیعی و بیمار گرفتار آلزهایمر که در میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شده است، به ترتیب در شکلهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود.



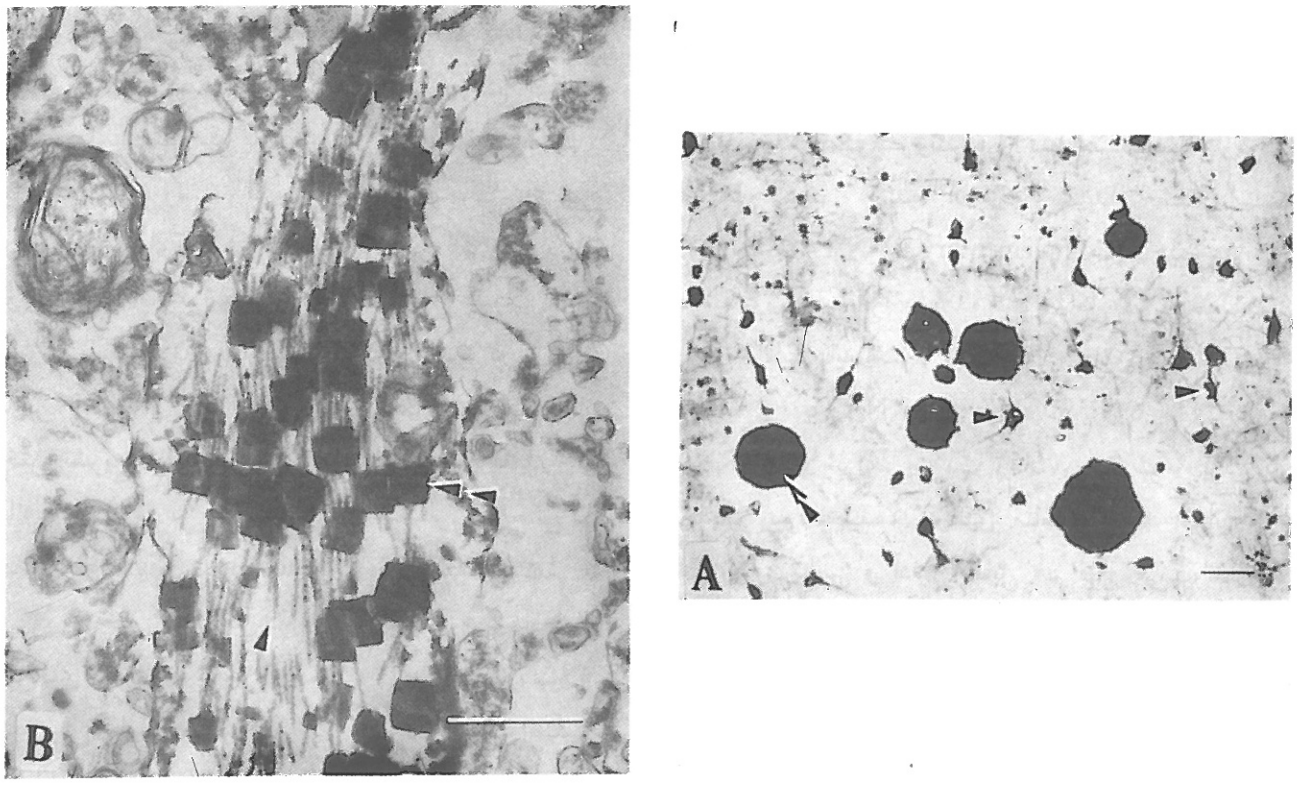
شکل ۱): A) نرونهای پیرامیدال حاوی AchE در ناحیه ۶ کورتکس فرد طبیعی؛ B) نرونهای پیرامیدال حاوی AchE در همان ناحیه کورتکس در بیمار مبتلا به آلزهایمر؛ C) نرونهای AchE در ناحیه ۲۲ فرد طبیعی و D) در همان ناحیه در بیمار مبتلا به آلزهایمر؛ کم شدن تعداد نرونهای استیل‌کولین‌استراز در این بیمار کاملا" مشهود است. پیکان خمیده نرونهای غنی از AchE و فلش مستقیم نرونهائی که مقدار کمی AchE دارند، را نشان می‌دهد (۵).

با استفاده از شیوه فوق، تغییرات کیفی آنزیم استیل‌کولین استراز در روند رشد، تکامل و تداخل آن روی نوروترانسمیترهای دیگر در موارد پاتولوژیک امروزه زمینه تحقیقات وسیعی را در علوم اعصاب باز کرده است.

۲) ایمینوهیستو - سیتوشیمی بافت عصبی

تحول تحقیقات در نوروآناتومی از دهه ۱۹۸۰ با معرفی و کاربرد پادتن‌های چند دودمانی (Polyclonal) و تک دودمانی (Monoclonal) برای شناخت ترکیبات شیمیائی بیشمار در سلولهای عصبی آغاز شد. این جهش با به کار گرفتن روشهای ایمونوهیستوشیمی و زیست‌شناختی ملکولی تحقق یافت. اساس این روش را واکنش پادگن - پادتن تشکیل می‌دهد. ملکولهای پادگن با استفاده از مواد ثابت کننده در بافت باقی می‌مانند. پادتن از قبل با ایمن‌سازی حیوان توسط پروتئین (نوروترانسمیتر مورد نظر) به دست می‌آید.

پادتن پلی‌کلونال تهیه شده با مواد فلوئورسنت، آنزیمی و یا پرتوزا، مستقیم و یا غیرمستقیم، نشاندار



شکل ۲) فعالیت آنزیم AchE در قشر ناحیه گیجگاهی در یک زن بیمار دچار آلزهایمر.
A) فلش‌های مضاعف پلاکهای آمیلوئیدی را نشان می‌دهد که در نزدیکی نرونهای تیره‌رنگ (سر پیکان) که دارای پیچشهای نوروفیبریلاری هستند، معمولا" دیده می‌شوند. این نورن‌ها با استفاده از روش هیستوشیمی آنزیمی شکل خاص خود را نشان می‌دهند؛ B) در میکروسکوپ الکترونی واکنش AchE روی کریستالهای مکعبی فیلامنت‌هائی تولید می‌کند (فلش مضاعف) که در نورونهای طبیعی دیده نمی‌شود. بافت از کورتکس گیجگاهی بیمار آلزهایمری گرفته شده است (۱).

می‌شود (۲). پادتن‌های تک دودمانی نیز با هم‌جوشی (Fusion) با لنفوسیت‌های B حیوان ایمن شده به سلولهای میلوم و کلون کردن (Cloning) انتخابی می‌توان به دست آورد و آنرا نیز نشاندار کرد. وقتی بافت عصبی در معرض این پادتن‌ها قرار گرفت با پادگن خود در بافت، همبسته پادگن - پادتن نشاندار شکل می‌گیرد (۷). بدین ترتیب همبسته (کمپلکس) یاد شده در بافت عصبی با میکروسکوپ قابل مشاهده است.

روش ایمینوهیستوشیمی برای هدفهای مختلف به کار می‌رود: در میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی سیستم‌های عملی اعصاب مرکزی و محیطی، تجزیه و تحلیل راههای عصبی و مواد متابولیک خاص آنها، و وضعیت آسیب‌شناختی بافت عصبی قابل تشخیص است. برای مثال در بررسی مکانیسم عمل ساختمانهای عصبی درگیر در راههای اکستراپیرامیدال و نتیجه‌گیری از آن در روشن کردن پاتولوژی این مسیرها که در انسان سبب بیماری پارکینسون و کره‌هانتینگتون می‌شود در ۱۹۸۹ هاربر (Harber) و گروئن‌وگن (Groenwegen)، از بخش تشریح دانشگاه Vrije هلند یافته‌های جدیدی را ارائه دادند (۴). بر پایه تقسیم‌بندی شیمیایی دو بخش در جسم سیاه(Substantia Nigra) مشخص شده است:

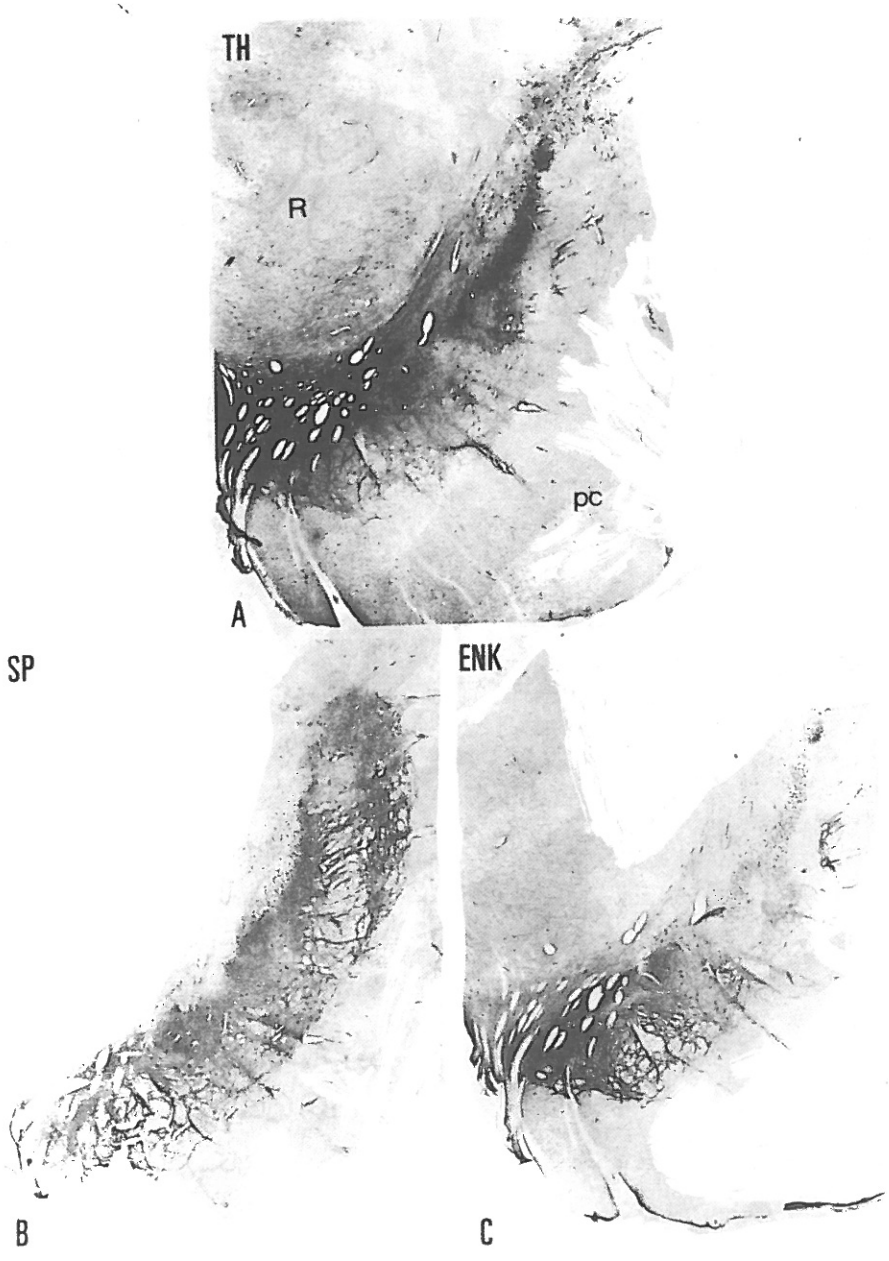
- بخش کمپکتا دارای ملانین و در واقع از سلولهای حاوی دوپامین و یا تیروزین هیدروکسیلاز آنزیم پیش سازنده آن تشکیل شده است و هدف اصلی ترمینالهای این بخش استریاتوم می‌باشد (Nigro-Striatal Pathways).

- بخش رتیکولانا در مقابل ترمینالهای گابارژیک از استریاتوم دریافت می‌کند (Striato - Nigral Pathways). این پژوهندگان با به کارگیری روش ایمونوهیستوشیمی ارتباط دقیق و نحوه توزیع و تداخل آورانهای استریاتو- نیگرال را بررسی کردند و نشان دادند که این راه دارای پپتیدهائی مانند Substance و انکفالین (Enkephalin) می‌باشد. براساس این یافته روشن شد که راه استریاتو- نیگرال دیگری روی مسیر نیگرو-استریاتال و عمل آن نفوذ دارد (شکل ۳).

۳) هیبریداسیون درون‌بافتی **(In situ hybridization)**

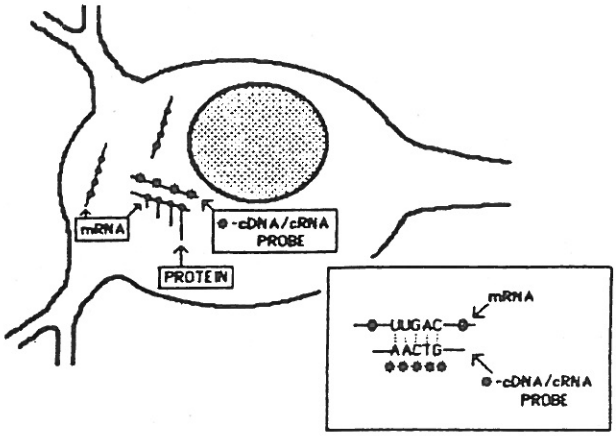
امروزه روش هیبریداسیون برای تشخیص و تعیین محل دقیق DNA و mRNA در سیستم عصبی به کار می‌رود. در ایمونوسیتوشیمی مشاهده یک پروتئین در نورون امکانپذیر می‌شود. مشابه آن توسط روش هیبریداسیون درون‌بافتی می‌توان mRNA خاص و سازنده یک پروتئین را با استفاده ازکرده DNA تکمیل کننده آن که نشاندار شده است [Complementary DNA (CDNA)] هیبرید و با میکروسکوپ آنرا مشاهده کرد (شکل ۴). اصول این روش بر این پایه استوار است که دو بازوی cDNA - DNA و یا DAN - mRNA و یا cRNA - RNA تحت شرایط مناسب زمان، حرارت و یونی با یکدیگر پیوند شده، بازهای مناسب مانند گوآنین و سیتوزین، تیمین و آدنین مقابل هم قرار می‌گیرند. به عنوان مثال، mRNA با بازهای ...AUGCA... مقابل cDNA با بازهای مناسب ...TACGT... قرار می‌گیرد.

پس از آنکه توالیهای بازی mRNA سازنده یک نوروترانسمیتر شناخته شد، با استخراج آن cDNA مناسب آن به طور مصنوعی ساخته شده، با مواد رادیواکتیو یا غیرپرتوزا نشاندار می‌شود. اگر هیبریداسیون mRNA-cDNA حدود ۲۰ از را شامل شود همبسته پایداری به دست می‌آید. والگر (Walker) و همکاران از بخش نوروپاتولوژی دانشگاه جان‌هاپکینز با استفاده از

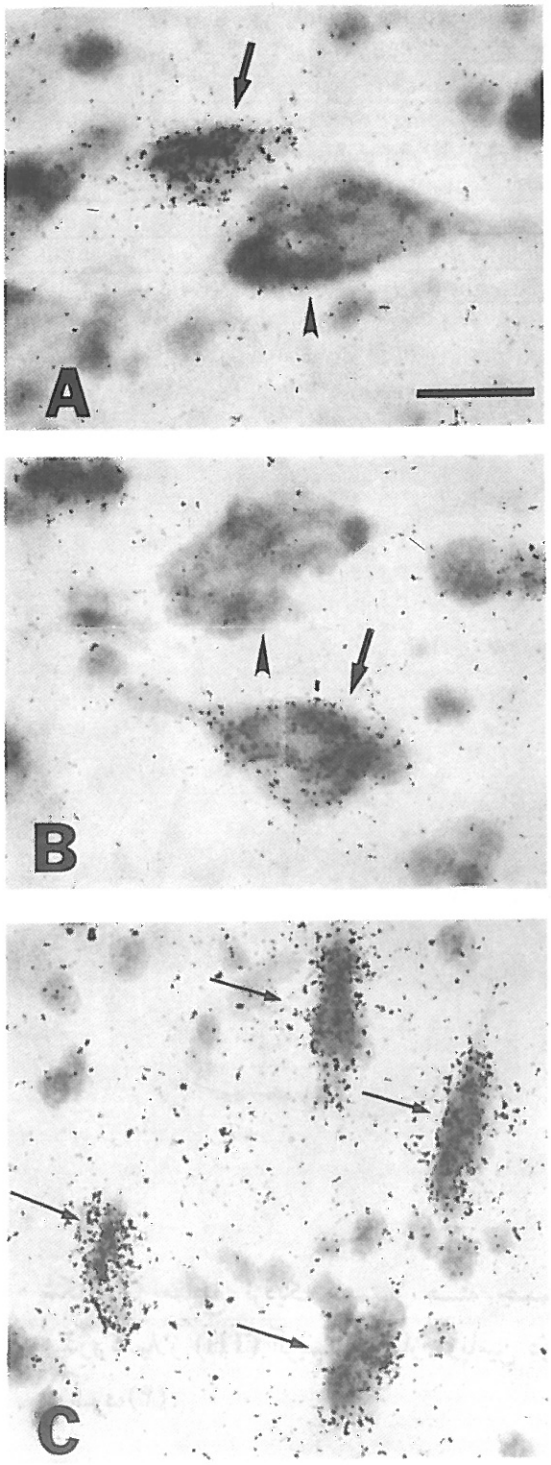


شکل ۳) مقاطع نزدیک بهم از هسته جسم سیاه (Substantia-Nigra) از مغز انسان. واکنش تیروزین هیدروکسیلاز (TH) آنزیم پیش‌ساز دوپامین در شکل A؛ ماده P (SP) در شکل B و انکفالین در شکل C دیده می‌شود (۴).

این روش توانستند در مغز میمون نشان دهند که در میان نورونهای کولینرژیک هسته قاعده‌ای ماینرت نورونهای بزرگ حاوی گابا نیز وجود دارند که سرنوشت این نورونها در فرآیند بیماریهای دژنراتیو وابسته به کهنسالی، مانند آلزهایمر هنوز روشن نیست و باید بررسی بیشتری صورت گیرد (شکل ۵).



شکل ۴) مکانیسم روش هیبریداسیون درون‌بافتی



شکل ۵) فتومیکروگراف از نورونهای هسته ماینرت که در آنهاmRNA نوروترانسمیتر GABA بیان شده است (تجمع دانه‌های سیاه در روی نورن‌ها با پیکان مشخص شده است).

A) سلولهای کوچکتر حاوی گابا در کنار یک نورون بزرگ که احتمالا" دارای گابا نیست (سر پیکان)؛ B) دو نورون بزرگ که یکی دارای گابا (پیکان) و دیگری نشاندار نشده است (سر پیکان)؛ C) در مقایسه چهار نورون بزرگ دیگر تالاموس که تجمع دانه‌های سیاه در آنها نشانه بیان mRNA برای نوروترانسمیتر GABA است همبسته تالاموس دارای تعداد زیادی نورون حاوی گابا می‌باشد (۶).

۴) تعیین محل گیرنده‌ها به روش اتورادیوگرافی

از سال ۱۹۸۷ که Palacios و Dietl (۱۰) روش اتورادیوگرافیک In vitro را برای نشاندادن گیرنده‌ها به کار بردند، تعیین نقاط عمل مغز در مقابل نوروترانسمیترها و داروها زمینه تحقیقاتی وسیعی را در علوم اعصاب ایجاد کرد. در این روش با تلخیص پروتئین‌های رسپتوری و نشاندار کردن آنها توسط رادیوایزوتوپ‌های تریتیوم (H_3) و ید ۱۳۵ مقاطع ۴۰ میکرونی از بافت مغز در معرض پروتئین ایزوتوپ شده قرار می‌گیرد و به نقاطی که دارای همین پروتئین هستند متصل می‌شود. و مقاطع، با میکروسکوپ مجهز به سیستم آنالیز تصویر کامپیوتری (Computrized image analysis) مطالعه می‌شوند. این روش نوروآناتومیک و کمی است و از آن، برداشتهای فیزیولوژیک نتیجه‌گیری می‌شود؛ به عنوان مثال، مطالعه تحقیقاتی بیگون (Biegon) و همکاران از بخش رواندرمانی دانشگاه نیویورك که با استفاده از روش بالا انجام داده‌اند، ارائه می‌شود (شکل ۶). در این تحقیق محل و تجمع گیرنده‌های 5-HT_1A سروتونین روی مغز بیماران افسرده، کهنسال و یا الکلی بررسی شده است. این محققان پی بردند که رسپتورهای 5-HT_1A سروتونین بیشتر در مناطقی که در فعالیتهای شناختی (Cognitive) مغز دخالت دارند یعنی قشر مغز و هیپوکامپ توزیع شده‌اند. مصرف الکل و کهنسالی اختلال در شناخت و درك را در پی دارد که همراه با کم شدن چشمگیر چگالی رسپتورهای 5-HT_1A در این نواحی از مغز می‌باشد (۳).

استنباط کلی

همان طور که شرح داده شد و براساس مثالهای ارائه شده توانایی و نقش روشهای مورفو- فونکسیونل در تحقیقات علوم اعصاب دارای اهمیت بسیار است. مطالعات مورفولوژیک نه تنها انواع مختلف نورون‌ها ومواد ترانسمیتری آنها را نشان می‌دهند بلکه جهت کشف اطلاعات نوین درباره نورونها گام برداشته، ارتباط سیناپسی آنها را توجیه می‌کند. با روشهای ذکر شده از ساختمان ژن مسئول تا ماده سنتز شده در نورون اطلاعات سیتولوژیک به دست می‌آید؛ و در نتیجه، با شناسایی مواد انتقال دهنده در سطح نورون و جایگاه آنها در ساختمانهای درون نورونی، می‌توان نحوه عملکرد آنها را در سیستم اعصاب معین کرد.

شکل ۶) خطوط خاکستری در سطح چین‌خوردگیهای قشر مغز، توزیع اتورادیوگرافیک 5-HT$_1$A را در مغز انسان نشان می‌دهد: A و D (ستون چپ) بیمار الکلیک ۲۵ ساله. B، E و G (ستون وسط) فرد کنترل ۲۸ ساله و C و F (ستون راست) فرد کهنسال ۶۲ ساله. مقاطع A، B و C از کورتکس پری‌فرونتال می‌باشد. مقاطع میانی در سطح هیپوکامپ و G از هسته‌های رافه است. کاهش قابل توجه چگالی رسپتور مذکور در مقاطع خلفی کورتیکال در شکل D متعلق به بیمار الکلیک و شکل F خاص فرد کهنسال است. ۱) هسته دم‌دار؛ ۲) پوتامن؛ ۳) تالاموس در مقطع E (۳).

مراجع

1) Carson KA, Geula C, and Mesulam MM: Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. Brain Res 540: 240-248, 1991
2) Polak JM and Van Noorden S: An introduction to immunocytochemistry: Current techniques and problems. Oxford Univ Press 1984
3) Dillon KA, Gross-Isseroff, Israeli M, and Bigon A: Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT1A receptor binding in the human brain postmortem: Effects of age and alchohol. Brain Res 554: 56-64, 1991
4) Harber SN, and Groenwegen HJ: Inter-relationship of the distribution of neuropeptides and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the human substantia Nigra. J Comp Neur 290: 53-68, 1989
5) Heckers S, Geula C, and Mesulam MM: Acetylcholinesterase rich pyramidal neurons in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 13: 455-60, 1992
6) Walker LC, Price DL and Young WS: Gabaergic neurons in the primate basal forebrain magnocellular complex. Brain Res 499: 192, 1989
7) MacMillan FM, Cuello AC: Monoclonal antibodies. In: Neurohistochemistry Modern methods and applications. Alan R Liss (ed) Inc New York 1986, PP 49-74
8) Mrzljak L, and Goldman-Rackic PS: Acetylcholinesterase reactivity in the frontal cortex of8Xhumaand monkey: Contribution of AChE-rich pyramidal neurons. J Comp Neur 342: 261-81, 1986
9) Oh JD, Woolf NJ, Roghani A, Edwads RH and Butcher LL: Cholinergic neurons in the rat central nervous system demonstrated by in situ hybridization of choline acetyltransferase mRNA. Neurosci 47 (4): 807-822, 1992
10) Palacios JM, and Dietl M: Regulatory peptides receptors: Visualization by autoradiography. Experientia 43: 750-761, 1987
11) Mesulam MM and Geula C: Acetylcholinesterase rich neurons of the human cerebral cortex: Cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distilution. J Comp Neur 306: 193-220, 1991

Evaluation of brain neurotransmitters by morpho-functional method

Behzadi J, Ebraheemi A

Shaheed Beheshti University of Medical Sciences & Tehran University of Medical Sciences

SUMMARY

This review discribes some of the morphological tools which have allowed not only to discribe the chemical nature of neuronal pathways in the central nervous system but also to approach their physiology and their functions: Enzyme histochemistry; this technique shows the entity of an enzyme in nervous tissue. Immunocyto-histochemistry; based on antigen-antibody reaction constitute the basic neuroanatomical and neurocytological studies concerning their neuropeptides and neurotransmitters. In situ hybridization with cloned or synthetic probes and radioactive or enzymatic labelings, permit to localize the specific sequence of nucleic acids (RNA of DNA) corresponding to a persumed neurotransmitter or neuropeptide. Using radioactive ligands permit to demonstrate receptors by autoradiography technique. Finally several combinations of these different methods can be used to detect the neurotransmitters and their receptors or of the corresponding mRNA. Considering the possibilities and limitations of these modern methods, we conclude their implication for the understanding of cytophysiology of neurons in normal or pathological aspects.