

บทที่ 3

ผลการวิจัย



ขอบเขตของบริเวณที่ฉีด HRP (injection site)

การสำรวจวิธีประสาทในสมองโดยใช้วิธีขนส่งย้อนกลับในใยประสาทของฮอรัชราดิซเปอร์ออกซิเดส (HRP) นั้น สิ่งสำคัญที่ต้องระวังคือตำแหน่ง ขนาด ปริมาณ HRP ในบริเวณที่ฉีด กล่าวคือปริมาณที่ฉีดต้องมีขอบเขตอยู่ใน NVL เท่านั้น ไม่แผ่กระจายไปบริเวณใกล้เคียง เพราะจะทำให้การแปรผลเกี่ยวกับวิธีประสาทที่ส่งมาอาจคลาดเคลื่อนได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าว การใช้วิธีฉีด HRP ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้พยายามกำหนดให้จำนวน HRP ที่ฉีด จำกัดอยู่เฉพาะใน NVL เท่านั้น ดังแสดงในรูปภาพ (รูปที่ 3) บริเวณที่ฉีด HRP จะเห็นลักษณะเป็นขอบเขตสีน้ำเงินเข้ม (dark blue) รอบ ๆ ปลายไปเขตที่ฉีด สีน้ำเงินเข้มที่เห็นนี้เป็นบริเวณที่มีตะกอนจากปฏิกิริยาฮอรัชราดิซเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase reaction products) อยู่ ตะกอนดังกล่าวจะมากหรือน้อยขึ้นกับจำนวน HRP และความสามารถของเอ็นไซม์ที่จะออกซิไดซ์ (oxidize) tetramethyl benzidine (TMB) ที่ใช้เป็นโครโมเจน (chromogen) ของปฏิกิริยา

ลักษณะของฮอรัชราดิซเปอร์ออกซิเดสเลเบลเซลล์ (HRP labeled cell)

HRP เลเบลเซลล์คือเซลล์ที่มีตะกอนของฮอรัชราดิซที่เกิดจากปฏิกิริยา เซลล์เหล่านี้คือเซลล์ที่ส่งแอกซอนไปยังบริเวณที่ฉีด HRP ปลายแอกซอนดกกิ่งและใช้วิธีขนส่งย้อนกลับเอา HRP มายังเพอริแคเรียน (perikaryon) ของเซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยากับ TMB จะเห็นโปรดักต์ลักษณะเป็นเม็ดกลมมีสีน้ำเงินอยู่ในเพอริแคเรียน ตัวอย่างในรูปที่ 11 (B) เซลล์บางเซลล์อาจเห็นแกรนูลัสเม็ดสีน้ำเงินนี้ในบริเวณเดนไดรต์ (dendrite) ด้วย ตัวอย่างเช่นในรูปที่ 5 (D) ส่วนบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ไม่เห็นเม็ดสีน้ำเงินดังกล่าว^(26,27,28) ความมากน้อยของแกรนูลัสขึ้นกับเหตุผลหลายอย่างคือ จำนวน HRP ความสามารถของเซลล์ประสาทในการขนส่ง

ย้อนกลับ HRP และปฏิกิริยาทางฮิสโตเคมีที่เหมาะสมในการทำให้เห็น HRP โปรดักส์ในเซลล์
นั้น ๆ

ฉีด HRP ในตำแหน่งด้านข้างของ NVL (lateral part of the lateral vestibular nucleus)

เมื่อฉีด HRP ในตำแหน่งด้านข้างของ NVL (R-44) พบ HRP เลเบลเซลล์หลายบริเวณ กล่าวคือพบจำนวนมากในเวอร์มิสส่วนหน้า (anterior vermis) ของซีรีเบลลัม ข้างเดียวกัน (ipsilateral) กับ NVL ตำแหน่งที่พบคือโลบูล (lobule) ที่สาม โลบูลที่หนึ่งและโลบูลที่สี่พบจำนวนปานกลาง ส่วนโลบูลที่สองและโลบูลที่ห้าพบจำนวนน้อย ในซีรีเบลลานิวเคลียส (cerebellar nuclei) พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยที่นิวเคลียสฟาสติเจียลข้างเดียวกัน (ipsilateral fastigial nucleus) นิวเคลียสพรีโพซิทีสด้านตรงข้าม (contralateral prepositus nucleus) นอกจากนี้ยังพบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนเล็กน้อยที่ฟลอคคูลัสของซีรีเบลลัมข้างเดียวกัน (ipsilateral flocculus) นิวเคลียสของสไปนัลแทรคโคโรเจมินัลด้านตรงข้าม (contralateral nucleus of the spinal tract of trigeminal nerve) ส่วนในกลุ่มนิวเคลียสเวสติบูลาร์ด้วยกัน (commisural neuron) พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนปานกลางที่นิวเคลียสเวสติบูลาร์มีเดียลทั้งสองข้าง (ipsilateral and contralateral of the medial vestibular nucleus) และพบจำนวนน้อยที่นิวเคลียสเวสติบูลาร์สไปนัลลิสข้างเดียวกัน (ipsilateral nucleus vestibular spinalis) จำนวนเลเบลเซลล์ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบดูได้จากตารางที่ 2 และแผนภาพประกอบของหนูขาวตัวที่ R-44 (รูปที่ 4A)

ฉีด HRP ในตำแหน่งด้านในของ NVL (medial part of the lateral vestibular nucleus)

เมื่อฉีด HRP ในตำแหน่งด้านในของ NVL พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยที่เวอร์มิสส่วนหน้าของซีรีเบลลัมข้างเดียวกัน ตั้งแต่โลบูลที่หนึ่งถึงโลบูลที่ห้า นอกจากนี้ยังพบที่นิวเคลียสฟาสติเจียลทั้งสองข้าง นิวเคลียสเดนเตท (dentate nucleus) นิวเคลียสคอชลาโคเคลียร์ (dorsal cochlear nucleus) นิวเคลียสพรีโพซิทีส (prepositus nucleus)

กลุ่มเซลล์ที่แทรกอยู่ในมีเดียลลองกิวติคัลฟาสซิкулัส (medial longitudinal fasciculus) นิวเคลียสรีโทรเฟเชียล (retrofacial nucleus) และนิวเคลียสของสไปนัลแทรคไตรเจมินัล (nucleus of the spinal tract of trigeminal nerve) ทั้งสองข้าง ส่วนในกลุ่ม นิวเคลียสเวสติบูลาร์ด้วยกันพบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนปานกลางที่นิวเคลียสเวสติบูลาร์มีเดียล ทั้งสองข้าง นิวเคลียสเวสติบูลาร์สไปนัลลิสข้างเดียวกันและ NVL ด้านตรงข้ามพบจำนวนน้อย จำนวนเลเบลเซลล์ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบดูได้จากตารางที่ 2 และแผนภาพประกอบของหนูขาว ตัวที่ R-50 และ R-49 (รูปที่ 4B, 4C)

ชนิด HRP ในตำแหน่งส่วนบนของ NVL (dorsal half of the lateral vestibular nucleus)

เมื่อฉีด HRP ในตำแหน่งส่วนบนของ NVL พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนปานกลาง ที่เวอริสส่วนหน้าของซีรีเบลลัมข้างเดียวกันในโกลบูลที่สามและสี่ โกลบูลที่ห้าพบจำนวนน้อย ส่วนในโกลบูลที่หนึ่งและโกลบูลที่สองไม่พบ HRP เลเบลเซลล์เลย นอกจากนี้ยังพบ HRP เลเบล เซลล์จำนวนน้อยที่นิวเคลียสฟาสติเจียล นิวเคลียสเคนเทท นิวเคลียสอินเตอร์โพซิตัส นิวเคลียส คอลโคเคลียร์ นิวเคลียสพรีโพซิตัส นิวเคลียสโซลิทารีข้างเดียวกัน กลุ่มเซลล์ในมีเดียล เลมนิสคัสและนิวเคลียสของสไปนัลแทรคไตรเจมินัลทั้งสองข้าง นิวเคลียสรีโทรเฟเชียลและมีเดียลลองกิวติคัลฟาสซิкулัส (median longitudinal fasciculus) ทั้งสองข้าง ใน นิวเคลียสอินฟีเรียโอลิวารีด้านตรงข้ามในส่วนมีเดียลแอกเซสเซอร์รี่ (contralateral medial accessory olive) พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยและในฟลอคคูลัสของซีรีเบลลัมข้างเดียวกันพบจำนวนปานกลาง ส่วนในกลุ่มนิวเคลียสเวสติบูลาร์ด้วยกันพบ HRP เลเบลเซลล์ที่ NVL ด้านตรงข้าม นิวเคลียสเวสติบูลาร์สไปนัลลิสข้างเดียวกัน และนิวเคลียสเวสติบูลาร์มีเดียลทั้งสอง ข้าง จำนวนเลเบลเซลล์ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบดูได้จากตารางที่ 2 และแผนภาพประกอบของ หนูขาวตัวที่ R-43 และ R-59 (รูปที่ 4D, 4E)










ฉีด HRP ในตำแหน่งส่วนล่างของ NVL (ventral half of the lateral vestibular nucleus)

เมื่อฉีด HRP ในตำแหน่งส่วนล่างของ NVL ไม่พบ HRP เลเบลเซลล์ในบริเวณเวอร์มิสส่วนหน้าของซีรีเบลลัมเลย พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยที่นิวเคลียสฟาสติเซียล ด้านตรงข้ามและนิวเคลียสเวนทรัลโคเคลียร์ข้างเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบในกลุ่มเซลล์ที่แทรกอยู่ไม่มีติดยาลองกิจูดินัลฟาสซิคูลัส นิวเคลียสรีโทรเฟเซียล นิวเคลียสของสไปนัลแทรคโตรเจมินัลข้างเดียวกัน ส่วนในกลุ่มของนิวเคลียสเวสติบูลาร์ด้วยกันพบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยที่นิวเคลียสเวสติบูลาร์มีติดยาลองทั้งสองข้าง จำนวนเลเบลเซลล์ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบดูได้จากตารางที่ 2 และแผนภาพประกอบของหนูขาวตัวที่ R-56 และ R-64 (รูปที่ 4F, 4G)

ฉีด HRP ในตำแหน่งตรงกลางของ NVL (central of the lateral vestibular nucleus)

เมื่อฉีด HRP ในตำแหน่งตรงกลางของ NVL พบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนปานกลางที่เวอร์มิสส่วนหน้าของซีรีเบลลัมข้างเดียวกันในโลบูลที่สาม ส่วนโลบูลที่หนึ่ง สอง สี่และห้าพบ HRP จำนวนน้อย นอกจากนี้ยังพบ HRP เลเบลเซลล์ที่นิวเคลียสฟาสติเซียล นิวเคลียสเดนเต นิวเคลียสอินเตอร์โพซิทัล นิวเคลียสคอร์ซัลโคเคลียร์ นิวเคลียสเวนทรัลโคเคลียร์ นิวเคลียสโซลิทารีข้างเดียวกัน นิวเคลียสปรีโพซิทัลทั้งสองข้างพบจำนวนน้อย นอกจากนี้ยังพบ HRP เลเบลเซลล์อยู่ในกลุ่มเซลล์ที่แทรกอยู่ไม่มีติดยาลองกิจูดินัลฟาสซิคูลัสข้างเดียวกัน นิวเคลียสของสไปนัลแทรคโตรเจมินัลข้างเดียวกันพบมาก ด้านตรงข้ามพบน้อย ในกลุ่มของนิวเคลียสเวสติบูลาร์ด้วยกันพบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนน้อยที่นิวเคลียสเวสติบูลาร์มีติดยาลอง นิวเคลียสเวสติบูลาร์มีติดยาลองด้านตรงข้ามพบ HRP เลเบลเซลล์จำนวนปานกลาง จำนวนเลเบลเซลล์ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบดูได้จากตารางที่ 2 และแผนภาพประกอบของหนูขาวตัวที่ R-53 และ R-54 (รูปที่ 4H, 4I)










ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของ NVL ที่ฉีด HRP และบริเวณที่พบ HRP labeled cell ตัวเลขในตารางแสดงจำนวนของ HRP labeled cell

บริเวณที่พบ HRP labeled cell	ตำแหน่งที่ฉีด HRP									
		R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54
<u>cerebellar cortex</u>										
ipsilateral										
vermian lobule I (C I)		6	2	-	-	-	-	-	3	1
II (C II)		4	1	-	-	-	-	-	4	4
III(C III)		16	4	1	6	8	-	-	5	5
IV (C IV)		6	2	-	2	8	-	-	-	1
V (C V)		3	2	1	4	2	-	-	-	1
contralateral										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>cerebellar nuclei</u>										








ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตำแหน่งที่ฉีด HRP										
	R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54	
Fastigial nucleus (NF)										
ipsilateral	2	5	-	2	-	-	-	-	5	
contralateral	-	1	-	-	-	3	-	-	-	
Dentate nucleus (ND)										
ipsilateral	-	5	-	2	4	-	-	4	4	
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Interpositus nucleus (NI)										
ipsilateral	-	-	-	1	-	-	-	5	5	
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 2 (ต่อ)










บริเวณที่พบ HRP labeled cell	ตำแหน่งที่ฉีด HRP									
		R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54
Dorsal cochlear nucleus (NCD)										
ipsilateral	-	4	-	1	-	-	-	-	4	4
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ventral cochlear nucleus (NCV)										
ipsilateral	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prepositus nucleus (NPH)										
ipsilateral	-	2	-	2	6	-	-	2	3	

ตารางที่ 2 (ต่อ)










ตำแหน่งที่พบ HRP	บริเวณที่พบ HRP labeled cell									
										
	R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54	
contralateral	1	-	-	1	-	-	-	-	1	
Solitary nucleus (SOL)										
ipsilateral	-	-	1	-	4	-	-	-	2	
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Retrofacial nucleus (NRF)										
ipsilateral	-	1	-	5	-	2	-	-	-	
contralateral	-	1	-	-	-	-	-	-	-	



ตารางที่ 2 (ต่อ)










ตำแหน่งที่พบ บริเวณที่พบ HRP labeled cell	ตำแหน่งที่พบ HRP									
										
	R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54	
nucleus of the spinal tract of trigeminal nerve (NTST)										
ipsilateral	-	2	3	7	1	3	3	5	10	
contralateral	1	3	-	-	2	-	-	-	4	
กลุ่มเซลล์ใน Medial lemniscus (LM)										
ipsilateral	-	-	-	-	2	-	-	-	-	
contralateral	-	-	-	-	3	-	-	-	-	

ตารางที่ 2 (ต่อ)










บริเวณที่พบ HRP labeled cell	ตำแหน่งที่พบ HRP									
										
	R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54	
กลุ่มเซลล์ใน Medial longitudinal fasciculus (FLM)										
ipsilateral	-	1	-	5	-	1	-	2	1	
contralateral	-	2	-	1	-	3	-	-	-	
<u>Flocculus (fl)</u>										
ipsilateral	3	-	-	-	6	-	-	-	-	
contralateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตำแหน่งที่พบ บริเวณที่พบ HRP labeled cell									
	R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54
<u>Inferior Olivary nucleus (OL)</u>									
ipsilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-
contralateral	-	-	-	3	3	-	-	-	-
Comissural Neurons									
NVL									
contralateral	-	1	-	2	3	-	1	-	1
NVM									
ipsilateral	9	5	2	1	5	4	2	8	5

ตารางที่ 2 (ต่อ)

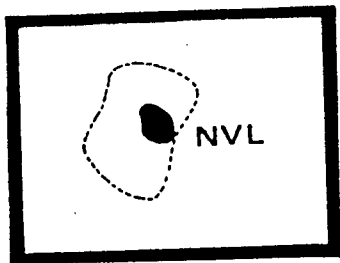
บริเวณที่พบ HRP labeled cell	ตำแหน่งที่พบ HRP									
		R-44	R-50	R-49	R-59	R-43	R-56	R-64	R-53	R-54
contralateral		8	6	-	3	7	1	1	-	4
NVS										
ipsilateral		-	-	-	-	-	-	-	3	-
contralateral		-	-	-	-	-	-	-	-	-
NVSP										
ipsilateral		4	6	1	-	7	-	-	5	4
contralateral		-	-	-	-	1	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 (A-I) แสดง serial diagram transverse section ของสมองหนู
แต่ละตัวในการทดลองครั้งนี้และตำแหน่งต่าง ๆ ในสมองที่พบ HRP
labeled cell

- : HRP labeled cell 1 cell

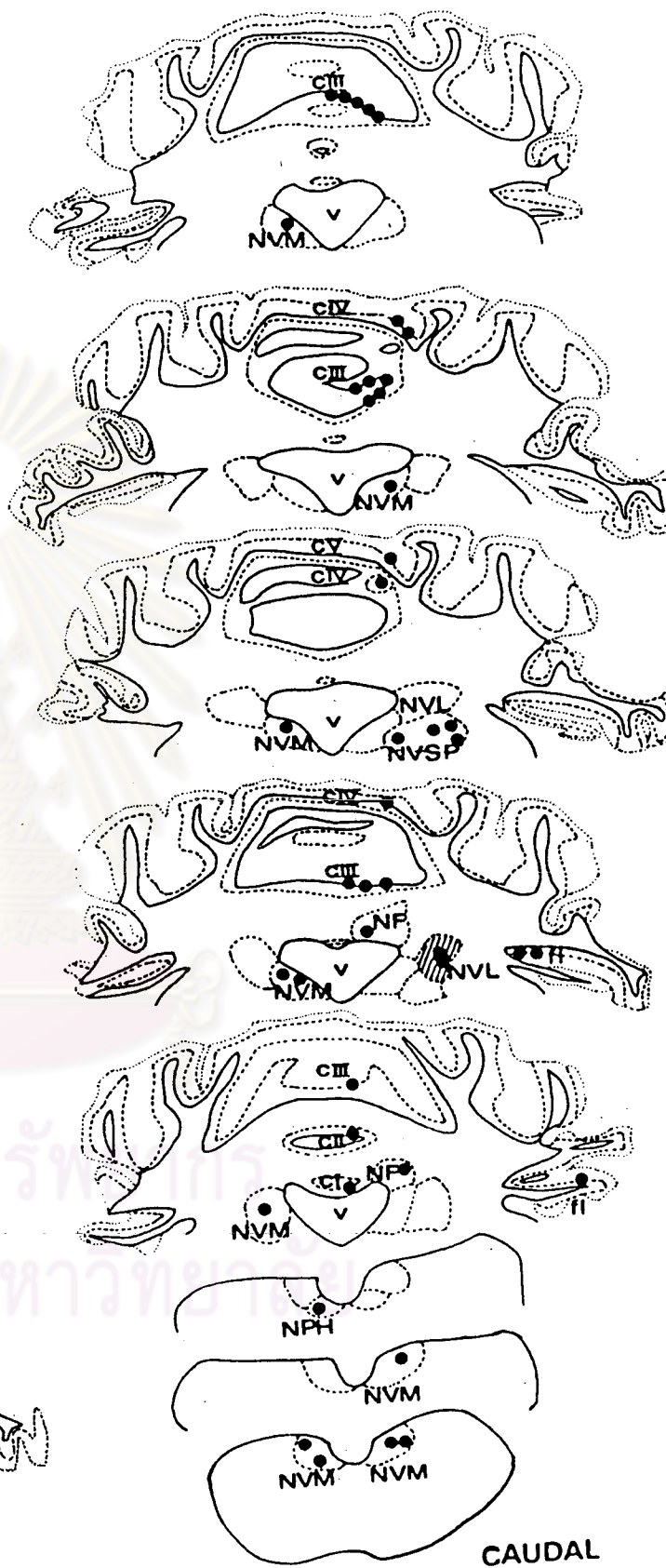
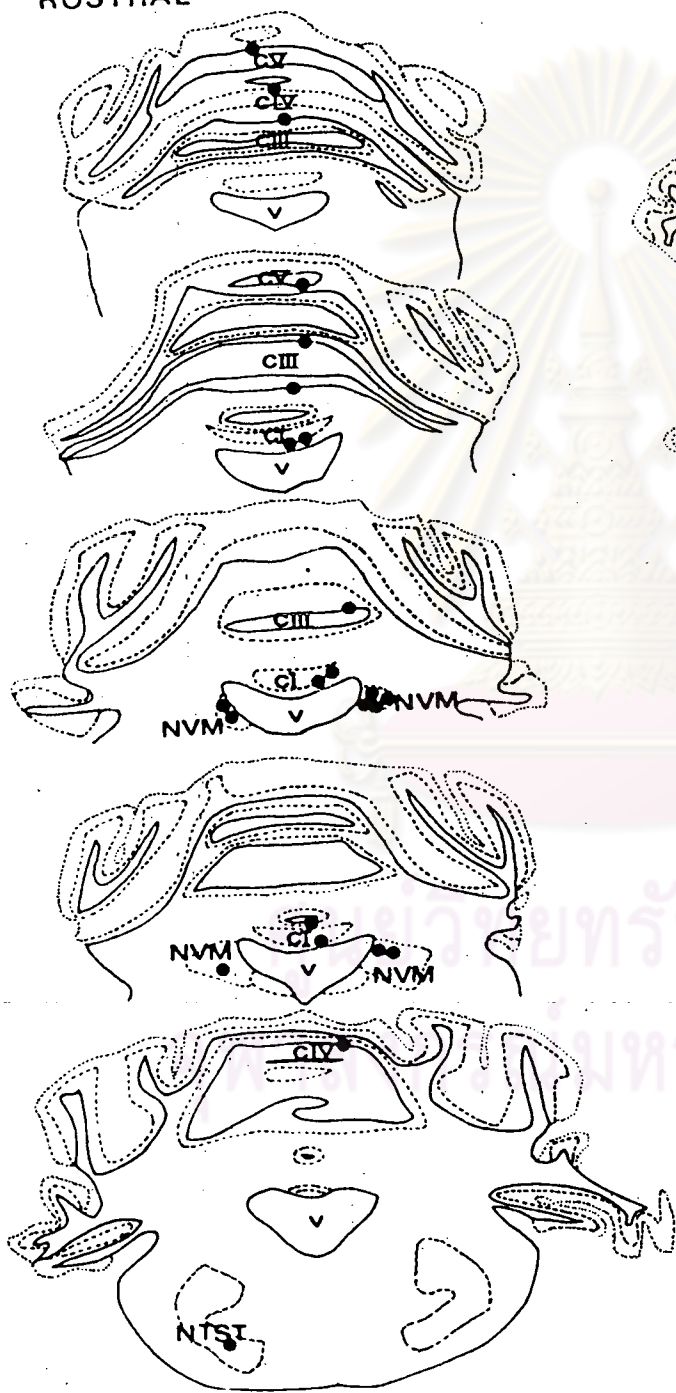
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



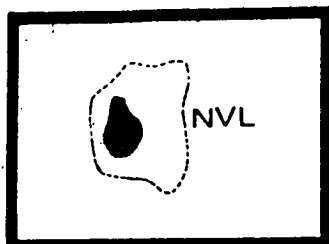
INJECTION SITE



ROSTRAL

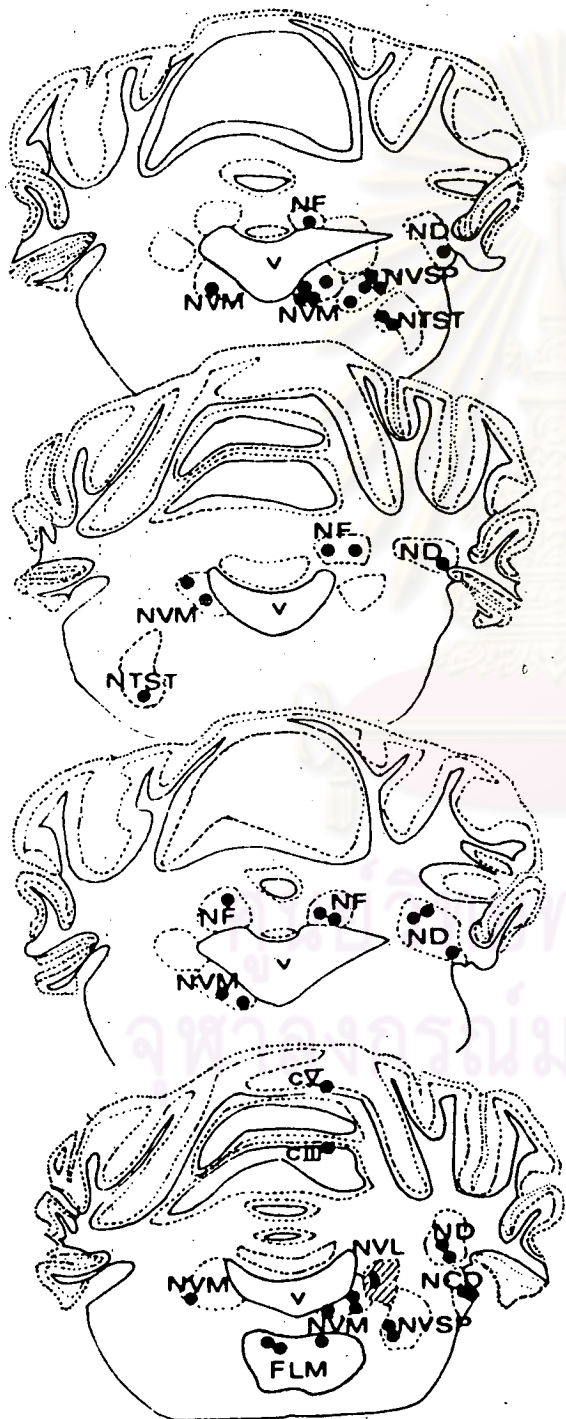


CAUDAL

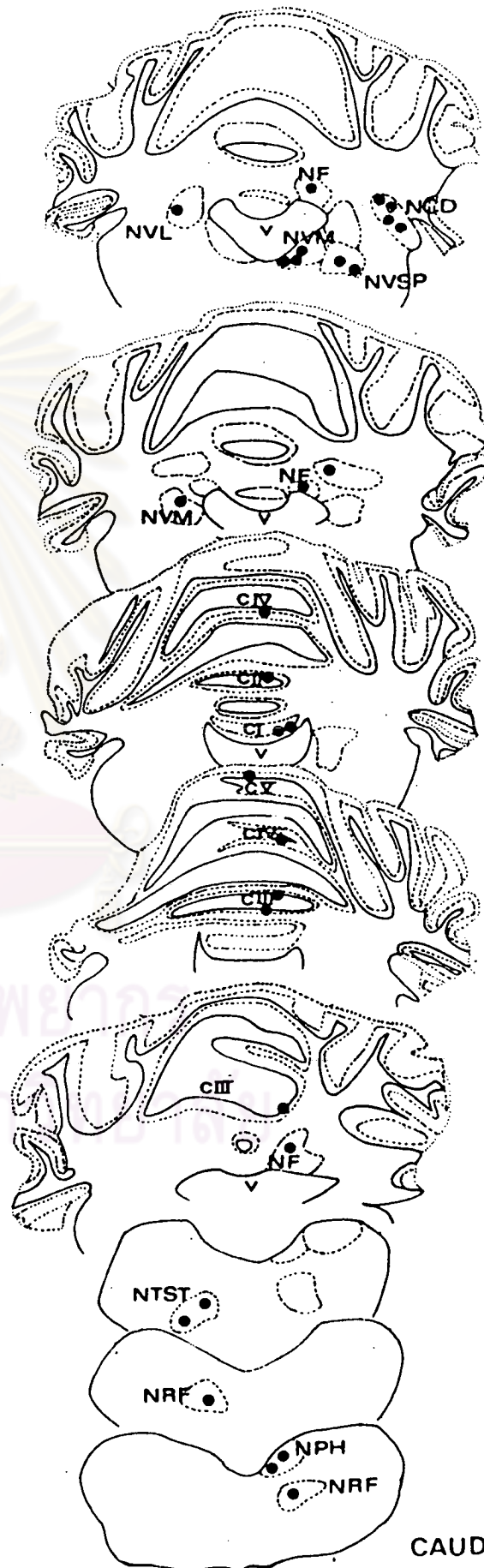


INJECTION SITE

ROSTRAL

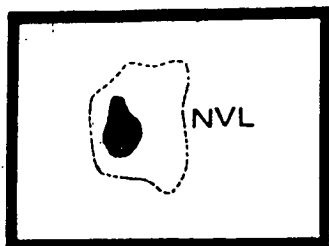


1mm



R-50

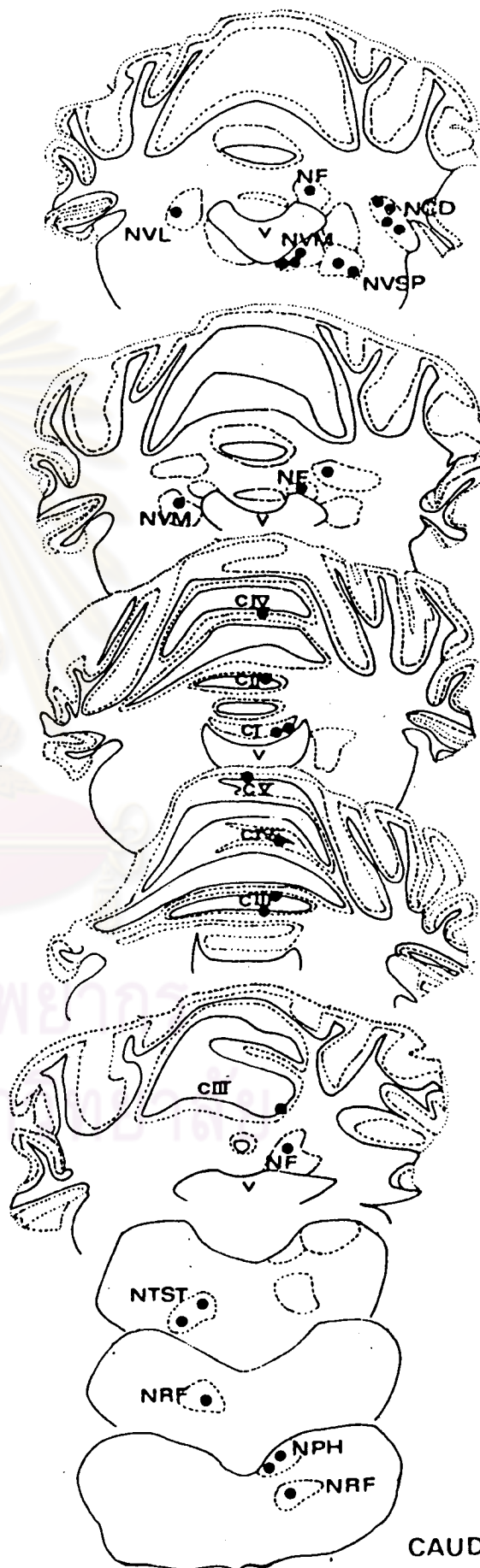
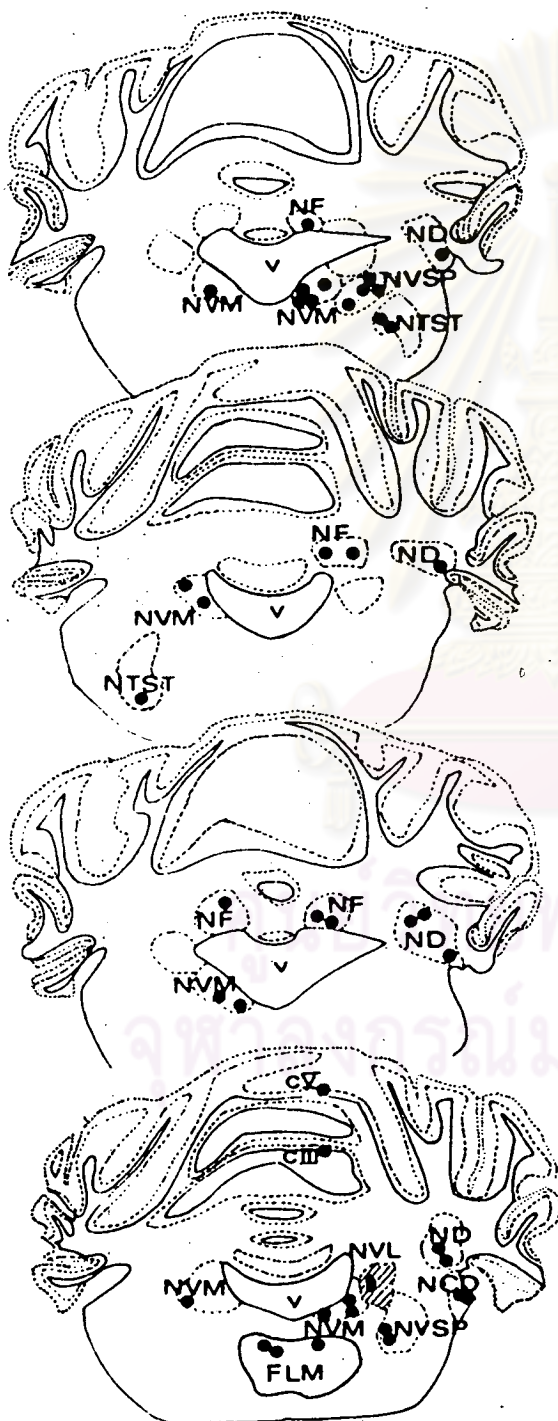
CAUDAL



INJECTION SITE

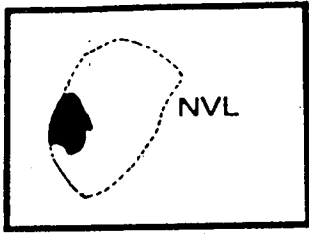
1mm

ROSTRAL



R-50

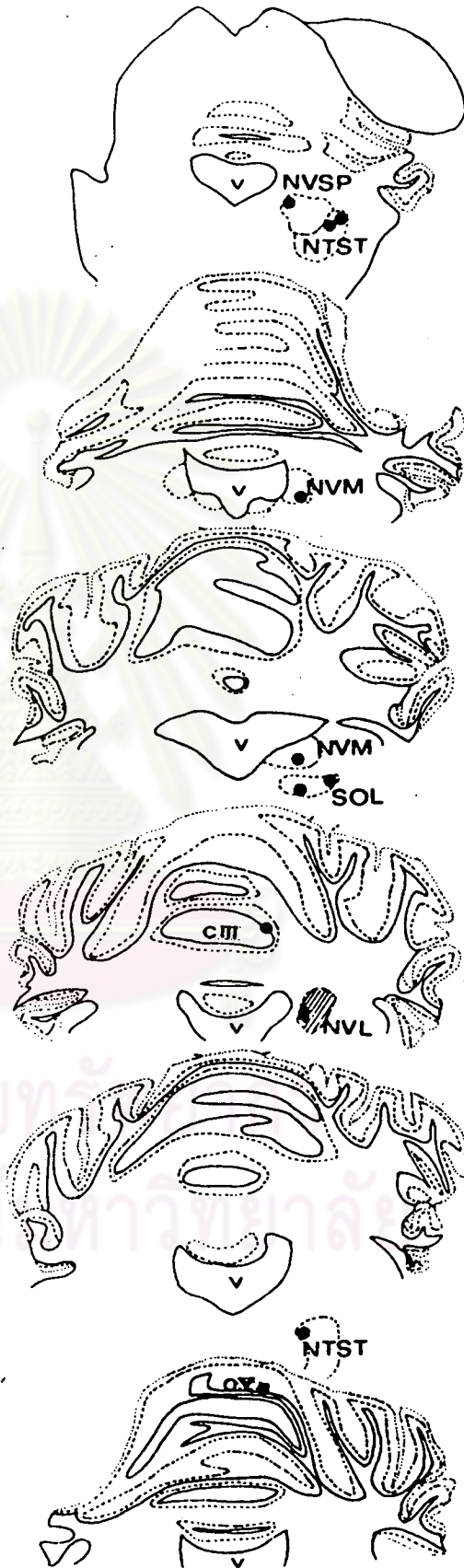
CAUDAL



INJECTION SITE

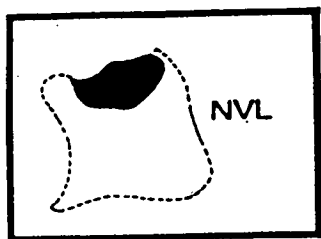
ROSTRAL

4 C
1mm



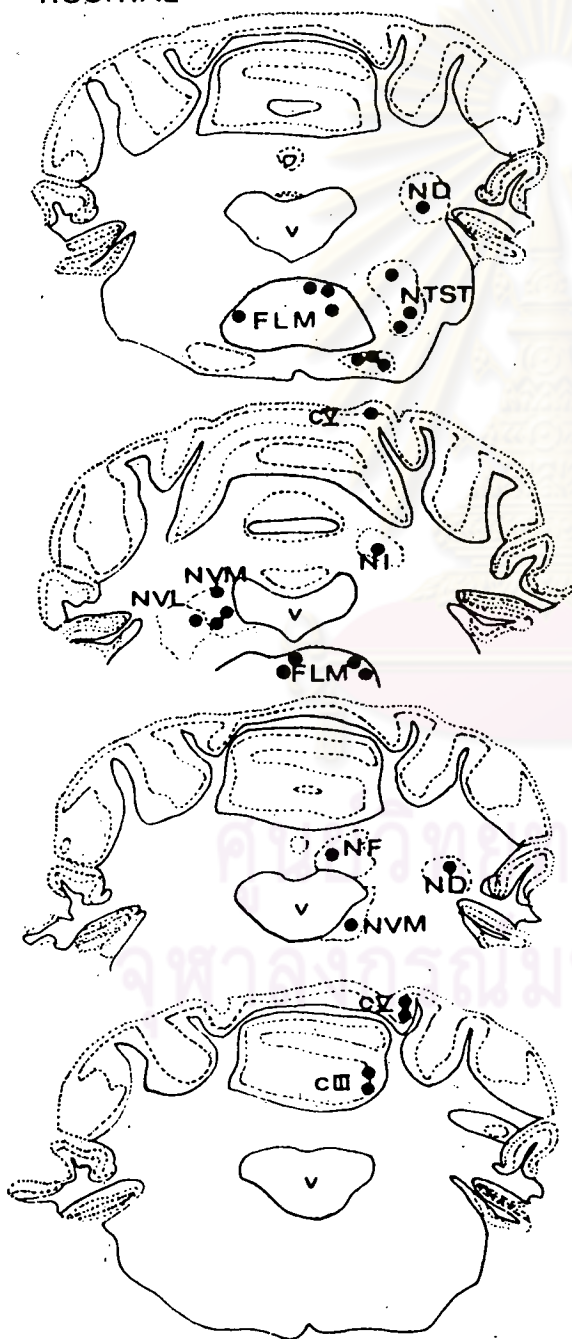
R-49

CAUDAL

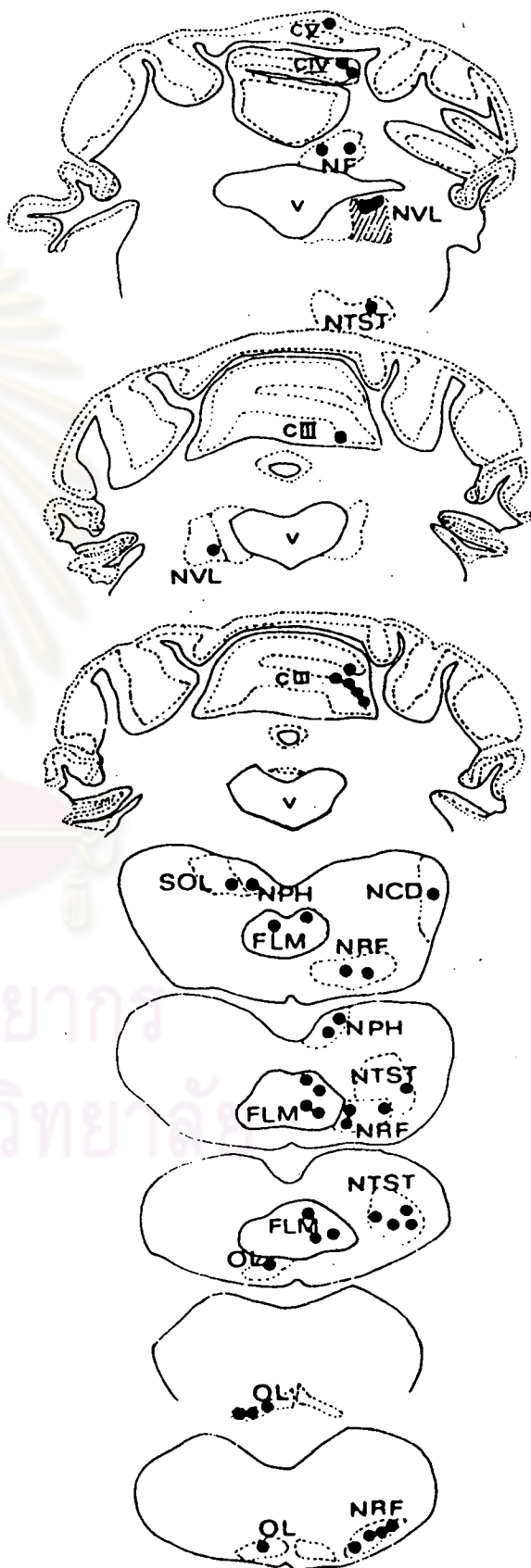


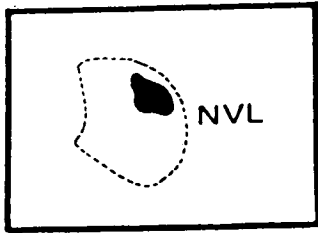
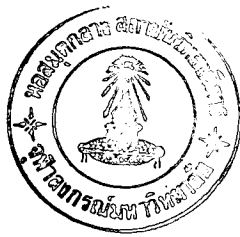
INJECTION SITE

ROSTRAL



1mm



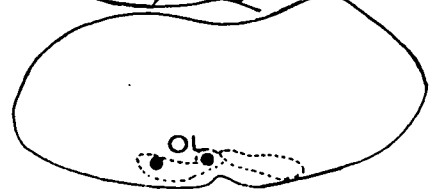
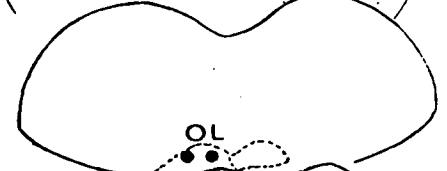
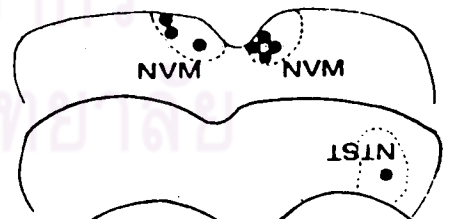
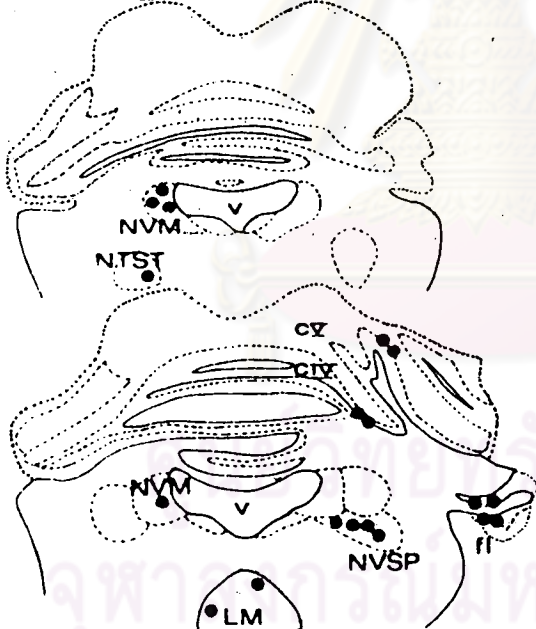
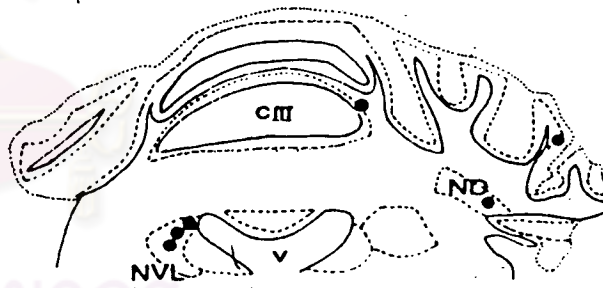
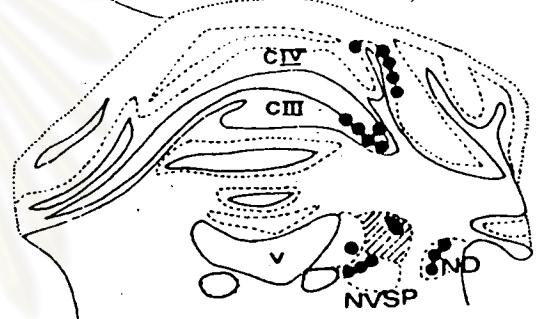
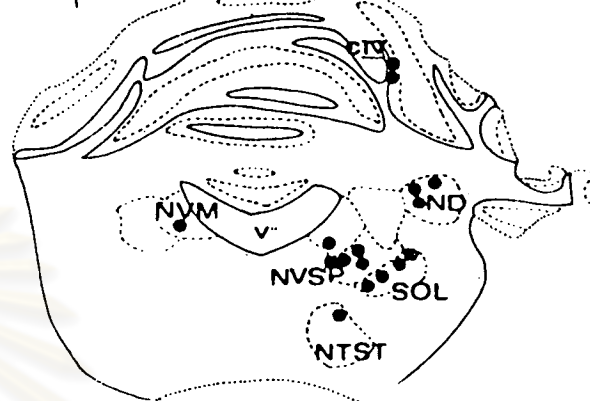
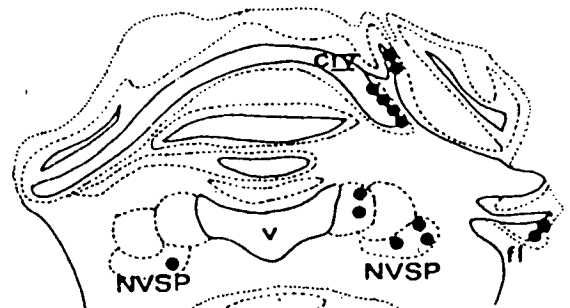
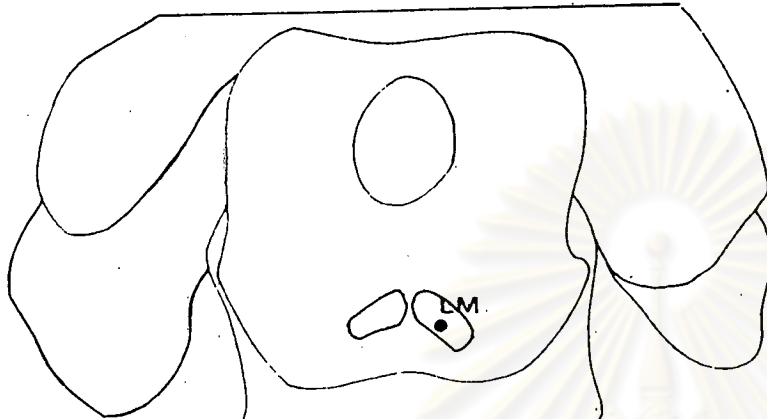


INJECTION SITE

1mm

4E

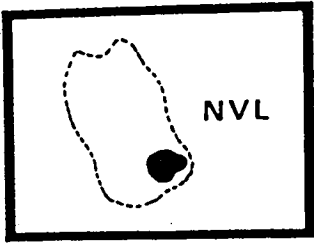
ROSTRAL



CAUDAL

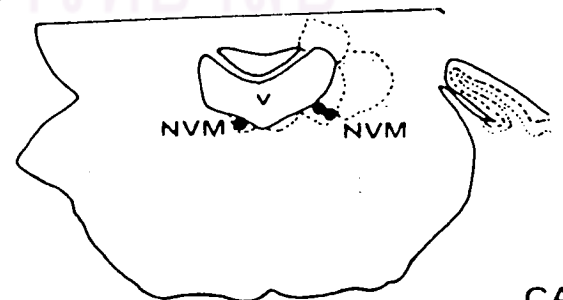
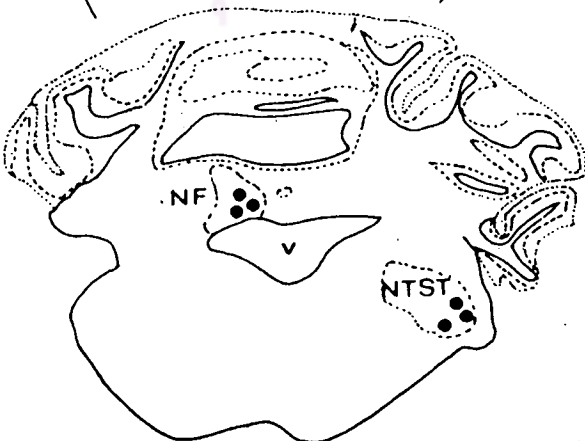
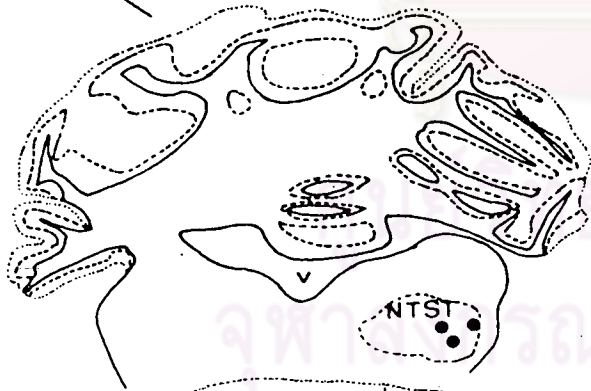
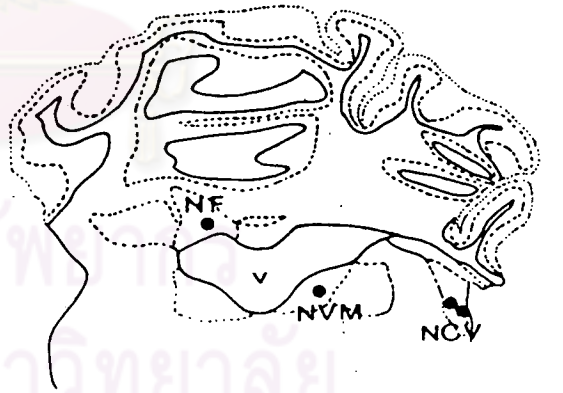
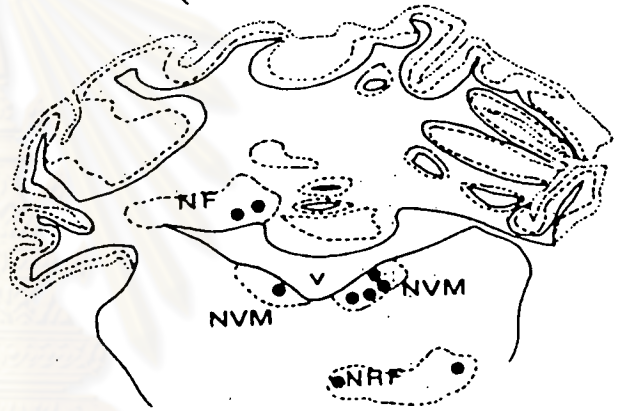
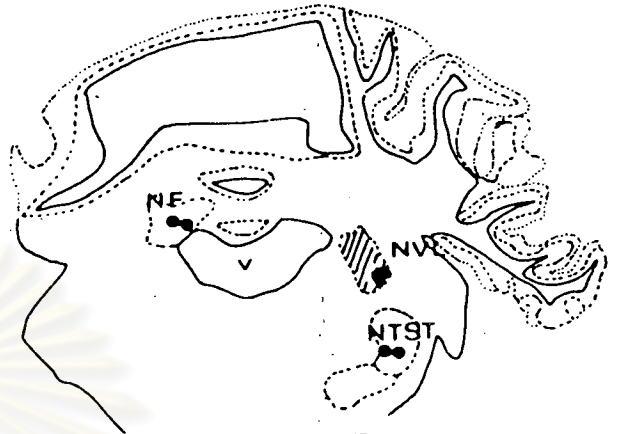
1mm

4 F



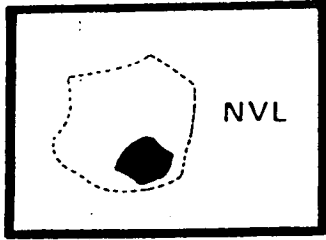
INJECTION SITE

ROSTRAL

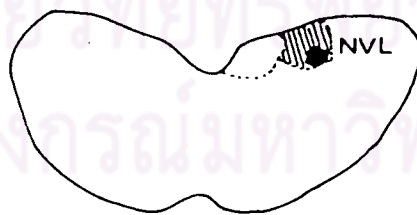
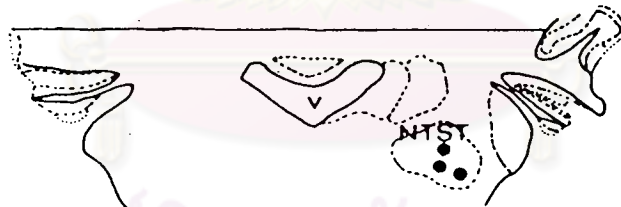


CAUDAL

R-56

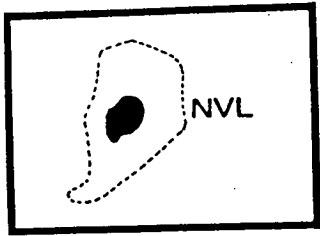


INJECTION SITE



R-64

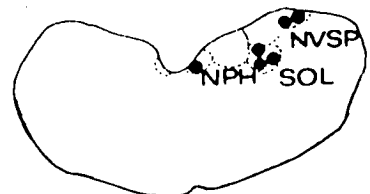
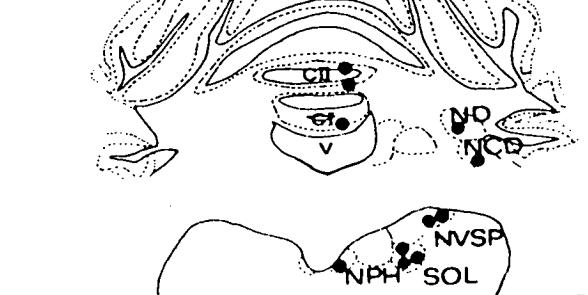
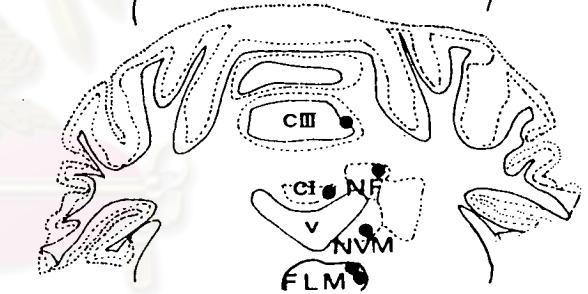
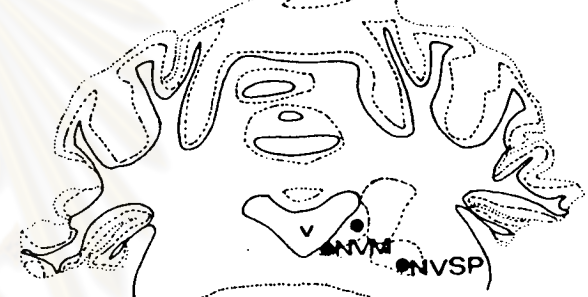
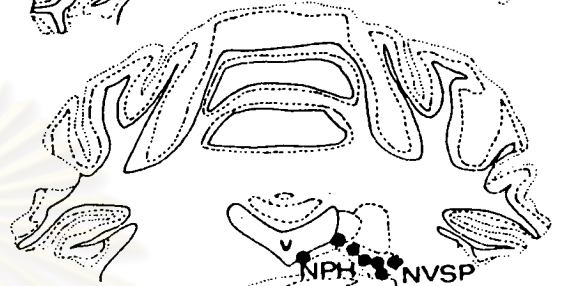
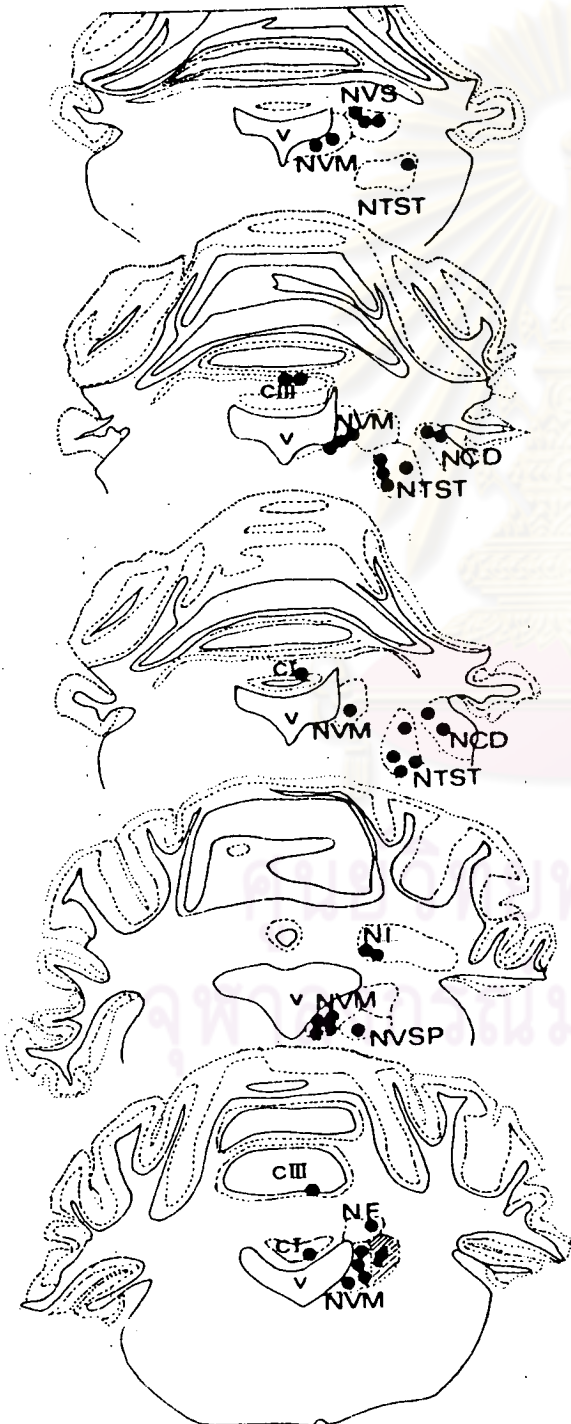
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



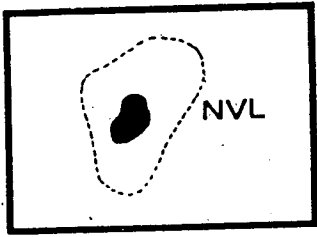
INJECTION SITE

1mm

ROSTRAL

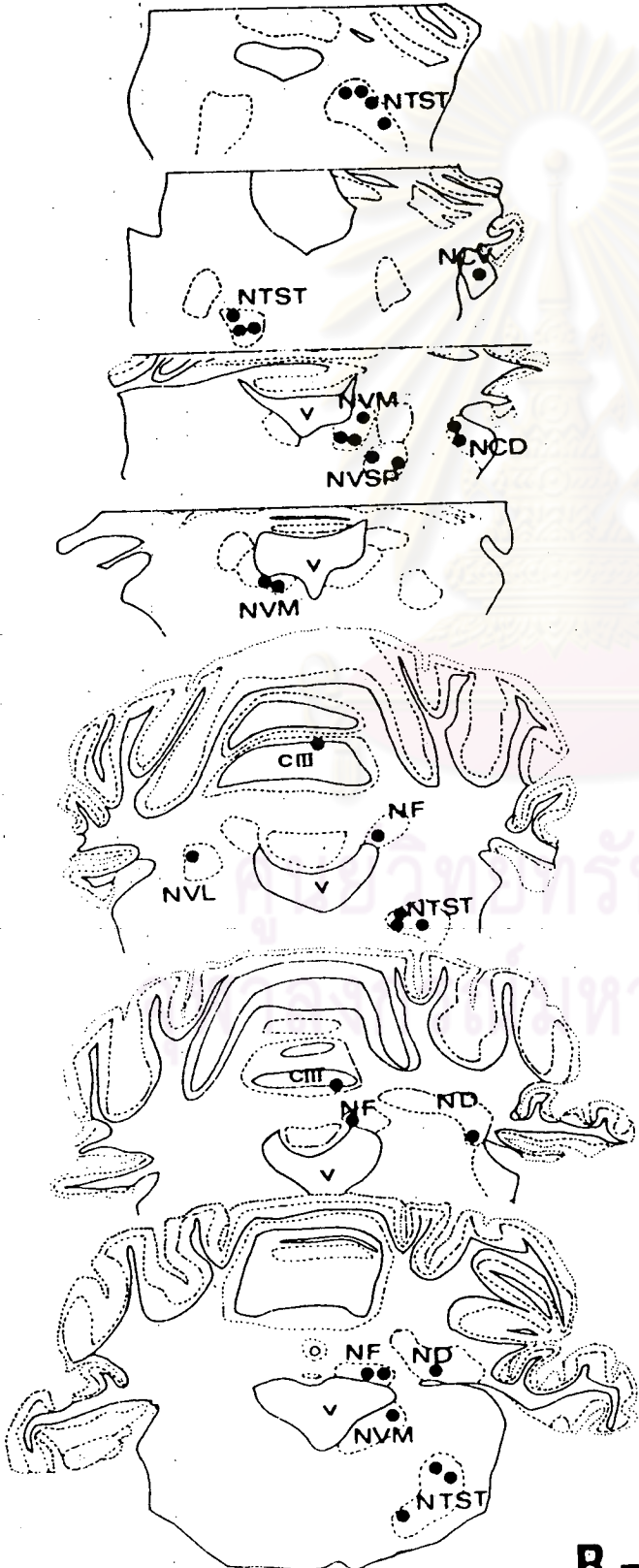


CAUDAL

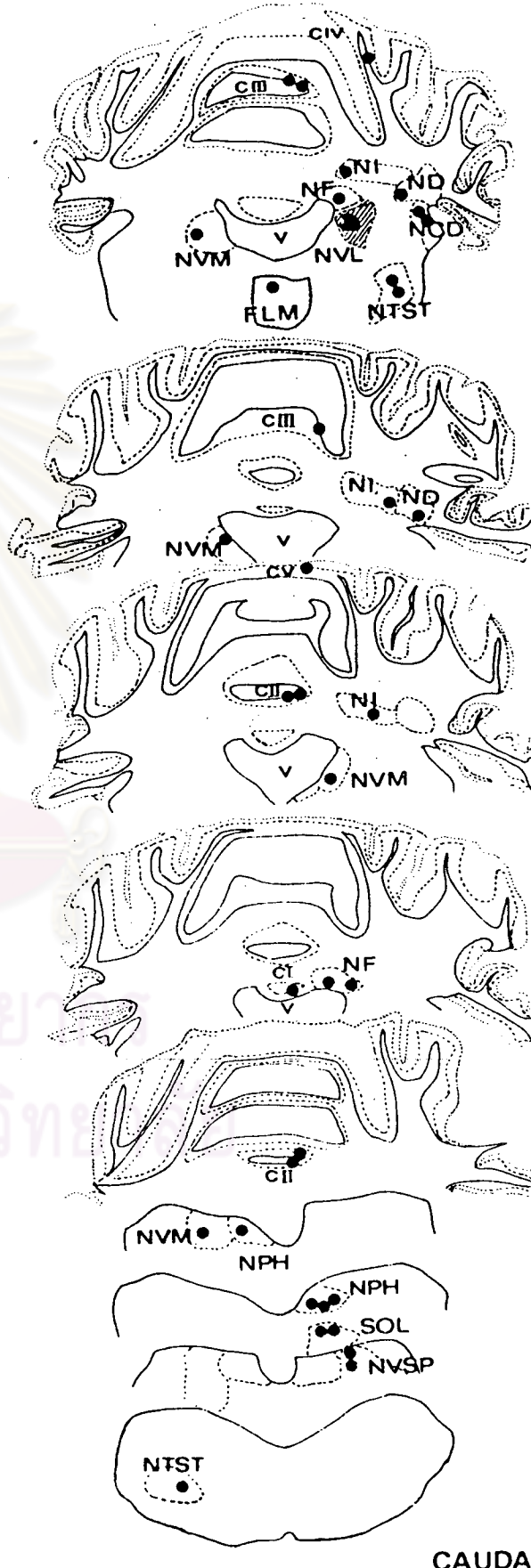


INJECTION SITE

ROSTRAL



1mm



CAUDA

รูปที่ 5 (A-F)

รูปถ่ายแสดง HRP labeled cell ที่พบใน ipsilateral anterior vermis ของ cerebellum

A : กลุ่ม Purkinje cell (ลูกศรชี้) จากหนู R-44

B : Purkinje cell (R-44)

C : Purkinje cell (R-43) แสดงให้เห็น granular layer และ molecular layer ของ cerebellar cortex

D : Purkinje cell (R-43) แสดงให้เห็น HRP granules product ในบริเวณ dendrite ของเซลล์

E : Purkinje cell (R-50)

F : Purkinje cell (R-44) แสดงให้เห็น nucleus ของเซลล์

เส้นตรงได้รูป : 10 ไมครอน



รูปที่ 6 (A-B) รูปถ่ายแสดง HRP labeled cell ที่พบใน ipsilateral flocculus

A : R-43 แสดงให้เห็น granules ของ HRP product และ nucleus ของเซลล์

B : R-44 แสดงให้เห็น dendrite ของเซลล์

เส้นตรงใต้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 (A-B) แสดง HRP labeled cell ที่พบใน fastigial nucleus

A : ipsilateral fastigial nucleus (R-44)

B : contralateral fastigial nucleus (R-56)

เส้นตรงใต้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 (A-B) แสดง HRP labeled cell ที่พบในส่วน contralateral medial accessory olive ของ inferior olivary nucleus (OL) ของหนู R-43

เส้นตรงได้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 (A-D) แสดง HRP labeled cell ที่พบใน medial vestibular nucleus

A : ipsilateral NVM (R-43)

B : contralateral NVM (R-43)

C : contralateral NVM (R-44)

D : contralateral NVM (R-50)

เส้นตรงได้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 (A-B) แสดง HRP labeled cell ที่พบใน contralateral NVL
(giant cell) ของหนู R-43

เส้นตรงใต้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11

A : แสดง HRP labeled cell ที่พบในกลุ่มเซลล์ที่แทรกอยู่ใน medial lemniscus (LM) จากหนู R-43

B : แสดง HRP labeled cell ที่พบในกลุ่มเซลล์ที่แทรกอยู่ใน medial longitudinal fasciculus (FLM) จากหนู R-56

แสดงให้เห็น granule จำนวนมากใน perikaryon ของเซลล์

เส้นตรงได้รูป : 10 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย