ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 24 : 51 - 55 (2533)

การหาตำแหน่งของเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสในสมองเซเรเบลลาคอร์เท็กซ์ของไก่

Neuronal Localization of Butyrylcholinesterase in the Cerebellar Cortex of Chicken

วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ [1]

Voravit Siripholvat

ABSTRACT

The distribution of enzyme butyrylcholinesterase in the chicken cerebellar cortex was studied by histochemical method using butyrylthiocholine as the substrate. The enzyme was uniformly localized in the perikarya and processes of the Bergmann glia or Golgi epithelial cell as well as in the glial cell at the molecular and granular layers. However, a mild reactivity of the enzyme was found in some Purkinje cells, while the others in the vicinity were devoid of it.

บทคัดย่อ

การกระจายตัวของเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสในสมองเซเรเบลลาคอร์เท็กซ์ของไก่ด้วยวิธีฮิสโตเคมมิสทริ โดยใช้บิวทิริลไทโอโคลีนเป็นสารถูกย่อย (substrate) พบตำแหน่งของเอนไซม์จะจำกัดอยู่ในตัวเซลล์และแขนงของเบอร์กแมน เกลียเซลล์ หรือเรียกว่า กอลล์จี อีพิทีเลียล เซลล์ นอกจากนั้นยังพบในตัวเซลล์ของพวกเกียล เซลล์ ที่อยู่ในชั้นของโมเลกูลาและชั้นของแกรนูลาของสมองเซเรเบลลาคอร์เท็กซ์ อย่างไรก็ตามในเซลล์ประสาทยนต์เพอร์คินเจบางส่วนนั้นจะพบว่ามีปฏิกิริยาของเอนไซม์เจือจางมาก ในขณะที่เพอร์คินเจเซลล์ที่อยู่ถัดไปหรือบริเวณใกล้ ๆ จะไม่พบว่ามีปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่อย่างใด

คำนำ

เอนไซม์โคลิเนสเทอร์เรสแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ โคลิเนสเทอร์เรสจริง หรือเรียกอีกชื่อว่า อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรส กับ โคลิเนสเทอร์เรสปลอม ซึ่งจะรวมถึงโคลิเนสเทอร์เรสที่เหลือมักเรียกชื่อว่า ซูโดโคลิเนสเทอร์เรส หรืออาจเรียกเป็นบิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสก็ได้ อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรสสามารถย่อยหรือทำให้การแยกตัวของอะเซทิลไทโอโคลินที่ใช้สำหรับเป็นสารถูกย่อยได้ดีกว่าการใช้บิวทิริลไทโอโคลีน ในทางตรงข้ามบิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสสามารถย่อยบิวทิริลไทโอโคลินได้ดีกว่าอะเซทิลไทโอโคลีน (Aldridge, 1953)

ได้มีการศึกษาถึงตำแหน่งการกระจายตัวของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรสในสมองเซเรเบลลา-

[1] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

คอร์เท็กซ์ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก แต่ที่ศึกษาในไก่โดยใช้กล้องอิเล็กตรอน พบว่าเซลล์ประสาทยนต์หลัก ๆ ทั้ง 5 ชนิดของเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ มีเอนไซม์ชนิดนี้ (Siripholvat *et al,* 1988) สำหรับการศึกษาการย้อมติดเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสจะทำในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนมาก Silver (1967) รายงานว่าจะพบเอนไซม์ชนิดนี้น้อยมากหรือเกือบไม่มีในชั้นโมเลกูลาของเซเรเบลลาคอร์เท็กซ์ในแมว ยกเว้นในเกียลเซลล์ ซึ่งจะมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Kasa *et al,* 1965 ; Silver, 1967) และจากการใช้เทคนิคการย้อมแบบอิมมูโนฮิสโตเคมมิสทริในหนูแรทก็ให้การสนับสนุนผลดังกล่าว (Barth and Ghandour, 1983) นอกจากนั้นการย้อมติดบิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสยังจำกัดอยู่ที่เบอร์กแมน เกียลเซลล์ ซึ่งจะอยู่บริเวณชั้นของเพอร์คินเจ และจัดเป็นเกียลเซลล์ชนิดหนึ่ง และยังย้อมติดเอนโดทีเลียลเซลล์ในเส้นเลือดฝอยของเซเรเบลลาคอร์เท็กซ์ในหนูแรท (Kasa *et al,* 1966 ; Gorenstein *et al,* 1987) อย่างไรก็ตาม Gorenstein *et al* (1987) ยังรายงานว่าเพอร์คินเจเซลล์บางกลุ่มจะย้อมติดเอนไซม์ชนิดนี้เช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้เพื่อดูผลการย้อมติดเอนไซม์ชนิดนี้ในเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ของไก่ซึ่งจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งว่าจะให้ผลสอดคล้องกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือไม่ และความสนใจพิเศษให้กับการจะย้อมติดเพอร์คินเจเซลล์หรือไม่ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

นำไก่ลูกผสม พันธุ์บาร์พลีมัทร็อค กับ พันธุ์อาหรับ อายุประมาณ 6 สัปดาห์ มาทำให้สลบด้วยไดเอทธิล อีเทอร์ ต่อจากนั้นจะฉีดสารทำให้คงสภาพ (fixative) ที่ประกอบด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ 1% กลูทาร์อัลดีไฮด์ 1.25% ในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ ผ่านหัวใจด้านล่างซ้าย (Siripholvat, 1989)

ตัดสมองส่วนเซเรเบลลัมแบ่งครึ่งตามทางยาว แล้วนำไปตัดให้หนาประมาณ 10 ไมครอน ด้วยเครื่องตัด cryostat นำชิ้นส่วนของสมองที่ตัดแล้ววางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลลาติน และเก็บรอไว้ข้ามคืน หรือจะดำเนินการย้อมทันทีก็ได้ โดยนำสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อสมองติดอยู่มาผึ่งให้แห้งด้วยอากาศในห้อง หรือจะใช้เครื่องเป่าลมช่วยก็ได้ ขั้นตอนในการย้อมดำเนินตามแบบของ Hedreen *et al,* (1985) ซึ่งดัดแปลงมาจากขั้นตอนของ Karnovsky and Roots (1964) แต่การใช้สารถูกย่อยสำหรับการย้อมติดบิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสนั้นจะเปลี่ยนมาใช้บิวทิริลไทโอโคลินแทน

ล้างสไลด์ที่มีชิ้นสมองด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 5.4 หลังจากนั้นจะนำมาย้อมในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 – 0.2 mM บิวทิริลไทโอโคลินใน 32.5 ml ของโซเดียมอะซิเตท 0.1 M โซเดียมซิเตรท 4 mM คิวพริกซัลเฟต 3 mM โพแตสเซียมเฟอร์ริไซอะไนด์ 0.1 mM และ BW 284 C 51 ซึ่งใช้สำหรับเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของอะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรส 0.01 mM ที่ pH 5.4 ใช้เวลาย้อมประมาณ 20 ชั่วโมง ล้างด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ทำปฏิกิริยากับ 1% แอมโมเนียมซัลไฟด์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยโซเดียมไนเตรท 0.1 M ประมาณ 5 ครั้ง เพิ่มความเข้มของการย้อมติดด้วย 0.5% ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยโซเดียมไนเตรท 0.1 M อีกประมาณ 5 ครั้ง ทำให้แห้งและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

ชิ้นสมองที่ใช้สำหรับตรวจสอบการย้อม (controlled section) จะถูกย้อมและดำเนินการด้วยวิธีดังกล่าว ยกเว้นในสารละลายที่ใช้ย้อมนั้นจะไม่มีสารถูกย่อยบิวทิริลไทโอโคลินรวมอยู่

ผล

เมื่อนำชิ้นสมองที่ผ่านการย้อมมาดูด้วยกล้องใน

ระดับกำลังขยายต่ำ พบปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นสีน้ำตาลกระจายตัวอยู่ทั้งในชั้นของโมเลกูลา เพอร์คินเจและแกรนูลา เมื่อเทียบกับบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งมีสีเหลืองซีด ในชั้นโมเลกูลานั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์กระจายหนาแน่นและเป็นเส้นยาว ๆ ส่วนในชั้นแกรนูลา กระจายแบบหลวม ๆ และเป็นจุด ๆ

ในชั้นโมเลกูลา – ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่พบในชั้นนี้จะจำกัดอยู่ในส่วนของเกียลเซลล์ และส่วนแขนงของเบอร์กแมน เกลียเซลล์ (Figure 1 and 2) ที่ยื่นจากตัวเซลล์ที่อยู่ในชั้นของเพอร์คินเจผ่านชั้นโมเลกูลาไปยังแกรนูลาชั้นนอกที่อยู่นอกสุด ส่วนเซลล์ประสาทยนต์พวกบาสเกตและสเตลเลทที่อยู่ในชั้นนี้นั้นไม่พบว่ามีการย้อมติดเอนไซม์แต่อย่างใด

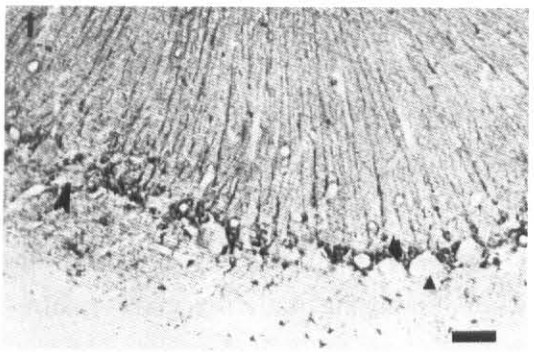


Figure 1. Localization of butyrylcholinesterase in the Bergmann glia cells and its processes (arrow) and in the glial cells of molecular and internal granular layers. Arrow head = mild staining of Purkinje ; Triangle = unspotted Purkinje cell. Scale bar : 40 μ m.

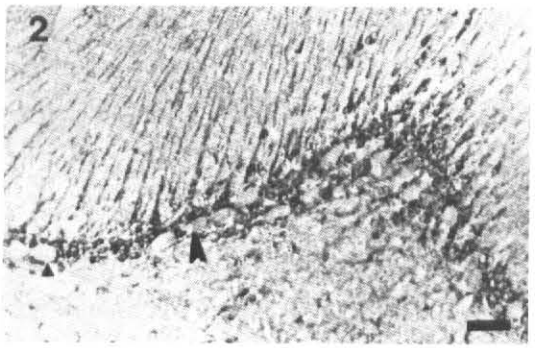


Figure 2. Butyrylcholinesterase activity in the cell bodies and processes of the Bergmann glia and in the glial cells of the cerebellar cortex. Arrow head = mild staining of Purkinje cell ; Triangle = unspotted Purkinje cell. Scale bar : 40 μ m.

ชั้นเพอร์คินเจ – เป็นชั้นที่อยู่ระหว่างชั้นโมเลกูลาและแกรนูลาชั้นใน ประกอบด้วยเพอร์คินเจเซลล์ที่เรียงตัวอยู่เป็นชั้นเดียว การย้อมติดเอนไซม์ของเพอร์คินเจเซลล์จะเป็นแบบจาง ๆ (Figure 1) และการย้อมติดจะมีในเฉพาะบางกลุ่มของเซลล์ ในขณะที่อีกบางกลุ่มที่อยู่ข้างเคียงจะย้อมไม่ติดเลย (Figure 1 and 2) ในชั้นเพอร์คินเจ จะพบพวกเบอร์กแมน เกลียเซลล์ซึ่งมีขนาดเซลล์เล็กมากเมื่อเทียบกับเซลล์ประสาทยนต์เพอร์คินเจ เบอร์กแมน เกลียเซลล์ เหล่านี้จะย้อมติดเอนไซม์เข้มมาก และจะกระจายตัวอยู่บริเวณข้างเคียงหรือรอบ ๆ เซลล์เพอร์คินเจนั่นเอง

ชั้นแกรนูลาชั้นใน – เป็นชั้นในสุดของส่วนเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะพบจำกัดอยู่เฉพาะในเกียลเซลล์เท่านั้น (Figure 1 and 2) ส่วนกอลจีเซลล์นั้นจะไม่มีเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์เต่อย่างใด

ในการศึกษาครั้งนี้จะไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์ในส่วนของเอนโดทีเลียลเซลล์ที่อยู่ในเส้นเลือดฝอยที่กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นของโมเลกูลาและแกรนูลาชั้นใน จะพบแต่เส้นเลือดฝอยที่ย้อมไม่ติดเอนไซม์เท่านั้น (Figure 1)

ใน controlled section ที่ย้อมโดยไม่ใส่สารถูกย่อยบิวทิริลไทโอโคลินนั้น จะไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์ในส่วนใด ๆ ของเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์

วิจารณ์

ตำแหน่งและการกระจายเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสในเกียลเซลล์ ในตัวเซลล์และแขนงของเบอร์กแมน เกลียเซลล์ นั้นให้ผลสอดคล้องกับที่มี

รายงานไว้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น แมว และหนูแรท (Barth and Ghandour, 1983 ; Gorenstein *et al,* 1987 ; Kasa *et al,* 1965 ; 1966) นอกจากนั้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังพบว่ามีปฏิกิริยาของเอนไซม์ในเอนโดทีเลียลเซลล์ที่อยู่ในเส้นเลือดฝอย (Friede and Flemming, 1964 ; Gorenstein *et al,* 1987 ; Kasa *et al,* 1966) ซึ่งเป็นผลตรงข้ามกับที่ทำการทดลองในครั้งนี้ อันอาจเนื่องมาจากขั้นตอนการฉีดไล่เลือด (perfuse) ผ่านหัวใจด้วยสารละลายที่ทำให้คงสภาพนั้น สามารถขับไล่เลือดให้ไหลออกมาหมดได้ จึงไม่เหลือเม็ดเลือดในเส้นเลือดฝอยทำให้ไม่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่อย่างใด แต่ถ้าหากการฉีดไล่เลือด ทำแบบไม่สมบูรณ์หรือปล่อยให้มีเลือดเหลืออยู่ในเส้นเลือดฝอยบ้าง คาดว่าคงต้องย้อมติดเอนไซม์ชนิดนี้เช่นกัน

นอกจากเอนไซม์จะย้อมติดพวกเกียลเซลล์แล้ว ยังพบเอนไซม์ชนิดนี้ในเซลล์ประสาทยนต์ของบริเวณ dorsal thalamus ของหนูแรท (Robertson *et al,* 1986) และในเซลล์ประสาทยนต์เพอร์คินเจของสมองเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ ของหนูแรท (Gorenstein *et al,* 1987) และของนกพิราบซึ่งเป็นพวกสัตว์ปีก (Friede and Flemming, 1964) ผลดังกล่าวจะเป็นการสนับสนุนผลการทดลองในไก่ครั้งนี้ที่พบว่าเพอร์คินเจเซลล์บางกลุ่มจะมีปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่บ้างแต่จางมาก

ตำแหน่งและการกระจายตัวของเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสที่พบจะต่างจากเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรส ในส่วนสมองเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ของไก่ซึ่งเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรสนั้นจำกัดอยู่ในเซลล์ประสาทยนต์หลัก ๆ ทั้ง 5 ชนิดคือ เพอร์คินเจ กอลจี บาสเกต สเตลเลท และแกรนูลาเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์ประสาทยนต์หลัก ๆ เหล่านี้ก็ไม่ใช่คลอลิเนอร์จิก นิวรอน (cholinergic neuron) (Sripholvat *et al,* 1988) ส่วนเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสจะจำกัดอยู่เฉพาะในเกียลเซลล์และเบอร์กแมนเกลียเซลล์ มีเพียงส่วนน้อยที่พบในเพอร์คินเจเซลล์ สันนิษฐานว่า เกียลเซลล์เหล่านี้และเพอร์คินเจเซลล์บางส่วนน่าจะมีบทบาทหรือเกี่ยวข้องกับสารชนิดอื่น ๆ ในสมอง ซึ่งจากการทดลองของ Lockridge (1984) พบว่าเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสารชนิด พี (Substance P) แต่อย่างไรก็ตามบทบาทที่แท้จริงของเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เนสในสมองนั้นยังจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากกว่านี้

จากการทดลองหาตำแหน่งของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอร์เรสในสมองเซเรเบลลา คอร์เท็กซ์ในแมวที่ตัดตามแนวขวาง พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์จะจำกัดเป็นแถบเล็ก ๆ สลับกับแถบที่ไม่มีปฏิกิริยาสลับกันไป (Marani and Voogd, 1977) ซึ่งผลดังกล่าวอาจเนื่องจากสมองเซเรเบลลัม ถึงแม้จะประกอบด้วยเซลล์ประสาทยนต์หลัก ๆ 5 ชนิดที่เหมือน ๆ กันแต่ตำแหน่งของเซลล์ประสาทยนต์เหล่านี้ที่กระจายอยู่ตามโฟเลียมทั้ง 10 ของเซเรเบลลัมนั้นย่อมทำหน้าที่แตกต่างกันไป โดยจะได้รับปลายประสาทกระตุ้น (afferent) ทั้งจากไคลบิง ไฟเบอร์ (climbing fiber) ซึ่งยื่นส่งมาจากเซลล์ประสาทยนต์ โอลิวารี (olivaries) และมอสซี ไฟเบอร์ (mossy fiber) ซึ่งยื่นส่งมาจากเซลล์ประสาทยนต์ส่วนต่าง ๆ หลายแหล่ง เช่น เซลล์ประสาทยนต์จากไขสันหลัง (spinal cord) ส่วนปลายประสาทกระตุ้น (efferent) ซึ่งเป็น axon ที่ยื่นมาจากเพอร์คินเจของโฟเลียมต่าง ๆ จะถูกส่งไปยังเซลล์ประสาทยนต์แหล่งอื่น ๆ อีกมาก ดังนั้นการย้อมติดเอนไซม์บิวทิริลโคลิเนสเทอร์เรสแบบจาง ๆ ของเพอร์คินเจเซลล์บางกลุ่ม กับอีกบางกลุ่มที่ย้อมไม่ติดน่าเป็นผลจากเพอร์คินเจเซลล์เหล่านั้นทำหน้าที่ที่แตกต่างกันไป

เอกสารอ้างอิง

Aldridge, W.N. 1953. The differentiation of true and pseudocholinesterase by organophosphorus compounds. Biochem. J. 53 : 62 - 67.

Barth, F. and M.S. Ghandour, 1983. Cellular localization of butyrylcholinesterase in adult rat cerebellum determined by immunofluorescence. Neurosci. Lett. 39 : 149 - 153.

Friede, R.L. and L.M. Flemming, 1964. A comparison of cholinesterase distribution in the cerebellum of several species. J. Neurochem. 11 : 1 - 7.

Gorenstein, C., M.C. Bundman, J.L. Bruce and A. Rotter, 1987. Neuronal localization of pseudocholinesterase in the rat cerebellum ; sagittal bands of Perkinje cells in the nodulus and uvula. Brain Res. 418 : 68 - 75.

Hedreen, J.C., S.J. Bacon and D.L. Price, 1985. A modified histochemical technique to visualize acetyl cholinesterase - containing axons. J. Histochem. Cytochem. 33 : 134 - 140.

Karnovsky, M.J. and L. Roots, 1964. A " direct - coloring " thiocholine method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem. 12 : 219 - 221.

Kasa, P., Joo, F. and B. Csillik, 1965. Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cat cerebellar cortex. J. Neurochem. 12 : 31 - 35.

Kasa, P., B. Csillik, F. Joo, and E. Knyihar, 1966. Histochemical and ultrastructural alterations in the isolated archicerebellum of the rat. J. Neurochem. 13 : 173 - 178.

Lockridge, O. 1982. Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. J. Neurochem. 107 : 106 - 110.

Marani, E. and J. Voogd, 1977. An acetylcholinesterase band - pattern in the molecular layer of the cat cerebellum. J. Anat. 127 : 335 - 345.

Robertson, R., C.L. Lieu., K. Lee, and C. Gorenstein, 1986. Distribution of " non - specific " cholinesterase - containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. Brain Res. 368 : 116 - 124.

Silver, A. 1967. Cholinesterases of the central nervous system with special reference to the cerebellum. Int. Rev. Neurobiol. 10 : 57 - 109.

Siripholvat, V.,T. Watanabe, and T. Tomita, 1988. Cytochemical study on the distribution of acetylcholinesterase (AChE) in the cerebellar cortex of chickens. Electron Microscopy pp. 433 - 434.

Siripholvat, V. 1989. GABA immunohistochemical study in the lower auditory brainstem nuclei of chickens. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 23 (2) : 167 - 171.