ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 23 : 167 - 171 (2532)

การศึกษา GABA ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมมิสทรีในเซลล์ประสาทการได้ยินตอนล่างในบริเวณ brainstem ของไก่

GABA Immunohistochemical Study in the Lower Auditory Brainstem Nuclei of Chickens

วรวิทย์ สิริพลวัฒน์[1]

Voravit Siripholvat

ABSTRACT

Using immunohistochemical technique to study the distribution of GABA (Gamma-aminobutyric-acid) reactivity in the lower auditory brainstem nuclei, nucleus magnocellularis (NM) and nucleus laminaris (NL). GABA immunoreactivity was not found in the cell bodies of these neurons. On the contrary, the immunoreactivity was strongly localyzed in the axon terminals surrounding NM and NL, and in the punctate profiles which was presumed to be synapse with dendrites of NL. This investigation suggested that both NM and NL were not GABA-ergic neurons. However, at least, GABA was supposed to involve in inhibitory action of the lower auditory brainstem pathway.

บทคัดย่อ

การใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมมิสทริ เพื่อศึกษาถึง GABA ในเซลล์ประสาทยนต์ NM และ NL ที่อยู่ในส่วนของระบบประสาทการได้ยินตอนล่างในบริเวณ brainstem (lower auditory brainstem) พบว่าในเซลล์ประสาทยนต์ NM และ NL จะไม่มีปฏิกิริยาของ GABA แต่จะพบปฏิกิริยาของ GABA เป็นจุดเล็ก ๆ สีเข้ม ในบริเวณรอบ ๆ cell bodies ของ NM และ NL และรอบ ๆ dendrites ของ NL ซึ่งจุดเล็ก ๆ ของปฏิกิริยาของ GABA ที่เห็นจะเป็นปลาย axon ที่ยื่นมาจากเซลล์ประสาทยนต์ที่เป็น GABA-ergic การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้ทราบว่าเซลล์ประสาทยนต์ NM และ NL ไม่ใช่เป็นแบบ GABA-ergic แต่จากการที่พบปฏิกิริยาของ GABA เป็นจุดเล็ก ๆ นั้นก็คาดว่า GABA จะต้องเกี่ยวข้องกับระบบการได้ยินตอนล่างในบริเวณ brain-stem pathway.

คำนำ

ไก่เป็นสัตว์ปีกที่จัดได้ว่ามีความไวและตื่นตัวมากต่อการได้ยินเสียง ซึ่งการได้ยินนี้เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาทยนต์ที่อยู่ในส่วนของ forebrain (Muller and Scheich, 1987) ในส่วนของ midbrain (Conlee

[1] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

and Parks, 1986) และในส่วนของ brainstem (Parks, 1981) เซลล์ประสาทยนต์ในส่วนของ brainstem ยังแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เซลล์ประสาทการได้ยินตอนบนของ brainstem ประกอบด้วย nucleus ventralis lemnisci lateralis (VLV) และ nucleus olivaris superior (OS) และกลุ่มเซลล์ประสาทการได้ยินตอนล่างของ brainstem ซึ่งมี nucleus magnocellularis (NM), nucleus laminaris (NL) และ nucleus angularis (NA) (Youngren and Phillips, 1978) ซึ่งทั้ง NM, NL และ NA จะยื่น axon ไป synapse กับ VLV และ OS (Conlee and Parks, 1986) และ NM กับ NA จะได้รับการ synapse จาก cochlear nerve (Parks, 1981) เป็นส่วนใหญ่

GABA เป็น inhibitory neurotransmitter ที่พบในระบบสมองส่วนกลาง (Krnjevic, 1974) และมีรายงานว่า GABA มีส่วนเกี่ยวข้องกับการได้ยินเสียงของไก่ โดยพบว่าในส่วนของ auditory forebrain จะมีปฏิกิริยาของ GABA ในปริมาณที่สูง (Muller and Scheich, 1987) นอกจากนั้น Muller (1987) ยังพบว่าจะมีปฏิกิริยาของ GABA ในตัวเซลล์ประสาทยนต์ของ VLV และ OS ซึ่งศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมมิสทริ จากข้อมูลดังกล่าวจึงทำให้อยากทราบว่า เซลล์ประสาทยนต์ NM, NL และบริเวณรอบ ๆ ตัวเซลล์เหล่านี้ จะมี GABA อยู่หรือไม่ เพื่อที่จะทำให้ทราบบทบาทของ GABA ที่เกี่ยวข้องกับการได้ยินเสียงได้ดีขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ไก่ไวท์เล็กฮอร์น อายุประมาณ 3–5 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว ถูกทำให้สลบด้วย diethyl ether หลังจากนั้นไก่ถูก perfuse ผ่านหัวใจด้านล่างซ้ายด้วย fixative ซึ่งประกอบด้วย formalaldehyde 1% และ glutaraldehyde 1.25% ใน cacodylate buffer pH 7.2 โดยมี calcium acetate ในปริมาณ 2 มิลลิโมล่าผสมอยู่ สมองส่วนของ brainstem ถูกนำออกมาและแช่ลงใน fixative สูตรเดิมเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นนำไปล้างข้ามคืนใน Isotonic sodium sulphate solution (washing solution) ที่ผสม sucrose 20% ที่อุณหภูมิ 4° ซ. โดยเปลี่ยน washing solution บ่อย ๆ ครั้ง

สมอง brainstem ถูกนำไปตัดหนาประมาณ 20 ไมครอน ด้วยเครื่อง cryostat แล้วแผ่ลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยเจลลาติน เตรียมพร้อมที่จะนำมาย้อม GABA ด้วยขบวนการย้อมแบบ unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) (Sternberger, 1986) ตามขั้นตอนย่อ ๆ ดังนี้ (สภาพอุณหภูมิที่ใช้ในการย้อมถ้าหากไม่ได้ระบุเป็นอื่นแสดงว่าย้อมในสภาพอุณหภูมิห้อง)

1. ล้างด้วย Tris-buffer saline (TBS) pH 7.3 ซึ่งประกอบด้วย Triton x-100 0.4% เป็นเวลา 20 นาที
2. ทำปฏิกิริยาใน 20% heat-inactivated normal goat serun (NGS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ย้อมใน antiserum ต่อ GABA (Maruzen Oil Biochemical, Inc.) ซึ่งเจือจางด้วย Tris-buffer saline ในสัดส่วน 1 : 1,000 ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ย้อมใน goat-anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (Cooper Biochemical) ซึ่งเจือจางด้วย Tris-buffer saline ในสัดส่วน 1 : 40 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. ย้อมใน PAP (Zymed Laboratories, Inc.) ซึ่งเจือจางด้วย Tris-buffer saline 1 : 100 ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

เมื่อเสร็จสิ้นการย้อมในขั้นตอนที่ 2, 3, 4 และ 5 ทุกครั้งจะต้องล้างด้วย TBS เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีเป็นอย่างต่ำ หลังจากนั้นจะนำมาทำปฏิกิริยากับ 0.05% DAB และ 0.01% H_2O_2 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย Phosphate buffer ต่อมานำมาเพิ่มความ

เข้มของการย้อมด้วย 0.01% OsO_4 เป็นเวลา 5 นาที นำมา dehydrate ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ และปิดด้วย cover-slip นำมาดูผลด้วย Light microscope.

สำหรับ section ข้างเคียงที่ใช้เป็น control ขบวนการย้อมจะเหมือนทุกขั้นตอน ตามที่กล่าวไว้ข้างบน ยกเว้นในขั้นตอนที่ 3 แทนที่จะย้อมด้วย antiserum ต่อ GABA ก็เปลี่ยนเป็นใช้ NGS แทน

ผล

Nucleus Magnocellularis : ขนาดและรูปทรงของ NM จะค่อนข้างกลมใหญ่และกระจายเป็นกลุ่มแถวยาวหลายแถว ภายใน cell body จะไม่พบปฏิกิริยาของ GABA แต่บริเวณรอบ ๆ ที่ติดกับ cell membrane ของ NM เหล่านี้ จะมีปฏิกิริยาของ GABA เป็นจุดเล็ก ๆ อย่างเด่นชัด (Figure 1) ซึ่งจุดเล็ก ๆ ที่ปรากฏนี้จะเป็นปลาย axon ที่ยื่นมาจาก GABA-ergic neurons มา synapse กับ cell body ของ NM

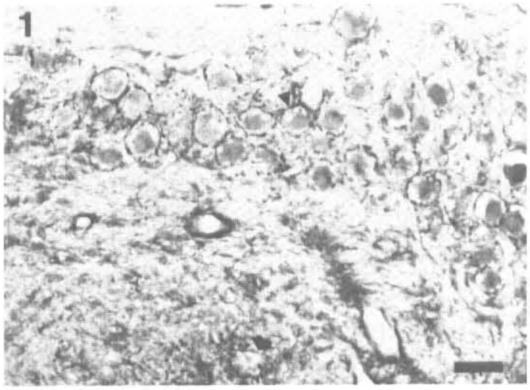

Figure 1. GABA - positive terminals around both GABA - negative somata in NM (arrow head) and in NL (arrow). Scale bar = 40 μm.

Nucleus laminaris : เซลล์ประสาทยนต์พวกนี้จะมีขนาดเล็กกว่า NM และจะจัดเรียงตัวอยู่เป็นแถวเดียวเท่านั้น ตำแหน่งจะอยู่ใกล้กับ NM ภายใน cell body ของ NL เหมือนกับที่พบใน NM คือจะไม่มีปฏิกิริยาของ GABA แต่จะพบจุดเล็ก ๆ เข้มข้นของปฏิกิริยา GABA เฉพาะรอบ ๆ cell membrance และ dendrites ของ NL (Figure 2) นอกจากนั้นบริเวณข้าง ๆ NL จะพบเซลล์ประสาทยนต์ขนาดเล็กเพียงไม่กี่เซลล์ และเซลล์เหล่านี้จะย้อมติด GABA ใน cell body (Figure 2)

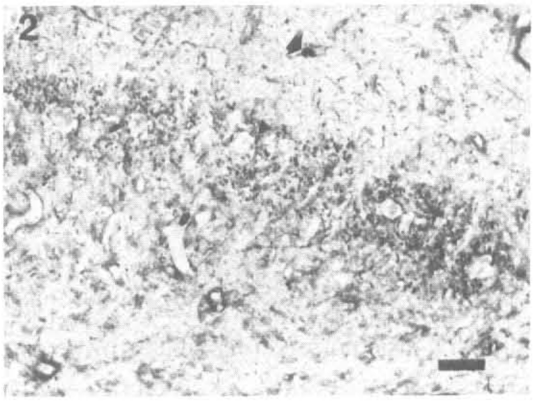

Figure 2. The densely stained terminals are present both in association with unstained neurons in NL (arrow head) and in association with dendrite. In the dendritic layer a few GABA - positive neurons are only found (arrow). Scale bar = 40 μm.

ใน section ข้างเคียงที่ใช้เป็น control นั้น ไม่ปรากฏว่ามีปฏิกิริยาของ GABA ที่บริเวณใด ๆ ของ section เลย จะพบก็เฉพาะความเข้มของ background สีน้ำตาลจาง ๆ เหมือนกันหมด ซึ่ง background เช่นนี้ก็พบใน section ที่ย้อมด้วย antiserum ต่อ GABA เช่นกัน จึงพอกล่าวได้ว่าปฏิกิริยาของ GABA ที่เกิดขึ้นนี้เป็น reactivity ที่เฉพาะเจาะจงกับ GABA แต่ไม่ใช่เนื่องมาจากการเกิด cross-reactivity จาก secondary antibody (goat - anti - rabbit serum) หรือ NGS แต่อย่างใด

วิจารณ์

เซลล์ประสาทยนต์ NM และ NL ที่ไม่มีปฏิกิริยาของ GABA ภายใน cell นั้น ย่อมบ่งบอกได้ชัดเจนว่า

เซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ใช่เซลล์ประสาทยนต์แบบ GABA-ergic ส่วนรอบ ๆ cell bodies ของ NM และ NL และรอบ ๆ dendrites ของ NL นั้น ปรากฏมีปฏิกิริยาของ GABA เป็นจุดเล็ก ๆ แสดงว่าทั้ง NM และ NL ได้รับการ synapse จากปลาย axon ของเซลล์ประสาทยนต์แบบ GABA-ergic เป็นที่น่าสังเกตว่า dendrites ด้านบนของ NL จะได้รับการ synapse จากปลาย axon ของ NM ที่อยู่ในด้านเดียวกัน (ipsilateral) ส่วน dendrites ด้านล่างนั้นจะได้รับการ synapse จาก NM ที่อยู่ในด้านตรงข้าม (contralateral)(Heil and Scheich, 1986) แต่เซลล์ประสาทยนต์ NM ไม่ใช่ GABA-ergic ตามที่กล่าวข้างต้น แสดงว่าจุดเล็ก ๆ ของปฏิกิริยาของ GABA ที่ล้อมรอบ NL อยู่นั้นย่อมไม่ใช่ปลาย axon ที่ยื่นมาจาก NM แต่อย่างใด นอกจาก NM และ NL ของระบบประสาทการได้ยินตอนล่างในส่วนของ brainstem แล้ว ยังมีเซลล์ประสาทยนต์อีกชนิดหนึ่งคือ NA ซึ่งพบว่ามีปฏิกิริยาของ GABA อยู่ภายในตัวเซลล์ (Muller, 1987) จึงน่าที่จะเป็นไปได้หรือไม่ว่าจุดเล็ก ๆ ของปฏิกิริยาของ GABA นั้นจะเป็นปลาย axon ที่ยื่นมาจาก NA หรืออาจจะมีบางส่วนที่เป็นปลาย axon ที่ยื่นมาจากเซลล์ประสาทยนต์ขนาดเล็กที่พบอยู่ใกล้ ๆ กับกลุ่มของ NL ซึ่งย้อมติด GABA เช่นกัน

ปลาย axon ของเซลล์ประสาทยนต์ทั้งของ NM และ NL ยื่นไป synapse กับเซลล์ประสาทยนต์ VLV และ SO ของระบบประสาทการได้ยินตอนบนในบริเวณ brainstem (Conlee and Parks, 1986) ซึ่งเซลล์ประสาทยนต์ทั้ง VLV และ SO ดังกล่าวนั้นมีปฏิกิริยา GABA ใน cell bodies (Muller, 1987) ในขณะที่ NM และ NL จะไม่มีปฏิกิริยาของ GABA ยกเว้นในบริเวณรอบ ๆ cell bodies และรอบ ๆ dendrite เฉพาะใน NL ซึ่งพอที่จะกล่าวได้ว่า GABA neurotransmitter ชนิดนี้จะต้องเกี่ยวข้องกับ auditory brainstem โดยที่เซลล์ประสาทยนต์ของ NM และ NL ยกเว้น NA ของระบบประสาทการได้ยินตอนล่างในบริเวณ brainstem ไม่ทำหน้าที่เป็น inhibitory neurons ในขณะที่ NA และเซลล์ประสาทของระบบการได้ยินตอนบนในบริเวณ brainstem, VLV และ SO ทำหน้าที่เป็น inhibitory neurons.

การทดลองนี้ได้ผลสอดคล้องกับที่มีรายงานของ Sullivan and Kinoshi (1984) ที่พบว่า เซลล์ประสาทยนต์ anteroventral conchlear nucleus ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ปรากฏว่ามีปฏิกิริยาของ GABA เหมือนกับเซลล์ประสาทยนต์ NM ของไก่ และเซลล์ทั้งคู่จะเหมือนกัน และยังสอดคล้องกับรายงานของ Moiseff and Konishi (1983) ที่พบว่า เซลล์บางเซลล์ของ medial superior olive nucleus ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะย้อมติด GABA แต่ส่วนมากจะย้อมไม่ติด ซึ่งให้ผลเหมือนกับเซลล์ประสาทยนต์ NL ของไก่ และทั้งคู่ก็ถูกจัดให้เหมือนกันเช่นกัน.

เอกสารอ้างอิง

Conlee, J.W., and T.N. Parks. 1986. Origin of ascending auditory projections to the nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis in the chicken. Brain Res. 367 : 96 - 113.

Hail, P., and H. Scheich. 1986. The effects of unilateral and bilateral cochlear removal on 2 - deoxyglucose patterns in the chick auditory system. J. Comp. Neurol. 252 : 279 - 301.

Krnjevic, K. 1974. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. Physiol. Rev. 54 : 418 - 540.

Moiseff, A., and M. Konishi. 1983. Binaural characteristics of units in the owl's brainstem auditory pathway : precursors of restricted spatial receptive fields. J Neurosci. 12 : 2553 - 2562.

Muller, C.M. 1987. Gamma - aminobutyric acid immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of chicken. Neurosci. Lett. 77 : 272 -276.

Muller, C.M., and H. Scheich. 1987. GABA-ergic inhibition increases the neuronal selectivity to natural sounds in the avian auditory forebrain. Brain Res. 414 : 376 - 380.

Parks, T.N. 1981. Morphology of axosomatic endings in an avian cochlear nucleus : nucleus magnocellularis of the chicken. J. Comp. Neurol. 203 : 425 - 440.

Sternberger, L.A. 1986. Immunocytochemistry - 3^{th} Edition. New York : John Wiley.

Sullivan, W.E., and M. Konishi. 1984. Segregation of stimulus phase and intensity coding in the cochlear nucleus of the barn owl. J. Neurosci. 4 : 1787 - 1799.

Youngren, O.M., and R.E. Philips 1978. A stereotaxic atlas of the brain of the three - day - old domestic chick. J. Comp. Neurol. 181 : 567 - 600.