การศึกษาตำแหน่งของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองกระแต (common tree shrew : *Tupaia glis*) โดยวิธี Immunohistochemistry

ธาริณี ตันติไกรสร, วท.ม.

บทคัดย่อ Dopaminergic neuron เป็นเซลล์ประสาทชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างสารสื่อประสาท dopamine ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการติดต่อสื่อสารทำให้ระบบการสั่งการที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกายทำงานได้อย่างเป็นปกติ ในคนที่เป็น Parkinson's disease พบว่ามีการสูญเสียสารสื่อประสาท dopamine จึงทำให้การทำงานของระบบประสาทสั่งการผิดปกติ ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาตำแหน่งการกระจายของ dopaminergic neurons ในสมองส่วนกลางบริเวณ substantia nigra และ striatum ส่วนบริเวณ caudate และ putamen ของสัตว์ประเภทกระแต (common tree shrew : *Tupaia glis*) ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้ anti-tyrosine hydroxylase monoclonal antibody จากผลการทดลองพบว่ามีการกระจายของ dopaminergic neurons ในสมองของกระแตบริเวณ substantia nigra เป็นจำนวนมากโดย cytoplasm ของเซลล์ที่มี dopamine ติดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนบริเวณ putamen และ caudate พบ cytoplasm ติดสีน้ำตาลจางลงมาตามลำดับ และได้เปรียบเทียบจากการศึกษาโครงสร้างโดยรวมด้วยการย้อมสี hematoxylin และ eosin การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นเกี่ยวกับตำแหน่งและการกระจายของ dopaminergic neurons ในสมองของกระแตเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

Abstract **Immunohistochemistry localization of dopaminergic neurons in common tree shrew *(Tupaia glis)* brain**

Tarinee Tantikraisorn, M.Sc.

One of the neurotransmitters playing a major role in addiction is dopamine. Dopamine affects brain processes that control movement, emotional response, and

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

ability to experience pleasure and pain. Degeneration of dopaminergic neurons and terminals leads to behavioral and motor dysfunction, for example Parkinson's disease. Localization of dopamine-containing nigrostriatal projection in common tree shrew were determined by using anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody. TH-positive cells were almost completely intended in substantia nigra (SN). In addition, the numbers of TH-labeled terminals in the dorsal striatum, caudate-putamen nuclei (CPN) were less than the numbers in substantia nigra. Moreover, the characteristic of TH-content in CPN showed the dominantly patchy morphological pattern. Noteworthy, the observed information of dopaminergic neurons and terminals from this study may be useful and applied to further medical study in the clinical aspect.

(MJS 2003 ; 10 : 1 - 6)

บทนำ

Dopaminergic neuron เป็นเซลล์ประสาทกลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างสารสื่อประสาท dopamine (DA) ซึ่งพบอยู่ในสมองส่วนที่เรียกว่า substantia nigra (SN) แล้วทำการส่งสาร DA ไปตามเส้นทางประสาท nigrostriatal pathway ไปสู่สมองส่วน basal ganglia ในขอบเขตที่เรียกว่า striatum ตรงบริเวณเฉพาะที่สำคัญ ได้แก่ caudate และ putamen ทั้งนี้เพื่อควบคุมการติดต่อสื่อสารและทำให้ระบบการสั่งการที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์ต่อการทำงานในการเคลื่อนไหวของร่างกายให้เป็นปกติ[1]

จากการศึกษาอย่างต่อเนื่องในทางวิทยาศาสตร์พบว่าถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นที่สมองส่วน basal ganglia และมีผลกระทบต่อการทำงานของ dopaminergic neurons จะมีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพของระบบประสาทที่เรียกว่า โรคพาร์กินสัน : Parkinson's disease ในผู้ป่วยโรคนี้จะแสดงอาการที่เด่นชัด ได้แก่ มีกล้ามเนื้อสั่นรัวโดยเฉพาะเวลาพัก (tremor at rest) มีความตึงตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (hypertonia) จนทำให้เกิดมีอาการเกร็ง (rigidity) มีความลำบากในการเคลื่อนไหว จึงไม่ชอบการเคลื่อนไหว (hypokinesia, akinesia) นอกจากนี้การทรงตัวไม่ดี และเสียสมดุลของการยืนตัวตรง (postural defect)[2,3] ในแง่ของพยาธิสรีรวิทยาพบว่า โรคพาร์กินสันเกิดขึ้นเพราะมีการเสื่อมและสูญเสียสภาพของ dopaminergic nigrostriatal pathway โดยมีการลดจำนวนของ dopaminergic projection จากสมองส่วน substantia nigra ไปสู่ striatum[4,5,6]

มีการศึกษาค้นคว้าที่เป็นจุดเด่นและน่าสนใจเกี่ยวกับโรคพาร์กินสันนี้ว่า ลักษณะอาการผิดปกติในทางคลินิกของผู้ป่วยจะไม่ปรากฏหรือแสดงออกมาจนกว่ากระบวนการเสื่อมสภาพหรือการทำลายของ dopaminergic nigrostriatal pathway จะเกิดขึ้นสมบูรณ์เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์[5,6,7] โดยในช่วงระยะเวลาที่ผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการของโรคออกมา เรียกว่า "preclinical phase of Parkinsonism" โดยที่ร่างกายพยายามที่จะสร้างกระบวนการทดแทนหรือชดเชยสภาวะของโรค (compensatory changes)[6,7,8,9,10]

ในสัตว์ประเภทหนู ได้มีการศึกษาค้นคว้าทดลองเกี่ยวกับสารสื่อประสาท dopamine ในด้านต่างๆ โดยทำลาย dopaminergic nigrostriatal pathway โดยการฉีดสารที่เป็นพิษต่อสมอง ที่มีชื่อว่า 6 hydroxydopamine (6-OHDA)[7,11,12,13] พบว่ามีความผิดปกติต่อการทำงานของสัตว์ โดยเฉพาะด้านพฤติกรรมต่างๆ ที่แสดงออกมา เช่น มีการเคลื่อนไหวผิดปกติและมีความลำบากในการเคลื่อนที่ มีความลำบากและดื่มน้ำน้อยลง (adipsia) มีความลำบากในการกลืน (aphagia)

มีการค้นพบและวิเคราะห์ว่า ภายหลังการ

ทำลายเส้นประสาท dopaminergic pathway ด้วย 6-OHDA กลับมีการเพิ่มขึ้นของการหลั่ง DA (dopamine release) จาก dopaminergic neuronal terminals ที่ยังเหลืออยู่ในสภาพดีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการเพิ่มขึ้นของ DA efflux มีความสัมพันธ์และขึ้นต่ออัตราที่เป็นค่าคงที่ในการสร้าง DA (DA synthesis) การที่มีการเพิ่มขึ้นในการหลั่งของ DA เช่นนี้เป็นส่วนของกระบวนการปรับตัวและการสร้างสภาวะชดเชยต่อการทำหน้าที่ เพื่อที่จะรักษาสภาพการทำงานของ dopaminergic control[7] ที่มีต่อการทำงานของ striatum ทั้งๆ มีการทำลายอย่างมากและรุนแรงของ dopaminergic neurons[5] นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้องและสอดคล้องจำนวนมากเกี่ยวกับการใช้สาร 6-OHDA ในการทำลายส่วนของสมองที่เกี่ยวกับการศึกษาระดับของ DA ใน striatum และ substantia nigra มีการพบเพิ่มเติมที่ว่ามีการเพิ่มขึ้นของ dopaminergic receptors (D2 receptors) ในส่วนหน้าของ striatum และพบว่าบริเวณของ DA innervation จาก dopaminergic neurons ที่ยังคงเหลือในสภาพดีมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นสัดส่วน[4,14,15]

ในการศึกษาครั้งนี้ มีการเลือกใช้กระแต เป็นสัตว์ในการทดลอง เพื่อศึกษาโครงสร้าง ตำแหน่งและการกระจายตัวของเซลล์ประสาทโดปามีน ทั้งในด้านประสาทกายวิภาคและจุลกายวิภาค โดยมุ่งเน้นที่การศึกษา เอ็นไซม์ tyrosine hydroxylase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างสารโดปามีน ด้วยเทคนิคทาง immunohistochemistry เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน แล้วนำมาเปรียบเทียบผลการทดลองในหนูและในคน กอรปกับมีการศึกษาทางด้านนี้เป็นจำนวนน้อยมากในสัตว์ประเภทกระแต

ระเบียบวิธีวิจัย

กระแต (common tree shrew :*Tupaia glis*) น้ำหนัก 120-180 กรัม ทำให้สลบแล้วเปิดช่องอก ฉีด heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดผ่านไปทาง ascending aorta แล้วฉีดล้าง (perfuse) น้ำเลือดออกให้หมดด้วยสารละลาย 0.9% NaCl หลังจากนั้น ฉีดน้ำยา Bouin's fixative เข้าทางเดิม เพื่อทำการตรึงและรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย แล้วทำการเปิดกระโหลกเพื่อเอาสมองออกแช่ใน fixative อีกรอบ

นำเนื้อเยื่อไปผ่านขบวนการฝังในพาราฟินแล้วตัดเนื้อเยื่อในแนวขวาง (coronal section) ให้เป็นแผ่นบางๆ ติดบนสไลด์แก้ว นำมาศึกษาด้านจุลกายวิภาคด้วยกล้องจุลทรรศ์ธรรมดาด้วยเทคนิคการย้อมสีประเภท hematoxylin และ eosin และศึกษาด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้ antibody ที่จำเพาะเจาะจง โดยนำแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อที่มีความต่อเนื่องเป็นลำดับ มาย้อมด้วย primary antibody ซึ่งได้แก่ monoclonal anti-tyrosine hydroxylase ด้วย dilution 1: 4,000 (from Sigma Ltd.) แล้วล้างออกด้วย PBS หลังจากนั้นย้อมด้วย secondary antibody ได้แก่ HRP-Streptavidin-Biotin Histo ST 5050 Kit (from Zymed laboratories Inc.) แล้วล้างออกด้วย PBS

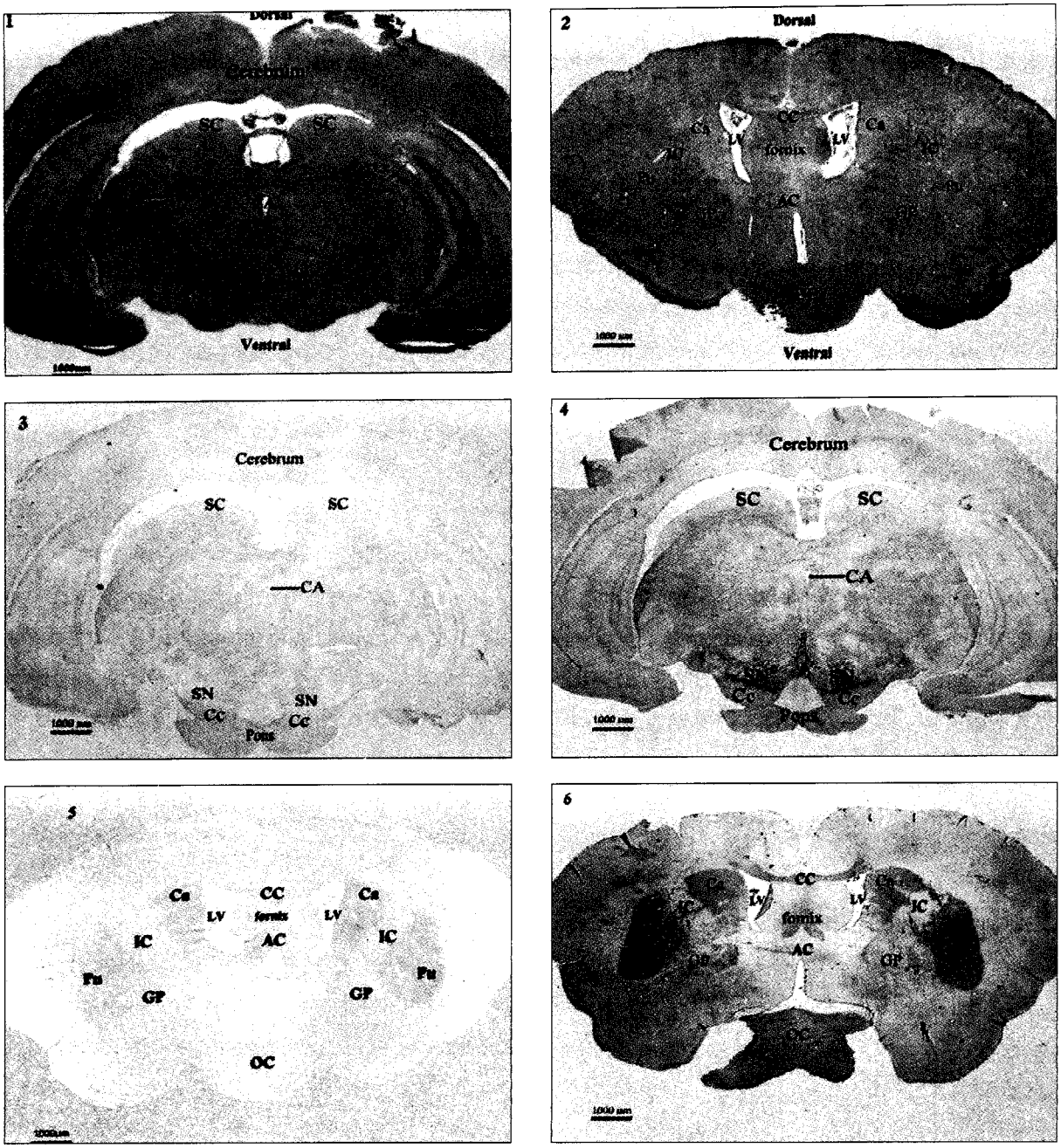
ทำการใส่ substrate ซึ่งได้แก่ diaminobenzidine (DAB) (from Zymed laboratories Inc.) ซึ่งจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างส่วนของ secondary antibody และส่วนของ DAB ซึ่งถ้าเป็น dopaminergic neurons จะแสดงผลการย้อมเซลล์ออกมาเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทุกครั้งที่ทำการทดลอง จะมีกลุ่มควบคุม (control group) เสมอ

ผลการทดลอง

จากการศึกษาโครงสร้างโดยทั่วไปของสมองกระแต โดยการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin พบว่าตำแหน่งของ substantia nigra (SN) อยู่หลังต่อ crus cerebri (Cc) หน้าต่อ midbrain tegmentum พบได้ตลอดความยาวของสมองระดับ midbrain (รูปที่ 1) และตำแหน่งของ cuadate (Ca) ซึ่งเป็น gray mass จะขนาบสองข้างของ lateral ventricle (LV) โดยตลอด ส่วน putamen (Pu) จะพบว่าเป็นตำแหน่งใหญ่ที่สุด วางตัวอยู่ระหว่าง external capsule และ lateral medullary lamina ของ globus pallidus และมี internal capsule (IC) เป็นเส้นใยประสาทที่กั้นระหว่าง caudate และ putamen (รูปที่ 2)

จากการศึกษาด้วยเทคนิค immunohistochemistry พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ dopaminergic neuron จะแสดงผลออกมาในเนื้อเยื่อ คือปรากฏเป็นสี

การศึกษาตำแหน่งเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองกระแต



รูปภาพตัดสมองกระแต (whole brain) ในแนว coronal section *(ดูภาพสีได้จากปกหลังด้านในฉบับนี้)*

คำอธิบายตัวย่อ

AC	=	Anterior commissure	IC	=	Internal capsule
Ca	=	Caudate nucleus	LV	=	Lateral ventricle
Cc	=	Crus cerebri	OC	=	Optic chiasma
CA	=	Cerebral aqueduct	Pu	=	Putamen
CC	=	Corpus callosum	SC	=	Superior colliculus
GP	=	Globus pallidus	SN	=	Substantia nigra

น้ำตาลเข้มใน cytoplasm ของเซลล์ (positive reaction) และในการทดลองกลุ่มควบคุม (control group) ปฏิกิริยาจะไม่เกิดขึ้น จึงไม่ปรากฏสีน้ำตาลเข้มใน cytoplasm ของเซลล์ (negative reaction)

โครงสร้างสมองของกระแต ที่พบว่าแสดงปฏิกิริยาทาง immunohistochemistry แสดงถึงตำแหน่งและการกระจายตัวของ dopaminergic neuron พบได้ในโครงสร้าง ต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 บริเวณ substantia nigra แสดงกลุ่มเซลล์ที่มี cytoplasm ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (รูปที่ 4) และในกลุ่มควบคุมบริเวณ substantia nigra ไม่ติดสีน้ำตาลใน cytoplasm ของเซลล์ (รูปที่ 3)

ส่วนที่ 2 บริเวณ striatum โดย caudate และ putamen แสดงกลุ่มเซลล์ที่มี cytoplasm ติดสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 6) และในกลุ่มควบคุมบริเวณ caudate และ putamen ไม่ติดสีน้ำตาลใน cytoplasm ของเซลล์ (รูปที่ 5)

สรุปและวิจารณ์ผลทดลอง

จากการศึกษา ตำแหน่งและการกระจายตัวของ dopaminergic neurons ในสมองของกระแต (common tree shrew : *Tupaia glis*) ด้วยเทคนิค immunohisto chemistry โดยใช้ anti-tyrosine hydroxylase monoclonal antibody พบ dopaminergic neurons ในสมองส่วนกลางบริเวณ substantia nigra และ striatum ซึ่งได้แก่ caudate และ putamen โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงปกติ พบการกระจายตัวของ dopaminergic neurons บริเวณ substantia nigra เป็นจำนวนมาก โดย cytoplasm ของเซลล์ที่มีสารสื่อประสาท dopamine ติดสีน้ำตามเข้ม ส่วนบริเวณ caudate และ putamen พบ cytoplasm ติดสีน้ำตาลจางลงมาเป็นลำดับ ซึ่งสันนิษฐานได้ว่า การที่ cytoplasm ของเซลล์บริเวณ substantia nigra ติดสีน้ำตาลมากกว่าบริเวณ caudate และ putamen เนื่องจากบริเวณ substantia nigra เป็นแหล่งที่สร้างและหลั่งสารสื่อประสาท dopamine และส่งต่อไปยังส่วน caudate และ putamen ซึ่งเป็น terminal end ของสารสื่อประสาทนี้ จึงทำให้ cytoplasm ของเซลล์บริเวณ substantia nigra ติดสีน้ำตาลเข้มมาก ในการเลือกสัตว์ประเภทกระแตเป็นสัตว์กลุ่มตัวอย่าง (new model) ในการทดลองครั้งนี้ มีหลักการและเหตุผลที่ว่า กระแตเป็นสัตว์ประเภท non rodent mammalian species ซึ่งในสายวิวัฒนาการจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มระหว่าง insectivores และ primate โดยที่มนุษย์อยู่ในกลุ่มของ primate การศึกษาค้นคว้าในเชิงประสาทกายวิภาคศาสตร์ของ dopaminergic neurons และส่วนที่สัมพันธ์กันในระบบประสาทของกระแตยังค่อนข้างมีการศึกษาค้นคว้าจำนวนน้อยมาก เท่าที่มีการศึกษาได้มีรายงานที่เกี่ยวข้องถึงตำแหน่งของ dopaminergic receptors ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี[16] รูปแบบของการกระจายตัวและความสัมพันธ์ของ dopamine receptors มีลักษณะเป็น species-specific distribution[15] และการศึกษาเปรียบเทียบเส้นประสาทจากสมองส่วน thalamus และ mesencephalon ไปสู่สมองส่วน neocortex[9] เท่านั้น

ในการทดลองครั้งนี้ ข้อมูลที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ในเชิงวิวัฒนาการของระบบประสาทของสัตว์ประเภทต่างๆ โดยเฉพาะเกี่ยวกับ dopaminergic neurons ในกระแต และจะเป็นพื้นฐานความรู้ต่อการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพ Parkinsonism เปรียบเทียบกับสภาวะในหนูและในคน ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการใช้สารหรือยาต่างๆ ที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาสภาพความผิดปกติของโรคพาร์กินสัน โดยสามารถเลือกใช้สารหรือยาต่างๆ ในช่วงเวลาที่ถูกต้อง เหมาะสม ในช่วง preclinical phase ซึ่งเป็นระยะที่ร่างกายยังคงมีเซลล์ประสาทโดปามีนและ dopaminergic pathway ที่ยังมีสภาพดีหลงเหลืออยู่ ก่อนที่สิ่งนี้จะถูกทำลายอย่างรุนแรงและถาวรจนแสดงอาการรุนแรงเต็มที่ของโรคพาร์กินสัน ซึ่งการทำการค้นคว้าวิจัยเช่นนี้ ต้องเริ่มดำเนินการในสัตว์ทดลองก่อนเท่านั้น

References

1. Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. Principles of neuroscience : The basal ganglia. 3rd ed.1991; 42: 647.
2. Carpenter MB.. Core text of Neuroanatomy. 4th ed.Baltimore, Williums and Wilkins, U.S.A. 1991.
3. Martin JH. Neuroanatomy : The basal ganglia. 2nd ed. A

Simon & Schuster Company, 1996.

4. Pickle VM, Johnson E, Carson M, Chan J. Ultrastructure of spared dopamine terminals in caudate-putamen nuclei of adult rats neonatally treated with intranigral 6-hydro-xydopamine. Development Brain Research 1992; 70: 75-86.
5. Stachowiak MK, Keller RW, Stricker EM, Zigmond MJ .Increased dopamine efflux from striatal slices during development and after nigrostriatal bundle damage. The Journal of Neuroscience 1987; 7: 16-48.
6. Zigmond MJ, Acheson AL, Stachowiak MK, Strickerm EM . Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical Parkinsonism. Arch Neurol 1984; 41: 856.
7. Snyder G.L, Keller RW, Zigmond MJ. Dopamine efflux from striatal slaces after intracerebral 6-hydroxydo-pamine:evidence for compensatory hyperactivity of residual terminals. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 1990; 253: 867-76.
8. Anupunpisit V. A schema of Compensatory Events for Parkinson's Disease. Srinakharinwirot University Science Journal 1998; 14(2): 56-65.
9. Garris PA, Walker QD, Wightman RM. Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terninals. Brain research 1996; 753: 225.
10. Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensations after central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. TINS 1990; 13: 290.
11. Orr WB, Gardiner TM, Stricker EM, Zigmind MJ, Berger TW. Short-Term effects of dopamine-depleting brain lesions on spontaneous activity of striatal neuron : relation to local dopamine concentration and behavior. Brain Research 1986; 376: 20-8.
12. Divac I, Bjorklund A, Lindvall O, Passingham RE . Converging projections from the mediodorsal thalamic nucleus and mesencephalic dopaminergic neurons to the neocortex in Three species. J.Comp.Neur 1978; 180: 59-72.
13. Lindvall O, Bjorklund A. The glyxylic acid fluorescence histochemical method : a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. Histochemistry 1975; 83: 531-37.
14. Dewar KM, Soghomonian JJ, Bruno JP, Descarries L, Reader TA.\ Elevation of dopamine D2 but not D1 receptors in adult rat neostriatum after neonatal 6-hydroxydopamine denervation, Brain Res 1990; 536: 287-96.
15. Camps M, Kelly PH, Palacios JM. Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. J. Neural. Tranm. : Gen. Sect 1990; 80: 05-27.
16. Mijnster MJ, Isovich E, Flugge G, Fuchs E. Localization of dopamine receptors in the tree shrew brain using [^{3}H] -SCH 23390 and [^{125}I] -epidepride. Brain Research 1999; 841: 101-13.