ฤทธิ์ยับยั้งของเปอร์กินเจเซลล์ในซีรีเบลลัม หลังจากการทำลายนิวเคลียสอินฟีเรียโอลีฟ

นางสาวพรทิพย์ ศักดิ์สุจริต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2529

ISBN 974-567-220-3

012268

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย I16603485

INHIBITORY ACTIONS OF CEREBELLAR PURKINJE CELLS FOLLOWING DESTRUCTION OF THE INFERIOR OLIVARY NUCLEUS

MISS PORNTHIP SAKSUCHRITH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

ISBN 974 - 567 - 220 - 3

Thesis Title	Inhibitory Actions of Cerebellar Purkinje Cells Following Destruction of the Inferior Olivary Nucleus
Name	Miss Pornthip Saksucharith
Department	Physiology
Thesis Advisor	Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Thavorn Vajrabhaya.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Pongsak Kanluan.....Chairman

(Assistant Professor Pongsak Kanluan)

.....Pavich Tongroach.....Member

(Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.)

.....Sunibhond Pummangura.....Member

(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

.....Ratree Sudsuang.....Member

(Associate Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ยับยั้งของเบอร์กินเจเซลล์ในซีรีเบลลั่มหลังจากการทำลายนิวเคลียสอินฟีเรียโอลีฟ

ชื่อนิสิต นางสาวพรทิพย์ ศักดิ์สุจริต

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิช ทองโรจน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิพนธ์ ภุมมางกูร

ภาควิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Purkinje cells (P-cells) เป็นเซลล์ประสาทที่สำคัญที่สุดภายในสมองส่วนซีรีเบลลั่ม ส่วนเปลือกนอก (cerebellar cortex) ได้รับคำสั่งจากเส้นใยประสาท 2 แห่ง ที่มีต้นกำเนิดที่ต่างกัน ได้แก่ ระบบเส้นใยประสาท climbing และ ระบบเส้นใยประสาท mossy เส้นใยประสาท climbing มีต้นกำเนิดมาจากกลุ่มเซลล์ประสาท inferior olive ซึ่งเรียงตัวอยู่ใน brain stem ส่วนเส้นใยประสาท mossy แตกแขนงอย่างมากมายมาจาก vestibular system, reticular formation, cerebral cortex และ spinal cord

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการทำลายกลุ่มเซลล์ประสาท Inferior olive จะทำให้เกิดความผิดปกติของการเคลื่อนไหวที่อยู่ภายใต้อำนาจจิตใจ คล้ายกับการตัด cerebellum ออกไป แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของระบบเส้นใยประสาท climbing ที่มีผลต่อการควบคุมการเคลื่อนไหว และคอยปรับการเคลื่อนไหวให้เกิดความชำนาญ มีความละเอียดอ่อน ถูกเป้าหมายยิ่งขึ้น ข้อมูลจากการศึกษาทางสรีรวิทยาทางไฟฟ้าหลังจากการทำลายระบบเส้นใยประสาท climbing พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งของ P-cells ต่อกลุ่มเซลล์ประสาทเป้าหมายจะลดลง

การลดลงของฤทธิ์ยับยั้งของ P-cells อาจเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ r-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทออกฤทธิ์ยับยั้ง หรือ กรดอะมิโน ตัวอื่นๆ ที่หลั่งจากปลาย

ประสาทของ P-cells ในการศึกษานี้ จึงทำการทดสอบโดยใช้ 3-Acetylpyridine (3-AP) ทำลายกลุ่มเซลล์ประสาท Inferior olive ในหนูขาวแล้วนำหนูขาวไปเก็บ น้ำไขสันหลังที่เตรียมขึ้นแล้วฉีดเข้าไปบริเวณปลายประสาท P-cells โดยใช้วิธี superfusion ด้วย push-pull canula และใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน

การศึกษานี้พบว่า ในหนูขาวที่ทำลายกลุ่มเซลล์ประสาท inferior olive การกระตุ้นปลายประสาทของ P-cells ด้วยสารละลาย depolarize ด้วย potassium ปริมาณสูง (100 mM) จะพบปริมาณการหลั่ง GABA และกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวในกลุ่มควบคุม ผลการศึกษานี้สนับสนุนข้อเสนอแนะของ Ito (1984) ที่กล่าวไว้ว่า เมื่อทำลายเส้นใยประสาท climbing อาจจะมีผลรบกวนขบวนการขนส่งภายใน axon ของ P-cells และทำให้เกิดการลดปริมาณของ macromolecule ที่ปลายประสาท P-cells ซึ่งอาจทำให้ปริมาณการหลั่งสารสื่อประสาทลดลงได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Inhibitory Action of Cerebellar Purkinje Cell Following Destruction of the Inferior Olivar Nucleus

Name Miss Pornthip Saksucharith

Thesis Advisor Associate Professor Pavich Thongroach,Ph.D.

Co-Advisor Associate Professor Sunibhond Pummangura,Ph.D.

Department Physiology

Academic Year 1986

ABSTRACT

Purkinje cells (P-cells), the principal neurons in the cerebellar cortex, receive two different sets of excitatory inputs : the climbing fiber system and the mossy fiber system. The climbing fiber afferents (CF'S) originate solely from neurons of the inferior olivary nucleus, located in the brain stem, whereas the mossy fiber afferents (MF'S) arise widely from the vestibular system, the reticular formation, cerebral cortex, and spinal cord.

Inferior olive lesions produce defect in voluntary movement which closely resembles total cerebellectomy, indicating that CF'S are essential for cerebellar control of intentional movement. It has also been established that long-term modification of motor

activities involving the cerebellum are also dependent on the CF'S. A great deal of information has been obtained in recent years about the electrophysiological investigation, which suggests a decrease in P-cells inhibitory action on their target neurons following climbing fiber denervation. The aim of the present experiments are to investigate any possible changes in r-aminobutyric acid (GABA) and/or other amino acids released from P-cells terminal following olivary lesion in the rats which received 3-acetylpyridine (3-AP) intoxication. A push-pull canula was employed as collecting methods by superfusing the vestibular nuclei complex with artificial CSF. A high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection was used for quantitative assay of the amino acids.

It was found that in olivary lesioned rats, K^+-deporalizing solution failed to evoke the release of GABA as well as other amino acids from P-cells terminals. The present findings provide general support for the suggestion by Ito (1984) that the P-cells axoplasmic flow may be disturbed by climbing fiber deafferentation and lead to reduction of macromolecules in the P-cells terminals.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to my advisor, Associate professor Dr. Pavich tongroach, for his kind advice, guidance,keen interest and constant encouragement throughout this study.

I would also like to thank Associate professor Sunibond Pummangura of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his kind help in suggestion in HPLC experiment.

I am much thankful to all staff member of the Scientific and Technological Research Equipment Centre (STREC), Chulalongkorn University, and those of the Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for providing advice and facilities used in experimental works.

Apart from the financial support from my parents this study programme has been made possible party by Chulalongkorn University Graduate School for granting my partial financial support (of fourteen thousand and four hundred baht) to conduct this research. To them my gratitude goes.

Finally, I would like to extend my appriciation to my parents for their love and encouragement.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... IV

ENGLISH ABSTRACT..... VI

ACKNOWLEDGEMENTS..... VIII

TABLE OF CONTENTS..... IX

LIST OF TABLES..... XI

LIST OF FIGURES..... XII

ABBREVIATION.....XIIII

CHAPTER

1. INTRODUCTION..... 1

- Proposal roles of the climbing and mossy fiber..... 3

2. MATERIAL AND METHODS

1. Animals and materials..... 14

2. Preperation of olivary lesioned rats..... 16

3. Perfusion method..... 17

4. Amino acid assays..... 18

4.1 Materials..... 18

4.2 Reagent and chemicals..... 19

4.3 Chromatography..... 20

4.4 Derivatization..... 20

Page

3. RESULTS

1. Amino acid analysis:

Preparation of standard curve..... 24

2. Perfusion experiment..... 24

3. Spontaneous release of endogeneous amino acids..... 28

4. Evoked release of endogeneous amino acids..... 36

5. Effect of Ca^{2+} on amino acids release..... 36

6. Effect of perfusion with high K^{+} solution..... 41

7. Effect of 3-AP treated rats..... 41

4. DISCUSSION..... 49

REFERENCES..... 56

VITA..... 66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Coefficient of variation (C.V.) of the peak area.....	27
2.	Levels of the spontaneous release of endogeneous amino acids from the rat vestibular nucleus.....	35
3.	Evoked release of amino acids with high K^+ 100 mM.....	39
4.	The Ca^{2+} dependency of K^+-evoked release of amino acids.....	40
5.	Evoked release of amino acids with high K^+ 50 mM.....	44
6.	The release of amino acids from 3-AP treated rats.....	48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Basic neuronal circuitry and putative neurotransmitters in the cerebellum.....	4
2.	Wiring diagram of the cerebellar cortex and the brain centers.....	5
3.	Comparator hypothesis of the inferior olive	6
4.	Superfusion push-pull canula.....	15
5.	The flow diagram of high-performance liquid chromatography (HPLC).....	21
6.	o-Phthaldehyde (OPA) froms fluorescent derivatives.....	23
7.	Chromatogram of OPA-derivatived standard amino acids.....	25
8.	Standard curve of amino acids measurement.....	26
9	Chromatogram of the perfusate sample from the rat vestibular nucleus.....	29
10	Histological section from a successful experiment.....	30
11	Chromatogram of the perfusate sample from incorrect placement of the push-pull canula.....	31

Figure Page

12. Histological section of the canula tip site located outside of the vestibular nuclei..... 32

13. Time course of spontaneous release of endogeneous amino acids..... 34

14. Effect of high concentration of K^+ - stimulated with Ca^{2+} -dependent and K^+ -stimulated with Ca^{2+} -free on the release of endogeneous amino acids..... 38

15 Effect of high concentration of K^+ (50 mM and 100 mM)..... 43

16 Amino acid release in 3-AP treated rats compared the result obtained in normal rats..... 47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

3-AP	=	3-acetylpyridine
Ala	=	alanine
AOAA	=	amino-oxyacetic acid
Asp	=	aspartic acid
cm	=	centimetre
CSF	=	cerebrospinal fluid
$^{\circ}C$	=	degree celcieus
EDTA	=	ethyldiaminotetraacetic acid
Fig.	=	figure
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
g	=	gram
Glu	=	glutamic acid
$Glu-NH_2$	=	glutamine
Gly	=	glycine
HPLC	=	high-performance liquid chromatography
I.D.	=	internal diameter
IO	=	inferior olive
IPSP	=	inhibitory postsynaptic potential
kg	=	kilogram
M	=	molar
mg	=	milligram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

min	=	minute
mM	=	millimolar
mm	=	millimetre
nm	=	nanometre
nmol	=	nanomole
p	=	probability
P-cells	=	Purkinje cells
pmol	=	picomole
Psi	=	pound per square inch
S.E.	=	standard error
Ser	=	serine
Tau	=	taurine
ul	=	microlitre
um	=	micrometre
v/v	=	volume by volume
%	=	percent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย