NEURONAL ORIGIN OF CEREBELLAR AFFERENTS FROM MOTONEURONS INNERVATING EXTRAOCULAR MUSCLES

PEENARAYA SUNARTPIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(NEUROSCIENCE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-2406-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

4036354 STNS/D: สาขาวิชา : ประสาทวิทยาศาสตร์; ปร.ด. (ประสาทวิทยาศาสตร์)

ปีนณ์พยาข์ สุนารทพิณ : เซลล์ประสาทที่เป็นต้นกำเนิดของเส้นประสาทเข้าสู่สมองส่วนซีรีเบลลั่มจากมอเตอร์นิวรอนที่ควบคุมกล้ามเนื้อนัยน์ตา (NEURONAL ORIGIN OF CEREBELLAR AFFERENT FROM MOTONEURON INNERVATING EXTRAOCULAR MUSCLES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : นัยพินิจ คชภักดี, Ph.D., ไอ้ออน ชินธเนศ, Ph.D., ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงษ์, Ph.D., นวลจันทร์ จุฑาภักดีกุล, Ph.D. 113 หน้า ISBN 974-04-2406-6

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ลักษณะและการกระจายของเซลล์ประสาทที่เป็นต้นกำเนิดของเส้นประสาทจากกลุ่มมอเดอร์นิวรอนที่ส่งไปยังกล้ามเนื้อนัยน์ตาโดยอาศัยการลำเลียงแบบย้อนกลับในเส้นประสาทของสารเรืองแสงสองชนิดในหนู หลังจากทำให้สลบโดยปราศจากเชื้อ หนูกลุ่มหนึ่งฉีดสารละลาย 10% ของ Micro-Ruby (MR) ในฟอสเฟทบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาณ 0.3 ไมโครลิตร ที่เวอร์มิสส่วนหน้า (lobule I, II), ส่วนหลัง (lobule VI, VII, IX, X), ฟลอคคูลัส, พาราฟลอคคูลัส และที่นิวเคลียสของซีรีเบลลั่ม การฉีดครอบคลุมพื้นที่หลายส่วนของซีรีเบลลั่มเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ประสาทที่ติดฉลากเป็นจำนวนมากที่สุด หนูในกลุ่มนี้บางตัวฉีดบริเวณเฉพาะบางส่วนของซีรีเบลลั่มเพื่อศึกษาการกระจายและลักษณะของเซลล์ประสาท หนูทดลองอีกกลุ่มหนึ่งทำการฉีดสารเรืองแสงสองชนิด คือ MR ที่ซีรีเบลลั่ม และฉีดสารละลาย 3% Fluoro-Gold (FG) ใน PBS ปริมาณ 5 ไมโครลิตรเข้าในแต่ละมัดกล้ามเนื้อนัยน์ตาซึ่งเลี้ยงโดยเส้นประสาทสมองคู่ที่ 3, 4, 6 แล้วติดตามการติดฉลากของสารเรืองแสงทั้งสองชนิดในซับโตพลาสมของมอเตอร์นิวรอนในบริเวณกลุ่มเซลล์ประสาทออคูโลมอเตอร์ (CN 3) โทรเคลีย (CN 4), แอบดูเซนส์ (CN 6) หนูทดลองอีกกลุ่มหนึ่งฉีดสารละลาย PBS เพื่อใช้ในการตรวจสอบ background ของสารเรืองแสง ต่อมาอีก 3 วันหลังทำให้สัตว์ทดลองสลบอีกครั้งจึงทำการเก็บรักษาสมองโดยวิธีการ purfusion ด้วย 4% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ แล้วนำเนื้อสมองส่วนซีรีเบลลั่มมาตัดเรียงตามแนวยาวและก้านสมองตัดเรียงตามขวางด้วยความหนา 40 ไมโครเมตร ก่อนส่องดูเซลล์ประสาทที่ติดฉลากด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิดฟลูออเรสเซนด้วยแผ่นกรองแสงสำหรับ FG และ MR เก็บข้อมูลด้วยภาพถ่ายและเก็บไว้ในแฟ้มข้อมูลภาพคอมพิวเตอร์ เซลล์ประสาททั้ง 3 กลุ่มถูกนับจำนวนและวาดแบบพื้นที่สมองไว้ทุกชิ้นสไลด์ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ประสาททั้งสามกลุ่ม CN 3, CN 4, CN 6 ทั้งสองข้างของก้านสมองติดสีแดงด้วย MR ที่ลำเลียงย้อนกลับมาจากซีรีเบลลั่มแต่อย่างเดียวเป็นอินเตอร์นิวรอนมีจำนวนไม่มากนัก มีทั้งเซลล์ขนาดเล็กและกลาง กระจายอยู่ระหว่างมอเตอร์นิวรอนขนาดกลางและใหญ่ที่ติดสีเหลืองทองของ FG ที่ลำเลียงย้อนกลับมาจากกล้ามเนื้อนัยน์ตา มีเซลล์ประสาทจำนวนหนึ่งที่มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่อยู่ในตอนกลางของกลุ่มเซลล์ประสาทเหล่านี้ที่ติดทั้งสองสีในเซลล์ตัวเดียวกัน แสดงว่ามีมอเตอร์นิวรอนที่ส่งแขนงของเส้นประสาท (axon collaterals) ไปสู่ทั้งซีรีเบลลั่มและกล้ามเนื้อนัยน์ตา สรุปได้ว่า ต้นกำเนิดของเซลล์ประสาทจาก CN3, CN 4, CN 6 ที่ส่งเส้นประสาทไปสู่ซีรีเบลลั่มมาจากทั้งกลุ่มมอเตอร์นิวรอนและอินเตอร์นิวรอน ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมประสานงานการเคลื่อนไหว ของนัยน์ตา ดังนั้นสมองส่วนซีรีเบลลั่มจึงสามารถควบคุมติดตามการเคลื่อนไหวของนัยน์ตาได้โดยตรงและรวดเร็วกว่าวงจรประสาทที่ทราบกันมาแต่ก่อนหน้านี้

4036354 STNS/D : MAJOR: NEUROSCIENCE: Ph.D. (NEUROSCIENCE)
KEY WORDS : CEREBELLAR AFFERENTS / EXTRAOCULAR MOTOR NUCLE/RETROGRADE AXONAL TRANSPORT/ EYE MOVEMENTS/EXTRAOCULAR MUSCLES

PEENARAYA SUNARTPIN: NEURONAL ORIGIN OF CEREBELLAR AFFERENTS FROM MOTONEURONS INNERVATING EXTRAOCULAR MUSCLES. THESIS ADVISOR: NAIPHINICH KOTCHABHAKDI Ph.D., PIYARAT GOVITRAPONG Ph.D., THYON CHENTANEZ Ph.D., NUANCHAN JUTAPAKDEEGUL Ph.D. 113 p.ISBN 974-04-2406-6

The objective of this study is to investigate the characteristics and distributions of neuronal origin of cerebellar afferents from motor cranial nerve nuclei innervating extraocular muscles by the method of retrograde transport of two fluorescence tracers in rats. Under deep anesthesia and aseptic conditions, 5 μl of 3% solution of Fluoro-Gold (FG) in phosphate buffer solution (PBS) was injected into the bellies of the six extraocular muscles to study the labeling of motoneurons innervating corresponding extraocular muscles. The cerebellum was exposed by craniotomy, and 0.3 μl of 10% solution of Dextran Tetramethyl Rhodamine Biotin (Micro Ruby: or MR) in PBS was injected into many regions of the anterior vermis (lobule I, II) and the posterior vermis (lobule VI, VII, IX, X) , the flocculus, the paraflocculus and the deep cerebellar nuclei. Multiple injections were made to cover the entire cerebellum in order to obtain a near maximum labeling of cerebellar afferent neurons. In other cases, only small single or a few injections were made in specific areas of the cerebellum to study specific distributions and topographic organization. In one group of rats, injections were made both in the extraocular muscles with FG and in the cerebellum with MR to study the double labeling of neurons, which project their axons to both the extraocular muscle and the cerebellum. Another group of rats were injected in both sites with only the PBS and served as the control for auto-fluorescence background. After 3 days postoperative survival time, all animals were deeply reanesthetized and perfused with heparinized normal saline solution, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and 30% sucrose solution in PBS. The brainstem and the cerebellum were removed immediately, and stored in sucrose solution in PBS at 4°c. Serial transverse sections of the brainstem and sagittal sections of the cerebellum were obtained by a freezing microtome at 40 μm thickness, collected on uncoated glass slides, and immediately dried. All sections were examined under an epifluorescence or confocal microscope equipped with filter systems for FG and MR. The presence of both single and double retrograde labeled neurons in the Oculomotor (CN3), Trochlear (CN4) and Abducens (CN6) nuclei was recorded, photographed, stored as computer images files and printed out as hard copies. The labeling neurons in the vicinity of the CN 3, 4, 6 from all sections were plotted onto diagrams and counted. Neurons labeled only with MR retrogradely transported from injection sites in the cerebellum were found bilaterally and scattered throughout in the Oculomotor, Trochlear and Abducens nuclei. These neurons labeled only with MR were small and medium-sized interneurons and represented only a small proportion of the entire population. Neurons labeled only with FG retrogradely transported from injection sites in the extraocular muscles were the most numerous, and distributed almost throughout the entire population of small, medium-sized and large motoneurons, which innervate the extraocular muscles. A smaller proportion of small and medium-sized FG labeled neurons within these nuclei were also double labeled with MR, indicating that they project their axon collaterals to both extraocular muscles and the cerebellum. In conclusion, the present findings provide clear anatomical evidence that a small population of motoneurons in the Oculomotor, Trochlear and Abducens nuclei of the rat project their axon collaterals directly to the cerebellum and the extraocular muscles, in addition to the cerebellar afferents from other interneurons within these nuclei. The findings also indicate that cerebellar neuronal circuits play more direct roles in monitoring and controlling eye movements than previously known.