



วิทยานิพนธ์

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของ neuronal Nitric Oxide Synthase
(nNOS) ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อน
และโคแก่

QUANTITATIVE COMPARISON OF neuronal NITRIC OXIDE
SYNTHASE (nNOS) IN HIPPOCAMPAL NEURONS OF
YOUNG AND OLD CATTLE

นางสาวสุภาวดี จิตภักดีบัณฑิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)
ปริญญา

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์
สาขา
กายวิภาคศาสตร์
ภาควิชา

เรื่อง การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ในเซลล์ประสาท
ของสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนและโคแก่

Quantitative Comparison of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Hippocampal
Neurons of Young and Old Cattle

นามผู้วิจัย นางสาวสุภาวดี จิตภักดีบัณฑิต

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พราพษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สมชัย พงศ์จรรยากุล, Dip. in Vet. Path., F.R.V.C.S.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พราพษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ในเซลล์ประสาทของ
สมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนและ โคแก่

Quantitative Comparison of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Hippocampal Neurons of
Young and Old Cattle

โดย

นางสาวสุภาวดี จิตภักดีสินธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2550

สุภาวดี จิตภักดีบัณฑิต 2550: การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนและโคแก่ ปรินญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขากายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พรพวงษ์, Ph.D. 92 หน้า

สมองส่วน Hippocampus จากโคอ่อน (อายุ 1 ปี) และโคแก่ (อายุ 10 ปี) รุ่นละ 2 ตัว ถูกเก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ทำการวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก จากนั้นสุมเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสมองส่วนดังกล่าวเพื่อนำมาเตรียมด้วยวิธี Paraffin technique และย้อมเนื้อเยื่อบางส่วนด้วยสี Luxol Fast Blue เพื่อศึกษาโครงสร้างและส่วนประกอบพร้อมกับนับจำนวนเซลล์ในแต่ละบริเวณของเนื้อเยื่อสมองส่วนนี้ จากนั้น ทำการย้อมเนื้อเยื่ออีกส่วนด้วยวิธีการทาง Immunohistochemistry โดยใช้ Anti-nNOS ร่วมกับ ABC technique นำเนื้อเยื่อที่ได้มาทำการวัดความเข้มสีของรงควัตถุที่เกิดจาก Immunoreactivity ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของแต่ละบริเวณ (DG CA3 และ CA1) จากเนื้อเยื่อสมองทั้งโคอ่อนและโคแก่โดยใช้ Image Analysis Software (Olympus Microimage®) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนเมื่อนำมาทำการเปรียบเทียบกับโคแก่ พบว่า มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณของสมองส่วนนี้ระหว่างโคอ่อนและโคแก่ พบว่า ในโคแก่มีจำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 มากกว่าโคอ่อน ในขณะที่บริเวณที่เหลือมีจำนวนไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของรงควัตถุจาก Immunoreactivity ต่อ Anti-nNOS ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณระหว่างโค 2 รุ่น ไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากผลการศึกษานี้แสดงว่า โคมีการพัฒนาของสมองส่วน Hippocampus เจริญเต็มที่แล้วเมื่ออายุ 1 ปี แต่โคแก่มีเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 ของสมองส่วนนี้เจริญมากกว่าโคอ่อน อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ nNOS ซึ่งเป็น endogenous enzyme ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่สร้าง Nitric Oxide (NO) จาก L-Arginine เพื่อใช้เป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งกลับไม่พบความแตกต่างกัน ซึ่งต่างจากงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งพบว่าปริมาณของเอนไซม์ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) จะเพิ่มมากขึ้นในมนุษย์และสัตว์ที่มีอายุมาก และมีการตั้งสมมติฐานว่า อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับเซลล์ประสาทและทำให้สมองโดยเฉพาะสมองส่วน Hippocampus เกิดความบกพร่องทางด้านความจำและการเรียนรู้ได้ แต่งานวิจัยบางส่วนกลับรายงานว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในสัตว์อายุมากกับสัตว์อายุน้อย

Supawadee Jitpakdeebordin 2007: Quantitative Comparison of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Hippocampal Neurons of Young and Old Cattle. Master of Science (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Associate Professor Theerasak Prapong, Ph.D. 92 pages.

Hippocampus of 2 young cattle (1 yr.) and 2 old cattle (10 yr.) were collected from slaughter houses. After measuring their weight and dimension, the tissue samples were randomly picked up to prepare with paraffin technique. Some prepared tissue samples were stained with Luxol Fast Blue to study microscopic structures and components. Neurons in each area (DG, CA3 and CA1) of hippocampus were also counted. Other prepared tissue samples were processed with immunohistochemistry by using anti-nNOS and ABC technique. Color intensity of pigments, occurred from immunoreactivity, within cytoplasm of neurons in each of hippocampus from both groups of cattle was assessed by using image analysis software (Olympus Microimage[®]) under microscopes.

Comparing between young and old cattle, hippocampus from those had same size and weight. It was found that old cattle had slightly high number of neurons in CA3 when comparing to the young whereas other areas had similarity of neuron population. There was no significant difference ($p > 0.05$) of color intensity of pigment in cytoplasm of neurons of each area between the young and the old. The results of this study showed that hippocampus of cattle had already reached to maximum development at the age of 1 year but the development of neurons in CA3 area of old cattle was higher than the young. However, when comparing the quality of nNOS, an endogenous enzyme in neurons generating Nitric Oxide (NO) for being used as one of neurotransmitter substances, between the young and the old, there was no different result. Unlike this study, other research reports illustrated the increase of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in old aged human and animals. It was proposed that elevation of nNOS referred as NO amount would cause the deficit of neurons and would affect to the hippocampus. This deficit is the one of causes of dysfunction of learning and memory. Nevertheless, some studies found no difference of nNOS among different ages of animals.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธีระศักดิ์ พรพวงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งในด้านของการให้คำปรึกษา การวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษา คำแนะนำและตรวจทาน แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์สมชัย พงศ์จรรยกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิริวรรณ พรพวงษ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ รองศาสตราจารย์จันทนา ญูชรรณอยุธยา อาจารย์ผู้แทนบัณฑิต ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณ วิไล บุญทวี บริษัท อีฟอ์แอล จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านกล้องถ่ายภาพดิจิทัลและโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่ายด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ศิริชัย วงศ์นาคเพ็ชร คุณ พชรินทร์ นาคะประวิง นักวิชาการคอมพิวเตอร์ 7 วช. กลุ่มระบบเครือข่ายคอมพิวเตอร์ ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร และคุณ สุกัญญา กองเงิน นักวิชาการ 7 ว. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลทางสถิติ และขอกราบขอบพระคุณ คุณ ฤชญา แสงประไพทิพย์ คุณ วรรณิการ์ วงษ์พานิชย์ คุณ ผลาวดี พงษ์เกษ คุณ วราภรณ์ แพทย์รักษ์ คุณ สุภชัย นิตพันธ์ คุณ สันติ ชันทอง และคุณ อติลันท์ หนิมัน ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาค ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการจัดหาเครื่องมืออุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในการทำงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุรศักดิ์ คุณแม่จิตสุภา จิตภักดี บดินทร์ และเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุก ๆ คน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจเป็นอย่างดีทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุภาวดี จิตภักดีบดินทร์

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
ขอบเขตการวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	44
สรุป	44
ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและสีย้อมสำหรับพาราฟินเทคนิค	53
ภาคผนวก ข สีย้อมและวิธีการย้อมสีย้อมด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี	57
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ความเข้มสีโดยโปรแกรม Olympus Micro Image 4.5	65
ภาคผนวก ง ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity	73
ผลงานวิจัยเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์	90
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงรายละเอียดของเอนไซม์ Nitric Oxide Synthase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	18
2	แสดงขนาดและน้ำหนักของสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคอ่อนและโคแก่	31
3	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณของสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคแก่และโคอ่อน	36
4	เปรียบเทียบความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคแก่และโคอ่อน	40

ตารางผนวกที่

ง1	แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก่	75
ง2	แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน	78
ง3	แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก่	81
ง4	แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน	82
ง5	แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก่	83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง6	
แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ้อน	88

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงส่วนบนของสมองกระป๋องปลัก ซึ่งนำสมองส่วน Cerebrum ออกเพื่อเปิดให้เห็น ส่วน Lateral Ventricle (CA = Caudate nucleus, CF = Commissure of fornix, F = Fimbria, FB = body of fornix, FS = crus of fornix, H = Hippocampus, R = Rostrum of corpus callosum และ SP = Septum pellucidum)	9
2 แสดงบริเวณต่างๆของสมองส่วน Hippocampus ได้แก่ DG, CA3และ CA1	10
3 แสดงตำแหน่งของสมองส่วน Hippocampus ในสมองหนู Rats (CA1, CA2, CA3 = cornu ammonis fields 1–3, DG = dentate gyrus, EC = entorhinal cortex, f = fornix, s = septal pole of the hippocampus, S = subiculum, t = temporal pole of the hippocampus)	11
4 แสดงวงจรกระแสประสาทที่เกิดขึ้นในสมองส่วน Hippocampus	13
5 แสดงปฏิกิริยาการสร้างก๊าซ NO โดยมีเอนไซม์ NOS เป็นสารกระตุ้น	15
6 แสดงแบบจำลององค์ประกอบพื้นฐานของเอนไซม์ NOS ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ Reductase domain และ Oxygenase domain	17
7 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ NOS ทั้ง 3 ชนิด (nNOS, eNOS และ iNOS) ซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก คือ Oxygenase, Reductase, PDZ domains และ CaM-binding site	20
8 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างสมองส่วน Hippocampus	24
9 สมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างสมองของโคอ่อน (9a) และ โคแก่ (9b)	25
10 แสดงการตัดแบ่งสมองส่วน Hippocampus เพื่อเข้าสู่กระบวนการพาราฟินเทคนิค	25
11 ขั้นตอนการทำงานเพื่อตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณ (DG, CA3 และ CA1)	30
12 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อน (12a) ในบริเวณ DG (12c) CA3 (12e) และ CA1 (12g) เปรียบเทียบกับโคอ่อน (12b) ในบริเวณ DG (12d) CA3 (12f) และ CA1 (12h) ด้วยกำลังขยาย 2 (12a และ 12b) และ กำลังขยาย 4 (12c 12d 12e 12f 12g และ 12h)	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG ของโคฮ่อน (13a) และ โคแก่ (13b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40	34
14 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคฮ่อน (14a) และ โคแก่ (14b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40	35
15 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA1 ของโคฮ่อน (15a) และ โคแก่ (15b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40	36
16 แผนภูมิแสดงจำนวนเซลล์ประสาทภายในสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคฮ่อนและโคแก่ ในแต่ละบริเวณ	37
17 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG ของโคฮ่อน (17a) และ negative control (17b) เปรียบเทียบกับโคแก่ (17c) และ negative control (17d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20	37
18 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคฮ่อน (18a) และ negative control (18b) เปรียบเทียบกับโคแก่ (18c) และ negative control (18d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20	38
19 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคฮ่อน (19a) และ negative control (19b) เปรียบเทียบกับโคแก่ (19c) และ negative control (19d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20	39
20 แผนภูมิแสดงความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS ภายในสมองส่วน Hippocampus ของเปรียบเทียบระหว่างโคแก่และโคฮ่อนในแต่ละบริเวณ	40
 ภาพผนวกที่	
ค1 แสดงการเปิดโปรแกรมเพื่อตั้งค่าความเข้มสี	68
ค2 แสดงหน้าต่าง Intensity Calibration เพื่อกำหนดค่าความเข้มสี	68
ค3 แสดงหน้าต่าง FreeForm Intensity Calibration เพื่อกำหนดค่า input และ output	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค4 แสดงหน้าต่าง Intensity Calibration เพื่อกำหนดหน่วยตามต้องการ	70
ค5 แสดงการเปิดโปรแกรมเพื่อเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ความเข้มสี	71
ค6 แสดงหน้าต่าง Count/Size	71
ค7 แสดงหน้าต่าง Select Measurements เพื่อกำหนดค่าที่ต้องการ	72
ค8 แสดงหน้าต่าง Segmentation เพื่อกำหนดคสีที่ต้องการวิเคราะห์	72
ค9 แสดงการกำหนดคสีที่ต้องการวิเคราะห์	73

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AD	=	Alzheimer's disease
BH ₄	=	Tetrahydrobiopterin
CaM	=	Calmodulin
CA1	=	Cornu Ammonis 1
CA3	=	Cornu Ammonis 3
DG	=	Dentate Gyrus
EC	=	Entorhinal Cortex
FAD	=	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	=	Flavin-mononucleotide
sGC	=	soluble Guanylyl Cyclase
GH	=	Growth Hormone
cGMP	=	cyclic Guanosine Monophosphate
IL-1	=	Interleukin-1
LHRH	=	Luteinizing hormone-releasing hormone
LEC	=	Lateral Entorhinal Cortex
LPP	=	Lateral Perforant Pathways
LTP	=	Long Term Potentiation
MEC	=	Medial Entorhinal Cortex
MPP	=	Medial Perforant Pathways
NADP ⁺	=	Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate (Oxidised form)
NADPH	=	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO	=	Nitric Oxide
NOS	=	Nitric Oxide Synthase
nNOS	=	neuronal Nitric Oxide Synthase
iNOS	=	inducible Nitric Oxide Synthase
eNOS	=	endothelial Nitric Oxide Synthase
NMDA	=	N-methyl-D-aspartic acid
Sb	=	Subiculum

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ในเซลล์
ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนและโคแก่

Quantitative Comparison of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in
Hippocampal Neurons of Young and Old Cattle

คำนำ

เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น สิ่งก็ตามมาคือความแก่ซึ่งจะแสดงออกในรูปของความความผิดปกติที่อวัยวะภายในต่างๆ เนื่องจากเซลล์เสื่อมสภาพ และสามารถแสดงออกมาในรูปของรูปร่างลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ขนร่วง ผิวหนังเหี่ยวย่น เป็นต้น (Johnson *et al.*, 1999) ความผิดปกติอย่างหนึ่งที่แสดงออกมาเมื่อสิ่งมีชีวิตเข้าสู่วัยแก่ คือความสามารถในการจดจำสิ่งต่างๆ โดยเฉพาะเรื่องราวที่เข้ามาใหม่ลดน้อยลง และเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ ได้ยากขึ้นหรือใช้ระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นด้วย ซึ่งสมองส่วนที่มีบทบาทในด้านของการเรียนรู้ การแสดงอารมณ์ความรู้สึก และการจดจำเรื่องราวต่างๆ คือ สมองส่วน Hippocampus และหากสมองส่วนนี้เสื่อมสภาพลงหรือทำงานผิดปกติไปจะส่งผลให้ความสามารถด้านการเรียนรู้และความจำลดลงไปด้วย (Broholm *et al.*, 2004) และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตเข้าสู่วัยแก่ สมองส่วน Hippocampus จะมีจำนวนลดลง เช่น ในมนุษย์ที่มีอายุมากขึ้นสมองส่วน Hippocampus จะเกิดการหดตัวลงและน้ำหนักลดลง เป็นต้น (Trollor and Valenzuela, 2001) และจากการศึกษาการทำงานของสมองส่วน Hippocampus ในด้านการเรียนรู้และความจำพบว่า สมองส่วน Hippocampus จำเป็นต้องอาศัย Nitric Oxide (NO) เป็นสารสื่อประสาทในการส่งสัญญาณประสาท (Huang and Lee, 1995) และยังพบอีกว่า NO ทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ ภายในสมองส่วน Hippocampus ด้วย (Prast and Philippu, 2001) โดยเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus จะหลั่งเอนไซม์ nNOS ออกมาที่บริเวณ Cytoplasm ของเซลล์ และสร้าง NO มาใช้เป็นสารสื่อประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในกระบวนการจดจำและการเรียนรู้ (Kulkarni and Sharma, 1993)

จากการศึกษาคุณสมบัติของ NO ทำให้ทราบว่า NO เป็นก๊าซอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืชและสัตว์ โดยในพืช NO จะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของรากและใบ (Greener, 2004) และในสัตว์นั้น NO จะมีบทบาทในหลายๆ กระบวนการของร่างกาย ทั้งในด้านของการทำงานของเส้นเลือด (Snyder *et al.*, 1998) ระบบ

ภูมิคุ้มกัน (Greener, 2004; Schuman and Madison, 1994; Snyder *et al.*, 1998) ระบบสืบพันธุ์ (Rosselli *et al.*, 1998) และระบบประสาท (Hölscher, 1997; Snyder and Dawson, 2000) แต่เนื่องจาก NO เป็นก๊าซที่มีครึ่งชีวิตสั้นมาก ร่างกายไม่สามารถสะสม NO ไว้ภายในเซลล์เพื่อหลั่งออกมาเมื่อต้องการใช้งานได้ แต่เซลล์จะสร้าง NO ขึ้นโดยมีเอนไซม์ NOS เป็นตัวกระตุ้นโดยจะออกซิไดซ์ guanidine group ของ L-Arginine O_2 และ NADPH และได้ผลผลิตออกมาเป็น ก๊าซ NO L-Citrulline และ $NADP^+$ (Alderton *et al.*, 2001) ซึ่งเอนไซม์ NOS นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) และ endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) (Kulkarni and Sharma, 1993) และแต่ละชนิดจะทำหน้าที่สร้าง NO เพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ ในแต่ละอวัยวะและระบบต่างๆ ดังนั้น ในการศึกษาเกี่ยวกับเกี่ยวกับการเรียนรู้และการจดจำสิ่งต่างๆ ในสมองส่วน Hippocampus นั้น สิ่งหนึ่งที่เราให้ความสนใจศึกษาคือ NO ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทและสารกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทอื่นๆ ในสมองส่วน Hippocampus แต่ในการศึกษา NO ซึ่งมีครึ่งชีวิตสั้นมากและสลายไปในเวลาอันรวดเร็ว จึงต้องศึกษาผ่านทางเอนไซม์ nNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ NOS ชนิดที่เซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus หลั่งออกมาเพื่อสร้าง NO (Schuman and Madison, 1994; Snyder and Dawson, 2007) จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์หลายๆ ชนิดรวมถึงมนุษย์เพื่อเปรียบเทียบระหว่างสัตว์อายุน้อยและสัตว์อายุมากกลับพบมีปริมาณเอนไซม์ nNOS ที่แตกต่างกันในระหว่าง 2 ช่วงอายุ เช่น ในหนู Rats พบว่า เมื่อหนู Rats มีอายุมากขึ้นจะมีปริมาณเอนไซม์ nNOS ลดลง (Law *et al.*, 2002) แต่จากงานวิจัยบางชิ้นกลับพบมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ nNOS (Liu *et al.*, 2003; Porta and Comolli, 1999) ในขณะที่การทดลองในหนู Mice พบว่าเมื่ออายุมากขึ้น จะมีปริมาณของเอนไซม์ nNOS ลดลง (Colas *et al.*, 2006) แต่ในมนุษย์นั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณ nNOS ในช่วงอายุ 12 วันถึง 90 ปี พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของอายุและเพศ (Blum-Degen *et al.*, 1999) เป็นต้น ดังนั้น จุดประสงค์ของการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคแก่และโคอ่อนนั้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น

การศึกษานี้ได้ทำการนับจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ของโคทั้งสองช่วงอายุในแต่ละบริเวณ พบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของโคแก่ (อายุมากกว่า 10 ปี) มีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ประสาทของโคอ่อน (อายุประมาณ 1 ปี) ในบริเวณ CA3 และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของร่องรอยที่เกิดจาก Immunoreactivity ต่อ Anti-nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์

ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ทั้งในโคแก่และโคอ่อนพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ทั้ง 3 บริเวณ ในขณะที่การเปรียบเทียบขนาดและน้ำหนักของสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโค 2 รุ่นนี้พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก นอกจากนั้น ผลการศึกษานี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ในโคที่อายุรุ่นเดียวกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ nNOS ระหว่างทั้ง 3 บริเวณของสมองส่วน Hippocampus ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบความแตกต่างของปริมาณ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ทั้งในโคที่อายุรุ่นเดียวกันและโคที่มีอายุแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาวิจัยในสัตว์อื่นและมนุษย์มีทั้งให้ผลที่ต่างกันและไม่ต่างกัน ดังนั้น อายุอาจมีปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ก็ได้

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ในสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคแก่และโคอ่อน

ขอบเขตการวิจัย

เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) ที่พบในเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณระหว่างโคแก่และโคอ่อนโดยใช้การย้อมสีแบบ Immunohistochemistry

การตรวจเอกสาร

ความแก่

ความแก่เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น และในปัจจุบัน ยังไม่สามารถหากลไกที่แน่ชัดถึงสาเหตุของลักษณะต่างๆ ที่แสดงออกมาเมื่อสิ่งมีชีวิตแก่ตัวลงหรือวิธีการเพื่อหยุดยั้งตอนการแก่ตัวลงของร่างกายได้ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของความแก่ เช่น Sohal, 2002a; 2002b; Sohal, 1995 กล่าวว่าความแก่มีสาเหตุเนื่องมาจากการเกิดภาวะ Oxidative stress เป็นเวลานาน หรืออาจเกิดจากความเสียหายของไมโทคอนเดรียเนื่องจาก Oxidative stress (Sohal, 1995) เป็นต้น ในทางกายภาพสามารถแบ่งลักษณะของความแก่ออกเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เมื่อมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นในอวัยวะใดๆ ก็ตามทำให้อวัยวะนั้นๆ ทำงานหรือมีรูปร่างลักษณะที่ผิดปกติไป จะเป็นสาเหตุให้ความแก่ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพิ่มขึ้นตามลำดับด้วย และแบบที่ 2 คือการที่สิ่งมีชีวิตนั้นแสดงลักษณะของความแก่ออกมา เช่น ขนร่วง ผิวหนังเหี่ยวย่น เป็นต้น (Johnson *et al.*, 1999)

ในส่วนของโคนั้นยังไม่สามารถระบุอายุที่เข้าสู่วัยชราได้อย่างแน่นอน เช่น Geelhoed, 1996 นั้นได้ทำการทดลองโดยถือว่าโคที่มีอายุมากกว่า 6 ปี 6 เดือนเป็นโคแก่ ในขณะที่ Malhi *et al.*, 2006 ได้ถือเอาโคที่มีอายุประมาณ 13-14 ปีมาเป็นต้นแบบในการศึกษาลักษณะของระบบสืบพันธุ์ของโคแก่ โดยตามปกติแล้วโคจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 22 ปี และมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 7 ปี ในขณะที่มนุษย์นั้นถือว่าเริ่มเข้าสู่วัยชราเมื่ออายุ 65 ปีขึ้นไป (Innvista, 2007) และจะมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 77 – 79 ปี แต่จากการวิจัยพบว่า ความเสื่อมถอยของสมองทั้งด้านกายภาพและประสิทธิภาพการทำงานนั้นจะเริ่มพบได้ในมนุษย์ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป (Trollor and Valenzuela, 2001) ส่วนในสุนัขที่ถือว่าชีวิตย่างเข้าสู่วัยชราคือสุนัขที่มีอายุ 10 ปีขึ้นไป (Baum *et al.*, 2007; Pugliese *et al.*, 2007) ซึ่งในสุนัขนั้นจะมีอายุเฉลี่ยมากกว่า 20 ปี ในสายพันธุ์ขนาดเล็ก (Toy breed) 13 - 14 ปี ในสายพันธุ์ขนาดกลางและ 7 - 8 ปี ในสายพันธุ์ขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับแมวซึ่งจะถือว่าเป็นวัยชราเมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไปเช่นกัน (Gunn-Moore *et al.*, 2006) แต่เมวนั้นจะมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 25 ปี

เมื่อสิ่งมีชีวิตอย่างเข้าสู่วัยแก่จะมีลักษณะและสัญญาณต่างๆ เกิดขึ้น เช่น ลักษณะของผิวหนังที่เหี่ยวย่น หรือ การทำงานของระบบต่างๆ ที่เริ่มผิดปกติไป รวมถึง ความสามารถในการคิด เรียนรู้ และจดจำสิ่งต่างๆ โดยเฉพาะเรื่องราวที่เข้ามาใหม่ โดยจะพบว่าในสิ่งมีชีวิตที่มีอายุย่างเข้าสู่วัยชรา จะมีความสามารถในการจดจำที่แย่ลง และเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ ได้ยากขึ้นหรือใช้ระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นในการเรียนรู้ เช่น ในผู้สูงอายุ จะมีปัญหาด้านการจดจำเรื่องราวต่างๆ ในชีวิตประจำวัน และหากต้องเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ จะมีความสามารถในการจดจำที่น้อยกว่าสิ่งมีชีวิตอายุน้อย เป็นต้น และนอกจากนี้ยังพบมีความผิดปกติเกิดขึ้นในระบบประสาทของสิ่งมีชีวิตที่มีอายุมากขึ้นทั้งทางกายภาพและการทำงาน โดยในแง่ของกายภาพนั้นจะพบว่า เซลล์ประสาทในสมองมีจำนวนลดลง ซึ่งจะส่งผลให้ความสามารถในการจดจำความทรงจำระยะสั้น (Short-term memory) ลดลง รวมถึงความสามารถในการระลึกถึงความทรงจำเก่าๆ ความสามารถในการคิดแก้ไขสถานการณ์เฉพาะหน้า หรือความตื่นตัวในการหลีกเลี่ยงอันตรายลดลงได้ด้วย และนอกจากนี้ยังส่งผลให้การเปลี่ยนความทรงจำระยะสั้น (Short-term memory) เป็นความทรงจำระยะยาว (Long-term memory) ยากขึ้นด้วย (Zhang *et al.*, 2007) และจากการที่จำนวนของเซลล์ประสาทลดลงนี้ ทำให้น้ำหนักและขนาดของสมองลดลง จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการตรวจสอบสมองมนุษย์เปรียบเทียบกับกันทั้งสองช่วงอายุ คือ วัยหนุ่มสาว (อายุน้อยกว่า 50 ปี) กับผู้สูงอายุ (อายุมากกว่า 50 ปี) ด้วยเครื่อง Magnetic Resonance Imaging (MRI) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของสมองในแต่ละช่วงอายุนั้น จะพบว่าเมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้นจะเกิดการเหี่ยวลงของสมอง (Trollor and Valenzuela, 2001) โดยเฉพาะในบริเวณสมองส่วน Cerebral Cortex (DeLisi *et al.*, 1997; Petten, 2004) และพบว่าเกิดการหดตัวของสมองส่วน Frontal lobe ส่วนในสมองชั้นนอก (Neocortex) นั้น ส่วน Grey matter จะมีปริมาณลดลงมากกว่าในชั้น White matter ในขณะที่ บริเวณ Limbic areas นั้น จะพบการหดตัวของสมองส่วน Hippocampus เมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้นด้วย (Trollor and Valenzuela, 2001)

และจากการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทและขนาดและน้ำหนักของสมองในสิ่งมีชีวิตที่มีอายุมากขึ้นนั้น ทำให้พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตอย่างเข้าสู่วัยชรา จะมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าหรืออันตรายที่มาถึงได้ช้าลง อันเป็นผลเนื่องมาจากการที่อัตราการส่งกระแสประสาทช้าลง โดยจะพบว่า ในมนุษย์ที่มีอายุประมาณ 65 ปี จะมีอัตราการส่งกระแสประสาทช้าลงประมาณ 5–10 % (Innvista, 2007) ซึ่งส่งผลให้การตอบสนองแบบฉับพลันของร่างกายช้าลงไปด้วย และนอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้นปริมาณของสารสื่อประสาทจะลดลง โดยและจำนวนของ Receptor sites ที่ใช้ในการรับสัญญาณประสาทในเซลล์ประสาทยังลดลงอีกด้วย และเซลล์ประสาทที่อายุมากอาจเกิดรงควัตถุหรือสารบางชนิดขึ้นภายในเซลล์โดยไม่ทราบสาเหตุและหน้าที่ของสารเหล่านี้ แต่จะ

ส่งผลให้เซลล์ประสาทเหล่านี้สูญเสียความสามารถในการทำงานหรือทำงานได้น้อยลง และอวัยวะรับความรู้สึกต่างๆ จะรับความรู้สึกได้ช้าลงหรือแยลง เช่น หูจะได้ยินเสียงได้น้อยลง ตาจะมองเห็นได้น้อยลง จมูกรับกลิ่นได้แยลง ลิ้นรับรสได้แยลง เป็นต้น ซึ่งเหล่านี้ล้วนมีผลเนื่องมาจากการที่เซลล์ประสาทรับความรู้สึกต่างๆ ลดจำนวนลง และยังส่งผลให้การตอบสนองช้าลงอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีโรคที่มักเกิดกับผู้สูงอายุ ได้แก่ Alzheimer's disease, Parkinson's disease และ Stroke เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้รวมถึงความสามารถในการรับรู้ เรียนรู้ และจดจำสิ่งต่างๆ ที่ลดลงนั้น มักเกิดจากความผิดปกติที่สมองส่วน Hippocampus เนื่องจากสมองส่วนนี้มีหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนไหว ควบคุมการแสดงออกทางบุคลิกภาพและพฤติกรรมในรูปแบบต่างๆ การเรียนรู้และจดจำเรื่องราวต่างๆ ที่เกิดขึ้นในอดีต รวมถึงเป็นสมองส่วนที่จะสร้างความทรงจำที่เกิดจากเหตุการณ์ใหม่ และพบว่าหากสมองส่วน Hippocampus เกิดความเสียหายหรือได้รับความกระทบกระเทือนๆ ยกตัวอย่างเช่น ในผู้ป่วยที่ประสบอุบัติเหตุจนทำให้ส่วนของฮิปโปแคมปัสเสียหายไปจนไม่สามารถทำงานได้จะส่งผลให้คนๆ นั้นไม่สามารถจดจำเรื่องราวเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นใหม่ได้ ทำให้ผู้ป่วยคนนั้นติดอยู่กับเหตุการณ์ในอดีต และไม่มี ความทรงจำเกี่ยวกับสิ่งใหม่ๆ ที่ได้พบเจอหลังอุบัติเหตุครั้งนั้น เป็นต้น และนอกจากนี้ สมองส่วนนี้ยังทำหน้าที่ในส่วนของการเรียนรู้ จดจำชื่อเรียกของสิ่งต่างๆ ทั้งชื่อผู้คนที่ได้พบเจอ ชนิดของสัตว์ ชนิดของเครื่องมือ หรือชื่อของสถานที่ต่างๆ อีกด้วย (Broadbent *et al.*, 2004) ซึ่งสารสื่อประสาทที่ใช้ในสมองส่วน Hippocampus คือ NO นั่นเอง (Huang and Lee, 1995) และนอกจากนี้ NO ยังถูกใช้เป็นสารกระตุ้นให้เซลล์ประสาทหลังสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ ออกมาอีกด้วย เช่น acetylcholine, catecholamine และ serotonin เป็นต้น (Prast and Philippu, 2001) ดังนั้น เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น เซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus มีจำนวนลดลง ย่อมส่งผลกระทบต่อปริมาณของ NO ที่ใช้ในการส่งกระแสประสาทในสมองส่วน Hippocampus เพื่อใช้สร้างความทรงจำและการเรียนรู้อย่างแน่นอน

ผลกระทบเนื่องจากความแก่ที่ส่งผลต่อ NO นั้น จะพบว่า เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น เซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ลดลง ความสามารถในการสร้าง NO ลดลง จะพบความบกพร่องด้านการตอบสนองต่อสิ่งเร้าและความสามารถด้านการเรียนรู้เกิดขึ้นอยู่เสมอ ซึ่งส่วนหนึ่งน่าจะเกิดขึ้นจากผลกระทบจากความแก่ที่ส่งผลต่อ NO และนอกจากนี้ เนื่องจาก NO เป็นก๊าซที่มีคุณสมบัติเป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่เมื่อมีการสะสมในร่างกายในปริมาณที่มากระดับหนึ่ง จะส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ และยังมีรายงานอีกว่า NO เป็นก๊าซที่มีบทบาทในแง่ของการเป็นสาเหตุให้มีการหลั่งฮอร์โมนบางชนิดลดลง และยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรค Alzheimer's Disease และโรค Parkinson ในผู้สูงอายุอีกด้วย (McCann *et al.*, 2005) จึงมี

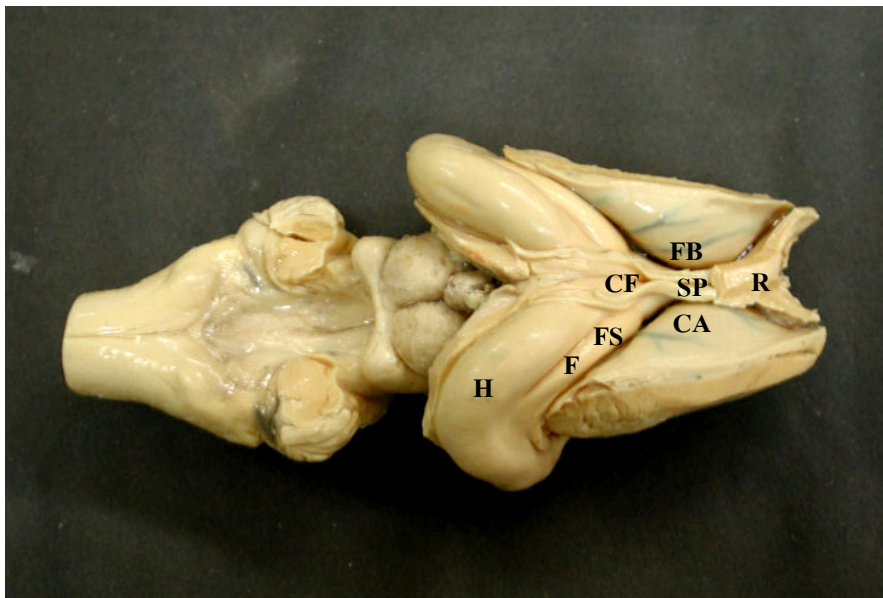
นักวิจัยหลายท่านทำงานวิจัยเพื่อตรวจสอบปริมาณเปรียบเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิตสองช่วงอายุ โดยผ่านการตรวจวัดปริมาณของเอนไซม์ NOS ในสัตว์หลายๆ ชนิด เช่น ในมนุษย์ พบว่า ปริมาณของเอนไซม์ NOS ในสมองมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่างมนุษย์ที่มีอายุแตกต่างกัน (0 – 90 ปี) (Blum-Degen *et al.*, 1999) ในขณะที่การทดลองในหนู rats นั้น กลับพบว่าได้ผลที่แตกต่างกันในหลายๆ งานวิจัย โดยงานวิจัยบางชิ้นระบุว่า เมื่อหนู rats มีอายุมากขึ้น จะพบมีการหลั่งเอนไซม์ NOS ในสมองมากขึ้นตามไปด้วย (Liu *et al.*, 2003; Porta and Comolli, 1999; Siles *et al.*, 2002) แต่ในงานวิจัยบางชิ้นกลับระบุว่าเมื่อหนู rats มีอายุมากขึ้น จะมีการหลั่งเอนไซม์ NOS ได้ลดลง (Joo *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2000; Yua *et al.*, 2000) เป็นต้น จึงยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดถึงผลกระทบระหว่างอายุที่เพิ่มขึ้นกับความเปลี่ยนแปลงของการหลั่งเอนไซม์ NOS และการสร้าง NO

Hippocampus

สมองส่วน Hippocampus เป็นสมองส่วนที่เก่าแก่ที่สุดในวิวัฒนาการ เป็นส่วนของ cerebral cortex ส่วน Archipallium ที่ม้วนเข้าไปอยู่ใน temporal horn ของ lateral ventricle เกิดจากการขยายของเซลล์ประสาทด้านในของ Temporal lobe ของสมองส่วนหน้า ซึ่ง Temporal lobe นี้เป็นสมองส่วนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและอยู่ด้านหน้าของสมอง โดยสมองส่วนหน้านั้นจะประกอบไปด้วย Cerebral hemispheres, Limbic system, Thalamus, Hypothalamus และ Corpus callosum และสมองส่วน Hippocampus นี้เป็นส่วนประกอบหนึ่งใน Limbic system

สมองส่วน Hippocampus เป็นบริเวณที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายเกือกม้า (horseshoe-shaped) ขนาดใหญ่ วางตัวอยู่ใต้ Corpus callosum และสามารถพบสมองส่วน Hippocampus ได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด โดยจะพบสมองส่วนนี้ได้ในโคด้วย โดยในโคนั้นสมองส่วน Hippocampus จะมีลักษณะเหมือนกับที่พบในกระบือ ม้า และสุนัข และมีลักษณะคล้ายกับที่พบในคน และสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนี้ โดยทั่วไปจะมีรูปร่างโค้งเป็นรูปตัวซี (C-shaped) 2 ข้าง ผิวของ hippocampus จะมี white matter บางๆ กลุ่มอยู่เรียกว่า *alveus* ซึ่งส่วนหนึ่งของ *alveus* จะ cross midline ไปเป็น commissure of fornix เพื่อเชื่อมทั้ง 2 ส่วนไว้ด้วยกัน ส่วนที่ไม่ cross midline จะรวมเป็นส่วนที่เรียกว่า *frimbria* และ *frimbria* นี้จะต่อเนื่องไปเป็น fornix โดยไปสิ้นสุดที่ mammillary body สมองส่วน Hippocampus มีจุดเริ่มต้นอยู่ที่ Subcortical piriform area และอยู่ใกล้กับ Amygdala ในสมองของสุนัข แมว และมนุษย์ จะพบสมองส่วน Hippocampus อยู่บริเวณใต้

Corpus callosum ส่วนในโคนและกระบือจะพบสมองส่วน Hippocampus อยู่ในพื้นที่ส่วน Inferior horn, posterior horn จนถึงบริเวณ ตอนท้ายของ body ของ lateral ventricle และอยู่ในตำแหน่ง ตอนล่าง ด้านในของ Caudate nucleus ในบริเวณระหว่าง Caudate nucleus กับสมองส่วน Hippocampus จะพบ Choroid plexus ของ Lateral ventricle แทรกขึ้นมา และจากการที่สมองส่วน Hippocampus มีลักษณะโค้งไปตามตำแหน่งของ Lateral ventricle จึงพบว่าใน Coronal section ของสมองจะพบสมองส่วน Hippocampus วางตัวอยู่ที่ตอนบนของแผ่นสมองในตำแหน่ง body ของ Lateral ventricle โดยตำแหน่งที่อยู่จะสัมพันธ์กับ Corpus callosum และวางตัวอยู่บริเวณตอนล่าง ของแผ่นสมองที่ตำแหน่ง Inferior horn ของ Lateral ventricle ซึ่งจะแตกต่างจากตำแหน่งของสมอง ส่วน Hippocampus ที่พบในคน ซึ่งบริเวณส่วนใหญ่ของสมองส่วน Hippocampus นั้นจะอยู่เฉพาะ ใน Inferior horn ของ Lateral Ventricle และมีขนาดเล็ก (มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ และคณะ, 2543)

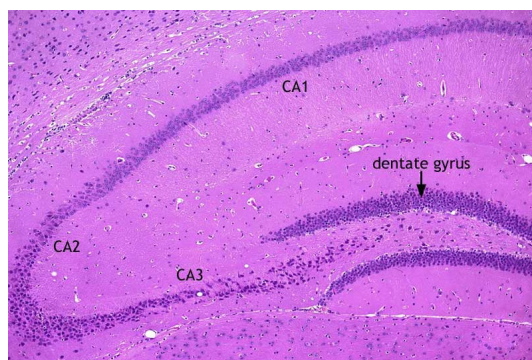


ภาพที่ 1 แสดงส่วนบนของสมองกระบือปลัด ซึ่งนำสมองส่วน Cerebrum ออกเพื่อเปิดให้เห็นส่วน Lateral Ventricle (CA = Caudate nucleus, CF = Commissure of fornix, F = Fimbria, FB = body of fornix, FS = crus of fornix, H = Hippocampus, R = Rostrum of corpus callosum และ SP = Septum pellucidum)

ที่มา: มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ และคณะ (2543)

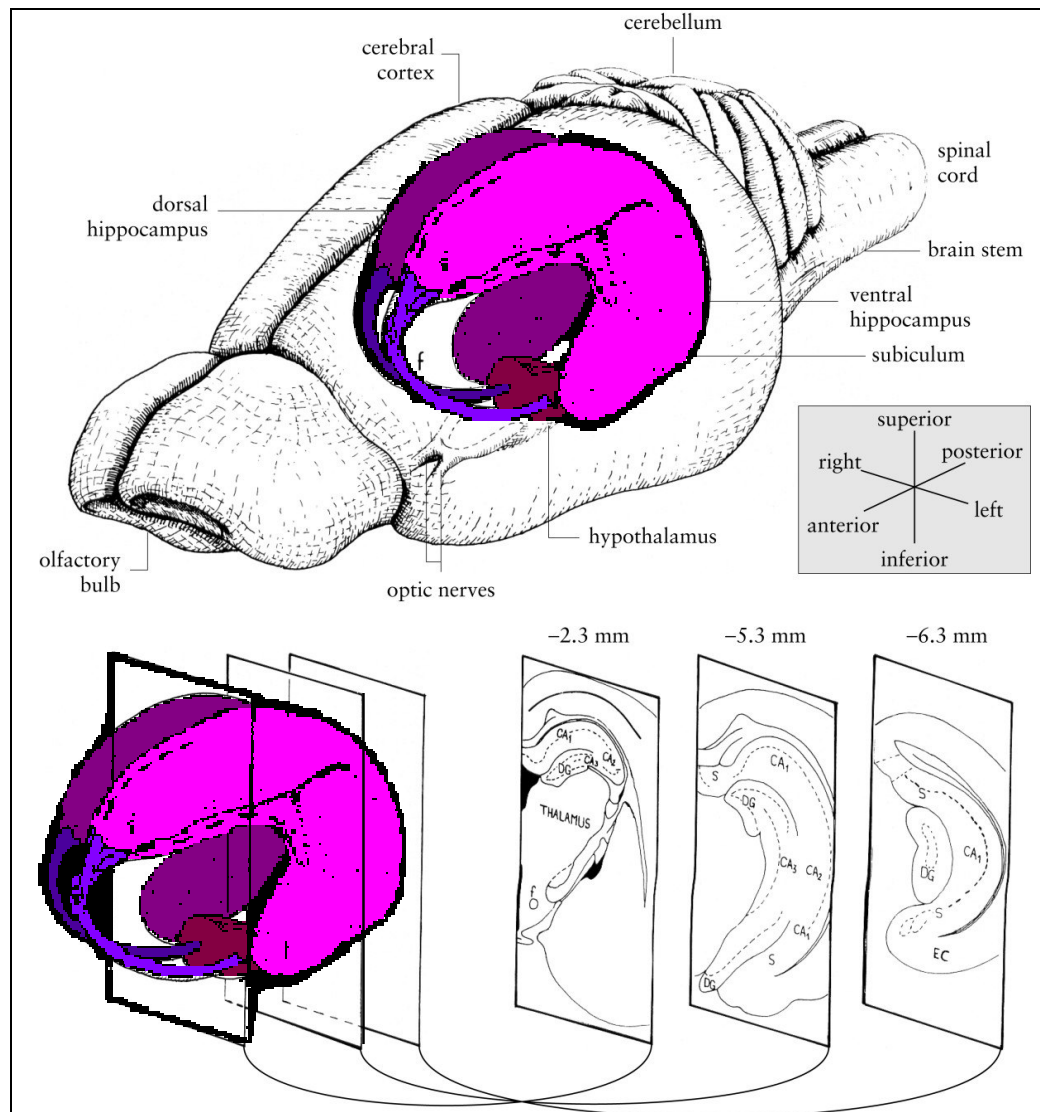
สมองส่วน Hippocampus นั้นจะทำงานเกี่ยวข้องกับระบบประสาทอัตโนมัติเป็นหลัก โดยจะรับสัญญาณข้อมูลที่ส่งมาจากสมองส่วน Temporal ของสมองส่วน Cerebral cortex แล้วทำการกระจายสัญญาณไปให้กับประสาทรับความรู้สึกส่วนต่างๆ เช่น การมองเห็น การดมกลิ่น และการฟัง เป็นต้น (Burnod, 1990) และสมองส่วน Hippocampus ยังทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนไหว ควบคุมบุคลิกภาพและพฤติกรรมในรูปแบบต่างๆ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจดจำเรื่องราวเหตุการณ์ต่างๆ ในอดีต และยังทำหน้าที่การเรียนรู้จดจำชื่อเรียกของสิ่งต่างๆ ทั้งชื่อผู้ที่คนที่ได้พบเจอ ชนิดของสัตว์ ชนิดของเครื่องมือ หรือชื่อของสถานที่ต่างๆ อีกด้วย (Broadbent *et al.*, 2004)

สมองส่วน Hippocampus ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชั้น คือ ชั้นนอกสุด (Molecular layer), ชั้นกลาง (Pyramidal cell layer) และชั้นในสุด (Polymorphic cell layer) ซึ่งในชั้นในสุดนี้จะประกอบด้วยเซลล์ประสาท (Pyramidal neurons) และ Granule cells และนอกจากนี้ สมองส่วน Hippocampus ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 บริเวณหลักตามแนวการจัดเรียงตัวของเซลล์ประสาท (Pyramidal neurons) ได้แก่ Dentate Gyrus (DG), Cornu Ammonis 3 (CA3) และ Cornu Ammonis 1 (CA1) และนอกจากนี้ยังมีส่วนที่เรียกว่า Subiculum ซึ่งเป็นส่วนต่อระหว่างสมองส่วน Entorhinal Cortex (EC) และบริเวณ CA1 ของสมองส่วน Hippocampus ด้วย โดยเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG นั้นจะเป็น Pyramidal neurons ในขณะที่ในบริเวณ CA3 และ CA1 นั้นจะเป็น Granule cells ซึ่งในแต่ละบริเวณนั้นจะมีจำนวนเซลล์ประสาทที่แตกต่างกันออกไป และยังทำหน้าที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณด้วย



ภาพที่ 2 แสดงบริเวณต่างๆของสมองส่วน Hippocampus ได้แก่ DG, CA3และ CA1

ที่มา: Deltagen Inc (2007)



ภาพที่ 3 แสดงตำแหน่งของสมองส่วน Hippocampus ในสมองหนู Rats (CA1, CA2, CA3 = cornu ammonis fields 1–3, DG = dentate gyrus, EC = entorhinal cortex, f = fornix, s = septal pole of the hippocampus, S = subiculum, t = temporal pole of the hippocampus)

ที่มา: Cheung and Cardinal (2005)

โดยจากการศึกษาในทั้ง 3 บริเวณของสมองส่วน Hippocampus พบว่า บริเวณ Entorhinal Cortex (EC) เป็นบริเวณหลักในการรับกระแสประสาทเข้าสู่สมองส่วน Hippocampus และบริเวณ Subiculum เป็นบริเวณหลักในการส่งกระแสประสาทออกจากสมองส่วน Hippocampus (O'Mara, 2005) ซึ่งในการรับกระแสประสาทนั้น บริเวณ EC จะรับสัญญาณประสาทจากหลายๆ ส่วนของสมอง เช่น Perirhinal Cortex และ Prefrontal Cortex เป็นต้น จากนั้น เซลล์ประสาทในบริเวณ EC จะส่งกระแสประสาทไปยังชั้น Molecular layer ของบริเวณ DG (Insausti, 1993) และบริเวณ CA3 (Hasselmo, 2005) และเซลล์ประสาทในบริเวณ DG จะส่งกระแสประสาทไปยังเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 เช่นกัน จากนั้น เซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 จะส่งกระแสประสาทไปให้เซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 ซึ่งเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 นี้จะส่งกระแสประสาทออกไปยังบริเวณ Subiculum เพื่อส่งกระแสประสาทออกไปยังบริเวณอื่นๆ ต่อไป และจากรูปแบบของการส่งกระแสประสาทไปยังบริเวณต่างๆ ภายในสมองส่วน Hippocampus นั้น จึงอาจสรุปวงจรประสาทที่เกิดขึ้นได้ 4 วงจร ได้แก่ Perforant pathway, Mossy Fiber Pathway, Schaffer Collateral/ Associational Commissural Pathway และ CA1- Subiculum – EC

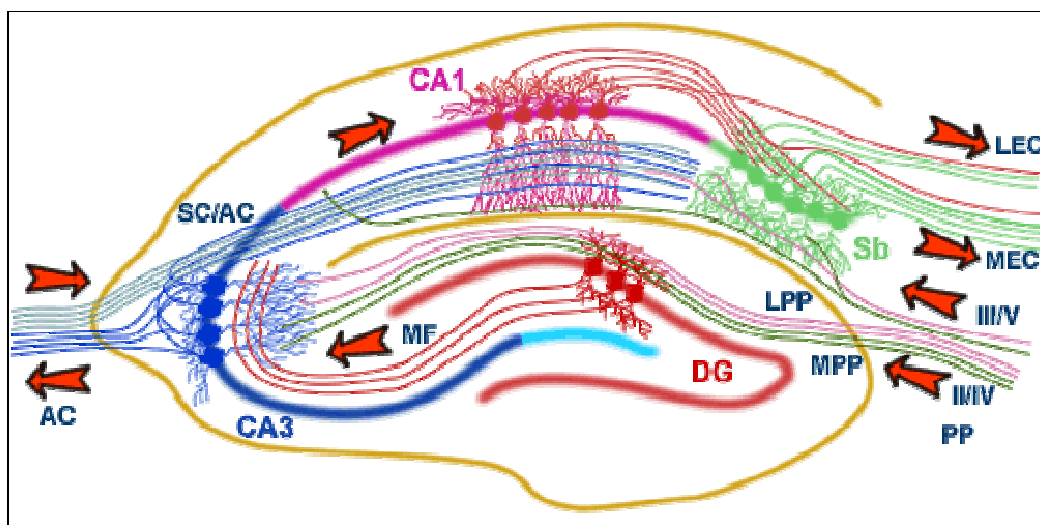
1. Perforant Pathway เป็นการส่งข้อมูลเข้าสู่สมองส่วน Hippocampus โดย Axon จากเซลล์ประสาท (Pyramidal neurons) และ Stellate cells ในส่วน EC จะยื่นแขนงประสาทเข้ามาติดต่อกับ Granule cells ที่อยู่ในบริเวณ DG และยื่นแขนงประสาทเข้ามาติดต่อกับเซลล์ประสาท (Pyramidal neurons) ที่อยู่ในบริเวณ CA3 โดย Perforant Pathway นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น Lateral และ Medial Perforant Pathways (LPP และ MPP) โดยเรียกชื่อตามแขนงประสาทว่ามีที่มาจาก EC ส่วน Lateral หรือส่วน Medial (LEC หรือ MEC) โดยวงจรประสาทนี้เป็นวงจรแรกที่มีการค้นพบ LTP

2. Mossy Fiber Pathway เกิดจากการที่ Axon ของ Granule cells ในบริเวณ DG ซึ่งเรียกว่า Mossy fibres ทำการยื่นแขนงเข้าไปส่งกระแสประสาทให้กับ pyramidal cells ในบริเวณ CA3

3. Schaffer Collateral/Associational Commissural Pathway วงจรประสาทนี้เริ่มต้นจาก axon จากเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 ยื่นแขนงประสาทเข้าไปยังบริเวณ CA1 โดยแขนงประสาทนี้มีทั้งส่วนที่มาจากสมองส่วน Hippocampus ซีกเดียวกัน (Ipsilateral) หรืออาจจะมาจากสมองส่วน Hippocampus อีกซีกหนึ่ง (Contralateral) ก็ได้ โดยเรียกเส้น

แขนงประสาทในกระแสประสาทนี้ที่มีการยื่นแขนงไปยังสมองส่วน Hippocampus อีกซีก หนึ่งว่า Commissural fibres ซึ่งวงจรประสาทนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของ NMDA receptor กับ LTP และ LTD

4. CA1 - Subiculum - EC เป็นวงจรประสาทจากบริเวณ CA1 ไปยังบริเวณ Subiculum (Sb) โดยจะพบว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่ของบริเวณ CA1 จะยื่นแขนงประสาทไปยังบริเวณ Subiculum และเซลล์ประสาทจากทั้งสองบริเวณนี้จะส่งกระแสประสาทไปยัง EC



ภาพที่ 4 แสดงวงจรกระแสประสาทที่เกิดขึ้นในสมองส่วน Hippocampus

ที่มา: University of Bristol (2007)

และเมื่อทำการศึกษาถึงหน้าที่การทำงานในแต่ละบริเวณของสมองส่วน Hippocampus พบว่าเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ยังมีบทบาทในการรับกระแสประสาทจากประสาทรับความรู้สึกต่างๆ เช่น การมองเห็น การฟัง การดมกลิ่น และการรับสัมผัส อีกด้วย (Kesner *et al.*, 2005) โดยเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 จะรับข้อมูลที่ได้จากการมองเห็นและการดมกลิ่น (Kesner *et al.*, 2005; Rajji *et al.*, 2006) จากนั้นจึงส่งข้อมูลที่ได้นี้ไปยังเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 เพื่อส่งต่อข้อมูลที่ไปยังสมองส่วนอื่นๆ และเก็บข้อมูลนั้นๆ ไว้ในรูปของความทรงจำ (Vazdarjanova and Guzowski, 2004) นอกจากนี้ อวัยวะรับความรู้สึกต่างๆ ยังส่งข้อมูลที่ได้จาก

การฟัง การมองเห็น การดมกลิ่น มายังบริเวณ EC ซึ่งจากบริเวณ EC นี้จะส่งข้อมูลที่ได้ออกให้กับเซลล์ประสาทในบริเวณ DG และบริเวณ CA3 ด้วย (O'Mara, 2005) และยังพบว่าเซลล์ประสาทของบริเวณ CA1 ทำงานเกี่ยวกับความทรงจำระยะยาว โดยหากสิ่งมีชีวิตเกิดความเครียดหรือมีอายุมากขึ้นส่งผลให้การหลั่งฮอร์โมนในร่างกายผิดปกติไป และไปขัดขวางการส่งกระแสประสาทระหว่างบริเวณ CA1 และบริเวณ Subiculum สิ่งมีชีวิตนั้นจะเกิดความผิดปกติเกี่ยวกับความทรงจำระยะยาวได้ (O'Mara, 2005)

Nitric Oxide Synthase

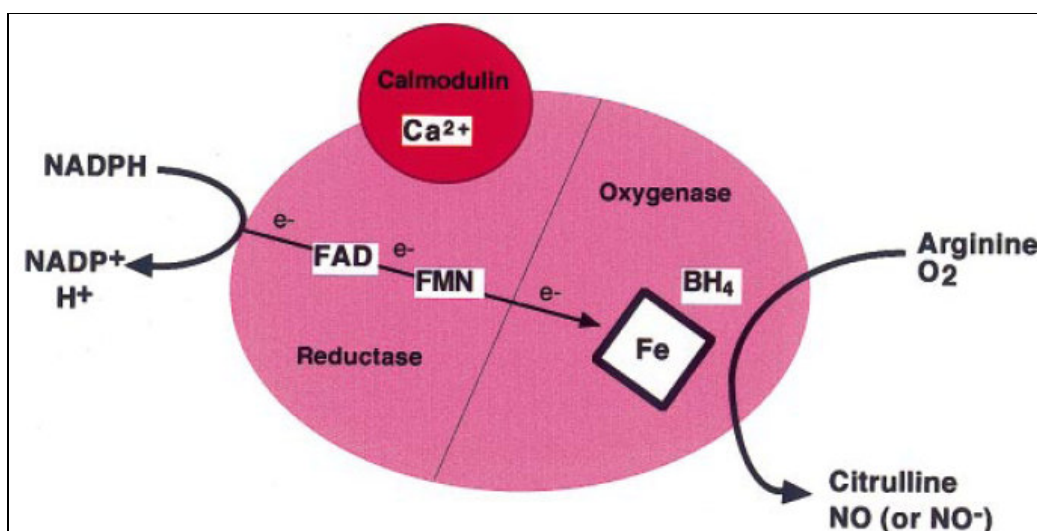
Nitric Oxide (NO) เป็นก๊าซอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืชและสัตว์ โดยในพืชนั้นพบว่า NO มีบทบาทในด้านของการเจริญเติบโตของรากและใบ และยังมีส่วนในกระบวนการป้องกันไม่ให้พืชได้รับผลกระทบจากความเครียดเนื่องมาจากผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมและการติดเชื้อ (Greener, 2004)

ส่วนในสัตว์นั้น มีการค้นพบบทบาทของ NO เป็นครั้งแรกในด้านของการตอบสนองต่อการอักเสบและการทำงานของเส้นเลือด (Snyder *et al.*, 1998) ต่อมาจึงพบว่า NO มีบทบาทในระบบการทำงานต่างๆ ของร่างกาย ทั้งในด้านของภูมิคุ้มกัน โดย NO จะเข้าไปมีส่วนในการควบคุมการทำงานของ Macrophages, Neutrophils และ Leukocytes เพื่อการต่อสู้กับเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต (Greener, 2004) เกี่ยวข้องกับ Macrophage cytotoxicity (Schuman and Madison, 1993) และนอกจากนี้ NO ยังมีความสามารถในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเซลล์เนื้องอกและเชื้อราของ macrophages อีกด้วย (Snyder *et al.*, 1998) ส่วนในด้านของระบบไหลเวียนโลหิต NO จะเข้าไปมีบทบาทในด้าน Penile Erection (Schuman and Madison, 1993) การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การคลายตัวของกล้ามเนื้อ Penile Corpus Carvernosum และการควบคุมแรงดันเลือด (Kiechle and Malinski, 1993) โดยในการเกิด penile erection นั้นมีสาเหตุมาจากการกระตุ้นเส้นประสาท pelvic nerve โดยเอ็นไซม์ nNOS และยังพบว่า NO ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ โดยพบว่าหากมนุษย์สูดดมก๊าซ NO จะเกิดอาการความดันเลือดในหลอดเลือด Pulmonary artery ลดลง และยังพบว่ามีปริมาณของก๊าซ O_2 เพิ่มขึ้น (Kiechle and Malinski, 1993) ในด้านของระบบสืบพันธุ์ เมื่อเกิดการปฏิสนธิ Acrosome ที่ส่วนหัวของอสุจิจะสร้าง NO ออกมาเพื่อกระตุ้นให้ไข่เกิดการแบ่งตัว Meiosis II และเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ของการปฏิสนธิต่อไป (Rosselli *et al.*, 1998)

ทางด้านระบบประสาท พบว่าในระบบประสาทส่วนกลาง NO มีบทบาทสำคัญในการทำงานของสมองส่วน Cerebellum โดยผ่านการกระตุ้นของ soluble Guanylate Cyclase (sGC) และการเหนี่ยวนำของ cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) (McCann *et al.*, 2005; Vincent and Hope, 1992) และมีบทบาทอย่างมากในแง่ของ Long-Term Synaptic Depression, Long-Term Potential of Synaptic Transmission (Kiechle and Malinski, 1993), Neurotoxicity, Plasticity ในสมองส่วน Hippocampus (Schuman and Madison, 1994) มีการค้นพบว่า เมื่อออกซิเจนลดต่ำลง จะเกิดการลดต่ำลงของ NO ด้วย ซึ่งส่งผลให้เซลล์บางเซลล์ในสมองส่วน Medulla Oblongata ตั้งเพิ่มอัตราการหายใจให้มากขึ้นและยาวขึ้น และนอกจากนี้ NO ยังทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการทำงานของสารต่างๆ (เช่น Guanylate Cyclase) และเป็นสารยับยั้งการทำงานของสารบางชนิด (เช่น เอนไซม์ Cytochrome oxidase) เป็นต้น (Ledo *et al.*, 2004) และยังพบว่าในทุกส่วนของสมองจะมีการสร้าง NO ออกมาเพื่อกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทหลายๆ ชนิด เช่น Acetylcholine, Catecholamine, Serotonin, Histamine และ Adenosine (Prast and Philippu, 2001; Snyder and Dawson, 2007) นอกจากนี้ NO ยังทำหน้าที่ควบคุมปริมาณของ hypothalamic peptides ที่จะหลั่งออกมา ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนควบคุมพฤติกรรมกำหนัดของสัตว์ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย และจากการทดลองในหนู rats พบว่า เมื่อยับยั้งการสร้าง NO จะเกิดการยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน Growth hormone (GH) และยังพบมีการยับยั้งการหลั่ง Somatostatin ด้วย (McCann *et al.*, 2005) ภายในสมองส่วน Hippocampus NO ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ LTP (Bon and Garthwaite, 2003; McCann *et al.*, 2005) โดย NO จะทำหน้าที่เป็น retrograde messenger ช่วยในการส่งกระแสประสาทจากเซลล์ประสาทไปยัง Schaffer Collateral pathway ในกระบวนการ LTP ในสมองส่วน Hippocampus (Snyder and Dawson, 2007) และพบมีการสร้าง NO ออกมาจากบริเวณ CA1 ของสมองส่วน Hippocampus เมื่อมีการส่งกระแสประสาทในสมองส่วนนี้ (Ledo *et al.*, 2004) และจากการทดลองฉีดสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NOS จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ LTP ด้วย และยังพบ hemoglobin และ oxymyoglobin ที่มีการดูดซึม NO จะมีความสามารถในการส่งกระแสประสาทแบบ LTP ลดลงด้วย (Prast and Philippu, 2001)

จากการศึกษาคุณสมบัติของ NO ทำให้ทราบว่า NO เป็นก๊าซที่มีครึ่งชีวิตสั้นมาก กล่าวคือเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตสร้าง NO ขึ้นมา ก๊าซชนิดนี้จะแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปเพื่อไปยังเซลล์เป้าหมาย และจะสลายไปภายในเวลาเพียง 5 – 10 วินาทีเท่านั้น (McCann *et al.*, 2005) ร่างกายจะไม่สามารถสะสม NO ไว้ภายในเซลล์เพื่อหลั่งออกมาเมื่อต้องการใช้งานได้ (Ledo *et al.*, 2004) แต่

เซลล์จะสร้าง NO ขึ้นโดยใช้เอนไซม์ Nitric Oxide Synthase (NOS) โดยเอนไซม์ NOS เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างก๊าซ NO ด้วยการออกซิไดซ์ guanidine group ของ L-Arginine O_2 และ NADPH และได้ผลผลิตออกมาเป็น NO L-Citrulline และ $NADP^+$ (Alderton *et al.*, 2001) และยังพบว่าเมื่อสร้าง NO ได้ในระดับหนึ่งซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายแล้ว NO ที่เหลือจากการใช้งานจะย้อนกลับไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NOS เอง (Poulos, 2005) ดังนั้น หากต้องการศึกษาการทำงานของ บริเวณที่ผลิต และปริมาณของ NO จะต้องศึกษาผ่านทางเอนไซม์ NOS (Kulkarni and Sharma, 1993)



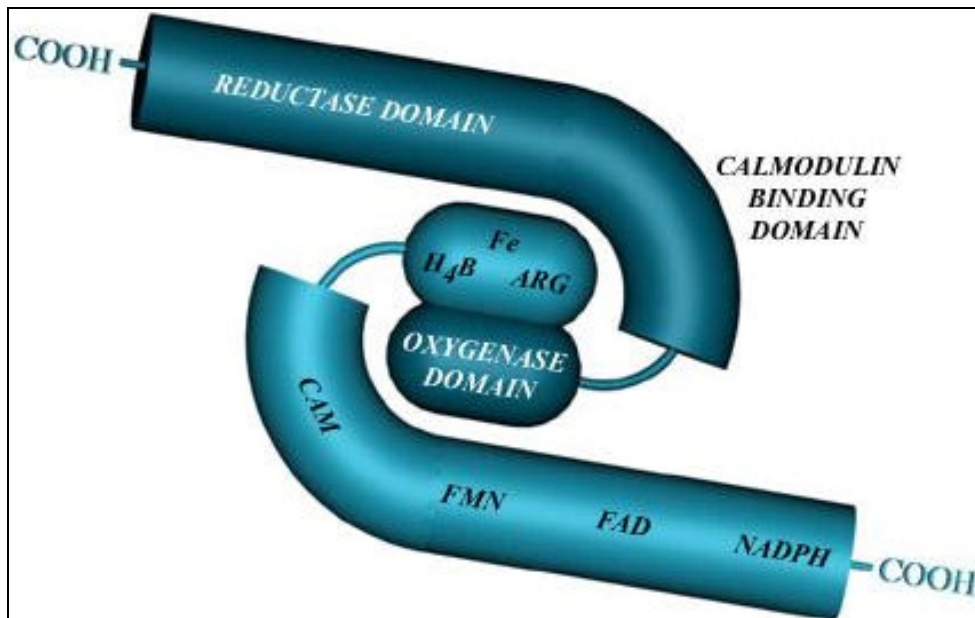
ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการสร้าง NO โดยมีเอนไซม์ NOS เป็นสารกระตุ้น

ที่มา: Alderton *et al.* (2001)

แต่นอกจากประโยชน์ในด้านต่างๆ ของ NO กับระบบการทำงานต่างๆ ของร่างกายแล้ว การที่เซลล์มีการผลิต NO ออกมามากเกินความต้องการจะส่งผลให้เกิด Neurotoxicity (Snyder and Dawson, 2007) และยังพบว่า NO มีความสามารถในการรวมตัวกับ hemoglobin ในเม็ดเลือดแดง ได้อย่างรวดเร็ว (Garcia and Stein, 2006) และยังสามารถเข้ารวมตัวกับ haem groups อื่นๆ ในเอนไซม์บางชนิด เป็นเหตุให้เอนไซม์นั้นๆ ไม่สามารถทำงานได้ และไปขัดขวางการหายใจของเซลล์ส่งผลให้เซลล์นั้นตายไปได้ นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Parkinson's disease ได้อีกด้วย (McCann *et al.*, 2005) และเนื่องจาก NO ถูกสร้าง

จากปฏิกิริยาซึ่งกระตุ้นโดยเอนไซม์ NOS และเอนไซม์ชนิดนี้บางชนิดจะทำงานเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ซึ่งบาง Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ทาง NMDA- Glutamate Receptors และหากมีการกระตุ้นการทำงานของ NMDA- Glutamate Receptors มากเกินไปจะก่อให้เกิดความผิดปกติในเซลล์ประสาท เรียกความผิดปกติเช่นนี้ว่า Excitotoxicity ซึ่งเป็นความผิดปกติที่มักพบในโรคทางระบบประสาทหลายๆ โรค เช่น AD, Parkinson's disease, multiple sclerosis หรือ AIDS dementia เป็นต้น (Ledo *et al.*, 2004) และในโรค AD ซึ่งเป็นโรคทางระบบประสาทที่สำคัญโรคหนึ่ง โรคนี้มีสาเหตุมาจากพอลิเพปไทด์ Amyloid โดยจะพบว่าบริเวณรอบๆ พอลิเพปไทด์ Amyloid นั้นมีเซลล์ Astrocytes ล้อมรอบมากมาย และเซลล์ Astrocytes เหล่านี้จะผลิต Interleukin-1 (IL-1) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ iNOS ไปกระตุ้นการสร้าง NO เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทรอบๆ พอลิเพปไทด์ และจากการหลั่ง IL-1 เมื่อเกิดการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น multiple sclerosis หรือ การที่สมองได้รับความกระทบกระเทือนอย่างรุนแรง เป็นต้น เหล่านี้ล้วนทำให้เอนไซม์ iNOS ทำงานสร้าง NO ออกมา เป็นเหตุให้เซลล์ประสาทตายได้เช่นกัน (McCann *et al.*, 2005)

เอนไซม์ NOS เกิดจากการรวมกันของโปรตีน 2 monomers กลายเป็น dimer คือประกอบด้วย C-terminal Reductase domain และ N-terminal Oxygenase domain (Andrew and Mayer, 1999) และนอกจากนี้ยังมี PDZ domains และ CaM-binding site (Alderton *et al.*, 2001) ซึ่งโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของเอนไซม์ โดยที่บริเวณ N-terminal Oxygenase domain จะประกอบด้วยบริเวณ binding site ของ haem ในขณะที่ BH_4 และ L-Arginine จะเข้าจับที่บริเวณ CaM-recognition site ที่อยู่ที่บริเวณ C-terminal Reductase domain ซึ่งประกอบไปด้วย binding site ของ FAD, FMN และ NADPH ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งลักษณะดังกล่าวของ C-terminal Reductase domain นี้จะมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ Cytochrome P-450 Reductase และระหว่าง 2 domains นี้จะเป็นบริเวณที่ CaM เข้าทำปฏิกิริยา (Andrew and Mayer, 1999) ที่บริเวณ C-terminal Reductase domain จะเป็นบริเวณที่มีการส่งถ่ายอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปยัง Cytochrome c ในขณะที่ บริเวณ N-terminal Oxygenase domain จะเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน L-Arginine ให้เป็นก๊าซ NO และ L-Citrulline (Andrew and Mayer, 1999)



ภาพที่ 6 แสดงแบบจำลององค์ประกอบพื้นฐานของเอนไซม์ NOS ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ Reductase domain และ Oxygenase domain

ที่มา: Castle and Sutter (2007)

โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ NOS ออกได้เป็น 3 ชนิดหลัก ได้แก่ NOS Type 1 (nNOS), NOS Type 2 (iNOS) และ NOS Type 3 (eNOS) ซึ่งแต่ละชนิดนั้น จะทำหน้าที่สร้าง NO เพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ ในแต่ละอวัยวะและระบบต่างๆ ที่แตกต่างกันออกไป เช่น nNOS เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง NO ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Autonomic และ Central Nervous System โดยจะพบเอนไซม์ nNOS ในปริมาณสูงในสมองส่วน Cerebellum Cerebral cortex Hypothalamus และ Hippocampus โดยเฉพาะเซลล์ประสาทในส่วน of Paraventricular และ Supraoptic และนอกจากนี้ ยังพบเอนไซม์ nNOS ถูกสร้างขึ้นในระบบประสาทส่วนนอกเพื่อใช้ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบส่วนต่างๆ ด้วย (Alderton *et al.*, 2001) ในขณะที่เอนไซม์ iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) จะมีบทบาททางด้านภูมิคุ้มกัน โดยจะทำหน้าที่ในการสร้างก๊าซ NO เพื่อเหนี่ยวนำ macrophages ให้ทำงาน (Garcia and Stein, 2006) ในส่วนของ eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthases) เป็นเอนไซม์ที่สร้างก๊าซ NO เพื่อใช้ใน vascular smooth muscle และ smooth muscle เพื่อทำหน้าที่เป็น vasodilator สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของเอนไซม์ Nitric Oxide Synthase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ชนิด	ขนาด (จำนวนกรดอะมิโน; kDa)	บริเวณที่พบได้
NOS Type 1; nNOS	160	เซลล์ประสาท (neurons), Photoreceptor Inner Segments, เซลล์ในผนังระบบทางเดินอาหาร, เซลล์ในผนังระบบทางเดินหายใจ, กล้ามเนื้อลาย, Endothelium และ mast cells
NOS Type 2; iNOS	135	Macrophages, Cardiomyocytes, Hepatocytes, Megakaryocytes, Keratinocytes, Chondrocytes, Vascular cells
NOS Type 3; eNOS	130	Endothelium cells, Gastrointestinal cells และ เซลล์ประสาท (neurons)

ที่มา: Kulkarni and Sharma (1993)

1. nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase; NOS type 1)

ประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาด 160 kDa และยังถือว่าเป็นเอนไซม์ NOS ชนิดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดอีกด้วยเนื่องจากพบมีกรดอะมิโนอีก 300 ตัวเข้ามาเกาะที่บริเวณ N-terminus ด้วย และในบริเวณ N-terminus ของเอนไซม์ nNOS ยังมี PDZ domain ซึ่งทำหน้าที่เป็นที่ใช้เชื่อมต่อระหว่างเอนไซม์ nNOS กับโปรตีนอีกหลายๆ ชนิดเพื่อให้เอนไซม์ nNOS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น (Andrew and Mayer, 1999) และเนื่องจากการค้นพบครั้งแรกในสมองส่วน Cerebellum จึงเรียกว่า neuronal Nitric Oxide Synthase แต่ต่อมามีการศึกษาค้นคว้าจนได้ทราบว่านอกจากสมองส่วน Cerebellum แล้วยังสามารถพบเอนไซม์ nNOS นี้ได้ทั้งในระบบประสาทส่วนกลาง ระบบประสาทส่วนนอก และระบบกล้ามเนื้อ โดยจะพบในเซลล์ประสาท (neurons) Photoreceptor Inner Segments

เซลล์ในผนังระบบทางเดินอาหาร เซลล์ในผนังระบบทางเดินหายใจ กล้ามเนื้อลาย Endothelium mast cells และ pyramidal cells (Lüth and Arendt, 2002) ซึ่งในส่วนของการหลั่งเอนไซม์ nNOS ในเซลล์ประสาทนั้น พบมีการสร้างในสมองส่วน Cerebral cortex Hippocampus และ Corpus striatum (Snyder and Dawson, 2007) โดยเอนไซม์ nNOS จะรับหน้าที่ในการสร้าง NO ขึ้นเพื่อใช้เป็น Neuromodulator เพื่อกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทในเซลล์ประสาท เพื่อใช้ในกระบวนการทำงานเกี่ยวกับการจดจำสิ่งต่างๆ และการแสดงออกทางพฤติกรรมของสมองส่วน Hippocampus (Snyder and Dawson, 2007) ในขณะที่เอนไซม์ nNOS ที่ระบบประสาทส่วนนอกจะสร้าง NO ขึ้นเพื่อใช้เป็นสารสื่อประสาทในการควบคุมส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ ควบคุมการเคลื่อนไหวของลำไส้และระบบทางเดินอาหาร และควบคุมการหลั่งฮอร์โมนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เป็นต้น และรวมถึงควบคุมการเกิด Penile erection ในเพศผู้ด้วย (Andrew and Mayer, 1999) และเอนไซม์ nNOS ยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ บางชนิด เช่น อาการบาดเจ็บของเส้นประสาท เป็นต้น ในเซลล์ประสาทพบว่า NO จะถูกสร้างขึ้นเมื่อ Glutamate receptors ไปกระตุ้น NMDA receptors ให้ Ca^{2+} channels เปิดเพื่อนำ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ (Ca^{2+} - influx) จากนั้น Ca^{2+} จะไปกระตุ้น CaM ให้ทำงานโดยจะไปกระตุ้นเอนไซม์ nNOS ให้สร้าง NO ออกมา (Necchi *et al.*, 2002)

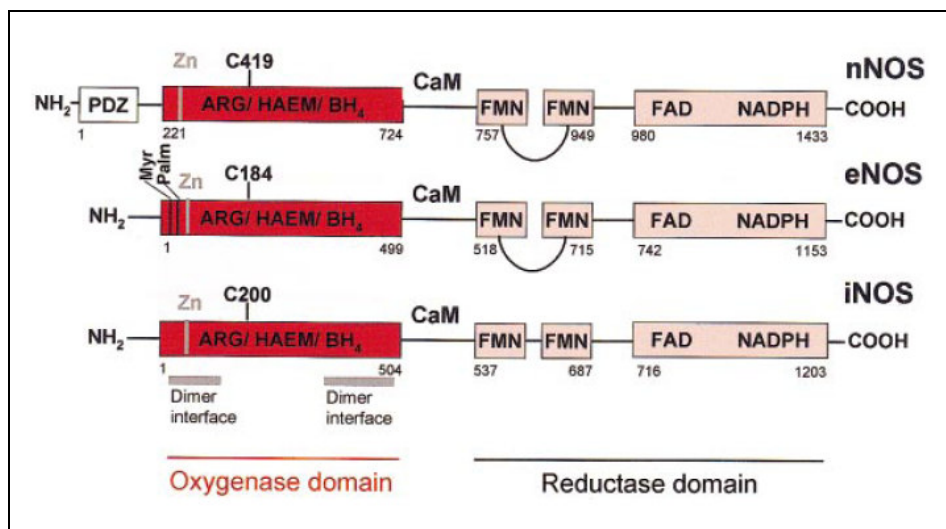
2. iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase; NOS Type 2)

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 135 kDa ถูกค้นพบครั้งแรกในเซลล์ macrophages ด้วยเหตุนี้ ครั้งแรกจึงได้ชื่อว่าเอนไซม์ mNOS (macrophages Nitric Oxide Synthase) แต่เนื่องจากในภายหลังมีการค้นพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ออกฤทธิ์ในลักษณะเหนี่ยวนำการแสดงออกของภูมิคุ้มกัน (inducible) เอนไซม์ชนิดนี้จึงถูกเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) โดยเราจะสามารถพบเอนไซม์ iNOS นี้ได้ในเซลล์หลายๆ ชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Macrophages Cardiomyocytes Hepatocytes Megakaryocytes Chondrocytes Vascular cells ชนิดต่างๆ และ Astrocytes (Lüth and Arendt, 2002) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบเอนไซม์ iNOS ได้ในกล้ามเนื้อเรียบภายในหลอดเลือดและผนังลำไส้อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ iNOS ภายใน Vascular cells Endothelial cells Cardiomyocytes และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจะถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วย

inflammatory mediators ส่วนภายในเซลล์ Macrophages นั้น เอนไซม์ iNOS จะทำหน้าที่สร้าง NO ขึ้นมาเพื่อใช้ในกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน

3. eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase; NOS type 3)

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 130 kDa โดยมีการค้นพบครั้งแรกใน Vascular Endothelial cells เอนไซม์ชนิดนี้จึงมีชื่อว่า eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) นอกจากนี้ เรายังสามารถพบเอนไซม์ eNOS ได้ใน Endothelial cells Gastrointestinal cells เซลล์ประสาท และ Astrocytes (Lüth and Arendt, 2002) ซึ่งก๊าซ NO ที่สร้างขึ้นโดยเอนไซม์ eNOS นั้นจะมีหน้าที่หลักอยู่ในระบบไหลเวียนโลหิต โดย NO ที่ได้นี้จะไปทำหน้าที่กระตุ้นการหดและขยายตัวของเส้นเลือด



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ NOS ทั้ง 3 ชนิด (nNOS, eNOS และ iNOS) ซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก คือ Oxygenase, reductase, PDZ domains และ CaM-binding site

ที่มา : Alderton et al. (2001)

และจากการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ NOS ทั้ง 3 isoforms พบว่า เอนไซม์ nNOS และเอนไซม์ eNOS จะทำงานเมื่อมีการเข้ามาจับของ CaM ซึ่งถูกกระตุ้นการทำงานด้วย Ca²⁺ (Poulos, 2005) ในขณะที่ เอนไซม์ iNOS จะมี CaM จับอยู่ที่บริเวณ CaM binding site

ตลอดเวลา (Poulos, 2005) และจะถูกกระตุ้นให้ทำงานด้วยการเหนี่ยวนำจากระบบภูมิคุ้มกัน (Necchi *et al.*, 2002) จึงอาจเรียกเอนไซม์ nNOS และเอนไซม์ eNOS ได้ว่าเป็นเอนไซม์ NOS แบบ constitutive NOS (cNOS) (Kiechle and Malinski, 1993)

ในการศึกษาเกี่ยวกับการเรียนรู้และความทรงจำพบว่า สมองส่วนที่มีความสำคัญและเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องคือ สมองส่วน Hippocampus และการที่สมองส่วนนี้จะทำงานได้นั้นจะต้องอาศัย NO เป็นสารสื่อประสาทและใช้เป็นสารกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ ด้วย แต่จะพบว่า เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น ความสามารถในการเรียนรู้และจดจำสิ่งต่างๆ จะลดน้อยถอยลง ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการสูญเสียเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ทำให้ปริมาณ NO ที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการสื่อประสาทและกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ นั้น มีปริมาณลดลงไปด้วย จากสาเหตุเหล่านี้อาจส่งผลให้เมื่อสิ่งมีชีวิตมีอายุมากขึ้น จะมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำที่ลดลง และได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายๆ ท่านทำการทดลองและทดสอบถึงความแปรผันระหว่างอายุของสัตว์ทดลองต่างๆ กับปริมาณของ NO ในสมองส่วน Hippocampus ผ่านทางการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ nNOS เพื่อใช้เป็นข้อมูลเชื่อมโยงไปถึงความสามารถในการเรียนรู้และการจดจำ เช่น การทดลองในหนู Rats พบว่า เมื่อหนูมีอายุมากขึ้นจะมีปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ลดลง (Law *et al.*, 2002; Necchi *et al.*, 2002) แต่ Liu *et al.*, 2003 กลับพบว่า เมื่อหนู Rats มีอายุมากขึ้นเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ลดลง เป็นต้น แต่สำหรับในโคซึ่งเป็นสัตว์ใหญ่และมีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่าหนูนั้นยังไม่พบมีการศึกษาในแง่ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus กับอายุที่เพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นฐานข้อมูล

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สมองส่วน Hippocampus ของโคขุนอายุ 1 ปี (โคอ่อน) ที่ถูกชำแหละในโรงฆ่าสัตว์ จ.นนทบุรี จำนวน 2 ตัว และโคขุนอายุ 10 ปี (โคแก่) ที่ถูกชำแหละในโรงฆ่าสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

2. Antibodies

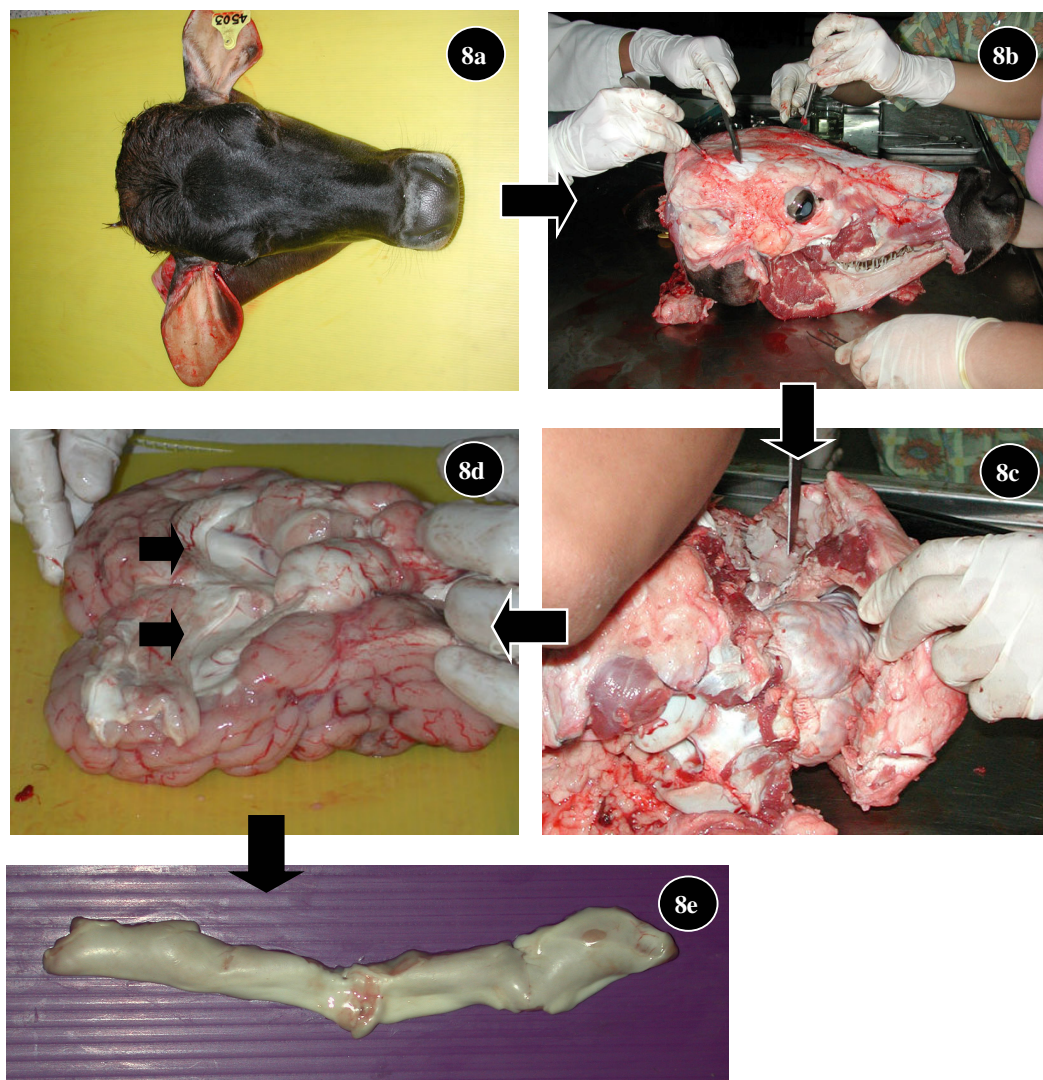
Polyclonal Anti bNOS/NOS-I จากกระต่ายและ Biotinylated Anti-rabbit IgG จากแพะของบริษัท Vector Laboratories

วิธีการ

1. การเก็บสมองส่วน Hippocampus ของโค

นำส่วนหัวของโคมาและผิวหนังและกล้ามเนื้อออกเพื่อเปิดให้เห็นในส่วนของกะโหลกศีรษะ จากนั้นเปิดแผ่นกะโหลกส่วนที่คลุมสมองออกด้วยสว่าน และ Dura mater ส่วนที่ยึดระหว่างกะโหลกศีรษะกับสมองออกอย่างระมัดระวัง ตัดเส้นประสาทสมองทั้ง 12 คู่ออก จากนั้นจึงยกสมองทั้งลูกออกจากช่องกะโหลก ด้วยวิธีการนี้จะทำให้ได้สมองออกมาทั้งลูก ซึ่งจะประกอบไปด้วยสมองส่วน Cerebrum, Cerebellum และก้านสมองติดออกมาด้วย นำสมองทั้งลูกนั้นมาและเชื่อมสมองส่วน Dura mater ออก ตัด Falx cerebelli ซึ่งเป็นส่วนที่หนาตัวของ Dura mater ที่ทำหน้าที่กั้นระหว่างสมองส่วน Cerebrum และ Cerebellum ออกจากกันเพื่อแยกเอาสมองส่วน Cerebrum ออกมา ตัด Falx cerebri ซึ่งทำหน้าที่กั้นระหว่างสมองส่วน Cerebrum ซีกซ้ายและขวาออกจากกัน

เพื่อแยกสมองทั้ง 2 ซีกจากกัน ใช้มือแยกสมอง Cerebrum ซีกซ้ายและขวาออกจากกันอย่างระมัดระวัง จะสังเกตเห็นสมองส่วน Hippocampus วางตัวโค้งเป็นรูปเกือกม้าอยู่ตรงกลางระหว่างสมองทั้ง 2 ข้าง เลาะสมองส่วน Hippocampus ออกมาอย่างระมัดระวัง โดยนำเอาส่วนของ Frimbria ซึ่งเป็นเยื่อหุ้ม Hippocampus ออกมาด้วย โดย สมองส่วน Hippocampus ที่เลาะออกมาได้ จะมี 2 ซีก คือซีกซ้ายและขวา ซึ่งสมองส่วน Hippocampus ทั้งสองซีกที่ได้ออกมานี้จะอยู่ติดกัน และเชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบางๆ



ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างสมองส่วน Hippocampus



ภาพที่ 9 สมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างสมองของโคอ่อน (9a) และ โคแก่ (9b)

นำสมองส่วน Hippocampus ที่ได้มาแยกซีกซ้ายและขวาออกจากกัน จากนั้นนำสมองส่วน Hippocampus แต่ละซีกมาแบ่งออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยกำหนดหมายเลขให้สมองส่วน Hippocampus ชิ้นแรกของส่วนต้นเป็นหมายเลข 1 แล้วไล่เรียงลำดับหมายเลขไปเรื่อยๆ โดยทำการตัดแบ่งให้แต่ละชิ้นมีความหนาชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร ดังภาพที่ 14 จากนั้นนำชิ้นเนื้อ Hippocampus ที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยวิธีการทางพาราฟินเทคนิคต่อไป



ภาพที่ 10 แสดงการตัดแบ่งสมองส่วน Hippocampus เพื่อเข้าสู่กระบวนการพาราฟินเทคนิค

2. กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยวิธีการทางพาราฟินเทคนิค ดังมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 สุ่มเลือกเนื้อเยื่อ 6 ชิ้นจากทั้งหมด (ประมาณ 12 ชิ้น)

2.2 คงสภาพเนื้อเยื่อ (Fixation) โดยนำชิ้นเนื้อที่ได้มาแช่ในน้ำยาฟอรัมาลิน 10% เพื่อคงสภาพและรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อเป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 นำเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อบล็อกพาราฟินด้วยเครื่อง Automatic Tissue Processing โดยกระบวนการนี้จะใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง และมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ล้างเนื้อเยื่อ (Washing) โดยนำเนื้อเยื่อที่แช่ในน้ำยาฟอรัมาลิน 10% มาล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3.2 ขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration) เพื่อเตรียมพร้อมให้สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (Embedding Media) ไปแทนที่น้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อโดยนำชิ้นเนื้อไปแช่แอลกอฮอล์จากระดับต่ำไปสูงดังนี้

แอลกอฮอล์ 70%	5	ชั่วโมง	1	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 70%	2	ชั่วโมง	1	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 80%	1	ชั่วโมง	2	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 95%	1	ชั่วโมง	2	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 100%	1	ชั่วโมง	2	ครั้ง

2.3.3 ทำเนื้อเยื่อให้ใส (Clearing) เพื่อให้สารเคมีที่เป็นตัวกลางในการนำสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อเข้าสู่ภายในเซลล์สามารถเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ได้ โดยในที่นี้สารเคมีที่ทำให้ใส (Clearing Agent) ที่ใช้คือ ไซลีน (Xylene) โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่ในไซลีนนาน 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง

2.3.4 แทรกซึมพาราฟินเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Infiltration) โดยนำชิ้นเนื้อมาแช่ในพาราฟินหลอมเหลวอุณหภูมิ 50 - 52 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ½ ชั่วโมง 2 ครั้ง จากนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการแทรกซึมของพาราฟินให้ดียิ่งขึ้น นำเนื้อเยื่อเข้าเครื่องปรับความดันสุญญากาศโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา ½ ชั่วโมง

2.4 ฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Embedding) เป็นการขึ้นพิมพ์เนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อที่ได้มาขึ้นพิมพ์ในแม่พิมพ์และหล่อพิมพ์ด้วยพาราฟินเหลว แล้วทำให้พาราฟินรอบๆ เนื้อเยื่อลดอุณหภูมิลงจนแข็งตัว โดยในขั้นตอนนี้จะทำในเครื่อง Histoembedder

2.5 ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (Sectioning) โดยนำเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟินมาตัดเป็นแผ่นบางด้วยเครื่องมือไมโครโทม (Microtome) โดยตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางประมาณ 3 ไมครอนเป็นลำดับต่อเนื่องกันไป

2.6 ติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (Affix) นำเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ได้มาทำให้ยึดออกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 50% จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อลงลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส นำแผ่นเนื้อเยื่อไปติดลงบนสไลด์แก้วที่ทำด้วย Egg Albumin 2 แผ่น และติดแผ่นเนื้อเยื่อลงบนสไลด์แก้วชนิดพิเศษ Probe On Plus Slide[®] (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 2 แผ่น โดยติดแผ่นเนื้อเยื่อ 1 แผ่นต่อ 1 สไลด์

2.7 ย้อมสี (Staining) นำแผ่นสไลด์ที่ได้มาย้อมสีโดยแบ่งออกเป็น

แผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วที่ทำด้วย Egg Albumin นำไปย้อมสี Luxol fast blue เพื่อศึกษาส่วนประกอบโดยทั่วไปของเนื้อเยื่อและเซลล์ประสาท

แผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วชนิดพิเศษ Probe on Plus Slide[®] นำไปย้อมสี Immunohistochemistry เพื่อศึกษาคำแหน่งและปริมาณของเอนไซม์ nNOS

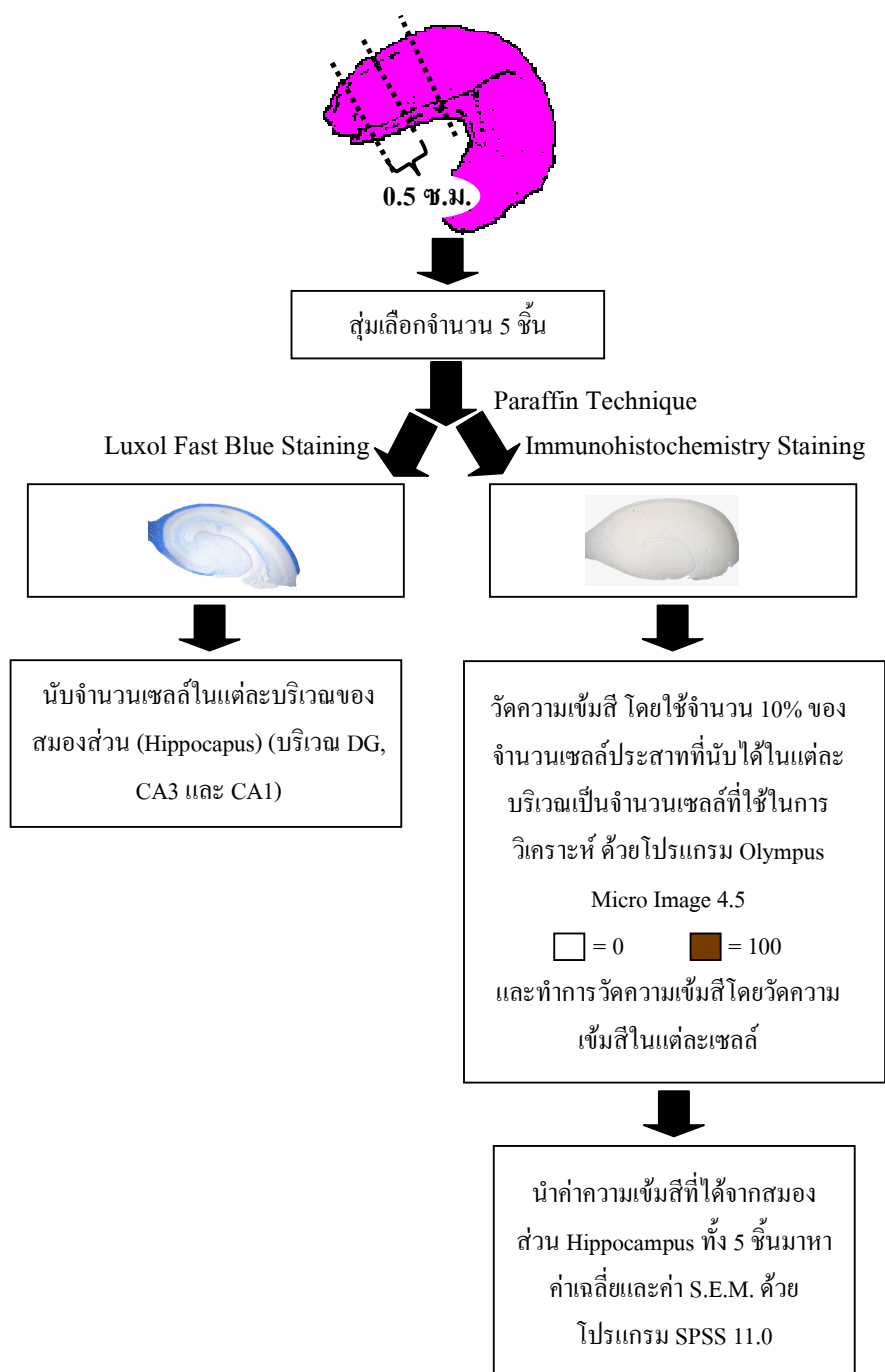
2.8 ปิดกระจกปิดสไลด์ (Mounting) นำแผ่นสไลด์ที่ได้จากการย้อมสีมาปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้น้ำยา Permount จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา

2.9 การนับจำนวนเซลล์ โดยนำแผ่นสไลด์ที่ได้จากการย้อมด้วยสี Luxol Fast Blue มาทำการนับจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดในแต่ละบริเวณของสมองส่วน Hippocampus (DG, CA3 และ CA1) ซึ่งวิธีการนับทำได้โดยนับจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดที่พบในแต่ละบริเวณของสมองส่วน Hippocampus จากนั้นนำจำนวนเซลล์สมองที่นับได้ไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อให้ทราบว่าในแต่ละบริเวณในเนื้อเยื่อแผ่นบาง 1 แผ่นนั้นมีจำนวนเซลล์ประสาทอยู่ในปริมาณเท่าไร

2.10 การวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity โดยนำแผ่นสไลด์ที่ได้จากการย้อมด้วยสี Immunohistochemistry มาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus

BX50) และถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล (Olympus DP70 Cooled CCD) ที่ความละเอียด 12.5 megapixel โดยภาพที่ได้จะเก็บในรูปแบบ TIFF files และถ่ายภาพในทั้ง 3 บริเวณของสมองส่วน Hippocampus (DG CA3 และ CA1) เพื่อนำภาพถ่ายที่ได้มาวิเคราะห์ความเข้มข้นของการติดสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity ในบริเวณไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทโดยใช้โปรแกรม Olympus Microimage 4.5 และวิเคราะห์ในเซลล์ประสาทจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดในแต่ละบริเวณ และค่าความเข้มสีที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

2.11 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS 11.0 โดยทำการคำนวณแบบ Independent Samples T-Test ซึ่งค่าความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทในทั้ง 3 บริเวณของสมองส่วน Hippocampus จะแสดงออกมาในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM. ที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการทำงานเพื่อตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณ (DG, CA3 และ CA1)

ผลและวิจารณ์

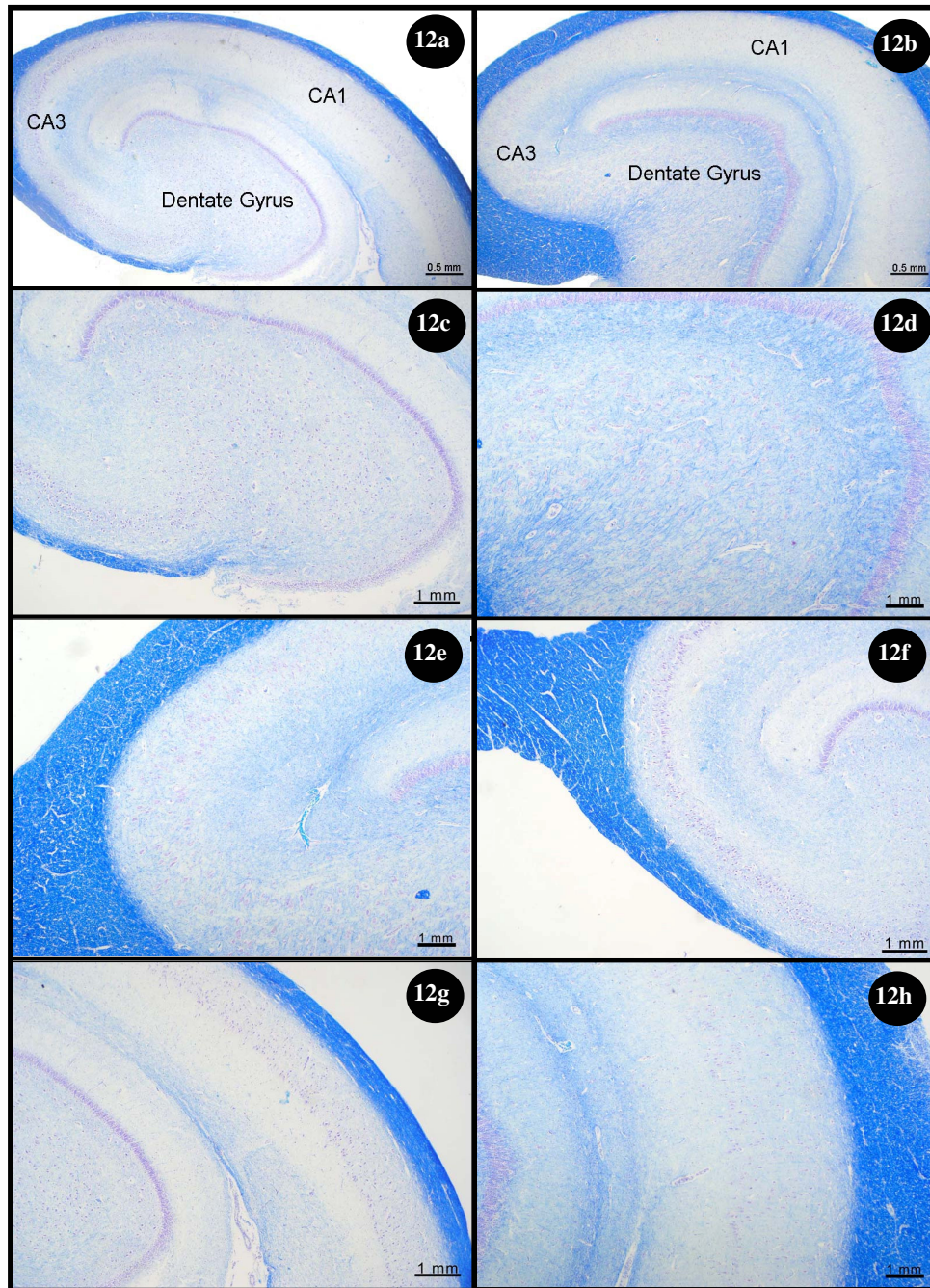
ผล

จากการชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดของสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคอ่อน และ โคแก่พบว่า สมองส่วน Hippocampus ของโคทั้งสองช่วงอายุมีขนาดและน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงขนาดและน้ำหนักของสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคอ่อนและ โคแก่

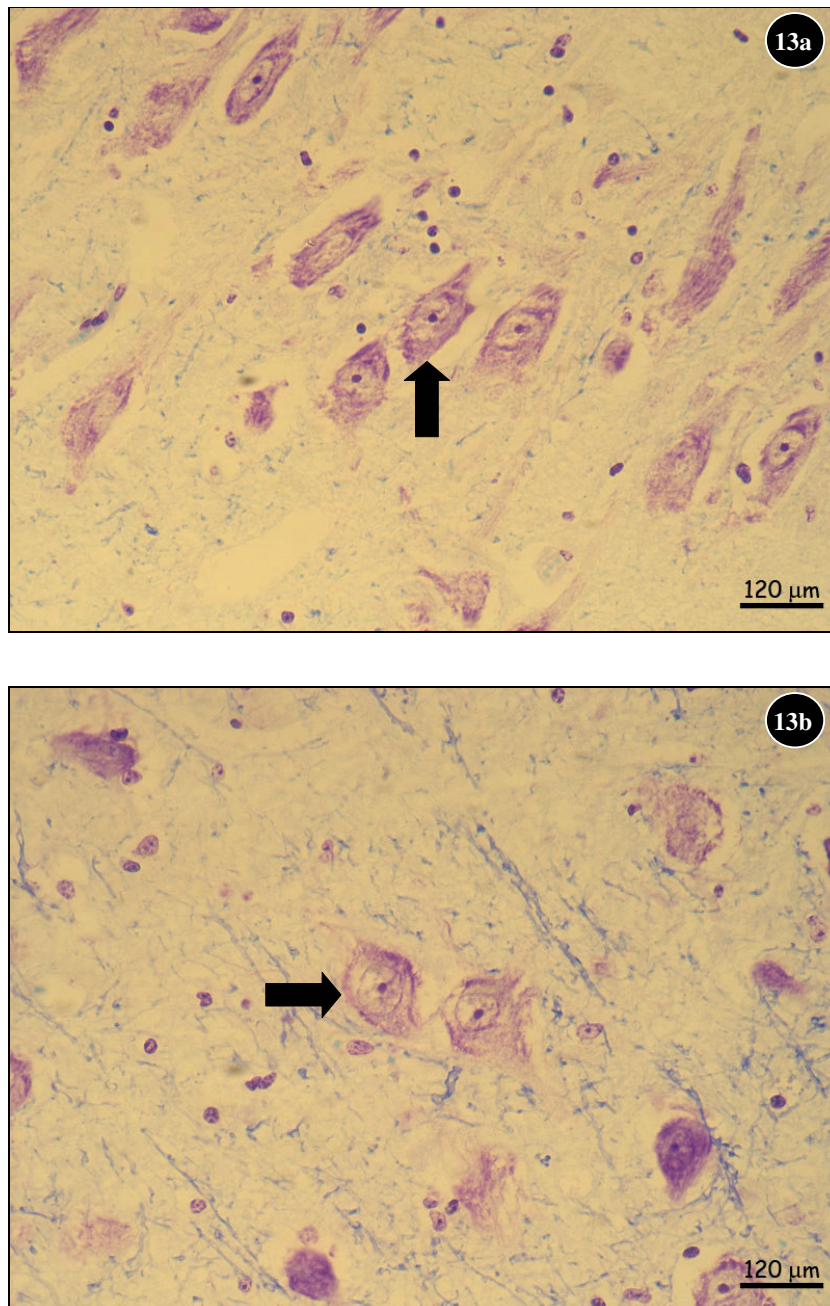
	ความกว้าง (cm)	ความยาว (cm) (แต่ละข้าง)	น้ำหนัก (g.) (ทั้ง 2 ข้าง)
โคแก่	1	7-8	20 - 22
โคอ่อน	1	7-8	16 - 20

และเมื่อศึกษาส่วนประกอบของตัวอย่างสมองสมองส่วน Hippocampus ของโคทั้ง 2 ช่วงอายุ โดยการย้อมสี Luxol Fast Blue พบว่า สมองส่วน Hippocampus ของโคทั้ง 2 ช่วงอายุสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 บริเวณ คือ Dentate Gyrus (DG), Cornu Ammonis1 (CA1) และ Cornu Ammonis3 (CA3) ดังภาพที่ 12

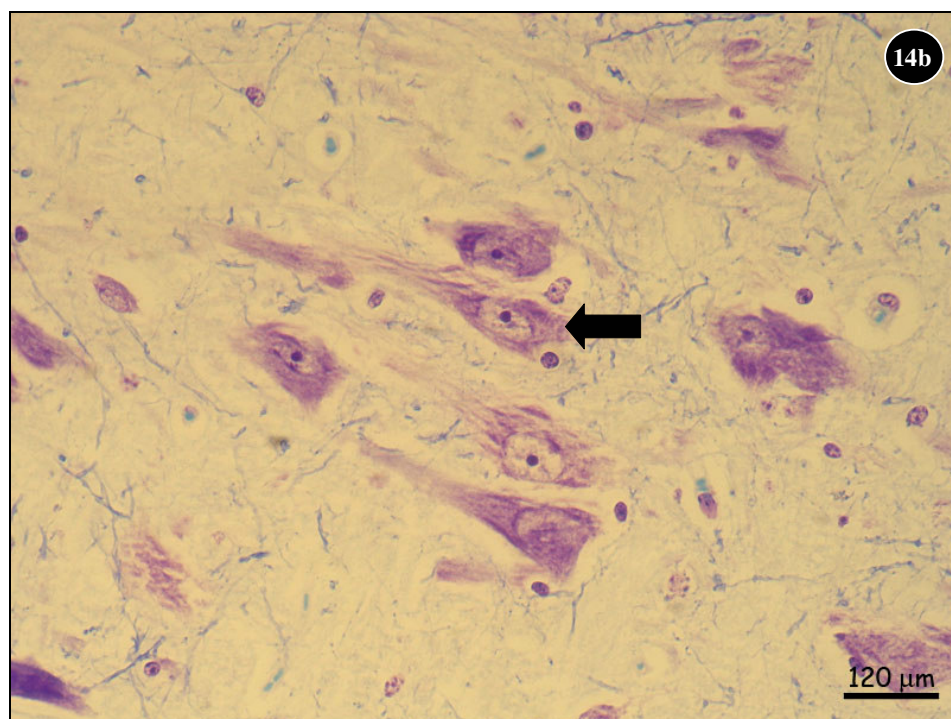
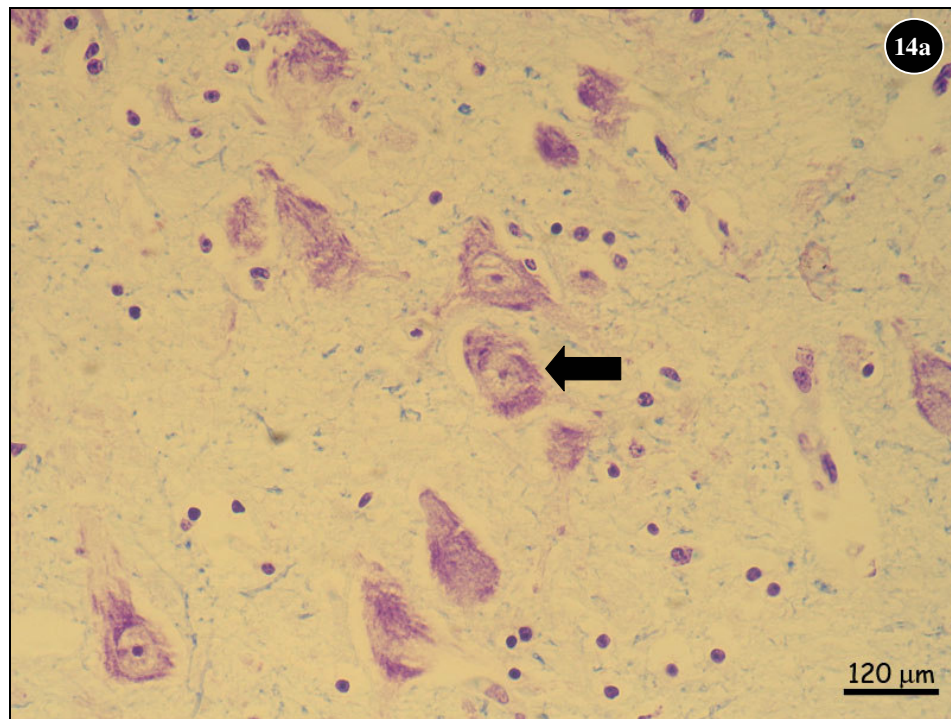


ภาพที่ 12 แสดงส่วนประกอบของเนื้อเยื่อสมองส่วน Hippocampus ของโคอ่อนที่กำลังขยาย 2 (12a) และกำลังขยาย 4 ณ ตำแหน่ง DG (12c) ตำแหน่ง CA3 (12e) และตำแหน่ง CA1 (12g) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสมองส่วนเดียวกันของโคแก่ที่กำลังขยาย 2 (12b) และกำลังขยาย 4 ณ ตำแหน่ง DG CA3 และ CA1 ตามลำดับ (12d 12f และ 12h) (Luxol Fast Blue Staining)

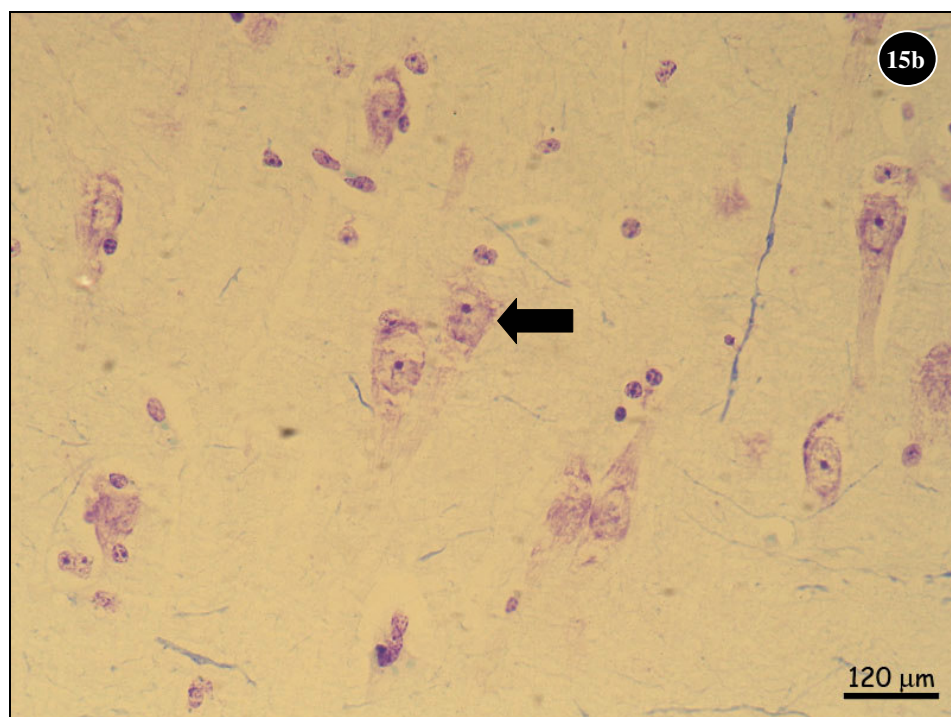
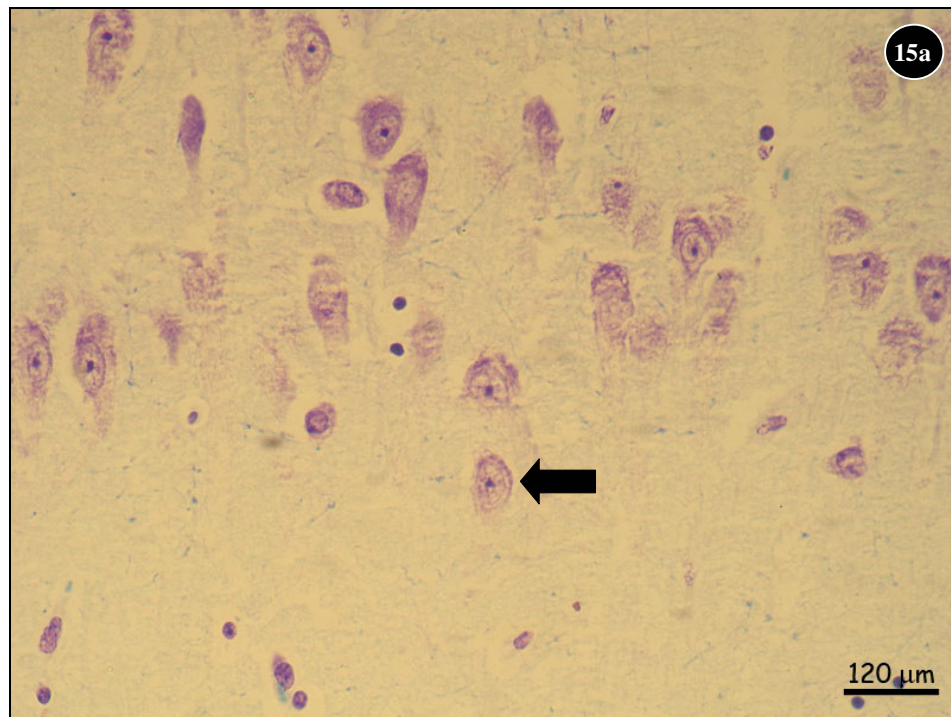
โดยจะพบว่าทั้ง 3 บริเวณนั้น ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (Pyramidal neurons) และ Granule cells ดังภาพที่ 13, 14 และ 15



ภาพที่ 13 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG ของโคฮอน (13a) และโคแก (13b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40



ภาพที่ 14 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคอ่อน (14a) และโคแก่ (14b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40

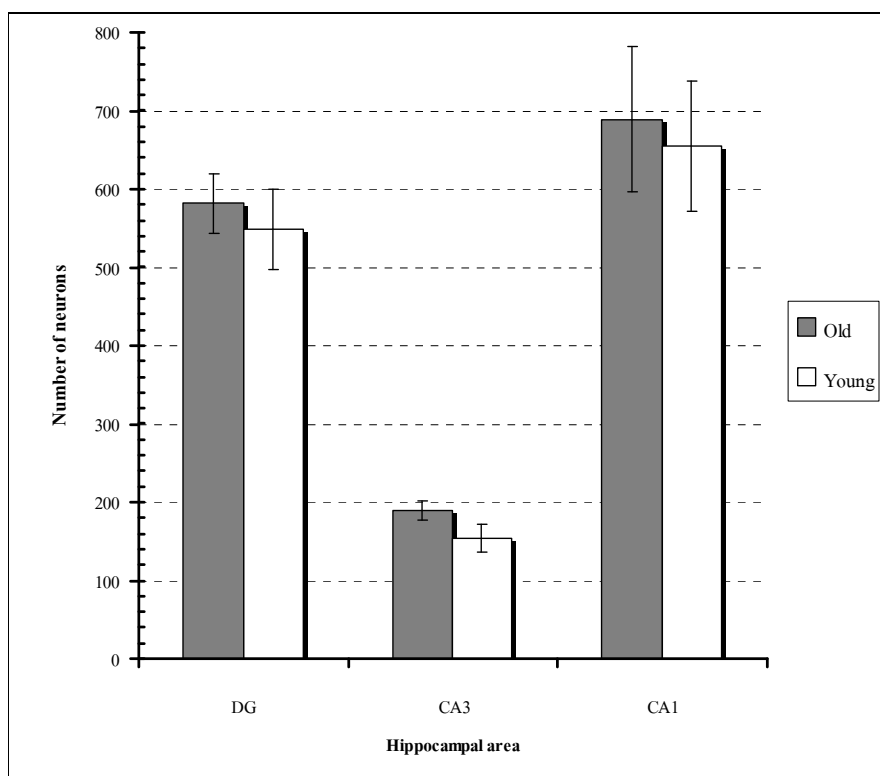


ภาพที่ 15 แสดงการติดสี Luxol Fast Blue ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA1 ของโคอ่อน (15a) และโคแก่ (15b) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 40

และเมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละบริเวณในเนื้อเยื่อแผ่นบางแต่ละแผ่น แล้วนำเอาค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณของเนื้อเยื่อแผ่นบาง 1 แผ่น พบว่า ในและบริเวณนั้นจะมีจำนวนเซลล์ประสาทไม่เท่ากันดังแสดงในตารางที่ 2

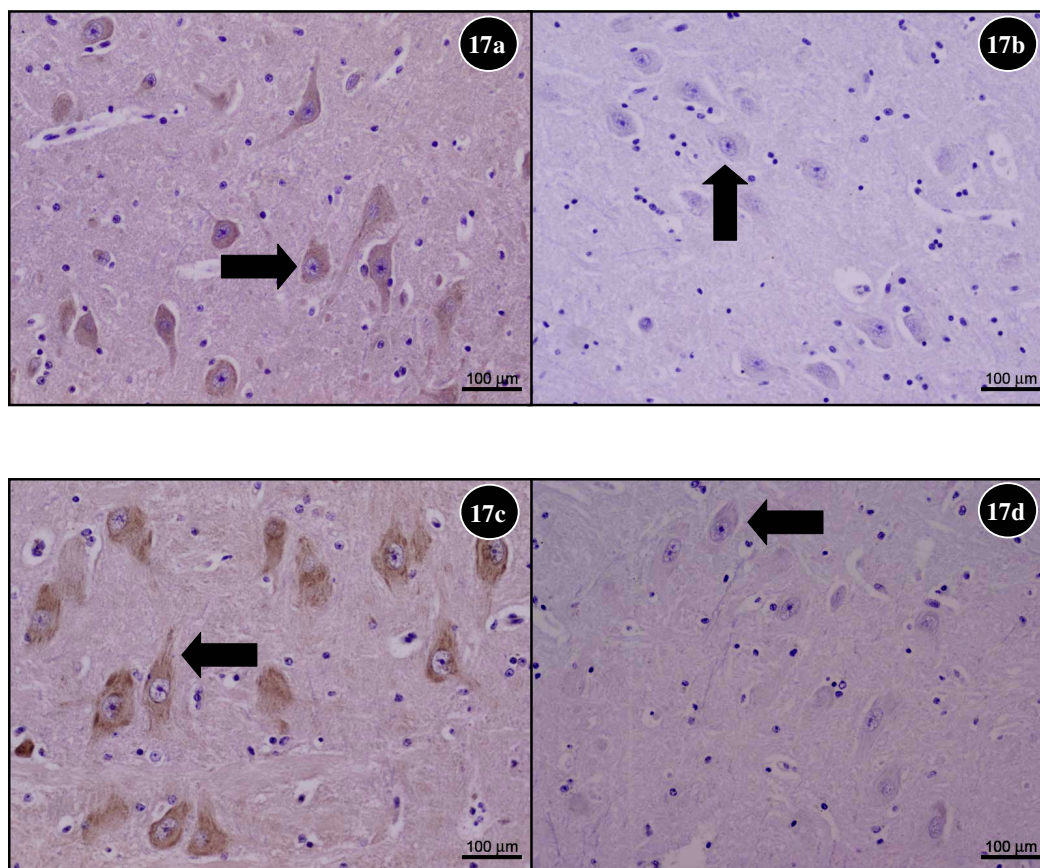
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณของสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคแก่และโคอ่อน

บริเวณ	จำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงอายุของวัว	
	โคแก่ (ค่าเฉลี่ย)	โคอ่อน (ค่าเฉลี่ย)
DG	581.44	549.13
CA3	189.22	153.57
CA1	689.10	654.29

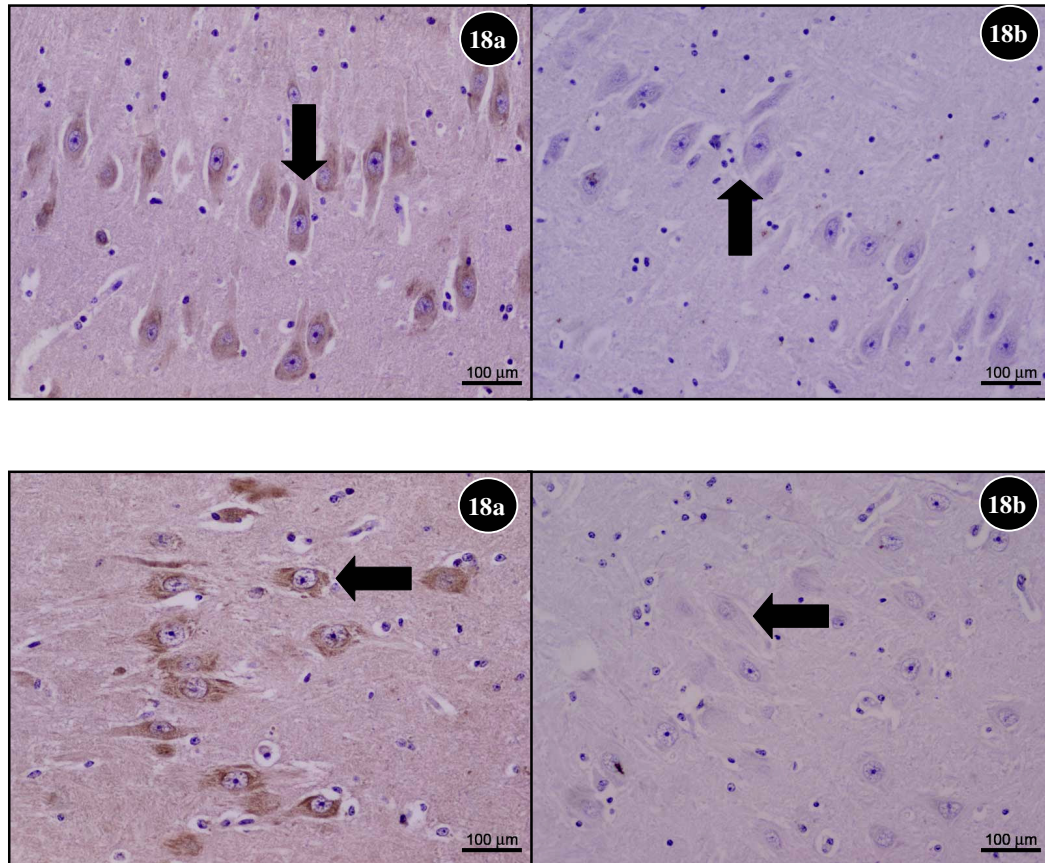


ภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงจำนวนเซลล์ประสาทภายในสมองส่วน Hippocampus เปรียบเทียบระหว่างโคอ่อนและโคแก่ ในแต่ละบริเวณ

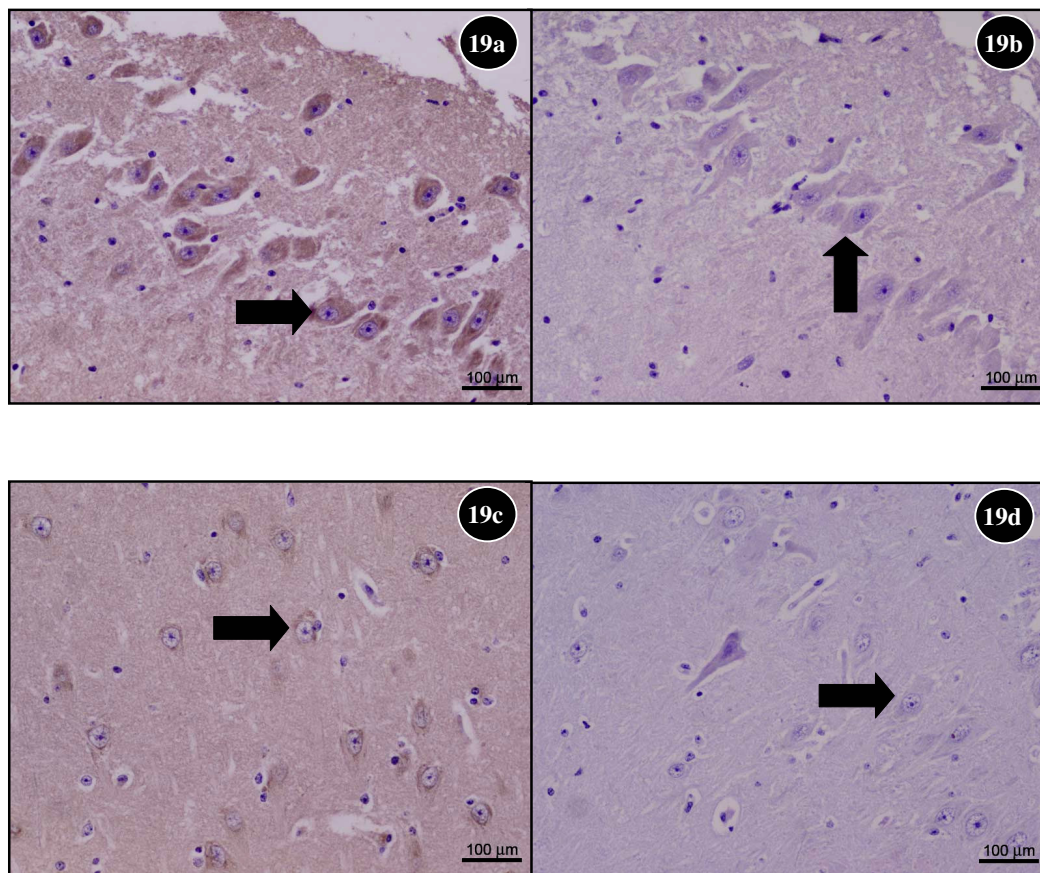
เมื่อทำการตรวจสอบสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Immunohistochemistry มี Immunoreactivity ต่อ Anti-nNOS เกิดขึ้น แล้วพบว่า ในบริเวณไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อของโคทั้ง 2 ช่วงอายุในทุกบริเวณโดยมี رنگวัตถุสีน้ำตาลซึ่งใน negative control จะไม่พบ رنگวัตถุดังกล่าว ดัง ภาพที่ 17 18 และ 19



ภาพที่ 17 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ต่อ Anti-nNOS ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG ของโคอ่อน (17a) และ negative control (17b) เปรียบเทียบกับโคแก่ (17c) และ negative control (17d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20



ภาพที่ 18 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ต่อ Anti-nNOS ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคอ่อน (18a) และ negative control (18b) เปรียบเทียบกับโคแก่ (18c) และ negative control (18d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20

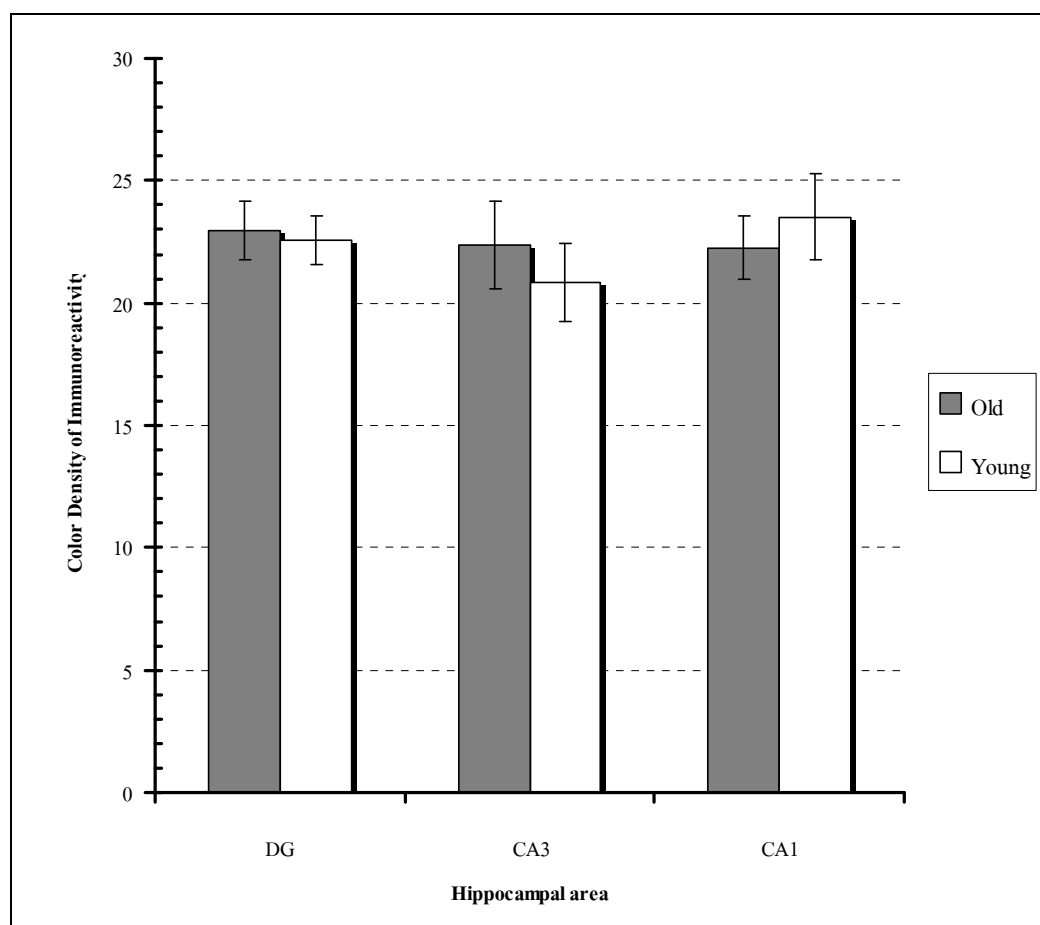


ภาพที่ 19 แสดงการติดสี Immunohistochemistry ต่อ Anti-nNOS ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ CA3 ของโคอ่อน (19a) และ negative control (19b) เปรียบเทียบกับ โคแก่ (19c) และ negative control (19d) ตามลำดับ ด้วยกำลังขยาย 20

และเมื่อนำภาพถ่ายที่ได้จากสไลด์ที่ย้อมด้วยสี Immunohistochemistry มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม OMI 4.5 เพื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของรงควัตถุในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณในแต่ละช่วงอายุ แล้วพบว่า ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาททุกเซลล์ในทุกบริเวณจะมีรงควัตถุสีน้ำตาลจากปฏิกิริยา Immunoreactivity แต่จะมีความเข้มสีแตกต่างกันออกไปในแต่ละบริเวณ โดยเมื่อนำค่าความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของแอนไทม์ nNOS ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบ ในแต่ละบริเวณระหว่างโคแก่และโคอ่อน จะพบว่า ในทั้ง 3 บริเวณไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคแก่และโคอ่อน

บริเวณ	ความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS		
	โคแก่ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M.)	โคอ่อน (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M.)	Sig.
DG	22.98 $\pm$ 1.187	22.58 $\pm$ 0.998	.671
CA3	22.37 $\pm$ 1.821	20.86 $\pm$ 1.582	.332
CA1	22.26 $\pm$ 1.281	23.52 $\pm$ 1.735	.572



ภาพที่ 20 แผนภูมิแสดงความเข้มสีจากปฏิกิริยา Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS ภายในสมองส่วน Hippocampus ของเปรียบเทียบระหว่างโคแก่และโคอ่อนในแต่ละบริเวณ

วิจารณ์

ในการวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายวิภาคของสมองส่วน Hippocampus ในโคอ่อนและโคแก่ โดยทำการวัดขนาดและชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกัน พบว่า มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน จึงอาจสรุปได้ว่า ที่อายุ 1 ปี สมองส่วน Hippocampus ของโคได้เจริญสูงสุดแล้ว ทำให้มีความใกล้เคียงกับโคที่อายุมากกว่า 10 ปี และเมื่อทำการศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ สมองส่วนนี้โดยใช้เนื้อเยื่อย้อมด้วยสี Luxol Fast Blue ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า โครงสร้างของสมองส่วน Hippocampus ประกอบด้วย 3 บริเวณ คือ บริเวณ Dentate Gyrus (DG) บริเวณ Cornu Ammonis 1 (CA1) และบริเวณ Cornu Ammonis 3 (CA3) เช่นเดียวกับในสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่ได้มีการศึกษา เช่น ในกระบือปลัก (Swamp buffalo) (มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ และคณะ, 2543) หนู rats (Rapp and Gallagher, 1996) หนู mice (Halbach and Unsicker, 2002) และช้าง (Kupsky *et al.*, 2001) โดยจะมีขนาดและน้ำหนักแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดและขนาดตัวของสัตว์แต่ละชนิด

การศึกษานี้ได้ทำการนับจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ของโคทั้งสองช่วงอายุในแต่ละบริเวณ พบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของโคแก่ (อายุมากกว่า 10 ปี) มีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ประสาทของโคอ่อน (อายุประมาณ 1 ปี) ในบริเวณ CA3 ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Rapp และ Gallagher ในปี ค.ศ. 1996 ซึ่งได้ทำการนับจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ของหนู rats และพบว่าในหนู Rats ที่มีอายุน้อย (อายุ 6 เดือน) นั้น จะมีจำนวนเซลล์ประสาทที่น้อยกว่าหนู Rats ที่มีอายุมาก (27 – 28 เดือน) ในบริเวณ CA1 และ CA3 เช่นกัน แต่จากการศึกษาของ Halbach และ Unsicker ในปี ค.ศ. 2002 กลับพบว่าเมื่อหนู Rats มีอายุมากขึ้น จำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ลดลงในทุกบริเวณ ในขณะที่การศึกษาในสุนัข กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแง่ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างสุนัขอายุน้อย (3.4 – 3.5 ปี) และสุนัขอายุมาก (13 – 15 ปี) (Siwak-Tapp *et al.*, 2006) ในส่วนของลิง Rhesus นั้น ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณต่างๆ เช่นกัน โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างลิงอายุน้อย (0 - 4 ปี) กับลิงแก่ (18 – 31 ปี) และพบว่า ลิงอายุน้อยจะมีจำนวนของเซลล์ประสาทมากกว่าลิงแก่ในทุกๆ บริเวณ (Keuker *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในมนุษย์ที่พบว่า จะมีการลดลงของเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 เมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณ DG และ CA3 (Uylings and Brabander, 2002)

ผลจากการวิจัยนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของรงควัตถุที่เกิดจาก Immunoreactivity ต่อ Anti-nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ทั้งในโคแก็งและโคฮอนพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้ง 3 บริเวณ ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาถึงปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus ในสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยผลการศึกษาในแต่ละงานวิจัยนั้นมีความแตกต่างกันไป เช่น ในหนู Rats พบว่าเมื่อหนู Rats มีอายุมากขึ้นจะมีปริมาณเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Hippocampus (Law *et al.*, 2002) Amygdala (Joo *et al.*, 2004) และ Cerebellum (Yua *et al.*, 2000) ลดลง แต่ผลการวิจัยอื่นๆ ในหนู Rats กลับพบมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Prefrontal Cortex (Liu *et al.*, 2004) Cortex Striatum (Porta and Comolli, 1999) และ Hippocampus (Liu *et al.*, 2003; Porta and Comolli, 1999) ส่วนผลการวิจัยในหนู Mice พบว่า ในสมองส่วน Cortex, Hippocampus และ Brain stem มีปริมาณของเอนไซม์ nNOS ลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น (Colas *et al.*, 2006) ส่วนผลการวิจัยในมนุษย์นั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในสมองส่วน Cerebellar Cortex ในช่วงอายุ 12 วันถึง 90 ปี พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของอายุและเพศ (Blum-Degen *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ เพียงแต่เป็นการศึกษาในสมองส่วนที่ต่างกัน

นอกจากนั้น ผลการศึกษานี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ในโคที่อายุรุ่นเดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ nNOS ระหว่างทั้ง 3 บริเวณของสมองส่วน Hippocampus ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Liu *et al.* ในปี ค.ศ. 2003 ที่พบว่าในหนู Rats ที่มีอายุมาก (24 เดือน) นั้น จะมีปริมาณเอนไซม์ nNOS มากที่สุดที่บริเวณ CA1 รองลงมาคือบริเวณ DG และบริเวณที่มีปริมาณน้อยที่สุด คือ บริเวณ CA3 ในขณะที่หนู Rats ที่มีอายุน้อย (4 เดือน) นั้น จะมีปริมาณเอนไซม์ nNOS มากที่สุดที่บริเวณ CA3 รองลงมาคือบริเวณ CA1 และน้อยที่สุด คือ บริเวณ DG แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง 2 ช่วงอายุ กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณในสมองส่วน Hippocampus เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนู Rats อายุมากกับหนูอายุน้อย (Liu *et al.*, 2003) และในส่วนของมนุษย์นั้น ได้มีการวิจัยถึงปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในบริเวณ CA3 และ CA1 ของสมองส่วน Hippocampus ของผู้สูงอายุ (อายุ 52 – 79 ปี) โดยพบว่า ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus จะมีปริมาณของเอนไซม์ nNOS ในบริเวณ CA3 มากกว่าบริเวณ CA1 (Doyle and Salter, 1997)

แม้การศึกษานี้จะไม่พบความแตกต่างของปริมาณ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ทั้งในโคที่อายุรุ่นเดียวกันและโคที่มีอายุแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาวิจัยในสัตว์อื่นและในคนมีทั้งให้ผลที่แตกต่างกันและไม่แตกต่างกัน ดังนั้น อายุอาจมีใช้ปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ก็ได้ อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาถึงหน้าที่การทำงานของสมองส่วน Hippocampus โดย Kesner *et al.* ในปี ค.ศ.2005 และ Rajji *et al.* ในปี ค.ศ. 2006 รายงานว่าเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus มีส่วนเกี่ยวข้องกับการรับกระแสประสาทจากประสาทรับความรู้สึกต่างๆ เช่น การมองเห็น การฟัง การดมกลิ่น และการสัมผัสอีกด้วย ซึ่งผู้วิจัยเหล่านี้ได้รายงานว่าเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 จะรับข้อมูลที่ได้จากการมองเห็นและการดมกลิ่น จากนั้นจึงส่งข้อมูลที่ได้นี้ไปยังเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 เพื่อส่งต่อข้อมูลที่ไปยังสมองส่วนอื่นๆ และเก็บข้อมูลนั้นไว้ในรูปของความทรงจำต่อไป และนอกจากนี้ Vazdarjanova and Guzowski ในปี ค.ศ. 2004 ได้กล่าวว่า อวัยวะรับความรู้สึกต่างๆ ยังส่งข้อมูลที่ได้จากการฟัง การมองเห็น การดมกลิ่น มายังบริเวณ EC ซึ่งจากบริเวณ EC นี้จะส่งข้อมูลที่ให้กับเซลล์ประสาทในบริเวณ DG และบริเวณ CA3 ด้วย และในปี ค.ศ. 2005 O'Mara รายงานว่าเซลล์ประสาทของบริเวณ CA1 ทำงานเกี่ยวกับความทรงจำระยะยาว

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการศึกษานี้พบว่า ลักษณะทางกายวิภาคทั้งขนาดและน้ำหนักของสมองส่วน Hippocampus ในโคอายุ 1 ปีใกล้เคียงกับโคอายุ 10 ปี และมีโครงสร้างเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์เช่นเดียวกับในสัตว์อื่น และเมื่อทำการศึกษาถึงจำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณต่างๆ ของสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคอ่อนและโคแก่ พบว่า ในบริเวณ CA3 ของโคแก่มีจำนวนมากกว่าในโคอ่อนเล็กน้อย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการทำหน้าที่เฉพาะของบริเวณ CA3 ในสัตว์ที่มีอายุมากมีการพัฒนาที่ดีกว่าในสัตว์อายุน้อย

จากการศึกษาโดยเทคนิค Immunocytochemistry โดยใช้ Anti-nNOS ในกระบวนการ ABC พบว่า มีรงควัตถุสีน้ำตาลเกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทที่บริเวณ DG CA3 และ CA1 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของ Immunoreactivity ดังกล่าวในเนื้อเยื่อจากสมองโคแก่และโคอ่อน โดยการใช้โปรแกรม Olympus Micro Image 4.5 แล้ว ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้ง 3 บริเวณ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ อย่างไรก็ตาม ในผลการวิจัยของผู้วิจัยต่างๆ ที่เคยรายงานไว้ พบว่ามีทั้งการพบความแตกต่างและไม่พบความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในเซลล์สมองระหว่างสัตว์อายุน้อยและสัตว์อายุมาก

และแม้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ระหว่างโคที่วัยต่างกัน แต่การเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ในสมองส่วนนี้ตามอายุโค เช่น ปริมาณ Glucose Transporter หรือสารอื่นๆ เช่น Glutamate ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ด้วยข้อจำกัดของอายุโคซึ่งใช้เป็นตัวอย่างที่มีอายุ 1 ปีและ 10 ปีอาจไม่พบความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ nNOS ในเซลล์สมองได้ หากมีการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ nNOS ในโคที่มีอายุมากกว่า เช่น 15 ปี ขึ้นไปอาจได้ผลที่แตกต่างออกไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ, บรรณารักษ์ แก้วจรรยา, อภินันท์ สุประเสริฐ, เสรี ภูญจนาค และ อภินันท์ ดิวงเงิน. 2543. การศึกษากายวิภาคของ Hippocampus และเส้นทางติดต่อของสมองกระป๋องปลั๊ก. **วารสารสัตวแพทย์**. 10: 20-28

Alderton, Wendy K., Chris E. Cooper, and Richard G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. **Biochem J**. 357:593-615.

Andrew, Penelope J., and Bernd Mayer. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases **Cardiovasc Res**. 43:521 - 531.

Baum, Berit, Felix Meneses, Sven Kleinschmidt, Ingo Nolte, and Marion Hewicker-Trautwein. 2007. Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: A histologic and immunohistologic study. **World J Gastroenterol**. 13:152-157.

Blum-Degen, Doris, Thoralf Heinemann, Jing Lan, Vera Pedersen, Fritz Leblhuber, Werner Paulus, Peter Riederer, and Manfred Gerlach. 1999. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing **Brain Res**. 834:128-135.

Bon, Christelle L. M., and John Garthwaite. 2003. On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. **J Neurosci**. 23:1941-1948.

Broadbent, Nicola J., Larry R. Squire, and Robert E. Clark. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **PNAS**. 101:14515 - 14520.

- Broholm, H., B. Andersen, B. Wanscher, J. L. Frederiksen, I. Rubin, B. Pakkenberg, H. B. W. Larsson, and M. Lauritzen. 2004. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand.** 109:261-269.
- Burnod, Yves. 1990. An Adaptive Neural Network in the cerebral cortex. **Masson Paris.** X:180-182
- Colas, Damien, Abdallah Gharib, Laurent Bezin, Anne Morales, Gérard Guidon, Raymond Cespuglio, and Nicole Sarda. 2006. Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain. **BMC Neurosci.** 81.
- DeLisi, L. E., W. Tew, R. Grimson, M. Sakuma, M. Kushner, and A. L. Hoff. 1997. Brain change over time in schizophrenia **Biol Psychiatry.** 42:73.
- Doyle, C.A., and P. Salter. 1997. Localization of Neuronal and Endothelial Nitric Oxide Synthase Isoforms in Human Hippocampus. **Neurosci.** 76:387-395.
- Garcia, Xiomara, and Fernando Stein. 2006. **Nitric Oxide. Semin Pediatr Infect Dis.** 17:55-57.
- Greener, Mark. 2004. Now You're Signaling, With Gas. **The Scientist.** 18:20.
- Gunn-Moore, Daniëlle A., Jill McVee, Janet M. Bradshaw, Geoffrey R. Pearson, Elizabeth Head, and Francis J. Gunn-Moore. 2006. Ageing changes in cat brains demonstrated by β -amyloid and AT8-immunoreactive phosphorylated tau deposits. **J Feline Med Surg.** 8:234-242.
- Halbach, Oliver von Bohlen und, and Klaus Unsicker. 2002. Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. **Eur J Neurosci.** 16:2434-2440.

- Hasselmo, Michael E. 2005. The Role of Hippocampal Regions CA3 and CA1 in Matching Entorhinal Input With Retrieval of Associations Between Objects and Context: Theoretical Comment on Lee et al. (2005). **Behavioral Neuroscience Copyright 2005 by the American Psychological Association**. 119:342-345.
- Hölscher, Christian. 1997. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci**. 20:298-303.
- Huang, A-Min, and Emory H. Y. Lee. 1995. Role of Hippocampal Nitric Oxide in Memory Retention in Rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 50:327-332.
- Innvista. 2007. <http://www.innvista.com/health/anatomy/nervage.htm>.
- Insausti, Ricardo. 1993. Comparative Anatomy of the Entorhinal Cortex and Hippocampus in Mammals. **Hippocampus**. 3:19-26.
- Johnson, F. Brad, David A. Sinclair, and Leonard Guarente. 1999. Molecular Biology of Aging. **Cell**. 96:291-302.
- Joo, Kyeung Min, Yoon Hee Chung, Chung Min Shin, Yun Jung Lee, and Choong Ik Cha. 2004. Region-specific alterations of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression in the amygdala of the aged rats. **Brain Res**. 999:231-236.
- Kesner, Raymond P., Michael R. Hunsaker, and Paul E. Gilbert. 2005. The Role of CA1 in the Acquisition of an Object–Trace–Odor Paired Associate Task. **Behav Neurosci**. 119:781-786.
- Keuter, Jeanine I.H., Paul G.M. Luiten, and Eberhard Fuchs. 2003. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. **Neurobiol Aging**. 24:157-165.

Kiechle, Frederick L., and Tadeusz Malinski. 1993. Nitric oxide: Biochemistry, Pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.** 100:567-575.

Kulkarni, S.K., and Avadesh C. Sharma. 1993. Nitric Oxide: A new generation of neurotransmitter. **Indian J Pharmacol.** 25:14-17.

Kupsky, W.J., G.H. Marchant, K. Cook, and J. Shoshani. 2001. Morphologic analysis of the hippocampal formation in *Elephas maximus* and *Loxodonta africana* with comparison to that of human. **The world of Elephants - International Congress, Rome.**

Law, A., J. O'Donnell, S. Gauthier, and R. Quirion. 2002. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. **Neuroscience.** 112:267-275.

Law, A., S. Dore, S. Blackshaw, S. Gauthier, and R. Quirion. 2000. Alteration of Expression Levels of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Haem Oxygenase-2 Messenger RNA in the Hippocampi and Cortices of Young Adult and Aged Cognitively Unimpaired and Impaired Long-Evans Rats. **Neuroscience.** 100:769-775.

Ledo, Ana, Joao Frade, Rui M. Barbosa, and Joao Laranjinha. 2004. Nitric Oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal regions. **Mol Aspects Med.** 25:75-89.

Liu, P., P. F. Smith, I. Appleton, C. L. Darlington, and D. K. Bilkey. 2003. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. **Neuroscience.** 119:679-687.

Liu, P., P.F. Smith, I. Appleton, C.L. Darlington, and D.K. Bilkey. 2004. Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. **Neurobiol Aging.** 25:547-552.

- Lüth, Hans-Joachim, and Gerald MünchThomas Arendt. 2002. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. **Brain Res.** 953:135-143.
- McCann, S.M., C.Mastronardi, A. De Laurentiis, and V. Rettori. 2005. The Nitric Oxide Theory of Aging Revisited. **Ann N Y Acad Sci.** 1057:64-84.
- Necchi, Daniela, Marco Virgili, Barbara Monti, Antonio Contestabile, and Elda Scherini. 2002. Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. **Brain Res.** 933:31-41.
- O'Mara, Shane. 2005. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. **J Anat.** 207:271-282.
- Petten, Cyma Van. 2004. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. **Neuropsychologia.** 42:1394-1413.
- Porta, Caterina A.M. La, and Roberto Comolli. 1999. Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expression in rat cortex, striatum, and hippocampus. **Exp Gerontol.** 34:863-874.
- Poulos, Huiying Li and Thomas L. 2005. Structure–function studies on nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem.** 99:293-305.
- Prast, Helmut, and Athineos Philippu. 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol.** 64:51-68.

- Pugliese, Marco, Carlo Gangitano, Sabrina Ceccariglia, Josep Lluís Carrasco, Aurora Del Fà, Manuel José Rodríguez, Fabrizio Michetti, Joan Mascort, and Nicole Mahy. 2007. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: Acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. **Brain Res.** 1139:85-94.
- Rajji, Tarek, David Chapman, Howard Eichenbaum, and Robert Greene. 2006. The Role of CA3 Hippocampal NMDA Receptors in Paired Associate Learning. **J Neurosci.** 26:908-915.
- Rapp, P R, and M Gallagher. 1996. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proc Natl Acad Sci.** 93:9926-9930.
- Rosselli, M, RJ Keller, and RK Dubey. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction **Hum Reprod Update.** 4:3-24.
- Schuman, Erin M., and Daniel V. Madison. 1993. Nitric oxide as an intercellular signal in long-term potentiation. **Seminars in Neuroscience.** 5:207-215.
- Schuman, Erin M., and Daniel V. Madison. 1994. Nitric Oxide and Synaptic Function. **Annu Rev. Neurosci.** 17:153-183.
- Siles, Eva, Esther Martínez-Lara, Ana Cañuelo, Marta Sánchez, Raquel Hernández, Juan Carlos López-Ramos, María Luisa Del Moral, Francisco José Esteban, Santos Blanco, Juan Angel Pedrosa, Jose´Rodrigo, and Maria Angeles Peinado. 2002. Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. **Brain Res.** 956:385-392.
- Siwak-Tapp, Christina T., Elizabeth Head, Bruce A. Muggenburg, Norton W. Milgram, and Carl W. Cotman. 2006. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment **Neurobiol Aging.** X:1-12.

- Snyder, Solomon H., and Ted M. Dawson. 2007. Nitric Oxide and Related Substances as Neural Messengers <http://www.acnp.org/g4/GN401000060/CH060.html>.
- Snyder, Solomon H., Samie R. Jaffrey, and Randa Zakhary. 1998. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. **Brain Res Rev.** 26:167-175.
- Sohal, Sanjiv Agarwal and R. S. 1995. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. **Mech Ageing Dev.** 85:55-63.
- Trollor, Julian N., and Michael J. Valenzuela. 2001. Brain ageing in the new millennium. **Aust N Z J Psychiatry.** 35:788-805.
- Uylings, Harry B. M., and J. M. de Brabander. 2002. Neuronal Changes in Normal Human Aging and Alzheimer's Disease. **Brain Cogn.** 49:268-276.
- Vazdarjanova, Almira, and John F. Guzowski. 2004. Differences in Hippocampal Neuronal Population Responses to Modifications of an Environmental Context: Evidence for Distinct, Yet Complementary, Functions of CA3 and CA1 Ensembles. **J Neurosci.** 24:6489-6496.
- Vincent, Steven R., and Bruce T. Hope. 1992. Neurons that say NO. **TINS.** 15:108-113.
- Yua, Wen-Jen, Shiow-Wen Juanga, Jie-Jen Leeb, Tsang-Pai Liub, and Juei-Tang Chenga. 2000. Decrease of neuronal nitric oxide synthase in the cerebellum of aged rats. **Neurosci Lett.** 291:37 - 40.
- Zhang, Zhiyong, Hasker P. Davis, Timothy A. Salthouse, and Elliot M. Tucker-Drob. 2007. Correlates of individual, and age-related, differences in short-term learning, pp. 1-10 **Learn Individ Differ.**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและสีย้อมสำหรับพาราฟินเทคนิค

การเตรียมสารเคมีและสีย้อมสำหรับพาราฟินเทคนิค

1. น้ำยาคงสภาพ

10% Formalin

37-40% Formalin	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

สีย้อม Luxol's fast blue (ตุลลักษณ์, 2545) และวิธีการย้อม

เพื่อศึกษาส่วนประกอบของเนื้อเยื่อและเซลล์ประสาท

2.1 0.5% Lithium Carbonate Solution

Lithium Carbonate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

2.2 0.1% Luxol Fast Blue Solution

Luxol Fast Blue	0.2	กรัม
แอลกอฮอล์ 95%	200	มิลลิลิตร
10% Gracial Acetic acid	1.0	มิลลิลิตร

2.3 0.1% Cresyl Fast Violet Solution

Cresyl Fast Violet	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ก่อนนำไปใช้เติม 10% Gracial Acetic Acid 30 หยด กรอง

2.4 10% Gracial Acetic acid

Concentrated Gracial Acetic acid	0.25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.25	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมสี Luxol Fast Blue

1. นำสไลด์ไปขจัดพาราฟินออก (Deparaffin) ด้วยไซลีนนาน 5 นาที 3 ครั้ง และนำน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ระดับต่างๆ ดังนี้

Absolute Alcohol I	3	นาที
Absolute Alcohol II	3	นาที
Absolute Alcohol III	3	นาที
95% Alcohol	3	นาที
70% Alcohol	3	นาที
Deionized distilled Water	3	นาที

2. แช่สไลด์ใน 0.1% Luxol Fast Blue ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน
3. แช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 95% นาน 5 นาที 2 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก (Decolorized)
4. ล้างด้วยการเปลี่ยนน้ำประปาไหลผ่าน 2 นาที
5. จุ่มสไลด์ใน 0.5% Lithium Carbonate Solution นาน 30 วินาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก (Decolorized)
6. แช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 2 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก (Decolorized)
7. ล้างด้วยการเปลี่ยนน้ำประปาไหลผ่าน 2 นาที
8. จุ่มสไลด์ใน 0.5% Lithium Carbonate Solution นาน 30 วินาที และแช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 2 นาที
9. แช่สไลด์ใน 0.1% Cresyl Fast Violet Solution และนำไปอบที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที
10. ล้างสีส่วนเกินออก (Decolorized) โดยแช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 95% นาน 3 นาที 2 ครั้ง

11. ขจัดน้ำออก (Dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์ 100% นาน 3 นาที 2 ครั้ง ขจัดแอลกอฮอล์และทำให้ใส (Clearing) โดยแช่สไลด์ในไซลีนนาน 5 นาที 3 ครั้ง
12. หยอดเปอร์เมตต์และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

ภาคผนวก ข

สีและวิธีการย้อมสีด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

สีและวิธีการย้อมสีด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี

เพื่อศึกษาดำแหน่งและปริมาณของเอนไซม์นิวโรนอลไนตริกออกไซด์ซินเทสในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus

3.1 0.9% Sodium Chloride

Sodium Chloride	9.0	กรัม
น้ำกลั่นชนิด Deionized	1.0	ลิตร

3.2 1 M sodium Hydroxide

Sodium Hydroxide	4.0	กรัม
น้ำกลั่นชนิด Deionized	100	มิลลิลิตร

3.3 0.1 M Sodium Acetate

Sodium Acetate	13.608	กรัม
น้ำกลั่นชนิด Deionized	1.0	ลิตร

3.4 50 mM KPBS

Sodium Chloride	18.0	กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	11.7	กรัม
Potassium Dihydrogen Phosphate	4.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นชนิด Deionized จนครบ 2 ลิตร		
ปรับค่า pH ให้เป็น 7.4 และเตรียมปริมาตรทั้งหมด 8 ลิตร		

3.5 Citric Buffer Solution

โดยในขั้นแรกต้องเตรียม

3.5.1 0.1 M Citric acid

Citric acid	0.21015 กรัม
น้ำกลั่นชนิด Deionized	10 มิลลิลิตร

3.5.2 0.1 M Sodium Citrate

Sodium Citrate	1.4705 กรัม
น้ำกลั่นชนิด Deionized	50 มิลลิลิตร

จากนั้นนำ 0.1 M Citric acid ปริมาตร 9 มิลลิลิตร มาผสมกับ 0.1 M Sodium Citrate ปริมาตร 41 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และปรับ pH ให้เป็น 6.0

นำสารเคมีทั้งหมดที่เตรียมไว้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และไม่ควรเก็บไว้นานเกินกว่า 3 วัน

วิธีการย้อมสีด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี

วันที่ 1

1. นำสไลด์ Probe on Plus slides® (Fisher Scientific, Cat#15-188-52; Fischer Scientific, Fairlawn, NJ.) ซึ่งติดเนื้อเยื่อแผ่นบางแล้ว เข้าอบที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อช่วยในการกำจัดพาราฟินออก (Deparaffin)

2. นำสไลด์ไปกำจัดพาราฟินออก (Deparaffin) ด้วยไซลีนนาน 5 นาที 3 ครั้ง และนำน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ระดับต่างๆ ดังนี้

Absolute Alcohol I	3	นาที
Absolute Alcohol II	3	นาที

Absolute Alcohol III	3	นาที่
95% Alcohol	3	นาที่
70% Alcohol	3	นาที่
Deionized distilled Water	3	นาที่

3. นำสไลด์ลงต้มใน Citrate Buffer นาน 20 นาที จากนั้นนำสไลด์แช่ทิ้งไว้ใน Citrate Buffer ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที

4. ใช้ปากกา ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen, (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) วรอบเนื้อเยื่อบนสไลด์

5. แช่สไลด์ใน 50 mM KPBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง

ระหว่างนี้เตรียม 03.% Hydrogen Peroxide จากสูตร

6% Hydrogen Peroxide	10	มิลลิลิตร
50 mM KPBS	190	มิลลิลิตร

6. กำจัด Endogenous activity โดยการนำสไลด์ไปแช่ใน 0.3% Hydrogen Peroxide นาน 30 นาที และระหว่างนี้เตรียม Blocking Diluent และ Normal Blocking Serum จากสูตร

6.1 Blocking Diluent

50 mM KPBS	20	มิลลิลิตร
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.2	กรัม
Triton X-100	80	ไมโครลิตร

6.2 Normal Blocking Serum

Blocking Diluent	10	มิลลิลิตร
Normal Goat Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)	150	ไมโครลิตร

7. นำสไลด์มาวางในแนวนอนและหยด Normal Blocking Serum พอท่วมตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงใน Humid Chamber

ระหว่างนี้เตรียม Primary Antibody Solution สำหรับเจือจาง Primary Antibody ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:200 และ Negative Control ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:1,000 และ 50 mM KPBS/Triton X-100 โดยเตรียมจากสูตร

7.3 Primary Antibody Solution

Blocking Diluent	10	มิลลิลิตร
Normal Goat Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)		
	100	ไมโครลิตร

7.4 Primary Antibody

Rabbit Anti bNOS/NOS-1 (1 mg /ml) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)	10	ไมโครลิตร
Primary Antibody Solution	1,990	ไมโครลิตร

7.5 Negative Control

Rabbit IgG (5 mg /ml) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)		
	1	ไมโครลิตร
Primary Antibody Solution	5	มิลลิลิตร

7.6 50 mM KPBS/Triton X-100

50 mM KPBS	2	ลิตร
Triton X-100	400	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer ปั่นนานอย่างน้อย 30 นาที

8. นำสไลด์มาวางในแนวนอนและหยด Primary Antibody บนสไลด์ที่ต้องการและหยด Negative Control บนสไลด์ที่กำหนดให้เป็น Negative control พอท่วมตั้งทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสใน Humid Chamber

วันที่ 2

1. ล้างสไลด์ด้วย 50 mM KPBS/Triton X-100 นาน 10 นาที 10 ครั้ง

ระหว่างรอเตรียม Diluent A เพื่อใช้สำหรับเป็นส่วนผสมของ Secondary Antibody Solution ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:250 และ Avidin – biotin – peroxidase complex โดยเตรียมได้จากสูตร

1.1 Diluent A

50 mM KPBS/Triton X-100	10	มิลลิลิตร
Normal Goat Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)		
	150	ไมโครลิตร
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.1	กรัม

1.2 Secondary Antibody Solution

Diluent A	5	มิลลิลิตร
Biotinylated Anti-rabbit IgG (H+L) affinity purified made in Goat (5 mg /ml)		
(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)	20	ไมโครลิตร

2. นำสไลด์มาวางในแนวนอนและหยด Secondary Antibody Solution พอท่วมตั้งทิ้งไว้ นาน 2 ชั่วโมง ใน Humid Chamber

ระหว่างเตรียม Avidin – biotin – peroxidase complex ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ชุดเครื่องมือ Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) โดยเตรียมได้จากสูตร

2.1 Avidin – biotin – peroxidase complex

Diluent A	5	มิลลิลิตร
Reagent A	2	หยด
Reagent B	2	หยด

ในขั้นตอนการหยด จะต้องหยด Reagent A แล้วผสมให้เข้ากันก่อน จึงหยด Reagent B เสมอ

3. ล้างสไลด์ใน 50 mM KPBS/Triton X-100 นาน 10 นาที 2 ครั้ง
4. แช่สไลด์ใน 0.1 M Sodium Acetate นาน 10 นาที
5. นำสไลด์มาวางในแนวนอนและหยด Avidin – biotin – peroxidase complex พอท่วมตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ใน Humid Chamber
6. แช่สไลด์ใน 50 mM KPBS นาน 10 นาที
7. แช่สไลด์ใน 0.1 M Sodium Acetate นาน 10 นาที 2 ครั้ง

ระหว่างนี้เตรียม 3,3' – diaminobenzidine โดยใช้ DAB Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) จากสูตร

7.1 DAB Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร
Stock Buffer	2	หยด
ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม		
DAB Solution	4	หยด
ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม		
Stock Hydrogen Peroxide	2	หยด

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใช้งานทันที

ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องทำในที่มืด และการเตรียมน้ำยาต้องเตรียมใส่ขวดทึบแสง เนื่องจาก DAB Solution มีความไวต่อแสง

8. หยด DAB Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ลงบนเนื้อเยื่อบนสไลด์พอท่วมสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยจะพบว่าเนื้อเยื่อมีตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้น

ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องทำในที่มืด และเนื่องจาก 3,3' – diaminobenzidine เป็นสารก่อมะเร็งที่ร้ายแรง ดังนั้น ควรทิ้งส่วนที่เหลือลงในขวดทิ้งสารเคมีอันตราย

9. แช่สไลด์ลงใน 0.9% Sodium Chloride นาน 5 นาที 2 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกิริยา

10. ย้อมสีซ้ำ (Counterstain) ด้วยสี Mayer's hematoxylin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) นาน 5 นาที

11. ล้างสไลด์โดยประปาไหลผ่านนาน 2 นาที

12. จัดน้ำออก (Dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์ระดับต่างๆ ดังนี้

แอลกอฮอล์ 70%	นาน	3	นาที	1	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 95%	นาน	3	นาที	1	ครั้ง
แอลกอฮอล์ 100%	นาน	3	นาที	3	ครั้ง

13. จัดแอลกอฮอล์และทำให้ใส (Clearing) โดยแช่สไลด์ในไซลีนนาน 5 นาที 3 ครั้ง

14. หยดเปอร์มาต์และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

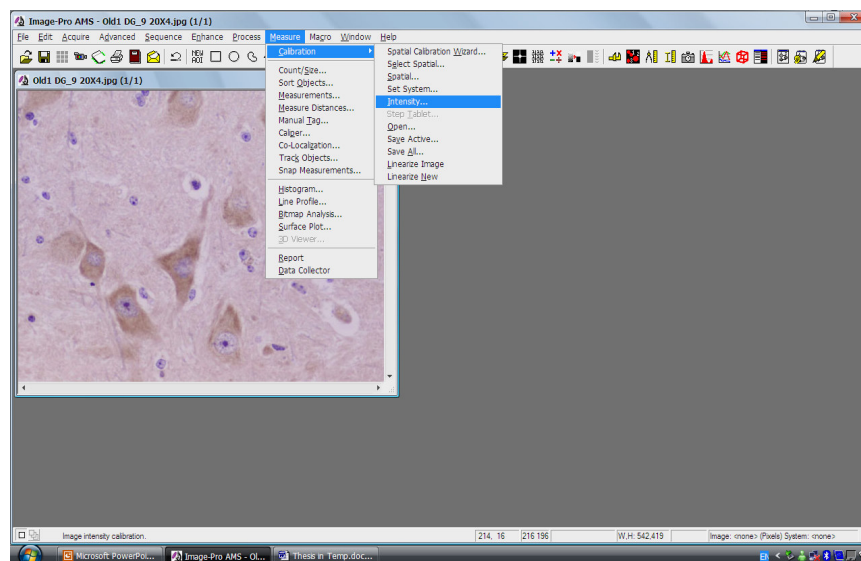
ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์ความเข้มสี โดยโปรแกรม Olympus Micro Image 4.5

การวิเคราะห์ความเข้มสีโดยโปรแกรม Olympus Micro Image

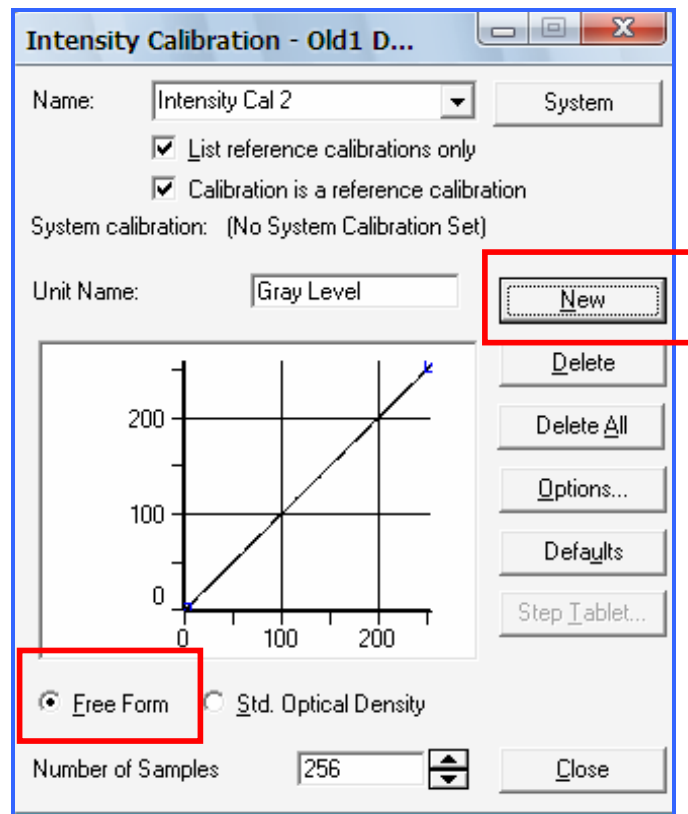
โปรแกรม Olympus Micro Image 4.5 (OMI 4.5) เป็นโปรแกรมจากบริษัท Olympus มีจุดประสงค์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีหลายรูปแบบ แต่สำหรับการทดลองในครั้งนี้ จะใช้ Histogram menu เพื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มสีของ Immunoreactivity ของเอนไซม์ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus ในบริเวณ DG, CA3 และ CA1 ซึ่งได้มาจากสมองโคแอกและโคออน โดยทำการสุ่มเลือกมาจำนวน 6 ชิ้น โดยใน Histogram menu ของโปรแกรม OMI 4.5 นี้จะทำการคำนวณค่าความเข้มสีของรงควัตถุสีน้ำตาลที่ได้จากการติดสี DAB ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทจากภาพถ่าย ซึ่งในการทดลองนี้ จะใช้ภาพถ่ายที่ได้จากกล้องถ่ายภาพดิจิทัล Olympus DP70 ที่ความละเอียด 12.5 megapixel ที่บันทึกในรูปแบบ TIFF file เพื่อให้ได้ภาพถ่ายที่มีความละเอียดสูงนั่นเอง

ในการวิเคราะห์ความเข้มสีนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ การ Calibrate สีเพื่อกำหนดมาตรฐาน และจากนั้นจึงทำการความเข้มสีตามต้องการ โดยในขั้นแรกนั้น เมื่อเปิดใช้โปรแกรมนี้เป็นครั้งแรกต้องทำการ Calibrate เพื่อดึงค่ามาตรฐานให้กับโปรแกรมเสียก่อน ซึ่งทำได้โดยในขั้นแรกต้องเปิด file ภาพถ่ายที่ต้องการโดยเลือกปุ่ม  จากนั้นเลือก “Measure menu” บน Toolbar จากนั้นเลือก “Calibration” และ “Intensity” ตามลำดับ



ภาพผนวกที่ ๑1 แสดงการเปิดโปรแกรมเพื่อดึงค่าความเข้มสี

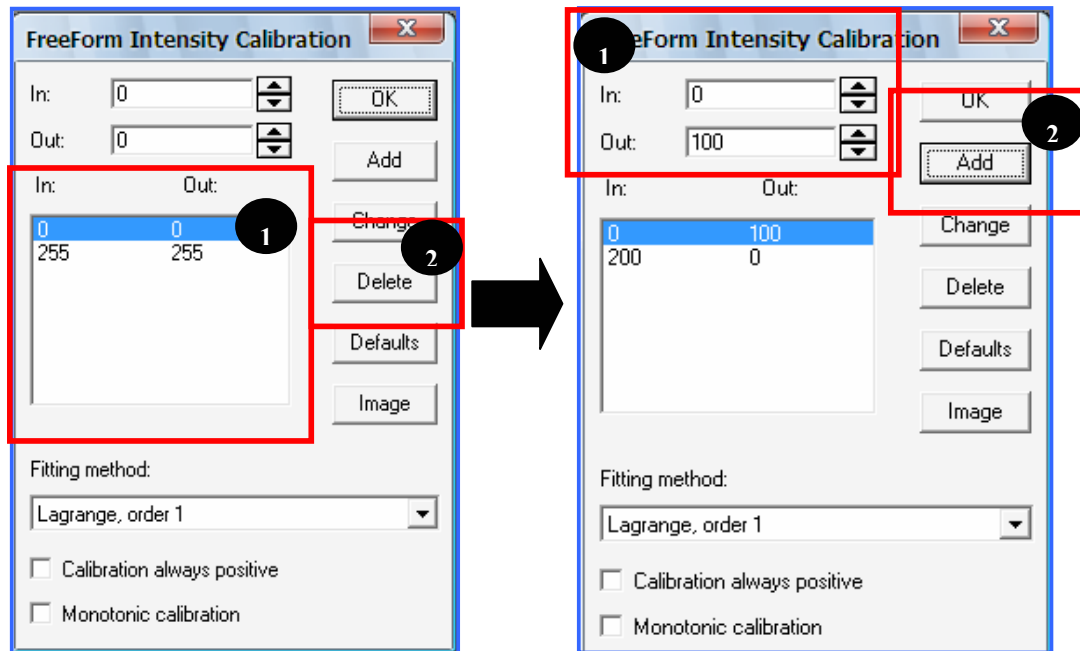
บนหน้าจอจะปรากฏหน้าต่าง Intensity Calibration ขึ้นมา จากนั้นเลือก New menu กำหนดให้เป็น free form กดปุ่ม ok



ภาพผนวกที่ ค2 แสดงหน้าต่าง Intensity Calibration เพื่อกำหนดค่าความเข้มสี

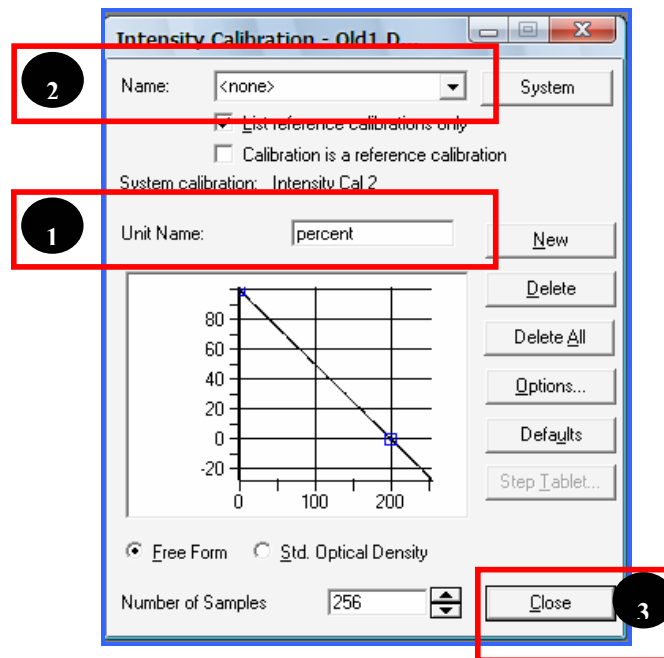
แล้วจึงเลือก “Options... menu” เพื่อกำหนดค่า Input และ Output ของการวิเคราะห์ความเข้มสี ซึ่งจะเป็นการเปรียบเทียบโดยใช้โทนสีขาว-ดำ โดยจะต้องตั้งค่าความเข้มสีให้อยู่ระหว่าง 0 ซึ่งเป็นค่าความเข้มสีสูงสุด ถึง 255 ซึ่งเป็นความเข้มสีต่ำสุด โดยในการทดลองครั้งนี้จะแสดงผลออกมาในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์ความเข้มสี จึงตั้งค่า 0 ในช่อง Input เพื่อใช้เป็นตัวแทนของความเข้มสีสูงสุด และตั้งค่า 100 ในช่อง Output โดยเมื่อแสดงผลออกมาจะออกมาในรูปแบบของค่า 100% จากนั้นทำการตั้งค่า input ของ Intensity เป็น 0 เพื่อใช้เป็นตัวแทนของความเข้มสีต่ำสุด และตั้งค่า Output เป็น 200 ซึ่งจะทำให้แสดงผลออกมาในรูปแบบของ 0% (เนื่องจากทางโปรแกรมได้ตั้งค่าไว้เป็นมาตรฐาน ดังนั้น ในการตั้งค่าตามความต้องการนั้นต้องลบค่าเดิมทิ้ง โดยเลือกค่าที่ต้องการ

ลบ จากนั้นเลือกปุ่ม “Delete” จากนั้นจึงตั้งค่าตามต้องการได้โดยเลือกปุ่ม “Add” เพื่อเพิ่มค่าที่ต้องการ)



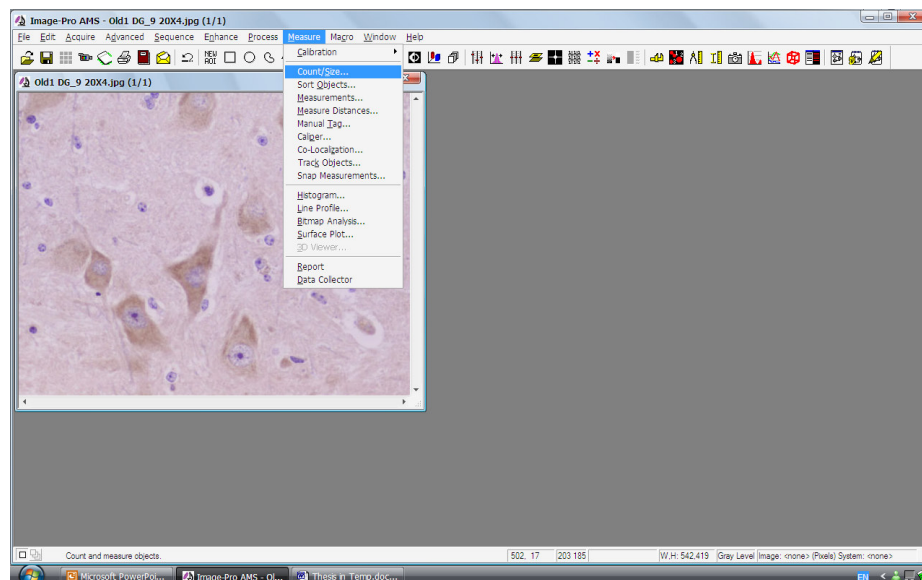
ภาพผนวกที่ ค3 แสดงหน้าต่าง FreeForm Intensity Calibration เพื่อกำหนดค่า input และ output

จากนั้นคลิกปุ่ม “OK” เพื่อบันทึกการตั้งค่า และเลือก unit name เพื่อกำหนดหน่วยของค่าที่แสดงออกมา โดยในที่นี้กำหนดให้เป็น percent และกำหนดชื่อของการตั้งค่าจากนั้นเลือกปุ่ม “Close” เพื่อบันทึกการตั้งค่า



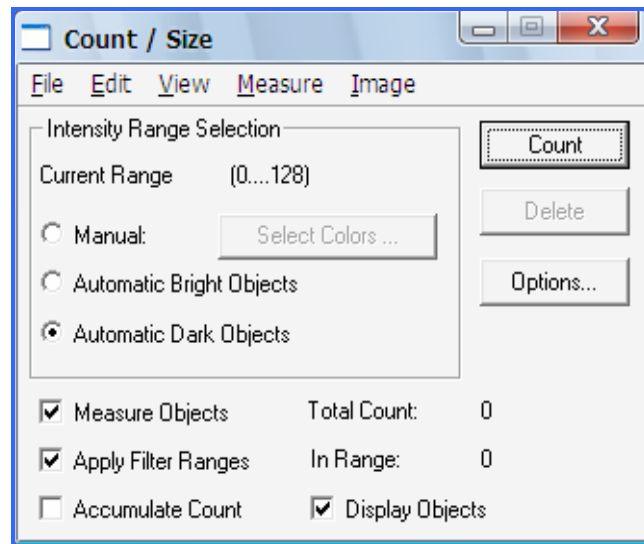
ภาพผนวกที่ ค4 แสดงหน้าต่าง Intensity Calibration เพื่อกำหนดหน่วยตามต้องการ

และเริ่มการวิเคราะห์ความเข้มสีจากภาพถ่ายโดยใช้ Histogram based โดยเริ่มจากการเลือก “Count/Size menu” บน Toolbar



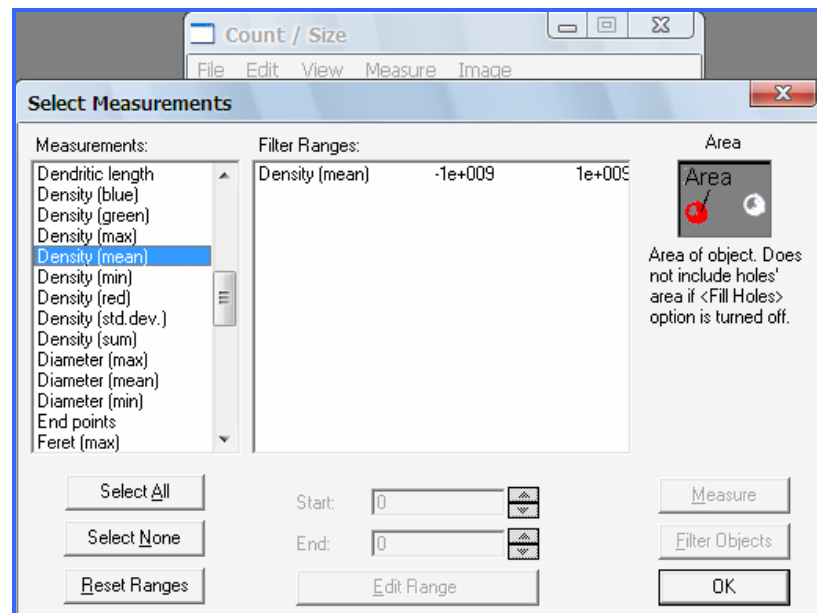
ภาพผนวกที่ ค5 แสดงการเปิดโปรแกรมเพื่อเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ความเข้มสี

จะปรากฏ Count/Size window ขึ้นมา



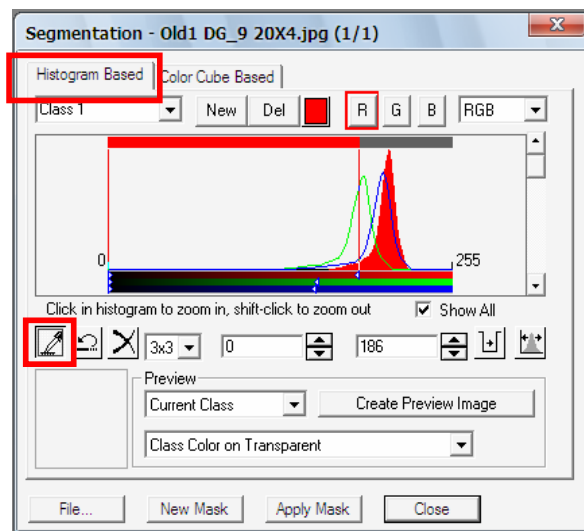
ภาพผนวกที่ ค6 แสดงหน้าต่าง Count/Size

ทำการกำหนดค่าที่ต้องการให้โปรแกรมคำนวณโดยเลือก “Measure menu” บน Toolbar ของหน้าต่าง Count/Size เลือก “Select Measurement menu” จะปรากฏหน้าต่าง Select Measurement ขึ้นมา เลือกค่าที่ต้องการซึ่งในการทดลองนี้ต้องการคือค่า Density (mean) จากนั้นเลือกปุ่ม “OK” เพื่อจบการตั้งค่า



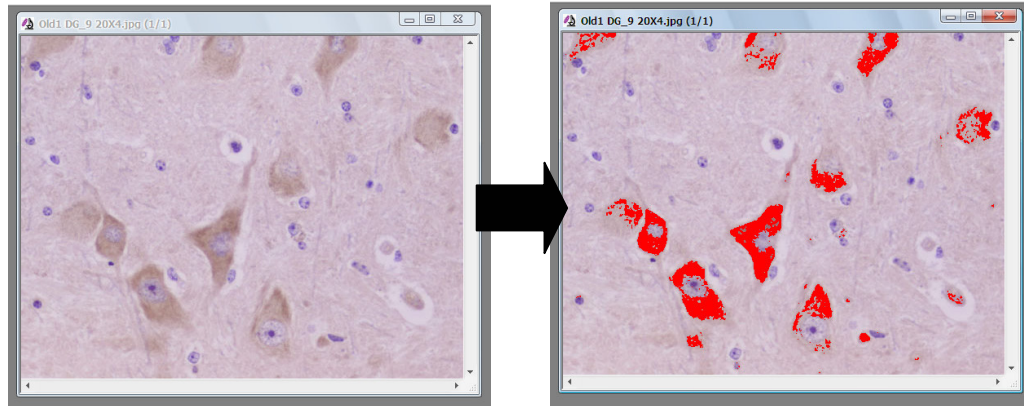
ภาพผนวกที่ ค7 แสดงหน้าต่าง Select Measurements เพื่อกำหนดค่าที่ต้องการ

จากนั้นเลือกช่อง “manual” บนหน้าต่าง Count/Size และเลือกปุ่ม “Select Colors...” จะปรากฏหน้าต่าง Segmentation – (ชื่อภาพที่ต้องการวิเคราะห์) และเลือก “Histogram based” เพื่อเข้าสู่ Histogram based window และมีสัญลักษณ์  ให้เลือกที่ปุ่มสัญลักษณ์นี้



ภาพผนวกที่ ค8 แสดงหน้าต่าง Segmentation เพื่อกำหนดสีที่ต้องการวิเคราะห์

จากนั้นคลิกที่ภาพถ่ายโดยเลือกบริเวณที่มีรงควัตถุสีน้ำตาลจาก Immunoreactivity ของ เอนไซม์ nNOS ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทที่ต้องการวิเคราะห์ โดยในทุกบริเวณของ ภาพถ่ายที่มีสีน้ำตาลในระดับที่ต้องการนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีแดง



ภาพผนวกที่ ๙ แสดงการกำหนดสีที่ต้องการวิเคราะห์

เมื่อทำการเลือกสีจนเป็นที่พอใจแล้ว เลือกปุ่ม “Close” เพื่อปิดหน้าต่างเลือกสี และเลือกปุ่ม “Count” เพื่อให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มสี แต่หากต้องการทราบค่าความเข้มสีของรงควัตถุสีน้ำตาลในแต่ละเซลล์นั้นสามารถทำได้โดย double click ที่บริเวณที่ต้องการ บนหน้าจอจะปรากฏเปอร์เซ็นต์ความเข้มสีของรงควัตถุสีน้ำตาลในบริเวณนั้นๆ และหากต้องการทราบผลทั้งหมดสามารถดูได้จากการเลือก “View menu” บน Toolbar ของ Count/Size window เลือก “Measureent data” จะปรากฏหน้าต่างแสดงค่าความเข้มสีในแต่ละเซลล์ออกมาในรูปของตาราง และสามารถส่งค่าที่ได้ในรูปของตารางไปยังโปรแกรม Microsoft excel เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไปได้ โดยเปิดโปรแกรม Microsoft excel จากนั้นกลับมายังโปรแกรม OMI เลือก “File menu” บน Toolbar ของหน้าต่าง Measurement data จากนั้นเลือก “Export Data menu” ข้อมูลทั้งหมดในตารางจะไปปรากฏอยู่ในตารางของโปรแกรม Microsoft excel ต่อไป ซึ่งในการทดลองนี้ กำหนดให้ทำการวิเคราะห์โดยสุ่มเลือกเซลล์ประสาทในบริเวณ DG มาจำนวน 62 เซลล์, บริเวณ CA3 มาจำนวน 17 เซลล์ และบริเวณ CA1 มาจำนวน 88 เซลล์ (10% ของเซลล์ประสาททั้งหมดในแต่ละบริเวณ) เพื่อเป็นตัวแทนในการแสดงเปอร์เซ็นต์ของ nNOS immunoreactivity ในแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ภาคผนวก ง

ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS Immunoreactivity

ตารางผนวกที่ ง1 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก่

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก่ ตัวที่ 1	โคแก่ ตัวที่ 2	โคแก่ ตัวที่ 1	โคแก่ ตัวที่ 2	โคแก่ ตัวที่ 1	โคแก่ ตัวที่ 2	โคแก่ ตัวที่ 1	โคแก่ ตัวที่ 2	โคแก่ ตัวที่ 1	โคแก่ ตัวที่ 2
25.80	21.61	26.38	16.36	28.64	21.30	25.63	17.78	-	18.94
27.68	25.78	28.08	16.51	31.47	20.26	26.21	18.20	-	18.91
27.51	21.12	25.38	16.37	31.96	21.32	27.68	17.43	-	19.53
27.77	21.47	26.98	16.41	29.15	19.81	27.67	18.31	-	18.83
29.18	21.21	24.72	16.36	28.08	20.51	25.34	17.84	-	18.94
27.39	21.22	29.99	16.73	32.47	20.46	23.60	17.64	-	18.98
26.59	21.46	25.15	16.97	31.56	19.91	25.12	18.12	-	18.92
25.86	23.40	26.57	17.93	39.60	21.05	26.83	17.34	-	19.41
26.75	23.28	24.75	18.45	28.12	20.45	31.86	18.27	-	19.00
25.49	23.16	25.17	17.82	25.38	20.44	29.20	17.43	-	19.00
24.64	22.88	24.57	17.64	27.64	19.95	30.05	19.64	-	19.19
23.98	23.82	24.58	17.32	31.00	19.88	29.84	20.05	-	19.29
26.02	19.16	23.67	14.98	25.72	20.07	31.49	19.80	-	18.83
22.98	19.14	26.35	14.98	27.00	20.56	30.85	19.96	-	19.05
27.74	19.39	24.90	15.43	28.04	20.15	31.13	19.66	-	18.65
22.66	19.00	24.66	15.99	27.76	20.04	31.27	20.29	-	19.50
22.78	18.53	23.36	14.68	27.26	20.84	30.36	19.57	-	19.43
25.67	18.91	24.78	14.74	26.13	20.63	31.61	19.45	-	18.40
25.73	19.62	23.22	14.70	25.06	21.39	28.99	19.99	-	19.39
24.56	20.71	23.99	14.42	25.07	18.77	26.87	20.15	-	19.65
22.05	20.53	23.32	15.78	26.14	18.79	27.53	19.38	-	19.62
22.76	20.76	23.28	15.94	27.82	18.81	27.13	19.33	-	19.32
22.84	21.21	25.01	16.13	26.27	18.39	27.05	19.49	-	19.39
22.76	21.49	23.47	15.75	26.57	18.78	27.68	19.17	-	19.55

ตารางผนวกที่ ง1 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็ (ต่อ)

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
23.36	20.24	24.94	16.15	25.92	18.84	26.46	19.48	-	19.56
24.29	23.21	23.76	15.72	24.97	19.13	26.27	19.60	-	19.68
25.63	22.40	24.03	16.89	25.05	18.32	30.50	19.43	-	19.41
23.91	21.21	23.90	15.50	24.47	18.39	26.01	20.04	-	19.30
22.99	21.46	23.45	14.83	26.08	18.97	27.74	18.61	-	19.02
24.02	20.87	22.87	15.21	27.8	19.41	29.57	18.51	-	19.34
22.57	23.15	23.10	15.17	27.35	19.49	27.96	19.15	-	19.91
28.50	24.06	22.94	16.19	28.81	19.33	23.03	19.54	-	22.74
26.92	22.40	22.82	15.26	27.05	19.22	25.13	19.20	-	23.59
27.08	23.54	22.80	14.01	28.77	19.01	23.69	19.30	-	23.64
28.09	22.51	25.13	14.07	27.57	19.46	23.39	18.93	-	23.21
28.99	21.02	22.43	13.66	27.53	19.23	23.74	19.20	-	24.27
27.42	22.37	23.08	14.00	26.16	19.47	24.29	20.49	-	24.51
27.52	22.62	24.58	13.72	27.54	19.50	22.89	19.16	-	24.19
26.56	21.42	23.64	13.72	27.79	19.17	22.96	18.18	-	23.77
28.53	21.61	20.26	17.30	27.61	19.08	27.79	18.94	-	23.43
28.87	22.02	19.62	16.77	29.48	19.29	30.18	17.87	-	23.01
23.34	21.15	19.07	16.23	32.11	19.68	24.93	19.71	-	26.11
24.41	21.34	18.88	16.51	34.32	24.69	25.09	19.11	-	24.96
26.55	23.69	18.85	16.34	28.60	23.56	24.63	19.58	-	26.13
22.63	22.01	18.19	16.15	30.10	21.72	24.32	18.30	-	24.23
26.01	25.87	19.04	22.15	28.41	21.54	25.02	20.09	-	24.70
25.72	25.19	18.59	23.14	33.86	20.58	25.29	19.18	-	25.56

ตารางผนวกที่ ง1 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็ (ต่อ)

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
25.13	29.97	26.63	22.73	31.03	20.68	25.65	19.59	-	24.07
25.93	26.13	18.76	24.25	30.11	21.60	26.80	20.42	-	25.42
24.93	23.91	23.71	23.40	31.79	20.75	24.94	24.12	-	23.79
25.47	25.10	19.58	22.21	35.04	21.71	26.38	23.98	-	24.25
25.12	22.86	17.54	22.89	32.87	21.70	25.51	25.25	-	25.23
25.11	26.09	31.07	21.31	35.01	20.62	27.78	20.61	-	23.26
26.34	28.57	24.73	21.15	31.20	21.32	23.66	25.04	-	24.20
26.65	27.78	23.55	21.23	32.16	22.54	22.69	23.53	-	23.21
25.14	26.08	26.41	20.97	32.28	23.15	22.14	24.22	-	25.22
25.67	28.31	21.22	22.04	31.49	24.03	23.44	23.42	-	22.60
26.33	26.23	19.29	21.62	32.95	22.80	21.44	21.39	-	23.48
22.32	23.40	19.48	22.07	33.17	22.36	22.82	20.99	-	23.25
25.86	21.91	16.63	20.22	29.99	21.88	21.63	21.49	-	24.19
23.12	23.70	19.48	20.88	34.13	22.85	21.64	20.68	-	23.43
22.80	20.74	25.14	26.08	30.74	23.10	26.08	21.10	-	22.67
22.09	25.23	25.69	28.31	30.93	23.23	23.11	20.49	-	24.52

ตารางผนวกที่ ๖2 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
18.80	-	23.35	-	21.83	20.06	27.78	16.81	27.66	-
19.43	-	23.01	-	21.39	18.99	28.13	16.86	26.92	-
20.46	-	21.70	-	21.58	20.90	26.92	17.61	28.17	-
18.06	-	17.83	-	21.48	20.01	26.16	16.41	24.56	-
20.02	-	19.64	-	21.66	20.76	26.41	16.46	24.95	-
18.97	-	20.16	-	21.27	19.78	25.46	17.25	24.58	-
18.72	-	18.53	-	22.26	19.80	26.47	17.13	24.93	-
19.20	-	17.59	-	21.26	20.10	24.35	17.32	23.97	-
19.10	-	18.13	-	21.37	21.03	25.67	16.55	25.19	-
18.47	-	19.02	-	22.73	20.03	22.75	16.69	25.69	-
20.21	-	18.92	-	21.29	20.03	24.69	17.20	25.03	-
17.76	-	17.43	-	21.28	20.04	22.67	17.28	24.35	-
20.15	-	16.86	-	22.20	20.11	25.25	18.02	25.53	-
20.40	-	16.45	-	21.94	16.99	23.16	16.67	25.66	-
21.21	-	17.65	-	27.99	17.73	23.31	16.58	25.65	-
20.58	-	17.72	-	30.35	17.82	27.06	17.53	24.66	-
21.13	-	19.43	-	26.77	16.94	22.29	16.48	26.67	-
20.44	-	18.89	-	27.06	17.97	25.81	17.73	24.93	-
20.75	-	18.29	-	27.56	17.23	24.09	16.62	25.21	-
20.33	-	18.80	-	28.24	17.32	21.49	17.76	24.99	-
20.63	-	17.79	-	27.69	16.65	21.29	22.78	24.34	-
19.80	-	18.33	-	27.89	19.74	20.23	21.47	24.78	-
19.93	-	18.08	-	27.70	18.13	23.45	21.30	24.35	-
19.95	-	17.99	-	27.53	17.75	20.01	19.03	25.68	-

ตารางผนวกที่ ๖2 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน (ต่อ)

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
22.20	-	18.88	-	30.95	19.92	23.10	20.01	24.95	-
22.02	-	18.28	-	26.17	17.93	23.26	19.50	24.53	-
20.28	-	18.24	-	26.37	18.81	20.09	20.42	24.73	-
20.65	-	21.77	-	27.48	18.52	24.03	18.49	24.23	-
28.91	-	20.32	-	25.94	20.54	19.77	18.83	24.30	-
29.39	-	21.46	-	26.36	18.36	20.39	16.90	24.67	-
28.25	-	22.23	-	25.61	19.95	20.12	16.82	26.34	-
28.88	-	21.37	-	27.83	18.84	25.75	16.83	25.13	-
27.96	-	21.96	-	28.26	18.84	24.28	18.63	24.52	-
29.50	-	21.76	-	28.00	20.39	25.37	16.18	23.26	-
27.80	-	20.52	-	26.66	18.15	27.54	16.00	23.80	-
29.82	-	21.48	-	27.64	19.94	24.04	16.64	23.00	-
27.19	-	21.56	-	27.55	18.74	24.81	17.50	22.96	-
27.31	-	21.63	-	26.69	17.46	23.33	16.67	23.11	-
27.62	-	20.83	-	26.80	18.11	23.90	22.58	22.73	-
26.76	-	20.98	-	26.92	21.62	23.99	19.48	25.10	-
26.95	-	20.89	-	29.35	20.06	25.46	21.80	24.36	-
27.85	-	21.55	-	27.64	16.66	28.71	22.17	26.20	-
27.34	-	20.93	-	25.37	17.74	23.64	20.78	23.73	-
26.28	-	21.18	-	24.98	24.00	22.37	25.36	23.78	-
25.96	-	21.99	-	25.54	26.09	24.18	25.63	24.86	-
27.03	-	20.97	-	26.53	22.33	23.62	26.43	24.82	-
24.35	-	21.21	-	27.08	26.54	23.06	23.96	23.02	-
26.53	-	21.72	-	29.04	26.76	23.02	22.11	25.36	-

ตารางผนวกที่ ง2 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ DG ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน (ต่อ)

DG ชั้นที่ 1 (%)		DG ชั้นที่ 2 (%)		DG ชั้นที่ 3 (%)		DG ชั้นที่ 4 (%)		DG ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
25.09	-	21.36	-	24.14	30.04	22.12	21.60	23.36	-
24.41	-	24.36	-	30.68	20.96	23.12	20.71	23.68	-
24.10	-	21.85	-	29.89	21.36	21.80	21.83	24.35	-
25.72	-	21.27	-	29.56	20.79	22.46	21.52	20.40	-
22.66	-	22.34	-	29.75	20.70	21.94	21.54	24.82	-
24.79	-	18.76	-	29.33	22.50	22.09	20.47	22.30	-
23.94	-	19.31	-	29.11	20.37	21.87	21.54	25.52	-
24.39	-	19.01	-	32.37	22.17	21.70	21.21	22.48	-
25.73	-	17.31	-	26.75	19.55	22.30	20.37	22.81	-
23.08	-	18.02	-	27.32	21.12	24.58	21.00	22.14	-
25.30	-	17.87	-	28.59	20.09	24.92	21.28	22.65	-
23.61	-	23.86	-	28.42	25.46	23.61	21.40	24.07	-
26.22	-	17.88	-	28.28	23.18	23.59	21.41	23.44	-
25.21	-	25.21	-	28.36	23.78	23.29	20.86	21.51	-
29.52	-	29.52	-	30.21	23.09	24.34	20.29	20.20	-

ตารางผนวกที่ 3 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็

CA3 ชั้นที่ 1 (%)		CA3 ชั้นที่ 2 (%)		CA3 ชั้นที่ 3 (%)		CA3 ชั้นที่ 4 (%)		CA3 ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
26.72	18.44	27.14	18.79	39.19	17.40	27.08	19.12	20.55	-
26.37	18.66	23.44	18.31	33.15	16.99	30.43	19.15	20.07	-
27.21	20.68	23.46	18.64	41.89	17.24	27.50	18.66	20.76	-
28.87	21.71	22.93	18.32	34.41	17.41	26.87	19.64	20.00	-
28.19	20.07	22.47	20.00	36.32	17.14	28.95	19.05	19.75	-
28.02	20.47	22.54	17.19	38.39	16.14	25.99	19.10	20.48	-
26.79	21.64	17.76	17.12	34.97	16.16	26.23	19.20	20.03	-
26.31	20.19	16.55	16.91	31.12	16.24	30.32	19.10	19.76	-
26.12	23.00	19.27	17.06	30.19	15.76	26.36	19.79	19.18	-
27.76	21.57	17.44	16.82	34.07	16.18	27.73	18.16	19.49	-
26.25	22.44	16.45	17.11	28.02	15.72	25.37	18.20	19.40	-
26.02	23.35	18.87	17.00	31.73	16.08	29.04	17.92	20.11	-
28.98	22.37	17.33	19.50	28.70	16.56	30.78	18.21	18.26	-
22.10	21.79	17.30	20.31	29.07	16.17	25.78	17.56	18.12	-
23.36	23.97	18.33	19.45	31.28	16.20	26.10	17.93	18.49	-
21.45	22.86	17.72	19.64	32.83	16.06	26.23	17.41	18.22	-
23.35	23.59	22.78	19.59	30.10	15.99	26.60	17.89	17.99	-

ตารางผนวกที่ ๔ แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน

CA3 ชั้นที่ 1 (%)		CA3 ชั้นที่ 2 (%)		CA3 ชั้นที่ 3 (%)		CA3 ชั้นที่ 4 (%)		CA3 ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
-	-	-	21.15	24.62	22.14	21.78	15.37	18.06	-
-	-	-	22.95	26.10	22.44	22.47	15.16	17.93	-
-	-	-	22.39	25.81	21.84	22.06	14.93	18.44	-
-	-	-	20.68	26.46	22.42	22.17	13.04	17.63	-
-	-	-	21.65	23.72	22.61	22.76	14.58	17.93	-
-	-	-	19.68	24.24	23.56	23.00	13.93	17.95	-
-	-	-	20.09	24.75	22.77	22.57	13.23	17.48	-
-	-	-	20.79	23.11	22.49	22.82	12.91	18.73	-
-	-	-	22.73	23.70	23.05	23.55	13.48	17.52	-
-	-	-	22.56	23.40	22.58	23.53	15.79	16.41	-
-	-	-	24.25	30.13	22.19	23.31	14.56	16.86	-
-	-	-	23.27	30.35	18.39	24.04	15.75	17.51	-
-	-	-	22.33	25.53	19.27	22.68	15.60	17.26	-
-	-	-	24.75	25.71	18.72	28.17	13.15	17.04	-
-	-	-	23.80	26.74	18.80	24.40	18.68	17.16	-
-	-	-	23.50	24.85	18.39	25.22	18.20	17.63	-
-	-	-	22.95	25.28	18.82	23.67	18.38	17.04	-

ตารางผนวกที่ 5 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
20.17	24.45	20.25	14.12	23.21	18.12	24.38	19.50	20.16	-
19.51	22.94	18.46	13.44	26.31	18.70	23.64	19.12	18.83	-
21.18	25.01	18.31	13.58	24.45	18.13	25.37	20.03	18.56	-
19.33	24.37	18.07	13.58	26.34	18.40	25.00	19.55	16.87	-
19.57	24.66	17.71	13.83	25.30	17.74	22.75	19.73	20.75	-
21.55	25.68	19.19	13.15	25.59	18.13	24.64	19.48	19.82	-
21.31	22.23	18.23	13.54	24.39	18.50	23.70	19.65	19.49	-
20.56	22.85	18.39	13.78	24.10	17.77	25.28	19.52	17.66	-
21.24	21.33	19.65	14.17	26.79	17.89	23.68	19.69	21.02	-
18.83	21.33	16.54	14.23	26.15	18.08	24.87	20.35	19.57	-
19.50	21.15	21.43	13.22	25.09	19.35	23.84	20.37	21.16	-
19.00	21.51	19.77	13.40	25.10	17.25	24.14	20.75	19.01	-
17.75	21.28	22.11	13.04	24.66	16.77	24.26	20.95	19.01	-
18.91	21.32	20.96	13.27	23.85	18.54	28.42	20.38	17.15	-
21.46	21.34	21.33	12.96	23.94	22.14	28.40	20.94	19.70	-
23.02	21.64	23.81	12.60	23.48	20.74	29.44	20.20	20.11	-
24.02	21.41	20.47	12.76	24.32	21.36	27.96	20.63	20.19	-
23.33	21.15	23.53	12.76	22.85	21.33	27.10	20.36	18.43	-
22.90	20.50	20.88	12.64	24.24	20.13	26.68	20.74	17.83	-
22.70	21.92	24.49	12.57	21.92	21.46	28.65	20.27	19.64	-
22.72	22.80	21.16	12.52	21.58	21.32	25.02	20.49	19.75	-
24.24	22.42	21.63	12.02	26.10	21.30	25.26	20.24	19.52	-
23.96	22.09	21.45	13.11	26.08	22.21	24.46	20.18	20.02	-
21.37	22.37	22.83	12.47	25.99	21.92	24.66	19.86	16.93	-

ตารางผนวกที่ ๖5 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็ (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
23.21	21.30	25.35	12.49	24.88	22.76	25.66	19.30	16.93	-
22.62	21.64	22.25	12.62	25.22	21.64	26.45	19.72	16.94	-
21.27	22.81	24.15	11.90	25.56	22.33	24.96	19.43	17.13	-
23.28	22.41	26.09	11.54	24.48	22.79	26.47	21.37	16.80	-
25.64	20.52	22.09	12.73	24.47	22.41	25.35	19.82	17.28	-
26.68	25.04	22.25	12.11	23.31	20.99	24.46	19.47	16.78	-
29.13	24.71	22.33	11.21	26.39	22.65	26.39	19.97	16.79	-
26.09	23.90	22.69	11.51	27.54	21.71	24.56	20.62	17.17	-
24.84	25.34	22.50	11.41	25.60	21.11	25.06	20.46	16.74	-
24.42	23.98	21.16	11.10	23.29	22.11	23.87	19.36	16.84	-
25.07	24.51	21.05	11.80	27.66	15.47	22.38	18.91	16.76	-
25.80	24.89	20.94	11.46	23.61	15.85	23.53	19.77	16.99	-
23.87	24.44	21.69	12.18	27.38	15.62	23.72	18.56	18.78	-
23.76	24.71	19.68	12.52	24.11	15.52	25.16	18.94	18.74	-
23.35	24.22	20.07	11.59	24.61	15.25	24.98	18.67	18.51	-
24.11	24.99	21.01	11.38	36.19	15.98	23.79	17.90	18.09	-
23.22	24.34	21.01	11.27	29.48	15.91	23.81	17.26	18.71	-
23.56	20.98	21.20	11.17	32.00	16.26	22.83	17.57	18.08	-
23.40	22.01	20.65	11.75	31.73	16.17	24.58	17.96	19.78	-
22.86	22.99	18.45	12.01	30.31	15.57	22.06	16.89	19.82	-
23.63	21.50	18.50	12.44	32.46	15.93	23.88	18.13	20.13	-
23.40	21.49	19.23	12.29	31.19	15.97	23.96	17.86	20.01	-
22.47	22.63	18.28	11.92	30.47	15.68	24.81	18.17	19.51	-
23.45	22.70	19.31	12.33	29.84	15.71	25.85	17.02	20.19	-

ตารางผนวกที่ ๖5 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็ (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
23.36	21.35	18.76	12.10	27.29	21.27	24.22	18.51	19.24	-
30.46	22.37	18.19	12.05	29.52	24.55	24.32	17.71	19.56	-
30.15	22.25	20.01	12.15	32.74	23.76	24.30	17.11	19.73	-
24.99	28.35	18.91	12.23	35.73	20.39	23.48	17.91	18.96	-
25.68	31.42	18.75	12.45	30.48	22.73	24.50	17.40	20.03	-
26.26	31.09	19.74	12.01	31.66	23.25	26.72	18.26	25.57	-
26.47	30.57	18.24	12.03	33.11	22.81	25.98	19.40	25.74	-
25.66	27.18	18.31	12.07	31.04	26.29	26.57	21.15	28.47	-
28.48	25.74	22.32	11.91	31.97	28.07	24.77	17.69	30.44	-
25.18	26.91	21.99	17.38	33.08	28.24	24.62	19.73	28.62	-
24.15	25.61	22.62	17.13	31.99	27.72	24.92	20.14	27.32	-
23.70	27.57	23.09	17.20	35.08	26.92	25.81	20.00	23.43	-
24.16	25.38	22.62	16.99	32.77	27.10	27.37	18.10	23.17	-
24.93	26.59	17.23	16.96	30.75	26.44	24.31	18.06	23.63	-
23.62	24.32	17.12	17.12	28.25	27.74	26.24	18.35	24.54	-
24.70	24.35	20.56	18.33	28.62	26.03	25.85	17.55	23.31	-
24.98	24.11	18.37	17.04	28.26	27.42	24.29	19.07	23.76	-
24.83	22.79	17.38	17.09	30.67	23.57	24.29	23.28	23.57	-
25.20	27.87	17.86	18.75	30.47	23.27	24.24	27.32	23.44	-
27.64	26.37	19.87	17.27	30.65	23.21	22.00	26.98	25.31	-
24.72	25.85	17.25	16.74	31.41	23.41	24.39	27.51	24.75	-
25.16	28.75	17.44	17.55	30.79	23.68	22.81	27.54	23.71	-
24.10	26.51	22.27	17.60	30.32	23.12	23.93	28.71	25.13	-
25.43	27.02	23.09	16.95	29.50	22.76	22.16	28.20	24.14	-

ตารางผนวกที่ ๖5 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคแก็ (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2	โคแก็ ตัวที่ 1	โคแก็ ตัวที่ 2
25.15	24.77	19.97	18.30	34.77	23.97	26.05	28.02	23.92	-
24.75	27.97	21.31	18.19	30.66	23.40	23.20	28.45	23.86	-
29.96	28.32	20.52	18.01	31.39	22.54	22.77	24.18	23.97	-
27.97	27.36	19.36	17.96	30.57	22.54	23.73	25.31	25.15	-
26.68	28.44	19.89	17.99	28.16	23.27	22.47	26.12	25.06	-
28.22	26.35	21.19	17.99	28.50	23.99	24.02	25.16	23.50	-
24.08	31.85	23.83	18.29	28.97	23.82	24.46	24.29	24.07	-
24.10	28.70	22.83	18.13	28.59	24.47	23.76	24.09	25.45	-
23.79	27.85	23.73	17.81	31.85	23.08	23.96	25.30	24.36	-
23.94	35.25	27.15	17.82	27.79	23.65	22.99	25.87	24.10	-
23.76	28.15	25.84	17.58	28.74	24.14	21.94	25.13	23.46	-
23.23	28.15	26.59	17.54	30.82	23.36	25.31	24.38	25.78	-
22.74	24.48	26.30	17.80	33.86	23.55	23.38	24.26	24.36	-
21.97	25.48	24.93	17.53	28.32	22.84	26.90	25.84	23.82	-
23.27	24.75	24.91	18.46	29.74	25.62	23.14	25.98	25.86	-
22.97	25.86	25.10	18.06	29.89	26.76	22.96	26.51	25.35	-

ตารางผนวกที่ ๖ แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
19.53	-	-	29.67	19.89	32.06	23.37	17.66	19.09	-
20.52	-	-	30.79	22.26	30.51	20.85	18.84	18.86	-
20.66	-	-	30.93	20.22	32.13	22.81	18.81	19.76	-
19.95	-	-	30.04	21.29	29.05	22.41	16.70	19.78	-
19.62	-	-	30.51	19.83	35.27	22.01	16.67	22.65	-
20.21	-	-	30.75	18.42	35.93	22.52	16.34	20.78	-
19.63	-	-	31.54	20.51	30.59	20.84	16.70	21.14	-
21.72	-	-	30.67	19.83	30.92	18.66	15.75	18.97	-
19.73	-	-	31.09	19.97	30.48	18.93	16.82	23.02	-
19.68	-	-	32.85	19.86	37.10	18.35	17.25	18.84	-
20.96	-	-	28.95	19.30	27.59	18.78	17.25	22.78	-
19.51	-	-	29.87	19.37	28.40	18.84	16.75	19.56	-
19.46	-	-	23.45	19.62	26.81	20.44	16.22	18.44	-
19.20	-	-	26.69	18.46	27.92	19.69	16.21	18.35	-
20.31	-	-	28.55	18.11	28.04	20.86	17.35	26.59	-
25.23	-	-	27.48	16.88	28.67	19.65	16.79	24.89	-
22.57	-	-	26.25	16.85	27.85	18.72	16.45	26.64	-
22.32	-	-	29.13	15.77	28.38	21.35	14.86	24.52	-
22.33	-	-	25.52	17.15	27.53	19.97	15.07	25.96	-
22.49	-	-	28.73	15.99	27.20	19.72	15.80	26.43	-
24.28	-	-	25.94	17.33	28.76	20.03	15.06	23.52	-
23.87	-	-	25.10	17.20	31.47	19.47	15.04	26.99	-
21.37	-	-	24.74	15.64	31.33	18.00	16.15	26.97	-

ตารางผนวกที่ ง6 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
23.10	-	-	26.20	15.21	30.27	19.30	13.84	26.17	-
23.41	-	-	24.71	29.60	33.30	19.77	14.52	25.44	-
20.74	-	-	24.79	26.82	32.09	19.07	14.31	27.77	-
21.46	-	-	24.48	28.59	32.52	18.57	14.53	25.68	-
21.97	-	-	23.29	30.01	29.59	18.69	16.36	20.94	-
20.59	-	-	24.87	30.28	27.80	19.86	16.61	23.04	-
21.03	-	-	24.61	27.17	30.11	20.75	15.93	25.07	-
21.68	-	-	25.92	29.31	30.36	20.66	15.82	21.18	-
22.07	-	-	25.54	28.27	30.17	19.13	15.74	23.80	-
22.32	-	-	24.89	25.62	30.54	18.83	17.24	25.02	-
21.21	-	-	25.93	25.23	28.36	19.09	16.40	24.06	-
20.26	-	-	25.60	27.69	28.36	20.24	16.53	26.56	-
24.35	-	-	25.37	27.29	30.22	19.50	16.29	24.21	-
24.20	-	-	22.98	24.51	30.38	18.32	17.69	21.68	-
22.71	-	-	24.52	29.76	30.53	18.95	16.56	25.23	-
24.73	-	-	23.47	23.93	31.89	16.98	17.33	24.98	-
22.80	-	-	23.99	28.49	28.34	22.57	15.82	20.88	-
22.63	-	-	24.49	24.25	31.17	21.44	16.32	24.76	-
21.83	-	-	22.78	27.16	32.06	22.03	17.73	20.19	-
19.36	-	-	21.52	30.51	28.92	21.98	17.67	21.17	-
18.84	-	-	19.90	29.48	29.58	26.63	18.34	21.35	-
19.12	-	-	21.04	28.54	31.69	19.91	17.89	25.86	-
17.48	-	-	21.49	29.66	31.57	25.42	17.52	27.49	-
19.42	-	-	20.50	29.26	30.38	23.39	16.97	24.07	-

ตารางผนวกที่ ง6 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
18.54	-	-	21.12	25.57	31.82	23.57	17.87	26.15	-
17.32	-	-	20.64	28.43	31.28	22.19	17.18	24.75	-
18.91	-	-	22.33	27.93	38.96	23.27	16.72	24.81	-
17.60	-	-	21.60	29.49	38.84	19.17	18.32	22.49	-
19.07	-	-	21.12	27.02	34.80	22.08	18.17	25.41	-
17.84	-	-	21.98	26.52	37.49	25.73	17.20	22.55	-
18.70	-	-	18.23	29.55	34.84	19.33	17.57	22.66	-
18.56	-	-	19.99	30.75	34.78	18.29	15.77	24.09	-
24.29	-	-	19.95	25.89	36.55	25.25	18.07	23.25	-
22.93	-	-	18.64	27.16	33.77	22.72	17.93	18.79	-
24.98	-	-	19.94	25.88	35.41	20.78	18.53	22.00	-
19.47	-	-	17.42	31.56	37.99	20.47	18.57	20.11	-
21.69	-	-	19.30	30.94	36.94	20.13	17.85	20.89	-
20.50	-	-	20.60	31.06	35.57	22.05	18.11	20.08	-
22.81	-	-	19.40	31.47	37.23	22.94	17.65	20.92	-
24.92	-	-	23.46	30.00	36.39	22.07	18.07	23.44	-
21.99	-	-	23.13	31.90	36.98	21.77	18.30	20.68	-
21.25	-	-	25.45	29.42	36.49	20.68	18.69	26.30	-
21.45	-	-	25.47	29.61	36.42	20.26	18.31	23.74	-
22.08	-	-	23.33	29.79	35.11	20.50	17.63	24.28	-
19.67	-	-	21.53	29.57	38.55	24.35	18.90	28.27	-
19.13	-	-	21.21	30.59	40.70	24.03	17.55	24.13	-
19.63	-	-	20.56	29.00	38.07	22.05	21.10	24.39	-
21.72	-	-	22.84	33.77	35.72	23.49	22.18	25.22	-

ตารางผนวกที่ ง6 แสดงข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเข้มสีจากปฏิกิริยา nNOS immunoreactivity ใน
สมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ชั้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของโคอ่อน (ต่อ)

CA1 ชั้นที่ 1 (%)		CA1 ชั้นที่ 2 (%)		CA1 ชั้นที่ 3 (%)		CA1 ชั้นที่ 4 (%)		CA1 ชั้นที่ 5 (%)	
โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2	โคอ่อน ตัวที่ 1	โคอ่อน ตัวที่ 2
	-	-							-
22.40	-	-	21.93	33.97	39.46	22.88	22.52	22.73	-
19.92	-	-	21.46	32.23	36.26	20.69	22.36	22.25	-
25.52	-	-	21.55	30.26	29.48	20.02	18.68	20.46	-
23.36	-	-	22.03	36.65	34.85	20.42	20.01	21.34	-
25.39	-	-	20.23	33.45	31.26	20.43	17.60	20.36	-
24.23	-	-	19.83	34.12	33.26	19.55	18.40	20.64	-
21.51	-	-	21.58	33.05	30.66	19.40	18.21	22.56	-
24.92	-	-	20.80	29.90	31.42	19.49	18.72	21.13	-
24.54	-	-	22.48	34.40	29.18	19.78	18.48	18.68	-
21.72	-	-	22.80	30.15	24.84	21.11	18.95	21.14	-
20.87	-	-	23.53	28.88	25.63	18.94	17.77	22.61	-
24.30	-	-	22.48	29.04	24.93	19.85	18.05	22.31	-
22.24	-	-	21.70	29.40	25.83	19.07	18.13	23.40	-
21.93	-	-	20.60	30.23	25.26	19.58	18.52	24.61	-
19.75	-	-	20.95	29.91	25.60	19.14	17.41	20.63	-
19.98	-	-	25.92	29.86	24.86	20.83	17.84	20.40	-
21.75	-	-	25.18	32.47	25.37	20.64	20.55	17.81	-

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

P-23

Comparative Study of Proliferation Pattern in the Endometrium between Pyometra and Normal Bitches During Dioestrus

Srisuwatanasagul S.¹, Srisuwatanasagul K.¹, and Pianchop S.¹

¹Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Introduction and Objectives: Pyometra was the most frequent endometrial disorder found in the bitches during dioestrus. Knowledge of proliferation pattern in the bitch uteri may lead to a better understanding on the pathogenesis of pyometra. Therefore, the aim of the present study was to investigate proliferation in the endometrium of pyometra and compared with normal bitches during dioestrus stage.

Material and Methods: Uterine samples were collected from pyometra and normal bitches during dioestrus. Immunohistochemistry was applied to evaluate proliferation by using monoclonal antibody to proliferative marker Ki-67 (clone MM1, Novocastra Laboratories Ltd., New Castle, UK).

Results: During dioestrus, Ki-67 positive cell was almost absent in all compartments of the normal uterus. When compared between normal and pyometra bitches, the differences could be observed that higher number of positive Ki-67 cells was found in the stroma of pyometra cases. Moreover, there were some positive Ki-67 cells found in the cystic endometrial glands of pyometra cases while almost no positive Ki-67 immunolabelling cells was observed in the endometrial glands of normal bitch at dioestrus.

Conclusions: The present study demonstrated that proliferation was low or absent in the endometrium of normal bitch during dioestrus. Therefore, the higher proliferation in the stroma of pyometra

cases might involve in the pathogenesis of this uterine disorder during dioestrus or it indicated that the normal pattern of proliferation during dioestrus was lost in pyometra cases. Moreover, higher leukocyte proliferation may be the result of uterine response for bacterial infection in pyometra cases.

P-24

Quantitative Comparison of Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Hippocampus between Young and Old Cattle

Jitpakdeebordin S.¹, Prapong S.², Pongjunyakul S.³, and Prapong T.³

¹ Graduate program in Veterinary Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, ² Departments of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, ³ Departments of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Introduction and objectives: Nitric oxide (NO) is a gas and a free radical which is now recognized to be involved in a wide range of physiological and pathological events. It is synthesized as needed by Nitric oxide synthase (NOS) enzymes. The aim of this study was comparing the quantity of neuronal isoform of NOS (nNOS) enzyme in the bovine hippocampus sections between young and old cattle by using immunohistochemical staining.

Materials and Methods: Sections of hippocampus from young (less than 1 year) and old cattle (more than 10 years) were stained immunohistochemically, took pictures and analyzed the images by using 'Olympus Image Tool 4.5'

Results: The results of this study are following:

- 1) There were brown pigments from immunohistochemical reaction in cytoplasm of pyramidal neurons located in all area (Dentate Gyrus (DG), CA1 and CA3) of both young and old cattle's hippocampus sections.
- 2) Comparing between young and old cattle, immunoreactivity of nNOS in CA1 was higher than old cattle. However, the DG and CA3 of Old cattle had higher immunoreactivity than the young cattle.
- 3) In the young cattle; CA1 > DG > CA3 of immunoreactivity. But in the old cattle; DG > CA3 > CA1 of immunoreactivity.
- 4) Comparing number of neurons between young and old cattle; the old cattle had higher number of neurons in all area. Whereas in the same age, the number of neurons in CA1 > DG > CA3

Conclusions: From the result, it might imply that the quantity of nNOS in neurons was varying in each area of hippocampus. It might assume that each area of the bovine hippocampus has different level of nNOS and reflected to the different role of neuronal functions in different area of hippocampus.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	น.ส.สุภาวดี จิตภักดีดินทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 ธันวาคม พ.ศ.2522
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ.ขอนแก่น
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับประถมศึกษาและระดับมัธยมศึกษา ตอนต้นจากโรงเรียนลาซาลโชติรวินครสวรรค์ จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียน นครสวรรค์ จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะเทคนิคการสัตว แพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เกรดเฉลี่ย 2.83
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลดีเด่นการเสนอผลงานประเภทโปสเตอร์จากงาน ประชุมวิชาการสมาคมสัตววิทยา (ประเทศไทย) ครั้งที่ 33 ประจำปี พ.ศ.2547
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี งบประมาณ 2547