การสร้างเครื่องฝานเนื้อสมองและการศึกษาสรีรวิทยาทางไฟฟ้าของแผ่นฝานสมองน้อยของหนูแรท

นาย นิวัติ เทพาวราพฤกษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-576-175-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016407
I10306006

THE CONSTRUCTION OF OSCILLOTOME AND ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF RAT CEREBELLAR SLICES.

Mr. Niwat Taepavarapruk

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-576-175-3

Thesis Title The Construction of Oscillotome and Electrophysiological Study of Rat Cerebellar Slices.

By Mr. Niwat Taepavarapruk

Inter-Department Physiology

Thesis Advisor Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for Master's degree.

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Prapa Loypetjra ..... Chairman

(Associate Professor Prapa Loypetjra, DVM.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

Narongsak Chaiyabutr ..... Member

(Associate Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.)

Choogiart Sucanthapree ..... Member

(Assistant Professor Choogiart Sucanthapree, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างเครื่องฝานเนื้อสมองและการศึกษาสรีรวิทยาทางไฟฟ้าของแผ่นฝานสมองน้อยของหนูแรท

ชื่อนิสิต นาย นิวัติ เทพาวราพฤกษ์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิช ทองโรจน์

ภาควิชา สหสาขาสรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2532

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการศึกษาระบบประสาทภายนอกร่างกาย ในลักษณะแผ่นฝานเนื้อเยื่อ (100-500 ไมครอน) กำลังเป็นที่นิยมสำหรับนักประสาทชีววิทยา เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาทางสรีรวิทยา และเภสัชวิทยาของระบบประสาท การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาปฏิบัติการศึกษาแผ่นฝานของสมองน้อย โดยใช้วัสดุและอุปกรณ์ที่สามารถหาได้ตามท้องตลาด และอะไหล่อุปกรณ์ที่ใช้แล้ว องค์ประกอบพื้นฐานในการศึกษาจำแนกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนแรกคือการสร้างเครื่องฝานเนื้อสมองระบบอัตโนมัติชื่อ "ออสซิลโลโตม" ซึ่งเครื่องนี้จะทำการฝานแผ่นสมองในแนวราบ ภายใต้น้ำไขสันหลังเทียม (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) ซึ่งเป็นน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขั้นตอนที่สองคือการสร้างภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบถ่ายเทน้ำเลี้ยง โดยที่ให้แผ่นฝานจมอยู่ภายใต้น้ำเลี้ยงที่กำลังไหลถ่ายเท และขั้นตอนที่สามคือการออกแบบระบบถ่ายเท ACSF การถ่ายเทน้ำเลี้ยงที่เร็วมีความสำคัญสำหรับการศึกษาทางเภสัชวิทยา ในกรณีที่ต้องการกำหนดปริมาณยาที่ให้ต่อเนื้อเยื่อ

การทดสอบองค์ประกอบทั้งสาม โดยการฝานสมองน้อยของหนูแรท ที่ความหนา 300 ไมครอน พบว่าแผ่นฝานที่ฝานด้วยเครื่องฝานจะมีลักษณะบางและสม่ำเสมอกว่าการฝานด้วยมือ ผลการศึกษาการทำงานของเซลล์ประสาทในแผ่นฝาน โดยการวัดสัญญาณไฟฟ้าภายนอกเซลล์พบการทำงานของเซลล์ประสาทหลายลักษณะ ซึ่งภายใต้ ACSF ที่เหมาะสม (36-37 องศาเซลเซียส) เซลล์สามารถมีชีวิตยาวนาน 6 ถึง 10 ชั่วโมง และพบว่าการทำงานของเซลล์ประสาทส่วนใหญ่สามารถถูกยับยั้ง เมื่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส แต่จะมีการทำงานเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับกลูตาเมต

Thesis Title The Construction of Oscillotome and Electrophysiological Study of Rat Cerebellar Slices.

Name Mr. Niwat Taepavarapruk

Thesis Advisor Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.

Inter Department Physiology

Academic Year 1989

ABSTRACT

Recently, an in vitro study of the mammalian CNS using thin (100-500 um) sectioned tissue, so-called brain slice preparation, has become popular among neurobiologists as a useful tool for neurophysiology and neuropharmacology. This study, therefore, aims to develop cerebellar slice preparation by utilizing materials available locally, some from discarded instruments. The development consists mainly of three basic elements.

First, an automatic tissue sectioner, so-called Oscillotome, had been constructed. The machine produces thin brain slices by cutting in the horizontal plane under 2°C ACSF (artificial cerebrospinal fluid). In addition, the hand-slicing technique was also developed for comparative study to the machine method. Second, an superfusion tissue chamber had been constructed. The bath keeps the slices fully submerged in the perfused media. Third, a superfusion system had been

designed. Rapid changing of the medium would facilitate pharmacological study when rapid termination of the action of the drug under study was required.

Validation of these elements had been performed by producing 300 um rat cerebellar slices. The slices obtained by this method showed the better morphology than those obtained by hand-slicing method. Extracellular recording of neuronal activity obtained various patterns of discharge. Under the suitable condition of ACSF (36^{o}-37^{o}C) cells could be maintained over a period of 6 and 10 hours. Most activities were depressed during exposure to cold ACSF (20^{o}C) but increased by glutamate.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อ วิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชีวิต เทพาวราพฤกษ์ : การสร้างเครื่องฝานเนื้อสมองและการศึกษาสรีรวิทยาทางไฟฟ้าของแผ่นฝานสมองน้อยของหนูแรท (THE CONSTRUCTION OF OSCILLOTOME AND ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF RAT CEREBELLAR SLICES) **อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ภาวิช ทองโรจน์**, 113 หน้า. ISBN 974-576-175-3

ปัจจุบันการศึกษาระบบประสาทภายนอกร่างกาย ในลักษณะแผ่นฝานเนื้อเยื่อ (100-500 ไมครอน) กำลังเป็นที่นิยมสำหรับนักประสาทชีววิทยา เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาทางสรีรวิทยา และเภสัชวิทยาของระบบประสาท การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาปฏิบัติการศึกษาแผ่นฝานของสมองน้อย โดยใช้วัสดุและอุปกรณ์ที่สามารถหาได้ตามท้องตลาด และอะไหล่อุปกรณ์ที่ใช้แล้ว องค์ประกอบพื้นฐานในการศึกษาจำแนกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนแรกคือการสร้างเครื่องฝานเนื้อสมองระบบอัตโนมัติชื่อ "ออสซิลโลโตม" ซึ่งเครื่องนี้จะทำการฝานแผ่นสมองในแนวราบ ภายใต้น้ำไขสันหลังเทียม (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) ซึ่งเป็นน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขั้นตอนที่สองคือการสร้างภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบถ่ายเทน้ำเลี้ยง โดยที่ให้แผ่นฝานจมอยู่ภายใต้น้ำเลี้ยงที่กำลังไหลถ่ายเท และขั้นตอนที่สามคือการออกแบบระบบถ่ายเทน้ำเลี้ยง การถ่ายเทน้ำเลี้ยงที่เร็วมีความสำคัญสำหรับ การศึกษาทางเภสัชวิทยา ในกรณีที่ต้องการกำหนดปริมาณยาที่ให้ต่อเนื้อเยื่อ

การทดสอบองค์ประกอบทั้งสาม โดยการฝานสมองน้อยของหนูแรทที่ความหนา 300 ไมครอน พบว่าแผ่นฝานที่ฝานด้วยเครื่องฝานจะมีลักษณะบางและสม่ำเสมอกว่าการฝานด้วยมือ ผลการศึกษาการทำงานของเซลล์ประสาทในแผ่นฝาน โดยการวัดสัญญาณไฟฟ้าภายนอกเซลล์ พบการทำงานของเซลล์ประสาทหลายลักษณะ ซึ่งภายใต้ ACSF ที่เหมาะสม (36-37 องศาเซลเซียส) เซลล์สามารถมีชีวิตยาวนาน 6 ถึง 10 ชั่วโมง และพบว่าการทำงานของเซลล์ประสาทส่วนใหญ่สามารถถูกยับยั้ง เมื่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส แต่จะมีการทำงานเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับกลูตาเมต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

NIWAT TAEPAVARAPRUK : THE CONSTRUCTION OF OSCILLOTOME AND ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF RAT CEREBELLAR SLICES. THESIS ADVISOR : ASS. PROF. PAVICH TONGROACH, Ph.D. 113 pp. ISBN 974-576-175-3

Recently, an in vitro study of the mammalian CNS using thin (100-500 um) sectioned tissue, so-called brain slice preparation, has become popular among neurobiologists as a useful tool for neurophysiology and neuropharmacology. This study, therefore, aims to develop cerebellar slice preparation by utilizing materials available locally, some from discarded instruments. The development consists mainly of three basic elements.

First, an automatic tissue sectioner, so-called Oscillotome, had been constructed. The machine produces thin brain slices by cutting in the horizontal plane under 2°C ACSF (artificial cerebrospinal fluid). In addition, the hand-slicing technique was also developed for comparative study to the machine method. Second, an superfusion tissue chamber had been constructed. The bath keeps the slices fully submerged in the perfused media. Third, a superfusion system had been designed. Rapid changing of the medium would facilitate pharmacological study when rapid termination of the action of the drug under study was required.

Validation of these elements had been performed by producing 300 um rat cerebellar slices. The slices obtained by this method showed the better morphology than those obtained by hand-slicing method. Extracellular recording of neuronal activity obtained various patterns of discharge. Under the suitable condition of ACSF (36°-37° C) cells could be maintained over a period of 6 and 10 hours. Most activities were depressed during exposure to cold ACSF (20° C) but increased by glutamate.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGMENTS

The theme of this study was initiated by Dr. Pavich Tongroach to whom I would like to express my deepest sincere gratitude and appreciation for his excellent supervision, guidance and encouragement throughout this study, and kindly editing this thesis.

I am indebted to Assistant Professor Pongsak Kunluan for his kindness in providing laboratory facilities during this study. My appreciation is also expressed to Mr. Viboon Leenhapattanalert and Mr. Kittipong Kumdee, the technical staff of the Department of Physiology, for their helpful technical guidance.

Actually, this thesis may be hardly finished unless I obtained the valuable tuition of brain slice technique from Dr. Paiboon Buranarugsa and Dr. John Sibbald during the First Intensive Workshop on Basic Neuroscience that had been held at Chulalongkorn University since 1988.

This developmental preparation has been made possible by financial support from the Somdej Phramahittalhathibeth Research Fund (of ten thousand bath). To her my gratitude goes.

Finally, I would also like to extend my deepest gratitude to my parents for their constant support and encouragement during the course of this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	IV
ENGLISH ABSTRACT	V
ACKNOWLEDGMENTS	VII
TABLE OF CONTENTS	IX
LIST OF TABLES	XII
LIST OF FIGURES	XV
ABBREVIATION	XVI

CHAPTER

1. INTRODUCTION	1
1. General Introduction	1
2. Cerebellar Cortex; An Overview	3
3. Electrical Activity of the Cortical Neurons	5
4. Reviews of Cutting Procedures	7
5. Slice Thickness	12
6. Slice Bath	13
7. Bathing Medium	16
8. The Present Study : Rationale	20

CHAPTER Page

2. MATERIAL AND METHODS..... 21
1. Developmental of Experimental Set Up for Brain Slice Preparation..... 22
1.1 Oscillotome..... 22
1.2 Hand-Slicing Apparatus..... 27
1.3 Tissue Bath..... 29
1.4 Perfusion System..... 31
2. Methods for Preparing of Cerebellar Slice..... 33
2.1 Experimental Animal..... 33
2.2 Bathing Medium..... 33
2.3 Killing and Brain Extracting Techniques..... 34
2.4 Slicing Procedures..... 34
2.5 Incubation Technique..... 36
3. Electrophysiological Studies..... 37
3.1 Microelectrode Techniques..... 37
3.2 Recording Technique..... 38
3.3 Processing of Spike Data..... 39
4. Application in Physiology and Pharmacology..... 41
4.1 Technique of Lowering Temperature 41
4.2 Drug Application..... 43

CHAPTER Page

3. RESULTS..... 45

1. General Observation..... 45

2. Spontaneous Activity of the Cortical Neurons..... 48

3. Effects of Temperature..... 55

4. Effects of Glutamate..... 57

4. DISCUSSION..... 64

REFERENCES..... 71

APPENDIX A..... 87

APPENDIX B..... 93

VITA..... 95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Schematic picture of a segment of a cerebellar folium.....	4
2.	Background continuous discharge of a Purkinje cell extracellulary recorded from an anesthetized rat.....	5
3.	Perspective diagram of the Oscillotome...	23
4.	Cross-sectioned diagram of the oscillator box.....	24
5.	Cross-Sectioned diagram of interior components of the section bath of the Oscillotome.....	25
6.	Photograph showing the whole equipments used in hand-slicing technique.....	28
7.	Diagrammatic picture of the perfusion chamber.....	30
8.	Diagrammatic picture of the simple perfusion system (gravity-feed).....	32
9.	Wiring diagram showing a standard electrophysiological set-up.....	40
10.	Diagrammatic picture illustrating method of changing medium temperature.....	42
11.	Wiring diagrammatic picture of the micro-iontophoretic arrangement.....	44

Figure Page

12. Photograph of a 300 um cerebellar vermis slice prepared with using the Oscillotome and magnified part of cerebellar folium.. 47

13. Action potentials recorded extracellulary from a spontaneously active Purkinje cell 50

14. Spontaneous activity of inhibitory interneurons recorded at the granular layer..... 51

15. Bursty discharges of the neurons recorded in vicinity of the Purkinje cell layer... 52

16. Ratemeter records of the phasic discharge of two different bioelectric activities.. 53

17. Background noise recorded in granular layer..... 54

18. Ratemeter records of the Purkinje neuron responding to the cold ACSF (10^{o}C)... 56

19. Ratemeter records showing the biphasic responses of the Purkinje cell to bath application of glutamate..... 59

20. Ratemeter records showing effects of glutamate applied iontophoretically to the vicinity of a Purkinje cell..... 60

Figure Page

21. Ratemeter records of non-Purkinje cells showing no response to the glutamate when applied by perfusion technique or by microiontophoresis..... 62

22. Oscillograph records showing effect of glutamate induced inhibition of neuronal firing..... 63

23. Circuit diagram of the main DC power supply..... 88

24. DC regulated circuit provides a controllable voltage (Vout)..... 89

25. Control circuits of three relay switches. 90

26. Control circuit of the oscillating motor Mo..... 91

27. Control circuit of the driving motor M1.. 91

28. Control circuit of the micrometer driving motor M2..... 92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Advantages and disadvantages of three types of tissue bath used in brain slice preparation.....	15
2.	List of ionic compositions (in mM) in mammal CSF.....	18
3.	Variety of ACSF used in cerebellar slice preparation.....	19
4.	General observation of cerebellar slices obtained by Oscillotome technique and Hand-Slicing technique.....	46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

ACSF	=	artificial cerebrospinal fluid
approx.	=	approximate
Ca	=	calcium
Ca^{2+}	=	calcium ion
$CaCl_2.2H_2O$	=	calcium chloride dihydrate
Cm	=	centimeter
Cm^3	=	cubic centimeter
CNS	=	central nervous system
CO_2	=	carbondioxide
DC	=	direct current
dia.	=	diameter
Fig.	=	figure
g	=	gram
Glu	=	glucose
KCl	=	potassium chloride
KH_2PO_4	=	potassium dihydrogen phosphate
l	=	liter
M	=	molar
mg	=	milligram
$MgSO_4.7H_2O$	=	magnesium sulfate heptahydrate
min	=	minute
ml	=	milliliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mM	=	millimolar
mth	=	month
mV	=	millivolt
nA	=	nanoampere
NaCl	=	sodium chloride
$NaHCO_3$	=	sodium hydrogen carbonate
no.	=	number
O_2	=	oxygen
PO_2	=	oxygen pressure
rev/sec	=	revolution per second
sec	=	second
um	=	micrometer (micron)
wk	=	week
%	=	percent
/sec	=	per second
^oC	=	degree celsius

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย