บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาโดยทั่วไป

จากการย้อม calbindin - D28K (CaLB) และ parvalbumin (PV) ในบริเวณต่าง ๆ ของสมองกระแต (Tupaia glis) พบว่ามีการกระจายของ immunoreactive neurons (IRN) และ immunoreactive fibers (IRF) โดยทั่วไปเกือบทุกบริเวณของสมอง โดยมีความแตกต่างกันในด้านปริมาณและความเข้ม ของ IRN และ IRF เมื่อย้อมด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกัน การศึกษาในครั้งนี้ ได้พยายามเปรียบเทียบปริมาณและความเข้มของ calbindin - D28K immunoreactive neuron (CaLB-IRN) และ calbindin-D28K immunoreactive fiber (CaLB-IRF) กับ parvalbumin immunoreactive neuron (PV-IRN) และ parvalbumin immunoreactive fiber (PV-IRF) ในตำแหน่งเดียวกัน

จากการทดลองในครั้งนี้ antibody ที่ใช้ศึกษานั้น เป็น monoclonal antibody ซึ่งจะมี sensitivity และ specificity ที่ค่อนข้างสูง ต่างจาก polyclonal antibody ซึ่งสกัดมาจากสัตว์ ที่ได้รับการ immunization โดยจะมี sensitivity และ specificity ที่ค่อนข้างต่ำกว่าและยังพบว่ามี cross-reaction ได้ง่ายกับ calcium binding protein (CaBP) และโปรตีนชนิดอื่นๆที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันเช่น calretinin และ calbindin - D9K เป็นต้น

พบว่าจากการศึกษาในระยะแรก ๆ นั้น มักจะใช้ polyclonal antibody ที่ทำการสกัดขึ้นเองเป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้ผลการศึกษามีความแตกต่างกันออกไปบ้าง กับการศึกษาในปัจจุบัน อีกทั้งวิธีการที่ใช้ทดลองเช่น น้ำยาดอง และสารเคมี ก็อาจมีส่วนให้ผลการศึกษาแตกต่างกันออกไปได้เช่นกันแต่อย่างไรก็ตาม Celio (1990) ซึ่งได้ศึกษารายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับ CaLB และ PV ในสมองหนู พบว่าความแตกต่างของน้ำยาดองไม่มีผลต่อ immunoreaction มากนัก รวมถึงพวก embedding material ด้วยเช่น epon หรือ aradite ก็ไม่สามารถที่จะทำลาย antigenicity ได้ หรือแม้กระทั่งพวก strong fixative ต่าง ๆ เช่น 2.5% glutaraldehyde ถ้าได้รับการเติม calcium chloride ลงไปเพียงพอก็สามารถที่จะนำมาใช้ในการทดลองได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ น้ำยาดองที่ใช้ ได้แก่ 10% formalin

พบว่าให้ผลการทดลองที่เด่นชัด และทำให้ชิ้นสมอง มีความแข็งพอเหมาะ ในการตัดด้วยเครื่อง vibratome แต่ก็ยังพบว่ามีปัญหาอยู่บ้าง ในขั้นตอนการสวนน้ำยาเข้าทางหัวใจไม่ดีพอ จึงทำให้เซลล์เม็ดเลือดยังตกค้างบ้างในบางบริเวณและรบกวนปฏิกิริยาได้ ทำให้เกิดมี artifact เกิดขึ้น ซึ่งแก้ไขโดยทำการทดลองในสัตว์ตัวใหม่

จากการศึกษาพบมีการกระจายของ IRN และ IRF โดยทั่วไปในบริเวณต่าง ๆ ของสมองจากการย้อมทั้งสองวิธี โดยในบางบริเวณก็พบว่าเห็นความแตกต่างอย่างเด่นชัด บางบริเวณพบว่าไม่มีความแตกต่าง ส่วนบางบริเวณก็พบว่ามีความแตกต่าง แต่ไม่มากนัก บริเวณซึ่งพบมีความแตกต่างอย่างเด่นชัดเช่น reticular formation, inferior olivary nucleus, deep cerebellar nuclei, oculomotor nucleus, substantia nigra, mammillary body, facial nucleus, cochelar nucleus และ vestibular nucleus เป็นต้นส่วนบริเวณซึ่งไม่พบมีความแตกต่างมากนัก หรือแตกต่างเพียงเล็กน้อย เช่น olfactory bulb, olfactory nucleus, cerebral cortex, hippocampal formation , corpus striatum, claustrum, cerebellum, amygdaloid nucleus,lateral geniculate nucleus, central gray และ hypoglossal nucleus เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่า immunoreactive reaction ที่เกิดขึ้น จะมีตำแหน่งอยู่ใน perikarya,dendrites และ axons ส่วนใน nucleolus นั้นไม่พบมี immunoreactive และในสมอง ซึ่งต่างบริเวณกัน จะมี immunoreactive ต่อส่วนต่าง ๆ ของเซลล์แตกต่างกันออกไป รวมถึงความเข้มของ reaction ก็พบว่ามีความเข้มที่ไม่เท่ากันด้วย ซึ่งความเข้มที่แตกต่างกันนี้ คาดว่าจะขึ้นกับปริมาณ calcium binding protein นั่นเอง (Celio, 1990)

ส่วนใน ependymal cells และ gial cells พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วจะไม่ให้ผลบวกต่อการย้อม ทั้ง CaLB และ PV ยกเว้น ependymal cells ในบางบริเวณเช่น บริเวณที่คาดอยู่รอบๆ third ventricle เท่านั้นซึ่งให้ผลบวกเฉพาะต่อการย้อม CaLB

Cerebral cortex

ในบริเวณ cerebral cortex จะกล่าวถึงเฉพาะ neocortex เท่านั้น จากการทดลองพบว่ามี CaLB-IRN และ PV-IRN มีการกระจายอย่างกว้างขวางทุกบริเวณ โดยในการย้อมทั้งสองวิธีนี้พบมี IRN ในปริมาณปานกลาง ส่วน IRF ก็พบกระจายอยู่ทั่วไปในทุกชั้น และเหมือนกันทั้งสองวิธี

บริเวณ cerebral cortex นี้ พบทุกบริเวณให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงจะ

กล่าวโดยรวม ๆ โดยพบว่าใน cortex นี้ จะประกอบไปด้วยชั้นต่าง ๆ ถึง 6 ชั้น จากผลการทดลองพบว่าในทุกชั้นให้ผลบวกต่อการย้อมทั้งสองวิธี ทั้ง IRN และ IRF แต่ยกเว้นในชั้นที่ 1 (molecular layer) เท่านั้น ซึ่งไม่พบเซลล์ให้ผลบวกเลย นอกจากนี้เซลล์ซึ่งให้ผลบวกในชั้นต่างๆนั้น ดูจากรูปร่างลักษณะแล้วน่าจะเป็นพวก pyramidal cells เพราะมีรูปร่างสามเหลี่ยมกระจายอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังพบพวก fusiform cells โดยมักพบให้ผลบวกในชั้นลึกของ cerebral cortex ผลการทดลอง สอดคล้องกับการทดลองของ Celio (1990) ซึ่งทำการย้อมทั้งสองวิธี แต่อย่างไรก็ตาม PV-IRN นอกจากจะเป็น pyramidal cells แล้ว ยังพบว่าพวก non-pyramidal cells ก็ให้ผลบวกด้วยเช่นกัน และพบได้อย่างหนาแน่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในชั้นที่ 2-4 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Celio และ Heizmann (1981) และการทดลองของ DeFelipe และคณะ (1989)

PV-IRN ใน cerebral cortex นี้ โดยส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์เดียวกันกับ GABAergic neuron (Celio and Heizmann,1981) พบว่า GABAergic neurons บางเซลล์ก็ไม่เป็นเซลล์เดียวกันกับ PV-IRN (Heizmann,1984) จากการทดลองพบว่า CaLB-IRN ให้ผลบวกค่อนข้างหนาแน่นในชั้นที่ 2-4 เช่นเดียวกัน และสอดคล้องกับการทดลองของ Feldman และ Christakos (1983) ด้วย ส่วน Garcia-Segura และคณะ (1984) ได้สรุปว่าปริมาณของ CaLB-IRN มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ให้ผลบวก ซึ่งจากการทดลองคาดว่าอาจจะมีความเป็นไปได้ เนื่องจากพบ CaLB-IRN ในปริมาณปานกลางเท่านั้น อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า IRN จากการย้อมทั้งสองวิธี จะให้ผลบวกในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่มีบางรายงาน (Kobayashi et al., 1990)แสดงให้เห็นว่า CaLB-IRN และ PV-IRN ไม่ coexist กันในบริเวณนี้ และยังพบว่าคนไข้ที่เป็น Down's syndrome มีปริมาณ CaLB-IRN และ PV-IRN ลดลงใน cerebral cortex ด้วย

Limbic system

ระบบของ limbic system ประกอบด้วยสมองบริเวณต่าง ๆ ดังนี้คือ hippocampal formation ซึ่งประกอบไปด้วย hippocampus , dentate gyrus และ subiculum , parahippocampal gyrus , cingulate gyrus , retrosplenial cortex, septal area และ basolateral amygdaloid nucleus ซึ่งทั้งหมดนี้ อยู่ใน telencephalon (มีชัย ศรีใส, 2530) และยังประกอบไปด้วย mammillary body, anterior thalamic nucleus และ habenular nucleus โดยจากการย้อม CaLB และ PV ในบริเวณต่าง ๆ เหล่านี้ ไม่สามารถครอบคลุมได้ในทุกนิวเคลียส เนื่องจากไม่สามารถ

ที่จะหาตำแหน่งที่แน่นอนได้ แต่อย่างไรก็ตามในบริเวณต่าง ๆ ที่สำคัญก็ได้ทำการศึกษาไว้ดังจะกล่าวรายละเอียดต่อไป

จากการทดลองในบริเวณ hippocampus นั้นพบ CaLB -IRN ปริมาณที่เล็กน้อยจนถึงปานกลางในชั้นของ polymorphic cell layer และพบ PV-IRN กระจายโดยทั่วไปในทุกชั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในชั้นของ polymorphic cell layer มีค่อนข้างหนาแน่นกว่าชั้นอื่นๆ เป็นที่น่าสังเกตว่า pyramidal cells ไม่ให้ผลบวกเลย ส่วน CaLB-IRF พบมีปริมาณมากในชั้นของ polymorphic cell layer เช่นเดียวกันแต่จะพบว่า PV-IRF มีการกระจายอยู่โดยทั่วไปในทุกชั้น โดยในชั้นของ polymorphic cell layer นั้นให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี ในการทดลองของ Rodriguez-moldes และคณะ (1990) พบว่า CaLB-IRN จะเป็นพวก non -pyramidal cell ซึ่งได้ผลตรงกับการทดลองในครั้งนี้เช่นกันและ Sloviter (1991) ยังได้ทำการทดลองและพบว่า non-pyramidal cell ใน hippocampus ยังเป็นเซลล์เดียวกันกับ GABAergic neurons ด้วยโดย GABAergic neurons เหล่านี้จะส่ง fibers ไปยังบริเวณ medial septum นอกจากนี้การทดลองของ Celio และ Heizmann (1981) ที่ได้ทำการย้อม PV ในบริเวณนี้พบว่า PV-IRN มักจะอยู่ในชั้นของ pyramidal cell layer เท่านั้นซึ่งจะเห็นว่าขัดแย้งกับการทดลองในครั้งนี้ ที่พบ PV-IRN ในทุกชั้น และในชั้นของ polymorphic cell layer จะเป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นมากที่สุด จึงสรุปได้ว่า pyramidal cells ในบริเวณ hippocampus นี้ ไม่พบให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีนี้เลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ

ในบริเวณ subicular complex พบว่าโดยส่วนใหญ่ให้ผลบวกซึ่งใกล้เคียงกันทั้งสองวิธี โดย IRN มักจะอยู่ในชั้นของ polymorphic cell layer และ pyramidal cell layer ส่วนปริมาณของ IRF ในทุกชั้นพบได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

ในบริเวณของ dentate gyrus โดยส่วนใหญ่ พบว่าเซลล์ซึ่งให้ผลบวกจะอยู่ในชั้น polymorphic cell layer เท่านั้น จากการย้อมทั้งสองวิธี โดยจะมี CaLB-IRN ในปริมาณที่ค่อนข้างหนาแน่น ส่วน PV-IRN พบเพียงเล็กน้อยเท่านั้นในชั้นนี้ และ IRF จากการย้อมทั้งสองวิธี พบได้ในปริมาณที่หนาแน่น การทดลองนี้ ให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลองของ Celio และ Heizmann (1981) ซึ่งพบว่ามี CaLB-IRN ใน dentate gyrus อย่างหนาแน่น และพบว่าเซลล์ซึ่งให้ผลบวกทั้งลักษณะและรูปร่างจะค่อนข้างเหมือนกัน ๆ จัดเป็นพวก granule cells ซึ่งตรงกับข้อสรุปของ Sloviter (1989) ซึ่งทำการทดลองในหนู อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองที่ได้นี้ คาดว่าเซลล์ซึ่งให้ผลบวก นอกจากจะเป็น granule cells แล้ว ยังพบมี pyramidal cells บางเซลล์ให้ผลบวกด้วย เนื่องจาก IRN บางเซลล์มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมปะปนอยู่ด้วย ซึ่งก็คือ pyramidal cells นั่นเอง และจากการทดลองของ Sloviter ยังพบว่า

PV-IRN มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ซึ่งตรงกับผลการทดลองนี้เช่นกัน และเขาสรุปว่าเซลล์ชนิดนี้ คือ basket cells ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะการย้อม PV เท่านั้น

นอกจากบริเวณซึ่งกล่าวมาแล้ว ใน limbic system ยังประกอบด้วย septal area รวมถึง fornix และ fimbria ทั้งหมดนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของ " Papez loop " (มีชัย ศรีใส, 2530) จากการทดลองศึกษาในบริเวณต่าง ๆ ของ septal area , medial septal , septofimbrial และ septohypothalamic nucleus พบว่า CaLB-IRN มีปริมาณปานกลาง PV-IRN ไม่ให้ผลบวกเลยในบริเวณต่าง ๆ ของ septal nucleus ส่วนบริเวณ triangular septal nucleus ไม่ให้ผลบวกเลยจากการย้อมทั้งสองวิธีแต่บริเวณ fornix พบ PV-IRN และ CaLB-INR อย่างเด่นชัดโดย PV-IRN พบได้ในปริมาณที่หนาแน่นมากกว่า อย่างไรก็ตามกล่าวโดยสรุปแล้วพบว่าในบริเวณ septal area ส่วนใหญ่จะให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ส่วน PV มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Garcia-Segura (1983) ซึ่งได้ทำการศึกษาในบริเวณเดียวกัน จะให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB และจากการทดลองของ Alonso และคณะ (1990) ศึกษาบริเวณนี้เช่นกันโดยการย้อม PV พบว่ามี PV-IRN น้อยมากเกือบไม่พบเลย และไม่สัมพันธ์กับ cholinergic และ GABAergic neurons

บริเวณ amygdaloid nucleus โดยเฉพาะส่วน basolateral amygdaloid nucleus ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ limbic system พบว่าให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ในปริมาณที่หนาแน่นกว่า PV ทั้งปริมาณ IRN และ IRF และใน stria terminalis ซึ่งเป็นกลุ่มเส้นใยประสาทที่ออกจาก amygdala ไปสิ้นสุดที่ septal area, preoptic nucleus, anterior และ ventromedial hypothalamic nuclei (มีชัย ศรีใส, 2530) พบว่าให้ผลบวกจากการย้อม CaLB อย่างเด่นชัด ส่วนการย้อม PV ไม่ให้ผลบวกเลย ซึ่งรวมถึง bed nucleus ของ stria terminalis ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน

ใน mammillary body ซึ่งกล่าวไว้ในเรื่อง hypothalamus จัดอยู่ในระบบ limbic system ด้วยเช่นกัน ก็ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB และให้ผลลบต่อการย้อม PV

ในบริเวณ anterior thalamic nucleus ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ medial และ lateral โดยมีความเกี่ยวข้องกับระบบนี้ด้วย พบว่าให้ผลบวกจากการย้อม CaLB อย่างเด่นชัดส่วนการย้อม PV นั้น ปรากฏว่าให้ผลบวกน้อยมาก หรือเกือบไม่พบเลย

โดยสรุปแล้วจะเห็นว่า ใน limbic system นี้ ส่วนใหญ่มี CaLB อย่างเด่นชัด ส่วน PV พบได้น้อยมาก ทั้งนี้ยกเว้นในบริเวณ hippocampal formation ซึ่งพบได้ค่อนข้างใกล้เคียงกัน

Thalamus

จากการศึกษาบริเวณต่าง ๆ ของ thalamic nucleus ได้แก่ reuniens, centromedial, paraventricular, medial anterior, lateral anterior และ ventral thalamic nucleus พบว่ามี CaLB-IRN อยู่อย่างหนาแน่น ส่วน PV-IRN พบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และปริมาณของ IRF จากการย้อมทั้งสองวิธี พบปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนบริเวณของ reticular thalamic nucleus ให้ผลการทดลองแตกต่างอย่างเด่นชัด คือไม่พบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF เลย ตรงกันข้ามพบ PV-IRN และ PV-IRF อยู่อย่างหนาแน่น

บริเวณต่าง ๆ ของ thalamus เหล่านี้ เป็นที่ทราบดีแล้วว่า ทำหน้าที่รับความรู้สึก ควบคุมการเคลื่อนไหว เกี่ยวกับอารมณ์และความรู้สึกตัว แล้วส่งต่อไปยังสมองใหญ่ โดยกลุ่มประสาทในบริเวณนี้ จะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ sensory relay nuclei, motor relay nuclei, associative nuclei, affective nuclei และ diffuse thalamic nuclei (มีชัย ศรีใส, 2530)

ผลการทดลอง ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Celio และ Heizmann (1981) และการทดลองของ Frassoni และคณะ (1991) โดยพบปริมาณ PV-IRN น้อยมากในบริเวณต่างๆเหล่านี้ แต่ตรงกันข้ามบริเวณ reticular thalamic nucleus พบ PV-IRN ให้ผลบวกอย่างหนาแน่น ส่วน CaLB-IRN พบว่าให้ผลบวกในบริเวณต่าง ๆ เหล่านี้เป็นส่วนใหญ่ นอกนี้จากนี้ยังมีการศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่าง CaLB, PV และ GABA (Hashikawa et al.,1991) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันในกลุ่มโปรตีนเหล่านี้เลย

Feldman และ Christakos (1983) ได้ศึกษาการกระจายของเซลล์ในบริเวณ thalamus พบลักษณะค่อนข้างซับซ้อนมากกว่าบริเวณอื่น ๆ โดยแบ่งบริเวณนี้ออกเป็น 3 บริเวณ ดังนี้คือ midline, lateral และ posterior nuclei

บริเวณของ epithalamus ได้แก่ habenular พบว่าให้ผลบวกจากการย้อม CaLB ทั้งเซลล์และ fibers ส่วนการย้อม PV นั้น ไม่ให้ผลบวกเลย ผลการทดลองสอดคล้อง กับการทดลองของ Garcia-Segura และ คณะ (1984) พบว่าเซลล์ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ใน habenular เช่นเดียวกัน ส่วน pineal body จากการทดลองย้อมทั้ง 2 วิธี ครั้งนี้พบเซลล์ให้ผลบวกน้อยมาก และผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของ Celio (1990)

โดยสรุปจะเห็นว่า thalamic nuclei ส่วนใหญ่จะให้ผลบวกต่อ CaLB และให้ผลบวกน้อยมากหรือเป็นลบ จากการย้อม PV ทั้งนี้ยกเว้นบริเวณ reticular thalamic

nucleus ซึ่งจะกล่าวในเรื่อง reticular formation ด้วยเช่นกัน

Reticular formation

ในบริเวณ reticular formation ระดับต่างๆ นั้นพบว่าผลการศึกษาคล้ายคลึงกันในทุกบริเวณ โดยเฉพาะบริเวณที่เห็นความแตกต่างอย่างเด่นชัดได้แก่ pontine reticular nucleus, gigantocellular nucleus และ reticular thalamic nucleus ซึ่งพบ PV-IRN อย่างหนาแน่นและชัดเจน ส่วน CaLB-IRN ไม่ให้ผลบวกเลยนอกจากบริเวณดังกล่าวซึ่งไม่ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ก็พบว่าในบริเวณอื่นๆ ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน โดยตรงกันข้ามกับ PV ซึ่งพบว่าให้ผลบวกอย่างหนาแน่น

PV-IRN ในบริเวณ gigantocellular reticular nucleus พบขนาดเซลล์ซึ่งให้ผลบวกค่อนข้างใหญ่ และเห็นชัดเจน เชื่อว่าบริเวณนี้ เป็นบริเวณที่ควบคุมการเต้นของหัวใจ (cardiovascular center) และการหายใจเข้าออก (มีชัย ศรีใส , 2530) ส่วนใน pavocellalar reticular nucleus ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก อยู่ทางด้านในต่อ spinal trigeminal tract พบว่าให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี ซึ่งแตกต่างจากบริเวณอื่น pavocellular นี้ทำหน้าที่รับสัญญาณประสาทจากการทรงตัว,การได้ยินและความรู้สึกจากอวัยวะภายใน และส่งต่อไปยัง diencephalon (มีชัย ศรีใส, 2530)

บริเวณ raphe nucleus ไม่ให้ผลบวกจากการย้อมทั้ง 2 วิธี และใน locus caeruleus พบว่ามี PV-IRN ปริมาณปานกลาง ส่วน CaLB-IRN ไม่ให้ผลบวกเลย และพบ fibers ในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมีค่อนข้างหนาแน่น

Reticular formation ของ midbrain จะไม่รวมกันเป็นกลุ่มเด่นชัด อย่างใน pons และ medulla บริเวณ tegmental nucleus พบมี PV-IRN ปริมาณปานกลางโดยเฉพาะ ventral tegmental nucleus ส่วนบริเวณของ dorsal และ lateral tegmental nucleus ไม่พบ PV-IRN เลย ตรงกันข้ามกลับพบว่า CaLB-IRN พบค่อนข้างมากกว่าปริมาณของ IRF จากการย้อมทั้ง 2 วิธี ปรากฏว่ามีปริมาณใกล้เคียงกัน

บริเวณ interpeduncular nucleus ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ mesencephalic reticular formation พบ CaLB-IRN ปริมาณปานกลาง ส่วน PV-IRN พบน้อยมาก และพบ IRF ปริมาณใกล้เคียงกัน และเช่นเดียวกันกับ centromedian thalamic nucleus ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบนี้พบ CaLB-IRN อย่างหนาแน่น ส่วน PV-IRN พบเพียงเล็กน้อย

โดยสรุปจะเห็นว่า reticular formation ระดับ pons และ medulla

ส่วนใหญ่จะให้ผลบวกต่อการย้อม PV อย่างเด่นชัด ส่วน CaLB ให้ผลบวกน้อยมาก และในระดับ midbrain และ diencephalon พบ CaLB-IRN ปริมาณมากกว่า โดยยกเว้นบริเวณ reticular thalamic nucleus เท่านั้น

Cerebellum

จากการศึกษาบริเวณ cerebellum พบทั้ง CaLB-IRN และ PV-IRN ให้ผลบวกอย่างเด่นชัด เซลล์ที่พบมีลักษณะติดสีค่อนข้างเข้มและขนาดใหญ่ ซึ่งคือ Purkinje cells นั่นเอง ผลการทดลองนี้ตรงกับการทดลองจากงานวิจัยอื่นๆ (Celio, 1990; Jande and Maler, 1981; Baimbridge and Miller, 1982 ; Garcia-Segura et al., 1984) ใน Purkinje cells นี้นอกจากจะพบว่ามีขนาดใหญ่แล้ว ยังเรียงตัวกันเป็นแถวอย่างมีระเบียบ ในชั้น Purkinje cells layer ส่วนในชั้น molecular layer นั้นผลการย้อม CaLB พบ IRN ลักษณะกลมและค่อนข้างเล็ก ติดสีเข้มทึบ กระจายทั่ว ๆ ไป ส่วนจากการย้อม PV พบเซลล์ชนิดนี้ให้ผลบวกน้อยมาก จากการเปรียบเทียบ ลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์กับบทสรุปของ Carpenter (1983) คาดว่าเป็นพวก microglia cells ส่วนเซลล์พวก basket cells และ stellate cells ให้ผลบวกจากการย้อม PV อย่างเด่นชัด ส่วนจากการย้อม CaLB ให้ผลลบ ซึ่งตรงกับการทดลองของ Heizmann ปี 1984 และ Ohshima และคณะ ปี 1991 ในชั้น molecular layer นี้ พบมีปริมาณของ IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีใกล้เคียงกัน โดยจะสังเกตเห็น dendrites ของ Purkinje cells อย่างเด่นชัด แต่ส่วนปลายของ dendrites จะไม่พบว่ามี immunoreactive ให้สังเกตได้เลย นอกจาก dendritesของ Purkinje cells แล้วยังสามารถเห็น climbing fiber มี immunoreactive ด้วย ซึ่งตรงกับการทดลองของ Baimbrige และ Miller (1982) ที่ได้สรุปว่า fiber นี้ได้รับมาจาก inferior olive แล้วส่งต่อไปยัง deep cerebellar nuclei climbing fiber ซึ่งให้ผลบวกนี้พบในปริมาณมากจากการย้อม CaLB และพบเล็กน้อยจากการย้อม PV ส่วนในชั้น granular layer จากการย้อมทั้งสองวิธี ไม่พบ IRN เลย ผลการทดลองนี้เป็นเช่นเดียวกับ Heizmann (1984) , Ohshima (1991) และ Baimbridge (1982) แต่พบการย้อม calmodulin ในชั้นนี้พบ IRN ได้ (Heizmann,1984) ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้จากการย้อม CaLB และ PV ในชั้น granular layer นี้ พบ IRF ซึ่งคาดว่าเป็น Purkingje cell axon และ mossy fiber ที่ติดสีจางเท่านั้น ถัดลงไปจาก granular layer จะเป็นส่วนของ medullary layer ซึ่งเป็นบริเวณชั้นในของ cerebellum และประกอบไปด้วยเส้นใยประสาทเข้า และ

ออกจาก cerebellar cortex พบ IRF เพียงเล็กน้อยเท่านั้นทั้งสองวิธี ซึ่งในบริเวณดังกล่าวประกอบด้วย mossy fibers ผ่านขึ้นมา synape กับ dendrites ของ granule cells, climbing fiber ขึ้นมา synape กับส่วนต้นของ Purkinje cell dendrites และ axons ของ Purkinje cells ไปสู่ deep cerebellar nuclei หรือ vestibular nuclei ในก้านสมอง (มีชัย ศรีใส, 2530)

โดยสรุปจะเห็นว่าเซลล์ที่ให้ผลบวกหลักในบริเวณ cerebellum ได้แก่ Purkinje cell จะให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี และมีความเป็นไปได้ที่โปรตีนสองชนิดนี้ ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ชนิดนี้และยังพบว่าความเข้มของ IRN ค่อนข้างเข้มกว่า basket และ stellate cells ซึ่งตรงกับการทดลองของ Celio (1990) นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับ Ca^{2+}-action potentials ยังพบว่า ใน Purkinje cells มีความต้านทานต่อ tetrodotoxin ได้เป็นอย่างดี ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ประสาทบริเวณอื่นๆโดยความต้านทานนี้คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของ calcium binding protein เหล่านี้ด้วยก็เป็นไปได้ (Kretsinger, 1981)

บริเวณ deep cerebellar nuclei จากการย้อมทั้งสองวิธี ปรากฏว่า ไม่พบ CaLB-IRN เลย ตรงกันข้าม กลับพบ PV-IRN ปริมาณปานกลาง และสังเกตได้ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งตรงกับการทดลองของ Celio (1990) และ Braimbrige (1982) ส่วน IRF ปรากฏว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งสองวิธี ใน deep cerebellar nuclei จะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ซึ่งมีอยู่สามคู่คือ fastigial, interposed และ dentate nucle (Larsell, 1972) จากการทดลองพบว่าบริเวณ lateral cerebellar nucleus ตรงกับ dentate nucleus ซึ่งจะเห็นว่ามีลักษณะค่อนข้างใหญ่ และหยัก คล้ายกับบริเวณ inferior olivary nucleus ส่วนบริเวณ infracerebellar nucleus จะตรงกับ fastigial nucleus และ interposed cerebellar nucleus จะตรงกับ globose และ emboliform ในคน nuclei ต่าง ๆ เหล่านี้ มี PV-IRN ในปริมาณใกล้เคียงกัน รวมถึง IRF เช่นกัน

มีชัย ศรีใส (2530) ได้สรุปเกี่ยวกับ deep cerebellar nuclei เหล่านี้ว่าจะได้รับสัญญาณประสาทจาก Purkinje cells โดยส่งมาเพื่อยับยั้งการทำงาน และจะได้รับการกระตุ้นจาก mossy fibers ใน cerebellum ส่วนสัญญาณประสาทจาก nuclei เหล่านี้จะส่งออกไป เพื่อกระตุ้นการทำงานของ กลุ่มเซลล์ประสาทในก้านสมอง อย่างไรก็ตามจากการทดลอง จะเห็นว่า Purkinje cells ซึ่งให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี และส่งเส้นใยประสาทไปยัง deep cerebellar nuclei ที่พบว่ามี IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีเช่นเดียวกัน จึงเป็นเหตุผลหนึ่งซึ่งยืนยันได้ว่า calcium binding protein ทั้งสองชนิดนี้ ถูกสร้างขึ้น

โดย Purkinje cells ของ cerebellum และถูกส่งเข้าไปบริเวณ deep cerebellar nuclei เพื่อควบคุมระดับของ Ca^{2+}

Pyramidal system

ในระบบนี้จากการศึกษาสังเกตได้ไม่ชัดเจนนัก เช่นใน pyramid ซึ่งอยู่ใน medulla ไม่พบมี IRF ให้ผลบวกเลยจากการย้อมทั้งสองวิธี ซึ่งตรงกับการทดลองของ Celio ในปี 1990 โดยเป็นที่ทราบแล้วว่า pyramidal cell เหล่านี้ที่ระดับของ cortex พบ CaLB-IRN ได้มาก และ PV-IRN พบเพียงปริมาณเล็กน้อย

จากการทดลองของระบบนี้ การศึกษาปริมาณของ IRN และ IRF ไม่ละเอียดเท่าที่ควรเนื่องจากไม่สามารถที่จะระบุตำแหน่งได้แน่นอน เช่น corticospinal tract และ corticobulbar tract ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่า tract ต่าง ๆ เหล่านี้ ไม่ให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี จึงไม่สามารถสังเกตเห็น IRF ได้ แต่ได้ทำการศึกษาบริเวณ cranial nerve nuclei ต่างๆ ซึ่งเป็นบริเวณที่ corticobulbar tract ส่งผ่าน medial lemniscus ไปเลี้ยงกลุ่มเซลล์ประสาทสั่งการ (motor nuclei) ในสมองซึ่ง ได้แก่ trochlear nucleus, oculomotor nucleus, motor nucleus ของ nerve V, motor nucleus ของ nerve VII, nucleus ambiguus, abducens nucleus และ hypoglossal nucleus ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป

ใน oculomotor nucleus ให้ผลแตกต่างอย่างเด่นชัด จากการย้อมทั้งสองวิธี คือ พบ PV-IRN และ PV-IRF อย่างหนาแน่น ส่วน CaLB-IRN และ CaLB-IRF พบได้ในปริมาณที่น้อยมาก หรือเกือบไม่พบเลย

ส่วนใน trigeminal motor nucleus พบว่า IRN จากการย้อมทั้งสองวิธีพบในปริมาณที่น้อยมาก หรือเกือบไม่พบเลย ดังจะได้กล่าวไว้ในระบบของ general sensory system ส่วนใน facial nucleus ไม่พบมี CaLB-IRN เลย แต่พบมี PV-IRN พบในปริมาณปานกลาง และ IRF ก็พบได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ในบริเวณของ hypoglossal nucleus พบ CaLB-IRN ได้เล็กน้อย ส่วน PV-IRN ไม่พบปรากฏเลย ใน ambigus nucleus ก็พบมี IRN จากการย้อมทั้งสองวิธีโดย PV-IRN พบค่อนข้างหนาแน่นกว่า ส่วน IRF พบได้ใกล้เคียงกัน และใน abducens nucleus พบ CaLB-IRN เพียงเล็กน้อย ส่วน PV-IRN ไม่พบเลย แต่ปริมาณของ IRF พบได้ใกล้เคียงกันส่วนบริเวณ paraabducens nucleus พบ PV-IRN มากกว่า CaLB-IRN และ PV-IRF ก็หนาแน่นกว่า CaLB-IRF ด้วยเช่นกัน

โดยสรุปแล้วจะเห็นว่า ในระบบของ pyramidal system นี้ มีความแตกต่าง

จากการย้อมทั้งสองวิธีไม่ชัดเจนนัก แต่อย่างไรก็ตาม ใน motor nucleus ต่าง ๆ ของสมอง โดยส่วนใหญ่พบว่ามีแนวโน้มให้ผลบวกต่อการย้อม PV มากกว่าการย้อม CaLB และการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Celio (1990)

Extrapyramidal system

ใน corpus striatum ซึ่งได้แก่ caudate nucleus, putamen และ globus pallidus จากการทดลองพบว่าใน caudate nucleus และ putamen พบ CaLB-IRN และ PV-IRN ได้อย่างเด่นชัด CaLB-IRN พบค่อนข้างหนาแน่นกว่า PV-IRN ส่วน CaLB-IRF ก็พบหนาแน่นกว่า เช่นเดียวกันผลการทดลองบริเวณ globus palliclus (paleostriatum) พบ CaLB-IRN ในปริมาณน้อยมาก หรือเกือบจะไม่พบเลย ส่วน PV-IRN ปรากฏว่าพบได้ในปริมาณปานกลาง จากการทดลองในบริเวณ corpus striatum นี้พบว่า IRN จากการย้อมทั้งสองวิธี มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน และคาดว่าเป็นพวก medium size neurons ซึ่งเป็น major neuronal population ของเซลล์ใน caudate nucleus และ putamen เซลล์พวกนี้ จะมีปริมาณที่ลดลงในสมองคนเป็นโรค Huntingtion's disease (Kiyama et al., 1990)

Gerfen และคณะ (1985) แสดงให้เห็นว่า CaLB-IRN เป็น marker ของ medium sized spiny neurons โดยทำการทดลองในหนูและลิง และยังมีการพบว่าในเซลล์ชนิดนี้ให้ผลบวกต่อการย้อม acetylcholinesterase ด้วยเช่นเดียวกัน (Graybiel et al., 1981) นอกจากนี้ CaLB-IRN จะมี projection ไปยัง substantia nigra ด้วย ส่วน PV-IRN พบว่าให้ผลบวกใน medium size neurons เช่นกัน (Oshima et al.,1991) อย่างไรก็ตามจากการย้อมทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าจะให้ผลบวกในพวก medium size neurons เช่นเดียวกัน แต่ก็ยังไม่ได้รับการยืนยันว่า ทั้ง CaLB-IRN และ PV-IRN เป็นเซลล์ เดียวกันหรือไม่ มีการทดลองฉีดสารพวก neurotoxin เข้าไปในบริเวณ corpus striatum ก็พบว่า PV-IRN จะ sensitive กว่า CaLB-IRN (Waldvogel et al., 1991) นอกจากนี้ยังได้พบว่า CaLB-IRN จะมี coexist กับเซลล์ซึ่งให้ผลบวกต่อ somatostatin อีกด้วย

จากการศึกษาโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า CaLB-IRN จะเป็นพวก spiny neurons และพบ CaLB ใน axon terminals ที่ไปสิ้นสุดที่ globus pallidus CaLB ให้ผลบวกอยู่ภายใน matrix ของ cytoplasm ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ microfilaments และ axoplasmic matrix ของ axons ส่วนใน membrane ,

endoplasmic reticulum และ mitochondria ไม่ให้ผลบวก อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานการวิจัยซึ่งพบ small - sized neurons ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB และพบ IRN ชนิดนี้ ค่อนข้างมี dendrites ที่ยาว และมีลักษณะเป็น spiny dendrite (Braun et al., 1991) จากการทดลอง ในครั้งนี้ พบว่าให้ผลบวกแตกต่างเพราะพบเฉพาะ medium sized neurons เท่านั้น

บริเวณ globus pallidus จากการทดลองพบปริมาณของ CaLB-IRN ค่อนข้างน้อยมาก หรือเกือบจะไม่พบเลย ส่วน PV-IRN พบได้ในปริมาณที่มากกว่า โดยเซลล์ที่ให้ผลบวกมี ขนาดที่ค่อนข้างใหญ่ และปริมาณของ IRF นั้น กลับพบว่า CaLB-IRF ให้ผลบวกอย่างหนาแน่นโดยรวมกันเป็นกลุ่มจนเป็นแถบทึบ ส่วน PV-IRF พบในปริมาณใกล้เคียงกันแต่มีลักษณะโปร่ง และประสานกันจนดูคล้ายตาข่าย จากการทดลองของ Celio (1990) พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันใน globus pallidus แต่ Celio พบว่า PV-IRN มีอย่างหนาแน่น ซึ่งในการทดลองนี้พบปริมาณปานกลางเท่านั้น

บริเวณ zona incerta ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ extrapyramidal system จากการย้อมพบ CaLB-IRN ปริมาณน้อยมาก ส่วน PV-IRN พบปริมาณที่มากกว่า และ IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีให้ผลบวกในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน จะเห็นว่าบริเวณ zona incerta ให้ผลบวกต่อการย้อม PV อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับบริเวณ globus pallidus โดยสอดคล้องกับคำอธิบายของ มิชัย ศรีใส (2530) ซึ่งกล่าวว่า zona incerta ได้รับสัญญาณประสาทจากบริเวณ globus pallidus ส่วนหน้าที่ของมันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

บริเวณ substantia nigra (SN) พบมี CaLB-IRN เฉพาะบริเวณ pars compacta และ pars lateralis เท่านั้น ส่วน PV-IRN พบอย่างหนาแน่นในบริเวณ pars reticulata และพบปริมาณเล็กน้อยจนถึงปานกลางใน pars comacta และ pars lateralis ส่วน IRF นั้น พบว่าให้ผลบวกใกล้เคียงกันจากการย้อมทั้งสองวิธี

บริเวณ pars compacta เป็นที่ทราบแล้วว่า จะมีเส้นใยประสาท ซึ่งมี dopamine และส่งไปยับยั้งการทำงานของ neostraitum ส่วนใน pars reticulata เป็นกลุ่มเซลล์ประสาทที่มีเหล็กมาก และยังไม่ทราบหน้าที่อย่างแน่นอน (มิชัย ศรีใส, 2530)

Gerfen และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาและพบว่า CaLB-IRN ในบริเวณ substantia nigra นั้นโดยส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์เดียวกันกับ dopaminergic neurons และพบเล็กน้อย ในเซลล์ชนิด non - dopaminergic neurons จึงมีความเป็นไปได้ว่า ทั้ง CaLB และ dopamine มีความเกี่ยวข้องกันใน pars compacta ของ substantia nigra นอกจากนี้เขายังพบอีกว่า ทั้งหมดของ dopaminergic neurons ใน ventral tegmental area เป็นเซลล์เดียวกับ CaLB-IRN อีกด้วย ส่วน PV-IRN ซึ่งพบอย่างกว้างขวางใน pars

reticulata นั้น พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Gerfen และคณะ (1985) และการทดลองของ Celio (1990) ด้วยเช่นกัน

บริเวณของ inferior olivary nucleus พบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF อย่างหนาแน่น ส่วน PV-IRN ไม่ให้ผลบวกเลย และ PV-IRF พบปริมาณปานกลางโดยติดสีจางมาก จะเห็นว่าในบริเวณนี้มีความแตกต่างจากการย้อมทั้งสองวิธี ค่อนข้างเด่นชัดโดยผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Celio (1990)

กลุ่มเซลล์ต่าง ๆที่เกี่ยวข้องในระบบของ extrapyramidal system นอกจากกลุ่มต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว ยังพบอีกหลายกลุ่ม เช่น dorsal thalamus โดยได้กล่าวไว้แล้วในเรื่อง thalamus อย่างไรก็ตามใน ventral anterior thalamic nucleus และ ventral lateral thalamic nucleus พบ CaLB-IRN ปริมาณที่หนาแน่นกว่า PV-IRN นอกจากนี้ใน pontine reticular formation, medullary reticular formation และ vestibular nuclei ก็พบ PV-IRN อย่างเด่นชัดและหนาแน่นกว่า CaLB-IRN ซึ่งได้กล่าวไว้บ้างแล้วในเรื่อง thalamus, reticular formation และ vestibular system ส่วน cerebellum ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ cerebellum โดยพบเซลล์ให้ผลบวกปริมาณใกล้เคียงกันจากการย้อมทั้งสองวิธี

โดยสรุปแล้วจะเห็นว่า extrapyramidal system นี้ ไม่มีความแตกต่างจากการย้อมทั้งสองวิธีอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่ดูจากส่วนใหญ่แล้ว มีแนวโน้มว่า nuclei ที่เกี่ยวข้องกับระบบนี้โดยตรง ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB มากกว่า PV อย่างไรก็ตามยังไม่ได้รับการยืนยันจากงานวิจัยอื่น ๆ

hypothalamus

การศึกษาในบริเวณต่าง ๆ ของ hypothalamus ทั้งการย้อม CaLB และ PV พบว่าบริเวณนี้ มีความแตกต่างของผลการย้อมค่อนข้างที่จะเด่นชัด โดยจะพบมี CaLB-IRN ในปริมาณที่หนาแน่นกว่า PV-IRN เกือบทุกบริเวณของส่วนนี้ โดย PV-IRN พบน้อยมาก หรือเกือบไม่พบเลย และพบว่าบริเวณที่ไม่มี PV-IRN เลยได้แก่บริเวณ anterior medial preoptic area, anteroventral preoptic nucleus และ supraoptic nucleus โดยตรงกันข้ามในบริเวณดังกล่าวพบ CaLB-IRN อย่างเด่นชัด นอกจากนี้บริเวณที่พบ PV-IRN ได้เพียงเล็กน้อยได้แก่ median preoptic area และ lateral preoptic area โดยเฉพาะใน median preoptic area ให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธี ในปริมาณที่เล็กน้อยใกล้เคียงกัน ส่วน IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีในทุกบริเวณพบมีปริมาณใกล้เคียงกันโดยมีปริมาณตั้งแต่ปานกลาง

จนถึงหนาแน่น

บริเวณ mammillary body ผลการทดลองให้ผลเช่นเดียวกับ hypothalamus โดยพบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF ปริมาณปานกลาง จนถึงหนาแน่น ส่วน PV-IRN ไม่พบให้ผลบวกเลย และ PV-IRF พบปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

การทดลองนี้ขัดแย้งกับการทดลองของ Celio และ Heizmann (1981) ซึ่งศึกษาการกระจายของ PV ในสมองหนู และพบมี PV-IRN ในบริเวณ mammillary body อย่างกว้างขวาง แต่สอดคล้องกับการทดลองของ Celio (1990) ซึ่งได้ศึกษาในหนูเช่นกันพบว่าในบริเวณ mammillary body โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ medial mammillary body มี CaLB-IRN ในปริมาณที่หนาแน่น ส่วน PV-IRN พบในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้น การศึกษาของ Celio ในปี 1990 น่าจะเป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือกว่า เนื่องจากการพัฒนาของ antibody ที่ใช้มี sensitivity และ specificity สูงมากกว่า นอกจากนี้การทดลองของ Feldman และ Christakos (1983) และการทดลองของ Garcia-Segura (1984) ก็ยังให้ผลการศึกษาเหมือนกับการทดลองในครั้งนี้เช่นกัน โดยพบว่ามี CaLB-IRN และ CaLB-IRF กระจายโดยทั่วไปใน hypothalamus ส่วนการทดลองของ Christakos และคณะ (1987) ในบริเวณ supraoptic nucleus ก็พบ CaLB-IRN อย่างหนาแน่นเช่นเดียวกัน

โดยสรุปพบว่าบริเวณ hypothalamus ส่วนต่างๆ มีการกระจายของ CaLB อย่างกว้างขวาง ส่วน PV พบการกระจายอยู่น้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า CaLB มีบทบาทที่สำคัญในระบบนี้ เกี่ยวกับการควบคุมระบบประสาทอัตโนมัติ ระบบประสาท somatic และระบบต่อมไร้ท่อ ซึ่งมีการติดต่อกับสมองบริเวณต่าง ๆ อย่างมากมาย

General sensory system

บริเวณ spinal trigeminal tract นั้น พบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF อย่างเด่นชัด ส่วน PV-IRN ไม่ให้ผลบวกเลย และ PV-IRF พบได้บ้างปานกลาง นอกจากนี้ใน spinal trigeminal nucleus พบ CaLB-IRN ปริมาณเล็กน้อย ส่วน PV-IRN พบในปริมาณปานกลาง และ IRF พบได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะเห็นว่าในบริเวณนี้ ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจนว่าให้ผลบวกโปรตีนชนิดใดมากกว่ากัน

ในระบบ dorsal column-medial lemniscal system ซึ่งจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการรับความรู้สึก จากกล้ามเนื้อและข้อ การสัมผัสชนิดละเอียด และความรู้สึกสั่นสะเทือน (มีชัย ศรีใส , 2530) นั้น พบว่าบริเวณของ gracile และ cuneate nucleus

มี IRN จากการย้อมทั้งสองวิธีค่อนข้างน้อยยกเว้น PV-IRN ใน cuneate nucleus เท่านั้นซึ่งพบในปริมาณปานกลาง ส่วน IRF จากการย้อมทั้งสองวิธี ให้ผลบวกอย่างหนาแน่น และปริมาณใกล้เคียงกัน

บริเวณ principle sensory trigeminal nucleus ไม่พบ CaLB-IRN เลย ส่วน PV-IRN พบปริมาณปานกลาง และ IRF พบในปริมาณใกล้เคียงกัน

ใน motor root trigeminal nerue พบว่า IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีใกล้เคียงกัน ส่วนใน motor trigeminal nucleus นั้น พบว่า IRF จากการย้อมทั้งสองวิธี ส่วน IRF ก็พบอย่างหนาแน่นเช่นเดียวกันด้วย

เซลล์ประสาทในชั้นที่สามของระบบนี้ซึ่งอยู่ในบริเวณต่าง ๆ ของ thalamus นั้น ได้กล่าวรายละเอียดไว้ในหัวข้อ thalamus ซึ่งส่วนใหญ่จะพบ CaLB-IRN มากกว่า PV-IRN

จากการทดลอง จะเห็นว่า ระบบนี้ ไม่สามารถ แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูโดยรวมระบบนี้ มีแนวโน้มที่จะให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ในปริมาณที่มากกว่า PV การทดลองในบริเวณนี้ ให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองของ Celio (1990)

Olfactory system

จากการย้อม calcium binding protein บริเวณ olfactory bulb ผลการทดลองพบ IRN และ IRF กระจายโดยทั่วไปในปริมาณต่างกัน ในแต่ละชั้นของบริเวณนี้ โดยในชั้นของ glomerular layer พบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF อย่างค่อนข้างหนาแน่น ส่วน PV-IRN พบเพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น ในชั้นถัดลงมาได้แก่ external plexiform layer นั้น พบ PV-IRN ปริมาณที่มากกว่า CaLB-IRN และปริมาณของ PV-IRF ก็มากกว่าเช่นกัน ถัดจากชั้น external plexiform layer ลงไปได้แก่ mitral cell layer, internal plexiform layer และ internal granular layer ตามลำดับ จากการย้อมทั้งสองวิธีปรากฏว่าชั้นต่าง ๆ เหล่านี้พบ IRN ในปริมาณน้อยมาก หรือเกือบไม่พบเลย ส่วน IRF มักพบในปริมาณปานกลางจากการย้อมทั้งสองวิธี โดย PV-IRF มีปริมาณมากกว่า CaLB-IRF บ้างเล็กน้อย

ผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับการทดลอง ในหนูของ Braimbridge และ Miller (1982) และการทดลองของ Garcia-Segura และคณะ (1984) ผลการทดลองพบ CaLB-IRN อย่างเด่นชัดในบริเวณ glomerular layer เช่นเดียวกับ การทดลองในครั้งนี้ ซึ่งเป็นการทดลองในกระแต นอกจากนี้ได้มีการทดลองในสัตว์พวก cartilaginous fish (Rodriguez-Moldes et al ., 1990) ปรากฏว่าให้ผลการทดลองที่ขัดแย้งกัน โดยพบว่า

CaLB-IRN พบน้อยมากในบริเวณ olfactory bulb จากผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้ อาจจะเป็นที่สังเกตได้ว่า CaLB พบได้ในสัตว์ที่มีวิวัฒนาการค่อนข้างสูงขึ้นไป ดังการยืนยันของ Rodriguez-Moldes และคณะ

Carpenter (1976) ได้สรุปถึงบริเวณ olfactory bulb ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ olfactory pathway ว่าได้รับ fiber มาจาก olfactory nerve และภายใน gray matter ของ olfactory bulb นี้ จะประกอบด้วยเซลล์ต่าง ๆ หลายชนิด โดยเซลล์ที่มีรูปร่างสามเหลี่ยม และมีขนาดใหญ่ คือ mitral cell ซึ่งอยู่ในบริเวณ mitral cell layer นั่นเอง แต่จากการทดลองในครั้งนี้ ปรากฏว่า เซลล์ชนิดนี้ไม่ให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีนี้เลย นอกจากนี้ Carpenter ยังพบว่ามี fibers ซึ่งมา synape กับ dendrites ของ mitral cells จะเกิดลักษณะของ olfactory glomeruli ซึ่ง อยู่ในบริเวณ glomerular layer นั่นเอง ในชั้นนี้ดังกล่าวแล้วว่า พบ CaLB-IRN และ CaLB-IRF ในปริมาณที่หนาแน่น และติดสีที่เข้ม ส่วน PV-IRN และ PV-IRF พบได้ในปริมาณไม่มากนัก

จากการศึกษา ขนาด และรูปร่าง ของเซลล์ดังกล่าว ปรากฏว่าเซลล์ซึ่งให้ผลบวกเหล่านี้เป็นพวก periglomerular cells มีรูปร่างกลมตามคำอธิบายของ Carpenter (1976) และเขายังได้อธิบายว่าเซลล์เหล่านี้ ส่ง fibers ไปเชื่อมกับ mitral cell glomeruli ด้วย

ส่วนในบริเวณ internal granular layer ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่เป็นพวก granule cells พบมี IRN ในปริมาณน้อยมากหรือเกือบไม่พบเลย โดยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง mitral cells และทางกลับกัน mitral cells ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น granule cells จากการทดลองพบว่าในชั้นของ granular layer นี้ไม่พบ CaLB-IRN เลย ส่วน PV-IRN พบได้บ้างแต่น้อยมาก ซึ่ง PV-IRN เหล่านี้ คาดว่าเป็นเซลล์เดียวกันกับเซลล์ซึ่งหลั่ง r-amino-butyric acid (GABA) เป็น neurotransmitter ตามการศึกษาของ Celio (1986)

Heizmann (1984) ได้ทำการศึกษาและพบว่า periglomerular cells ในชั้น glomerular layer ที่ให้ผลบวกต่อการย้อม PV เป็นเซลล์เดียวกันกับ GABAergic neurons และเขายังได้สรุปว่า PV เป็น neuron-specific antigen ชนิดหนึ่งและจะพบได้ในบางกลุ่มของเซลล์ประสาทเท่านั้น ส่วน periglomerular cells ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB อย่างหนาแน่นนั้น Garcia-Segura และคณะ (1984) ทำการศึกษาพบเพียงบางส่วนของเซลล์เหล่านี้ ซึ่งเป็น CaLB-IRN (26%) แต่การทดลองนี้ คาดว่า periglomerular cells ซึ่งให้ผลบวกต่อ CaLB นั้น ควรจะมีปริมาณ 60-80% ของเซลล์ทั้งหมด เนื่องจากได้พบในปริมาณที่หนาแน่น Garcia-Segura และคณะ ยังพบว่ามีบาง granule cells ในชั้น granular layer

ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ด้วย ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองในครั้งนี้ ที่ไม่พบ granule cells ให้ผลบวกต่อการย้อมเลย แต่ให้ผลบวกบ้างเล็กน้อยต่อการย้อม PV ซึ่งเขาไม่ได้ทำการศึกษาไว้

บริเวณของ olfactory bulb จะพบ กลุ่มเซลล์ประสาทของ anterior olfactory nucleus ซึ่งแบ่งเป็นบริเวณต่าง ๆ ด้วยกันคือ external, ventral, lateral, dorsal และ medial จากการทดลองพบมี CaLB-IRN ค่อนข้างหนาแน่นปานกลาง เกือบทุกบริเวณ ยกเว้นในบริเวณ external olfactory nucleus พบได้ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น และ ตรงกันข้าม พบ PV-IRF พบมีปริมาณที่หนาแน่นกว่า CaLB-IRF จากการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Celio ในปี 1990 ซึ่งเป็นการทดลองในหนูไม่พบว่า PV-IRN เลย ซึ่งแตกต่าง จากการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบ PV-IRN ได้ในทุก subdivisions ของ nucleus

Carpenter (1976) ได้สรุปถึงเซลล์ประสาทในบริเวณ anterior olfactory nucleus ว่าเซลล์เหล่านี้ จะส่ง dendrites ผ่านเข้าไปใน fibers ของ olfactory tract ส่วน axons จะทอดเข้าสู่ส่วนกลาง และทอดข้าม ส่วนหน้าของ anterior commissure เข้าสู่ contralateral anterior olfactory nucleus และ olfactory bulb ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ สามารถเห็น fiber ของเซลล์ในบริเวณนี้วิ่งเข้าสู่บริเวณ olfactory tract อย่างชัดเจน จากการย้อมทั้งสองวิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พบว่ามี fiber วิ่งไปยังบริเวณ anterior commissure ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น axons ของเซลล์ในบริเวณนี้ ตามคำอธิบายของ Carpenter

Auditory system

จากการศึกษาผลการย้อมใน cochlear nucleus ทั้งในบริเวณ dorsal และ ventral พบ PV-IRN อย่างค่อนข้างหนาแน่น ส่วน CaLB-IRN พบ ในปริมาณที่น้อยมาก หรือเกือบจะไม่พบเลย และจากการสังเกต fiber ซึ่งให้ผลบวกในบริเวณนี้ ก็พบ IRF ได้ในปริมาณซึ่งใกล้เคียงกัน โดยในบริเวณ cochlear nucleus นี้เป็นที่ทราบแล้วว่าเป็นจุดสิ้นสุดของเส้นประสาท vestibulo-cochlear nerve (N VIII) จากนั้นจะวิ่งเข้าสู่บริเวณ primary auditory cortex และจะมี synape ที่ superior olivary nucleus, trapezoid body, nucleus of lateral lemniscus, tectum of inferior colliculus และ medial geniculate nucleus ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวเป็นส่วนหนึ่งของระบบนี้ โดยจะได้กล่าวถึงผลการศึกษาต่อไป

จากการทดลองครั้งนี้ ในบริเวณ cochlear nucleus พบว่าขัดแย้งกับ

การทดลองของ Zettel และคณะ (1991)ได้ศึกษาพบ CaLB-IRN ใน cochlear nucleus ในพวก bushy และ multipolar cells บริเวณ ventral cochlear nucleus ความแตกต่างของการทดลองนี้ เป็นไปได้ว่าเกิดจากการใช้ antibody ซึ่งมีแหล่งผลิตที่แตกต่างกัน โดยมักพบเสมอว่า CaLB มักมี cross reaction กับ calretinin ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันมาก แต่ถ้าเป็น monoclonal antibody แล้ว ปัญหาเหล่านี้ก็จะหมดไป นอกจากชนิดของ antibody ที่ใช้แล้ว อาจจะขึ้นกับชนิดของสัตว์ทดลองก็เป็นไปได้ ในค้างคาวพบว่า ความสำคัญของระบบนี้ จะมีค่อนข้างสูงจึงมีความเป็นไปได้ว่า จะมีการพัฒนาของระบบนี้ แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่น ๆ

Celio (1990) ได้ศึกษาและพบว่าในบริเวณ cochlear nucleus ให้ผลบวกต่อการย้อม PV อย่างเด่นชัดในบริเวณ ventral ส่วน dorsal ให้ผลบวกเพียงเล็กน้อยจากการย้อมทั้งสองวิธี ส่วนจากการทดลองของ Pochet และคณะ (1985) ไม่พบ CaIb-IRN ใน nucleus แต่กลับพบว่า จากการย้อม calretinin ให้ผลบวกเด่นชัด อย่างไรก็ตาม Pochet ได้สรุปถึง ในบริเวณ auditory system ว่ามีการกระจายของ CaLB น้อยมาก ตรงข้ามกับข้อสรุปของ zettel และคณะ ซึ่งเขาได้บอกว่า CaLB จะมีการกระจายอย่างกว้างขวางในระบบนี้ ใน mustached bat แต่จากการทดลองในครั้งนี้ จะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับของ Celio และ Pochet

บริเวณ medial superior olive พบมี CaLB-IRN ได้ในปริมาณปานกลาง โดยจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วน PV-IRN พบได้ในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งตรงกับการทดลองของ Zettel และคณะ (1991) และเขายังได้สรุปว่า CaLB-IRN ในบริเวณนี้ว่าเป็น marginal cells อีกด้วย ซึ่งให้ผลตรงกับการทดลองครั้งนี้ ส่วนในตำแหน่งของ lateral superior olive ปรากฏว่าไม่สามารถหาตำแหน่งที่แน่นอนได้ แต่ก็คาดว่าอาจจะให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับ medial superior olive ก็เป็นไป

บริเวณของ periolivary nucleus จากการทดลองพบมีปริมาณ CaLB-IRN เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วน PV-IRN พบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างมากกว่า และ IRF พบได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งการทดลองที่ได้ในบริเวณนี้เหมือนกับการทดลองของ Zettel และคณะ (1991) ซึ่งได้ทดลองในค้าวคาวดังกล่าวแล้วข้างต้น และพบว่าขนาด และรูปร่างของเซลล์ให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วย

บริเวณ inferior colliculus นั้น พบว่ามี CaLB-IRN อยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณ external และ dorsal cortex ส่วนบริเวณ central nucleus ไม่พบว่ามี IRN เลย ส่วน PV-IRN จากการทดลองพบว่ามีการกระจายอยู่ทั่วไปทุกบริเวณ และปริมาณ fiber จากการย้อมทั้งสองวิธีโดยรวมแล้วก็พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันในปริมาณปานกลางจนถึง

หนาแน่น จากการทดลองจะเห็นว่าในบริเวณนี้ไม่สามารถที่จะแยกความแตกต่างของการย้อมทั้งสองวิธีได้อย่างแน่นอนนัก นอกจากบริเวณ central nucleus ซึ่งพบว่ามี PV-IRN และ PV-IRF มากกว่า CaLB-IRN และ CaLB-IRF ซึ่งการทดลองในบริเวณนี้ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Zettel และคณะ (1991) ด้วย อย่างไรก็ตามโดยทั่วไป จะเห็นว่าแนวโน้มของ IRN ในบริเวณนี้ให้ผลบวกเด่นชัดต่อการย้อม PV มากกว่า CaLB ซึ่งตรงกับการทดลองของ Celio (1990) ที่ศึกษาในหนู ผลการทดลองของเขาพบว่ามีความแตกต่างกันมากจากการย้อมทั้งสองวิธี แต่ celio ไม่ได้แบ่งบริเวณของ inferior collicalus อย่างละเอียด เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ส่วนการทดลองของ Zook และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาในแต่ละบริเวณ ของ inferior colliculus เช่นกัน เขาได้พบว่าในบริเวณ central nucleus ของ inferior collicalus จะมีเซลล์ในขนาดต่าง ๆ กัน และเป็นพวก multipolar cell โดย CaLB-IRN จะมีขนาด 7-18 um ส่วนบริเวณ external และ dorsal cortex พบว่า CaLB-IRN จะติดสีเข้ม และส่วนใหญ่จะเป็น neuropil จะเห็นว่าผลการศึกษาของเขา มีความใกล้เคียงกับการทดลองนี้พอสมควร

บริเวณ trapezoid nucleus ซึ่งเป็นบริเวณ ที่เกี่ยวข้องกับ anditory pathway จากการทดลองพบมี CaLB-IRN และ PV-IRN ในปริมาณที่หนาแน่นใกล้เคียงกัน และความเข้มของปฏิกิริยา พบว่า CaLB-IRN มีความเข้มมากกว่า PV-IRN บ้างเล็กน้อย ส่วน IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีก็พบว่าให้ผลบวกที่ใกล้เคียงกันด้วย Zettel และ O'Neill (1991) ทำการย้อม CaLB ใน nucleus นี้ก็พบว่าให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน เซลล์ซึ่งให้ผลบวกเป็นพวก medium sized neurons มีขนาด 12-15 um ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองนี้โดยพบมีขนาด 13-20 um จะเห็นว่าการทดลองที่ได้นี้ มีผลการทดลองไม่แตกต่าง ๆ จากการทดลองอื่นๆมากนัก เช่น การทดลองของ Celio ในปี 1990 ก็ให้ผลที่เหมือนกัน

บริเวณ medial geniculate body นั้น เป็นที่สิ้นสุดของเส้นใยประสาทจาก tectum ของ inferior colliculus และรวมเป็น anditory radiation ไปยัง primary anditory cortex เพื่อไปแปลผลที่สมองต่อไป (มีชัย ศรีใส, 2530) พบว่าในบริเวณนี้พบทั้ง IRN และ IRF กระจายโดยทั่วไปทั้งบริเวณ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CaLB-IRN จะมีปริมาณที่หนาแน่นกว่า PV-IRN ซึ่งติดสีค่อนข้างจาง และเห็นขอบเขตได้ไม่ชัดเจน ส่วนการแบ่งส่วนต่าง ๆ ในบริเวณ medial geniculate body นั้น แบ่งตามการศึกษาของ Oliver และ Hall (1978 a) ที่ได้ทำการศึกษาไว้ในกระแต เช่นเดียวกัน โดยเขาทำการย้อมในบริเวณนี้ โดยวิธี golgi impregnated method และศึกษากลุ่มต่าง ๆ ของเซลล์ประสาท และได้ทำการแบ่งออกเป็น 3 subdivisions คือ ventral,dorsal และ medial นอกจากนี้ยังได้สรุปว่า ในแต่ละ class ของ auditory pathway จะผ่านเข้าไปในแต่ละ subdivision

แล้วจึงผ่านเข้าไปใน neocortex โดยรายละเอียด จะไม่กล่าวถึง แต่การทดลองที่ได้ในครั้งนี้ มี CaLB-IRN พบในปริมาณปานกลางจนถึงหนาแน่น โดยไม่สามารถที่จะชี้ชัดได้ว่าทุกเซลล์หรือไม่ที่ให้ผลบวก แต่จากการเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ซึ่งได้จากการย้อมโดยวิธีของ Oliver และ Hall (1978 a) คาดว่ามีเพียง 70-80% ของเซลล์ทั้งหมดที่มี CaLB-IRN และ 20-40% ที่มี PV-IRN ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Zettel และ O'Neill (1991) ที่ได้สรุปว่าเกือบทุกเซลล์ในบริเวณนี้ จะเป็น CaLB-IRN, ในบริเวณของ ventral division จะพบมี CaLB-IRN ที่หนาแน่นกว่า บริเวณอื่น ๆ โดยให้ผลเช่นเดียวกัน ในการทดลองของ Celio (1990) และปริมาณ IRF ในบริเวณนี้ พบมี PV-IRF อย่างหนาแน่น ส่วน CaLB-IRF พบในปริมาณปานกลางเท่านั้น และยังมีการกระจายไม่สม่ำเสมอกันนัก

จากการทดลองของ Hashikawa และคณะ (1991) ศึกษาทั้ง CaLB และ PV โดยวิธี fluorescent tracer ควบคู่กับ immunohistochemistry พบว่าทั้ง CaLB-IRN และ PV-IRN จะส่งเส้นใยประสาทไปยัง layer IV และ layer I ใน primary anditory cortex และเขายังได้สรุปว่า IRN เหล่านี้ มันทำหน้าที่เป็น relay neurons ในระบบนี้ โดยสรุปแล้วจะเห็นว่า ใน anditory system นี้ โดยส่วนใหญ่จะให้ผลบวกทั้ง CaLB และ PV ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ก็มีบางการทดลอง (Hashikawa et al., 1991) ได้ศึกษาและสรุปว่า principle pathway จากบริเวณ midbrain ไปยัง cerebral cortex มีรูปแบบของ "parvalbumin system" อย่างไรก็ตามข้อสรุปของเขาก็ยังไม่ได้รับการยืนยันจากการทดลองอื่น ๆ เลย โดยเฉพาะจากการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบทั้ง CaLB และ PV ในปริมาณไม่ต่างกันมากนัก ยกเว้นในบริเวณ central nucleus ของ inferior colliculus เพียงแห่งเดียวเท่านั้น

Vestibular system

จากการทดลองพบว่าในบริเวณต่าง ๆ ของ vestibular nucleus ให้ผลการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดจากการย้อมทั้งสองวิธีในทุกบริเวณ ของ nuclei นี้ ได้แก่ medial, superior, lateral และ spinal vestibular nuclei โดยพบ PV-IRN ในปริมาณที่หนาแน่น ส่วน CaLB-IRN ไม่ให้ผลบวกเลย นอกจากนี้ IRF จากการย้อมทั้งสองวิธีพบให้ผลบวกเช่นเดียวกัน แต่ PV-IRF ค่อนข้างหนาแน่นมากกว่า CaLB-IRF ในบริเวณ medial vestibular nucleus

เป็นที่ทราบแล้วว่าใน vestibular nuclei เหล่านี้ จะได้รับ main input จาก vestibular receptors และ cerebellum โดยจะมี reciprocal connections กับ

flocculonodular lobe และ fastigial nuclei ของ cerebellum ซึ่งใน fastigial nuclei จะพบว่ามี PV-IRN อย่างชัดเจนเช่นกัน ส่วน CaLB-IRN ไม่ให้ผลบวกเลย จึงมีความเป็นไปได้ว่าการติดต่อระหว่าง vestibular nuclei และ fastigial nuclei มีความเกี่ยวข้องกับ PV ด้วย นอกจากนี้ output ของ vestibular nuclei จะส่งไปยัง spinal cord, cerebellum และ brain stem โดยผ่านทาง medial longitudinal fasciculus ไปยัง ventral posterior inferior thalamic nucleus ซึ่งใน medial longitudinal fasciculus ก็พบว่า fiber ของมัน ให้ผลบวกเฉพาะการย้อม PV เท่านั้นเช่นกัน

จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Garcia-Segura และคณะในปี 1984 ซึ่งพบว่าใน vestibular nuclei ให้ผลลบต่อการย้อม CaLB ส่วนจากการศึกษาปริมาณ PV ใน nuclei นี้ของ Ohshima และคณะในปี 1991 ก็พบว่าให้ผลบวกอย่างเด่นชัดและหนาแน่นเช่นเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ ส่วนการศึกษาใน peripheral vestibular system ไม่ได้ทำการศึกษาไว้ในครั้งนี้ แต่ก็ได้มีผู้ศึกษาไว้ในสัตว์หลายชนิด เช่น ในแมว (Sans et al., 1986) และใน cartilaginous fish (Rodriguez-Moldes et al., 1990) เป็นต้น โดยพบว่าในบริเวณ vestibular ganglion neurons และ vestibular sensory hair cells ให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ส่วนการทดลองของ Eybalin และ Ripoll ในปี 1990 พบว่า ในบริเวณ inner hair cells ของ organ of corti และ spiral ganglion neurons ให้ผลบวกต่อการย้อม PV และเขายังพบอีกว่า PV-IRN ในบริเวณนี้ มีการหลั่ง neurotransmitter คือ glutamate และหรือ aspatate อีกด้วย และยังได้สรุปว่า PV อาจจะมีบทบาทในการควบคุม ภายหลังการเข้าไปของ potassium ions ระหว่าง transduction process ก็เป็นได้

อย่างไรก็ตามโดยสรุปของ vestibular system นี้ มีความแตกต่างของปริมาณ CaLB และ PV อย่างชัดเจน โดยเป็นไปได้ว่า parvalbumin จะเป็นตัวสำคัญในระบบนี้อย่างแน่นอน

Visual system

จากการทดลองพบว่าในบริเวณ lateral geniculate nucleus ให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ทั้งปริมาณ IRN และ IRF ส่วนความหนาแน่นของชั้นต่าง ๆ ในบริเวณนี้ พบว่ามีความแตกต่างไปได้บ้าง ซึ่งไม่ได้รายงานไว้โดยละเอียด อย่างไรก็ตาม พบว่า CaLB-IRN มีลักษณะการติดสีที่เข้มชัดกว่า PV-IRN และมีการกระจายอยู่ห่าง ๆ กัน

มิชัย ศรีใส (2530) ได้สรุปถึง lateral geniculate nucleus ว่า ทำหน้าที่เป็น sensory relay nucleus ของ dorsal thalamus โดยประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ประสาท 6 ชั้น ซึ่ง 4 ชั้นบนจะประกอบไปด้วยเซลล์ประสาทที่มีขนาดเล็ก ส่วน 2 ชั้นล่างจะพบมีเซลล์ซึ่งมีขนาดใหญ่ และเส้นใยจาก lateral geniculate nucleus จะรวมเป็น visual radiation ไปยังบริเวณ visual cortex เพื่อแปลผลต่อไป

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าให้ผลตรงกับการทดลองของ Demeulemeester และคณะ (1989) และ Celio (1990) ซึ่งพบว่า lateral geniculate nucleus ให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าในบาง CaLB-IRN และ PV-IRN เป็นเซลล์เดียวกันอีกด้วย ได้มีบางงานวิจัยพบว่า ในบริเวณนี้ให้ผลลบจากการย้อม CaLB (Garcia-Segura et al., 1984) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองโดยส่วนใหญ่ โดยในการทดลองเขาได้ทำการสกัด poly clonal antibody ขึ้นเอง ซึ่งได้มาจากบริเวณ duodenum ซึ่งวิธีการอาจจะไม่ดีพอ จึงทำให้เกิด false negative ขึ้นได้

Tigges (1991) ได้สรุปถึงหน้าที่ของ PV ในระบบนี้ว่ามีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับ visual information processing เพราะเขาได้ทำการทดลองและพบว่า ภายหลังจากทำ monocular enucleation ใน rhesus monkeys ก็ยังพบว่า มี PV-IRN ยังคงอยู่ใน lateral geniculate nucleus และ PV-IRF ก็ยังคงพบอยู่ทั้ง 6 ชั้นของบริเวณนี้ด้วย ส่วนความเปลี่ยนแปลงของ CaLB-IRN และ CaLB-IRF ไม่ปรากฏว่ามีการศึกษาไว้ ส่วนการศึกษาของ Stichel และ Heizmann (1988) พบว่า PV ให้ผลบวกในทุกชั้น เช่นเดียวกับการทดลองนี้ โดย PV-IRN จะมีรูปร่างกลม และกระสวย โดยมีขนาดที่ค่อนข้างเล็ก ซึ่งให้ผลตรงกันกับการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาในระดับ ultrastructure พบว่า reaction จะอยู่ในส่วนต่าง ๆของเซลล์ คือ perikarya, axons และ dendrites และยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ microtubules และบริเวณ postsynaptic ด้วย นอกจากนี้เขายังพบว่าในบริเวณ perigeniculate nucleus พบ PV-IRN เป็นเซลล์เดียวกับ GABAergic neurons อีกด้วย ส่วนบริเวณ dorsolateral geniculate nucleus ก็พบเช่นเดียวกัน

ในบริเวณ superior colliculus จากการย้อมทั้งสองวิธีพบว่าให้ผลบวกค่อนข้างใกล้เคียงกันทั้ง IRN และ IRF, ทั้งสองวิธี พบมี IRN ในปริมาณไม่มากนักโดยพบได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยจนถึงปานกลาง กระจายโดยทั่วไปทุกชั้นสม่ำเสมอกัน และขนาดของเซลล์ซึ่งให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีก็มีขนาดไร่เรี่ยกัน โดย PV-IRN มักจะมีขนาดใหญ่กว่า CaLB-IRN เพียงเล็กน้อย

ในบริเวณ optic tract พบ CaLB-IRF และ PV-IRF ในปริมาณเท่ากัน โดยลักษณะการเรียงตัวของ fiber ค่อนข้างสม่ำเสมอและเป็นระเบียบ ซึ่งการทดลองที่ได้พบว่า

เหมือนกับการทดลองของ Celio (1990)

จากการทดลองของ Celio และ Heizmann (1981) ก็พบเช่นกันว่า CaLB-IRN พบได้ในทุกชั้นของ superior colliculus เขายังได้สังเกตว่าในชั้นของ intermediate layer เซลล์ซึ่งให้ผลบวกจะมีขนาด 6-8 um ซึ่งจะเห็นว่าแตกต่างจากการทดลองนี้ ซึ่งพบขนาด 10-20 um อาจจะเป็นไปได้ว่าสัตว์ซึ่งนำมาศึกษาเป็นคนละชนิดกัน แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองของเขา ก็ยังพบว่ามีเซลล์ขนาด 20-25 um บ้างเล็กน้อย และเป็นเซลล์ซึ่งจะกระจายผ่านชั้น deep gray layer ลงไป แต่จากการทดลองนี้ไม่พบเซลล์ขนาดดังกล่าวให้ผลบวกจากการย้อม CaLB เลย ส่วนการศึกษา PV-IRN ในบริเวณ superior colliculus นั้น พบว่ามีไม่มากนัก เช่น การทดลองของ Illing และคณะ (1990) ทำการย้อม PV ในบริเวณ superior colliculus และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งเขาได้ทำการทดลองในหนู และได้สรุปว่า PV-IRN ในชั้น intermediate layer มีความเกี่ยวข้องกับ acetylcholinesterase โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ medial part ของ superior colliculus ส่วน cytochrome oxidase นั้น พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับเซลล์นี้

การศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาในบริเวณ peripheral visual system แต่จากการศึกษาอื่น ๆ เช่นบริเวณ retina พบว่ามีเฉพาะ cone cells เท่านั้น ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม CaLB ส่วน rod cells ไม่ปรากฏมี immunoreactive (Verstappen et al., 1986) และจากการย้อม PV ก็ยังไม่พบมีผู้ศึกษาไว้ใน peripheral visual system นี้เลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการย้อม calbindin - D28K และ parvalbumin ในบริเวณต่างๆ ของสมองกระแต (Tupaia glis) โดยวิธี immunohistochemistry พบมี immunoreactive neurons และ immunoreactive fibers กระจายโดยทั่วไปในเกือบทุกบริเวณของสมองและได้พบว่าบริเวณซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม calbindin-D28K มากกว่า parvalbumin อย่างชัดเจนได้แก่บริเวณเหล่านี้คือ thalamus, hypothalamus, limbic system (ยกเว้น hippocampal formation), sensory system, superior olive ส่วนบริเวณซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม parvalbumin ชัดเจนกว่า calbindin - D28K ได้แก่ pyramidal system, reticular formation, cerebellar nuclei, vestibular system, cochlear nucleus และ periolivary nucleus นอกจากนี้พบว่าบริเวณซึ่งให้ผลบวกจากการย้อมทั้งสองวิธีที่มีปริมาณใกล้เคียงกันได้แก่ olfactory system, trapezoid nucleus, medial geniculate nucleus, visual system, hippocumpal formation, cerebral cortex, cerebellar cortex และ extrapyramidal system ซึ่งความแตกต่างของการกระจายในโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ แสดงให้เห็นว่า หน้าที่ของมันภายในสมองมีความแตกต่างกันด้วย

ข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยคิดว่าน่าจะมีการศึกษา calcium binding protein ทั้งสองชนิดนี้ต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในคนนั้น ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ทั้งปริมาณของโปรตีนเหล่านี้ ในภาวะปกติและภาวะที่เป็นโรค นับว่าน่าสนใจอย่างยิ่งซึ่งถ้ามีการศึกษาอย่างเพียงพอจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปค้นหาวิธีรักษา และหาสาเหตุของโรคของระบบประสาทต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย