บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

สัตว์ทดลอง สารเคมี ยาสลบและเครื่องมือ

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) ทั้งสองเพศ น้ำหนักระหว่าง 200-320 กรัม

สารเคมี

1. horseradish peroxidase (HRP, Sigma type VI)

2. fixative ประกอบด้วย 1 % paraformaldehyde, 1.5 % glutaraldehyde, และ 4 % sucrose ใน 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4

3. HRP developers ประกอบด้วย

3.1 สารละลาย 3,3',5,5' tetramethyl benzidine (TMB, Sigma)

3.2 สารละลาย gelatin buffer

3.3 สารละลาย sodium nitroprusside

3.4 0.75 % hydrogen peroxide (H_2O_2)

4. stain ประกอบด้วยสารละลาย 1 % aqueous neutral red

ดูรายละเอียดของการเตรียมสารละลายต่าง ๆ จากภาคผนวก

ยาสลบ

ใช้สารละลาย pentobarbital sodium ขนาด 35 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ฉีดเข้าทางช่องท้อง

เครื่องมือ

1. stereotaxis ที่ใช้สำหรับหนู (Narishige Scientific Laboratory, Tokyo)
2. electronic stimulator (Nihon Kohden model SEN-1101)
3. stimulus isolator (Nihon Kohden model SS-301 J)
4. cathode ray oscilloscope (Dual-beam memory oscilloscope, VC-10)
5. microelectrode amplifier
6. pre-amplifier (Nihon Kohden model AVB 8, AVZ 8)
7. micropipette puller
8. capillary glass tubing
9. electrode resistance meter
10. เครื่องมือผ่าตัด
11. perfusion set
12. freezing microtome (American Optical Company, N.Y., U.S.A.)
13. microprojector (Bausch & Lomb, N.Y., U.S.A)
14. light microscope ประกอบด้วยเลนส์กำลังขยาย 20 x 4, 20 x 10, 20 x 20, 20 x 40 และ 20 x 100 ตามลำดับ (Olympus model BH-2)
15. เครื่องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดควบคุมด้วย microprocessor (Olympus model PM-10 AD)
16. อุปกรณ์สำหรับผลิตภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

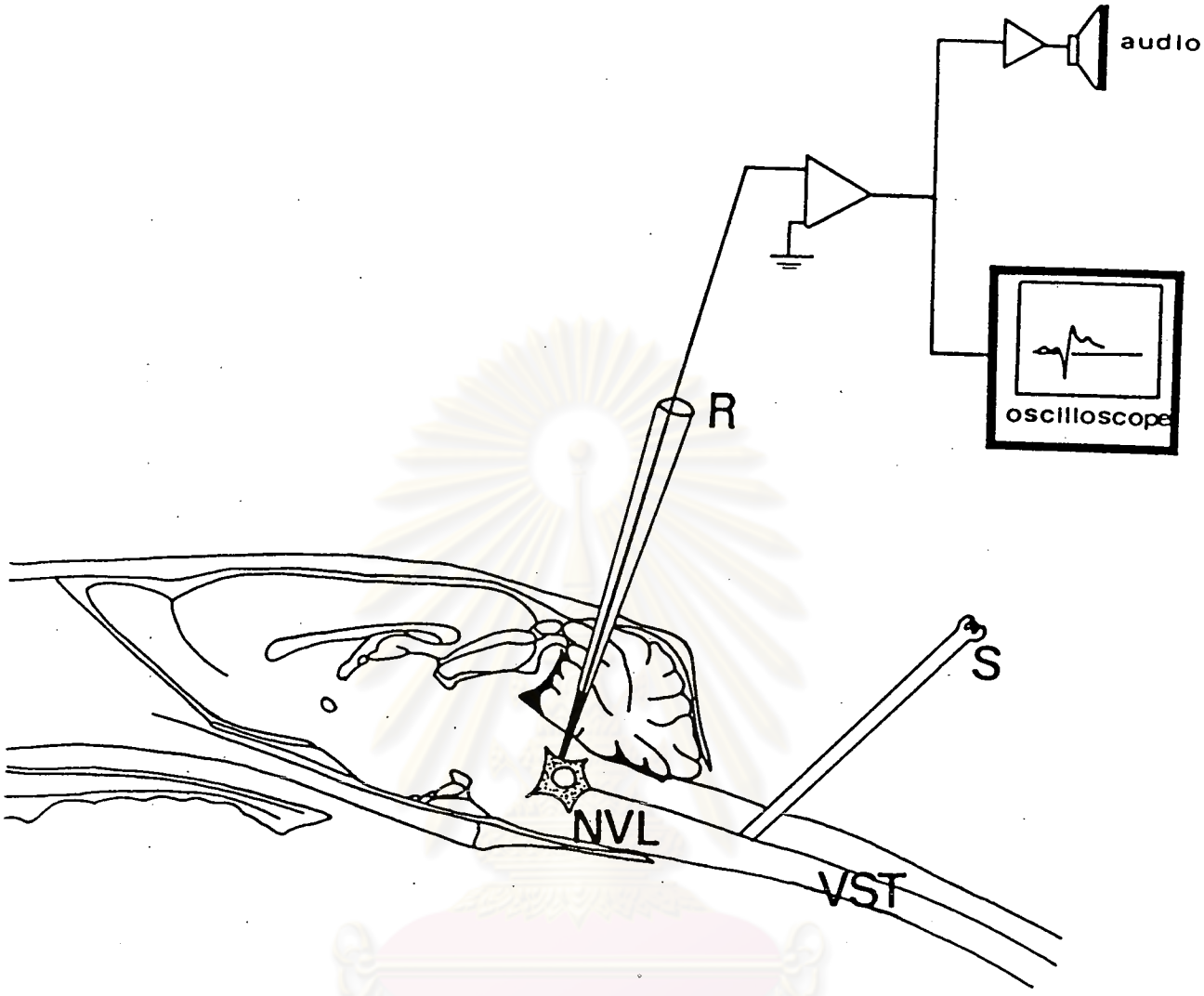
การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำให้หนูขาวหมดความรู้สึกโดยใช้สารละลาย pentobarbital sodium ขนาด 35 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ฉีดเข้าทางช่องท้อง เมื่อหนูสลบ ตรึงศีรษะหนูไว้ใน stereotaxis

ที่ใช้สำหรับหนู ตามวิธีของ Fifkova และ Marsala[22] หลังจากนั้นจึงกรีดหนังศีรษะตามแนวกลางตัวจากบริเวณ frontal ถึงกระดูกต้นคอชิ้นที่ 2 ทำ craniotomy บริเวณเหนือ cerebellum และทำ laminectomy ของกระดูกต้นคอชิ้นที่ 1 และ 2 จากนั้นเปิดชั้น dura matter บริเวณ cerebellum lobule ที่ 5 และ 6 เพื่อให้เป็นทางผ่านของ micropipette ลงไปสู่ lateral vestibular nucleus (NVL) และเปิด dura matter บริเวณเหนือไขสันหลังบริเวณกระดูกต้นคอชิ้นที่ 1 และ 2 ด้วย เพื่อให้เป็นทางผ่านของ stimulating electrode ลงไปสู่ lateral vestibulospinal tract (VST)

การหาตำแหน่งของ NVL

NVL เป็นต้นกำเนิดของ VST โดยที่วิถีประสาทของ VST ส่งผ่านจาก NVL ลงมาตามแนวล่างของไขสันหลังและไปสิ้นสุดที่บริเวณ lumbosacral[23] ดังนั้นเพื่อความถูกต้องในการหาตำแหน่งของ NVL จึงใช้เทคนิคทาง electrophysiology เข้าช่วย ตามการทดลองของ M.Ito และคณะที่ทำไว้เมื่อปี ค.ศ. 1964[6] โดยใช้ monopolar stainless steel electrode แทงลงไปในไขสันหลังบริเวณกระดูกต้นคอชิ้นที่ 2 โดยแนวของ electrode ห่างจากแนวกลางของไขสันหลังประมาณ 0.5-1 มม. แทงลงไปจนถึงส่วนล่างของไขสันหลัง ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่ VST ทอดผ่านลงมา จากนั้นกระตุ้นด้วย square pulse ใช้ความถี่ 2 Hz, duration 0.1 msec, ความแรงของกระแส 100-300 μA ซึ่งกำเนิดมาจาก electronic stimulator และ stimulus isolator ในขณะที่กระตุ้น VST นั้น ใช้ capillary glass micropipette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตอนปลาย 1.25 - 2.5 ไมครอน บรรจุด้วย 2M NaCl มีความต้านทาน 1-3 MΩ เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดความต้านทานใน normal saline, เป็น recording electrode แทงผ่านลงไปใน cerebellum lobule ที่ 5-6 โดยให้แนวแกนของ electrode ทำมุม 20° กับแนวตั้ง ณ ระดับความลึกโดยประมาณ 4.85-5.5 มม.(ดังแสดงในรูปที่ 1) ทำการบันทึก antidromic field potential ที่ปรากฏภายใน NVL จะเห็นลักษณะ negative field potential ที่มีขนาดใหญ่ (ดังแสดงในรูปที่ 2)



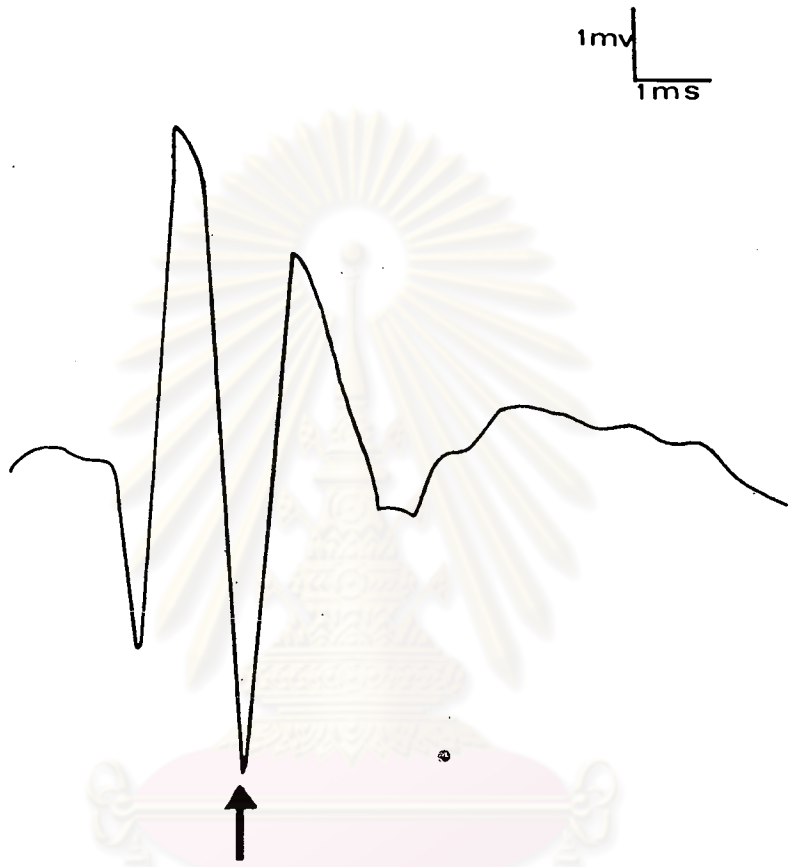
NVL : LATERAL VESTIBULAR NUCLEUS

VST : LATERAL VESTIBULOSPINAL TRACT

S : STIMULATING ELECTRODE

R : RECORDING ELECTRODE

รูปที่ 1 แสดงแผนภาพการจัดเครื่องมือ ตำแหน่งของ NVL และ VST ในการทดลองครั้งนี้



ANTIDROMIC FIELD POTENTIAL OF DEITERS' NUCLEUS

CALIBRATION : 1 ms , 1 mv

รูปที่ 2 แสดงลักษณะ Antidromic Field Potential ของ NVL จะเห็น negative field potential ขนาดใหญ่ (ลูกศรชี้)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีฉีด HRP

เมื่อได้ตำแหน่งของ NVL แล้ว จึงแทนที่ recording glass microelectrode ด้วย glass micropipette ที่บรรจุสารละลาย 30-50 % HRP ใน Tris HCl buffer pH 8.6 และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตอนปลาย 12.5-25 ไมครอน ความต้านทาน 2-3 MΩ เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดความต้านทานใน normal saline การฉีด HRP ทำโดยวิธี microelectrophoresis โดยการผ่านกระแสไฟฟ้า DC ขนาด 2-3 μA ให้ปลายไปเปดเป็นขั้วบวก ใช้เวลาผ่านนาน 5 นาที หลังจากนั้นทิ้งไปเปดไว้ในสมองของสัตว์ทดลองอีก 5 นาที เพื่อให้สารละลาย HRP แพร่กระจายไปในเนื้อสมองได้อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงดึงออก เมื่อฉีด HRP เรียบร้อยแล้ว เย็บปิดหนังศีรษะ สัตว์ทดลองจะฟื้นเป็นปกติภายใน 4-6 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่อีกประมาณ 24-72 ชั่วโมง

วิธีทำให้เนื้อสมองคงรูป (perfusion-fixation)

เมื่อครบกำหนดเวลาที่ต้องการให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบอีกครั้ง ด้วยสารละลาย pentobarbital sodium ในขนาดสูงไม่เกิน 50 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ฉีดเข้าทางช่องท้องและตัด jugular vein ทั้งสองเพื่อให้เป็นทางออกของเลือดและสารละลาย จากนั้นปิดทางเพื่อไม่ให้สารละลายไหลไปยังอวัยวะส่วนล่างของร่างกายโดย clamp บริเวณ descending aorta ช่วงอก ทำการไล่แทนที่เลือดที่ไปเลี้ยงสมองและอวัยวะส่วนบนของร่างกายด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 โดย perfuse เข้าไปในหัวใจห้องล่างข้างซ้าย ผ่านทางเข็มฉีดยาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงในประมาณ 1 มม. แล้วผ่านสารละลายให้ไหลเข้าไปจนกระทั่งน้ำที่ไหลออกทาง jugular vein มีลักษณะใส จึงแทนที่สารละลายนี้ด้วย fixative solution ปริมาตร 300-500 มล.ต่อหนู 1 ตัว ตัดหัวหนูและแกะกระโหลกเอาสมองออกทันที กรีดสมองข้างขวาตามแนวยาว เพื่อเป็นเครื่องหมายบอกให้ทราบว่าเป็นข้างขวา จึงนำสมองแช่ใน fixative solution ชนิดเดิมอีกประมาณ 12-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วเปลี่ยนแช่สมองในสารละลายของ 30 % sucrose ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกระทั่งสมองจมลงในสารละลาย (ปกติใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง) ซึ่งจะแสดงว่า fixative ได้แพร่เข้าไปในเนื้อสมองอย่างสมบูรณ์แล้ว

รายละเอียดของการเตรียมสารละลาย fixative ดูในภาคผนวก

ปฏิกิริยาทางฮิสโตเคมีเพื่อแสดง granules ของ HRP ภายในเซลล์

นำสมองที่ผ่านขบวนการ fixative แล้ว มาทำ frozen section ตาม fronatal plane หนา 50 ไมครอน โดยใช้ freezing microtome และเก็บ section ทุก ๆ 1 ใน 3 เรียงตามลำดับไว้ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.4, ที่อุณหภูมิ 4° ซ หลังจากนั้นนำ section มาทำปฏิกิริยาทางฮิสโตเคมีเพื่อให้ HRP granules ปรากฏ โดยใช้ H_2O_2 เป็น substrate และ 3,3',5,5' tetramethyl benzidine (TBM) เป็น chromogen ตามวิธีของ Mesulam[24]

ดูรายละเอียดของ TMB process ในภาคผนวก

วิธีย้อมสี

นำสไลด์จากข้างต้นมาย้อมสีด้วยสารละลาย 1 % neutral red ใช้เวลาย้อมนาน 3-5 นาที จากนั้นล้างน้ำและ dehydrate ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 70, 90, 95, 100 %) แล้วจึงล้างแอลกอฮอล์ด้วย xylene ปิด section ด้วย cover slip ทิ้งไว้ให้แห้ง

ดูรายละเอียดของการเตรียมสารละลาย วิธีย้อมสี และขั้นตอนของการ dehydrate ในภาคผนวก

การศึกษาทางฮิสโตโลยี

นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาศึกษา macroscopic topography ในขั้นแรกทำการสร้างแผนภูมิของสมองตาม section ตัวอย่าง โดยใช้ microprojector ฉายภาพ section ต่าง ๆ เหล่านั้น แล้ววาดภาพ section พร้อมทั้งรายละเอียดทางกายวิภาคและประมวลลำดับของ section เป็น serial diagram ของสมองหนูแต่ละตัว จากนั้นจึงกำหนดตำแหน่งต่าง ๆ ของสมองตามแผนที่สมองหนูของ Pellegrino และ Cushman[25] แล้วจึงนำสไลด์เหล่านั้นมาตรวจดูอย่างละเอียดทางจุลกายวิภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 x 4, 20 x 10, 20 x 20, 20 x 40, และ 20 x 100 ตามลำดับ เพื่อหาเซลล์ที่มีอนุพันธ์สีน้ำเงินของ HRP ปรากฏอยู่ (positive labeled cell) ทำการบันทึกตำแหน่งของเซลล์เหล่านั้นลงใน serial diagram ของสมองที่สร้างขึ้นจากหนูแต่ละตัว

รายละเอียดของสัตว์ทดลอง ขนาดของไปเปต กระแสและระยะเวลาที่ใช้ในการฉีด HRP ความลึกของไปเปต และระยะเวลาที่ปล่อยให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ภายหลังการฉีด HRP แสดงไว้ในตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับน้ำหนัก เพศของหนูขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปลายไปเปต ความต้านทาน กระแส DC และระยะเวลาที่ใช้ในการฉีด HRP ความลึกของไปเปต ระยะเวลาที่ปล่อยให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่อีกภายหลังจากการฉีด HRP ในการวิจัยครั้งนี้

สัตว์ทดลอง Rat No.	น้ำหนัก (ก.)	เพศ	เส้นผ่า – ศูนย์กลาง (ไมครอน)	ความต้านทาน (MΩ)	กระแส (μA) / เวลา (นาที)	ความลึก (มม.)	เวลาที่ให้สัตว์ทดลองมีชีวิต (ชั่วโมง)
R - 43	320	ผู้	18	2.2	2 x 5	5.05	26
R - 44	300	ผู้	15	3	2 x 5	4.95	24
R - 49	260	เมีย	12.5	2	3 x 5	4.95	46
R - 50	260	ผู้	18	2	2 x 5	5.05	30
R - 53	300	ผู้	18	2.5	2 x $5\frac{1}{2}$	5.15	28
R - 54	280	ผู้	18	2.5	2 x $5\frac{1}{2}$	5.10	26
R - 56	300	ผู้	18	2	2 x 5	5.25	30
R - 59	300	ผู้	18	2.5	2 x $5\frac{1}{2}$	5.05	40
R - 64	280	ผู้	25	3	3 x 5	5.10	48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย