บทที่ 3

วิธีทำการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electrical Stimulator)

เป็นเครื่องมือที่ปล่อยสัญญาณไฟฟ้าเป็นรูปต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อ เช่น สัญญาณรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (rectangular pulse), สัญญาณรูปคลื่น (sine wave) เป็นต้น ขณะที่ใช้สามารถควบคุมความถี่ (frequency), ความแรง (voltage) และ ช่วงเวลา (duration) ของลักษณะสัญญาณ (wave form) ต่าง ๆ ได้ ปัจจุบันนี้เรานิยมใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้าชนิดนี้กับผู้ป่วย เพราะสามารถควบคุมความแรง ความถี่ และลักษณะสัญญาณที่ต้องการกระตุ้นได้ดี

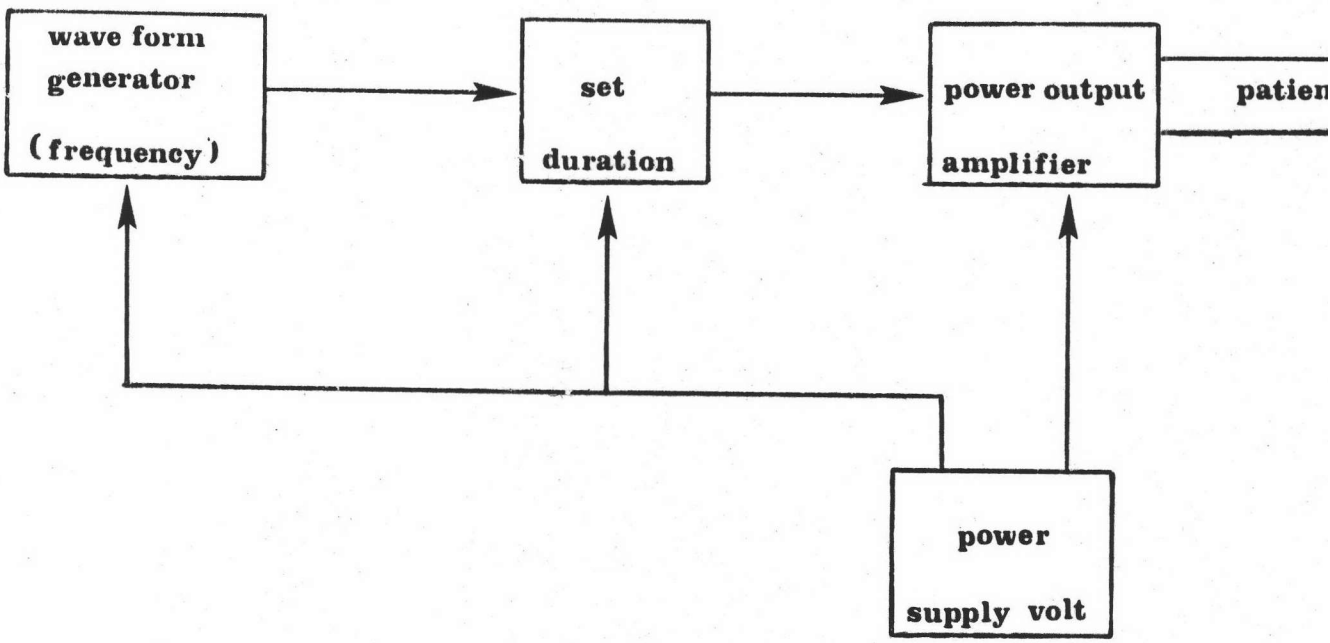
หลักการทำงานเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า จะมีหลักการโครงสร้างและการทำงานที่สำคัญ ดังนี้ (ประโยชน์ บุญสินสุข และคณะ, 2529)

1. ภาค power supply เป็นแหล่งจากไฟฟ้ากระแสตรง (Direct current) หรือไฟ DC ให้กับภาคต่าง ๆ เนื่องจากภาคต่าง ๆ ประกอบด้วย วงจรอิเลคทรอนิคส์ ได้แก่ ทรานซิสเตอร์, ไอซี จำเป็นต้องมีกระแสไฟฟ้าตรงมาจ่ายเข้าไปจึงจะทำงานได้

2. ภาค wave form generator เป็นวงจรผลิตรูปคลื่นไฟฟ้าชนิดต่างๆ เช่น square wave (rectangular), triangular, surge diadynamic current ในเครื่องกระตุ้นไฟฟ้าบางเครื่องสามารถผลิตรูปคลื่นไฟฟ้าได้หลายชนิดรวมอยู่ในเครื่องเดียวกัน วงจรที่ใช้ในภาคนี้ได้แก่วงจร oscililator แบบต่าง ๆ

3. ภาค set duration ทำหน้าที่รับรูปคลื่นไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จากภาค wave form generator เข้าปรับตั้งช่วงเวลาการเกิดหรือการหยุด (on-off) ของรูปคลื่นไฟฟ้าให้ได้ขนาดเวลาที่ต้องการนั่นคือ การปรับช่วงเวลาของ pulse interval หรือ pulse width นั่นเอง วงจรที่ใช้ในภาคนี้ได้แก่ วงจร monostable แบบต่าง ๆ

4. ภาค power output amplifier เนื่องจากรูปคลื่นไฟฟ้าที่ผ่านภาค set duration ได้รูปคลื่นไฟฟ้าที่สมบูรณ์แล้ว แต่ขนาด amplitude ยังเล็กอยู่ไม่สามารถนำไปกระตุ้นผู้ป่วยได้โดยตรง ภาค power output จึงต้องรับช่วงมาทำการขยายให้รูคลื่นไฟฟ้ามี amplitude สูงพอที่จะกระตุ้นผู้ป่วยได้



รูปที่ 11 แผนผังการทำงานของเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า

3.2 เครื่องฉายแสงเลเซอร์

เครื่องฉายแสงเลเซอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ เครื่อง endolaser 476 ซึ่งหัวฉายแสงเลเซอร์จะเป็นชนิดที่มีแสงนำทางภายในจะประกอบด้วย laser diode ชนิด Ga-As-Al ซึ่งจะให้แสงเลเซอร์ชนิดอินฟราเรดเลเซอร์ ซึ่งเป็นแสงเลเซอร์ที่มีพลังงานต่ำมีความยาวคลื่น 830 mm มีกำลัง 30 mw ให้จุดฉายแสงขนาดเล็ก (1 mm ที่ความห่างจากหัวฉายแสง 10 mm) ซึ่งแสงอินฟราเรดเลเซอร์ที่ออกมาจาก laser diode ชนิด Ga-As-Al สามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับแสง 4-5 เซนติเมตร

เครื่อง endolaser 476 สามารถเลือกใช้ 2 แบบคือ continuous และ pulsed แบบ continuous ใช้ในการรักษาอาการที่รุนแรงปานกลางและชนิดเรื้อรัง ในขณะที่แบบ pulse ใช้ในกรณีรุนแรงค่ากำลังที่ใช้รักษาสามารถกำหนดได้ 4 ระดับ (25, 50, 75, 100%) ขณะทำการใช้เครื่องฉายเลเซอร์ผู้ใช้จะต้องใส่แว่นป้องกันแสงเสมอ เพื่อความปลอดภัยต่อดวงตา และในการรักษาครั้งหนึ่งห้ามให้พลังงานมากกว่า 8-9 j/cm^2 หลักการเกิดแสงเลเซอร์และส่วนประกอบของเครื่อง endolaser 476 มีหลักการเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วในบทวารสารปริทัศน์

3.3 สัตว์ทดลอง (Animal)

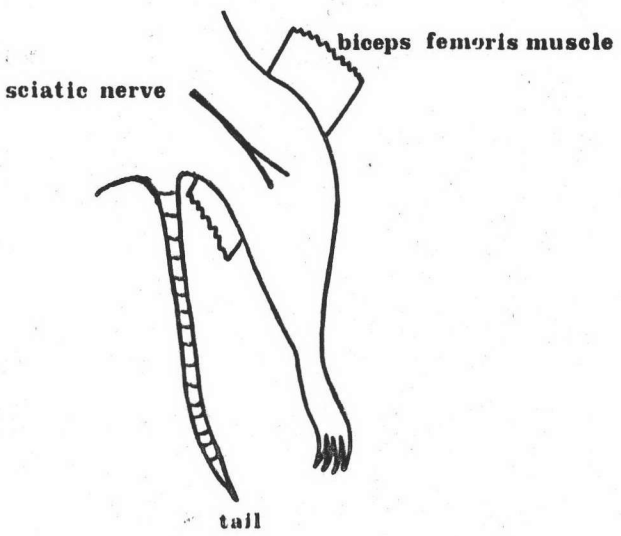
ใช้หนูแรท (wistar rat) เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 300-400 กรัม จำนวน 20 ตัว กล้ามเนื้อที่ทำการศึกษาคือ Tibialis anterior เป็นกล้ามเนื้อทางด้านหน้าของปลายขาทำหน้าที่กระดกข้อเท้าขึ้น (dorsiflexion) ถูกเลี้ยงโดยเส้นประสาท deep peroneal ซึ่งเป็นแขนงที่แยกมาจากเส้นประสาท common peroneal ซึ่งก็เป็นส่วนหนึ่งของเส้นประสาท sciatic

สาเหตุที่เลือกกล้ามเนื้อ Tibialis anterior มาทำการศึกษาเนื่องจากกล้ามเนื้อมัดนี้อยู่หน้าสุดของปลายขา สะดวกต่อการกระตุ้นด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า มองเห็นการตอบสนองได้ชัดเจนขณะทำการกระตุ้น และสะดวกต่อการฉายแสงเลเซอร์ เนื่องจากกล้ามเนื้ออยู่บริเวณหน้าสุดของปลายขา ซึ่งแสงเลเซอร์สามารถทะลุผ่านไปถึงได้ง่าย

3.4 <u>วิธีการทดลอง</u> แบ่งหนูทดลอง เป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว

<u>กลุ่มที่ 1</u> เป็นกลุ่มควบคุม (control group) ไม่ต้องทำอะไร

<u>กลุ่มที่ 2</u> เป็นกลุ่มที่ตัดเส้นประสาทออก (denervated group) กลุ่มนี้จะตัดเส้นประสาท sciatic ข้างขวาออก ก่อนตัดทำการสลบหนูด้วยยาสลบ Nembutal dose 35 mg./kg.b.w. เข้าทางช่องท้องตรึงตัวหนูด้วยกระดาษกาวโกนขนบริเวณต้นขาขวาออกให้สะอาด เช็ดด้วย alcohol 70% เพื่อฆ่าเชื้อโรค เปิดผิวหนังจะพบกล้ามเนื้อ biceps femoris ใช้มีดกรีดในแนวตั้งฉากกับแนวลายของกล้ามเนื้อ biceps femoris เพื่อเปิดหาเส้นประสาท sciatic เมื่อพบเส้นประสาท sciatic แล้วทำการตัดออก ดังรูปที่ 12 หลังจากนั้นเย็บปิดผิวหนังใส่ยาฆ่าเชื้อโรค แล้วปล่อยให้สัตว์ทดลองฟื้น



<u>รูปที่ 12</u> แสดงการเปิดหาเส้นประสาท sciatic

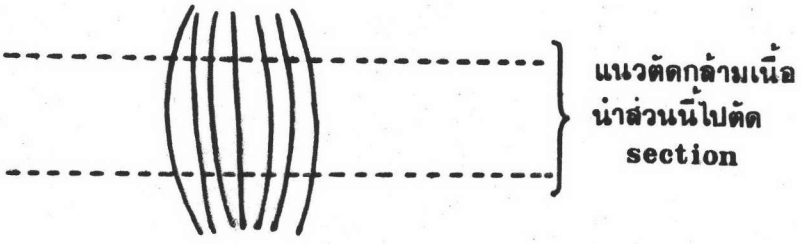
กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ตัดเส้นประสาทออกและกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (denervated with electrical stimulation group, E.S.) หลังจากตัดเส้นประสาท sciatic ข้างขวาออกแล้วจะปล่อยหนูทิ้งไว้ 4 วัน เนื่องจากมีผู้ศึกษาค้นพบว่า เมื่อตัดเส้นประสาทออกแล้วอิทธิพลของเส้นประสาทที่ตัดออกไปยังคงมีผลบนกล้ามเนื้อที่เส้นประสาทนั้นไปเลี้ยงอยู่มากที่สุดประมาณ 4 วัน แล้วจะหมดฤทธิ์ลงไป (Bruce, 1982 ; Kakulas, 1985) ทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อ Tibialis anterior ด้วยไฟฟ้า โดยใช้ค่า chronaxie เป็นช่วงกระตุ้น ซึ่งทำการหาค่า chronaxie จากเครื่องกระตุ้นไฟฟ้าโดยไม่ต้องหา SD curved (ดูภาคผนวก) จะใช้ความเข้มของกระแสไฟฟ้าที่ทำให้มองเห็นการกระดกข้อเท้าขึ้น (dorsiflexion) ของหนู ทำการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัวทั้งหมด 100 ครั้ง ซึ่งจะช่วยชะลอการฝ่อลีบของกล้ามเนื้อลายที่ขาดเส้นประสาทมาเลี้ยงได้ (ประโยชน์ บุญสินสุข และคณะ, 2529) โดยกระตุ้น 1 วัน พัก 1 วัน ขณะทำการกระตุ้นต้องทำให้หนูสลบป้องกันการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ ยาสลบที่ใช้จะใช้ควบคู่กัน 2 ชนิด โดยฉีด Ketalar dose 15 mg./kg.b.w. เข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณสะโพก และตามด้วย Nembutal dose 15 mg./kg.b.w. ฉีดเข้าช่องท้อง

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ตัดเส้นประสาทออกและได้รับการฉายแสงอินฟราเรดเลเซอร์ (Denervated with laser treatment) หลังจากตัดเส้นประสาท sciatic ข้างขวาออกแล้ว 4 วันทำการฉายแสงอินฟราเรดเลเซอร์ชนิดต่อเนื่องโดยปลายของท่อเลเซอร์ติดกับผิวหนังของขาข้างขวา ซึ่งจะฉายตรงไปยังกล้ามเนื้อ Tibialis anterior โดยใช้ความเข้ม 4 j/cm^2, 1mW, 2.13 วินาที (Basford et al., 1986; Kert and Rose, 1989) โดยฉายแสง 1 วัน พัก 1 วัน (ขณะทำการกระตุ้นต้องทำให้หนูสลบเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3)

หลังจากนั้น 90 วัน จะตัดกล้ามเนื้อ Tibialis anterior ของขาขวา วัดขนาดและชั่งน้ำหนักของกล้ามเนื้อ และตัด section ด้วย cryostat เนื่องจากต้องนำชิ้นเนื้อไปย้อมในกระบวนการของฮีสโตเคมี ชิ้นเนื้อที่ต้องการตัด section จะต้องเย็นจัดเพื่อป้องกันการสลายตัวของเอ็นซัยม์ในชิ้นเนื้อนั้น จึงได้แช่ชิ้นเนื้อในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -160 °c

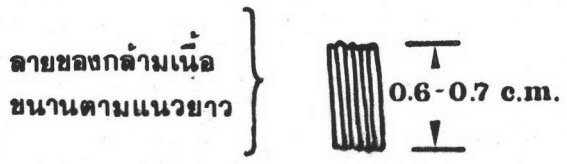
ขั้นตอนการตัด section ด้วย cryostat มีดังนี้

1. เลือกตัดกล้ามเนื้อจากการทดลองตรงบริเวณกึ่งกลางของกล้ามเนื้อ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงแนวการตัดกล้ามเนื้อ

2. แบ่งกล้ามเนื้อให้มีขนาดพอเหมาะ ความยาวประมาณ 0.6 -0.7 ซม. โดยให้ลายของกล้ามเนื้อขนานตามแนวยาว ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงขนาดของชิ้นเนื้อที่แบ่งให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อนำไปตัด section

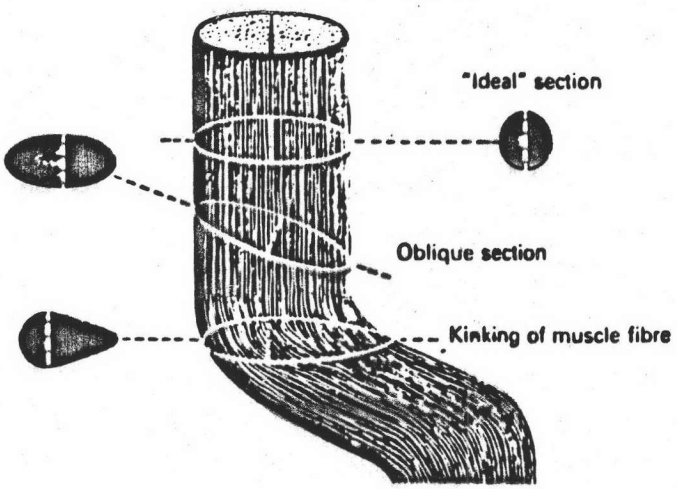
3. ก่อนที่จะนำชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 2 แช่ลงในไนโตรเจนเหลว ต้องนำชิ้นเนื้อที่ได้แช่ลงใน Isopentane ที่เย็น ซึ่งแช่อยู่ในไนโตรเจนเหลวอยู่ก่อนแล้ว เพราะถ้าแช่ชิ้นเนื้อลงในไนโตรเจนเหลวโดยไม่ผ่านการแช่ด้วย Isopentane ก่อน เอ็นซัยม์ในชิ้นเนื้อนั้นจะละลายในไนโตรเจนเหลวหมด (แช่ชิ้นเนื้อใน Isopentane ที่เย็นจัดประมาณ 10 วินาที)

4. นำชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลวไปตัด section ด้วย cryostat ที่อุณหภูมิ -20 °c โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 6-8 ไมครอน แปะชิ้นที่ได้ บน slide ที่ชุบด้วย AAS solution (ดูภาคผนวก) สาเหตุที่ต้องใช้ AAS slide เนื่องจากป้องกันชิ้นเนื้อหลุดขณะทำการย้อม ข้อควรระวังที่สำคัญหลังจากที่แช่ชิ้นเนื้อในไนโตรเจนเหลวแล้ว เมื่อต้องการจะนำชิ้นเนื้อหลุดออกจากไนโตรเจนเหลวต้องให้ชิ้นเนื้ออยู่ในสภาพที่เย็นจัดตลอดเวลา รวมทั้งปากคีบที่คีบชิ้นเนื้อออกต้องเย็นจัดเช่นกัน มิฉะนั้นจะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในชิ้นเนื้อ ทำให้เซลล์ของกล้ามเนื้อแตกเป็นช่องโหว่ได้

เมื่อได้ชิ้นเนื้อที่ติดอยู่บน AAS slide แล้ว จะนำไปย้อมด้วย ATPase เทคนิค(ดูภาคผนวก) เพื่อศึกษาลักษณะเส้นใยของกล้ามเนื้อและวัดขนาด

ศึกษาเนื้อเยื่อที่เตรียมได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเมื่อย้อมกล้ามเนื้อด้วย ATPase เทคนิคจะสามารถแยกกล้ามเนื้อได้เป็น 2 type ทำการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของกล้ามเนื้อทั้ง type 1 และ type 2 ด้วย micrometer การวัดจะวัดแบบ "lesser fiber diameter" (Brook and Engel, 1969) เพื่อหลีกเลี่ยงบริเวณที่ถูกตัดแบบ oblique และ kinking of muscle fiber ดังรูปที่ 15

i17888783



<u>รูปที่ 15</u> แสดงการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของกล้ามเนื้อแบบ "lesser fiber diameter"

3.5 <u>การรวบรวมข้อมูล</u> (data collection)

รวบรวมค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของกล้ามเนื้อทั้ง type 1 และ type 2 ที่วัดจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ด้วย micrometer ทั้ง 4 กลุ่ม นำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.6 <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> (data analysis)

นำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของกล้ามเนื้อทั้ง type 1 และ type 2 ที่บันทึกไว้มาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้ ANOVA test ดูว่ามีความแตกต่างของกลุ่มของทั้ง 4 กลุ่มหรือไม่อย่างไร แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผลต่อไป