บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการทดลอง

1) <u>สัตว์ทดลอง</u> ใช้หนูตะเภาขาว (albino guinea pig) น้ำหนักประมาณ 0.5-0.8 Kg. ทั้ง 2 เพศเป็นสัตว์ทดลอง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 สำหรับศึกษา spinocerebellar tract neurons ด้วยการฉีดสาร HRP จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ 2 สำหรับศึกษา interneurons ด้วยการฉีดสาร WGA-HRP จำนวน 20 ตัว

2) <u>วิธีการ</u>

2.1 นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบโดยใช้ Nembutal (30 Mg/Kg body weight) เข้าทางช่องท้อง ตรึงสัตว์ทดลองเข้ากับเครื่อง stereotaxic เปิดหนังศีรษะ ใช้เครื่องกรอกระดูกตรงบริเวณ lamdoid suture จนถึง dura mater เปิด dura ออก แล้วทำการฉีด 50% (w/v) HRP (Sigma, type VI) ละลายใน sterile normal saline ในสัตว์ทดลองกลุ่ม 1 และฉีด 4% (w/v) WGA-HRP (Sigma) ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 2 เข้าไปในส่วนหน้าของ cerebellum และ cerebellar vermis โดยใช้ Hamilton syring และ micro injector ปริมาณสารที่ฉีดจำนวน 2-4 μl เย็บหนังศีรษะปล่อยสัตว์ทดลองให้ฟื้น และเลี้ยงต่อไปโดยกระตุ้นให้สัตว์ทดลองวิ่งในกรงกว้าง 2 วันสำหรับ HRP และ 6 วันสำหรับ WGA-HRP รายละเอียดจำนวนหนูตะเภาที่ศึกษาดูตำแหน่งเซลล์ ปริมาณสาร ตำแหน่งที่ฉีด และระยะเวลาที่สัตว์ทดลองมีชีวิตรอดได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

หนูตะเภาเลขที่	ชนิดและจำนวนของ tracer (µl)	ตำแหน่งที่ฉีด tracer	ระยะเวลาที่มีชีวิตรอด (วัน)
30, 31	HRP 2 µl	cerebellar vermis (posterior lobe)	2
37	HRP 4 µl	cerebellar vermis (anterior และ posterior lobe)	2
32	WGA-HRP 2 µl	cerebellar vermis (posterior lobe)	6
47, 48 49, 50	WGA-HRP 4 µl	cerebellar vermis (anterior และ posterior lobe)	6

ตารางที่ 2 แสดงหมายเลขของหนูตะเภาที่ศึกษาดูตำแหน่งเซลล์, ชนิดและจำนวนของ tracer ตำแหน่งที่ฉีด tracer และระยะเวลาที่สัตว์ทดลองมีชีวิตรอด

2.2 Histological technique นำสัตว์ทดลองในข้อ 1 มาทำให้สลบอีกครั้ง แล้ว perfuse ทาง ascending aorta ด้วยน้ำยาที่ใช้ process (ภาคผนวก ก.) แกะสมองและไขสันหลังส่วนล่างออกมา วัดความยาวของไขสันหลังส่วน lumbar และ sacral โดยตัดเป็นท่อนตามความยาวของแต่ละ segment มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm) จากนั้นนำไขสันหลังแต่ละท่อนไปตัดตามแนวขวางด้วย freezing microtome แบบ serial section ความหนาของเนื้อเยื่อประมาณ 50 µm แล้วนำไป Process โดยวิธี Peroxidase TMB (Mesulam, 1978) ด้วยน้ำยาที่ใช้ process (ภาคผนวก ข.) ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี neutral red (ภาคผนวก ค.)

3) <u>การอ่านผล</u> เลือกศึกษาเฉพาะตัวที่ perfusion ดี และมี artifact น้อยเท่านั้น

3.1 ดูตำแหน่งที่ติดสาร HRP และ WGA-HRP บริเวณ cerebellum แล้ววาดลงบนภาพ cerebellum ที่ยืดออกมา

3.2 หาตำแหน่งของ SCT neurons โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ติด polarize filter จะเห็น granules ในเซลล์ชัดเจน วาดรูปร่างของไขสันหลังระดับต่าง ๆ และลงตำแหน่งของเซลล์โดยใช้อุปกรณ์วาดภาพที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์ (camera lucida)

3.3 หาตำแหน่งของ interneurons ในสัตว์ทดลองที่ฉีด WGA-HRP โดยใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับข้อ 3.2 และอาศัย criteria ในการวินิจฉัยว่าเป็น interneurons ดังต่อไปนี้

3.3.1 มี reaction product ใน cytoplasm ไม่น้อยกว่า 10 granules

3.3.2 reaction product ต้องกระจายออยู่ทั่วไปใน cytoplasm

3.3.3 เซลล์ที่นับนั้นต้องมี nucleolus เห็นชัดเจน

3.4 วัดขนาดของ SCT neurons และ interneurons โดยใช้ micrometer โดยวัดจากความยาวของเส้นที่ลากตั้งฉากจากจุดกึ่งกลางของเส้นผ่าศูนย์กลางที่ยาวที่สุดของเซลล์ ขนาดของเซลล์แบ่งเป็น 3 ขนาดดังนี้ ขนาดเล็ก < 20 µm, ขนาดกลาง 20-30 µm, ขนาดใหญ่ > 30 µm (Grant and Xu, 1988)