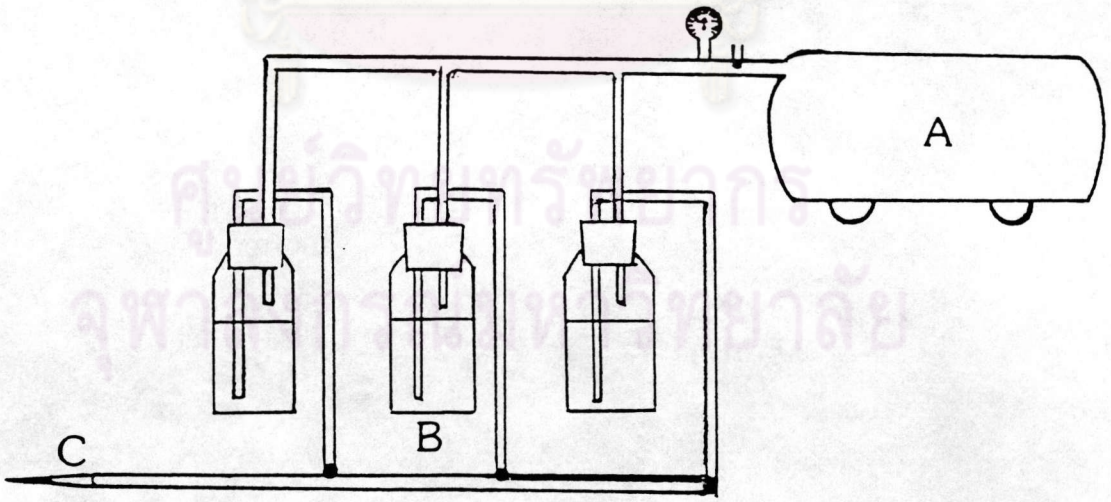
# บทที่ 3

## วิธีทำการทดลอง

### 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์สวนน้ำยาเข้าทางหัวใจ (Perfusion set)

เป็นเครื่องมือสำหรับสวนน้ำยาเข้าทางหัวใจของกระแต ซึ่งประกอบไปด้วยเครื่องปั๊มอากาศ, ขวดใส่น้ำยา,สายยาง และ เครื่องวัดความดัน โดยเครื่องปั๊มอากาศจะปั๊ม อากาศเข้าสู่ขวดซึ่งบรรจุน้ำยาต่างๆ เป็นผลทำให้เกิดภาวะที่มีแรงดันมากภายในขวด ดังนั้นน้ำยาจะมีแรงดันออกไปตามท่อสายยาง ซึ่งตอนปลายของท่อจะมีเข็มปลายแหลมเพื่อแทงเข้าหัวใจของสัตว์ทดลอง ควบคุมการไหลของน้ำยาโดยการปิดเปิด valve และควบคุมความดันโดยดูจาก scale และปิดเปิด valve เพื่อควบคุมแรงดันอากาศความดันที่ใช้มักอยู่ในช่วง 80-100 มิลลิเมตรปรอท พบว่าเป็นแรงดันที่เหมาะสม (รูปที่ 9) (ถ้าไม่มีอุปกรณ์ต่างๆ ดังกล่าว สามารถใช้หลอดฉีดยาขนาดใหญ่แทนได้ เช่นกัน แต่ไม่สามารถควบคุมความดันได้)




**รูปที่ 9** แผนผังการต่ออุปกรณ์สำหรับ perfusion

A = เครื่องปั๊มอากาศ

B = ขวดสำหรับใส่น้ำยา

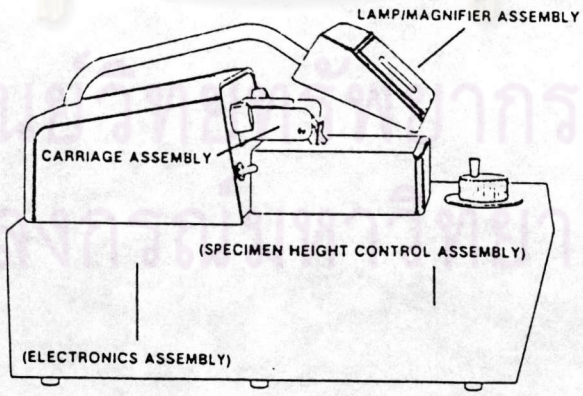
C = เข็มสำหรับแทงเข้าหัวใจ

### 3.1.2 เครื่องตัดชิ้นเนื้อโดยใช้แรงสั่นสะเทือน (Vibratome)

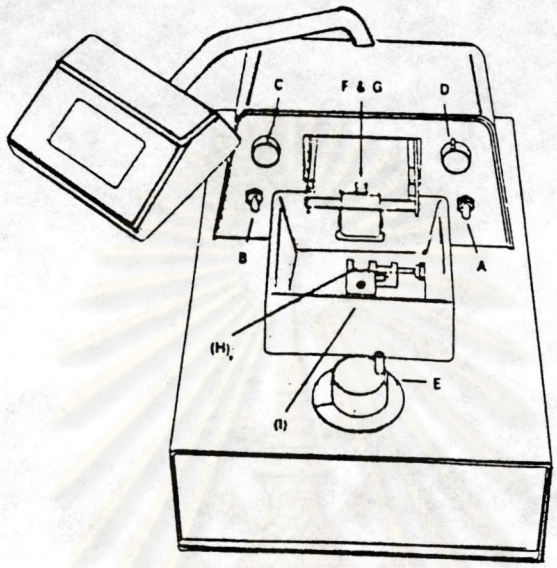
เป็นเครื่องมือที่อาศัยหลักการ คือ การสั่นของใบมีดด้วยความถี่สูง ตัดชิ้นเนื้อสดได้โดยตรง โดยชิ้นเนื้อไม่ต้องผ่านการทำให้แข็ง หรือ embedding มาก่อนเลย จึงทำให้รายละเอียดต่างๆ ของ เซลล์และเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายไปจากขั้นตอนดังกล่าว รวมทั้ง artifacts ต่างๆ ก็พบได้น้อยลงด้วย

การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง vibratome นี้ ชิ้นเนื้อและมีดจะแช่อยู่ในสารละลายใน chamber โดยทั่วไปมักจะใช้สารละลาย isotonic ซึ่งได้แก่ phosphate buffer เป็นต้น ซึ่งจะมีประโยชน์ในการควบคุมอุณหภูมิ เพื่อรักษาคุณสมบัติของสารต่างๆ ภายในเซลล์ที่ต้องการศึกษา เช่น enzyme และ organells ต่างๆ เป็นต้น

เครื่อง vibratome นับว่าเป็นเครื่องชนิด semi-autometic โดยแต่ละรอบของการตัดจะได้รับการควบคุม เช่น ความเร็วของใบมีด,ความถี่ของการสั่นทะเทือนและความหนาของชิ้นเนื้อโดยขึ้นอยู่กับ ชนิด และขนาดของเนื้อเยื่อเป็นสิ่งสำคัญ (รูปที่ 10,11)




**รูปที่ 10** แสดงส่วนประกอบต่างๆ ที่สำคัญของเครื่อง vibratome ทางด้านข้าง




**รูปที่ 11** แสดงปุ่มต่างๆ ในการควบคุมและปรับเครื่อง

A. ปุ่มสำหรับปิดเปิดเครื่องและไฟสำหรับส่องชิ้นเนื้อในขณะการตัด

B. ปุ่มปรับทิศทางการเคลื่อนที่ของใบมีด

C. ปุ่มปรับระดับความเร็วของใบมีดในการเคลื่อนที่เข้าหาชิ้นเนื้อ

D. ปุ่มปรับความถี่การสั่นของใบมีด

E. ปุ่มปรับความหนาของ section ที่ต้องการตัด โดยมีหน่วยเป็น um

F & G ปุ่มปรับมุมของใบมีด และ สำหรับเลื่อนมีดไปซ้าย-ขวา

H. ปุ่มสำหรับยึดแท่นชิ้นเนื้อ

I. ปุ่มยึดแท่นชิ้นเนื้อไปข้างหน้า-ข้างหลัง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T16564601

3.2 <u>สัตว์ทดลอง</u> (Animal)

ใช้กระแตธรรมดา (common treeshrew) ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 130-200 g จำนวน 8 ตัว

3.3 <u>วิธีการทดลอง</u> แบ่งกระแตเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 2 ตัว

กลุ่มที่ 1 ศึกษาการกระจายของ calbindin immunoreactive neurons จากชิ้นเนื้อของสมองกระแต ตัดแบบ coronal

นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบด้วย Nembutal ขนาด 50 mg/kg ทำให้สมองแข็งตัวโดยการสวนน้ำยา (perfuse) เข้าไปทางหัวใจ
จากนั้นทำการแกะสมอง และตัดออกเป็น block นำไปตัดแบบ coronal ด้วยเครื่อง vibratome โดยใช้ความหนา 50 um แล้วเก็บชิ้นเนื้อที่ได้ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.4 และนำไปย้อม calbindin-D28K ด้วยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อนำไปศึกษาถึงลักษณะการกระจายและตำแหน่งต่างๆของ calbindin-D28K immunoreactive neurons ในสมองต่อไป

กลุ่มที่ 2 ศึกษาการกระจายของ calbindin immunoreactive neurons จากชิ้นเนื้อของสมองกระแต ตัดแบบ sagittal

ทำเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 แต่ตัดแบบ sagittal

กลุ่มที่ 3 ศึกษาการกระจายของ parvalbumin immunoreactive neurons จากชิ้นเนื้อสมองกระแต ตัดแบบ coronal

ทำเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 แต่ทำการย้อมด้วย parvalbumin

กลุ่มที่ 4 ศึกษาการกระจายของ parvalbumin immunoreactive neurons ชิ้นเนื้อของสมองกระแต ตัดแบบ sagittal

ทำเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 3 แต่ตัดแบบ sagittal

3.3.1 ขั้นตอนการสวนน้ำยาเข้าทางหัวใจ (Perfuse) และการเตรียมเนื้อเยื่อสมอง

การสวนน้ำยาเข้าทางหัวใจ (perfuse) มีวัตถุประสงค์ เพื่อกำจัด เม็ดเลือดต่างๆ ออกจากร่างกายทั้งระบบ เพราะเม็ดเลือดสามารถรบกวนปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ยังเป็นการรักษาเนื้อเยื่อและเซลล์ต่างๆ ให้อยู่ในสภาพที่ดี เพราะ fixative สามารถเข้าไปตามเส้นเลือดฝอยเล็กๆ ทั่วร่างกาย และดูดซึมเข้าสู่ เนื้อเยื่อ และเซลล์อย่างทั่วถึง ทำให้โปรตีนที่ต้องการศึกษาคงสภาพเป็นอย่างดี

ขั้นตอนการสวนน้ำยาเข้าทางหัวใจ (purfuse) มีดังนี้คือ

1. สลบกระแตด้วย Nembutal ในขนาด 50 mg / kg / bw โดยฉีดเข้าช่องท้องและใช้กรรไกตัดผิวหนังบริเวณช่องท้อง และเปิดช่องท้อง ต่อไปจนถึงช่องอกโดยการตัดซี่โครงออกทั้งสองข้าง ตัด diaphram ออกและเปิดช่องอกจนสามารถเห็นหัวใจ ใช้กรรไกขนาดเล็กเลาะเอา pericardium ออก ต่อจากนั้นใช้กรรไกตัดบริเวณ left ventricle เล็กน้อย แล้วใช้เข็มซึ่งต่อมาจากสายน้ำยา แทงเข้า left ventricle จนปลายเข็มเข้าไปอยู่บริเวณ ส่วนต้นๆ ของ aorta เปิดน้ำยาชนิดแรกเพื่อให้เข้าสู่ aorta และจะเห็นว่าหัวใจจะมีขนาดบวมพองขึ้น จากนั้น จึงใช้กรรไกปลายแหลมตัดที่ บริเวณ right atrium เล็กน้อย เพื่อเป็นการระบายน้ำยาออก ความดันของน้ำยาที่เข้าสู่ร่างกาย ควรอยู่ในช่วง 80-100 มิลลิเมตรปรอท น้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในการ purfuse จะให้ตามลำดับคือ

   1.1 Normal saline ปริมาณ 300 ml และควรมีอุณหภูมิ 37°C

   1.2 10% formalin (dilute ด้วย 0.1 M PBS pH7.4) ควรใช้ประมาณ 500 ml

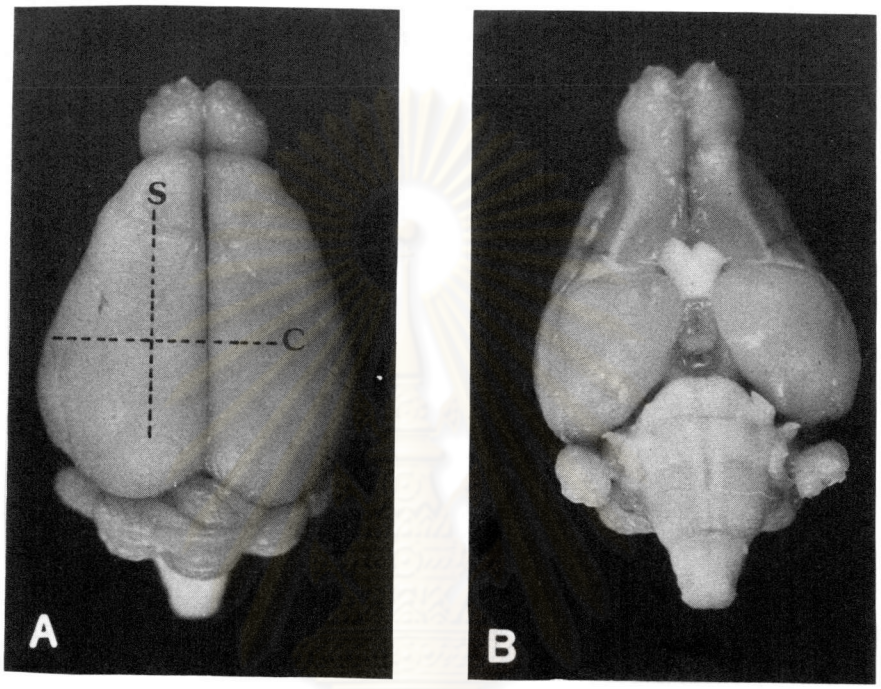
   1.3 10% Sucrose (ทำละลายด้วย 0.1 M PBS pH 7.4) ประมาณ 500 ml และค่อนข้างเย็น

2. ภายหลังการ purfuse (จะสังเกตได้ว่า กระแตมีลักษณะลำตัวแข็งมาก) ทำการแกะกะโหลกศีรษะของสัตว์ทดลองออก และนำสมองออกไปแช่ใน 30% sucrose (W/V) โดยแช่ค้างคืน ไว้เพื่อให้เนื้อสมองแข็งขึ้น

3. นำสมองที่แช่แล้วมาตัดเป็นท่อนๆ เพื่อนำมาทำ block ก่อนนำไปตัดด้วยเครื่อง vibratome การทำ block จะใช้สารพวก albumin-gelatin solution (ภาคผนวก) เพื่อให้ชิ้นเนื้อคงสภาพดีในระหว่างขั้นตอนการย้อม (แต่ละ block ของชิ้นเนื้อไม่ควรมีความสูงเกิน 1 cm)

4. นำ block ชิ้นเนื้อ ทำ marker ไว้ เพื่อความสะดวกในการดูซ้าย-ขวา และ บน-ล่าง จากนั้นนำไปตัด ด้วยเครื่อง vibratome โดยให้ได้ ชิ้นเนื้อ มีความหนา 50 um

ชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วจะแช่ PBS pH 7.4 ในถาดหลุม โดยเรียงชิ้นเนื้อตามลำดับที่ตัด (serial section) และให้ ชิ้นเนื้อ เสียหายน้อยที่สุด ทำการตัดสมองกระแตแต่ละตัว แล้วจึงนำไปทำการย้อมทาง อิมมูโนฮิสโตเคมี การตัดชิ้นเนื้อสมองกระแตจะมีทั้งแบบ coronal และ sagittal (รูปที่ 12)




**รูปที่** 12 แสดงสมองกระแต ทางด้านบน (A) และด้านล่าง (B)

S: แนวการตัดแบบ sagittal

C: แนวการตัดแบบ coronal

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 <u>ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี</u>

ชิ้นเนื้อซึ่งผ่านการตัดด้วยเครื่อง Vibratome จะแช่อยู่ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ซึ่งการย้ายชิ้น ชิ้นเนื้อ ไปยังถาดหลุมอื่นๆ เพื่อเปลี่ยนน้ำยานั้นจะต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจมีความเสียหายเกิดขึ้นได้ อุปกรณ์ที่นำมาใช้ช้อน ชิ้นเนื้อ นั้น ในการทดลองนี้ได้ใช้ capillary pipett ซึ่งนำมาเผาไฟจนส่วนปลายโค้งงอ และให้ปลายมนเพราะจะไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่ ชิ้นเนื้อ ได้ง่าย

ขั้นตอนของการย้อม ชิ้นเนื้อ ด้วยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี มีขั้นตอนต่างๆ ตามลำดับคือ

1. นำ ชิ้นเนื้อ ซึ่งเดิมแช่อยู่ใน 0.1 M PBS pH 7.4 นำไปใส่ถาดหลุมซึ่งใส่ 3% normal rabbit serum (ภาคผนวก) incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ

ห้องหรืออาจจะ incubate ที่ 4°C ค้างคืนก็ได้ ในการ incubate ควรจะเขย่าน้ำยาตลอดเวลา (โดยการใช้เครื่อง rotator) เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างทั่วถึง การใช้ 3% normal rabbit serum ในขั้นตอนนี้ เพื่อเป็นการดูดซับ non specific antigen ต่างๆ นั่นเอง

2. นำ ชิ้นเนื้อ ไป incubate ใน primary antibody (ภาคผนวก) โดยใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมงในอุณหภูมิ 4°C

3. นำ ชิ้นเนื้อ ไปล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นการล้างครั้งแรก แล้วจึงนำ ชิ้นเนื้อ ไปล้างครั้งที่สองด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 เช่นกัน และแช่ไว้ค้างคืน โดยใช้อุณหภูมิ 4°C

4. นำ ชิ้นเนื้อไป incubate ใน secondary antibody (ภาคผนวก) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าตลอดเวลา

5. ล้าง ชิ้นเนื้อ ด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 3 ครั้ง โดยใช้เวลาครั้งละประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าตลอดเวลาในขณะที่ทำการล้าง

6. นำ ชิ้นเนื้อ ไป incubate ใน steptavidin-biotinylated peroxidase complex (ภาคผนวก) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและเขย่าตลอดเวลา

7. ล้าง ชิ้นเนื้อ ด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

8. นำ ชิ้นเนื้อ incubate ใน 0.05% 3',3' diaminobenzidine tetrahydrochloride ประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเติม 30% hydrogenperoxide ($H_2O_2$) โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.003% เขย่าตลอดเวลา ด้วย rotator จะสังเกตุเห็นว่าสีของ ชิ้นเนื้อเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลขึ้นเรื่อยๆจนเมื่อเป็นสีน้ำตาลแก่ จึงย้ายชิ้นเนื้อไปล้างในขั้นตอนต่อไป

9. ย้าย ชิ้นเนื้อ ไปล้างใน 0.1 M PBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นจึงแช่ ชิ้นเนื้อ ไว้ใน 0.02 M PBS pH 7.4 เพื่อรอนำไปติดวางบนแผ่นสไลด์ ต่อไป

10. นำ ชิ้นเนื้อ ไปติดบน สไลด์ ซึ่งผ่านการเคลือบด้วย chromalum solution (ดูภาคผนวก) โดยเรียงตามลำดับ แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

11. เมื่อ ชิ้นเนื้อ แห้งสนิทดีแล้ว จึงนำไปผ่านขบวนการ dehydration , clear และ mount

## 3.4 การรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อมูล (data collection and data analysis)

ทำการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลตามลำดับขั้นตอนคือ

1. วาดรูปร่างของสมองโดย camera lucida จาก ชิ้นเนื้อ ที่ทำการศึกษาหา calbindin-D28K immunoreactive neurons ใน cross sections โดยเริ่มจากบริเวณ rostral ไปยัง caudal และวาดเช่นเดียวกันใน sagittal sections โดยเริ่มจากบริเวณ medial ไปยังบริเวณ lateral ซึ่งจะทำการวาดในทุก ชิ้นเนื้อ ที่ค่อนข้างสมบูรณ์

2. จุดหาตำแหน่งของ เซลล์ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม calbindin - D28K (calbindin-D28K immunoreactive nearons) ในบริเวณ nucleus ต่างๆ โดยจุดให้ตรงกับตำแหน่งของเซลล์ประสาทนั้นๆ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงตำแหน่งและปริมาณที่แน่นอนของเซลล์ซึ่งให้ผลบวก

3. วาดรูปเซลล์ในทุกบริเวณซึ่งให้ผลบวก โดยการใช้ camera lucida พร้อมทั้งศึกษารายละเอียดต่างๆ ของเซลล์ รวมทั้งลักษณะของ fiber ซึ่งให้ผลบวกในบริเวณนั้นเช่นการติดสีเป็นต้น และในการวาดเซลล์ต่างๆ ออกมานั้น จะสุ่มตัวอย่างเซลล์ซึ่งเป็นตัวแทนประมาณ 30-50 เซลล์ ในบริเวณที่มีปริมาณเซลล์อยู่อย่างหนาแน่นส่วนในบริเวณที่มีเซลล์ค่อนข้างน้อยจะวาดออกมาทุกเซลล์

ในการบันทึกความหนาแน่นของเซลล์และ fiber จะแบ่งเป็น 6 ระดับ คือ (รูปที่ 14)

0 = ไม่พบเซลล์ หรือ fiber ซึ่งให้ผลบวกเลย

$1^+$ = พบเซลล์หรือ fiber ในปริมาณน้อยมาก (พบประมาณ 1-5 เซลล์/0.5 ตารางมิลลิเมตร)

$2^+$ = พบเซลล์หรือ fiber ได้บ้าง (พบประมาณ 6-15 เซลล์/0.5 ตารางมิลลิเมตร)

$3^+$ = พบเซลล์หรือ fiber ในปริมาณปานกลาง (พบประมาณ 16-40 เซลล์/0.5 ตารางมิลลิเมตร)

$4^+$ = พบเซลล์หรือ fiber ได้มาก (พบประมาณ 41-60 เซลล์/0.5 ตารางมิลลิเมตร)

$5^+$ = พบเซลล์หรือ fiber หนาแน่น (พบประมาณ > 60 เซลล์/0.5 ตารางมิลลิเมตร)

4. จากเซลล์ในบริเวณต่างๆ ซึ่งได้วาดไว้ นำมาวัดขนาดด้วย micrometer ซึ่งวาดออกมาเช่นกัน โดยทำการวัดความยาวของเซลล์ตาม long axis และผ่าน nucleolus จะทำให้ได้ขนาดที่แท้จริงของเซลล์ (รูปที่ 13) พร้อมกันนี้ก็ทำการบันทึกรูปร่างของเซลล์ซึ่งวาดออกมาเช่น กลม, กลมรี, สามเหลี่ยมและหลายเหลี่ยม เป็นต้น (รูปที่ 13)

5. ถ่ายรูปสมองในระดับต่างๆ ใน ชิ้นเนื้อ เดียวกันกับในข้อ 1 จากนั้น ทำการวาดรูปและลงตำแหน่งของ nucleus ต่างๆ โดยเปรียบเทียบและอ้างอิงจาก stereotaxic atlas ของ สมองหนู ลิง และมนุษย์ ในตำแหน่งซึ่งใกล้เคียงมากที่สุด

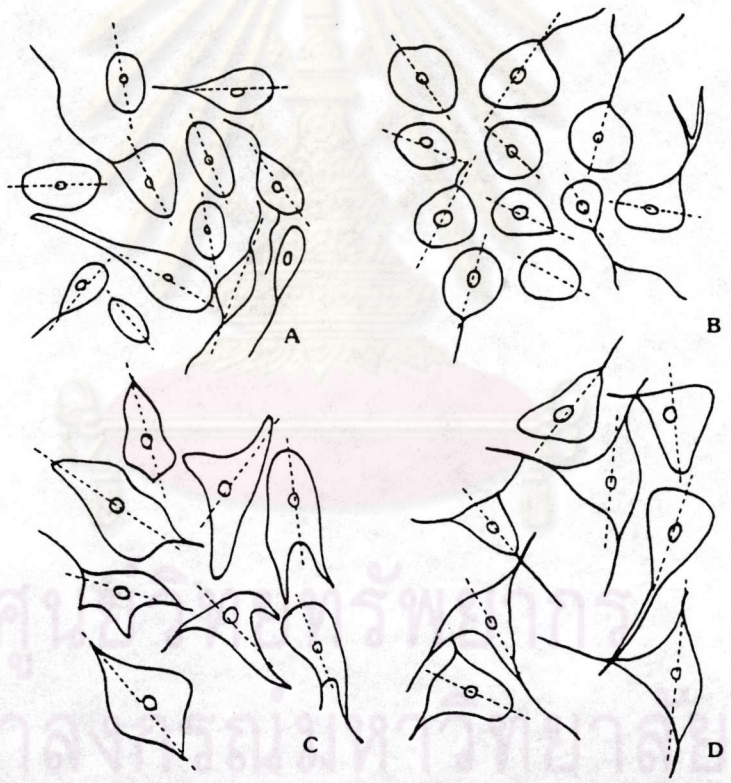
6. จากรูปสมองในข้อ 5 ซึ่งได้วาดไว้นำมา plot ความหนาแน่นของเซลล์ และ fiber ในบริเวณซึ่งให้ผลบวกโดยแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ

low = บริเวณซึ่งพบมีความหนาแน่นของเซลล์หรือ fiber ในปริมาณ $0\text{-}1^{+}$

moderate = บริเวณซึ่งพบมีความหนาแน่นของเซลล์หรือ fiber ในปริมาณ $2^{+}\text{-}3^{+}$

high = บริเวณซึ่งพบมีความหนาแน่นของเซลล์หรือ fiber ในบริเวณ $4^{+}\text{-}5^{+}$

7. ทำเช่นเดียวกันตั้งแต่ข้อ 1-6 ในการหา parvalbumin immunoreactive neurons




**รูปที่ 13** ตัวอย่างแสดงเซลล์รูปร่างต่างๆ ซึ่งรายงานในการทดลอง

A: รูปร่างรี

B: รูปร่างกลม

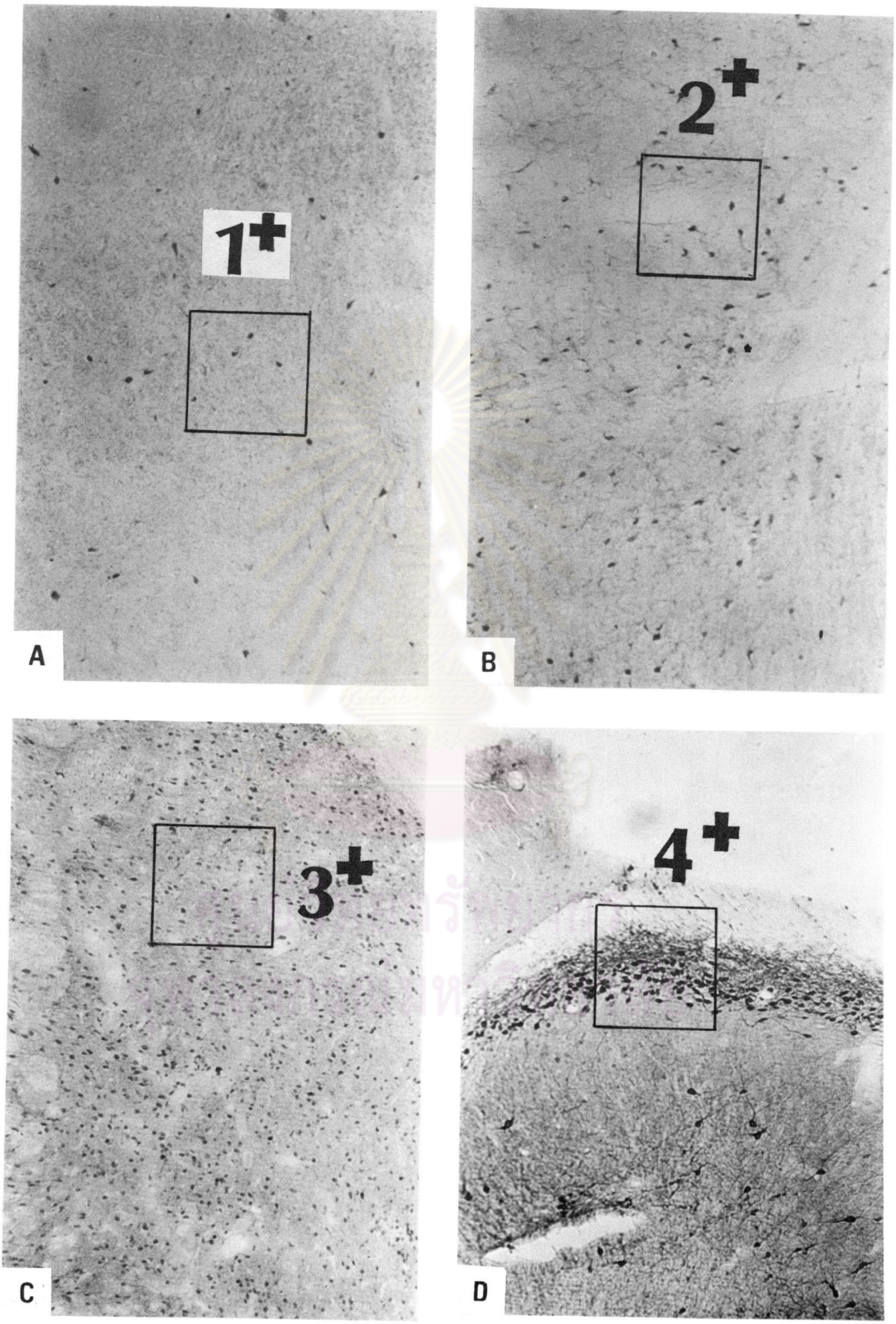
C: รูปร่างหลายเหลี่ยม

D: รูปร่างสามเหลี่ยม

เส้นประแสดงแนวทิศทางการวัดขนาดของเซลล์ตาม long axis

**รูปที่ 14** ภาพแสดงตัวอย่าง การบันทึกความหนาแน่นของเซลล์ในระดับต่างๆ ตารางสี่เหลี่ยมคิดเป็นพื้นที่ 0.5 ตารางมิลลิเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


1+
2+
3+
4+
A
B
C
D
100μ