บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีทำการวิจัย

วิธีการศึกษาบาร์เรล

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูถีบจักรพันธุ์สวิส (Swiss mice) อายุ 2-3 เดือน น้ำหนักระหว่าง 20-35 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. เคมีภัณฑ์

- 10% Formalin
- 0.9% NaCl
- 70%, 95%, 100% alcohol
- Xylene
- Permount
- Cresyl violet (cresyl fast violet for microscopy)
- 10% Acetic acid
- Lead acetate
- Ether

3. เครื่องมือ

- ชุดให้น้ำเกลือ
- เข็มฉีดยาเบอร์ 26½, 23, 21
- ตู้อบ
- กระดาษวัด pH
- เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด
- แผ่นสไลด์ และ Cover glass
- Microtome (cryo-cut, American optical company)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- กล้องจุลทรรศน์ model BH_2 (Olympus optical company)
- ปริซึม (Projection Prism BH-WP)
- Microprojector (Bausch and Lomb)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (analytical balance แบบ automatic release model sartorius GMBH)
- ตาชั่ง สำหรับชั่งน้ำหนักหนู
- กรงพลาสติก สำหรับเลี้ยงหนู

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 การเตรียม 10% formalin

ใช้ formalin (40% formadehyde) 100 มล. เติมด้วย 0.9% NaCl 900 มล. ทำให้สารละลายเป็นกลางด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

4.2 การเตรียม cresyl violet

ชั่ง cresyl violet 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล. ก่อนนำไปใช้เติมด้วย 10% acetic acid 50หยดในสีย้อม 300 มล. จากนั้นนำสีไปกรองด้วยเครื่องกรอง (buchner funnel) ก่อนใช้สีย้อมทุกครั้ง ควรอุ่นให้มีอุณหภูมิ 50 °ซ ในตู้อบ

5. การเตรียมสไลด์

นำสไลด์มาชุบในไข่ขาว ซึ่งละลายในน้ำกลั่น อัตราส่วนไข่ขาว 1 ฟองต่อน้ำกลั่น500 มล. ทำให้สไลด์แห้ง

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การผสมพันธุ์สัตว์ทดลอง

เลี้ยงหนูในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 21 °ซ ± 5 °ซ และอยู่ในความมืด/ความสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำตามต้องการ เลี้ยงหนูให้ชินกับห้องปรับอากาศ 1 อาทิตย์ จึงนำมาผสมพันธุ์ ในเพศเมีย นำหนูมาทำ vaginal smear และชั่งน้ำหนักตอนเช้าเวลา 9.00 น. ทุกวัน เมื่อตรงกับ proestrous phase จะถูกนำไปผสมกับตัวผู้ในอัตราส่วน ตัวเมีย 2 ตัว ต่อตัวผู้ 1 ตัว หลังจากนั้นตรวจดูว่ามีการผสมพันธุ์หรือไม่โดยดู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จาก vaginal plugs ซึ่งถ้าพบก็ถือว่าเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ เมื่อตั้งครรภ์แล้ว แยกแม่หนูออกมาใส่กรงต่างหาก กรงที่ใช้เป็นกรงพลาสติก เพื่อป้องกันการปะปนของตะกั่ว ถ้าใช้กรงโลหะ

6.2 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

แบ่งแม่หนูที่ตั้งครรภ์ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ใช้น้ำกลั่นฉีดเข้าช่องท้อง 0.5 มล.

กลุ่มที่ 2, 3, 4 กลุ่มทดลอง ใช้ ตะกั่วอะซิเตทฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 5, 10, 30 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ตามลำดับ

โดยฉีดตั้งแต่วันที่ 10-20 ของการตั้งครรภ์ทุกวัน เนื่องจาก Rice (1973, 1974) พบว่า เซลล์ประสาทบริเวณชั้นที่ 4 ของ somatosensory cortexจะเริ่มฟอร์มใน ลูกหนู ในวันที่ 10 ถึง 13 ของการตั้งครรภ์ วันที่ 14-18 เริ่มรวมกันเป็นชั้นที่ 4 เห็นได้ชัดเจน และเริ่มเจริญเป็นบาร์เรล แต่การเจริญจะสมบูรณ์เต็มที่ต้องเป็นวันที่ 6 หลังคลอด หลังจาก ฉีดยาแล้วตรวจดูกรงทุกวัน วันแรกที่คลอดนับเป็นอายุ1 วัน นำลูกหนูอายุต่าง ๆ กันมาศึกษาทาง วิทยาฮีสโตต่อไป

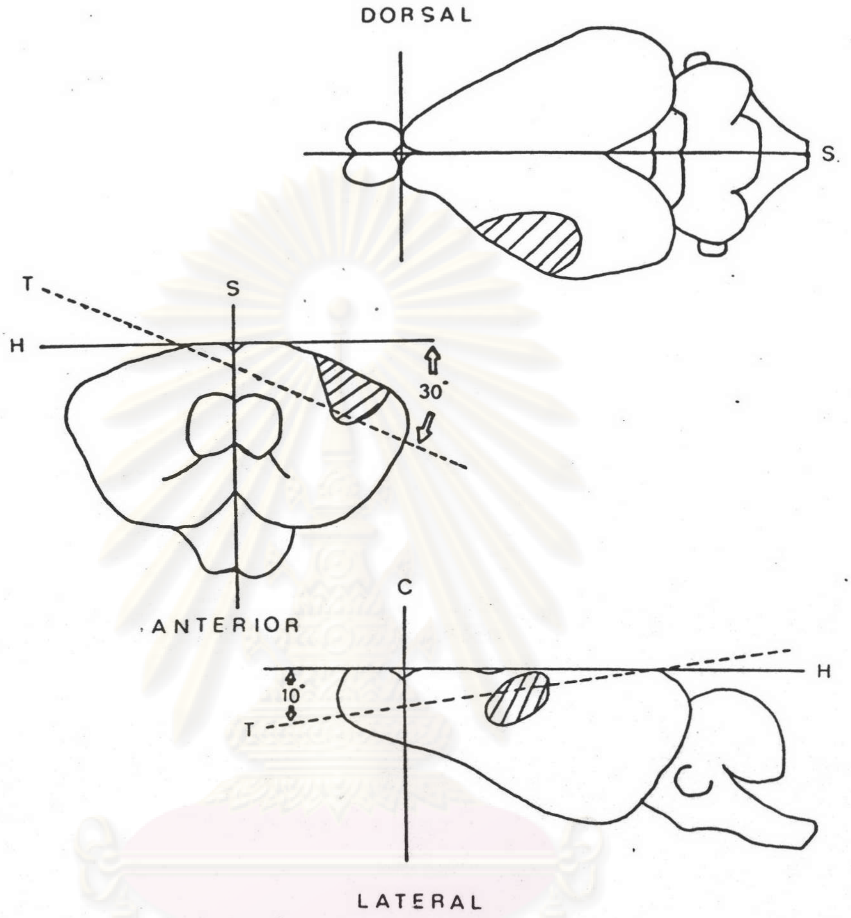
7. การศึกษาทางวิทยาฮีสโต

7.1 การ perfuse

นำลูกหนูที่ได้จากแม่หนูทั้ง 4 กลุ่ม มาศึกษาโดยชั่งน้ำหนักตัวก่อนสลบหนู ด้วยอีเธอร์ นำหนูมา perfuse ด้วย 0.9% NaCl ประมาณ 10-50 มล. ณ อุณหภูมิห้อง เข้าสู่หัวใจห้องล่างซ้ายทันที แล้วตัดหัวใจห้องบนขวาให้ fluid ไหลออก จากนั้นฉีด ด้วย 10% neutralize formalinประมาณ 20-100 มล. นำสมองมาชั่งน้ำหนักและแช่ไว้ ใน 10% formalin นาน 30-60 นาที

7.2 การตัดเนื้อสมอง

นำสมองมาตัด tangential section (ดังรูปที่ 3) นำชิ้นสมองที่ ได้วางบนแท่นรองและแช่แข็งใน microtome อุณหภูมิระหว่าง -10ถึง -20 องศาเซลเซียส จนสมองแข็งแล้ว ตัดสมองหนา 50 ไมครอนผ่านบาร์เรล นำแผ่นชิ้นเนื้อที่ได้แช่ในน้ำประปา



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงการตัดชิ้นเนื้อสมองในแนว tangential section บริเวณที่แรเงา คือบริเวณที่มีบาร์เรลอยู่

(T = Tangential plane, S = Sagittal plane,

H = Horizontal plane, C = Coronal plane)

ก่อนที่จะ mount ลงบนสไลด์ตามลำดับ (serial section) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1-2 วัน ก่อนนำไปย้อมสี

7.3 การย้อมสี

นำสไลด์ที่แห้งแล้วมาผ่านขบวนการย้อมสีตามลำดับคือจุ่มล้างสไลด์ในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปย้อมใน cresyl violet อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 2-5 นาที จากนั้นล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำกลั่น ขั้นต่อไป dehydrate ด้วย 70%, 95% และ absolute alcohol ตามลำดับนานขั้นละ 1-2 นาที ทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene นาน 1-2 นาที เปลี่ยน 2 ครั้ง นำสไลด์ที่ได้หยด Permount แล้วปิดด้วย cover glass.

7.4 การศึกษาการเจริญของบาร์เรล

นำสไลด์ที่ย้อมแล้วจากลูกหนูอายุ 1-12 วัน มาตรวจดูการเริ่มเห็นบาร์เรล และการเห็นบาร์เรลที่สมบูรณ์ โดยใช้ microprojecter และกล้องจุลทรรศน์ดูเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

7.5 การศึกษาจำนวนเซลล์ประสาท ลักษณะโครงสร้าง และขนาดของบาร์เรล

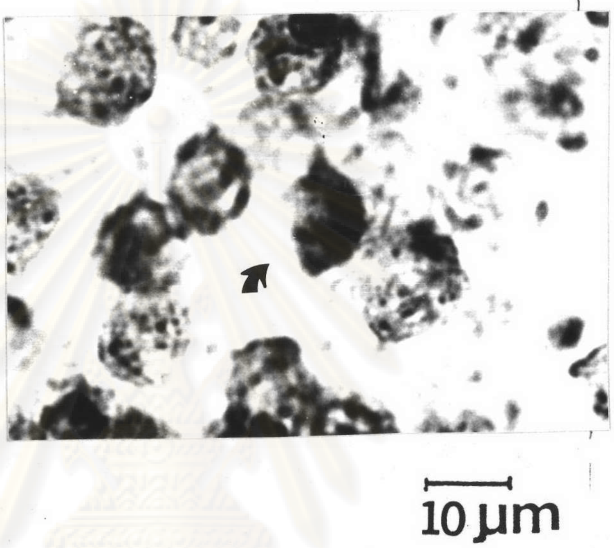
นำสไลด์ของลูกหนูอายุ 9, 12, 15, 21 และ 60 วัน มาวาดรูปบาร์เรลจาก Microprojecter โดยใช้หลอดเลือดเป็น land mark และวาดจากหลาย ๆ section จนได้ภาพ PMBSF ที่สมบูรณ์วัดพื้นที่ของ PMBSF ทั้งหมด

โดยการอาศัยกล้องจุลทรรศน์ที่ติดปริซึมฉายภาพบาร์เรล C-1 จากสไลด์แล้วนับจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดในบาร์เรล C-1 โดยใช้หลักที่ว่า เซลล์ประสาทจะต้องมี nucleolus ใหญ่อยู่ตรงกลาง และมี cytoplasm เห็นได้ชัดเจน เซลล์พวก astrocytes, oligodendrocytes, endothelial cell ของหลอดเลือดฝอยจะไม่นับ (ดังรูปที่ 4) แล้ววัดขนาดของพื้นที่ทั้งหมดในบาร์เรล C-1 เปรียบเทียบระหว่างหนูทั้ง 2 กลุ่ม

7.6 การศึกษาความหนาของ cerebral cortex

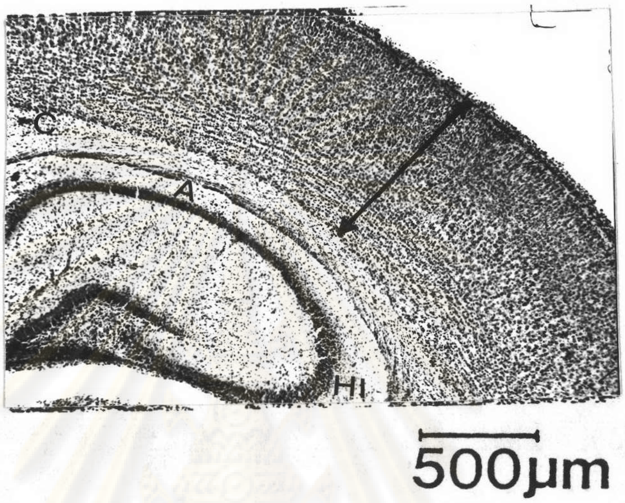
โดยนำสมองที่แช่ 10% formalin มาตัด coronal section ผ่านส่วนที่มีบาร์เรล (รูปที่ 5) นำไปย้อมด้วย cresyl violet แล้ววัดความหนาของ cortex

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 . แสดงเซลล์ประสาทในบาร์เรล (ศรชี้) Bar = 10 µm.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดง cerebral certex ในแนว coronal section เป็นบริเวณที่วัดความหนาของ cortex (⟷)

Bar = 500 µm.

A = Alveus hippocampi

C = Cingulum

HI = Hippocampus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในลูกหนูอายุ 9, 12, 15, 21และ 60 วัน

การตรวจตะกั่วในเลือด

เคมีภัณฑ์

1. Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (ammoniumtetramethylen-dithiocarbamate, APDC) solution, 2% (w/v) in deionized water.
2. Methyl isobutyl ketone (4-methylpentan-2-one, MIBK, BDH Anala R) water-saturated.
3. Triton x-100 (Tx; an alkyl phenoxy polyethoxy ethanol, Rohn and Haas,Philadelphia, PA) solution, 10% (v/v) in deionized water.
4. Lead nitrate, $Pb(NO_3)_2$ standard solution for AAS. (BDH Chemical Ltd Poole England).
5. Heparine.

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Perkin-Elmer model 373. atomic absorption spectrophotometer
2. Vortex mixer (Lab-Line instruments, Inc. melrose park, ill USA).
3. Centrifuge (GLS-2B, DUPONT INSTRUMENTS/SORVALL)
4. เครื่องแก้วที่แช่ด้วย 10% HNO_3ค้างคืนได้แก่ beaker, pipet, test tube with plastic snap caps.
5. Polypropylene tube 12 x 75 mm.
6. กรรไกรผ่าตัด, tuberculin syringe.

การเก็บตัวอย่างเลือด

หนูที่นำมาศึกษาระดับตะกั่วในเลือดนั้นใช้แม่หนูที่เพิ่งคลอดลูก และใช้แม่และลูกหนูหลังคลอด21 และ 60 วัน โดยใช้ tuberculin syringeเจาะเลือดจากหัวใจใส่ใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

polypropylene tube ที่มี heparine เคลือบอยู่ เก็บตัวอย่างเลือดแช่แข็งในตู้เย็น เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์ตะกั่วในภายหลัง

<u>การสกัดสารตะกั่วจากเลือด</u> ตามวิธีของ Hessel (1968)

1. Lead Standard : stock 1000 ppm. เตรียมจาก reagent grade lead nitrate และ deionized water. working standard 10 ไมโครกรัม/มล.

2. ใส่เลือด (blank) 5 มล. ในหลอดที่ 1 หลอดที่ 2, 3, 4 ใส่ working standard 0.15, 0.3 และ 0.5 มล. ตามลำดับ ซึ่งจะมีความเข้มข้นของตะกั่ว 30, 60, 100 ไมโครกรัมต่อ 100 มล. เลือด หลอดที่ 5 ใส่เลือดหนูที่ต้องการตรวจหาระดับตะกั่ว

3. ทุกหลอดเติม 0.5 มล. 10% Tx. แล้ว mix ด้วย vortex mixer ในขั้นนี้จะเกิด hemolysis.

4. เติม 1 มล. 2% APDC ทุกหลอด แล้ว mix ด้วย vortex mixer

5. เติม 1 มล. MIBK ทุกหลอด mix ด้วย vortex mixerนานประมาณ 5 นาที หรือเขย่าไปมาประมาณ 60 ครั้ง

6. นำทุกหลอดเข้าเครื่อง centrifuge ประมาณ 5 นาทีใช้ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที จะได้สารละลายแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็น MIBK ซึ่งจะมีตะกั่วละลายอยู่ นำไปตรวจด้วย atomic absorption spectrophotometer

<u>การวิเคราะห์</u>

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่วใช้ atomic absorption technic โดยใช้เครื่องมือ Perkin-Elmer model 373. atomic absorption spectrophotometer จากห้องปฏิบัติการของแผนกนิติเวช โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งใช้วิธีของ Hessel (1968) วิเคราะห์สารตะกั่วในเลือด โดยนำสารละลายตะกั่วในเตรทมาตรฐานจากหลอดที่ 2, 3, 4 และ blank ไปวัดหาค่าแอบซอบแบนซ์ ที่ความยาวช่วงคลื่น 283 นาโนเมตรโดยใช้ atomic absorption spectrophotometer ชนิดใช้เปลวไฟ แล้วจึงนำค่าแอบซอบแบนซ์ที่อ่านได้กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปเขียนกราฟ จากนั้นจึงนำค่าแอบซอบแบนซ์ของสารละลายตัวอย่างในหลอดที่ 5มาเทียบหาค่าความเข้มข้นของปริมาณตะกั่วจากกราฟมาตรฐานในแต่ละครั้ง

<u>สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล</u>

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ unpair Student's t-test ในข้อมูลที่แสดงค่าเป็น mean ± S.D. และใช้ Chi-square ในข้อมูลที่แสดงค่าเป็นร้อยละ เลือกระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย