บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒.๑ สัตว์ทดลอง สารเคมี เครื่องมือ และยาสลบ

๒.๑.๑ สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Rat, Wistar strain) ทั้งสองเพศ น้ำหนักระหว่าง ๒๐๐-๓๐๐ กรัม

๒.๑.๒ สารเคมี

๒.๑.๒.๑ Horseradish peroxidase (HRP Sigma type VI)

๒.๑.๒.๒ Fixative ประกอบด้วย

1% paraformaldehyde และ 1.25% glutaraldehyde ใน phosphate buffer pH 7.4

๒.๑.๒.๓ Developpers

๒.๑.๒.๓.๑ 0.05% 3,3 diaminobenzidine tetra HCl (DAB) ใน Tris HCl buffer pH 7.6

๒.๑.๒.๓.๒ 0.05% 3.3 diaminobenzindine tetra HCl (DAB) ใน Tris HCl buffer pH 7.6 + 66 µl ของ 30% H_2O_2 ต่อ Tris HCl buffer pH 7.6 100 ml.

๒.๑.๒.๔ 30% sucrose ใน phosphate buffer pH 7.4 และ 5% sucrose ใน phosphate buffer pH 7.4

๒.๑.๒.๕ Stain

0.1% cresyl violet ก่อนใช้เติม 10% acetic acid จำนวน ๕๐ หยด ต่อ สารละลาย ๓๐๐ ml และอุ่นให้ได้อุณหภูมิ ๕๐°c

ดูรายละเอียดการเตรียมสารละลายเหล่านี้จากภาคผนวก

๒.๑.๓ เครื่องมือ

๒.๑.๓.๑ Stereotaxic apparatus for rat. model 13-306 Takahashi Co. LTD.

๒.๑.๓.๒ Hamilton syringe 10 µl หรือใช้ glass micropipette ร่วมกับ "Agla" micrometer syringe ดังแสดงไว้ในรูปที่ ๖ ซึ่งประกอบขึ้นตามวิธีของ Tongroach (1977)[๓๒] และ Davies กับ Tongroach (1979)[๓๓] ดังนี้ glass micropipette ทำจาก capillary tube (เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก ๑.๓-๑.๔mm) ดึงปลายเล็กลง ขนาด ๕๐-๑๐๐ µm (โดยใช้ micropipette puller) glass pipette นี้ นำมาต่อกับ "Agla" microsyringe (Wellcome) โดยใช้ polyethylene tube ภายใน syringe, polyethylene Tube และ micropipette บรรจุด้วย liquid paraffin โดยขจัดจนไม่มีฟองอากาศอยู่ภายในเลย สารละลาย HRP ถูกนำมาบรรจุไว้ในส่วนปลายของ pipette เท่านั้น (1.5 mm จากปลาย) วิธีบรรจุทำโดยการดูดกลับ โดยใช้ negative pressure

๒.๑.๓.๓ Dental drill

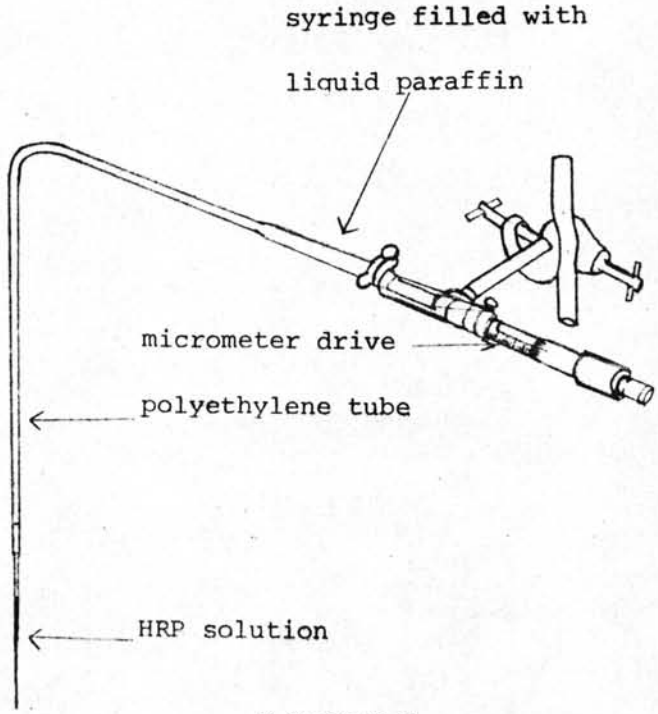
๒.๑.๓.๔ Perfusion kit ประกอบด้วย air pump และขวด pressure reservoir บรรจุ perfusion fluid

๒.๑.๓.๕ เครื่องมือผ่าตัด

๒.๑.๓.๖ Freezing microtome Cat. No. 880, American Optical company

๒.๑.๓.๗ Light microscope (Olympus) มีกำลังขยาย 10 x 10, 10 x 40, 20 x 10 และ 20 x 40

๒.๑.๔ ยาสลบใช้ Pentobarbital sodium solution ขนาดที่ให้ 35 mg/kg ฉีดเข้ามาช่องท้อง



005889

รูปที่ ๖ แผนภูมิแสดงการจัดเครื่องมือซึ่งใช้ฉีด HRP solution ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งประกอบขึ้นตามวิธีของ Tongroach[๓๒] และ Davies กับ Tongroach[๓๓] คือ glass micropipette ทำจาก capillary tube (เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก ๑.๓-๑.๔ ม.ม.) ดึงให้ปลายเล็กลงขนาด ๕๐-๑๐๐ um) แล้วนำมาต่อกับ "Agla" microsyringe โดยใช้ polyethylene tube ภายใน syringe, polyethylene tube และmicropipette บรรจุด้วย liquid paraffin โดยขจัดจนไม่มีฟองอากาศอยู่ภายในเลย

i 18000423

๒.๒ วิธีการ

๒.๒.๑ การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยใช้ pentobarbital sodium solution (35 mg/kg) ฉีดเข้าทางช่องท้อง นำศีรษะของหนูเข้าตรึงไว้ในเครื่อง Stereotaxic apparatus for rat ตามวิธีของ Fifkova และ Marsala[๓๔] กรีดหนังศีรษะตามแนวกลางตัวจากบริเวณ frontal ถึง occipital ของกระโหลกศีรษะ ถ่างหนังศีรษะออก แล้วเกลี่ยเนื้อเยื่อบริเวณข้าง ๆ ออกจนหมด เจาะรูกระโหลกศีรษะด้วย dental drill ให้ได้ขนาดพอที่จะฉีด HRP ได้ ในตำแหน่งที่ได้กำหนดเลือกไว้ในหนูขาวแต่ละตัว โดยอาศัย stereotaxic map ตามระบบของ Fifkova Marsala[๓๔]

๒.๒.๒ การกำหนดบริเวณสำหรับฉีด HRP

ตำแหน่งที่จะฉีด HRP ในเปลือกสมองด้านหน้า (frontal cortex) ใช้ stereotaxic co-ordinates ตาม stereotaxic ของหนูขาว โดย Fifkova และ Marsala[๓๔] โดยกำหนดจะฉีดตั้งแต่ AP 0 ถึง AP-5 จุดหนึ่ง ๆ ห่างกัน 1 mm ทั้งตามแนว anterior-posterior และตามแนว lateral ทั้งหมดมี ๓๓ ตำแหน่ง ในการทำวิจัยครั้งนี้ หนูตัวที่ ๑ ถึงตัวที่ ๑๖ ได้กำหนดฉีด HRP ๙ จุดแต่เมื่อได้พบว่าไม่มีการไขว้ของวิถีประสาทจากสมองซีกตรงกันข้ามมาถึงบริเวณที่ฉีดเลย ฉะนั้น เพื่อความรวดเร็วขึ้นของการวิจัย หนูตัวที่ ๑๗ ถึงตัวที่ ๒๗ จึงได้กำหนดตำแหน่งฉีด HRP ทั้งสองข้างของสมอง โดยฉีดข้างละจุด แล้วทำเครื่องหมายเป็นสัญญลักษณ์ไว้ให้ทราบได้อย่างแน่ชัดว่าข้างใดเป็นข้างซ้ายหรือข้างขวา ในการฉีด HRP นี้ เมื่อเราทำการวิจัยได้ใช้ Hamilton microsyringe ขนาด 10 µl แต่ได้พบว่าปลายเข็มของ syringe ดังกล่าวมีขนาดใหญ่ ทำให้ควบคุมอัตราความเร็วในการฉีดได้ยาก ซึ่งมักเป็นผลให้ HRP ซึมออกนอก cortex ได้ จึงได้เปลี่ยนมาใช้ glass micropipette แทน ซึ่งได้พบว่า ทำให้การฉีดได้ผลดีกว่า กล่าวคือ HRP ครอบคลุมบริเวณที่ฉีดเพียงใกล้ ๆ ปลาย pipette นอกจากนั้น การควบคุมความเร็วในการฉีดโดยใช้ micrometer ยังสามารถทำได้โดยง่าย โดยใช้ micrometer drive

๒.๒.๓ การฉีด HRP

เมื่อเตรียมสัตว์ทดลอง เครื่องมือที่จะใช้ฉีด และสารละลาย 30% HRP ใน 0.9% NaCl พร้อมกับกำหนดตำแหน่งที่จะฉีดเรียบร้อยแล้ว จึงดูดสารละลาย HRP ด้วยเข็มที่จะใช้ฉีด ยึด Hamilton syringe หรือ glass micropipette ให้ติดกับ stereotaxic pipette holder แทงเข็มของ syringe หรือ glass pipette ผ่านรูเปิดของกระโหลกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ปลายเข็มไปอยู่ในตำแหน่งที่ต้องการในสมอง แล้วฉีด HRP จำนวน 0.5 µl-1 µl ช้า ๆ ใช้เวลาฉีดประมาณ ๑๐ นาที และคาเข็มไว้ในสมองอีก ๑๐ นาที จึงดึงเข็มออก แล้วเย็บหนังศรีษะ หนูขาวจะฟื้นเป็นปรกติภายใน ๕-๑๐ ชม. ทำให้หนูขาวมีชีวิตอยู่ได้อีก ๒๔-๔๘ ชม.

๒.๒.๔ วิธีทำให้เนื้องสมองคงรูป (fixation)

เมื่อครบกำหนดที่ต้องการให้หนูมีชีวิตอยู่แล้ว นำหนูมาทำให้สลบอีกครั้งหนึ่ง ด้วยสารละลาย pentobarbital sodium เปิดทรวงอก เขี่ยเยื่อหุ้มหัวใจออก แทงปลายเข็มเข้าทางหัวใจห้องล่างข้างซ้าย ตัดหัวใจห้องบนขวา เพื่อให้เลือดและสารละลายออกทางนี้ ไล่แทนที่เลือดทั้งหมดในร่างกายด้วย isotonic phosphate buffer จนกระทั่งน้ำที่ไหลออกมาทางหัวใจด้านบนขวานั้นใส ต่อมาจึง perfuse ด้วย fixative solution (ประมาณ ๕๐๐ ml ต่อหนู ๑ ตัว) ภายใต้ความดัน ซึ่งจะเพียงพอที่จะทำให้เนื้อสมองคงรูปอยู่ได้ แล้วจึงตัดหัวหนูและแกะกระโหลกศรีษะเอาสมองออกทันที กรีดสมองข้างขวาตามแนวยาว เพื่อเป็นเครื่องหมายบอกให้ทราบว่าเป็นข้างขวา หลังจากแช่สมองใน fixative solution อีกประมาณ ๑๒-๑๘ ชม. แล้ว จึงเปลี่ยนมาแช่ใน ๓๐% sucrose ใน phosphate buffer pH 7.4 จนสมองจมลงไปภายในสารละลายนี้

๒.๒.๕ ปฏิกริยาเพื่อให้เมล็ดของ HRP ปรากฏ

นำสมองที่ผ่านวิธีในข้อ ๒.๒.๔ มาตัดด้วยวิธี frozen section หนาประมาณ ๕๐ µ ด้วย freezing microtome แล้วเก็บ sections เหล่านี้เรียงตามลำดับ (serial section) ไว้ในสารละลาย ๕% sucrose ใน phosphate buffer pH 7.4 นำ section นี้มาเข้าขบวนการทำปฏิกริยาทางฮิสโตเคมี กับ peroxidase (peroxidase histochemical reaction) เพื่อให้ HRP granules ปรากฏ โดยใช้ 3,3' diaminobenzidine tetra HCl (DAB) เป็น substrate ตามวิธีของ Graham และ Karnovsky[๓๕] โดยขั้นแรก pre-incubate sections

ในสารละลาย 50 mg DAB ใน 100 ml Tris HCl buffer pH 7.6 เป็นเวลานาน ๕ นาที แล้วเปลี่ยนมา incubate ใน ๕๐ mg DAB ใน 100 ml Tris HCl buffer ซึ่งผสม 66 µl ของ 30% H_2O_2 นาน ๑๕ นาที section จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แล้วจึงล้างด้วยน้ำ ๓ ครั้ง ๆ ละ ๑๐ นาที ในที่สุดจึงนำ serial section นี้มาเรียงไว้บน microscopic slide ปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

อนึ่ง จากรายงานของ Keefer และ Christ [๓๖] ในปี ๑๙๗๖ และ Wong Riley [๓๗] ในปี ๑๙๗๖ พบการปรากฏของ false positive cell โดยผลที่เนื่องมาจาก endogenous peroxidase ในสมองของหนูขาวและสิง ทั้ง ๆ ที่สัตว์ทดลองเหล่านี้ไม่ได้รับการฉีด HRP ซึ่งเป็น exogenous pexoxidase แต่ถ้ามีสภาวะต่าง ๆ เหมาะสม false positive cell ก็อาจปรากฏขึ้นได้ ฉะนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้พยายามควบคุมเกี่ยวกับความเป็นกรด ด่าง และความเข้มข้นของ H_2O_2 [๓๗] ให้พอเหมาะสำหรับการปรากฏของ exogenous HRP granule และหลีกเลี่ยงการปรากฏของ false positive cell

๒.๒.๖ วิธีย้อมสี (staining method)

นำ slide จาก ๒.๒.๕ มาแช่ใน xylene ๕ นาที แล้วทำให้แห้งในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงแช่ใน 70% alcohol อีก ๕ นาที จากนั้นจึง hydrate ด้วยน้ำ แล้วจึงนำ slide มาย้อมสีด้วย 0.1% cresyl violet นานประมาณ ๓-๕ นาที แล้วล้างด้วยน้ำ จากนั้น dehydrate ด้วย 100% alcohol แล้วล้างด้วย xylene แล้วจึงปิด slide ด้วย cover slip

๒.๒.๗ การศึกษาทาง histology

นำ slide เหล่านี้มาตรวจดูอย่างละเอียดโดย light microscope ทั้ง bright and dark ground illuminations ด้วยกำลังขยาย 10 x 10, 10 x 40, 20 x 10 และ20 x 40 เพื่อหา cell ที่มีอนุพันธ์สีน้ำตาลของ HRP ซึ่งปรากฏอยู่ในลักษณะของเม็ด (positive HRP cell) แล้วจึงเขียนบันทึกเครื่องหมายลงบน serial diagram ของ brain section ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ การแยกแยะบริเวณสมอง การเรียกชื่อตามกายวิภาค และการใช้คำย่อ ได้ใช้ตาม stereotaxic atlas for cat, rabbit and rat ของ Fifkova และ Marsala [๓๙]

๒.๒.๔ การสร้างแผนผังเพื่อแสดงผลการทดลอง

เมื่อได้ตรวจดูในบริเวณ subcortical โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ thalamusและ midbrain tecmentum ในส่วนที่ substantia nigra ครอบคลุมไปถึงแล้ว หากพบ HRP positive cells ในบริเวณใดก็ทำเครื่องหมายแสดงไว้ในบริเวณเดียวกันนั้นใน serial diagram ของสมอง ขณะเดียวกันใน serial diagram ก็จะแสดงบริเวณที่ฉีด HRP รวมทั้งบริเวณรอบ ๆ รอยฉีดที่ได้พบว่า HRP แพร่กระจายไปถึง ความสัมพันธ์เช่นนี้ย่อมแสดงว่า มีวิถีประสาทเชื่อมระหว่างบริเวณที่พบ HRP positive cell กับบริเวณที่ฉีด โดย HRP positive cell เหล่านั้นจะส่งใยประสาท (axon) ไปในวิถีเหล่านั้น เพื่อไปสิ้นสุด ณ บริเวณที่ฉีด

ตารางที่ ๑

ข้อมูลสรุปเกี่ยวกับน้ำหนักสัตว์ทดลอง, ปริมาณ HRP ที่ฉีด,ระยะเวลาที่ปล่อยให้มีชีวิตอยู่อีกหลังจากฉีด HRP และบริเวณที่ฉีด HRP ในหนูแต่ละตัว ของการวิจัยครั้งนี้

สัตว์ทดลอง Rat - No	น้ำหนัก	ปริมาณ HRP (µl)	ระยะเวลาที่ให้มีชีวิตอยู่อีก (ชั่วโมง)	ตำแหน่งที่ฉีด HRP*		
				L	AP	D
01	266	0	48		CONTROL	
02	274	1	48	L1	AP-5	D2.5
03	279	1	48	L2	AP-4	D2.5
04	246	1	48	L2	AP-5	D2.5
05	242	0.5	48	L1	AP-3	D2.5
06	280	0.5	48	L1	AP-4	D1
07	275	0.5	48	L4	AP-4	D3
08	276	0.5	48	L3	AP-3	D3
09	300	0.5	48	L3	AP-5	D3
10	280	0.5	48	L3	AP-4	D3
11	200	0.5	48	L3	AP-2	D3
12	200	0.5	48	L1	AP-2	D1
13	225	0.5	48	L5	AP 0	D4
14	215	0.5	48	L3	AP-1	D3
15	228	0.5	48	L4	AP-2	D3
16	224	0.5	48	L3	AP 0	D3
17	218	0.5	48	(l)L2	AP-1	D2.5
				(r)L2	AP 0	D2.5

ตารางที่ ๑ ต่อ

สัตว์ทดลอง Rat - No	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาณ HRP (µl)	ระยะเวลาที่ให้มีชีวิตอยู่อีก (ชั่วโมง)	ตำแหน่งที่ฉีด HRP*		
				L	AP	D
18	200	0.5	48	(l) L4	AP-3	D3
				(r) L1	AP-1	D2.5
19	226	0.5	48	(l) L4	AP 0	D3
				(r) L2	AP-3	D2.5
20	225	0.5	48	(l) L4	AP-1	D3
				(r) L2	AP-2	D2.5
21	244	0.5	48	(l) L1	AP 0	D2.5
				(r) L5	AP-2	D4
22	260	0.5	48	(l) L5	AP-1	D4
				(r) L5	AP-3	D4
23	212	0.5	48	(l) L1	AP-2	D2.5
				(r) L1	AP-3	D2.5
24	200	0.5	48	(l) L1	AP-1	D2.5
				(r) L1	AP-4	D2.5
25	206	0.5	48	(l) L5	AP 0	D7
				(r) L3	AP-5	D4
26	200	0.5	48	(l) L5	AP-1	D7
				(r) L4	AP-4	D6
27	208	0.5	48	(l) L5	AP-2	D7
				(r) L5	AP-3	D7

*ตาม stereotaxic atlas ของ Fifkova และ Marsala[34]

L = lateral plane

AP = anterior-posterior plane

D = depth

r = right

l = left