

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาเนื้อเยื่อสมองส่วนพรีซูปิคิวลัม (presubiculum) ในครั้งนี้ เป็นการศึกษาด้วยการทดลอง ภายในห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูขาว (Sprague-Dawley rats) เพศผู้ ขนาดตัวโตเต็มวัย อายุ 8-10 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-250 กรัม จำนวน 100 ตัว รายละเอียดการศึกษาเป็นการแสดงคุณลักษณะของเซลล์ประสาท และการติดต่อเชื่อมโยงระหว่างเส้นใยประสาทชั้นที่ 5 ในสมองส่วนพรีซูปิคิวลัม กับสมองส่วนอื่น วิธีการที่นำมาใช้ศึกษาแบ่งออกเป็นการศึกษา ลักษณะทางโครงสร้างของเซลล์ประสาท เช่น ชนิด ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่มาประกอบกันเป็นชั้นต่างๆ (cytoarchitectonic) โดยการย้อมเนื้อเยื่อสมองหนูด้วยเมทิลีนบลู (Nissl stain) (ภาคผนวก ก) ร่วมกับการศึกษาลักษณะของการแบ่งเป็นชั้น และขอบเขตของสมอง (chemoarchitectonic) โดยการย้อมเนื้อเยื่อสมองเพื่อหาเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase reaction) (ภาคผนวก ข) และเปรียบเทียบลักษณะที่สอดคล้องกับการศึกษา การติดต่อเชื่อมโยงของเซลล์ประสาทในชั้นนี้ด้วยการฉีดสารเรืองแสงเข้าไปในส่วนปลายเส้นใยประสาทแอกซอน (terminal field) ที่ถูกส่งออกมาจากเซลล์ประสาทในชั้นที่ 5 ของสมองส่วนพรีซูปิคิวลัม (retrograde axoplasmic labeling with fluorescent dye) (ภาคผนวก ค) กรรมวิธีที่ใช้ศึกษาทั้งหมดมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ฉีดสารทำให้สลบ (sodium pentobarbital) ปริมาณ 35-40 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูทดลอง ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าหนูสลบจริง
2. จัดตำแหน่งหัวหนูให้อยู่กับที่โดยใช้เครื่องยึดหัวหนู (stereotaxic unit) (ภาคผนวก ง)
3. เปิดผิวหนังเหนือหัวหนูโดยใช้มีดกรีดในแนวกึ่งกลางขนานกับความยาวส่วนหัว เพื่อเปิดให้เห็นกระดูกกะโหลกศีรษะและลอกเยื่อหุ้มกระดูกออก
4. วัดตำแหน่งสมองบริเวณที่ต้องการฉีดสารเรืองแสง โดยใช้คู่มือแสดงภาพส่วนต่างๆ ของสมองหนู (stereotaxic atlas) ของ Pellegrino, Pellegrino and Cushman (1981) เป็นแนวทางในการกำหนดค่าตำแหน่งโครงสร้างที่ต้องการฉีดสารเรืองแสงเข้าไป และทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งที่วัดไว้ ในกรณีที่ต้องการความชัดเจนของรายละเอียดเกี่ยวกับตำแหน่งที่วัดสามารถใช้กล้อง

จุลทรรศน์ผ่าตัด (surgical microscope) ขยายช่วยได้ เพื่อให้ตำแหน่งที่กำหนดมีความถูกต้องมากที่สุดและไม่ผิดพลาด

5. เจาะกระดูกส่วนหัวตรงตำแหน่งที่วัดไว้โดยใช้เครื่องเจาะกระดูก เพื่อเปิดให้เห็นเยื่อหุ้มสมอง หลังจากนั้นกรีดเยื่อหุ้มสมองออก (ถ้ามีเลือดออกมากใช้สำลีสับห้ามเลือดก่อน)

6. ฉีดสารเรืองแสง (fluorescent dye) ซึ่งใช้ 2 ชนิดคือ ฟาสท์บลู (Fast blue) (4%FB; Illing, F.R.G.) และฟลูออโรโกลด์ (Fluoro-gold) (4%FG; Fluorochrome, Inc. Englewood, Co.) ที่มีความเข้มข้นของสาร 4 กรัมในน้ำ 100 กรัม ปริมาณ 30-40 นาโนลิตร ผ่านทางเข็มฉีดยาแฮมิลตัน (Hamilton syringe) ขนาด 0.5-1 ไมโครลิตร เข้าไปที่ตำแหน่งซึ่งกำหนดไว้แล้วในข้อ 4. (หนูแต่ละตัวอาจได้รับการฉีดสารเรืองแสงทั้งสองชนิดหรือชนิดเดียว) เมื่อปริมาณของสารเรืองแสงเข้าไปในเนื้อเยื่อสมองหนูตามต้องการแล้วให้แช่ปลายเข็มไว้ในเนื้อเยื่อสมองหนูอีกประมาณ 3-5 นาที จึงดึงปลายเข็มออก

7. เย็บผิวหนังส่วนหัวหนูให้สนิทโดยใช้คลิปเย็บ

8. เลี้ยงหนูไว้ประมาณ 7-10 วัน (survival time) เมื่อครบกำหนดแล้ว หนูแต่ละตัวจะถูกนำมาทำให้สลบอีกครั้งด้วยสารชนิดเดียวกันแต่มีปริมาณมากขึ้นเป็น 50-60 มก./กก. เข้าไปในช่องท้อง

9. เปิดหน้าอกหนูที่สลบเพื่อทำการสวนหัวใจ (transcardial perfusion) โดยใช้ปลายเข็มแทงผ่านหัวใจเข้าสู่หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ล้างด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 9 กรัม ในน้ำ 1000 มล. (0.9% normal saline) ปริมาณ 50 มล. ตามด้วยสารตรึงเนื้อเยื่อ (10% formalin ใน 0.1 M. phosphate buffer PH 7.4) ปริมาณ 50-60 มล.

10. ผ่าตัดเอาเฉพาะส่วนสมองออกจากกะโหลกหัวหนู แช่เนื้อเยื่อสมองลงในสารละลายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 30 กรัม (30% sucrose) ในสารตรึงเนื้อเยื่อ 100 มล. (10% formalin ใน 0.1 M. phosphate buffer) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ประมาณ 24-48 ชม.)

11. นำเนื้อเยื่อสมองมาตัดด้วยเครื่องตัดเย็น (freezing microtome) ในแนวทำมุมประมาณ 20° กับแนวระนาบเพื่อให้เห็นบริเวณของสมองส่วนพรีซูบิคิวลัมได้กว้างมากขึ้น (oblique section) ในลักษณะเป็นแผ่น และต่อเนื่องกันไปตลอด (serial section) แต่ละแผ่นมีความหนาประมาณ 30 ไมโครเมตร

12. แผ่นเนื้อเยื่อสมองถูกเก็บไว้ศึกษา 3 แผ่น ทั้ง 3 แผ่น ทำให้ได้แผ่นเนื้อเยื่อทั้งหมด 3 ชุด แต่ละชุดจะถูกเก็บไว้ชั่วคราวในตะแกรงที่แบ่งเป็นช่องและแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. วางแผ่นเนื้อเยื่อสมองชุดที่ 1 ลงบนกระจกสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin coated slide) (ภาคผนวก จ)

วางแผ่นเนื้อเยื่อสมองชุดที่ 2 ลงบนกระจกสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยสารละลายเจลาตินและตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24-48 ชม. จึงนำไปย้อมด้วยเมทิลีนบลู (0.05% methylene blue)

นำแผ่นเนื้อเยื่อสมองชุดที่ 3 ไปย้อมเพื่อหาเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase reaction) และวางเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการย้อมแล้วลงบนแผ่นสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยเจลาตินทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

14. เมื่อแผ่นเนื้อเยื่อสมองแห้งสนิทแล้วจึงนำแผ่นสไลด์ทั้งหมดไปทำให้ใส (clear) ในสารไซลีน (xylene) ประมาณ 1 นาที จึงปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

15. สไลด์ที่ได้จะถูกนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแหล่งกำเนิดแสง 2 ชนิด คือ ให้แสงที่มีความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visible light) และอีกชนิดหนึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นย่านอุลตราไวโอเลต (330-380 นาโนเมตร) เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ประสาทและการติดต่อเชื่อมโยงของเส้นใยประสาทดังนี้

ชุดที่ 1 : แสดงเซลล์ประสาทที่เรืองแสงของสารเรืองแสง (fluorescent dye)

ชุดที่ 2 : เปรียบเทียบเซลล์ประสาทที่เรืองแสงกับเซลล์ประสาทที่ติดสีฟ้าของเมทิลีนบลู

ชุดที่ 3 : เปรียบเทียบเซลล์ประสาทที่เรืองแสง กับชั้นต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase reaction)

16. สไลด์ชุดที่ 2 ที่ผ่านการย้อมด้วยสารละลายเมทิลีนบลู จะถูกนำมาศึกษาลักษณะที่แตกต่างกันทั้งด้านรูปร่าง ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้น ด้วยวิธีการวิเคราะห์ภาพ (image analyser) (ภาคผนวก ฉ)

17. ถ่ายภาพและแปลผล