

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วยสารละลายเมทิลีนบลู
(Methylene blue staining)

ภาคผนวก ก

เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วยสารละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue staining)

วิธีการย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วยสารละลายเมทิลีนบลูที่มีความเข้มข้นของสาร 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. (0.05% methylene blue) (methylene blue chloride ; Allied Chemical Corp, U.S.A.) เป็นวิธีการย้อมแกรนูลภายในเซลล์ประสาท (Nissl stain) วิธีหนึ่งที่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาททั้งทางด้านรูปร่าง, ขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ประสาท (cytoarchitectonic) ได้อย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังสามารถใช้วิธีการนี้ย้อมร่วมกับเนื้อเยื่อสมองที่ได้รับการฉีดสารเรืองแสงโดยไม่มีผลทำให้สารเรืองแสงที่อยู่ในเนื้อเยื่อสมองเสื่อมคุณภาพ (Sripanidkulchai and Wyss, 1986) ซึ่งแตกต่างจากการย้อมแกรนูลภายในเซลล์ประสาทวิธีอื่นที่ทำให้สารเรืองแสงเสื่อมคุณภาพด้วย ผลที่ได้จากการย้อมด้วยวิธีการนี้จะทำให้เซลล์ประสาทติดสีฟ้าของเมทิลีนบลู ดังขั้นตอนการดำเนินงานต่อไปนี้

1. วางแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการตัดด้วยวิธีการตัดเย็น (freezing technique) ให้เรียงลำดับอย่างต่อเนื่องลงบนกระจกสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยเจลาติน (gelatin coated slide)
2. นำแผ่นกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อสมองจากข้อ 1 แช่ลงในน้ำกลั่นที่มีกรดน้ำส้ม (acetic acid) ผสมอยู่เล็กน้อย ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที
3. นำแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นจากข้อ 2 จุ่มลงในสารละลายเมทิลีนบลู นาน 1-3 นาที หรือสามารถสังเกตได้จากลักษณะปรากฏการติดสีของเนื้อเยื่อสมองที่แตกต่างกันอยู่ในไวท์แมทเทอร์ (white mater) โดยเนื้อเยื่อสมองบริเวณไวท์แมทเทอร์จะมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะการติดสีม่วง ขณะที่บริเวณเกรย์แมทเทอร์ (gray mater) ติดสีฟ้า
4. ล้างเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการย้อมด้วยสารละลายเมทิลีนบลู ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 ครั้ง หรือประมาณ 10 วินาที เพื่อให้สีที่ติดเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อสมองซึ่งมากเกินไป
5. ซับน้ำออกจากแผ่นเนื้อเยื่อสมองโดยใช้แผ่นกระจกสไลด์ซับลงบนกระดาษกรองเพื่อให้เนื้อเยื่อสมองเรียบและติดแน่นกับกระจกสไลด์
6. ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 6-24 ชม.
7. นำแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการย้อมแล้วมาทำให้ใส (clear) ในสารไซลีน (xylene) ก่อนปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

ภาคผนวก ข

เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อสมองเพื่อหาเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส
(Acetylcholinesterase staining)

ภาคผนวก ข

เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อสมองเพื่อหาเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase staining)

วิธีการย้อมเนื้อเยื่อสมองเพื่อหาเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการแบ่งชั้นและขอบเขตของสมองส่วนต่าง ๆ (chemoarchitectonic) ผลที่ได้จากวิธีการนี้จะแสดงในลักษณะการติดสีน้ำตาลของตะกอนซิลเวอร์ซัลไฟด์แตกต่างกันตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการมีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) อยู่ในแต่ละชั้นของสมอง การศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธีการของ Sripanidkulchai and Wyss (1986) มาใช้ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Geneser-Jensen and Blackstad (1971) โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. นำแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการตัดด้วยวิธีการตัดเย็น (freezing technique) ใส่ลงในตะแกรงที่ถูกแบ่งเป็นช่องในลักษณะเรียงเป็นลำดับอย่างต่อเนื่อง

2. นำตะแกรงที่มีแผ่นเนื้อเยื่อสมองบรรจุอยู่ในแต่ละช่องไปทำให้อุ่นขึ้น (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 60-75 นาที ในสารละลายอะเซทิลโคลีน (Cu-acetylthiocholine medium containing) ซึ่งได้รับการเตรียมใหม่ ๆ ประกอบด้วย

- 2.1 4 mM acetylthiocholine

- 2.2 2 mM copper sulfate

- 2.3 10 mM glycine

- 2.4 50 mM sodium acetate

- 2.5 0.02 mM ethopropazine เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่มากเกินไป (unspecific cholinesterase reaction) (Bayliss and Todrick, 1956 ; Gordon, 1984 ; Lewis, 1961)

ควบคุมความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายอะเซทิลโคลีนที่ได้ให้อยู่ในระดับ 5 ด้วยการเติมกรดน้ำส้ม (glacial acetic acid) ลงไปที่ละหยด ตะแกรงที่มีเนื้อเยื่อสมองนี้จะถูกเขย่าอย่างเป็นจังหวะประมาณ 1 ครั้ง ในทุกๆ 2 วินาที เพื่อให้สารละลายเข้าไปทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึงตลอดเนื้อเยื่อสมอง

3. ล้างเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านการอบมาแล้วในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง

4. แช่เนื้อเยื่อสมองในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ ที่ความเข้มข้น 1.25 กรัมในน้ำ 100 มล. (1.25% sodium sulfide) โดยควบคุมความเป็นกรดต่างให้อยู่ในระดับ 7.8 ใช้เวลาประมาณ 30-60 วินาที

5. ล้างเนื้อเยื่อสมองด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง

6. แช่เนื้อเยื่อสมองลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดที่ความเข้มข้น 1 กรัม ในน้ำ 100 มล. (1% silver nitrate) ประมาณ 1 นาที
7. ล้างเนื้อเยื่อสมองด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง
8. วางแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านกรรมวิธีทั้งหมด ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยเจลาติน (gelatin coated slide)
9. ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6-24 ชั่วโมง
10. นำแผ่นกระจกสไลด์ซึ่งมีเนื้อเยื่อสมองติดอยู่นี้มาทำให้ใส (clear) ในไซลีน (xylene) ก่อนปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

ภาคผนวก ค

เทคนิคการศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดด้วยการฉีดสารเรืองแสง
(Retrograde transported tracer with fluorescent dye technique)

ภาคผนวก ค

เทคนิคการศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดด้วยการฉีดสารเรืองแสง(Retrograde transported tracer with fluorescent dye technique)

วิธีการศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดด้วยการฉีดสารเรืองแสงมีพื้นฐานทางการศึกษาโดยใช้คุณสมบัติของเส้นใยประสาทแอกซอน (axon) ที่สามารถเคลื่อนย้ายสารเป้าหมาย (markers) ในทิศทางเข้าหาตัวเซลล์ประสาทและออกจากเซลล์ประสาทได้ การนำวิธีการนี้มาใช้ทำให้ความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับการติดต่อเชื่อมโยง (connection) ของระบบประสาทมีการเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการศึกษาในระยะต่อมา จึงให้ความสนใจสารที่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดได้ เช่น สารเรืองแสง (fluorescent dyes) ระยะเวลาานมากกว่า 10 ปีมาแล้วที่สารเรืองแสงได้รับความสนใจและถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ประสาทต้นกำเนิด (origin of projection), การแตกแขนงเส้นใยประสาทแอกซอนของเซลล์ประสาทต้นกำเนิด (collateralization), พัฒนาการของทางเดินเส้นใยประสาทปกติ (neuronal pathway) และลักษณะรูปร่างของเซลล์ประสาท (morphology) (Sripanidkulchai and Wyss, 1994) ปัจจุบันสารเรืองแสงที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ สารฟลูออโรโกลด์ (Fluorogold; FG) (Schmued and Fallon, 1986) และสารเรืองแสงที่ให้แสงสีฟ้าหลายชนิดเช่น ฟาสท์บลู (Fast blue; FB) (Bentivoglio et al., 1978, 1980) สารเรืองแสงแต่ละชนิดที่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดได้เป็นอย่างดีส่วนมากจะเป็นสารที่มีการทำปฏิกิริยากับสารเตตราเมทิลเบนซิมายด์ (tetramethyl benzimide) ตามโปรโตคอล (protocol) ของ Mesulam (1982) โดยที่สารเรืองแสงเหล่านี้มีคุณสมบัติของการถูกดูดซึมจากบริเวณส่วนปลายเส้นใยประสาทแอกซอน (terminal field) แล้วย้อนกลับเข้าไปยังตัวเซลล์ประสาทได้ดี มีผลทำให้เซลล์ประสาทต้นกำเนิดเรืองแสงได้ ประสิทธิภาพของการเรืองแสงนี้ Schmued and Fallon (1986) ทำการทดสอบในสมองหนูโดยการทดลองฉีดสารฟลูออโรโกลด์เข้าไปยังบริเวณต่าง ๆ ของสมอง และทดสอบโดยการทดลองแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารเรืองแสงด้วยวิธีการโครมาโตกราฟี (chromatography) พบว่าสามารถแสดงรายละเอียดของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดได้ดีมากกว่าทั้งแสดงให้เห็นแขนงเล็ก ๆ ของเส้นใยประสาทได้อย่างชัดเจน แต่มีข้อเสีย คือจำกัดขอบเขตของตำแหน่งสารเรืองแสงได้ยาก ซึ่งแตกต่างจากคุณสมบัติของฟาสท์บลูที่สามารถจำกัดขอบเขตของตำแหน่งที่ฉีดได้ดีและยังสามารถถูกดูดซึมเข้าไปตามเส้นใยประสาทได้อย่างรวดเร็วด้วย (Huisman et al., 1983; Kuypers et al., 1980) นอกจากวิธีการศึกษาด้วยการฉีดสารเรืองแสงจะทำให้สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทต้นกำเนิดซึ่งอยู่ในแต่ละชั้นของสมองได้อย่างชัดเจนแล้วยังสามารถนำวิธีการนี้มาใช้ร่วมกับการศึกษาด้วยวิธีการอื่น ๆ อีกด้วย เช่น การศึกษาร่วมกับวิธีการย้อมเนื้อเยื่อหาเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส (Albanese and

Butcher, 1982) หรือการศึกษาร่วมกับวิธีการทางปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน (immunohistochemistry) (Brann and Emson, 1980; Hokfelt et al., 1979; Sawchenko and Swanson, 1981) นอกจากนั้นคุณสมบัติที่แตกต่างกันในเรื่องความยาวคลื่นของสารเรืองแสงยังทำให้สามารถแสดงการแตกแขนงของเส้นใยประสาทแอกซอนได้ด้วย (collateralization) ดังการศึกษาของ Van de Kooy et al. (1978) โดยใช้สารเรืองแสงอีแวนบลู (Evan blue; EB) และสารเรืองแสงดีเอพีไอ - พริมิลิน (DAPI - primiline) เพื่อแสดงว่าเส้นใยประสาทแอกซอนที่ถูกส่งมาจากเซลล์ประสาทในแมมมิลารีบอดี (mammillary body) จะเข้าไปทั้งในส่วนเทกเมนทัม (tegmentum) และส่วนธาลามัส (thalamus) เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะใช้ประโยชน์จากสารเรืองแสงได้มากแต่ยังมีข้อเสียคือการเรืองแสงของสารจะจางลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และเมื่อสารเรืองแสงสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกเช่น แสงอุลตราไวโอเลต, ความร้อน, แอลกอฮอล์ จะมีผลทำให้สารเสื่อมคุณภาพได้รวดเร็วขึ้น (Kuyers and Huisman, 1984; Sawchenko and Swanson, 1981) ดังนั้น Sripanidkulchai and Wyss (1986) จึงได้พัฒนาวิธีการเพื่อสามารถรักษาคุณภาพของการเรืองแสงในเนื้อเยื่อให้นานมากขึ้น ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ใช้วิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นมาด้วยทำให้สามารถรักษาคุณภาพของการเรืองแสงได้นานถึง 3 ปี สำหรับสารเรืองแสงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ ฟาสท์บลู และ ฟลูโอโรโกล ที่มีความเข้มข้นของสาร 4 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. ฉีดเข้าไปในสมองส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองในปริมาณ 30-40 นาโนลิตร โดยที่สารเรืองแสงทั้ง 2 ชนิดนี้ Sripanidkulchai ได้พัฒนาขึ้นมาเช่นเดียวกัน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. เตรียมหนูทดลองสำหรับฉีดสารเรืองแสงโดยการจัดตำแหน่งที่จะฉีดในเครื่องมือยึดหัวสัตว์ทดลอง (stereotaxic unit)
2. ใช้เข็มฉีดยาชนิด Hamilton syringe) ฉีดสารเรืองแสงขึ้นมาไว้ในกระบอกแก้วของเข็มฉีดยาชนิดจำนวนพอสมควร
3. ใช้ไม้พันสำลี 2 ตัวชุบน้ำกลั่นเช็ดปลายเข็มให้แห้งสะอาดเพื่อป้องกันการแพร่กระจาย (diffusion) ของสารเรืองแสงที่บริเวณตำแหน่งที่ฉีด
4. ฉีดสารเรืองแสงครั้งละประมาณ 0.01 ไมโครลิตรในทุก 5 นาทีทั้งหมดประมาณ 30-40 นาโนลิตร
5. แฉปลายเข็มไว้ในเนื้อเยื่อสมองหนูอีกประมาณ 5 นาที หลังจากฉีดสารเรืองแสงครั้งสุดท้ายเข้าไป ก่อนดึงปลายเข็มออกจากเนื้อเยื่อสมองหนู
6. เย็บปิดหนังหัวหนูให้เรียบร้อย

ภาคผนวก ง

เทคนิคการจัดตำแหน่งของส่วนหัวหนูโดยใช้เครื่องยึดหัวสัตว์ทดลอง
(Stereotaxis)

ภาคผนวก ง

เทคนิคการจัดตำแหน่งของส่วนหัวหนูโดยใช้เครื่องยึดหัวสัตว์ทดลอง (Stereotaxis)

เครื่องยึดหัวสัตว์ทดลอง (stereotaxic unit) มีประโยชน์มากสำหรับการทดลองที่เกี่ยวข้องกับทางประสาทวิทยาศาสตร์ เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากเครื่องมือนี้ในการจัดตั้งส่วนหัวของสัตว์ทดลองให้อยู่กับที่ในขณะที่มีกิจกรรมทางวิทยาศาสตร์ซึ่งเกี่ยวข้องกับส่วนหัว ดังการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการวัดเพื่อหาตำแหน่งต่าง ๆ ของสมองหนู เพื่อฉีดสารเรืองแสงเข้าไปในตำแหน่งที่ต้องการ โดยที่การวัดจะใช้แนวแกนทั้ง 3 มิติเป็นหลักคือ แนวแกนวัดในระนาบหน้า-หลัง (antero-posterior plane), แนวแกนวัดในระนาบกึ่งกลางไปด้านข้าง (medio-lateral plane), แนวแกนวัดในระนาบตั้ง (vertical plane) ซึ่งมีวิธีดำเนินการดังต่อไปนี้

1. จัดระนาบของส่วนหัวหนูตามหลักการของ de Groot (1959) ดังนี้

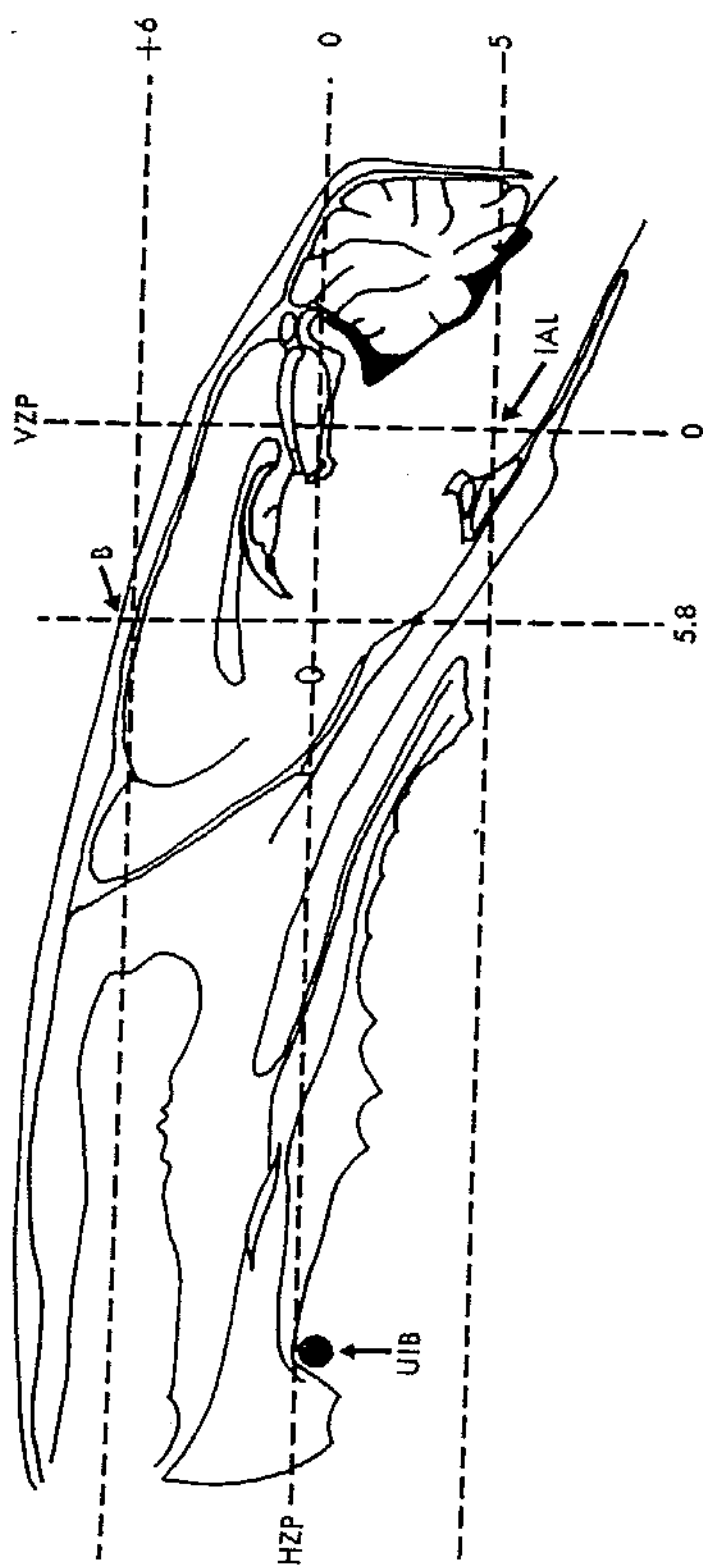
1.1 ระนาบในแนวนอนประกอบด้วย แนวเส้นสมมุติซึ่งลากผ่านจุดกึ่งกลางของรูหูจากข้างหนึ่งไปยังอีกข้างหนึ่ง (Interaural line; IAL) (แนวเส้นสมมุตินี้จะอยู่ต่ำกว่าระดับส่วนบนของตะขอเหล็กที่ยึดเกาะพื้นหน้าคู้บน (upper incisor bar) ของสัตว์ทดลองประมาณ 5 มม.) และ แนวเส้นสมมุติที่ลากผ่านส่วนบนของตะขอเหล็กที่ยึดเกาะพื้นหน้าคู้บนของสัตว์ทดลองในแนวกึ่งกลางขนานกับความยาวส่วนหัว ซึ่งแนวนี้อาจตรงกับตำแหน่งที่ลากผ่านส่วนหน้าของคอมมิชเชอร์ (anterior commissure) และส่วนหลังของคอมมิชเชอร์ (posterior commissure) พอดี (Horizontal zero plane; HZP) ทำให้ HZP อยู่สูงกว่า IAL ประมาณ 5 มม.

1.2 ระนาบในแนวตั้ง 1 ระนาบคือ เส้นสมมุติที่ลากไปตั้งฉากกับ IAL (Vertical zero plane; VZP) โดยตำแหน่งที่ระนาบนี้ตัดกับ IAL จะเป็นตำแหน่งที่ 0 ในแนวหน้า-หลัง นอกจากนั้นจะมีตำแหน่งของเบรกมา (bregma) ซึ่งเป็นจุดตัดระหว่างรอยต่อโคโรนัล (coronal suture) กับรอยต่อแซกจิทัล (sagittal suture) โดยระยะห่างจากเบรกมามายัง VZP มีความยาวประมาณ 5.8 มม.

2. ตรึงส่วนหัวหนูเข้ากับเครื่องยึดหัวสัตว์ทดลอง โดยใช้แกนเหล็ก (ear bar) สอดเข้าไปในรูหู (external auditory meatus) ทั้ง 2 ข้าง และใช้ตะขอเหล็ก (incisor bar) คล้องที่พื้นบนด้านหน้าเพื่อยึดและจับตรึงส่วนหัวให้อยู่กับที่ ด้วยวิธีการนี้เองทำให้แนวแกนของแท่งเหล็กตรึงหู 2 ข้างของสัตว์ทดลองให้อยู่ในระดับเดียวกันซึ่งเป็นระดับของ IAL

3. วัดหาตำแหน่งของสมองส่วนที่ต้องการตามแนวแกนทั้ง 3 มิติที่กล่าวถึงข้างต้นโดยใช้คู่มือแสดงภาพส่วนต่างๆของสมอง (stereotaxic atlas) ของ Pellegrino et al. (1981) เป็นแนวทางในการค้นหาค่าตำแหน่งซึ่งมี IAL หรือเบรกมาเป็นจุดอ้างอิง โดยกำหนดให้ IAL ที่ตำแหน่ง -5.8 และเบรกมาที่ตำแหน่ง 0 การคำนวณหาระยะห่างจากจุดอ้างอิงโดยการวัดค่าตำแหน่งที่ต้องการแล้วนำไปบวกเข้าหรือลบออกจากจุดอ้างอิง ค่าที่คำนวณได้นี้จะเป็นค่าที่อยู่ในแนวนอน

ภาพที่ ๑ ภาพวาดลายเส้นแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของกระโหลกหัวหนูในการจัดตำแหน่งของส่วนหัวโดยใช้เครื่องมือยัดหัวสัตว์ทดลอง (stereotaxic unit)
 (HZP = horizontal zero plane, IAL = interaural line, UIB = upper incisor bar, VZP = vertical zero plane B = bregma)



ภาคผนวก จ

เทคนิคการเคลือบแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายเจลาติน
(gelatin coated slide)

ภาคผนวก จ

เทคนิคการเคลือบแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin coated slide)

วิธีการเคลือบแผ่นกระจกสไลด์ด้วยสารละลายเจลาตินมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เนื้อเยื่อ
สมองสามารถยึดติดกับแผ่นกระจกสไลด์ได้ดีโดยไม่ลอกหลุดในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ของการ
ทดลอง ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังต่อไปนี้

การเตรียมสารละลายเจลาติน

1. เตรียมสารเจลาติน 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
2. เติมสารโครเมียมโพตัสเซียมซัลเฟต (chromium potassium sulfate) ปริมาณ 0.5 กรัม ลงไป คนให้ละลายจนเข้ากันดี
3. กรองสารละลายที่เข้ากันดีแล้วในขณะที่ยังร้อน

การเคลือบแผ่นกระจกสไลด์ด้วยสารละลายเจลาติน

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกสไลด์ และเช็ดให้แห้งด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95 มล. ในน้ำ 100 มล. (95% alcohol)
2. จุ่มแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วลงในสารละลายเจลาตินที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ
3. นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยเจลาตินแล้วเข้าตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ภาพ (Analytical measurement)

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ภาพ (Analytical measurement)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพ (image analysis) ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ภาพ เป็นวิธีการศึกษาโดยนำประโยชน์จากระบบคอมพิวเตอร์มาใช้งาน โดยโปรแกรม (software) ที่นำมาใช้ศึกษาเป็นโปรแกรมที่ทำงานเฉพาะด้านเพื่อการวิเคราะห์ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรม VIDS IV สำหรับการทำงานมีหลักการเช่นเดียวกันกับระบบคอมพิวเตอร์ทั่วไปซึ่งประกอบด้วยคอมพิวเตอร์ (hardware), โปรแกรมหรือชุดคำสั่ง และผู้ใช้งาน โดยโปรแกรมนี้อาจมีลักษณะพิเศษสามารถควบคุมผ่านทางระบบคอมพิวเตอร์ที่มีอยู่ในตัวเครื่อง หรือผ่านทางเครื่องคอมพิวเตอร์อีกตัวเพื่อประโยชน์ในการใช้งานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีหลักการว่าหน่วยรับข้อมูลของเครื่องคอมพิวเตอร์ทำหน้าที่ในการรับคำสั่งจากผู้ใช้งานผ่านให้เครื่องคอมพิวเตอร์ หน่วยประมวลผลกลางของเครื่องคอมพิวเตอร์จะทำหน้าที่เก็บรวบรวมคำสั่ง หรือข้อมูลที่ใช้ป้อนเข้าไปเพื่อนำไปวิเคราะห์ และแปลผลออกมาทางหน่วยแสดงผลที่เรียกว่าจอภาพ (screen) การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ประโยชน์จากเครื่องมือนี้ในการแปลข้อมูลที่ได้จากการวัดคุณลักษณะของเซลล์ประสาทในชั้นต่าง ๆ ของสมองส่วนพรีซูบิวลัมที่ถูกถ่ายภาพเก็บบันทึกไว้บนจอและคอมพิวเตอร์ ทำหน้าที่ในการวิเคราะห์ออกมาเป็นค่าที่เป็นตัวเลขทั้งทางด้านขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ โดยเกณฑ์ที่ใช้วัดในครั้งนี้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั้งหมด ดังนี้

1. การเปรียบเทียบขนาดของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นของสมองส่วนพรีซูบิวลัม หลักการวัดเซลล์ประสาทจะวัดทุกเซลล์ที่ปรากฏอยู่ในพื้นที่ ๆ หนึ่งซึ่งถูกกำหนดด้วยวิธีการสุ่มในแต่ละชั้นของสมอง และเซลล์ที่ถูกวัดต้องมีลักษณะของนิวคลีโอลัส (nucleolus) ปรากฏอยู่ด้วย ทำการวัดเซลล์ประสาทซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง หลังจากนั้นจึงกำหนดพื้นที่ใหม่และทำการวัดเช่นเดิม พื้นที่ของแต่ละชั้นที่ถูกกำหนดด้วยวิธีการสุ่มทั้งหมด 10 แห่งเท่ากันหมดทุกชั้น เพื่อให้การวัดขนาดของเซลล์ประสาทเป็นไปอย่างทั่วถึงตลอดทั้งชั้น โดยทำการวัดทั้งพื้นที่, เส้นรอบวง และเส้นผ่านกลางเซลล์ ข้อมูลที่ได้จากการวัดทั้งหมดจะถูกแปลค่าออกมาเป็นตัวเลขและเก็บบันทึกไว้ในหน่วยความจำของเครื่องคอมพิวเตอร์และสามารถแสดงข้อมูลต่าง ๆ ได้เมื่อต้องการ ดังตารางที่ 1 เป็นการแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นที่ได้จากการวัดขนาดของเซลล์ประสาทด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ภาพ

2. การเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในแต่ละชั้นของสมองส่วนพรีซูบิวลัม หลักการทั่วไปคล้ายกับการวัดขนาดของเซลล์ คือการหาค่าความหนาแน่นของเซลล์จะทำการสุ่มนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในพื้นที่ ๆ หนึ่ง 10 ครั้ง และกำหนดพื้นที่ทั้งหมด 10 แห่งเช่นกัน ซึ่งจะเท่าเหมือนกันทุกชั้น ข้อมูลที่ได้จะถูกบันทึกและแปลผลออกมาเป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์ในหนึ่งหน่วยพื้นที่