

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเนื้อเยื่อสมองบริเวณ entorhinal cortex เพื่อที่จะอธิบายลักษณะการจัดตัวเป็นชั้นของเซลล์ประสาท (cytoarchitectonic) โดยวิธีย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วย methylene blue (Nissl stain) (ดูภาคผนวก ก) ร่วมกับการศึกษาการติดสีภายในชั้น โดยปฏิกิริยาย้อมหาเอินไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน (acetylcholinesterase, AChE) (ดูภาคผนวก ข) และแสดงตำแหน่งและคุณลักษณะของเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทไปยัง subcortical structures โดยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายประสาทเหล่านั้น เพื่อแสดงให้เห็นเซลล์ประสาทต้นกำเนิด (retrograde axoplasmic tracing with fluorescent dye) (ดูภาคผนวก ค) การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดลองในหนูขาวเพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 180 กรัม ถึง 250 กรัม จำนวน 40 ตัว โดยมีกรรมวิธีในการเตรียมเนื้อเยื่อสมองสำหรับการศึกษาดังนี้

1. ฉีด sodium pentobarbital ในปริมาณ 35-40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องของหนู (intraperitoneal injection) เพื่อให้หนูสลบ
2. ตรึงส่วนหัวของหนูให้อยู่ในเครื่อง stereotaxis (ดูภาคผนวก ง)
3. กรีดหนังส่วนหัวของหนูในแนวกึ่งกลางตามความยาว เปิดให้เห็นกะโหลกตั้งแต่บริเวณ bregma จนถึงบริเวณ lambda แล้วขูดเอาเยื่อหุ้ม periosteum ออก ขับเลือดให้แห้ง
4. จัดตำแหน่งที่จะฉีดสารเรืองแสงโดยอาศัยการวัดระยะจากหนังสือ A stereotaxic atlas of the rat brain (Pellegrino *et al.*, 1981) เป็นแนวทาง และมองตำแหน่งผ่านกล้อง surgical microscope เพื่อความแม่นยำชัดเจนยิ่งขึ้น
5. เมื่อได้ตำแหน่งที่ต้องการแล้วใช้เครื่องเจาะเปิดกะโหลกศีรษะให้เห็นเยื่อหุ้มสมองที่อยู่ใต้กระดูก ต่อจากนั้นจึงกรีดเยื่อหุ้มสมองให้ขาดเปิดให้เห็นส่วนผิวของเนื้อสมอง
6. ใช้เข็มที่มีปลายแหลมขนาด 120 ไมโครเมตร และตรึงติดกับ Hamilton syringe ที่มีขนาด 1 ไมโครลิตร แทงเข้าไปในเนื้อสมองในตำแหน่งและระดับที่ต้องการ แล้วฉีดสารเรืองแสงชนิดต่าง ๆ ลงไปในปริมาณ 25-40 นาโนลิตร ในการทดลองครั้งนี้ใช้สารเรืองแสง 2 ชนิด คือ Fast blue ที่มีความเข้มข้น 4% ในน้ำ (4% FB; ILLing, F.R.G.) และ Fluoro-Gold ที่มีความเข้มข้น 4% ในน้ำ (4% FG; Fluorochrome, Inc. Englewood, Co.) สำหรับการฉีดสารเรืองแสงดังกล่าวนี้หนูบางตัวอาจฉีดเพียงชนิดเดียว และบางตัวอาจฉีดทั้งสองชนิด
7. ภายหลังการฉีดสารเรืองแสงแล้ว จะเลี้ยงหนูไว้ประมาณ 7-10 วัน
8. เมื่อครบกำหนดจะผ่าหนูโดยการฉีด sodium pentobarbital ในปริมาณที่สูงขึ้น คือ 55-60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องเช่นเดิม แล้วเปิดช่องท้องและช่องอกให้เห็นหัวใจ

9. ทำการฉีดล้างไล่เลือดออกจากระบบการไหลเวียนทั้งหมดด้วยน้ำเกลือ โดยใช้เข็มแทงทะลุหัวใจห้องล่างด้านซ้าย (left ventricle) ให้ปลายเข็มอยู่ในเส้นเลือดแดงใหญ่ aorta ตรงบริเวณ arch of aorta แล้วปล่อยน้ำเกลือเข้าไปแทนที่เลือดในเส้นเลือดในอัตรา 40 หยด/นาที และเพื่อให้เลือดไหลออกจากระบบไหลเวียนหมด จะตัดกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา (right atrium) ให้ทะลุ ในการนี้ จะใช้น้ำเกลือประมาณ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะฉีดน้ำยา fixative (10% formalin in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เข้าแทนที่น้ำเกลือ เพื่อเป็นการตรึง (fix) เนื้อเยื่อสมอง

10. ทำการแกะเอาสมองหนูกออกมาอย่างรวดเร็วและด้วยความระมัดระวังไม่ให้มีการฉีกขาด หลังจากนั้นเอาสมองหนูมาแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 30% ใน fixative (30% sucrose in 10% formalin in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

11. ตัดเนื้อเยื่อสมองเป็นแผ่นบางๆตามแนวที่พามุมกับแนวระนาบ (horizontal plane) ของสมองประมาณ 20° โดยใช้เครื่องตัด freezing microtome ชิ้นเนื้อเยื่อแต่ละแผ่นจะมีความหนา 30 ไมโครเมตร โดยที่แผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้จะแยกเป็น 3 ชุด แต่ละชุดจะเป็นการตัดเก็บ 1 ใน 6 ของแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดอย่างเป็นลำดับต่อเนื่อง (ตัดเก็บ 3 แผ่น และตัดทิ้ง 3 แผ่นอย่างต่อเนื่อง) และเก็บแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ไว้ในตะแกรงที่แบ่งเป็นช่อง ๆ สำหรับเก็บเนื้อเยื่อ (tissue rack) ซึ่งแช่อยู่ในน้ำกลั่นที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส

12. วางแผ่นเนื้อเยื่อชุดที่ 1 และชุดที่ 2 บนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin coated slides) แล้วทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 12-24 ชั่วโมง จึงนำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อชุดที่ 2 มาย้อมด้วย methylene blue (Nissl stain) (ดูภาคผนวก ก)

13. เนื้อเยื่อชุดที่ 3 นำไปย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน (acetylcholinesterase, AChE) (ดูภาคผนวก ข) จึงนำไปวางบนแผ่นสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้งเช่นเดียวกัน

14. นำเอาสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชุดดังกล่าวไปทำให้ใส (clearing) โดยการจุ่มใน xylene แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (coverslips)

15. เนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ที่ผ่านกรรมวิธีในการเตรียมดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น จะนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสง ที่มีความยาวคลื่นแสงที่เห็นด้วยตา (visible wave-length) และผ่านความยาวคลื่นแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งมีความยาวคลื่น 330-380 นาโนเมตร

16. นำเนื้อเยื่อชุดที่ 2 ไปศึกษาขนาดและความหนาแน่นของเซลล์แต่ละชั้น โดยใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพ ผ่านเครื่องคอมพิวเตอร์ (image analysis program) ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษาได้แก่ พื้นที่ของเซลล์ เส้นรอบวงของเซลล์ เส้นผ่านกลางของเซลล์ และจำนวนเซลล์ต่อหน่วยพื้นที่