

การคำนวณ

ภาคผนวก ก
การย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วย methylene blue (Nissl stain)

การย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วย methylene blue (Nissl stain)

การย้อมเนื้อเยื่อสมองด้วย methylene blue นี้ เป็นการย้อม Nissl stain วิธีหนึ่ง โดยมีวัตถุประสงค์ให้เห็นรูปร่างลักษณะและขนาดของเซลล์ประสาทตลอดจนการจัดตัวเป็นชั้นของกลุ่มเซลล์ภายในเนื้อเยื่อสมอง โดยการใช้สารละลาย methylene blue มีความเข้มข้น 0.05% ในน้ำกลั่น (methylene blue chloride; Allied chemical corp. U.S.A.) จากการศึกษาพบว่าสารละลายนี้สามารถย้อมเนื้อเยื่อสมองที่มีสารเรืองแสงอยู่ในเซลล์ประสาทโดยไม่มีผลทำให้สารเรืองแสงเสื่อมประสิทธิภาพลงไป (Sripanidkulchai and Wyss, 1986b)

ขั้นตอนในการย้อมเนื้อเยื่อประสาทด้วย methylene blue มีดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อสมองที่วางอยู่บนแผ่น slide ไปแช่น้ำให้ชุ่ม(rehydrate) โดยการจุ่มลงในน้ำกลั่นที่เติม acetic acid เล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3-5 นาที
2. เมื่อเนื้อเยื่อสมองชุ่มน้ำดีแล้วจึงจุ่มลงในสารละลาย methylene blue ที่มีความเข้มข้น 0.05% ในน้ำกลั่น นานประมาณ 1-3 นาที
3. ล้างเนื้อเยื่อในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ครั้ง
4. ซับแผ่นสไลด์ด้วยกระดาษกรอง ให้เนื้อเยื่อติดเรียบแน่นกับแผ่นสไลด์
5. ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
6. นำแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อผ่านการย้อมแล้วผ่านส่วนผสม 15-20% alcohol ใน xylene อีกครั้งหนึ่ง จึงปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้สาร DPX (BDH, England) เป็นตัวเชื่อม

ภาคผนวก ข

การย้อมหาเอนไซม์ทำลายอเซทิลโคลีน

(acetylcholinesterase staining)

การย้อมหาเอนไซม์ทำลายอเซทิลโคลีน

(acetylcholinesterase staining)

การย้อมหาเอนไซม์ทำลายอเซทิลโคลีนในเนื้อเยื่อสมองนี้ เป็นการศึกษาถึงปฏิกิริยาการติดสีภายในชั้นต่างๆของแผ่นเนื้อเยื่อสมอง (chemoarchitectonic) ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ในกระบวนการย้อมจึงทำให้สามารถกำหนดขอบเขตของชั้นภายในเนื้อเยื่อสมอง (lamination) และกำหนดขอบเขตบริเวณสมองส่วนต่างๆ (area) ได้ง่าย เนื่องจากระดับของปฏิกิริยาแต่ละชั้นไม่เหมือนกันในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีการศึกษา Sripanidkulchai and Wyss (1986b) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการศึกษาของ Geneser-Jensen and Blackstad (1971) สำหรับขั้นตอนการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอเซทิลโคลีนมีดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อสมองไปทำให้อุ่นขึ้น (incubate) ในสารละลาย Cu-acetyl-thiocholine ซึ่งประกอบด้วย

- 4 mM acetylthiocholine (AThCh) iodide
- 2 mM copper sulfate
- 10 mM glycine
- 50 mM sodium acetate

ทั้งนี้โดยควบคุมระดับ pH ให้เท่ากับ 5 โดยการเติม glacial acetic acid ลงที่ละหยดและเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่เกินพอ (unspecific cholinesterase (ChE)) จึงเติม 0.2 mM ethopropazine hydrochloride ลงไปด้วย (Bayliss and Todrick, 1956)

การทำเนื้อเยื่อสมองให้อุ่นขึ้น (incubate) นี้ใช้เวลา 60-75 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงล้างเนื้อเยื่อสมองด้วยน้ำกลั่นที่เย็น มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง

3. แช่เนื้อเยื่อสมองในสารละลาย sodium sulfide ที่มีความเข้มข้น 1.25% ในน้ำ pH 7.8 ประมาณ 1 นาที

4. ล้างเนื้อเยื่อสมองด้วยน้ำกลั่นที่เย็น อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง

5. แช่เนื้อเยื่อสมองในสารละลาย silver nitrate ที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำประมาณ 1 นาที

6. ล้างเนื้อเยื่อสมองด้วยน้ำกลั่นที่เย็น อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ครั้ง

7. วางเนื้อเยื่อสมองที่ผ่านกรรมวิธีทั้งหมดบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบเจลาติน ทิ้งไว้ให้แห้ง
8. นำแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อสมองดังกล่าวไปทำให้ใส โดยการผ่าน xylene ต่อจากนั้นจึงปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้สาร DPX (BDH, England) เป็นตัวเชื่อม

ภาคผนวก ค

การศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดโดยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายเส้นใยประสาท
(retrograde axoplasmic tracing with fluorescent dye)

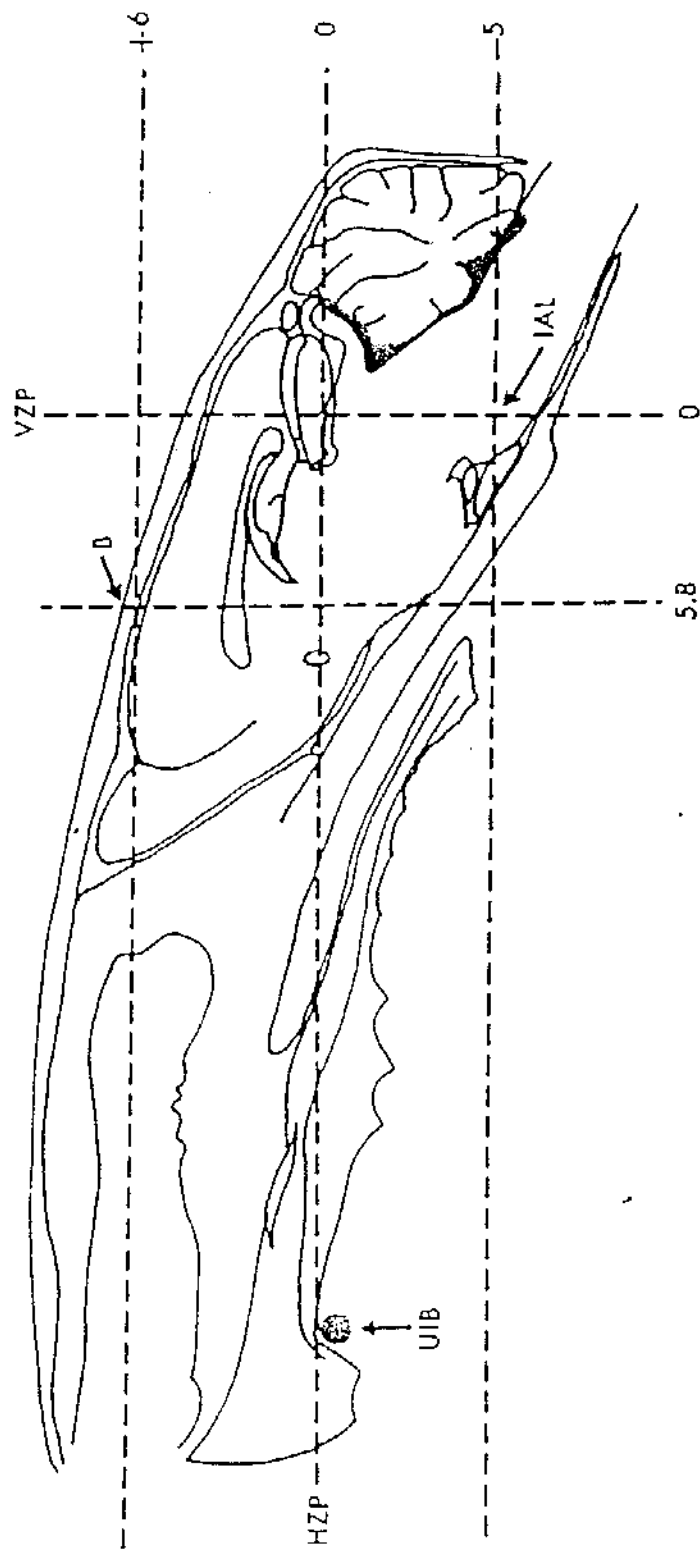
การศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดโดยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายเส้นใยประสาท
(retrograde axoplasmic tracing with fluorescent dye)

การศึกษาเซลล์ประสาทต้นกำเนิดโดยการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายเส้นใยประสาทนี้ เป็นวิธีที่สามารถแสดงให้เห็นตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่ส่งเส้นใยประสาทออกไปสิ้นสุด (terminal field) หรือมีเส้นใยวิ่งผ่านบริเวณที่ฉีดสารเรืองแสง (fiber of passage) เนื่องจากสารเรืองแสงที่ฉีดเข้าไปถูกดูดซึมย้อนกลับไปสู่ส่วนตัวของเซลล์ประสาท (cell body) ดังนั้นเมื่อเลือกใช้ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมกับชนิดของสารเรืองแสง ทำให้สามารถมองเห็นตัวเซลล์ประสาทได้ชัดเจน แม้ว่าตำแหน่งที่ฉีดสารเรืองแสงอยู่ห่างออกไปมาก การใช้วิธีการฉีดสารเรืองแสงเข้าปลายเส้นใยประสาทนั้นมีความยุ่งยากอยู่ตรงที่ต้องหาตำแหน่งปลายประสาทให้ถูกต้อง ซึ่งใช้หลักการว่าบริเวณปลายประสาทคือตำแหน่งสุดท้ายที่เมื่อฉีดสารเรืองแสงเข้าไปแล้วเซลล์ประสาทตัวนั้นยังคงเรืองแสงอยู่ การศึกษาวิธีนี้ได้รับการยอมรับว่าสามารถแสดงให้เห็นตำแหน่งของเซลล์ประสาทต้นกำเนิด ตลอดจนเห็นลักษณะรูปร่างของเซลล์ประสาทได้เป็นอย่างดี (Kuypers *et al.*, 1977; Bentivoglio *et al.*, 1979, 1980) สำหรับสารเรืองแสงที่ใช้ฉีดได้มีการพัฒนาเรื่อยมาตามลำดับ และปัจจุบันยอมรับว่า Fast blue (FB) เป็นสารเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถดูดซึมเข้าปลายเส้นใยประสาทได้รวดเร็ว (Kuypers *et al.*, 1979; Huisman *et al.*, 1983) และคุณสมบัติที่โดดเด่นอีกประการหนึ่งก็คือ สามารถฉีดได้ในปริมาณที่น้อย ซึ่งเป็นการจำกัดขอบเขตของบริเวณที่ฉีดได้ (confined injection site) สำหรับ Fast blue นี้ทำให้เซลล์ประสาทต้นกำเนิดเรืองแสงเป็นสีน้ำเงิน นอกจาก Fast blue แล้ว ยังพบว่าสารเรืองแสงอีกชนิดหนึ่งคือ Fluoro-Gold (FG) เป็นสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ Fast blue แต่อย่างไรก็ตามสำหรับ Fluoro-Gold มีข้อดีกว่า คือ ขอบเขตของตำแหน่งที่ฉีดกว้างกว่า Fast blue เล็กน้อยเมื่อฉีดในปริมาณเท่าๆกัน การใช้สารเรืองแสงมากกว่า 1 ชนิด อาจใช้สำหรับการศึกษาหาเส้นใยประสาท ที่แตกแขนงออกไป (collateralization) (Donovan and Wyss, 1983; Swanson *et al.*, 1981; Kuypers *et al.*, 1979; Sawchenko and Swanson, 1981) เนื่องจากปลายของเส้นใยประสาทแต่ละแขนงสามารถดูดซับสารเรืองแสงได้ ซึ่งถ้าหากเป็นกรณีนี้พบว่าตัวเซลล์ประสาทมีการเรืองแสงผิดไปจากสีดั้งเดิมทั้งสองสี เช่น เมื่อใช้ Fast blue ร่วมกับ Fluoro-Gold ทำให้เซลล์ประสาทที่ดูดซับสีทั้งสองเป็นสีขาว อย่างไรก็ตามประโยชน์ของการฉีดสารเรืองแสงสองชนิดนั้นมีอยู่มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถแสดงให้เห็นเซลล์ประสาทแต่ละเซลล์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกันหรืออยู่ชิดกัน แต่ส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณที่แตกต่างกัน (spatial relationship) ทั้งนี้ต้องฉีดสารเรืองแสงที่แตกต่างกันสองชนิดเข้าไปในบริเวณปลายเส้นใยประสาทของแต่ละเซลล์ให้ได้ (Sripanidkulchai and Wyss, 1987)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้สารเรืองแสงสองชนิด คือ Fast blue และ Fluoro-Gold ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 4% ในน้ำ ฉีดเข้าไปในสมองส่วนต่างๆในปริมาณที่น้อย ระหว่าง 25-40 นาโนลิตร ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นเซลล์ประสาทต้นกำเนิดเรืองแสงอย่างชัดเจน นอกจากนี้เนื้อเยื่อที่มีสารเรืองแสงทั้งสองชนิดดังกล่าวยังสามารถนำไปศึกษาด้วยกรรมวิธีการย้อมหาเอนไซม์ทำลายอะเซทิลโคลีน (ดูภาคผนวกที่ ข) ได้อีก อย่างไรก็ตามคุณภาพของสารเรืองแสงในเนื้อเยื่อจะลดลงเรื่อยๆตามเวลา และเสื่อมได้เร็วเมื่อสารกระทบกับแสงอุลตราไวโอเลต ความร้อน และแอลกอฮอล์ (Kuypers and Huisman, 1984; Sawchenko and Swanson, 1981) แต่ด้วยวิธีการที่ Sripanidkulchai และ Wyss (1986 b) ได้พัฒนาขึ้นและนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ทำให้สามารถรักษาคุณภาพการเรืองแสงในเนื้อเยื่อได้นานถึง 3 ปี

ภาคผนวก ง

การจัดตำแหน่งที่ฉีดสารเรืองแสงในสมองหนูโดยใช้เครื่อง stereotaxis



ภาพที่ 14 ภาพวาดแสดงเส้นในแนวระนาบต่าง ๆ ของสมองหนู เมื่อครึ่งส่วนหัวหนูอยู่ในเครื่องมือ stereotaxis (ภาพวาดเมื่อตัดผ่านแนว midsagittal)

(B = bregma, HZP = horizontal zero plane.

IAL = interaural line.

UIB = upper incisor bar.

VZP = vertical zero plane)

ที่มา : Pellegrino, Pellegrino and Cushman, A stereotaxic atlas of the rat brain, 1981 ; Plenum Press, p.5.

การจัดตำแหน่งที่ฉีดสารเรืองแสงในสมองหนูโดยใช้เครื่อง stereotaxis

เครื่อง stereotaxis นี้ประกอบด้วยแกนที่มีมาตรการวัดมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรอยู่ 3 แกนด้วยกันคือ แกนวัดในแนวระนาบหน้า-หลัง (anterior and posterior plane) แกนวัดในแนวระนาบตั้ง (vertical plane) และแกนวัดในแนวระนาบกึ่งกลางไปทางด้านข้าง (medio-lateral plane) (ดูภาพที่ 14)

การตรึงส่วนหัวของหนูเข้าในเครื่อง stereotaxis นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดตำแหน่งต่างๆของสมอง ทั้งในแนวหน้า-หลัง แนวกึ่งกลางไปด้านข้าง และแนวตั้ง (ความลึก) เพื่อจะได้ฉีดสารเรืองแสงลงในตำแหน่งที่ต้องการ ทั้งนี้ต้องอาศัยตำแหน่งอ้างอิงในการวัดตามระนาบต่างๆที่สำคัญ ดังนี้

1) ระนาบในแนวนอน มี 2 ระนาบ คือ ระนาบที่ลากผ่าน interaural line (IAL) เป็นเส้นสมมุติที่ลากผ่านจุดกึ่งกลางของรูหูข้างหนึ่งไปยังอีกข้างหนึ่ง อีกระนาบหนึ่งคือ horizontal zero plane (HZP) เป็นแนวเส้นที่ลากผ่านผิวบนของตะขอยี่เกาะฟันบน (upper incisor bar) ในแนวหน้าหลังซึ่งระนาบนี้ลากผ่าน anterior และ posterior commissure พอดิและเป็นตำแหน่งศูนย์ในแนวนอน-ล่าง อยู่เหนือกว่าระดับ interaural line ประมาณ 5 มิลลิเมตร

2) ระนาบในแนวตั้งมี 1 ระนาบ คือ vertical zero plane (VZP) เป็นระนาบที่ตั้งฉากกับ interaural line ตรงตำแหน่งของระนาบนี้ตัด interaural line เป็นตำแหน่งศูนย์ในแนวหน้าหลัง และจากจุดตัดนี้พบว่าตำแหน่ง bregma อยู่ห่างไปทางด้านหน้าประมาณ 5.8 มิลลิเมตร และ bregma อยู่เหนือกว่า horizontal zero plane ประมาณ 6 มิลลิเมตร

3) วัดหาตำแหน่งของสมองที่ต้องการฉีดสารเรืองแสงตามแนวระนาบทั้งสามมิติ โดยอาศัยการอ้างอิงจากหนังสือ A stereotaxic atlas of the rat brain (Pellegrino et al., 1981) ซึ่งมีวิธีการและขั้นตอนดังนี้

3.1 ยึด Hamilton syringe เข้ากับที่ยึด (microelectrode manipulator) ในเครื่อง stereotaxis แล้วตรึงให้แน่น

3.2 ตรึงส่วนหัวของหนูที่สลบแล้วเข้ากับเครื่อง stereotaxis ให้ฟันบนข้างหน้าเกาะกับตะขอยึดฟันบน (upper incisor bar) และใช้แท่งเหล็ก (ear bar) สอดเข้าไปตรึงในรูหูทั้งสองข้างให้แน่น ด้วยวิธีนี้ทำให้แนวแกนของแท่งเหล็กตรึงหูทั้งสองข้างตรงกัน และถือว่าเป็นแกนในแนว interaural line ซึ่งเป็นผลให้ระดับของฟันบนข้างหน้าอยู่สูงกว่าแนว interaural line ประมาณ 5 มิลลิเมตร

3.3 ใช้ปลายเข็มที่ต่อจาก Hamilton syringe ไปแตะที่ตำแหน่ง bregma ก่อน แล้วบันทึกระยะต่างๆ ในแต่ละระนาบ โดยดูจากมาตรการวัด (scale bar) ในแกนต่างๆทั้งสามแกนของ microelectrode manipulator

3.4 ดูระยะตำแหน่งที่ต้องการฉีด โดยอาศัยแนวทางจากหนังสือ A stereotaxic atlas of the rat brain (Pellegrino et al., 1981) แล้วคำนวณหาตำแหน่งที่ต้องการ โดยเพิ่มหรือลดจากตำแหน่งของ bregma

3.5 ดูดสารเรืองแสงเข้า Hamilton syringe แล้วฉีดเข้าสมองส่วนต่างๆตามที่ต้องการ