หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีทำการวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็น หนูแรทเพศผู้น้ำหนัก 280-300 กรัม นำมาทำให้สลบด้วยการฉีดยูรีเทน (Urethane, ethyl carbamate) ในขนาด 1.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังจากสลบดีแล้วยึดหูทั้งสองข้างติดกับ ear bar ของ Narishige's stereotaxic head holder ซึ่งจะจัดให้ฟันบนและหูทั้งสองข้างวางอยู่ในแนวราบเดียวกัน

การผ่าตัดสัตว์ทดลอง เริ่มจากการกรีดหนังศีรษะในแนวกลางเป็นทางยาวจากศีรษะไปจนถึงคอ เผยอหนังศีรษะออก ตัดกล้ามเนื้อบาง ๆ ที่คลุมกระโหลกศีรษะด้านบนออก รวมทั้งกล้ามเนื้อที่คลุมกระดูกออกซิพิทัล (occipital bone) ด้วย เพื่อให้เห็นซิสเทอนาแมกนา (cisterna magna) แล้วจึงกรีดเยื่อที่ปิดซิสเทอนนี้ออกให้น้ำไขสันหลังไหลออกมาซึ่งจะสามารถลดการกระเพื่อมจากการหายใจ (pulsation) และการบวมได้ จากนั้นตัดกระดูกออกซิพิทัลและเยื่อดูรา (dura matter) ออกอย่างระมัดระวังภายใต้กล้องผ่าตัด ในระหว่างนี้อาจมีเลือดไหลออกมาจากบาดแผลบ้างก็ซับออกด้วยสำลีชุบน้ำเกลืออุ่น ๆ บิดพอหมาด เมื่อนำกระดูกออกซิพิทัลออกแล้วจึงเอียงสัตว์ทดลองให้ศีรษะก้มลง 30^{o} จากแนวราบและตัดเยื่อเปีย (pia matter) ที่คลุมขอบล่างของซีรีเบลลัมออก ทำการยกซีรีเบลลัมทางด้านหลังให้เห็นพื้นของเวนตริเคิลที่ 4 โดยใช้ micromanipulator และช้อนเล็ก ๆ ซึ่งประดิษฐ์ขึ้นมาในขนาดพอดีสำหรับการวิจัยนี้โดยเฉพาะ

ข้อควรระวังประการหนึ่งต่อจากนี้ก็คือการป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้งซึ่งทำได้โดยทาผิวหน้าของเนื้อเยื่อด้วยส่วนผสมของพาราฟินเหลวและวาสลิน (liquid paraffin-vaselin mixture) และเมื่อเคลื่อนไมโครอีเล็คโทรด (microelectrode) เข้าไปถึงเวสติบูลาร์นิวเคลียสแล้วจะคลุมผิวหน้าของสมองและเนื้อเยื่อทั้งหมดด้วยวุ้น (4% agar ในน้ำเกลือ) เพื่อลดการกระเพื่อมที่เกิดจากการหายใจ

การให้สารทางเส้นเลือดสามารถทำได้โดยการสอดแคนูลา (cannula) เข้าไปใน femoral vein และอุณหภูมิของสัตว์ทดลองควบคุมไว้ที่ 37 ± 1°ซ. ด้วย electric heater

การกระตุ้นเส้นประสาทเวสติบูลาร์

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้น (stimulating electrode) ทำด้วยลวดแพลตตินัมเออริเดียม (platinum-irridium) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มม. ฉาบน้ำมันวาณิชตลอดความยาวลวดยกเว้นบริเวณปลายที่จะสัมผัสกับเส้นประสาทเวสติบูลาร์ หลังจากยกซีรีเบลลัมขึ้นแล้วจะเคลื่อนขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้นนี้ผ่านซีรีเบลลัมลงไปหาเส้นประสาทเวสติบูลาร์

สิ่งเร้าที่ใช้กระตุ้นเส้นประสาทเป็น rectangular pulses มีขนาดความถี่ 2 Hz duration 0.03 มิลลิวินาที โดยผ่าน stimulus isolator (Nihon Kohden SS-301 J) ความแรงของกระแสที่ใช้สามารถอ่านได้จาก oscilloscope (Nihon Kohden, VC 10) โดยการต่อความต้านทานขนาด 10 กิโลโอห์มแบบอนุกรมกับขั้วไฟฟ้าที่ใช้ในการกระตุ้น

ไมโครอีเล็คโทรด

ไมโครอีเล็คโทรดที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นขนาด 2 และ 7 ท่อ (doulbleและ seven-barrel) สร้างจากหลอดแก้วฮีมาโตคริต (borosilicate haematocrit glass tubings) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1.15 ± 0.05 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 1.55 ± 0.05 มม. หลอดแก้วดังกล่าวต้องล้างให้สะอาดก่อนนำไปใช้โดยแช่ใน cleansing solution เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้างด้วยการปล่อยให้น้ำประปาไหลผ่านตลอดเวลา 2 ชั่วโมง จึงกลั้วด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งให้แห้งแล้วเก็บในภาชนะปิดปราศจากฝุ่น

ไมโครอีเล็คโทรดขนาด 7 ท่อ ได้มาจากการนำหลอดแก้ว 7 อัน มาจัดเรียงให้มีท่อกลางยาวกว่าท่อรอบ ๆ อีก 6 ท่อ เพื่อทำเป็นด้ามของอีเล็คโทรด แล้วใช้ความร้อนแยกปลายทั้งหกของท่อรอบนอกให้เผยอออกจากกัน (เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเมื่อเติมสารลงในแต่ละท่อ) จึงทำการยึดหลอดแก้วทั้งเจ็ดให้ติดกันด้วยกาวที่แข็งตัวเร็ว (5-minute setting epoxy resin) ในแต่ละท่อของไมโครอีเล็คโทรดจะใส่ท่อแก้วลักษณะยาวเล็ก ซึ่งได้จากการนำหลอดแก้วฮีมาโตคริต

มาใช้ความร้อนดึงยืดออกให้ เล็กลง ท่อแก้ว เล็ก ๆ นี้ถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ในแง่ของ capillaric attraction พาให้สารละลายที่ เติมในแต่ละท่อลงไปถึงปลายสุดได้โดยง่าย หลอดแก้วทั้ง เจ็ดจะผ่านการดึงด้วย เครื่องดึงอี เล็คโทรดในแนวตั้ง (vertical type electrode puller) การดึงจะแบ่ง เป็น 2 ช่วง ช่วงแรกหลอดแก้วทั้ง เจ็ดจะ เคลื่อนลงมาตามแรงโน้มถ่วงของโลก และ เคลื่อนผ่านขดลวดโซลินอยด์ที่มีกระแสไฟฟ้าดึงอีกช่วงหนึ่ง จากนั้นจึงนำไมโคร-อี เล็คโทรดไป เคลื่อน เข้าชนแท่งแก้ว เหล็กหน้า เรียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อ เปิดปลายให้มี เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 ± 1 ไมครอน

สารที่จะใส่ลงในไมโครอี เล็คโทรด เตรียมได้จากการละลายผงยาลงในน้ำที่ผ่านการกลั่น 3 ครั้ง หากผงยาละลายยากหรือแตกตัวไม่ดีแก้ไขโดยการละลายลงใน 165 mM NaCl เพื่อประโยชน์ในแง่ของ electroosmosis pH ของสารละลายต้องปรับให้พอดีคือมีการแตกตัวพอ เหมาะโดยใช้ HCl หรือ NaOH หลังจาก เตรียมแล้วต้อง เก็บในตู้ เย็นจนกว่าจะนำออกมาใช้ ในตารางที่ 1 แสดงความ เข้มข้นและ pH ของสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

ในการ เติมสารละลายลงในแต่ละท่อของอี เล็คโทรด ใช้ เข็มที่มีขนาด เล็กและยาวสอด เข้าไปให้ถึงปลายของอี เล็คโทรดให้มากที่สุดแล้วจึงฉีดไล่สารออกไปอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันการ เกิดฟองอากาศ หลังจากใส่สารละลายลงไปหมดทุกท่อแล้ว ก่อนที่จะนำอี เล็คโทรดไปใช้ต้องตรวจความต้านทานก่อน เนื่องจากการไหลของสารละลายจะดีหรือไม่ขึ้นกับความต้านทานภายในท่อ เป็นสำคัญ โดยทั่วไปอี เล็คโทรดขนาด 7 ท่อ ที่มี เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 ไมครอน ความต้านทานของท่อที่ใส่ 4 M NaClมีค่าประมาณ 4-8 เมกกะโอห์ม และยาอื่น ๆ ประมาณ 15-150 เมกกะโอห์ม อนึ่งสำหรับอี เล็คโทรดขนาด 2 ท่อ มีการ เตรียมคล้ายคลึงกับขนาด 7 ท่อ ต่างกันที่ใช้หลอดแก้วฮีมาโตคริต เพียง 2 ท่อมามัดรวมกัน เท่านั้น

Microiontophoretic Technique

หลักการของ microiontophoresis คือ การใช้กระแสไฟฟ้าจำนวนพอ เหมาะผ่านไมโครอี เล็คโทรดทำให้ เกิดการ เคลื่อนที่ของไอออน ซึ่งจะ เป็นไปในทิศทางใดขึ้นกับ polarity ของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ หากสารที่ต้องการศึกษามีสภาพ เป็นไอออนมาก เมื่อผ่านกระแสบวกลงในท่อ

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อสารที่ใช้ในการวิจัย

สาร	คำย่อ	ความเข้มข้น (โมลาร์)	pH	แหล่งผลิต
L-aspartate	ASP	0.20	7	Sigma
Glutamate, monosod	GLU	0.20	7	Sigma
N-methyl-D-aspartic acid	NMDA	0.05*	7	Sigma
Quisqualic acid	QUIS	0.02	7	Sigma
Kainic acid	KA	0.10*	7.5	Sigma
D-α-amino adipic acid	DAA	0.20	7	Sigma
Glutamic acid diethylester	GDEE	0.20	3.5	Sigma
Atropine	ATRO	0.20	4.5	Sigma

*เตรียมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 165 มิลลิโมลาร์

ที่บรรจุสารนี้จะมีผลเกิดการขับไอออนบวกให้ออกมาจากปลายไมโครอีเล็คโทรด เรียกกระแสที่ใช้ฉีดไล่สารที่ต้องการศึกษาเพื่อให้ออกไปมีผลต่อเนื้อเยื่อบริเวณปลายไมโครอีเล็คโทรดว่า injecting current แต่หากผ่านกระแสลบลงในท่อดังกล่าว ไอออนบวกที่ต้องการศึกษานั้นจะถูกดึงให้อยู่ในไมโครอีเล็คโทรดได้ดีขึ้น ผลที่กล่าวนี้นำมาใช้ประโยชน์ในกรณีที่ไม่ต้องการให้สารที่กำลังศึกษาอยู่รั่วออกไปมีผลต่อเซลล์ประสาทได้ในขณะที่มิได้มีการฉีดสารนั้นออกไปจริง ๆ เพราะสารสามารถรั่วออกมาจากปลายไมโครอีเล็คโทรดได้ตลอดเวลาโดยการแพร่จึงต้องมีกระแสไฟฟ้าขั้วตรงข้ามกับไอออนที่ต้องการศึกษาคอยดึงไอออนไว้ไม่ให้รั่วออกไปสู่เนื้อเยื่อได้ เรียกกระแสนี้ว่า retaining current ปกติจะใช้ประมาณ 10-30 nA

การใช้ injecting และ retaining current จะมีผลทำให้ความต่างศักย์ที่ปลายอีเล็คโทรดไม่เป็นศูนย์อันจะมีผลกระทบต่อการศึกษาได้ การแก้ไขในเรื่องนี้กำหนดให้มีท่อหนึ่งของอีเล็คโทรดสำหรับผ่านกระแสจำนวนหนึ่งซึ่งมีค่าเท่ากับผลรวมทางพีชคณิตของกระแสอีก 5 ท่อรวมกันแต่มี polarity ตรงกันข้ามผ่านลงในท่อนี้เพื่อตัดกระแสที่ปลายไมโครอีเล็คโทรดให้เป็นศูนย์ กระแสดังกล่าวเรียกว่า balancing current ในการวิจัยนี้ท่อที่ใช้ผ่าน balancing current เป็นท่อที่ใส่สี 2% alcian blue ใน 2 M NaCl ไว้เพื่อแสดงตำแหน่งของปลายไมโครอีเล็คโทรด

<u>เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการศึกษาทางสรีรวิทยาไฟฟ้า</u>

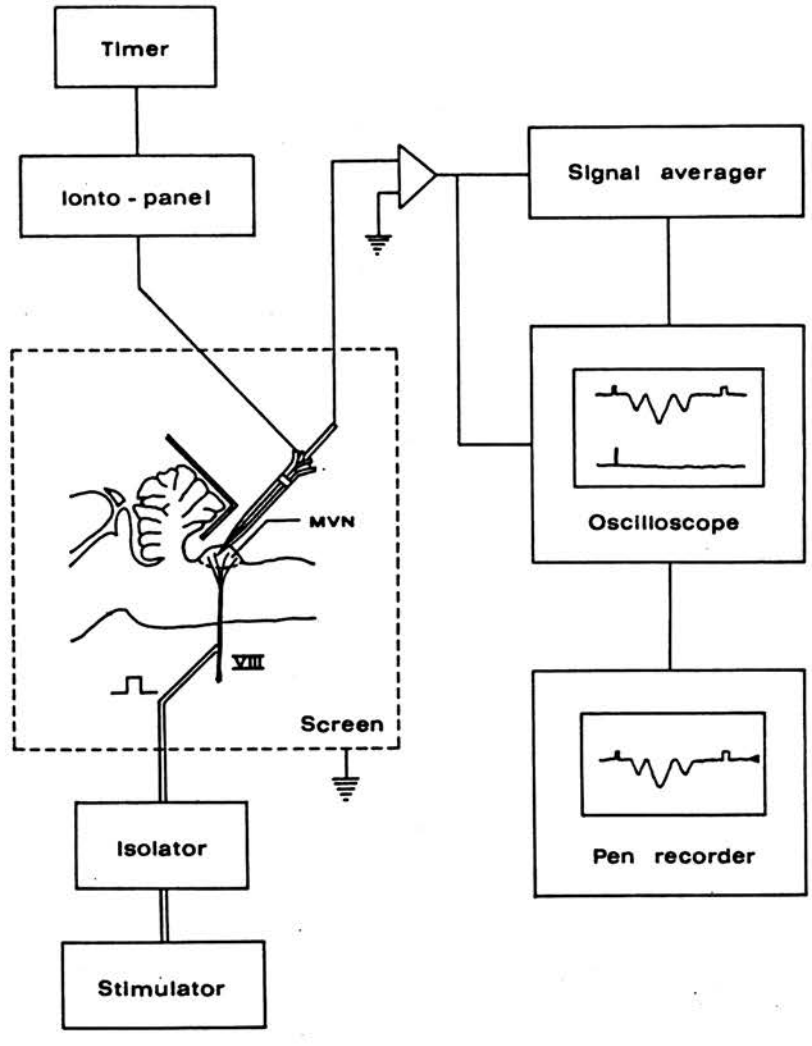
ท่อกลางของไมโครอีเล็คโทรดจะใส่ 4 M NaCl เพื่อทำหน้าที่ในการบันทึกกระแสประสาทจากเซลล์ประสาทเวสติบูลาร์ ซึ่งจะถูกส่งผ่าน high input impedance probe (Nihon Kohden, JZ 802 J) และ microelectrode amplifier (gain x 10, Nihon Kohden, MEZ-8201) ซึ่งสามารถตัดคลื่นรบกวนทั้งความถี่สูงและความถี่ต่ำออกไปได้ กระแสประสาทที่ได้รับการขยายแล้วนี้จะส่งผ่านไปแสดงบน oscilloscope (Nihon Kohden, VC 10)

การทดลองในตอนแรกเป็นการบันทึกฟิลด์โพเทนเชียลที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการให้สารแต่ละอย่างความสูงของฟิลด์โพเทนเชียลที่ได้แต่ละครั้งมีความแปรปรวนสูง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อข้อมูลที่ได้ การหลีกเลี่ยงกระทำโดยใช้ signal averager (Nihon Kohden, DAT-1100) รวบรวมและเฉลี่ยฟิลด์โพเทนเชียล 10 ครั้งไปแสดงบน oscilloscope

แล้วจึงบันทึกลง recorder (Nohon Kohden, RJG-4022) ดังแสดงเป็นแผนภาพในรูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยที่ได้จะมีความแปรปรวนต่ำทำให้ประเมินผลข้อมูลได้โดยง่าย

การทดลองในตอนต่อมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเกิดกระแสประสาทของเซลล์ประสาทเวสติบูลาร์ในขณะที่ไม่มีการกระตุ้นเส้นประสาทเวสติบูลาร์ ในภาวะปกติเซลล์ประสาทหั่ว ๆ ไปจะส่งกระแสประสาทเป็นลักษณะที่เรียกว่า action potential อัตราการเกิด action potential เรียกว่า spontaneous firing rate (SFR) การศึกษาแบบภายนอกเซลล์ทำให้ action potential มีลักษณะเป็น diphasic คือเฟสลบที่ตามด้วยเฟสบวก หากสามารถเคลื่อนไมโครอีเล็คโทรดเข้าใกล้เซลล์ประสาทได้มาก action potential ที่บันทึกได้จะมีขนาดใหญ่แยกจากคลื่นรบกวน (baseline noise) ได้อย่างชัดเจน ในกรณีของเซลล์ประสาทเวสติบูลาร์ action potential ที่ศึกษามีขนาดความสูงประมาณ 300 μV (คลื่นรบกวนมีความสูงประมาณ 100 μV) SFR ประมาณ 20 ครั้งต่อวินาที แต่บางครั้งไมโครอีเล็คโทรดสามารถบันทึก action potential จากเซลล์ประสาทได้มากกว่า 1 เซลล์ สังเกตได้จากการที่ action potential มีขนาดสูงต่ำต่าง ๆ กัน (action potential จากเซลล์เดียวกันจะมีขนาดความสูงเท่ากันตลอด) วิธีแยกให้เหลือเพียงเซลล์เดียวจะผ่านกระแสประสาทที่ขยายแล้วนี้ไปยัง pulse high selector เลือกเฉพาะความสูงของสไปค์ตามที่ต้องการโดยสังเกตุจากความสูงของสไปค์ที่พอเหมาะ 1 สไปค์จะทำให้เกิด standard pulse 1 pulse epoch counter จะทำหน้าที่รับ standard pulse มานับตามหน่วยเวลาที่กำหนดในที่นี้กำหนดไว้ครึ่งวินาที แสดงผลบันทึกลงบน recorder ออกมาเป็น histogram ของจำนวนสไปค์ในเวลาครึ่งวินาที คือเป็นอัตราการเกิดสไปค์ต่อหน่วยเวลานั่นเอง ดังแสดงเป็นแผนภาพในรูปที่ 2

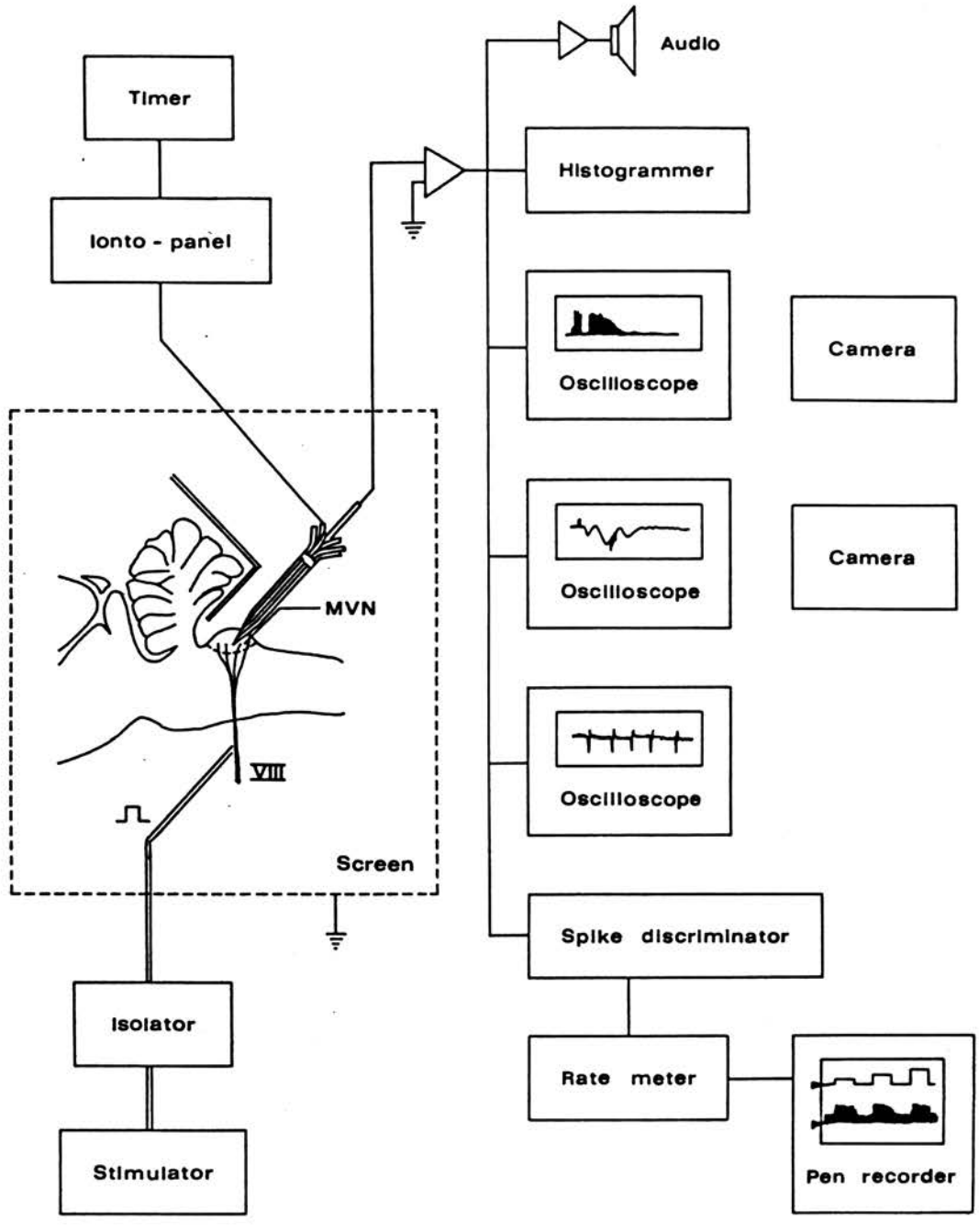
การทดลองในตอนสุดท้ายวัดการเปลี่ยนแปลงกระแสประสาทที่ละเอียดมากขึ้น คือวัดการเปลี่ยนแปลงของโมโนหรือโพลีซัยแนปส์ติคสไปค์ในช่วงเวลาเป็นมิลลิวินาที หลังจากกระตุ้นเส้นประสาทเวสติบูลาร์ อาศัยเครื่องมือที่ชื่อว่า peristimulus histogram เริ่มต้นจากการตั้ง sweep time ให้ครอบคลุมเหตุการณ์ทั้งหมดที่ต้องการศึกษาคือ ในการวิจัยนี้ฟิลด์โพเทนเชียลจะเกิดให้เห็นครบในช่วงประมาณ 3 มิลลิวินาที หลังการกระตุ้น ก็จัดให้ sweep time ประมาณ 5 มิลลิวินาที histograms ที่เกิดขึ้นจะแบ่งออกเป็น bin เพื่อ



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการจัด เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองศึกษาการ เปลี่ยนแปลงของฟิลด์โพ เทน เชียล หลังจากให้สารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ทาง เส้น เลือดดำที่ขา (femoral vein)

MVN = medial vestibular nucleus

012071



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการจัดเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ SFR, โมโน- และโพลีไซแนปส์ติคสไปค์ หลังจากให้สารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์โดยตรงต่อ เซลล์ประสาทเวสติบูลาร์

MVN = medial vestibular nucleus

ความเหมาะสมก็จัดให้มี 10 bins แต่ละ bin แทนเวลา 0.5 มิลลิวินาที ในการกระตุ้นชุดหนึ่งก็จัดให้กระตุ้นชุดละ 10 ครั้ง ดังนั้นการกระตุ้นแต่ละครั้งหากเกิดสไปค์ซ้อนบนฟิลด์โพเทนเชียลที่เวลาใด bin ตรงเวลานั้นก็จะทำการนับโดยเพิ่มความสูงของ bin ขึ้นไป เมื่อกระตุ้น 10 ครั้งก็จะเกิด histogram ดังแสดงในรูปที่ 25

การศึกษาตำแหน่งของอีเล็คโทรด

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองของแต่ละตัวอย่างจะมีการบันทึกตำแหน่งของสมองที่ทำการศึกษา โดยผ่านกระแสไฟฟ้าลบ 200 μA เป็นเวลา 10-30 นาที ลงในท่อของไมโครอีเล็คโทรดที่ใส่สี alcian blue จะทำให้สีถูกขับออกจากท่อไปรวมตัวกันอยู่บริเวณปลายภายนอกไมโครอีเล็คโทรด ซึ่งเป็นตำแหน่งของไมโครอีเล็คโทรดนั่นเอง

ตำแหน่งของอีเล็คโทรดที่ต้องการศึกษาอีกประเภทหนึ่งคือ อีเล็คโทรดที่ใช้ในการกระตุ้นเส้นประสาทเวสติบูลาร์ ใช้กระแสไฟฟ้าบวกขนาด 1 mA ผ่านอีเล็คโทรดที่ใช้ในการกระตุ้นนาน 1 นาที มีผลทำให้โปรตีนบริเวณปลายอีเล็คโทรดเสื่อมสภาพ เกิดเป็นรอยแผลไหม้ให้เห็น

หลังจากผ่านกระแสให้อีเล็คโทรดทั้งสองแล้ว นำสัตว์ทดลองมาผ่านกระบวนการ perfusion โดยฉีดสารละลายของ 10% ฟอร์มาลีน ในน้ำเกลือเข้าหัวใจห้องล่างซ้ายให้ไปเลี้ยงเฉพาะสมองแล้วทิ้งออกทางเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอ (jugular vein) ซึ่งตัดให้ขาดทั้งสองข้าง เมื่อสมองแข็งดีแล้วนำออกมาแช่เก็บไว้ใน 10% ฟอร์มาลีน

การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของตำแหน่งไมโครอีเล็คโทรดทำได้โดยนำสมองสัตว์ทดลองที่ผ่านการ perfusion แล้วมาแช่แข็งใน freezing microtome ก่อนจึงทำการตัดแบบ coronal section ให้มีความหนา 50 ไมครอน บริเวณปลายไมโครอีเล็คโทรดที่ใช้บันทึกจะเห็นเป็นจุดสีน้ำเงินต่าง ๆ ส่วนปลายอีเล็คโทรดที่ใช้กระตุ้นจะเห็นเป็นรอยแผลไหม้

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ความสูงของฟิลด์โพเทนเชียลที่วัดได้จะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± standard error ที่ได้มาจาก 4 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างภาวะปกติกับการให้สารต่าง ๆ ใช้วิธี F-test ค่า P ที่น้อยกว่า 0.05 จัดเป็นเกณฑ์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ