บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง ใช้หนูไมซ์พันธุ์สวิส อายุประมาณ 2-3 เดือน น้ำหนัก 20-35 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล

2. สารเคมี

- 0.9% NaCl
- 10% formalin
- 70%, 95% และ absolute alcohol
- xylene
- cresyl violet
- 10% acetic acid
- permount
- ether
- คลอเฟนิรามีน มาลีเอต (Chlorpheniramine maleate) ชนิดผลึกบริสุทธิ์

3. อุปกรณ์

- เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด
- ชุดให้น้ำเกลือ
- เข้มฉีดยาเบอร์ 26½, 25,และ 21
- กระดาษวัด pH
- ตู้อบ
- Microtome ชนิด Cryo-cut (American optical company)
- กล้องจุลทัศน์ Model BH_2 (Olympus optical company)
- Microprojector (Bausch & Lomb)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ปริซึม (projection prism BH-WP)
- สไลด์ (slide)
- cover glass
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (analytical balance แบบ automatic model sartorius GMBH)
- ตาชั่งสำหรับชั่งน้ำหนักหนู

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 การเตรียม 10% formalin ใช้ formalin (40% formadehyle) 100 มล. ผสมใน 0.9% NaCl 900 มล. ทำสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

4.2 การเตรียม cresyl violet ใช้ cresyl violet 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล. เติม 10% acetic acid 50หยดในสีย้อม 500 มล. เมื่อจะใช้ย้อมนำไปอบในตู้อบให้ได้อุณภูมิ 50-60°ซ.

5. การเตรียมแผ่นสไลด์

นำสไลด์ชุบไข่ขาวที่ละลายในน้ำกลั่น อัตราส่วนไข่ขาว 1 ฟองต่อน้ำ 500 มล. ทิ้งไว้ให้แห้ง

6. วิธีดำเนินการทดลอง

6.1 การผสมพันธุ์สัตว์ทดลอง เลี้ยงหนูในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 21 ± 5°ซ และให้อยู่ในความมืดและสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำ ad libitum เลี้ยงหนูให้ชินกับห้องปรับอากาศเป็นเวลา 1 อาทิตย์ นำหนูตัวเมียมาทำ Vaginal smear และชั่งน้ำหนักตอนเช้าเวลา 9.00 น. ทุกวัน เมื่อตรงกับ proestrous phase จะถูกนำไปขังกรงเดียวกับตัวผู้ โดยใช้ตัวผู้ 1 ตัวต่อตัวเมีย 2 ตัวในกรงเดียวกัน หลังจากนั้นตรวจดูว่ามีการผสมพันธุ์หรือไม่โดยดูจาก vaginal plugs ซึ่งถ้าพบก็ถือว่าเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ เมื่อตั้งครรภ์แล้วแยกแม่หนูออกมาใส่กรงต่างหาก

6.2 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง แบ่งหนูตั้งครรภ์ออกเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ฉีดน้ำกลั่น 0.5 มล. เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 ฉีดคลอเฟนิรามีน ความเข้มข้น 20 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 3 ฉีดคลอเฟนิรามีน ความเข้มข้น 30 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 4 ฉีดคลอเฟนิรามีน ความเข้มข้น 40 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.

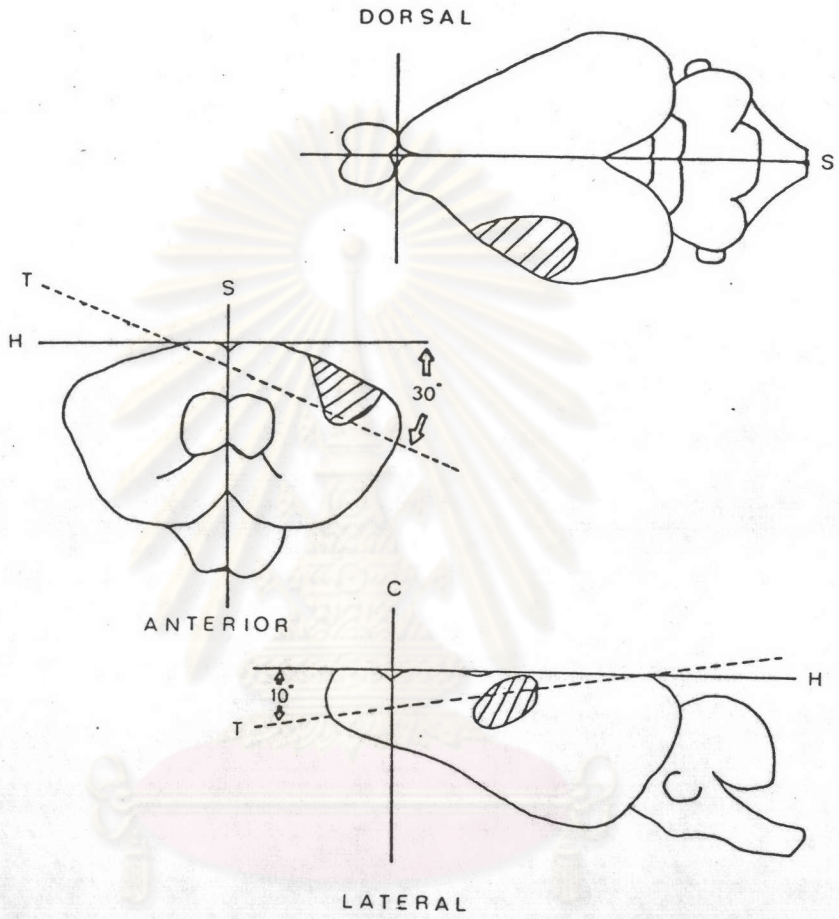
กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของหนูในแต่ละกลุ่มตั้งแต่วันที่ 10 ถึง 20 ของการตั้งครรภ์ โดยจะฉีดยาทุกวันเนื่องจาก Rice (1974) พบว่า ระยะเวลาที่เซลประสาทบริเวณ layer IV, V ของ somatosensory cortexจะเริ่มฟอร์มในลูกหนูวันที่ 10 ถึง 13 ของการตั้งครรภ์ วันที่ 14 ถึง 18 เริ่มรวมเป็น layer IV ให้เห็นชัดเจนและเริ่มเจริญเป็นบาร์เรลแต่จะเจริญเต็มที่ก็ต้องวันที่ 6 หลังคลอดหลังจากฉีดยาแล้วตรวจดูกรงทุกวัน วันแรกที่คลอดนั้นเป็นอายุ 1 วัน นำลูกหนูอายุต่าง ๆ กันไปศึกษาทางวิทยาฮีสโตต่อไป

ขนาดของคลอเฟนิรามีนที่ใช้ คิดเปรียบเทียบจากค่า LD 50 (ขนาดของยาที่ให้หนูขาวตาย 50%) ของหนูขาวที่โตเต็มที่แล้วซึ่งเท่ากับ 50 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 ก.ก. (ศิริวงษ์และคณะ, 2523) แล้วใช้ขนาดยาที่ต่ำกว่า LD 50 คือ 20,30 และ 40 ม.ก.ต่อน้ำหนักตัว 1 ก.ก.

7. การศึกษาทางวิทยาฮีสโต

7.1 การ perfuse ลูกหนู นำลูกหนูที่ได้จากแม่หนูมาชั่งน้ำหนักตัวและสลบหนูด้วยอีเทอร์ รีบ perfuse ด้วย 0.9% NaCl ประมาณ10-50 มล. ที่อุณหภูมิห้อง เข้าสู่หัวใจห้องล่างซ้ายทันทีและตัดหัวใจห้องบนขวา จากนั้น push 10% neutralized formalin ประมาณ 20-100 มล. แล้วนำสมองมาชั่งน้ำหนักและแช่ไว้ใน 10% formalinนานครึ่งถึงหนึ่งชั่วโมง

7.2 การตัดเนื้อสมอง นำสมองที่แช่ไว้แล้วมาตัดในมุม tangential section (รูปที่ 3) นำชิ้นสมองที่ได้ไปแช่ให้แข็งในตู้เย็น microtome ที่อุณหภูมิ -10 ถึง -20°ซ แล้ว section หนา 50 ไมครอนผ่านบาร์เรล นำแผ่นชิ้นเนื้อที่ได้แช่น้ำประปาก่อน mount บนสไลด์ตามลำดับ (serial section) ทิ้งไว้ให้แห้ง 1-2 วัน จึงนำไปย้อมด้วย cresyl violet



รูปที่ 3 แสดงการตัดชิ้นเนื้อสมองในแนว tangential section บริเวณที่แรเงา คือบริเวณที่มีบาร์เรลอยู่

(T = Tangential plane, S = Sagittal plane,

H = Horizontal plane, C = Coronal plane)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3 การย้อมสี นำสไลด์ ที่ชิ้นเนื้อสมองที่แห้งแล้วมาผ่านขบวนการย้อมสี ตามลำดับคือ ชุบสไลด์ในน้ำกลั่น แล้วนำไปย้อมใน cresyl violet นาน 2-5 นาที dehydrate ด้วย 70%, 95% และ absolute alcohol นานอย่างละ 1-2 นาที ตามลำดับ ทำให้ใส (clearing) ด้วย xylene นาน 1-2 นาทีซ้ำ 2 ครั้ง นำสไลด์ที่ได้หยดด้วย permount และปิด cover glass

7.4 การศึกษาการเจริญของบาร์เรล นำสไลด์ที่ย้อมแล้วจากลูกหนูอายุ 1-12 วันมาตรวจดูการเริ่มเห็นบาร์เรล และการเห็นบาร์เรลที่สมบูรณ์ โดยใช้ microprojector และกล้องจุลทรรศน์ ดูเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

7.5 การศึกษาจำนวนเซลประสาท ลักษณะโครงสร้างและขนาดของบาร์เรล นำสไลด์ที่ย้อมแล้วจากลูกหนูอายุ 9, 12, 15, 21 และ 60 วันในแต่ละกลุ่ม มาวาดรูปบาร์เรล จาก microprojector โดยใช้หลอดเลือดเป็น land mark และวาดภาพจาก section หลาย ๆ section ต่อกันจนได้ภาพ PMBSF ที่สมบูรณ์ และวัดพื้นที่ของ PMBSF ทั้งหมด

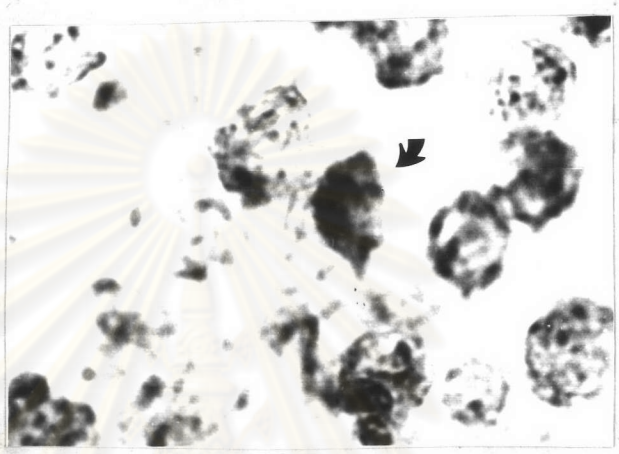
ใช้ปริซึมและกล้องจุลทรรศน์ ฉายภาพบาร์เรล C-1จากสไลด์ และจำนวนเซลประสาท และขนาดพื้นที่ทั้งหมดในบาร์เรล C-1เปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง (รูปที่ 4)

7.6 การศึกษาความหนาของ cerebral cortexนำสมองที่แช่ 10% formalin แล้วมาตัดในแนว coronal section ผ่านบาร์เรล ย้อมด้วย cresyl violet และวัดความหนาของ cortex ในลูกหนูอายุ 9, 12, 15, 21 และ 60 วัน เปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (รูปที่ 5)

8. <u>สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล</u>

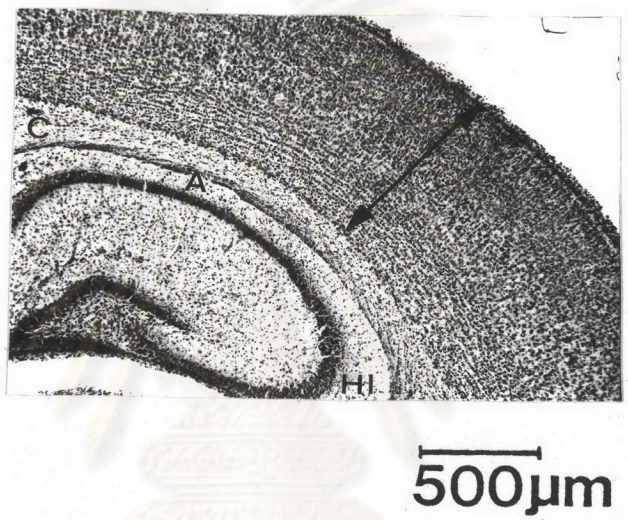
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ unpair Student's t-test ในข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean ± S.D. และใช้ Chi-square ในข้อมูลที่แสดงค่าเป็นร้อยละ เลือกระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

010228



รูปที่ 4 แสดงเซลล์ประสาทในบาร์เรล (ศรชี้) Bar = 10 µm.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดง cerebral cortex ในแนว coronal section เป็นบริเวณที่วัดความหนาของ cortex (⟷)

Bar = 500 µm.

A = Alveus hippocampi

C = Cingulum

HI = Hippocampus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย