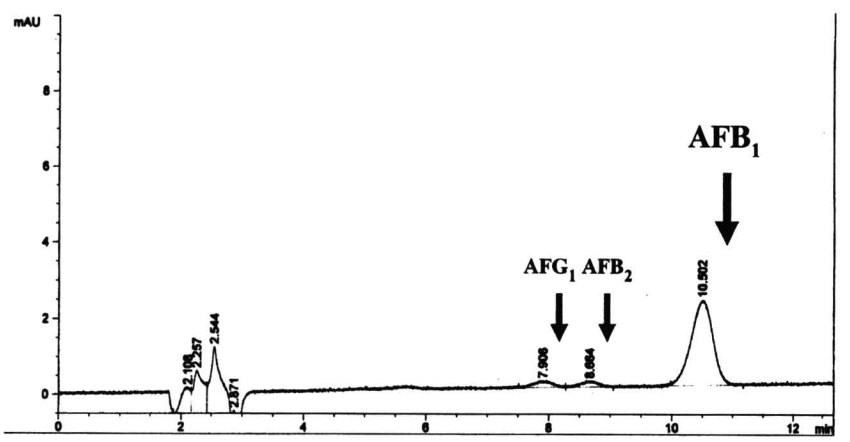
บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม จำนวน 126 ตัว จากบุญโฮมฟาร์ม อ.มัญจาคีรี จ.ขอนแก่น ปลาแบ่งเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว เลี้ยงปรับสภาพปลาก่อนทำการทดลอง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหารทุกวัน วันละ 3 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. การเตรียมอะฟลาทอกซิน

การศึกษานี้ใช้อะฟลาทอกซินที่ได้จากการสกัดออกมาในรูปของเหลว อะฟลาทอกซินเตรียมจากเชื้อราชนิด Aspergillus parasiticus สายพันธุ์ NRRL 2999 โดยใช้ข้าว จำนวน 50 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask นำเข้าอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าไม่ให้ข้าวเกาะกันเป็นก้อนใส่สปอร์เชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar และนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเครื่อง UV spectrophotometer และหาความบริสุทธิ์ของสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลงสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) (Phillips et al., 1999; Pimpukdee et al., 2000)



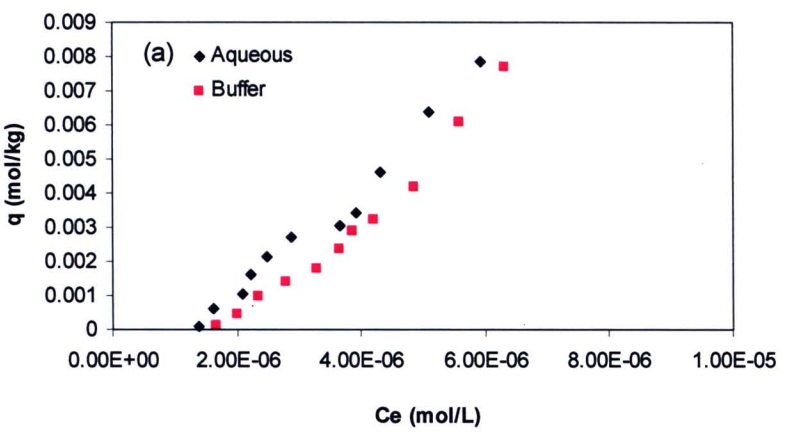
ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของอะฟลาทอกซินบี 1 (ลูกศร) ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมีความบริสุทธิ์ประมาณ 97%

การสกัดและตรวจหาระดับสารพิษเขย่าตัวอย่างเชื้อราที่เพาะได้ในสารผสมที่มีคลอโรฟอร์ม ซีไลท์ และน้ำกลั่น นาน 30 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนใส ไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยโฟลรีซิล ชะล้างสิ่งปนเปื้อนที่เกาะในคอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล จากนั้นทำการชะเอาอะฟลาท็อกซินออกด้วยสารละลายอะซิโตน และนำของเหลวจากการชะล้างครั้งสุดท้ายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 362 นาโนเมตร และวัดหาปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มีสารชะผ่านเป็นของผสมระหว่างน้ำ อะซีโตไนไตร์ล และเมทานอล และตรวจวัดความเข้มข้นในสารละลายด้วยเครื่องยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน

3. เบนโทไนท์

3.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารดูดซับสารอะฟลาท็อกซินในหลอดทดลอง

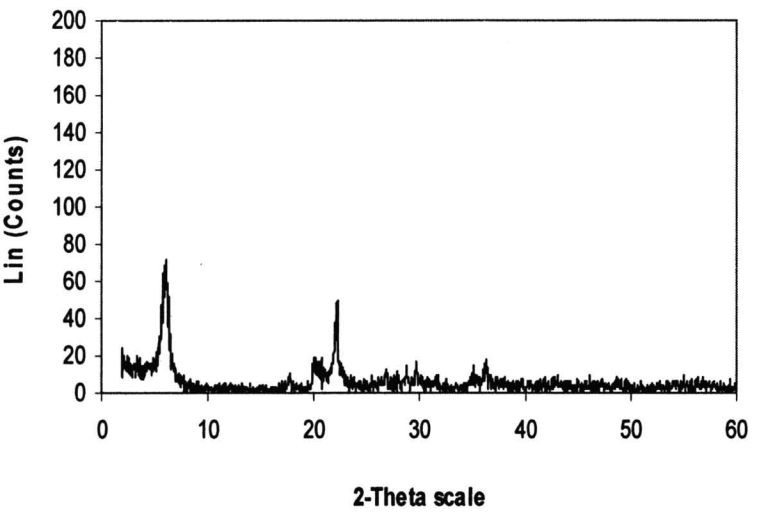
นำสารดูดซับจากแหล่งแร่ดินในจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ที่องค์ประกอบและชนิดของแร่ดินมีการศึกษาและรายงานไว้ (Yoothong et al., 1997) จำนวน 100 µg นำมาทดสอบการดูดซับสารอะฟลาท็อกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยผสมกันในหลอดทดลองแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้าที่อัตรา 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้อยู่ในสภาพสมดุลย์ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดซับโดยสารดูดซับด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และการแปรผลปริมาณการดูดซับ (Pimpukdee et al., 2000)



ภาพที่ 6 ความสามารถในการดูดซับสารพิษ AFB_1 ของสารดูดซับ ที่อุณหภูมิ 25 °C

3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบแร่ในสารดูดซับ

การวิเคราะห์องค์ประกอบแร่ในดิน ตัวอย่างที่มีความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินปริมาณสูงสุดโดยเทคนิค X-ray diffraction spectrometry (XRD) จากการใช้เทคนิค X-ray diffraction spectrometry (XRD) พบว่าสารที่มีความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีจะมีแร่มอนท์มอริลโลไนต์ (montmorillonite) เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับเบนโทไนต์



ภาพที่ 7 สเปกโตรแกรมของดินตัวอย่างที่มีความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินปริมาณสูงสุดโดยเทคนิค X-ray diffraction spectrometry (XRD)

4. วิธีการทดลอง

การศึกษานี้ออกแบบการทดลองโดยวิธีการสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ใช้ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม จำนวน 126 ตัว ปลาแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตู้ ๆ ละ 6 ตัว และใช้ตู้ขนาด 60 ลิตร เลี้ยงปรับสภาพปลาก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหารทุกวัน วันละ 2 เวลาคือเวลา 10.00 น. และเวลา 16.00 น. ให้อาหารจนปลาอิ่ม มีการตรวจวัดคุณภาพน้ำโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จทุก 2 วันและเปลี่ยนน้ำทุกวันตลอดการทดลอง น้ำที่ใช้เลี้ยงปลากำจัดพิษอะฟลาทอกซินที่อาจปนเปื้อนโดยใช้แคลซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 กิโลกรัมต่อตันน้ำ ซากปลากำจัดโดยการเผาในเตาเผา การทดลองได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

กลุ่มทดลอง	อาหาร
1	อาหารไม่ผสมทั้ง AF B1 และ BN (กลุ่มควบคุม)
2	อาหารผสม AF B1 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
3	อาหารผสม AF B1 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
4	อาหารผสม AF B1 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
5	อาหารผสม AF B1 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม +1% BN โดยน้ำหนัก
6	อาหารผสม AF B1 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม + 1% BN โดยน้ำหนัก
7	อาหารผสม AF B1 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม + 1% BN โดยน้ำหนัก

5. เครื่องมือ/วัสดุ และอุปกรณ์

5.1 ตู้เลี้ยงปลาพร้อมอุปกรณ์

5.2 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

5.3 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

5.4 เครื่องตัดเนื้อเยื่อโรตารีไมโครโตม

5.5 ตู้อบ

5.6 อ่างน้ำอุ่น

5.7 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

5.8 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบต่อเข้ากับกล้องถ่ายรูป

5.9 สารเคมีและสีย้อมสำหรับศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา

5.10 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5.11 เครื่องตัดอัลตร้าไมโครโตม

5.12 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

6. การเก็บรวบรวมข้อมูล

6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

สังเกตลักษณะผิดปกติภายนอก ดูสีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนังและอวัยวะภายนอกอื่น ๆ สังเกตพฤติกรรม เช่น การว่ายน้ำ การกินอาหารที่ผิดปกติในปลา แต่ละกลุ่ม ทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง ช่วงเวลาที่สังเกต 10.00 น. และ 16.00 น. เมื่อครบกำหนด 6 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักรวมของปลานิลในแต่ละกลุ่ม หาน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว นับจำนวนปลาที่ตาย หาอัตราตาย

6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราตาย

ชั่งน้ำหนักปลานิลในสัปดาห์ที่ 6 เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น โดยการชั่งน้ำหนักรวมแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้อาหารปลาเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ เมื่อครบสัปดาห์ที่ 6 นำข้อมูลมาคำนวณหา

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น
- อัตราตาย

6.3 การศึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สุ่มปลานิลจำนวน 20% ของปลาทดลองทั้งหมด ทำให้สลบด้วย phenoxy-ethanol (Fluka, Germany) ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ตรวจดูรอยโรคภายนอกแล้วผ่าเปิดช่องท้องปลาเพื่อดูรอยโรคสังเกตดูอวัยวะภายใน กล้ามเนื้อ ไต ตับ ม้าม และลำไส้ เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก ไต ตับ ม้าม และลำไส้ส่วนต้น จากแต่ละกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ขนาดความหนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร แช่เนื้อเยื่อด้วยน้ำยาตรึงเนื้อเยื่อ (fixative) ซึ่งประกอบด้วย 10% ฟอร์มาลินใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 (Uopasai, 2000; Uopasai, 2006) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เตรียมสไลด์ถาวรด้วยกรรมวิธีพาราฟิน โดยนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อ โดยผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ตัดให้มีความหนา 4-6 ไมโครเมตร แล้วนำผ่านกรรมวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อ (ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545) เมื่อได้สไลด์ชิ้นเนื้อถาวร นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่พ่วงต่อเครื่องคอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรมกล้องถ่ายภาพ (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Nikon corporation, Made in Japan) ศึกษาลักษณะของเซลล์ เช่น ขนาดของนิวเคลียส รูปร่างของเซลล์ การติดสีของเนื้อเยื่อ ซากปลาที่เหลือเผาทำลายทิ้งด้วยความร้อนสูงเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในสิ่งแวดล้อม สถานที่ทำการทดลองในการเตรียมสไลด์แก้ว เพื่อศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ทำที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขั้นตอนที่กล่าวมามีรายละเอียดดังนี้

1) การเก็บตัวอย่าง (specimen collecting)

การเก็บตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพราะเนื้อเยื่อสัตว์ที่เก็บจากสัตว์ที่ทำให้สลบหรือเพิ่งตายตัดแต่งเป็นรูปลูกบาศก์ หน้าตัดเรียบ ขนาดไม่หนาหรือใหญ่เกินไป ไม่ควรหนาเกิน 0.5 เซนติเมตร ล้างเนื้อเยื่อที่มีเลือดและน้ำเหลืองปนด้วยน้ำเกลือ (normal saline) หรือ 0.9% NaCl

2) การดองเนื้อเยื่อสัตว์ (fixation)

นำเนื้อเยื่อที่เก็บอย่างถูกวิธี ตัดแต่งสวยงามตามต้องการแล้วมาแช่ในสารละลายดอง เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ให้มีสภาพใกล้เคียงขณะที่มีชีวิตมากที่สุด ทั้งนี้ต้องเลือกใช้น้ำยาดองให้ถูกต้อง เหมาะสม และใช้ปริมาณที่เพียงพอ น้ำยารักษาสภาพที่นิยมใช้กันมาก คือ 10% นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (neutral buffer formalin) โดยให้น้ำยาดองท่วมเนื้อเยื่อแช่เก็บไว้อย่างน้อย 24 ชั่งโมงหรือนานกว่านั้น ซึ่งขึ้นกับชนิด และขนาดของเนื้อเยื่อ

3) การล้างสารละลายออกจากเนื้อเยื่อ (washing)

หลังจากที่แช่เนื้อเยื่อด้วยน้ำยาดองครบเวลาตามกำหนดแล้ว นำชิ้นเนื้อที่ดองในน้ำยารักษาสภาพมาล้างเอาน้ำยาดองออก ในกรณีที่ดองด้วย 10% นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (neutral buffer formalin) ใส่ตลับใส่เนื้อเยื่อพร้อมเขียนรายละเอียด (label) แล้วใส่ในบีกเกอร์นำไปวางไว้ใต้ก๊อกน้ำ ให้เปิดน้ำประปาไหลผ่าน (running water) ขึ้นกับเวลาที่ต้องแช่เนื้อเยื่อแช่ในฟอร์มาลิน ถ้าแช่นาน 12 ชั่วโมงให้ล้างนาน 10 นาที ดังนั้น ถ้าแช่นาน 24 ชั่วโมง ควรล้างนาน 30 นาที - 1 ชั่วโมง

4) การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)

ในการขจัดน้ำออกจากเซลล์นั้นต้องดึงออกที่ละน้อยเพื่อไม่ให้เซลล์เสียรูปร่างมากเกินไป สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) คือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethanol) โดยเริ่มจากเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาสูง ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการดึงน้ำออกนั้นจะเท่ากับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ใช้ล้างน้ำยาดองออกจากเนื้อเยื่อ และความแตกต่างของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แต่ละขั้นตอนขึ้นกับขนาดของเนื้อเยื่อ ถ้าเนื้อเยื่อมีขนาดใหญ่อาจใช้ความแตกต่างได้ถึง 30-40% ถ้าเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กบอบบาง ความแตกต่างของความเข้มข้นไม่ควรเกิน 15-20% เช่น 70% เอทิลแอลกอฮอล์, 80% เอทิลแอลกอฮอล์, 95% เอทิลแอลกอฮอล์และ 100% เอทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ

5) การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization)

เป็นการล้างแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อและทำให้เนื้อเยื่อมีลักษณะใส โดยการแทนที่ด้วยไซลีน (xylene) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางนำพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ ถ้าขั้นตอนดึงน้ำออกไม่ดีจะทำให้ไซลีนขุ่น ต้องย้อนกลับมาลง 100% เอทิลแอลกอฮอล์ใหม่ เพื่อไล่น้ำออกอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงนำกลับมาลงไซลีนที่เปลี่ยนใหม่ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าดึงน้ำออกอย่างสมบูรณ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

6) การแทรกซึมเนื้อเยื่อด้วยสารตัวกลาง (infiltration)

เป็นการทำให้พาราฟินที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อและเซลล์ เพื่อเป็นการเสริมโครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อให้แข็งเท่าเทียมกัน และสม่ำเสมอกันโดยตลอด สารเคมีที่ใช้คือ พาราฟิน (paraffin) หรือ ขี้ผึ้ง (wax) ต่อมามีการพัฒนาโดยเติมพลาสติกเข้าไปในพาราฟิน เรียกว่า พาราพลาส (paraplast) จุดหลอมเหลว 60-68 องศาเซลเซียส ใช้เมื่อต้องการตัดเนื้อเยื่อให้บางกว่า 5 ไมครอน

ตั้งแต่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ การขจัดแอลกอฮอล์ออกและทำให้เนื้อเยื่อใสจนถึง การแทรกซึมของพาราฟิน สามารถทำได้โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ เครื่องมือนี้จะทำงานโดยนำชิ้นเนื้อผ่านสารละลายไปตามลำดับขั้นและยังช่วยทำให้สารละลายซึมผ่านชิ้นเนื้อได้ดีขึ้น เพราะมีระบบกลไกที่ทำให้ตะกร้านี้หมุนผ่านสารละลายตามเวลาที่กำหนด นอกจากนี้ยังมีระบบสูญญากาศที่ช่วยให้พาราฟินซึมผ่านชิ้นเนื้อได้เร็วยิ่งขึ้น

7) การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

เป็นการนำตัวอย่างที่ผ่านการแทรกซึมเนื้อเยื่อ แล้วนำไปฝัง (embed) ในพาราฟินเหลววิธีการฝังทำได้โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน (dispenser) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่ร้อนซึ่งมีที่ทำให้พาราฟินหลอมเหลวและสำหรับวางในการเตรียมตัวอย่าง อีกส่วนทำความเย็นเพื่อทำให้พาราฟินแข็งตัว

การฝังหยอดพาราฟินเหลวลงในกระทงโลหะ (mould) ใส่เนื้อเยื่อลงไป ไล่ฟองอากาศโดยใช้ปากคีบเขี่ยวนในกระทงโลหะที่มีพาราฟินเหลวอยู่และเขี่ยที่เนื้อเยื่อ กดที่เนื้อเยื่อเบา ๆ เป็นการไล่ฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศก็จะเห็นฟองอากาศลอยผุดขึ้นมาแล้วหายไป และจัดให้เนื้อเยื่ออยู่ตรงกลางกระทงโลหะให้เอาด้านผิวหน้าตัดเรียบหรือด้านที่ต้องการตัดไว้ด้านล่าง แล้วนำไปวางในพื้นที่ที่ทำความเย็น วางกรอบพลาสติก (embedding ring) บนกระทงโลหะพอติดกันดีแล้ว เติมพาราฟินเหลวให้ท่วมตัวอย่าง แล้วทำให้พาราฟินรอบ ๆ เนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลงโดยวางบนส่วนทำความเย็นหรือถาดน้ำแข็งทิ้งไว้ให้แข็ง แล้วแคะออกจากกระทงโลหะ นำไปแช่ในตู้เย็นให้บล็อกเย็นก่อนแล้วตัดด้วยเครื่องไมโครโตมต่อไป

8) การตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม (rotary microtome)

เป็นการตัดเนื้อเยื่อที่อยู่ในแท่งพาราฟินแข็ง (paraffin Block) ให้บาง 4-6 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโตม โดยนำบล็อกพาราฟิน (paraffin Block) มาตัด (trimmimg) พาราฟินส่วนเกินออก ตัดให้ห่างจากเนื้อเยื่อเล็กน้อย ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู สี่เหลี่ยมจัตุรัส หรือสี่เหลี่ยมผืนผ้าก็ได้ โดยให้ด้านบนและด้านล่างขนานกัน เพื่อการเกิดแถบ (ribbon) ของเซกชั่น (section)

9) การติดเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์ (mounting)

นำเนื้อเยื่อแผ่นบาง (section) ที่ได้มาลอยในอ่างน้ำอุ่น (water bath) ที่ใส่เจลาติน (gelatin) ประมาณ 0.5 % ในน้ำกลั่น อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส ในการลอยเทคนิคที่ช่วยให้เนื้อเยื่อแผ่นบางยืดไม่ย่นคือลอยเนื้อเยื่อแผ่นบางใน 30% บนแผ่นแก้วหรือพลาสติกข้างนอกก่อนแล้วนำไปลอยในอ่างน้ำ ใช้สไลด์ตักเนื้อเยื่อแผ่นบางให้ติดตรงกลางสไลด์แก้ว เขียนชื่อเนื้อเยื่อที่ขอบฝ้าของสไลด์ด้วยดินสอ แผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อติดอยู่ต้องทำให้แห้งสนิท เพราะถ้าแห้งไม่สนิทจะทำให้เนื้อเยื่อหลุดได้ในขั้นตอนย้อมสี ดังนั้นต้องทำให้แห้งสนิทก่อนนำไปย้อม โดยวางบนเครื่องสำหรับอุ่นสไลด์ (slide warmer) ตลอดทั้งคืนหรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิ 56-66 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 30 นาที

10) การย้อมสีเนื้อเยื่อ (staining)

เพื่อให้เห็นความแตกต่างของโครงสร้างของเนื้อเยื่อและองค์ประกอบของเซลล์ เพื่อความปลอดภัยขั้นตอนการย้อมสีควรทำในตู้ดูดควัน (hood)

ขั้นตอนที่กล่าวมามีรายละเอียดดังนี้

1) Deparaffinnization เป็นการล้างพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อและสไลด์ด้วย xylene

2) Hydration เป็นการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ โดยผ่านแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำไปสูง

3) Primary Staining เป็นการย้อมสีแรก คือ Haematoxylin เป็นสีพวก basic dye ที่สำหรับย้อมนิวเคลียส สามารถย้อมให้ติดเข้มเกินไปได้แล้วจึงล้างออกที่หลัง ด้วยน้ำหรือกรดอ่อน

4) Differentiation คือการล้างสีที่มากเกินออกด้วยกรดอ่อน (acid alcohol)

5) Counter Staining เป็นการย้อมสีซ้ำ คือ Eosin เป็นสีพวก acid dye เวลาย้อมต้องใช้เวลาที่เหมาะสม เพราะไม่มีการล้างออก ถ้าสีจางให้เติม กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 ml. ต่อ Eosin (working solution) 100 ml. จุดประสงค์ในการย้อมเพื่อเห็นความแตกต่างระหว่างสีที่ย้อมในครั้งแรก สีนี้จะย้อมติด cytoplasm

6) Dehydration เป็นการดึงน้ำออกจากเซลล์หลังจากที่ย้อมสีทั้ง 2 สีแล้ว โดยผ่าน ethanol จากความเข้มข้นต่ำไปสูง

7) Clearing เป็นการขจัดแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์และทำให้เนื้อเยื่อใส โดยใช้ xylene เป็น clearing agent

8) Mounting เป็นการปิดผนึกเนื้อเยื่อโดยหยด permount ซึ่งเป็นตัวกลางที่มีดัชนีหักเหของแสงต่ำ โดยหยด permount แล้วปิดด้วย cover slip ก็จะได้สไลด์ที่นำไปศึกษาและเก็บเป็น permanent slide

6.4 การศึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การเก็บตัวอย่างและการล้าง เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยตัวอย่างที่จะนำมาศึกษานั้น จำเป็นต้องล้างเสียก่อนเพื่อขจัดเมือกและเลือดที่เกาะตามพื้นผิวเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาที่เป็นกลางเช่น น้ำเกลือ หรือบัฟเฟอร์โซลูชั่น (buffer solution) เก็บตัวอย่าง ไตและตับ จากแต่ละกลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว ตัดด้วยใบมีดที่สะอาดและคมกริบ ขนาด 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

การคงสภาพตัวอย่าง (fixation) เพื่อป้องกันการถูกทำลายด้วยขบวนการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ (autolysis) เพื่อคงสภาพโครงสร้างต่าง ๆ ให้เหมือนตอนมีชีวิตให้มากที่สุด โดยแช่เนื้อเยื่อด้วยน้ำยาตรึงเนื้อเยื่อคาร์นอฟสกี (Modified Karnorvsky' s fixative) นาน 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วคงสภาพซ้ำด้วย (post fixed) ด้วย 1% ออสเมียมเทตทรอกไซด์ (osmium tetroxide, OsO_4) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐาน (เวคิน นพนิตย์, 1981) ดังนี้

การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยการผ่านตัวอย่างลงในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ 30, 50, 70, 80, 90, 95 และ 100% ขั้นตอนละ 15 นาที ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง

การนำตัวกลางที่จะยึดตัวอย่างเข้าสู่เนื้อเยื่อ (infiltration) เป็นขั้นตอนที่นำสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) เข้าสู่เนื้อเยื่อแทนที่สารที่ทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยการแช่ตัวอย่างในน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารที่ทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) กับตัวกลางสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) หลาย ๆ ครั้งแต่ละครั้งเปลี่ยนน้ำยาที่มีความเข้มข้นของตัวกลางสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็น 100% ทำให้ตัวอย่างเนื้อเยื่อถูกแทรกซึมอย่างค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งทั่วทุกส่วน สารที่นิยมใช้คือ อีปอน (epon), อาราลไดต์ (aradite) ขั้นตอนการนำตัวกลางที่จะยึดตัวอย่างเข้าสู่เนื้อเยื่อนี้ เริ่มจากแทนที่เอทิลแอลกอฮอล์ด้วยสารที่เป็นตัวทำละลายได้ทั้งเอทิลแอลกอฮอล์และตัวกลางหรือพลาสติก โดยผ่านลงในโพรพีลีนออกไซด์ (propylene oxide) 15 นาที แช่ตัวอย่างในสารผสมโพรพีลีนออกไซด์ต่อพลาสติก (propylene oxide : plastic, 3:1) นาน 1 ชั่วโมง โพรพีลีนออกไซด์ต่อพลาสติก (propylene oxide : plastic, 1:1) นาน 1 ชั่วโมงหรือตลอดคืน (over night) และโพรพีลีนออกไซด์ต่อพลาสติก (propylene oxide : plastic, 1:3) นาน 1 ชั่วโมง และพลาสติก นาน 1 ชั่วโมงหรือตลอดคืน (over night) แต่ไม่ควรเกิน 18 ชั่วโมง ตามลำดับ

การฝังตัวอย่างในพลาสติก (embedding) แยกตัวอย่างชิ้นเล็ก ๆ และฝัง (embed) ในพลาสติกเหลวซึ่งบรรจุในแม่พิมพ์แบบบีมแคปซูล (BEEM capsule) หรือแม่พิมพ์ชนิดแฟลตโมลด์ (flat mold) นาน 30 นาที – 1 ชั่วโมง

การทำพลาสติกให้แข็ง (polymerization) นำตัวอย่างที่ฝังในพลาสติกเข้าอบในตู้อบจนแข็ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 – 72 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างที่แข็งเพื่อตัดให้บาง (block trimming) เป็นการตัดหรือเฉือนเอาพลาสติกที่มากเกินออก ให้หน้าตัดของตัวอย่างที่ฝังในพลาสติกมีขนาดเหมาะสม (0.1x0.2 มิลลิเมตร) เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู เพื่อง่ายและสะดวกในการตัด

การตัดตัวอย่าง (ultramicrotomy/sectioning) นำตัวอย่างไปตัดเนื้อเยื่อแผ่นบาง (section) ด้วยตัดที่มีความบางที่สุดจะมีสีเงินเมื่อสะท้อนแสง ถ้าหนาขึ้นจะมีสีทองและสีอื่น

การติดตัวอย่างบางบนแผ่นวางตัวอย่าง (mounting) ติดเนื้อเยื่อแผ่นบาง (section) ที่บาง 60-90 นาโนเมตรบนแผ่นวางตัวอย่างที่เรียกว่า “กริด” ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นโลหะประเภททองแดงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร อย่างระมัดระวังเป็นพิเศษเนื้อเยื่อแผ่นบางหลายแผ่นที่วางบนกริดจะติดแน่นพร้อมที่จะนำไปย้อมด้วยโลหะหนักก่อนที่จะนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ต่อไป

การย้อม (staining) เป็นการย้อมแบบ positive staining เพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความทึบแสงให้แก่องค์ประกอบของตัวอย่าง (contrast) ของภาพมี 2 ขั้นตอนคือ ย้อมด้วย 5% ยูเรนิลอะซิเตต (uranyl acetate) ในน้ำ (หรือ 2% ยูเรนิลอะซิเตต ใน 50% เอทิลแอลกอฮอล์ นาน -30-40 นาที ย้อมด้วย 0.01% เลดซิเทรต (lead citrate) นาน 2-10 นาที ตามลำดับ

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่าน (transmission electron microscope) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 กิโลโวลต์ ใส่ตัวอย่างที่ย้อมด้วยโลหะหนักแล้วในช่องใส่ตัวอย่างของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาลักษณะรูปร่างและโครงสร้างภายในเซลล์และถ่ายภาพ

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD-Completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window Version 11.5 เพื่อศึกษาค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราตาย