

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือต่อมน้ำลายหลัก 3 คู่ ได้แก่

1. ต่อมน้ำลายหน้ากกหู (parotid gland)
2. ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกรล่าง (submandibular gland)
3. ต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual gland)

จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 4 ชนิด ชนิดละ 3 ตัว ได้แก่

1. หนู rat
2. กระต่าย
3. แพะ
4. สุนัข

โดยเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ศึกษาจะต้องไม่มีพยาธิสภาพเมื่อดูด้วย light microscope

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Tissue preparation)

นำชิ้นเนื้อของต่อมน้ำลายที่จะใช้ศึกษามาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ความหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อที่ได้ทั้งหมดไปทำการตรึงสภาพ (fixation) ด้วยน้ำยาตรึงสภาพ (fixative)

2. การตรึงสภาพเนื้อเยื่อ (Fixation)

นำเนื้อเยื่อที่ได้มาแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเน่าเปื่อย และช่วยรักษารูปร่างและโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อให้มีสภาพเหมือนตอนมีชีวิตมากที่สุด น้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ buffered neutral formalin ความเข้มข้น 10 % (Prophet *et al.*, 1992) เนื่องจากมีความสามารถในการทำซาบ (penetration) เร็ว และไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งเกินไป แม้จะแช่ในน้ำยาเป็นเวลานาน และสามารถนำเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพแล้วไปย้อมสีได้หลายวิธี เนื้อเยื่อจะถูกแช่ในน้ำยาตรึงสภาพนานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ

3. การเตรียมเนื้อเยื่อ (Processing of tissue)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงสภาพมาผ่านขั้นตอน dehydration, clearing และ infiltration ต่อมาจึงนำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน ตามลำดับ เพื่อให้ได้บล็อกชิ้นเนื้อและนำไปผ่านขั้นตอนการตัดให้ได้เป็นแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับนำไปย้อมสีต่อไป โดยมีรายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ

3.1 การกำจัดน้ำยาตรึงสภาพและน้ำโดยวิธี Dehydration

เป็นการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพด้วยการใช้ ethanol ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก (graded strengths of ethanol) คือ 50%, 70%, 80%, 95% และ 100% โดยผ่านเนื้อเยื่อไปสู่อัลกอฮอล์ ในแต่ละความเข้มข้น 2 ครั้ง ตามลำดับดังต่อไปนี้

ethanol	50%	นาน	1	ชั่วโมง	เปลี่ยนทุก	30 นาที
ethanol	70%	นาน	1	ชั่วโมง	เปลี่ยนทุก	30 นาที
ethanol	80%	นาน	1	ชั่วโมง	เปลี่ยนทุก	60 นาที
ethanol	95%	นาน	1	ชั่วโมง	เปลี่ยนทุก	60 นาที
ethanol	100%	นาน	1	ชั่วโมง	เปลี่ยนทุก	60 นาที

3.2 การนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่ dehydrant (Clearing)

เป็นการทำให้ tissue element ใส ซึ่งสารที่ใช้ในการ clearing ต้องเป็นสารที่ใช้ในการทำละลาย paraffin ที่ใช้ในการ embed ได้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้ xylene ทำหน้าที่เป็น clearing agent แทรกซึมเข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ในชิ้นเนื้อ และเป็นตัวกลางให้ embedding media ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดี วิธีการโดยแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยา xylene 2 ครั้ง นาน ครั้งละ 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกชั่วโมง

3.3 การนำ embedding media เข้าแทนที่ clearing agent (Infiltration)

หลังจาก clearing แล้ว เป็นการ infiltrate ด้วย supporting medium คือ wax เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อถูก compression และ distortion ขณะที่ใช้เครื่อง microtome ในการตัด block ของเนื้อเยื่อ วิธีการในการ infiltration คือการใช้ wax ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง xylene กับ paraffin โดยที่ xylene จะเป็นตัวนำเอา paraffin เข้าไปแทรกระหว่าง cells ในเนื้อเยื่อ เมื่อ paraffin แข็งตัว ก็จะเป็นตัวพยุงเนื้อเยื่อไว้อย่างดี เนื้อเยื่อจะถูกนำผ่าน wax ดังนี้

Wax 1	=	xylene : paraffin	อัตราส่วน	2:1	นาน	30 นาที
Wax 2	=	xylene : paraffin	อัตราส่วน	1:1	นาน	30 นาที
Wax 3	=	pure paraffin	นาน	30 นาที		

3.4 การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding)

เป็นการนำเนื้อเยื่อไปใส่ใน paraffin ที่ละลายแล้ว เมื่อ paraffin แข็งจะป้องกันโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อไว้ขณะถูกตัด (sectioning) ด้วยเครื่อง microtome สำหรับการศึกษานี้ ใช้ paraffin ซึ่งละลายใน xylene โดยปกติแล้ว paraffin เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ในการ embedding ต้องละลาย paraffin ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56-58 องศาเซลเซียส เมื่อ paraffin เป็นของเหลวแล้วจะสามารถกำซาบ (penetrate) เข้าไปในเนื้อเยื่อได้

วิธีการในการ embedding

1. ใช้แท่งเหล็กรูปตัว L 2 อันประกอประกกันเป็นรูปสี่เหลี่ยม ให้ได้ขนาดความกว้าง ความยาวที่เหมาะสมกับขนาดของเนื้อเยื่อที่จะใช้ embed ซึ่งจะวางอยู่บนแผ่นโลหะรูป สี่เหลี่ยม
2. เท paraffin ที่ละลายแล้วลงใน block สี่เหลี่ยมที่เตรียมไว้ในข้อ 1
3. นำ forceps ไปลนไฟให้ร้อน แล้วคีบเนื้อเยื่อที่ infiltrate ไว้แล้วใส่ลงใน block โดยใช้ด้านที่เรียบของเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านล่าง ซึ่งก็คือหน้า block เมื่อแกะออกมานั่นเอง
4. ทิ้งไว้ให้เย็น ขณะที่รอให้ paraffin แข็งตัว ต้องคอยกดขอบของ paraffin ที่เริ่มแข็งตัวอยู่ตลอดเพื่อป้องกันไม่ให้เป็นรอยบุ๋มตรงกลาง paraffin ซึ่งจะ ทำให้อากาศเข้าไปได้ เมื่อ paraffin แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ได้ระดับหนึ่ง จึงนำไปใส่ในตู้เย็น เพื่อให้การแข็งตัวเร็วขึ้น
5. เมื่อ paraffin แข็งตัวดีแล้ว แกะเอา block ของ paraffin ออกจากแท่งเหล็ก และแผ่นโลหะ แล้วเขียนชื่อเนื้อเยื่อใส่กระดาษที่ติด block ไว้ ให้สังเกต หน้า block ว่ามีฟองอากาศอยู่ใน block หรือไม่ ถ้ามีฟองอากาศต้องแกะเอาเนื้อเยื่อไปใส่ใน wax 3 ซึ่งอยู่ในตู้อบเพื่อทำการ embed ใหม่

3.5 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ (Preparation of sections)

3.5.1 การตัดบล็อกเนื้อเยื่อ

1. นำบล็อกเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว มาตัดเอา paraffin ส่วนเกินบริเวณรอบๆเนื้อเยื่อออก นำบล็อกไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อมีความแข็งพอต่อการตัดและไม่ทำให้แถบของเนื้อเยื่อย่นเวลาตัดด้วยเครื่อง microtome
2. นำบล็อกที่แช่เย็นแล้ว มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร สำหรับการย้อมสีทั่วไป และการย้อมสีพิเศษจะได้แผ่นเนื้อเยื่อบางๆ เรียงต่อเป็นแถว (ribbons)
3. นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ไปติดกับสไลด์ต่อไป

3.5.2 การติดแผ่นเนื้อเยื่อกับสไลด์

1. ละลาย gelatin ใน water bath โดยให้ความร้อนช่วย จน gelatin ละลายหมดแล้ววัดอุณหภูมิของน้ำให้ได้ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียสแล้วจึงนำเอาแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาลอยใน water bath ทิ้งไว้สักครู่ ถ้าแผ่นเนื้อเยื่อย่น ให้ใช้ forcep ดึงแผ่นเนื้อเยื่อส่วนที่ย่นให้ขยายออกจนไม่มีรอยย่น
2. นำสไลด์ที่สะอาด และเขียนเครื่องหมายไว้แล้ว ช้อนเอาแผ่นเนื้อเยื่อขึ้นมาติดกับสไลด์ ใช้ forcep ปรับขึ้นเนื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการบนสไลด์
3. นำสไลด์ที่ติดแผ่นขึ้นเนื้อเรียบร้อยแล้วใส่ไว้ใน rack แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อ paraffin ส่วนเกินละลายออก แล้วนำออกมาจากตู้อบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเพื่อในไปย้อมตามวิธีที่ต้องการต่อไป

3.6 การย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

การย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างต่างๆ ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ ส่วนจะย้อมด้วยวิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าต้องการจะศึกษาอะไรจากเนื้อเยื่อนั้น การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคการย้อมสี 2 วิธีดังนี้

3.6.1 การย้อมสีทั่วไป (Routine staining)

ใช้วิธี Harris's hematoxylin and eosin (H&E) ตามเทคนิคของ Luna (1968) เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อและใช้แยกแยะให้เห็นความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของต่อมน้ำลายทั้ง 3 คู่

3.6.2 การย้อมสีพิเศษ (Special staining)

วิธีการย้อมสีพิเศษนี้ ใช้เพื่อแสดงลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเซลล์ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็น ความแตกต่างอย่างชัดเจนด้วยการย้อมสีทั่วไป การศึกษาครั้งนี้ใช้ 3 วิธีคือ

Periodic Acid Schiff (PAS)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เป็นการย้อมพิเศษสำหรับ mucosubstance โดยเมื่อย้อมจะแสดงลักษณะ

- | | |
|-------------------|---|
| - glycogen, mucin | ย้อมติดสีชมพูถึงแดง |
| - nuclei | ย้อมติดสีฟ้า |
| - background | ย้อมติดสีเขียวอ่อน (ถ้าใช้ light green) |

Gomori's one step trichrome method

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เป็นการย้อมพิเศษสำหรับ connective tissue โดยเมื่อย้อมจะแสดงลักษณะ

- | | |
|----------------|-------------------|
| - muscle fiber | ย้อมติดสีแดง |
| - nuclei | ย้อมติดสีดำ |
| - collagen | ย้อมติดสีฟ้าถึงดำ |

Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เป็นการย้อมพิเศษสำหรับ mucosubstance โดยเมื่อย้อมจะแสดงลักษณะ

- | | |
|-----------------|--------------------------|
| - mucosubstance | ย้อมติดสีม่วงหรือม่วงแดง |
| - nuclei | ย้อมติดสีดำ |
| - cytoplasm | ย้อมไม่ติดสีใดเลย |

3.6.3 การย้อมสีด้วยเทคนิค Lectin histochemistry

เป็นการย้อมเพื่อศึกษาองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ โดยอาศัยคุณสมบัติความเฉพาะเจาะจงของ lectin ต่ออนุพันธ์ของน้ำตาลที่พบภายในเซลล์ โดย lectin แต่ละชนิดจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังนี้

<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	galactocyl
<i>Maclura pomifera</i> (MPA)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	galactocyl
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	galactocyl
<i>Pisum sativum</i> (PSA)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	manocyl
<i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	fucosyl
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม	glucocyl, sialic acid

การเก็บรวบรวมข้อมูล

นำบล็อกเนื้อเยื่อของต่อมน้ำลายทั้งข้างซ้ายและขวาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้ง 4 ชนิด ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วมาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้เป็น serial sections จำนวน 12 sections ติดต่อกัน แล้วจึงแบ่งสไลด์ของสัตว์แต่ละชนิดให้เป็น 4 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของ Right parotid gland

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของ Left parotid gland

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของ Right submandibular gland

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของ Left submandibular gland

จากนั้นนำสไลด์ในแต่ละกลุ่มของสัตว์แต่ละชนิดมาย้อมด้วยวิธีต่างๆดังต่อไปนี้

1. Harris's hematoxylin and eosin (H&E)
2. Periodic Acid Schiff (PAS)
3. Gomori's one step trichrome method
4. Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-Pas)
5. Lectin histochemistry โดยใช้ lectin 6 ชนิด ดังต่อไปนี้

5.1 *Dolichos biflorus* (DBA)

5.2 *Maclura pomifera* (MPA)

5.3 *Arachis hypogaea* (PNA)

5.4 *Pisum sativum* (PSA)

5.5 *Ulex europaeus* (UEA-I)5.6 *Triticum vulgare* (WGA)

โดยเรียงลำดับในการย้อมสไลด์ดังต่อไปนี้

แผ่นที่ 1 (No.1)	ย้อมด้วยเทคนิค Gomori's one step trichrome method
แผ่นที่ 2 (No.2)	ย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin & Eosin
แผ่นที่ 3 (No.3)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ DBA
แผ่นที่ 4 (No.4)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ MPA
แผ่นที่ 5 (No.5)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ PNA
แผ่นที่ 6 (No.6)	ย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin & Eosin
แผ่นที่ 7 (No.7)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ PSA
แผ่นที่ 8 (No.8)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ UEA-I
แผ่นที่ 9 (No.9)	ย้อมด้วยเทคนิค lectin histochemistry โดยใช้ WGA
แผ่นที่ 10 (No.10)	ย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin & Eosin
แผ่นที่ 11 (No.11)	ย้อมด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff
แผ่นที่ 12 (No.12)	ย้อมด้วยเทคนิค Alcian Blue - Periodic Acid Schiff

จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาทำการศึกษา

1. ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยทั่วไปของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้ง 4 ชนิด (หนู, กระจ่าง, แพะ และสุนัข) จากการย้อมด้วยเทคนิค H&E และศึกษารูปแบบการติดสีพิเศษด้วยวิธี Trichrome, PAS, AB-PAS ของเซลล์ต่อม (glandular cells) ทั้งชนิดเซลล์หลั่ง (secretory cells) และเซลล์บุท่อ (ductal cells) ของต่อมน้ำลายหลักของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ศึกษา

2. ศึกษาความแตกต่างของคุณสมบัติการย้อมติดสีโดยใช้ lectin ของเซลล์ต่อม (glandular cells) ทั้งชนิดเซลล์หลั่ง (secretory cells) และเซลล์บุท่อ (ductal cells) ของต่อมน้ำลายหลักของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ศึกษา โดยใช้ lectin 6 ชนิดได้แก่ DBA, MPA, PNA, PSA, UEA-I และ

WGA

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษานำร่องเพื่อเลือกความเข้มข้นของ lectin แต่ละชนิดที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง เหนือในการเลือกใช้ความเข้มข้น พิจารณาโดยเลือกความเข้มข้นของ lectin ที่น้อยที่สุด ที่สามารถสังเกตการจับตัวของ lectin กับอนุพันธ์ของน้ำตาลที่พบภายในเซลล์ที่ศึกษา และเมื่อได้ความเข้มข้นของ lectin ที่เหมาะสมแล้วจึงนำค่าความเข้มข้นของ

lectin แต่ละชนิดที่ได้ มาทำการศึกษาในกระต่าย, แพะ และสุนัขต่อไป ความเข้มข้นของ lectin แต่ละชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ

1. <i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	ความเข้มข้น	1:50
2. <i>Maclura pomifera</i> (MPA)	ความเข้มข้น	1:100
3. <i>Arachis hypogea</i> (PNA)	ความเข้มข้น	1:25
4. <i>Pisum sativum</i> (PSA)	ความเข้มข้น	1:50
5. <i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)	ความเข้มข้น	1:50
6. <i>Triticum vulgare</i> (WGA)	ความเข้มข้น	1:400

โดยอัตราการจับตัวของ lectin ต่ออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ แสดงได้โดยอาศัย จำนวน "+" เพื่อแสดงความเข้มข้นของสีที่ปรากฏในเนื้อเยื่อ จำนวน "+" มาก แสดงถึงความเข้มข้นของสีที่ปรากฏในเนื้อเยื่อมีมาก และ จำนวน "+" น้อย แสดงถึงความเข้มข้นของสีที่ปรากฏในเนื้อเยื่อน้อยตามลำดับ