

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียซึ่งประกอบด้วย

1. รังไข่ (ovary)
2. ท่อนำไข่ (oviduct)
3. มดลูก (uterus)

จากสุนัขเพศเมียจำนวน 5 ตัว โดยเนื้อเยื่อที่นำมาทำการศึกษาค้างนี้ผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นว่าไม่มีพยาธิสภาพ

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Tissue preparation)

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ นำชิ้นเนื้อของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกที่จะใช้ศึกษาค้างนี้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ทั้งหมดไปทำการตรึงสภาพ

2. การตรึงสภาพเนื้อเยื่อ (Fixation)

นำเนื้อเยื่อที่ได้มาแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเน่าเปื่อย และช่วยรักษารูปร่างและโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ ให้มีสภาพเหมือนตอนมีชีวิตมากที่สุด น้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือ buffered neutral formalin ความเข้มข้น 10 % (Prophet *et al.*, 1992) เนื่องจากมีความสามารถในการกำซาบ (penetrate) เร็ว ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งมากเกินไป แม้จะแช่ในน้ำยานาน และสามารถนำเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพแล้วไปย้อมสีได้หลายวิธี โดยแช่เนื้อเยื่อที่ต้องการตรึงสภาพในน้ำยานานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ

3. การเตรียมเนื้อเยื่อ (Processing of tissue)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงสภาพมาผ่านขั้นตอน dehydration clearing infiltration และ embeddedding ตามลำดับเพื่อให้ได้บล็อกชิ้นเนื้อเพื่อนำไปผ่านขั้นตอนการตัดให้ได้เป็นแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อ ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อดังกล่าวคือ

3.1 การกำจัดน้ำยาตรึงสภาพและน้ำ (Dehydration)

เป็นการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพด้วยการใช้ ethanol ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก (graded strengths of ethanol) คือ 50% 70% 80% 90% 95% และ 100% โดยผ่านเนื้อเยื่อไปสู่ alcohol ในแต่ละความเข้มข้น 2 ครั้ง ตามลำดับดังต่อไปนี้

ethanol 50%	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที
ethanol 70%	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที
ethanol 80%	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 60 นาที
ethanol 90%	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 60 นาที
ethanol 95%	ทิ้งไว้ค้างคืน	
ethanol 95%	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที
ethanol 100%	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 60 นาที

3.2 การนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่ dehydrant (Clearing)

เป็นการทำให้เนื้อเยื่อใส ซึ่งสารที่นิยมใช้ในการ clearing ต้องเป็นสารที่ใช้ในการทำละลาย paraffin ที่ใช้ในการ embedded ได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้ xylene ทำหน้าที่เป็น clearing agent แทรกซึมเข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ในชิ้นเนื้อ และเป็นตัวกลางในการนำ paraffin ซึ่งเป็น embedding media ให้แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี โดยวิธีการแช่ชิ้นเนื้อที่ต้องการศึกษาในน้ำยา xylene 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกชั่วโมง

3.3 การนำ embedding media เข้าแทนที่ clearing agent (Infiltration)

เป็นวิธีการช่วยให้ชิ้นเนื้อคงรูปอยู่ได้ ไม่ให้เนื้อเยื่อถูกกดหรือผิดรูปไปขณะตัดบล็อกชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome โดยการใช้ wax ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง xylene กับ paraffin ในอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่ง xylene จะเป็นตัวนำเอา paraffin เข้าไปแทรก

ระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อ เมื่อ paraffin แข็งตัวก็จะเป็นตัวพองเนื้อเยื่อเป็นอย่างดี โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการ clearing แล้วไปผ่านขั้นตอนตามลำดับดังนี้

Wax 1 เป็นส่วนผสมระหว่าง xylene : paraffin อัตราส่วน 2:1 นาน 30 นาที

Wax 2 เป็นส่วนผสมระหว่าง xylene : paraffin อัตราส่วน 1:1 นาน 30 นาที

Wax 3 เป็น pure paraffin นาน 30 นาที

ขั้นตอนทั้ง 3 นี้ต้องทำในตู้อบ อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

3.4 การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding)

เป็นการนำเนื้อเยื่อใส่ใน paraffin ที่ละลายแล้ว เมื่อ paraffin แข็งตัวจะช่วยป้องกันโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อไว้ขณะถูกตัด (sectioning) ด้วยเครื่อง microtome สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ paraffin ซึ่งละลายใน xylene โดยปกติแล้ว paraffin เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นในการ embedding ต้องละลาย paraffin ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56-58 องศาเซลเซียส เมื่อ paraffin เป็นของเหลวแล้วจะสามารถกำซาบ (penetrate) เข้าไปในเนื้อเยื่อได้

วิธีการในการ embedding

1. ใช้แท่งเหล็กรูปตัว L 2 อันประกอประกกันเป็นรูปสี่เหลี่ยม ให้ได้ขนาดความกว้างและความยาวที่เหมาะสมกับขนาดของเนื้อเยื่อ วางบนแผ่นโลหะรูปสี่เหลี่ยม
2. เท paraffin ที่ละลายแล้วลงในบล็อกสี่เหลี่ยมที่เตรียมไว้ในข้อ 1
3. นำ forceps ไปลนไฟให้ร้อน แล้วคีบเนื้อเยื่อ infiltrate ไว้แล้วใส่ลงไปในบล็อก โดยให้ด้านที่เรียบของเนื้อเยื่ออยู่ด้านล่าง ซึ่งเป็นหน้าบล็อกเมื่อแกะแท่งเหล็กออกนั่นเอง
4. ทิ้งไว้ให้เย็น ขณะที่รอให้ paraffin แข็งตัวต้องคอยกดขอบของ paraffin ที่เริ่มแข็งตัวให้เรียบ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดรอยบุ๋มตรงกลาง ซึ่งจะทำให้อากาศเข้าได้ เมื่อ paraffin แข็งตัวได้ระดับหนึ่งที่อุณหภูมิห้องจึงนำไปใส่ในตู้เย็นเพื่อให้ paraffin แข็งตัวเร็วขึ้น
5. เมื่อ paraffin แข็งตัวดีแล้วจึงแกะบล็อกออกจากแท่งเหล็กและแผ่นโลหะ แล้วเขียนชื่อเนื้อเยื่อใส่กระดาษติดที่บล็อกไว้

สังเกตบริเวณหน้าบล็อกว่ามีฟองอากาศอยู่หรือไม่ ถ้ามีฟองอากาศอยู่หน้าบล็อกต้องนำบล็อกไปละลายใน wax 3 ในตู้อบเพื่อทำการ embedded ใหม่

3.5 การเตรียม สไลด์เนื้อเยื่อ (Preparation of sections)

3.5.1 การตัดบล็อกเนื้อเยื่อ

1. นำบล็อกเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว มาตัดเอา paraffin ส่วนเกินบริเวณรอบ ๆ เนื้อเยื่อออก นำบล็อกไปแช่ตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อมีความแข็งพอต่อการตัด และไม่ทำให้แถบของเนื้อเยื่อย่นเวลาตัดด้วยเครื่อง microtome
2. นำบล็อกที่แช่เย็นแล้ว มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร สำหรับการย้อมสีทั่วไป และการย้อมสีพิเศษ จะได้แผ่นเนื้อเยื่อบาง ๆ เรียงต่อกันเป็นแถว (ribbons)
3. นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ไปติดกับสไลด์ต่อไป

3.5.2 การติดเนื้อเยื่อกับสไลด์

1. ละลาย gelatin ใน water bath โดยใช้ความร้อนช่วย จน gelatin ละลายหมดแล้ววัดอุณหภูมิของน้ำให้ได้ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส แล้วนำเอาแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ มาลอยใน water bath ทิ้งไว้สักครู่ ถ้าแผ่นเนื้อเยื่อย่นให้ใช้ forcep ดึงแผ่นเนื้อเยื่อที่ย่นให้ขยายออกจนไม่มีรอยย่น
2. นำสไลด์ที่สะอาด และเขียนเครื่องหมายไว้แล้ว ช้อนเอาแผ่นเนื้อเยื่อขึ้นมาติดกับสไลด์ ใช้ forcep ปรับขึ้นเนื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการบนสไลด์
3. นำสไลด์ที่ติดแผ่นขึ้นเนื้อเรียบร้อยแล้วใส่ไว้ใน rack แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อให้ paraffin ส่วนเกินละลายออก แล้วนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเพื่อนำไปย้อมตามวิธีที่ต้องการต่อไป

3.6 การย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

การย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงให้เห็นโครงสร้างต่าง ๆ ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ ซึ่งการย้อมสีเนื้อเยื่อนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการย้อมสีว่าต้องการศึกษาอะไรจากเนื้อเยื่อนั้น การย้อมสีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีดังนี้

3.6.1 การย้อมสีทั่วไป (Routine staining)

ใช้วิธี Harris's hematoxylin and eosin (H&E) ตามเทคนิคของ Luna (1968) เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อและใช้แยกแยะให้

เห็นความแตกต่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูก

3.6.2 การย้อมสีพิเศษ (Special staining)

วิธีการย้อมสีพิเศษนี้ ใช้เพื่อแสดงลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเซลล์ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อด้วยวิธีการย้อมสีทั่วไป การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้การย้อมสีพิเศษ 3 วิธีคือ

Alcian Blue-Periodic Schiff (AB-PAS)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เป็นการย้อมสีพิเศษสำหรับ mucosubstance โดยเมื่อย้อมจะแสดงลักษณะ

- polysaccharide & mucosubstance ย้อมติดสีม่วงหรือม่วงแดง
- nuclei ย้อมติดสีดำ
- cytoplasm ย้อมไม่ติดสีใดเลย

Periodic Acid Schiff (PAS)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เป็นการย้อมพิเศษสำหรับ mucosubstance โดยเมื่อย้อมจะแสดงลักษณะ

- mucosubstance ย้อมติดสีชมพูถึงสีม่วงแดง
- 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

3.6.3 การย้อมสีด้วยเทคนิค Lectin histochemistry

เป็นการย้อมเพื่อศึกษาองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ โดยอาศัยคุณสมบัติความเฉพาะเจาะจงของ lectin ต่ออนุพันธ์ของน้ำตาลที่พบภายในเซลล์ โดย lectin แต่ละชนิดจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังนี้

Dolichos biflorus (DBA) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม galactocyl

Maclura pomifera (MPA) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม galactocyl

Arachis hypogaea (PNA) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม galactocyl
Pisum sativum (PSA) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม manococyl
Ulex europaeus (UEA-I) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม glucocyl, sialic acid
Triticum vulgare (WGA) มีความเฉพาะเจาะจงต่อน้ำตาลกลุ่ม fucocyl

ขั้นตอนการย้อม

1. นำสไลด์ที่ย้อมมาละลายพาราฟินออก โดยใช้ Xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. นำสไลด์มาผ่าน alcohol 95% 80% และ 70% ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. นำสไลด์แช่ใน 37% H₂O₂ นาน 20-30 นาที
4. นำสไลด์แช่ใน PBS buffer (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
5. เช็ดสไลด์รอบๆ ขึ้นเนื้อให้แห้งแล้วใช้ paraplast ครอบขึ้นเนื้อเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำยาไหลออกนอกขึ้นเนื้อ
6. หยด lectin ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ให้ท่วมเนื้อเยื่อ วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น จากนั้นทิ้งสไลด์ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
8. เช็ดรอบๆ สไลด์เนื้อเยื่อให้แห้ง หยด Avidin-Biotin Complex (ABC) ลงบนเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นวางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-1.30 ชั่วโมง
9. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4)
10. หยด DAB ลงบนสไลด์เนื้อเยื่อนาน 1 นาที
11. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4)
12. ย้อมทับด้วย Harris' Hematoxylin นานประมาณ 1-2 นาที หรือจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อขึ้นลงประมาณ 6-10 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
13. Dehydrate ด้วย 95% และ 100% alcohol อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาทีตามลำดับ
14. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
15. Mount ด้วย permoun

การเก็บรวบรวมข้อมูล

นำบล็อกเนื้อเยื่อของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัขที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยแล้วมาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้เป็น serial sections จำนวน 12 sections ติดต่อกัน จากนั้นนำสไลด์ในแต่ละบริเวณของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกมาย้อมด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

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 ชนิดดังนี้
 - 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 Harris's hematoxylin and eosin (H&E) |
| 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 Harris's hematoxylin and eosin (H&E) |
| 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 Harris's hematoxylin and eosin (H&E) |
| แผ่นที่ 11 (No. 11) | ย้อมด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) |
| แผ่นที่ 12 (No. 12) | ย้อมด้วยเทคนิค Alcian Blue-Periodic Acid Schiff(AB-PAS) |

จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาทำการศึกษา

1. ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยทั่วไปของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัข จากการย้อมด้วยเทคนิค H&E และศึกษารูปแบบการติดสีพิเศษด้วยวิธี Trichrome, PAS และ AB-PAS ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัข
2. ศึกษาความแตกต่างของคุณสมบัติการย้อมติดสีโดยใช้ lectin ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัข โดยแปลผลตามการพบลักษณะของ granule สีน้ำตาลที่พบภายในเซลล์ ซึ่งให้เป็น “+” เมื่อปรากฏสีน้ำตาลภายในเซลล์ และให้เป็น “-” เมื่อไม่ปรากฏสีน้ำตาลภายในเซลล์
3. เปรียบเทียบแบบแผนของกลัยโคคอนจูเกทในแต่ละบริเวณของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัข