

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ตับอ่อนของมนุษย์วัยผู้ใหญ่ จำนวน 5 ราย ไม่จำกัดเพศ อายุ 16-58 ปี จากผู้เสียชีวิตที่จำเป็นต้องทำการผ่าศพพิสูจน์ (autopsy) หลังการเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมง ของหน่วยงานนิติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาสารคาม จังหวัดร้อยเอ็ด

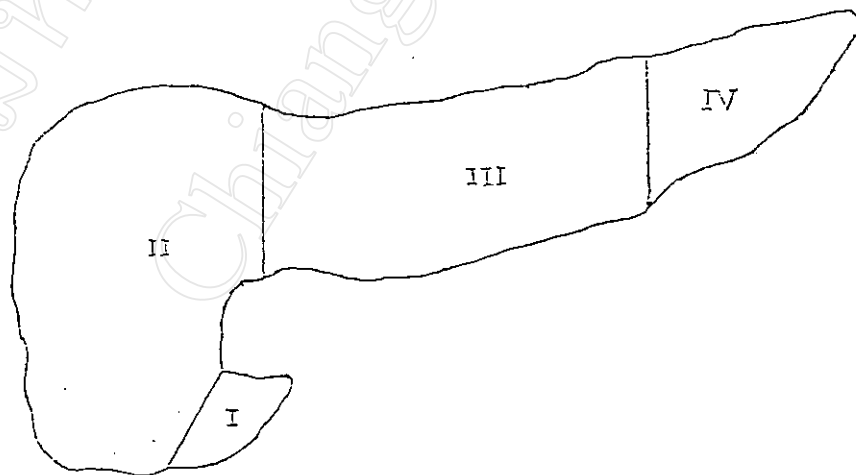
วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Tissue preparation)

หลังจากผ่าตัดนำตับอ่อนออกจากผู้เสียชีวิตแล้ว นำตับอ่อนมาตัดแบ่งเป็นส่วน head, body, tail และ uncinete process (รูปที่ 7) โดยอาศัยเกณฑ์ทางมหากายวิภาคศาสตร์ดังนี้

1.1 ขอบด้านขวาของ superior mesenteric vein แบ่งส่วน head ออกจาก body โดยในบริเวณ head จะมีส่วนของตับอ่อนที่ยื่นยาวออก เรียกว่า uncinete process ซึ่งอยู่หลังต่อ superior mesenteric vessels

1.2 รอยคอดทางด้านซ้ายสุดของตับอ่อนแบ่งส่วน body ออกจาก tail



รูป 7 แสดง anterior view ของตับอ่อนมนุษย์ แสดงการแบ่งออกเป็น 4 ส่วน

I = uncinete process

III = body

II = head

IV = tail

หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อแต่ละส่วนของตับอ่อนมาตัดแบ่งเป็นชิ้น (slice) จากขวาไปซ้าย แต่ละชิ้น กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ (fixation)

2. การตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (Fixation)

การตรึงสภาพชิ้นเนื้อเพื่อช่วยรักษาโครงสร้างตลอดจนรูปร่างลักษณะของเซลล์ต่างๆ ของชิ้นเนื้อให้มีสภาพโครงสร้างเหมือนเดิม หรือ ใกล้เคียงกับขณะที่ยังมีชีวิตอยู่มากที่สุด ในการเลือกน้ำยาตรึงสภาพนั้นขึ้นอยู่กับว่าจะย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธีอะไร และจะคงสภาพโครงสร้างใดเป็นพิเศษ น้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (fixative) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10% เนื่องจาก ฟอร์มาลินมีความสามารถในการกำซาบ (penetration) เร็ว ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งเกินไปแม้จะแช่ในน้ำยานาน และสามารถนำเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพแล้วไปย้อมสีได้หลายวิธี รวมทั้งเทคนิคการย้อม silver stains ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ด้วย วิธีการคือ นำชิ้นเนื้อที่ได้ไปแช่ในน้ำยานานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ

3. การเตรียมเนื้อเยื่อ

หลังจากนำชิ้นเนื้อผ่านการตรึงสภาพแล้วจะต้องนำชิ้นเนื้อมาผ่านขั้นตอนในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้บล็อกชิ้นเนื้อ ก่อนที่จะนำไปผ่านขั้นตอนการตัดให้ได้แผ่นสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับนำไปย้อมสีต่อไป ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อประกอบด้วย

3.1 Dehydration

เป็นการดึงน้ำยาตรึงสภาพและน้ำออกจากชิ้นเนื้อ โดยการนำชิ้นเนื้อไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นน้อยไปมาก (graduated strengths of ethyl alcohol) แอลกอฮอล์จะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับน้ำ (dehydrants) ช่วยดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็วไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งและเปราะ มีวิธีการทำตามลำดับดังนี้

เอทิลแอลกอฮอล์ 50% นาน 1 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที)

เอทิลแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที)

เอทิลแอลกอฮอล์ 80% นาน 2 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 1 ชั่วโมง)

เอทิลแอลกอฮอล์ 90% นาน 2 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 1 ชั่วโมง)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ค้างคืน

เอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 1 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 30 นาที)

เอทิลแอลกอฮอล์ 100% นาน 2 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 1 ชั่วโมง)

3.2 Clearing

เป็นการนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่ dehydrants สารเคมีที่จะใช้ในการ clearing (clearing agent) จะต้องสามารถเข้ากันได้กับ แอลกอฮอล์ซึ่งเป็น dehydrants และเป็นตัวกลางที่ยอมให้พาราฟิน (paraffine) ซึ่งเป็น embedding media แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ xylene เป็น clearing agent เพราะสามารถเข้าแทนที่แอลกอฮอล์ในเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว และเข้าได้ดีกับพาราฟิน วิธีการทำโดย แช่ชิ้นเนื้อใน xylene นานครั้งละ 1 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง

3.3 Infiltration

เป็นการขจัดเอา clearing agent ออกจากชิ้นเนื้อและแทนที่ด้วย embedding media ซึ่ง embedding media เป็นสารที่จะช่วยให้เซลล์และเนื้อเยื่อตลอดจนโครงสร้างภายในของเซลล์และเนื้อเยื่อคงรูป และแข็งพอที่จะตัดเป็นสไลด์เนื้อเยื่อได้ embedding media ที่นิยมใช้กันมากในงานที่เกี่ยวกับกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป และนำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ พาราฟิน ซึ่งมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ต้องนำพาราฟินไปละลายให้เป็นของเหลว ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทำ Infiltration นี้จึงต้องทำภายในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส โดยนำชิ้นเนื้อไปแช่ในส่วนผสม ระหว่าง xylene กับพาราฟิน ในอัตราส่วนต่างๆ กันคือ

WAX I ส่วนผสมระหว่าง xylene: paraffine อัตราส่วน 1:1 นาน 30 นาที

WAX II ส่วนผสมระหว่าง xylene :paraffine อัตราส่วน 1:2 นาน 30 นาที

WAX III paraffine อย่างเดียว นาน 30 นาที

3.4 Embedding

การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ นับเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการ infiltration แล้ว ไปแช่ใน พาราฟินเหลว เพื่อต้องการให้พาราฟินแข็งตัวห่อหุ้มชิ้นเนื้อไว้ การตัดชิ้นเนื้อเป็นแผ่นบางๆ (section) สะดวกขึ้น และสามารถรักษาชิ้นเนื้อไม่ให้ถูกแมลงกัดหรือถูกกระแทกกระแทก มีวิธีการทำดังนี้

3.4.1 นำแท่งเหล็กรูปตัว L 2 อัน มาประกบกันให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม ให้ได้ขนาดที่เหมาะสมกับขนาดของชิ้นเนื้อ โดยวางลงบนแผ่นโลหะรูปสี่เหลี่ยม

3.4.2 เทพาราฟินเหลวซึ่งละลายไว้ลงไปใบบล็อกสี่เหลี่ยมที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ให้ปริมาณพอดีกับขอบบนของแท่งเหล็ก

3.4.3 ใช้ปากคีบ (forceps) ลงไฟให้ร้อนแล้วหยิบชิ้นเนื้อที่ผ่านการ infiltration ไว้แล้วใส่ ลงไปใบบล็อกโดยให้ด้านที่มีหน้าตัดเรียบอยู่ด้านล่างซึ่งจะเป็นหน้าบล็อก

3.4.4 ทิ้งบล็อกตัวอย่างขึ้นเนื้อไว้ให้เย็น โดยคอยกดขอบของพาราฟินที่เริ่มแข็งให้เรียบเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดรอยบุ๋มตรงกลาง ซึ่งจะทำให้อากาศเข้าได้ แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นเพื่อให้พาราฟินแข็งตัวเร็วขึ้น

3.4.5 เมื่อพาราฟินแข็งดีแล้ว จึงแกะบล็อกตัวอย่างขึ้นเนื้อออกจากแท่งเหล็ก แล้วเขียนชื่อเนื้อเยื่อใส่กระดาษติดไว้ที่บล็อก

4. การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

หลังจากได้บล็อกขึ้นเนื้อแล้ว จะต้องนำมาตัดด้วยเครื่องตัด (microtome) เพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อซึ่งมีวิธีการดังนี้

4.1 การตัดแต่งบล็อกเนื้อเยื่อ (Trimming)

เป็นการตัดเอาพาราฟินส่วนเกินที่อยู่รอบๆ ขึ้นเนื้อออกโดยใช้ใบมีดโกนหรือมีดบางๆ ตัดหน้าบล็อกให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เพราะทำให้การตัด section ง่ายขึ้น และได้ section เต็มหน้า โดยไม่มีพาราฟินมาคอยตั้งอยู่ทั้งสองด้าน และสะดวกต่อการแผ่ตัวอย่างขึ้นเนื้อบนผิว water bath อีกทั้งได้ section ที่มีลักษณะเป็นแถบต่อเนื่องกัน (ribbon) หลังจากตัดแต่งผิวหน้าบล็อกแล้ว นำบล็อกตัวอย่างขึ้นเนื้อไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 20-30 นาที เพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อเกาะตัวแน่น เมื่อตัดด้วยเครื่องตัด microtome แล้ว แผ่น section จะไม่ย่น

4.2 การยึดบล็อก (Facing)

นำบล็อกที่ผ่านการตัดแต่งและแช่เย็นจนแข็งดีแล้วมาใส่ในช่องสำหรับยึดบล็อกขึ้นเนื้อ (block holder) แล้วปรับหน้าตัดของบล็อกให้ด้านยาวขนานกับใบมีดของเครื่อง microtome แล้วจึงยึดบล็อกให้แน่นพอที่จะตัดด้วยเครื่องต่อไปได้

4.3 การตัดขึ้นเนื้อเป็นแผ่นบางๆ (Sectioning)

ตัดบล็อกขึ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร

4.4 การติด section บนกระจกสไลด์ (Picking up section)

เป็นการนำ section ที่ตัดได้ไปวางไว้บนแผ่นกระจกสไลด์ มีขั้นตอนดังนี้

4.4.1 ละลาย gelatin ใน water bath ความเข้มข้นของสารละลายประมาณ 0.5% สารละลาย gelatin จะช่วยให้ section ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ได้ดีขึ้น โดยปรับอุณหภูมิของน้ำประมาณ 43-45 องศาเซลเซียส ลอย section บนผิว water bath อุณหภูมิที่อุ่นจะช่วยให้ section ขยายตัวออกได้เต็มที่ ถ้า section ขยายตัวออกไม่เต็มที่ อาจใช้ฟู่กัน และ forceps ช่วยดึงยืดออกได้

4.4.2 นำกระจกสไลด์ที่สะอาด และเขียนเครื่องหมายไว้แล้วจุ่มลงในน้ำอุ่นเลื่อนกระจกสไลด์ไปแตะติด section โดยให้ด้านข้างของแผ่น section ติดกับผิวหน้าของกระจกสไลด์ จากนั้นค่อยเลื่อนกระจกสไลด์เฉียงเป็นมุม 45 องศา ขึ้นจากน้ำอุ่น แผ่น section จะเกาะติดกับ กระจกสไลด์ขึ้นมา และใช้ forceps ปรับ section ให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการ

4.5 การทำสไลด์เนื้อเยื่อให้แห้ง (Drying slide)

คือ การทำให้ section ที่ติดอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์แห้ง โดยปล่อยให้วางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือเป่าด้วยลมร้อน หลังจากที่ได้แผ่นสไลด์เนื้อเยื่อแล้ว ก่อนที่จะย้อมสี เนื้อเยื่อจะต้องนำแผ่นสไลด์ที่ได้ละลายเอาพาราฟินส่วนเกินออก โดยการนำสไลด์เนื้อเยื่อเข้าตู้อบอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นแล้วจึงนำไปย้อมสีตามที่ต้องการ

5. การย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ต้องอาศัยการย้อมสี เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการย้อมสีจะแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีการย้อมสีซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

5.1 การย้อมสีทั่วไป (Routine staining)

เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะ โครงสร้างต่างๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อและนับจำนวนของ islets of Langerhans โดยใช้ Mayer's hematoxylin eosin staining method (H&E) (Luna, 1968)

5.2 การย้อมสีพิเศษ (Special staining)

วิธีการย้อมสีพิเศษนี้ใช้เพื่อย้อมแสดงลักษณะจำเพาะเจาะจงของโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นได้ด้วยการย้อมสีแบบทั่วไป เทคนิคการย้อมสีพิเศษที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ

5.2.1 Gomori's chromium hematoxylin phloxine stain

(Chrome-alum hematoxylin stain) (Preece, 1959)

เพื่อย้อมแสดงลักษณะของ endocrine cell ต่างๆ ภายใน islets of Langerhans

5.2.2 Grimelius staining technique

เพื่อย้อมแสดง alpha cells ของ islets of Langerhans

(รายละเอียดของวิธีการย้อมแต่ละวิธี อธิบายในภาคผนวก)

6. เทคนิคการย้อมแสดง endocrine cell แต่ละชนิด

6.1 Beta cell

การย้อมแสดง beta cell สามารถกระทำได้โดยตรงจากเนื้อเยื่อที่ย้อมแสดงด้วยเทคนิค chrome-alum hematoxylin โดยที่เซลล์ชนิดนี้ติดสีน้ำเงิน (blue)

ผลการย้อม endocrine cell ของตับอ่อน ด้วยวิธี chrome-alum hematoxylin

beta cell - blue

alpha cell - red

delta cell - pink to red (แยกจาก alpha cell ไม่ชัดเจน)

6.2 Alpha cell และ Delta cell

การย้อมแสดงเซลล์ 2 ประเภทนี้ไม่สามารถกระทำได้โดยตรง ทันที จากเนื้อเยื่อที่ย้อมแสดงด้วยเทคนิค chrome-alum hematoxylin เนื่องจากเซลล์ทั้งสองประเภทนี้ต่างก็ให้ผลลัพธ์การย้อมเป็นสีแดง แม้จะมีผู้ที่พยายามอธิบายว่าสีเข้มต่างกัน (alpha cell ติดสีแดง, delta cell ติดสีชมพูถึงแดง) ก็ตาม แต่ก็ยากที่จะชี้ชัดลงไปได้ การย้อมเพื่อแยกเซลล์ 2 ประเภทนี้ จำเป็นต้องอาศัยคุณสมบัติการติดสีด้วยเทคนิค Grimelius ที่แตกต่างกันมาประกอบ ดังนี้

ตาราง 1 แสดงการเปรียบเทียบผลการย้อมของ alpha cell และ delta cell ระหว่างวิธี chrome - alum hematoxylin กับ Grimelius technique

เทคนิค	alpha cell	delta cell
Chrome-alum hematoxylin	แดง	ชมพูถึงแดง
Grimelius	ติดสี	ไม่ติดสี

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

นำบล็อกชิ้นเนื้อที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว จากส่วนต่างๆ ของตัวอ่อน คือ head, body, tail และ uncinata process มาทำการเลือกโดยวิธีสุ่มตัวอย่าง (random sampling) เลือกประมาณ 1 ใน 4 (25%) จากจำนวนบล็อกชิ้นเนื้อทั้งหมดในแต่ละบริเวณ จากนั้นจึงนำบล็อกที่สุ่มได้มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้เป็น serial sections แล้วนำไปย้อมสี ด้วยวิธี

- Mayer's hematoxylin eosin staining method
- Gomori's chromium hematoxylin phloxine stain
(Chrome – alum hematoxylin)
- Grimelius technique

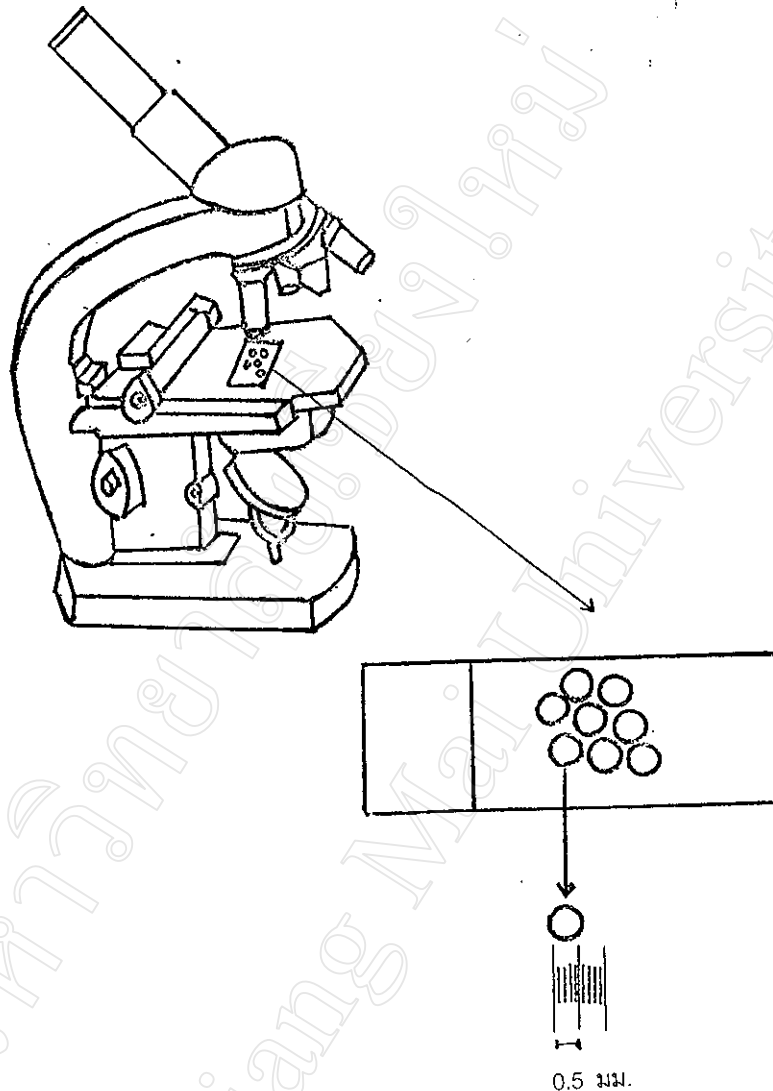
หลังจากได้สไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมสีตามต้องการแล้ว นำสไลด์มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป ดังนี้

1. ดูปริมาณและการกระจายของ islets of Langerhans ในบริเวณ head, body, tail และ uncinata process โดยใช้เทคนิคการย้อมสีทั่วไป (Mayer's hematoxylin eosin stain) โดยในหนึ่งบล็อกของชิ้นเนื้อ เลือกเตรียมสไลด์ 1 section เพื่อนับจำนวน islets โดยใช้ช่องนับจำนวน (counting chamber) ประดิษฐ์จากแผ่นกระดาษแข็งขนาดเท่ากับแผ่นสไลด์ บริเวณตรงกลางซึ่งตรงกับ section เนื้อเยื่อมีช่องเจาะขนาด 5 มิลลิเมตร อยู่จำนวน 8 ช่อง (รูปที่ 8)

วิธีการนับจำนวน islets of Langerhans

1. ติดแผ่นกระดาษช่องนับจำนวนลงบนแผ่น section เนื้อเยื่อ เหนือต่อแผ่น cover slip แล้วจึงวางชุดสไลด์นี้ลงบนแท่น (stage) ของกล้องจุลทรรศน์
2. สังเกตว่าเนื้อเยื่อภายในช่องใดปรากฏอยู่เต็มเนื้อที่ของช่องนับจำนวน เลือกสุ่มนับจำนวน islets of Langerhans จากบริเวณเหล่านั้น อย่างน้อย 2 ตำแหน่งของช่องนับจำนวน ถ้าในบริเวณที่สุ่มนับปรากฏ islets of Langerhans เพียงส่วนใดส่วนหนึ่งให้นับเป็น 1 islets

หลังจากนั้นจึงนำปริมาณเฉลี่ยของ islets of Langerhans ในแต่ละบริเวณคิดออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับจำนวนเฉลี่ยทั้งหมดของ islets of Langerhans ในทุกบริเวณ



รูป 8 แสดงลักษณะของช่องนับจำนวน (counting chamber)

2. ศึกษาลักษณะของ endocrine cell แต่ละประเภท (alpha, beta และ delta cells) รวมทั้งดูปริมาณและการกระจายของ endocrine cell แต่ละประเภท ใน islets of Langerhans โดยใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษ โดยในหนึ่งบล็อกของชิ้นเนื้อนำมาเตรียมสไลด์ 2 sections ที่ต่อเนื่องกัน ย้อมด้วย chrome-alum hematoxylin และ Grimelius technique โดยในแต่ละแผ่นของสไลด์จะสุ่มเลือกดูเซลล์ใน islets ที่ต่างกันอย่างน้อย 2 islets แล้วจึงนับจำนวน เซลล์แต่ละประเภทใน islets แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของ endocrine cell แต่ละประเภทคิดออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับจำนวนเฉลี่ยทั้งหมดของ endocrine cell ทุกประเภทที่ตรวจสอบ