

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นส่วนของท่อทางเดินอาหารสุนัข จำนวน 5 ราย โดยเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาจะต้องไม่มีพยาธิสภาพของท่อทางเดินอาหารเมื่อดูด้วย กล้องจุลทรรศน์ทั่วไป สุนัขที่ใช้ไม่กำหนด เพศ อายุ เนื่องจากท่อทางเดินอาหารมีลักษณะ เป็นท่อยาว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงเลือกส่วนของท่อทางเดินอาหารที่จะใช้ศึกษา โดยแบ่งเป็น 3 ส่วนตามการเติบโตในระยะเอมบริโอคือ กระเพาะอาหาร (stomach) เป็นตัวแทน foregut, ลำไส้เล็กส่วน jejunum เป็นตัวแทน midgut และ rectum เป็นตัวแทน hindgut

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ นำเอาชิ้นเนื้อจากส่วนต่างๆของท่อทางเดินอาหาร ที่จะใช้ ศึกษา มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ดังนี้

1. กระเพาะอาหาร (stomach)

นำกระเพาะอาหารมาแบ่งออกเป็นส่วน fundus, body และ pylorus โดยอาศัย ลักษณะทางกายวิภาค fundus คือส่วนของกระเพาะอาหารที่อยู่เหนือกว่ารอยต่อที่ หลอดอาหารเปิดเข้าสู่กระเพาะอาหาร pyloric part คือส่วนของกระเพาะอาหารที่ แยกจากส่วน body ที่บริเวณ angular notch ส่วนที่เหลือคือ body ตัดแต่ละส่วน ออกเป็นชิ้นเล็กๆตามแนวขวาง (cross sections) ขนาดประมาณ 2X10 มิลลิเมตร

2. ลำไส้เล็ก jejunum

ลำไส้เล็ก jejunum เป็นส่วนของลำไส้ที่อยู่ distal ต่อ duodenum โดยที่ duodenum สุนัขยาวประมาณ 5 เซนติเมตร การเก็บตัวอย่าง jejunum จึงกระทำโดยวัดจาก pyloric sphincter ไปทางลำไส้เป็นระยะทาง 20 เซนติเมตร ตัดส่วนของลำไส้ ออกเป็นวงตามแนวขวาง (cross sections) หนาประมาณ 4 มิลลิเมตร

3. rectum

rectum เป็นส่วนปลายของท่อทางเดินอาหาร โดยตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่อยู่เหนือต่อ anal sinuses เป็นวงตามแนวขวาง (cross sections) หนาประมาณ 4 มิลลิเมตร

นำชิ้นเนื้อที่ตัดไว้ใช้ศึกษาทั้งหมดไปทำการตรึงสภาพ (fixation)

การเตรียมเนื้อเยื่อพาราฟินเล็คชัน

การตรึงสภาพ (fixation)

นำชิ้นเนื้อที่ตัดไว้ มาตรึงสภาพด้วยน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) การศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำยาตรึงสภาพคือ สารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แช่เนื้อเยื่อในน้ำยานาน 24 ชั่วโมง การแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยาตรึงสภาพเพื่อ

1. ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเปื่อยและ autolysis
2. ป้องกันเนื้อเยื่อที่อ่อนเกิดการแข็งตัว
3. รักษาสภาพของเซลล์ให้เหมือนกับตอนที่มันมีชีวิตมากที่สุด
4. ให้ส่วนที่เป็นของแข็งกึ่งเหลวในเซลล์คงสภาพเป็นแบบนั้น
5. ช่วยให้เห็นความแตกต่างของโครงสร้าง โดยใช้สีธรรมชาติ และสารเคมี

การกำจัดน้ำยาตรึงสภาพและน้ำ (dehydration)

เป็นการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพไว้ โดยการนำชิ้นเนื้อออกจากน้ำยาตรึงสภาพ ไปใส่ในแอลกอฮอล์ ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (graduated strenghts of ethyl alcohol) แอลกอฮอล์จะทำหน้าที่เป็นตัวดูดน้ำ (dehydrants) ช่วยสกัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งและเปราะ มีวิธีการทำดังนี้

<u>วันที่ 1</u>	ethyl alcohol	50 %	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกครึ่งชั่วโมง
	ethyl alcohol	70 %	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกครึ่งชั่วโมง
	ethyl alcohol	80 %	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุก 1 ชั่วโมง
	ethyl alcohol	90 %	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุก 1 ชั่วโมง
	ethyl alcohol	95 %	ทิ้งไว้ค้างคืน	
<u>วันที่ 2</u>	ethyl alcohol	95 %	นาน 1 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุกครึ่งชั่วโมง
	ethyl alcohol	100 % (absolute alcohol)	นาน 2 ชั่วโมง	เปลี่ยนน้ำยาทุก 1 ชั่วโมง

การนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่ dehydrants (clearing)

วิธีการ embed โดยใช้พาราฟิน สารละลายที่ใช้ในการ clearing ต้องเป็นสารที่ทำละลายพาราฟินได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้ Xylene ทำหน้าที่เป็น clearing agent แทรกซึมเข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ในชิ้นเนื้อ และเป็นตัวกลางให้ embedding media ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดี วิธีการโดยแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยา Xylene 2 ครั้ง นาน ครั้งละ 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกชั่วโมง

การนำ embedding media เข้าแทนที่ clearing agent (infiltration)

เป็นวิธีการช่วยให้ชิ้นเนื้อคงรูปอยู่ได้ ไม่ให้ถูกกดหรือผิดรูปไป ขณะที่ตัดบล็อกชิ้นเนื้อ วิธีการโดยการใช้ wax ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง Xylene กับพาราฟิน ในอัตราส่วนต่างๆกันดังนี้

wax I เป็นส่วนผสมระหว่าง Xylene : paraffin อัตราส่วน 1:1 นาน 30 นาที

wax II เป็นส่วนผสมระหว่าง Xylene : paraffin อัตราส่วน 1:2 นาน 30 นาที

wax III เป็น paraffin บริสุทธิ์ นาน 30 นาที

การปฏิบัติขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส โดย Xylene จะเป็นตัวนำให้ พาราฟินเหลวแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์และ โครงสร้างภายในเซลล์

การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (embedding)

การทำ embed ด้วยพาราฟิน มีวิธีการดังนี้

1. นำพาราฟินใส่บีกเกอร์ นำไปละลายในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส
2. นำแท่งเหล็กรูปตัว L 2 อัน มาประกบกันให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม ความกว้างตามขนาดที่ต้องการ วางลงบนแผ่นเหล็กรูปสี่เหลี่ยม
3. เทพาราฟินเหลวที่เตรียมไว้ เทลงไปในบล็อกสี่เหลี่ยม ให้ปริมาณพอดีกับขอบบนของบล็อก
4. ใช้ปากคีบสนไฟ แล้วหยิบชิ้นเนื้อที่แช่ใน wax III วางลงไปกึ่งกลางบล็อกที่มีพาราฟินอยู่ โดยให้ด้านเรียบของชิ้นเนื้ออยู่ด้านล่าง ซึ่งจะเป็นหน้าบล็อกที่ใช้สำหรับตัด
5. ทิ้งบล็อกไว้ให้เย็น และขณะรอให้เย็น ควรกดขอบบล็อกที่พาราฟินเริ่มแข็งตัว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเป็นรูบุ๋มลงไปบนบล็อก
6. ทำเครื่องหมาย หรือเขียนชื่อของชิ้นเนื้อลงบนกระดาษ นำไปติดที่บล็อก เพื่อที่จะได้ทราบว่าเป็นบล็อกของชิ้นเนื้ออะไร อวัยวะส่วนไหน

สรุปขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อพาราฟินสไลด์

<u>วันที่ 1</u>	10% buffered formalin	24 ชั่วโมง	fixation
<u>วันที่ 2</u>	50% ethyl alcohol	30 นาที	dehydration
	50% ethyl alcohol	30 นาที	
	70% ethyl alcohol	30 นาที	
	70% ethyl alcohol	30 นาที	
	80% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	80% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	90% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	90% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	95% ethyl alcohol	ทิ้งค้างคืน	
<u>วันที่ 3</u>	95% ethyl alcohol	30 นาที	clearing
	95% ethyl alcohol	30 นาที	
	100% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	100% ethyl alcohol	1 ชั่วโมง	
	Xylene	1 ชั่วโมง	clearing
	Xylene	1 ชั่วโมง	
	Wax I	30 นาที	infiltration
	Wax II	30 นาที	
	Wax III	30 นาที	

↓
Embedding

การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

หลังจากที่ได้บล็อกชิ้นเนื้อแล้ว จะต้องนำบล็อกมาตัดเพื่อทำเป็นสไลด์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. นำบล็อกที่มีชิ้นเนื้ออยู่ข้างใน มาตัดเอาพาราฟินส่วนเกินบริเวณรอบๆออก นำบล็อกไปแช่ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้บล็อกพาราฟินมีความแข็งพอที่จะไม่ยุ่ยหรือเกิดการย่นเวลาตัดด้วยเครื่องตัด
2. นำหม้อน้ำอุ่น (water bath) ใส่น้ำและโรยด้วยผงเจลาตินให้ทั่วผิวน้ำ รอจนกระทั่งให้น้ำอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียส เจลาตินจะเป็นตัวทำให้ section เกิดการติดตัว ติดแน่นกับแผ่นสไลด์ และไม่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการเหี่ยวยุ่น
3. นำบล็อกที่แช่เย็นไว้มาตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร จะได้แผ่นเนื้อเยื่อบางๆ (sections) เรียงติดต่อกันเป็นแถว (ribbons)
4. นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ ไปลอยในหม้อน้ำอุ่นที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้แผ่นเนื้อเยื่อมีรอยพับหรือเหี่ยวยุ่น เอาแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ จุ่มลงไปให้แผ่นเนื้อเยื่อแนบติดกับแผ่นสไลด์ จัดให้เนื้อเยื่ออยู่ตรงกลางแผ่นสไลด์
5. นำแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ ไปแช่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดพาราฟินส่วนเกินที่อยู่รอบๆเนื้อเยื่อ หลังจากนั้น นำสไลด์ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปย้อมสีตามที่ต้องการ

การย้อมสีเนื้อเยื่อ (tissue staining)

การย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงให้เห็นโครงสร้างต่างๆ ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ ส่วนจะย้อมด้วยวิธีใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าต้องการจะศึกษาอะไรจากเนื้อเยื่อนั้น การศึกษาครั้งนี้ใช้การย้อมสีดังนี้

1. การย้อมสีทั่วไป (routine stain) ใช้วิธีการย้อม hematoxylin และ eosin ตามเทคนิคของ Luna (1968) เพื่อแสดงลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์ และใช้แยกแยะให้เห็นความแตกต่างทางจุลกายวิภาคแต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหาร
2. การย้อมสีพิเศษ (special stain) วิธีการย้อมพิเศษ ใช้เพื่อย้อมแสดงลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเซลล์ ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนได้ด้วยวิธีการย้อมสีทั่วไป การศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 วิธีคือ

2.1 Churukian - Schenk method for argyrophil granules การย้อมวิธีนี้ ย้อมพิเศษสำหรับ argyrophil cells โดยเซลล์พวกนี้เมื่อย้อมและจะแสดงลักษณะ

Argyrophil granules ติดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ

Nuclei and cytoplasm ติดสีชมพูถึงแดง

- 2.2 Fontana - Masson method for argentaffin granules การย้อมวิธีนี้ ย้อมพิเศษสำหรับ argentaffin cells เมื่อย้อมแล้วจะแสดงลักษณะ
- Argentaffin granules ติดสีดำ
- Nuclei and cytoplasm ติดสีชมพูถึงแดง
- (รายละเอียดเกี่ยวกับการย้อมแต่ละวิธี อธิบายในภาคผนวก)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

หลังจากย้อมสไลด์เนื้อเยื่อแล้ว นำสไลด์มาทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทั่วไป (light microscopy) เพื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของ argentaffin cells และ argyrophil cells ที่อยู่บริเวณเดียวกัน ในแต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหาร โดยทำการศึกษาดังนี้

1. นับจำนวน argentaffin cells และ argyrophil cells ที่พบในแต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหารสุนัข
2. ตรวจสอบการกระจายตัวของ argentaffin cells และ/หรือ argyrophil cells ภายในท่อทางเดินอาหาร ว่าอยู่ในชั้นใดบ้าง นอกเหนือจากที่พบใน epithelium และต่อมต่างๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำบล็อกเนื้อเยื่อที่เป็นตัวแทนของท่อทางเดินอาหาร มาทำการชุ่มตัวอย่าง (random sampling) จำนวนครึ่งหนึ่งของบล็อกเนื้อเยื่อทั้งหมดของแต่ละส่วนคือ กระเพาะอาหาร, ลำไส้เล็กส่วน jejunum และ rectum จากนั้นนำบล็อกที่เลือกไว้มาตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้เป็น serial sections และนำไปย้อมด้วยวิธีการย้อมตามที่ต้องการ นำสไลด์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป (light microscopy) วิธีการโดยสุ่มหยิบ section ที่ย้อมแต่ละวิธีมานับจำนวน argentaffin cells และ argyrophil cells โดยแต่ละแผ่นสไลด์ที่เลือกมา จะสุ่มบริเวณที่จะนับประมาณ 2-4 บริเวณที่แตกต่างกัน และใช้กำลังขยายขนาด 40 เท่า นับเซลล์ที่ต้องการเปรียบเทียบกับเซลล์หลักของแต่ละส่วนทางเดินอาหารเช่น ในกระเพาะอาหารนับเทียบกับเซลล์อื่นๆที่อยู่ในต่อมเดียวกันหรือ ลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ลำไส้ตรง จะนับเทียบกับเซลล์ที่บออยู่ภายใน crypt หรือต่อมเดียวกันกับที่พบเซลล์ทั้งสองชนิด จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ต้องการที่พบในแต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหารเปรียบเทียบกับเซลล์ข้างเคียงจำนวน 1,000 เซลล์ นำข้อมูลที่ได้ไปคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกันในแต่ละส่วน