วิธีดำเนินการวิจัย

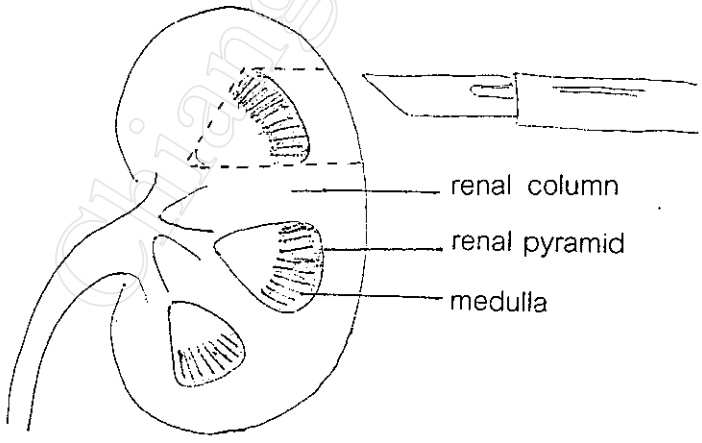
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้จากไตมนุษย์วัยผู้ใหญ่ จำนวน 12 ร่าง ไม่จำกัดเพศ อายุประมาณ 20-40 ปี หลังการเสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นไตซ้ายและขวาอย่างละ 10 ข้าง และไม่มีประวัติการเจ็บป่วยและพยาธิสภาพของไตเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

วิธีการวิจัย

1. **การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ**_(Tissue preparation)

นำไตข้างที่สมบูรณ์มาผ่าแบ่งครึ่งเป็น 2 ส่วนตามแนวยาวขนานกับผิวไต (coronal section) แล้วนำมาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยตัดตามแนวยาวตั้งแต่บริเวณ cortex ซึ่งมีสีเข้ม ตัดผ่านเนื้อส่วน medulla ซึ่งมีสีอ่อนกว่าจนถึงส่วนยอดของ renal pyramid (รูปที่ 6) ชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ส่วนความกว้างและความยาวของชิ้นเนื้อขึ้นอยู่กับขนาดของ renal pyramid ของแต่ละไต แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปตรึงสภาพเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาตรึงสภาพ (fixative)



รูป 6 แสดงการตัดชิ้นเนื้อไต

2. **การตรึงสภาพเนื้อเยื่อ**_(fixation)

นำชิ้นเนื้อมาแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเน่าเปื่อย และช่วยรักษารูปร่างและโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อให้มีสภาพเหมือนตอนมีชีวิตมากที่สุด และน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ buffered neutral formalin ความเข้มข้น 10% (Prophet et al.,1992) เนื่องจากมีความสามารถในการกำซาบ (penetrate) เร็ว ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งเกินไป แม้จะแช่ในน้ำยานาน และสามารถนำเนื้อเยื่อที่ตรึงสภาพแล้วไปย้อมสีได้หลายวิธี โดยแช่ในน้ำยานานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ

3. **การเตรียมเนื้อเยื่อ**_(processing of tissue)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงสภาพมาผ่านขั้นตอน dehydration clearing infiltration และ embeddeding ตามลำดับ เพื่อให้ได้บล็อคชิ้นเนื้อเพื่อนำไปผ่านขั้นตอนการตัดให้ได้เป็นแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับนำไปย้อมสีต่อไป ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้คือ

3.1 **การกำจัดน้ำยาตรึงสภาพและน้ำ** (dehydration)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงสภาพแล้วมากำจัดน้ำและน้ำยาตรึงสภาพ ด้วยการแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นตามลำดับดังนี้

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

3.2 **การนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่** dehydrants (Clearing)

เป็นการทำให้เนื้อเยื่อใส ซึ่งสารที่นิยมใช้ในการ clearing คือ Xylene (xylol) โดยนำชิ้นเนื้อที่ผ่านขบวนการ dyhydration แล้ว ไปแช่ใน Xylene ซึ่งเป็นสารเคมีที่จะเข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ และเป็นตัวกลางในการนำ paraffin ซึ่งเป็น embedding media ให้แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี โดยเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 ชั่วโมง

3.3 **การนำ embedding media เข้าแทนที่ clearing agent (Infiltration)**

เป็นวิธีการช่วยให้ชิ้นเนื้อคงรูปอยู่ได้ ไม่ให้เนื้อเยื่อถูกกดหรือผิดรูปไปขณะตัดบล็อกชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome โดยการใช้ wax ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง xylene กับ paraffin ในอัตราส่วนต่างๆ โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการ clearing แล้วไปผ่านขั้นตอนตามลำดับดังนี้

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

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

Wax 3 เป็น paraffin บริสุทธิ์ นาน 30 นาที

ขั้นตอนทั้งสามนี้ต้องทำในตู้อบ อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส โดย xylene จะเป็นตัวนำเอา paraffin เหลวเข้าในแทรกระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อ เมื่อ paraffin แข็งตัวจะเป็นพยุงเนื้อเยื่อไว้ขณะถูกตัดด้วยเครื่อง microtrome

3.2 **การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ** (Embedding)

เป็นการนำเนื้อเยื่อใส่ใน paraffin ที่ละลายแล้ว เมื่อ paraffin แข็งตัวจะช่วยป้องกันโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อไว้ขณะถูกตัดด้วยเครื่อง microtrome ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ paraffin ซึ่งเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นในการ embedding ต้องละลาย paraffin ในตู้อบอุณหภูมิ 56-58 องศาเซลเซียส เมื่อ paraffin เป็นของเหลวแล้วจะสามารถกำซาบเข้าไปในเนื้อเยื่อได้

วิธีการ

1. ใช้แท่งเหล็กรูปตัว L 2 อัน ประกอบเป็นรูปสี่เหลี่ยมให้ได้ขนาดที่เหมาะสมกับขนาดของเนื้อเยื่อ วางบนแผ่นโลหะรูปสี่เหลี่ยม
2. เท paraffin ที่ละลายแล้วลงในบล็อกหรือแท่งเหล็กที่เตรียมไว้ในข้อ 1
3. นำ forcep ไปลนไฟให้ร้อน แล้วคีบเนื้อเยื่อที่ infilltrate ไว้แล้วใส่ในบล็อกโดยให้ด้านเรียบของเนื้อเยื่ออยู่ด้านล่าง ซึ่งเป็นหน้าบล็อก
4. ทิ้งไว้ให้เย็น โดยคอยกดขอบของ paraffin ที่เริ่มแข็งให้เรียบ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดรอยบุ๋มตรงกลาง ซึ่งจะทำให้อากาศเข้าได้ แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นเพื่อให้ paraffin แข็งตัวเร็วขึ้น
5. เมื่อแข็งตัวดีแล้วจึงแกะบล็อกออกจากแท่งเหล็ก แล้วเขียนชื่อเนื้อเยื่อใส่กระดาษติดที่บล็อกไว้

ถ้ามีฟองอากาศอยู่หน้าบล็อก ต้องนำบล็อกไปละลายใน wax 3 ในตู้อบอีกครั้งเพื่อ embed ใหม่

3.5 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

3.5.1 การตัดบล็อกเนื้อเยื่อ

1. นำบล็อกเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว มาตัดเอา paraffin ส่วนเกินบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อออก นำบล็อกไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสนานประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้บล็อกเนื้อเยื่อมีความแข็งพองง่ายต่อการตัดและไม่ทำให้แถบของเนื้อเยื่อย่นเวลาตัดด้วยเครื่อง microtome
2. นำบล็อกที่แช่เย็นแล้ว มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร สำหรับการย้อมสีทั่วไป และการย้อมสีพิเศษส่วนการย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโน ตัดแผ่นเนื้อเยื่อหนาประมาณ 3 ไมโครเมตร จะได้แผ่นเนื้อเยื่อบางๆ เรียงต่อกันเป็นแถว (ribbons)
3. นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ไปติดกับสไลด์ต่อไป

3.5.2 การติดแผ่นเนื้อเยื่อกับสไลด์

1. ละลาย gelatin ใน water bath โดยใช้ความร้อนช่วย จน gelatin ละลายหมด แล้ววัดอุณหภูมิของน้ำให้ได้ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส แล้งจึงนำเอาแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดไว้มาลอยใน water bath ทิ้งไว้สักครู่ ถ้าแผ่นเนื้อเยื่อย่น ให้ใช้ forcep ดึงแผ่นเนื้อเยื่อส่วนที่ย่นให้ขยายออกจนไม่มีรอยย่น
2. นำ slide ที่สะอาด และเขียนเครื่องหมายไว้แล้ว ช้อนเอาแผ่นเนื้อเยื่อขึ้นมาติดกับสไลด์ ใช้ forcep ปรับชิ้นเนื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการบนสไลด์
3. นำสไลด์ที่ติดแผ่นเนื้อเยื่อเรียบร้อยแล้ว ใส่ไว้ใน rack แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อ paraffin ส่วนเกินละลายออก แล้วนำออกมาจากตู้อบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเพื่อนำไปย้อมตามที่ต้องการต่อไป

3.6 **การย้อมสีเนื้อเยื่อ** (Tissue staining)

การย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงให้เห็นโครงสร้างต่างๆ ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ ซึ่งการย้อมสีเนื้อเยื่อมีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการย้อมสีว่าต้องการศึกษาอะไรจากเนื้อเยื่อนั้น การย้อมสีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีดังนี้

3.6.1 **การย้อมสีทั่วไป** (Routine staining)

ใช้วิธี Mayer's hematoxylin and eosin (H&E) อ้างอิงตาม Luna (1986) เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อ

3.6.2 **การย้อมสีพิเศษ** (Special staining)

การย้อมสีพิเศษนี้ เพื่อแสดงลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของเซลล์ได้ชัดเจนด้วยการย้อมสีทั่วไป การศึกษาครั้งนี้ใช้การย้อมสีพิเศษ 2 วิธี คือ

Masson Trichrome Stain (MSB)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) ย้อมเพื่อแสดง IC โดย

- cytoplasm	ย้อมติดสีแดง
- connective tissue	ย้อมติดสีฟ้าหรือน้ำเงิน
- nuclei	ย้อมติดสีดำ

Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS)

การย้อมสีวิธีนี้อ้างอิงตาม Luna (1986) เพื่อย้อมแสดง IC โดย

- mucosubstance	ย้อมติดม่วงหรือม่วงแดง
- nuclei	ย้อมติดสีดำ
- cytoplasm	ย้อมไม่ติดสีใดเลย

3.6.3 **การย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโน** (Immunohistochemical staining)

เป็นการศึกษาส่วนประกอบของเนื้อเยื่อโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) ที่ต้องการศึกษา (Mao et al., 1994) โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ human Epithelial

Membrane Antigen (EMA), clone E29 (DAKO M613) ย้อมเพื่อแสดงเซลล์บุท่อภายใน collecting duct

สำหรับการย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโน (Immunohistochemistry) นั้น นำสไลด์ที่อบแห้งแล้วไปละลายพาราฟินออกด้วย xylene แล้วนำไปผ่านยัง alcohol เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากสูงไปต่ำ แล้วแช่ในน้ำและ buffer ไม่ควรปล่อยให้สไลด์แห้ง และเนื่องจากการตรึงสภาพชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาตรึงสภาพต่างๆ เช่น ฟอร์มาลิน ทำให้แอนติเจนหลายตัวถูกบดบัง (mask) ไว้ด้วยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำยาตรึงสภาพกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ ดังนั้นก่อนการย้อมจำเป็นต้องทำให้แอนติเจนที่ถูกบดบังนั้นเปิดออก (unmask) สารที่ใช้คือ เอนไซม์ต่างๆ เช่น trypsin protease การเลือกใช้เอนไซม์ชนิดใด ความเข้มข้นเท่าใด ใช้เวลาย่อยนานเท่าไร ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนที่ต้องการหา ชนิดของน้ำยาตรึงสภาพ และระยะเวลาในการตรึงสภาพชิ้นเนื้อ

1) Primary antibody

ความเข้มข้นของ primary antibody ที่ใช้งานขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนและความไวของเทคนิคที่ใช้ย้อม ไม่สามารถกำหนดเป็นมาตราฐานตายตัวไปว่าแอนติบอดีชนิดหนึ่งๆ จะใช้ dilution เท่าใดจึงจะเหมาะสมที่สุด

dilution buffer ที่ใช้ในการเจือจางแอนติบอดีต่างๆ อาจใช้ 0.05M Tris-HCl pH 7.6 หรือ 0.01M Phosphate buffer Saline pH 7.2-7.4 ส่วน washing buffer ที่ใช้ได้แก่ PBS หรือ Tris HCl ในอัตราส่วน 1 : 10

ก่อนหยด primary antibody ควรเช็ด buffer ที่ค้างบนสไลด์ออกเพื่อป้องกันมิให้ไปเจือจาง antibody ตัวต่อไป และระวังอย่าให้สไลด์แห้ง วางสไลด์ตามแนวนอนในกล่องเก็บความชื้น (Humidity chamber) หยด primary antibody ให้มีปริมาณเพียงพอท่วมเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น)

2) การแปลผล (Detection)

การแปลผลใช้วิธี Streptavidin-Biotin method ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีความไวสูง เป็นที่นิยมมาก หลักการคือ ใช้ Avidin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากไข่ขาว หรือ Streptavidin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรียชนิดหนึ่ง คือ Streptomyces avidinii และ biotin ซึ่งเป็นวิตามินชนิดหนึ่ง ทั้ง Streptavidin และ avidin มีความสามารถในการจับกับ biotin ได้ถึง 4 โมเลกุล แต่ Streptavidin จะไม่มีส่วนของ glycoprotein จึงทำให้เกิด blackground staining ได้น้อยกว่า avidin วิธีที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ

- Avidin-Biotin Complex (ABC) method

ใช้ biotinylated secondary antibody เป็นตัวเชื่อมระหว่าง primary antibody และ complex ของ avidin-biotin-enzyme

- Labelled streptavidin (avidin) – Biotin Technique

ใช้ Biotinylated secondary antibody เป็นตัวเชื่อมระหว่าง primary antibody และ enzyme conjugated streptavidin (abidin)

ทั้งสองวิธีนี้มีความไวสูง สามารถใช้กับ primary antibody ที่เจือจางได้สูง และรอเวลาการ incubate secondary antibody ให้น้อยลง และ enzyme conjugated strepavidin (avidin) ยังสามารถเก็บไว้ในรูปของสารละลายเจือจางได้นาน 2-3 เดือน แต่ ABC complex จะต้องเตรียมใหม่ก่อนที่จะใช้

3) Mounting media

การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของ chromogen ว่าละลายใน alcohol หรือไม่

- สำหรับ chromogen ที่ละลายใน alcohol จะต้องใช้ aqueous base medium เช่น glycerol gelatin

- สำหรับ chromogen ที่ไม่ละลายใน alcohol จะใช้ solvent base medium เช่น permount

(รายละเอียดเกี่ยวกับการย้อมแต่ละวิธี อธิบายในภาคผนวก)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

นำบล็อกเนื้อเยื่อที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว มาทำการสุ่มตัวอย่าง (random sampling) จำนวน 5 บล็อก จากนั้นนำบล็อกที่สุ่มได้มาตัดด้วยเครื่อง microtrome ให้เป็น serial sections แล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี

1. Mayer 's Hematoxylin and Eosin (H&E)
2. Masson Trichrome (MSB)
3. Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS)

นำบล็อกเดียวกันมาตัดให้เป็น serial sections และย้อมด้วย Immunohistochemistry ด้วย antibody ต่อ human Epithelial Membrane Antigen (EMA) แล้วนำสไลด์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) Olympus Model CHS โดยสุ่มหยิบสไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี Masson Trichrome มานับจำนวน Intercalated cell และ Principal cell ใน collecting ducts จาก 3 บริเวณ คือ

1. Cortical Collecting Ducts (CCD)
2. Outer Medullary Collecting Ducts (OMCD) แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
   - outer stripe (OSOMCD)
   - inner stripe (ISOMCD)
3. Inner Medullary Collecting Ducts (IMCD)

การนับจำนวนเซลล์ในแต่ละบริเวณ ใช้วิธีสุ่มนับเซลล์ที่กำลังขยายขนาด 40 เท่าโดยนับจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิดให้ได้เซลล์รวมเป็นจำนวน 1,000 เซลล์ในแต่ละบริเวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของ intercalated cell และ principal cell ในแต่ละส่วนของ collecting duct