วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้คือ ท่อนำไข่และเยื่อบุโพรงมดลูกของมนุษย์ที่ได้มาจาก

1. ผู้เสียชีวิต ที่จำเป็นต้องทำการผ่าศพพิสูจน์ (autopsy) ที่ภาควิชานิติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเอาท่อนำไข่ และมดลูกออก ซึ่งได้จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขั้นตอนการวิจัย

<u>การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ</u>

1. ท่อนำไข่

หลังจากผ่าตัดนำมดลูก และท่อนำไข่ออกจากผู้เสียชีวิต หรือผู้ป่วยแล้ว นำท่อนำไข่มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยตัดตามขวาง (cross-section) หนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร โดยตัดออกมาจากส่วน infundibulum บริเวณถัดจาก fimbriae, กึ่งกลางของส่วน ampulla (mid-ampulla), กึ่งกลางของส่วน isthmus (mid-isthmus) และ ส่วน intramural ถัดจาก uro-tubal junction เล็กน้อย แล้วนำชิ้นเนื้อไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (fixative) ท่อนำไข่ที่นำมาใช้ศึกษา จะต้องไม่มีพยาธิสภาพของท่อนำไข่ เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. มดลูก

ส่วนของมดลูกที่นำมาใช้ในการวิจัย คือ ชั้นเยื่อบุโพรงมดลูก (endometrium) เพื่อนำมาใช้บอกถึงระยะของรอบประจำเดือน (menstrual cycle) เลือกตัดเยื่อบุโพรงมดลูก ในบริเวณ body ถัดจากส่วน fundus ลงมาเล็กน้อย นำไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ

<u>การตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (Fixation)</u>

การตรึงสภาพชิ้นเนื้อ เพื่อช่วยรักษาโครงสร้างตลอดจนรูปร่างลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ น้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (fixative) ที่ใช้ใน

การวิจัยครั้งนี้ คือ น้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ นำชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วมาแช่ในน้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

การเตรียมเนื้อเยื่อพาราฟินเส็คชั่น

หลังจากที่ผ่านการตรึงสภาพชิ้นเนื้อแล้ว จะต้องนำชิ้นเนื้อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ก่อนที่จะได้เป็นแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับนำไปย้อมสี เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคต่อไป ขั้นตอนดังกล่าว คือ

1. การกำจัดน้ำยาตรึงสภาพและน้ำ (dehydration)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงสภาพแล้วไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่มีระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับดังนี้ 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% แอลกอฮอล์จะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับน้ำ (dehydrants) ช่วยกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งและเปราะ

2. การนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่ dehydrants (Clearing)

หลังจากกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์แล้ว นำชิ้นเนื้อไปแช่ในน้ำยา xylene ซึ่งทำหน้าที่เป็น clearing agent เข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ และเป็นตัวกลางในการนำ embedding media ให้แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี

3. การนำ embedding media เข้าแทนที่ clearing agent (Infiltration)

ขั้นตอนนี้จะเป็นการนำพาราฟิน (paraffin) ซึ่งเป็น embedding media เข้าสู่ชิ้นเนื้อเพื่อแทนที่ xylene โดยการนำชิ้นเนื้อไปแช่ในส่วนผสมระหว่าง xylene และ paraffin ในอัตราส่วนต่างๆ กัน คือ xylene : paraffin = 2 : 1, 1 : 1 และ paraffin อย่างเดียวตามลำดับ ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส พาราฟินจะช่วยทำให้เซลล์ และเนื้อเยื่อ ตลอดจนโครงสร้างภายในของเซลล์ และเนื้อเยื่อคงรูปและแข็งพอที่จะนำไปตัดเป็นแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อได้

4. การเตรียมบล็อกตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Embedding)

เป็นขั้นตอนสุดท้ายของกรรมวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการ infiltration แล้ว ไปวางในแม่พิมพ์ที่มีพาราฟินเหลวอยู่ โดยวางชิ้นเนื้อด้านที่ต้องการจะตัดลงด้านล่าง ทิ้งไว้ให้พาราฟินแข็งตัว แล้วแกะแม่พิมพ์ออก จะได้บล็อกที่มีชิ้นเนื้ออยู่ตรงกลางสำหรับนำไปตัดเพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อต่อไป

การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ (Tissue slides preparation)

นำบล็อกที่มีตัวอย่างชิ้นเนื้ออยู่มาตัด ให้มีความหนาประมาณ 6 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องตัด (microtome) จะได้เป็นแผ่นเนื้อเยื่อบางๆ ต่อเนื่องกัน จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อ (section) ที่ตัดได้นี้ไปวางลงบนแผ่นสไลด์ โดยนำ section ไปลอยในหม้อน้ำอุ่น (water bath หรือ floating bath) ที่มีเจลาติน (gelatin) ผสมอยู่ 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับอุณหภูมิของน้ำประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำแผ่นสไลด์จุ่มลงไปให้ แผ่นเนื้อเยื่อแนบติดกับแผ่นสไลด์ หลังจากนั้นจึงนำแผ่นสไลด์ที่ติดเรียบร้อยแล้วไปอบในตู้อบนานประมาณ 45 นาที เพื่อกำจัดพาราฟินที่อยู่รอบๆ ชิ้นเนื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จะได้สไลด์เนื้อเยื่อที่พร้อมสำหรับการนำไปใช้ย้อมสีเพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

การย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ต้องอาศัยการย้อมสี เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการย้อมสีจะแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีการย้อมสีซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ ๆ คือ

1. การย้อมสีทั่วไป (routine stain)

เทคนิคที่ใช้ย้อมคือ การย้อมด้วย Meyer' s hematoxylin และ eosin (Luna, 1968) การย้อมวิธีนี้ใช้ย้อมเพื่อแสดงให้เห็นลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะนิวเคลียสและซัยโตปลาสซัม

2. การย้อมสีแบบพิเศษ (special stain)

วิธีการย้อมสีพิเศษนี้ จะใช้ในกรณีที่ต้องการย้อมเพื่อแสดงลักษณะจำเพาะเจาะจงของโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นได้ด้วยการย้อมสีแบบทั่วไป เทคนิคการย้อมสีพิเศษที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ

2.1 Periodic Acid Schiff stain (PAS) (Luna, 1968) ใช้ย้อมเพื่อแสดงสารประกอบภายใน epithelial cells ของท่อนำไข่ ได้แก่ ย้อมแสดงกลัยโคเจน (glycogen) ใน epithelial cells และแสดง secretory granules ใน secretory cells

2.2 Gomori's one step trichrome stain (Luna, 1968) ใช้ย้อมเพื่อแสดงกล้ามเนื้อเรียบ และ collagen เพื่อนำมาเปรียบเทียบความหนาของชั้นกล้ามเนื้อเรียบในส่วนต่าง ๆ ของท่อนำไข่

รายละเอียดเกี่ยวกับสารเคมีและขั้นตอนการย้อม แสดงในภาคผนวก ก

<u>การเก็บรวบรวมข้อมูล</u>

หลังจากย้อมสีสไลด์เนื้อเยื่อแล้ว นำสไลด์เนื้อเยื่อมาทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคในแต่ละส่วนของท่อนำไข่และเปรียบเทียบความแตกต่างของท่อนำไข่ในระหว่างระยะก่อนและหลังตกไข่ (proliferative and secretory phase) โดยทำการศึกษาในชั้นต่าง ๆ ดังนี้

1. ชั้น mucosa

1.1 ศึกษาชนิดของ epithelial cells

1.2 นับจำนวน epithelial cells แต่ละชนิด ในแต่ละส่วนของท่อนำไข่ โดยจะนับ 1,000 เซลล์ ต่อ 1 section ในส่วน infundibulum, ampulla และ isthmus ส่วนใน isthmus และ intramural ที่มีจำนวนเซลล์ไม่ถึง 1,000 เซลล์ จะใช้วิธีนับทุกเซลล์ ในหนึ่งบล็อกชิ้นเนื้อจะทำการนับจาก 2 sections ใช้วิธีสุ่มเลือกบริเวณที่จะนับ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและคิดออกมาในรูปของเปอร์เซนต์

1.3 วัดความสูงของ epithelial cells โดยใช้ ocular micrometer วัดที่กำลังขยาย 400 เท่า วัด 4 ครั้งต่อ 1 section แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (วิธีการวัดโดยละเอียด แสดงในภาคผนวก ข)

1.4 ศึกษาลักษณะรูปแบบของ mucosal fold

2. ชั้น muscularis

2.1 เปรียบเทียบความหนาของชั้น muscularis

2.2 ศึกษาการจัดเรียงตัวของใยกล้ามเนื้อ