บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง ทำการทดลองในหนูแรท (Rats) พันธุ์ Wistar strains เพศผู้ที่โตเต็มที่แล้ว น้ำหนักประมาณ 250-350 กรัม ซึ่งเป็นหนูแรทจากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตนครปฐม หลังจากนำหนูมาจากศาลายาแล้วนำมาเลี้ยงโดยให้หนูแรททั้งหมดได้รับอาหารสำเร็จรูป(pellet diet) โดยมีส่วนประกอบของอาหารดังนี้ มีปริมาณโปรตีนแบบหยาบอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 20 ปริมาณไฟเบอร์แบบหยาบมากที่สุดร้อยละ 5 ปริมาณไขมันแบบหยาบอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 2.5 มีความชื้นมากที่สุดร้อยละ 13 มีเถ้า(ash) มากที่สุดร้อยละ 7 แคลเซียมมีมากที่สุดร้อยละ 0.7-1.4 ฟอสฟอรัสมีมากที่สุดร้อยละ 0.6-1.2 ไนโตรเจน (free extract) มีประมาณร้อยละ 49.5 นอกจากนั้นมีไวตามินเอ ดี 3 อี ซี เค บี 12 ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน กรดแพนโตธีนิค ไนอะซิน ไพริด๊อกซีน โคลลีน แอนติอ๊อกซิแดนท์(antioxidant) และไมโครมิเนอรัล (microminerals) ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูป(gold coin)ที่ผลิตจากประเทศสิงคโปร์ และน้ำดื่มเป็นน้ำประปา ไม่จำกัดปริมาณ(ad libitum) และเลี้ยงให้หนูแรทได้ชินหรือปรับตัวกับสถานที่ใหม่และสิ่งแวดล้อมใหม่เพื่อให้แข็งแรงดีประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาทดลอง โดยตลอดการทดลองใช้หนูแรททั้งหมด 252 ตัว

2. วิธีการเตรียมสารละลายพิษงู โดยนำพิษงูแมวเซาแบบหยาบ(lyophilized crude venom of Russell's viper siamensis) ซึ่งได้มาจากกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย นำพิษงูแมวเซามาละลายด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรค ร้อยละ 0.9 (Steriled normal saline solution 0.9%) โดยให้มีความเข้มข้นของพิษงูแมวเซา 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำเกลือ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ

3. การเตรียมสัตว์ทดลองเบื้องต้น นำหนูแรทมาชั่งน้ำหนัก ฉีดน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ในกลุ่มควบคุม หรือฉีดสารละลายพิษงูแมวเซาในกลุ่มทดลอง

โดยฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ(intramuscular) ต้นขาขวาตรงส่วนกล้ามเนื้อบริเวณที่อยู่ใกล้ลำตัว โดยฉีดเป็น single bolus injection

4. <u>ขั้นตอนและวิธีการทดลอง</u> ให้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ในกลุ่มควบคุมในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม และให้สารละลายพิษงูแมวเซาในกลุ่มทดลองในขนาด 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม (โดยละลายในน้ำเกลือ 1 มิลลิลิตร) ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อต้นขาขวา ศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังให้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ในกลุ่มควบคุม และหลังให้สารละลายพิษงูแมวเซาในกลุ่มทดลอง เมื่อฉีดน้ำเกลือหรือสารละลายพิษงูแมวเซาไว้ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันดังต่อไปนี้คือ

1 3 6 24 72 120 และ 168 ชั่วโมง (ตามลำดับ)

โดยในแต่ละขนาดและช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังฉีดสาร เมื่อครบตามกำหนดแล้วสุ่มหนูมาทำการทดลองโดยแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมรรถภาพของไตและอีกส่วนหนึ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตทั้งข้างขวาและซ้ายโดย

4.1 การทดลองส่วนที่ 1 ศึกษาสมรรถภาพของไต ใช้หนูแรททั้งหมด 168 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองย่อยดังนี้คือ

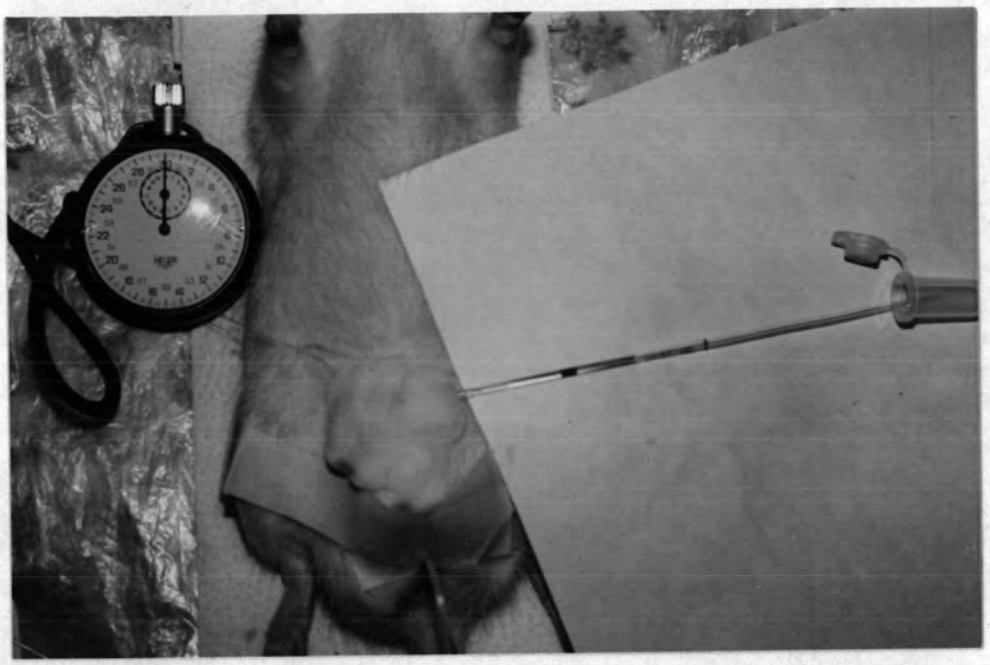
4.1.1 กลุ่มควบคุม ใช้หนูแรททั้งหมด 56 ตัว ฉีดด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม

4.1.2 กลุ่มทดรอง ใช้หนูแรททั้งหมด 112 ตัว ฉีดด้วยสารละลายพิษงูแมวเซาในขนาดพิษ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม โดยในแต่ละขนาดพิษใช้หนูแรททั้งหมด 56 ตัว

ในการทดลองส่วนที่ 1 นี้ ในแต่ละขนาดและช่วงระยะเวลาต่าง ๆ หลังฉีดสารใช้หนูแรทกลุ่มย่อยละ 8 ตัว (n=8) เมื่อครบตามกำหนดช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังฉีดสารแล้ว นำหนูแรทมาทำให้สลบโดยใช้ยาสลบอินแอคติน(inactin ของ Byk Gulden Konstanประเทศเยอรมันตะวันตก)ในขนาด 100 มก.ต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กก. โดยละลายยาสลบอินแอคตินด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 50 มก.ต่อ 1 มล. ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneum) หลังฉีดยาสลบอินแอคตินนานประมาณ 3-5 นาที หนูแรทจะสลบและเมื่อหนูแรทสลบลึกดีแล้ว หลังจากนั้นนำมาผ่าตัดใส่สายยางโดยใช้(high pressure

polyethylene tube เข้าทางกระเพาะปัสสาวะ ต่อจากนั้นใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก (disposible capillary micropipette ของ Hirschmann EM ประเทศเยอรมันตะวันตก) ขนาด 100 ไมโครลิตรมาต่อเข้ากับปลายสายยาง (catheter bladder) (ดังแสดงไว้ดังรูปที่ 1) เพื่อวัดอัตราขับถ่ายปัสสาวะ (urine flow rate หรือ V) และเพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะด้วย ในช่วงหลังจากใส่สายยางเข้ากระเพาะปัสสาวะและต่อหลอดแก้วขนาดเล็กเข้ากับปลายสายยางเรียบร้อยแล้ว (ดังรูปที่ 1) พยายามควบคุมอุณหภูมิร่างกายของหนูแรทให้ได้ 37°C (ทางทวารหนัก) ตลอดการทดลอง โดยใช้เทเลเทอร์โมมิเตอร์ (telethermometer) สอดปลายเทอร์โมมิเตอร์ (probe) เข้าทางทวารหนักบันทึกอุณหภูมิภายในตัวหนูแรททดลอง พยายามรักษาอุณหภูมิและให้ความอบอุ่น (keep warm) แก่หนูแรทเพื่อให้ได้อุณหภูมิร่างกายประมาณ 37°C ตลอดการทดลอง โดยใช้โคมไฟขนาด 60 วัตต์ส่องให้ความร้อนร่วมกับใช้กระเป๋าไฟฟ้า (heat pad) ด้วย นับตั้งแต่หลังจากใส่สายยางเข้ากระเพาะปัสสาวะจนเสร็จทั้งหมดเรียบร้อยแล้วคือตั้งแต่เริ่มใส่สายยางจนถึงต่อปลายสายยางเข้ากับหลอดแก้วขนาดเล็กขนาด 100 ไมโครลิตรจนเสร็จจะใช้เวลาประมาณ 3-5 นาที หลังจากหนูแรทสลบลึกดีแล้ว ดูแลให้หนูแรทอยู่ในภาวะคงที่ดีสักประมาณ 30 นาทีและรักษาอุณหภูมิ ให้ความอบอุ่นให้อุณหภูมิร่างกายหนูแรทคงที่ที่ 37°C ตลอด จึงเริ่มวัดอัตราขับถ่ายปัสสาวะ และเก็บตัวอย่างปัสสาวะ และเมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ (intracardiac blood) โดยวิธีเจาะเลือดจากหัวใจโดยตรง (cardiac puncture) หลังจากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างพลาสมามาตรวจวัดหาระดับความเข้มข้นของครีอะตินีน (Cr) ยูเรียไนโตรเจน (UN) โซเดียม (Na^+) โปตัสเซียม (K^+) คลอไรด์ (Cl^-) แคลเซียม (Ca^{2+}) ฟอสฟอรัส (P) และออสโมลาลิตี (osmolality หรือ Osm) และเมื่อตรวจวัดทราบค่าต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้และนำมาคำนวณด้วยแล้วจะทราบสมรรถภาพของไตในหนูแรทกลุ่มควบคุมที่ให้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 และในหนูแรทกลุ่มทดลองที่ให้พิษงูแมวเซา โดยดูจากพารามิเตอร์ (Parameters) ต่าง ๆ ดังนี้คือ

- ความเข้มข้นของสารชีวเคมีและอีเล็คโทรลัยท์ในพลาสมาและในปัสสาวะ (Plasma and urine biochemical agents and electrolytes concentration) อันได้แก่ ครีอะตินีน ยูเรียไนโตรเจน โซเดียม คลอไรด์ โปตัสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัสและออสโมลาลิตี



รูปที่ 1 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากกระเพาะปัสสาวะของหนูแรท โดยใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก (disposible capillary micropipette) ขนาด 100 ไมโครลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงวิธีการเปิดหน้าท้องหนูแรท เพื่อนำไปมาศึกษาทางพยาธิวิทยา

-อัตราการกรอง (filtered load) ของโซเดียม (F_{Na}) คลอไรด์ (F_{Cl}) โปตัสเซียม (F_K) แคลเซียม (F_{Ca}) และฟอสฟอรัส (F_P)

-อัตราขับถ่ายปัสสาวะ อัตราการขับถ่าย (urinary excretion rate) โซเดียม (UV_{Na}) คลอไรด์ (UV_{Cl}) โปตัสเซียม (UV_K) แคลเซียม (UV_{Ca}) และฟอสฟอรัส (UV_P)

-เคลียแรนซ์ของครีอะตินีน (Creatinine clearance หรือ C_{Cr}) หมายถึง อัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate หรือ GFR) เคลียแรนซ์ของยูเรีย (urea clearance หรือ C_{UREA}) โซเดียม (C_P) คลอไรด์ (C_{Cl}) โปตัสเซียม (C_K) แคลเซียม (C_{Ca}) ฟอสฟอรัส (C_P) ออสโมลาลิตี (Osmolal clearance หรือ C_{Osm}) น้ำอิสระ (free water clearance หรือ C_{H_2O}) และหาอัตราส่วนระหว่างออสโมลาลิตีของปัสสาวะต่อออสโมลาลิตีของพลาสมา (U_{Osm}/P_{Osm})

-แฟรคชั่นของการขับถ่าย (Fractional excretion) โซเดียม (FE_{Na}) คลอไรด์ (FE_{Cl}) โปตัสเซียม (FE_K) แคลเซียม (FE_{Ca}) และฟอสฟอรัส (FE_P)

และสำหรับตัวอย่างเลือดวัดหาค่าปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่นหรือค่าฮีมาโตคริต (packed cell volume หรือ hematocrit หรือ Hct) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองตัดไตทั้งสองข้างออกมาชั่งน้ำหนักเอาไว้เพื่อเปรียบเทียบสมรรถภาพของไตต่อน้ำหนักไตด้วย

วิธีหรือหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารต่าง ๆ ทั้งในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะ (Analytical determinations of plasma and urin samples)

การหาระดับความเข้มข้นของครีอะตินีน ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะโดยใช้วิธี Jeffe reaction (Tietz, 1970) การหาระดับความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจน (UN) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะโดยใช้ Diacetyl monoxime method (Morin และ Prox, 1973) การหาระดับความเข้มข้นของโซเดียม (Na^+) และโปตัสเซียม (K^+) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะวัดหาโดยใช้ flame photometer (Klina flame operating, Beckman instrument, instrumentation lab, model 343) การหาระดับความเข้มข้นของคลอไรด์ (Cl^-) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะวัดหาโดยใช้ Chloride analyzer (Beckman instrument,

instrumentation lab, mode, 179) การหาระดับความเข้มข้นของแคลเซียม (Ca^{++}) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะวัดหาโดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer ตาม colorimetric method ของ Moorehead และ Biggs (1974) การหาระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (P หรือ inorganic phosphorus) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะโดยใช้วิธีการของDreyer และ Routh method (1963) การหาระดับความเข้มข้นของออสโมลาลิตี (Osm) ในตัวอย่างพลาสมาและในปัสสาวะหาโดยใช้หลัก freezing point depression โดยใช้ Advanced osmometer instrument (instrumentation lab, models 3L, 3W) และใช้ค่าเคลียแรนซ์ของครีอะตินีน (C_{Cr}) เป็นการแสดงถึงอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate หรือ GFR) ส่วนการหาค่าปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่น (hematocrit หรือ Hct หรือ packed cell volume) ใช้ microcapillaries centrifuge (Runne Heidelberg micro hematocrit centrifuge, model 85-1) และอ่านค่าโดยใช้international microcapillary reader (Hawksley micro hematocrit reader)

การคำนวณ

อัตราการกรองของอีเล็คโทรลัยท์ (F_e หน่วยเป็นมิลลิอิควิวาเลนซ์/นาที) = ความเข้มข้นของอีเล็คโทรลัยท์ในพลาสมา (P_e) x อัตราการกรองของไต (GFR)

อัตราการขับถ่ายอีเล็คโทรลัยท์ทางปัสสาวะ (UV_e หน่วยเป็นมิลลิอิควิวาเลนซ์/นาที) = ความเข้มข้นของอีเล็คโทรลัยท์ในปัสสาวะ (U_e) x อัตราขับถ่ายปัสสาวะ (V)

เคลียแรนซ์ของสารใด (C หน่วยเป็นมิลลิลิตร/นาที) = $\frac{\text{ความเข้มข้นของสารนั้นในปัสสาวะ (U) x อัตราขับถ่ายปัสสาวะ (V)}}{\text{ความเข้มข้นของสารนั้นในพลาสมา (P)}}$

เคลียแรนซ์ของออสโมลาลิตี (C_{Osm} หน่วยเป็นมิลลิลิตร/นาที) = $\frac{\text{ค่าออสโมลาลิตีในปัสสาวะ } (U_{Osm}) \text{ x อัตราจับถ่ายปัสสาวะ (V)}}{\text{ค่าออสโมลาลิตีในพลาสมา } (P_{Osm})}$

เคลียแรนซ์ของน้ำอิสระ (C_{H_xO} หน่วยเป็นมิลลิลิตร/นาที) = อัตราขับถ่ายปัสสาวะ (V) - เคลียแรนซ์ของออสโมลาลิตี (C_{Osm})

อัตราส่วนระหว่างออสโมลาลิตีของปัสสาวะต่อออสโมลาลิตีของพลาสมา = $\frac{\text{ค่าออสโมลาลิตีของปัสสาวะ } (U_{Osm})}{\text{ค่าออสโมลาลิตีของพลาสมา } (P_{Osm})}$

แฟรคชั่นของการขับถ่ายอีเล็คโทรลัยท์ (FE_e หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{อัตราการขับถ่ายอีเล็คโทรลัยท์ทางปัสสาวะ/ความเข้มข้นของอีเล็คโทรลัยท์ในพลาสมา } (UV_e/P_e) \text{ x } 100}{\text{อัตราการกรองของไต (GFR)}}$

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ทดสอบในการวิจัย

ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย(mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean) ความแตกต่างของข้อมูลในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับพิษงูแมวเซาในขนาดพิษ 1 และ 2 มก./กก.ของน้ำหนักตัวหนูแรท ใช้สถิติ Student's unpaired t-test และตัวบ่งบอกถึงระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติใช้ค่าพี (P-values) ซึ่งน้อยกว่า 0.05 0.01 และ 0.001 จึงถือว่าข้อมูลทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2 การทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตทั้งข้างขวาและซ้าย ใช้หนูแรททั้งหมด 84 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองย่อยดังนี้ คือ

4.2.1 กลุ่มควบคุม ใช้หนูแรททั้งหมด 28 ตัว ฉีดด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม

4.2.2 กลุ่มทดลอง ใช้หนูแรททั้งหมด 56 ตัว ฉีดด้วยสารละลายพิษงูแมวเซาในขนาดพิษ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูแรท 1 กิโลกรัม โดยในแต่ละขนาดพิษใช้หนูแรททั้งหมด 28 ตัว

ในการทดลองส่วนที่ 2 นี้ ในแต่ละขนาดและช่วงระยะเวลาหลังฉีดสารใช้หนูแรทกลุ่มย่อยละ 4 ตัว (n=4) เมื่อครบตามกำหนดช่วงระยะเวลาดังที่กล่าวแล้ว นำหนูแรทมาดึงคอหรือดึงรอยต่อระหว่างกระดูกสันหลังส่วนคอและช่วงอกให้แยกออกจากกัน (cervical dislocation) แล้วรีบเปิดผนังหน้าท้อง เยื่อบุช่องท้องและเปิดจนเห็นได้ (ซึ่งอยู่หลังเยื่อบุช่องท้อง) (ดังแสดงไว้ดังรูปที่ 2) ตัดไตทั้งสองข้างออก ล้างคราบเลือดด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ประมาณ 4-5 ครั้งหรือตามความจำเป็น ตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมัน (connective tissues and fat) ออกให้หมด ล้างด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 อีกตามความจำเป็น ซับให้แห้งและลอกแคปซูล (capsule) ที่ห่อหุ้มไตออก นำไตทั้งสองข้างมาชั่งน้ำหนักไว้ หลังจากนั้นผ่าครึ่งทั้งไตข้างขวาและข้างซ้ายออกเป็นสองซีกโดยผ่าตามยาว เนื้อไตที่ผ่าซีกแยกเป็นไตข้างขวาและไตข้างซ้ายแช่หรือดอง (fixed) ในน้ำยานิวทรัลฟอร์มาลิน (neutral formalin) ร้อยละ 10 โดยแยกแช่ในน้ำยาแต่ละขวดซึ่งมีปริมาตรน้ำยามากกว่าปริมาตรของเนื้อเยื่อไตประมาณ 20-25 เท่า (วิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาพยายามทำโดยใช้กระทบกระเทือนต่อหนูแรทและต่อเนื้อเยื่อไตทั้งสองข้างให้น้อยที่สุด) แล้วจึง

น้ำยาแต่ละขวดซึ่งมีปริมาตรน้ำยามากกว่าปริมาตรของเนื้อเยื่อไตประมาณ 20 - 25 เท่า (วิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาพยายามทำโดยให้กระทบกระเทือนต่อหนูแรทและต่อเนื้อเยื่อไตทั้งสองข้างให้น้อยที่สุด) แล้วจึงดำเนินการตามขั้นตอนหรือขบวนการทางพยาธิวิทยาต่อไป โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อชิ้นเนื้อไตทั้งขวาและซ้ายที่แช่ในน้ำยานิวทรัลฟอร์มาลินร้อยละ 10 นำมาผ่านขบวนต่าง ๆ ในการเตรียมเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา (tissue processing) จนขั้นสุดท้ายจะอยู่ในพาราฟิน ทำเป็นบล็อคพาราฟินแข็ง แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเนื้อบางวางบนแผ่นแก้ว (slide) แล้วนำมาย้อม (stained) ด้วยสี hematoxylin eosin ซึ่งเป็นการย้อมธรรมดาที่ใช้กันทั่วไป (routine stain) และทำการย้อมพิเศษ (special stain) เพิ่มเติมจากการย้อมประจำด้วย โดยย้อมพิเศษอีก 3 ชนิดคือย้อมพิเศษ Jone's silver, Masson's trichrome stain แล้ว Periodic acid-schiff reaction (PAS) (ซึ่งวิธีการต่าง ๆ จะได้กล่าวถึงโดยสังเขปพอเข้าใจ) แล้วจึงนำมาอ่านผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination)

เทคนิคและลำดับขั้นตอนวิธีการต่าง ๆ ทางพยาธิวิทยาที่ใช้ในการทดลองนี้ มีดังนี้คือ

1. ฟิกเซชั่น (fixation) หรือการแช่เนื้อในน้ำยารักษารูป
2. โพรเซดชิง (processing) ขบวนการผ่านเนื้อในน้ำยาชนิดต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงเนื้อเยื่อให้เหมาะสม
3. เซคชั่นนิ่ง (sectioning) หรือการตัดชิ้นเนื้อให้เป็นแผ่นบาง ๆ
4. สเตนนิ่ง (staining) หรือการย้อมสีชิ้นเนื้อ

ขั้นตอนกระบวนการทั้งสี่อย่างนี้ได้แก่

1. ฟิกเซชั่นหรือการแช่เนื้อในน้ำยารักษารูป

วิธีการขั้นแรกที่สำคัญในการเตรียมชิ้นเนื้อไตเพื่อการศึกษาทางจุลทัศน์วิทยา คือการทำให้ชิ้นเนื้อและเซลล์อยู่ในสภาพคงที่ถาวร ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อรวมเรียกว่าฟิกเซทีฟ (fixatives) หรือฟิกซิ่ง เอเจนท์ (fising agents)

วัตถุประสงค์ของฟิกเซชั่นคือทำให้เซลล์มีสภาพเหมือนเดิมให้มากที่สุด แต่ยังไม่มีฟิกเซทีฟชนิดใดหรือตัวใดที่ทำหน้าที่ได้สมบูรณ์แบบ อย่างไรก็ตามฟิกเซทีฟที่ดีควรจะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

(1) ฆ่าเซลล์อย่างฉับพลันทันทีที่เซลล์สัมผัสกับตัวฟิกเซทีฟ

(2) มีความสามารถทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อแข็งตัว (hardening)

(3) มีความสามารถในการซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อและเซลล์ในอัตราที่รวดเร็ว

ในการทดลองนี้ได้ใช้ฟิกเซทีฟคือบัฟเฟอร์นิวทรัลฟอร์มาลิน (buffered neutral formalin solution) ร้อยละ 10 ซึ่งถือว่าเป็นน้ำยาฟิเซทีฟที่ดีที่สุดในการฟิกเซชั่นหรือการเก็บทำให้ชิ้นเนื้อไตคงรูป ทำได้โดยการจุ่มหรือแช่ (imersion fixation) ชิ้นเนื้อไตลงในน้ำยานิวทรัลฟอร์มาลินร้อยละ 10 ทันที ขั้นตอนของฟิกเซชั่นจะสมบูรณ์แบบได้นั้นจะต้องปฏิบัติดังนี้

ก. ล้าง (rinsing) ล้างชิ้นเนื้อไตในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 ทันที

ข. ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดพอเหมาะและการใช้ปริมาตรของฟิกเซทีฟที่พอเหมาะกับขนาดชิ้นเนื้อ

ค. ล้างชิ้นเนื้อภายหลังฟิกเซชั่น เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด

2. ขบวนการผ่านเนื้อเยื่อในน้ำยาต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงเนื้อเยื่อให้เหมาะสม

ชิ้นเนื้อจำต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการเสริมความแข็งให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำไปผ่านขบวนการอื่น ๆ ต่อไป วิธีการโดยย่อมีดังนี้

2.1 การล้าง (washing)

ชิ้นเนื้อไตจะต้องผ่านการล้างในน้ำประปา เพื่อล้างน้ำยานิวทรัลฟอร์มาลินร้อยละ 10 ออก ภายหลังจึงนำมาล้างในเครื่องมือที่เรียกว่า Autotechnicon หรือ Automatic tissue processor

2.2 การเอาน้ำออก (dehydration)

ชิ้นเนื้อไตจะถูกนำไปผ่านในสารเคมีเหลวที่ทำหน้าที่ดูดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการผสมระหว่างน้ำและสารเคมีตัวอื่น ซึ่งใช้ในการเคลียริ่งกับไซลิน (xylene) ได้ สารที่ใช้เรียกว่าดีไฮแดรนท์ (dehydrant) ได้แก่ เอ็ททิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดน้ำออกได้ดีโดยไม่ทำให้ชิ้นเนื้อไตแข็งจนเปราะ โดยผ่านเนื้อเยื่อไตในดีไฮแดรนท์ที่มีความเข้มข้นจากต่ำไปทางสูง

2.3 เคลียริ่ง (clearing)

โดยการนำสารเคมีที่เป็นตัวกลางในการนำสารขี้ผึ้งเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื้อเยื่อ เรียกชื่อว่าเคลียริ่ง เอเจนท์ (agent) ได้แก่ ไซลีน

2.4 อินฟิลเทรชั่น

การทำให้ขี้ผึ้งเหลวเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อให้มีการเสริมสร้างเซลล์และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อให้มีความแข็งเท่าเทียมและสม่ำเสมอกันโดยตลอด

2.5 เอ็มเบดดิ้งและบล็อคกิ้ง (embedding และ blocking)

ชิ้นเนื้อไตจะถูกนำไปฝังลง (embed) ในพาราฟินเหลวแล้วปล่อยให้มีการแข็งตัวของพาราฟิน วิธีการนี้เรียกว่าเอ็มเบดดิ้ง

3. เซคชั่นนิ่งหรือการตัด

การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางด้วยไมโครโตม (microtome) วิธีการนี้เรียกว่าเซคชั่นนิ่ง (sectioning) ในงานวิจัยนี้ความหนาของเซคชั่นประมาณ 2 - 5 ไมโครเมตร หลังจากนั้นก็นำแผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วไปลอยในอ่างน้ำ (water bath) ซึ่งปรับอุณหภูมิให้สูงกว่าอุณหภูมิของห้อง เพื่อให้แผ่นชิ้นเนื้อขยายตัวเต็มที่ไม่ย่น แล้วจึงนำมาวางบนแผ่นแก้ว (slide) จากนั้นทำให้แห้งโดยวางไว้ในบรรยากาศธรรมดาของห้อง เมื่อสไลด์แห้งสนิทแล้วจึงนำไปย้อมต่อไป

4. สเตนนิ่งหรือการย้อม

การย้อมสีคือการทำให้สีหรือสารเคมีไปมีปฏิกริยากับเนื้อเยื่อที่จะศึกษาให้เกิดเป็นสี เพื่อสะดวกในการแยกแยะส่วนต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการย้อมสีคือการแสดงหรือชี้ให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจากการใช้สีหรือสารเคมี ขั้นตอนทั่วไปในการย้อมสี

1. การล้างหรือขจัดเอาขี้ผึ้งพาราฟินออกจากสไลด์หรือจากเซคชั่น (หลังจากการตัดเป็นแผ่นบาง) หรือ deparaffinization โดยใช้น้ำยาเคมีได้แก่ ไซลีน จุ่มสไลด์ที่มีเซคชั่นลงในไซลีนจนชิ้นเนื้อปราศจากพาราฟิน จากนั้นนำไปผ่านแอบโซลูทแอลกอฮอล์และตามด้วยเอ็ททานอลร้อยละ 95 และร้อยละ 70

2. การทำให้น้ำเข้าไปสู่ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ (hydration) โดยผ่านในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นจากสูง (ร้อยละ 100) ลงไปหาต่ำ (ร้อยละ 70)

3. การย้อมสีแรก (primary staining) ใช้สีที่เป็นด่างเพื่อย้อมนิวเคลียสได้แก่ สีhematoxylin

4. ล้างสีที่มากเกินพอออก (differentiation) การล้างสีที่มากเกินพอนี้อาจใช้น้ำหรือสารละลายกรดอ่อนผสมในแอลกอฮอล์ แล้วตามด้วยน้ำเพื่อเตรียมการย้อมสีชนิดที่ 2 หรือชนิดต่อไป

5. การย้อมสีซ้ำ (counterstaining) เพื่อเป็นการเพิ่มสีใหม่ในชิ้นเนื้อส่วนใหญ่สีที่ใช้ย้อมซ้ำเป็นสีที่เป็นกรดโดยย้อมด้วยสี eosin จะย้อมไซโตปลาสมหรือส่วนอื่นของเนื้อเยื่อที่ไม่จำเพาะเจาะจงเท่าสีชนิดแรก

6. ขจัดเอาน้ำออก (dehydration) หลังจากการย้อมสีแล้ว ผ่านเนื้อเยื่อในสารละลายแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 70) จนถึงแอบโซลูทแอลกอฮอล์เพื่อให้เนื้อเยื่อปราศจากน้ำ

7. เซคชั่นหลังจากผ่านการย้อมและการขจัดเอาน้ำออกแล้ว ใช้ไซลีนเป็นตัวเคลียริ่ง เอเจนท์ เพื่อให้มีดรรชนีหักเหของแสงน้อยลงและเซคชั่นโปร่งใส

๘. การใช้ตัวกลางชนิดที่มีดรรชนีหักเหของแสงต่ำร่วมกับการใช้กระจกบางปิดทับเนื้อเยื่อบนแผ่นแก้ว (mounting)

วิธีการย้อมธรรมดา (routine staining) เป็นสิ่งที่จำเป็นยิ่งในการศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์วิทยาพื้นฐานเพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อและเซลล์ วิธีย้อมสีพิเศษจำเป็นในการศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อสนับสนุนข้อมูลพื้นฐาน

วิธีการย้อมสีแบบธรรมดาที่ใช้เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์ภายในเซคชั่นได้แก่การย้อมโดยใช้ hematoxylin และ eosin (H & E stain)

ซึ่งเนื้อเยื่อที่ผ่านวิธีการต่าง ๆ ในการย้อมออกมาสำเร็จรูปล้ว นิวเคลียสจะติดสีม่วง-น้ำเงินเข้ม ไซโตปลาสมติดสีชมพู เนื้อเยื่อเกี่ยวพันติดสีชมพู-แดง เม็ดเลือดแดงติดสีแดงส้ม

การย้อมสีพิเศษซึ่งใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มี ๓ ชนิด

๑. การย้อมพิเศษตามวิธีการของ Jone (Jone' method for kidney) ใช้ย้อมพิเศษสำหรับไตโดยเฉพาะ ผลที่ได้รับหลังการย้อม เบสเมนท์ เมมเบรน (basement membrane) ติดสีดำ Reticulum fibers ติดสีดำ นิวเคลียสติดสีน้ำเงิน ไซโตปลาสมคอลลาเจนและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันติดสีชมพูส้ม (pink to orange) (Jones, 1981)

๒. การย้อมพิเศษตามวิธีการของ Masson (Masson's trichrome stain method) ผลที่ได้รับหลังจากย้อมนิวเคลียสจะติดสีดำ ไซโตปลาสมและอินเตอร์เซลลูลาร์ไฟเบอร์ (intercellular fibers) ติดสีแดง คอลลาเจนติดสีน้ำเงิน (Masson, 1929 ; Lillie, 1948)

๓. การย้อมพิเศษ Periodic Acid-Schiff Reaction (PAS) การย้อมพิเศษโดยวิธีนี้ ไฟบริน (fibrin) หรือธร็อมไบ (thrombi) สารไฮยาไลน์ที่สะสมอยู่ในไกลเมอรูไล (hyalin deposits in glomeruli) เซลล์แกรนูลาร์ในหลอดเลือดแดงอาร์เทอริโอลของไต (granular cells in the renal arterioles) ส่วนใหญ่ของเบสเมนท์ เมมเบรน (most basement membranes) จะติดสีม่วงแดง (purplis red)

นิว เคลียรสติดสีน้ำเงิน พื้น (background) ติดสีเขียวอ่อน (MacManus, 1948)

ในการทดลองทั้งสองส่วนนี้คือ ส่วนที่ 1 ที่ศึกษาสมรรถภาพของไตและส่วนที่ 2 ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต ขนาดสารที่ให้ ระยะเวลาหลังฉีดสาร และจำนวนหนูแรท ที่ใช้ทดลองสรุปเป็นตารางแสดงได้ดังนี้คือ

ชนาดสารที่ให้และจำนวนหนูแรทที่ใช้ทดลอง

ระยะเวลาตั้งแต่หลังฉีดสารจนถึงนำมาทดลอง	ศึกษาสมรรถภาพของไต			ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง		กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	
	น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 1 มล./กก.น้ำหนักตัว	พิษงูแมวเซา 1 มก./กก.น้ำหนักตัว	พิษงูแมวเซา 2 มก./กก.น้ำหนักตัว	น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อโรคร้อยละ 0.9 1 มล./กก.น้ำหนักตัว	พิษงูแมวเซา 1 มก./กก.น้ำหนักตัว	พิษงูแมวเซา 2 มก./กก.น้ำหนักตัว
1 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
3 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
6 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
24 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
72 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
120 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
168 ชั่วโมง	8 ตัว	8 ตัว	8 ตัว	4 ตัว	4 ตัว	4 ตัว
	รวม 56 ตัว	รวม 56 ตัว	รวม 56 ตัว	รวม 28 ตัว	รวม 28 ตัว	รวม 28 ตัว