

บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

ชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่ที่ได้จากการทำ suction rectal biopsy ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรค Hirschsprung ในช่วงเดือนมกราคม 2535 ถึง เดือนธันวาคม 2535 กระจายผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม ตามอายุ

กลุ่ม 1 (G1) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน มีจำนวน 3 ราย

กลุ่ม 2 (G2) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 6 เดือน มีจำนวน 5 ราย และ

กลุ่ม 3 (G3) เด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค HD ที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 3 ปี มีจำนวน 13 ราย

2. วิธีการ

ตัดชิ้นเนื้อโดยใช้เครื่อง cryostat และทำการย้อมเพื่อดู activity ของ AChE ที่เพิ่มขึ้น โดยมีขั้นตอน (ภาพที่ 9) ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 นำชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่จากข้อ 1 มาจุ่มลงใน isopentane ที่เย็นจนเป็นวุ้น (ภาชนะที่บรรจุ isopentane จะหล่อด้วย liquid nitrogen) เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาจุ่มใน liquid nitrogen เป็นเวลา 20 วินาที แล้วจึงฝังลงในสาร OCT compound แล้วนำไปแช่เย็นจนสาร OCT compound แข็งตัว จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ถูกหุ้มด้วยสาร OCT compound มาตัดโดยผ่านกระบวนการแช่แข็งให้มีความหนาของชิ้นเนื้อ 6 μm นำมาติดบนแผ่นสไลด์ที่ชุบด้วย chromalum solution (ดูภาคผนวก ก.) จำนวน 10 แผ่น สำหรับการย้อมหา AChE activity และ 2 แผ่น สำหรับการย้อม H&E

2.2 นำแผ่นสไลด์ทั้งหมดที่ย้อมหา AChE activity มา fix ใน 4% formaldehyde (ภาคผนวก ข.) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 วินาที

2.3 นำแผ่น สไลด์จากข้อ 2.2 จำนวน 8 แผ่นมาใส่ใน solution A (ภาคผนวก ค.) สำหรับสไลด์อีก 2 แผ่น ใส่ใน solution A ที่ไม่มี acetylthiocholine iodide เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

Incubate สไลด์ทั้งสองชุดไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง (10 วินาที)

2.4 นำสไลด์จากข้อ 2.3 ทั้งสองชุดมาใส่ใน 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) เป็นเวลา 45 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 10 วินาที

2.5 นำสไลด์จากข้อ 2.4 มาย้อมด้วย 1% osmium tetroxide (OsO_4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

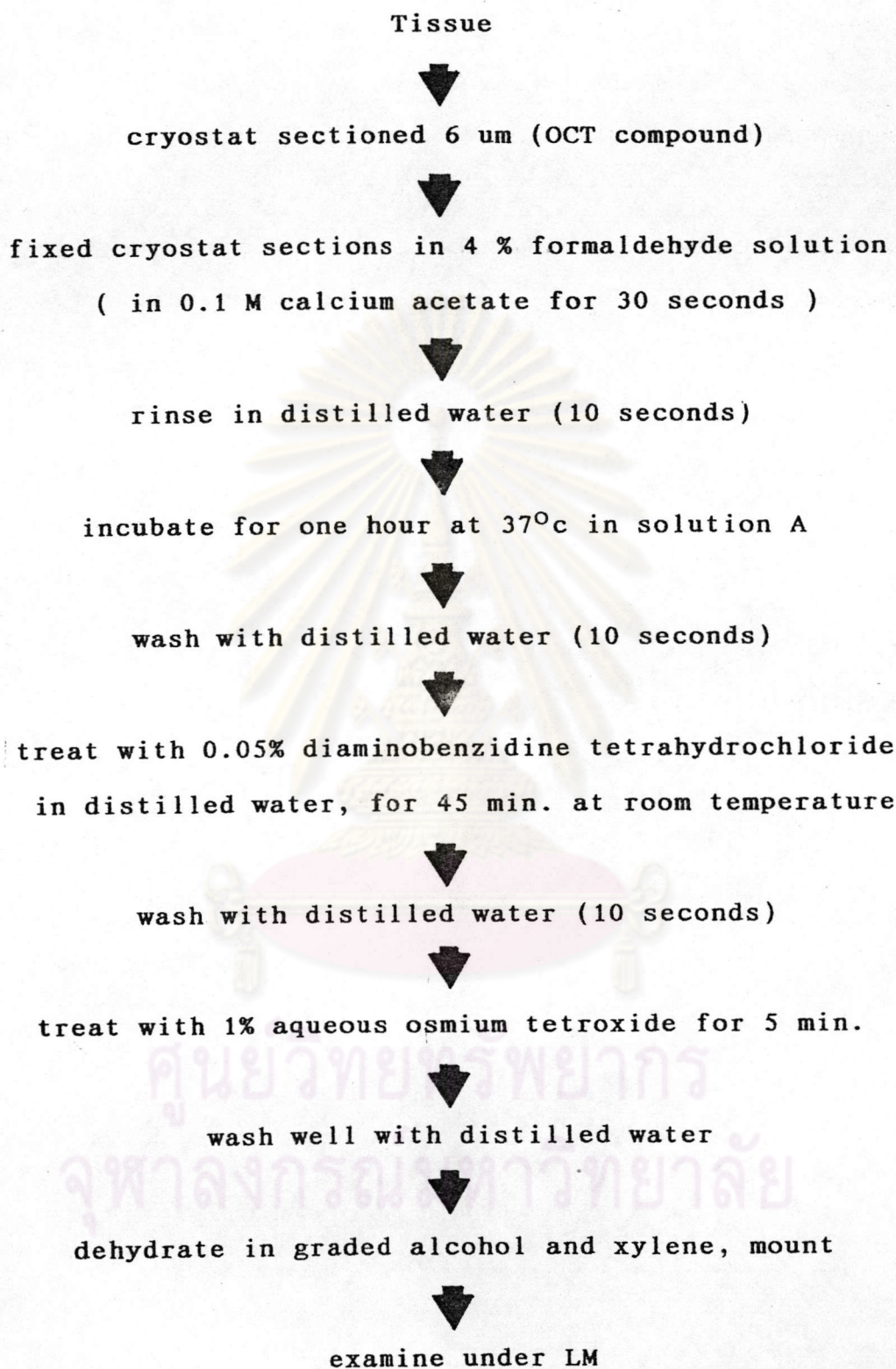
2.6 นำสไลด์ทั้งหมดมาผ่านขบวนการ dehydration , clear และ mount

3. การอ่านผล

3.1 ตรวจดูชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย H&E ว่ามีชั้น submucosa หรือไม่

3.2 ตรวจดู activity ของ AChE ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละชั้นของชิ้นเนื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 บันทึกผลพร้อมทั้งถ่ายภาพ



ภาพที่ 9 แสดงขั้นตอนการทำ AChE-stained in suction rectal biopsy