บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ

- การทดลองในสุนัขทดลอง
- การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

<u>การทดลองในสุนัขทดลอง</u>

1. เตรียมสุนัข สุนัขจำนวน 8 ตัว เพศเมีย 7 ตัว เพศผู้ 1 ตัว พันธุ์ไทยผสม อายุระหว่าง 8-12 เดือน ทำการตรวจประเมินสภาพร่างกายทางกายภาพ (physical examination) และตรวจทางห้องปฏิบัติการ (laboratory examination) ได้แก่ ตรวจค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count) ตรวจหาปรสิตในกระแสเลือดโดยใช้ buffy coat smear ตรวจค่าชีวเคมีเลือด ได้แก่ ค่า serum alanine transferase (ALT), serum alanine aspartate (AST), alkaline phosphatase (ALP), blood urea nitrogen (BUN) และค่า creatinine และแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 จำนวน 1 ตัว ทำการผ่าตัดนำม้ามออก (splenectomy) เพื่อใช้ในการเตรียมเชื้อ *E. canis*
- กลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัว เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม
- กลุ่มที่ 3 จำนวน 5 ตัว เพื่อใช้เป็นกลุ่มทดลอง

สุนัขทั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อยู่ในกรงลวดตาข่าย กั้นมุ้งลวด ขนาดพื้นที่ 1X1X1.5 เมตร ต่อตัว ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำสะอาดอย่างเพียงพอ ซึ่งได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ ประจำปี 2547 ทำการฉีดยา Ivomectin (Verbamac®, Virbac) ขนาด 200 μg/kg เพื่อป้องกันเห็บ หมัด และหนอนพยาธิหัวใจ เลี้ยงดูประมาณ 7 วันเพื่อปรับสภาพ ก่อนเริ่มทำการทดลอง

2. เตรียมตัวอย่างเลือดจากสุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* โดยนำตัวอย่างเลือดของสุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* โดยคัดเลือกจากสุนัขป่วยที่ศูนย์รับเลี้ยงสุนัขเขตประเวศ กรุงเทพมหานคร โดยพิจารณาจากมีประวัติพบเห็บตามตัว ลักษณะอาการทางคลินิก ได้แก่ พบจุดเลือดออกตามร่างกายหรือความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดอื่นๆ มีไข้สูงและไม่มีปัญหาการป่วยจากโรคอื่นๆ เช่น พยาธิหนอนหัวใจ โรคหัวใจ โรคการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง

ทำการตรวจหามอรูลาร์ ของเชื้อ *Ehrlichia spp.* โดยใช้ buffy coat smear นำมาป้ายบนสไลด์ และนำไปย้อมสี Giemsa จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบเชื้อไปทำการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ *E. canis*

3. การเตรียมเชื้อ *E. canis* ในสุนัขทดลอง

กลุ่มที่ 1 สุนัขที่เตรียมการติดเชื้อ *E. canis* จำนวน 1 ตัว ทำโดยวิธีการดังนี้ ทำการตรวจสภาพร่างกายเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการผ่าตัด ทำการเหนี่ยวนำการสลบด้วย Atropine sulfate ขนาด 0.04 มก./กก. และ Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer, German) ขนาด 1 มก./กก. และวางยาสลบด้วย Pentobarbital (Nembutal®, Sanofi, France) ขนาด 25 มก./กก. ทำการผ่าตัดเอาม้ามออกตามขั้นตอนของคู่มือปฏิบัติการศัลยศาสตร์สัตว์เล็ก (Fossum, 2002) ดูแลสุนัขผ่าตัด จนแผลผ่าตัดหาย และสุขภาพสมบูรณ์ภายในช่วง 2 สัปดาห์

ทำการเหนี่ยวนำการติดเชื้อ *E. canis* โดยการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้จากสุนัขคัดเลือกในข้อ 2. จำนวน 5 มล. (มีปริมาณเชื้อ *E. canis* ร้อยละ 0.01 ต่อเซลล์โมโนไซต์) ที่ผสมสารกันแข็งตัวของเลือดชนิด heparin ฉีดเข้าหลอดเลือดดำตามวิธีของ Codner และ Maslin (1992) สังเกตอาการทางคลินิก และทำการตรวจ buffy coat smear เพื่อยืนยันการติดเชื้อ *E. canis* ทุกวันจนตรวจพบภาวะ parasitemia และส่งตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี PCR ทำการนับจำนวนของเชื้อที่ปรากฏในกระแสเลือด โดยนำคำนวณเป็นค่าร้อยละของเชื้อต่อเซลล์โมโนไซต์

4. เหนี่ยวนำการติดเชื้อในสุนัขทดลอง

สุนัขในกลุ่มที่ 3 จำนวน 5 ตัว ทำการฉีดตัวอย่างเลือดจากข้อ 3. เข้าหลอดเลือดดำ ในปริมาณตัวละ 5 มล. ปริมาณเชื้อในกระแสเลือดมีค่า *E. canis* ร้อยละ 0.0015 / ต่อเซลล์โมโนไซต์ (15×10^{-5}) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง

ทำการติดตามประเมินสภาพสุนัขเป็นระยะๆ โดยทำการเก็บข้อมูลทางคลินิก ได้แก่ อัตราการเต้นของหัวใจ อัตราการหายใจ อัตราการเต้นของชีพจร อุณหภูมิ น้ำหนักตัว และ capillary refilling time (CRT)

ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และปัสสาวะสุนัขทดลอง ในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21,..., 60 หลังจากฉีดเชื้อและสุนัขกลุ่มควบคุม เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count, CBC) เพื่อดูปริมาณของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ โดยวิธีการใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ (รุ่น MS4, MELET SCHLOESING Laboratories ประเทศฝรั่งเศส) ค่าที่ได้มีดังนี้ คือ ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงรวม (Red blood cell, RBC), ค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบิน (hemoglobin concentration, Hb) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, Hct) ค่าปริมาตรเฉลี่ยของหนึ่งเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular volume, MCV), ค่าปริมาณของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (mean corpuscular hemoglobin, MCH), ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), ค่าการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดง (red cell distribution width, RDW), ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (white blood cell, WBC), ค่านับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว เซลล์ลิมป์โฟไซต์ (lymphocyte) เซลล์โมโนไซต์ (monocyte) และเซลล์แกรนูโลไซต์ (granulocyte) ค่าจำนวนเกล็ดเลือดทั้งหมด (thrombocyte count) ค่าการกระจายตัวของเกล็ดเลือด (platelet distribution width, PDW) และค่าปริมาณเกล็ดเลือดเฉลี่ย (mean platelet volume, MPV)

ใช้หัวเข็มเบอร์ 21 ขนาด 1 นิ้วในการเก็บตัวอย่างเลือดและใช้หลอดเก็บเลือดขนาด 5 มล. เก็บตัวอย่างเลือดจาก cephalic vein จำนวนตัวละ 4 มล. จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างเลือดที่เก็บมาออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ทำการเก็บในสารกันเลือดแข็งตัว ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) เพื่อเก็บ whole blood

2. การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีคลินิก โดยนำตัวอย่างเลือดส่วนที่ 2 ใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัวนำมาปั่นแยกเพื่อเก็บซีรั่มแล้วทำการตรวจค่าชีวเคมีคลินิกโดยใช้เครื่อง spectrophotometer เพื่อประเมินค่าต่างๆ ดังนี้

2.1 ค่าการทำงานของตับ ได้แก่ ค่า alanine transaminase (ALT) โดยวิธี Reitman-Frankel, alkaline phosphatase (ALP) โดยวิธี phenolphthalein monophosphate, aspatate transminase (AST) โดยวิธี Reitman-Frankel, total และ direct bilirubin โดยวิธี Jendrassik & Grof, total protein โดยวิธี Biuret-End Point Reaction-Reagent Blank, albumin โดยวิธี Bromocresal Green-Succinate, globulin, albumin:globulin (A:G) ratio

2.2 ค่าการทำงานของไต เช่น Blood urea nitrogen (BUN) โดยวิธี Diacetyl Monoxime (DAMO), creatinine โดยวิธี Alkaline Picrate-End Point reaction (Jaffe), BUN/creatinine ratio

3. การวิเคราะห์ปัสสาวะ เพื่อศึกษาการทำหน้าที่ของไต โดยทำการเก็บปัสสาวะด้วยวิธีรองปัสสาวะในช่วงกลางของการปัสสาวะ โดยระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของอุจจาระ ดิน หรือสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ นำปัสสาวะที่เก็บได้ไปวิเคราะห์

3.1 คุณสมบัติทางเคมีของปัสสาวะ โดยทำการหยดน้ำปัสสาวะลงบนแผ่นตรวจ urine reagent strips (URS-10, Multistix TM SG, Combistix TMSG) ซึ่งมีอยู่ 10 แถบจากบนลงล่างได้แก่ glucose, bilirubin, ketone, specific gravity, blood, pH, protein, urobilinogen, nitrite, leukocyte

3.2 คุณสมบัติทางกายภาพของปัสสาวะ ได้แก่ ปริมาตร ความถ่วงจำเพาะ ทำการวัดโดยใช้ refractometer ค่าที่ได้คือ ค่าความถ่วงจำเพาะ (urine specific gravity, USG)

3.3 องค์ประกอบต่างๆในปัสสาวะ ได้แก่ ตะกอน เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง ผลึก เซลล์เยื่อบุผิว จุลชีพ เพื่อดูความผิดปกติของไต โดยมีขั้นตอนคือ

ทำการคนปัสสาวะให้ตะกอนที่นอนก้นผสมกับน้ำปัสสาวะ แล้วจึงเทปัสสาวะใส่หลอดก้นแหลม 10 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 3-5 นาที แยกส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนและปัสสาวะรวมกัน 1 มล. เขย่าส่วนที่เหลือให้เข้ากัน หยดใส่สไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ อย่าให้มีฟองอากาศ นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยดูที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า สำหรับเซลล์ต่างๆ และที่กำลังขยาย 10 เท่า สำหรับตะกอน

3.4 ค่า Urine protein และ Urine creatinine เพื่อนำมาคำนวณหาค่า urine protein-creatinine ratio (UP/Cr) และ urine protein/urine creatinine ratio (UP/UCr) ทำการหาปริมาณของโปรตีน ในปัสสาวะ (mg/dl) ด้วยการใช้ trichloroacetic acid precipitation และค่า creatinine ในปัสสาวะด้วยการใช้ picric acid method (mg/dl)

3.4.1 วิธีการตรวจ Urine protein

ตรวจหาโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธี sulfosalicylic acid (Folin and Denis, 1914) ปิเปตปัสสาวะ 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดแรกเติม sulfosalicylic acid ความเข้มข้น 3% 2 มล. ผสมให้เข้ากัน อีกหลอดใช้เป็น blank โดยเติมกรด hydrogen chloride (HCl) ความเข้มข้น 0.6% 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าความดูดกลืนแสง ที่ 650 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะตามสูตร *O.D. Unknow X Factor 320.0 = มก./100 มล.*

นำทั้งซีรัมและพลาสมา มาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นใช้ค่าทางซีรัมวิทยา การวิเคราะห์ปัสสาวะร่วมกับวิเคราะห์ค่าเคมีเลือดอื่นๆ เพื่อทำการจำแนกการอักเสบของไตทางคลินิกเพื่อดูความผิดปกติในส่วนโกลเมอรูลัส

4. ทำการชันสูตร หลังจากสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 66 หลังจากฉีดเชื้อ ทำการการุณฆาต (euthanasia) สุนัขทดลองทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ pentobarbital (Nembutal®, Sanofi, France) แล้วเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อไตทั้งสองข้างขนาดความหนาของเนื้อเยื่อประมาณ 1 ซม. ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชม.เพื่อตรึงสภาพเนื้อเยื่อไต จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำบล็อคพาราฟิน โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Luna, 1994[b])

นำชิ้นเนื้อออกมาจาก 10% ฟอร์มาลิน และทำการล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา ใช้เวลา 30-60 นาที ทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยผ่านแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไประดับสูง โดยเริ่มจาก 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ หลังจากนั้นขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) ในไซลีน 2 ครั้ง ทำการแทรกซึมพาราฟิน (infiltration) โดยเลือกใช้พาราฟินที่มีจุดหลอมเหลว 56-58° ซ. เปลี่ยนพาราฟิน 2 ครั้ง ครั้งละ 30-60 นาที ฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) จากนั้นนำตัวอย่างมาทำสไลด์โดยทำการการตัดเซกชั่น (sectioning) ด้วยเครื่อง microtome โดยตัดให้มีความหนาประมาณ 4 ไมครอน

4.1 ทำการย้อมสีสไลด์ด้วย conventional method ทำการย้อมสี Hematoxylin and Eosin (H&E) เพื่อนำมาทำการศึกษาพยาธิสภาพของไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยมีขั้นตอนการย้อมสีคือ (Luna, 1994[b])

ขจัดพาราฟินในเนื้อเยื่อ (deparaffinization) โดยจุ่มในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยใส่ในแอลกอฮอล์ 100 95 และ 70% ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำมาย้อมสี Harris's Hematoxylin นาน 5 นาที แล้วจุ่มใน 1% acid alcohol จุ่มเร็วๆ 1-2 ครั้งและ จุ่มใน $LiCO_3$ ประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงย้อมด้วยสี Eosin นาน 2 นาที ทำการดึงน้ำออกโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70, 95 และ 100% ตามลำดับ จากนั้นแช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาทีแล้วจึงทำการปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting)

4.2 ทำการย้อมสีพิเศษ Periodic acid Schiff (PAS) เพื่อตรวจหาการสะสมของสาร mucopolysaccharide, fibrin, collagen ในส่วนต่างๆของไต เช่น glomerular basement membrane โดยมีขั้นตอนดังนี้ (Luna, 1994[d])

ขจัดพาราฟินจากเนื้อเยื่อ ผ่านแอลกอฮอล์จากระดับสูงมาต่ำ จนกระทั่งแช่ในน้ำประปาไหลผ่าน จุ่มในสารละลาย Periodic acid นาน 5 นาที จุ่มสไลด์ใน Schiff's reagent นาน 30 นาที ล้างน้ำประปาแบบไหลผ่าน นาน 5 นาที เปลี่ยนมาจุ่มในสารละลายซัลไฟต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ล้างน้ำประปาแบบไหลผ่าน นาน 5 นาที ย้อมสีซ้ำด้วย Mayer's hematoxylin นาน 5 นาที ขจัดน้ำออกโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 100 % และทำให้เนื้อเยื่อใสในไซลีน อย่างละ 2 ครั้ง แล้วทำการปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

การย้อมด้วยสีพิเศษ PAS จะให้ปฏิกิริยาบวกกับ ไกลโคเจน, แป้ง (starch) เซลลูโลส มิวซิน (mucin) แมทริกซ์ของกระดูกอ่อน (cartilage matrix) ไคติน เรทิคูลา (reticula) มิวโคโพลิแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) ไฟบริน (fibrin) หรือ คอลลาเจน (collagen) โดยจะติดสีกุหลาบถึงม่วงแดง

ให้คะแนนรอยโรคของโกลเมอรูลัสในการย้อมด้วย H&E และ PAS โดยแบ่งเป็น 0–3 คะแนนตามความหนาของเยื่อบุฐานของโกลเมอรูลัส การเพิ่มขึ้นของ mesangial matrix และการ

เพิ่มขึ้นของเซลล์ในโกลเมอรูลัส ดังนี้คือ คะแนน **0** หมายถึง ปกติ คะแนน **1** หมายถึงเล็กน้อย และไม่พบการผิดรูปของ glomerular tuft คะแนน **2** หมายถึงปานกลางและมีการอุดตันของหลอดเลือดในโกลเมอรูลัสบางส่วน คะแนน **3** หมายถึงรุนแรง ร่วมกับมีการอุดตันของหลอดเลือดอย่างสมบูรณ์และเกิด glomerular sclerosis (Codner et al., 1992)

4.3 ทำการย้อมสีพิเศษ Congo Red เพื่อตรวจการสะสมของสารอะไมลอยด์ (amyloid) ในส่วนโกลเมอรูลัสของไต เช่น glomerular basement membrane โดยมีขั้นตอนดังนี้ (Luna, 1994[C])

ละลายพาราฟินในเนื้อเยื่อ แล้วผ่าน alcohol จากระดับสูงมาต่ำ จนกระทั่งแช่ในน้ำประปาไหลผ่าน เปลี่ยนจุ่มในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ย้อมด้วย Mayer's hematoxylin นาน 5 นาที ล้างน้ำประปาแบบไหลผ่าน นาน 5 นาที จุ่มในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จุ่มในสารละลาย NaCl นาน 20 นาที จุ่มในสารละลาย Congo red นาน 30 ชม. ขจัดน้ำออกโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95, 100% และทำให้เนื้อเยื่อใสในไซลีน อย่างละ 2 ครั้ง แล้วทำการปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

การย้อมสี Congo red ผลบวกจะติดสีชมพูถึงแดง

4.4 การย้อมวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาชนิดของ immunoglobulin (Ig) ที่ประกอบอยู่ในสารประกอบเชิงซ้อน (immune complex) ในบริเวณของส่วนโกลเมอรูลัส โดยวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) มีขั้นตอนดังนี้คือ

4.4.1 วิธีการตรวจหาการสะสมของ IgM และ IgG

ตัดเนื้อเยื่อไตที่ฝังในพาราฟิน ให้ได้สไลด์ที่มีความหนา 4-6 ไมครอน โดยใช้แผ่นสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane (Silane®, Sigma, USA) ขจัดพาราฟินและนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยจุ่มในไซลีน นาน 30 นาที จุ่มในไซลีนผสมกับแอลกอฮอล์ 2 นาที จุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100, 95 80 และ 70% อย่างละ 2 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่าน นาน 5 นาที จุ่มในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วแช่ใน phosphate buffer saline (PBS) ทำการ pretreatment โดยการนำสไลด์เข้าเครื่องอบไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121°ซ. นาน 10 นาที ใน Tris EDTA pH9 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ทำการขจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.3% ใน methanol solution นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำ nonspecific background blocking ด้วยการใช้ 1% bovine serum albumin ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 60 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ goat anti-Dog IgM (h&l) antibody (Bethyl Lab Inc., USA) หรือ goat anti-Dog IgG (h&l) (Bethyl Lab Inc., USA) เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:400 ลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°ซ. ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated anti-goat IgG antibody (Dako, Denmark) ในอัตราส่วน 1:400 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยด avidin-biotin complex peroxidase solution (ABC kit, DAKO, Denmark) ลงบนสไลด์ที่

อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วยน้ำยา 0.05% 3-3' diaminonzidinetetrachloride (DAB; Sigma, USA) ใน 0.05 M Tris HCL pH 7.6 and 0.03% H_2O_2 นาน 13 วินาที ย้อมสีทับ (counter stain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin นาน 35 วินาที ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ ทำการตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

4.4.2 วิธีการตรวจหาการสะสมของ C3a

ตัดเนื้อเยื่อไตที่ฝังในพาราฟิน ให้ได้สไลด์ที่มีความหนา 4-6 ไมครอน โดยใช้แผ่นสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane (Silane®, Sigma, USA) ขจัดพาราฟิน และ นำน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยมีขั้นตอนดังนี้ จุ่มในไซลีน 30 นาที จุ่มในไซลีนผสมกับแอลกอฮอล์ 2 นาที จุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 95 80 และ 70% อย่างละ 2 นาที ตามลำดับ ล้างน้ำประปาแบบไหลผ่าน นาน 5 นาที จุ่มในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วแช่ใน PBS ทำ pretreatment โดยการนำสไลด์เข้าเครื่องอบไอน้ำความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121°ซ. นาน 10 นาที ใน tris EDTA pH. 9 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดด้วยเอนไซม์ trypsin ความเข้มข้น 0.1% บ่มอบที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ทำการขจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ H_2O_2 ความเข้มข้น 0.3% ใน methanol solution นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำ nonspecific background blocking ด้วยการใช้ 1% bovine serum albumin ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 60 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ Goat anti-Dog C3 antibody (Bethyl Lab Inc., USA) เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:300 ลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°ซ. ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinlated anti-goat IgG antibody (Dako®, Denmark) ในอัตราส่วน 1:300 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยด avidin-biotin complex peroxidase solution (ABC kit, DAKO, Denmark) ลงบนสไลด์ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วยน้ำยา 0.05% 3-3' diaminonzidinetetrachloride (DAB; Sigma, USA) ใน 0.05 M Tris HCL pH 7.6 and 0.03% H_2O_2 นาน 13 วินาที ย้อมสีทับ (counter stain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin นาน 35 วินาที ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ให้คะแนนการย้อมติดสีอิมมูนโนฮิสโตเคมี โดยให้คะแนนจาก 0-3 คือ คะแนน **0** หมายถึงไม่มีการติดสี คะแนน **1** หมายถึงติดสีเล็กน้อย คะแนน **2** หมายถึงติดสีปานกลาง คะแนน **3** หมายถึงติดสีอย่างชัดเจน (Codner et al., 1992)

4.6 ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง ของโกลเมอรูลัสในระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยมีขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อดังนี้

ทำการเก็บเนื้อไตขนาด 1X1X1 มม. นำมาตรึงสภาพด้วย 2.5-3% glutaraldehyde ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer; PB) pH 7.4 แช่ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ประมาณ 4-5 ชม. ล้างออก ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 10 นาที ทำการ ตรึงสภาพครั้งที่สองด้วย osmium tetroxide (OsO_4) 2 ชม. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 10 นาที ดึงน้ำ ออกด้วยแอลกอฮอล์ 30 50 70 80 95% อย่างละ 15 นาที และแอลกอฮอล์ 100% 3 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. จุ่ม acetone 3 ครั้งๆละ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แทรกซึมด้วยเรซิน (resin) เจือจาง กับ acetone (Epon resin:100% acetone; 1:1) 60 นาที เติม Epon resin 1:1 จุ่มตัวอย่างต่อ 30 นาที embedding ใน embedding media ที่ประกอบด้วย Resin: Epon 812 ปริมาณ 47.6 ก. Hardeners:DDSA (dodenyl succinic anhydride) ปริมาณ 9.2 ก. NMA (nadic methyl anhydride) ปริมาณ 35.6 ก., Accelerator:DMP-30 (2,4,6-tridimethylamino methyl phenol) จำนวน 1.6 มล. หลังจากนั้น curing โดยใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60-70°ซ. เป็นเวลา 1-2 วัน ตัดแต่งและทำ specimen block ตัดเซกชั่นหนา 1-2 ไมครอน ด้วย glass knife ย้อมดูด้วย 1% toluidine blue staining เพื่อหา ตำแหน่งของโกลเมอรูลัสที่ต้องการศึกษา

เมื่อได้ตำแหน่งที่ต้องการแล้วทำการตัดแต่งอีกครั้ง แล้วตัดเซกชั่นหนา 60-120 นาโนเมตร ด้วย diamond knife เรียงลงบนกริด ย้อมสี positive staining ด้วย 1% Uranyl acetate (in H_2O or EtOH) และ lead citrate ที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงแสง จากนั้นศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM; STREC(JEM-2100), Japan) และทำการถ่ายภาพ

ทำการศึกษาลักษณะและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใน ultrastructure ของส่วนโกล เมอรูลัสของไต วัดความหนาของ basement membrane และผลรวมของความยาวของ podocyte process ที่ยื่นเข้าไปใน basement membrane ในภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การวัดและการวิเคราะห์ผล

ใช้ Unpaired t-test ในการศึกษาความแตกต่างของผลทางโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีคลินิก และ ค่าการวิเคราะห์ปัสสาวะระหว่างสุนัขในกลุ่มควบคุมและสุนัขกลุ่มทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ใช้ Mann-Whitney rank sum test ในการศึกษาความแตกต่างของระดับความรุนแรงของ รอยโรคในส่วนโกลเมอรูลัสของไต และคะแนนการย้อมติดสีอิมมูนโนฮิสโตเคมี