บทความพิเศษ

ปัญหาบางประการในการทำ ออโตเรดิโอกราฟี่ ด้วยวิธีใช้ ฟิล์ม ลอก

วิเชียร ดิลกสัมพันธ์ พ.ด.

(ภาควิชากายวิภาคศาสตร์)

(หัวหน้าภาควิชา : ศาสตราจารย์ นายแพทย์เธียร อุทยานัง)

การทำ ออโตเรดิโอกราฟี่ เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อาจทำได้หลายวิธี เช่น เอา ฟิล์ม ทั้งแผ่นมาสัมผัสกับ เส็คชั่น ที่มีสารกัมมันตรังสีโดยตรง (คอนแท็คท ออโตเรดิโอกราฟี่) หรือหยดน้ำยา อิมัลชั่น ลงบน เส็คชั่น ที่มีสารกัมมันตรังสี[๑, ๒] หรือโดยใช้ ฟิล์ม ลอก (สตริปปิ่งก์ ฟิล์ม).

หลักการของวิธี ฟิล์ม ลอกก็คือลอกเอาเฉพาะแผ่น อิมัลชั่น ของ ฟิล์ม จากแผ่นกระจกหรือแผ่น อะซีเตท แล้วเอามาแผ่คลุมบน เส็คชั่น หรือสิ่งย้ายที่มีสารกัมมันตรังสีบน สไลด. จะย้อมสี เส็คชั่น ก่อนหรือหลังจากที่แผ่น อิมัลชั่น ถูกกัมมันตรังสีแล้วก็ได้. เส็คชั่น ที่ไม่ย้อมสีก็อาจศึกษาได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซนิคเฟส คอนทราสุท.

ข้อดีของวิธี ฟิล์ม ลอก ก็คือแผ่นอิมัลชั่น ที่ลอกออกมามีความหนาสม่ำเสมอและเรียบจึงแนบกับ เส็คชั่น ได้สนิทและถูกกัมมันตรังสีใน เส็คชั่น ได้อย่างสม่ำเสมอ, ทำให้การอ่านผลเป็นไปอย่างตรงตามความเป็นจริง รวมทั้งความสัมพันธ์ของกัมมันตรังสีที่ปรากฏบนแผ่นอิมัลชั่น กับจุลลักษณะของส่วนสร้างต่างๆ ก็ถูกต้องด้วย.

ข้อเสียของวิธีนี้มีบ้าง เช่น

ก. อาจมีการสูญเสียสารกัมมันตรังสีไปบ้างในระหว่างกระบวนการ ซึ่งต้องผ่านน้ำ.

ข. ความไวค่อนข้างต่ำ.

ค. แผ่น อิมัลชั่น อาจย้อมติดสีด้วย และทำให้ เส็คชั่น ย้อมติดสีได้ช้าลง, ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลยากขึ้น.

วิธีการทำ ฟิล์ม ลอกมีหลายวิธี.(๓, ๔) ผู้รายงานเลือกใช้และดัดแปลงวิธีที่เคยทำในแผนกกายวิภาคศาสตร์, มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย.(๕)

การทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์ ไม่ว่าจะทำในสถานที่ใดก็ตาม มักจะมีปัญหายุ่งยากเกิดขึ้นไม่มากก็น้อย, ซึ่งขึ้นอยู่กับอุปกรณ์การทำงาน, วิธีการ, สิ่งแวดล้อม และดินฟ้าอากาศ. ถ้ามีอุปกรณ์พร้อมเพรียง, วิธีการดีและดินฟ้าอากาศเหมาะก็จะเกิดปัญหาต่าง ๆ ขึ้นน้อยมาก. ในการทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์ ของผู้รายงาน(๖, ๗) ในปี พ.ศ. ๒๕๐๕ - ๒๕๑๑ ได้ ประสบ ปัญหา และ ความ ยุ่งยาก หลายประการที่แตกต่างจากที่เคยทำมาแล้วในแคลิฟอร์เนีย, จึงขอนำมารายงานไว้พร้อมทั้งวิธีการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ เพื่อประโยชน์แก่ผู้ที่จะทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์ต่อไป.

ลำดับปัญหาและความยุ่งยากที่เกิดขึ้นมีดังนี้

๑. การติด เส็คชั่น พารัฟฟิน บนสไลด.

๒. การทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์.

๓. การย้อมสี เส็คชั่น ในวิธีการทำฟิล์ม ลอก.

๔. การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของ ออโตเรดิโอกราฟีค เส็คชั่น ที่ย้อมแล้ว.

๑. การติด เส็คชั่น พารัฟฟิน บนแผ่นสไลด. ต้องใช้เทคนิคพิเศษ. ที่สำคัญก็คือต้องมีน้ำยาซับติด โฆรม—อะลัม (น้ำยา สัยยิงก์) ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ : เจละติน ๕ ก., โปแตสเสียม โฆรเมียม สัลเฟต (โฆรม—อะลัม) ๐.๕ ก., เติมน้ำกลั่นจนครบ ๑,๐๐๐ มล. ตั้งบนไฟอ่อน ๆ จน เจละติน ละลายหมดแล้วกรองผ่านสำลีแก้ว.

การติด เส็คชั่น พารัฟฟิน บนแผ่นสไลด ทำได้ ๒ วิธีคือ

๑. จุ่ม สไลด สะอาดในน้ำยาโฆรม—อะลัม แล้วพิงไว้ในตะแกรง เพื่อให้ น้ำยา ที่มากเกิน ไหลออกไป เสีย บ้าง. ปล่อยทิ้งไว้จนแห้ง. วาง สไลด ที่แห้งบนพื้นราบ, หยดน้ำกลั่นลงไป แล้วแผ่

เส็คชั่น พารัฟฟีน บนน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วยเล็กน้อยเพื่อให้ เส็คชั่น คลี่แผ่ออกเต็มที่. ค่อย ๆ เอียง สไลด เพื่อเทน้ำที่มากเกินออกและปล่อยให้แห้ง.

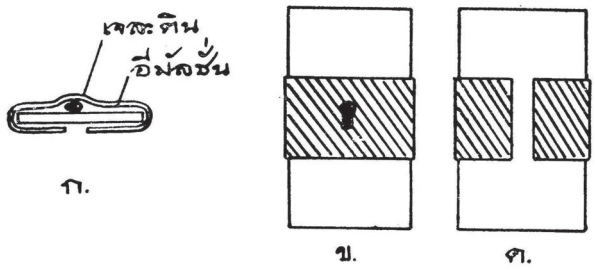
๒. อุ่นน้ำยา โฆรม—อะลัม ในอ่างน้ำให้มีอุณหภูมิ ๕๔—๕๖°ซ. แผ่พารัฟฟีน เส็คชั่น ให้ลอยบนน้ำยาโฆรม—อะลัม แล้วใช้ สไลด ช้อนขึ้นมา. เอียง สไลด ไว้ในตะแกรงจนแห้ง.

น้ำยาซับติด โฆรม—อะลัม นี้มีความสำคัญมากในการทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์. จากวิธีทำทั้งสองดังกล่าว น้ำยาจะเคลือบทั้งสองหน้าของ สไลด, ทำให้แผ่น อิมัลชั่น ที่ลอกจาก ฟิล์ม ติดบน เส็คชั่น ได้แนบแน่นและขอบของแผ่น อิมัลชั่น ซึ่งพ้นขอบ สไลด ก็จะพับไปติดกับด้านหลังของ สไลด ได้อย่างแนบแน่นเช่นกัน (รูปที่ ๑).

*ปัญหา*และความยุ่งยากที่เกิดในระยะนี้โดย มาก เนื่อง จาก ไม่ เข้าใจ และ ไม่เห็นความสำคัญของการจุ่ม สไลด ในน้ำยาซับติด โฆรม—อะลัม, อาทิเช่น

ก. การติด เส็คชั่น บน สไลด ด้วยวิธีการธรรมดา, ไม่ใช้น้ำยาซับติดโดยกรณีใด ๆ ก็ตาม, ทำให้เมื่อล้าง ฟิล์ม แล้วแผ่น อิมัลชั่น หลุดออกหรือมิฉะนั้นก็บวมโป่งและเคลื่อนที่.

ข. เนื่องจากไม่มีอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิให้คงที่ตามต้องการเมื่อติด เส็คชั่น โดยวิธีที่สอง, พนักงานวิทยาศาสตร์ได้ดัดแปลงวิธีการเอง เพื่อความสะดวก และรวดเร็วโดย การใช้ น้ำยาซับ ติด หยดบน สไลด และติด เส็คชั่น อย่างวิธีธรรมดา. ในกรณีนี้แผ่น อิมัลชั่น ไม่ติดกับด้านหลังของ สไลด. ดังนั้นในระยะล้าง ฟิล์ม



รูปที่ ๑. แสดงการแผ่แผ่น อิมัลชั่น คลุม เส็คชั่น และ สไลด.
ก. ด้านขวาง ข. ด้านหน้า ค. ด้านหลัง.

หลังจากถูกกัมมันตรังสีแล้ว แผ่น อิมัลชั่น จึงบวมและลอกหลุดง่าย และอาจพาเอาแผ่น อิมัลชั่น ทางด้านหน้าลอกหลุดออกไปด้วย.

ค. น้ำยาซับติด โซรม—อะลัม ที่เก่าเกินไปจะเสื่อมคุณภาพในการยึดแผ่น อิมัลชั่น ให้ติดกับ สไลด.

การแก้ไขปัญหา

ก. ต้องถือเทคนิคในการติด เส็คชั่น กับ สไลด นี้เป็นเรื่องสำคัญ. ต้องใช้น้ำยาซับติดเสมอและต้องจุ่ม สไลด ลงให้น้ำยาเคลือบ สไลด ทั้งสองด้าน.

ข. ถ้าขาดอุปกรณ์หรือไม่ถนัดในการทำวิธีที่สองก็ใช้วิธีที่หนึ่ง. เมื่อพนักงานวิทยาศาสตร์ ได้รับ คำแนะนำ และ แก้ไขแล้วปัญหาในระยะนี้ก็หมดไป.

ค. น้ำยา ซับติด ควรมีอายุ ไม่เกิน ๑ สัปดาห์.

เอา พารัฟฟีน ออกจาก เส็คชั่น โดยการ แช่ใน น้ำยา ตามลำดับดังต่อไปนี้ คือ ก์ซัลีน ๒ ครั้งๆ ละ ๑๐ นาที, แอลคอฮอล ๑๐๐% ๒ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที, แอลคอฮอล ๙๕% ๒ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที, แอลคอฮอล ๘๐% ๒ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที, แอลคอฮอล ๗๐% ๒ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที, และใน แอลคอฮอล ๕๐% นาน ๕ นาที แล้วแช่ไว้ในน้ำกลั่นพร้อมที่จะทำ ออโต-เรดิโอกราฟี่ ต่อไป. ควรเรียง สไลด ให้ด้านที่ติด เส็คชั่น อยู่ทางด้านเดียวกันเสมอแล้วนำเข้าห้องมืด.

๒. การทำ ออโตเรดิโอกราฟี่

การทำ ออโตเรดิโอกราฟี่ ยังไม่แพร่หลายและมีผู้รู้วิธีทำนี้ไม่มากนัก จึงขอนำมากล่าวไว้ ณ ที่นี้ด้วย.

สถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ ออโตเรดิโอกราฟี่

๑. ห้องมืดสนิท, มีอุณหภูมิ ๒๔—๒๗° ซ. และมีความชื้น ๕๕—๖๕ เปอร์เซ็นต์.

๒. หลอดปลอดภัย ควรเป็นวัตแรตแตน เบอร์ ๑, มีกระจกกรองแสงสีแดง, หลอดไฟ ๒๕ แรงเทียน พร้อมทั้งมีเครื่องเปลี่ยน โวลเตจ ได้.

๓. แว่นตาสีแดง เพื่อปรับสายตาให้เข้ากับห้องมืดได้เร็ว.

๔. กล่องทึบแสงซึ่งมีพัดลมเป่าภายในให้ สไลด แห้ง.

๕. อ่างแก้วหรืออ่าง พลาสติค ตื้น ๆ บรรจุน้ำกลั่นอุณหภูมิ ๒๔—๒๕° ซ. สำหรับลอยแผ่น อิมัลชั่น ที่ลอกจาก พีล์ม.

๖. ผ้าเช็คมือหลาย ๆ ผืนสำหรับเช็คให้มือแห้งอยู่เสมอ.

๗. เออาร์—๑๐ ออโตเรดิโอกราฟีค สตริปปิงก์ พีล์ม. ต้องเก็บในตู้เย็นทันทีที่ได้รับจากบริษัท.

๘. กล่องบรรจุ สไลด ทำด้วยพลาสติค สีน้ำตาล.

๙. เทป พันสายไฟสีดำ.

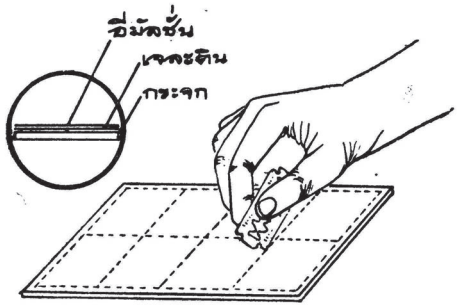
๑๐. ไครเออไรท (แคลเศียม สัลเฟต) วิธีการทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์ มีลำดับดังนี้คือ

๑. เอากล่อง พีล์ม ออกจากตู้เย็นประมาณครึ่งชั่วโมงก่อนใช้.

๒. ให้แสงปลอดภัยให้น้อยที่สุดในห้องมืดขณะทำงานเกี่ยวกับ พีล์ม ที่ยังไม่ถูกรังสี.

๓. เอา พีล์ม ออกจากกล่อง.

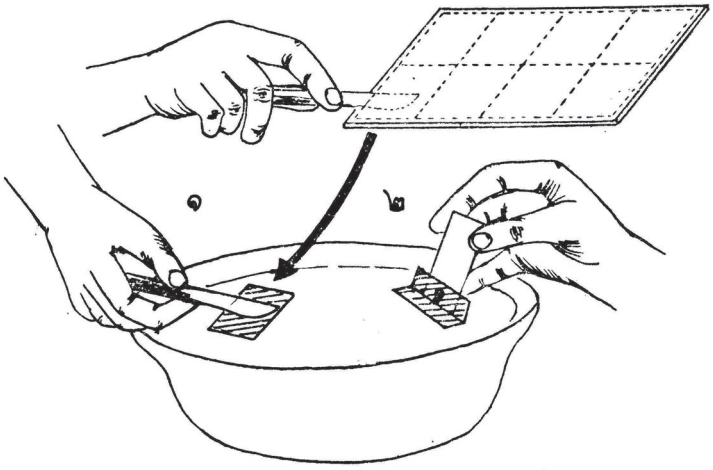
๔. ใช้ใบมีดโกนที่มีคมข้างเดียวกรีดตัดลงไปบนแผ่น อิมัลชั่น ห่างจากขอบของกระจก พีล์ม ประมาณ ๑/๔ นิ้วทั้งสี่ด้าน. กรีดตัดแผ่น อิมัลชั่น ขนาด ๑×๒ นิ้ว (รูปที่ ๒).



รูปที่ ๒. แสดงการกรีดแบ่งแผ่น อิมัลชั่น. รูปภายในวงกลมแสดงชั้นต่าง ๆ ของแผ่น พีล์ม.

๕. ใช้ใบมีดแซะลอกขอบของแผ่นอิมัลชั่น ให้เผยอขึ้นจากพื้นกระจก พีล์ม แล้วสอดใบมีดแซะให้ออกมาเป็นแผ่นหรือจะใช้นิ้วมือแห้งสนิทจับขอบของแผ่นลอกออกมาเป็นแผ่นก็ได้. การลอกนี้ต้องทำช้า ๆ. ถ้าลอกดีจะได้แผ่นตามที่กรีดไว้. คว่ำหน้าแผ่นลงบนผิวน้ำในอ่างแก้ว (รูปที่ ๓.๑). ประมาณ ๑—๒ นาทีแผ่นอิมัลชั่น จะบวมโตขึ้นประมาณสองเท่าของขนาดเดิม.

ข้อสังเกต เออาร์—๑๐ ออโตเรดิโอกราฟีค สตริปปิงก์ พีล์ม มีชั้นอิมัลชั่น อยู่บนสุด, ชั้นกลางเป็น เจละติน, และชั้นล่างเป็นแผ่นกระจก (รูปที่ ๒ ในวงกลม). เวลาลอกจะได้ได้ทั้งชั้น อิมัลชั่น



รูปที่ ๓.๑ แสดงการลอก ฟิล์ม แล้วคว่ำลงบนผิวน้ำ.
๓.๒ แสดงการเอา สไลด ช้อนแผ่น อิมัลชั่น ให้แผ่คลุมบน เส็คชั่น.

และชั้น เซละติน ออกมาด้วยกัน. เมื่อคว่ำหน้าลงน้ำชั้น อิมัลชั่น จึงอยู่ข้างล่างและแตะกับผิวน้ำ (รูปที่ ๓.๑).

๖. สอด สไลด เข้าใต้แผ่น อิมัลชั่น ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำ. ค่อย ๆ ยก สไลด ขึ้นให้เอียงประมาณ ๓๐° กับแนวระดับจนขอบด้านยาวของแผ่น อิมัลชั่น แตะกับ สไลด แผ่น อิมัลชั่น จะแผ่คลุมไปบน เส็คชั่น ในขณะที่ค่อย ๆ ยก สไลด ขึ้นพ้นน้ำ (รูปที่ ๓.๒). ขยับให้กระจกเอียงซ้ายและขวาให้ส่วนของแผ่น อิมัลชั่น พับโอบไปติดกับด้านหลังของ สไลด.

๗. เสียบปลายข้างหนึ่งของ สไลด ติดกับที่หนีบหรือลวดสปริงที่ฝากล่องทึบแสง. เมื่อคว่ำฝาปิดกล่อง สไลด จึงห้อยอยู่ในกล่อง. ใช้พัดลมเป่าจนแห้งสนิท, ซึ่งใช้เวลาประมาณ ๑—๑½ ชั่วโมง. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิห้องและจำนวน สไลด ในกล่อง.

๘. ดึง สไลด จากที่หนีบหรือลวดสปริงจากฝากล่องและเรียงเก็บไว้ในกล่องเก็บ สไลด พลาสติค สีน้ำตาลซึ่งใส่ไดรเออไรท ไว้ดูดความชื้น. ต้องใส่ สไลด เปล่าหนึ่งอันคั่นระหว่าง ไดรเออไรท และ สไลด เส็คชั่น เสมอ.

๙. ปิดฝากล่อง พลาสติค ให้สนิท และใช้ เทป พันสายไฟสีดำพันทับรอยต่อให้รอบเพื่อป้องกันการถ่ายเทของอากาศ. เก็บกล่อง สไลด นี้ไว้ในตู้เย็น

(๔—๕° ซ.) เพื่อให้แผ่น อิมัลชั่น ได้ถูกกับกัมมันตรังสีจาก เส็คชั่น นานตามต้องการ, ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของ ไอโสโทป ที่ใช้. ผู้รายงานได้ใช้กำมะถัน^{35} ๕๐ ไมโครคูรี/ ๑๐๐ กรัม ของน้ำหนักตัว, ใช้เวลา ๒๘ วัน.

ปัญหา และความยุ่งยากที่เกิดขึ้นในระยะนี้มีดังนี้

ก. การเอาแผ่น อิมัลชั่น แผ่นบนเส็คชั่น

ในระยะนี้เกิดขึ้นจากทั้งด้านอุปกรณ์และสิ่งแวดล้อม.

๑. *ห้องมืด* ต้องมีห้องมืดสนิทที่ปรับอากาศได้จึงจะสะดวกต่อการปฏิบัติงาน, มิฉะนั้นการควบคุมอุณหภูมิน้ำที่ต้องให้อยู่ที่ ๒๔—๒๕° ซ. จะทำได้ยาก, ต้องวัดอุณหภูมิน้ำบ่อย ๆ และคอยเติมน้ำกลั่นที่เย็นกว่า.

๒. *เครื่องดูดความชื้นในห้องมืด* ถ้าไม่มีใช้ก็ต้องทำงานตามธรรมชาติของดินฟ้าอากาศ ทำให้ได้ผลดีบ้างตามกาละ.

๓. *หลอดไฟปลอดภัยในห้องมืด* ถ้าไม่มีเครื่องควบคุม โวลเตจ ให้มืดน้อย หรือมากตามต้องการ ก็จะต้องทำงานในที่มืดเกือบสนิทตลอดเวลา ซึ่งทำให้ทำงานไม่สะดวก.

๔. *การเก็บ ฟิล์ม* ถ้าเก็บในตู้เย็นเฉพาะทันทีที่ได้รับจากบริษัทก็จะไม่มีปัญหายุ่งยาก. แต่ถ้าเก็บรวมกับของอื่นและตู้เย็นที่เก็บนั้นต้องทำความสะอาดกันบ่อย ๆ, น้ำแข็งละลายออกและอาจซึมกล่องบรรจุ ฟิล์ม ทำให้ ฟิล์ม เปียก. การลอกแผ่น อิมัลชั่น ออกจาก ฟิล์ม ที่เคยเปียกจะทำได้ยากมากเพราะติดกับกระจกแน่นและเปื่อยยุ่ย.

ข. การลอกแผ่น อิมัลชั่น จากกระจก ฟิล์ม

๑. เมื่อเอา ฟิล์ม ออกจากตู้เย็นอย่านำไปใช้ทันทีเพราะความชื้นในอากาศจะมาเกาะกระจก ฟิล์ม เป็นเหงื่อและทำให้ อิมัลชั่น ชื้น. ถ้าทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนานเกินไปก็ลอกแผ่น อิมัลชั่น ได้ยากอีก. ฉะนั้นต้องคำนึงถึงอุณหภูมิของอากาศ

ในขณะนั้นด้วย. ถ้าอากาศร้อนก็เอากล่องฟิล์ม ออกมาไว้นอกตู้นาน ๒๐—๓๐ นาที, ถ้าอากาศเย็นก็ใช้เวลานาน ๓๐—๔๐ นาที, โดยเฉลี่ยประมาณ ๓๐ นาที (ที่มลรัฐ แคลิฟอร์เนีย อากาศเย็นจัดตลอดปีต้องใช้เวลานานถึง ๖๐ นาที).

๒. เมื่ออากาศชื้นมาก, ซึ่งมักเกิดในฤดูฝนและฤดูร้อน, ชั้น อิมัลชั่น ดูดกระจกแน่นทำให้ลอกเป็นแผ่นบริบูรณ์ได้ยาก. ต้องใส่เครื่องดูดความชื้นในห้องมืดมิฉะนั้นก็ต้องใช้ความอดทนและประณีตในการลอกให้มากขึ้น.

๓. ถ้าอากาศแห้งมากเกินไป, ซึ่งมักเกิดในฤดูหนาว, จะลอกแผ่น อิมัลชั่น ได้ง่าย. แต่มีปัญหาเกิดขึ้นบ่อย ๆ จากไฟฟ้าสถิตย์เป็นเรื่อง ๆ ในขณะลอกแผ่น อิมัลชั่น ทำให้การอ่านและการแปลผลยาก. วิธีแก้อาจทำได้โดยพยายามลอกช้า ๆ. ถ้าลอกช้า ๆ แล้วยังเกิดไฟฟ้าสถิตย์อีกก็แก้โดยเปิดน้ำประปาให้ไหลอยู่ตลอดเวลาเพื่อช่วยเพิ่มความชื้นขึ้น.

๔. เมื่อลอกออกแล้วต้องรีบคว่ำลอยบนผิวน้ำทันที. ถ้าอยู่ในอากาศนานเกินไป แผ่น อิมัลชั่น จะม้วนตัวและไม่คลี่ออกเป็นแผ่น. วิธีแก้ไขก็คือ ต้องลอกให้ใกล้กับผิวน้ำที่สุด.

๕. อย่าทิ้งแผ่น อิมัลชั่น ไว้บนผิวน้ำนานเกินไปเพราะจะบวมมากและจมไปอยู่ใต้น้ำ. ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงเกิน ๒๕° ซ. จะทำให้แผ่น อิมัลชั่น บวมเร็วและจมลงจนยากที่จะทราบได้ว่าด้านไหนเป็นด้านเจละติน.

๖. การเอา สไลด ช้อนให้แผ่น อิมัลชั่น คลุม เส็คชั่น เรียบร้อยนั้นในการปฏิบัติทำได้ไม่ง่ายนักเพราะต้องทำในที่มืด. ดังนั้นจึงต้องติด เส็คชั่น ให้อยู่กึ่งกลาง สไลด เสมอและเรียงให้หันหน้าไปทางเดียว, เพราะถ้ามัวแต่ดูว่า เส็คชั่น อยู่ตรงไหนและทางด้านไหนของ สไลด แผ่น อิมัลชั่น ก็จะบวมมากเกินไปและจมน้ำไปเสียก่อน.

๗. ต้องดูว่าแผ่น อิมัลชั่น ที่คลุม เส็คชั่น นั้นเรียบจนไม่มีรอยย่นเลย. ถ้ามีรอยย่นต้องแตะรั้งแผ่น อิมัลชั่น ทางด้านหลัง สไลด ให้ทางด้านหน้าตึงและเรียบ.

ค. การทำให้ ฟิล์ม แห้ง

ในขณะที่ขาดภาชนะที่มีดสนิทที่มีพัดลมเป่าให้ สไลด แห้ง (สั่งไม่ได้เนื่องจากไม่มีใน แคตะลอก) ผู้รายงานได้ใช้วิธีเรียง สไลด ที่มีแผ่น อิมัลชั่น คลุมอยู่นั้น

กับขอบของถาดอะลูมิเนียมขอบสูงแล้วใช้พัดลมเป่า. การทำเช่นนี้เกิดมีความยุ่งยากขึ้นหลายอย่าง เช่น

๑. การเรียง สไลด พิงกับขอบของถาดนั้นเปลืองเนื้อที่มากเพราะต้องเรียงห่างกันพอควร, มิฉะนั้นแผ่น อิมัลชั่น จะติดกันและเมื่อดึงแยกจากกันก็จะขาด, หลุด, หรือเคลือนที่ได้.

๒. สไลด ที่พิงอยู่กับขอบถาดนี้ล้มง่ายเมื่อถูกกระทบกระเทือนเพียงเล็กน้อย. ลมจากพัดลมก็ทำให้ล้มได้. ทำให้แผ่น อิมัลชั่น เคลือนที่, ลอกหลุด, และสกปรก.

๓. เสียเวลารอคอยในห้องมืดนานมากเพราะใช้พัดลมเป่าแรง ๆ ไม่ได้.

๔. สไลด แห้งไม่พร้อมกันเพราะถูกกระแสลมเป่าไม่เท่ากัน.

๕. พัดลมพาฝุ่นละอองปลิวมาติดได้ง่าย.

ผู้รายงานได้แก้ไขโดยทำกล่องทึบแสงสำหรับทำให้ สไลด แห้งแบบง่าย ๆ และใช้เครื่องเป่าผมช่วยเป่าในกล่อง. โดยวิธีนี้ทำให้ สไลด แห้งได้เร็วพร้อม ๆ กัน (๘) ความยุ่งยากต่าง ๆ ดังกล่าวก็หมดไป.

ง. การล้าง ฟิล์ม

เมื่อถึงกำหนดที่ ฟิล์ม รับกัมมันตรังสีนานพอแล้ว นำกล่องเก็บ สไลด ออกจากตู้เย็นเข้าห้องมืด. เปิดกล่องนำเอา สไลด มาเรียงในที่จับที่ทำด้วยแก้ว แล้วจุ่มในน้ำกลั่นและน้ำยาในอ่างแก้ว (อุณหภูมิ ๑๗—๑๘° ซ.) ตามลำดับดังนี้

๑. จุ่มในน้ำกลั่นนาน ๑ นาทีเพื่อให้อิมัลชั่น เปียกสม่ำเสมอ.

๒. จุ่มในน้ำยา โคดัค ดีเวลอเปอร์ดี—๑๑ นาน ๘ นาที. ขณะที่จุ่มในน้ำยานี้ห้องควรมืดสนิท.

๓. จุ่มในน้ำกลั่นนาน ๓๐ วินาที.

๔. จุ่มในน้ำยา แอมฟิกซ ของ อักฟา นาน ๑๕ วินาที.

๕. จุ่มในน้ำกลั่นอีก ๓ อ่าง ๆ ละ ๑๐ นาที.

เอา สไลด ขึ้นจากน้ำกลั่น, ปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง แล้วเก็บไว้เพื่อย้อมสีต่อไป หรือจะศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เฟส คอนทราสท ในตอนนี้ก็ได้.

*ปัญหา*ยุ่งยากที่เกิดขึ้นในระยะการล้างฟิล์ม มีดังนี้

๑. เมื่อนำกล่อง สไลด จากตู้เย็นเข้าห้องมืดแล้วเปิดกล่องเอา สไลด ออก

ล้างทันที ถ้าห้องมีความร้อนและมีความชื้นมาก ไอน้ำจะจับ อิมัลชั่น เป็นเหงื่อทำให้แผ่น อิมัลชั่น เปียกไม่เสมอกัน. ในกรณีนี้ควรรอสักพักหนึ่งก่อนเปิดกล่อง.

๒. การควบคุมอุณหภูมิของน้ำกลั่นและน้ำยาต่าง ๆ เป็นปัญหาค่อนข้างยุ่งยาก ดังกล่าวแล้ว ต้องคอยวัดอุณหภูมิและเติมน้ำยาที่เย็นกว่าอยู่ตลอดเวลา.

๓. ขณะที่จุ่มที่จับ สไลด ในน้ำยาดีเวลอเปอร์ ควรให้ห้องมืดจริง ๆ จึงทำให้การปฏิบัติงานต่อเนื่องค่อนข้างยาก. ดังนั้นต้องอาศัยการจดจำเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ที่วางไว้อย่างมีระเบียบ เช่น นาฬิกาตั้งเวลา, ที่จับ สไลด, และอ่างน้ำยาต่าง ๆ เพราะในการปฏิบัติงานตอนนี้ต้องใช้มือคลำเป็นส่วนใหญ่.

๔. เมื่อพ้นระยะจุ่มในน้ำยา แอมฟิกซแล้วอาจเพิ่มแสงให้พอเห็นได้ลาง ๆ. การที่ไม่มีเครื่องปรับ โวลเตจ ของหลอดป่องกันภัยจึงทำได้ลำบาก.

๕. ตอนที่จุ่มในน้ำกลั่น อย่าเขย่าที่จับสไลด เป็นอันขาดเพราะแผ่น อิมัลชั่น จะบวมมากและลอกหลุดได้ง่ายที่สุด. ต้องระวังอย่าให้แผ่น อิมัลชั่น เปลี่ยนอุณหภูมิทันทีทันใดเพราะแผ่น อิมัลชั่น จะพองเป็นเม็ดใส ๆ ได้. ระยะนี้ควรต้องคอยดูที่สไลด ถ้า ฟิล์ม บวมพองมาก อาจเอาชั้นจากน้ำเสียเลยก็ได้มิฉะนั้น ฟิล์ม อาจเลื่อนที่หรือลอกหลุดไปก็ได้. ถ้าการติดเส็คชั่น กับ สไลด ไม่ถูกวิธีตั้งแต่ต้นหรืออุณหภูมิของน้ำสูงกว่าที่กำหนด อิมัลชั่นจะบวมและพองเป็นเม็ดใสมากขึ้นอีก.

*การแก้ไข*ในระยะนี้ก็คือ ต้องควบคุมอุณหภูมิของน้ำกลั่นและน้ำยาให้คงที่ที่ ๑๗—๑๘° ซ. ตลอดเวลา.

๓. การย้อมสี

มีหลายวิธี(๑, ๒, ๔, ๕) แต่ต้องย้อมสีในอุณหภูมิต่ำตามที่กำหนด. การย้อมสีในอุณหภูมิห้อง อิมัลชั่น จะติดสีจัดเกินไปและยังอาจบวมและลอกหลุดได้ การใช้สีฮีมาทอกซีย์ลิน—อีโอสิน ธรรมดาจะทำให้ติดสีจัดเช่นกัน. ผู้รายงานได้เลือกใช้วิธีของ บีลังเกอร์(๑๐) ซึ่งใช้สีผสมของคิงก์สลีย์(๑๑) และสี เบสิค ฟุฆสิน ร่วมกัน. การย้อมวิธีนี้ต้องการอุณหภูมิที่ ๔° ซ. จึงเกิด*ปัญหา*ยุ่งยากในการควบคุมอุณหภูมิ.

*วิธีแก้*ทำดังนี้

๑. เอาอ่างแก้วน้ำยาเก็บค้างคืนในตู้เย็น. เมื่อเอาออกจากตู้เย็นก็วางลงในอ่างอะลูมิเนียม ที่มีก้อนน้ำแข็งและเกลือเล็กน้อย. วัดอุณหภูมิของน้ำยาจนได้ ๔°ซ. แล้วจึงเริ่มย้อม. ต้องคอยวัดอุณหภูมิอยู่ตลอดเวลา. ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นก็ต้องเติมน้ำยาที่เย็นกว่าและคนน้ำยาตลอดเวลา.

๒. เอา ออโตเรดิโอกราฟีค เส็คชั่น ทีละ ๑ สไลด จากสัตว์ทดลองแต่ละพวกมาย้อมเป็นชุด ๆ ไป เพราะถ้าย้อมทุกสไลด ของสัตว์ทดลองพวกหนึ่งพร้อมกัน ถ้าย้อมเสียก็จะเสียไปหมดพวก. ถ้าพวกหนึ่งเสียเพียง ๑—๒ สไลด ในการย้อมหลายชุดที่เหลือ ก็ยังเพียงพอสำหรับการศึกษา.

๔. การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

ในการศึกษาดูด้วยตา จากกล้องจุลทรรศน์ไม่ค่อยมีปัญหานัก เพราะอาจจะโฟคัส ให้เห็น แกรนูล ในชั้น อิมัลชั่น ซึ่งเกิดจากกัมมันตรังสีและเห็นเซลล์ได้. โดยการขยับที่ปรับ โฟคัส เพียงเล็กน้อยก็จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง แกรนูล กับเซลล์ได้ดี. ถ้าในการย้อม อิมัลชั่น ติดสีทึบก็จะศึกษาได้ยากขึ้น.

การถ่ายภาพ ออโตเรดิโอกราฟีค เส็คชั่น จากกล้องจุลทรรศน์ประสบปัญหายุ่งยากบ้าง เนื่องจากระดับของเซลล์และแกรนูล ในแผ่น อิมัลชั่น อยู่คนละระดับ. เมื่อ โฟคัส ที่ระดับ แกรนูล ภาพของเซลล์ก็จะไม่ค่อยชัด. การถ่ายภาพให้ชัดเจนทั้ง แกรนูล และเซลล์จึงค่อนข้างยากมาก.

การถ่ายภาพขาวดำจะดูได้ยากกว่า เพราะ แกรนูล มีสีดำหรือน้ำตาลแก่, แม้ว่าเซลล์และสารระหว่างเซลล์ถูกย้อมติดสีอื่น ก็จะเห็นเป็นสีดำเช่นกัน. การถ่ายภาพสีจะแยก แกรนูล จากสีของ ศัยโตพลาสม, นูเคลียส, และเนื้อระหว่างเซลล์ได้ง่ายกว่า.

ผลการทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์

ในการวิจัยเรื่อง อิทธิพลของปริมาณเคเสอิน ในอาหารต่อการขับกำมะถันกัมมันตรังสีในกระดูกอ่อน[๖] และผลของอะนาโบลิค สตีรอยด (ดูราบอลิน)[๗] ผู้รายงานได้ทำ ออโตเรดิโอกราฟีค เส็คชั่น ของกระดูก ทิเบีย รวมทั้งสิ้น ๑,๒๙๐ สไลด. สไลด เสียไป ๒๘๖ อัน (ประมาณ ๒๒%). สไลด ที่เสียแยกได้ตามสาเหตุดังนี้

๑. แผ่น อิมัลชั่น ลอกหลุดจาก สไลด ๓๐ สไลด.

๒. แผ่น อิมัลชั่น บวมและย่น ๕๐ สไลด.

๓. อิมัลชั่น ติดสีทึบเกินไป ๑๖๐ สไลด.

๔. อิมัลชั่น ถูกแสงจากไฟฟ้าสถิตย์ ขณะลอก พีล์ม ๖ สไลด.

สาเหตุ ๑ และ ๒ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายได้มากนั้น อาจหลีกเลี่ยงได้โดยง่ายหากติด เส็คชั่น กับ สไลด โดยใช้น้ำยาชับติด โฆรม—อะลัม ให้ถูกวิธี.

สรุป

ได้ชี้แจงวิธีการทำ ออโตเรดิโอกราฟีค เส็คชั่น โดยละเอียด. ได้แสดงความยุ่งยากที่เกิดขึ้นเนื่องจากการขาดอุปกรณ์, สภาวะธรรมชาติของดินฟ้าอากาศ, และข้อบกพร่องในการปฏิบัติ พร้อมทั้งวิธีแก้ไขความยุ่งยากแต่ละข้อ.

เอกสาร

๑. Bélanger, L.F., and C.P. Lebond: A Method for Locating Radioactive Elements in Tissues by Covering Histological Sections with a Photographic Emulsion. Endocrinology 1946, 39: 8.

๒. Bélanger, L.F.: Improvements to the Melted Emulsion Technique of Autoradiography. Nature 1952, 170: 625.

๓. Pelc, S.R.: Autoradiograph Technique. Nature 1947, 160: 749.

๔. Fitzgerald, P.J.: Autoradiography in Cytology. In Mellors, R.C. ed. Cytology. McGraw-Hill Book, New York, 1959, p. 381.

๕. Bryant, B.J., et al.: Procedures for Autoradiographs—Methods in Use as May, 1960, in the University of California, Berkeley.

๖. Diloksambandh, V.: Influence of Dietary Casein on S^{35} Fixation Cartilages. J. Med. Ass. Thailand 1970, 53: 85.

๗. Diloksambandh, V.: The Effects of an Anabolic Steroid (Durabolin) on S^{35} Fixation in Cartilages in Rats Fed with Different Levels of Casein. In preparation.

๘. Diloksambandh, V.: การประดิษฐ์กล่องทึบแสงมีลมเป่าให้ ฟีล์ม แห้งในการทำ ออโตเรดิโอกราฟีย์. กำลังส่งไปตีพิมพ์.

๙. Boyd, G.A.: Autoradiography in Biology and Medicine. Academic Press, New York, 1955.

๑๐. Bélanger, L.F.: Staining Processed Radiographs. Stain Techn. 1961, 36: 313.

๑๑. Kingsley, D.M.: A New Hematological Stain I. Constituents and Methods of Use. Stain Techn. 1935, 10: 127.