

ภาคผนวก

### การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่ออวัยวะ

1. นำอวัยวะมาล้างด้วย 0.1M phosphate buffer saline pH 7.4 จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาคงสภาพใน 10% buffer formalin นาน 24 ชั่วโมง เนื้อเยื่อที่ผ่านการคงสภาพจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดยาว 1 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำมาล้างน้ำ ประมาณ 30 นาที (ให้ formalin ออกให้หมด) แล้วนำไปผ่านกระบวนการโดยใช้เครื่อง automatic tissue processor ตามขั้นตอนดังนี้

70% ethyl alcohol	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 1 ครั้ง
80% ethyl alcohol	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 1 ครั้ง
95% ethyl alcohol	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 2 ครั้ง
100% ethyl alcohol	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 3 ครั้ง
xylene + 100% ethyl alcohol	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 1 ครั้ง
xylene	ครึ่งละ 1 ชั่วโมงครึ่ง 2 ครั้ง
paraffin หลอมเหลว	ครึ่งละ 2 ชั่วโมง 2 ครั้ง

2. นำเนื้อเยื่อเข้าเครื่องปรับความดันสุญญากาศ ตั้งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

3. นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน (embedding) โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน ทิ้งไว้ให้พาราฟินแข็งตัว

4. นำบล็อกพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อเยื่อฝังอยู่มาตัดแต่งหน้าบล็อก แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครทอม ความหนาของการตัด 5 ไมโครเมตร

5. นำ sections ที่ได้มาติดกับสไลด์กระจก โดยนำ sections ไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (tissue floating bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในอ่างน้ำกลั่น แล้ววางกระจกสไลด์พร้อม sections อยู่ที่แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

6. นำกระจกสไลด์ที่มี sections ไปย้อมสี โดยสีที่ใช้ย้อมคือ hematoxylin และ eosin มีขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

6.1 การขจัดพาราฟิน (deparaffinization) โดยจุ่มกระจกสไลด์ที่มี sections อยู่ลงไป ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.2 การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยเริ่มจาก

6.2.1 100% ethyl alcohol 2 นาที

6.2.2 95% ethyl alcohol 2 นาที

6.2.3 70% ethyl alcohol 2 นาที

แล้วนำมาลงสี hematoxylin (ย้อมสีครั้งแรก)

7. การย้อมสีครั้งแรก (primary stain) ย้อมด้วย hematoxylin นานประมาณ 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา จนกระทั่งน้ำที่ล้างสี ไม่มีสีม่วงออกมาอีก

8. การล้างสีส่วนเกิน โดยการจุ่มสไลด์ที่มี sections อยู่ลงใน 1% acid alcohol 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1-2 นาที

9. การปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralization) โดยการจุ่มกระจกสไลด์ที่มี sections อยู่ลงใน lithium carbonate นานประมาณ 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1-2 นาที

10. การย้อมสีซ้ำ (counterstain) ย้อมด้วย eosin นาน 2 นาที

11. การขจัดน้ำ (dehydration) เริ่มจาก

11.1 70% ethyl alcohol จุ่ม 30 วินาที

11.2 95% ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

11.3 100% ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นทำให้แห้ง

12. การขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยการจุ่มกระจกสไลด์ที่มี sections อยู่ลงใน xylene 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยด mounting media ลงบนกระจกสไลด์แล้วปิดกระจกปิดสไลด์

13. นำกระจกสไลด์ที่มี sections ที่ย้อมสีเสร็จแล้ว ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์