

ภาคผนวก

## 1. การเปลี่ยนแปลงของท่อสร้างอสุจิ

ตารางผนวกที่ 1 ระดับการเปลี่ยนแปลงของท่อสร้างอสุจิ

| ตัวที่/กลุ่ม  | control         | vehicle         | CPA             | CPC10           | CPC11           | CPC12           | CPOH            |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1             | 0               | 2               | 3               | 3               | 3               | 3               | 3               |
| 2             | 1               | 1               | 3               | 3               | 3               | 2               | 3               |
| 3             | 1               | 1               | 3               | 3               | 4               | 2               | 2               |
| 4             | 0               | 1               | 3               | 3               | 3               | 2               | 2               |
| ค่าเฉลี่ย (X) | 0.5             | 1.25            | 3               | 3               | 3.25            | 2.5             | 2.5             |
| $\sum X$      | 2               | 5               | 12              | 12              | 13              | 10              | 10              |
| $(\sum X)^2$  | 4               | 25              | 144             | 144             | 169             | 100             | 100             |
| $\sum X^2$    | 2               | 7               | 36              | 36              | 43              | 26              | 26              |
| $\sigma$      | 0.58            | 0.5             | 0               | 0               | 0.25            | 0.58            | 0.58            |
| SE            | 0.29            | 0.25            | 0               | 0               | 0.12            | 0.29            | 0.29            |
| $X \pm SE$    | 0.50 $\pm$ 0.29 | 1.25 $\pm$ 0.25 | 3.00 $\pm$ 0.00 | 3.00 $\pm$ 0.00 | 3.25 $\pm$ 0.12 | 2.50 $\pm$ 0.29 | 2.50 $\pm$ 0.29 |

หมายเหตุ : วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะ ตามวิธีการของ Kaufman *et al.* (1956) และ Riengrojpitak (1977) แบ่งตามระดับการเปลี่ยนแปลงที่พบในท่อสร้างอสุจิ ได้เป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 เซลล์อสุจิมียังมีจำนวนมากบรรจุอยู่กลางท่อ เซลล์สร้างอสุจิระยะต่าง ๆ เป็นปกติ

ระดับ 1 จำนวนเซลล์อสุจิลดลง และสเปิร์มาติดบางเซลล์เสื่อม

ระดับ 2 จำนวนเซลล์อสุจิลดลงอย่างเด่นชัด และสเปิร์มาติดส่วนใหญ่เสื่อม มีท่อสร้างอสุจิจำนวนน้อยที่ปกติ

ระดับ 3 ท่อสร้างอสุจิทุกท่อแสดงลักษณะเหมือนกันคือ ไม่พบเซลล์อสุจิ สเปิร์มาไทด์ลดลง และอาจพบสเปิร์มาโทโกเนียเสื่อม

ระดับ 4 ในท่อสร้างอสุจิเหลือเพียงสเปิร์มาโทโกเนีย บางท่ออาจยังคงพบสเปิร์มาติด และสเปิร์มาไทด์ที่เสื่อม

ระดับ 5 ในท่อสร้างอสุจิเหลือเพียงเซลล์เซอร์โทลี อาจพบสเปิร์มาโทโกเนียได้ในบางท่อ

## 2. การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนทางพาราฟินเทคนิค (Humason, 1972)

| ขั้นตอนที่ | สารละลาย      | เวลา (ชั่วโมง) |
|------------|---------------|----------------|
| 1          | 70 % alcohol  | 5              |
| 2          | 70 % alcohol  | 2              |
| 3          | 80 % alcohol  | 1              |
| 4          | 80 % alcohol  | 1              |
| 5          | 95 % alcohol  | 1              |
| 6          | 95 % alcohol  | 1              |
| 7          | 100 % alcohol | 1              |
| 8          | 100 % alcohol | 1              |
| 9          | xylene I      | 1              |
| 10         | xylene II     | 1              |
| 11         | paraplast I   | 1.5            |
| 12         | paraplast II  | 1.5            |

## 3. การเตรียมสารเคมี และวิธีการย้อมสีทางพาราฟินเทคนิค

### 3.1 น้ำยาคงสภาพ

น้ำเกลือล้างเนื้อเยื่อก่อนคงสภาพ

Normal saline (NaCl) 0.9 เปอร์เซ็นต์

น้ำยาคงสภาพ Neutral buffered formalin solution (Drury *et al.*, 1967)

Formalin (30-40 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde) 100.00 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 900.00 มิลลิลิตร

Sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 4.00 กรัม

Sodium phosphate dibasic (anhydrous) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 6.50 กรัม

ผสมเข้าด้วยกัน

คุณสมบัติ : เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปตามห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เหมาะสำหรับรักษาสภาพเนื้อเยื่อทั่วไป ทั้งที่ต้องการย้อมสีธรรมดาและสีพิเศษ formalin จะเป็นตัวคงสภาพโปรตีนในไซโทพลาซึม ระยะเวลาในการรักษาสภาพประมาณ 24 ชั่วโมง หรือถ้าจำเป็นต้องรักษาสภาพไว้นานกว่านี้ก็ยังสามารถใช้ได้ ล้างออกด้วยน้ำไหลประมาณ 6 ชั่วโมง (Humason, 1972)

### 3.2 สีย้อม Harris's hematoxylin และ Eosin (Luna, 1960)

#### 3.2.1 Harris's hematoxylin

|                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| Hematoxylin crystal  | 5.00 กรัม         |
| Absolute alcohol     | 50.00 มิลลิลิตร   |
| Ammonium alum        | 100.00 กรัม       |
| Mercuric oxide (red) | 2.50 กรัม         |
| น้ำกลั่น             | 1000.00 มิลลิลิตร |

ต้มน้ำกลั่นในปิกเกอร์ขนาด 1,500 มิลลิลิตร ให้เดือด เติม ammonium หรือ potassium alum คนให้ละลาย ละลายผง hematoxylin ใน absolute alcohol ในปิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลายของ ammonium หรือ potassium alum ที่กำลังเดือด คนให้เข้ากัน ต้มต่อไปอีก 30 วินาที ยกลงแช่ในน้ำเย็น และเติม mercuric oxide ลงไปอย่างช้า ๆ ที่ละน้อย ไม่ควรเติมทีเดียวหมด เพราะจะกระเด็นซึ่งอาจเกิดอันตรายได้เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารุนแรง คนสารละลายให้เข้ากัน จนกระทั่งได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินเข้ม ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทใส่ขวดสีน้ำตาล เก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องรีบใช้ทันที ก็ใช้ได้เลยหลังจากที่สารละลายเย็นแล้ว สารละลายนี้เก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือนในที่มืด

การตรวจว่าสารละลายหมดอายุนั้นทำได้โดยหยดสารละลาย 3-5 หยด ในน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ถ้าได้สารละลายสีน้ำตาลแสดงว่าสารละลายหมดอายุแล้วให้ทิ้ง สารละลายที่เก็บไว้ก่อนใช้ให้เติม glacial acetic acid 2-4 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร เพื่อช่วยให้ hematoxylin เปลี่ยนเป็น hematein อย่างช้า ๆ และทำให้เกิดการติดสีนิวเคลียสดีขึ้น

## 3.2.2 การเตรียม Eosin

## ก. 1% Stock Alcohol Eosin

|                                           |                 |
|-------------------------------------------|-----------------|
| Eosin Y                                   | 1.00 กรัม       |
| น้ำกลั่น                                  | 20.00 มิลลิลิตร |
| ละลายเข้าด้วยกันแล้วจึงเติม 95% แอลกอฮอล์ | 80.00 มิลลิลิตร |

## ข. Working Eosin Solution

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Eosin stock solution | 1 ส่วน |
| แอลกอฮอล์ 80%        | 3 ส่วน |

ก่อนใช้ให้เติม glacial acetic acid 1-1.5 มิลลิลิตร ต่อสี 100 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน  
เพื่อการติดสีของ Eosin ที่จับกับไซโทพลาซึม

## 3.2.3 Acid alcohol 1%

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| แอลกอฮอล์ 70%     | 1000.00 มิลลิลิตร |
| Hydrochloric acid | 10.00 มิลลิลิตร   |

## 3.2.4 Ammonium water 0.2%

|                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| Tab water              | 1000.00 มิลลิลิตร |
| Ammonium hydroxide 28% | 2.00 มิลลิลิตร    |

#### 4. วิธีย้อมสี Harris's hematoxylin-Eosin (Luna, 1960)

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

- 4.1 deparaffinized โดยจุ่มใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 4.2 hydration ใน 100%alcohol, 95%alcohol, 70%alcohol และน้ำกลั่นครั้งละ 2 นาที
- 4.3 ย้อมสี Harris's hematoxylin 10 นาที
- 4.4 ล้างในน้ำประปาที่ไหลจนแผ่นเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงิน 5-10 นาที
- 4.5 differentiate ใน acid alcohol 1% โดยจุ่ม (dip) 1-2 ครั้ง
- 4.6 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที
- 4.7 จุ่มใน ammonium water solution 1 นาที
- 4.8 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที
- 4.9 ย้อมสี Eosin นาน 1-2 นาที
- 4.10 differentiate ใน 70%alcohol แล้วยกขึ้นอย่างรวดเร็ว
- 4.11 dehydrate ใน 95%alcohol, 100%alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อขจัดน้ำ
- 4.12 clearing ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 4.13 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นให้แน่นด้วยน้ำยา permount ทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนนำไป

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

ผล : นิวเคลียส ย้อมติดสีม่วงน้ำเงิน หรือน้ำเงิน

ไซโทพลาซึม ย้อมติดสีชมพูถึงส้มแดง