หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3.

วิธีดำเนินการ

1. การฆ่าสัตว์

ฆ่าสัตว์โดยวิธีคว้านสมอง (pith) ตัดผิวหนังออกจากลำตัวด้านหลังและด้านท้องของสัตว์โดยแบ่งเป็น

1.1 ส่วนหัว สำหรับคางคกและจงโคร่ง ด้านหลังตัดเอาส่วนต่อมพาโรติด ส่วนกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่างตัดเอาบริเวณที่ตรงกับส่วนต่อมพาโรติดของคางคกและจงโคร่ง ด้านท้องตัดเอาบริเวณต้นขาหน้า

1.2 ส่วนท้าย ตัดเอาบริเวณต้นขาหลัง ทั้งด้านหลังและด้านท้อง นำผิวหนังที่ได้ไปทำ frozen section และ paraffin section

2. การทำ frozen section ของผิวหนัง

2.1 การตัดและติด section

นำผิวหนังทั้งหมดมาติดบนแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง cryostat, IEC โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยาไครโอฟอร์ม (cryoform) ทันทีที่ตัดออกจากตัวสัตว์ แล้วทำให้เย็นจัดด้วยน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ทิ้งให้เนื้อเยื่อแข็งและเย็นจัดทั่วกันหมดประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำมาตัด section ด้วยเครื่อง cryostat ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ - 20° C ตัด section หนา 8 ไมครอน เก็บ section ไว้บนคัฟเวอร์ กลาส สำหรับวิธีการเก็บ section จะเก็บเป็นสองวิธีคือ

002011

2.1.1 การเก็บ section เพื่อนำไปศึกษาเอนไซม์ แอสิดฟอสฟาเตส เก็บโดยการติด section บน cover glass เก็บไว้ในเครื่อง cryostat เมื่อจะนำมาย้อมสี จึงเอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

2.1.2 การเก็บ section เพื่อนำไปศึกษาไขมัน เก็บโดยใช้พู่กันขนอ่อนช้อน section ขึ้นมาวางไว้ในหยดน้ำกลั่นที่หยดอยู่บนสไลด์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

2.2 การย้อมสี

2.2.1 การศึกษาเอนไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตส (Pearse, 1968)

หลักการ เมื่อ incubate section กับ incubation medium (pH 5.0) เอนไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตสจะไฮโดรไลส์ (hydrolyse) Sodium-β-glycerophosphate ได้ free phasphate เกิดขึ้น ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปกับ lead nitrate กลายเป็น lead phosphate และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อไปกับ ammonium sulfide จะได้ lead sulfide เกิดขึ้น เห็นเป็นตะกอนสีดำ ตรงบริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตส

วิธีการย้อม incubate section ใน Gomori's incubation medium ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผ่านลงใน 1 % yellow ammonium disulfide ในน้ำกลั่น 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และย้อมด้วย 1 % Eosin ในน้ำประมาณ 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วปิดสไลด์โดยใช้ glycerine jelly

สำหรับการย้อมควบคุม (control) มีวิธีการย้อมเหมือนกัน แต่ใช้ 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0) แทน 3 % Sodium-β-glycerophosphate ซึ่งเป็น substrate

2.2.2 การศึกษาไขมันโดยย้อมด้วย Oil red O. (Zugibe, 1970)

หลักการ เมื่อย้อม section ในสารละลายสี Oil red O สี Oil red O จะผ่านจากตัวทำละลายในสารละลาย เช่น propylene glycol เข้าสู่ส่วนที่มีไขมันของ section เห็นเป็นหยดไขมัน (droplet) สีแดง หรือ แดงอมส้ม

วิธีการย้อม

- ผ่าน section ลงใน absolute propylene glycol 2 นาที
- ย้อมด้วย Oil red O ใน propylene glycol 30 นาที
- ล้างสีที่มากเกินไปออกด้วย 85 % propylene glycol ในน้ำ 1 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วปิดสไลด์ด้วย glycerine jelly

สำหรับการย้อมควบคุม ใช้วิธีย้อมเช่นเดียวกัน แต่ก่อนย้อมต้องผ่าน section ลงใน petroleum ether ก่อน 30 นาที เพื่อล้างเอาไขมันที่อยู่ใน section ออก จากนั้นจึงนำไปย้อมตามขั้นตอนปกติ

3. การทำ Paraffin section ของผิวหนัง

3.1 การทำสไลด์

3.1.1 การทำสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะทางฮีสโตโลยี และฮีสโตเคมีเกี่ยวกับมิวโคโพลีแซคคาไรด์

นำผิวหนังทั้งหมดมาแช่ในน้ำยา Bouin's fluid ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 70 % เอธิลอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง และแช่ใน 70 % เอธิลอัลกอฮอล์ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปดึงน้ำออก (dehydrate) ด้วย 90 % เอธิลอัลกอฮอล์ 6 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น 95 % เอธิลอัลกอฮอล์ ทิ้งไว้ข้ามคืน (โดยเปลี่ยนอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง) และเปลี่ยนเป็นบิวทานอล 1 ชั่วโมง แช่ในไซลีน 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวกลางนำ paraffin เข้าแทรกในเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปแช่ในส่วนผสมของไซลีน และ paraffin ในอัตรา 1 : 1 ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น paraffin 2 ครั้ง ครั้งแรก 30 นาที ครั้งที่สอง

1 ชั่วโมง นำมาฝัง (embed) ใน paraffin หลังจากทิ้งไว้ให้แข็งดีแล้ว นำมาตัด section หนา 8 ไมครอน ติด section บนสไลด์ด้วยไข่ขาว (ใช้ไข่ขาว 1 หยดต่อน้ำกลั่น 10 มล.) โดยติด section ของสัตว์ทั้ง 5 ชนิดไว้บนสไลด์แผ่นเดียวกัน โดยที่ section ชิ้นที่ 1 จะติดบนสไลด์แผ่นที่ 1, ชิ้นที่ 2 ติดบนสไลด์แผ่นที่ 2 จนครบจำนวนสไลด์ที่ต้องการ ส่วน section ชิ้นต่อไปก็นำมาติดบนสไลด์แผ่นที่ 1, 2, 3 .... จนครบ ทำเช่นนี้กับ section ของสัตว์ทั้ง 5 ชนิด

3.1.2 <u>การทำสไลด์เพื่อศึกษาทางฮีสโตเคมีเกี่ยวกับฮอสโฟไลปิดและแคลเซียม</u>

วิธีการจะเหมือนกับข้อ 3.1.1 แต่เปลี่ยนน้ำยาเก็บรักษาเนื้อเยื่อจาก Bouin's fluid มาเป็น 10 % Formalin

3.1.3 <u>การทำสไลด์เพื่อศึกษาทางฮีสโตเคมีเกี่ยวกับไมโตคอนเดรีย</u>

นำผิวหนังทั้งหมดมาแช่ในน้ำยา Champy's fluid นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที นำไปแช่ในส่วนผสมของ glacial acetic acid (25 มล.) กับ 1 % chromium trioxide ในน้ำ (50 มล.) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที แล้วแช่ใน 3 % potassium dichromate ในน้ำ 72 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา (running tap water) 24 ชั่วโมง จากนั้นผ่านลงใน 70 % เอธิลอัลกอฮอล์และทำต่อไปเหมือนกับข้อ 3.1.1 จนถึงนำมาฝังใน paraffin แต่ต้องเปลี่ยนบิวทานอลมาเป็น 100 % เอธิลอัลกอฮอล์ จากนั้นตัด section หนา 4 ไมครอน ติดบนสไลด์ด้วยไข่ขาว โดยติด section ของสัตว์แต่ละชนิดแยกกัน คือสไลด์ 1 แผ่นจะติดเพียง 1 ชนิด ทั้งนี้เนื่องจากการติดสีของผิวหนังของสัตว์แต่ละชนิดไม่เท่ากัน จึงต้องแยกติดคนละสไลด์

3.2 การย้อมสี

3.2.1 การย้อมสีเพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปทางฮีสโตโลยี

ย้อม section ด้วยสี Ehrlich's acid haematoxylin และ Eosin Y จะได้นิวเคลียส (nucleus) ติดสีน้ำเงินเข้ม และไซโทพลาสซึม (cytoplasm) สีชมพู

3.2.2 การย้อมสีเพื่อศึกษาทางฮีสโตเคมี

3.2.2.1 การย้อมด้วยสี Alcian Blue เพื่อศึกษาสารพวก แอสิด มิวโคโพลีแซคคาไรด์ (Acid mucopolysaccharide) (Lison, 1954)

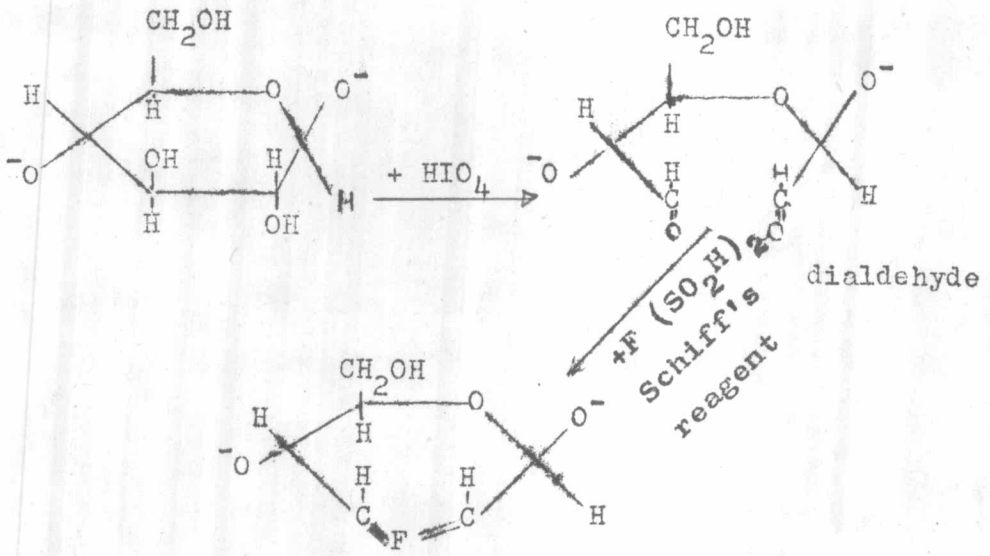
หลักการ สี Alcian Blue เป็นสีพวก Copper phthalocyanin ละลายได้ในน้ำ มีประจุบวกในตัว ดังนั้นมันจึงสามารถจับกับประจุลบของ sulfate ester group หรือ Carboxyl group ของพวก แอสิด มิวโคโพลีแซคคาไรด์ในสารละลายที่เป็นกรด ทำให้เกิดสีฟ้าแก่ (blue) ขึ้น

วิธีการย้อม

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำกลั่น
- ย้อมใน Ehrlich's acid haematoxylin 10 นาที
- ผ่านลงในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา ประมาณ 10-15 นาที ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ให้นิวเคลียสมีสีน้ำเงินเข้ม
- ย้อมใน 1 % Alcian Blue ใน 3 % acetic acid 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น, ดึงน้ำออกด้วยอัลกอรอล์ ทำให้ใสด้วยไซลีน แล้วปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

3.2.2.2 การย้อมด้วย Periodic acid-Schiff's reagent (PAS) เพื่อศึกษามิวโคโพลีแซคคาไรด์ (Culling, 1963)

หลักการ Periodic acid มีฤทธิ์เป็นตัวออกซิไดส์ (oxidize) อย่างแรง ซึ่งสามารถทำลาย-C-C-bond ที่ตำแหน่ง 1,2-glycol group (-CHOH-CHOH-) ให้ได้เป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) 2 หมู่ ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับ Schiff's reagent จะให้สารสีแดงทับทิม (margenta) เกิดขึ้น ปฏิกิริยาจะเป็นดังนี้



สารสีแดงทับทิม (margenta)

วิธีการย้อม

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำกลั่น
- ออกซิไดส์ด้วย 1 % Periodic acid ในน้ำ 10 นาที ที่ 17° C
- ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น

- ผ่านลงใน Schiff's reagent 30 นาที
- ผ่านลงใน Sulfite rinse 3 ครั้ง ครั้งแรก 1 นาที ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ครั้งละ 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 10 นาที
- ดึงน้ำออกด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ
- ทำให้ใสด้วยไซลีน
- ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

สำหรับการย้อมควบคุมของ PAS จะใช้วิธี Acetylation (Lillie, 1954) ซึ่งผลจากการ acetylation นี้จะมีผลทำให้ปฏิกิริยาของ PAS เป็นผลลบ คือไม่มีสีแดงทับทิมเกิดขึ้น วิธีการทำก็คือ หลังจากผ่าน section จนถึงน้ำกลั่นแล้ว นำ section นี้ไปแช่ลงในส่วนผสมระหว่าง acetic anhydride 16 มิลลิลิตร และ pyridine 24 มิลลิลิตร ในอุณหภูมิ 22°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปออกซิไดส์ด้วย 1 % Periodic acid และเข้าขั้นตอนของการย้อมตามปกติต่อไป

3.2.2.3 <u>การย้อมด้วย Luxol Fast blue เพื่อศึกษาฟอสโฟไลปิด</u> (Salthouse, 1962a)

<u>หลักการ</u> สี Luxol Fast blue ละลายได้ดีมากในฟอสโฟไลปิด โดยที่ base ของฟอสโฟไลปิดจะเข้าไปแทนที่ base ของสี Luxol Fast blue ทำให้เกิดสี blue ขึ้นในบริเวณที่มีฟอสโฟไลปิด (Salthouse, 1962b)

<u>วิธีการย้อม</u>

1. ผ่าน section ลงในไซลีน จนถึง 95 % อัลกอฮอล์ แล้วทิ้งไว้ 2 นาที
2. Incubate ในสารละลาย Luxol Fast blue 3 ชั่วโมงที่ 35°-40°ซ

3. ล้างใน 95 % อัลกอฮอล์ แล้วตามด้วยน้ำกลั่น

4. ผ่านลงใน 0.005 % Lithium carbonate ในน้ำ 2 นาที

5. ล้างด้วย 70 % อัลกอฮอล์ ถ้ายังไม่ได้สีที่ต้องการให้ทำซ้ำข้อ 3, 4 และ 5 จนได้ที่ต้องการ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น, ดึงน้ำออกด้วยอัลกอฮอล์ ทำให้ใสด้วยไซลีน ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

3.2.2.4 <u>การย้อมด้วยวิธีของ Kossa สำหรับศึกษาแคลเซียม</u> (Luna, 1960)

<u>หลักการ</u> วิธีของ Kossa นี้จะแสดงถึงแคลเซียมในรูปของเกลือฟอสเฟต (phosphate) และคาร์บอเนต (carbonate) ไม่ใช่ในรูปของแคลเซียมเดี่ยว ๆ โดยอาศัยหลักของการที่เกลือของแคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ Silver nitrate และมีแสงอาทิตย์หรือแสงอุลตราไวโอเล็ต หรือสารที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) อย่างแรง เข้าช่วยในปฏิกิริยานี้ ทำให้เกิด metallic silver สีดำขึ้นในบริเวณที่มีเกลือของแคลเซียม (Pearse, 1968)

<u>วิธีการย้อม</u>

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำกลั่น
- แช่ลงใน 5 % Silver nitrate ในน้ำ 60 นาที ตั้งทิ้งไว้กลางแดด
- ล้างด้วยน้ำกลั่น
- ผ่านลงใน 5 % Sodium thiosulfate 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น

- ย้อมด้วย Nuclear fast red 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น

- ดึงน้ำออก ด้วย 95 % และ 100 % อัลกอฮอล์ แล้วผ่านลงในไซลีน 2 ครั้ง และปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

3.2.2.5 <u>การย้อมด้วยวิธีของ Champy-Kull เพื่อศึกษาไมโตคอนเดรีย</u> (Culling, 1963)

<u>หลักการ</u> ใช้วิธีย้อมสีเซลล์ (cell) ให้มากเกินไปด้วย acid fuchsin โดยใช้ความร้อนช่วยให้สีตกตะกอนและช่วยให้สีเข้าไปในไมโตคอนเดรียได้ดีขึ้น จากนั้นจึงใช้สีพวกแอสิด (acid dye) อีกชนิดหนึ่ง เช่น Aurantia หรือ Picric acid ล้างสีที่มากเกินไปในเซลล์ออก ซึ่งสีเหล่านี้จะเข้าไปแทนที่สี acid fuchsin ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้ไซโตพลาสซึมมีสีเหลือง ส่วนไมโตคอนเดรียยังคงติดสีแดงของ acid fuchsin (Ruthmann, 1970)

<u>วิธีการย้อม</u>

- ผ่าน section ลงในไซลีน, 100 %, 95 %, 90 % และ 70 % อัลกอฮอล์ และลงในน้ำกลั่น ใส่สี Altmann's acid fuchsin anilin ให้ท่วม section

- นำไปอุ่นด้วยตะเกียงอัลกอฮอล์ จนมีไอลอยขึ้น แต่อย่าให้สีเดือด แล้วทิ้งไว้ให้เย็น ทำซ้ำเช่นนี้ 2-3 ครั้งในระยะเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

- ล้างสีที่มากเกินไปออกด้วย saturated picric acid ในน้ำ จนกระทั่งได้ไซโตพลาสซึมสีเหลือง และไมโตคอนเดรียสีแดง แล้วผ่านลงใน 90 % อัลกอฮอล์ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ picric acid จากนั้นล้างใน 100 % อัลกอฮอล์ ลงในไซลีน และปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

4. วิธีการศึกษา

ศึกษาจากผิวหนังทั้งหมด 4 ส่วนคือ ส่วนหัว, ส่วนท้ายด้านหลัง และส่วนหัว, ส่วนท้ายด้านท้อง

4.1 การศึกษาลักษณะทางฮีสโตโลยีจากการย้อมด้วย Haematoxylin และ Eosin

ผิวหนังของพวกอนูแรน แบ่งได้เป็นชั้นใหญ่ ๆ 2 ชั้น โดยถือตามหลักของ Andrew และ Hickman (1974) และ Goin และ Goin (1971) ดังนี้

(1) ชั้นอีปิเดอร์มิส เป็นชั้นบน ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นชั้นย่อย ๆ ได้อีก

(2) ชั้นเดอร์มิส เป็นชั้นล่าง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นหลัก รวมทั้งต่อมต่าง ๆ, เซลล์รงค์วัตถุ (pigment cell) และเส้นเลือด ชั้นนี้แบ่งออกเป็นชั้นย่อย ๆ 2 ชั้น

การแบ่งชั้นอีปิเดอร์มิส แบ่งออกเป็นชั้นย่อย ๆ ได้ 4 ชั้น ตามลักษณะรูปร่างของเซลล์ และถือตามหลักการแบ่งชั้นอีปิเดอร์มิสของ Farquhar และ Palade (1961) และของ Compenhaver et al (1971) ดังนี้

(1) ชั้นสตราตัม เจอมินาติวัม (Stratum Germinativum, SGe) เป็นชั้นล่างสุดอยู่ติดกับชั้นเดอร์มิสเซลล์ ในชั้นนี้มีรูปร่างเป็นรูปกระบอก, สูง มีนิวเคลียสรียาวตั้งตามความสูงของเซลล์

(2) ชั้นสตราตัม สไปโนซัม (Stratum Spinosum, SS) เป็นชั้นกลางอยู่ถัดขึ้นมา มีเซลล์เป็นรูปหลายเหลี่ยม มีส่วนของผนังเซลล์ยื่นออกมาคล้ายหนามติดต่อกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์

(3) ชั้นสตราตัม กรานูโลซัม (Stratum Granulosum, SG) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากชั้น SS ขึ้นมาอยู่ติดเซลล์มีรูปร่างแบน และภายใน cell จะมีเม็ดเคอราโตไฮยาลิน (keratohyalin granule) ติดสีน้ำเงินของ Haematoxylin

(4) ชั้นสตราตัม คอร์เนียม (Stratum corneum, SC) เป็นชั้นบนสุก เซลล์ในชั้นนี้จะเป็นเซลล์แบนบางและไม่มีนิวเคลียสแล้ว

การแบ่งชั้นเดอร์มิส ถือตามหลักของ Andrew และ Hickman (1974) และ Goin และ Goin (1971) ซึ่งแบ่งชั้นเดอร์มิสออกเป็น 2 ชั้น โดยใช้ลักษณะของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นหลัก คือ

(1) ชั้นบน เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รวมกันอย่างหลวม ๆ และมีพวกตอมตาง ๆ, เซลล์รงควัตถุ, เส้นเลือด เข้ามาอยู่ด้วย เป็นชั้นที่อยู่ติดกับชั้น Epidermis เรียกชั้นนี้ว่า สตราตัม สปองจิโอซัม (Stratum Spongiosum, Ssp)

(2) ชั้นล่าง เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รวมกันอย่างหนาแน่นรวมกันเป็นมัด และเรียงตัวอยู่ในลักษณะเป็นคลื่น เรียกชั้นนี้ว่า สตราตัม คอมแพกตัม (Stratum Compactum, SCo)

นอกจากนั้น พบว่ามีชั้นที่อยู่ใต้ชั้น SCo ลงไปอีกเป็นชั้นบาง ๆ อยู่ติดกับกล้ามเนื้อ ซึ่ง Andrew และ Hickman (1974) เรียกเป็นชั้นสับคิวทาเนียส คอนเนคทิฟ ทิสชู (Subcutaneous Connective tissue) ส่วน Elkan (1968) เรียกว่าชั้นทีลา สับคิวทานี (Sela subcutanea, T)

4.2 การศึกษาผลทางฮีสโตเคมี แบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้

4.2.1 กลุ่มของมิวโคโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ การศึกษาด้วยปฏิกิริยาของ Alcian blue และ PAS โดยใช้สไลด์ที่ย้อมด้วย Haematoxylin และ Eosin เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยที่ section ของ H.E, PAS และ Alcian

blue จะเป็น section ติดต่อกันมา

4.2.2 กลุ่มของเอนไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตส ศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับสไลด์ที่ย้อมควบคุมโดยการ incubate ใน incubation medium ที่ไม่มี substrate

4.2.3 กลุ่มของไขมัน ศึกษาปฏิกิริยาของไขมัน ซึ่งจะเป็นหยดสีส้มแดง เปรียบเทียบกับสไลด์ที่ย้อมควบคุมซึ่งถูกล้างไขมันออกด้วย Petroleum ether

4.2.4 กลุ่มของฟอสโฟไลปิดและแคลเซียม ศึกษาโดยดูจากผลของปฏิกิริยาสีฟ้าของฟอสโฟไลปิด และสีดำของแคลเซียม

4.3 การศึกษาการให้ชื่อต่อมต่าง ๆ และลักษณะพิเศษที่พบในชั้นเดอร์มิส

การศึกษาและให้ชื่อลักษณะพิเศษที่พบ ศึกษาทางฮีสโตโลยี พบว่าลักษณะพิเศษที่พบในผิวหนังไม่ใช่ลักษณะของ cell ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 พวก และได้ให้ชื่อโดยใช้อักษร A, B และ C เป็นสัญญลักษณ์ตามลำดับการพบก่อนหรือหลัง ดังนี้

4.3.1 แถบ A - ลักษณะเป็นแถบยาว ตั้นอยู่ระหว่างชั้น Ssp และ Sco ของชั้นเดอร์มิส

4.3.2 กลุ่ม B - ลักษณะเป็นกลุ่ม และมีผลึกเป็นเกล็ดเล็ก ๆ ติดอยู่บนกลุ่มนี้ด้วย พบเฉพาะในชั้น Ssp ถ้าผลึกหลุดออกไปหมด กลุ่ม B จะมีลักษณะกลายเมือก

4.3.3 แถบ C - ไม่ได้มีลักษณะเป็นแถบยาวเหมือนแถบ A แต่จะกระจายอยู่ในชั้น Ssp อย่างไม่เป็นระเบียบ

4.4 การศึกษาและการให้ชื่อต่อมต่าง ๆ ในผิวหนัง

4.4.1 การแยกต่อมเมือกและต่อมกรานูลาร์

4.4.1.1 ใช้ลักษณะของซีครีชัน (secretion) ทางฮีสโตโลยี

- ต่อมเมือก มีซีครีชันเป็นเมือกเรียบ ไม่เป็นเม็ด
- ต่อมกรานูลาร์ มีซีครีชันเป็นเม็ด

4.4.1.2 ใช้ลักษณะการติดสีของซีครีชันทางฮีสโตเคมี ซึ่งแสดงปฏิกิริยากับ PAS และ Alcian blue

4.4.2 การศึกษา และการให้ชื่อต่อมกรานูลาร์

4.4.2.1 จากลักษณะทางฮีสโตโลยี - พบว่าต่อมกรานูลาร์มี 4 ชนิด และให้ชื่อโดยใช้อักษร a, b, c และ d เป็นตัวแทนของแต่ละต่อมตามลำดับการพบก่อน, หลัง ซึ่งลักษณะทางฮีสโตโลยีที่นำมาใช้ในการแยกชนิดของต่อม ก็คือลักษณะของซีครีชันซึ่งเป็นเม็ด ต่อมทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะของเม็ดซีครีชันต่างกัน

4.4.2.2 จากผลของปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมี ซึ่งแสดงปฏิกิริยากับ PAS, Alcian blue, ไขมันและแอสิด ฟอสฟาเตส

4.4.3 การศึกษาและการให้ชื่อต่อมเมือก

ใช้ลักษณะทางฮีสโตโลยีและผลของปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีในการแยกชนิดของต่อมเมือก

4.4.3.1 ทางฮีสโตโลยี - ใช้ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวของต่อม เป็นหลัก และให้ชื่อต่อมโดยใช้อักษร a, b, c .. ถึง f เป็นตัวแทนของแต่ละต่อม

4.4.3.2 ทางฮีสโตเคมี - ใช้ปฏิกิริยาของ Alcian blue และ PAS เป็นหลัก ประกอบกับลักษณะทางฮีสโตโลยี

4.5 การศึกษาขนาดของต่อม

ใช้ไมโครมิเตอร์วัดขนาดของต่อม โดยการวัดตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของต่อมทั้งที่ขนานกับความยาวของผิวหนัง ซึ่งจะเป็นเส้นผ่าศ.ก. ของต่อม และที่ตั้งฉากกับความยาวของผิวหนัง ซึ่งจะเป็นความลึก ของต่อม วัดจากต่อมที่มีขนาดเท่า ๆ กัน ของต่อมแต่ละชนิดหาค่าเฉลี่ยและคิดเป็นไมครอน

4.6 การศึกษาจากรูปถ่ายที่กำลังขยายต่าง ๆ

- กำลังขยาย 80 x - เพื่อศึกษาลักษณะทั่ว ๆ ไปของผิวหนัง
- กำลังขยาย 310 x - เพื่อศึกษาลักษณะของ cell และเนื้อเยื่อของบริเวณนั้น ๆ และศึกษาปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีด้วย