MKHJ
วารสาร โรงพยาบาลมหาสารคาม
MAHASARAKHAM HOSPITAL JOURANAL

Journal homepage: https://he02.tci-thaijo.org/index.php/MKHJ/index

การศึกษาผลของสบู่ในการลดความแข็งของชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน

The study of the effect of soap on reducing the hardness of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue

กาญจนา จงเชิดชูแดน
Kanchana Jongcherdchudan

กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลนครปฐม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
Department of Anatomical Pathology, NakhonPathom Hospital, Muang, NakhonPathom, 73000
Corresponding author e-mail: kanc_nid@hotmail.com
(Received: 19 October 2022 Revised: 21 March 2023 Accepted: 27 March 2023)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อประยุกต์ใช้น้ำสบู่ในการทำให้ชิ้นเนื้อที่แข็งหรือเหนียวอ่อนนุ่มลงหลังจากการฝังในบล็อกพาราฟิน

รูปแบบและวิธีวิจัย : ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากเนื้องอกมดลูกและต่อมไทรอยด์ (n=240) ผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยานำไปแช่ในน้ำสบู่ pH 7 และpH 10 เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 นาทีต่อ 1 บล็อกและตัดเป็นสไลด์ ประเมินความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟินและคุณภาพการติดสี H&E

ผลการศึกษา : การแช่บล็อกชิ้นเนื้อในน้ำสบู่เป็นระยะเวลานาน 3 นาที มีผลทำให้ชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟินมีความอ่อนนุ่มลงมากที่สุด (10 จาก 21 บล็อก 47.6%) ใน pH 7 และ 9 จาก 14 บล็อก (64.3%) ใน pH 10) คุณภาพการติดสีที่ไม่ดี (10 จาก 10 บล็อก 100%) สัมพันธ์กับการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 10 เป็นระยะเวลา 3 หรือ 4 นาที

สรุปผลการศึกษา : บล็อกชิ้นเนื้อที่แช่น้ำสบู่ pH 7 เป็นระยะเวลา 3 นาที ทำให้ได้ชิ้นเนื้อมีความอ่อนนุ่มและคุณภาพการติดสีดีที่สุด

คำสำคัญ : กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ, บล็อกพาราฟิน, น้ำสบู่, เนื้องอกมดลูก, เนื้องอกไทรอยด์

ABSTRACT

Objective : Application of soapwater to soften the hard paraffin-embedded tissue block

Method : Samples from myoma uteri and thyroid (n=240) are processed through histopathological preparation and then soaking in soap water at pH 7 and pH 10 for 1, 2, 3, and 4 minutes per each block and preparing slides. Assess the softness and quality of H&E-stained slides.

Results : Soaking paraffin-embedded tissue in soapy water for 3 minutes results in best tissue softness (10 out of 21 blocks (47.6%) in pH 7 and 9 out of 14 blocks (64.3%) in pH 10). Poor quality of H&E-stained slides (10 out of 10 blocks (100%)) is related to soaking in pH 10 for 3 or 4 minutes.

Conclusion : Soaking paraffin-embedded tissue in soapy water at pH 7 for 3 minutes gives the best tissue softness and quality of H&E-stained slides.

Keywords : Tissue processing, Paraffin-embedded tissue, Soap, Myoma uteri, Thyroid

บทนำ

ชิ้นเนื้อในงานทางพยาธิวิทยากายวิภาคที่มีความแข็ง ได้แก่ กระดูก (bone resection) ไขกระดูก (bone marrow biopsy) หรือชิ้นเนื้อที่มีแคลเซียมที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า มักจะได้รับการกำจัดแคลเซียม (decalcification) ด้วยสารละลายต่าง ๆ เช่น EDTA[1], formic acid[2], และ nitric acid[3] เพื่อลดความแข็งของชิ้นเนื้อก่อนเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ (tissue processing) ซึ่งปัญหาที่พบได้บ่อยคือ ชิ้นเนื้อบางชนิดที่มีความเหนียวหรือมีแคลเซียมปนอยู่บ้าง เช่น เนื้องอกมดลูก (myoma uteri หรือ uterineleiomyoma) เนื้องอกต่อมไทรอยด์ (thyroid noduleหรือ thyroid cancer) และผิวหนัง(skin biopsy, excision) เป็นต้นมักไม่ได้รับการกำจัดแคลเซียมก่อนเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ

ในปีพ.ศ. 2561 ถึง 2563 กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลนครปฐม มีชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเนื้องอกมดลูก และเนื้องอกต่อมไทรอยด์รวมปริมาณ 568และ 239 รายตามลำดับ โดยเป็นชิ้นเนื้อที่เกิดปัญหาจากความเหนียวหรือไม่ได้รับการกำจัดแคลเซียมบ่อยมากที่สุดปัญหาที่พบได้แก่ ทำให้ใบมีดสำหรับเครื่องไมโครโตม (microtome) เป็นรอย ส่งผลต่อ ribbon paraffin ที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่เป็นรอย หรือ ribbon paraffin ที่ตัดได้หนาเกินไปทำให้หลุดจากแผ่นสไลด์ในขั้นตอนการย้อมสี ไปจนถึงการหลุดของพาราฟินจากตัวตลับ (cassette)ในขณะทำการตัด (trim) หน้าตัดชิ้นเนื้อ และอาจมีผลต่อการวินิจฉัยของพยาธิแพทย์ วิธีการแก้ไขที่ใช้ในปัจจุบันคือ การเปลี่ยนใบมีดตัด การทำพาราฟินบล็อกใหม่ หรือนำชิ้นเนื้อไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อใหม่ (re-processing) และอาจต้องนำมาแช่ในสารละลายกรดสำหรับละลายแคลเซียมหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อใหม่[4] ซึ่งทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองทรัพยากรมาก

จากการทบทวนวรรณกรรม Pearlman และ Cole (1951) ทดลองแช่ paraffin block ลงในใช้น้ำยาทำความสะอาด (1% detergent aqueous solution) เป็นระยะเวลาข้ามคืน พบว่าเนื้อเยื่อที่มีความแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ ผิวหนัง กระดูกอ่อน มีความอ่อนนุ่มและตัดบางได้ง่ายขึ้น[5] Turner และ Holtom (1981) ใช้น้ำยาปรับผ้านุ่ม (0.2% fabric conditioner in isotonic saline) กับชิ้นเนื้อ paraffin embedded (FFPE) ที่มีความแห้งแข็ง (mummified tissue) พบว่าการติดสีของนิวเคลียสให้ผลที่ไม่ดี ในขณะที่การติดสีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ให้ผลดีสามารถแยกชนิดของเส้นใยต่างๆ ได้[6] Orchard และคณะ (2008) ทดลองเปรียบเทียบสารทำความนุ่มหลายชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลาย 30% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (30% KOH) น้ำยาปรับผ้านุ่มยี่ห้อต่าง ๆ และครีมกำจัดขน พบว่าน้ำยาปรับผ้านุ่มและครีมกำจัดขน สามารถทำให้ชิ้นเนื้อเล็บมีความอ่อนนุ่มขึ้นดีที่สุด มีราคาถูก และหาซื้อได้ทั่วไป ในขณะที่ 30% KOH ทำให้เนื้อเยื่อแตกสลายมากเกินไป[7] ในด้านคุณภาพของการติดสีย้อม Orchard และคณะ (2009) ทำการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิด cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) ที่มีต่อชิ้นเนื้อ FFPE โดยพบว่าชิ้นเนื้อที่ผ่านการทำให้นุ่มด้วยสารดังกล่าว ยังคงติดสี periodic acid-Schiff (PAS), Grocott-Gomori's methenamine silver (GMS) และอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemical stain) ได้ดี[8]

งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาวิธีการทำให้ชิ้นเนื้อที่เหนียวหรือแข็งมีความอ่อนนุ่มขึ้นและง่ายต่อการตัด โดยใช้น้ำสบู่ซึ่งหาได้ง่ายราคาถูกและปลอดภัยซึ่งสามารถใช้ในกระบวนการ decalcification เฉพาะผิว (surface

decalcification)[9] ทั้งนี้คุณสมบัติความเป็นด่างของน้ำสบู่อาจทำให้ความแข็งของชิ้นเนื้อที่ฝังในบล็อกพาราฟินลดลงได้(softening agent) และอาจเทียบเคียงกับการใช้สารละลาย potassium hydroxide ในชิ้นเนื้อที่มีความแข็งจาก keratinization[10] ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของการใช้น้ำสบู่ที่มีค่าความเป็นกลางและด่างในการลดความแข็งของชิ้นเนื้อหลังจากฝังในพาราฟินแล้วในเวลาที่แตกต่างกันเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับชิ้นเนื้อที่แข็งจากการมีแคลเซียม หรือเกิดจากกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อที่มีปัญหา เป็นการลดระยะเวลา ประหยัดทรัพยากร และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในงานทางด้านจุลพยาธิวิทยา

วัตถุประสงค์

ประยุกต์การใช้น้ำสบู่ในการทำให้ชิ้นเนื้อที่แข็งหรือเหนียวอ่อนนุ่มลงหลังจากการฝังในบล็อกพาราฟิน

รูปแบบและวิธีวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) กลุ่มควบคุมได้แก่ บล็อกพาราฟินทั้งหมดที่ยังไม่ผ่านการแช่น้ำด้วยสบู่ โดยอนุมานว่ามีความแข็งเริ่มต้นอยู่ในระดับแข็งมาก กลุ่มทดลองได้แก่ บล็อกพาราฟินที่ผ่านการแช่น้ำสบู่ที่ pH 7 และ pH 10 โดยใช้เวลาในการแช่นาน 1, 2, 3 และ 4 นาทีรวมทั้งสิ้น 8 กลุ่มทดลอง

การดำเนินการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองโดยคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนโรงพยาบาลนครปฐมแล้ว เลขที่โครงการ 035/2020

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างงานวิจัยนำมาจากชิ้นเนื้อจากเนื้องอกมดลูก (myoma uteri) และไทรอยด์โดยตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (fixation) ด้วย 10% neutral buffered formalin (10% NBF) ที่มีการรายงานผลการตรวจจากพยาธิแพทย์เรียบร้อยแล้วมากกว่า 2 สัปดาห์ รอการส่งทำลายเป็นระยะเวลา 6 เดือนโดยไม่ระบุว่าชิ้นเนื้อเป็นของผู้ป่วยรายใด อย่างละ 120 ตัวอย่าง รวม 240 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1)

การเตรียมชิ้นเนื้อ

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เหมาะสมจากกลุ่มตัวอย่างลงตลับใส่ชิ้นเนื้อ (tissue cassette) โดยการตัดชิ้นเนื้อส่วนที่เป็นรอยโรคขนาดประมาณ 2x2 เซนติเมตรและหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยา ด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อ (tissue processing) และฝังเนื้อลงบล็อกพาราฟิน (tissue embedding)

การเตรียมน้ำสบู่

ใช้สบู่เหลวเข้มข้นชนิดไม่ผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ เตรียมโดยกลุ่มงานพัสดุการแพทย์ โรงพยาบาลนครปฐม นำมาผสมกับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนเริ่มต้น 1:2 ปรับ pH ด้วยน้ำให้ได้ pH7 และ pH10 ใช้กระดาษลิตมัสตรวจวัดค่า pH

วิธีการทดลอง

ทำการตัดบล็อกพาราฟินทั้งหมดด้วยเครื่องไมโครโตมที่ความหนา 3 ไมครอน เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่อยู่บนสไลด์โดยอนุมานว่ามีความแข็งเริ่มต้นอยู่ในระดับแข็งมาก จากนั้นทำการแบ่งบล็อกชิ้นเนื้อทั้งหมดโดยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) ออกเป็น 8 กลุ่ม เพื่อทำการตัดเป็นกลุ่มทดลอง คือแช่ในน้ำสบู่ pH 7 และ pH 10 โดยใช้เวลาในการแช่นาน 1, 2, 3 และ 4 นาที ของแต่ละค่า pH

การประเมินความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อ

ทำการประเมินระดับความอ่อนนุ่มของบล็อกพาราฟินระหว่างตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ดังนี้

0 = ชิ้นเนื้อยังแข็งอยู่ และมีรอยที่เกิดจากใบมีดไมโครโตมมาก

1 = ชิ้นเนื้ออ่อนลงเล็กน้อย และยังมีรอยที่เกิดจากใบมีดไมโครโตม

2 = ชิ้นเนื้ออ่อนลงมากและมีรอยที่เกิดจากใบมีดไมโครโตมเล็กน้อย

3 = ชิ้นเนื้ออ่อนลงมากที่สุด และมีรอยที่เกิดจากใบมีดไมโครโตมน้อยมากหรือไม่มีเลย

เมื่อทำการตัดเสร็จนำสไลด์ชิ้นเนื้อที่มีทั้งกลุ่มตัวอย่างควบคุมและกลุ่มทดลองไปทำการย้อมสี H&E (hematoxylin and eosin) ด้วยเครื่องย้อมสีอัตโนมัติเพื่อประเมินคุณภาพการติดสี

การทดสอบคุณภาพการติดสี H&E (hematoxylin and eosin)

นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี H&E มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และประเมินผลโดยพยาธิแพทย์ (ภาพที่ 2) มีเกณฑ์การประเมิน ดังนี้

1 = คุณภาพการติดสีไม่ดี คือมีความ contrast ของการติดสี hematoxylin และ eosin น้อย มีการบวมของเซลล์มาก

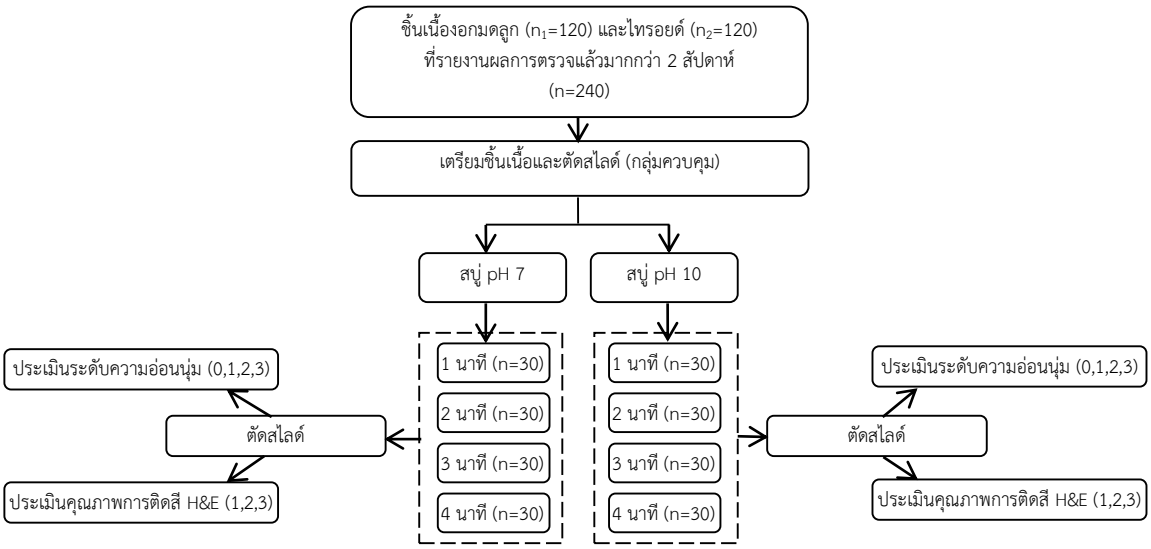
2 = คุณภาพการติดสีดีคือมีความ contrast ของการติดสี hematoxylin และ eosinมาก มีการบวมของเซลล์เล็กน้อย

3 = คุณภาพการติดสีดีที่สุดคือมีความ contrast ของการติดสี hematoxylin และ eosin มากที่สุด ไม่มีการบวมของเซลล์

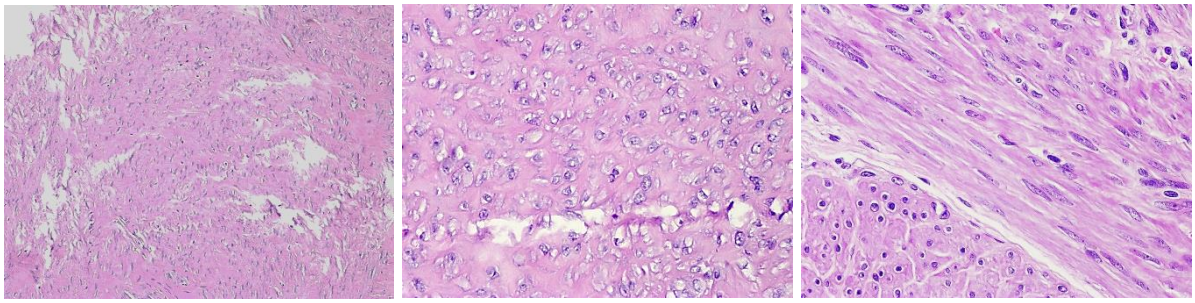
นำค่าที่ได้แปลงเป็นค่าทางสถิติต่อไป

วิธีการวิเคราะห์ผลงานวิจัย

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics for Windows version 26.0 (IBM, USA) ประกอบด้วยสถิติเชิงพรรณนาเพื่ออธิบายคุณลักษณะของกลุ่มตัวอย่าง โดยการหาจำนวนค่าร้อยละ และสถิติที่ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (pH และระยะเวลาในการแช่น้ำสบู่) กับตัวแปรตาม (ความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อ และคุณภาพการติดสี) ด้วยการทดสอบไคสแควร์ (chi-square) โดยทดสอบนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05



รูปที่ 1 ขั้นตอนการทำวิจัย



รูปที่ 2 ตัวอย่างผลการติดสีของชิ้นเนื้อจากการย้อมสี H&E

ภาพซ้าย (กำลังขยาย 100 เท่า) คุณภาพการติดสีไม่ดี นิวเคลียสติดสีฟ้าอมเทา พื้นหลังมี chatter artifact ปริมาณมาก

ภาพกลาง (กำลังขยาย 400 เท่า) คุณภาพการติดสีดี มีความ contrast ของการติดสี H&E มีการบวมของเซลล์เล็กน้อย มี chatter artifact เล็กน้อย

ภาพขวา (กำลังขยาย 400 เท่า) คุณภาพการติดสีดีที่สุดมีความ contrast ของการติดสี H&E มากที่สุด ไม่มีการบวมของเซลล์

ผลการวิจัย

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างได้จากการคัดเลือกชิ้นเนื้องอกมดลูก (myoma uteri) 120 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 50 และชิ้นเนื้อไทรอยด์ 120 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 50

2. ความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อ

ในกลุ่มน้ำสบู่ pH 7 บล็อกชิ้นเนื้อที่อ่อนนุ่มลงมากที่สุด 10 บล็อกจาก 21 บล็อก (47.6%) ได้รับการแช่น้ำสบู่เป็นระยะเวลา 3 นาที ในกลุ่มน้ำสบู่ pH 10 บล็อกชิ้นเนื้อที่อ่อนนุ่มลงมากที่สุด 9 บล็อกจาก 14 บล็อก (64.3%) ได้รับการแช่น้ำสบู่เป็นระยะเวลา 3 นาที และ 5 บล็อกจาก 14 บล็อก (35.7%) ได้รับการแช่น้ำสบู่เป็นระยะเวลา 2 นาที (ตารางที่ 1 และ 2)

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 7 และ pH 10 พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05(ตารางที่ 1 และ 2)

ที่ระยะเวลาการแช่ 2 และ 3 นาที เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่าง(pH 7 และ pH 10) กับความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 1 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อกลุ่ม pH 7

ระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 7	ความอ่อนนุ่ม				Chi-square	p-value
	แข็ง	อ่อนนุ่มลงเล็กน้อย	อ่อนนุ่มลงมาก	อ่อนนุ่มลงมากที่สุด		
1 นาที	10(25.0%)	5(20.0%)	9(26.5%)	6(28.6%)	25.549	0.002
2 นาที	5(12.5%)	5(20.0%)	15(44.1%)	5(23.8%)		
3 นาที	10(25.0%)	5(16.7%)	5(14.7%)	10(47.6%)		
4 นาที	15(37.5%)	10(40.0%)	5(14.7%)	0		
รวม	40	25	34	21		

ตารางที่ 2 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความอ่อนนุ่มของชิ้นเนื้อกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อกลุ่ม pH 10

ระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 10	ความอ่อนนุ่ม				Chi-square	p-value
	แข็ง	อ่อนนุ่มลงเล็กน้อย	อ่อนนุ่มลงมาก	อ่อนนุ่มลงมากที่สุด		
1 นาที	15(37.5%)	10(22.2%)	5(23.8%)	-	27.540	0.001
2 นาที	5(12.5%)	15(33.3%)	5(23.8%)	5(35.7%)		

3 นาที	10(25.0%)	5(11.1%)	6(28.6%)	9(64.3%)
4 นาที	10(25.0%)	15(33.3%)	5(23.8%)	-
รวม	40	45	21	14

3. คุณภาพการติดสี

สไลด์จากบล็อกชิ้นเนื้อที่แช่ในน้ำสบู่ pH 7 มีคุณภาพการติดสีดีหรือดีที่สุด (37.5% และ 62.5% ตามลำดับ) ไม่พบสไลด์ที่มีคุณภาพการติดสีไม่ดีจากบล็อกชิ้นเนื้อที่แช่ในน้ำสบู่ pH 7

สไลด์จากบล็อกชิ้นเนื้อที่มีคุณภาพการติดสีไม่ดีทั้งหมด (10 จาก 10 บล็อก) พบในบล็อกชิ้นเนื้อที่แช่ในน้ำสบู่ pH 10 (50% และ 50% แช่เป็นระยะเวลา 2 และ 3 นาที ตามลำดับ)

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพการติดสีกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 7 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05(ตารางที่ 3)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพการติดสีกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 10พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพการติดสีกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อกลุ่ม pH 7

ระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในสบู่ pH 7	คุณภาพการติดสี			Chi-square	p-value
	ไม่ดี	ดี	ดีที่สุด		
1 นาที	-	10(22.2%)	20(26.7%)	2.667	0.446
2 นาที	-	15(33.3%)	15(20.0%)		
3 นาที	-	10(22.2%)	20(26.7%)		
4 นาที	-	10(22.2%)	20(26.7%)		
รวม	-	45	75		

ตารางที่ 4 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพการติดสีกับระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อกลุ่ม pH 10

ระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 10	คุณภาพการติดสี			Chi-square	p-value
	ไม่ดี	ดี	ดีที่สุด		
1 นาที	-	15(25.0%)	15(30.0%)	15.333	0.018
2 นาที	-	20(33.3%)	10(20.0%)		
3 นาที	5(50.0%)	15(25.0%)	10(20.0%)		
4 นาที	5(50.0%)	10(33.3%)	15(30.0%)		

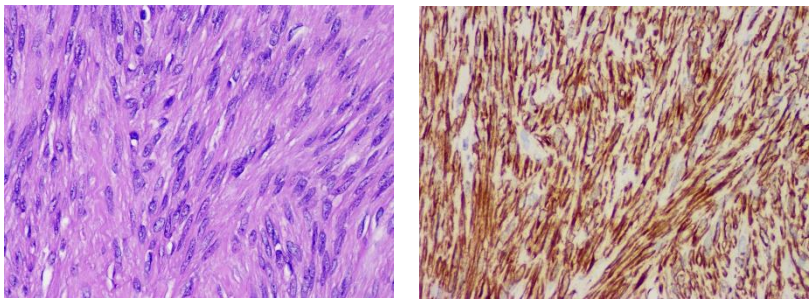
ระยะเวลาการแช่ชิ้นเนื้อในน้ำสบู่ pH 10	คุณภาพการติดสี			Chi-square	p-value
	ไม่ดี	ดี	ดีที่สุด		
รวม	10	60	50		

อภิปรายผล

จากการศึกษาผลของน้ำสบู่ต่อการลดความแข็งของชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟิน สรุปได้ว่าการแช่บล็อกชิ้นเนื้อในน้ำสบู่เป็นระยะเวลานาน 3 นาที มีผลทำให้ชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟินมีความอ่อนนุ่มลงมากที่สุด (47.6% ใน pH 7 และ 64.3% ใน pH 10) โดยไม่ขึ้นกับค่า pH ที่เป็นกลางหรือด่างของน้ำสบู่ที่ทำการศึกษา

คุณภาพการติดสี H&E บนสไลด์จากบล็อกชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในน้ำสบู่ที่ pH 7 ไม่พบว่ามีตัวอย่างใดที่มีการติดสีไม่ดี ในขณะสไลด์ที่คุณภาพการติดสีไม่ดีเกิดจากจากบล็อกชิ้นที่ผ่านการแช่ในน้ำสบู่ที่ pH 10 เป็นเวลา 3 และ 4 นาที (50% และ 50% ตามลำดับ โดยคำนวณจากสไลด์ที่คุณภาพการติดสีไม่ดีทั้งหมด) กล่าวคือความ contrast ของการติดสี H&Eน้อยและมีการบวมของเซลล์มาก ทั้งนี้อาจเกิดจากการผสมสบู่ให้ได้ pH สูงต้องใช้สบู่ปริมาณมากกว่าทำให้สารละลายเหนียวข้นมีคราบสบู่ที่ติดค้างบริเวณหน้าบล็อกชิ้นเนื้อรวมถึงค่าความเป็นกรดด่างของชิ้นเนื้อที่เปลี่ยนไปซึ่งมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติของสี H&E[11].

ผู้วิจัยทดสอบเพิ่มเติม โดยนำบล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่าง 1 บล็อก ที่ผ่านการแช่ในน้ำสบู่ที่ pH 7 เป็นระยะเวลานาน 3 นาที มาย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีต่อ desmin พบว่าไม่ส่งผลต่อคุณภาพสไลด์และการแปลผล (ภาพที่ 3) ทั้งนี้การใช้สารทำให้นุ่มชนิดต่าง ๆ อาจไม่ส่งผลต่อการติดสีพิเศษ (special stain) และและอิมมูโนฮิสโตเคมี[8] อย่างไรก็ตามสารละลายที่มีความเป็นด่างสูง อาจทำให้เนื้อเยื่อเสียสภาพมากจนไม่สามารถส่งตรวจพิเศษเพิ่มเติมได้



รูปที่ 3 ตัวอย่างผลการติดสีของชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในน้ำสบู่ที่ pH 7 เป็นระยะเวลานาน 3 นาที
ภาพซ้าย (H&E, กำลังขยาย 400 เท่า) **ภาพขวา** (desmin, กำลังขยาย 400 เท่า)

จากงานวิจัยข้างต้นคุณสมบัติทำให้นุ่ม/ลดแรงตึงผิว (softening agent/surfactant) และความเป็นด่างของน้ำสบู่สามารถทำให้ชิ้นเนื้อที่แข็งมีความอ่อนนุ่มลงได้ แต่ต้องระมัดระวังในน้ำสบู่ที่มีคุณสมบัติเป็นด่างเนื่องจากอาจทำให้คุณภาพการติดสี H&E ไม่ดี อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการศึกษานี้ได้แก่ ชิ้นเนื้อที่นำมาเป็นกลุ่มตัวอย่างอาจมีความแข็งเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่น้ำสบู่ซึ่งควบคุมได้ยากในชิ้นเนื้อปริมาณมาก ความคมของไมโครโตม ความเข้มข้นของสีที่ใช้ย้อม เป็นต้น สำหรับระยะเวลาในการแช่น้ำสบู่นั้น ในทาง

ปฏิบัติอาจแช่เป็นระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่ทดสอบแล้วว่าชิ้นเนื้อในบล็อกพาราฟินมีความอ่อนนุ่มเพียงพอ เพื่อไม่ให้ชิ้นเนื้อมีความเป็นด่างมากเกินไปจนอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพการติดสี

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองพบว่าบล็อกชิ้นเนื้อที่แช่น้ำสบู่ pH 7 เป็นระยะเวลา 3 นาที ทำให้ได้ชิ้นเนื้อมีความอ่อนนุ่มและคุณภาพการติดสีดีที่สุดผู้วิจัยเห็นว่าการใช้น้ำสบู่สามารถนำมาใช้งานเพื่อลดความแข็งของชิ้นเนื้อและมีความสะดวกในการนำมาใช้งานเนื่องจากเป็นสบู่เหลวอยู่แล้วทำการละลายน้ำได้ง่าย ทั้งนี้การใช้น้ำสบู่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานเมื่อพบปัญหาเกี่ยวกับชิ้นเนื้อเหนียวแข็ง เพื่อลดระยะเวลา ประหยัดทรัพยากรและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในงานทางด้านจุลพยาธิและสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับชิ้นเนื้อแข็งจากอวัยวะอื่นๆ หรือชิ้นเนื้อที่แข็งเกินไปจากกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ (tissue processing) จากสารเคมีเสื่อมสภาพหรือในกรณีที่เครื่อง tissue processing มีปัญหาได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการควบคุมระยะเวลาแช่ในน้ำสบู่ไม่ให้นานมากเกินไป อาจมีผลกระทบต่อเซลล์ของชิ้นเนื้อและทำให้ชิ้นเนื้อเปื่อยยุ่ยได้

เอกสารอ้างอิง

1. Hillemann HH., Lee CH. Organic chelating agents for decalcification of bones and teeth. Stain Technol. 1953 Nov;28(6):285-7.
2. Gooding H, Stewart D. A comparative study of histological preparations of bone: which have been treated with different combinations of fixatives and decalcifying fluids. Lab. J. 1932;7:55.
3. Clayden, EC. A discussion on the preparation of bone sections by the paraffin wax-method with special reference to the control of decalcification. J. Med. Lab. Technol. 1952;70:103-23.
4. Gray SJ. Practice of microtomy. Essentials of Microtomy. London: Butterworths, 1972;72
5. Pearlman RC, Cole BC. Softening of hard tissue for sectioning. Stain Technol. 1951;26:115–8.
6. Turner PJ, Holtom DB. The use of a fabric softener in the reconstitution of mummified tissue prior to paraffin wax sectioning for light microscopical examination. Stain Technol. 1981;56:35–8.
7. Orchard GE, Torres J, Sounthararajah P. Use of softening agents to improve the production of formalin-fixed, paraffin embedded sections of nail tissue: an assessment. Br J Biomed Sci. 2008;65:68–70.
8. Orchard GE, Torres J, Poirier A, Sounthararajah R, Webster J, Notini L, Hacker L, Ismail F, Nwokie T, Humphrey P, Spigler E, Missaghian-Cully S, Brewer C, Meredith-Jones A. Investigation into a new softening agent for use on formalin-fixed, paraffin wax-embedded tissue. Br J Biomed Sci. 2009;66(2):63-6.
9. กัลยา ผลากรกุล. เนื้อเยื่อพื้นฐานของร่างกายและหลักการปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา. กรุงเทพฯ: ดีไซร์; 2534.

10. Winsor L. Tissue Processing. In Woods AE and Ellis RC eds. Laboratory Histopathology. New York: Churchill Livingstone. 1994;4;2-37.
11. Singer M Factors which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes. Int Rev Cytol 1952;1:211-55.