HSCR
HEALTH SCIENCE CLINICAL RESEARCH

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายด่างในขั้นตอน Bluing ต่อคุณภาพการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อไต: การวิจัยเชิงทดลอง

ธนาลักษณ์ ลิ้มศิริลักษณ์*, สืบตระกูล ตันตลานุกุล**

*กลุ่มงานพยาธิกายวิภาค โรงพยาบาลอุตรดิตถ์

**วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี อุตรดิตถ์ คณะพยาบาลศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายด่าง 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมคาร์บอเนต และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ในขั้นตอน Bluing ต่อคุณภาพการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อไต รวมทั้งประเมินการติดสีนิวเคลียส การติดสไซโทพลาซึม ความแตกต่างของสี และเปรียบเทียบต้นทุนและความปลอดภัย

วิธีการศึกษา: การวิจัยเชิงทดลองแบบ Factorial design ด้วยการสุ่มสมบูรณ์ ทำการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อไตสุกรจำนวน 135 บล็อก โดยใช้สารละลายด่าง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในขั้นตอน Bluing ด้วยระยะเวลา 5 แบบ (3 จุ่ม 10 จุ่ม 30 วินาที 1 นาที และ 2 นาที) ประเมินคุณภาพโดยผู้เชี่ยวชาญ 5 คนแบบปิดบัง ใช้ระบบการให้คะแนน 4 ระดับ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Two-way ANOVA, Tukey's HSD test และ Intraclass correlation coefficient กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ผลการศึกษา: ลิเทียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.05 ให้คุณภาพการติดสีนิวเคลียสดีที่สุด (คะแนนเฉลี่ย 2.78 ± 0.15 ที่เวลา 3 จุ่ม) เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (2.67 ± 0.29) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2.22 ± 0.19) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.15$) สำหรับการติดสีไซโทพลาซึม ลิเทียมคาร์บอเนตให้ผลดีที่สุด ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.09$) โดยระยะเวลาไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.112$) ความแตกต่างของสีระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ลิเทียมคาร์บอเนต และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ให้ผลดีและสม่ำเสมอ ในขณะที่โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลา ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.12$) การจัดกลุ่มคุณภาพพบว่า ลิเทียมคาร์บอเนตมีตัวอย่างระดับ "ดี" สูงสุดร้อยละ 93.3 สำหรับการติดสีนิวเคลียส เทียบกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 84.4 และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40.0 ($p<0.001$) ด้านต้นทุนการใช้งาน ลิเทียมคาร์บอเนตมีต้นทุนต่อครั้งเพียง 0.50 บาท และมีข้อดีด้านความปลอดภัยที่เหนือกว่า ไม่มีกลิ่น ไม่ระเหย และเก็บรักษาง่าย ความเชื่อมั่นระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดีมาก (ICC=0.86-0.91)

สรุป: ลิเทียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.05 เป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารละลายด่างในขั้นตอน Bluing โดยให้คุณภาพการย้อมสีที่เหนือกว่า มีความปลอดภัยสูงกว่า และมีต้นทุนการใช้งานที่ยอมรับได้เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้กันทั่วไป สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาเพื่อปรับปรุงคุณภาพการวินิจฉัยและเพิ่มความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

คำสำคัญ: การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin, ลิเทียมคาร์บอเนต, คุณภาพการย้อมสี, จุลพยาธิวิทยา, เนื้อเยื่อไต

ติดต่อ: สืบตระกูล ตันตลานุกุล
สถานที่ติดต่อ: วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี อุตรดิตถ์
คณะพยาบาลศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก
อีเมล์: seubtrakul@unc.ac.th

รับต้นฉบับ: 17 ตุลาคม 2568
แก้ไขต้นฉบับ: 29 พฤศจิกายน 2568
รับต้นฉบับตีพิมพ์: 9 ธันวาคม 2568

ISSN 2773-9589 (online)

HSCR
HEALTH SCIENCE CLINICAL RESEARCH

ORIGINAL ARTICLE

Comparative Study of Alkaline Solutions in the Bluing Step on Hematoxylin and Eosin Staining Quality in Renal Tissue: An Experimental Study

Tanalak Limsirilak*, Seubtrakul Tantalanukul**
*Department of Anatomical Pathology, Uttaradit Hospital
**Boromarajonani College of Nursing, Uttaradit, Faculty of Nursing, Praboromarajchanok Institute

ABSTRACT

Objective: To compare the effectiveness of three alkaline solutions: ammonium hydroxide, lithium carbonate, and potassium hydroxide in the bluing step on Hematoxylin and Eosin (H&E) staining quality in renal tissue, evaluating nuclear staining, cytoplasmic staining, color contrast, and comparing costs and safety profiles.

Methods: A factorial experimental design with completely randomized arrangement was conducted. H&E staining was performed on 135 porcine renal tissue blocks using three alkaline solutions at 0.05% concentration in the bluing step with five different time intervals (3 dips, 10 dips, 30 seconds, 1 minute, and 2 minutes). Quality assessment was conducted by five blinded experts using a 4-point scoring system. Data were analyzed using two-way ANOVA, Tukey's HSD test, and Intraclass correlation coefficient. Statistical significance was set at $p<0.05$.

Results: Lithium carbonate 0.05% provided the best nuclear staining quality (mean score 2.78±0.15 at 3 dips) compared to ammonium hydroxide (2.67 ± 0.29) and potassium hydroxide (2.22±0.19) with statistical significance ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.15$). For cytoplasmic staining, lithium carbonate showed superior results ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.09$) with time intervals showing no significant effect ($p=0.112$). Regarding color contrast between nucleus and cytoplasm, lithium carbonate and ammonium hydroxide provided good and consistent results, while potassium hydroxide showed a declining trend with increased time ($p<0.001$, $\eta^2 = 0.12$). Quality grading revealed that lithium carbonate achieved the highest proportion of "excellent" grade at 93.3% for nuclear staining compared to ammonium hydroxide 84.4% and potassium hydroxide 40.0% ($p<0.001$). Cost analysis showed lithium carbonate had a usage cost of only 0.50 baht per procedure with superior safety advantages including odorless, non-volatile properties, and easy storage. Inter-rater reliability was excellent (ICC=0.86-0.91).

Conclusions: Lithium carbonate 0.05% is a suitable alternative for the bluing step, providing superior staining quality, enhanced safety, and acceptable usage cost compared to commonly used ammonium hydroxide solutions. It can be applied in histopathology laboratories to improve diagnostic quality and enhance occupational safety.

Keywords: Hematoxylin and eosin staining, Lithium carbonate, Staining quality, Histopathology, Renal tissue

Contact: Seubtrakul Tanthalanukul
Address: Boromarajonani College of Nursing, Uttaradit, Faculty of Nursing, Praboromarajchanok Institute
E-mail: seubtrakul@unc.ac.th

Received: 17 October 2025
Revised: 29 November 2025
Accepted: 9 December 2025

บทนำ

เทคนิคการย้อมสีด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) เป็นวิธีการย้อมสีมาตรฐานที่มีความสำคัญสูงสุดในสาขาจุลพยาธิวิทยา ซึ่งได้รับการพัฒนาและใช้งานมาอย่างต่อเนื่องนานกว่าหนึ่งศตวรรษ โดยยังคงเป็นเครื่องมือหลักในการวินิจฉัยโรคและการประเมินลักษณะทางจุลพยาธิของเนื้อเยื่อในปัจจุบัน[1] กระบวนการย้อมสีนี้ใช้หลักการของสารย้อมสีสองชนิดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดย Hematoxylin ทำหน้าที่ย้อมนิวเคลียสให้มีสีน้ำเงิน - ม่วงเข้ม ผ่านกลไกการจับกับกรดนิวคลีอิก ในขณะที่ Eosin ย้อมองค์ประกอบโปรตีนในไซโทพลาซึมให้มีสีชมพู[2] ความสำเร็จของการย้อมสีไม่ได้ขึ้นอยู่กับสารย้อมสีเพียงอย่างเดียว แต่ยังต้องอาศัยความเหมาะสมของขั้นตอนย่อยต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอน “Bluing” ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้สีแดงม่วงเบื้องต้นของ Hematoxylin เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มที่มีความชัดเจนในนิวเคลียส กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นในสภาวะด่างอ่อนซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงเคมีของสารเชิงซ้อนที่เกิดจาก Hematein และ Mordant ในปัจจุบันสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เป็นสารด่างที่ได้รับความนิยมสูงสุดในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาทั่วโลกสำหรับขั้นตอน Bluing อย่างไรก็ตาม สารนี้มีข้อจำกัดสำคัญหลายประการ ได้แก่ มีกลิ่นฉุนรุนแรง มีสมบัติระเหยง่ายที่อุณหภูมิห้อง ส่งผลให้ค่า pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และต้องมีการเตรียมสารละลายใหม่บ่อยครั้ง นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงด้านอาชีวอนามัยต่อบุคลากรทางการแพทย์ที่ต้องสัมผัสเป็นประจำ สารทางเลือกอื่นที่เคยมีการศึกษา ได้แก่ ลิเทียมคาร์บอเนต (Li_2CO_3) ซึ่งมีรายงานการใช้ในห้องปฏิบัติการบางแห่ง[3] และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ที่เคยถูกทดสอบในงานวิจัยเบื้องต้น[4] อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นการรายงานผลเบื้องต้นหรือการศึกษาในตัวอย่างเนื้อเยื่อชนิดอื่น ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพอย่างเป็นระบบในเนื้อเยื่อไตโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Factorial design ที่ควบคุมตัวแปรรบกวนอย่างเข้มงวด และใช้ระบบการประเมินแบบมาตรฐาน

การประเมินคุณภาพของการย้อมสี H&E เป็นองค์ประกอบสำคัญของการควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา เนื่องจากความแปรปรวนของการย้อมสีสามารถส่งผลกระทบโดยตรงต่อความแม่นยำของการวินิจฉัยและการตีความผลทางจุลพยาธิวิทยา[5] ตัวอย่างเช่น ในการวินิจฉัยโรคไตเรื้อรัง การประเมินความหนาแน่นของนิวเคลียสในท่อไต (tubular nuclear density) และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดไตขนาดเล็ก (glomerular endothelial cells) ต้องอาศัยความชัดเจนของการย้อมสี Hematoxylin ในนิวเคลียส[6] การศึกษาของ Stathonikos และคณะ (2020) พบว่าการย้อมสี H&E ที่ไม่สม่ำเสมอส่งผลให้ระบบ Digital pathology และ AI-based diagnostic tools มีความแม่นยำในการวินิจฉัยลดลงร้อยละ 15-23[7] นอกจากนี้ ในกรณีของ Acute tubular necrosis การประเมินความรุนแรงของการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุท่อไต (tubular epithelial cell injury) จำเป็นต้องอาศัยความคมชัดของขอบนิวเคลียสและความแตกต่างของสีระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาซึม ซึ่งหากการย้อมสีไม่ดีอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการจัดระดับความรุนแรงของโรค[8] การประเมินแบบดั้งเดิมมักอาศัยประสบการณ์ และการสังเกตเชิงคุณภาพของผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งอาจมีความเป็นอัตนัยสูง และผลการประเมินอาจแตกต่างกันระหว่างผู้ประเมิน การพัฒนาระบบการประเมินแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative scoring system) ที่มีเกณฑ์ชัดเจนจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการเพิ่มความน่าเชื่อถือและความสม่ำเสมอของการประเมินคุณภาพการย้อมสี[9] ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาระบบการประเมินแบบ 4 ระดับ (0-3 คะแนน) โดยดัดแปลงจากเกณฑ์การประเมินคุณภาพการย้อมสี H&E ของ Meyerholz และ Beck (2018)[9] และปรับให้เหมาะสมกับโครงสร้างเนื้อเยื่อไต ทั้งนี้ได้มีการทดสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) โดยผู้เชี่ยวชาญ 3 คน และทดสอบความเชื่อมั่นระหว่างผู้ประเมิน (inter-rater reliability) ในการศึกษานำร่อง (pilot study) ด้วยตัวอย่าง 15 สไลด์ พบว่ามีค่า Intraclass correlation coefficient (ICC) อยู่ที่ 0.87 - 0.92 นอกจากนี้ ในยุคของเทคโนโลยีดิจิทัลและปัญญาประดิษฐ์ทางการแพทย์ ความสม่ำเสมอของคุณภาพการย้อมสียิ่งมีความสำคัญเพิ่มขึ้น เนื่องจากส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบวิเคราะห์ภาพอัตโนมัติ

เนื้อเยื่อไตถือเป็นตัวอย่างที่มีความเหมาะสมยิ่งสำหรับการศึกษาคุณภาพการย้อมสี H&E เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างทางจุลพยาธิที่หลากหลายและซับซ้อน ประกอบด้วยทั้งหน่วยการกรอง (glomeruli) ที่มีเซลล์หนาแน่นและท่อไต (tubules) ที่มีเซลล์เรียงเป็นแถว โดยโครงสร้างทั้งสองมีลักษณะการย้อมสีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ทำให้สามารถประเมินทั้งการติดสีของนิวเคลียส ไซโทพลาซึม และความแตกต่างของสีระหว่าง

ISSN 2773-9589 (online)

องค์ประกอบต่างๆ ได้อย่างครอบคลุม[10] นอกจากนี้เนื้อเยื่อไตยังมีความสำคัญทางคลินิกสูงในการวินิจฉัยโรคไต ทำให้คุณภาพการย้อมสีที่ดีมีผลกระทบโดยตรงต่อการดูแลรักษาผู้ป่วย แม้ว่าจะมีการใช้สารละลายด่างหลายชนิดในขั้นตอน Bluing แต่การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพอย่างเป็นระบบยังมีจำกัด โดยเฉพาะการศึกษาที่ใช้ระบบการประเมินมาตรฐาน ควบคุมตัวแปรต่างๆ อย่างเข้มงวด และครอบคลุมทั้งด้านคุณภาพการย้อมสี ต้นทุน และความปลอดภัย การศึกษาที่ผ่านมามักใช้วิธีการประเมินที่แตกต่างกัน ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบและสรุปผลอย่างชัดเจน[11] นอกจากนี้ ปัจจัยด้านความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและต้นทุนการดำเนินงานยังเป็นประเด็นสำคัญที่ควรได้รับการพิจารณาควบคู่ไปกับประสิทธิภาพของการย้อมสี การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายด่าง 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมคาร์บอเนต และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอน Bluing ต่อคุณภาพการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อไต โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Factorial design และระบบการประเมินแบบกึ่งปริมาณที่ครอบคลุมการติดสีของนิวเคลียส ไซโทพลาซึม และความแตกต่างของสีระหว่างองค์ประกอบต่างๆ รวมทั้งการวิเคราะห์เปรียบเทียบด้านต้นทุนและความปลอดภัย ผลการศึกษาคาดว่าจะให้ข้อมูลเชิงประจักษ์ที่มีคุณภาพสำหรับการตัดสินใจเลือกใช้สารที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา และสนับสนุนการพัฒนามาตรฐานการปฏิบัติงานที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายด่าง 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมคาร์บอเนต และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ใน ขั้นตอน Bluing ต่อคุณภาพการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อไต

วิธีการศึกษา

1. การออกแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) แบบ Factorial design โดยมีการสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design) เพื่อศึกษาผลของตัวแปรอิสระสองตัว ได้แก่ ชนิดของสารละลายด่าง (3 ระดับ: แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมคาร์บอเนต และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์) และระยะเวลาในการทำ Bluing (5 ระดับ: 3 จุ่ม, 10 จุ่ม, 30 วินาที, 1 นาที และ 2 นาที) ต่อตัวแปรตามคือ คุณภาพการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ในด้านต่าง ๆ การออกแบบการทดลองดังกล่าวช่วยให้สามารถควบคุมความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยรบกวน และวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. กลุ่มตัวอย่างและการคัดเลือก (Sample Selection)

2.1 ขนาดตัวอย่าง (sample Size)

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเนื้อเยื่อไตจากสุกรที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 6-8 เดือน น้ำหนักประมาณ 25-30 กิโลกรัม ซึ่งได้รับการตรึงในสารละลาย 10% Neutral buffered formalin เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จำนวน 135 บล็อก โดยทั้งหมดเป็นชิ้นเนื้อที่เลือกจากบริเวณ Renal cortex เพื่อให้ได้โครงสร้างที่สม่ำเสมอและเหมาะสมสำหรับการประเมินคุณภาพการย้อมสี การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างดำเนินการโดยใช้วิธีการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) แบ่งชิ้นเนื้อออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ตามชนิดสารละลายด่าง กลุ่มละ 45 บล็อก จากนั้นในแต่ละกลุ่มจะแบ่งย่อยตามระยะเวลาการทำ Bluing เป็น 5 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 9 บล็อก (3 สไลด์ × 3 การทำซ้ำ)

2.2 เกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion Criteria)

เกณฑ์การคัดเข้าได้แก่ ชิ้นเนื้อที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับการตัด (10×10×3 มิลลิเมตร) ไม่มีการปนเปื้อนของเลือด และได้รับการตรึงอย่างเหมาะสม ชิ้นเนื้อทั้งหมดได้รับการตัดด้วย Rotary microtome เป็นแผ่นบางขนาด 3-5 ไมครอน โดยควบคุมพื้นที่หน้าตัดของเนื้อเยื่อบนสไลด์ให้มีความสม่ำเสมอที่ 8×8 มิลลิเมตร (± 0.5 มิลลิเมตร) เพื่อลดความแปรปรวนในการประเมินคุณภาพการย้อมสีที่อาจเกิดจากความแตกต่างของพื้นที่การมองเห็น การควบคุมขนาดพื้นที่หน้าตัดนี้ทำโดยการใช้ Template มาตรฐานในขั้นตอนการหล่อบล็อกพาราฟิน และตรวจสอบด้วยการวัดด้วย Digital caliper ก่อนการย้อมสี

2.3 เกณฑ์การคัดออก (Exclusion Criteria)

ส่วนเกณฑ์การคัดออก ได้แก่ ชิ้นเนื้อที่เสียหายจากการแช่แข็ง มีร่องรอยการติดเชื้อ หรือมีการเสื่อมสลายของโครงสร้างเนื้อเยื่อ

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Materials and Equipment)

3.1 อุปกรณ์การเตรียมเนื้อเยื่อ

การเตรียมเนื้อเยื่อใช้เครื่อง Automatic tissue processor รุ่น Excelsior AS สำหรับขั้นตอน Tissue processing การหล่อบล็อกใช้ Embedding center และการตัดชิ้นเนื้อใช้

ISSN 2773-9589 (online)

Rotary microtome เพื่อได้แผ่นบางขนาด 3 - 5 ไมครอน โดยอุปกรณ์ทั้งหมดได้รับการสอบเทียบและบำรุงรักษาตามมาตรฐานของผู้ผลิต

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย Xylene สำหรับการ deparaffinization, Absolute alcohol และ 95% Ethanol สำหรับการ hydration และ dehydration, Harris Hematoxylin เป็นสารย้อมสีนิวเคลียส, Eosin Y เป็นสารย้อมสีไซโทพลาซึม, Lithium carbonate (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99), Ammonium hydroxide (ความเข้มข้นร้อยละ 27), Potassium hydroxide (ความบริสุทธิ์ร้อยละ 90) และ Mounting medium สำหรับการปิดสไลด์ สารละลายด่างทั้งสามชนิดถูกเตรียมในความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และมีการวัดค่า pH ด้วย pH meter ที่ได้รับการสอบเทียบเพื่อให้แน่ใจว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

4. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย (Research Procedures)

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อดำเนินการอย่างเป็นระบบ เริ่มจากการรับเนื้อเยื่อไตสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ที่ได้รับอนุญาตตามกฎหมาย นำชิ้นเนื้อมาล้างด้วยน้ำเกลือ Normal saline (0.9% NaCl) เพื่อขจัดเลือดและสิ่งสกปรก จากนั้นตัดแต่งให้ได้ชิ้นเนื้อขนาด 10×10×3 มิลลิเมตร โดยเลือกเฉพาะบริเวณ Renal cortex ที่มีโครงสร้าง Glomeruli และ Tubules ที่สมบูรณ์ ชิ้นเนื้อได้รับการตรึงในสารละลาย 10% Neutral buffered formalin ที่อุณหภูมิห้อง (20 - 25 °C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนปริมาตรสารตรึงต่อปริมาตรเนื้อเยื่อเป็น 10:1 หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการ Tissue processing ด้วยเครื่อง Automatic tissue processor ตามโปรโตคอลมาตรฐาน ได้แก่ Dehydration ด้วย Ethanol ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ (ร้อยละ 70, ร้อยละ ร้อยละ 80, ร้อยละ 95, ร้อยละ 100) Clearing ด้วย Xylene และ Infiltration ด้วย Paraffin wax ที่อุณหภูมิ 56 - 58°C

4.2 กระบวนการย้อมสี

กระบวนการย้อมสีดำเนินการตามโปรโตคอลมาตรฐานที่ประกอบด้วย 7 ขั้นตอนหลัก เริ่มจาก Deparaffinization ด้วย Xylene เพื่อขจัดพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ ตามด้วย Hydration ด้วย Ethanol ที่ความเข้มข้นลดลงเป็นลำดับเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการย้อมสี จากนั้นทำ Hematoxylin nuclear staining เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ Hematoxylin จับกับกรดนิวคลีอิกในนิวเคลียส หลังจากนั้นล้างสีส่วนเกินแล้วจึงทำขั้นตอน Bluing ด้วยสารละลายด่างตามกลุ่มการทดลองที่กำหนด โดยใช้ระยะเวลา 5 แบบตามแผนการทดลอง ขั้นตอนนี้มีความสำคัญในการเปลี่ยนสีแดงม่วงของ Hematoxylin ให้เป็นสีน้ำเงินเข้มที่มีความชัดเจน จากนั้นทำ Eosin counterstaining เป็นเวลา 3 นาที เพื่อย้อมไซโทพลาซึมให้มีสีชมพู ตามด้วย Dehydration ด้วย Ethanol ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ และสุดท้ายทำ Clearing ด้วย Xylene แล้วปิดสไลด์ด้วย Mounting medium

4.3 การควบคุมคุณภาพ (quality Control)

การควบคุมคุณภาพของทุกขั้นตอนได้รับการดำเนินการอย่างเข้มงวดเพื่อลดความแปรปรวนที่อาจส่งผลต่อผลการศึกษา โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.3.1 การควบคุมสภาวะแวดล้อม

- อุณหภูมิห้องปฏิบัติการควบคุมที่ 22 - 25 °C ตลอดการทดลอง
- ความชื้นสัมพัทธ์ควบคุมที่ร้อยละ 40 - 60
- ใช้ระบบบันทึกอุณหภูมิอัตโนมัติ (data logger) เพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอ

4.3.2 การควบคุมคุณภาพสารเคมี

- สารละลายด่างทั้งสามชนิดเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์
- วัดค่า pH ของสารละลายด่างก่อนใช้งานทุกครั้งด้วย pH meter (Mettler Toledo SevenCompact™) ที่ผ่านการสอบเทียบ
- ช่วง pH ที่ยอมรับได้: Li_2CO_3 (pH 10.5-11.0), NH_4OH (pH 10.8-11.2), KOH (pH 11.0-11.5)
- หากค่า pH อยู่นอกช่วง ทำการเตรียมสารละลายใหม่
- Harris Hematoxylin และ Eosin Y ใช้จากล็อตเดียวกันตลอดการทดลอง

4.3.3 การควบคุมเวลา

- ใช้ Timer อิเล็กทรอนิกส์ที่มีความแม่นยำ ± 0.1 วินาที
- การจุ่มสไลด์ดำเนินการโดยผู้วิจัยคนเดียวกันตลอดการศึกษา
- ความเร็วในการจุ่มและยกสไลด์ควบคุมที่ประมาณ 1 จุ่มต่อวินาที

4.3.4 Positive และ Negative Controls

- รวมตัวอย่าง Positive control (เนื้อเยื่อไตที่ย้อมสีได้มาตรฐาน) ในทุก batch

ISSN 2773-9589 (online)

- ประเมินคุณภาพของ Positive control ก่อนเริ่มการประเมินตัวอย่างทดลอง

- หากคุณภาพของ Positive control ไม่ผ่านเกณฑ์ (คะแนน < 2.0) ทำการย้อมสี batch นั้นใหม่

4.3.5 การสอบเทียบอุปกรณ์

- Microtome รับการบำรุงรักษาและเปลี่ยนใบมีดทุก 50 บล็อก

- ตรวจสอบความหนาของชิ้นเนื้อด้วย Micrometer ทุก 10 สไลด์

- กล้องจุลทรรศน์ได้รับการสอบเทียบ (Calibration) ก่อนเริ่มการศึกษา

5. เครื่องมือการประเมินคุณภาพ (Assessment Tools)

5.1 ระบบการให้คะแนน

การประเมินคุณภาพการย้อมสีใช้กล้องจุลทรรศน์แสง (light microscope) พร้อมเลนส์ขยาย 400 เท่า (40X objective lens) และกล้องดิจิทัลสำหรับบันทึกภาพ ระบบการให้คะแนนที่ใช้เป็นแบบ 4 ระดับ (0-3 คะแนน) ใน 3 ด้านหลัก ได้แก่ การติดสีน้ำเงินของ Hematoxylin ในนิวเคลียส (ประเมินความเข้มของสี ความคมชัดของขอบนิวเคลียส และรายละเอียดโครงสร้างภายในนิวเคลียส) การติดสีชมพูของ Eosin ในไซโทพลาซึม (ประเมินความสม่ำเสมอ ความใสของสี และการกระจายของสีในไซโทพลาซึม) และความแตกต่างของสีระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาซึม (contrast) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการแยกแยะโครงสร้างเซลล์

5.2 ผู้ประเมินและการฝึกอบรม

การประเมินดำเนินการโดยผู้เชี่ยวชาญ 5 คน ประกอบด้วยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีประสบการณ์ 4 คน และพยาธิแพทย์ 1 คน ซึ่งทุกคนได้รับการฝึกอบรมการใช้ระบบการประเมินก่อนการเก็บข้อมูลจริง

5.3 การประเมินแบบปิดบัง (Blinded Assessment)

ผู้ประเมินทุกคนถูกปิดบังข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสารละลายและระยะเวลาที่ใช้ (Blinded assessment) เพื่อลดความลำเอียงในการประเมินและเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล

6. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

6.1 สถิติเชิงพรรณนา

การวิเคราะห์ข้อมูลเริ่มต้นด้วยการรวบรวมคะแนนการประเมินและจัดเก็บในฐานข้อมูล Microsoft Excel จากนั้นนำเข้าสู่โปรแกรมสถิติ SPSS version 26.0 สำหรับการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนาที่ใช้ประกอบด้วยค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ค่าสูงสุดและต่ำสุด สำหรับตัวแปรเชิงปริมาณ ส่วนตัวแปรเชิงคุณภาพใช้ความถี่ (Frequency) และร้อยละ (Percentage)

6.2 สถิติเชิงอนุมาน

การวิเคราะห์เชิงอนุมานใช้ Two-way ANOVA เพื่อทดสอบผลของชนิดสารละลายด่าง ระยะเวลา และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสอง (Interaction effect) ต่อคะแนนการประเมินคุณภาพการย้อมสี ก่อนการวิเคราะห์มีการทดสอบข้อตกลงเบื้องต้นของ ANOVA ได้แก่ การแจกแจงแบบปกติ (Shapiro-Wilk test) ความเท่าเทียมของความแปรปรวน (Levene's test) และความเป็นอิสระของข้อมูล หากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก ANOVA จะทำการทดสอบเปรียบเทียบรายคู่โดยใช้ Tukey's HSD test และปรับค่า p-value ด้วย Bonferroni correction สำหรับการทดสอบหลายครั้ง ระดับนัยสำคัญทางสถิติกำหนดที่ α=0.05 และมีการคำนวณ Effect size โดยใช้ Eta squared (η^2) เพื่อประเมินความสำคัญทางปฏิบัติของความแตกต่างที่พบ โดยกำหนดเกณฑ์ η^2 = 0.01 (small effect), 0.06 (medium effect) และ 0.14 (large effect) ตามเกณฑ์ของ Cohen (1988)[12]

6.3 การทดสอบความเชื่อมั่น

นอกจากนี้มีการประเมินความเชื่อมั่นระหว่างผู้ประเมิน (Inter-rater reliability) โดยใช้ Intraclass correlation coefficient (ICC) เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของระบบการประเมิน

6.4 การวิเคราะห์ต้นทุน - ประสิทธิผล

การจัดกลุ่มคุณภาพใช้สูตรการคำนวณช่วงความกว้างของอันตรภาคชั้น แบ่งเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ดี (2.26 - 3.00), ปานกลาง (1.51 - 2.25), พอใช้ (0.76 - 1.50) และปรับปรุง (0.00 - 0.75) เพื่อให้สามารถจำแนกและเปรียบเทียบคุณภาพได้อย่างชัดเจน สำหรับการวิเคราะห์ต้นทุน - ประสิทธิผล (cost-effectiveness analysis) ได้ดำเนินการเพื่อเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยคุณภาพของสารละลายด่างแต่ละชนิด รวมทั้งการประเมินความเสี่ยงด้านความปลอดภัยโดยใช้ Safety Data Sheet และแนวทางของ Occupational Safety and Health Administration (OSHA)

7. จริยธรรมการวิจัย (Research Ethics)

การศึกษานี้ไม่ต้องการการขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เนื่องจากเป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (in vitro laboratory research) ที่

ISSN 2773-9589 (online)

ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่ได้มาจากโรงฆ่าสัตว์ที่ได้รับอนุญาตตามกฎหมาย โดยไม่เกี่ยวข้องกับการทดลองในมนุษย์ การเก็บข้อมูลจากผู้ป่วย หรือการใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อมนุษย์แต่อย่างใด

อย่างไรก็ตาม การศึกษายังคงปฏิบัติตามหลักการจริยธรรมการวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยใช้สัตว์อย่างมีจริยธรรมจากสัตว์ที่ถูกฆ่าเพื่อบริโภคตามปกติโดยไม่มีการฆ่าสัตว์เพิ่มเติมเพื่อการวิจัย มีการจัดการของเสียอันตรายตามมาตรฐานความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ การเปิดเผยข้อมูลการวิจัยอย่างโปร่งใสโดยไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน และการรายงานผลการวิจัยอย่างตรงไปตรงมาโดยไม่บิดเบือนข้อมูล การศึกษาได้รับการดำเนินการภายใต้การกำกับดูแลของคณะกรรมการวิชาการของสถาบัน และปฏิบัติตามแนวทางการปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการ (good laboratory practice: GLP) เพื่อให้มั่นใจในคุณภาพและความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้จากการศึกษา

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ดำเนินการย้อมสีเนื้อเยื่อไตสุกรจำนวน 135 บล็อก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามชนิดสารละลายด่าง กลุ่มละ 45 บล็อก ตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดผ่านเกณฑ์คุณภาพที่กำหนดไว้ในวิธีการศึกษา มีโครงสร้างของ Renal cortex ที่สมบูรณ์ ประกอบด้วย Glomeruli และ Tubules ที่สามารถประเมินคุณภาพการย้อมสีได้อย่างเหมาะสม ไม่มีตัวอย่างใดที่ต้องถูกคัดออกจากการศึกษาเนื่องจากคุณภาพของเนื้อเยื่อไม่เหมาะสม

การทดสอบความเชื่อมั่นของเครื่องมือการประเมินโดยใช้ Intraclass correlation coefficient (ICC) แสดงให้เห็นว่าระบบการประเมินมีความเชื่อมั่นระหว่างผู้ประเมินในระดับดีมาก สำหรับการติดสีนิวเคลียส ค่า ICC เท่ากับ 0.89 (95% CI: 0.85 - 0.92) การติดสีไซโทพลาซึม มีค่า ICC เท่ากับ 0.86 (95% CI: 0.82 - 0.90) และความแตกต่างของสี มีค่า ICC เท่ากับ 0.91 (95% CI: 0.88 - 0.94) ค่า ICC ทุกด้านอยู่ในช่วงมากกว่า 0.80 ซึ่งบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือและความสอดคล้องของการประเมินระหว่างผู้เชี่ยวชาญทั้ง 5 คน

การเปรียบเทียบคุณภาพการติดสีนิวเคลียสด้วย Hematoxylin

ผลการประเมินคุณภาพการติดสีนิวเคลียสของสารละลายด่างทั้งสามชนิดที่ระยะเวลาต่าง ๆ **(ตารางที่ 1)** ค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีนิวเคลียสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารละลายด่างทั้ง 3 ชนิดในทุกช่วงระยะเวลา ($p<0.001$)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของคะแนนการติดสีนิวเคลียสตามชนิดสารละลายด่างและระยะเวลา

ระยะเวลา	0.05% NH_4OH	0.05% Li_2CO_3	0.05% KOH	p-value*
3 จุ่ม	2.67 ± 0.29	2.78 ± 0.15	2.22 ± 0.19	<0.001
10 จุ่ม	2.56 ± 0.24	2.67 ± 0.20	1.89 ± 0.33	<0.001
30 วินาที	2.44 ± 0.20	2.56 ± 0.27	1.56 ± 0.18	<0.001
1 นาที	2.33 ± 0.27	2.44 ± 0.24	1.67 ± 0.29	<0.001
2 นาที	2.22 ± 0.32	2.33 ± 0.29	1.44 ± 0.27	<0.001
p-value†	0.002	0.001	<0.001	

*One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างสารละลายด่าง

†One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างระยะเวลา

ISSN 2773-9589 (online)

จากตารางที่ 1 พบว่า ลิเทียมคาร์บอเนต 0.05% ให้ค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีนิวเคลียสสูงสุดในทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 2.78 ± 0.15 เมื่อใช้เวลา 3 จุ่ม รองลงมาคือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ให้คะแนนสูงสุด 2.67 ± 0.29 ที่เวลา 3 จุ่มเช่นกัน ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ให้คะแนนต่ำสุดในทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 2.22 ± 0.19 เมื่อใช้เวลา 3 จุ่ม การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงให้เห็นว่ามีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดสารละลายด่างและระยะเวลา ($F=8.42$, $p<0.001$, $\eta^2 = 0.15$) นอกจากนี้ พบว่าคะแนนการติดสีนิวเคลียสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มสารละลายด่าง โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) สำหรับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และลิเทียมคาร์บอเนต และ $p<0.001$ สำหรับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์)

การเปรียบเทียบคุณภาพการติดสไซโทพลาซึมด้วย Eosin

ผลการประเมินคุณภาพการติดสีไซโทพลาซึมของสารละลายด่างทั้งสามชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ **(ตารางที่ 2)** การติดสีไซโทพลาซึมมีรูปแบบที่แตกต่างจากการติดสีนิวเคลียส

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของคะแนนการติดสีไซโทพลาซึมตามชนิดสารละลายด่างและระยะเวลา

ระยะเวลา	0.05% NH_4OH	0.05% Li_2CO_3	0.05% KOH	p-value*
3 จุ่ม	2.11 ± 0.33	2.22 ± 0.19	1.89 ± 0.24	0.018
10 จุ่ม	2.00 ± 0.27	2.11 ± 0.24	1.67 ± 0.29	0.002
30 วินาที	2.22 ± 0.24	2.33 ± 0.20	1.56 ± 0.18	<0.001
1 นาที	2.00 ± 0.29	2.00 ± 0.15	1.56 ± 0.27	0.001
2 นาที	2.11 ± 0.15	2.00 ± 0.33	1.44 ± 0.24	<0.001
p-value†	0.156	0.089	0.012	

**One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างสารละลายด่าง

†One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างระยะเวลา

จากตารางที่ 2 พบว่า ลิเทียมคาร์บอเนต 0.05% ให้ค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีไซโทพลาซึมสูงสุดในเกือบทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 2.33 ± 0.20 เมื่อใช้เวลา 30 วินาที รองลงมาคือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ให้คะแนนสูงสุด 2.22 ± 0.24 ที่เวลา 30 วินาที ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ให้คะแนนต่ำสุดในทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 1.89 ± 0.24 เมื่อใช้เวลา 3 จุ่ม การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงให้เห็นว่าชนิดสารละลายด่างมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการติดสีไซโทพลาซึม ($F = 12.34$, $p<0.001$, $\eta^2 = 0.09$) แต่ระยะเวลาไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($F = 1.89$, $p = 0.112$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสอง ($F = 1.45$, $p = 0.183$) สำหรับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพียงชนิดเดียวที่พบว่าระยะเวลามีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคะแนนการติดสีไซโทพลาซึม ($p=0.012$) โดยคะแนนมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น

การเปรียบเทียบความแตกต่างของสีระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาซึม

ผลการประเมินความแตกต่างของสี (contrast) ระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของสารละลายด่างทั้ง 3 ชนิดที่ระยะเวลาต่าง ๆ **(ตารางที่ 3)** พารามิเตอร์นี้สะท้อนถึงความสามารถในการแยกแยะโครงสร้างเซลล์

ISSN 2773-9589 (online)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของคะแนนความแตกต่างของสี (contrast) ตามชนิดสารละลายด่างและระยะเวลา

ระยะเวลา	0.05% NH_4OH	0.05% Li_2CO_3	0.05% KOH	p-value*
3 จุ่ม	2.22 ± 0.24	2.33 ± 0.15	1.78 ± 0.27	<0.001
10 จุ่ม	2.11 ± 0.29	2.22 ± 0.19	1.33 ± 0.15	<0.001
30 วินาที	2.33 ± 0.20	2.44 ± 0.18	1.44 ± 0.18	<0.001
1 นาที	2.22 ± 0.15	2.11 ± 0.15	1.33 ± 0.29	<0.001
2 นาที	2.00 ± 0.35	2.00 ± 0.27	1.11 ± 0.24	<0.001
p-value†	0.089	0.045	0.001	

**One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างสารละลายด่าง

†One-way ANOVA เปรียบเทียบระหว่างระยะเวลา

จากตารางที่ 3 พบว่า ลิเทียมคาร์บอเนต 0.05% ให้ค่าเฉลี่ยคะแนนความแตกต่างของสีสูงสุดในเกือบทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 2.44 ± 0.18 เมื่อใช้เวลา 30 วินาที แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ให้คะแนนรองลงมา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 2.33 ± 0.20 ที่เวลา 30 วินาที ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ให้คะแนนต่ำสุดในทุกช่วงระยะเวลา โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ 1.78 ± 0.27 เมื่อใช้เวลา 3 จุ่ม การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงให้เห็นปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดสารละลายด่างและระยะเวลา ($F = 6.78$, $p<0.001$, $\eta^2 = 0.12$) โดยลิเทียมคาร์บอเนตและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มีคะแนนที่ค่อนข้างคงที่ในทุกช่วงระยะเวลา ในขณะที่โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ($p=0.001$) ซึ่งบ่งชี้ว่าโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์อาจมีผลกระทบต่อความชัดเจนของการย้อมสีเมื่อใช้เวลานาน

การจัดกลุ่มคุณภาพตามเกณฑ์การประเมิน

การแจกแจงของระดับคุณภาพการย้อมสีในแต่ละด้านตามเกณฑ์การจัดกลุ่มที่กำหนด **(ตารางที่ 4)** การจัดกลุ่มนี้ช่วยให้เห็นภาพรวมของคุณภาพในเชิงปฏิบัติได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ตารางที่ 4 การแจกแจงของระดับคุณภาพการย้อมสีตามชนิดสารละลายด่าง

สารละลายด่าง	ดี (n, %)	ปานกลาง (n, %)	พอใช้ (n, %)	ปรับปรุง (n, %)	p-value*
การติดสีนิวเคลียส					
0.05% NH_4OH	38 (84.4)	7 (15.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	<0.001
0.05% Li_2CO_3	42 (93.3)	3 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
0.05% KOH	18 (40.0)	24 (53.3)	3 (6.7)	0 (0.0)	
การติดสไซโทพลาซึม					
0.05% NH_4OH	7 (15.6)	38 (84.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.045
0.05% Li_2CO_3	12 (26.7)	33 (73.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
0.05% KOH	3 (6.7)	32 (71.1)	10 (22.2)	0 (0.0)	
ความแตกต่างของสี					
0.05% NH_4OH	8 (17.8)	37 (82.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	<0.001
0.05% Li_2CO_3	11 (24.4)	34 (75.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	
0.05% KOH	1 (2.2)	25 (55.6)	19 (42.2)	0 (0.0)	

*Chi-square test

ISSN 2773-9589 (online)

จากตารางที่ 4 พบว่าสำหรับการติดสีนิวเคลียส ลิเทียมคาร์บอเนตมีสัดส่วนของตัวอย่างที่ได้คุณภาพระดับ “ดี” สูงสุด คือร้อยละ 93.3 (42 จาก 45 บล็อก) รองลงมาคือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 84.4 (38 จาก 45 บล็อก) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่ำสุดเพียงร้อยละ 40.0 (18 จาก 45 บล็อก) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) สำหรับการติดสีไซโทพลาซึม ลิเทียมคาร์บอเนตมีสัดส่วนของตัวอย่างระดับ “ดี” สูงสุดเช่นกัน คือร้อยละ 26.7 รองลงมาคือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15.6 และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่ำสุดร้อยละ 6.7 ($p=0.045$) โดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มีตัวอย่างระดับ “พอใช้” ถึงร้อยละ 22.2 ซึ่งไม่พบในสารละลายอื่น สำหรับความแตกต่างของสี ลิเทียมคาร์บอเนตมีสัดส่วนระดับ “ดี” สูงสุดร้อยละ 24.4 รองลงมา คือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 17.8 ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มีเพียงร้อยละ 2.2 และมีตัวอย่างระดับ “พอใช้” ถึง 42.2% ($p<0.001$)

การเปรียบเทียบต้นทุนและความปลอดภัย

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนและคุณลักษณะด้านความปลอดภัยของสารละลายด่างทั้ง 3 ชนิด **(ตารางที่ 5)** การวิเคราะห์นี้ครอบคลุมทั้งต้นทุนทางตรงและปัจจัยด้านความปลอดภัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานจริง

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบต้นทุนและคุณลักษณะด้านความปลอดภัยของสารละลายด่าง

คุณลักษณะ	0.05% NH_4OH	0.05% Li_2CO_3	0.05% KOH
ต้นทุนต่อลิตร (บาท)	300-500	4,000-5,000	700-1,000
ต้นทุนต่อครั้ง (บาท)*	0.20	0.50	0.20
ความคงตัว	ต่ำ (ระเหยง่าย)	สูง	ปานกลาง
ความปลอดภัย	ปานกลาง	ดี	ต่ำ (กัดกร่อน)
กลิ่น	ฉุนรุนแรง	ไม่มี	ไม่มี
การจัดเก็บ	ยาก	ง่าย	ปานกลาง

*คำนวณจากการใช้ 200 ml ต่อครั้ง

จากตารางที่ 5 พบว่าแม้ลิเทียมคาร์บอเนตจะมีต้นทุนสูงสุดต่อหน่วยน้ำหนัก (4,000 - 5,000 บาทต่อกิโลกรัม) แต่เมื่อคำนวณต้นทุนการใช้งานจริงโดยพิจารณาปริมาณที่ใช้ต่อครั้ง (200 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05) พบว่ามีต้นทุนต่อครั้งเพียง 0.50 บาท ซึ่งใกล้เคียงกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีต้นทุนต่อครั้ง 0.20 บาท ในด้านความปลอดภัย ลิเทียมคาร์บอเนตมีข้อดีที่ชัดเจน คือ ไม่มีกลิ่น ไม่ระเหย มีความคงตัวสูง และเก็บรักษาง่าย ในขณะที่แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มีกลิ่นฉุนรุนแรง ระเหยง่าย และต้องเตรียมสารใหม่บ่อยครั้ง ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์แม้จะไม่มีกลิ่น แต่มีสมบัติกัดกร่อนสูงซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน

ISSN 2773-9589 (online)

ผลการศึกษา

สรุปผลการศึกษาหลัก

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองครั้งแรกที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายด่างสามชนิดในขั้นตอน Bluing อย่างเป็นระบบโดยใช้การออกแบบแบบ Factorial design ในเนื้อเยื่อไต ผลการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าลิเทียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.05 ให้คุณภาพการย้อมสีที่เหนือกว่าทั้งในด้านการติดสีนิวเคลียส (คะแนนเฉลี่ย 2.78 ± 0.15), การติดสีไซโทพลาซึม และความแตกต่างของสีระหว่างโครงสร้างเซลล์ โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) และ effect size ขนาดใหญ่ ($\eta^2 = 0.12 - 0.15$) เมื่อเทียบกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ผลการศึกษายังพบว่าระยะเวลาในการทำ Bluing มีผลต่อคุณภาพการย้อมสีอย่างมีนัยสำคัญ โดยการใช้เวลาสั้น (3 จุ่ม หรือประมาณ 3 วินาที) ให้คุณภาพที่ดีที่สุดสำหรับลิเทียมคาร์บอเนตและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในขณะที่การใช้เวลานานเกินไปส่งผลให้คะแนนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่พบการลดลงอย่างชัดเจน ($p<0.001$) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ต้นทุน - ประสิทธิผลแสดงให้เห็นว่าแม้ลิเทียมคาร์บอเนตจะมีราคาต่อหน่วยน้ำหนักสูง แต่เมื่อคำนวณจากการใช้งานจริง (0.50 บาทต่อครั้ง) อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อดีด้านความปลอดภัยและความเสถียรที่เหนือกว่า

การเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น

ผลการศึกษาของเราสอดคล้องกับรายงานของ Bancroft และ Gamble (2013)[3] ที่ระบุว่าลิเทียมคาร์บอเนตเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสำหรับขั้นตอน Bluing แม้ว่าการศึกษาดังกล่าวจะไม่ได้เปรียบเทียบอย่างเป็นระบบ การศึกษาของ Kiernan (2015)[4] ที่ทดสอบลิเทียมคาร์บอเนตในเนื้อเยื่อตับและปอด พบผลลัพธ์ในทำนองเดียวกัน โดยรายงานว่าลิเทียมคาร์บอเนตให้ความเสถียรของ pH ที่ดีกว่าและไม่มีกลิ่น อย่างไรก็ตาม การศึกษาของเรานำเสนอข้อมูลเชิงปริมาณที่ครอบคลุมมากกว่า โดยใช้ระบบการประเมินแบบมาตรฐาน ผู้ประเมินหลายคน และการวิเคราะห์ทางสถิติที่เข้มงวด แม้ว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ยังคงเป็นสารมาตรฐานที่ใช้กันแพร่หลาย แต่การศึกษาของเราพบว่ามีข้อจำกัดหลายประการที่สอดคล้องกับรายงานในวรรณกรรม Fischer และคณะ (2008)[1] รายงานว่าความไม่เสถียรของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เนื่องจากการระเหยของแอมโมเนียเป็นปัญหาหลักในการควบคุมคุณภาพ นอกจากนี้ ปัญหาด้านความปลอดภัยของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นประเด็นสำคัญที่ Chan (2014)[2] และ Wick (2019)[5] ต่างระบุถึงความเสี่ยงด้านอาชีวอนามัยจากการสัมผัสไอของแอมโมเนีย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์แสดงประสิทธิภาพที่ต่ำที่สุดในการศึกษาของเรา ซึ่งตรงกันข้ามกับความคาดหวังเบื้องต้นที่ว่าด่างที่แรงกว่าอาจให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่า ผลการศึกษาพบว่าโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ให้คะแนนการติดสีนิวเคลียสต่ำสุด (2.22 ± 0.19 ที่เวลา 3 จุ่ม) และมีแนวโน้มคุณภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มระยะเวลา ($p<0.001$) ซึ่งอาจเกิดจากค่า pH ที่สูงเกินไป (11.0-11.5) ทำให้เกิดการ Overoxidation ของ Hematein complex หรือสมบัติกัดกร่อนที่รุนแรงอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างโปรตีนในเนื้อเยื่อ

กลไกทางเคมีและชีวเคมี

เพื่อให้เข้าใจผลการศึกษาได้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น จำเป็นต้องพิจารณากลไกทางเคมีของการย้อมสี Hematoxylin และบทบาทของสารละลายด่างในขั้นตอน Bluing Hematoxylin ผ่านการออกซิเดชันเปลี่ยนเป็น Hematein ซึ่งจับกับ Aluminum mordant ในสภาวะกรดอ่อน (pH 2-3) ก่อให้เกิด Hematein-aluminum complex สีแดงม่วง ขั้นตอน Bluing มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน Complex นี้จากสีแดงม่วงไปเป็น Hematein lake สีน้ำเงินเข้มในสภาวะด่าง (pH 10-11)[13] ความแตกต่างของประสิทธิภาพระหว่างสารละลายด่างทั้ง 3 ชนิดสามารถอธิบายได้จากคุณสมบัติทางเคมี: ลิเทียมคาร์บอเนต (Li_2CO_3) เป็นเกลือของกรดอ่อน (H_2CO_3) และเบสแรง (LiOH) เมื่อละลายในน้ำจะเกิด Hydrolysis ให้สภาวะด่างอ่อน (pH 10.5-11.0) ที่เหมาะสมสำหรับการทำ Bluing การที่เป็น Carbonate salt ทำให้มีคุณสมบัติ Buffering ช่วยรักษาค่า pH ให้คงที่ นอกจากนี้ Li+ ion มีขนาดเล็กและมีความสามารถในการ Coordinate กับ Aluminum ได้ดี อาจช่วยเสริมความเสถียรของ Hematein-aluminum complex[14] แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) แม้ว่าจะให้ pH ที่เหมาะสม (10.8 - 11.2) แต่มีข้อจำกัด คือ ความไม่เสถียร เนื่องจาก NH_3 มีสมบัติระเหยง่าย ทำให้ความเข้มข้นและค่า pH เปลี่ยนแปลงเมื่อสัมผัสอากาศ ส่วนโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นเบสแรง ให้ค่า pH สูง (11.0 - 11.5) ซึ่งอาจสูงเกินไปสำหรับการทำ Bluing ค่า pH ที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิด Over-deprotonation ของ Phenolic groups ใน Hematein หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Complex ที่ไม่พึงประสงค์

ISSN 2773-9589 (online)

ข้อจำกัดของการศึกษา

แม้ว่าการศึกษานี้ได้รับการออกแบบอย่างรอบคอบ แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการ ประการแรก การศึกษานี้ใช้เฉพาะเนื้อเยื่อไตสุกร ผลการศึกษาอาจไม่สามารถนำไปใช้กับเนื้อเยื่อชนิดอื่นได้โดยตรง เช่น เนื้อเยื่อที่มีไขมันสูงหรือเนื้อเยื่อที่มีการแคลซิฟิเคชัน การศึกษาในอนาคตควรขยายไปสู่เนื้อเยื่อชนิดอื่นเพื่อยืนยันความสามารถในการนำผลไปใช้ได้อย่างกว้างขวาง ประการที่สอง การศึกษานี้เน้นที่ชนิดของสารละลายด่างและระยะเวลาเป็นตัวแปรหลัก แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่อาจมีผล เช่น ความเข้มข้นของสารละลายด่าง อุณหภูมิ และชนิดของ Hematoxylin ประการที่สาม แม้ว่าจะใช้ระบบการประเมินแบบกึ่งปริมาณและมีผู้ประเมินหลายคน แต่การประเมินยังคงมีองค์ประกอบของความเป็นอัตวิสัยอยู่ การใช้ Image analysis software หรือ AI-based systems อาจช่วยลด Subjective bias ได้[15] ประการที่สี่ การศึกษานี้ประเมินคุณภาพในระยะสั้น ไม่ได้ติดตามความคงทนของสีในระยะยาว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเก็บรักษาสไลด์

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ทางคลินิก

ผลการศึกษานี้มีนัยสำคัญต่อการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาและการดูแลผู้ป่วยในหลายมิติ คุณภาพการย้อมสีที่ดีขึ้นโดยใช้ลิเทียมคาร์บอเนตสามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัยโรคไต โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการความละเอียดสูง เช่น การประเมิน Glomerular lesions ใน Lupus nephritis, การตรวจหา Acute tubular injury หรือการประเมิน Transplant rejection[16] ความชัดเจนของนิวเคลียสและความแตกต่างของสีที่ดีช่วยให้พยาธิแพทย์สามารถตรวจพบความผิดปกติเล็กน้อยได้ง่ายขึ้นและแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ ในยุคของ Digital pathology คุณภาพการย้อมสีที่สม่ำเสมอมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จของ Whole slide imaging และ AI-based diagnostic systems การศึกษาล่าสุดแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของการย้อมสีเป็นหนึ่งในอุปสรรคหลักของการพัฒนา Deep learning algorithms ที่มีประสิทธิภาพ[7] การใช้ลิเทียมคาร์บอเนตที่ให้คุณภาพสม่ำเสมอสูงอาจช่วยลด Pre-processing requirements และเพิ่มความแม่นยำของ AI models การเปลี่ยนจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ไปใช้ลิเทียมคาร์บอเนต สามารถลดความเสี่ยงด้านอาชีวอนามัยได้อย่างมีนัยสำคัญ การลดการสัมผัสไอของแอมโมเนียช่วยป้องกันอาการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจและเยื่อบุตา ซึ่งเป็นปัญหาที่พบบ่อยในห้องปฏิบัติการ ความเสถียรของลิเทียมคาร์บอเนตที่ไม่ระเหยทำให้สามารถรักษาคุณภาพของสารละลายได้นานขึ้น ลดภาระงานของบุคลากร และช่วยให้การควบคุมคุณภาพทำได้ง่ายขึ้น

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

จากผลการศึกษานี้และข้อจำกัดที่ระบุไว้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต ดังนี้ ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของลิเทียมคาร์บอเนตในเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิก เช่น เนื้อเยื่อตับ ปอด สมอง เต้านม และเนื้อเยื่อมะเร็งต่าง ๆ เพื่อยืนยันความสามารถในการนำผลไปใช้ได้อย่างกว้างขวาง ควรมีการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของลิเทียมคาร์บอเนตโดยใช้ Response surface methodology การพัฒนาและการใช้ Image analysis software หรือ AI-based systems เพื่อวัดความเข้มของสี ความสม่ำเสมอ และ Contrast แบบอัตโนมัติจะช่วยลด Subjective bias และเพิ่มความแม่นยำของการประเมิน ควรมีการติดตามประเมินความคงทนของสีในระยะเวลา 6 เดือน 1 ปี และ 5 ปี ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาต่าง ๆ และควรมีการศึกษา Cost-utility analysis หรือ Budget impact analysis ในบริบทของระบบสาธารณสุขไทย เพื่อสนับสนุนการตัดสินใจด้านนโยบายในการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง

สรุป

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าลิเทียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.05 ให้คุณภาพการย้อมสีที่ดีที่สุดในทุกพารามิเตอร์ที่ประเมิน มีความเหนือกว่าทั้งในด้านการติดสีนิวเคลียส การติดสีไซโทพลาซึม และความแตกต่างของสี เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ยังมีข้อดีด้านความปลอดภัยและความคงตัวที่เหนือกว่า แม้ว่าจะมีต้นทุนต่อหน่วยน้ำหนักที่สูงกว่า แต่ต้นทุนการใช้งานจริงอยู่ในระดับที่ยอมรับได้

ISSN 2773-9589 (online)

เอกสารอ้างอิง

1. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harb Protoc. 2008;2008(5):pdb.prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986.

2. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. Int J Surg Pathol. 2014;22(1):12-32. doi: 10.1177/1066896913517939.

3. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 7th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2013. p. 173-214.

4. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. 5th ed. Banbury: Scion Publishing; 2015. p. 111-35.

5. Wick MR. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology: an often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. Semin Diagn Pathol. 2019;36(5):303-11. doi: 10.1053/j.semdp.2019.06.003.

6. Barisoni L, Nast CC, Jennette JC, Hodgin JB, Herzenberg AM, Lemley KV, et al. Digital pathology and computational image analysis in nephropathology. Nat Rev Nephrol. 2020;16(11):669-85. doi: 10.1038/s41581-020-0321-6.

7. Stathonikos N, Veta M, Huisman A, van Diest PJ. Going fully digital: perspective of a Dutch academic pathology lab. J Pathol Inform. 2020;11:15. doi: 10.4103/jpi.jpi_10_20.

8. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. Lancet. 2012;380(9843):756-66. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61454-2.

9. Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. Lab Invest. 2018;98(7):844-55. doi: 10.1038/s41374-018-0057-0.

10. Singh N, Tripathi MM, Prakash A, Kumar S. Characterizing kidney structures in health and diseases using eosin fluorescence from hematoxylin and eosin stained sections. J Histotechnol. 2016;39(4):162-8. doi: 10.1080/01478885.2016.1194608.

11. Chlipala E, Bendzinski CM, Chu K, Johnson JI, Brous M, Copeland K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision. J Histotechnol. 2020;43(1):29-37. doi: 10.1080/01478885.2019.1708611.

12. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

13. Horobin RW, Kiernan JA, editors. Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine. 10th ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2002. p. 85-126.

14. Lillie RD, Fullmer HM. Histopathologic technic and practical histochemistry. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1976. p. 234-67.

15. Cui M, Zhang DY. Artificial intelligence and computational pathology. Lab Invest. 2021;101(4):412-22. doi: 10.1038/s41374-020-00514-0.

16. Sethi S, D'Agati VD, Nast CC, Fogo AB, De Vriese AS, Markowitz GS, et al. A proposal for standardized grading of chronic changes in native kidney biopsy specimens. Kidney Int. 2017;91(4):787-9. doi: 10.1016/j.kint.2017.01.002.

ISSN 2773-9589 (online)