

โครงการนำเสนอผลงานพัฒนาคุณภาพ งบประมาณปี 2563

R2R

- ชื่อเรื่อง** การเปรียบเทียบสี Counterstain ด้วย Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อม และน้ำยาที่เตรียมเอง
- ชื่อผู้รับผิดชอบโครงการ** นางสาวมณฑนา ดรพาเหล่า กลุ่มงานจุลพยาธิ
- เนื้อเรื่องโดยสังเขป**

ปัจจุบันงานจุลพยาธิรับงานย้อมสีด้วยวิธีพิเศษ (Histochemistry) ที่หลากหลาย โดยในบางตัวย้อม เช่น PAS, Reticulin, Oil red o, Congo red ต้องมีการย้อมสีทับ (Counterstain) ด้วย Hematoxylin ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก อีกทั้งสารเคมีที่ใช้เตรียมยังหาซื้อได้ยาก จึงได้ทำการทดลองโดยนำ Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อม H&E มาใช้ในการ Counterstain แทน เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีและลดขั้นตอนในการเตรียม Hematoxylin เอง
- วัตถุประสงค์**
 - เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมี
 - เพื่อลดขั้นตอนในการเตรียม Hematoxylin เอง
 - เพื่อนำ Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมมา Counterstain แทนน้ำยาที่เตรียมเองได้
- คำสำคัญของโครงการวิจัย**

Hematoxylin, Counterstain
- ทฤษฎีสมมติฐานหรือกรอบความคิดของงานวิจัย**

สามารถนำ Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมมา Counterstain แทนน้ำยา Hematoxylin ที่เตรียมเองได้
- แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย**

ระยะเวลาดำเนินการ เดือนมกราคม - กันยายน 2563

กิจกรรม	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
ทบทวนเอกสาร	↔								
เขียนโครงการวิจัย	↔	↔							
เตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ		↔	↔						
ดำเนินการวิจัย ถ่ายภาพประกอบผลการวิจัย		↔	↔	↔	↔				
รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์ประเมินผล					↔	↔	↔		
เขียนรายงานการวิจัยและนำเสนอผลงาน							↔	↔	↔

8. ขั้นตอนและวิธีดำเนินงาน

- เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี โดยใช้เครื่อง Tissue processing เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- ตัดบล็อกชิ้นเนื้อที่ความหนา 3 ไมครอน บล็อกกละ 4 สไลด์ โดยแบ่งเป็น
 - Positive control 1 สไลด์

- 3 นาที 1 สไลด์
 - 5 นาที 1 สไลด์
 - 7 นาที 1 สไลด์
- รวมเป็น 120 สไลด์

8.3 นำสไลด์ทั้ง 120 สไลด์ มาย้อมพิเศษด้วยวิธี PAS (Periodic acid-Schiff reaction) โดยมีขั้นตอนการย้อมดังนี้

- Deparaffinization
- จุ่มลงใน 1% Periodic acid เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างในน้ำกลั่น
- จุ่มใน Schiff reagent เป็นเวลา 15 นาที
- จุ่มลงในน้ำประปา เป็นเวลา 5 นาที
- ล้างในน้ำประปาไหล เป็นเวลา 10 นาที

8.4 แบ่งสไลด์ออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 30 แผ่น เพื่อ Counterstain ใน Hemmatoxylin ดังนี้

- ชุดที่ 1 Counterstain โดยจุ่มใน Hematoxylin ที่เตรียมเองเป็นเวลา 3 นาที เพื่อใช้เป็น Control
- ชุดที่ 2 Counterstain โดยจุ่มใน Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมเป็นเวลา 3 นาที
- ชุดที่ 3 Counterstain โดยจุ่มใน Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมเป็นเวลา 5 นาที
- ชุดที่ 4 Counterstain โดยจุ่มใน Hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมเป็นเวลา 7 นาที

8.5 ล้างในน้ำประปาไหล

8.6 จุ่มใน Litium carbonate เป็นเวลา 1 นาที

8.7 ล้างน้ำประปาไหล

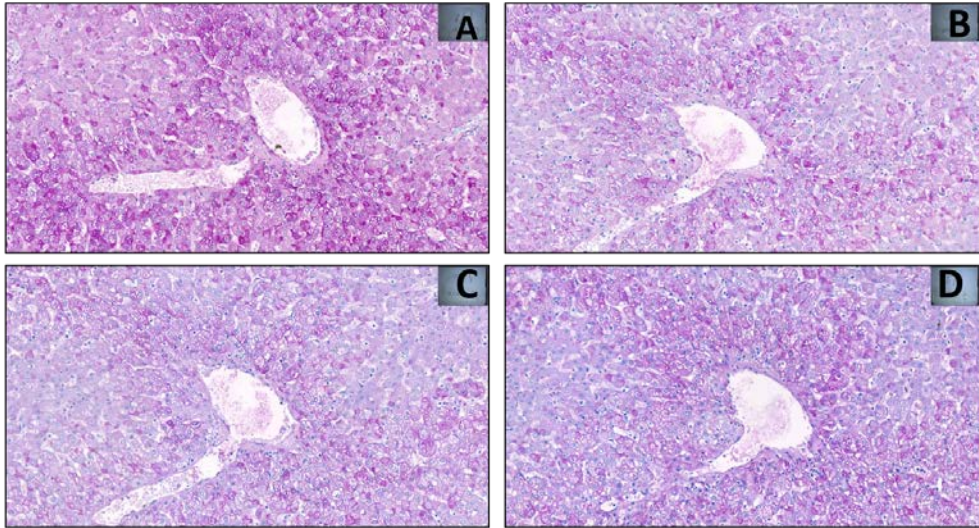
8.8 Dehydrate

8.9 Permount

8.10 เปรียบเทียบการติดสีของ Hematoxylin โดยนักวิทยาศาสตร์การแพทย์

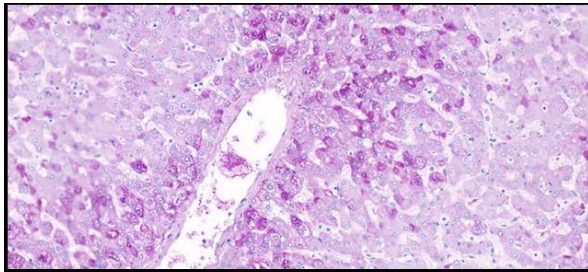
9. ผลการทดลอง

เปรียบเทียบการติดสี Counterstain ด้วย hematoxylin ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20X

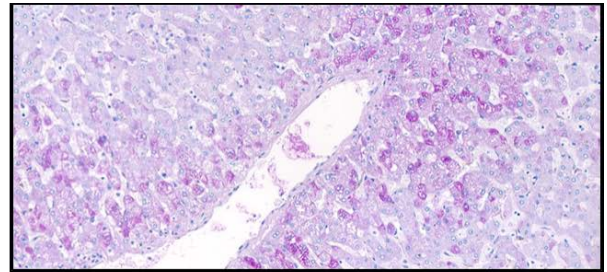


หมายเหตุ **A = Control, B = 3 นาที**
C = 5 นาที, D = 7 นาที

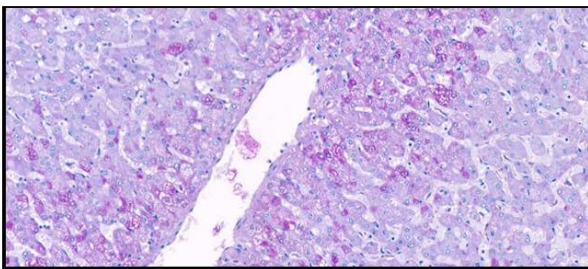
แปลผลโดยให้ระดับการติดสี hematoxylin เป็น +1 = ติดสีจาง, +2 = ติดสีปานกลาง, +3 = ติดสีเข้ม และ +4 = ติดสีเข้มมาก ตามลำดับ



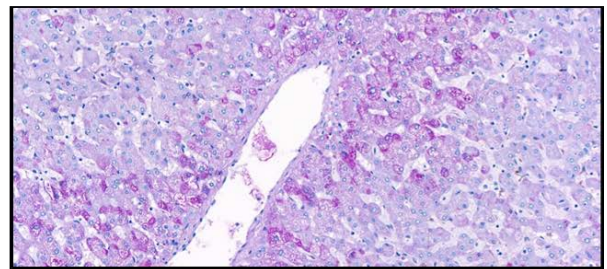
+1 = ติดสีจาง



+2 = ติดสีปานกลาง



+3 = ติดสีเข้ม



+4 = ติดสีเข้มมาก

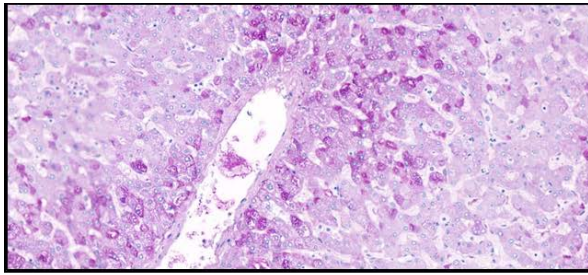
หมายเหตุ : พิจารณาการติดสี จากการติดสีของ **hematoxylin** ซึ่งจะติดสีน้ำเงินที่นิวเคลียส

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณค่าร้อยละของระดับการติดสี counterstain ด้วย hematoxylin จากการย้อมทั้งสี่วิธีเปรียบเทียบกันได้เป็นตารางดังนี้

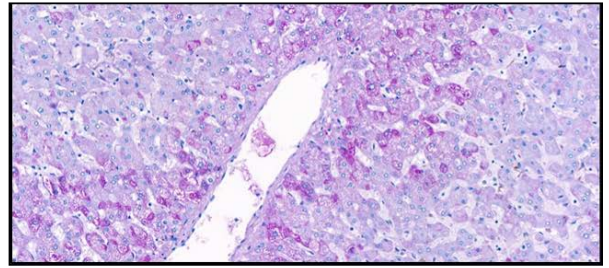
ระดับความเข้มของการติดสีย้อม	วิธีการย้อม							
	A		B		C		D	
	จำนวนสไลด์	ร้อยละ	จำนวนสไลด์	ร้อยละ	จำนวนสไลด์	ร้อยละ	จำนวนสไลด์	ร้อยละ
0	0	0	0	0	0	0	0	0
+1	30	100	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	25	83.33	2	6.67	0	0
+3	0	0	5	16.67	24	80	5	16.67
+4	0	0	0	0	4	13.33	25	83.33

หมายเหตุ **A = Control, B = 3** นาที
C = 5 นาที, **D = 7** นาที

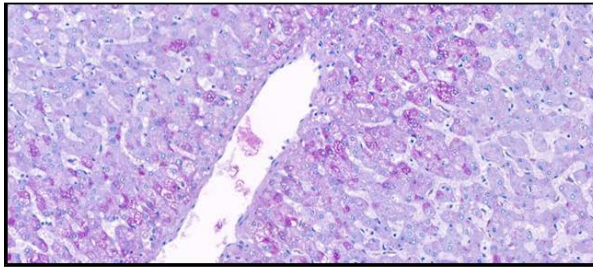
จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าการ counterstain ด้วย hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมและน้ำยาที่เตรียมเอง ทั้งสองวิธีให้ผลการติดสี hematoxylin ที่ไม่แตกต่างกัน โดยความเข้มของการติดสีขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการ counterstain ยิ่งใช้เวลานานจะติดสีเข้มขึ้น แต่ระหว่างการแปลผลผู้ทำการทดลองพบว่าการ counterstain ด้วย hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมนั้นทำให้การติดสีแดงของ Schiff reagent ลดลง จึงได้ทำการเปรียบเทียบการติดสีของ Schiff reagent จากการย้อมทั้งสี่วิธีด้วย โดยแปลผลโดยให้ระดับการติดสี Schiff reagent เป็น +4 = ติดสีเข้มมาก, +3 = ติดสีเข้ม, +2 = ติดสีปานกลาง และ +1 = ติดสีจาง ตามลำดับ



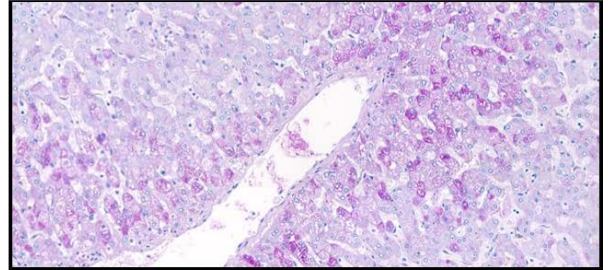
+4 = ติดสีเข้มมาก



+3 = ติดสีเข้ม



+2 = ติดสีปานกลาง



+1 = ติดสีจาง

หมายเหตุ : พิจารณาการติดสี จากการติดสีของ **Schiff reagent** ซึ่งจะติดสีแดง, ม่วงแดง

จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณค่าร้อยละของระดับการติดสี Schiff reagent จากการย้อม ทั้งสี่วิธีเปรียบเทียบกันและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS

ตารางค่าร้อยละของจำนวนสไลด์ในการติดสี Schiff reagent ของการย้อมทั้งสี่วิธีที่ความเข้มในระดับต่างๆ

ระดับ ความเข้ม ของการ ติดสีย้อม	วิธีการย้อม							
	A		B		C		D	
	จำนวน สไลด์	ร้อยละ	จำนวน สไลด์	ร้อยละ	จำนวน สไลด์	ร้อยละ	จำนวน สไลด์	ร้อยละ
0	0	0	0	0	0	0	0	0
+1	0	0	0	0	20	66.67	0	0
+2	0	0	5	16.67	10	33.33	8	26.67
+3	0	0	25	83.33	0	0	21	70
+4	30	100	0	0	0	0	1	3.33

หมายเหตุ **A = Control, B = 3** นาที
C = 5 นาที, **D = 7** นาที

10. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า การ counterstain ด้วย hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมและน้ำยาที่เตรียมเอง ทั้งสองวิธีให้ผลการติดสี hematoxylin ที่ไม่แตกต่างกัน โดยความเข้มของการติดสีขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการ counterstain ยิ่งใช้เวลานานจะติดสีเข้มขึ้น แต่การ counterstain ด้วย hematoxylin จากชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เหลือจากเครื่องย้อมนั้นทำให้การติดสีแดงของ Schiff reagent ลดลงและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-Value} < 0.05$) ซึ่งอาจส่งผลในการวินิจฉัยโรคของพยาธิแพทย์ จึงไม่สามารถนำมาใช้แทนกันได้

11. ข้อเสนอแนะ

- 11.1 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณน้อยเกินไป
- 11.2 ควรทดลอง counterstain ด้วย hematoxylin ในการย้อมพิเศษอื่นๆ หรืองาน Immunohistochemistry