ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายที่เสียชีวิต สำหรับงานด้านนิติเวชศาสตร์

โดย

นางสาวปัทมานุช นักเลิศพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายที่เสียชีวิต สำหรับงานด้านนิติเวชศาสตร์

โดย

นางสาวปัทมานุช นักเลิศพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DEATH MALE PRISONER FOR FORENSIC MEDICINE

By

Patamanuch Naglertphan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2008

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง " ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายที่เสียชีวิต สำหรับงานด้านนิติเวชศาสตร์ " เสนอโดย นางสาวปัทมานุช นักเลิศพันธ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตังกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 25 เดือน กันยายน พ.ศ. 2551

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
2. พันตำรวจตรี นายแพทย์ ปกรณ์ วะศินรัตน์
3. พันตำรวจโท วิรัช เที่ยวมาพบสุข

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุวา อารีกิจเสรี)

22 / ก.ย. / 51

พ.ต.ท. .... กรรมการ

(พันตำรวจโท นายแพทย์ สุพิไชย ลิ่มศิวะวงศ์)

22 / ก.ย. / 51

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)

22 / ก.ย. / 51

พ.ต.ต. .... กรรมการ

(พันตำรวจตรี นายแพทย์ ปกรณ์ วะศินรัตน์)

22 / ก.ย. / 51

.... กรรมการ

(พันตำรวจโท วิรัช เที่ยวมาพบสุข)

22 / ก.ย. / 51

49312317 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : ลักษณะทางจุลพยาธิ

ปัทมานุช นักเลิศพันธ์ : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายที่เสียชีวิต สำหรับงานด้านนิติเวชศาสตร์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล, พันตำรวจตรีนายแพทย์ ปกรณ์ วะศินรัตน์ และ พันตำรวจโท วิรัช เที่ยวมาพบสุข. 126 หน้า.

ในปัจจุบันนี้มีนักโทษที่เสียชีวิตขณะถูกคุมขังมีจำนวนมากขึ้น แต่การชันสูตรพลิกศพอย่างเดียวในบางรายยังไม่เพียงพอในการยืนยังถึงสาเหตุการเสียชีวิตที่แท้จริง ในทางปฏิบัติจึงต้องมีการส่งศพมาผ่าตรวจอีกครั้ง ซึ่งเป็นหน้าที่ของพยาธิแพทย์ ตลอดจนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีจำเป็นในการวินิจฉัย ทำโดยการนำชิ้นเนื้อ เตรียมโดยวิธีพาราฟิน และตัดตัวอย่างให้บางจึงนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และ สีอีโอซิน (Eosin) เพื่อยืนยันสาเหตุการตายที่แท้จริง ในการศึกษานี้ได้ศึกษาสาเหตุการตายของนักโทษชายจำนวน 100 คน และจากผลการวิจัยนี้พบว่า นักโทษมีการเสียชีวิตจากหลายสาเหตุ ได้แก่ ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจำนวน 27 คน ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบจำนวน 1 คน ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอดจำนวน 2 คน ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวายจำนวน 2 คน ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิหัวใจและปอดจำนวน 1 คน ปอดอักเสบจำนวน 28 คน ไตอักเสบจำนวน 1 คน ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อราจำนวน 1 คน ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบจำนวน 2 คน หัวใจอักเสบ 1 คน ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับจำนวน 1 คน ไตวายจำนวน 1 คน เนื้องอกที่ลำไส้จำนวน 1 คน มะเร็งตับจำนวน 2 คน วัณโรคปอดจำนวน 9 คน pneumonia จำนวน 3 คน สมองขาดเลือดจำนวน 1 คน ขาดอากาศหายใจจำนวน 2 คน เลือดออกที่สมองจำนวน 3 คน ติดเชื้อในกระแสโลหิตจำนวน 7 คน เยื่อหุ้มสมองอักเสบจำนวน 2 คน และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบจำนวน 2 ราย จากข้อมูลที่ได้รับสามารถสรุปได้ว่าสาเหตุการตายส่วนใหญ่เกิดจากปอดอักเสบ โดยใช้เทคนิคการเตรียมพาราฟินและตัดเนื้อเยื่อให้บาง แล้วนำมาย้อมสีฮีมาทอกซิลินและสีอิโอซิน เพื่อยืนยันสาเหตุการตายได้

สาขานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. .... 3. ....

49312317 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORD : HISTOPATHOLOGYCAL

PATAMANUCH NAGLERTPHAN : HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DEATH MALE PRISONER FOR FORENSIC MEDICINE. THESIS ADVISORS : ASST.PROF.TO THONGCHAI THECHOWISARN Ph.D , MAJOR PAKORN WASINRAT AND Lt.Col LIEUTENANT WIRAT THEAUMAPOBSUK . 126 pp.

Nowadays the amount of prisoner being dead during imprisonment is increasing. Although every corpse of prisoner is sent to have an autopsy, only the autopsy in some cases is not enough to know the true cause of death. In the practical way, it needs the reinvestigation by the pathologist and the biopsy for microscopic examination to acquire important information for the diagnosis. The technique of Hematoxylin and Eosin Stain is used in this step of the reinvestigation. In this research, the researcher has studied the cause of death of the 100 male prisoners during the imprisonment. The result was presented that the prisoners were died by the various caused as following; failure of respiratory and circulation system 27 cases, failure of respiratory and circulation system due to pericarditis and lungs inflammation 1 cases, failure of respiratory and circulation system due to pathological condition of lungs 2 cases, failure of respiratory and circulation system added with paralyzed liver 2 cases, failure of respiratory and circulation system due to pathological conditions of heart and lungs 1 case, lung inflammation 28 cases, kidney inflammation 1 case, pneumonia caused by the fungus 1 case, infection in the circulation system also with pericarditis 2 cases, myocarditis 1 case, lung inflammation with infection in the liver 1 case, renal failure 1 case, tumor at the intestine 1 case, hepatocellular carcinoma 2 cases, tuberculosis in lungs 9 cases, pneumonia 3 cases, Anoxia 1 case, suffocation 2 cases, cerebral hemorrhage 3 cases, septicemia 7 cases, meningitis 2 cases, and pericarditis 2 cases. These results lead to the conclusion that the majority causes of death are from lungs inflammation. Besides, the technique of Hematoxylin and Eosin Stain can be used to confirm causes of death.

Department of Forensic Science / Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008
Student's signature ....
Thesis Advisors' signature 1. .... 2. .... 3. ....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายสำหรับงานทางด้านนิติเวชศาสตร์ สำหรับลุล่วงได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาและความร่วมมือช่วยเหลือจากทางสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ และบุคคลหลายท่านที่ได้กรุณาสละเวลาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่มีคุณค่า และเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล และ พ.ต.ท.วิรัช เที่ยวมาพบสุข รวมทั้ง พ.ต.ต. นพ. ปกรณ์ วะศินรัตน์ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา อีกทั้งได้ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ พล.ต.ต.สุรศักดิ์ จ้อยจำรูญ และ พ.ต.อ.พรชัย สุธีรคุณ จาก โรงพยาบาลตำรวจ ที่กรุณาสละเวลาคอยให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ พ.ต.ท. สุพิไชย ลิ่มศิวะวงศ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุวา อารีกิจเสรี ให้คำแนะนำตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและสมบูรณ์มากขึ้น รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ต่างๆ

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบพระคุณผู้ที่มิได้เอ่ยนามมา ณ โอกาสนี้ ซึ่งมีส่วนช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ

กิตติกรรมประกาศ... ฉ

สารบัญตาราง.. ฌ

สารบัญภาพ... ญ

บทที่

1 บทนำ.. 1

วัตถุประสงค์.. 2

สมมติฐานของการศึกษา.. 2

ขอบเขตการศึกษา.. 2

ข้อจำกัดของการวิจัย... 2

นิยามศัพท์เฉพาะ.. 2

กรอบแนวคิด.. 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 4

พยาธิสภาพที่ทำให้เกิดโรคที่ระบบต่าง ๆ ในร่างกาย................................ 4

HEMODYNAMIC DERANGEMENT.. 4

RESPIRATORY STSTEM.. 6

LIVER.. 11

NERVOUS SYSTEM.. 16

หลักการปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา.. 19

การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ (Preparation of Tissues).................. 19

การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue Processing)........................ 23

การใช้เครื่องสุญญากาศช่วยในการ Infiltration................................. 35

การทำบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin Block or Embedding in Paraffin)......... 50

การตัด Paraffin Section... 56

บทที่		หน้า

การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Staining, Tissue Staining)........ 63
สิ่งที่ควรรู้เกี่ยวกับการย้อมสีโดยทั่ว ๆ ไป........ 65
Technical term ต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ........ 65
วิธีการย้อมสี........ 68
ขั้นตอนในการย้อมสี........ 69
อุปกรณ์ต่าง ๆที่ใช้ในการย้อมสี........ 75
อุปกรณ์ต่าง ๆที่ใช้ในการย้อมสี........ 75
การย้อมสีชิ้นเนื้อในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา........ 76
การย้อมสีวิธีธรรมดา........ 76
ผลที่ได้จากการย้อม : -นิวเคลียส – ติดสีน้ำเงิน (blue) ของ haematoxylin.... 78
สี Haematoxylin และสีที่ใช้เป็น Counterstaining........ 78
ข้อเสีย (Disadventage) ของ Alum haematoxylin........ 82
3 ระเบียบวิธีวิจัย........ 88
สิ่งส่งตรวจ........ 88
วัสดุอุปกรณ์........ 88
วิธีทำการทดลอง........ 89
4 ผลการทดลอง........ 93
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ........ 120
สรุปผลการวิจัย........ 120
อภิปรายผล........ 121
ข้อเสนอแนะ........ 124
ข้อเสนอแนะจากการวิจัย........ 124

บรรณานุกรม........ 125
ประวัติผู้วิจัย........ 126

สารบัญตาราง

ภาพที่ หน้า

1 เปรียบเทียบคุณสมบัติข้อดีข้อเสีย Dehydrant ที่นิยมในการเตรียมชิ้นเนื้อ
ห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา 28

2 เปรียบเทียบคุณสมบัติข้อดีข้อเสียของ Clearing agent 32

3 การใช้ Clearing agent และจำนวนของโถขี้ผึ้งเหลวที่เหมาะสมในงานประจำ.. 35

4 เปรียบเทียบคุณสมบัติข้อดี ข้อเสีย ของ wax... 37

5 การปฏิบัติ (Processing Schedule) 39

6 การเตรียมชิ้นเนื้อ.. 42

7 ข้อดีข้อเสียสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยวิธีการนี้.................................. 43

8 ลักษณะสิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น การแก้ไขป้องกัน.. 46

9 ข้อดีข้อเสียของการทำบล็อกชิ้นเนื้อด้วยวิธีนี้... 51

10 ข้อดีข้อเสียของการทำบล็อกชิ้นเนื้อด้วยวิธีนี้... 52

11 สาเหตุต่างๆที่ทำให้เกิดอุปสรรคขณะตัด Section และการแก้ไข..................... 60

12 Hematoxylin and Eosin stain.. 76

13 อุปสรรคกับสาเหตุและการแก้ไขภายหลังการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธี H&E stain.... 83

14 แสดงสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชายจำนวน 100 คน.......................... 94

15 สรุปสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชายจำนวน 100 คน.......................... 106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของปอดที่มีการติดเชื้อ (pneumonia) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากพบ PMN สูง (กำลังขยาย 40 เท่า) ………………..…………	109
2	ลักษณะของปอดที่มีการติดเชื้อ (pneumonia)……………………………………	109
3	ลักษณะของสมองที่มีเลือดออกในสมอง (กำลังขยาย 40 เท่า) ..………………	110
4	ลักษณะของสมองที่มีเลือดออกในสมอง และสมองบวมน้ำ (กำลังขยาย 40 เท่า)..	110
5	ลักษณะของสมองที่ขาดเลือด พบลักษณะของเนื้อตาย (necrosis) (กำลังขยาย 40 เท่า)..……………………………………………………	111
6	ลักษณะของไตวายจะพบไตมีการอักเสบเรื้อรัง พบเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte (กำลังขยาย 40 เท่า)………………………………………	111
7	ส่วนของโกลเมอลูลัสที่ไต พบส่วนที่เป็นเนื้อตายส่งผลให้ไตเสื่อมสภาพ ในการกรอง (กำลังขยาย 40 เท่า)………………………………………	112
8	ลักษณะของปอดที่มีการอักเสบจากเชื้อรา จะพบลักษณะ soap bubble และ พบเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่บริเวณถุงลม (กำลังขยาย 40 เท่า)………………	112
9	ลักษณะของปอดที่มีการอักเสบจากเชื้อรา จะพบลักษณะ soap bubble และ พบเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่บริเวณถุงลม (กำลังขยาย 40 เท่า)………………	112
10	ลักษณะของกล้ามเนื้อบริเวณคอที่มีเลือดออกในเนื้อเยื่อ (กำลังขยาย 40 เท่า)…..	113
11	ลักษณะของมะเร็งตับจะพบตับมีพังผืด (กำลังขยาย 40 เท่า)……………………	113
12	ลักษณะของมะเร็งตับจะพบตับมีพังผืด (กำลังขยาย 40 เท่า) ……….…………	113
13	ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจที่มีการอักเสบพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทลฟิล……	114
14	ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจที่มีเนื้อตาย (necrosis) และเยื่อหุ้มหัวใจ หนาตัว (กำลังขยาย 40 เท่า)……………………………….. ………	114
15	ภาพที่สมองพบเนื้อตาย (กำลังขยาย 40 เท่า)……………………… . ………	115
16	ผนังลำไส้ พบก้อนเนื้อที่ผิดปกติ (กำลังขยาย 40 เท่า)…………………….. …	115
17	เนื้องอกที่ลำไส้ (กำลังขยาย 40 เท่า)………………………………………...	116
18	เนื้องอกที่ลำไส้ พบเม็ดเลือดขาวจำนวนมากที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มะเร็ง(กำลังขยาย 40 เท่า)………	116

ภาพที่		หน้า

19 ลักษณะของไตที่มีการอักเสบ (กำลังขยาย 40 เท่า).. 117

20 ลักษณะของไตที่มีการอักเสบ จะพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทลฟิล
(กำลังขยาย 40 เท่า) 117

21 ลักษณะของเยื่อหุ้มสมองที่มีการหนาตัว.. 118

22 เยื่อหุ้มสมองที่มีการอักเสบ พบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทลฟิลจำนวนมาก
(กำลังขยาย 40 เท่า) 118

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันนี้มีนักโทษที่เสียชีวิตขณะถูกคุมขังมีจำนวนมากขึ้น จากข้อมูลของทางสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ พบว่าอัตราการเสียชีวิตของนักโทษประมาณ 15-20 รายต่อเดือน และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยศพของนักโทษทุกรายที่ส่งมาต้องมีการชันสูตรพลิกศพและผ่าศพเพื่อตรวจพิสูจน์หาสาเหตุในการเสียชีวิตในทุกกรณี ตามกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญา มาตรา 148 เรื่องการชันสูตรพลิกศพ ความว่า "เมื่อปรากฏแน่ชัดหรือมีเหตุอันควรสงสัยว่าบุคคลใดตายโดยผิดธรรมชาติ หรือตายในระหว่างอยู่ในความควบคุมของเจ้าพนักงานให้มีการชันสูตรพลิกศพ เว้นแต่ตายโดยการประหารชีวิตตามกฎหมาย " ดังนั้นเมื่อมีการตายโดยผิดธรรมชาติจึงมีความจำเป็นต้องมีการชันสูตรพลิกศพในทุกกรณี แต่การชันสูตรพลิกศพอย่างเดียวไม่สามารถทราบสาเหตุการเสียชีวิตที่แท้จริง ในทางปฏิบัติจึงต้องมีการส่งศพมาผ่าตรวจอีกครั้ง ซึ่งเป็นหน้าที่ของพยาธิแพทย์ ตลอดจนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) มีความจำเป็นมาก ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่ผู้ตายมักจะตายในขณะเกิดเหตุ บาดแผลต่างๆมักไม่ทันมีการเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์ แต่ยังมีผู้ตายในกรณีอื่นๆ เช่น ผู้ที่ตายอย่างกะทันหันและไม่คาดคิด หรือผู้ป่วยตายในระหว่างการควบคุมของเจ้าพนักงาน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการตายตามธรรมชาติ และการตัดชิ้นเนื้อทางกล้องจุลทรรศน์จะเป็นข้อมูลอันสำคัญในการวินิจฉัยเป็นอย่างมาก โดยสามารถส่งตรวจศพได้ตามหน่วยงานของรัฐ และหนึ่งในนั้นคือสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ซึ่งจะทำหน้าที่ในการหาสาเหตุในการเสียชีวิต ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการที่จะศึกษาสาเหตุการตายของนักโทษชายในขณะที่ถูกคุมขังว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากอะไรเนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีการดำรงชีวิตคล้ายๆกันในระยะเวลาหนึ่ง และยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการเสียชีวิตของนักโทษในเชิงของสถิติ โดยทางผู้วิจัยจะทำการศึกษาจากโดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาคือการนำชิ้นเนื้อมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์เพื่อช่วยในการวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิต แล้วนำผลที่ได้มาทำการเก็บข้อมูลในเชิงของสถิติเพื่อสะดวกในการสืบค้นข้อมูล และเป็นประโยชน์กับทางกรมราชทัณฑ์ ในการทราบข้อมูลการตายของนักโทษและสามารถนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาระบบภายในองค์กรให้ดียิ่งขึ้น เพื่อช่วยลดอัตราการเสียชีวิตในขณะถูกคุมขัง

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสาเหตุการตายของนักโทษชายในระหว่างที่ถูกต้องขังในเรือนจำ

2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาระบบการดูแลนักโทษในระหว่างต้องขังให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและลดอัตราการเสียชีวิตในขณะถูกคุมขัง

3. สมมติฐานของการศึกษา

สามารถทราบถึงสาเหตุการตายที่แท้จริงของนักโทษได้และนำเอาข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ได้

4. ขอบเขตการศึกษา

1. เพื่อศึกษาสาเหตุการเสียชีวิตของศพนักโทษชายที่ส่งศพมาตรวจที่สถาบันนิติเวชวิทยา ในขณะที่ถูกต้องขังในเรือนจำ

2. นำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์และสรุปผล

5. ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถระบุเหตุการณ์เสียชีวิตบางกรณีได้ชัดเจนต้องมีการย้อมพิเศษ เช่นในกรณีที่มีการเสียชีวิตจากการติดเชื้อไม่สามารถระบุว่าเสียชีวิตจากเชื้อตัวได้

6. นิยามศัพท์

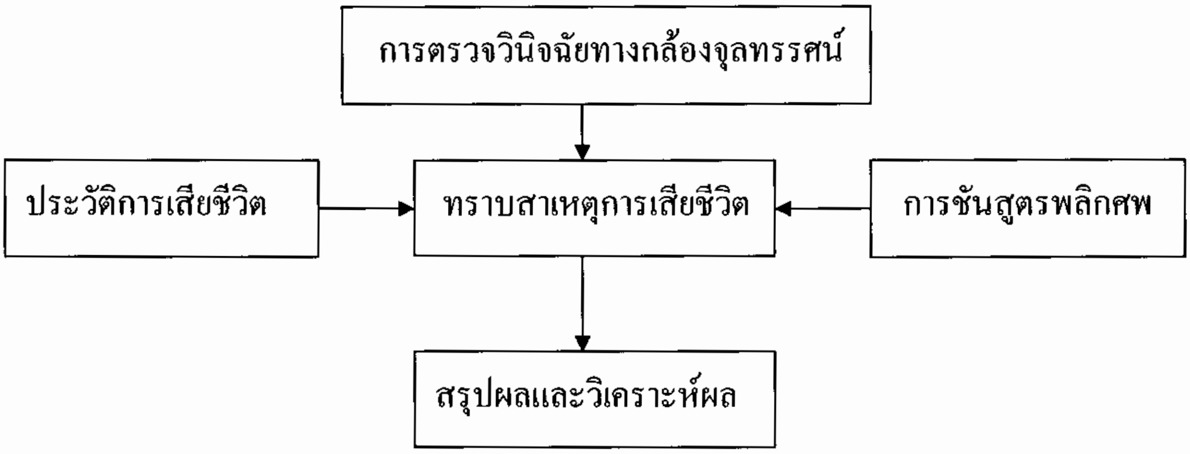
Caseous necrosis เป็นการตายของเนื้อเยื่อ การตายนี้จำเพาะกับการติดเชื้อวัณโรค

Congestion การคั่งเลือด

Edema การบวมน้ำ

Hemorrange ภาวะที่มีเลือดออกในเนื้อเยื่อ

7. กรอบแนวคิด



8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นประโยชน์กับทางหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องกับกระบานการยุติธรรม รวมถึงกรมราชทัณฑ์ในการนำผลการทดลองที่ได้มาทำการปรับปรุงพัฒนาระบบภายในองค์กรให้ดียิ่งขึ้น เพื่อช่วยลดอัตราการเสียชีวิตในระหว่างถูกต้องขัง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พยาธิสภาพที่ทำให้เกิดโรคที่ระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น

1. HEMODYNAMIC DERANGEMENT

การที่เซลล์ดำรงชีวิตอยู่ได้ต้องได้รับออกซิเจน และสารอาหารภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์ส่วนมากได้รับออกซิเจนและสารอาหารที่ผ่านทางเลือดและน้ำประมาณว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของร่างกายมนุษย์เป็นน้ำโดย 40 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในเซลล์ละ 20% อยู่นอกเซลล์ (intercellular space) เช่นใน กระแสเลือด เป็นต้น ความผิดปกติของกระแสเลือดและน้ำย่อยทำให้เกิดสภาวะที่ผิดปกติของเซลล์และเนื้อเยื่ออย่างมากมาย เช่น การขาดน้ำและเลือด (shock) ภาวะบวมน้ำ เลือดออก เป็นต้น

1.1 Edema

การบวมน้ำเป็นภาวะที่มีการสะสมของน้ำอยู่ภายใต้หลอดเลือดและหลอดน้ำเหลือง สาเหตุเกิดจาการที่มี hydrostatic pressure ในหลอดเลือดเพิ่มขึ้นหรือมี oncotic pressure ในหลอดเลือดลดลง จึงมีน้ำผ่านออกจากหลอดเลือดสู่เนื้อเยื่อภายนอกเพื่อให้ hydrostatic และ oncotic pressure อยู่ในระดับปกติ หรืออาจเกิดจากผนังหลอดเลือดยอมให้มีการซึมผ่านของน้ำเพิ่มขึ้น (increased vascular permeability) จากสาเหตุอื่น ๆ หรืออาจเกิดจากมีการอุดตันของหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง น้ำที่สะสมอยู่ในเซลล์ (intercellular space) หรือตามช่องของร่างกายต่าง ๆ เช่น pericardial cavity, pleural cavity, peritoneal cavity เป็นต้น

เมื่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะมีการบวมน้ำ จะเต่งขึ้นมีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำหนักมากขึ้นและสีซีดกว่าปกติ ลักษณะที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่า intercellular space กว้างขึ้น น้ำที่สะสมจะไม่ติดสี แต่ถ้าเป็นน้ำที่มีโปรตีนร่วมด้วยบ้างจะติดเป็นสีชมพูจาง ๆ

1.2 Congestion

การคั่งเลือด (congestion หรือ hyperemia) เป็นภาวะที่มีการคั่งของเลือดตามเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่าง ๆ อาจเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน (acute) หรือเรื้อรัง (chronic) ก็ได้ ลักษณะการคั่งเลือดแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ active congestion และ passive congestion

Active congestion เป็นการคั่งของเลือดในหลอดเลือดแดงและ capillaries เมื่อมีการขยายของหลอดเลือด เช่น หน้าแดงเวลาโกรธ หรือรอยแดงที่ผิวหนังจาการขีดข่วน รอยแดงบริเวณที่การอักเสบ ส่วน

Passive congestion เป็นการคั่งในหลอดเลือดดำและ capillaries เป็นผลจาการที่เลือดดำไม่สามารถไหลกลับได้อย่างปกติ เช่น ภาวะหัวใจวาย หัวใจบีบตัวไม่เต็มที่ เลือดเข้าหัวใจได้น้อยลง ทำให้มีเลือดคั่งอยู่ภายนอกหัวใจ และมีผลย้อนกลับไปถึงระบบเลือดดำทั้งหมดที่ต้องไหลเข้าสู่หัวใจ ทำให้มีเลือดคั่งในอวัยวะต่าง ๆ เช่น การคั่งเลือดในปอด ตับ ม้าม เมื่อมีหัวใจวาย

ลักษณะที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์จะพบหลอดเลือดขยายตัวออกและมีเม็ดเลือดแดงอยู่ภายนอกจำนวนมาก อาจพบมีเลือดออกร่วมด้วยเพราะมีการขยายตัวของหลอดเลือดมาก ๆ จะทำให้เม็ดเลือดแดงเล็ดออกมาจากหลอดเลือดได้ (piapedesis) รวมทั้งมีน้ำออกมาด้วยเป็นลักษณะของ Edema

1.3 Hemorrhage

การตกเลือดหรือเลือดออก เป็นภาวะที่มีเลือดออกนอกระบบไหลเวียน คือนอกหลอดเลือด ออกมาอยู่ใน intercellular space หรือ body cavity สาเหตุอาจเกิดจากมีพยาธิสภาพของหลอดเลือด เช่นได้รับอุบัติเหตุ หลอดเลือดฉีกขาด หลอดเลือดอักเสบ เป็นต้น หรือเกิดจากความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด (coagulation defect)

ลักษณะที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์จะพบเม็ดเลือดแดงออกมาอยู่นอกหลอดเลือด ต่อมาเม็ดเลือดแดงจะแตก heme จะสลายเป็นเหล็กในรูปของ hemosiderin เห็นเป็น pigment สีน้ำตาลทองและอาจมีmacrophageมาเก็บกิน hemosiderin เรียก macrophage นี้ว่าhemosiderin laden macrophage

1.4 Thrombosis

Thrombosis คือภาวะที่เม็ดเลือดแข็งตัวเป็นก้อนขึ้นภายในหลอดเลือดหัวใจคืออยู่ในระบบไหลเวียน ถ้าเป็นเลือดแข็งตัวนอกหลอดเลือด เช่น เวลาเลือดออกไม่เรียก thrombosis แต่เรียกว่า clot ก้อนเลือดที่แข็งจากการเกิด thrombosis เรียกว่า thrombus (หลายอันเรียก thrombi) สาเหตุอาจเกิดจากมีพยาธิสภาพที่ผนังหลอดเลือด (endothelial injury) หรือเลือดไหลช้ามากหรือไม่ไหล หรือมีสภาวะ hypercoagubility ที่ทำให้เลือดแข็งตัวได้ง่ายมากขึ้น ลักษณะของ thrombus จะขึ้นกับตำแหน่งที่เกิด ถ้าเกิดในหัวใจอาจเป็นก้อนเนื้อโตได้มาก ๆ บางครั้งอาจเป็นก้อน thrombus เต็มช่องหัวใจก็ได้ ในกรณีที่ลิ้นหัวใจทำงานไม่ได้ เช่น มีลิ้นหัวใจ mitral valve ตีบมาก ๆ หลอดเลือดคั่งในหลอดเลือดแดงนาน ๆ อาจเกิดเป็นก้อน thrombus อุดเต็ม atrium คนไข้

จะเสียชีวิตทันที ในกรณีที่ก้อน thrombus ใหญ่ อาจเห็นเป็นเส้นซ้อน ๆ กันเรียกว่า lines of Zahn เกิดจาก platelets และเส้น fibrin (สีซีด) สลับกับการทับถมของเม็ดเลือดแดง (สีแดงเข้มมากกว่า) เป็นชั้น ๆ ไป แต่ถ้า thrombus ก้อนเล็กก็จะไม่พบลักษณะเส้นซ้อน ๆ กันนี้

Thrombus ที่เกิดในที่หนึ่ง แล้วหลุดลอยไปตามกระแสเลือดไปอุดตันในอีกที่หนึ่ง ที่ไกลออกไป เรียกสภาวะนี้ว่า thromboembolism และเรียกก้อน thrombus ที่หลุดออกมาจากที่อื่นว่า thromboembolus

1.5 Hemorrhagic necrosis

หมายถึง สภาวะที่มีการตายของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะร่วมกับมีเลือดออกในบริเวณที่มีการตายนั้นด้วย ส่วนมากเกิดจากการอุดตันของหลอดเลือด ไม่ว่าจะจากหลอดเลือดแดงหรือหลอดเลือดดำ ในกรณีที่เป็นการอุดตันของหลอดเลือดแดงในระยะแรกจะเป็น coagulation necrosis หรือ white infarct แต่ต่อมาอาจมี collateral circulation ทำให้มีเลือดออกในบริเวณเนื้อตาย จึงเป็น hemorrhagic necrosis ส่วนในกรณีที่เป็นการอุดตันของหลอดเลือดดำนั้น เมื่อเกิดการคั่งของเลือดในเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่เหนือต่อเลือดดำนั้นมาก ๆ เม็ดเลือดแดงจะหลุดออกมานอกหลอดเลือด เนื่องจากไม่มีการไหลเวียนของเลือด ทำให้เนื้อเยื่อตาย หลอดเลือดก็แตกออกทำให้มีเลือดออกเป็นจำนวนมาก เป็น hemorrhagic necrosis ตัวอย่างหนึ่งของ hemorrhagic necrosis ที่พบบ่อยคือ hemorrhagic necrosis ของลำไส้ซึ่งเกิดจากการที่เลือดไปเลี้ยง segment ใด segment หนึ่งของลำไส้ลดลง หรือว่ามีการอุดตันของหลอดเลือดบริเวณ mesentery หรือ มีลำไส้ขดพันกัน (volvul) สาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้เกิด hemorrhagic necrosis ของลำไส้ได้ทั้งสิ้น

2. RESPIRATORY STSTEM

โรคในระบบทางเดินหายใจที่ยกตัวอย่างมาศึกษานี้เอาเฉพาะโรคของปอดเท่านั้น โรคของปอดเองโดยเฉพาะปอดอักเสบนั้นพบได้เสมอ และอาจพบร่วมกับโรคอื่น ๆ โดยเฉพาะเมื่อคนไข้อยู่ในโรงพยาบาลนาน ๆ หลังผ่าตัด เป็นโรคมะเร็งหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องจะเสี่ยงต่อการเกิดปอดอักเสบได้ง่าย และอาจติดเชื้อราในปอดง่ายกว่าคนปกติด้วย อีกเรื่องหนึ่งคือวัณโรคปอดสำหรับประเทศไทยแล้วยังนับว่ามีอุบัติการณ์ที่สูงอยู่ โดยเฉพาะเมื่อมีโรคเอดส์แพร่กระจายในขณะนี้ ทำให้วัณโรคแพร่มากขึ้น นอกจากโรคติดเชื้อแล้ว มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยและคนไข้มักเสียชีวิตอย่างรวดเร็วภายหลังการวินิจฉัย นอกจากนี้ภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) และคั่งเลือด (congestion) ในปอดเป็นภาวะที่พบร่วมกับโรคอื่น ๆ เสมอโดยเฉพาะในภาวะหัวใจล้มเหลว

2.1 Pulmonary congestion

Pulmonary congestion หรือ hyperemia หมายความถึงการที่มีเลือดมาสะสมใน ปริมาณมากในบริเวณผนังกั้นถุงลมพบทั้งชนิดเฉียบพลัน (acute) และเรื้อรัง (chronic passive congestion) โดยทั่วไปพบว่าเมื่อมีการคั่งของเลือดภายในหลอดเลือดฝอย มักจะเกิดการบวมน้ำตามมา ดังนั้นจึงมักจะพบพยาธิสภาพดังกล่าวเกิดขึ้นร่วมกัน สาเหตุที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพกล่าวเกิดขึ้นจึงคล้ายกัน พบบ่อยจากภาวะหัวใจวายลักษณะที่เห็นด้วยตาเปล่า ปอดมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น เนื้อปอดมีจุดเลือดออก ผิวหน้าชุ่มด้วยเลือด ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ พบว่า บริเวณผนังกั้นถุงลมมีการคั่งของเลือดปริมาณมากในหลอดเลือดฝอย หากมีการฉีกขาดของหลอดเลือดจะพบว่ามีเลือดออกแล้วไปสะสมอยู่ในถุงลม ส่งผลทำให้เกิดการเก็บกินและทำลายเม็ดเลือดแดงโดย macrophage และมี hemosiderin อยู่ใน macrophage จึงเรียกว่า hemosiderin - laden macrophage หรือ heart failure cell เมื่อเวลาผ่านไปจะพบว่าบริเวณผนังกั้นเริ่มเกิด fibrosis ร่วมกับมีการสะสมของ hemosiderin pigment ทำให้เห็นเนื้อปอดโดยทั่วไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแข็งมากขึ้น

2.2 Pulmonary edema

ปอดบวมน้ำเป็นผลเนื่องจากการเพิ่มแรงขับของสารน้ำภายในหลอดเลือดออกสู่ interstitium หรือ ในถุงลมเกิดได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งพอจะแบ่งแยกได้ดังนี้

1. Hemorrhagic pulmonary edema สาเหตุที่ทำให้เกิดกลไกอันนี้เนื่องจาก

1.1 การเพิ่มความดันภายในหลอดเลือด (increased hydrostatic pressure) เช่น ภาวะหัวใจวายทางด้านซ้าย (left – sided heart failure), mitral stenosis หรือภาวะได้รับสารน้ำปริมาณมากเกินไปเป็นต้น

1.2 Oncotic pressure ลดลงพบในภาวะที่มี albumin ต่ำในเลือด เช่น nephrotic syndrome, proteinlosing enteropathy เป็นต้น

1.3 การอุดตันของทางเดินน้ำเหลือง

2. Edema due to microbascular injury กลไกสำคัญอีกอันหนึ่งที่ทำให้เกิดปอดบวมน้ำคือ การที่หลอดเลือดฝอยในผนังกั้นถุงลมได้รับภยันตราย ทำให้สารน้ำและโปรตีนเคลื่อนออกสู่ interstitial space ถ้าเป็นรุนแรงมาก ก็จะเข้าสู่ในถุงลมหากพบพยาธิสภาพเกิดขึ้นเฉพาะที่ มักจะเกิดขึ้นในภาวะที่เกิดการติดเชื้อของปอด แต่ถ้าพยาธิสภาพเกิดขึ้นทั่ว ๆ ในเนื้อปอดจะพบได้ในภาวะ Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) นอกจากนั้นยังพบในภาวะที่ผู้ป่วย shock ได้รับยาบางชนิด ฉายแสง สูดดมสารพิษ หรือสำลัก เป็นต้น

3. Edema due to undetermined origin พบได้ในภาวะความผิดปกติในระบบประสาท (neurogenic) และในผู้ที่ขึ้นที่สูงเป็นต้น

ลักษณะที่เห็นด้วยตาเปล่าพบว่าปอดทั้ง 2 ข้างมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นและชุ่มน้ำ การบวมน้ำจะปรากฏในทุกกลีบปอด โดยเฉพาะปอดกลีบล่าง พื้นที่หน้าตัดพบสารน้ำปะปนกับฟองอากาศ ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ในระยะเริ่มแรกมีการสะสมของสารน้ำในผนังกั้นถุงลม เมื่อระยะเวลาผ่านไป ถ้ายังมีสาเหตุที่ทำให้เกิดยังคงอยู่ จะพบว่าสารน้ำที่มีโปรตีนปนอยู่จะเคลื่อนออกจากหลอดเลือดและไปสะสมในถุงลม เห็นเป็นสารสีชมพูอ่อน

2.3 Chronic passive congestion

เป็นภาวะที่พบในกรณีที่มีหัวใจวายเรื้อรัง โดยเฉพาะหัวใจข้างซ้ายวาย ความดันในหัวใจข้างซ้ายสูงขึ้น และย้อนกลับไปถึงปอด เลือดจากปอดจะเข้าหัวใจยากขึ้น และมีภาวะเลือดคั่งอยู่ในปอดอยู่ตลอดเวลา เมื่อผ่านไปนานเข้าจะทำให้มีผนังถุงลมหนาขึ้นมีเลือดออกในถุงลม และมี macrophage มาเก็บกิน hemosiderin ที่เกิดจากเม็ดเลือดแดงแตก เรียกว่า hemosiderin – iaden macrophage ซึ่งจะพบเป็นจำนวนมาก

2.4 Pneumonia

การติดเชื้อภายในปอดเกิดขึ้นได้จากเชื้อโรคหลายชนิดซึ่งจะทำให้เกิดรูปแบบการติดเชื้อที่แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ดังนี้คือ

แบ่งตามชนิดของเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรามัยโคพลาสมา เป็นต้น

แบ่งตามชนิดของการตอบสนองต่อโรค เช่น suppuratiave เป็นต้น

แบ่งตามการแพร่กระจายตามกายวิภาค ได้แก่ lobar pneumonia และ lobar pneumonia (bronchopneumonia)

ถ้าหากแบ่งตามชนิดของเชื้อโรคที่พบบ่อยคือ bacterial pneumonia จะจัดแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่ Lobar pneumonia พบบ่อยจากเชื้อ pneumococci (Streptococcus pneumoniae) เป็น Community–acquired pneumonia เกิดการติดเชื้อทั่วทั้งกลีบปอดโดยแพร่กระจายผ่านทาง pore of Kohn แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะได้แก่ congestion , red hepatization , gray hepatization และ resolution ส่วน lobar pneumonia หรือ bronchopneumonia เกิดได้จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้ง aerobic และ anaerobic พบพยาธิสภาพกระจายเป็นหย่อม ๆ (patchy) ในเนื้อปอด เกิดได้ทั่วปอดทั้ง 2 ข้าง แต่มักจะพบบริเวณด้านล่างของปอด ลักษณะที่เห็นด้วยตาเปล่าปอดมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น เมื่อคลำดูจะพบว่าเนื้อปอดแข็งมากขึ้น พบมีการอักเสบของปอดเป็นหย่อม พื้นผิวหน้าตัดแห้งนูนขึ้นเป็นเม็ดเล็ก ๆ (granular) สีเทาปนแดงจนถึงเหลือง มีขอบเขตไม่ชัดเจนพบได้ตั้งแต่ขนาดเล็ก ๆ ไปจนถึง 3 – 4 ซม. ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ จะพบ exudate มีนิวโทลฟิลมากมายอยู่ในหลอดลมขนาดใหญ่และเล็กจนไปถึงถุงลม แต่มีไฟบรินน้อย เม็ดเลือดแดงก็พบได้น้อยเช่นกัน ส่วน pleura มักจะเป็นปกติ

2.5 Interstitial pneumonia

แบ่งได้เป็นหลายชนิด เช่น acute interstitial pneumonia(Hamman–Rich syndrome), usual interstitial pneumonia (UIP), desquamative interstitial pneumonia (DIP), lymphoid interstitial pneumonia (LIP) เป็นต้น นอกจากชนิด acute interstitial pneumonia แล้ว ที่เหลือเป็น interstitial pneumonia ที่เรื้อรังทั้งสิ้น มีอาการค่อยเป็นค่อยไป อาจพบร่วมกับโรคอื่น ๆ โดยเฉพาะในกลุ่ม UIP มักพบร่วมกับ connective tissue disease และอาจคิดว่าเป็น from หนึ่งของ immune complex lung disease

พยาธิสภาพโดยทั่วไปพบว่าใน interstitial tissue มี fibrosis และเซลล์อักเสบ ความรุนแรงแตกต่างกันในแต่ละส่วนของเนื้อปอด

2.6 Organizing pneumonia

เป็นกระบวนการที่ร่างกายมีการตอบสนองตอบต่อการอักเสบซึ่งอยู่ในระยะหาย (resolution) โดย fibroblast จากผนังกันถุงลมเริ่มเคลื่อนตัวออกสู่ถุงลมซึ่งจะมี proteoglycan matrix จำนวนมาก เริ่มมีเซลล์อักเสบเรื้อรังเข้ามามากขึ้น ลักษณะภายนอกพบว่าปอดมีน้ำหนักมากขึ้นและบริเวณที่เกิดการอักเสบจะมีความแข็งเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ขอบเขตการอักเสบมักจะชัดเจนผิวหน้าตัดแข็งสีเทาแดงจนถึงเหลือง ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ ภายในถุงลมพบ exudate ที่ประกอบด้วยไฟบริน เยื่อบุผิวที่ตายและเซลล์อักเสบเฉียบพลันและเซลล์อักเสบเรื้อรัง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับว่ากระบวนการที่เกิดการตอบสนองนั้น ๆ เข้าสู่ระยะใด

2.7 Tuberculosis

วัณโรคปอดนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญมากของระบบสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะเมื่อมีโรคเอดส์แพร่กระจายมากขึ้น ทำให้วัณโรคเป็นรุนแรงมากขึ้นและดื้อต่อยาที่ใช้รักษามากขึ้น พยาธิสภาพที่พบในโรคติดเชื้อวัณโรคนั้นพบได้หลายแบบ แบบที่ยกตัวอย่างเอามาให้ดูเป็นชนิดที่พบได้บ่อย คือ มีลักษณะเป็น caseous necrosis และมีปฏิกิริยาการอักเสบชนิด granuloma อยู่ล้อมรอบ การวินิจฉัยที่แน่นอนต้องได้จาการเพาะเชื้อ การย้อมสี acid – fast อาจเห็น acid – fast bacilli แต่ไม่ได้บ่งชี้ว่าเป็น mycobacterium ชนิดใด

2.8 Fungal infection of lung

การติดเชื้อราในปอด พบไม่ค่อยบ่อยในคนปกติ แต่ในคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือได้รับยาหรือสารที่กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agent) ก็ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดติดเชื้อราในปอดได้สูงกว่าคนปกติอย่างมาก จึงมักพบการติดเชื้อราในปอดในผู้เป็นมะเร็งระยะสุดท้าย หรือในคนไข้โรคเอดส์ระยะท้าย ๆ เป็นต้น เชื้อราที่พบในปอดพบได้หลายชนิด ที่พบบ่อยก็มี *Aspergillus* spp , *Candida* spp , Mucormycosis เป็นต้น

2.9 Emphysema

ถุงลมโป่งพอง คือภาวะที่ถุงลมขยายขนาดใหญ่ขึ้นจาการที่ผนังกั้นถุงลมถูกทำลาย ส่งผลทำให้ถุงลมมารวมตัวกัน มีขนาดกว้างและใหญ่มากขึ้น ลักษณะการทำลายนี้จะเกิดขึ้นอย่างถาวรพบมีพยาธิสภาพบริเวณทางเดินหายใจที่อยู่ส่วนปลายต่อ etrminal bronchiole แต่จะไม่พบมีลักษณะของการเกิด fibrosis ที่ชัดเจน แยกออกเป็น 4 ชนิดตามส่วน หรือตามตำแหน่งที่ acinus มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้แก่ centriacinar, panacinar, paraseptal และ irregular emphysema Centriacinar emphysema (centrilobular emphysema) เกิดพยาธิสภาพขึ้นใน lobule บริเวณตรงกลางซึ่งหมายความถึงส่วนที่อยู่ส่วนต้น (proximal) ของ acini นั่นคือส่วนของ respiratory bronchioles ในขณะที่ถุงลมส่วนปลายยังปกติอยู่ ดังนั้นใน lobule เดียวกันจะพบทั้งปอดที่เกิดถุงลมโป่งพองร่วมกับเนื้อปอดที่ยังเป็นปกติ

Panacinar (panlobular) emphysema พบพยาธิสภาพตั้งแต่ respiratory bronchioles จนถึงถุงลมส่วนปลาย คำว่า pan ที่ใช้นำหน้านี้หมายถึงทั่ว ๆ acinus ไม่ได้หมายความถึงทั่วทั้งปอด พบเกิดขึ้นบ่อยที่บริเวณด้านหน้าของปอดและกลีบล่างและจะเกิดรุนแรงมากที่สุดบริเวณล่างสุดซึ่งแตกต่างจาก centriacinar type ส่วนสาเหตุที่พบเกิดร่วมกันได้บ่อยกับถุงลมโป่งพองชนิดนี้คือโรคที่เกิดจากการขาดเอนไซม์ alpha – 1 – antitrypsin

Paraseptal (distal acinar) emphysema พยาธิสภาพที่เกิดจะพบว่าส่วนต้นของ acinus จะเป็นปกติแต่บริเวณส่วนปลายจะมีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้น ดังนั้นจะพบว่าเกิดขึ้นบ่อยในบริเวณที่ใกล้หรือติดกับเยื่อหุ้มปอดโดยเฉพาะบริเวณที่เกิดแผลเป็น (scar) พังผืด (fibrosis) และบริเวณเนื้อปอดแฟบ (atelectasis)

Irregular emphysema จากชื่อที่ใช้เรียกว่า irregular หมายถึงตำแหน่งของพยาธิสภาพที่เกิดนั้นไม่แน่นอน แต่โดยส่วนใหญ่จะพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับบริเวณที่เกิดแผลเป็น (scar)

ลักษณะภายนอกปอดจะมีพยาธิสภาพแล้วแต่ความรุนแรงของโรค โดยถ้าเป็นชนิด panacinar จะพบปอดขยายขนาดใหญ่ขึ้น และมีปริมาตรเพิ่มมากขึ้น ส่วนชนิด centricainar พบมีพยาธิสภาพรุนแรงบริเวณปอดด้านบน โดยจะเห็นได้ชัดมากขึ้น ถ้ามีพยาธิสภาพเกิดรุนแรงจะพบเนื้อปอดมีสีซีด แต่ถ้าเป็นชนิด irregular จะพบมี bleb หรือ dullae ขนาดใหญ่ที่เกิดเนื่องมาจากแผลเป็น (scar) ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์มีการทำลายเกิดขึ้นใน lung lobule บริเวณผนังกั้น (septal wall) ซึ่งจะถูกทำลายอย่างถาวร ถ้าเป็นรุนแรงจะพบว่าถุงลมที่ถูกทำลายจะมารวมตัวกันเกิดเป็นช่องอากาศที่มีขนาดใหญ่ผิดปกติ ส่วน respiratory bronchiole และหลอดเลือดที่อยู่บริเวณผนังจะถูกกดเมื่อช่องอากาศขยายใหญ่ขึ้น

3. LIVER

ลักษณะจุลกายวิภาคของตับสามารถมองได้เป็น 2 แบบ แบบที่มองเห็นง่ายและใช้มาแต่ดั้งเดิม คือการมองโครงสร้างของเซลล์ตับเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexaglonal lobule) ที่มี central vein อยู่ตรงกลางและมี portal tracts อยู่ สามมุมในหกมุม เซลล์ตับเรียงตัวเป็นแท่ง มุ่งสู่ศูนย์กลาง คือ central vein โดยเซลล์ตับเรียงตัวเป็นแถวเดียว ระหว่างแท่งของเซลล์ตับเป็น sinusoid ซึ่งพบมี Kupffer cell และ endothelial cell ส่วนของ portal tract ประกอบขึ้นจาก terminal hepatic arteriole , terminal portal venule และ bile duct

ถ้าพิจารณารูปแบบตามการเลี้ยงของเส้นเลือด จะได้ลักษณะโครงสร้างเป็นรูปคางหมู หรือรูปลิ่ม (hepatic acinus) ที่มีทางเดินของเส้นเลือดที่นำออกซิเจนและอาหารมาสู่เซลล์ตับเป็นด้านฐานกว้าง เส้นเลือดดังกล่าวคือ hepatic arteriole และ portal venule ส่วน central vein ซึ่งแท้ที่จริงคือ terminal hepatic venule ที่รวมเลือดที่ผ่านออกมาจาก sinusoid เพื่อสู่ hepatic vein และ inferior vena cana จะเป็นได้แค่ขอบโครงสร้างนี้ การมองเป็น acinus จะเห็นพื้นที่ของเซลล์ตับเป็น 3 บริเวณ ตามความใกล้ไกลจากแหล่งของเส้นเลือดที่นำออกซิเจนและอาหาร เรียกเป็น zone 1, zone 2, และ zone 3 ตามลำดับ

3.1 Chronic passive congestion

ส่วนใหญ่เกิดจากหัวใจห้องขวาล้มเหลว นอกจากนี้ยังเกิดจากสาเหตุใด ๆ ที่ส่งผลให้เกิดการอุดตันขึ้นใน hepatic vein และ inferior vena cana หรือ hepatic vein ซึ่งสาเหตุหลังนี้ พบน้อยกว่า ลักษณะของ chronic congestion คือ พบบริเวณตรงกลางของ lobule เป็นสีแดงคล้ำสลับด้วยเซลล์ที่มีสีซีด เกิดลักษณะที่เรียก nutmeg liver ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็น entral vein และ sinusoid ที่อยู่บริเวณตอนกลางของ lobule ขยายออกเนื่องจากเลือดคั่ง และเซลล์ตับบริเวณนั้นบางครั้งพบลีบเล็กลงไปอันเป็นผลจาก chronic hypoxia เซลล์ตับที่อยู่บริเวณรอบนอกซึ่งเกิด hypoxia น้อยกว่า การเปลี่ยนแปลงจึงเป็นลักษณะของ fatty change กรณีที่มีหัวใจล้มเหลวอย่างรุนแรงจะพบการตายของเซลล์ตับรอบ ๆ central vein รวมกับมีเลือดออก เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า central hemorrhagic necrosis ภาพของ central hemorrhagic necrosis ยังสามารถพบได้ ในภาวะช็อก ซึ่งเลือดมาเลี้ยงตับลดลงทันทีโดยไม่จำเป็นต้องมี Chronic passive congestion นำมาก่อน

Massive and submassive hepatic necrosis

เป็นชื่อใช้เรียกรอยโรคที่มีการทำลายเนื้อตับอย่างรุนแรงและเป็นบริเวณกว้าง ผู้ป่วยมีอาการของ fulminant hepatic failure เป็นภาวะแทรกซ้อนของโรคที่มีสาเหตุต่าง ๆ อาทิการติดเชื้อ การใช้ยาและสารเคมีที่ทำอันตรายต่อเซลล์ตับตลอดจนภาวะเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ เป็น

ต้น ไวรัสตับอักเสบเป็นสาเหตุนำที่พบบ่อยที่สุดคือคิดเป็นร้อยละ 60 – 75 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด ไวรัสตับอักเสบทุกชนิดทำให้เกิดการตายของเนื้อตับอย่างรุนแรงนี้ได้ แต่ที่พบมากคือชนิด B และ D นอกจากนี้อาจเกิดจากไวรัสกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่ม herpesvirus (ไวรัสในกลุ่มนี้มี Eptein – Barr virus , cytomegalovirus , herpes simplex virus , และ varicella – zoster virus) adenovirus , coxsackievirus, และ echovirus ไวรัสในกลุ่มอื่น ๆ ที่กล่าวถึงตอนหลังนี้มักเกิดโรคเมื่อเป็นการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ขณะที่การใช้ยาและได้รับสารพิษต่าง ๆ เป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยรองลงมาคือราว 20% ยาที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนนี้ ได้แก่ acetaminophen , halothane , isoniazid , methyldopa , dihydralazine และ ticrynafen อัตราตายของโรคนี้สูงถึง 60 - 70 % ในส่วนของผู้ป่วยที่รอดชีวิตยังมีโอกาสเกิดเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรังและตับแข็งตามหลังด้วย ลักษณะของตับเมื่อดูด้วยตาเปล่าพบว่า ตับมีขนาดเล็กลง เนื้อตับนุ่ม มีสีแดงคล้ำ ถ้ามีภาวะน้ำดีคั่งร่วมด้วยจะมีสีออกเขียวปนน้ำตาล ในทางกล้องจุลทรรศน์พบว่าโครงสร้างเดิมของเนื้อเยื่อเซลล์ตับหายไป เกิดการยุบตัวของ reticulin framework เห็นเซลล์ตับตายอย่างมาก มีเซลล์อักเสบแทรกกระจายอยู่ส่วยใหญ่เป็น mononuclear cells และ pigment – laden Kupffer cell นอกจากนี้ยังพบว่ามี lymphocyte แทรกอยู่ ตามผนังของ central vein (lymphocytic endopheblitis) bile ductule มีจำนวนเพิ่มขึ้นและมี neutrophil แทรกปนอยู่ภายในและรอบ ๆ portal tract ด้วย เซลล์ตายมักกระจายอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบภายในเนื้อตับและพื้นที่ของเนื้อตายแตกต่างกัน ถ้ายังมีเนื้อตับที่ดีเหลืออยู่บ้าง เรียก submassive necrosis ถ้าเนื้อตับตายทั้งหมด เรียก massive necrosis โรคนี้มักเกิดกับกลีบซ้ายของตับมากกว่าส่วนของเซลล์ตับที่ยังหลงเหลืออยู่อาจเห็นมี regeneration คือเห็นเซลล์แบ่งตัวจำนวนมาก และพบเซลล์ตับเรียงตัวหลาย ๆ แถวชิดติดกันเกิดเป็นลักษณะของก้อน (nodule) ซึ่งมีขอบเขตไม่ชัดเจน ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยานี้มักไม่ช่วยบอกถึงสาเหตุ ยกเว้นกรณีพบ viral inclusion ซึ่งบอกได้ว่ามีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ

Fatty metamorphosis

เซลล์ในร่างกายมีปริมาณของไขมันภายในเซลล์ต่าง ๆ กัน ปรากฏในรูปของ fat droplets ซึ่งอาจตรวจพบเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาวะที่เรียก fatty metamorphosis หรือ steatosis หรือ fatty change คือภาวะที่พบการสะสมของไขมันในปริมาณมากอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ triglyceride การสะสมไขมันสามารถบอกได้โดยการดูด้วยตาเปล่าซึ่งอวัยวะที่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ได้บ่อย คือ ตับเนื่องจากมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ lipid metabolism

การเกิด fatty metamorphosis เกิดขึ้นได้ในหลายกรณีสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดคือ ดื่มสุราเป็นอาจิณ สาเหตุอื่น ๆ ที่พบได้ได้แก่ protein – calorie malnutrition , hepatotoxin อาทิ aflatoxin และ carbon tetrachloride , ภาวะ hypoxia หรือ anoxia , เบาหวาน , อ้วน , ผู้ป่วยที่รับสาร

อาหารทางเส้นเลือด , Reye's syndrome การเกิดปฏิกิริยาไวต่อปฏิชีวนะบางชนิดเช่น tetracycline และในสตรีตั้งครรภ์เป็นต้น ปริมาณของ triglyceride ที่มีมากเกินไปในเซลล์นั้นอาจเกิดจากกลไกดังต่อไปนี้คือ

1) เซลล์ตับได้รับ fatty acid ในปริมาณที่มากขึ้น

2) มีการสร้าง fatty acid เพิ่มขึ้นจาก acetate

3) การ oxidation ของ fatty acid ลดลง

4) เกิดการรวมตัวกันของ triglyceride และ apoprotein molecule เพื่อให้เป็น lipoprotein ได้ไม่ดี จึงมีการสะสมของ triglyceride เพิ่มขึ้นภายในเซลล์

5) การปล่อย lipoprotein จากเซลล์ตับลดน้อยลงรูปแบบของ fatty change ในตับแบ่งเป็น 2 แบบ คือ microvesicular fatty change (microvesicular steatosis) และ large droplet fatty change (macrovesicular steatosis) แบบแรกมี vesicles ขนาดเล็กจำนวนมาก อยู่ภายใน cytoplasm ของเซลล์ตับ พบนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ ไม่มีความผิดปกติของรูปร่าง สาเหตุที่พบลักษณะแบบนี้ เช่น alcoholic liver , injury , Reye's syndrome, acute fatty liver of pregnancy, drug – induced injury และ inherited metabolic disease นอกจากนี้ที่พบได้บ่อยในบ้านเราคือผู้ป่วย chronic hepatitis B virus ส่วนลักษณะของ macrovesicular fatty change นั้นจะพบเซลล์ตับที่เกิดพยาธิสภาพ จะพบ fat vacuole อาจมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ตับก็ได้ สาเหตุของ macrovesicular steatosis ก็มีหลายสาเหตุเช่นกัน ได้แก่ alcohotism , malnutrition , เบาหวาน, โรคอ้วน , malabsorption , post – jejunoileal bypass surgery , ภาวะโรคเรื้อรังต่าง ๆ ที่เป็นเหตุให้ต้องนอนอยู่บนเตียงเป็นเวลานาน , ยา , สารเคมี รวมถึงโรคเกี่ยวข้องกับ metabolism บางประเภท

3.4 Alcoholic hepatitis

พยาธิสภาพที่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์เป็นเวลานานหลายปีพบได้ 3 แบบ คือ

1) hepatic steatosis

2) alcoholic hepatitis

3) cirrhosis

แต่พยาธิสภาพนั้นไม่ขึ้นต่อกันและไม่จำเป็นต้องเกิดต่อเนื่องกัน พยาธิสภาพของ alcoholic hepatitis เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นตับบวม มีสีน้ำตาลแดง ลักษณะพยาธิสภาพเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ พบลักษณะเซลล์ตับบวม และ ตาย อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นกลุ่มกระจัดกระจายไปทั่ว แต่พบบ่อยบริเวณตรงกลางของ lobule เซลล์ตับบางตัวมีการสะสมของ cytokeratin intermediate filament ซึ่งอยู่รวมกับโปรตีนชนิดอื่น อยู่ภายใน cytoplasm มองเห็นเป็น inclusion ติดสีชมพู เรียกว่า Mallory body (Mallory body ไม่จำเพาะสำหรับ alcoholic hepatitis สามารถพบ

เห็นได้ในโรคอื่นๆ เช่น primary biliary cirrhosis, Wilson's disease , chronic cholestasis syndrome focal nodular hyperplasia และ hepatocellular carcinoma) นอกจากนี้ พบว่ามี neutrophil แทรกอยู่ทั่ว ๆ ไปทั้ง lobule ของตับและรวมกลุ่มอยู่รอบ ๆ บริเวณที่มีเซลล์เสื่อม โดยเฉพาะเซลล์ที่พบมี Mallory body ส่วนเซลล์อักเสบชนิด lymphocyte และ macrophage ก็พบได้เช่นกัน จะพบบริเวณ portal tract หรือแทรกอยู่ทั่วไปใน lobule Alcoholic hepatitis ยังพบพยาธิสภาพอื่น ๆ อีกเช่น perivenular fibrosis และ sinusoidal fibrosis หรือบางครั้งพบ periportal fibrosis เด่นชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่ดื่มสุราปริมาณมากเป็นอาจิณ และยังพบว่าอาจจะมี hemosiderin สะสมอยู่ภายในเซลล์ตับ และ Kupffer cell ด้วย เนื่องจากคนที่ดื่มแอลกอฮอล์มาก ๆ จะมีความผิดปกติของขบวนการ metabolism ของธาตุเหล็กในร่างกาย

3.5 Cirrhosis

นิยามของตับแข็ง (cirrhosis) คือตับที่มีลักษณะเป็นตุ่มหรือเป็นก้อนทั่วทั้งตับ เกิดขึ้นจากการที่มีผังพืด (fibrous band) แทรกอยู่ระหว่าง regenerataitive nodule แบ่งตามขนาดของตุ่มได้เป็น 3 แบบ คือ

1) micronodular type : ขนาดของ nodule มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กว่า 3 มม.

2) macronodular trye : ขนาดของ nodule มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 3 มม.มักพบตุ่มมีขนาดแตกต่างกันปนเปอยู่

3) mixed type : พบทั้ง micronodula และ macronodulae ในปริมาณที่เท่า ๆ กันCirrhosis นั้นเป็น diffuse process ที่มี fibrosis และพบมีการเปลี่ยนแปลงของ normal liver architecture ไปเป็น abnormal nodule บางครั้ง ไม่เห็นเป็น regenerative nodule ชัดเจน เช่นภาวะตับแข็งที่เกิดจาก biliary cirrhosis และ hemochromatosis

การวินิจฉัย cirrhosis ในทางคลินิก มักระทำโดยการตัดชิ้นเนื้อตับออกมาเป็นเส้นเล็ก ๆ ด้วยเข็ม (needle biopsy) การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ ควรมีการประเมินหัวข้อต่อไปนี้

1. cirrhosis นั้นเกิดสมบูรณ์หรือไม่
2. เป็นชนิด micronodular , macronodular หรือ mixed type
3. ดู degree of activity
4. ถ้าเป็นไปได้ควรหาสมุหฐานของโรค

ในกรณี biopsy specimen พบ nodule มีเพียงบางส่วนของ septa ควรให้การวินิจฉัยเป็น incomplete cirrhosis จะบอกว่าเป็น cirrhosis เมื่อพบ diffuse nodule ที่มี septa หุ้มโดยรอบชัดเจน

การดู activity ของ cirrhosis ประเมินจาก hepato – cellular degeneration, hepatocellular necrosis , periseptal piecemeal necrosis และ inflammatory cell infiltrates ตับแข็งเป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศไทย สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ตับแข็งมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma การจำแนกแบบต่าง ๆ ของตับแข็งบ่งบอกถึงสาเหตุการเกิดโรคได้ ตัวอย่างเช่น

- micronodular pattern : มักพบใน alcoholic liver disease , non – alcoholic steatohepatitis, biliary cirrhosis (primary and secondary), glycogenosis type IV, genetic hemochromatosis , post jejunoileal bypass disease , Indian childhood cirrhosis , galactosemia และ congestive (cardiac) cirrhosis
- macronodular pattern : พบบ่อยที่สุดในกรณีของ viral hepatitis นอกจากนี้ยังพบใน Wilson's disease , hereditary tyroginemia , antitrypsin deficiency และ drug – induced injury

3.6 Hepatocellular carrinoma (HCC)

มะเร็งตับเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยที่สุดของผู้ชายไทย ประเทศที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งตับสูง ได้แก่ แอฟริกาและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศที่มีอุบัติการณ์สูงรองลงมา ได้แก่ ญี่ปุ่น ประเทศในตะวันออกกลาง และยุโรปกลางตอนใต้ ประเทศที่มีอุบัติการณ์สูงรองลงมา ได้แก่ ญี่ปุ่น ประเทศในตะวันออกกลาง และยุโรปกลางตอนใต้ แต่เป็นมะเร็งที่พบน้อยในกลุ่มประเทศแถบอเมริกาเหนือ และยุโรปตะวันตก ในประเทศไทยสาเหตุที่พบบ่อยว่ามีความสัมพันธ์กับการติดมะเร็งตับคือ ไวรัสอักแสบชนิด บี

อาการของผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC พบว่า 85 เปอร์เซ็นต์ มาด้วยปวดแน่นท้อง คลำพบก้อนในท้อง หรือมาด้วยตับโต มีท้องมาน (ascites) น้ำหนักลด เบื่ออาหาร ผอมลง ดีซ่าน อ่อนเพลีย ตรวจพบระดับ AFP (alpha- fetoprotein) ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (โดยเฉพาะในรายที่พบร่วมกับ HBV นั้น ค่าอาจจะสูงมากกว่า 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

ลักษณะเมื่อดูด้วยตาเปล่าจะแตกต่างกันแล้วแต่สาเหตุที่เกิดร่วมกับ HCC เช่น การมีตับแข็งร่วมด้วย โดยทั่วไปขนาดของตับจะโตขึ้น น้ำหนักประมาณ 2,500 กรัม ก้อนเนื้องอกมักจะนุ่ม มีสีน้ำตาลปนเทาหรือเขียว มักพบมีบริเวณที่มีเลือดออกและเนื้อเน่า (hemorrhage and necrosis) ลักษณะของก้อนจะพบได้หลายแบบต่าง ๆ กัน คืออาจจะพบเป็นก้อนเดี่ยวหลายก้อน หรือแบบกระจายทั่วไป ก้อนขนาดเล็กคือเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 3 ซม. จะมีพยากรณ์โรคที่ดีมาก แต่ส่วนใหญ่ในบ้านเรามักพบในระยะท้ายซึ่งไม่สามารถผ่ารักษา ลักษณะของการงอกของก้อนเนื้อแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ expanding (discrete boundary) spreading (poorly defined

tumor border) multifocal (multiple discrete nodule) เนื้องอกนี้ชอบกระจายไปตามเส้นเลือด ต่าง ๆ ได้แก่ portal vein, major hepatic vein, inferior vena cava รวมทั้งกระจายเข้าไปใน intrahepatic และ extrahepatic bile duct ด้วย

ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์มะเร็งเป็นรูปหลายเหลี่ยมคล้ายเซลล์ตับมีขอบเซลล์ชัด cytoplasm ติดสีชมพูแลเห็นเม็ดเล็ก ๆ อยู่ภายใน นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินมีลักษณะหยาบ ขนาดของนิวเคลียสใหญ่กว่านิวเคลียสของเซลล์ตับปกติ อัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อ cytoplasm เพิ่มมากขึ้นนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้มขึ้นกว่าปกติ nucleous มีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบ intranuclear cytoplasmic invagination ได้บ่อย

มะเร็งตับ HCC จะพบว่ามีการเรียงตัวได้หลายรูปแบบต่าง ๆ กันเช่น

1) Trabecular : เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด โดยเซลล์มะเร็งเรียงตัวเป็นแถวหรือเป็นแผ่นโดยมีความหนา ต่าง ๆ กัน ไม่มีพบ storma กั้นระหว่างเซลล์ และยังพบว่ามี sinusoid ซึ่งบุด้วย endothelial cell อยู่ระหว่าง trabecular หรือพบ canaliculi ระหว่างเซลล์มะเร็ง ซึ่งบางครั้งอาจมี bile granule หรือ droplet บรรจุอยู่ภายใน ถ้าพบเซลล์มะเร็งสร้างน้ำดี แสดงว่าเป็น HCC ส่วน Kupffer cell ไม่พบหรือพบน้อย

2) Compact : แบบนี้เกิดจากสารที่ sinusoid ถูกกดเบียด ทำให้เห็นเซลล์อัดตัวกันแน่น

3) Pseudoglandular : พบว่า canaliculi ขยายใหญ่ขึ้นระหว่าง trabecular อาจพบว่ามีหรือไม่มี bile ขังอยู่ บางครั้งพบว่าภายใน cyst บรรจุสารคล้าย colloid ย้อม ติด PAS ซึ่งพบว่าสารนี้เป็น fibrin ไม่ใช่ mucus จึงทำให้ดูมีลักษณะคล้าย gland ซึ่งความจริงไม่ใช่ lumen ที่แท้จริง จึงเรียกว่า pseudogland

4) Scirrhous : แบบนี้มักทำให้เกิดเป็น secondary scarring ขึ้นภายในเนื้องอก

5) Fibrolamellar : แบบนี้ก้อนเนื้องอกจะประกอบด้วย fibrous หนาแทรกระหว่างเซลล์มะเร็งที่เรียงตัวกันเป็น sheet , small trabeculae หรือ pseudogland ลักษณะของเซลล์มะเร็งเป็นรูปหลายเหลี่ยม cytoplasm ติดสีชมพูเข้มเนื่องจากมี mitochondria จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ inclusion ซึ่งย้อมติด PAS ลักษณะกลม ๆ ติดสีจางปนอยู่ด้วย

4. NERVOUS SYSTEM

ระบบประสาท ประกอบด้วยระบบประสาทส่วนกลาง ส่วนปลาย และระบบประสาทอัตโนมัติ โรคที่พบได้บ่อยจะเกิดกับระบบประสาทส่วนกลาง โรคดังกล่าวได้แก่ การติด

เชื้อของสมองและไขสันหลังโรค CVA (cerebrovascular accident) และเนื้องอก เนื้องอกที่พบบ่อยได้แก่ glioma และ meningioma

4.1 Cerebral infarction

หมายถึงเนื้อสมองตายจากการขาดเลือด ดังนั้นพยาธิสภาพ จึงขึ้นกับขนาดของหลอดเลือดที่ตีบหรืออุดตัน และ collateral circulation ที่มาช่วยเสริม atherosclerosis เป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดที่ทำให้หลอดเลือดตีบ อาจร่วมกับการเกิด thrombosis ที่ตำแหน่งนั้น นอกจากนั้นสะเก็ด atheroma ที่หลุดมาในกระแสเลือด หรือ thrombus ที่หลุดจากที่ใดที่หนึ่งทางด้านหลอดเลือด แดง จะกลายเป็น embolus ไปอุดเส้นเลือดที่มีขนาดเล็กกว่า สาเหตุอื่นที่เป็นปัจจัยเสริมทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด เช่น การอักเสบของหลอดเลือด เลือดแข็งตัวเร็ว (hypercoaguable state) เป็นต้น

เมื่อสมองขาดเลือดใน 6 ชั่วโมงแรกแทบจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ภายใน 24 ชั่วโมง เนื้อสมองบริเวณนั้นจะซีดบวม และนุ่มกว่าปกติ ต่อมาเนื้อตายจะเริ่มสลาย (liquefy) แยกจากสมองโดยรอบที่บวมมาก เนื้อตายจะถูกกำจัดโดย macrophage พร้อม ๆ กับมีการซ่อมแซมจาก astrocyte และหลอดเลือดเล็ก ๆ ข้างเคียง เมื่อเนื้อตายถูกกำจัดไปจะเหลือเป็นโพรงมีใย glial tissue ภายในโพรง infarct ที่มีขนาดใหญ่ อาจใช้เวลาเป็นเดือน ๆ ในการกำจัดเนื้อตายให้หมดไป

Infarct อีกชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อย เป็นโพรงเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 – 1.5 ซม. ที่เรียก lacunar infarct นี้มักเกิดจากการอุดตันของ perforating branch จาก lipohyalinosis

4.2 Cerebral hemorrhage

ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ spontaneous intraparenchymal hemorrhage เท่านั้น ส่วนใหญ่เกิดจากความดันโลหิตสูงบ้างจึงเรียก hypertensive intracerebral hemorrhage

ตำแหน่งที่เกิดเลือดออกได้บ่อย ด้แก่ basal ganglia , thalamus, pons , cerebellum หรือใน white matter ส่วนใดส่วนหนึ่ง พบว่าเลือดที่ออกนั้นเกิดจาการแตกของ aneurysm ขนาดเล็ก (Charcot Bouchard aneurysm) หรืออาจเกิดจาก fibrinoid necrosis ของผนังเส้นเลือดอันเป็นผลมากจากความดันโลหิตสูง ก้อนเนื้อ (hematoma) จะเบียดดันเนื้อสมองรอบข้างอาจมีการตายของเนื้อสมองบ้าง แต่ไม่มากเท่ากับ infarction สมองโดยรอบจะบวมมากและมีปฏิกิริยาการอักเสบบ้าง ถ้าก้อนเลือดขนาดใหญ่หรือเลือดแตกเข้าในช่องสมอง (ventricle) จะทำให้ความดันในกะโหลกศรีษะ (intracranial pressure) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งจากปริมาณของก้อนเลือดจากสมองบวม (brain edema) และจาก hydrocephalus ผู้ป่วยมักจะถึงแก่กรรมภายในสัปดาห์

แรก ถ้ายังมีชีวิตรอดก้อนเลือดจะสลายมี macropahge เข้ามากำจัดเลือดและเนื้อสมองที่ตายและมี gliosis รอบ ๆ เมื่อสมองที่บวมยุบลงแล้ว มักจะเห็นร่องรอยเป็นช่องแคบ ๆ (slit) ขอบสีเหลืองส้ม ผู้ป่วยก็จะมีความผิดปกติทางระบบประสาท (neurological deficit) ตามตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพนั้น spontaneous intraceretral hemorrhage อาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น ในผู้ป่วยโรคเลือดที่มีการแข็งตัวของเลือดบกพร่อง (coagulation defect) มีประวัติดื่มสุรา ความผิดปกติของเลือด เป็นต้น

4.3 Meningitis

หมายถึงการอักเสบของเยื่อหุ้มสมอง (leptomeninges) และ subarachnoid space สาเหตุอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย , ไวรัส , เชื้อรา หรือสารเคมีอื่น ๆ นอกจากจะเรียกตามสาเหตุแล้ว อาจแบ่งเรียกตามลักษณะการอักเสบที่เยื่อหุ้มสมองและ subarachnoid space เช่น purulent meningitis , aseptic meningitis, eosinophilic meningitis เป็นต้นการตรวจน้ำไขสันหลังเป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติ การที่จำเป็น ในการวินิจฉัยโรคนี้

พยาธิสภาพของ meningitis จะพบการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองและชั้น subarachnoid space การอักเสบนั้นอาจลามเข้าไปในสมองได้ตาม Virchow – Robin space ข้าไปใน ventricular ystem (ventriculitis) ได้ด้วย ปฏิกิริยาการอักเสบจะแตกต่างกันไปตามสาเหตุ

Bacterial meningitis ในเด็กมักเกิดจากเชื้อ E. coli Group B streptococci , H. influenzae ในผู้ใหญ่มักจะพบ Streptococcus pneumoniae เยื่อหุ้มสมองจะมีการอักเสบแบบเฉียบพลัน หลอดเลือดที่ผิวสมองมีเลือดมาเลี้ยงมาก พบ neutrophils จำนวนมาก น้ำไขสันหลังจะขุ่น หรือเป็นหนอง exudate มักอยู่ด้านบนของสมองคลุม gyri sulci และเนื้อสมองทั่วไปจะบวม

4.4 Encephalitis

หมายถึงการอักเสบของเนื้อสมอง ส่วนใหญ่จะหมายถึงการติดเชื้อไวรัส (viral encephalitis) ซึ่งเกิดทั่วสมอง (diffuse lesion) การอักเสบจากสาเหตุอื่นมักเป็นเฉพาะที่ (focal lesion) อาจใช้คำว่า cerebritis แทน

Viral encephalitis เกิดจากไวรัสหลายชนิดเช่น Japanese B Virus , mumps, coxsackie virus เป็นต้น พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจะคล้าย ๆ กันได้แก่ การพบ microglia และ astrocyte รวมกันเป็นกระจุก (microglial nodule) พบ neuron ตายที่มี microglia ล้อมรอบ (neuronphagia) และพบ lymphocyte, mononuclear cell อยู่รอบ ๆ หลอดเลือด (perivascular cuffing) การเปลี่ยนแปลง ดังกล่าวไม่สามารถบอกถึงต้นเหตุได้แต่ยังมีไวรัสบางชนิดที่นอกจากจะพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้วจะมีลักษณะเฉพาะตัวเช่น

Negri body พบในการติดเชื้อพิษสุนัขบ้า (Rabies virus)

Intranuclear inclusion พบใน Herpes virus หรือ Cytomegalovirus

Multinucleated cell พบใน subacute encephalitis of AIDS

Inclusion ใน oligodendrocyte พบได้ใน progressive multifocal leukoencephlopathy ร่วมกับ demyelination

Poliovirus จะมีการทำลายเฉพาะ anterior horn cell เป็นต้น

นอกจาก Herpes virus แล้วยังไม่มีการรักษาเฉพาะสำหรับ viral encephalitis อื่น ๆ การพยากรณ์โรคจึงไม่แน่นอนความผิดปกติทางระบบประสาท (neurological deficit) ขึ้นกับว่าสมองถูกทำลายมากน้อยเพียงใด ส่วน Rabies นั้นจะตายทุกราย

หลักการปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา

การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อจากผู้ป่วย จะประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ ดังนี้

1. การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ (Preperation of Tissue)
2. การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue Processing)
3. การทำบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin Block or Embedding in Paraffin)
4. การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin Section)
5. การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Tissue Staining)

1. การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ (Preparation of Tissues)

หมายถึง การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำไบอ็อปซี่ , การผ่าตัด หรือวิธีอื่น ๆ ด้วยขบวนการต่าง ๆ เพื่อที่จะนำไปตรวจ และให้การวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำผลการวินิจฉัยนั้นไปเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยได้ถูกต้อง ขบวนการต่าง ๆ แบ่งในขั้นต้นได้ ดังนี้

1. การแช่น้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ (Fixation)
2. การตรวจด้วยตาเปล่าและการตัดชิ้นเนื้อ (Gross examination)

1. การแช่น้ำยาเพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อ (Fixation) เนื้อเยื่อเมื่อนำออกจากร่างกาย จะต้องมีการรักษาสภาพของชิ้นเนื้อเยื่อนั้น ให้เหมือนกับขณะที่อยู่ในร่างกายมากที่สุด โดยทำให้มากสูญเสียสภาพเดิมน้อยที่สุด ทั้งนี้ เพื่อนำไปปฏิบัติต่อไปด้วยกรรมวิธีห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา เพื่อศึกษาตรวจวินิจฉัยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องแม่นยำ Fixation เป็นขบวนการเก็บรักษาป้องกันชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue) ให้มีสภาพคงเดิมมากที่สุด โดยทำให้ส่วนประกอบของเซลล์ รวมทั้งเนื้อเยื่อถูกผนึกหรือตรึง (fix) ด้วยขบวนการทางฟิสิกส์ (physical) และบางส่วน

ทางเคมี (chemical) เพื่อให้ทนทานต่อสาร น้ำยาเคมี (reagents) ต่าง ๆ ตามขั้นตอนกรรมวิธีที่จะติดตามมาโดยให้มีการสูญเสียสภาพเดิมน้อยที่สุด

ขบวนการ fixation นี้ เป็นขั้นตอนเริ่มแรกสุดที่สำคัญทางห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา (Histopathological laboratory) และจำเป็นอย่างยิ่งต่อชิ้นเยื่อ เมื่อนำออกมาจากร่างกาย เพื่อตรวจหาพยาธิสภาพ

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ (Aim of Fixation)

1. ป้องกัน (prevent) และรักษา (preserve) สภาพชิ้นเนื้อเยื่อ ไม่ให้เกิดการสลายตัว (autolysis) รวมทั้งทำลาย (killing) พวกแบคทีเรียที่ไม่ให้เกิดการเน่าเปื่อย (putrefaction) ขึ้นได้ในชิ้น เนื้อเยื่อนั้น

2. ทำให้ชิ้นเนื้อคงสภาพเดิมที่สุด ทั้งรูปร่างและขนาด หรือเกิดการสูญเสียสภาพเดิมน้อยที่สุดการรักษาสภาพชิ้นเนื้อนี้ เราจะใช้น้ำยาเคมีที่เรียกว่า Fixative

น้ำยารักษาสภาพ คือน้ำยาเคมีที่ใช้เก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อให้มีสภาพเหมือนกับขณะอยู่ที่ร่างกายมากที่สุด

คุณสมบัติของน้ำยารักษาสภาพที่ดี (A good Fixative Properties) Fixative ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. สามารถแทรกซึม (penetrate) เข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็ว

2. ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อแข็ง เพื่อให้คงรูปอยู่ได้เมื่อผ่านชิ้นเนื้อเข้าไปในขบวนการต่าง ๆ ที่ตามมาตามขั้นตอนต่อไป

3. รักษาสภาพชิ้นเนื้อไม่ให้เกิดการ autolysis พร้อมทั้งทำลายพวกแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

ผลของน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ผลของน้ำยารักษาสภาพต่อเนื้อเยื่อเกิดจากการใช้น้ำยา fixative มีดังนี้

1. ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อค่อนข้างแข็ง และส่วนประกอบภายในชิ้นเนื้อเยื่อเองทนทานต่อการถูกทำลายต่าง ๆ ด้วยขบวนการต่อ ๆ ไปที่ตามมา

2. มีผลต่อโปรตีนในชิ้นเนื้อเยื่อคือจะทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงสภาพจากปกติที่มีลักษณะคล้ายวุ้นที่มีลักษณะค่อนข้างแข็ง

3. หลังจากผ่านน้ำยารักษาสภาพแล้ว ทำให้น้ำยาต่าง ๆ ซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น

4. มีผลต่อการย้อมสี (staining) เพราะน้ำยารักษาสภาพจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีสภาพเป็นกรดหรือต่างมากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการ fixed ด้วยน้ำยารักษาสภาพ

5. Fixative มีผลต่อการย้อมสี คือ fixative บางชนิดอาจจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อไม่ติดสีในขณะที่ fixative อื่น ๆ จะเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดสีดีขึ้น (ซึ่งเราเรียกว่า mordant) ในการใช้ fixative กับชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันการสลายของเนื้อเยื่อและการเน่าเปื่อยนั้น น้ำยา fixative ต้อง

1. ไม่ทำให้ชิ้นเนื้อหดตัว (shrinkage) และขยายตัว (swelling)
2. ไม่ทำลายหรือละลายส่วนหนึ่งส่วนใดของชิ้นเนื้อเยื่อ
3. หยุดปฏิกิริยาต่าง ๆ ของ enzyme (enzyme inactive)
4. ทำลายแบคทีเรียและเชื้อราต่าง ๆ
5. ทำให้ชิ้นเนื้อคงสภาพเดิมและทนต่อการทำลายจากขบวนการต่าง ๆ ที่ตามมา เช่น dehydrants clearing agents , embedding media , cutting , staining และ mounting

การเลือกใช้ Fixative ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา (Histopathological laboratory) การเลือกใช้น้ำยารักษาสภาพต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับลักษณะงานด้วยคือ (พิจารณาจากคุณสมบัติและปฏิกิริยาของน้ำยารักษาสภาพ ต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป็นหลัก)

1. ราคาถูก
2. สามารถ fix ชิ้นเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว
3. เหมาะสมกับชิ้นเนื้อเยื่อที่มีขนาดต่าง ๆ กันและเหมาะสมกับการ processing หลายวิธี
4. ชิ้นเนื้อเยื่อที่ fix ใน fixative แล้ว สามารถย้อมสีได้หลายวิธี ทั้งวิธีธรรมดาและวิธีพิเศษ (routine and special stain)
5. สามารถเก็บชิ้นเนื้อไว้ใน fixative ได้นานโดยมีผลกระทบน้อยที่สุด
6. เหมาะสมกับส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อที่เราต้องการศึกษา

ชนิดและคุณสมบัติของ fixative มี fixative อยู่มากมายที่ใช้ในการ fixed ชิ้นเนื้อเยื่อแต่ในงานประจำของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ (Histopathological laboratory) มี fixative ที่นิยมใช้เป็น primary และ secondary fixative ที่ควรทราบมีดังนี้

1. 10 % Formalin
2. Formalin with sodium acetate
3. Natral buffered formalin NBF solution

4. Formalin ammonium bromide solution
5. 10 % Alcoholic formalin
6. Zenker's fluid
7. Helly's fluid (Zenker – formal or Zenker without acetic acid)
8. Bouin's fluid
9. Carnoy's fluid
10. Clarke's fluid
11. Sanfelice's fluid

2. การตรวจด้วยตาเปล่าและการตัดชิ้นเนื้อ (Gross Examination) ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการผ่าตัดจะต้องรักษาสภาพในน้ำยาที่เหมาะสม ในขวดหรือภาชนะที่มีชื่อและนามสกุลผู้ป่วย จะถูกนำมาที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาพร้อมใบนำส่ง ที่มีชื่อ นามสกุล อายุ เพศ และที่อยู่ปัจจุบันของผู้ป่วย และยังต้องมีชื่อหน่วยงานที่นำผ่าตัด ชื่อแพทย์ผู้ทำการผ่าตัด และที่สำคัญมากคือตำแหน่งของชิ้นเนื้อเยื่อ

เมื่อทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาได้รับชิ้นเนื้อเยื่อที่ fix ในน้ำยานั้น ทางเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จะต้องปฏิบัติเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ตรวจสอบความถูกต้อง ชื่อ นามสกุล ของผู้ป่วยในใบนำส่งและขวด fix ชิ้นเนื้อจะต้องตรงกัน

2. ให้หมายเลขที่กำหนดขึ้นของหน่วยงานพยาธิวิทยาที่ใบนำส่งตามลำดับ 1, 2, 3 , ... เรื่อยไป

3. นำชิ้นเนื้อนั้นมาตรวจดูด้วยตาเปล่า ว่าลักษณะอย่างไร นิ่มหรือแข็ง มีสีอะไร เช่นสีน้ำตาล หรือสีขาว ขนาดเล็กหรือใหญ่อย่างไร ลักษณะภายนอก ภายใน มีสิ่งผิดปกติอย่างไร จะต้องอธิบายให้ละเอียดและบันทึกไว้ การปฏิบัติเช่นนี้เรียกว่า gross examination

4. ขั้นต่อไปก็คือ จะต้องนำหรือตัดชิ้นเนื้อที่ได้รับให้มีขนาดพอเหมาะที่จะนำไปทำบล็อกพาราฟินเพื่อขบวนการต่อไป (นำไปตัดด้วยเครื่อง microtome และวางบนแผ่นสไลด์ได้) ดังนั้น ถ้าชิ้นเนื้อขนาดเล็กก็อาจไม่ต้องเตรียมตัดแต่อย่างใด หลังจากอธิบายลักษณะแล้วก็นำไปใส่ตลับชิ้นเนื้อได้เลย แต่ถ้าเล็กเกินไปกว่ารูเล็ก ๆ ของตลับใส่ชิ้นเนื้อ (cassette) จะต้องห่อด้วยกระดาษบาง ๆ เสียก่อน เพื่อมิให้ชิ้นเนื้อนั้นรอดรูของ cassette ไปได้ แต่ถ้าชิ้นเนื้อนั้นมีขนาดใหญ่ จะต้องเลือกตัดบริเวณที่มีพยาธิสภาพให้ขนาดไม่ใหญ่กว่า 2.5 ซม. x 1.5 ซม. และไม่ควรหนากว่า 0.3 ซม. ทั้งนี้เพื่อ section ที่ได้จะไม่ใหญ่กว่าแผ่นสไลด์ที่ใช้รองรับ

การตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่มีพยาธิสภาพได้อย่างถูกต้องนั้น ผู้ตัดต้องเป็นผู้มีความรู้ ความชำนาญเป็นอย่างดีในการดูสิ่งผิดปกติต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้น ผู้ตัดจึงมีความสำคัญยิ่งในการที่จะได้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง ผู้ตัดชิ้นเนื้อจึงควรเป็นพยาธิแพทย์ หรือถ้าสถานที่ใดมีพยาธิแพทย์ไม่พอเพียง ก็อาจจะฝึกฝนนักวิทยาศาสตร์ให้มีความรู้ความชำนาญในด้านนี้มาช่วยการตัดได้ แต่อย่างไรก็ตามก็ควรจะดูแลและควบคุมอย่างใกล้ชิด

ในตลับชิ้นเนื้อที่ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้เหมาะสมแล้วนั้น จะต้องใส่หมายเลขประจำที่ได้ให้ไว้แล้วในใบนำส่งแนบชื่อผู้ป่วย กระดาษที่เขียนหมายเลขนั้นจะพิมพ์หรือเขียนด้วยดินสอดำก็ได้ แต่จะต้องไม่เขียนด้วยหมึกเนื่องจากหมึกจะละลายไปในน้ำยาต่าง ๆ ได้ ทำให้หมายเลขนั้นเลอะเลือนไปหลังจากนี้แล้วก็นำตลับชิ้นเนื้อเหล่านี้ไปเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ(Automatic tissue processor) ต่อไป

ส่วนชิ้นเนื้อที่เหลือจากการตัดแล้วจะต้องเก็บไว้ก่อนไม่ทิ้งไป เนื่องจากอาจต้องมีการตัดเพิ่มหรือตัดเพื่อทำการย้อมพิเศษ เพราะยังให้การวินิจฉัยที่แน่ชัดไม่ได้

ถ้าชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับเป็นกระดูกหรือมีส่วนของแคลเซียมปะปนอยู่ด้วยจะต้องนำไปทำให้นิ่มเสียก่อนจึงจะนำเข้าขบวนการต่อไปได้ การกระทำเช่นนี้เรียกว่า Decalcification

2. การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue Processing)

หมายถึงการที่เรานำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการ fixed และตรวจการวินิจฉัยด้วยตาเปล่า (gross examination) มาอย่างดีแล้วผ่านขบวนการ (processing) ทางเคมีเพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นมีความแข็งพอที่จะตัดออกเป็นชิ้นบาง ๆ (Paraffin section) ขนาด 3 – 5 ไมโครเมตร (Micron) ได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น

หลักการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Principle of Tissue Processing) หลักการนี้ประกอบด้วยการทำให้ตัวกลางที่เป็นน้ำยาเคมีต่าง ๆ ที่มีชิ้นเนื้อแช่อยู่ซึมแทรกเข้าไปในส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อ โดยทำให้ส่วนประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นมีความแข็งพอดีและพร้อมกันนั้นก็พยุงส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเหล่านั้นไว้ด้วย เพื่อที่จะสะดวกต่อการตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ได้ง่าย โดยการนี้จะมีผลกระทบต่อชิ้นเนื้อเยื่อและใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (Microtome Knife) น้อยที่สุดหรือไม่มีเลย ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญ ๆ 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. Completion of Fixation
2. Dehydration
3. Clearing
4. Infiltration (Impregnation with wax)

ซึ่งทั้ง 4 ขั้นตอนนี้จะสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพดีหรือไม่นั้นต้องพิจารณาถึง

1. การเลือกใช้สารอันได้แก่น้ำยาเคมีต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องเหมาะสมเพียงใด

2. สมรรถภาพของเนื้อเยื่อที่จะยอมให้น้ำยาเคมีต่าง ๆ ซึมแทรกเข้าไปได้อย่างทั่วถึงตลอดชิ้นเนื้อเยื่อหรือไม่

3. ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลกระทบต่อขบวนการ (processing) สิ่งหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการซึมแทรกของน้ำยาเคมีต่าง ๆ ในการเตรียมชิ้นเนื้อ (Factors Influencing the rate of Impregnation In Tissue Processing)

ในการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมีนั้นขณะที่เตรียม จะมีสิ่งหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่จะกล่าวต่อไปนี้เข้ามาเกี่ยวข้องและมีผลกระทบ (influencing) ต่อการซึมแทรกของน้ำยาเข้าไปในส่วนต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อ โดยที่เราต้องให้ความสำคัญและพิจารณาด้วย ได้แก่

1. การกวน (Agitation) หมายถึงการหมุนเวียนของน้ำยาเคมีต่าง ๆ โดยจะช่วยให้การแทรกซึม (infiltration/impregnation) ของน้ำยาเข้าไปในชิ้นเนื้อเยื่อได้ดีและตลอดชิ้นเนื้อเยื่อยิ่งขึ้นโดยการทำให้น้ำยาเกิดการหมุนเวียนในอัตราที่เหมาะสมและสม่ำเสมอไม่ช้าหรือเร็วเกินไป แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าแช่ชิ้นเนื้อเยื่อไว้ในน้ำยานิ่ง ๆ โดยไม่มีการหมุนวัยนของน้ำยาแล้ว การแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ ก็จะเกิดขึ้นบริเวณผิว (surface) และด้านข้างของชิ้นเนื้อเยื่อเท่านั้นจำไม่ไปถึงตรงกลางของชิ้นเนื้อเยื่อได้เลย

จากหลักการนี้เอง เราจะพบว่าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อแบบอัตโนมัติ (Automatic Tissue Processor) ที่ใช้ในงานเตรียมชิ้นเนื้อของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ (Histopathological laboratory) ได้ถูกออกแบบในส่วนของที่ใช้เกี่ยวหรือแขวนภาชนะที่ใช้บรรจุตลับชิ้นเนื้อ (เป็น basket ที่ใช้บรรจุ tissue cassette) แล้วแขวนหรือเกี่ยวยึดกับแกนเหล็ก ซึ่งติดอยู่กับฝาครอบเครื่องฯ โดยส่วนที่เป็นแกนนี้จะเคลื่อนที่และทำให้ภาชนะบรรจุตลับชิ้นเนื้อเคลื่อนที่ตามไปด้วย ขณะเดียวกันน้ำยารอบ ๆ ภาชนะที่บรรจุตลับซึ่งบรรจุอยู่โถน้ำยา (beaker) ก็จะเกิดการหมุนเวียนขึ้น ซึ่งช่วยให้การแทรกซึมเป็นไปอย่างดีและตลอดทั่วชิ้นเนื้อเยื่อมากยิ่งขึ้น การเคลื่อนที่ของแกนเหล็กนี้ มี 2 ลักษณะ คือ

1.1 Circular horizontal เป็นการเคลื่อนที่ในแนวระดับหรือแนวนอนโดยการเหวี่ยง (rotate) รอบ ๆ แกนในลักษณะไป – มาเป็นวงกลมหรือครึ่งวงกลม ลักษณะนี้เราจะเห็นว่าภาชนะ (Basket) ที่บรรจุตลับชิ้นเนื้อเยื่อหมุนรอบตัวเองในแนวระดับหรือแนวนอนเป็นรูปวงกลม (หรือครึ่งวงกลม) แล้วน้ำยารอบ ๆ ภาชนะนั้นก็เกิดการหมุนเวียนขึ้น การหมุนเหวี่ยงของภาชนะนี้ประมาณ 10 –12 ครั้งต่อนาที

1.2 Vertical เป็นการเคลื่อนที่ในแนวตั้งหรือแนวดิ่งโดยที่แกนเหล็กจะมีการเคลื่อนที่ขึ้นลง (up – down) ซึ่งฝาครอบเครื่องฯ จะเคลื่อนที่ตามไปด้วยซึ่งแบบแรกฝาครอบเครื่องฯ ไม่มีการเคลื่อนที่ลักษณะนี้เราจะเห็นว่าภาชนะที่บรรจุตลับชิ้นเนื้อเยื่อเคลื่อนที่ขึ้น ลง ซึ่งการเคลื่อนที่นี้ประมาณ 10 – 12 ครั้งต่อนาทีเช่นกันแล้วน้ำยารอบ ๆ ภาชนะนั้น ก็จะมีการซึมแทรกในลักษณะล่างบน , บนล่าง ซึ่งพบว่าการซึมแทรกดีกว่าลักษณะแรก (circular horizontal) โดยเฉพาะชิ้นเนื้อเยื่อที่มีขนาดโต ๆ ประเภทก้อนเนื้อและกล้ามเนื้อ เป็นต้น ส่วนพวกชิ้นเนื้อเยื่อขนาดเล็ก ๆ เช่นพวก biopsy , curettage จะไม่ค่อยแตกต่างกันทั้ง 2 แบบ

การเคลื่อนที่ทั้ง 2 แบบดังกล่าว อัตราการเคลื่อนที่ของแกน ซึ่งทำให้น้ำยาเคลื่อนที่ตามด้วยนั้นต้องอยู่ในอัตราที่เหมาะสมสม่ำเสมอไม่ช้าหรือเร็วเกินไป จึงจะเกิดประโยชน์ช่วยในการแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ เข้าไปในชิ้นเนื้อได้ดีขึ้น ซึ่งสำคัญมากในเรื่องนี้ เมื่อใดก็ตามที่อัตราการเคลื่อนที่ของแกนเปลี่ยนไปหรือเสียไปต้องรีบดำเนินการแก้ไขทันที มิฉะนั้นผลเสียหายต่อชิ้นเนื้อจะเกิดขึ้นได้

2. ความร้อน (Heat) ความร้อนจะเข้ามาช่วยเร่งการแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมชิ้นเนื้อ โดยใช้ความร้อนมาช่วยในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ เท่านั้น ไม่ได้ใช้ทุกขั้นตอน โดยที่ความร้อนนี้ไม่ทำลายหรือทำให้เกิดผลเสียต่อชิ้นเนื้อเยื่อและส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อแต่อย่างใด หรือแม้กระทั่งทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยา (Medium) ที่ใช้ความร้อนช่วยนั้นลดลง

ดังนั้น เราต้องใช้ความร้อนให้เหมาะสมกับขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อตามความจำเป็นจริง ๆ และเลือกใช้ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาในการใช้ให้ถูกต้องด้วย

บางขั้นตอนจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ความร้อนเข้ามาช่วย มิฉะนั้นแล้วการแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ จะเข้าไปในชิ้นเนื้อไม่ดีเท่าที่ควร หรือไม่สามารถแทรกซึมได้เลย

ขั้นตอนที่สำคัญยิ่ง ได้แก่ ขั้นตอน Infiltration จำเป็นต้องใช้ความร้อนช่วย ซึ่งระดับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะกล่าวโดยระเอียดอีกต่อไป

ความร้อนยังสามารถช่วยให้การ fixed ชิ้นเนื้อได้อย่ารวดเร็วขึ้นกว่าอุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิห้อง)โดยใช้ความร้อนประมาณ 60°C เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ซึ่งช่วยเร่งการ fixed ชิ้นเนื้อ ดังกล่าว

ในส่วนของความร้อนที่เข้ามาช่วยในการแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ นี้ ต้องระมัดระวังในเรื่องของระดับอุณหภูมิ อย่าใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป เป็นเวลานานเกินไป เพราะเกิดผลเสียต่อชิ้นเนื้อดังนี้

1. ชิ้นเนื้อเยื่อจะแข็งเกินไป และจะทำให้
2. ชิ้นเนื้อเยื่อเปราะ (brittle) มากขึ้น และเป็นสาเหตุให้

3. ชิ้นเนื้อหดตัวบิดงอ (shrinkage)

4. ส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อเสียไปจากการใช้ความร้อนสูงมากเกินไป (over heat)

5. ทำให้การติดสีของเซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่จะตามมาภายหลังไม่ดีผิดจากปกติไป

3. ความหนืด (Viscosity) ในการเตรียมชิ้นเนื้อความหนืด (viscosity) เข้ามาเกี่ยวข้องอย่างมากในขั้นตอน infiltration (impregnation) ซึ่งตัวกลาง (Medium) ที่เราใช้จะเป็นพวกขี้ผึ้ง (wax) เช่นไขพาราฟิน (Paraffin wax) เพราะโดยสภาพปกติของ wax จะอยู่ในรูปของแข็ง แต่เมื่อนำมาใช้ในขั้นตอน infiltration จะต้องเปลี่ยนสภาพให้เป็นของเหลวซึ่งต้องใช้ความร้อนเข้ามาช่วย โดยต้องคำนึงถึงจุดหลอมเหลว (melting point) ของขี้ผึ้งนั้นๆ เป็นสิ่งสำคัญแล้วเลือกระดับอุณหภูมิและเวลาให้เหมาะสมกัน เพื่อป้องกันผลเสียอันอาจจะเกิดขึ้นกับชิ้นเนื้อเยื่อได้เมื่อเราใช้ความร้อนระดับหนึ่งเข้ามาช่วยในการซึมแทรกของตัวกลาง พวกขี้ผึ้งแล้วก็จะสดความหนืดลงไปได้มาก ซึ่งจะกล่าวต่อไปในขั้นตอน infiltration

4. สุญญากาศ (Vacuum) Vacuum มีส่วนช่วยในการแทรกซึมของน้ำยา โดยใช้ในรูปของเครื่องละลายพาราฟินชนิดมีเครื่องทำสูญญากาศ (Paraffin Dispenser with Vacuum) เพราะเครื่องทำสูญญากาศนี้จะลดแรงต้านในการซึมแทรกของตัวกลางที่เป็นขี้ผึ้งเหลวจะซึมแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อได้เร็วยิ่งขึ้น และตลอดชิ้นเนื้อเยื่อนั้น ซึ่งบางครั้งเราจะใช้ในงานเร่งด่วนและใช้สำหรับชิ้นเนื้อเยื่อบางประเภทที่มีลักษณะเยื่ออัดตัวกันอย่างหนาแน่น

ปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น (4 ปัจจัย) เราจะต้องคำนึงถึงให้มากในการเตรียมชิ้นเนื้อในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ

ขั้นตอนในการเตรียมชิ้นเนื้อ (Step. In Tissue Processing) ขั้นตอนที่สำคัญมีดังนี้คือ

1. Fixation
2. Dehydration
3. Clearing
4. Infiltration

1. การแช่น้ำยาเพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อ (Fixation) วัตถุประสงค์ รายละเอียดของการ fixation ได้กล่าวมาแล้วในบทก่อนหน้านี้ ในส่วนของการเตรียมชิ้นเนื้อนี้ จะพูดถึงความจำเป็นที่ต้องมีขั้นตอนการแช่น้ำยาเพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อเท่านั้น เพื่อต้องการให้ชิ้นเนื้อนั้นถูกผนึกหรือตรึง (fix) ด้วยน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อ (fixative) ดียิ่งขึ้นไปอีก เนื่องจากชิ้น

เนื้อเยื่อที่ส่งตรวจทางพยาธิวิทยานั้น บางครั้งมีขนาดใหญ่ การซึมแทรกของน้ำยาไม่ดีพอและชิ้นเนื้อเยื่อที่ส่งมาจากหน่วยงานอื่นอาจแช่น้ำยาที่ไม่เหมาะสมขณะที่นำส่งมาตรวจที่หน่วยงานดังกล่าวนั้น จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญที่จะต้องเพิ่มขั้นตอนนี้เข้าไปในขบวนการการเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue Processing Schedule) ด้วย

น้ำยา fixative ที่ใช้ : ที่นิยมกันแพร่หลายได้แก่

1. 10 % Formalin
2. 10 % Formalin with sodium acetate

เวลาที่ใช้ : เวลาที่ใช้สำหรับขั้นตอนนี้ประมาณ 4 – 8 ชั่วโมง ช่วงเวลาดังกล่าวนี้ไม่ทำให้ชิ้นเนื้อได้รับผลกระทบจากน้ำยา fixative มากเกินไปและช่วย fixed ชิ้นเนื้อบางชิ้นที่ถูก fixed มาแต่ยังไม่พอเพียงพอ ให้ดียิ่งขึ้นไปอีกด้วย

ข้อดีและข้อเสีย (Adventage and Disadventage) ผลกระทบต่อชิ้นเนื้อเยื่อจากการเลือกใช้น้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อได้กล่าวไว้แล้วในบทก่อนหน้านี้

ข้อควรระวัง (Precaution) ถ้าเราเตรียมชิ้นเนื้อโดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อแบบอัตโนมัติ (Automatic Tissue Processor) ต้องระมัดระวังเรื่องการตัดเจาะแผ่นควบคุมเวลา (Plate Timer) เนื่องจากการเตรียมชิ้นเนื้อแบบที่ 1 ตะกร้า (Basket) กับแบบ 2 ตะกร้า จะตัดเจาะแผ่นควบคุมเวลาไม่เหมือนกัน ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในเรื่องวิธีปฏิบัติงานเตรียมชิ้นเนื้อโดยใช้เครื่องเตรียมอัตโนมัติ

2. ขั้นตอนการทำชิ้นเนื้อเยื่อให้ปราศจากน้ำและของเหลวต่าง ๆ (Dehydration)

วัตถุประสงค์ : ในขั้นตอนนี้เป็นการทำชิ้นเนื้อเยื่อปราศจากน้ำและของเหลวต่างๆ ซึ่งน้ำและของเหลวเหล่านี้มาจาก

1. น้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อ (fixative)
2. น้ำภายในของชิ้นเนื้อเยื่อเอง (tissue Fluid)

หลักการ : ใช้น้ำยาเคมีที่มีคุณสมบัติในการดึงน้ำและของเหลวต่างๆ ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ โดยที่ตัวมันเองเข้าไปแทนที่ในชิ้นเนื้อเยื่อนั้น น้ำยาเคมีที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้เราเรียกว่า Dehydrants และต้องใช้ Dehydrants ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำเรียงลำดับไปหาความเข้มข้นสูง ซึ่งจะเกิดผลกระทบต่อชิ้นเนื้อเยื่อน้อยที่สุดหรือไม่เกิดผลกระทบเลย

เวลา : เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้สำคัญมาก ต้องเหมาะสมกับขนาดและชนิดของชิ้นเนื้อที่แตกต่างกันออกไปโดยใช้เวลาที่เหมาะสมสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำยา

เคมีที่เลือกมาเป็น Dehydrants ปกติจะใช้เวลาประมาณ 3 – 5 ชั่วโมง โดยคำนึงถึงของขนาด , ประเภทของชิ้นเนื้อเยื่อ , การเรียงลำดับความเข้มข้นของ Dehydrants โดยต้องเหมาะสมและสัมพันธ์กันอย่างมาก กล่าวคือถ้าใช้เวลามากเกินไปในการ Dehydration เช่น ใช้ Dehydrants ประเภท Ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 80 %ขึ้นไป มาเรียงลำดับในการ Dehydrationโดยใช้เวลามากเกินที่ชิ้นเนื้อต้องการก็จะทำให้ชิ้นเนื้อมีสภาพแข็งมากเกินไป , เปราะ , แตก , ฉีกหักง่าย และมีผลต่อการตัดให้เป็นชิ้นเนื้อเยื่อบาง ๆ (paraffin section) โดยจะทำให้ตัดยากขึ้น แต่ถ้าใช้เวลาน้อยเกินไป ในขั้นตอน Dehydration ก็จะทำให้การดึงน้ำและของเหลวต่าง ๆ ในชิ้นเนื้อเยื่อไม่ทั่วตลอดชิ้น คือจะเห็นบริเวณตรงกลางชิ้นเนื้อเยื่อเป็นสีขาว และไม่แข็ง หรือเหมือนบริเวณขอบ ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อนั้น หลังจากครบขั้นตอนและเวลาของการเตรียมชิ้นเนื้อแล้ว (Cycle ending)

ดังนั้นการใช้เวลาในขั้นตอน Dehydration นี้ต้องพิจารณาให้ดีว่าเหมาะสมกับประเภท , ขนาด , และ Dehydrants ต่าง ๆ รวมทั้งเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อที่ใช้ในการปฏิบัติงานด้วย

ชนิดของ Dehydrants ต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในขั้นตอน Dehydration มีดังนี้

1. Alcohol ได้แก่
   1.1 Ethyl alcohol (ethanal) (C_2H_5OH)
   1.2 Methyl alcohol (methanol) (CH_3OH)
2. Isopropanal (Isopropyl alcohol) หรือ 2-Propanol ($CH_3CHOH\ CH_3$)
3. Acetone(CH_3COCH_3)

ซึ่งจะเปรียบเทียบให้เป็นข้อดีและข้อเสียและคุณสมบัติต่าง ๆ ของ Dehydrants เหล่านี้ในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติข้อดีและข้อเสีย Dehydrants ที่นิยมใช้ในการเตรียมชิ้นเนื้อของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ

DEHYDRANT	ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADVENTAGES)
1. Ethyl alcohol	1.1 พิษต่อผู้ใช้	1.1 ราคาแพงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง
1.1 Boiling point	1.2 เข้ากันได้ดีกับน้ำในเนื้อเยื่อ	Ethyl alcohol ประเภท absolute
(ethanol)	ทุกรูปแบบสภาวะ	1.2 ทำให้เนื้อเยื่อแข็งเกินและ
78.3 องศาเซลเซียส	1.3 มีอำนาจในการ dehydrate	เปราะแตกหักง่าย ซึ่งกระทบต่อ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

DEHYDRANT	ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADVENTAGES)
1.2 ของเหลวใส ไม่มีสี	ได้รวดเร็วมาก	การตัดเป็น paraffin section ได้
(C_2H_5OH)	1.4 เป็น dehydrant ที่ดีที่สุดตัว	ยากขึ้น
	หนึ่ง	1.3 ละลายสีบางชนิดได้ ซึ่งมี
	1.5 นิยมใช้กันมากในงานเตรียม	ผลกระทบต่อการย้อมสี
	ชิ้นเนื้อและในงานประจำของ	1.5 การหาซื้อยากเพราะเป็นสาร
	ห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ	ควบคุมของหน่วยงานรัฐบาล ซึ่ง
	1.7 ละลายตะกอนของ fixative	ควบคุมการผลิตการใช้และการ
	ในชิ้นเนื้อได้ ได้แก่ 70 % Ethyl	จำหน่ายอย่างเคร่งครัดได้แก่ 95%
	alcohol สามารถละลายตะกอน	Alcohol (ชนิดบริสุทธิ์) เพราะ
	Formalin ในชิ้นเนื้อได้	สามารถนำไปผลิตเป็นสุราได้
		1.6 Ethyl alcohol ที่มีความ
		เข้มข้นต่ำกว่า 70% เราจะไม่ใช้ใน
		ขั้นตอน dehydration นี้ เพราะ
		ไม่มีประสิทธิภาพในการดึงน้ำ
		จากชิ้นเนื้อได้
2. Methyl Alcohol	1. มีคุณสมบัติคล้าย Ethyl	1. มีพิษต่อผู้ใช้ได้
(Methanol)	Alcohol ในการ dehydrate	2. ไม่นิยมใช้ในงานเตรียมชิ้นเนื้อ
2.1 ของเหลว, มีสี	2. ใช้ในการ fixed ประเภท	และงานประจำของห้องปฏิบัติ
(เพราะต้องการให้	Blood film, clot, bone marrow	การจุลพยาธิ
แตกต่างกับ Ethyl	(film) , บน slide เพื่อการย้อมสี	3. เป็นสารไวไฟ , ติดไฟง่าย
alcohol (CH_3OH)	พิเศษบางอย่าง	
	3. ราคาถูก	
3. Isopropanal	3.1 ใช้เป็นตัวแทน (Substitute)	3.1ไม่ละลายสี ดังนั้นไม่นิยมใช้
(Isopropyl alcohol)	Ethyl alcohol โดยเฉพาะ absolute	เป็นตัวลาย (solvent) ในการ
Boiling point 82.3°C	alcohol ได้ดีที่สุดทั้งในการเตรียม	เตรียมสีย้อมชิ้นเนื้อต่าง ๆ
ของเหลวใส , ไม่มีสี	ชิ้นเนื้อและการย้อมสี โดยมี	3.2 ไม่ใช้ในงาน Celloidin
($CH_3CHOH\ CH_3$)	ประสิทธิภาพใกล้เคียงกันมาก	Technique เพราะ nitrocellulose

ตารางที่ 1 (ต่อ)

DEHYDRANT	ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADVENTAGES)
2-Propanol	3.2 ผลเสียที่กระทบต่อชิ้นเนื้อ	ไม่ละลาย
	น้อยกว่า ethyl alcohol (ทำให้ชิ้น	
	เนื้อแข็งและเปราะน้อยกว่า	
	(Ethyl alcohol)	
	3.3 หาซื้อง่ายเพราะไม่ใช่สาร	
	ควบคุมการใช้ของหน่วยงาน	
	รัฐบาล	
	3.4 ราคาถูกกว่า ethyl alcohol	
4. Acetone	4.1 มีอำนาจในการ dehydrate ได้	4.1 ต้องการตัว clearing เฉพาะ
Boiling point 56°C	รวดเร็วเหมือนกับ absolute	ได้แก่ xylene
ของเหลวใส , ไม่มีสี	alcohol	4.2 ระเหยเร็วมากเนื่องจากจุด
(CH_3COCH_3)		เดือดต่ำ

3. ขั้นตอนที่ทำให้ชิ้นเนื้อปราศจาก Dehydrant ต่าง ๆ (Clearing)

วัตถุประสงค์ : เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อปราศจาก dehydrant ต่าง ๆ ซึ่งเป็นขั้นตอนต่อจาก dehydration และเราจะพิจารณาใน 2 ความหมาย ดังนี้

1. Clearing before Embedding ในความหมายนี้เป็นส่วนของขั้นตอนของการเตรียมชิ้นเนื้อที่กำลังกล่าวถึง โดยทำให้ชิ้นเนื้อปราศจาก dehydrant โดยการดึงพวก dehydrant ออกจากชิ้นเนื้อและให้ตัว clearing agent เข้าไปแทนที่พร้อมกันนั้นเอง ตัว clearing agent จะเป็นสื่อนำให้ embedding media คือขี้ผึ้งเหลวซึมแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อได้ง่าย , สะดวกและตลอดชิ้นเนื้อนั้น

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกน้ำยาเคมีที่จะนำมาใช้เป็น clearing agent ให้ดีและเหมาะสม คือสามารถดึง dehydrant ได้ดี และเป็นสื่อนำขี้ผึ้งเหลวซึมแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อได้ดีอีกเช่นกัน

2. Clearing in mounting คือการทำให้ section ปราศจาก dehydrant ในขั้นตอนต่อจาก dehydration ในเรื่องของการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ (staining) และข้อสำคัญ clearing agent ที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนนี้ต้องละลายเข้ากันได้ดีกับ mounting medium เพราะถ้า mounting

medium จะช่วยยึดจับ cover glass ให้ปิดทับบน section อย่างสนิทแน่นไม่หลุดขณะที่ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และเก็บเป็นสไลด์ถาวรได้

หลักการ : ในขั้นตอนนี้จะเริ่มต่อจาก dehydration โดยการใช้น้ำยาเคมีที่มีอำนาจในการดึงและเข้าไปแทนที่สาร dehydrant ในชิ้นเนื้อ ซึ่งเรียกว่า clearing agent พร้อมกันนี้ตัวมันเองจะเป็นสื่อนำให้ enbedding medium แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างดีตลอดทั่วชิ้นเนื้อเยื่อ

เวลา : ต้องพิจารณาถึงขนาดและประเภทของชิ้นเนื้อและ dehydrant ให้เหมาะสมคือสามารถดึง dehydrant ได้หมดทั่วชิ้นเนื้อและไม่ทำให้เกิดผลเสียเกิดขึ้นหรือเกิดผลเสียขึ้นเพียงเล็กน้อยต่อชิ้นเนื้อขณะ clearing นั้นเพราะชิ้นเนื้อเมื่อผ่านการ dehydration มาแล้ว จะมีสภาพแข็งพอสมควรและเมื่อนำมาผ่านขั้นตอน clearing ที่มีclearing agent เป็น xylene (xylol) ก็จะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นแข็งขึ้นไปอีก

ในการตรงกันข้ามถ้าเราใช้เวลาน้อยเกินไป การ clearing จะได้ผลไม่ดีเท่าที่ควรคืออาจจะมีบางส่วนของชิ้นเนื้อโดยเฉพาะบริเวณตรงกลาง จะเห็นเป็นสีขาวซีด เนื่องจาก clearing agent ยังเข้าไม่ถึงส่วนที่ผ่านการ clearing มาดีก็จะปรากฏเป็นสีเหลืองใส (ส่องกับไฟดู) จากกรณีใช้ xylene เป็น clearing agent : ปกติจะใช้เวลาประมาณ 1 ½ ถึง 2 ชั่วโมงสำหรับขั้นตอนนี้โดยพิจารณาจากลักษณะดังกล่าวข้างต้นด้วย น้ำยาเคมีที่นิยมใช้เป็น clearing agent สำหรับขั้นตอน clearing ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

1. Xylene หรือเรียกอีกอย่างว่า xylol
2. Chlorofrom

โดยทั้งนี้ต้องคำนึงถึง

1. ความเร็วในการดึงพวก dehydrant , Clearing agent ที่ดีต้องมีอำนาจในการนี้อย่างรวดเร็ว
2. เป็นสื่อนำ embedding media (liquid wax) ให้แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้ดีตลอดชิ้นเนื้อ
3. Clearing agent ต้องไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งเกินต้องการ
4. พิษจากการ clearing agent นั้น ๆ
5. การระเหยเพราะอาจเกิดสภาพน้ำยาไม่ท่วมชิ้นเนื้อขณะปฏิบัติงานได้ (ในกรณีใช้เครื่อง Automate)

6. จุดเดือด (Boiling point) เนื่องจาก clearing agent ที่มีจุดเดือดต่ำจะดึงพวก dehydrant เช่น ethyl alcohol ได้ดีกว่า clearing agent ที่มีจุดเดือดสูง (จุดเดือดต่ำจะ clearing ได้ดีกว่า แต่จะระเหยเร็วกว่าจุดเดือดสูง)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติข้อดีและข้อเสียของ Clearing agent

DEHYDRANT	ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADVENTAGE)
1. Xylene (Xylol)	1.1 การ clear สาร dehydrant	1.1 ไอระเหยของ Xylene มีพิษ
- Refractive index 1.5	เป็นไปอย่างรวดเร็วหลังการ	ต่อระบบทางเดินหายใจ
- Boiling point 138	clearing แล้วจะสังเกตเห็นได้ง่าย	1.2 ระคายเคือง ปวดแสบ ปวด
องศาเซลเซียส	1.2 สามารถใช้เป็นclearing agent	ร้อนเมื่อโดนผิวหนังขณะปฏิบัติ
- ของเหลวใส ไม่มีสี	ได้ทั้งการเตรียมชิ้นเนื้อและการ	งาน
	ย้อมสี (Xylol ละลายเข้ากันได้ดี	1.3 ถ้าใช้เวลาไม่เหมาะสมมาก
	กับ mounting medium ประเภท	เกินต้องการ จะทำให้ชิ้นเนื้อแข็ง
	Synthetic resin)	มากขึ้น ซึ่งจะทำให้การตัดเป็นชิ้น
	1.3 เป็นตัว clearing agent ที่	เนื้อเยื่อบาง ๆ (paraffin section)
	เหมาะสมที่สุดตัวหนึ่งและนิยม	ได้ยากขึ้น
	ใช้กันมาก	
	1.4 ระเหยช้ากว่า chloroform	
	1.5 เป็นสื่อนำ embedding	
	medium ได้ดี	
	1.6 ไม่ละลายสีพวก aniline dye	
	และสีอื่นๆ ส่วนใหญ่ยกเว้นสีของ	
	Oil Red O และวิธีย้อมที่ไม่	
	ต้องการผ่านการ clearing	
	1.7 ชิ้นเนื้อเล็ก จะ clear ได้	
	ภายใน ½ - 1 ชั่วโมง และสำหรับ	
	ชิ้นใหญ่หนาไม่เกิน 5 mm. จะ	
	clear ได้ภายใน 2 – 4 ชั่วโมง	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

DEHYDRANT	ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADVENTAGE)
2. Chlorofrom	2.1 แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้	2.1 เป็นพิษต่อผู้ใช้ได้
- Refractive index	เร็วกว่า Xylene	2.2 ต้องปฏิบัติงานในห้องที่มีการ
- Boiling point 61.5	2.2 ไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งเกินไป	ถ่ายเทอากาศได้ดี
องศาเซลเซียส	ถึงแม้จะใช้เวลาในการ clearing	2.3 ระเหยเร็วมากกว่า Xylene
องศาเซลเซียส	นาน (สามารถแช่ชิ้นเนื้อทิ้งไว้	2.4 ภายหลังการ clearing จะ
	ค้างคืนได้)	สังเกตลักษณะของชิ้นเนื้อได้ยาก
	2.3 นิยมใช้กับวิธี manual	กว่าใช้ Xylene
	method ไม่ใช้กับ Automate	2.5 ต้องใช้เวลาการ Clearing
	เพราะระเหยง่ายและรวดเร็วมาก	มากกว่า Xylene
	2.4 ไม่เป็นสารไวไฟติดไฟง่าย	2.6 ถ้าจำเป็นต้องใช้ chloroform
	เหมือนกับ Xylene	ต้องหาภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด
	2.5 ไม่ทำให้ชิ้นเนื้อเปราะ	เพราะระเหยง่ายมาก ซึ่งไม่เหมาะ
	แตกง่าย เหมือน Xylene	กับการใช้กับเครื่อง Automate
		ควรใช้วิธี Manual Method เท่านั้น

ยังมี clearing agent ที่สำหรับใช้ขั้นตอน clearing ของการเตรียมชิ้นเนื้ออีกเช่น CNP 30 and inhibisol ซึ่งมีพิษน้อยกว่า Xylene และ chloroform แต่มีราคาแพงมากไม่เหมาะสำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติงานจุลพยาธิ Food oil derivate , cedar wood oil ซึ่งมีราคาแพงมากไม่เหมาะสำหรับงานประจำเช่นกัน จึงไม่กล่าวในรายละเอียด ปัจจุบันได้มี clearing agent ที่มีคุณสมบัติคล้าย Xylene แต่เป็น Non toxic agent เข้ามาจำหน่ายแต่มีราคาแพงเช่นกันและนำมาใช้งานได้อีก (Recycling processing fluids) แต่ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะสำหรับ Recycling processing fluids ซึ่งยุ่งยากเสียค่าใช้จ่ายมากไม่เหมาะสำหรับงานประจำ ถ้าจำเป็นต้องใช้ควรใช้สำหรับงานวิจัย (Research) ที่สำคัญ ๆ

4. ขั้นตอนการทำให้ชิ้นเนื้อแข็ง (Infiltration or Impregnation with wax)

วัตถุประสงค์ : ในขั้นตอนนี้เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อภายหลังการ clearing แล้วมีความแข็งพอที่จะนำไปตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อบาง ๆ (paraffin section) ขนาด 3 – 5 ไมครอน ได้ง่ายและสะดวก

หลักการ : มีหลักว่าจะทำให้ embedding medium ซึ่งต้องอยู่ในรูป liquid wax แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อพร้อมกันนั้นพยุง (support) โครงสร้างต่างของชิ้นเนื้อที่มีความแข็งแรงคงไว้ โดยมี clearing agent เป็นสื่อนำและมีสิ่งอื่น ๆ เข้าช่วยด้วย เช่น ความร้อน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะมีการกระทบต่อชิ้นเนื้อโดยตรง

เวลา : เวลาที่จะใช้ในขั้นตอนนี้ ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ เพราะถ้าใช้เวลามากเกินไป ก็จะทำให้ชิ้นเนื้อแข็งเกินต้องการ กระทบต่อการตัดเป็นชิ้นเนื้อบาง ๆ คือทำให้ตัดยากมาก ตรงกันข้ามถ้าใช้เวลาน้อยเกินไปก็จะทำให้ขี้ผึ้งเหลวแทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อไม่ทั่วตลอดชิ้นเนื้อ โดยเฉพาะบริเวณตรงกลาง และยังต้องพิจารณาถึงจำนวนโถขี้ผึ้งเหลว (liquid wax bath) ด้วย โดยมีสิ่งต่อไปนี้เข้ามาช่วยพิจารณาได้แก่

1. ขนาดและประเภทของชิ้นเนื้อเยื่อ (The size and Type of the tissue)

ขนาดของชิ้นเนื้อ : จากที่ได้กล่าวมาจะพบว่าการแทรกซึมของน้ำยาต่อชิ้นเนื้อจะได้ดีทั่วตลอดชิ้นเนื้อหรือไม่นั้นขนาดและความหนาของชิ้นเนื้อ จะมีผลต่อการแทรกซึมของน้ำยานั้น ๆ มาก และจะบอกเราว่าควรใช้เวลาเท่าใดจึงจะพอเพียง เช่น ชิ้นเนื้อใหญ่และหนาย่อมต้องการเวลามากกว่าชิ้นเนื้อเล็ก ๆ เป็นต้น

ประเภทของชิ้นเนื้อ : ชิ้นเนื้อประเภทกล้ามเนื้อ , เนื้อเยื่อ fibrous (มดลูก , ผิวหนัง) ย่อมต้องการเวลามากกว่าเนื้อเยื่อตับหรือไต แต่ปัญหาจะเกิดขึ้นกับชิ้นเนื้อที่มีการเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น เช่น ชิ้นเนื้อสมอง เพราะต้องการเวลามากและมักจะเกิดผลกระทบต่อชิ้นเนื้อ ทำให้ชิ้นเนื้อเปราะ , ร่วน แตกหักง่าย สำหรับชิ้นเนื้อประเภทนี้ควรใช้เครื่อง Vacuum paraffin dispenser ช่วยในการแทรกซึมของขี้ผึ้งเหลว เพราะสามารถลดเวลาได้ครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ปกติ และไม่เกิดผลเสียต่อชิ้นเนื้อมากเหมือนกับการใช้เวลาตามปกติ

2. จากการใช้ Clearing agent (The clearing agent employed) เนื่องจากการใช้ clearing agent เป็นจำนวนหลาย ๆ โถ (basket) ในการ clearing ชิ้นเนื้อขนาดใหญ่และหนาย่อมต้องการขี้ผึ้งเหลวหลาย ๆ โถเช่นกัน เพราะต้องดึงเอาพวก clearing agent จำนวนมาก ๆ ออก และขี้ผึ้งเหลวก็เข้าไปแทนที่ ซึ่งต้องใช้โถมากไปด้วย ซึ่งส่งผลต่อเวลาในการใช้มากไปด้วยเช่นกัน (ดูตารางข้างล่าง)

ตารางที่ 3 การใช้ clearing agent และจำนวนของโถของขี้ผึ้งเหลวที่เหมาะสมกับงานประจำ

CLEARING AGENT	LIQUID WAX BATH (AMOUNT)
Xylene , chloroform , CNP 30 , food oil	ใช้ 2 โถสำหรับชิ้นเนื้อขนาดเล็กขนาดใหญ่
Cedar wood oil	อย่างน้อย 3 โถ สำหรับชิ้นเนื้อขนาดเล็ก
	มากกว่า 3 โถ สำหรับชิ้นเนื้อขนาดใหญ่

3. การใช้เครื่องสูญญากาศช่วยในการ Infiltration (The Use of Vacuum)

เครื่องสูญญากาศที่ใช้เรียกว่า Vacuum Paraffin Dispenser จะช่วยในการแทรกซึมของขี้ผึ้งเหลวเข้าไปในชิ้นเนื้อโดยใช้เวลาเพียงครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ประจำ เพราะส่วนที่เป็นสูญญากาศจะช่วยเร่งการแทรกซึมให้เร็วทั่วตลอดชิ้นเนื้อเยื่อมากยิ่งขึ้น ปกติเราจะใช้เครื่องสูญญากาศระดับความดันปรอท ประมาณ 20 – 25 mm.Hg. เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไป Embedding และเครื่องสูญญากาศนี้เหมาะสำหรับชิ้นเนื้อที่มีการเรียงตัวของเซลล์อย่างหนาแน่น เช่น ชิ้นเนื้อสมองเป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะช่วยพิจารณาว่าควรใช้เวลาอย่างไรจึงจะเหมาะสมกับขนาดและประเภทของชิ้นเนื้อนั้น ๆ ซึ่ง โดยปกติแล้วในขั้นตอน Infiltration นี้ จะใช้เวลา 2 – 3 ชั่วโมง สำหรับงานประจำ

ความร้อน : ในขั้นตอน Infiltration จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ความร้อนช่วยในการแทรกซึมของขี้ผึ้งซึ่งปกติจะอยู่ในรูปแบบของ " ของแข็ง" เมื่อเวลานำมาใช้งานในการ Infiltration ต้องเปลี่ยนสภาพมาเป็น "ของเหลว" การแทรกซึมของขี้ผึ้งจึงจะเกิดขึ้นระดับของอุณหภูมิ (Temperature) สำคัญมากเพราะถ้า :

1. อุณหภูมิสูงมากเกินไป ก็จะเกิดผลเสียต่อชิ้นเนื้อ คือ จะทำให้ชิ้นเนื้อแข็งมากเกินไป , บิด , งอ เปราะแตกหักง่ายและโครงสร้างชิ้นเนื้อ (Tissue struucture) เสียไป และยังกระทบต่อการตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อบาง ๆ (thin section) โดยทำให้การตัด paraffin section บาง ๆ ทำได้ยากขึ้น

2. อุณหภูมิต่ำเกินไป คืออุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของขี้ผึ้งที่เราใช้ ก็จะทำให้ขี้ผึ้งไม่เปลี่ยนโมเลกุล (Molecule) ให้เล็กพอที่จะแทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้นั่นเอง ดังนั้น จึงต้องใช้ระดับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับขนาดและประเภทของชิ้นเนื้อเยื่อนั้น ปกติเราจะใช้ความร้อนระดับอุณหภูมิที่สูงกว่าจุดหลอมเหลว (melting point) ของขี้ผึ้งที่ใช้ประมาณ 2 – 5°C (ประมาณ

60 – 63°C ในโถขี้ผึ้งสำหรับงานประจำ ซึ่งระดับอุณหภูมินี้จะไม่ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อเกิดผลเสียแต่อย่างใด) Wax medium ที่ใช้ในการ Infiltration เราสามารถเลือกใช้ได้ดังนี้

1. Paraffin wax

1.1 Soft paraffin wax , จุดหลอมเหลวประมาณ 40 – 50°C

1.2 Hard paraffin wax , จุดหลอมเหลวประมาณ 56 – 60°C

ในทางทฤษฎีแล้ว Soft paraffin จะแทรกซึมได้ดีกว่า Hard paraffin เพราะมีจะหลอมเหลวต่ำกว่าแต่ในการตัดออกเป็นชิ้นเนื้อเยื่อบาง ๆ (paraffin section) จะทำได้ยากลำบาก เพราะต้องกระทำให้ห้องที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ (เย็นจัด) เพื่อไม่ใช้ wax อ่อนตัวได้ง่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ประเภท Hard paraffin wax แทน ถึงแม้จะต้องใช้ระดับอุณหภูมิสูงก็ตาม ก็ควบคุมโดยการกำหนดให้เหมาะสมในขั้นตอนนี้ส่วนใหญ่ในงานประจำเราใช้ Hard paraffin ที่มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 56 – 58°C

2. Paraplast

2.1 Paraplast ธรรมดา (Paraplast without DMSO.)

2.2 Paraplast plus (Paraplast with DMSO.)

DMSO. = Dimethyl Sulphoxide ทั้ง 2 ชนิด มีจุดหลอมเหลวประมาณ 56°Cแต่ต่างกันตรงที่ว่า Paraplast plus มีสาร DMSO ช่วยให้ wax นี้มีความเหนียวมากยิ่งขึ้นไม่ทำให้ใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (microtome kinfe) เสียหายหรือเสียความคมเร็ว ประการสำคัญ Paraplast plus จะช่วยให้การตัดเนื้อเยื่อให้ได้บาง ๆ (Thin section) ประมาณ 1 – 2 ไมครอน (Micron) ง่ายขึ้นกว่า Paraplast ธรรมดา

3. Paramatt

3.1 Paramatt ธรรมดา

3.2 Paramatt extra

ทั้ง 2 ชนิดมีจุดหลอมเหลวประมาณ 56°C เหมือนกัน และมีคุณสมบัติคล้ายกับ Paraplast กล่าวคือ Paramatt extra จะมีส่วนผสมของสารที่ช่วยให้การตัด thin section กระทำได้ง่ายสะดวกเหมือน Paraplast plus ทั้ง Paraplast และ Paraplast plus จะต่างกันก็ตรงที่ราคาซึ่งต่างกันออกไป

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียและคุณสมบัติของ wax ที่นำมาใช้ในงานประจำ

EMBEDDING MEDIUM	ข้อดี (ADENTAGES)	ข้อดี (ADENTAGES)
1. Paramatt , Hard	1.1 ราคาถูกกว่าชนิดอื่น ๆ	1. ต้องเลือก (หมายเลข)
- Melting point 56 – 60°C	1.2 มีความเหนียวพอที่จะตัดเป็น	number ของ paraffin wax ให้ดี
- สภาพ wax หลังละลาย	ชิ้นเนื้อเยื่อบางมาก ๆ (Thin	เพราะมีหลายหมายเลข ซึ่ง
แล้วจะใส ไม่ขุ่น หรือ	section) และทำ serial section	ยุ่งยากลำบากต่อการตรวจสอบ
เปลี่ยนสี	ได้ง่าย	1.2 Thin section จะฉีกขาดง่าย
	1.3 มีผลกระต่อใบมีดตัดชิ้นเนื้อ	กว่า Paraplast ทั้ง 2 ชนิด
	น้อยไม่ทำให้ใบมีดทื่อเร็วหรือ	1.3 เกิดการ over heat ได้ง่าย
	มีรอยเกิดขึ้นบนคมมีด	เพราะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการ
	1.4 สามารถนำมาใช้ใหม่ได้อีก	ละลายขณะใช้งาน
	และใช้ได้กับ embedding molds	
	ทุกแบบ	
2. Paraplast	2.1 มีความเหนียวและง่ายต่อการ	2.1 ราคาแพงกว่า paraffin wax
- Melting point 56 – 60°C	ตัดเป็นชิ้นเนื้อบางมาก ๆ (Thin	มาก ประมาณ 4 – 5 เท่า
- สภาพ wax หลังละลาย	section) มากกว่า paraffin wax	(Paraplast ทั้ง 2 ชนิดราคาต่างกัน
แล้วจะใส ไม่ขุ่น หรือ	เนื่องจากมี DMSO ช่วย	คือ paraplast plus จะแพงกว่า
เปลี่ยนสี	2.2 การทำ serial section จะทำ	paraplast ธรรมดาประมาณ 10 –
	ได้ง่ายกว่า paraffin	20 %)
	2.3 ผลกระทบต่อใบมีดตัดชิ้น	2.2 ควรเลือกใช้ embedding
	เนื้อน้อยกว่า paraffin หรือแทบ	molds ให้อยู่ในลักษณะ
	จะไม่มีเลย	สิ้นเปลือง wax น้อยที่สุด
	2.4 ไม่เกิดกรณี Over heat ต่อ	เนื่องจากมีราคาแพง
	ชิ้นเนื้อเพราะมีจุดหลอมเหลวต่ำ	
	2.5 Thin section , serial section,	
	ไม่ฉีกขาดง่ายเหมือน paraffin	
	wax	
3. Paramatt	เหมือนกับ Paraplast	

ทั้ง 3 ชนิดเป็น Embedding medium ที่นิยมใช้ในงานประจำห้องปฏิบัติการ ยังมี wax อื่น ๆ อีกมาก แต่ไม่ได้กล่าวถึง เพราะไม่ค่อยมีจำหน่ายในประเทศไทย เนื่องจากราคาแพงและบางประเภทไม่เหมาะสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการของประเทศไทย ซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่าประเทศยุโรปและอเมริกา

วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ (The Procedure of Tissue Processing) วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ สามารถกระทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. เตรียมโดยไม่ใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Manual Menthod)
2. เตรียมโดยใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automate Menthod)

1. เตรียมโดยไม่ใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Manual Menthod) บางครั้งเราจำเป็นต้องเตรียมชิ้นเนื้อด้วยวิธีนี้เพราะ

1.1 ความแตกต่างของชิ้นเนื้อแต่ละประเภท ไม่สามารถนำไปทำพร้อมกับวิธี Automate ได้

1.2 ส่วนของชิ้นเนื้อที่จุลวิทยา (Histology) เฉพาะบางโรค ทำให้ต้องแยกจากการเตรียมตามปกติ

1.3 ต้องการความรวดเร็วในการทำสไลด์ เพื่อการวินิจฉัยโรคโดยไม่ให้เกิดผลเสียกระทบต่อชิ้นเนื้อน้อยที่สุด

1.4 บางครั้งเครื่องมือเสียชำรุดก็จำเป็นต้องใช้วิธีนี้

วิธีการ (Procedure) : สำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อแบบ Manual Menthod นี้มีวิธี การปฏิบัติได้ดังนี้

1. วิธีอย่างง่าย (Simple Procedure)
2. วิธีการใช้เครื่องกวนและเตาให้ความร้อน (Magnetic stirror with hot plate Procedure)

1. วิธีอย่างง่าย (Simple Procedure)

หลักการและเทคนิค วิธีนี้เราจะใช้ผ้าก๊อซบาง ๆ ห่อตลับใส่ชิ้นเนื้อ (tissue cassette / tissue container) ไว้แล้วแช่ในน้ำยาโดยปลายของผ้าห่อตลับนี้ผูกเป็นปม ผูกกับแท่งแก้ว (glass rod) แล้ววางไว้บนโถน้ำยาการแทรกซึมของน้ำยาเข้าไปในชิ้นเนื้อ จะเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งเราจะช่วยเร่งได้โดยการยกห่อผ้าก๊อซ จุ่มขึ้น – ลง (up – down) ในโถน้ำยานั้น เป็นช่วงเวลา เช่น ทุก 10 นาที ก็จุ่มขึ้น – ลงในน้ำยาสัก 3 – 5 ครั้ง ในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลา 1 – 3 วัน จึงจะครบทุกขั้นตอน

ตารางที่ 5 การปฏิบัติ (Processing Schedule)

ขั้นตอน	น้ำยาที่ใช้	เวลา	เทคนิคการตรวจสอบชิ้นเนื้อ
1. Fixation	10 % Formalin (10 % Formalin with sodium acetate or Neutral buffer formalin)	ค้างคืน (over night)	สภาพชิ้นเนื้อภายหลังการ fixed ซีดขาวจางลงกว่าก่อน fixed และชิ้นเนื้อจะมีสภาพค่อนข้างแข็งขึ้นสภาพชิ้นเนื้อหลังการ dehydration จะมีสีขาวซีดมากกว่าตอนผ่านการและชิ้นเนื้อเริ่มแข็งขึ้นไม่หยุ่นกดชิ้นเนื้อดูจะไม่ปรากฏน้ำหลงเหลืออยู่สภาพชิ้นเนื้อภายหลังการ Clearing จะเหลือง ใส แสงไฟส่องผ่านได้ เมื่อส่องดูกับแสงไฟ จะไม่มีบริเวณร่องรอยขาวซีดหลงเหลืออยู่
2. Dehydration	เริ่มจาก low concentrate ถ้าใช้ Ethyl alcohol ต้องไม่ต่ำกว่า 70% แล้วไป medium concentrate แล้วสุดท้ายด้วย high concentrate dehydrants เช่น Alcohol 80% , Alcohol 95% , Absolute alcohol (Acetone , หรือ Isopropyl alcohol แทน ได้ Xylene , Chlorofrom (ถ้าใช้ Chlorofrom ต้องตรวจระดับน้ำยา ต้องท่วมตลับชิ้นเนื้อในห่อผ้าก๊อซเสมอเนื่องจากระเหยเร็วมาก)	low และ medium dehydrants ใช้เวลา 2 เท่า ของวิธี Automate แต่ high concentrate dehydrants แช่ค้างคืน (กรณีแช่ไว้ในน้ำยาปกติไม่ได้จุ่มน้ำยาขึ้น – ลง ในแต่ละขั้นตอน) ใช้เวลา 2 เท่า ของการใช้เครื่องเตรียมอัตโนมัติ	
3. Clearing	Xylene , Chloroform	ใช้เวลา 2 เท่า	สภาพชิ้นเนื้อจะเหลือง

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ขั้นตอน	น้ำยาที่ใช้	เวลา	เทคนิคการตรวจสอบชิ้นเนื้อ
4. Infiltration	Wax medium เช่น จะใช้ในรูป โดยใช้เตาความร้อนช่วย แต่ต้องระวังเรื่องอุณหภูมิให้ดี เพราะจะทำให้ชิ้นเนื้อเสียหายได้ - เตาความร้อนควรใช้แบบควบคุมอุณหภูมิได้ จะช่วยลดผลเสียของความร้อนสูงเกินไปที่กระทบต่อชิ้นเนื้อลงได้	1½ เท่าการใช้เครื่องเตรียมอัตโนมัติ	สภาพชิ้นเนื้อภายหลังการ infiltration แล้ว จะมีสีเหลือง , แข็ง ไม่ใสนัก เพราะมี wax แทรกซึมเข้าไปแทนภายหลัง Clearing แล้ว และจับยึดโครงสร้างภายในชิ้นเนื้อไว้ในสภาพ wax แข็งตัว

ข้อควรคำนึง จาการเตรียมชิ้นเนื้อโดยวิธีนี้ คือ

1. ใช้เวลามาก หรืออาจต้องใช้เวลา 1 – 3 วัน

2. การตรวจสอบชิ้นเนื้อในแต่ละขั้นตอน ผู้ปฏิบัติงานตรวจสอบนั้นต้องมีประสบการณ์และมีความชำนาญสูง มิฉะนั้น จะทำให้ชิ้นเนื้อเสียหาย โยงไปสู่การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิแพทย์ ทำให้การวินิจฉัยยากลำบากขึ้น

3. ระดับอุณหภูมิของความร้อนในขั้นตอน infiltration ที่ใช้ในการละลายสารนั้น จะเกิดการ over heat ได้ง่าย

4. เมื่อทำครบทุกขั้นตอนแล้ว พบว่า สภาพชิ้นเนื้อไม่ค่อยดีนักสำหรับการตัดเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ (Paraffin section) เหมือนกับการใช้เครื่องอัตโนมัติ เพราะการซึมแทรกของน้ำยา , ตัวกลางในแต่ละขั้นตอนไม่ดี ไม่สม่ำเสมอตลอดชิ้นเนื้อ

2. วิธีใช้เครื่องกวนและเตาให้ความร้อน (Magnetic stirror with Hot plate)

หลักการและเทคนิควิธีนี้จะเตรียมชิ้นเนื้อได้ง่ายและสะดวกขึ้น และผลเสียที่เกิดขึ้นกับชิ้นเนื้อเยื่อจะน้อยกว่าวิธีแรก การแทรกซึมของน้ำยาต่างๆ ในแต่ละขั้นตอนจะดีกว่า เพราะมีเครื่องกวน (Magnetic stirror) ช่วยอีกทั้งขั้นตอน infiltration สามารถใช้เตาให้

ความร้อน (hot plate) ซึ่งอยู่ในเครื่องเดียวกันช่วยละลาย wax medium ให้ได้ตามต้องการ และสามารถควบคุมอุณหภูมิโดยปรับที่ตัวเครื่องให้อยู่ในระดับเหมาะสม ป้องกันการเกิด over heat ต่อชิ้นเนื้อได้ ต่อการตรวจเช็คสภาพชิ้นเนื้อต้องกระทำทุกขั้นตอน

วิธีนี้เราจะนำตลับบรรจุชิ้นเนื้อไปเรียงในห่อผ้าก๊อส หรือตะกร้าสำหรับบรรจุตลับชิ้นเนื้อเฉพาะ (tissue basket) ก็ได้ แล้วนำไปแช่ในโถน้ำยา ซึ่งวางอยู่บนเครื่องกวนและเตาให้ความร้อน (Magnetic stirror with Hot plate) แล้วเปิดเครื่องกวนน้ำยา (stirror) ให้หมุนเวียนน้ำยา ไม่ช้า – ไม่เร็วเกินไป ตามขั้นตอนดังนี้ คือ

1. Fixation ขั้นตอนนี้เราควรแช่ตลับชิ้นเนื้อไว้ค้างคืนในน้ำยา firative กรณีเร่งด่วนต้องใช้ความร้อนระดับอุณหภูมิประมาณ 60°C ช่วยเร่งการ fixed ชิ้นเนื้อก็ได้ โดยใช้ควบคู่กับเครื่องกวนน้ำยา (magnetic stirror) ที่อยู่ในเครื่องเดียวกันพร้อมกันไปด้วย ใช้ 1 โถน้ำยาเวลาประมาณ 20 นาที ที่ 60 °C หรือ 30 นาที สำหรับปกติที่ใช้ความร้อนช่วย

2. Dehydration สำหรับ Dehydrants ที่ใช้ควรเป็นน้ำยาใหม่และมีความเข้มข้นสูง เนื่องจากเวลาน้อยกว่าปกติขั้นตอนนี้เราใช้เครื่องกวนอย่างเดียว ไม่ต้องใช้เตาให้ความร้อนใช้ 3 โถน้ำยา เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง (60 นาที)

3. Clearing สำหรับ Clearing agent ใช้ตามปกติ และใช้เครื่องกวนเพียงอย่างเดียวเช่นเดียวกับ Dehydration และ Clearing agent ควรเป็นน้ำยาใหม่เช่นกัน ใช้ 2 โถน้ำยาเวลาประมาณ 40 นาที

4. Infiltration ขั้นตอนนี้สำคัญและยุ่งยากเล็กน้อย กล่าวคือ ต้องใช้เตาให้ความร้อนควบคู่กับเครื่องกวนที่อยู่ภายในเครื่องเดียวกันพร้อมกัน โดยปรับอุณหภูมิที่ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (Temparature adjustment control) ที่ตัวเครื่องให้ความร้อนสูงกว่าการใช้เครื่องเตรียมอัตโนมัติ 2 – 3°C (ประมาณ 65°C) เพราะความร้อนกระจายออกจากโถได้ง่ายกว่า

แต่ถ้าเรามี wax bath เฉพาะสำหรับใช้งานในขั้นตอนนี้ ก็จะทำให้สะดวกขึ้น การปฏิบัติอาจจะกระทำโดยการแช่น้ำยาแล้วยกจุ่มขึ้น – ลง, 3 – 5 ครั้ง ทุก 10 นาทีก็ได้ ควรใช้ wax bath ช่วงนี้ 2 โถ ใช้เวลาโถละประมาณ 3 นาที และสุดท้ายของขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องสูญญากาศช่วยเร่งการแทรกซึมของ liquid wax medium โดยใช้ความดันปรอทประมาณ 20 – 25 มม. ปรอท เวลาประมาณ 30 นาที การตรวจสภาพชิ้นเนื้อต้องกระทำภายหลังสิ้นสุดของแต่ละขั้นตอนทุกขั้นตอน ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบได้กล่าวไว้แล้วในวิธีแรก

ตารางที่ 6 การเตรียมชิ้นเนื้อ

ขั้นตอน	น้ำยา	เวลา
1. Fixation	1.1 10 % Formalin	แช่น้ำยาไว้ค้างคืนก่อนนำมา
	10 % Formalin with sodium	เตรียม ประมาณ 20 – 30 นาที
	acetate Neutral buffer formalin	ตามขนาดของชิ้นเนื้อ
	1.2 น้ำยาใน 1.1 แต่ใช้ความร้อน	ประมาณ 20 นาที
	60°C ช่วยเร่งการ fixed	ประมาณ 20 นาที
		ประมาณ 20 นาที
2. Dehydration	2.1 Fresh , Absolute alcohol *	ประมาณ 20 นาที
	2.2 Fresh , Absolute alcohol *	ประมาณ 20 นาที
	2.3 Fresh , Absolute alcohol *	
	(*อาจใช้ acetone แทน absolute	
	alcohol ได้ ซึ่งราคาถูกกว่าและ	
	ได้ผลดีเช่นกัน)	
3. Clearing	3.1 Fresh , Xylene	
	3.2 Fresh , Xylene	
4. Infiltration	4.1 Liquid wax (63 –65°C)	ประมาณ 30 นาที
	4.2 Liquid wax (63 –65°C)	ประมาณ 30 นาที
	(Fresh)	
	4.3 Liquid wax (63 –65°C)	ประมาณ 30 นาที
	(Fresh) with vacuum , 20 – 25	
	mm.Hg.	

รวมเวลาที่ใช้ประมาณ 3 ½ ชั่วโมง ซึ่งสามารถทำเสร็จภายในวันเดียวได้

ตารางที่ 7 ข้อดีและข้อเสียสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อตามวิธีนี้

ข้อดี (ADVENTAGES)	ข้อเสีย (DISADENTAGES)
1. สามารถเตรียมชิ้นเนื้อได้ในเวลาอันสั้น (ประมาณ 3 ½ ชั่วโมง)	1. ผลเสียที่เกิดกับชิ้นเนื้อ เช่น ชิ้นเนื้อหดตัวจากความร้อนย่อมเกิดขึ้นได้ง่าย
2. ได้ผลการวินิจฉัยเร็งขึ้น	2. ผู้ปฏิบัติงานตรวจสอบนั้นต้องมีประสบการณ์และมีความชำนาญสูง ในการใช้เทคนิคตรวจสภาพชิ้นเนื้อ
3. เหมาะสำหรับงานที่ต้องการความเร่งด่วน	3.ถ้ามีการผิดพลาดด้วยสาเหตุใดก็ตาม ชิ้นเนื้อจะเสียสภาพทันที
4. เหมาะสำหรับชิ้นเนื้อบางอย่างที่ไม่สามารถเตรียมตามวิธีปกติด้วยเครื่อง	4. Permanent slide ที่ได้รับจากการเตรียมชิ้นเนื้อโดยวิธีนี้ถ้าผู้ปฏิบัติงานไม่มีความชำนาญในการตัดและการย้อมสีอย่างเพียงพอแล้ว การอ่านผลสำหรับพยาธิแพทย์เพื่อการวินิจฉัยจะเป็นไปได้อย่างยากมาก
5. สำหรับการศึกษาเฉพาะโรคและงานวิจัยที่มีเวลาจำกัด	5. พยาธิแพทย์และบุคลากรเทคนิคต้องมีประสบการณ์ความสามารถความชำนาญสูง

2. เตรียมโดยใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automate Menthod) การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า เครื่องมือเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automatic Tissue Processor) ซึ่งเครื่องได้ออกแบบมาใช้สำหรับงานเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue processing)โดยเฉพาะของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ (Histopathological Laboratory) ได้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับปฏิบัติการประจำห้องปฏิบัติการ เพราะเป็นไปได้ตามสัดส่วนความสัมพันธ์ที่เหมาะสมต่อ

2.1 สภาพชิ้นเนื้อเยื่อทุกประเภทและขนาดต่าง ๆ

2.2 อัตราการแทรกซึมของน้ำยาต่อชิ้นเนื้อเยื่อดีโดยมีส่วนของเครื่องมือช่วยในการแทรกซึมให้เป็นไปอย่างสม่ำเสมอ

2.3 ผลกระทบต่อชิ้นเนื้อมีน้อยมากหรือเกือบจะไม่มีเลย

ลักษณะการทำงานโดยสังเขปของเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อแบบอัตโนมัติ

1. เป็นเครื่องมือที่มีการทำงานเองโดยอัตโนมัติ
2. ตัวเครื่องประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ตัวเครื่องจะประกอบด้วยส่วนทำงานต่างกันออกไปด้วยกลไก (Mechanic) และอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic) สามารถควบคุมการทำงานได้ที่แผงควบคุมด้านหน้าของตัวเครื่อง ให้เริ่มทำงานและสิ้นสุดเองโดยอัตโนมัติ

2.2 มีชั้นวางโถยา (reagent beaker) ตามลักษณะการใช้งานในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมชิ้นเนื้อ (12 หรือ 24 โถ แล้วแต่แบบที่เลือกใช้ ซึ่งงานประจำจะเป็นแบบ 12 โถน้ำยา)

2.3 มีฝาครอบโถน้ำยาและที่แขวนตะกร้าใส่ตลับชิ้นเนื้อ (tissue beaket) ติดอยู่กับฝาครอบน้ำยาที่ป้องกันการระเหยของน้ำยาต่าง ๆ ขณะใช้งาน

3. การทำงานจะเปลี่ยนการแช่น้ำยาเองโดยใช้แผ่นควบคุมเวลาและกลไกทางอิเล็กทรอนิกส์ สั่งให้ทำงานซึ่งอยู่ด้านหน้าของเครื่อง

4. โถน้ำยาสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อถูกแบ่งให้ครบทุกขั้นตอน คือ fixation , dehydration , clearing และ infiltration

เวลา : การใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ สำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อนั้นจะใช้เวลา 16 ชั่วโมง ตลอดขบวนการ ซึ่งจะแยกได้ในแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. Fixation	ใช้เวลาประมาณ	8	ชั่วโมง
2. Dehydration	ใช้เวลาประมาณ	3	ชั่วโมง
3. Clearing	ใช้เวลาประมาณ	2	ชั่วโมง
4. Infiltration	ใช้เวลาประมาณ	3	ชั่วโมง
	รวม	16	ชั่วโมง

น้ำยาที่ใช้ (Reagent) การเลือกใช้น้ำยาต่าง ๆ ในแต่ละขั้นตอนรวมทั้งการเรียงลำดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำยาต้องพิจารณาถึง

1. ประเภทและขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อ
2. ความหนาบางของชิ้นเนื้อเยื่อ

ทั้ง 2 สิ่งนี้ จะเป็นตัวกำหนดว่าควรจะใช้น้ำยาและความเข้มข้นของน้ำยาต่าง ๆ อย่างไร ซึ่งแตกต่างกันออกไป (ดูตารางการใช้น้ำยาและ เวลาประกอบ)

ข้อควรระวังในการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ

1. ไม่ควรวางชิ้นเนื้อซ้อนกันในตลับเดียวกัน เพราะจะทำให้การแทรกซึมของน้ำยาไม่ดีพอในแต่ละขั้นตอน

2. ระดับน้ำยาต่าง ๆ ในโถน้ำยาและระดับของ Liquid wax ใน wax bath ต้องสูงกว่าขอบบนของตลับใส่ชิ้นเนื้ออย่างน้อย 1.3 – 1.5 ซม. เพราะขณะที่เครื่องทำงานและยก

เปลี่ยนจากโถน้ำยาหนึ่ง ๆ ย่อมทำให้น้ำยาระเหยได้ ดังนั้นจึงต้องใส่น้ำยาให้มากไว้ เพื่อระดับน้ำยาได้ท่วมตลับชิ้นเนื้ออยู่เสมอขณะเตรียมชิ้นเนื้อ และฝาปิดโถน้ำยาควรเรียบปิดให้สนิททุกโถน้ำยา

3. สำหรับชิ้นเนื้อที่มีขนาดเล็ก ควรห่อด้วยกระดาษสาหรือกระดาษเช็ดเลนส์ ก่อนบรรจุลงในตลับชิ้นเนื้อเพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุดหายขณะเตรียมชิ้นเนื้อ

4. ความหนาของชิ้นเนื้อสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อในงานปกติที่จะให้การแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ และ liquid wax เป็นไปด้วยดีและทั่วตลอดชิ้นเนื้อนั้นมีความหนา 3 – 4 มม. (0.3 – 0.4 ซม.) และขนาดที่เหมาะสมคือ 3 มม. (0.3 ซม.)

5. การบรรจุตลับชิ้นเนื้อลงในตะกร้า (tissue basket) ในเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อควรมีจำนวนที่ไม่มากเกินไป ถ้ามากเกินไปจะทำให้การแทรกซึมของน้ำยาต่าง ๆ และ liquid wax เข้าไปได้ไม่ทั่วถึง และจะทำให้ตะกร้ารับน้ำหนักมากเกินไปทำให้เครื่องมือเสียง่ายขึ้น จำนวนที่เหมาะสม คือ

5.1 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อขนาดความจุเหมาะสม 1 ลิตร ควรบรรจุประมาณ 20 – 25 ตลับ / ตะกร้า

5.2 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อขนาดความจุเหมาะสม 2 ลิตร ควรบรรจุประมาณ 40 – 45 ตลับ / ตะกร้า

6. ทุกครั้งก่อนเตรียมชิ้นเนื้อต้องทำการตรวจสภาพน้ำยาต่าง ๆ , Liquid wax ว่ายังคงมีประสิทธิภาพพอสำหรับการใช้งานหรือไม่ ถ้าน้ำยา หรือ liquid wax ใช้งานไม่ได้แล้วก็ต้องเปลี่ยนใหม่ทุกครั้งก่อนเตรียม ฯ

6.1 วิธีการตรวจสภาพน้ำยาเพื่อประสิทธิภาพในการใช้งาน

6.1.1 สภาพของน้ำยาต้องใส ไม่ขุ่น และไม่มีตะกอน

6.1.2 สภาพของ liquid wax ต้องเนียน ทดสอบสัมผัสโดยใช้นิ้วจุ่มต้องเนียน กระด้างเล็กน้อย ไม่ลื่น เหลว และปราศจากกลิ่นของ Clearing agent ผสมอยู่

6.2 การเปลี่ยนน้ำยา ถ้าเป็นน้ำยาที่เป็นชนิดเดียวกันในแต่ละขั้นตอน (Step) ของการเตรียมชิ้นเนื้อให้เปลี่ยนโถน้ำยาที่ใช้งานไม่ได้แล้วเลื่อนโถน้ำยาถัดไป ซึ่งชนิดเดียวกันนั้นขึ้นมาแทนที่ และโถน้ำยาใหม่ (Fresh) จะอยู่ถัดไป (หรือตำแหน่งสุดท้าย)

7. ต้องตรวจสอบอุณหภูมิของ wax bath อยู่เสมอทุกวันและจดบันทึกเพื่อป้องกันการ over heat ซึ่งจะทำให้ชิ้นเนื้อเสียหายได้ โดยทฤษฎีแล้วอุณหภูมิของ wax bath ที่ใช้งานควรสูงกว่าจุดหลอมเหลว (melting point) ของ wax medium ที่ใช้ประมาณ 2 – 4 °C แต่ในทางปฏิบัติขณะที่เครื่องทำงานและมีการเปลี่ยนแปลงของโถน้ำยาเองโดยอัตโนมัติ ความร้อนผิว

บริเวณด้านบนของ liquid wax ย่อมกระจายออกไปได้ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่ liquid wax ไม่หลอมเหลวพอที่จะแทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้ ควรใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าจุดหลอมเหลว 3 –5° C เผื่อไว้ด้วย ต้องตรวจสอบสภาพการทำงานของเครื่อง เช่น สวิทซ์อัตโนมัติ , แผ่นควบคุมเวลา , กระแสไฟฟ้า (power supply) safety control ต่าง ๆ ว่ายังทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8. ต้องทำความสะอาดตลับชิ้นเนื้อ , ตะกร้าใส่ตลับชิ้นเนื้อทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน เพื่อป้องกันการจับเกาะของคราบ wax

วิธีการทำความสะอาดตลับชิ้นเนื้อและตะกร้าใส่ชิ้นเนื้อ

1. แช่ในน้ำยา xylene ที่ไม่ใช้แล้ว ทันทีหลังการ embedding
2. ล้างในน้ำร้อนเพื่อละลายและขจัดคราบ wax ที่หลงเหลืออยู่
3. ล้างในน้ำยาละลายผงซักฟอกจนสะอาด
4. ล้างในน้ำประปาหลาย ๆ ครั้งจนสะอาด
5. ตากทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงนำไปใช้งาน
6. ทำความสะอาดส่วนต่าง ๆ ของเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อเป็นประจำสม่ำเสมอทุกวันหลังจากการ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นถึงหลักการและวิธีการเตรียมชิ้นเนื้อต่าง ๆ โดยละเอียดแล้วนั้น คงจะพอเป็นแนวทางนำไปปฏิบัติงานเตรียมชิ้นเนื้อ ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อสิ้นสุดการเตรียมชิ้นเนื้อครบทุกขั้นตอนแล้ว (cycle ending) ต้องรีบนำชิ้นเนื้อในตลับชิ้นเนื้อมาทำการ embedding ไม่ควรแช่น้ำยาไว้ในเครื่องอีกต่อไป สิ่งผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับชิ้นเนื้อภายหลังการเตรียมชิ้นเนื้อกับการแก้ไขและวิธีป้องกัน

ตารางที่ 8 ลักษณะสิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น การแก้ไขป้องกัน

สิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข	การป้องกัน
- บริเวณตรงกลาง	1. ชิ้นเนื้อตัดหนาเกิน	1. ใช้ surgical blade	1. ต้องไม่ตัดชิ้นเนื้อ
ของชิ้นเนื้อมีสีซีด ,	ที่น้ำยาจะแทรกซึม	คม ๆ เฉือนความหนา	สำหรับการเตรียมชิ้น
นิ่ม , ไม่แข็ง เหมือน	เข้าไปได้ทั่วตลอดชิ้น	ของชิ้นเนื้อให้บางลง	เนื้อ ให้มีความหนา
บริเวณโดยรอบในชิ้น	(หนาเกิน 3 มม.)	แล้วนำไปใส่ตลับชิ้นเนื้อทำการ infiltration	เกิน 3 มม. (0.3 ซม.)

ตารางที่ 8 (ต่อ)

สิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข	การป้องกัน
		2. ไม่ต้องเฉือนความ	
		หนาของชิ้นเนื้อออก	
		แต่นำไปใส่ในตู้อบ	
		ร้อน (hot oven) ให้	
		wax ละลายแทรกซึม	
		เข้าไปใหม่โดยใช้	
		อุณหภูมิประมาณ	
		60°C เวลาตั้งแต่ 30	
		นาที ขึ้นไปแล้วสังเกต	
		ดูสภาพชิ้นเนื้อเป็น	
		ระยะๆ ทุก 30 นาที	
- สภาพชิ้นเนื้อแข็ง	1. ใช้น้ำยา , ความ	1. ละลาย wax ออก	1. จัดตารางการเตรียม
หดตัว และบิดงอมาก	เข้มข้นของน้ำยาและ	แล้วย้อน กลับ	ชิ้นเนื้อ และเรียงลำดับ
การตัด section	เวลาไม่เหมาะสมกับ	(reprocessing) ดังนี้	ความเข้มข้นเสียใหม่
(paraffin sectioning)	ชิ้นเนื้อแต่ละขั้นตอน	(ใส่ชิ้นเนื้อในตลับชิ้น	ให้เหมาะสมกับ
ยากเป็นขุยร่วน	2. อุณหภูมิของ wax	เนื้อ)	ประเภทและขนาดของ
	bath สูงมาเกินไป	1.1 แช่ใน xylene	ชิ้นเนื้อและทดลองใช้
	(เกิน 65 องศาเซล	จนหมด wax	ดูผลก่อนนำใช้ปฏิบัติ
	เซียส)	1.2 แช่ใน isopropyl	งานจริง
		Alcohol จนหมด	2. ตรวจสอบอุณหภูมิ
		xylene	ของสม่ำเสมอทุกวัน
		1.3 แช่ใน 80%	แล้วจดบันทึกไว้ถ้ามี
		alcohol จนชิ้นเนื้อแข็ง	สิ่งแล้วจดบันทึกไว้ถ้า
		น้อยลง (เริ่มหยุ่นๆ)	มีสิ่งผิดปกติเกิดขึ้น
		1.4 แช่ใน normal	ต้องหาสาเหตุแล้วรีบ
		saline เป็นเวลา 3 ชม.	ดำเนินการแก้ไข

ตารางที่ 8 (ต่อ)

สิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข	การป้องกัน
		1.5 แล้วเริ่ม	
		dehydration , clearing	
		infiltraion ใหม่	
		(น้ำยาต้องแก้ไขแล้ว)	
		2. ถ้าเกิดจากอุณหภูมิ	
		ของ wax bath สูงเกิน	
		ไป ต้องปรับอุณหภูมิ	
		ของ wax bath ใหม่	
		ส่วนชิ้นเนื้อให้ดำเนิน	
		การแก้ไขเช่นเดียวกับ	
		ข้อ 1	
- ชิ้นเนื้อแห้งซีดแข็ง	1. ระดับน้ำยาใน	1 และ 2 เรานำชิ้น	1. ต้องเติมน้ำยาให้
ไม่เหมือนปกติซึ่งมีสี	ขั้นตอน dehydration	เนื้อมาแก้ไขดังนี้	ระดับน้ำยาสูงกว่าขอบ
เหลืองแข็งพอดี	clearing ไม่ท่วมตลับ	1. ละลาย wax ออก	บนของตลับชิ้นเนื้อ
(ผ่านน้ำยาไม่ครบ	ชิ้นเนื้อ	จนเกือบหมด	ประมาณ 1.3–1.5 ซม.
ขั้นตอน)	2. ชิ้นเนื้อแห้งก่อน	2. แช่ใน xylene จน	เพื่อการระเหยของน้ำ
	Fix ในน้ำยา	หมด wax	ยาไว้และฝาปิด ครอบ
	fixative	3. แช่ใน isopropyl	น้ำยา ต้องรีบสนิทกับ
		Alcohol จนหมด	ขอบบนโถน้ำยาทุกโถ
		xylene	2. ต้องระมัดระวัง
		4. แช่ใน 80% alcohol	ชี้แจงให้ผู้ปฏิบัติงาน
		(ethyl) จนชิ้นเนื้อแข็ง	นำส่งชิ้นเนื้อที่ต้องการ
			ตรวจทางพยาธิวิทยา
			ให้เข้าใจถึงหลักการ
		5. แช่ใน normal-	เก็บรักษา
		Saline เป็นเวลา	สภาพชิ้นเนื้อภายหลัง
		1-3 ชั่วโมง เริ่ม	นำออกจากร่างกาย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

สิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข	การป้องกัน
		dehydration, clearing ,	และวิธีนำส่งตรวจ
		infiltraion ใหม่	ที่ถูกต้อง
		(เติมน้ำยาให้ท่วมตลับ	
		ชิ้นเนื้อเสียก่อน)	
- ตะกร้า (tissue	1. เจาะตัดแผ่น ควบคุม	1. รีบนำตะกร้าออก	1. ต้องเจาะตัดแผ่น
basket) ไปจุ่มน้ำยา	เวลาผิด	จากน้ำยา	ควบคุมเวลาให้ถูกต้อง
fixative อีกภายหลัง	2. Safety lock และ	2. ล้างตลับชิ้นเนื้อ	พอดี ไม่เกินจำนวนโถ
สิ้นสุดขั้นตอน	safety control ของ	Tissue cassette ด้วยน้ำ	โดยลดลง 1 ช่อง (เช่น
	เครื่อง ไม่ทำงานเสีย	ยาประปาหลายๆ ครั้ง	โถน้ำยา 12 โถ เราจะ
	3. เครื่อง automate	จนหมดกลิ่นน้ำยา	ตัดแผ่นควบคุมเวลา
	ทำงานผิดพลาด	fixative	
		3. นำตลับชิ้นเนื้อ	เพียง 11 ช่อง) แล้ว
		ทั้งหมดเข้าตู้อบร้อน	ทดลองกับเครื่องไม่มี
		อุณหภูมิประมาณ 58-	ชิ้นเนื้อดู
		60°C เป็นเวลานาน	2. ต้องมีการตรวจเช็ค
		ประมาณ 30 นาที เพื่อ	สภาพเครื่องเตรียมชิ้น
		ไล่น้ำจนหมด	เนื้อประจำปีทุกปี หรือ
		4. นำไป infiltration	ทุก 6 เดือน ถ้าใช้งาน
		ใหม่, embedding แล้ว	มาก) และควรมีเครื่อง
		ลองตัดเนื้อดูถ้าตัดได้	เตรียมชิ้นเนื้อสำรอง
		ก็ดำเนินต่อไป ถ้าตัด	ถ้าสามารถจัดหาได้
		ไม่ได้ต้องแยกมา	3. ขณะใช้งานถ้ามี
		Re-processiong ใหม่	เสียงหรือสิ่งผิดปกติ
		ดังนี้	ต้องหยุดใช้งานและ
		วิธีการ Re-processing	รีบให้บริษัทผู้จำหน่าย
		1. ละลาย wax ออก	ส่งช่างเทคนิคมา

ตารางที่ 8 (ต่อ)

สิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข	การป้องกัน
		2. แช่ใน xylene จน	ตรวจเช็คแก้ไขทันที
		หมด wax สังเกตชิ้น	
		เนื้อจะเปลี่ยนเป็นสี	
		เหลืองใส เปลี่ยนน้ำยา	
		2 ครั้ง ครั้งละ 30 – 60	
		นาที	
		3. แช่ใน isppropyl	
		alcohol จนหมด xylene	
		เปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง	
		ครั้งละ 30 นาที	
		4. ล้างน้ำปะปา 5 – 10	
		นาที	
		5. แช่ใน fixative รอ	
		การเตรียมชิ้นเนื้อตาม	
		ปกติ (ในตอนเย็นวัน	
		เดียวกัน)	

4. การทำบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin Block or Embedding in Paraffin)

วัตถุประสงค์ : เพื่อช่วยให้การตัดเป็น paraffin section กระทำได้ง่าย , สะดวก ได้ paraffin section เป็นแถบยาว ๆ (ribbon) และมีความบาง (thin section) ตามที่ต้องการ

หลักการ : โดยการนำเอาเนื้อเยื่อที่ผ่านการ infitration มาอย่างดีแล้ว (สิ้นสุดการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมีแล้ว) ไปฝังลงใน liquid wax medium ซึ่งบรรจุในแบบ (molds) ที่มีขนาดต่างๆ ตามขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อนั้น และเมื่อ wax medium แข็งตัวก็จะพยุงชิ้นเนื้อเยื่อไว้ในลักษณะที่จะทำการตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อบางๆ ขนาด 3 – 5 ไมครอน ได้ง่ายสิ่งสำคัญการวางชิ้นเนื้อฝังลงใน liquid wax medium ของแต่ละชิ้นในแบบ ต้องวางชิ้นเนื้อในลักษณะที่ถูกต้องลงไป ซึ่งต้องใช้ความรู้ความชำนาญและความระมัดระวังรอบคอบเป็นอย่างมาก เพราะถ้าวางชิ้นเนื้อผิดลักษณะไม่ถูกต้องจะทำให้ไม่สามารถแปลผลวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องที่ควร

แบบ (Molds) ที่ใช้เป็นแบบบล็อกเนื้อ : ที่นิยมใช้กันอยู่มีดังนี้

1. โลหะรูปตัวแอล (L-shape stripe of metal)

2. แบบพลาสติก (A variety of plastic embedding molds)

ซึ่งแต่ละแบบจะมีวิธีทำดังนี้ คือ

1. โลหะรูปตัวแอล (L-shape stripe of metal) ตัวแบบ (Molds) : ประกอบด้วยโลหะรูปตัวแอล (L) และแผ่นโลหะแบนเรียบรูปสี่เหลี่ยม

วิธีทำ : มีวิธีทำบล็อกชิ้นเนื้อดังนี้

1. นำโลหะรูปตัวแอล (L-shape) มาประกอบกันเป็นรูปสี่เหลี่ยมตามขนาดของชิ้นเนื้อและประกอบบนแผ่นโลหะแบนเรียบให้แน่นเพื่อป้องกันไม่ให้ liquid wax medium ไหลซึมออกมาได้ทั้งโลหะรูปตัวแอล และแผ่นโลหะแบนต้องสะอาดปราศจากคราบ wax และเศษชิ้นเนื้อ

2. หลอด liquid wax ลงในช่องสี่เหลี่ยมนั้น

3. ใช้ปากคีบปลายแหลมจับชิ้นเนื้อ พิจารณาดูด้านที่ถูกต้อง แล้ววางชิ้นเนื้อฝังลงไปใน liquid wax ของช่องสี่เหลี่ยม โดยกระทำให้เสร็จก่อนที่ liquid wax จะแข็งตัว

4. หยอด liquid wax เติมลงไปให้เต็มขอบบนของโลหะรูปตัวแอล (L)

5. ติดหมายเลขของผู้ป่วยที่ให้ไว้ลงบริเวณขอบด้านในของโลหะรูปตัวแอลด้านใดด้านหนึ่ง

6. ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจน liquid wax แข็งตัวแล้วจึงค่อยๆแกะพาราฟินบล็อกชิ้นเนื้อจากโลหะรูปตัวแอล

ตารางที่ 9 ข้อดีและข้อเสียจากการทำบล็อกชิ้นเนื้อวิธีนี้

ข้อดี	ข้อเสีย
1. การทำบล็อกชิ้นเนื้อง่ายและสะดวก	1. ถ้าประกอบโลหะรูปตัวแอลไม่สนิท liquid
	wax จะไหลซึมออกมาได้ง่าย
2. โลหะรูปตัวแอล (L) และแผ่นแบนเรียบ	2. สิ้นเปลือง wax medium มาก
ทนทานต่อการใช้งานได้ดีหลายปี	3. บล็อกพาราฟินแตกหักง่ายเวลาตัดด้วยเครื่อง
	ตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
	4. เก็บรักษายาก , เพราะติดกันได้ง่ายและเบอร์
	หลุด , ขาดหายได้ง่าย

2. แบบพลาสติก (A variety of plastic embedding molds)

ตัวแบบ (Molds) : ประกอบด้วย

1. Stainless embedding molds (Base molds) คือแบบที่ทำด้วยสเตนเลสมีหลายขนาด ตามขนาดชิ้นเนื้อ ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในงาน embedding โดยเฉพาะ

2. Plastic embedding ring , disposable เป็นพลาสติกแข็งพอสมควรเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดใช้ประกอบกับ stainless embedding molds เพื่อยึดเกาะ wax ที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่

วิธีทำ : มีวิธีทำบล็อกชิ้นเนื้อดังนี้

1. เลือก Base molds ให้มีขนาดพอเหมาะกับขนาดของชิ้นเนื้อนั้น และต้องสะอาดปราศจากคราบ wax และเศษชิ้นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเปรอะเปื้อนจากเศษชิ้นเนื้อนั้น

2. หยอด liquid wax medium ลงไปใน base molds จนเกือบเต็มขอบบน

3. ใช้ปากคีบปลายแหลมจับชิ้นเนื้อ พิจารณาดูด้านที่ถูกต้อง แล้ววางชิ้นเนื้อฝังลงไปใน liquid wax ของ base molds นั้น โดยกระทำให้เสร็จก่อนที่ liquid wax จะแข็งตัว

4. นำ Plastic embedding ring มาประกอบบน base molds กดให้แน่นสนิทแล้วหยอด liquid wax medium จนเต็มขอบบนของ plastic embedding ring

5. ติดหมายเลขของผู้ป่วยกับขอบบนด้านในของ plastic embedding ring

6. ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วแกะบล็อกออกจาก base molds ก็จะได้พาราฟินบล็อกชิ้นเนื้อที่ต้องการ (เขียนหมายเลขของผู้ป่วยไว้บนขอบ plastic ring ด้วยดินสอ (2 บี) เพราะถ้ากระดาษหมายเลขขาดหลุดหายไปก็ยังทราบหมายเลขได้)

ตารางที่ 10 ข้อดีและข้อเสียจาการทำบล็อกชิ้นเนื้อวิธีนี้

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สิ้นเปลือง wax น้อยกว่าวิธีแรก	1. ใช้เวลาการทำมากกว่าวิธีแรก เนื่องจากมี
	ขั้นตอนมากกว่าผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญในการ
	ทำมากกว่าวิธีแรก
2. บล็อกชิ้นเนื้อเก็บรักษาง่ายและสะดวก	2. มีค่าใช้จ่ายของ เพิ่มขึ้นเพราะต้องติดอยู่กับ
ไม่ติดกันเนื่องจาก plastic ring	พาราฟินบล็อกตลอดไป

เทคนิคการวางชิ้นเนื้อฝังใน liquid wax medium ของแบบ (Molds) (Embedding Technique) เทคนิคการวางชิ้นเนื้อฯ มีความสำคัญมาก เพราะถ้าผู้ปฏิบัติไม่เข้าใจและทราบถึงลักษณะที่ถูกต้อง แล้วจะเกิดผลเสียตามมา ได้แก่

1. ไม่สามารถตัดบล็อกชิ้นเนื้อออกเป็นชิ้นเนื้อเยื่อบาง ๆ (paraffin section) ได้หรือถ้าตัดได้ก็อาจจะวินิจฉัยจากกล้องจุลทรรศน์ไม่ได้
2. เสียชิ้นเนื้อเยื่อไปมากหรืออาจจะหมดไปเลยก็ได้ โดยที่ยังไม่ได้ paraffin section เลย
3. กระทบต่อผู้ป่วยในการวินิจฉัยและการรักษาโรค

ดังนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ปฏิบัติงานจะต้องมีความรู้ความเข้าใจในเทคนิคการวางชิ้นเนื้อขณะที่ทำการ embedding การวางชิ้นเนื้อฝังใน liquid wax medium ของ molds แต่ละแบบที่ใช้ทำได้ใน 2 ลักษณะ คือ

1. วางตามขวาง (cross section)
2. วางตามแนวนอน (long section)

ซึ่งขณะที่ทำการวางชิ้นเนื้อ จะวางในลักษณะใดลักษณะหนึ่งก็ได้ หรืออาจจะรวมทั้ง 2 ลักษณะพร้อมกันก็ได้ใน paraffin block เดียวกัน แต่ส่วนใหญ่แล้วจะวางตามผู้ตัดชิ้นเนื้อต้องการ ทั้งนี้เพื่อให้การวินิจฉัยได้ดีทางกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะการวางชิ้นเนื้อที่สำคัญ ๆ (Embedding Technique) เช่น

1. Skin : ต้องการดู Section ตั้งแต่ขอบล่างสุดของชั้น dermis จนถึงผิวบนสุดของ Epidermisดังนั้นการ embedded เราจะวางชิ้นเนื้อให้ผิวของ skin (ส่วนที่เป็น epidermis) ตั้งฉากกับพื้นราบ โดยเลือกด้านที่เรียบ , กว้างที่สุด หรือด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีด้วยอินเดียอิงส์ เพื่อทำเป็นเครื่องหมายวางลงไปให้ติดกับพื้นของแบบที่ทำบล็อก

2. Muscle : ต้องการดูทั้งลักษณะ cross section และ long section ของเซลล์กล้ามเนื้อ , ถ้าเป็น long section เลือกด้านที่เรียบ , กว้างที่สุดหรือด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีวางลงไปให้ติดกับพื้นของแบบที่ทำบล็อก เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อมดลูกเป็นต้น ส่วน cross section เลือกด้านหน้าตัดเรียบที่สุดหรือด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีวางลงไปให้ติดกับพื้นของแบบทำบล็อกเช่นกัน

3. Tube : ส่วนใหญ่ต้องการดู section ในลักษณะตัดตามขวางมากกว่า การวางเราเลือกด้านหน้าตัดเรียบที่สุดหรือด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีวางลงไปให้ติดพื้นของแบบทำบยล็อก เช่น Vas deference , ท่อนำไข่ (Uterine tube)

4. ชิ้นเนื้อรูปสี่เหลี่ยม , สามเหลี่ยม ที่มีความกว้าง , ยาว , หนา : จะต้องการดู section ตามความกว้าง ยาวของชิ้นเนื้อนั้น การวางชิ้นเนื้อเราจะเลือกด้านที่กว้างที่สุดหรือด้านที่ตรงข้ามกับที่แต้มสีหรือลักษณะเดิมที่วางในตลับชิ้นเนื้อวางลงไปให้ติดกับพื้นของแบบที่ทำบล็อก

5. ชิ้นเนื้อที่เป็นแผ่นบาง ๆ (Wall) : ต้องการดู cross section การวางชิ้นเนื้อจะวางให้ชิ้นเนื้อที่เป็นแผ่นบาง ๆ ตั้งฉากกับพื้นราบเป็นรูปกำแพง เช่น cyst wall เป็นต้น

6. ชิ้นเนื้อของระบบทางเดินอาหาร : ต้องการดู section ตั้งแต่เยื่อบุผิวนอก ดังนั้นการวางชิ้นเนื้อต้องวางให้เห็นลักษณะดังกล่าว ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว ในทางปฏิบัติจะวางลักษณะเดิมที่วางไว้ในตลับชิ้นเนื้อหรือด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีไว้

7. Curettage : ต้องการดู section ทั้งหมด ดังนั้นการวางชิ้นเนื้อนี้ จะวางเป็นกลุ่ม ๆไม่ซ้อนกัน ถ้ามีจำนวนมากให้แยกบล็อกชิ้นเนื้อเพิ่มขึ้นโดยพยายามกดชิ้นเนื้อทั้งหมดให้ติดกับพื้นราบมากที่สุดไม่ลอยปนอยู่ใน wax ด้านบน

8. Cone blopsy : วางด้านที่เรียบ , กว้าง , ยาวที่สุด ซึ่งเป็นส่วนใหญ่จะเป็นด้านตรงข้ามกับที่แต้มสีไว้โดยวางลงไปเป็นกลุ่มให้เรียบติดพื้นราบของแบบมากที่สุด และหน้าตัดขอบชิ้นเนื้อเรียบเสมอเท่ากันตลอดใน paraffin block ถ้ามีจำนวนมากให้แยกบล็อกเพิ่มเช่นกัน

9. ชิ้นเนื้อลักษณะเป็นรูปรี (Oval) : ต้องการดูหน้าตัดของชิ้นเนื้อที่ผ่าครึ่ง (bisected) ทั้งหมด ดังนั้นการวางชิ้นเนื้อนี้เราจะวางด้านที่ถูกผ่าครึ่ง ซึ่งเรียบกว้าง , ยาวที่สุดลงไปให้ติดกับพื้นราบ และเสมอเท่ากันตลอดในแบบของบล็อกชิ้นเนื้อ เช่น lymph node biopsy เป็นต้น

10. Needle blopsy : ต้องการดู section ในลักษณะ long section ดังนั้นการวางชิ้นเนื้อ เราจะพยายามกดชิ้นเนื้อในแนวนอนทั้งชิ้น ให้เรียบติดพื้นของแบบที่ทำบล็อกชิ้นเนื้อแต่ถ้ามีหลายชิ้นเนื้อต้องกดชิ้นเนื้อให้เรียบเสมอตลอดแนว และอยู่ในแนวเดียวกันด้วยทุกชิ้น

11. ชิ้นเนื้อแต้มสี : ต้องการดูด้านตรงข้ามกับส่วนที่แต้มสี ที่แต้มสีเป็นส่วนที่ไม่ต้องการดู section การวางชิ้นเนื้อเราจะเลือกด้านตรงข้ามที่กว้าง , ยาว เรียบที่สุดลงไปให้ติดกับพื้นของแบบที่ทำบล็อกชิ้นเนื้อ ถ้ามีหลาย ๆ ชิ้น ต้องใช้ปลายปากคีบกดให้เรียบเสมอเท่ากันทุกชิ้นโดยจัดให้อยู่เป็นกลุ่มหรือแนวเดียวกันด้วย

การปะปนของชิ้นเนื้อและการป้องกัน (Contamination and Prevention) การ Contaminate : เป็นการปะปนของชิ้นเนื้อเยื่ออื่นเข้ามาอยู่ในตลับชิ้นเนื้อและบล็อกชิ้นเนื้อซึ่งเกิดจาก

1. เขียงตัดชิ้นเนื้อ (gross examination) ไม่สะอาดมีเศษชิ้นเนื้ออื่นค้างอยู่ให้ปะปนเข้ามาได้

2. ปลายปากคีบไม่สะอาดมีคราบ wax และเศษชิ้นเนื้ออื่นจับเกาะติดอยู่ขณะ embedded ชิ้นเนื้อ

3. แบบที่ใช้ทำบล็อกชิ้นเนื้อไม่สะอาด มีเศษชิ้นเนื้ออื่นเกาะติดอยู่

4. เปิดตลับชิ้นเนื้อพร้อมกันหลาย ๆ ตลับ ทำให้เกิดการปะปนของชิ้นเนื้อเล็ก ๆ ได้ และอาจทำให้เกิดการสลับชิ้นเนื้อกันได้ด้วย

การป้องกัน (Prevention) เพื่อไม่ให้เกิดการ contaminate ของชิ้นเนื้อเกิดขึ้น ควรปฏิบัติดังนี้

1. เขียงตัดชิ้นเนื้อ (gross examination) ต้องล้างทำความสะอาดจนหมดเศษเนื้อเล็ก ๆ ทุกครั้งหลังจากตัดแบ่งชิ้นเนื้อแล้ว

2. ในขณะ embedded ปลายปากคีบต้องจุ่มใน liquid wax , เพื่อละลายคราบที่จับเกาะอยู่ แล้วเช็ดให้สะอาดด้วยผ้าก่อนจับชิ้นเนื้อในการ embedded ทุกครั้ง

3. แบบ (molds) ต่าง ๆ ต้องทำความสะอาดจนหมดคราบ wax และเศษชิ้นเนื้อก่อนนำมาใช้งาน

4. เปิดตลับชิ้นเนื้อครั้งละ 1 ตลับ แล้วทำการ embedded ให้ เสร็จ ก่อนจะเปิดตลับชิ้นเนื้อต่อไป ซึ่งยังช่วยป้องกันการสลับรายและหมายเลขของผู้ป่วยได้อีกด้วย

ข้อควรระมัดระวังขณะทำการ Embedded (Precaution in Embedding)

1. ระมัดระวังการ contaminate และการสลับชิ้นเนื้อ และหมายเลขผู้ป่วย

2. ต้องตรวจสอบดูลักษณะที่ถูกต้องก่อนวางชิ้นเนื้อทุกครั้ง ถ้าเป็นชิ้นเนื้อเล็กมาก ๆควรใช้แว่นขยายหรือตรวจสอบลักษณะตำแหน่งที่มาของชิ้นเนื้อจากใบรายงานนำส่ง (request form) หรือปรึกษากับพยาธิแพทย์ก่อน

3. เมื่อวางชิ้นเนื้อแล้วต้องติดหมายเลขของแต่ละบล็อกให้เสร็จก่อนจะทำต่อไป

4. ชิ้นเนื้อเล็กๆ ชิ้นเนื้อแต้มสีต้องระมัดระวังให้มากในการวางชิ้นเนื้อฝังลงในบล็อก

5. ทุกครั้งที่วางชิ้นเนื้อต้องกดชิ้นเนื้อให้เรียบเสมอกันตลอดทั้งชิ้นและถ้าหลายชิ้นต้องกดให้เรียบเสมอกันตลอด

6. ถ้าใช้เครื่อง Paraffin Dispenser ในการละลาย wax เพื่อการ embedded ชิ้นเนื้อตัวเครื่องต้องมีที่กรองเศษชิ้นเนื้อ , ฝุ่นละอองไว้ไม่ให้ปะปนออกมากับ liquid wax ที่ใช้ในการ embedded

7. สิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ (foreign bodies) เช่น ไหมผ่าตัด , ลวดเย็บกระดาษ ถ้าพบในชิ้นเนื้อต้องเอาออกก่อนวางชิ้นเนื้อลงไปใน liquid wax ของแบบที่ทำบล็อก

5. การตัด Paraffin Section (Paraffin Section Cutting or Sectioning)

วัตถุประสงค์ : เป็นการนำเอาชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการ embedded ลงในพาราฟินบล็อกเรียบร้อยแล้วมาตัดออกเป็นเนื้อเยื่อแผ่นบาง ๆ (paraffin section) ด้วยเครื่องมือเฉพาะที่เรียกว่าเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome) โดยปกติ เราจะตัดให้ได้เนื้อเยื่อแผ่นบางๆ ขนาด 3 – 5 ไมครอน (1ไมครอน เท่ากับ 1/100 มม.) แต่มีชิ้นเนื้อเยื่อบางประการประเภทต้องตัดให้บางกว่านี้อีก คือหมีความบาง ประมาณ 2 ไมครอนได้แก่ เนื้อเยื่อประเภท ผิวหนัง , ตับ , ไต และต่อมน้ำเหลือง การตัด Paraffin Section การตัด section ที่ดีและบางตามต้องการนั้นประกอบด้วยประการสำคัญ 4 ประการดังนี้

1. ความชำนาญของเจ้าหน้าที่เทคนิค (A skilled technologist) เป็นความสามารถทางด้านเทคนิคของแต่บุคคล ซึ่งต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจในขั้นตอนต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี ตั้งแต่เตรียมชิ้นเนื้อจนถึงการย้อมสีชิ้นเนื้อ ต้องได้รับการสอนและฝึกหัดจากผู้ที่ชำนาญงานนี้เป็นอย่างดี จึงจะสามารถปฏิบัติงานได้ ซึ่งต้องฝึกหัดเป็นอย่างมากเพื่อให้มีประสบการณ์ และความรู้ความชำนาญมากขึ้น

2. ต้องใช้ใบมีดตัดชิ้นเนื้อที่คม (A sharp microtome knife) ใบมีดตัดชิ้นเนื้อเป็นอุปกรณ์ที่สำคัญมากในการตัด paraffin section ใบมีดต้องมีความคมมากขณะใช้งานและได้รับการดูแลรักษาเป็นอย่างดี และต้องลับใบมีให้คมอยู่เสมอด้วย การลับใบมีดมีวิธีการเฉพาะต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับเครื่องลับใบมีดที่ใช้ (rotary microtome knife sharpener หรือ sliding microtome knife sharpener)

3. ต้องมีเครื่องตัดชิ้นเนื้อที่ดี มีประสิทธิภาพในการใช้งาน คือ ควรใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ที่ดีมีประสิทธิภาพ เหมาะแก่การใช้งานตัด paraffin section และต้องดูแลรักษาเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีประสิทธิในการใช้งานอยู่เสมอ

4. วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมชิ้นเนื้อ ตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงการตัด section โดยมีการเลือกใช้เครื่องมือ , วัสดุ , อุปกรณ์ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมทุกขั้นตอน จึงจะทำให้ชิ้นเนื้อได้รับการปฏิบัติเป็นอย่างดีจนถึงขั้นตอนการตัดนี้และทำให้การตัดนี้และทำให้การตัด section เป็นไปด้วยความง่าย , สะดวกยิ่งขึ้น จึงจะได้ paraffin section ที่ดีตามต้องการ

การเตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อและวิธีการตัด Paraffin section (Setting up the microtome and cutting procedures)

เตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Setting up the microtome) การเตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. ทดสอบการทำงานของเครื่องโดยลองหมุน hand wheel และ coarse feel ของเครื่องว่าใช้งานได้ดีมีประสิทธิภาพหรือไม่

2. เลื่อน block holder กลับสู่เครื่องจนเกือบสุด

3. ใส่ knife holder เลื่อนเข้าใกล้ block holder ให้เว้นระยะห่างประมาณ ½ นิ้ว แล้วล็อก knife holder กับฐานของตัวเครื่องให้แน่น

4. ใส่ใบมีด (microtome knife) เข้ากับ knife holder แล้วขันสกรูล็อกใบมีดให้แน่น

5. ปรับมุมของใบมีดให้เอียงเล็กน้อย เพื่อที่ตัด section แล้วได้ Paraffin section บาง ตามที่สเกลกำหนด แล้วล็อกปรับมุมให้แน่น (การปรับหมุนนี้เราจะปรับครั้งเดียวตอนเริ่มใช้เครื่องหลังจากซื้อมาใหม่ ๆ)

วิธีการตัด Paraffin section (Cutting procedures) หลังจากการเตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อเรียบร้อยแล้ว นำแผ่นกระดาษมารองใต้ฐานของเครื่องเพื่อรองรับเศษ wax medium และเศษชิ้นเนื้อเยื่อไม่ให้ตกลงพื้น แล้วเริ่มปฏิบัติต่อดังนี้

1. นำบล็อกชิ้นเนื้อจากถาดน้ำแข็งใส่เข้าไปใน block holder ล็อกแผ่นให้แน่นด้วยสกรู ถ้าใช้ plastic embedding ring จะล็อกส่วนที่เป็น plastic ring บริเวณขอบพอดีเหลือชิ้นเนื้อใน wax เท่านั้น แต่ถ้าใช้โลหะรูปตัวแอล ทำแบบของบล็อกชิ้นเนื้อ ให้ใช้หน้าตัดส่วนที่มีชิ้นเนื้อพ้นขอบ block holder ประมาณ 1 ซม. แล้วปรับล็อกชิ้นเนื้อให้ตรงตั้งฉากกับพื้น , ขอบของบล็อกให้ขนานกับใบมีด

2. เริ่มทำการ trim บล็อกชิ้นเนื้อ (trimming of tissue block) วิธีการ Trim บล็อก : สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

2.1 วิธีที่ 1 ปรับไมครอนสเกลให้มีความหนามาก ๆ ประมาณ 10 – 15 ไมครอน แล้วหมุน hand wheel จนได้ชิ้นเนื้อเต็มหน้าตัดในบล็อก วิธีนี้เหมาะสมกับผู้เริ่มฝึกหัดตัด hand wheel ใหม่ ๆ

2.2 วิธีที่ 2 ใช้ coarse feel ช่วย โดยเริ่มใช้ coarse feel เลื่อนบล็อกชิ้นเนื้อเข้าหาใบมีดพร้อม ๆ กับหมุน hand wheel ไปด้วย การใช้ coarse feel ต้องเพิ่มจังหวะมากกว่าปกติและ ทีละน้อย ๆ จนกระทั่งได้ชิ้นเนื้อเต็มหน้าตัดในบล็อก วิธีนี้เหมาะสำหรับผู้มีความชำนาญในการตัด hand wheel แล้ว เพราะถ้าไม่ชำนาญอาจทำให้ชิ้นเนื้อในบล็อกฉีกขาดง่าย

ประโยชน์ที่ได้จากการ Trim บล็อก

1. ทราบทันทีว่าการ embedding ได้ทำอย่างถูกต้องหรือไม่ และสามารถแก้ไขได้ก่อนที่ชิ้นเนื้อในบล็อกจะถูกตัดไปหมดและไม่ได้ Paraffin section เลย

2. ขณะนั้นชิ้นเนื้อถูก ออกไปเพียงพอหรือยัง เพราะต้องตัดชิ้นเนื้อให้ได้ Paraffin section ที่เต็มหน้าชิ้นเนื้อ , สมบูรณ์มากที่สุด

3. ช่วยในการตัด Paraffin section ง่าย , สะดวกยิ่งขึ้นและได้ Paraffin section ที่สมบูรณ์ดีครบถ้วนตามขนาดชิ้นเนื้อและบางตามที่ต้องการ

4. ขจัดปัญหาแถบพาราฟีน (Paraffin ribbon) ติดขอบบล็อกชิ้นเนื้อขณะยกบล็อกขึ้นเพื่อตัด section ต่อไป

3. หลังจาก trim บล็อก ได้ชิ้นเนื้อเต็มหน้าตัดแล้ว ปรับไมครอนสเกลใหม่ให้เหลือเพียง 3 – 5 ไมครอนก่อนที่จะตัดต่อไป (ถ้าใช้ วิธีการที่ 1 ในการ trim บล็อกชิ้นเนื้อ) ใช้ปลายปากคีบทำรอยให้เป็นแนวจากขอบบนถึงขอบล่างของบล็อกชิ้นเนื้อโดยแนวนี้พอดีกับขนาดของชิ้นเนื้อในบล็อก เพื่อลดแรงดึงของ wax ด้านข้างและช่วยให้การลอย Paraffin section ในอ่างน้ำร้อนได้ง่ายขึ้น หลังจากทำรอยเป็นแนวดีแล้วใช้ก้อนน้ำแข็งถูบริเวณชิ้นเนื้อในบล็อกจนเย็นจะช่วยให้การตัดง่ายขึ้นเริ่มตัด section โดยหมุน hand wheel จนได้ Paraffin section เป็นแถบยาว (ribbon)

4. ใช้ปากคีบจับแถบยาวของ Paraffin section ไปลอยบนผิวน้ำในอ่างน้ำร้อน ๆ โดยวางแถบยาวนั้นในลักษณะเดิม ไม่พลิกด้าน

5. ใช้ปากคีบแยกเอา section ที่ดี , สมบูรณ์ครบถ้วนเท่าขนาดชิ้นเนื้อในบล็อกและมีความบางที่ต้องการเพื่อช้อนใส่สไลด์

6. นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาช้อน section ที่ได้เลือกแยกไว้ โดยช้อนใส่ section มากที่สุดบนพื้นที่บนผิวสไลด์

7. เขียนหมายเลขผู้ป่วยตามบล็อกชิ้นเนื้อที่ขอบข้างหนึ่งของสไลด์แล้วตากให้แห้งสนิทรอเข้าตู้อบร้อนเพื่อช่วยตรึง (fixed) paraffin section ให้ติดแน่นกับผิวสไลด์ยิ่งขึ้นโดยที่ไม่หลุดง่ายขณะทำการย้อมสี

8. ใช้เวลาตรึง , ยึด , paraffin section กับผิวสไลด์ในตู้อบร้อนอย่างน้อย 30 นาที และใช้อุณหภูมิ ประมาณ 58 – 60 $^{\circ}$C

9. เมื่อครบเวลา นำสไลด์ออกจากตู้อบร้อนทิ้งไว้จนเน้น แล้วนำไปย้อมสีตามขั้นตอนต่อไป

การปรับมุมเอียงของใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (Setting up the microtome knife angle)เป็นการปรับใบมีดให้เอียงทำมุมกับบล็อกชิ้นเนื้อพอดีที่จะตัดเป็น paraffin section ได้บาง

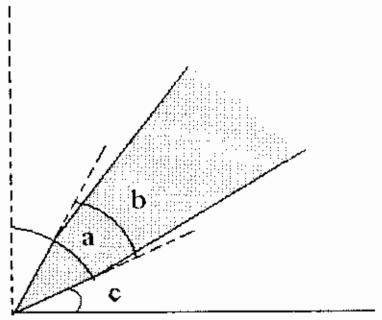
ตามไมครอนสเกลกำหนด โดยปรับให้มุมของช่องวาง (clearnce angle) ระหว่างแนวหน้าตัดของบล็อกชิ้นเนื้อ ซึ่งตั้งฉากกับพื้นราบกับแนวของคมมีด (knife facet) อยู่ระหว่าง 10 – 15 °C ขึ้นอยู่กับ knife holder ของเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ซึ่งแต่ละแบบ , จะต่างกันออกไป แต่มุมของช่องว่างจะอยู่ในช่วงที่จะทำให้การตัด section ได้ paraffin section ที่บางตามต้องการ

วิธีปรับมุมเอียงของใบมีดให้ปรับมุมนี้ตั้งแต่ซื้อเครื่องตัดชิ้นเนื้อมาใหม่ ๆ โดยปรับที่ knife holder ซึ่งจะมีสเกลบอก (บางรุ่นจะมีที่ล็อกให้ยึดแน่นอยู่กับที่ ไม่มีที่ล็อกต้องทำเครื่องหมายไว้) ลองปรับให้ได้ใกล้เคียงกัน 2 – 3 ตำแหน่ง แล้วเปรียบเทียบ paraffin section ที่ตัดได้ โดยการย้อมสีดูความหนาบางของ section ซึ่งจะได้ตำแหน่งที่ต้องการโดยที่สามารถตัด section ได้ใกล้เคียงกับไมครอนสเกลที่กำหนดมากที่สุด

การปรับมุมวิธีที่ง่ายที่สุดให้เริ่มจากแนวตั้งฉากโดยกะประมาณมุมของช่องว่างนั้น แล้วค่อย ๆ เพิ่มมุมของช่องว่างทีละน้อย ๆ ในการปรับครั้งต่อไป ถ้าปรับมุมของช่องว่างไม่เหมาะสมพอดี กล่าวคือ

1. ปรับมุมน้อยเกินไป (น้อยกว่า 10 องศา) จะพบว่ามุมของช่องว่างมีน้อยมาก ทำให้ใบมีดเอียงทำมุมชันมากเกินไป (Rake angle มากเกินไป) และผลที่ได้จากการตัดพบว่า paraffin section จะย่น , ซ้อนติดกันบนคมมีดไม่ได้ paraffin section เป็นแถบยาว

2. ปรับมุมมากเกินไป (มากกว่า 15 องศา) จะพบว่ามุมของช่องว่างมีมากเกินไป ทำให้ใบมีดเอียงราบเกินไป (Rake angle น้อยเกินไป) และผลที่ได้จาการตัด section พบว่า paraffin section จะหนาตลอดไม่บางตามที่ไมครอนสเกลกำหนดและไม่ต่อเนื่องเป็นแถบยาวดังนั้นเราจะต้องปรับมุมของช่องว่างนี้ให้เหมาะสมพอดี และต้องสัมพันธ์กับมุมที่ใช้ลับใบมีดด้วยเพื่อให้เกิดคมมีดที่เหมาะสมกัน โดยเฉพาะถ้าใช้เครื่องลับใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (microtome knife sharpener) แบบ sliding คือต้องปรับมุมที่ใช้ลับใบมีดทุกครั้งก่อนลับใบมีด โดยปรับมุมให้ลับใบมีดระหว่าง 30 – 45 ° (ส่วนเครื่องลับใบมีดแบบ rotary microtome knife sharpener ไม่สามารถปรับมุมลับใบมีดได้แต่ถ้ากำหนดมาจากผู้ผลิตให้ลับในมุมระหว่าง 30 – 45 ° นี้แล้ว) (*ดูรูป A*) ดังนั้นใบมีดสำหรับตัดบล็อกชิ้นเนื้อในการทำ paraffin section เราจะลับใบมีดให้คมด้วยมุม (cutting angl) ระหว่าง 30 – 45° เท่ากันทั้ง 2 ด้านของใบมีดปรับให้ใบมีดเอียงทำมุมกับบล็อกชิ้นเนื้อ โดยมุมของช่องว่างประมาณ 10 – 15 °



รูป A Angles associated with the knife edge. (a) rake; (b) bevel; (c) clearance

ตารางที่ 11 สาเหตุต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดอุปสรรคขึ้นขณะตัด Section และการแก้ไข

อุปสรรคที่เกิด	สาเหตุ	การแก้ไข
1. ตัดไม่ได้ section เลย	1. การเตรียมชิ้นเนื้อไม่ดีพอ	1. นำมาย้อมกลับทำการเตรียมชิ้น
	2. ชิ้นเนื้อไม่ fixed เน่า	เนื้อใหม่ (re-processing)
	3. Embedded ชิ้นเนื้อผิด	2. เติมชิ้นเนื้อเพิ่มหรือ re-processing
	ด้าน	ถ้าไม่มีชิ้นเนื้อเหลืออยู่
		3. ละลาย wax ออกแล้ว embedded
		ชิ้นเนื้อใหม่ (re-processing)
2. section หนา- บางไม่	2.1 wax อุ่น , ไม่เย็นพอ	2.1 ใช้น้ำแข็งถูนาน ๆ
เท่ากัน	2.2 สกรู (screw) ของบล็อก	2.2 ตรวจเช็คสกรู, ขันให้แน่นก่อนตัด
	หรือ knife holder หลวมไม่	ทุกครั้ง
	แน่นพอ	2.3 ต้องพยายามฝึกหมุน hand whell
	2.3 จังหวะการออกแรงหมุน	บ่อย ๆ
	hand whell (flying whell)	2.4 เปลี่ยนมีดที่มีความคมมาก ๆ
	ไม่สม่ำเสมอ	2.5 ตรวจสอบ wax เปลี่ยน wax ใหม่
	2.4 ชิ้นเนื้อแข็งไป	เลือกใช้ให้ถูกกับงาน
	2.5 wax แข็งไป (ผิดประเภท	
	ใช้งาน	
3. section ติดขอบบนของ	3.1 ผิวหน้าของบล็อกหรือ	3.1ใช้แปรงขนอ่อนปัดทำความสะอาด
บล็อกชิ้นเนื้อ	บนคมมีด (blade) สกปรก	3.2 ปรับ block holder ใหม่

ตารางที่ 11 (ต่อ)

อุปสรรคที่เกิด	สาเหตุ	การแก้ไข
	3.2 บล็อกชิ้นเนื้อไม่ขนาน	3.3 ปรับมุมใหม่ (แต่ละเครื่องตัดชิ้น
	กับใบมีด	เนื้อมุมนี้จะไม่เท่ากัน)
	3.3 มุมเอียง (Clarance	
	angle) ของใบมีดน้อยไป	
4. รอยบน section	4.1 มีสิ่งแปลกปลอมฝังอยู่	4.1 นำมาละลายหาสิ่งแปลกปลอม
	ในชิ้นเนื้อ , wax medium	แล้วทำการ embedded ใหม่
	4.2 ใบมีดเป็นรอย	4.2 เลื่อนใบมีด , แล้วลับใบมีดใหม่
	4.3 เกิดจากชิ้นเนื้อเอง เช่น	ให้หมดรอย
	สารแคลเซียม เป็นต้น	4.3 ควรใช้ใบมีดสำหรับตัด section
		จากชิ้นเนื้อประเภทนี้โดยเฉพาะ
5. Section ไม่ติดต่อเนื่อง	5.1 มุมเอียงของใบมีดไม่พอ	5.1 ปรับมุมเอียงของใบมีดใหม่
เป็นแถวยาว (ribbon)	ดี (มากไปหรือน้อยไปก็ได้)	5.2 เลื่อนใบมีดหาบริเวณคมใหม่ ,
	5.2 ใบมีดไม่คม	แล้วลับใบมีดใหม่
	5.3 คมมีดสกปรก	5.3ใช้แปรงขนอ่อนปัดทำความสะอาด
	5.4 wax medium แข็งไป	5.4 ตรวจดูคุณภาพของ wax เปลี่ยน
		แล้ว embedded
6. บางบริเวณของชิ้นเนื้อ	6.1 การ Trim block ยังไม่	6.1 Trim block เพิ่มอีกให้เต็มหน้าตัด
ในบล็อกหายไปไม่	เต็มหน้าตัดชิ้นเนื้อ	ชิ้นเนื้อ (deepper cut)
ปรากฏใน section	6.2 ชิ้นเนื้อหนามากเกินไป	6.2 ทำให้ชิ้นเนื้อบางลงแล้วนำไป
	ทำให้น้ำยาแทรกซึมไม่	Infiltration ใหม่ , embedded แล้วลอง
	ทั่วถึงโดย section เฉพาะ	Trim block ถ้าไม่ดีให้ re-processing
	บริเวณตรงกลาง	หรือตัดชิ้นเนื้อเพิ่ม
7. Section ติดซ้อนกัน	7.1 บล็อกชิ้นเนื้อไม่ขนาน	7.1 ปรับ block holder ใหม่
และม้วนขึ้น	กับใบมีด	7.2 Trim block ใหม่
	7.2 การ Trim block ยังไม่	7.3 เปลี่ยนมีด , ลับใบมีดให้คมใหม่
	เต็มหน้าตัด	7.4 ทำให้บางลง, ลอง infiltration
	7.3 ใบมีดไม่คม	ใหม่ถ้าไม่ดี re-processing

ตารางที่ 11 (ต่อ)

อุปสรรคที่เกิด	สาเหตุ	การแก้ไข
8. Section ตัดได้มีความ	8.1 สกรู , ที่จับยึด (clamp)	8.1 ตรวจเช็คแล้วทำให้แน่น
หนามาก	หลวมไม่แน่น	8.2 เปลี่ยนใบมีด , ลับใบมีดใหม่
	8.2 ใบมีดไม่คม	8.3 ต้องลดขนาดบล็อกชิ้นเนื้อลง
	8.3 บล็อกชิ้นเนื้อมีขนาด	แล้ว embedded ใหม่ ลองตัดดูใหม่
	ใหญ่เกินไป	8.4 ตรวจดูแล้วเปลี่ยน wax medium
	8.4 Wax medium แข็งมาก	ใหม่
	ไป (ผิดประเภทการใช้งาน)	8.5 แจ้งหน่วยซ่อมบำรุงรักษา, บริษัท
	8.5เครื่องตัดชิ้นเนื้อผิดพลาด	มาให้ตรวจเช็คและซ่อมแซมแก้ไข
	โดยเฉพาะเฟืองของ	
	ไมครอนสเกล	

เทคนิควิธีการตัด Tissue Block เพื่อให้ได้ Paraffin Section ที่ดีและบางตามต้องการ

1. ต้องปรับบล็อกชิ้นเนื้อให้อยู่ในแนวตรงตั้งฉากกับพื้นราบและขนานกับใบมีด

2. การใส่บล็อกชิ้นเนื้อใน block holder ของเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ควรสังเกตว่าลักษณะใดจะช่วยให้การตัด section ได้ง่ายขึ้นซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น ทั้งนี้ต้องฝึกหัดการตัดและสังเกตุการใส่บล็อกชิ้นเนื้อในลักษณะต่าง ๆ กันเปรียบเทียบดูผลจาการตัด section ที่ได้

3. ประสบการณ์การฝึกหัดมาก ๆ เพื่อให้เกิดความชำนาญในการตัด section เป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญมากของผู้ที่จะทำงานด้านนี้

4. การตัดแยก , แบ่งชิ้นเนื้อ (tissue) เพื่อทำ Paraffin Section โดยตัดขอบชิ้นเนื้อให้เรียบร้อยจะช่วยให้การตัด Paraffin Section ง่ายขึ้น

5. การทำรอยแนวบนบล็อกชิ้นเนื้อให้พอดีกับขนาดชิ้นเนื้อจะช่วยลดแรงดึงของ wax medium ด้านข้างและตัดได้ Paraffin Section เป็นแถบยาว (ribbon) ง่ายขึ้น

6. ประสิทธิภาพของเครื่องมือตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ต้องมีประสิทธิภาพและได้รับการดูแลรักษาอย่างถูกวิธีเป็นประจำสม่ำเสมอ

7. ใบมีดต้องคมไม่มีรอยบนคมมีดและสามารถใช้งานได้ตลอดแนวของคมมีดนั้น

8. การใช้ก้อนน้ำแข็งถูบริเวณชิ้นเนื้อในบล็อกให้เย็นขณะตัด จะช่วยให้ตัด section ได้ง่ายขึ้น

9. การหมุนเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ต้องหมุนในจังหวะสม่ำเสมอ ช้า – เร็วให้ดูจากประเภทของชิ้นเนื้อในบล็อกกล่าวคือ

9.1 Soft tissue ควรหมุน hand whell ช้า ๆ ไม่เร็วจะช่วยให้ได้ paraffin section บางและติดต่อกันเป็นแถบยาวได้ง่าย เช่น ชิ้นเนื้อที่ได้จากการขูด , ก้อนเลือด , ไต , ตับ และต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น และบางครั้งอาจจะต้องปรับมุมช่องว่าง (Clearance angle) ให้ต่างกับประเภทชิ้นเนื้อแข็ง ๆ ด้วย

9.2 ชิ้นเนื้อแข็ง (Hard tissue) ควรหมุน hand whell ให้เร็วกว่า Soft tissue และหมุนในจังหวะสม่ำเสมอไม่ออกแรงกระชากมือหมุน ชิ้นเนื้อประเภทนี้ ได้แก่ กล้ามเนื้อต่าง ๆ , ก้อนเนื้องอก , ผิวหนัง , ก้อนเต้านม

10. การลอย section (Floatation) ในอ่างน้ำร้อน ๆ ต้องระวังอย่าให้ผิดด้าน

6. การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Staining , Tissue Staining)

วัตถุประสงค์ : เพื่อเป็นการแยกส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์และชิ้นเนื้อเยื่อ (Tissue Structure) โดยอาศัยปฏิกิริยาของการติดสี ข้อกำหนดที่ควรปฏิบัติในการย้อมสี (Basic Staining Rules)

ข้อกำหนดต่าง ๆ ที่ควรปฏิบัติในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อต่อไปนี้ เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้การย้อมสีเป็นไปอย่างดีมีประสิทธิภาพและเป็นการรักษาสี, น้ำยา ไว้ใช้งานได้นาน ๆ ต่อไป

1. ปิดฝาภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้ใส่สีย้อมเมื่อเลิกใช้งาน

2. ควรกรองสี , น้ำยาก่อนใช้งาน เพราะสี น้ำยาบางอย่างทำให้เกิดตะกอนและสามารถแทรกเข้าไปในส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อได้

3. สไลด์ ที่นำออกมาจากตู้อบร้อน (hot air oven) ควรปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสัก (2 – 3 นาที) ก่อนที่จะนำมาย้อมสี (จุ่มลงใน xylene ของขั้นตอน deparaffinization) การจุ่มสีลงใน xylene ทันทีหลังจากนำสไลด์ออกจากตู้อบร้อน อาจทำให้เกิดผลเสียคือ section อาจจะแตก , แยกหรือหลุดจากผิวสไลด์ได้ง่าย

4. ขณะจุ่มสไลด์ใน xylene ของขั้นตอน deparaffinization เพื่อการละลายและดึง (remove) พวก wax medium ออกจาก section ในโถ xylene แรกสุดระดับน้ำยาต้องท่วมสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อนั้น

5. ขณะที่ย้อมสี (Staining) ระดับของสี , น้ำยาในภาชนะที่ใช้ย้อมต้องท่วมสไลด์

6. การยกสไลด์ออกจากโถน้ำยา , สี เพื่อย้อมชิ้นเนื้อต่อไปตามขั้นตอน ต้องปล่อยให้น้ำยาไหลกลับคืนสู่โถน้ำยาเดิมมากที่สุดโดยการแตะ , เอียงส่วนปลายของสไลด์กับโถน้ำยาเดิมนั้น เพื่อไม่ให้สิ้นเปลืองสี , น้ำยาโดยไม่จำเป็นและช่วยสี , น้ำยาโถต่อไปมีประสิทธิภาพในการติดสี , ใช้งานได้ตามกำหนดเวลาที่เหมาะสม

7. ตรวจสอบการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์และใช้ controle slide ด้วยเมื่อจำเป็นทุกครั้ง

8. ขณะปฏิบัติงานย้อมสีชิ้นเนื้อ พยายามหลีกเลี่ยงไม่ให้สีหรือน้ำยาสัมผัสผิวหนัง เพราะสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ และควรสวมเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานย้อมสี

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อ (Factors Influencing Staining Reaction) ปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปนี้ จะทำให้เกิดผลกระทบต่อปฏิกิริยาการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อ ขณะที่ย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อนั้นต้องคำนึงถึงและพิจารณาด้วยในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อคือ

1. ส่วนผสมหรือส่วนประกอบของน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ (The components of the fixative used) เนื่องจากสารเคมีหรือน้ำยาบางอย่างในส่วนประกอบของน้ำยา fixative นั้นจะช่วยให้การติดสีดียิ่งขึ้น (mordant) ซึ่งมีสาร , น้ำยามากมายที่มีคุณสมบัตินี้ ขึ้นอยู่กับวิธีย้อมสีชิ้นเนื้อซึ่งแตกต่างกันออกไปในแต่ละวิธี

2. สภาพความเป็นกรด – ด่างของน้ำยา Fixative (The pH of fixative) เพราะสภาพามเป็นกรด – ด่าง จะทำให้การติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไปในแต่ละวิธีการย้อมสี

3. สภาพความเป็นกรด – ด่างของสี , น้ำยาที่ใช้ในการย้อมสี (The pH of solutions)ในวิธีการย้อมสีบางวิธีจะพบว่าการติดสีของส่วนต่าง ๆ ในชิ้นเนื้อเยื่อจะติดสีได้ดีต้องในสีที่มีความเป็นกรด เช่น การย้อมสีตามวิธี ชิ้นเนื้อจะติดสีได้ดีในสภาพ Alcian blue (pH) เป็นกรดที่ระดับ 2.5 และ 1.0 เป็นต้น

4. สิ่งที่ช่วยในการติดสี (Mordants) เป็นสื่อที่จะให้การติดสีของเนื้อเยื่อถูกต้องครบถ้วนยิ่งขึ้น ซึ่งมีอยู่มากมายของแต่ละวิธีการย้อมสี

5. ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) ปฏิกิริยาทางเคมีที่เข้ามาเกี่ยวข้องในการติดสีของชิ้นเนื้อนั้น มีอยู่ 2 ปฏิกิริยาคือ

5.1 Oxidation reaction

5.2 Reduction reaction

ทั้ง 2 ปฏิกิริยาจะช่วยให้การติดสีของชิ้นเนื้อเป็นไปได้อย่างถูกต้องครบถ้วน ซึ่งแต่ละวิธีการย้อมสีจะใช้ปฏิกิริยานี้ต่างกันออกไป และสำคัญมากในการย้อมสีของวิธีนั้น ๆ

ปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนใหญ่แล้วจะปรากฏได้และมีผลกระทบมากต่อการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธีพิเศษ (Special stain) ส่วนในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีธรรมดา จะเกิดการเลือกใช้ fixative ที่เหมาะสม , สี Hematoxylin และวิธีปฏิบัติที่ถูกต้องมากกว่าปัจจัยอื่น ๆ

สิ่งที่ควรรู้เกี่ยวกับการย้อมสีโดยทั่ว ๆ ไป (General Staining Information)

สิ่งต่าง ๆ ต่อไปนี้ เป็นสิ่งที่ควรรู้เพื่อช่วยให้การย้อมสี ดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้องตามวิธีการแต่ละวิธี และช่วยให้มีความรู้ ความเข้าใจในเรื่องการย้อมสีชิ้นเนื้อดีมากยิ่งขึ้น ซึ่งได้แก่

1. การย้อมสีนั้น จะปฏิบัติได้โดยการจุ่มสไลด์ชิ้นเนื้อแช่ (soking) ลงไปในสี

2. สีที่เป็นด่างจะใช้ย้อมส่วนประกอบของชัยโตพลาสมา ของเซลล์ต่าง ๆ ในชิ้นเนื้อเยื่อ และสีที่เป็นกรดจะใช้ย้อมส่วนประกอบของนิวเคลียสของเซลล์ต่าง ๆ ในชิ้นเนื้อเยื่อ

3. การใช้สี 2 สีรวมกันหรือมากว่า 2 สี ก็ตาม ในการย้อมสีของแต่ละวิธี สีที่ใช้ย้อมรวมกันนั้นจะต้องเป็นสีที่ตัดกัน (contrasting colours)

4. เวลาที่ใช้ในการย้อมสี (length of time) การย้อมสีจะใช้ตั้งแต่ 2 – 3 วินาที จนถึง 24 ชั่วโมงหรือมากว่านั้น ตามวิธีการย้อมสีของแต่ละวิธีที่แตกต่างกันออกไป

5. สีที่ใช้งานนาน ๆ แล้ว ควรจะเพิ่มเวลาให้มากขึ้น เพื่อการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อได้ถูกต้องครบถ้วน

6. การเรียนรู้จากการปฏิบัติงานเป็นประจำสมาเสมอจะช่วยให้เราทราบว่าเทคนิคที่ดีของ

6.1 การย้อมสีแต่ละวิธีนั้น สี , น้ำยาที่ใช้ควรจะใช้งานย้อมสีได้นานเท่าใด จึงจะเลิกใช้และควรเพิ่มเวลาอีกมากเท่าใดในการย้อมสีเก่า (สีที่ถูกใช้งานแล้ว)

6.2 วิธีการย้อมสีที่สามารถใช้แทนกันได้ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต่าง ๆ ภายหลังการย้อมสี และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อการแปรผล อีกทั้งยังช่วยประหยัดสี , เวลาในการย้อมสีตามวิธีเก่า แต่ให้ผลในการย้อมสีเหมือนกันได้ด้วย

Technical term ต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ

คำศัพท์ซึ่งมีความหมายเฉพาะ เพื่อใช้ในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อตามวิธีการย้อมสีต่าง ๆ ที่ควรรู้และทำความเข้าใจ และนำไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง ขณะที่ทำการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ ได้แก่

1. Washing : หมายถึงการล้างสีให้ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องปฏิบัติภายหลังการย้อมสีหนึ่ง ๆ ก่อนย้อมสีต่อไปตามขั้นตอน ซึ่งอาจจะเป็นการล้างสีส่วนเกินต้องการไม่ให้ตกค้างในชิ้นเนื้อเยื่อ หรือเป็นการล้างสีเพื่อช่วยให้การติดสีต่อไปดียิ่งขึ้นและถูกต้องครบถ้วน (เป็น mordants ตามที่ต้องการก็ได้)

การล้างสีซึ่งเป็นการล้างบางส่วน สีเดิมยังคงติดชิ้นเนื้อเยื่อดีอยู่ และจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอน dehydration alcohol นี้ได้ ดังนั้นจะต้องคำนึงถึงสีเพื่อการนี้ด้วย (แต่สีจะไม่ละลายใน lsopropyl และ Absolute alcohol)

การล้างสี (washing) นี้ทำมากในวิธีการย้อมสีด้วยวิธีพิเศษ (special stain)

2. Dye solvents : ตัวทำละลายพบว่า น้ำจะเป็นตัวทำละลายได้ดีกว่า dilution alcohol (ethyl) ดังนั้นเราจะ dilution พวก alcohol ด้วยน้ำ และน้ำนั้นควรเป็นน้ำกลั่น (distilled water) และบางครั้งอาจจะต้องเติมสารพวกป้องกันเชื้อรา เช่น thymol ลงไปด้วย

3. Counterstaining : เป็นการย้อมสีทับสีเดิมลงไปอีก 1 สีหรือมากกว่านั้น โดยสีที่ใช้ย้อมทับสีเดิมนั้นจะต้องเป็นสีที่ตัดกัน (contrasting) กับสีเดิม เพื่อเป็นการเน้นส่วนของเนื้อเยื่อให้ชัดเจนแตกต่างกันออกไป ปกติจะเป็นการย้อมสีพื้น (background) และย้อมนิวเคลียส สีที่ใช้เป็นสี counterstaining นั้น มีมากมายขึ้นอยู่กับวิธีการย้อมสีนั้น ๆ สีที่ใช้เป็นสี counterstaining นั้นต้องติดสีชิ้นเนื้อเยื่อเร็ว ใช้เวลาน้อยและตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. Mordants : เป็นสื่อกลาง (Medium) ที่จะช่วยให้การติดสีถูกต้องครบถ้วนตามที่ควร ซึ่งถ้าขาด mordants ไป การติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อจะไม่ดีเท่าที่ควรหรือไม่ติดสีเลยก็ได้

การใช้ mordants นี้อาจใช้ในสีหรือน้ำยาตามลำพัง หรืออาจเป็นสารเป็นสารเคมีผสมอยู่ในสีก็ได้ เช่น mercury, ghromium , aluminium , iron ซึ่งอยู่ในรูปเกลือของโลหะหนัก สาร mordants นี้พบได้ในสีของ hematoxylin ในวิธีการย้อมสีวิธีธรรมดา คือเกลือของโลหะพวก aluminium , iron , tungstein และ lead นอกนั้นจะพบได้ในการย้อมสีพิเศษ (special stain) ในรูปของ secondary fixative และน้ำยา , สีของแต่ละวิธีการย้อมสีนั้น ๆ

5. Differentiation : เป็นการล้างสีส่วนเกินต้องการบางส่วนออกไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ เนื่องจากการวิธีการย้อมสีกำหนดให้ย้อมสีโดยติดสีเข้มไว้ก่อน แล้วล้างสีส่วนเกินภายหลัง ได้แก่การย้อมสีแบบ regressive staining ดังล้างสีส่วนเกินจะแตกต่างกันออกไปทั้งวิธีการย้อมสีด้วยวิธีธรรมกาและวิธีพิเศษ

วิธีธรรมดาใช้ 1% Acid alcohol เป็นตัว differentiated

วิธีพิเศษใช้ differentiated ต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวิธีการและวัตถุประสงค์การย้อมสีนั้น ๆ ภายหลังการ differentiation สีที่ต้องการยังคงติดคืออยู่กับชิ้นเนื้อเยื่อหรือส่วนประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อนั้น และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. Decolorization : ต่างกับ differentiation คือเป็นการล้างสีให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งภายหลังการ decolorization จะไม่มีสีหลงเหลือบนชิ้นเนื้อเยื่อเลย วิธีการนี้เราจะใช้สำหรับการย้อมสีชิ้นเนื้อใหม่ (restained) แต่ในการย้อมสีบางอย่าง ปฏิกิริยาบางปฏิกิริยาเมื่อเกิดขึ้นขณะย้อมสีแล้วคงไว้ ไม่สามารถย้อมสีใหม่ได้ คือ chemical reaction ดังนั้นสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมด้วยสีปฏิกิริยานี้แล้ว ไม่สามารถนำมาย้อมสีใหม่โดยการ decolorization ได้อีก

7. Control slide เป็นสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ผลบวก (positive) อยู่แล้ว และใช้ควบคู่กับการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้ออื่น ๆ (unknown) สำหรับตรวจสอบการย้อมนั้น คือ

7.1 ประสิทธิภาพของสี , น้ำยา ว่ายังใช้งานได้ดีอยู่หรือต้องเปลี่ยนใหม่ คือถ้าได้ผลลบ (negative) แสดงว่าสี , น้ำยานั้นใช้งานไม่ได้แล้วต้องเปลี่ยนใหม่

7.2 เทคนิควิธี ขั้นตอนของการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ ว่ามีการผิดพลาดทางเทคนิควิธีหรือข้ามขั้นตอนของการย้อมสีหรือไม่ ถ้า positive control slide ให้ผลลบ และไม่มีข้อผิดพลาด (error) จากสีและน้ำยาแล้วแสดงว่าเกิดจากเทคนิควิธีและขั้นตอนที่ไม่ถูกต้อง

การตรวจสอบเราจะใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบภายหลังการย้อมสีจาก control slide ซึ่งมีความสำคัญและจำเป็นมากสำหรับการย้อมด้วยวิธีพิเศษ (special stain) ที่มีเทคนิควิธีและขั้นตอนแตกต่างกันออกไป

ปฏิกิริยาในการติดสี (Staining Reaction) ปฏิกิริยาในการติดสีในงานย้อมสีชิ้นเนื้อเป็นสิ่งที่ควรรู้และเข้าใจ เพื่อนำไปใช้ในการปฏิบัติงานย้อมสีได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพซึ่งมีอยู่ 5 ปฏิกิริยาด้วยกันคือ

1. Direct Staining : เป็นปฏิกิริยาในการติดสีโดยอาศัยคุณสมบัติของสี ซึมแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อเยื่อขณะจุ่มชิ้นเนื้อลงในสีนั้นและเมื่อชิ้นเนื้อติดสีแล้วจะไม่เปลี่ยนไปติดสีอื่นอีกภายหลัง

2. Indirect Staining : เป็นปฏิกิริยาที่ต้องอาศัยตัวกลาง , สื่อ ที่เรียกว่า mordants ช่วยในการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งปกติเป็นสารพวกโลหะหนัก

3. Physical Staining : เป็นปฏิกิริยาการละลายตัวของสีอย่างง่ายในส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของสีที่ใช้ย้อมกับส่วนประกอบของเซลล์ในเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเท่านั้น เช่น สีที่ใช้ย้อมไขมันจะละลายตัวได้ดีแล้วทำให้ไขมันในเนื้อเยื่อติดสีขึ้นแต่จะไม่ละลายในส่วนประกอบอื่นๆ ของเนื้อเยื่อ

4. Chemical Staining : เป็นปฏิกิริยา oxidation และ reduction ที่ช่วยให้การติดสีเป็นไปได้อย่างถูกต้องครบถ้วน ขณะย้อมสี เช่น Periodic – acid Schiff's reaction ตัว oxidation ช่วยในการติดสีของ Schiff's reagent คือ 1 % Periodic acid solution และใน Reticulum stain ตัว reducing agent ช่วยให้สีน้ำตาลดำของ Reticulum stain ติดสีชัดเจนขึ้น คือ 1 % Reducing solution เป็นต้น

5. Absorption Phonomena : เป็นปฏิกิริยาการติดสีเฉพาะสารประกอบพื้นผิวภายนอก (surface substance) ของเซลล์ในเนื้อเยื่อกับสีที่ใช้ย้อม เช่น เนื้อเยื่อที่เป็นด่างจะดูดซับสีที่เป็นกรด (electrical attraction) ซึ่งเป็นการดูดซับระหว่าง Certain icon กับส่วนประกอบพื้นผิวนอก (surface substance) ของเนื้อเยื่อ

วิธีการย้อมสี (Staining Method)

วิธีการย้อมสีโดยทั่ว ๆ ไปแล้ว แบ่งได้ 3 กลุ่มคือ

1. Vital Staining
2. Routine Staining
3. Special Staining

1. Vital Staining : คือการย้อมสีที่ใช้กับสิ่งมีชีวิต (living tissue) โดยการฉีดสีเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลองหรือผสมสีกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (living cells) ส่วนใหญ่ใช้ในงานวิจัย (research)

2. Routine Staining : เป็นการย้อมสีที่นิยมใช้กันมากสำหรับชิ้นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา โดยใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (standrad) สำหรับย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นการศึกษาความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะ วิธีการย้อมสีซึ่งเป็นวิธมาตรฐาน คือ วิธี Haematoxylin and Eosin Stain

3. Special Staining : เป็นวิธีการย้อมสีที่เลือกใช้สำหรับการศึกษาสาเหตุของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นโดยเฉพาะว่ามาจากสิ่งใดหรือสาเหตุใด เช่นการย้อมดูแบคทีเรีย , เชื้อรา , สิ่งที่เซลล์สร้างขึ้น (Particular cell products) หรือสิ่งที่อยู่ในเซลล์ระหว่างเซลล์ เป็นต้น

ลักษณะการติดสีในชิ้นเนื้อเยื่อ (Type of Staining) เพื่อเป็นการปฏิบัติให้ถูกต้องขณะย้อมสีว่า การติดสีของชิ้นเนื้อเยื่ออยู่ในลักษณะที่ติดสีพอดีหรือติดสีมากเกินไป และต้องมีวิธีการ differentiation ตามมาภายหลังการย้อมหรือไม่ ซึ่งลักษณะการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อ มี 2 แบบ คือ

1. Regressive Staining : ลักษณะการติดสีแบบนี้เป็นการย้อมสีให้ติดชิ้นเนื้อเยื่อ โดยให้ติดสีส่วนที่ต้องการเข้มมากกว่าส่วนอื่น แล้วล้างสีส่วนเกินต้องการออกจากชิ้นเนื้อโดยการ differentiation ซึ่งตรวจสอบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ทุกครั้งภายหลังการล้างสีส่วนเกินต้องการนั้น

2. Progressive Staining : ลักษณะการติดสีแบบนี้แตกต่างจากแบบ regressive คือ เป็นการย้อมสีส่วนที่ต้องการในชิ้นเนื้อเยื่อให้ติดสีพอดีและส่วนที่ไม่ต้องการจะไม่ติดสีที่ใช้ย้อมนั้น ดังนั้น จะไม่มีการ differentiation ตามมาภายหลังการย้อมสี ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาในการติดสีต่าง ๆ ของส่วนประกอบต่าง ๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมีคุณสมบัติในการติดสีต่างกันออกไป

ขั้นตอนในการย้อมสี (Staining Step)

เราต้องรู้และทำความเข้าใจถึงขั้นตอนต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง และบรรลุตามวัตถุประสงค์ของการย้อมสีวิธีนั้น ๆ

การย้อมสีต้องเรียงลำดับตามขั้นตอนไม่ข้ามขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง และต้องรู้ด้วยว่าในแต่ละขั้นตอนมีจุดมุ่งหมายอย่างไรในการปฏิบัติต่อชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์

ขั้นตอนในการย้อมสีชิ้นเนื้อ ประกอบด้วยขั้นตอนใหญ่ที่สำคัญ ๆ ดังนี้

1. Deparaffinization
2. Hydration
3. Staining
4. Dehydration Clearing Mounting

1. Deparaffinization

1.1 วัตถุประสงค์ : เป็นขั้นตอนที่ต้องการละลายหรือดึง (removed) พวก wax medium ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ ก่อนการย้อมสีเพราะว่า wax medium เหล่านี้จะเคลือบเซลล์และส่วนอื่น ๆ ของเนื้อเยื่อไว้ไม่ให้ติดสีที่ใช้ย้อม ดังนั้นจึงเป็นขั้นตอนแรกของการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จาก paraffin section

1.2 น้ำยาที่ใช้ (Reagents) : ส่วนใหญ่เราจะใช้ Xylene เป็นตัวละลายหรือดึง wax medium ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ

1.3 จำนวนโถน้ำยา (Dish) : ควรใช้ Xylene จำนวน 2 โถ เพื่อประสิทธิภาพในการละลายหรือดึง wax medium ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ

1.4 เวลาที่ใช้ (Time) : ใช้เวลาโถละ 3 – 5 นาทีเป็นอย่างน้อย , รวม 5 – 10 นาที สำหรับขั้นตอนนี้

1.5 ข้อควรระมัดระวัง (Precaution) : ต้องระมัดระวังดังนี้

1.5.1 สไลด์ที่นำออกจากตู้อบร้อน ต้องทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักพักหนึ่ง (2-3 นาที) ก่อนจุ่มในน้ำยา xylene โถแรกสุด

1.5.2 ระดับของน้ำยา xylene ต้องท่วมขอบของสไลด์ขณะที่จุ่มแช่ในน้ำยานั้นเพื่อให้ wax medium ถูกละลายหรือดึงออกไปหมด

2. Hydration :

2.1 วัตถุประสงค์ : เป็นการล้าง xylene ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อและเตรียมนำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อลงสู่น้ำเพื่อการย้อมสี

2.2 น้ำยาที่ใช้ (Reagents) : ใช้ Dehydrants ต่าง ๆกันโดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นสูง (high หรือ pure concentrate dehydrants ซึ่งปราศจากน้ำและดึง xylene ออกโดยการเข้าไปละลายและแทนที่ xylene ได้ดี) ไปสู่ความเข้มข้นต่ำ (low concentrate dehydrants) ส่วนใหญ่ใช้ Ethyl alcohol โดยเริ่มจาก Absolute (Isopropyl) alcohol , มาหา 95% alcohol (ไม่ใช้ Acetone เนื่องจากละลายสีย้อมบางชนิดได้)

2.3 จำนวนโถน้ำยา (Dish) : ควรใช้ Absolute (Isopropyl) alcohol จำนวน 2 โถ และ 95% alcohol จำนวน 2 โถเพื่อประสิทธิภาพในการ hydrate

2.4 เวลาที่ใช้ : ควรใช้เวลาโถละ 1 – 2 นาที , รวม 4 – 8 นาที สำหรับขั้นตอนนี้

2.5 ข้อควรระมัดระวัง (Precaution) : ต้องระมัดระวังในสิ่งต่อไปนี้

2.5.1 Dehydrants ที่ใช้ ต้องเรียงลำดับความเข้มข้นให้ถูกต้อง (จากสูงไปหาต่ำ)

2.5.2 การล้างรงควัตถุ , ผลึกหรือตะกอนของน้ำยา fixative ที่ใช้ในการ fixed ชิ้นเนื้อเยื่อ ถ้าจำเป็นต้องกระทำต่อจากขั้นตอน hydration นี้ ก่อนการย้อมสี (ดูเรื่องการล้างรงควัตถุ , ผลึกหรือตะกอนของ fixative ในบทก่อนหน้านี้

3. Staining :

3.1 วัตถุประสงค์ : เป็นการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ ซึ่งมีวิธีการแตกต่างกันออกไปทั้งวิธีธรรมดา (routine stain) และวิธีพิเศษ (special stain) และภายหลังการย้อมสีแล้วชิ้นเนื้อเยื่อจะต้องติดสีย้อมเสมอ ถ้าไม่ติดต้องค้นหาสาเหตุและแก้ไขทันที อย่าปล่อยไป

3.2 สีที่ใช้ : ต่างกันออกไปทั้งในวิธีธรรมดาและวิธีพิเศษ ซึ่งมีอยู่มากมาย ซึ่งต้องเลือกใช้และปฏิบัติให้ถูกต้องตามขั้นตอนของวิธีการย้อมสีนั้น ๆ

3.3 จำนวนโถน้ำยา : ขึ้นอยู่กับจำนวนสีที่ใช้ย้อมชิ้นเนื้อของแต่ละวิธีการจะไม่เท่ากัน

3.4 เวลาที่ใช้ : ใช้เวลาตั้งแต่ 2 – 3 วินาที จนถึง 24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ย้อมสี

3.5 ข้อควรระมัดระวัง (Precaution) : ต้องระมัดระวังในสิ่งต่อไปนี้

3.5.1 ปฏิบัติตามกฎข้อกำหนดในการปฏิบัติงานย้อมสี (Basic staining rules) อย่างเคร่งครัด

3.5.2 อย่าเร่งเวลาในการย้อมสีชิ้นเนื้อ ให้ปฏิบัติตามเวลาที่กำหนดในแต่ละวิธีการย้อมสีนั้น ๆ

3.5.3 ตรวจสอบเทคนิควิธี , น้ำยาและสีย้อมด้วย control slide และใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบทุกครั้ง ภายหลังสิ้นสุดการย้อมสี

3.5.4 มีปัญหาในการติดสีของชิ้นเนื้อเยื่อต้องค้นหาสาเหตุให้พบแล้วรีบแก้ไขทันที

3.5.5 ต้องเตรียมน้ำยา , สีย้อมที่ใช้งานเมื่อใกล้จะหมด ไม่ควรเตรียมแล้วรีบนำมาใช้งาน ยกเว้นในวิธีการเตรียมน้ำยา , สี ระบุว่าให้ใช้งานได้ทันที

3.5.6 สีเก่าที่นำมาใช้งานควรเพิ่มเวลาในการย้อมสีให้มากขึ้นกว่าสีที่เปลี่ยนใหม่

3.5.7 หลีกเลี่ยงการสัมผัสน้ำยา , สีโดยตรงกับผิวหนัง เพราะสี , น้ำยาบางชนิดระคายเคืองต่อผิวหนังได้

4. Dehydration :

4.1 วัตถุประสงค์ : เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจากน้ำ ซึ่งเกิดจากสีที่ใช้ย้อมชิ้นเนื้อเยื่อก่อนที่นำไปทำให้ใส (clearing)

4.2 น้ำยาที่ใช้ : ใช้ dehydrants ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยเรียงลำดับความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง (หลักการเดียวกับการ dehydration ในการเตรียมชิ้นเนื้อ) ส่วนใหญ่ใช้ ethyl alcohol โดยเริ่มจาก 95% alcohol ไปหา absolute (Isopropyl) alcohol

4.3 จำนวนโถน้ำยา : ควรใช้ 95% alcohol จำนวน 2 โถ , absolute (Isopropyl) alcohol จำนวน 2 โถเพื่อประสิทธิภาพในการ dehydrate

4.4 เวลาที่ใช้ : ประมาณโถละ 1 – 2 นาที ในการย้อมปกติ แต่ถ้าย้อมสีละลายได้รวดเร็วใน 95% alcohol ต้องใช้เวลาเร็วกว่านี้หรือโดยการจุ่มน้ำยาเร็ว ๆ แทนก็ได้

4.5 ข้อควรระมัดระวัง (Precaution) : ต้องระมัดระวังในสิ่งต่อไปนี้

4.5.1 สีบางอย่าละลายได้ใน 95% alcohol ดังนั้นต้องใช้เวลาสั้นลงในการจุ่มในโถน้ำยา แต่ต้องแน่ใจว่าการ dehydrants ได้ผลด้วย และควรเพิ่มเวลาย้อมสีให้ติดสีเข้มมากขึ้นเผื่อการละลายขณะจุ่มใน 95% alcohol ด้วย

4.5.2 ความชื้นและละอองน้ำในอากาศบริเวณนั้น โดยเฉพาะฤดูฝนตกชุก จะทำให้ประสิทธิภาพของ dehydrants ด้อยลง และต้องทำให้เปลี่ยนน้ำยาใหม่บ่อย ๆ ควรปิดฝาภาชนะขณะที่ย้อมสไลด์และเมื่อย้อมสไลด์แล้ว

4.5.3 ประสิทธิภาพของ dehydrants ด้อยลง คือไม่สามารถดึงน้ำยาออกจากชิ้นเนื้อเยื่อได้หมดจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีสีขุ่นมัวเมื่อจุ่มลงใน xylene (โถแรกในการ clearing) และตัวน้ำยา xylene เองก็ไม่ใส มีสภาพขุ่นมัวไปด้วย ซึ่งต้องแก้ไขทั้ง dehydrants และ xylene โถแรกโดยการเปลี่ยนใหม่

4.5.4 อย่าจุ่มสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อเร็วมากเกินไป เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงสีถูกละลายออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ ควรใช้เวลาในการย้อมสีเพิ่มแทนให้ชิ้นเนื้อเยื่อติดสีเข้มกว่าปกติ เผื่อการละลายของสีใน 95% alcohol การจุ่มเร็ว ๆ อาจทำให้การ dehydration ไม่ดีพอและน้ำไม่หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์นั้น ๆ ได้ อีกทั้งมีผลต่อการ clearing และไม่สามารถแปรผลได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.5.5 อย่าเรียงโถน้ำยาโดยลำดับเข้มข้นผิด เพราะจะทำให้การ dehydration ไม่เกิดผลแต่อย่างใด

5. Clearing

5.1 วัตถุประสงค์ : เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจาก dehydrants ต่าง ๆ และพร้อมกันนั้นจะเป็นสื่อนำและต้องละลายเข้ากันได้ดีกับ mounting medium ในการ mounting ต่อจากขั้นตอน clearing นี้ด้วย

5.2 น้ำยาที่ใช้ : ใช้ xylene ซึ่งเป็น clearing agent เช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นเนื้อเนื่องจาก xylene สามารถดึงพวก ethyl alcohol ที่ใช้เป็นตัว dehydrant ได้ดี อีกทั้งยังสามารถเป็นสื่อนำและละลายเข้ากันได้ดีกับ permount ที่ใช้เป็น mounting medium

5.3 จำนวนโถน้ำยา : ควรใช้ xylene 3 โถในการ clearing (ถ้าใช้ 2 โถประสิทธิภาพการ clear อาจไม่ดีเท่าที่ควร)

5.4 เวลาที่ใช้ : ประมาณโถละ 2 – 3 นาที เพื่อให้ xylene ทำการ clear พวกแอลกอฮอล์จากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ได้หมด เวลาที่ใช้ใน xylene โถสุดท้ายก่อน mounting จะไม่จำกัดเพื่อการ clearing ที่ดี และ xylene ไม่ละลายสีออกจากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์อีกด้วย

5.5 ข้อควรระมัดระวัง : ควรระมัดระวังในสิ่งต่อไปนี้

5.5.1 สไลด์ชิ้นเนื้อต้องผ่านการ dehydration มาอย่างดีแล้ว สังเกตจากที่นำสไลด์จุ่มลงใน xylene โถแรก จะต้องไม่ทำให้น้ำยา xylene นั้นขุ่น มัว มีสีขาวเกิดขึ้น

5.5.2 ระดับน้ำยาของ xylene ในโถน้ำยาต้องท่วมขอบบนของสไลด์ตลอดทุกโถ

6. Mounting

6.1 วัตถุประสงค์ : เพื่อเป็นการช่วยในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ง่ายและสะดวก เห็นภาพได้ชัดเจนถูกต้องตามจริง และยังเป็นวิธีการเก็บรักษาสไลด์ชิ้นเนื้อได้นาน ๆ หลายปี (permanent slide)

6.2 วิธีการ Mount สไลด์ : โดยการนำเอาแผ่นกระจกบาง ๆ (cover glass) ที่มีขนาดใหญ่กว่าชิ้นเนื้อเล็กน้อยปิดทับลงบนชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์โดยใช้ mounting medium ช่วยยึดแผ่น cover glass ให้ติดแน่นกับสไลด์ตลอดไป (permanent slide)

6.3 ลักษณะการ mount : ทำได้หลายวิธี วิธีที่ง่าย คือ หยด mounting medium ลงบนขอบสไลด์ใกล้ ๆ ชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วปิดทับด้วย cover glass ที่มีขนาดปิดชิ้นเนื้อเยื่อนั้นได้หมด ออกแรงกดลงบนแผ่น เล็กน้อย เพื่อให้ติดแน่นยิ่งขึ้น และเป็นการไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นออกไปให้หมด เช็ดทำความสะอาดคราบmounting medium เป็นการเสร็จการ mount

6.4 Mounting medium : เป็นตัวกลางที่ใช้ยึดเกาะแผ่น cover glass ให้ติดแน่นกับแผ่นสไลด์ชิ้นเนื้อป้องกันไมให้ชิ้นเนื้อเยื่อหลุดจากสไลด์และเก็บรักษาสไลด์ได้นาน ๆ

: Mounting medium ต้องมีคุณสมบัติที่ดีเหมาะสมกับการใช้งาน mount แต่ละประเภท อีกทั้งต้องละลายเข้ากันได้ดีกับ clearing agent สำหรับ permanent mount

6.4.1 ลักษณะและคุณสมบัติของ Mounting medium ที่ดีสำหรับการทำ permanent mount ต้องมีลักษณะและคุณสมบัติดังนี้

1. ยึดเกาะแผ่น cover glass ให้ติดแน่นกับสไลด์ได้ตลอดไป
2. ต้องแห้งเร็ว
3. ไม่เปลี่ยนดัชนีหักเหของแสง (refractive index) ช่วยให้ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ถูกต้องไม่ผิดไปจากความจริง
4. เป็นตัวกลางโปร่งใส
5. ไม่ละลายสีที่ย้อมชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์หรือทำให้สีนั้นซีดหรือจางลง
6. มีสภาพเป็นกลาง (pH ประมาณ 6.8 – 7.0)

6.4.2 ประเภทของ Mounting medium : เราแบ่งประเภทของ Mounting medium ตามลักษณะการใช้งานดังนี้

1. เพื่อเก็บเป็นสไลด์ถาวร (Permanent mount) : เป็นการเก็บสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นได้เป็นเวลานาน ๆ หลายปี และสไลด์จะต้องผ่านการ dehydrate , clearing ก่อน ก่อนทำการ Mount

Mounting medium ที่ใช้มี 2 ชนิด

1.1 Natural resins : เป็น Mounting medium ที่ได้จากธรรมชาติ ทำมาจากยาง (resin) ของต้นไม้ เช่น Canada balsum , Gum dammar

: จะมีสีเหลือง และสีจะเข้มขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน ๆ

: pH ของ resin นี้ มีทั้งกรดและด่าง

: ไม่ค่อยนิยมใช้กันในการ mounting ของงานย้อมสี เนื่องจากกัดสีชิ้นเนื้อเยื่อให้ซีดจางลงได้

1.2 Synthetic resins : เป็น Mounting medium ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น มีสภาพ pH เป็นกลาง ไม่เปลี่ยนสีย้อมชิ้นเนื้อเยื่อสามารถเก็บได้นาน ๆ มี melting ของงานย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไปในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อความมุ่งหมายอื่น (Specific- purpose) : เป็นการ mounting สไลด์ชิ้นเนื้อ เพื่อความมุ่งหมายอื่น ตามวิธีการย้อมสีบางวิธีการโดยเฉพาะเพื่อช่วยให้การตรวจแปลผลด้วยกล้องจุลทรรศน์กระทำได้ง่ายสะดวก ไม่ใช้การทำเป็น Permanent mount, Mounting medium ประเภทนี้ส่วนใหญ่จะเป็น Water soluble Mounting medium

ในการย้อมสีวิธีพิเศษบางวิธีเท่านั้นที่ใช้ Mounting medium แบบนี้ เช่น Fat stain ใช้ Glycerine jelly เป็น mounting medium , Crystal violet stain ใช้น้ำกลั่น (distilled water) เป็น Mounting medium เป็นต้น

อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสี (Staining Equipment)

เราต้องจัดเตรียมหาอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้พร้อมก่อนการย้อมสี ซึ่งจะต้องพิจารณาจากปริมาณงานชิ้นเนื้อที่จะต้องปฏิบัติในแต่ละวันเป็นเกณฑ์ แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้งาน

อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการย้อมสีที่จำเป็นต้องจัดหามาและเตรียมไว้เพื่อการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อมีดังนี้

1. โถใส่น้ำยา สี พร้อมฝาปิด (Staining dish with cover)
2. ที่ใส่สไลด์สำหรับการย้อมสีพร้อมหูจับ (Staining rack with holder)
3. ปากคีบสำหรับจับสไลด์ (Slide forcep)

4. ผ้าสะอาด
5. ถาดใส่สไลด์หรือกล่องใส่สไลด์ (Slide tray or slide box)
6. ตู้เก็บสไลด์ (Slide cabinet)
7. ขวดแก้วใส่น้ำยา สีย้อมชนิดต่าง ๆ (Glass bottle)

1. โถใส่น้ำยา สี พร้อมฝาปิด (Staining dish with cover) มีทั้งชนิดเป็นแก้วและสเตนเลส ซึ่งทนทานต่อสภาพกรด – ด่างของน้ำยา, สีได้ดี มีหลายขนาด การเลือกใช้งานต้องเลือกให้มีขนาดพอดีกับ Staining rack แต่ในกรกณีย้อมสไลด์จำนวนน้อย เราอาจใช้โถที่มีขนาดความจุน้อยก็ได้ เช่น

1.1 Mc.Junkin dish เป็นโถเล็กๆ มีความจุน้ำยาประมาณ 10 – 15 ml. ใช้ย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อได้ประมาณ 5 – 6 แผ่น

1.2 Coplin jar เป็นโถแก้วมีความจุน้ำยาประมาณ 50 ml. ใช้ย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อได้ประมาณ 8 – 9 แผ่นทั้ง 1.1 และ 1.2 ส่วนใหญ่ใช้ในการย้อมสีวิธีพิเศษ

2. ที่ใส่สไลด์สำหรับการย้อมสีพร้อมหูจับ (Staining rack with holder) มีหลายขนาดต่าง ๆ กันตามปริมาณความจุสไลด์ มีทั้งชนิดเป็นแก้วและเป็นสเตนเลส

2.1 แบบเป็นแก้ว (Glass rack) แบบนี้จะมีความจุสไลด์ได้ประมาณ 18 – 19 สไลด์ต่ออัน และใช้กับ Staining dish ขนาดความจุประมาณ 400 ml.

2.2 แบบเป็นสเตนเลส (Stainiess rack) แบบนี้จะมีความจุสไลด์ 2 ขนาดคือ

1. ขนาดจุสไลด์ได้ 30 แผ่น จะใช้กับโถขนาดความจุประมาณ 800 ml.
2. ขนาดจุสไลด์ได้ 50 แผ่น จะใช้กับโถขนาดความจุประมาณ 1,000 ml.

ไม่ว่าจะเลือกใช้แบบใดก็ตาม ควรพิจารณาจากปริมาณงานที่ทำสไลด์เป็นหลักและการซื้อควรซื้อพร้อมหูจับ (rack holder) ซึ่งทำให้สะดวกเวลาเคลื่อนย้าย rack ขณะย้อมสี

3. ปากคีบสำหรับจับสไลด์ (Slide forcap) เป็นปากคีบสแตนเลส ส่วนปลายปากมักมีลักษณะแบนราบเรียบคล้ายปากเป็ดใช้สำหรับจับสไลด์โดยเฉพาะ

4. ผ้าสะอาด : ใช้สำหรับทำความสะอาดสไลด์ก่อน Mount ซึ่งใช้เช็ดคราบสี เศษชิ้นเนื้อที่ไม่ต้องการ ออกจาสไลด์

5. ถาดใส่สไลด์หรือกล่องใส่สไลด์ (Slide tray or Slide box)

5.1 ถาดใส่สไลด์ เป็นถาดพลาสสติกหรือสแตนเลสที่ใช้วางสไลด์ชิ้นเนื้อภายหลังการย้อมสี มีความจุได้ประมาณ 20 แผ่นต่อถาด

5.2 กล่องใส่สไลด์ ส่วนใหญ่เป็นพลาสติก ภายในแบ่งเป็นช่องเล็กขนาดใส่สไลด์ได้พอดี ความจุมีทั้ง 25 แผ่น และ 100 แผ่น ต่อกล่อง ใช้เก็บสไลด์ได้เป็นหมวดหมู่หรือเก็บไว้สำหรับสอน

6. ตู้เก็บสไลด์ (Slide cabinet) ส่วนใหญ่จะเป็นตู้ไม้ มีลิ้นชัก แต่ละลิ้นชักจะมีช่องใส่สไลด์ได้พอดี ใช้เก็บสไลด์ปกติ โดยเก็บไว้นานหลาย ๆ ปี ขนาดของตู้ก็แล้วแต่ผู้ใช้

การย้อมสีชิ้นเนื้อในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา (Tissue Staining in the Histopathological laboratory)

การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา ที่ปฏิบัติกันเป็นมาตรฐานทั่ว ๆ ไป มีทั้งการย้อมสีวิธีธรรมดา (routine stain) และวิธีพิเศษ (special stain) ซึ่งทั้ง 2 วิธี มีวิธีปฏิบัติการที่แตกต่างกันออกไปอย่างมากในการปฏิบัติเพื่อการแปรผลทางพยาธิวิทยานั้น เราต้องย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธีธรรมดาก่อน เมื่อแปลผลได้ไม่ชัดเจนจึงจะอาศัยการย้อมสีวิธีพิเศษ ช่วยในการแปรผลตามมาภายหลัง

การย้อมสีวิธีธรรมดา (Routine stain)

เป็นการย้อมสีที่ใช้เป็นมาตรฐาน ในการแปรผลสไลด์ชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา และจะใช้เป็นวิธีปฏิบัติกันอย่างเป็นประจำในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธีธรรมดา ที่นิยมปฏิบัติกันเป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ คือวิธี Hematoxylin และ Eosin (Hematoxylin and Eosin stain) ซึ่งมีวิธีโดยเรียงลำดับขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 12 Hematoxylin and Eosin stain

ขั้นตอน	น้ำยา , สีที่ใช้	เวลา	ผลต่อชิ้นเนื้อ
1. Deparraffinization	1.1 xylene	3 – 5 นาที	- ละลาย , ดึง wax medium
	1.2 xylene	3 – 5 นาที	ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์
2. Hydration	2.1 Absolute	1 – 2 นาที	- ล้าง xylene ออกจากชิ้น
	alcohol (Isopropyl		เนื้อเยื่อและเตรียมตัวลงสู่น้ำ
	alcohol)		เพื่อการย้อมสี
	2.2 95 % alcohol	1 – 2 นาที	

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ขั้นตอน	น้ำยา , สีที่ใช้	เวลา	ผลต่อชิ้นเนื้อ
*Note A	- Harris's	5 - 15 นาที	- ย้อมสีนิวเคลียสโดยให้ติดสี
3. Staining	hematoxylin	เปลี่ยนน้ำยา	เข้มมากกว่าส่วนอื่น
3.1 Regressive	- Tap water,	หลาย ๆ ครั้งหรือ	- ให้นิวเคลียสติดสีน้ำเงินมาก
staining	running	แช่ในน้ำประปา	ยิ่งขึ้น
	- 1% Acid alcohol	ไหล	- ล้างสีส่วนเกินของ
	(Differentiation)	จุ่ม 3 – 10 จุ่ม	hematoxylin ออกจากชิ้น
	- Tap water ,	เปลี่ยนน้ำยา	เนื้อเยื่อตรวจสอบด้วยกล้องฯ
	Running	หลาย ๆ ครั้งหรือ	ส่วนที่เป็นนิวเคลียสติดสีน้ำ
	- Saturated	แช่ในน้ำปะปา	เงิน ส่วนอื่นไม่ติดสี
	Lithium carbonate	ไหล 1- 2 นาที	- เป็นการ neutralized
	- Tap water,	จนสีน้ำเงินชัดเจน	bluing โดยผ่านชิ้นเนื้อ
	- Mayer's	ขึ้น 3 – 5 นาที	น้ำยานี้
	haematoxylin	10 – 20 นาที	- ตรวจสอบด้วยกล้อง
	- Tap water ,	- ล้างในน้ำประปา	จุลทรรศน์ นิวเคลียสต้องติด
	running	ไหล 5 นาที	สีน้ำเงินเข้ม (dark blue)
	- Saturated	จนกระทั่งสีน้ำเงิน	ส่วนอื่นไม่ติดสีเลย
	Lithium carbonate	ชัดเจนขึ้น	- ย้อมนิวเคลียสโดยติดสี
	- Tap water ,	2 – 3 นาที	เฉพาะนิวเคลียสเท่านั้น ส่วน
	running		อื่นไม่ติด
			- ให้นิวเคลียสติดสีน้ำเงินได้
			เร็วขึ้น
			- เป็นการทำให้นิวเคลียสติด
			สีน้ำเงินชัดเจนมากยิ่งขึ้น
			- ล้าง Lithium Carbonate
			ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อและเตรียม
			ย้อมสีต่อไป
3.2 Progressive	Working eosin	30 วินาที - 1 นาที	- ตรวจสอบด้วยกล้องต่อไป

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ขั้นตอน	น้ำยา , สีที่ใช้	เวลา	ผลต่อชิ้นเนื้อ
staining			- เป็นการย้อมสีส่วน
3.1 และ 3.2 เลือก			ประกอบที่เหลือ (ซัยโต
อย่างใดอย่างหนึ่ง			พลาสมาและส่วนประกอบ
3.3 Counterstaining			อื่น ๆ)
4. Dehydration	4.1 95 % alcohol	½ - 1 นาที	เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อปราศ
	4.2 95 % alcohol	½ - 1 นาที	จากน้ำ (และสีส่วนเกิน)
	4.3 Absolute		
	(Isopropyl) –		
	alcohol		
	alcohol		
5. Clearing	5.1 xylene	1-2 นาที	เป็นการ clearing dehydrants
	5.2 xylene	1-2 นาที	ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ
	5.3 xylene	2-5 นาที	และเตรียมพร้อมที่จะทำการ
			Mounting
6. Mounting	Synthetic resin		ทำเป็น permanent mount
	(permount)		เพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลที่ได้จากการย้อม : - นิวเคลียส - ติดสีน้ำเงิน (blue) ของ hematoxylin

ซัยโตพลาสมา – ติดสีส้ม – แดง (orange , red) ของ resin *Note A : เมื่อสิ้นสุดขั้นตอน Hydration ถ้าจำเป็นต้องล้างตะกอนของน้ำยา fixative ที่เป็น primery หรือ secondary fixative ก็ตาม ให้ทำการล้างตะกอนต่อจากขั้นตอนนี้ได้ ก่อนที่จะนำไปย้อมสีต่อไป ทั้งวิธีธรรมดาและวิธีพิเศษ

การล้างตะกอนนอกจากชิ้นเนื้อเยื่อจะมีวิธีปฏิบัติแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำยา fixative ที่ทำให้เกิดตะกอนนั้น (ดูเรื่องการล้างตะกอน , รงควัตถุออกจากชิ้นเนื้อเยื่อในบทก่อนหน้านี้)

สี Haematoxylin และสีที่ใช้เป็น Counterstaining

เป็นการจำเป็นต้องทำความข้าใจกับสี haematoxylin ที่ใช้ในการย้อมสีแบบ regressive และ progressive เพราะมีวิธีการเตรียมสี วิธีย้อมที่ต่างกันออกไป

สีที่ใช้เป็น counterstaining ก็เช่นกันต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของสี Haematoxylin ที่เลือกใช้ด้วยเพราะใช้ไม่เหมือนกัน

Hematoxylin

1. แหล่งที่ได้มา source : ได้จากการสกัดจากแก่นไม้ (heartwood) ที่ชื่อ Hematoxylin Campechianum จนได้สาร hematoxylin

2. การติดสี (Stain) : ตัวมันเองไม่สามารถทำให้เกิดการติดสีได้ ตังที่ทำให้เกิดการติดสีคือสาร hematoxylin ที่ได้จากการ oxidation สาร hematoxylin ซึ่งการ oxidized ทำได้ 2 วิธี คือ

1. โดยวิธีธรรมชาติ (Natural oxidation) เป็นการบ่ม (ripening) โดยใช้แสงและอากาศตามธรรมชาติ วิธีนี้ต้องใช้เวลานาน บางครั้งอาจใช้เวลาถึง 3 – 4 เดือน สี hematoxylin ที่เตรียมโดยวิธี Natural oxidation ได้แก่ Ehrlich's และ Delafield's hematoxylin

2. โดยวิธีสารเคมี (Chemical oxidation) เป็นการใช้สารเคมีพวก sodium iodate หรือ mercuric oxide เป็น oxidation agent หลังจากการเตรียมสีแล้วสามารถนำไปใช้ย้อมสีได้เลยแต่ต้องเก็บในภาชนะที่ป้องกันแสง (ขวดสีชา) ได้เนื่องจากแสงจะไปทำปฏิกริยาให้ haematin ลดน้อยลงได้ซึ่งจะมีผลต่อการติดสี แต่ที่สำคัญสาร haematein ซึ่งใช้ย้อมสีนิวเคลียสนั้นจำเป็นต้องอาศัย mordant ช่วยในการติดสีของนิวเคลียสให้ดีชัดเจนยิ่งขึ้น mordants ที่ใช้ ได้แก่ เกลือของโลหะ ซึ่งโลหะพวกนี้เป็นโลหะหนัก เช่น aluminium , iron , tungsten และ lead

3. Classified : แบ่งสี hematoxylin (hematoxylin solution) ตามลักษณะของ mordant ที่ใช้ดังนี้

- Alum hematoxylins
- Iron hematoxylins
- Tungsten hematoxylins
- Molybdenum haematoxylins
- Lead haematoxylins
- Hematoxylin without mordant

แต่hematoxylin ที่นิยมใช้ในการย้อมวิธี Hematoxylin and Eosin คือ Alum hematoxylin Alum hematoxylin เป็นสี hematoxylin ที่เตรียมโดยใช้ aluminium เป็น mordant ซึ่งจะให้ติดสีนิวเคลียสได้ดีตามที่ต้องการ

Auminium ที่เป็น mordants นั้นได้ใช้ในรูปของ Potashalum (aluminium potassium sulphate) หรือ Ammouium alum (Aluminium ammonium sulphate) นิวเคลียสเมื่อถูกย้อมสีโดย Alum hematoxylin จะติดสีแดงก่อนแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินดำ (น้ำเงินเข้มจัด) เมื่อนำไปล้างด้วยด่างอ่อน ๆ เช่นน้ำประปาไหล แต่ถ้าจะให้ติดสีดีขึ้นและติดมีนาน ควรจุ่มแช่สไลด์ชิ้นเนื้อลงในสารละลายอิ่มตัวของ Lithium carbonate (Saturated lithium carbonate solution)

ปกติ Alum hematoxylin ใช้ในการย้อมสีแบบ regressive stains ซึ่งต้องมีการ differntiation ด้วย aicd alcohol และมีการ neutralized ตามมา แต่ก็สามารถเตรียมและนำไปย้อมแบบ progressive stains ได้ เช่น Mayer's hematoxylin

สี Alum hematoxylin สามารถใช้งานไดนานพอสมควรและเมื่อเตรียมใหม่ ๆ จะมีสีม่วงแดงและจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเมื่อใช้ไปนาน ๆ ซึ่งจะต้องหยุดใช้และเปลี่ยนสี Hematoxylin ใหม่

1. Harris's Hematoxylin

1.1 ส่วนประกอบ มีดังนี้

Hematoxylin	5.0	gm.
Absolute alcohol	50.0	ml.
Potassium alum	100.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
Mercuric oxide	2.5	gm.
Glacial acetic acid	40.0	ml.

1.2 วิธีเตรียม มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ต้มน้ำกลั่นบนเตา (hot plate) พอน้ำเริ่มร้อนใส่ potassium alum ลงไปคนให้ละลายต้มต่อไปจนร้อน

2. ขณะที่ละลาย potassium alum ในน้ำร้อนให้เริ่มละลาย hematoxylin ด้วย absolute alcohol จนละลายหมด แล้วผสมลงไปในน้ำร้อนเพิ่มความร้อนต้มต่อไปจนเดือด (ควรใช้ภาชนะฝาเปิด เช่น glass beaker ชนิดทนความร้อนได้ดี)

3. เติม Mercuric oxide ลงไป จะสังเกตเห็นสีของน้ำยาเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้น ต้มต่ออีก 2 – 3 นาที เพื่อให้ Mercuric oxide ละลายหมด

4. ยกลงจากเตาแล้วทำให้เย็นทันที พอเย็นเติม glacial acetic acid ลงไป

5. ถ่ายเก็บใส่ขวดสีชาและไม่โดนแสง พร้อมที่จะใช้งานได้ทันที

6. ขณะที่นำไปใช้งานกรองก่อนใช้งานย้อมสีเพราะมีตะกอนมาก และสีของน้ำยาใหม่ ๆ จะมีสีม่วงแดง, เข้ม (จะเปลี่ยนไปหลังถูกใช้งาน)

1.3 ลักษณะการติดสี (Type of staining) : จะติดสีเนื้อเยื่อแบบ regressive stains

1.4 เวลาที่ใช้ในการย้อมสี : 5 –15 นาที ในการย้อมสีของชิ้นเนื้อเยื่อ

1.5 การล้างสีส่วนเกิน (Differentiation) : ต้องมีการล้างสีส่วนเกินออกจากชิ้นเนื้อเยื่อด้วย 1% Acid alcohol ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.6 อายุการใช้งานของสี : เป็นสัปดาห์ขึ้นอยู่กับปริมาณงานที่ปฏิบัติ

1.7 สภาพสีใช้งานไม่ได้แล้ว : สีของน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. Mayer’s Hematoxylin

2.1 ส่วนประกอบ มีดังนี้

Hematoxylin	1.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
Potassium or Ammouium alum	50.0	gm.
Citric aicd	1.0	gm.
Chloral hydrate	50.0	gm.
Sodium iodate	0.2	gm.

2.2 วิธีเตรียม มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ต้มน้ำกลั่นบนเตาพอเริ่มร้อนเติม Potassium alum ลงไปให้ละลายจนหมด ต้มต่อจนน้ำร้อน

2. เติม hematoxylin ลงไปทำให้ละลายเข้าด้วยกันในขณะน้ำร้อน

3. เติม sodium iodate ลงไปต้มต่อจนละลายเข้ากันได้ดี

4. ยกลงจากเตาทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องและทิ้งไว้ค้างคืน

5. วันรุ่งขึ้นเติม chloral hydrate และ citric aicd ต้มน้ำยาต่อจนเดือดปล่อยให้เดือดต่อไปอีกประมาณ 5 นาที ยกลงจากเตา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6. ถ่ายเก็บใส่ขวดสีชาและไม่ให้โดนแง พร้อมที่จะใช้งานได้ทันที

7. ขณะนำไปใช้งานควรกรองก่อนใช้งานย้อมสี และสีของน้ำยาใหม่ ๆ จะมีสีม่วงแดง , เข้มและจะเปลี่ยนไปหลังถูกใช้งาน

2.3 ลักษณะการติดสี (Type of staining) : จะติดสีเนื้อเยื่อแบบ progressive stains

2.4 เวลาที่ใช้ในการย้อมสี : 10–20 นาที ในการย้อมสีของชิ้นเนื้อเยื่อ

2.5 การล้างสีส่วนเกิน (Differentiation) : ไม่มี เพราะสีของ จะติดสีเฉพาะนิวเคลียสเท่านั้นเนื้อเยื่ออื่น ๆ จะไม่ติดสี จึงไม่ต้องมีการล้างสีส่วนเกิน

2.6 อายุการใช้งานของสี : เป็นสัปดาห์ขึ้นอยู่กับปริมาณงานที่ปฏิบัติ

2.7 สภาพสีใช้งานไม่ได้แล้ว : สีของน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

ข้อเสีย (Disadventage) ของ Alum haematoxylin

ข้อเสียที่สำคัญของการใช้ Alum haematoxylin ย้อมนิวเคลียส คือ ไม่สามารถทนต่อการกัดละลายสีของกรดในส่วนประกอบของน้ำยาหรือสีที่ใช้ย้อมในขั้นตอนที่ตามมาภายหลัง ทำให้สีของนิวเคลียสซีดหรือจางลงไม่ชัดเจนเท่าที่ต้องการ ซึ่งจะพบวิธีการย้อมสี ลักษณะนี้ในการย้อมสีพิเศษบางชนิด เช่น Van Gieson หรือ Trichrome Stain เราจึงไม่ใช้ Alum haematoxylin สำหรับการย้อมสีนิวเคลียสแต่จะใช้ Iron mordanted สีของนิวเคลียสทนต่อสภาพกรดของน้ำยาหรือสีที่ใช้ตามภายหลังได้ดี และ mordants haematoxylin ที่เหลือจะใช้ในงานย้อมสีวิธีพิเศษ เสียเป็นส่วนมากจึงไม่กล่าวถึงในส่วนของการย้อมสีวิธีธรรมดานี้

สี Counterstaining โดยหลักการสี Counterstaining สีที่ใช้ต้องตัดกับสีเดิม (contrasting) จึงจะเห็นข้อแตกต่างได้ และในการย้อมสีงานประจำสีที่นิยมใช้เป็นสี counterstain ของ Alum haematoxylin คือ eosin เพราะสามารถให้ข้อแตกต่างของส่วนประกอบของชิ้นเนื้อเยื่อประเภทต่าง ๆ ได้มาก เช่น ชัยโตพลาสมกับส่วนต่าง ๆ ของเซลล์และความแตกต่างของ fibers และ matrix ของเนื้อเยื่อผูกพัน โดยให้ลักษณะของสีต่างกันคือ สีแดงกับสีชมพู

Eosin

1. ลักษณะ เป็น Xanthene dyes
2. ชนิด มีดังนี้

   2.1 Eosin Y , (eosin yellowwish , eosin water soluble), (CT Acid Red 87)

   2.2 Ethyl eosin (eosin S , eosin alcohol- soluble), (CT Solvent Red 45)

   2.3 Eosin B (eosin bluish , erythrosin B), (CT Acid Red 91)

3. การนำมาใช้งานย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนใหญ่ที่นิยมนำ eosin มาใช้ในการเตรียมเป็นสี counterstain ของ alum haematoxylin คือ Eosin Y, (eosin yellowwish , eosin water soleble) เพราะเตรียมง่ายสามารถละลายได้ดีในน้ำ (น้ำกลั่น) สามารถนำมาเตรียมเพื่อใช้งานได้หลายรูปแบบ
4. การใช้เป็น counterstain ใช้ย้อมส่วนใหญ่ที่เป็นชัยโตพลาสซึมและส่วนอื่น ๆ ของเนื้อเยื่อโดยติดสีชมพูหรือสีแดง

5. ความเข้มข้นที่ใช้ (Concentrate) ประมาณ 1% Solution in distilled water ใช้สี Working eosin solution จาก stock 1% Alcohol eosin solution

Stock 1% Alcohol eosin solution

Eosin Y, water soluble	10.0 gm.
Distilled water	200.0 ml.
95% Alcohol , ethyl	800.0 ml.

Working eosin solution

Stock , eosin	50.0 ml.
95% Alcohol	120.0 ml.
Distilled water	30.0 ml.

6. เวลาที่ใช้ในการย้อมสี : 30 วินาที – 1 นาที
7. อายุการใช้งานของสี : เป็นสัปดาห์ขึ้นอยู่กับปริมาณงานที่ปฏิบัติ
8. สภาพสีใช้งานไม่ได้แล้ว : สีจะมีตะกอนเกิดขึ้นพื้นล่างของภาชนะที่ใช้ใส่สี
9. ข้อควรระวัง : สีของ eosin จะถูกละลายออกจากชิ้นเนื้อเยื่อได้ขณะโดน 95% Alcohol ดังนั้นต้องย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อเผื่อการนี้ไว้ด้วย

ตารางที่ 13 อุปสรรคกับสาเหตุและการแก้ไขภายหลังการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธี H & E stain

อุปสรรคที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข
ชิ้นเนื้อเยื่อติดสีเข้มไป	1. Section หนา	1. ตัด Section ใหม่ให้บางลง
	2. เกิดกับสีของ haematoxylin	2. Restaining , differentiation
	ในการย้อมแบบ regressive	ให้มากขึ้น ตรวจสอบด้วยกล้อง
	Stain โดย differentiation	จุลทรรศน์
	น้อยไป	
ชิ้นเนื้อเยื่อติดสีน้อยไป	1. สีเสื่อมสภาพแล้วใช้งาน	1. Restaining โดยเปลี่ยนสีใหม่
(สีจาง ไม่ชัดเจน)	ไม่ได้แล้ว	หมด
	2. ใช้เวลาน้อย , สั้นมาก	2. เพิ่มเวลาให้ถูกต้องเหมาะสม
	เกินไป	ในการย้อมสี

ตารางที่ 13 (ต่อ)

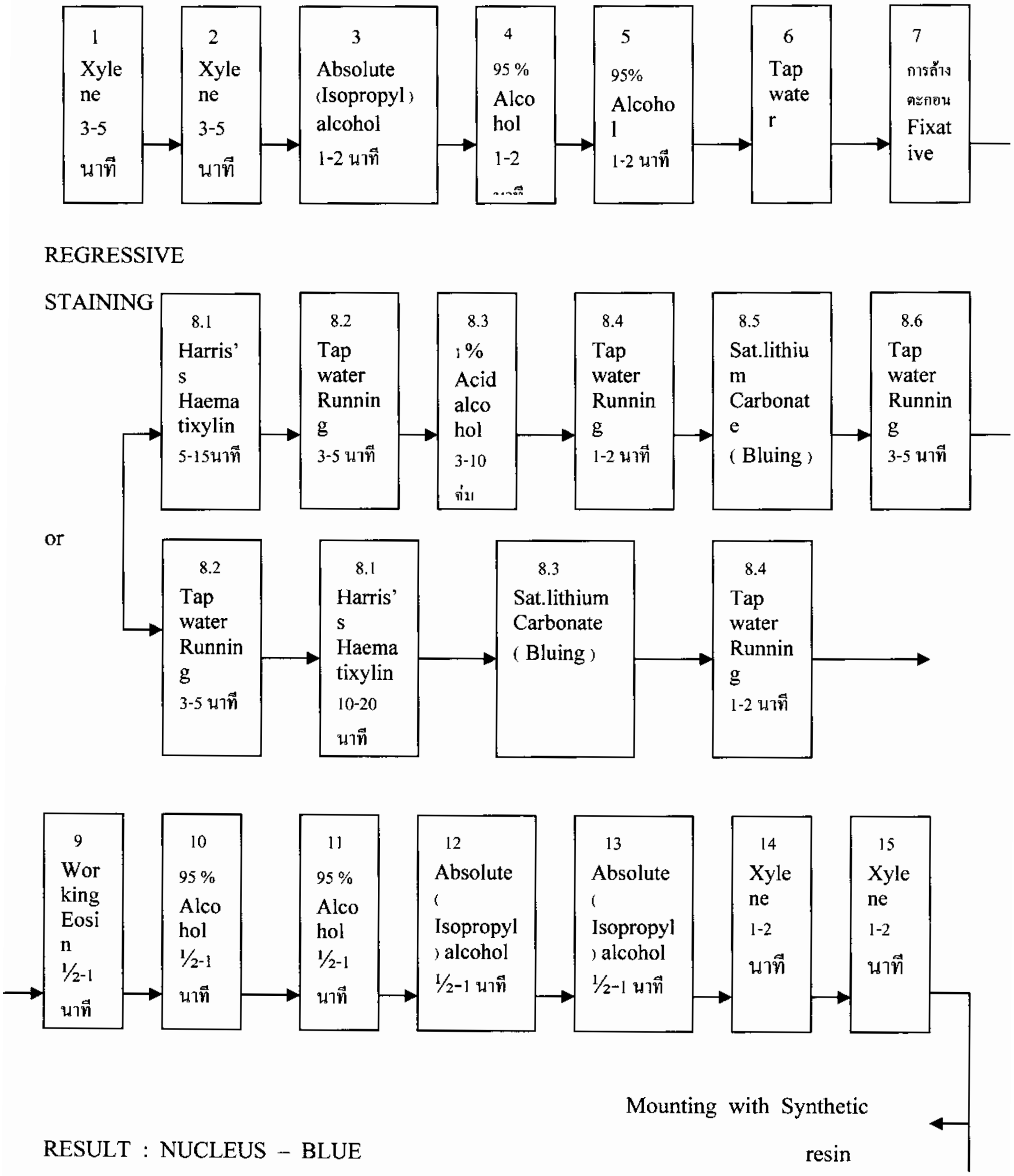
อุปสรรคที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข
	แรกมีสีขาว , ขุ่นมัว เกิดขึ้น	กลับ แล้วเปลี่ยนน้ำยา
	เนื่องจากมีน้ำปน	dehydrates และ xylene โถที่ขุ่น
		มัวการย้อนกลับ โดยเริ่มจาก
		Xylene, absolute (Isopropyl)
		95% Alcohol น้ำ (ล้างน้ำ)
		แล้วค่อยเริ่ม dehydrate, clear
		ใหม่ หลังเปลี่ยนน้ำยาแล้ว 1
		และ 2 ต้องนำสไลด์มา
		Restaining
บางบริเวณของชิ้น เนื้อเยื่อ	1. Deparaffinization ไม่ดี ไม่	1. แช่ Xylene จน cover glass
ไม่ติดสีย้อม	หมด wax	หลุดแล้วทำความสะอาดโดยจุ่ม
	2. สไลด์ติดกันขณะย้อมสี	สไลด์ใน Xylene หลาย ๆ ครั้ง
		แล้วค่อย mount slide ใหม่
มีฟองอากาศบนชิ้นเนื้อ	1. สไลด์สกปรกมีเศษผงติดอยู่	
ชิ้นเนื้อแตกแยกจากกัน	1. เกิดการใช้ high concentrate	1. เรียงลำดับจัด concentrate
(tissue crack) (อุปสรรคนี้	dehydrates มากเกินไปใน	ของ dehydrates เสียใหม่ ลด
บางครั้งเราไม่ทราบว่าได้	ขั้นตอนของการเตรียมชิ้นเนื้อ	high concentrate dehydrates
เกิดขึ้นจนกว่าจะพบได้จาก	2. ขณะลอย paraffin section	น้อยลง
การตรวจดูด้วยกล้อง ฯ	อุณหภูมิของน้ำในอ่างลอยชิ้น	2. ปรับอุณหภูมิของน้ำในอ่าง
ภายหลังการย้อมสีแล้ว	เนื้อสูงมากเกินไป	ลอยชิ้นเนื้อใหม่
	3. Wax เสื่อมคุณภาพมี	3. ตรวจสอบ wax แล้วเปลี่ยน
	Xylene ผสมอยู่มากเมื่อนำไป	wax ใหม่ สไลด์ชิ้นเนื้อต้องตัด
	ตัดเป็น paraffin section xylene	ใหม่ แล้วย้อมสีใหม่
	ที่ผสมอยู่จะทำให้ section เกิด	
	การแตกได้	

วิธีการย้อมสีใหม่ (Restaining) : เราต้องย้อนกลับ (Reversing) ดังนี้

1. แช่สไลด์ใน xylene จน cover glass หลุดเองจากสไลด์ (ถ้าได้ผ่านการ mount slide แล้ว)
2. แช่ใน xylene โถที่ 2 ประมาณ 1 – 2 นาที เพื่อล้าง mounting medium
3. แช่ใน xylene โถที่ 1 (ต่อจาก dehydrates โถสุดท้าย) ประมาณ 1 – 2 นาที เพื่อล้าง mounting medium
4. แช่ใน absolute (Isopropyl) alcohol โถที่ 2 , 1 – 2 นาทีเพื่อล้าง xylene
5. แช่ใน absolute (Isopropyl) alcohol โถที่ 1 , 1 – 2 นาทีเพื่อล้าง xylene ให้หมด
6. แช่ใน 95 % Alcohol โถที่ 2 , 1 – 2 นาทีเพื่อเตรียมตัวลงสู่น้ำ
7. แช่ใน 95 % Alcohol โถที่ 1 , 1 – 2 นาทีเพื่อเตรียมตัวลงสู่น้ำ
8. ล้างน้ำประปา เปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง หรือใช้ประปาไหลจนหมด alcohol
9. Decolorization ใน 1 % Acid alcohol จนชิ้นเนื้อเยื่อหมดสี
10. ล้างน้ำประปา เปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง หรือใช้ประปาไหลจนหมดกรด
11. เริ่มย้อมใหม่ตามขั้นตอนปกติ

แผนภูมิแสดงการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีธรรมดา

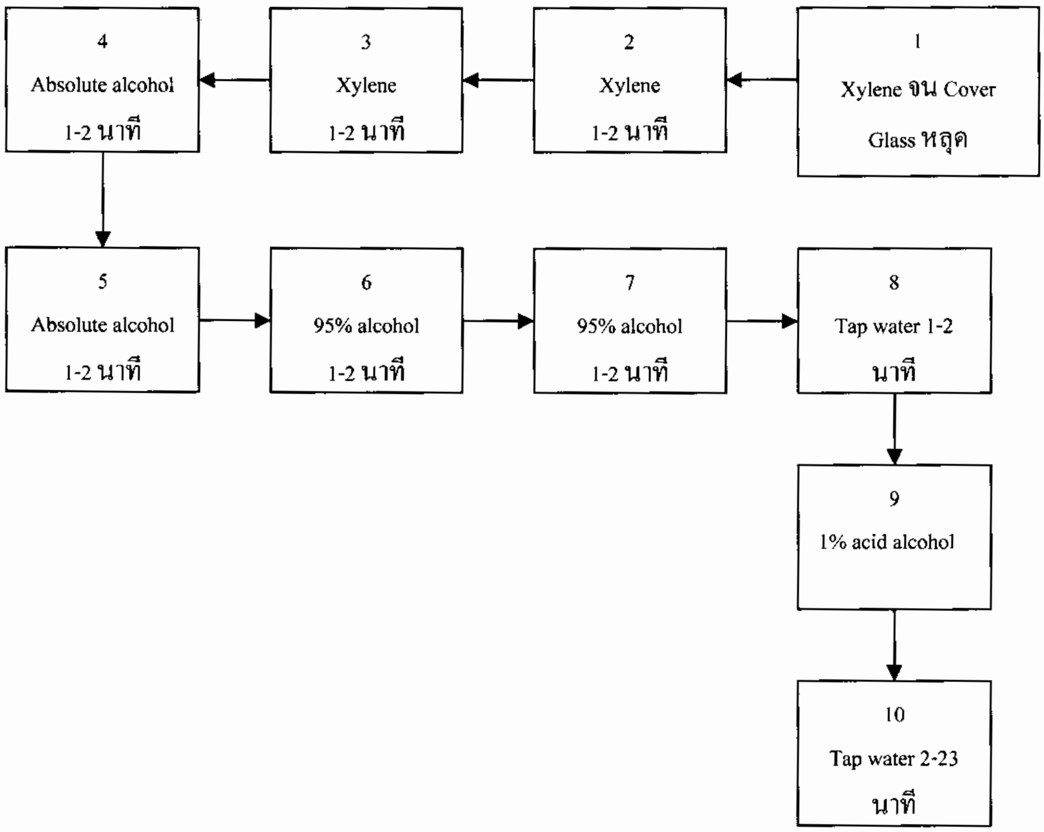
(HEMATOXYLIN AND EOSIN STAINING CHART)



RESULT : NUCLEUS – BLUE

CYTOPLASM - PINK TO RED

แผนภูมิแสดงวิธีการย้อมสีใหม่



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

สิ่งส่งตรวจ

ชิ้นเนื้ออวัยวะต่าง ๆ ที่ได้จากศพนักโทษชายจำนวน 100 รายได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือ

1. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary Microtome)	1	เครื่อง
2. เครื่องหล่อบล็อกชิ้นเนื้อ	1	เครื่อง
3. อ่างน้ำร้อนสำหรับลอย paraffin section ชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (Electric tissue floating bath)	1	เครื่อง
4. ตู้อบร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิ ได้ (Hot air oven)	1	เครื่อง
5. เครื่องย้อมสีสไลด์	1	เครื่อง
6. ตลับใส่ชิ้นเนื้อ (plastic embedding ring)	100	อัน
7. ตะกร้าใส่ชิ้นเนื้อ (Tissue baskets)	2	อัน
8. แบบใส่ชิ้นเนื้อ (Stainless Base molds)	700	อัน
9. ใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (Microtome knives)	10	เล่ม
10. ปากคีบปลายแหลม (Fine point forceps)	1	อัน
11. แปรงขนอ่อน (Soft hair brush)	1	อัน
12. สไลด์ฝ้า	800	แผ่น
13. ดินสอเขียนสไลด์ (Carbon pencil)	2	ด้าม
14. ที่ใส่สไลด์สำหรับการย้อมสีชิ้นเนื้อ (Slide rack)	4	อัน
15. ถาดใส่น้ำแข็ง	2	ถาด
16. ถุงมือ	2	กล่อง
17. Surgical Blade	2	กล่อง

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับรักษาสภาพชิ้นเนื้อ

1.1 10 % Formalin

2. สารเคมีสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อ

2.1 Absolute ethanol

2.2 95 % alcohol

2.3 Xylene

2.4 Paraplast

3. สารเคมีสำหรับการย้อมสีชิ้นเนื้อ

3.1 Absolute ethanol

3.2 95 % alcohol

3.3 Xylene

3.4 Bluing

3.5 Hematoxylin stain

3.6 Eosin stain

4. สารเคมีสำหรับการปิดกระจกสไลด์

4.1 Xylene

4.2 Permount

วิธีทำการทดลอง

1. การตรวจด้วยตาเปล่าและการตัดชิ้นเนื้อ (Gross Examination)

1.1 เมื่อได้รับชิ้นเนื้อต้องมีการตรวจสอบ ชื่อ นามสกุล ของตัวอย่างศพนักโทษว่าตรงกันหรือไม่

1.2 นำชิ้นเนื้อมาตรวจด้วยตาเปล่าว่ามีลักษณะอย่างไร นิ่มหรือแข็ง มีสีอะไร ขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ ลักษณะภายนอกภายใน และสิ่งที่ผิดปกติ และจดบันทึกไว้

1.3 นำชิ้นเนื้อมาทำการตัดให้มีขนาดเหมาะสม และต้องตัดบริเวณที่มีพยาธิสภาพให้มีขนาดกว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 1.5 ซม. และหนาประมาณ 0.3 เซนติเมตร

1.4 นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้ใส่ตลับใส่ชิ้นเนื้อ และใส่หมายเลขกำกับไว้

2. การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue Processing)

2.1 หลังจากนั้นนำตลับชิ้นเนื้อใส่ตะกร้าชิ้นเนื้อแล้วนำเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automatic Tissue processor) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การทำบล็อกชิ้นเนื้อ

3.1 นำตลับใส่ชิ้นเนื้อ ออกจากเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ ที่ละตลับแล้วเปิดออกดูขนาดชิ้นเนื้อเพื่อเลือกแบบ (Mold)

3.2 เลือกแบบที่จะใช้เป็นแบบบล็อกชิ้นเนื้อ ถ้าชิ้นเนื้อจำนวนมากหลายชิ้นอาจต้องแยกเป็น 2 บล็อก

3.3 หยดพาราฟินลงในบล็อกชิ้นเนื้อพอประมาณให้ท่วมชิ้นเนื้อได้

3.4 ใช้ปากคีบ (forcep) ปลายแหลมจับชิ้นเนื้อ พิจารณาดูว่าวางด้านที่ถูกต้องแล้วรีบวางชิ้นเนื้อฝังในพาราฟิน

3.5 หยดพาราฟินลงไปให้เต็มบล็อกชิ้นเนื้อพร้อมทั้งติดหมายเลขของชิ้นเนื้อลงไปด้วย

3.6 ปล่อยให้พาราฟินเย็นแล้วแกะบล็อกชิ้นเนื้อออกจากแบบ

4. การตัด Paraffin Section (Paraffin Section Cutting or Sectioning)

4.1 การเตรียมเครื่องตัดชิ้นเนื้อ

4.1.1 ทดสอบการทำงานของเครื่องโดยลองหมุน hand wheel และ coarse wheel ของเครื่องว่าใช้งานมีประสิทธิภาพหรือไม่

4.1.2 เลื่อน block holder กลับสู่เครื่องจนเกือบสุด

4.1.3 ใส่ knife holder เลื่อนเข้าใกล้ block holder ให้เว้นระยะห่างประมาณ 1/2 นิ้ว แล้วล็อก knife holder กับฐานของตัวเครื่องให้แน่น

4.1.4 ใส่ใบมีด (microtome knife) เข้ากับ knife holder แล้วขันสกรูล็อคใบมีดให้แน่น

4.2 การตัด paraffin section

4.2.1 นำบล็อกชิ้นเนื้อจากถาดน้ำแข็งใส่เข้าไปใน block holder ล็อกให้แน่นด้วยสกรู

4.2.2 เริ่มทำการ Trim บล็อกชิ้นเนื้อ (Trimming of Tissue block) โดยใช้ coarse feed ช่วย โดยเริ่มใช้ coarse feed เลื่อนบล็อกชิ้นเนื้อเข้าหาใบมีดพร้อมๆกับหมุน hand wheel ไปด้วย การใช้ coarse feed ต้องเพิ่มจังหวะมากกว่าปกติจนกระทั่งชิ้นเนื้อเต็มหน้าตัดในบล็อก

4.2.3 หลังจาก Trim บล็อก ได้ชิ้นเนื้อที่เต็มหน้าตัดแล้ว ปรับไมครอนสเกลใหม่ ให้เหลือ 3 ไมครอน ก่อนที่จะตัดต่อไป ใช้ปากคีบทำรอยเป็นแนวจากขอบบนถึงขอบล่างของบล็อกชิ้นเนื้อโดยแนวนี้พอดีกับขนาดของชิ้นเนื้อในบล็อก หลังจากทำรอยเป็นแนวดีแล้วใช้ก้อนน้ำแข็งถูบริเวณชิ้นเนื้อในบล็อกจนเย็น

4.2.4 เริ่มตัด section โดยหมุน hand wheel จนได้ paraffin section เป็นแถบยาว (ribbon)

4.2.5 ใช้ปากคีบแถบยาวของ paraffin sectionไปลอยบนผิวน้ำร้อนโดยวางแถบยาวนั้นในลักษณะเดิมไม่พลิกด้าน

4.2.6 ใช้ปากคีบเอา section ที่ดี สมบูรณ์ครบถ้วนเท่าขนาดชิ้นเนื้อในบล็อกและมีความบางตามที่ต้องการ

4.2.7 นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาช้อน section ที่ได้เลือกไว้ โดยช้อนให้ได้ section มากที่สุดของพื้นที่บนผิวสไลด์

4.2.8 เขียนหมายเลขตามบล็อกชิ้นเนื้อที่ขอบข้างหนึ่งของสไลด์ แล้วตากให้แห้งสนิทรอเข้าตู้อบร้อนเพื่อช่วยตรึง paraffin section ให้ติดแน่นกับผิวสไลด์ยิ่งขึ้นโดยที่ไม่หลุดขณะย้อมสี ประมาณ 30 นาที และใช้อุณหภูมิ ประมาณ 58-60 องศาเซลเซียส

4.2.9 เมื่อครบเวลา นำสไลด์ออกจากตู้อบร้อนทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปย้อมสีตามขั้นตอนต่อไป

5. การย้อมสีสไลด์ (Stainning)

5.1 นำสไลด์ไปเข้าเครื่องย้อมสไลด์ ซึ่งใช้วิธีในการย้อมคือ Hematoxylin และ Eosin Stain โดยทำการตั้งโปรแกรมเครื่องย้อมชิ้นเนื้อ ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> จุ่มใน Xylene	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 2</u> จุ่มใน Xylene	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 3</u> จุ่มใน Xylene	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 4</u> จุ่มใน Xylene	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 5</u> จุ่มใน 100 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 6</u> จุ่มใน 100 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 7</u> จุ่มใน 95 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 8</u> จุ่มใน 95 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 9</u> จุ่มใน 95 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 10</u> ล้างน้ำ	2 นาที

<u>ขั้นตอนที่ 11</u>	จุ่มในสี Hematoxylin	5 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 12</u>	ล้างน้ำ	5 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 13</u>	จุ่มใน Bluing	0.30 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 14</u>	ล้างน้ำ	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 15</u>	จุ่มใน 95 % Alcohol	0.30 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 16</u>	จุ่มในสี Eosin	1.30 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 17</u>	จุ่มใน 95 % Alcohol	0.30 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 18</u>	จุ่มใน 95 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 19</u>	จุ่มใน 100 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 20</u>	จุ่มใน 100 % Alcohol	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 21</u>	จุ่มใน Xylene	1 นาที
<u>ขั้นตอนที่ 22</u>	จุ่มใน Xylene	1 นาที

5.2 เมื่อครบเวลานำสไลด์ออกจากเครื่องย้อมสไลด์

5.3 หลังจากนั้นนำสไลด์ไปทำการ mounting โดยหยด mounting medium ลงบนขอบกระจกสไลด์ใกล้ๆเนื้อเยื่อ แล้วปิดทับด้วย coverglass ที่มีขนาดปิดชิ้นเนื้อนั้นได้หมด

5.4 ออกแรงกดบนแผ่น coverglass เล็กน้อย เพื่อให้ติดแน่นยิ่งขึ้น และไล่ฟองอากาศให้หมด เช็ดทำความสะอาดคราบ mounting medium

6. การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

6.1 นำสไลด์ที่ได้ไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 100 และ 400 จนถึง 1000 เท่า ในการดูภายใต้การดูแลของพยาธิแพทย์ ในการรายงานผลการตรวจวินิจฉัย

6.2 จดบันทึกผลจากกล้องจุลทรรศน์อย่างละเอียด

6.3 สรุปผลการทดลองพร้อมวิเคราะห์ผล

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจากศพนักโทษชายจำนวน 100 ราย โดยวิธีทางพยาธิวิทยาโดยตัดชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆในบริเวณที่มีพยาธิสภาพ และนำมาทำตามขั้นตอนการเตรียมพาราฟินและย้อมสี Hematoxylin และ Eosin stain พบว่าสามารถจำแนกการเสียชีวิตได้หลายสาเหตุ เช่น ปอดอักเสบ วัณโรค ระบบหายใจและระบบไหลเวียนโลหิตล้มเหลว ติดเชื้อในกระแสโลหิต มะเร็ง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และ เลือดออกที่สมอง โดยผลการตรวจทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 14 และ ตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ตารางแสดงสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชายจำนวน 100 คน

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
1.	B,H,Lu,Li,K	คั่งเลือด,บวมน้ำ	คั่งเลือด ,บวมน้ำ	คั่งเลือด,บวมน้ำ	คั่งเลือด,บวมน้ำ	คั่งเลือด,บวมน้ำ	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
2.	B,H,Lu,Li	ปกติ	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
3.	Lu	-	-	อักเสบ	-	-	-	ปอดอักเสบ
4.	Lu,K	-	-	อักเสบ,คั่งน้ำ	-	อักเสบ	-	ปอดอักเสบ ไตอักเสบ
5.	Lu,Li,K	-	-	พบโพรงหนอง	เสื่อมสภาพ	พบโพรงหนอง		ปอดติดเชื้อ
6.	B,H,Lu,Li,K	เยื่อหุ้มสมองอักเสบ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	ปกติ	บวมน้ำ,อักเสบ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	คั่งเลือดและมีไขมันแทรกในเซลล์ตับ	ปกติ	-	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
7.	B,H,Lu,Li	บวม , เยื่อหุ้มสมองหนาตัวเล็กน้อย, อักเสบบางส่วน	ปกติ	คั่งเลือด,บวมน้ำ ,อักเสบ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	ปกติ	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว จากเยื่อหุ้มสมอง และปอดอักเสบ
8.	B,Lu,Li	บวม	-	คั่งเลือด,บวมน้ำ ,อักเสบ	ไขมันแทรกในเซลล์ตับ	-	-	ปอดอักเสบ
9.	B,H,Lu,Li,K	บวมน้ำ,พบหย่อมเนื้อตาย	ปกติ	บวมน้ำ,อักเสบพบหย่อมเนื้อตาย	เริ่มเน่า	เริ่มเน่า	เริ่มเน่า	ปอดอักเสบ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
10.	Lu	-	-	พบโพรงหนอง	-	-	-	ปอดอักเสบ
11.	B,H,Lu,Li,K	บวมน้ำ	คั่งเลือด	อักเสบเรื้อรัง	-	อักเสบ	-	ปอดอักเสบ
12.	Lu,Li	-	-	อักเสบเรื้อรัง	ไขมันแทรกในเซลล์ตับ	-	-	ปอดอักเสบ
13.	Lu	-	-	อักเสบ	-	-	-	ปอดอักเสบ
14.	Lu,Li,S	-	-	อักเสบ	อักเสบ	-	คั่งเลือด	ปอดอักเสบ
15.	B,Lu,Li	บวม	-	บวมน้ำ,อักเสบ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	คั่งเลือด	-	-	ปอดอักเสบ
16.	Lu,Li,K	-	-	มีพังผืด,บวมน้ำ,อักเสบ พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	ปกติ	พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	-	ปอดอักเสบ
17.	H,Lu	-	ปกติ	คั่งเลือด,บวมน้ำ, อักเสบพบเซลล์เม็ดเลือดขาว	ไขมันแทรกในเซลล์ตับ	-	-	ปอดอักเสบ
18.	Lu,Li	-	-	อักเสบเป็นหนอง	เสื่อมสภาพ	-	-	ปอดอักเสบ
19.	Lu	-	-	อักเสบเรื้อรัง	-	-	-	ปอดอักเสบ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
20.	B,H,Lu	สมองตายเก่า	คั่งเลือด อักเสบ,เยื่อหุ้มอักเสบ	อักเสบ,คั่งเลือด,ถุงลมโป่งพอง	-	อักเสบ	-	ปอดอักเสบ สมองตายเก่า
21.	B,H,Lu,Li,K	ปกติ	ปกติ	อักเสบเรื้อรัง	อักเสบเรื้อรัง	อักเสบเรื้อรัง	-	ปอดอักเสบ
22.	B,H,Lu,Li,K	ปกติ	ปกติ	อักเสบเรื้อรัง	ปกติ	ปกติ	-	ปอดอักเสบ ติดเชื้อในเลือด
23.	B,H,Lu,Li,K	คั่งเลือด	คั่งเลือด	อักเสบเรื้อรัง	อักเสบเรื้อรัง	คั่งเลือด	-	ปอดอักเสบ ติดเชื้อในเลือด
24.	B,Lu,Li	บวม	-	บวมน้ำ,คั่งเลือด พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	ไขมันแทรกในเซลล์ตับ	-	-	ปอดอักเสบ
25.	H,Lu,Li	-	คั่งเลือด	บวมน้ำ,อักเสบ	ไขมันแทรกในเซลล์ตับ,มีเลือดออก	-	-	ปอดอักเสบ
26.	Lu,Li	-	-	บวมน้ำ,อักเสบ	เสื่อมสภาพ	-	-	ภาวะปอดแ ละตับล้มเหลว
27.	Lu,K	-	-	คั่งเลือด	เสื่อมสภาพ	พบเซลล์มะเร็งและเนื้อตาย	-	มะเร็งบริเวณไต
28.	B,Lu,Li	บวม	-	อักเสบ,บวมน้ำ	เสื่อมสภาพ	-	-	ภาวะเลือดออกใต้เยื่อหุ้มสมอง

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
29	B,H,Lu	สมองตายเก่า	คั่งเลือด อักเสบ,เยื่อหุ้มอักเสบ	อักเสบ,คั่งเลือด,ถุงลมโป่งพอง	-	อักเสบ	-	ปอดอักเสบ สมองตายเก่า
30.	Lu	-	-	ปกติ	-	-	-	ขาดอากาศหายใจ
31.	B,Li	ฟกช้ำบวม	-	-	เสื่อมสภาพ	-	-	สมองฟกช้ำบวมจากของแข็งไม่มีคม
32.	Lu	-	-	อักเสบติดเชื้อ	-	-	-	ภาวะปอดล้มเหลว
33.	Li	-	-	-	คั่งเลือด,พบก้อนเนื้องอกประเภทสารเมือกในตับ	-	-	มะเร็งตับ
34.	Lu,Li	-	-	พบโพรงหนอง	มีผังพืดแทรก	-	-	ตับวาย
35.	B,H,Lu,Li,K,S	ปกติ	ปกติ มีจุดเลือดออกคั่ง	บวมน้ำ,คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ปกติ	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
36.	B,H,Lu,Li	บวม	คั่งเลือด และเส้นเลือดหนา	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	พบเซลล์ไขมัน	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิปอด
37.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ	ปกติ	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
38.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด ถุงลมโป่งพอง	คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
39.	B,H,Lu,Li,K	บวมน้ำ	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ ติดเชื้อ พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	-	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
40.	B, Lu	มีพังผืดและเซลล์เม็ดเลือดขาว	-	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	-	-	-	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
41.	H,Lu	-	อักเสบบริเวณผิวหัวใจ	อักเสบ	-	-	-	ปอดอักเสบและหัวใจอักเสบ
42.	Lu,Li,S	-	-	อักเสบ	เสื่อมสภาพ	-	เสื่อมสภาพ	ปอดอักเสบ
43.	B,Lu,Li	คั่งเลือด,บวมน้ำ	-	อักเสบ	เน่า	-	-	ปอดอักเสบ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
44.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด	ปกติ	อักเสบ	อักเสบ	ปกติ	อักเสบ	ปอดอักเสบ
45.	B,Lu,Li	บวม	-	บวมน้ำ พบกลุ่มหนอง	พบเซลล์ไขมัน	-	-	ปอดอักเสบ
46.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือดอักเสบติดเชื้อ พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	ปกติ	คั่งเลือดพบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	คั่งเลือด	ภูมิคุ้มกันบกพร่องร่วมกับวัณโรคปอด
47.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ	ปกติ	บวมน้ำ มีลักษณะวัณโรคปอด	ปกติ	ปกติ	คั่งเลือด	วัณโรคปอด
48.	B,H,Lu,Li,K	คั่งเลือด	ปกติ	มีลักษณะวัณโรคปอด	พบเซลล์ไขมัน และพังผืด	ปกติ	ปกติ	วัณโรคปอด
49.	B, Lu,Li	พบเซลล์เม็ดเลือดขาว	-	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	-	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	-	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
50.	B,Lu,Li	ปกติ	-	อักเสบติดเชื้อ	อักเสบติดเชื้อ	-	อักเสบติดเชื้อ	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
51.	Lu,Li,S	-	-	เนื้อตายมีไขมันแทรก	มีไขมันแทรก	-	มีไขมันแทรก	วัณโรค

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
52.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด	เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ	อักเสบ	อักเสบ	อักเสบ	ปกติ	ติดเชื้อในกระแสโลหิต
53.	H,Lu,Li,K	-	คั่งเลือด เส้นเลือดหนา	บวมน้ำ คั่งเลือด	เสื่อมสภาพ คั่งเลือด	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรก	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
54.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ	ปกติ	บวมน้ำ เริ่มเน่า	เน่า	เน่า	เน่า	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
55.	B,H,Lu,Li,K,S	อักเสบเรื้อรัง	ปกติ	บวมน้ำ มีตุ่มก้อน	มีตุ่มก้อน	อักเสบ	มีตุ่มก้อน	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
56.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด บวมน้ำ	คั่งเลือด เส้นเลือดหนา	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ	พบเซลล์ไขมัน	ปกติ	คั่งเลือด	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
57.	Lu,Li,K	-	-	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ	อักเสบ มีเนื้อตาย	อักเสบ มีเนื้อตาย	-	วัณโรค
59.	B,H,Lu,Li,K,S	ปกติ	-	วัณโรคปอด	อักเสบติดเชื้อ	-	อักเสบติดเชื้อ	ติดเชื้อในกระแสโลหิต

ตารางที่ 14 (ต่อ)

	สิ่งส่งตรวจ	ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
60.	Lu,Li,S	-	-	เนื้อตายมีไขมันแทรก	มีจุดหนอง วัณโรค	มีจุดหนอง วัณโรค	มีจุดหนอง วัณโรค	วัณโรค
61.	Lu,Li	-	-	พบเซลล์เม็ดเลือดขาว แทรก	เสื่อมสภาพ	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลวจากพยาธิปอด
62.	B,Lu,Li	บวม	คั่งเลือด	คั่งเลือดพบเซลล์เม็ด เลือดขาว	มีลักษณะตับ แข็ง	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลว ร่วมกับตับวาย
63.	B,H,Lu,Li	บวม	คั่งเลือด	คั่งเลือดพบเซลล์เม็ด เลือดขาว	พบเซลล์ ไขมัน	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลวร่วมกับตับวาย
64.	H,Lu,Li,K,S	ปกติ	ปกติเส้น เลือดหนา	อักเสบเรื้อรัง	อักเสบ	ปกติ	ปกติ	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลว
65.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด บวมน้ำ	คั่งเลือด เส้นเลือด หนา	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ	พบเซลล์ ไขมัน	ปกติ	คั่งเลือด	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลว
66.	H,Lu,Li	-	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด	ปกติ	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลว
67.	B,H,Lu,Li,K	คั่งเลือด บวมน้ำ	คั่งเลือด บวมน้ำ	บวมน้ำ คั่งเลือด	อักเสบเรื้อรัง	อักเสบเรื้อรัง	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิต ล้มเหลว

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
68.	B,H,Lu,Li,K	บวมน้ำ	เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหดตัว มีเนื้อตาย	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ	หดตัว เสื่อมสภาพ	คั่งเลือด	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
69.	B,H,Lu,Li,K,S	คั่งเลือด	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด	ตับแข็ง	ปกติ	ปกติ	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
70.	Lu,Li, S	-	-	อักเสบเรื้อรัง เป็นพังผืด เยื่อหุ้มปอดหนาตัว	คั่งเลือด มีลักษณะเนื้อตาย	-	ปกติ	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
71.	B,H,Lu	อักเสบ	ปกติเส้นเลือดหนามาก	ก้อนเนื้อมะเร็ง คั่งน้ำ	อักเสบ	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
72.	Lu	-	-	บวมน้ำ คั่งเลือด	-	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
73.	H,Lu,Li	-	คั่งเลือด เส้นเลือด ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด	คั่งเลือด	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
74.	B,H,Lu	คั่งเลือด	ขาดเลือด เรื้อรัง	อักเสบ คั่งเลือด	-	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
75.	H,Lu	-	พบผังพืด แทรก สั้น เลือดหนา	อักเสบ	-	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว จากพยาธิสภาพหัวใจ ปอด
76.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ	ปกติ	คั่งน้ำ	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
81.	Lu,Li	-	-	บวมน้ำ คั่งเลือดมีเนื้อตาย	เน่า	-	-	ปอดอักเสบ
82.	B,Lu,Li,	บวม อักเสบ พบเม็ดเบือดขาว	-	บวมน้ำ คั่งเลือดถุงลม พบเม็ดเลือดขาว อักเสบ	ตับแข็งมี พังผืด	-	-	ปอดอักเสบ ร่วมกับตับแข็ง

ตารางที่ 14 (ต่อ)

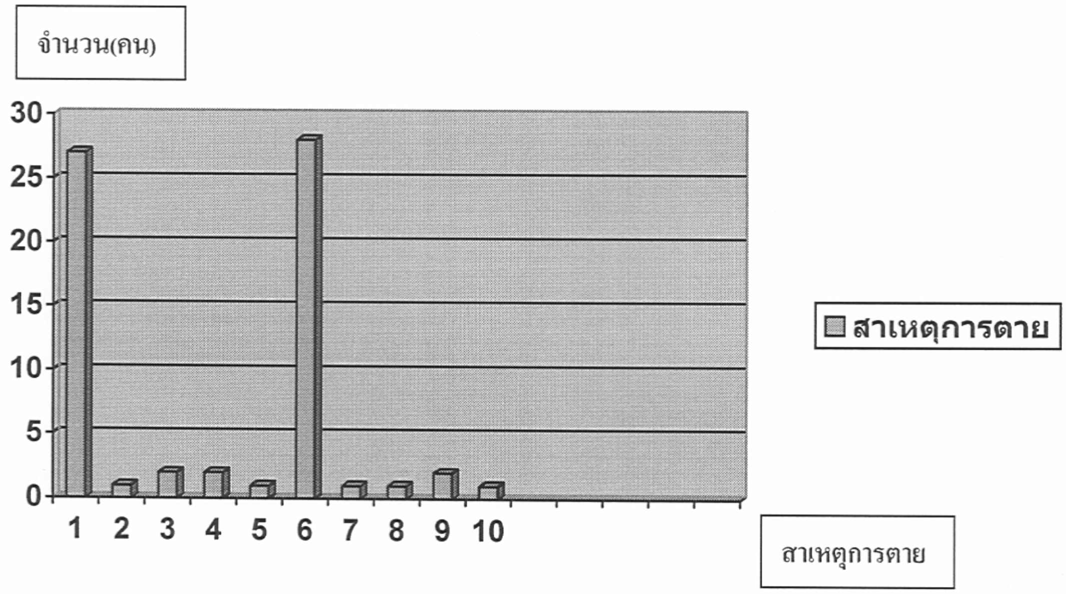
สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
83.	B,H,Lu,Li,K,S	บวมน้ำ เยื่อหุ้มหนา	คั่งเลือด	คั่งเลือด	พบเนื้อตาย คั่งเลือด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
84.	B,Lu,Li,K	คั่งเลือด บวมน้ำ มีการอักเสบ พบ PMN	-	บวมน้ำ คั่งเลือด พบ pneumonia	ปกติ	ปกติ	-	มีเลือดออกที่สมอง มี pneumonia แทรกซ้อนที่ปอด
85.	B,H,Lu,Muscle	มีเนื้อตาย มีการขาดเลือด	ปกติ	บวมน้ำ มี pneumonia	-	-	-	สมองขาดเลือดมี pneumonia แทรกซ้อน
86.	B,Lu,Li,K,S	ปกติ	-	คั่งเลือด บวมน้ำ	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ปกติ	ผูกคอตายพบเลือดออกที่เนื้อเยื่อ
87.	B,Lu,Li,S	ปกติ	-	มีเนื้อตาย พบ วัณโรค	มีเนื้อตาย	-	มีเนื้อตาย ขอบเขตชัดเจน	วัณโรค
88	Lu	-	-	อักเสบ	-	-	-	ปอดอักเสบ
89	B,Lu,Li,	บวม เยื่อหุ้ม อักเสบ	-	คั่งเลือด อักเสบ พบเนื้อตาย	เน่า	-	-	ปอดอักเสบ
90.	B,Lu,Li	คั่งเลือด	-	บวมน้ำ เริ่มเน่า	เน่า			มีเลือดออกที่สมอง

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สิ่งส่งตรวจ		ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์						สาเหตุการเสียชีวิต
		สมอง (Brain)	หัวใจ (Heart)	ปอด (Lung)	ตับ (Liver)	ไต (Kidney)	ม้าม (Speen)	
91.	H,Lu,Li	-	คั่งเลือด	บวมน้ำ คั่งเลือด	คั่งเลือด	-	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
92	B,Lu,Li,K	ปกติ	ปกติ	เน่า	เน่า	เน่า	-	ระบบหายใจไหลเวียนโลหิตล้มเหลว
93	B,Lu,Li,K,S	ปกติ	คั่งเลือด	บวมน้ำ	มีผังพืด	คั่งเลือด	ปกติ	เนื้องอกที่ตับ
94	B,Lu	บวมน้ำ เยื่อหุ้มหนาพบ WBC	-	บวมน้ำ คั่งเลือด	-	-	-	เยื่อหุ้มสมองอักเสบ
95	Lu,Li,	-	-	บวมน้ำ อักเสบ	เน่า	-	-	ปอดอักเสบ
96	B,H,Lu,Li	ปกติ	ปกติ	คั่งเลือด อักเสบ พบWBC	มีผังพืด	-	-	ปอดอักเสบ
97	B,H,Lu,Li,K,S	ปกติ	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ	มีพังผืด	คั่งเลือด	คั่งเลือด	ปอดอักเสบ
98.	B,H,Lu,Li,K,S	ปกติ	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด	ปกติ	คั่งเลือด	พบเนื้อตายลักษณะของวัณโรค	วัณโรค
99.	B,H,Lu,Li	คั่งเลือด บวม	ปกติ	บวมน้ำ คั่งเลือด	คั่งเลือด	-	-	เลือดออกที่สมอง
100.	B,H,Lu	บวม มีเนื้อตาย	มีการอักเสบ พบ neutophil	บวมน้ำ คั่งเลือด เยื่อหุ้มหนา	-	-	-	เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ

ตารางที่ 15 ตารางสรุปสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชายจำนวน 100 คน

สาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชาย	จำนวน (คน)
1. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว	27
2. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มอักเสบ	1
และปอดอักเสบ	
3. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอด	2
4. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวาย	2
5. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพหัวใจและปอด	1
6. ปอดอักเสบ	28
7. ไตอักเสบ	1
8. ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา	1
9. ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ	2
10 . หัวใจอักเสบ	1
11. ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับ	1
12. ไตวาย	1
13. เนื้องอกที่ลำไส้	1
14. มะเร็งตับ	2
15. วัณโรคปอด	9
16. pneumonia	3
17. สมองขาดเลือด	1
18. ขาดอากาศหายใจ	2
19. เลือดออกที่สมอง	3
20. ติดเชื้อในกระแสโลหิต	7
21. เยื่อหุ้มสมองอักเสบ	2
22. เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ	2



แผนภูมิที่ 1 แผนภูมิสรุปการสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชาย จำนวน 100 คน

1 = ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

2 = ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มสมอง

3 = ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอด

4 = ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวาย

5 = ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพหัวใจและปอด

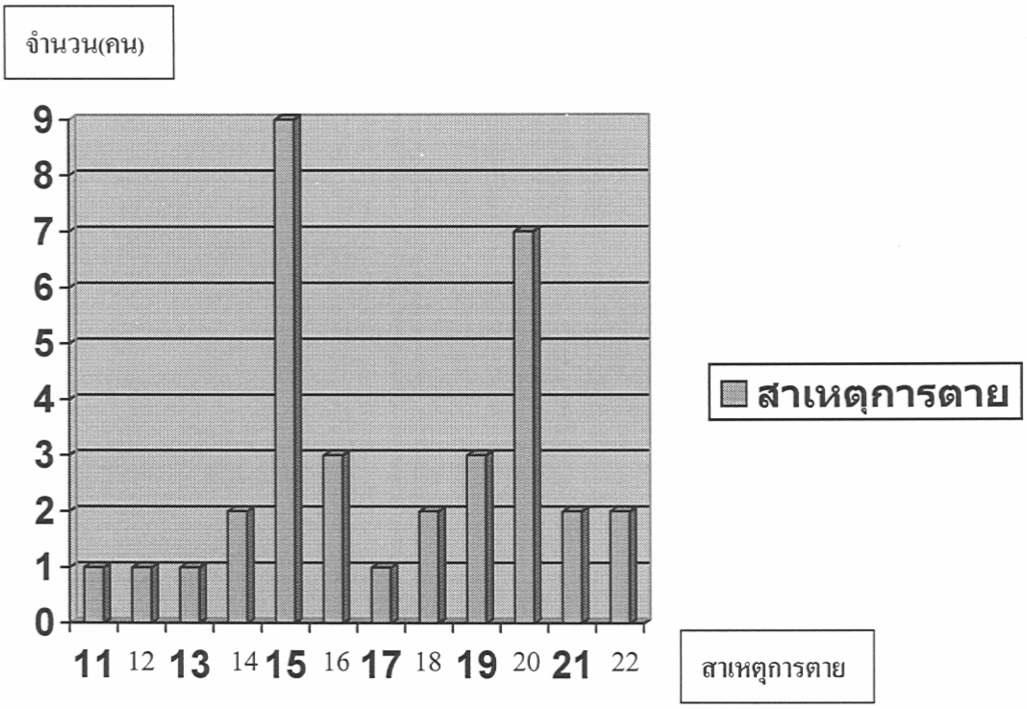
6 = ปอดอักเสบ

7 = ไตอักเสบและปอดอักเสบ

8 = ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา

9 = ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับติดเชื้อในกระแสโลหิต

10 = หัวใจอักเสบ



แผนภูมิที่ 2 แผนภูมิสรุปการสาเหตุการเสียชีวิตของนักโทษชาย จำนวน 100 คน

11 = ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับ

12 = ไตวาย

13 = เนื้องอกที่ลำไส้

14 = มะเร็งตับ

15 = วัณโรคปอด

16 = ปอดติดเชื้อ (pneumonia)

17 = สมองขาดเลือด

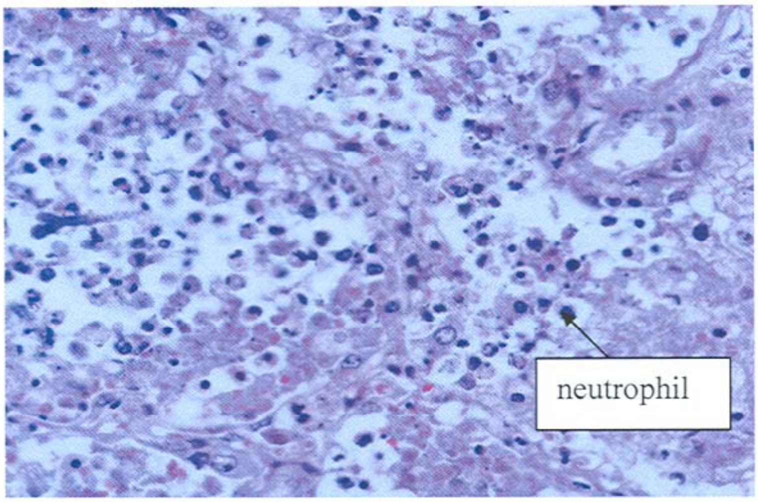
18 = ขาดอากาศหายใจ

19 = เลือดออกที่สมอง

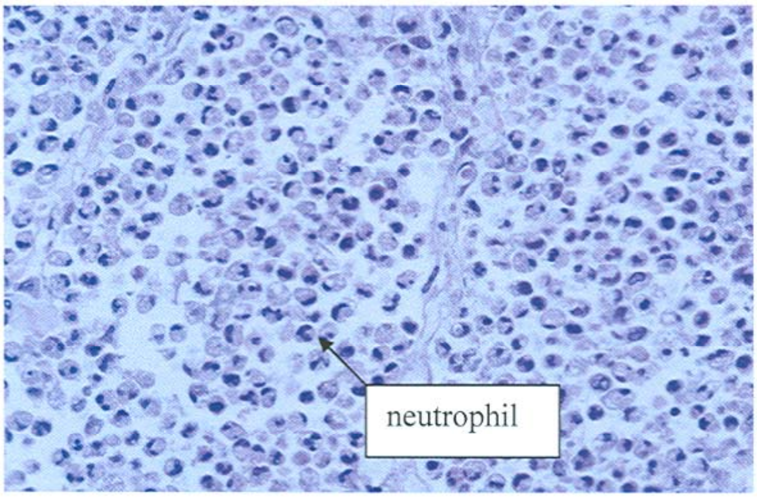
20 = ติดเชื้อในกระแสโลหิต

21 = เยื่อหุ้มสมองอักเสบ

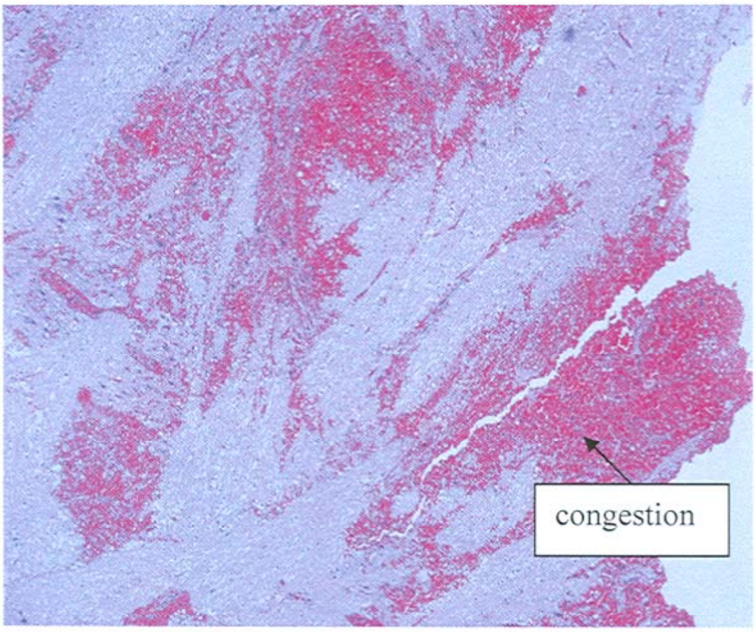
22 = เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ



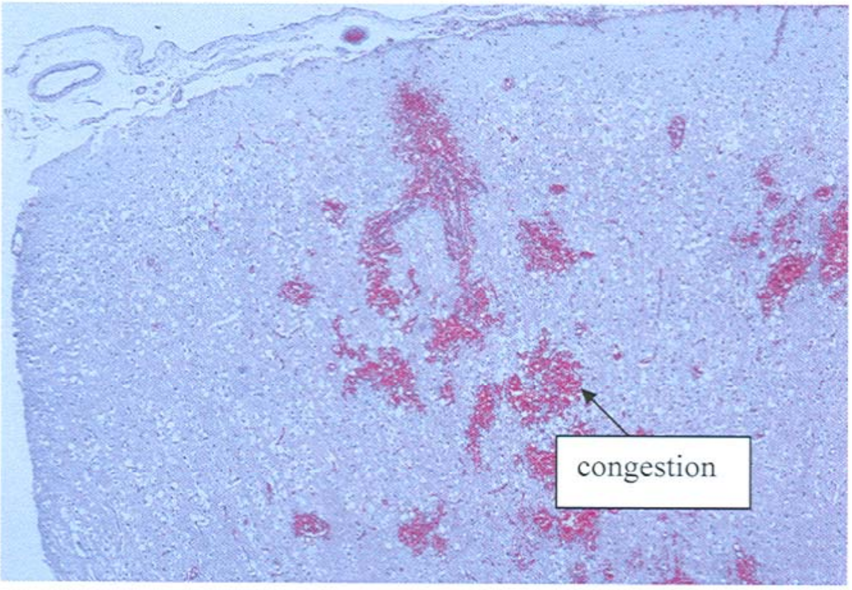
ภาพที่ 1 ลักษณะของปอดที่มีการติดเชื้อ (pneumonia) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากพบ PMN สูง (กำลังขยาย 40 เท่า)



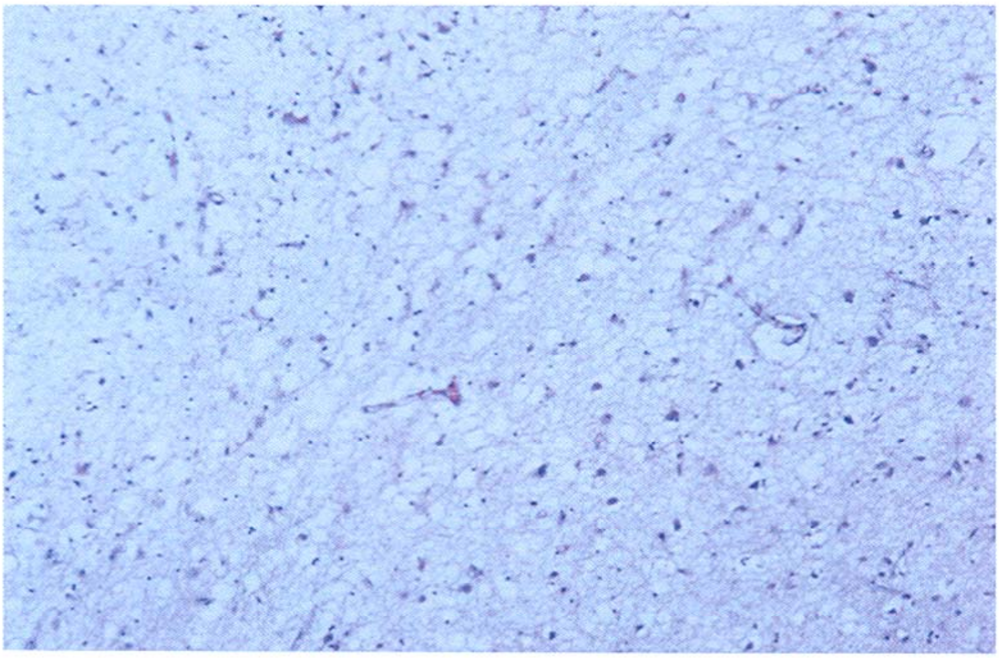
ภาพที่ 2 ลักษณะของปอดที่มีการติดเชื้อ (pneumonia) (กำลังขยาย 40 เท่า)



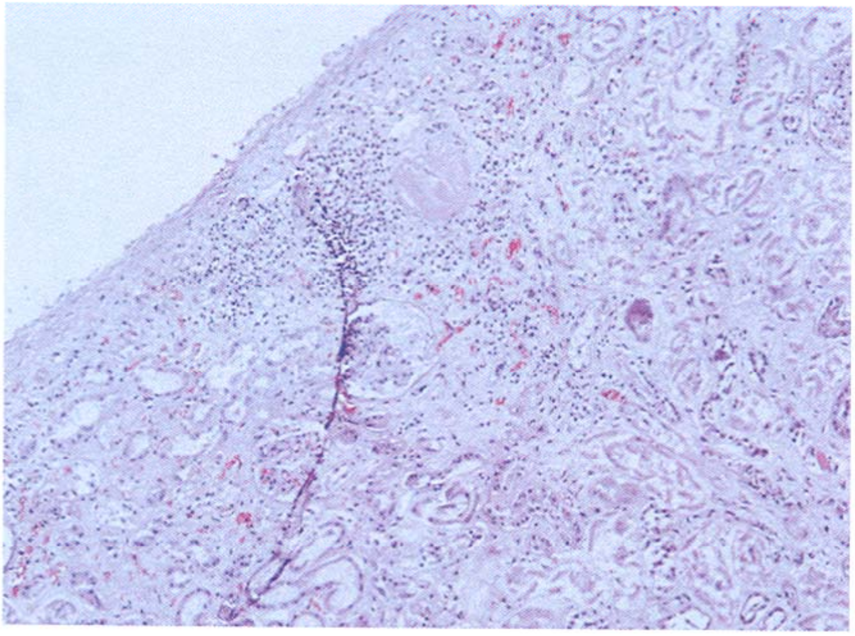
ภาพที่ 3 ลักษณะของสมองที่มีเลือดออกในสมอง (กำลังขยาย 40 เท่า)



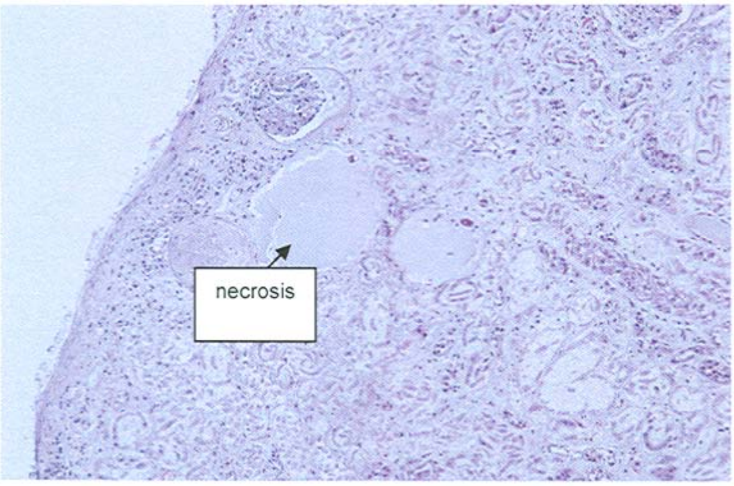
ภาพที่ 4 ลักษณะของสมองที่มีเลือดออกในสมอง และสมองบวมน้ำ (กำลังขยาย 40 เท่า)



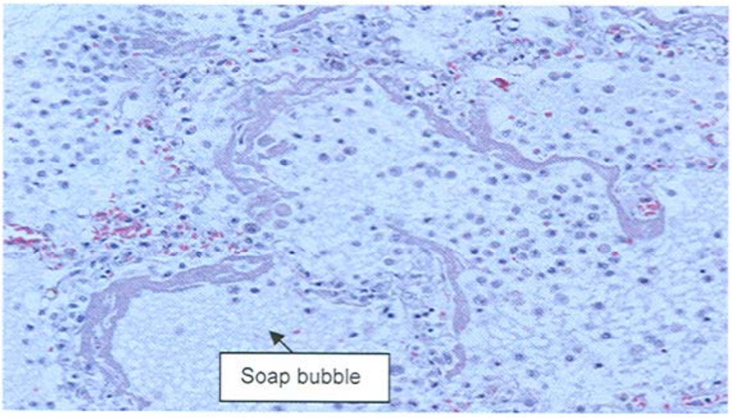
ภาพที่ 5 ลักษณะของสมองที่ขาดเลือด พบลักษณะของเนื้อตาย (necrosis)
(กำลังขยาย 40เท่า)



ภาพที่ 6 ลักษณะของไตวายจะพบไตมีการอักเสบเรื้อรัง พบเม็ดเลือดขาวชนิด
(กำลังขยาย 40 เท่า)

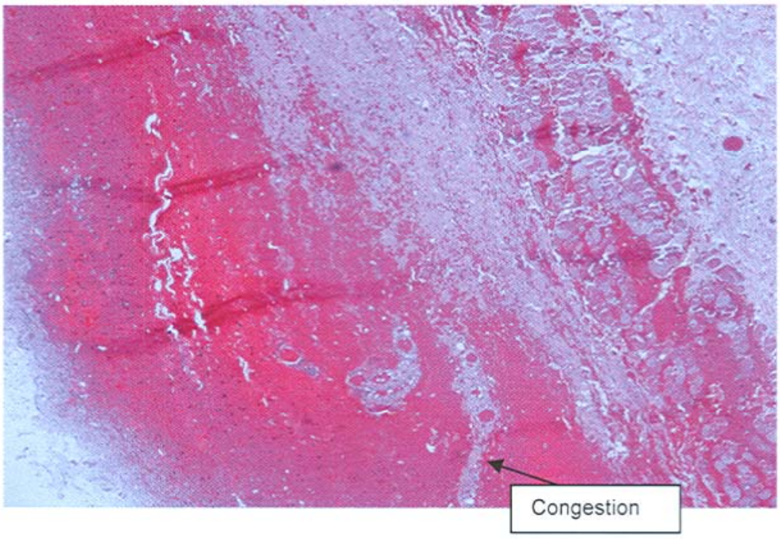


ภาพที่ 7 ส่วนของโกลเมอลูลัสที่ไต พบส่วนที่เป็นเนื้อตายส่งผลให้ไต
เสื่อมสภาพในการกรอง (กำลังขยาย 40 เท่า)

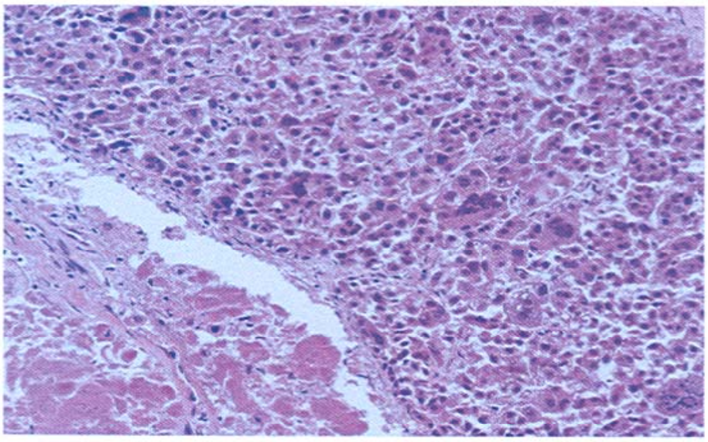


ภาพที่ 8 ลักษณะของปอดที่มีการอักเสบจากเชื้อรา (กำลังขยาย 40 เท่า)

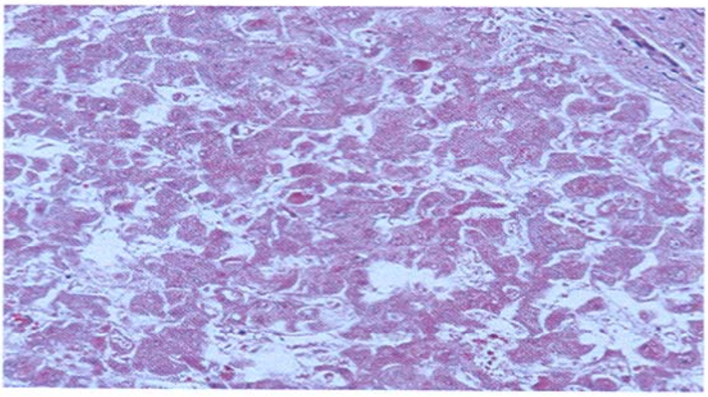
ภาพที่ 9 ลักษณะของปอดที่มีการอักเสบจากเชื้อรา จะพบsoap bubble
และพบเม็ดเลือด ขาวแทรกอยู่บริเวณถุงลม (กำลังขยาย 40 เท่า)



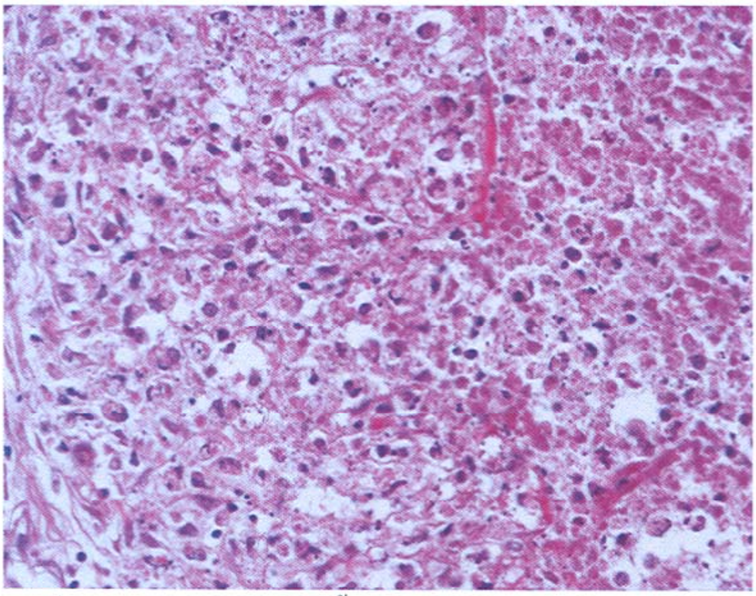
ภาพที่ 10 ลักษณะของกล้ามเนื้อบริเวณคอที่มีเลือดออกในเนื้อเยื่อ (กำลังขยาย 40 เท่า)



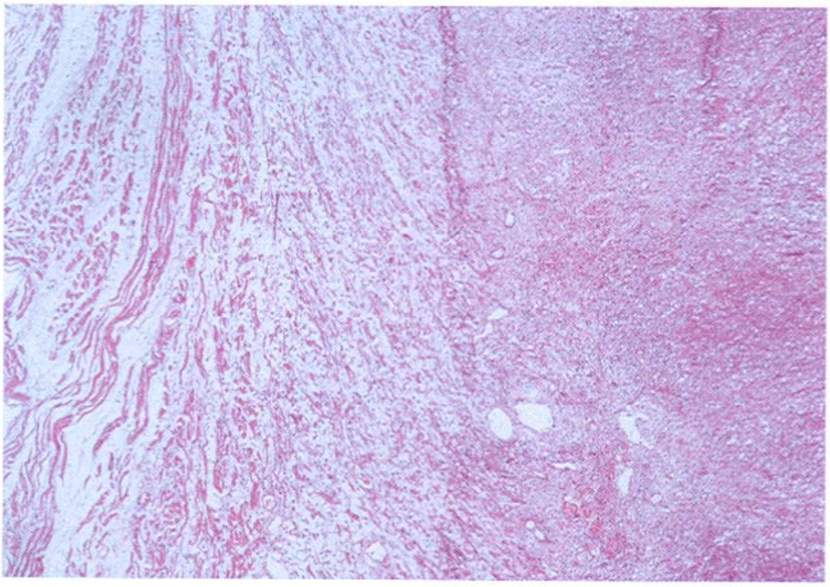
ภาพที่ 11 ลักษณะของมะเร็งตับจะพบตับมีพังผืด (กำลังขยาย 40 เท่า)



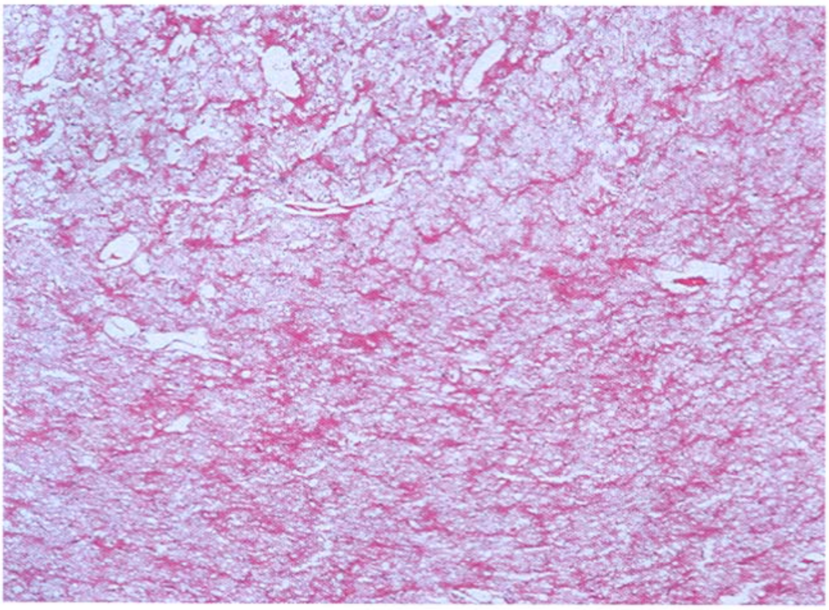
ภาพที่ 12 ลักษณะของมะเร็งตับจะพบตับมีพังผืด (กำลังขยาย 40 เท่า)



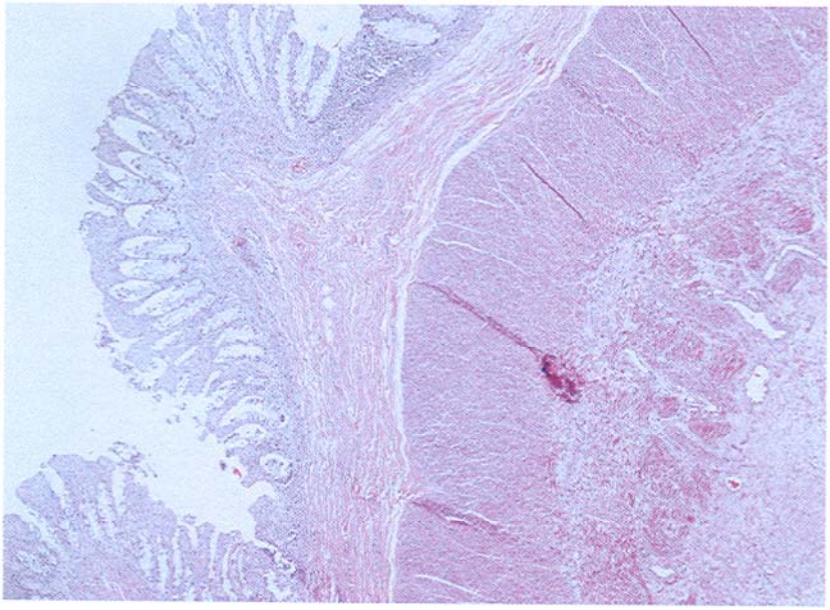
ภาพที่ 13 ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่มีการอักเสบพบเม็ดเลือดขาว
ชนิดนิวโทลฟิล



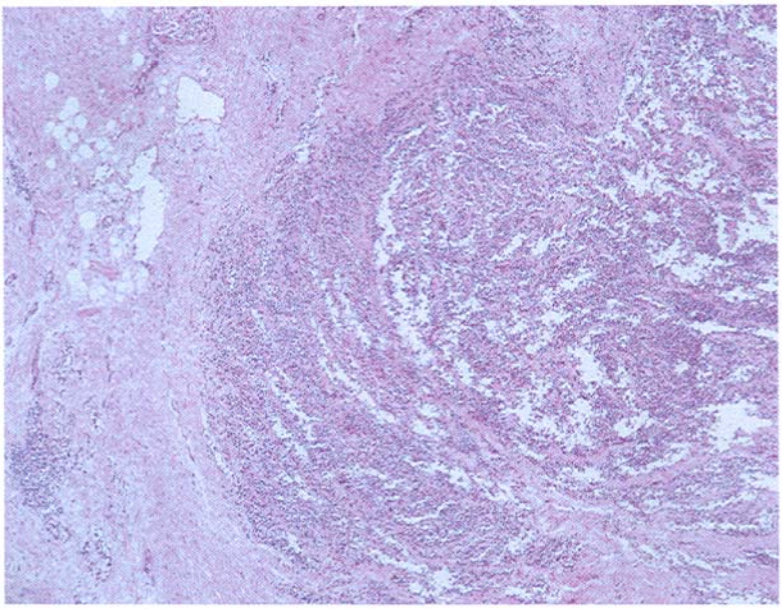
ภาพที่ 14 ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่มีเนื้อตาย (necrosis) และเยื่อหุ้มหัวใจหนาตัว
(กำลังขยาย 40 เท่า)



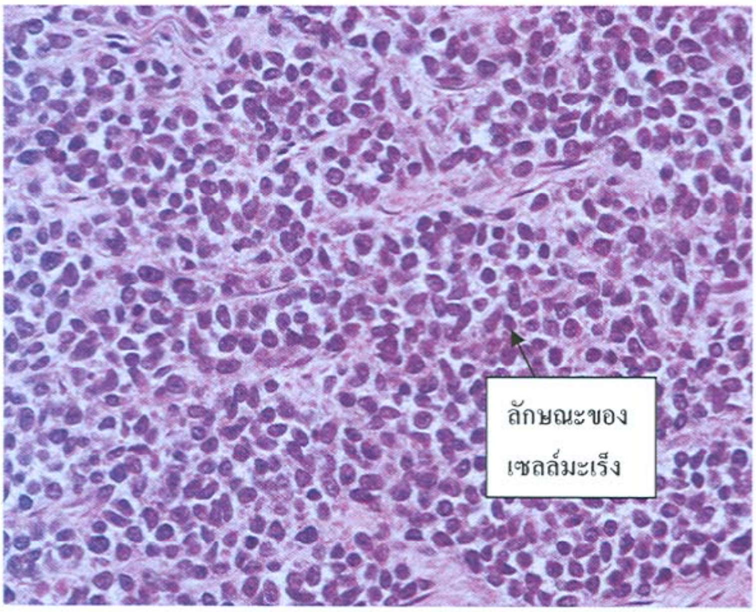
ภาพที่ 15 ภาพที่สมองพบเนื้อตาย (กำลังขยาย 40 เท่า)



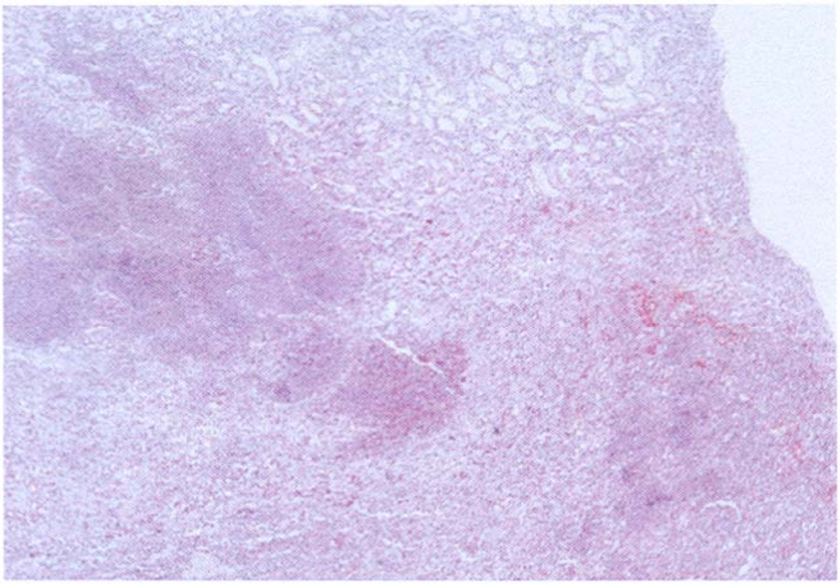
ภาพที่ 16 ผนังลำไส้ พบก้อนเนื้อที่ผิดปกติ (กำลังขยาย 40 เท่า)



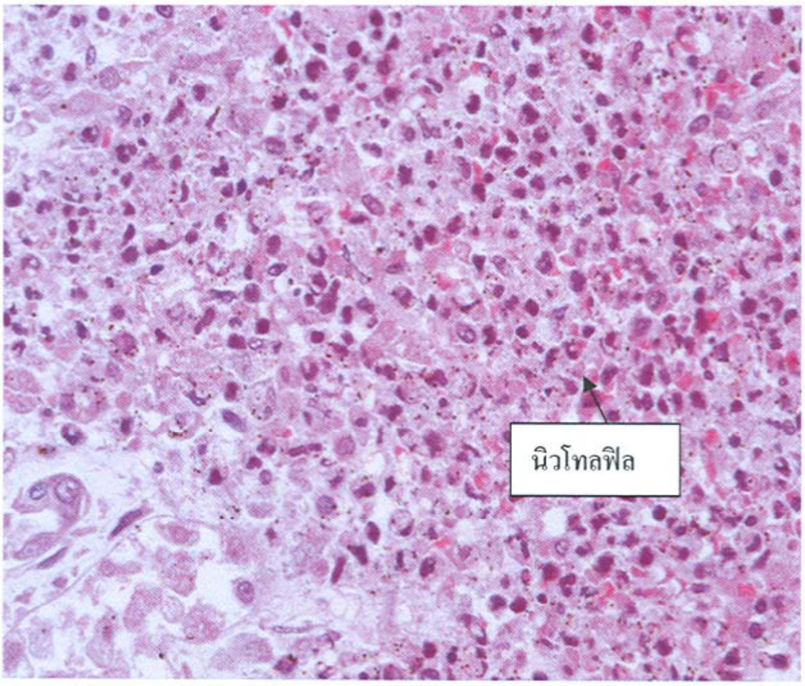
ภาพที่ 17 เนื้องอกที่ลำไส้ (กำลังขยาย 40 เท่า)



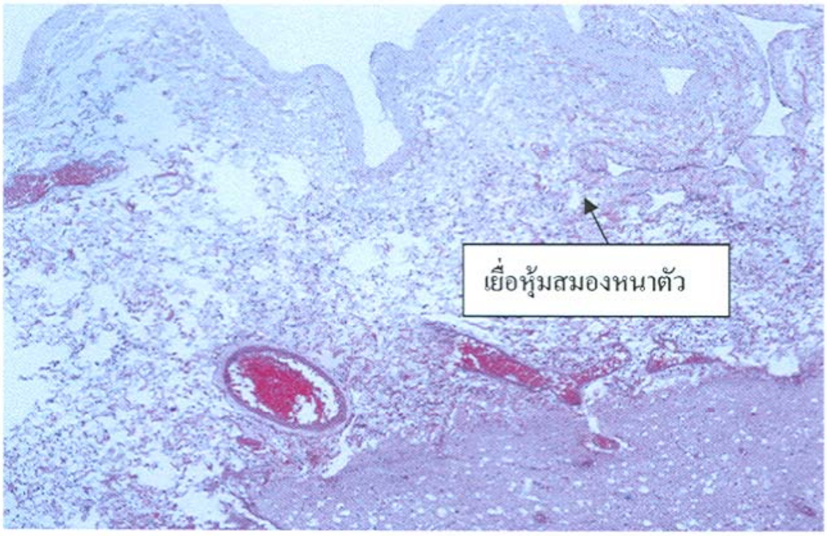
ภาพที่ 18 เนื้องอกที่ลำไส้ พบเม็ดเลือดขาวจำนวนมากที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มะเร็ง (กำลังขยาย 40 เท่า)



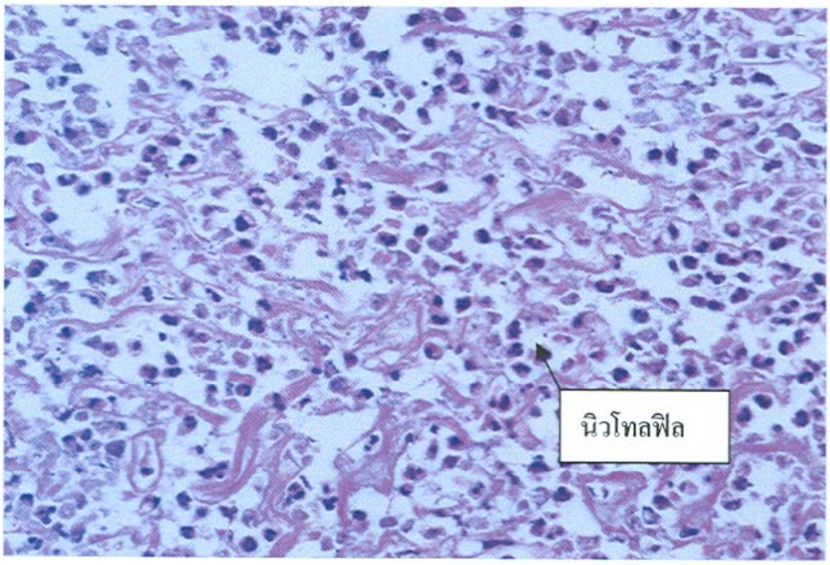
ภาพที่ 19 ลักษณะของไตที่มีการอักเสบ (กำลังขยาย 40 เท่า)



ภาพที่ 20 ลักษณะของไตที่มีการอักเสบ จะพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทลฟิล (กำลังขยาย 40 เท่า)



ภาพที่ 21 ลักษณะของเยื่อหุ้มสมองที่มีการหนาตัว (กำลังขยาย 40 เท่า)



ภาพที่ 22 เยื่อหุ้มสมองที่มีการอักเสบ พบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทลฟิลจำนวนมาก
(กำลังขยาย 40 เท่า)

จากการวิจัย ผลที่ได้รับจากการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ สามารถแสดงได้ ดังนี้

- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว จำนวน 27 คน พบในนักโทษคนที่ 1, 2, 35, 36, 38, 39, 54, 55, 56, 57, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 83, 85, 91 และ 92
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มอักเสบและปอดอักเสบ จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 7
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอด จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ที่ 37 และ 61
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวาย จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 62 และ 63
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพหัวใจและปอด จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 75
- ปอดอักเสบ จำนวน 28 คน พบในนักโทษคนที่ 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 29, 43, 44, 45, 46, 81, 89, 95, 96 และ 97
- ไตอักเสบ จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 4
- ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 5
- ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 22 และ 23
- หัวใจอักเสบ จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 42
- ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับ จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 82
- ไตวาย จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 27
- เนื้องอกที่ลำไส้ จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 32
- มะเร็งตับ จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 47, 48, 49, 52, 58, 60, 79, 87 และ 98
- Pneumonia จำนวน 3 คน พบในนักโทษคนที่ 26, 34 และ 80
- สมองขาดเลือด จำนวน 1 คน พบในนักโทษคนที่ 85
- ขาดอากาศหายใจ จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 86 และ 31
- เลือดออกที่สมอง จำนวน 3 คน พบในนักโทษคนที่ 84, 90 และ 99
- ติดเชื้อในกระแสโลหิต จำนวน 7 คน พบในนักโทษคนที่ 6, 40, 41, 50, 51, 53 และ 59
- เยื่อหุ้มสมองอักเสบ จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 94 และ 30
- เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ จำนวน 2 คน พบในนักโทษคนที่ 28 และ 100

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยเรื่อง ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของนักโทษชายสำหรับงานทางด้านนิติเวชศาสตร์ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสาเหตุการตายของนักโทษชายจำนวน 100 คน ในขณะถูกคุมขังภายในเรือนจำ กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้คือ ศพของนักโทษชายที่ส่งมาตรวจพิสูจน์ที่สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ นำชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆมาทำการตรวจในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา เพื่อหาสาเหตุการเสียชีวิต โดยใช้วิธีการย้อมด้วยวิธี Hmatoxylin and Eosia Stain

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยจำนวน 100 คน พบว่าสามารถจำแนกสาเหตุการตายออกเป็น 22 กลุ่ม ดังนี้

- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว 27 คน
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบ 1 คน
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอด 2 คน
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวาย 2 คน
- ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพหัวใจและปอด 1 คน
- ปอดอักเสบ 28 คน
- ไตอักเสบ 1 คน
- ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา 1 คน
- ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ 2 คน
- ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับ 1 คน
- ไตวาย 1 คน
- เนื้องอกที่ลำไส้ 1 คน
- มะเร็งตับ 2 คน
- วัณโรคปอด 9 คน
- ปอดติดเชื้อ (pneumonia) 3 คน
- สมองขาดเลือด 1 คน

- ขาดอากาศหายใจ 2 คน
- เลือดออกที่สมอง 3 คน
- ติดเชื้อในกระแสโลหิต 7 คน
- เยื่อหุ้มสมองอักเสบ 2 คน
- เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ 2 คน

อภิปรายผล

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาสาเหตุการตายของนักโทษชาย ในระหว่างถูกคุมขังภายในเรือนจำต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 100 คน สามารถแบ่งสาเหตุการตายออกเป็น 22 สาเหตุ ดังนี้

1. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว เป็นสาเหตุการตายที่พบเป็นอันดับที่สอง ของงานวิจัยนี้ โดยพบจำนวน 27 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า อวัยวะเกือบทุกส่วนจะพบ การอักเสบ (inflammation) คั่งเลือด (Congestion) และ บวมน้ำ (edema) ซึ่งส่งผลให้ระบบหายใจและระบบการไหลเวียนโลหิตของร่ายกายล้มเหลว และเสียชีวิตในที่สุด

2. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบ พบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่สมอง พบว่ามีการบวมน้ำ เยื่อหุ้มสมองหนาตัวและมีการอักเสบ ส่วนปอดมีการคั่งเลือด บวมน้ำ และมีการอักเสบ พบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก ซึ่งเมื่อมีการอักเสบของทั้งสองอวัยวะ ส่งผลให้ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบ

3. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพปอดพบจำนวน 2 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ พบเม็ดเลือดขาว ส่งผลให้อวัยวะอื่นๆ เกิดการเสื่อมสภาพ และทำให้ระบบไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

4. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวร่วมกับตับวาย พบจำนวน 2 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ ตับ พบเซลล์ไขมัน (fatty) และพบลักษณะของตับแข็ง ส่งผลให้อวัยวะอื่นๆ มีการอักเสบ บวมน้ำ และคั่งเลือด ทำให้ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

5. ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวจากพยาธิสภาพหัวใจและปอดพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่หัวใจ พบพังผืดแทรกเส้นเลือดหัวใจหนาตัว และปอดมีการอักเสบ ซึ่งส่งผลให้ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลว

6. ปอดอักเสบพบมากที่สุด ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า ปอดมีการบวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ และพบเซลล์อักเสบพวกนิวโทลฟิล จำนวนมาก และพบลักษณะเนื้อตาย (necrosis)

7. ไตอักเสบพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ ไตมีการอักเสบ คั่งเลือด พบเม็ดเลือดขาวพวกนิวโทลฟิล จำนวนมาก

8. ปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อราพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ปอดพบการอักเสบพบเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ภายในถุงลม พบลักษณะ soap bubble ซึ่งแสดงถึงการอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา

9. ติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมกับเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบพบจำนวน 2 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพ ที่เยื่อหุ้มหัวใจมีการอักเสบ พบลักษณะเนื้อที่ผิดปกติ ส่งผลให้มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต

10. หัวใจอักเสบพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพ ทีกล้ามเนื้อหัวใจ พบเนื้อตาย และพบเม็ดเลือดขาวพวกนิวโทลฟิล ในกล้ามเนื้อหัวใจจำนวนมาก

11. ปอดอักเสบร่วมกับติดเชื้อในตับพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ปอดมีการอักเสบ คั่งเลือด พบเม็ดเลือดขาวพวกนิวโทลฟิล และไม่พบถุงลมปอดร่วมกับการติดเชื้อที่ตับ โดยพบว่าตับมีพังผืด เจอเนื้อตาย

12. ไตวายพบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ไตพบว่าไตมีการอักเสบเรื้อรัง พบลิมโฟซัทย์ และส่งผลให้โกลเมอลูลัสเสื่อมสภาพในการกรองทำให้ไตวาย

13. เนื้องอกที่ลำไส้พบจำนวน 1 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ลำไส้ พบเนื้องอกซึ่งภายในเนื้องอกพบเซลล์ที่มีนิวเครียสโตติดสีเข้ม ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มะเร็ง

14. มะเร็งตับพบจำนวน 2 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ตับมีการคั่งเลือด พบก้อนเนื้องอกประเภทสารเมือกในตับ

15. วัณโรคปอดพบมากเป็นอันดับที่ 3 โดยพบจำนวน 9 คน ซึ่งผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่ามีพยาธิสภาพที่ปอด โดยพบว่าปอดมีการบวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ พบหย่อมเนื้อตายที่มีขอบเขตชัดเจน (Caseous necrosis) พบ granuloma และจุดหนองวัณโรค

16. Pneumonia พบจำนวน 3 คน ซึ่ง ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่ปอดถุงลมโป่งพอง คั่งเลือด บวมน้ำ พบเม็ดเลือดขาวนิวโทลฟิลจำนวนมากอยู่ในหลอดลมขนาดใหญ่และเล็กจนไปถึงถุงลม

17. สมองขาดเลือดพบจำนวน 1 คน ซึ่ง ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่สมองโดยสมองมีการขาดเลือด พบหย่อมเนื้อตาย

18. ขาดอากาศหายใจพบจำนวน 2 คน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่กล้ามเนื้อคอ โดยพบเลือดออกที่เนื้อเยื่อ ซึ่งเกิดจากการผูกคอตายทำให้ขาดอากาศหายใจ ทำให้เสียชีวิต

19. เลือดออกที่สมอง พบจำนวน 3 คน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่สมอง มีเลือดออกที่สมอง (hemorrange) มีอาการบวม การที่เลือดออกที่สมองอาจเกิดจากอุบัติเหตุ หรือเส้นเลือดในสมองแตก หลอดเลือดฉีกขาด

20. ติดเชื้อในกระแสโลหิต พบจำนวน 7 คน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าเกิดพยาธิสภาพเกือบทุกอวัยวะ โดยพบปอดมีการบวมน้ำ คั่งเลือด อักเสบ พบเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ที่ปอด ตับ และไต ทำให้ติดเชื้อในกระแสโลหิต

21. เยื่อหุ้มสมองอักเสบพบจำนวน 2 คน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่เยื่อหุ้มสมอง จะหนาตัว และพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก

22. เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบพบจำนวน 2 คน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เกิดพยาธิสภาพที่เยื่อหุ้มหัวใจ โดยพบเนื้อที่ผิดปกติ บริเวณกว้างที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่หัวใจ พบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก พวกนิวโทลฟิล

จากการวิจัยพบว่า จากการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากศพนักโทษชายจำนวน 100 คน สาเหตุการตายส่วนใหญ่ มาจากปอดอักเสบเป็นอันดับหนึ่ง ซึ่งเป็นโรคทางระบบทางเดินหายใจ และสามารถติดต่อทางการหายใจได้ และสามารถส่งผลต่อระบบอื่นๆ ในร่างกายได้ เช่น ทำระบบหายใจและไหลเวียนโลหิตล้มเหลวได้ หรือสามารถล่ามติดต่อไปทำให้เกิดการอักเสบติดเชื้อที่อวัยวะอื่น ๆ จนทำให้เสียชีวิตในที่สุด ผลการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลในการนำผลการวิจัยไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำมาช่วยในการลดอัตราการเสียชีวิตของนักโทษในขณะถูกคุมขังให้น้อยลงได้ และเป็นประโยชน์สำหรับงานราชการ

ข้อเสนอแนะ

1. **ข้อเสนอแนะจากการวิจัย**

ผลการวิจัย ข้างต้นยังคงมีข้อจำกัดบางประการที่เป็นอุปสรรคในการวิเคราะห์สาเหตุการตาย เช่น ประวัติของนักโทษก่อนเข้าเรือนจำว่ามีโรคประจำตัวอะไรบ้าง รวมทั้งการย้อมวิธีพิเศษต่างๆ ในการช่วยหาสาเหตุการตายได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การย้อม acid –fast ในรายที่เป็นวัณโรคแล้วเสียชีวิต เป็นต้น ซึ่งสาเหตุการตายของนักโทษถือว่าเป็นประเด็นที่น่าสนใจ และจำเป็นสำหรับงานที่เกี่ยวกับการพัฒนาระบบของกระบวนยุติธรรม

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 ควรเพิ่มกลุ่มตัวอย่างให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น หรือทำเปรียบเทียบระหว่างนักโทษชายกับนักโทษหญิงว่าผลที่ได้รับคล้ายคลึงกันหรือไม่

2.2 ควรมีการย้อมพิเศษเพิ่มเติม เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ผลได้อย่างชัดเจน

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

ประเสริฐ สำราญเวทย์. พยาธิวิทยาระบบทางเดินหายใจ. : พยาธิวิทยา.กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2534 : 139-174.

พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ . พิเชฐ สัมปทานุกูล. ตำราภาพจุลพยาธิวิทยา .จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2541 .

ภาษาอังกฤษ

Charles, K. , Johnson, WW., John Eo, Allen, RG. Infection of the lung .In : Damjanov I,Linder J, eds. Anderson's Pathology .10th ed. St. Louis : Mosby , 1996 : 1488-1496

Chensue, SW., Ward, SA. Inflammation In : Damjanov I,Linder J, eds. Anderson's Pathology ed. St. Louis : Mosby , 1996 :47-49

Kissane,OM.,et al.Infectious disease , : Damjanov I,Linder J, eds. Anderson's Pathology .10th ed. St. Louis : Mosby , 1996 : 747-1562

Lester, K.,Frederick, JS. The Lung.Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.Robbins .Pathologic Basis of disease .5th ed. Philadelphia :W.B. Saunders, 1994:673-734

Powers, JM. Horoupian,DS. Central nervous system. In : Damjanov I,Linder J, eds. Anderson's Pathology .10th ed. St. Louis : Mosby , 1996 :2693-2798

Virmani ,R ., Atkinson, JB., Fenoglio, JJ. : Cardiovascular Pathology. Philadelphia :W.B. Saunders,1991

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวปัทมานุช นักเลิศพันธ์
ที่อยู่	69/250 ซอยนครการศึกษา อำเภอเมือง ตำบลบางกระสอ จังหวัดนนทบุรี 11000
	สถานที่ทำงาน สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ถนนอังรีดูนังต์
	เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2550 นักเทคนิคการแพทย์ ห้องปฏิบัติการชิ้นเนื้อ กลุ่มงานนิติพยาธิ
สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ