

การเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสีเพิร์ลพริสเซียนบลู ระหว่างชั้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น
ภาวะหลอดเลือดขนาดเล็กที่ผิวหนังอักเสบ และ
ผื่นผิวหนังอักเสบ ชนิดพิกเมนเตด เพอร์เพอริค เดอร์มาโตซิส



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Comparison of perls prussian blue staining characteristics between
leukocytoclastic vasculitis and pigmented purpuric dermatoses



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสีเพิร์ลพาสเขียนบลู
ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น ภาวะหลอดเลือด
ขนาดเล็กที่ผิวหนังอักเสบ และ ผื่นผิวหนังอักเสบ ชนิดพิก
เมนเต็ด เพอร์เพอริค เดอร์มาโตซิส

โดย

น.ส.สิริวรรณ สุขุมวาท

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ครองวงศ์ มุสิกถาวร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิงจันทิญา จันทร์สว่างภวนะ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(แพทย์หญิงชุตติกา ศรีสุทธิยากร)

สิริวรรณ สุขุมวาท : การเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสีเพิร์ลพรัสเซียนบลู ระหว่างชั้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น ภาวะหลอดเลือดขนาดเล็กที่ผิวหนังอักเสบ และ ผื่นผิวหนังอักเสบ ชนิดพิกเมนเตด เพอร์เพอริค เดอร์มาโตซิส. (Comparison of perls prussian blue staining characteristics between leukocytoclastic vasculitis and pigmented purpuric dermatoses) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล

ที่มา: ภาวะหลอดเลือดขนาดเล็กที่ผิวหนังอักเสบ (LCV) และ ภาวะพิกเมนเตด เพอร์เพอริค เดอร์มาโตซิส (PPD) เป็นสองภาวะที่มีพยาธิกำเนิดแตกต่างกัน แต่ผู้ป่วย LCV และ PPD อาจมาด้วยอาการแสดงและผลการตรวจชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการที่คล้ายคลึงกันได้ ในขณะที่การย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค direct immunofluorescence เพื่อแยกทั้งสองภาวะอาจมีข้อจำกัดบางประการ การย้อมชิ้นเนื้อด้วยสีย้อมธาตุเหล็กที่ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาอย่างสีเพิร์ลพรัสเซียนบลู (Perls) อาจจะแยกภาวะ LCV ออกจากภาวะ PPD ได้

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบการติดสี Perls ระหว่างภาวะ LCV และภาวะ PPD

วิธีการศึกษา: ชิ้นเนื้อที่เหลือในพาราฟินจะถูกคัดเลือกมาเพื่อเข้าวิจัยและแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม LCV กลุ่ม PPD และกลุ่ม control และถูกนำมาย้อมสไลด์แก้วด้วยสี Perls จากนั้นสไลด์แก้วจะถูกอ่านผลโดยตจพพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ 3 ท่านซึ่งเป็นอิสระต่อกัน

ผลการศึกษา: การติดสีของสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสี และตำแหน่งที่ติดสี มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม LCV และกลุ่ม PPD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.006, น้อยกว่า 0.001 และ น้อยกว่า 0.001 ตามลำดับ

สรุปผล: การติดสีของสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสี และตำแหน่งที่ติดสี มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม LCV กลุ่ม PPD

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6370128030 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: PERL'S PRUSSIAN BLUE, PIGMENTED PURPURIC DERMATOSES,
LEUKOCYTOCLASTIC VASCULITIS

Sireewan Sukhumvat : Comparison of perls prussian blue staining characteristics between leukocytoclastic vasculitis and pigmented purpuric dermatoses. Advisor: Assoc. Prof. JADE WITITSUWANNAKUL, M.D.

Background: Leukocytoclastic vasculitis (LCV) and Pigmented Purpuric Dermatoses (PPD) are different in pathogenesis but their clinical manifestations and histological results sometimes look similar. While the distinctive technique, direct immunofluorescence staining technique, has some limitations, the commonly used iron stain in histological laboratory like Perl's Prussian blue (Perls) stain may be able to separate LCV and PPD.

Objective: To compare Perls staining characteristics between LCV and PPD.

Material and methods: The leftover paraffin specimen blocks were divided into 3 groups: LCV, PPD and control group. Then, they were processed into Perls staining glass slide and independently reviewed by 3 dermatopathologist experts.

Results: Perls staining at around the vessel, amount and location of the staining were significantly different between LCV and PPD group with p-value of 0.006, <0.001 and <0.001, respectively.

Conclusion: The Perls staining at around the vessel, amount, and location of the staining are different between LCV and PPD.

Field of Study: Medicine

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล ซึ่งให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในข้อขัดข้องต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณพันตรีหญิง แพทย์หญิง ชูติกา ศรีสุทธิยากร อาจารย์ประจำหน่วยตจวิทยา กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง เพ็ญวดี พัฒนปรีชากุล อาจารย์ประจำภาควิชาตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เสียสละเวลาในการประเมินผลชิ้นเนื้อในงานวิจัย

ขอบคุณ นางสาวเรืองรอง กลิ่นหอม และ นางสาวพรเทพินทร์ จำปาพันธุ์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำหน่วยตจวิทยา ที่ทำหน้าที่ดำเนินการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสีเพิร์ลพรัสเซียนบลู ซึ่งมีส่วนให้ งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อนที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีโดยเสมอมา

สิริวรรณ สุขุมวาท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research questions).....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	4
1.4 สมมติฐาน (Hypothesis).....	5
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	6
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	7
1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition).....	7
1.8 รูปแบบการวิจัย (Research design).....	8
1.9 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ (Brief study procedure).....	8
1.10 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration).....	9
1.11 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation).....	9

1.12. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or anticipated benefit gain)	9
1.13. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)	10
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures)	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	13
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)	13
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)	13
3.3 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยโดยละเอียด	21
3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)	22
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data analysis and statistics)	23
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	25
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา	25
4.2 ผลการวิจัย	29
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	34
5.1 อภิปรายผล	34
5.2 สรุปผลการวิจัย	39
5.3 จุดแข็งของการวิจัย	40
5.4 ข้อจำกัดในการวิจัย	40
5.5 ข้อเสนอแนะ	40
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	44
ภาคผนวก ค	45

ภาคผนวก ง.....	46
บรรณานุกรม.....	47
ประวัติผู้เขียน.....	51



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 แสดงการสรุปวิธีการรวบรวมข้อมูล	23
Table 2 แสดงจำนวนและร้อยละของคุณลักษณะของประชากรในการศึกษา.....	28
Table 3 ผลเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดเชื้อ Perls ระหว่างกลุ่ม LCV กลุ่ม PPD และกลุ่ม control	32
Table 4 ความสอดคล้องของผู้เชี่ยวชาญในการอ่านคุณลักษณะของสไลด์แก้ว ที่ย้อมด้วยสี Perls. 33	
Table 5 แสดงการจำนวนสไลด์ที่ติดเชื้อ Perls ไม่ว่าจะที่ตำแหน่งใดหรือปริมาณเท่าใดก็ตาม เปรียบเทียบระหว่าง PPD และ LCV	37
Table 6 แสดงการจำนวนสไลด์ที่ติดเชื้อ Perls ล้อมรอบเส้นเลือดเปรียบเทียบระหว่าง PPD และ LCV	37
Table 7 ผลการเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดเชื้อ Perls ระหว่างกลุ่ม stasis dermatitis (Stasis) LCV PPD และ กลุ่ม control	38

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
Figure 1 กรอบแนวคิดการวิจัย	6
Figure 2 ตัวอย่าง การติดสี Perls ที่เซลล์เอนโดทีเลียม.....	17
Figure 3 ตัวอย่าง การติดสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก.....	17
Figure 4 การประเมินปริมาณการติดสีด้วยสีย้อมธาตุเหล็ก.....	18
Figure 5 ตัวอย่าง การติดสีย้อมธาตุเหล็กที่ siderophage.....	19
Figure 6 แสดงการคัดเลือกประชากร.....	26
Figure 7 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก ที่พบในงานวิจัยนี้.....	29
Figure 8 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ปริมาณการติดสี 3+ ที่บริเวณชั้น papillary dermis ที่พบ ในงานวิจัยนี้.....	30
Figure 9 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ปริมาณการติดสี 0 ที่พบในงานวิจัยนี้.....	30
Figure 10 แสดงภาพชิ้นเนื้อที่วินิจฉัยต่างกันบนสไลด์แก้วเดียวกัน.....	35

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

ภาวะหลอดเลือดขนาดเล็กที่ผิวหนังอักเสบ (leukocytoclastic vasculitis; LCV) เป็นภาวะที่มีพยาธิกำเนิดหลัก 2 ประการ คือ (1.) เกิดจากการที่ immune complex อันประกอบไปด้วย อิมมูโนโกลบูลิน แอนติเจน และคอมพลีเมนต์ มาตกตะกอนที่ผนังของหลอดเลือดขนาดเล็ก นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิล ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์เอนโดทีเลียม ตามมาด้วยการอักเสบและการตายของหลอดเลือดในที่สุด (2.) เกิดจากการเกิดการที่ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อไซโตพลาสซึมของนิวโทรฟิล (antineutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) ทำให้มีการปล่อยเอนไซม์ที่อยู่ในแกรนูลของนิวโทรฟิลออกมา และนำไปสู่การอักเสบของหลอดเลือด⁽¹⁾ แม้ผู้ป่วยจะมาด้วยอาการของหลอดเลือดอักเสบที่ผิวหนัง แต่อาจเป็นเพียงอาการแสดงแรกเริ่มของหลอดเลือดอักเสบที่อวัยวะอื่นๆทั่วร่างกาย โดยอวัยวะที่มักเกิดการอักเสบร่วมด้วย เช่น ตา ไต ทางเดินอาหาร เป็นต้น การตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการอย่างใดอย่างหนึ่งอาจจะไม่ช่วยในการวินิจฉัย⁽¹⁾ การตรวจชิ้นเนื้อผิวหนังจึงมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยภาวะนี้ โดยมักพบผนังหลอดเลือดมีการตายแบบ fibrinoid necrosis พบนิวโทรฟิลออกมานอกหลอดเลือดร่วมกับการปล่อยเศษของนิวเคลียสออกมา (leukocytoclasia) และพบเม็ดเลือดแดงออกมานอกหลอดเลือด (RBC extravasation)^(1, 2) อย่างไรก็ตาม บางครั้งผลตรวจชิ้นเนื้ออาจพบเพียง leukocytoclasia แต่ไม่พบ fibrinoid necrosis ซึ่งทำให้การวินิจฉัยภาวะนี้ผิดพลาดได้⁽¹⁾ การรักษา LCV มุ่งเน้นการลดการอักเสบที่เกิดขึ้นทั้งในภาวะเฉียบพลันและในระยะยาว พยากรณ์โรคของภาวะนี้มีความรุนแรงแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับการอักเสบของหลอดเลือดที่อวัยวะอื่นๆที่เกิดร่วมด้วย⁽¹⁾

ภาวะพิกเมนต์เต็ด เพอร์เพอริค เดอร์มาโตซิส (Pigmented Purpuric Dermatoses; PPD) เป็นภาวะที่มีการรั่วของเม็ดเลือดแดงออกมานอกหลอดเลือด โดยไม่มีการอักเสบของผนังหลอดเลือด มักเกิดกับหลอดเลือดที่ผิวหนังบริเวณขา รอยโรคมักไม่มีอาการคันหรือเจ็บ สาเหตุหลักของภาวะนี้เกิดจากความอ่อนแอของผนังหลอดเลือดที่ผิวหนัง ทำให้มีเม็ดเลือดแดงรั่วออกมาจากหลอดเลือด

ผลตรวจชิ้นเนื้อจะพบมี RBC extravasation และสามารถพบเซลล์ที่บ่งถึงการอักเสบ (inflammatory cell) ร่วมด้วยได้^(3, 4) เนื่องจากภาวะนี้มักหายได้เอง จึงไม่มีการรักษาจำเพาะ การรักษาหลัก คือ รักษาตามอาการ เช่น การให้ยาทาากลุ่มสเตียรอยด์ในรายที่มีอาการคัน เป็นต้น⁽³⁾

แม้ทั้งสองภาวะจะมีพยาธิกำเนิด การดำเนินโรค และการรักษาที่แตกต่างกัน แต่ในคนไข้ บางรายกลับพบว่ามีอาการแสดงทางคลินิกที่ผิวหนังคล้ายคลึงกัน และผลตรวจชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย สีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E) ในบางครั้งมีลักษณะใกล้เคียงกันจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ชัดเจน จากการสืบค้นผลการตรวจชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี H&E ณ ห้องปฏิบัติการสาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2560 ถึง วันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ.2563 พบชิ้นเนื้อที่ส่งมาเพื่อวินิจฉัยแยกระหว่างภาวะ LCV และภาวะ PPD จำนวน 213 ชิ้น พบมีชิ้นเนื้อ 24 ชิ้น หรือคิดเป็น 11.3% ที่ไม่สามารถแยกภาวะทั้งสองออกจากกันได้ ด้วยการย้อมเพียงสี H&E ซึ่งทำให้เกิดปัญหาในการรักษาผู้ป่วย

การตรวจชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค direct immunofluorescence (DIF) สามารถช่วยในการ วินิจฉัยในกลุ่ม vasculitis ได้ โดยสีฟลูออเรสเซนซ์จะจับกับ immune complex ที่ตกตะกอนที่ผนัง หลอดเลือด และเรืองแสงออกมาเป็นสีเขียวในที่มืด ทำให้วินิจฉัยการมี vasculitis ได้⁽⁵⁾ แต่การตรวจ DIF มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือ ค่าใช้จ่ายของ DIF สูงกว่าการย้อมสีโดยทั่วไป และมีความ ยุ่งยากกว่า เนื่องจากจะต้องตัดจากรอยโรคที่เกิดขึ้นใหม่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง⁽²⁾ นอกจากนี้ ห้องปฏิบัติการที่สามารถดำเนินการรับตรวจชิ้นเนื้อ DIF และแพทย์ผู้มีความเชี่ยวชาญที่สามารถอ่าน ผลได้ ก็มีจำนวนจำกัดในประเทศไทย

จากข้อมูลข้างต้นพบว่า ผลการตรวจชิ้นเนื้อทั้ง LCV และ PPD จะพบ RBC extravasation ซึ่งทำให้มีธาตุเหล็กออกมาจากเม็ดเลือดแดง และพบ hemosiderin (อันมีธาตุเหล็กเป็นส่วนประกอบ) ออกมาอยู่ในชั้นหนังแท้ได้ การย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี H&E ไม่สามารถบอกความแตกต่าง ของธาตุเหล็กได้ แต่การย้อมด้วยสีเพิร์ลพรัสเซียนบลู (Perl's Prussian blue ; Perls) ซึ่งใช้สำหรับ ย้อมธาตุเหล็ก อาจแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างสองภาวะนี้ได้ ขั้นตอนการย้อมสี Perls นั้นไม่ ยุ่งยาก และเป็นสีที่มีในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาทั่วไป ราคาไม่แพงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้

จริง จึงนำไปสู่จุดประสงค์ของการวิจัย ที่จะศึกษาความแตกต่างของการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นเนื้อ
ระหว่าง LCV และ PPD ด้วยการย้อมสี Perls เพื่อช่วยในการวินิจฉัยที่ถูกต้องต่อไป

1.2 คำถามของการวิจัย (Research questions)

คำถามหลัก (Primary research question)

การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในการติดสีของธาตุเหล็ก เมื่อเทียบกับการ
ย้อมสี Perls ในภาวะPPD หรือไม่

คำถามรอง (Secondary research question)

- การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในการติดสีของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม เมื่อ
เทียบกับการย้อมสี Perls ในภาวะPPD หรือไม่
- การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในการพบลักษณะการติดสีของธาตุเหล็กใน
hemosiderin ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับการย้อมสี Perls ในภาวะPPD
หรือไม่
- การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในด้านปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้
เมื่อเทียบกับการย้อมสี Perls ในภาวะPPD หรือไม่
- การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในด้านตำแหน่งที่ติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้
เมื่อเทียบกับการย้อมสี Perls ในภาวะPPD หรือไม่
- การย้อมสี Perls ในภาวะ LCV มีความแตกต่าง ในด้านการพบ siderophages เมื่อเทียบกับการ
ย้อมสี Perls ในภาวะPPD หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาความแตกต่าง ในการพบลักษณะการติดสีของธาตุเหล็ก ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls

วัตถุประสงค์รอง

- เพื่อศึกษาความแตกต่าง ในการพบลักษณะการติดสีของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls
- เพื่อศึกษาความแตกต่างในการพบลักษณะการติดสีของธาตุเหล็กใน hemosiderin ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls
- เพื่อศึกษาความแตกต่างในด้านปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls
- เพื่อศึกษาความแตกต่างในด้านตำแหน่งที่ติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls
- เพื่อศึกษาความแตกต่างในด้านการพบ sideropharge ระหว่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD เมื่อย้อมด้วยสี Perls

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

Null Hypothesis: การย่อมนสี Perls ในภาวะ LCV มีคุณลักษณะการติดสีของธาตุเหล็ก *ไม่แตกต่าง* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการย่อมนสี Perls ในภาวะPPD

Alternative Hypothesis: การย่อมนสี Perls ในภาวะ LCV มีคุณลักษณะการติดสีของธาตุเหล็ก *แตกต่าง* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการย่อมนสี Perls ในภาวะPPD



1.5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)

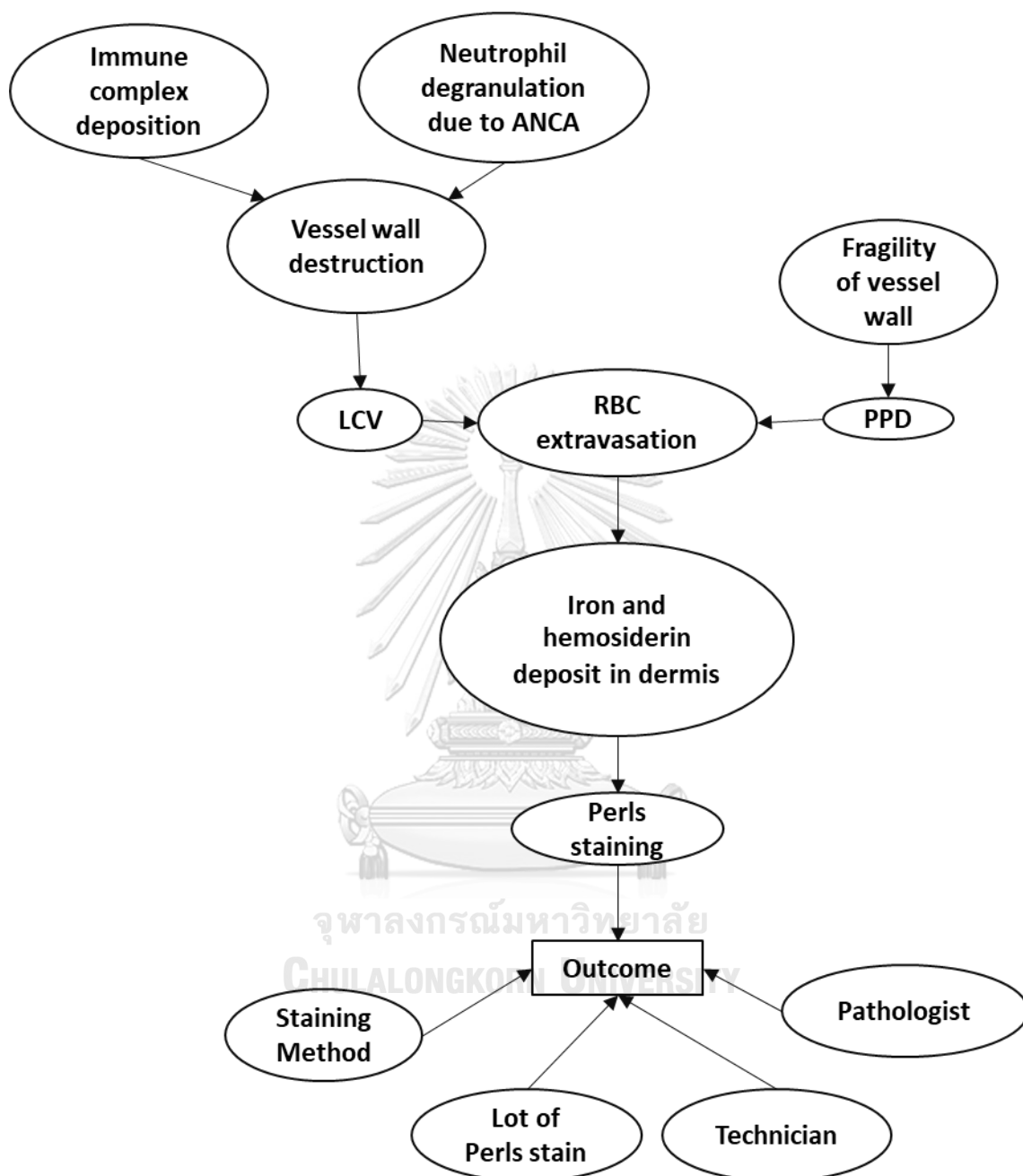


Figure 1 กรอบแนวความคิดการวิจัย

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย LCV คือ ชิ้นเนื้อที่มีคุณลักษณะเข้าได้กับ ภาวะ LCV จากผลการย้อมสี H&E เท่านั้น มิได้หมายรวมถึง ผลการตรวจร่างกาย ผลการย้อมด้วยเทคนิค DIF และผลทางห้องปฏิบัติการ
- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย PPD คือ ชิ้นเนื้อที่มีคุณลักษณะเข้าได้กับ ภาวะ PPD จากผลการย้อมสี H&E เท่านั้น มิได้หมายรวมถึง ผลการตรวจร่างกาย และผลทางห้องปฏิบัติการ
- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นชิ้นเนื้อขาปกติ คือ ชิ้นเนื้อผิวหนังของขาที่ไม่มีคุณลักษณะที่เข้าได้กลับ ภาวะ LCV และ ภาวะ PPD จากผลการย้อมสี H&E เท่านั้น มิได้หมายรวมถึง ผลการตรวจร่างกาย และผลทางห้องปฏิบัติการ

1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition)

- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย LCV คือ ชิ้นเนื้อที่มีคุณลักษณะเข้าได้กลับ ภาวะ LCV โดยการย้อมสี H&E กล่าวคือ ต้องพบมี perivascular infiltrate with neutrophil, leukocytoclasia, expansion of vessel wall, fibrin deposition within the vessel wall และพบมี RBC extravasation⁽⁶⁾
- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย PPD คือ ชิ้นเนื้อที่มีคุณลักษณะเข้าได้กลับ ภาวะ PPD โดยการย้อมสี H&E กล่าวคือ ต้องพบมี inflammatory cell (purely lymphoid) ล้อมรอบ capillaries (centered above the level of the post-capillary venule), hemosiderin และพบมี RBC extravasation⁽⁶⁾

- ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นชิ้นเนื้อผิวหนังขาปกติ คือ ชิ้นเนื้อของผิวหนังที่ขา ที่ไม่มีคุณลักษณะ
เข้าได้กับ ภาวะ LCV และ PPD ข้างต้น
จากการย้อมสี H&E

1.8 รูปแบบการวิจัย (Research design)

- การศึกษาวิเคราะห์แบบตัดขวาง (cross-sectional analysis study)
- แสดงผลแบบการวิจัยเชิงบรรยาย (descriptive research)

1.9 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ (Brief study procedure)

1. ตรวจสอบชิ้นเนื้อที่นำมาเข้าวิจัย ว่ามีใบยินยอมการทำหัตถการจากเวชระเบียนที่มีการแจ้ง
วัตถุประสงค์ ข้อดี ข้อเสีย และมีลายเซ็นยินยอมครบถ้วน
2. ตรวจสอบรายชื่อที่มีชิ้นเนื้อพาราฟินที่ยังไม่ผ่านการย้อมเหลืออยู่ โดยได้รับการเก็บไว้ใน
ห้องปฏิบัติการ
3. เก็บข้อมูลผลพยาธิวิทยาจากระบบบันทึกข้อมูลผลตรวจทางตรวจทางจุลพยาธิวิทยา
สาขาวิชาตจวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยอ้างอิงตามการออกผล
ด้วยรหัส ICD-10 ตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ. 2560 –31 ตุลาคม พ.ศ. 2563 ที่เข้าได้กับเกณฑ์การ
คัดเลือกเข้าร่วมและการตัดออกจากการศึกษา (inclusion and exclusion criteria)
4. ชิ้นเนื้อที่เดิมเคย ได้รับการออกผลวินิจฉัยว่าเป็นภาวะ LCV ภาวะ PPD และชิ้นเนื้อจากผิวหนัง
ขาที่ปกติ ด้วยการย้อมสี H&E จะถูกสุ่มเลือกมาด้วยวิธี simple random sampling กลุ่มละ
50 ชิ้นเนื้อ
5. นำชิ้นเนื้อในข้อ 4 มาทำการย้อมด้วยสี Perls
6. นำสไลด์แก้วชิ้นเนื้อที่ได้รับการย้อมสี Perls มาอ่านผลโดยตจพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ 3 ท่าน
7. บันทึกผลการอ่านชิ้นเนื้อที่ย้อมสี Perls

1.10 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

หลักเคารพในบุคคล (respect for person) มีการอำพรางข้อมูลผู้ป่วย และผลวินิจฉัยเดิมของผู้ป่วย ตจพยาธิแพทย์ผู้อ่านผลขึ้นเนื้อจะไม่ทราบข้อมูลดังกล่าว

หลักประโยชน์สูงสุด (beneficence) ผลการอ่านขึ้นเนื้อในงานวิจัยนี้จะมีได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการวินิจฉัยที่ผ่านมาของผู้ป่วยและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการรักษา

หลักการยุติธรรม (justice) ขึ้นเนื้อที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาคจะถูกเลือกมาแบบสุ่ม ซึ่งทำให้ทุกขึ้นเนื้อมีโอกาสถูกเลือกเข้ามาศึกษาเท่าๆกัน

ผู้วิจัยทำการค้นข้อมูลหลังจากได้รับหนังสืออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และผ่านข้อพิจารณาทางจริยธรรมแล้ว

1.11 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation)

การศึกษานี้เป็นการเก็บข้อมูลแบบย้อนหลัง จึงมีข้อจำกัดคือ การเก็บรวบรวมข้อมูลอาจทำได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากไม่มีการบันทึกไว้ และอาจมีอุปสรรคในเรื่องของจำนวนขึ้นเนื้อที่เหลือพอจะย้อมสีใหม่ได้

1.12. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or anticipated benefit gain)

ได้ทราบถึงคุณลักษณะการติดสี Perls ของภาวะ LCV และ PPD ซึ่งหากพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจริง จะเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือต่างจังหวัด เนื่องจากสี Perls เป็นสีที่หาซื้อได้ง่าย ราคาไม่แพง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยต่อไป

1.13. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

การวิจัยอาศัยการเก็บข้อมูลย้อนหลัง ดังนั้นอาจมีข้อมูลที่ไม่ครบถ้วน สูญหาย มาตรการการแก้ไข คือสืบค้นเพิ่มเติมจากระบบฐานข้อมูลของสาขาวิชาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นอกจากนี้อาจพบว่าคุณลักษณะการติดสี Perls ที่ระหว่างภาวะ LCV และ PPD ไม่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้ไม่สามารถแยกทั้ง 2 ภาวะด้วยการย้อมสี Perls ได้



บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures)

Perls Prussian Blue (Perls) เป็นเทคนิคการย้อมชิ้นเนื้อ ที่อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีของ potassium ferrocyanide ทำให้เกิดการแสดงของ ferric iron ที่ซ่อนอยู่ให้เห็นเป็นสีฟ้าเข้ม^(7, 8) โดยจะติดสีที่ธาตุเหล็ก (ferritin) แต่จะไม่ติดสีธาตุเหล็กที่ยังอยู่ในเม็ดเลือดแดง โดยทั่วไปมักใช้ย้อมเพื่อแยกแยะระหว่าง hemosiderin และ melanin⁽⁹⁾

การศึกษาการย้อมติดสีของธาตุเหล็กที่ชั้นหนังแท้ และที่ hemosiderin ในโรค PPD มีผู้ศึกษาไว้อย่างแพร่หลาย ดังเช่น Sharma และคณะ ได้ศึกษาชิ้นเนื้อที่วินิจฉัย PPD 100 ราย พบว่าทุกรายมีการติดสีธาตุเหล็กใน hemosiderin โดยไม่มีความสัมพันธ์กับการมี venous insufficiency หรือ hematologic disorders⁽¹⁰⁾ ในหลายการศึกษา พบว่าในภาวะ PPD มักพบการติดสีธาตุเหล็กใน hemosiderin ที่ superficial papillary dermis ซึ่งแตกต่างกับ โรค stasis dermatitis ที่มักพบการติดสีธาตุเหล็กของ hemosiderin ที่รอบๆหลอดเลือดที่อยู่ชั้นลึกลงไป⁽¹¹⁻¹³⁾ นอกจากนี้ การศึกษาของ Huang และคณะ พบว่าในโรคกลุ่ม PPD ทั้งหมด การย้อม hemosiderin ติดสี Perls จะช่วยยืนยันการวินิจฉัยภาวะ PPD ในระยะท้าย (late stage) ได้⁽¹⁴⁾

นอกจากภาวะ PPD แล้ว ยังมีการศึกษาการติดสีของธาตุเหล็กที่ผิวหนังในโรคอื่นๆ รวมทั้งในภาวะปกติด้วย Northcutt และคณะ พบว่ามีการติดสีธาตุเหล็กได้ในชั้นเนื้อจากขาที่ปกติได้ โดยจากการศึกษาชิ้นเนื้อขาปกติ 19 ราย พบติดสีธาตุเหล็ก 1 ราย (คิดเป็น 5.3%) ส่วนในโรค stasis dermatitis มักมีการติดสีของธาตุเหล็กปริมาณมาก⁽¹⁵⁾ การศึกษาของ Caggiati และคณะในโรค lipodermatosclerosis พบการติดสีธาตุเหล็กใน hemosiderin โดยเฉพาะบริเวณที่มี ulcer แต่จะไม่พบการตกตะกอนของ hemosiderin หากบริเวณก้นแผลของ ulcer นั้นมีการซ่อมแซมแล้ว⁽¹⁶⁾

ลักษณะการติดสีธาตุเหล็กของ hemosiderin ที่ผิวหนัง อาจมีความสัมพันธ์กับ systemic disease บางโรคได้ ดังเช่นในโรค hemochromatosis จะพบ hemosiderin ตกตะกอนที่ บริเวณ basement membrane ของ eccrine gland ⁽¹⁵⁾ ส่วนในโรค nephrogenic systemic fibrosis นั้น จากการศึกษาพบการตกตะกอนของธาตุเหล็กมีลักษณะเหมือนก้อนกรวด (gravel-like

deposition of iron) อยู่ใน siderophage ที่ชั้นหนังแท้ และพบการติดสีของธาตุเหล็กมีลักษณะเหมือนทรายข้างในเซลล์ fibrocyte และระหว่าง collagen fiber⁽¹⁷⁾

แม้ว่าการศึกษาการย้อมติดสีของธาตุเหล็กในภาวะ PPD และในภาวะอื่นเป็นที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายดังกล่าวข้างต้น แต่การศึกษาลักษณะการติดสีของธาตุเหล็กในภาวะ LCV กลับไม่เคยมีรายงานมาก่อน เมื่อค้นคว้าเพิ่มเติมถึงการศึกษาการติดสีธาตุเหล็กและการมี hemosiderin ในโรคกลุ่ม vasculitis ที่ผิวหนังชนิดอื่นทั้งหมด พบมีการศึกษาเป็นการรายงานผู้ป่วย (case report) 1 ราย ในผู้ป่วยโรค macular arteritis โดยผลชิ้นเนื้อพบว่า มี RBC extravasation และพบมี hemosiderin-laden macrophages อยู่รายรอบ subcutaneous vascular plexus นอกจากนี้การย้อมสี Perls ยังช่วยยืนยันการวินิจฉัยโดยพบธาตุเหล็กอยู่ล้อมรอบเส้นเลือดที่ชั้น subcutaneous⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตาม การอักเสบของหลอดเลือดในภาวะ LCV นั้นอยู่ในชั้นหนังแท้ ซึ่งตื้นกว่าชั้น subcutaneous จึงอาจจะเห็นลักษณะการติดสีของธาตุเหล็ก และลักษณะของ hemosiderin ที่แตกต่างกันได้

นอกจากการศึกษา vasculitis ที่ผิวหนัง ข้างต้น ยังมีรายงานการติดสีธาตุเหล็กในภาวะ vasculitis ที่ตำแหน่งอื่นของร่างกาย โดยการศึกษาการติดสีของธาตุเหล็กในกล้ามเนื้อของผู้ป่วยติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) ที่มีภาวะ vasculitis โดยมักพบการติดสีของธาตุเหล็กใน hemosiderin ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก และ พบมีผู้ป่วยบางรายที่มีการติดสีของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม⁽¹⁹⁾ ซึ่งลักษณะดังกล่าว ไม่มีรายงานในภาวะ PPD และโรคอื่นๆ

เนื่องจากการศึกษาลักษณะการติดสีธาตุเหล็กของ LCV เปรียบเทียบกับการติดสีธาตุเหล็กใน PPD ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน งานวิจัยชิ้นนี้จึงต้องการแสดงความแตกต่างคุณลักษณะการติดสีในสองภาวะดังกล่าว ซึ่งผลการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงกับห้องปฏิบัติการชิ้นเนื้อผิวหนัง โดยที่มีต้นทุนไม่สูงและและไม่ยุ่งยาก เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)

- การศึกษาวิเคราะห์แบบตัดขวาง (cross-sectional analysis study)
- แสดงผลแบบการวิจัยเชิงบรรยาย (descriptive research)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)

ประชากร (Population) : ชี้นเนื้อที่มีผลทางจุลพยาธิวิทยาจากการย้อมด้วยสี H&E เดิม ที่เข้าได้กับเกณฑ์การวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD

ตัวอย่าง (Sample) : ชี้นเนื้อที่ห้องปฏิบัติการ สาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่มีผลทางจุลพยาธิวิทยาจากการย้อมด้วยสี H&E เดิม ที่เข้าได้กับเกณฑ์การวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD ตาม operational definition ข้างต้น

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ชี้นเนื้อเป็นชี้นเนื้อของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ด้วยโรคผิวหนังและได้รับการตัดโดยมีการลงชื่อยินยอมในการทำผลการ
2. ชี้นเนื้อนั้น ได้รับการวินิจฉัยเป็น LCV และ PPD ตาม operational definition ด้วยผลทางจุลพยาธิวิทยาที่ย้อมด้วยสี H&E

3. ชิ้นเนื้อในข้อ 2 นั้น มีเหลือมากพอ หลังจากการตัดเพื่อย้อมสี H&E และออกผลการวินิจฉัยไปแล้ว (leftover specimen) โดยเหลือเก็บอยู่ในห้องปฏิบัติการ สาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และเป็นชิ้นเนื้อที่ยังไม่ผ่านการย้อมสีใดๆ เพื่อที่จะสามารถตัดเพิ่มและย้อมสี Perls เพิ่มได้

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ไม่สามารถตามข้อมูลผู้ป่วยได้
2. เมื่อติดตามผลการตรวจชิ้นเนื้อเดิม พบว่าผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยคลินิกเป็นโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ LCV และ PPD

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sample techniques)

- ประชากร (population) ได้แก่ ผู้ป่วยภาวะ LCV และ PPD ในประเทศไทย
- ประชากรเป้าหมาย (target population) ผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาด้วยโรคผิวหนังที่ได้รับการตัดชิ้นเนื้อและถูกวินิจฉัยว่าเป็น LCV และ PPD โดยผลการตรวจชิ้นเนื้อจากการย้อมสี H&E ตาม operational definition ข้างต้น
- กลุ่มตัวอย่าง (sample population) ผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาด้วยโรคผิวหนังที่ได้รับการตัดชิ้นเนื้อและถูกวินิจฉัยว่าเป็น LCV และ PPD จากผลการตรวจชิ้นเนื้อจากการย้อมสี H&E ตาม operational definition ข้างต้น ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- ประชากรควบคุม (control population) ผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาด้วยโรคผิวหนังที่ขา ได้รับการตัดชิ้นเนื้อที่ขา และไม่ได้ถูกวินิจฉัยว่าเป็น LCV และ PPD จากผลการตรวจชิ้นเนื้อจากการย้อมสี H&E ตาม operational definition ข้างต้น ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- การคัดเลือกเข้ามาศึกษา ตั้งแต่เดือน วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2560 – วันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2563

ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากการต้องการดูความแตกต่างของคุณลักษณะ 2 กลุ่ม โดยแสดงออกมาเป็นค่าร้อยละ จึงใช้วิธีคำนวณตัวอย่างโดยใช้สูตร Hypothesis testing two independent proportions

$$n_1 = \left[\frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\bar{p}\bar{q}(1+\frac{1}{r})} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1 q_1 + \frac{p_2 q_2}{r}}}{\Delta} \right]^2$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, q_1 = 1 - p_1, q_2 = 1 - p_2$$

$$\bar{p} = \frac{p_1 + p_2 r}{1+r}, \bar{q} = 1 - \bar{p}$$

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าในการศึกษาของ Northcutt และคณะ พบว่ามีการติดเชื้อธาตุเหล็กได้ในชั้นเนื้อจากขาที่ปกติ โดยจากการศึกษาชั้นเนื้อปกติ พบติดเชื้อธาตุเหล็ก 5.3% และติดเชื้อในกลุ่มที่มีโรคผิวหนังที่ขา (ที่ไม่ใช่กลุ่มโรค vasculitis) 36.7%⁽¹⁵⁾ จึงกำหนดค่าตัวแปร ดังนี้

Proportion in group 1 (p_1) = 0.053

Proportion in group 2 (p_2) = 0.367

Ratio (r) = 1

α = 0.05 และ Power = 80% (β = 0.20)

เมื่อกำหนดตามสูตร จะได้ขั้นต่ำชั้นเนื้อกลุ่มละ 26 ชั้น ซึ่งผู้วิจัยจึงต้องการเก็บกลุ่มละ 50 ชั้น จึงเพียงพอต่อการศึกษา

การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

- ตัวแปรอิสระ (Independent factors) คือ ตืดสี Perls ในชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการย้อมสี H&E ตาม operational definition เป็นภาวะ LCV PPD และขึ้นเนื้อจากผิวหนังขาที่ปกติ
- ตัวแปรตาม (Dependent factors) คือ การพบลักษณะการติดสีของธาตุจากการย้อมสี Perls ในชิ้นเนื้อ โดยมีหัวข้อที่สนใจ ดังนี้
 - การติดสีของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม : ประเมินเป็น มีการติดสี เมื่อติดสี Perls มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 25 ของเซลล์เอนโดทีเลียมทั้งหมด หรือ ไม่มีการติดสี เมื่อติดสี Perls น้อยกว่าร้อยละ 25 ของเซลล์เอนโดทีเลียมทั้งหมด (Figure 2)
 - การติดสีล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก: ประเมินเป็น มีการติดสี เมื่อติดสี Perls มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 25 ของบริเวณรอบหลอดเลือดเส้นนั้นๆ หรือ ไม่มีการติดสี เมื่อติดสี Perls น้อยกว่าร้อยละ 25 ของบริเวณรอบหลอดเลือดเส้นนั้นๆ (Figure 3)
 - ปริมาณการติดสี : โดยแบ่งเป็นระดับการติดสีที่ 0 1+ 2+ 3+ และ 4+ โดยอ้างอิงปริมาณการติดสีตามงานวิจัยของ Northcutt และคณะ⁽¹⁵⁾ (Figure 4)
 - ตำแหน่งที่ติดสีในชั้นหนังแท้ : ประเมินเป็น ตืดสีที่ส่วนบน (papillary dermis)และส่วนล่าง (reticular dermis)
 - การพบ siderophage : ประเมินเป็น มีหรือ ไม่มี (Figure 5)

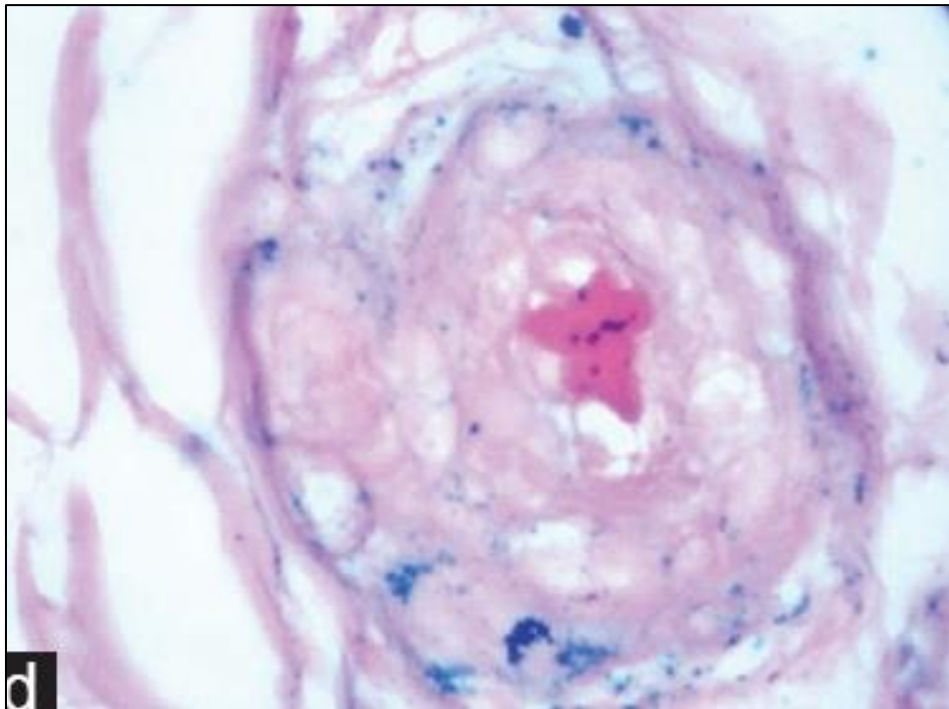


Figure 2 ตัวอย่าง การติดสี Perls ที่เซลล์เอนโดทีเลียม
 โดยมีการติดสีมากกว่าร้อยละ 25 ของเซลล์เอนโดทีเลียมทั้งหมด
 (Ann Indian Acad Neuro.l 2019;22:180-6)⁽²⁰⁾

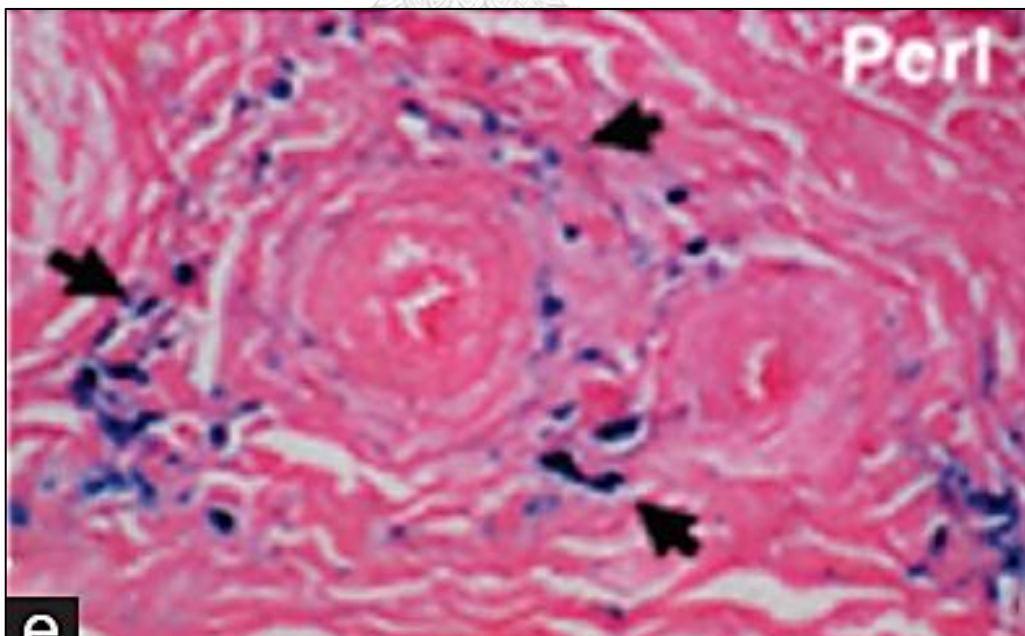


Figure 3 ตัวอย่าง การติดสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก
 โดยแสดงการติดสีมากกว่าร้อยละ 25 ของบริเวณรอบหลอดเลือด
 (Neurol India. 2019;67, Suppl S1:62-70)⁽²¹⁾

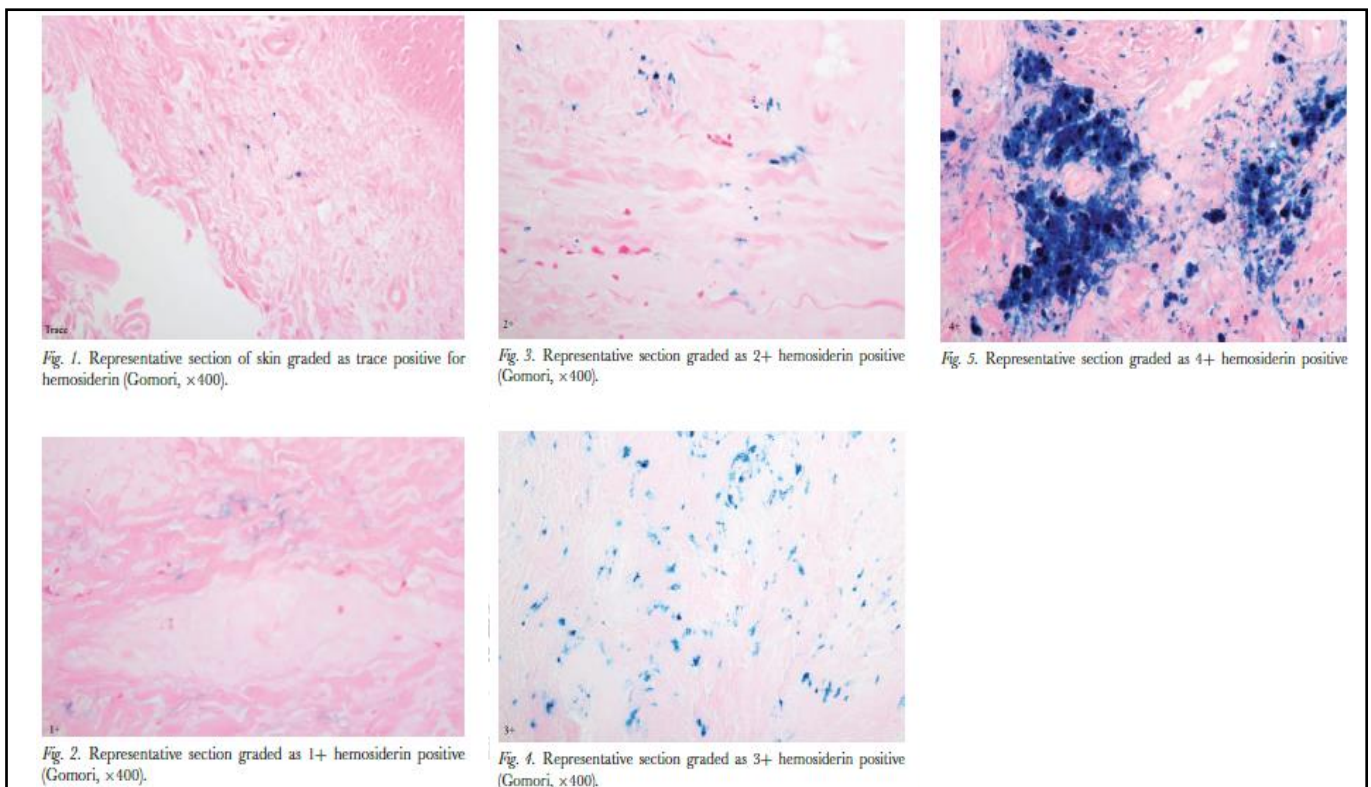


Figure 4 การประเมินปริมาณการติดสีด้วยสีย้อมธาตุเหล็ก

(*J Cutan Pathol.* 2015;42:717-21)⁽¹⁵⁾

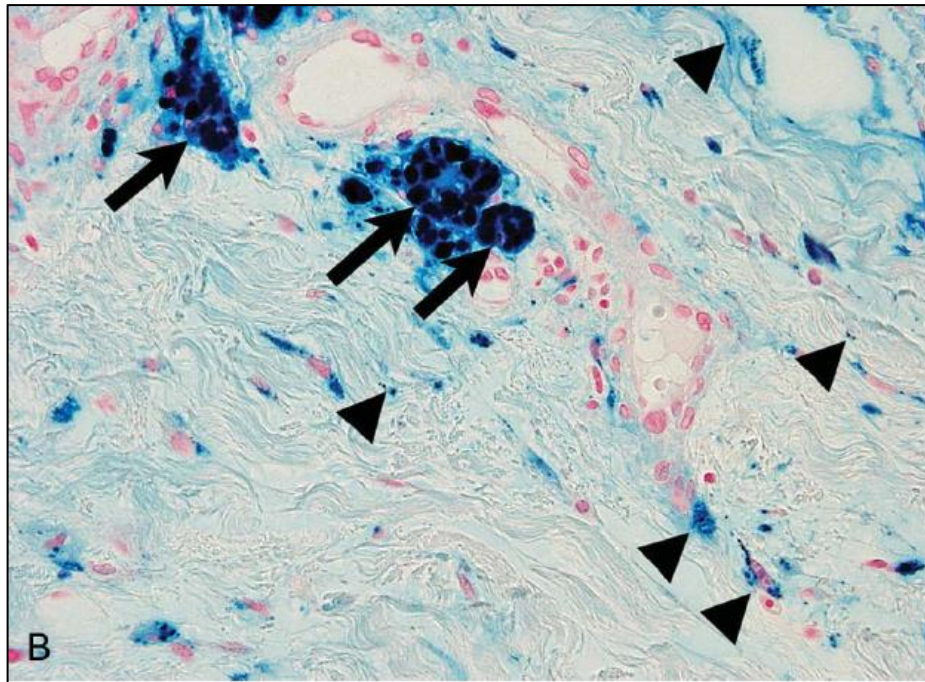


Figure 5 ตัวอย่าง การติดสีของธาตุเหล็กที่ siderophage มีลักษณะเหมือนก้อนกรวด (gravel-like deposition of iron) อยู่ใน siderophage ที่ชั้นหนังแท้ (ลูกศร)และพบการติดสีของธาตุเหล็กมีลักษณะเหมือนทรายข้างในเซลล์ fibrocyte และระหว่าง collagen fiber (หัวลูกศร) (Am J Dermatopathol. 2011;33:271-6)⁽¹⁷⁾

- ตัวแปรควบคุม (confounding factors) มีหลายประการ อันได้แก่

- เทคนิคในการย้อมสี Perls จะถูกควบคุมโดยชิ้นเนื้อทุกชิ้นจะถูกย้อมสี Perls ด้วยเทคนิคเดียวกันทั้งหมด
- สี Perls ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะถูกควบคุมโดยสารสำคัญที่ใช้ย้อม ซึ่งก็คือ potassium ferrocyanide lot 1809200590 เป็น lot เดียวกันทั้งหมด
- ผู้ปฏิบัติการตัดชิ้นเนื้อเพิ่มและย้อมสี Perls ในงานวิจัยนี้ จะถูกควบคุมโดยเป็นเจ้าหน้าที่ทีมเดียวกันทั้งหมด ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญ โดยปฏิบัติงานอยู่ที่ห้องปฏิบัติการสาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย มานานโดยปฏิบัติงานมาไม่ต่ำกว่าท่านละ 5 ปี

- ตจพยาธิแพทย์ผู้อ่านผลชิ้นเนื้อในงานวิจัยนี้ จะถูกควบคุมโดย แพทย์ทั้ง 3 ท่านจะถูกอำพราง (blind) ชื่อคนไข้และผลวินิจฉัยเดิม ผู้วิจัยจะให้เลขเฉพาะงานวิจัย (code number) กับสไลด์แก้วนั้นๆ โดยผู้วิจัยเป็นผู้เก็บความลับแต่เพียงผู้เดียว แพทย์ทั้ง 3 ท่านเป็นอิสระต่อกัน มาจากต่างสถาบันกัน ไม่ทราบผลการอ่านของท่านอื่น ช่วงเวลาและสถานที่ที่ใช้ในการอ่านผลชิ้นเนื้อแตกต่างกัน นอกจากนี้ ตจพยาธิแพทย์ที่เข้าร่วมงานวิจัยจะต้องมีความชำนาญอันเป็นที่ประจักษ์ กล่าวคือ เป็นอาจารย์แพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญมีวุฒิรับรองในด้านตจพยาธิวิทยา (dermatopathology) และปฏิบัติงานมาไม่ต่ำกว่า 5 ปี โดยมีรายนามดังต่อไปนี้

- รศ.นพ.เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล (คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

วุฒิการศึกษา : พ.บ. ว.ว. (ตจวิทยา) พ.ศ.2554

Dermatopathology, Yale School of Medicine,
Connecticut, USA, 2014 - 2015

- พ.ต.หญิง พญ.ชุตিকা ศรีสุทธิยากร (วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

วุฒิการศึกษา : พ.บ. ว.ว. (ตจวิทยา) พ.ศ.2552

Dermatopathology, Yale school of Medicine
Connecticut, USA, 2013 - 2014

- ผศ. พญ.เพ็ญวดี พัฒนปรีชากุล (คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล)

วุฒิการศึกษา : พ.บ. ว.ว. (ตจวิทยา) พ.ศ.2550

A visiting scholar in dermatopathology and infectious
dermatology at The University of Texas, MD Anderson
Cancer Center and UT Health Science Center at
Houston, Texas, USA, 2014

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยโดยละเอียด

1. ตรวจสอบใบยินยอมการทำหัตถการจากเวชระเบียนที่มีการแจ้งวัตถุประสงค์ ข้อดี ข้อเสีย และมีลายเซ็นยินยอมครบถ้วนของผู้ป่วยที่มารับการตัดชิ้นเนื้อตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2560 ถึง 31 ตุลาคม พ.ศ. 2563
2. นำรายชื่อในข้อ 1 มาเก็บข้อมูลผลพยาธิวิทยาของผู้ป่วยจากระบบบันทึกข้อมูลผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยา คัดกรองด้วยระบบ ICD-10 เฉพาะรายชื่อที่ออกผลการวินิจฉัยด้วยการย้อมสี H&E เป็นภาวะ LCV ภาวะ PPD และชิ้นเนื้อผิวหนังขาปกติ ที่เข้าได้กับเกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมและการตัดออกจากการศึกษา (inclusion and exclusion criteria) รวบรวมรายชื่อแต่ละกลุ่มที่ผ่านเกณฑ์ดังกล่าว
3. นำรายชื่อที่ผ่านเกณฑ์ข้อ 2 มาตรวจสอบรายชื่อที่มีชิ้นเนื้อพาราฟินที่ยังไม่ผ่านการย้อมว่ามีเหลืออยู่ในห้องปฏิบัติการเพียงพอหรือไม่ บันทึกรายชื่อที่มีชิ้นเนื้อเหลือมากพอจะทำการวิจัยได้
4. นำรายชื่อจากข้อ 3 มาคัดเลือกรายชื่อจากกลุ่มภาวะ LCV กลุ่มภาวะ PPD และกลุ่มชิ้นเนื้อผิวหนังขาปกติมาแบบสุ่ม กลุ่มละ 50 ราย
5. นำชิ้นเนื้อที่มีเลขชิ้นเนื้อตรงกับข้อ 4 มาทำการตัดเพิ่มและย้อมด้วยสี Perls โดยควบคุมตัวแปรควบคุมดังที่กล่าวไปในข้างต้น โดยใน 1 สไลด์แก้วจะมี 2 – 3 ชิ้นเนื้อที่แตกต่างกันวางอยู่แบบสุ่ม
6. นำสไลด์แก้วชิ้นเนื้อที่ได้รับการย้อมสี Perls มาทำการให้ code number แบบสุ่ม
7. นำสไลด์แก้วที่ได้รับการย้อมสี Perls มาอ่านผล โดยตจพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจาก 3 สถาบัน อันได้แก่ รศ.นพ.เจตน์ วิทิตสุวรรณกุล (คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย), พ.ต.หญิง พญ. ชูติกา ศรีสุทธียากร (วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า) และ ผศ.พญ.เพ็ญวดี พัฒนปรีชากุล. (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยที่แพทย์ทั้ง 3 ท่านเป็นอิสระต่อกัน ไม่ได้อยู่ในสถานที่และเวลาเดียวกันขณะอ่านผล และมีการ blind ผู้เชี่ยวชาญทั้ง 3 ท่าน บันทึกผลการอ่านชิ้นเนื้อที่ย้อมสี Perls ตาม primary และ secondary outcome ข้างต้น หากมีความไม่สอดคล้องกันในระหว่างแพทย์ 3 ท่าน จะยึดผลที่เหมือนกันของแพทย์

2 ใน 3 ท่าน ในกรณีของปริมาณการติดเชื้อ หากมีความไม่สอดคล้องกันเลยของแพทย์ทั้ง 3 ท่าน จะยึดการออกผลที่ให้ปริมาณการติดเชื้อที่มากที่สุด ในกรณีของตำแหน่งที่ติดเชื้อ หากมีความไม่สอดคล้องกันเลยของแพทย์ทั้ง 3 ท่าน คือ มีท่านที่ออกผลการติดเชื้อที่หนึ่ง หนึ่งส่วนบน มีท่านที่ออกผลการติดเชื้อที่หนึ่งส่วนล่าง และมีท่านที่ออกผลการติดเชื้อที่หนึ่งส่วนบนและส่วนล่าง จะยึดผลการติดเชื้อที่หนึ่งส่วนบนและส่วนล่างมาวิเคราะห์ต่อไป

3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

- เก็บข้อมูลพื้นฐานของคนไข้จากเวชระเบียน กระทำที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ประเมินการติดเชื้อ Perls โดยตจพยาธิแพทย์ 3 ท่านที่เป็นอิสระต่อกัน และไม่ทราบผลการประเมินของตจพยาธิแพทย์ท่านอื่น โดยทำในต่างสถานที่กัน คือ
 - หน่วยผิวน้ำ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
 - แผนกผิวน้ำ กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า
 - ภาควิชาตจพยาธิ โรงพยาบาลศิริราช
- รวบรวมข้อมูลจาก แบบบันทึกจาก ตจพยาธิแพทย์ ทั้ง 3 ท่าน กระทำที่หน่วยผิวน้ำ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีผู้เก็บข้อมูลและบันทึกข้อมูล คือ ผู้วิจัยแต่เพียงผู้เดียว

Table 1 แสดงการสรุปวิธีการรวบรวมข้อมูล

Variables		Methods
Demographic variables	Sex	Extracting from records
	Diagnosis	
	DIF result	
	Medical history	
Outcome variables	Staining at endothelial cell	Recording the presentations
	Staining around vessel	
	Staining at papillary dermis or reticular dermis	
	Staining at siderophage	
	Amount of staining	Grading scores

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data analysis and statistics)

- Primary outcome เป็นการเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยจะถือว่าถึง end point เมื่อมีอย่างน้อย 1 คุณลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

- Secondary outcome เป็นการเปรียบเทียบคุณลักษณะต่างๆ ข้างต้นในแต่ละภาวะเมื่อย้อมด้วยสี Perls โดยคำนวณทางสถิติดังนี้

- การติดสีของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียล การติดสีล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก และการพบ siderophage เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ ประเมินความชุกของการพบลักษณะดังกล่าวโดยแสดงออกมาเป็นค่าร้อยละ เปรียบเทียบแต่ละกลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้วิธี Chi-square test ในการทดสอบ

- ตำแหน่งที่ติดสีในชั้นหนึ่งแท่ง ประเมินความชุกของการพบลักษณะดังกล่าว โดยแสดงออกมาเป็นค่าร้อยละ เปรียบเทียบแต่ละกลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้วิธี Fisher exact test ในการทดสอบ
- ปริมาณการติดสี เป็นข้อมูลระดับเรียงอันดับ ประเมินความแตกต่างแต่ละกลุ่ม โดยใช้วิธี McNemar test

สำหรับการประเมินความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมิน (Inter-rater reliability) จะใช้ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's Kappa Coefficient) สำหรับกรณีมีการประเมิน 2 ประเภท และใช้สถิติแคปปาถ่วงน้ำหนัก (Weighted Kappa) สำหรับกรณีที่มีการประเมินตั้งแต่ 3 ประเภทขึ้นไป และ ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม STATA version 17.1 (StataCorp®, TX).



บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

การคัดเลือกประชากร

จากข้อมูลในระบบเวชระเบียนของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วง

1 มกราคม พ.ศ. 2560 – 31 ตุลาคม พ.ศ. 2563 พิจารณาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (แผนภูมิที่ 2)

- ในกลุ่ม LCV เมื่อใช้คำค้นหาใน ICD-10 คือ leukocytoclastic vasculitis และ other vasculitis limited to skin พบกลุ่มที่ถูกวินิจฉัยเป็น LCV 117 ราย เมื่อพิจารณาประวัติ ผลตรวจ DIF และปริมาณเนื้อที่เหลือเพียงพอที่จะตัดย้อมใหม่ จะเหลือ 97 ชิ้นที่เข้าร่วมวิจัยได้ จากนั้นจะถูกสุ่มมาเข้าวิจัย 50 ชิ้น
- ในกลุ่ม PPD เมื่อใช้คำค้นหาใน ICD-10 คือ pigmented purpuric dermatosis พบกลุ่มที่ถูกวินิจฉัยเป็น PPD 107 ราย เมื่อพิจารณาประวัติ ผลตรวจ DIF และปริมาณเนื้อที่เหลือเพียงพอที่จะตัดย้อมใหม่ จะเหลือ 84 ชิ้นที่เข้าร่วมวิจัยได้ จากนั้นจะถูกสุ่มมาเข้าวิจัย 50 ชิ้น
- ในกลุ่ม control เมื่อใช้คำค้นหาใน ICD-10 คือ melanocytic naevi of lower limb, including hip พบกลุ่มที่ถูกวินิจฉัยเป็น melanocytic naevi 60 ราย เมื่อพิจารณาประวัติ และปริมาณเนื้อที่เหลือเพียงพอที่จะตัดย้อมใหม่ จะเหลือ 30 ชิ้นที่เข้าร่วมวิจัยได้ และ เมื่อใช้คำค้นหาใน ICD-10 คือ panniculitis หรือ panniculitis, unspecified lower leg หรือ panniculitis, unspecified other พบกลุ่มที่ถูกวินิจฉัยเป็น panniculitis 30 ราย เมื่อพิจารณาประวัติ ผลชิ้นเนื้อเดิมไม่มีพยาธิสภาพที่ชั้นหนังแท้ และมีปริมาณเนื้อที่เหลือเพียงพอที่จะตัดย้อมใหม่ จะเหลือ 20 ชิ้นที่เข้าร่วมวิจัยได้ ชิ้นเนื้อ melanocytic naevi ทั้ง 30 ชิ้น และ panniculitis ทั้ง 20 ชิ้น ถูกนำมาเข้าวิจัยทั้งหมด

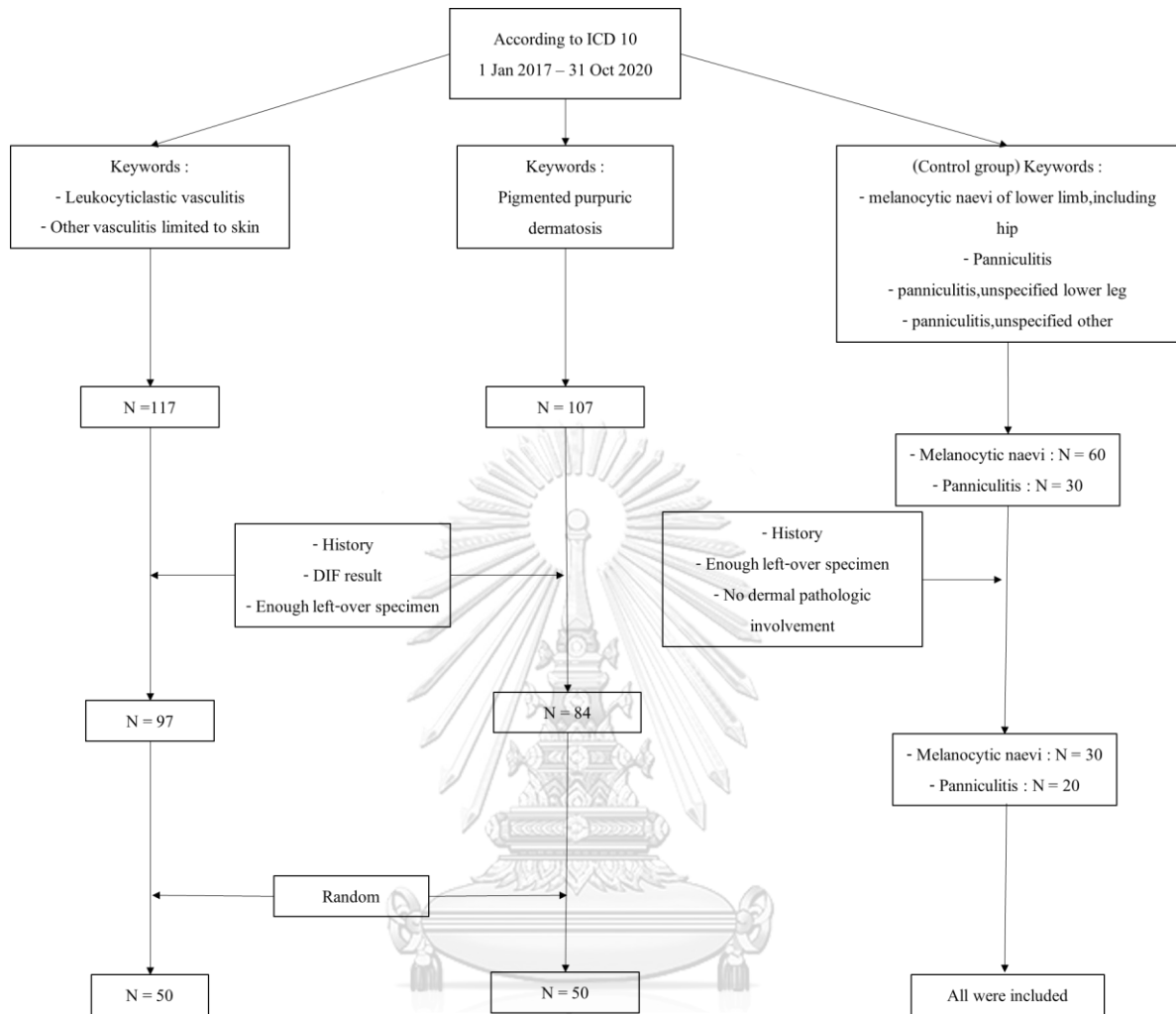


Figure 6 แสดงการคัดเลือกประชากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อมูลพื้นฐานของประชากร

ขึ้นเนื้อทั้ง 150 ชิ้นถูกตัดมาจากส่วนของรยางค์ล่าง (lower extremities) โดยเป็นขึ้นเนื้อจากผู้ป่วยหญิง 103 ราย ผู้ป่วยชาย 47 ราย โดยในแต่ละกลุ่ม มีอัตราส่วนของประชากรเป็นผู้หญิงประมาณ 60% ในกลุ่ม LCV มีขึ้นเนื้อที่มีผล DIF อยู่ 33 ชิ้น ซึ่งให้ผลเป็นบวกทั้งหมด ส่วนที่เหลืออีก 17 ชิ้นนั้น มีประวัติที่เข้าได้กับโรคที่มีการอักเสบของหลอดเลือด เช่น โรคแพ้ภูมิตัวเอง (Lupus Erythematosus) โรค Henoch-Schönlein purpura หรือมีประวัติการรักษาด้วยการรักษาหลอดเลือดอักเสบแล้วอาการดีขึ้น เช่น การให้ colchicine เป็นต้น ในกลุ่ม PPD มีขึ้นเนื้อที่มีผล DIF อยู่ 2 ชิ้น ซึ่งให้ผลเป็นลบทั้งคู่ และขึ้นเนื้อทั้ง 50 ชิ้น มีประวัติอาการดีขึ้นหลังการติดตามดู หรือให้การรักษาแบบตามอาการ ในกลุ่ม control เป็นขึ้นเนื้อ melanocytic naevi 30 ชิ้น และ panniculitis ที่ไม่มีพยาธิสภาพที่ขึ้นหนังแท้ 20 ชิ้น (Table 2)



Table 2 แสดงจำนวนและร้อยละของคุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

	ข้อมูล	จำนวน (ชิ้นเนื้อ)	อัตราส่วน (%)
กลุ่ม LCV	เพศ		
	ชาย	19	38
	หญิง	31	62
	ผล DIF		
	ผลบวก	33	66
	ผลลบ	0	0
	ไม่ได้ทำ DIF	17	34
	โรคที่วินิจฉัยจากประวัติ		
	Lupus Erythematosus	4	8
	Henoch-Schönlein purpura	16	32
	Suspected drug induced vasculitis	5	10
	Improve with treatment (e.g., colchicine, indomethacin)	16	32
	No history of underlying disease but positive DIF result	3	6
	Clinical diagnosis of vasculitis without DIF result	6	12
กลุ่ม PPD	เพศ		
	ชาย	17	34
	หญิง	33	66
	ผล DIF		
	ผลบวก	0	0
	ผลลบ	2	4
	ไม่ได้ทำ DIF	48	96
	โรคที่วินิจฉัยจากประวัติ		
Pigmented purpuric dermatitis	50	100	
กลุ่ม Control	เพศ		
	ชาย	11	22
	หญิง	39	78
	โรคที่วินิจฉัยจากประวัติ		
	Melanocytic naevi	30	60
Panniculitis	20	40	

4.2 ผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณลักษณะการติดสี Perls ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม LCV และ PPD ผู้วิจัยได้บันทึกความชุกคุณลักษณะต่างๆที่อ่านพบ อันได้แก่ การติดสี Perls ของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม การติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก (Figure 7) ปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ ตำแหน่งที่ติดสี Perls ในชั้นหนังแท้ (Figure 8 และ Figure 9) และการพบ siderophage เมื่อย้อมด้วยสี Perls

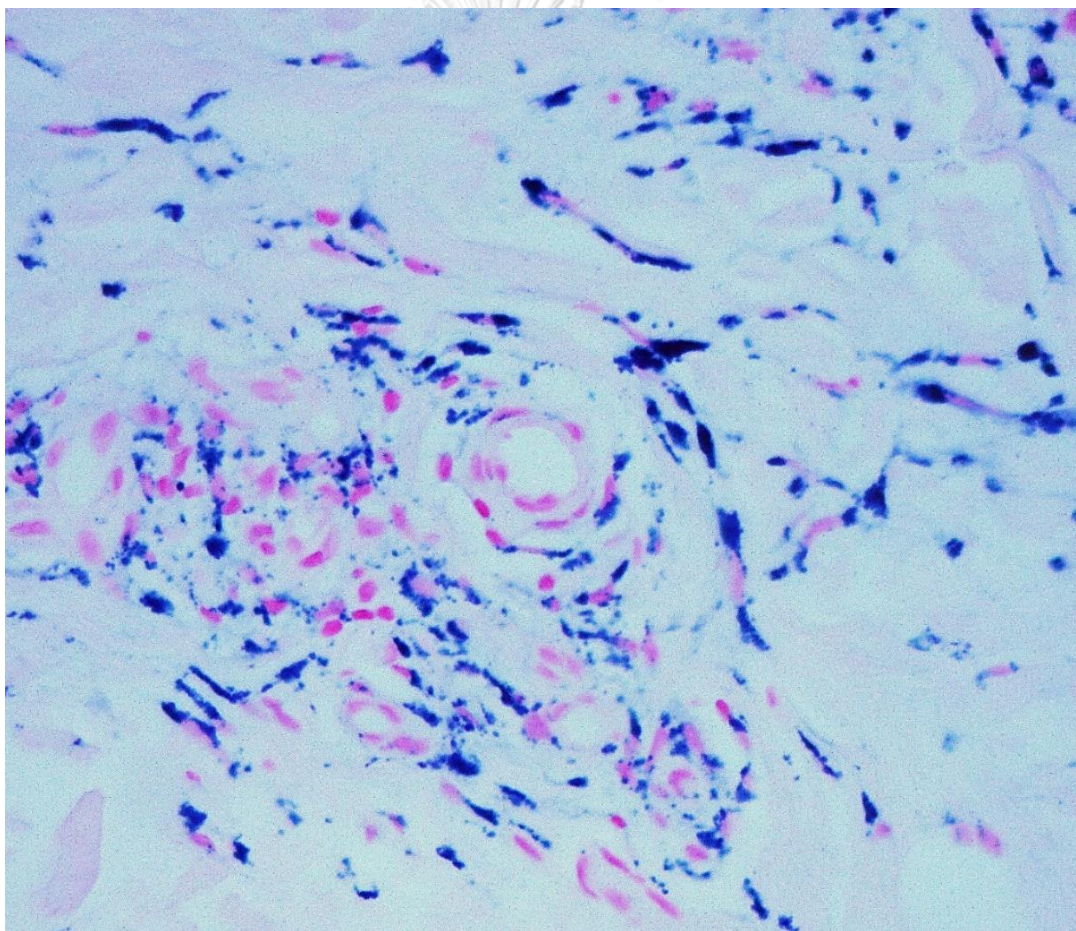


Figure 7 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก ที่พบในงานวิจัยนี้

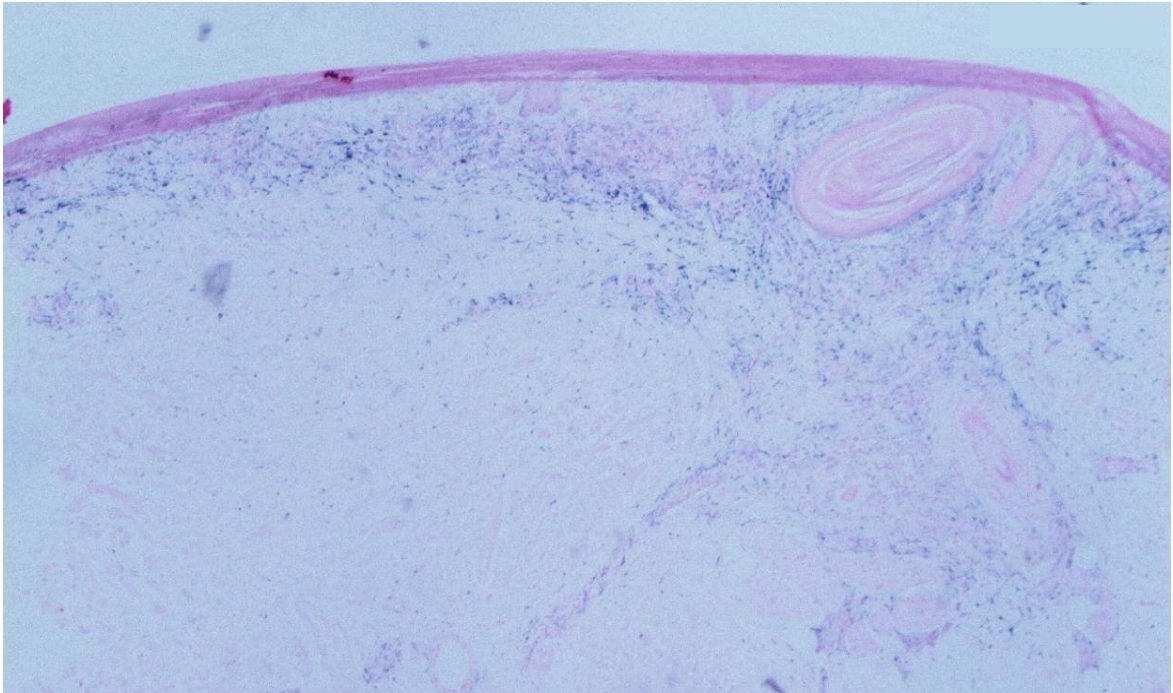


Figure 8 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ปริมาณการติดสี 3+ ที่บริเวณชั้น papillary dermis
ที่พบในงานวิจัยนี้

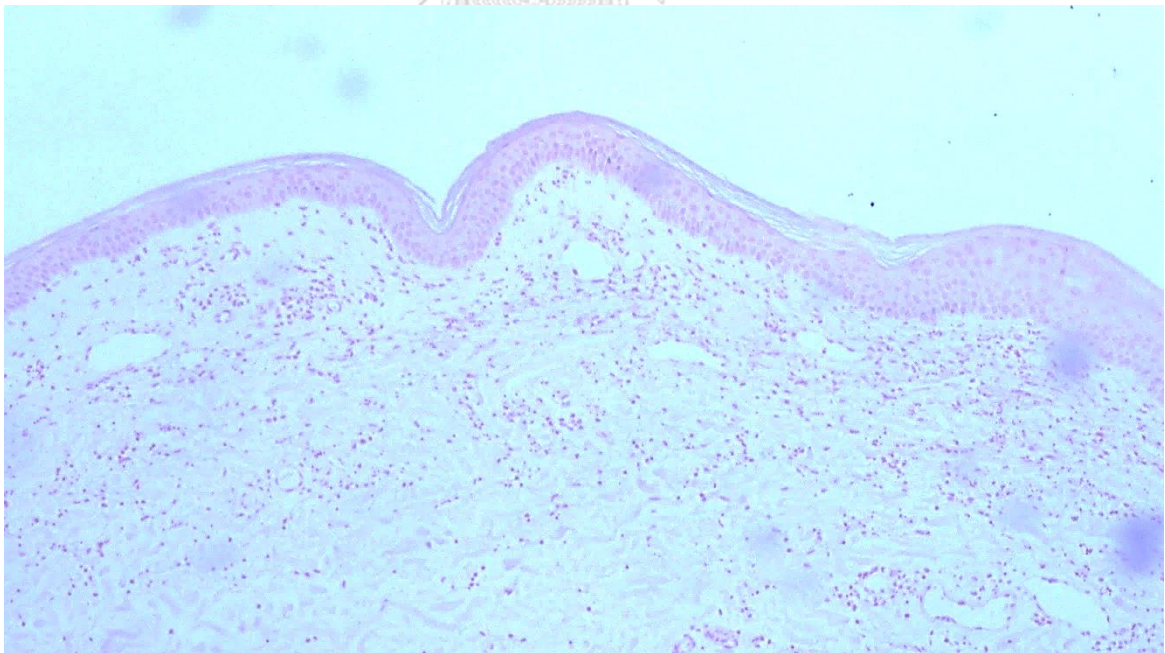


Figure 9 แสดงตะกอนสีฟ้าของสี Perls ปริมาณการติดสี 0 ที่พบในงานวิจัยนี้
แม้จะพบมี RBC extravasation ปริมาณมาก

ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบ กลุ่ม LCV กลุ่ม PPD และกลุ่ม control พร้อมกัน (Table 3) จะพบว่า การติดสี Perls ของธาตุเหล็กที่เซลล์เอนโดทีเลียม และการพบ sideropharge นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่คุณลักษณะที่เหลือคือการติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ และตำแหน่งที่ติดสี Perls ในชั้นหนังแท้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสี Perls ระหว่างกลุ่ม LCV และกลุ่ม control (Table 3) จะพบว่า ไม่มีคุณลักษณะใดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในแต่ละคุณลักษณะในกลุ่ม control มีจำนวนสไลด์ที่ติดสีมากกว่ากลุ่ม LCV และกลุ่ม LCV เกือบทั้งหมด ไม่ติดสี Perls เลย

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสี Perls ระหว่างกลุ่ม PPD และกลุ่ม control (Table 3) จะพบว่า การติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ และตำแหน่งที่ติดสี Perls ในชั้นหนังแท้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งให้ผลเหมือนกับการเปรียบเทียบ กลุ่ม LCV กลุ่ม PPD และกลุ่ม control พร้อมกัน และการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม LCV และกลุ่ม PPD (Table 3)

Perls Staining	Diagnostics			P-value for LCV vs PPD	P-value for LCV vs Control	P-value for PPD vs Control	P-value for LCV vs PPD vs Control
	LCV	PPD	Control				
Endothelial cell, n (%)							
Absent	50 (100.0)	48 (96.0)	50 (100.0)				
Observed	0 (0.0)	2 (4.0)	0 (0.0)	0.495	0.495	-	0.329
Around vessel, n (%)							
Absent	50 (100.0)	42 (84.0)	48 (96.0)				
Observed	0 (0.0)	8 (16.0)	2 (4.0)	0.006	0.046	0.495	0.004
Amount graded, n (%)							
0	48 (96.0)	30 (60.0)	46 (92.0)				
1	2 (4.0)	7 (14.0)	2 (4.0)				
2	0 (0.0)	9 (18.0)	2 (4.0)				
3	0 (0.0)	4 (8.0)	0 (0.0)				
4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	<0.001	0.001	0.554	<0.001
Papillary / Reticular dermis, n (%)							
Absent	45 (90.0)	29 (58.0)	46 (92.0)				
Papillary dermis	1 (2.0)	2 (4.0)	0 (0.0)				
Reticular dermis	1 (2.0)	1 (2.0)	0 (0.0)				
Both Papillary & reticular dermis	3 (6.0)	18 (36.0)	4 (8.0)	<0.001	<0.001	1	<0.001
Sideropharge, n (%)							
Absent	50 (100.0)	(100.0)	48 (96.0)				
Observed	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.0)	-	0.495	0.495	0.329

Table 3 ผลเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสี Perls ระหว่างกลุ่ม LCV กลุ่ม PPD และกลุ่ม control

Note : Endothelial cell : การติดสีที่เซลล์เอนโดทีเลียล, Around vessel : การติดสีที่อ้อมรอบเส้นเลือด, Amount graded : ปริมาณการติดสี,

Papillary/Reticular dermis : ตำแหน่งที่ติดสี, Sideropharge : การพบ sideropharge

ความสอดคล้องของผลการอ่านชิ้นจากผู้เชี่ยวชาญทั้ง 3 ท่าน พบว่ามีผลความสอดคล้องมากกว่า 80% เป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ 4)

Table 4 ความสอดคล้องของผู้เชี่ยวชาญในการอ่านคุณลักษณะของสไลด์แก้ว
ที่ย้อมด้วยสี Perls

Perls Prussian Blue Staining	Reader	Agreement (95% CI)
Endothelial cell	R1 vs R2	97.2 (93.6, 99.1)
	R1 vs R3	97.8 (94.4, 99.4)
	R2 vs R3	97.2 (93.6, 99.1)
Around vessel	R1 vs R2	83.9 (77.7, 88.9)
	R1 vs R3	87.2 (81.4, 91.7)
	R2 vs R3	84.4 (78.3, 89.4)
Amount graded	R1 vs R2	75.6 (68.6, 81.6)
	R1 vs R3	73.3 (66.2, 79.6)
	R2 vs R3	64.4 (57.0, 71.4)
Papillary / Reticular dermis	R1 vs R2	70.6 (63.3, 77.1)
	R1 vs R3	81.7 (75.2, 87.0)
	R2 vs R3	63.3 (55.8, 70.4)
Sideropharge	R1 vs R2	91.5 (86.4, 95.2)
	R1 vs R3	80.2 (73.6, 85.8)
	R2 vs R3	73.9 (66.8, 80.1)

Note: R1 = expert1, R2 = expert2, R3 = expert3

บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

เทคนิคการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Perls จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เป็นผลให้ ferric iron ที่ซ่อนอยู่ แสดงตัวออกมา และแสดงให้เห็นเป็นตะกอนสีฟ้า^(7, 8) ซึ่งสีฟ้าที่เห็นนั้นจะไม่ติดธาตุเหล็กที่ยังอยู่ใน เม็ดเลือดแดงที่ยังไม่แตก⁽⁹⁾ ดังนั้นแม้ว่าผลพยาธิวิทยาที่ย้อมด้วยสี H&E จะพบ RBC extravasation แต่หากไม่มีการแตกสลายของเม็ดแดง เมื่อย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Perls ก็จะไม่สามารถเห็นตะกอนสีฟ้า ดังกล่าวได้ (Figure 9)

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่ามีสไลด์แก้วกลุ่ม LCV จำนวนมาก (45 สไลด์ จาก 50 สไลด์) ย้อมสี Perls แล้วไม่พบตะกอนสีฟ้า ซึ่งต้องวิเคราะห์สาเหตุ ว่าเกิดจากการที่ชิ้นเนื้อนั้นไม่ติดสีจริง หรือเกิดจากข้อผิดพลาดทางกระบวนการย้อม เมื่อพิจารณาขั้นตอนในการจัดทำสไลด์แก้ว พบว่าใน 1 สไลด์แก้ว จะมีชิ้นเนื้อจากตัวอย่างที่วินิจฉัยแตกต่างกัน 2-3 ชิ้นเนื้อเรียงอยู่แบบสุ่ม และแม้ว่าชิ้นเนื้อที่ถูกวินิจฉัยเป็น LCV จะไม่ติดสี Perls แต่ชิ้นเนื้อบนสไลด์แก้วเดียวกันที่ได้รับการวินิจฉัยอื่นกลับพบตะกอนสีฟ้าได้ ลักษณะเช่นนี้พบได้ทุกสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อ LCV อยู่ (Figure 10) แสดงให้เห็นถึงการที่ชิ้นเนื้อ LCV ไม่ติดสีฟ้า ไม่ได้เกิดจากกระบวนการย้อมสี

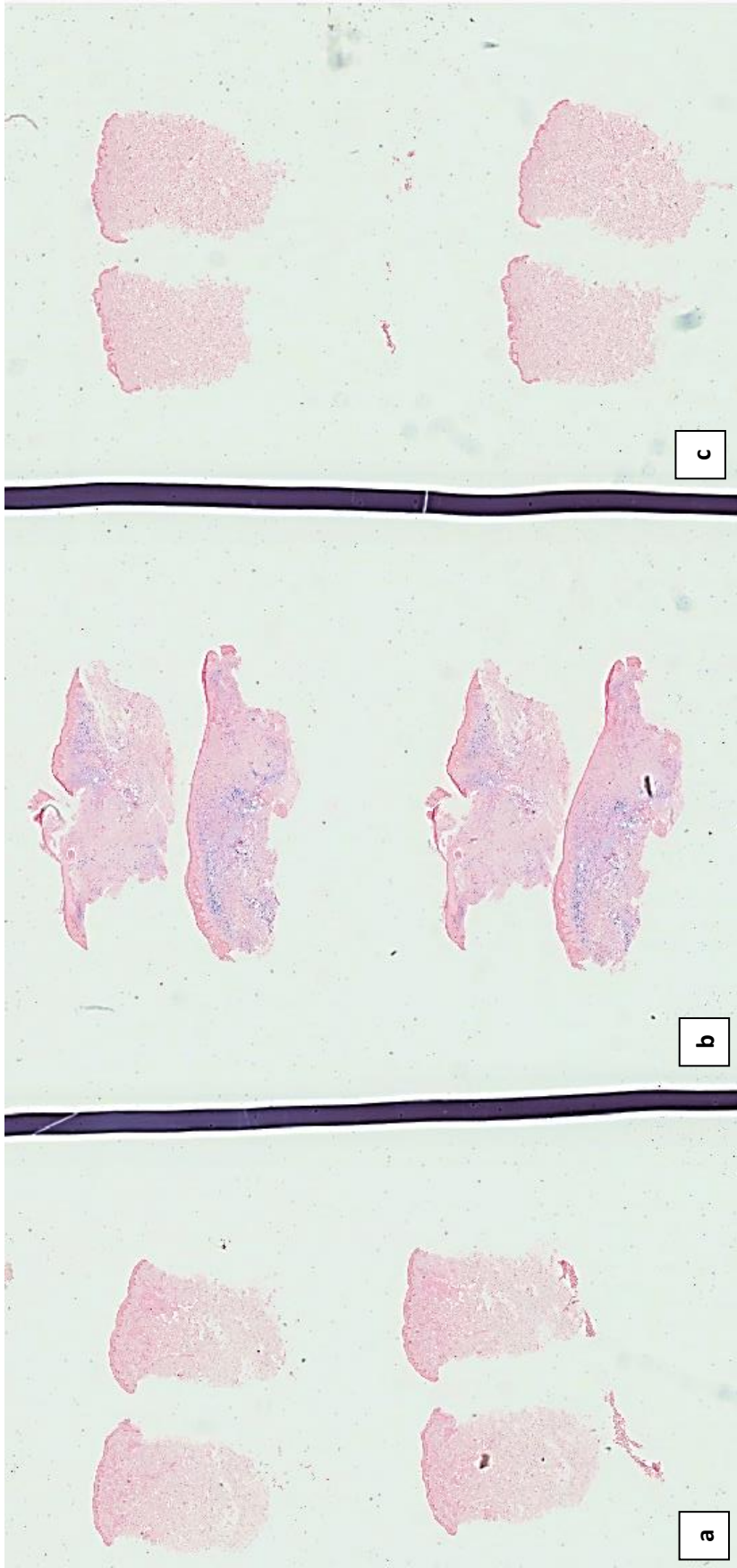


Figure 10 แสดงภาพชิ้นเนื้อที่วินิจฉัยต่างกันบนสไลด์แก้วเดียวกัน โดยชิ้นเนื้อ **a** และ **c** เป็นชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น **LCV** ชิ้นเนื้อ **b** ได้รับการวินิจฉัยเป็น **stasis dermatitis** จะสังเกตเห็นได้ว่า ชิ้นเนื้อ **a** และ **c** ไม่พบตะกอนสีฟ้าอยู่เลย ในขณะที่ชิ้นเนื้อ **b** สามารถมองเห็นตะกอนสีฟ้าได้

การที่ไม่พบตะกอนสีฟ้าในชั้นเนื้อ LCV จึงน่าจะเกิดจากการที่ชั้นเนื้อนั้นๆไม่ติดสีจริง ซึ่งอธิบายได้จากอายุของรอยโรคที่ถูกตัดมาตรวจ กล่าวคือ อนุมานได้ว่าชั้นเนื้อที่ส่งมาเพื่อวินิจฉัย LCV ทั้งหมดต้องทำตามมาตรฐานการตัดชิ้นเนื้อเมื่อสงสัยภาวะ LCV ซึ่งต้องเลือกรอยโรคที่เกิดขึ้นใหม่ที่สุด และหากต้องการจะส่งตรวจ DIF ในคราวเดียวกันก็ต้องเลือกรอยโรคที่เพิ่งเกิดใหม่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง⁽²⁾ แต่จากข้อมูลของการศึกษาวิจัยรอยช้ำในผิวหนังของมนุษย์ พบว่า ผลทางพยาธิวิทยาของรอยช้ำที่เกิดขึ้นใหม่ (อายุรอยโรคน้อยกว่า 24 ชั่วโมง) จะพบการแตกของเส้นเลือดขนาดเล็ก และ RBC extravasation แต่ไม่มีรายงานการพบ hemosiderin-laden macrophage ในทางตรงกันข้าม ในรอยช้ำที่มีอายุ 3-7 วัน เมื่อตรวจทางพยาธิวิทยาจะพบ hemosiderin-laden macrophage และ hematoidin granules ปริมาณมาก ซึ่งแสดงถึงการเสื่อมสลายของเม็ดเลือดแดงเมื่อเวลาผ่านไป⁽²²⁾ ซึ่งอายุของรอยโรคดังกล่าวน่าจะอธิบายการไม่พบตะกอนสีฟ้าได้ เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาแบบ retrospective study และใช้ left-over specimen ในการศึกษา ชิ้นเนื้อในกลุ่ม LCV จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นชั้นเนื้อที่มาจากรอยโรคที่อายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมงได้สูง

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้กับงานวิจัยก่อนหน้า จะพบว่าในงานวิจัยนี้ ภาวะ PPD มีตำแหน่งของการติดสีของธาตุเหล็กพบได้ทั้ง papillary dermis และ reticular dermis ซึ่งต่างจากงานวิจัยก่อนหน้าที่มักพบการติดสีธาตุเหล็กใน hemosiderin ที่ superficial papillary dermis⁽¹¹⁻¹³⁾ ในภาวะ LCV ในงานวิจัยนี้ ไม่พบคุณลักษณะการติดสี Perls ที่ เซลล์เอนโดทีเลียลและล้อมรอบเส้นเลือด ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าคุณลักษณะดังกล่าวในการศึกษาก่อนหน้า⁽¹⁹⁾ เป็นการศึกษาในเส้นเลือดที่มีขนาดใหญ่และอยู่ชั้นลึกกว่าเส้นเลือดที่ papillary dermis (ซึ่งเป็นตำแหน่งพยาธิสภาพของ LCV) และเป็นการรายงานในลักษณะ case report เท่านั้น

อย่างไรก็ตาม ผลของการศึกษานี้ยังคงแสดงให้เห็นผลความแตกต่างของการย้อมสี Perls ระหว่างกลุ่ม LCV กับกลุ่ม PPD การที่คุณลักษณะการติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสีของธาตุเหล็กในชั้นหนังแท้ และตำแหน่งที่ติดสี Perls ในชั้นหนังแท้ ซึ่งความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มนั้น เกิดจากกลุ่ม LCV แทบไม่แสดงการติดสีดังที่กล่าวมาข้างต้น (Table 3) ดังนั้น ในแง่ของ clinical application หากต้องการแยกระหว่าง LCV และ PPD อาจพิจารณาอย่างรวดเร็วได้ โดยเมื่อย้อมด้วยสี Perls แล้วพบการติดสีของธาตุเหล็กที่ชั้นหนังแท้ชัดเจน ไม่ว่าตำแหน่งใด หรือปริมาณเท่าใดก็ตาม จะคิดถึง PPD มากกว่า โดยเมื่อนำมาคำนวณคุณลักษณะดังกล่าวใน PPD

จะมี sensitivity 42% specificity 90% Positive Predictive value (PPV) 80.8% และ Negative predictive value (NPV) 61.8% คำนวณโดยอ้างอิงตารางการเปรียบเทียบใน Table 5 และหากพบการติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็ก จะคิดถึง PPD เท่านั้น เนื่องจาก กลุ่ม LCV ไม่พบคุณลักษณะนี้เลย โดยเมื่อนำมาคำนวณเมื่อมีการติดสี Perls ล้อมรอบหรือชิดกับเส้นเลือดขนาดเล็กใน PPD จะมี sensitivity 16% specificity 100% PPV 100% และ NPV 54.35% คำนวณโดยอ้างอิงตารางการเปรียบเทียบใน Table 6

Present in any amount or position	PPD (n)	LCV (n)
Observe	21	5
Absent	29	45

Table 5 แสดงการจำนวนสไลด์ที่ติดสี Perls ไม่ว่าที่ตำแหน่งใดหรือปริมาณเท่าใดก็ตาม เปรียบเทียบระหว่าง PPD และ LCV

Around vessel	PPD (n)	LCV (n)
Observe	8	0
Absent	42	50

Table 6 แสดงการจำนวนสไลด์ที่ติดสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดเปรียบเทียบระหว่าง PPD และ LCV

นอกจาก LCV และ PPD แล้ว ทางผู้วิจัยได้มีการต่อยอดการศึกษา โดยนำโรคที่มีการแสดงออกทางคลินิกที่ใกล้เคียงกับสองโรคข้างต้นมารวมวิเคราะห์ด้วย คือ stasis dermatitis ซึ่งเป็นโรคที่มีสาเหตุจากการมี chronic venous insufficiency เป็นผลให้เกิด venous hypertension นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง เช่น มีสีคล้ำขึ้น มีการบวม อาจพบมีผื่นผิวหนังอักเสบและแตกเป็นแผลได้ รอยโรคมักเกิดที่ขา ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มักเกิด PPD และ LCV^(23, 24) ผลของการเก็บข้อมูลเมื่อนำขึ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น stasis dermatitis 30 ตัวอย่าง มาย้อมด้วยสี Perls พบว่ามีความแตกต่างกับกลุ่ม control ($P < 0.05$) (Table 7) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PPD ($P > 0.05$) (Table 7) อธิบายได้จากพยาธิกำเนิดของ stasis dermatitis ที่มีความใกล้เคียงกับ PPD ซึ่งผนังหลอดเลือดไม่สามารถจะเก็บเม็ดเลือดไว้ในหลอดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีเม็ดเลือดแดงรั่วออกมานอกเส้นเลือด โดยที่ไม่มีการตายหรือการอักเสบของผนังหลอดเลือด ทำให้ผลอ่านสไลด์ไม่แตกต่างกับ PPD ในส่วนของผลการเปรียบเทียบกับ LCV พบความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) เนื่องจากการที่กลุ่ม LCV แทบไม่มีการติดสีตั้งที่กล่าวมาข้างต้น (Table 7)

Table 7 ผลการเปรียบเทียบคุณลักษณะการติดสี Perls ระหว่างกลุ่ม stasis dermatitis (Stasis) LCV PPD และ กลุ่ม control

Perls Prussian Blue Staining	P-value Stasis vs Control	P-value Stasis vs PPD	P-value Stasis vs LCV
Endothelial cell, n (%)	-	0.525	-
Around vessel, n (%)	0.001	0.072	<0.001
Amount, n (%)	<0.001	0.361	<0.001
Papillary / Reticular dermis, n (%)	<0.001	0.771	<0.001
Sideropharge, n (%)	1	0.375	0.375

Note : Endothelial cell : การติดสีที่เซลล์เอนโดทีเลียล, Around vessel : การติดสีล้อมรอบเส้นเลือด,

Amount graded : ปริมาณการติดสี, Papillary/Reticular dermis : ตำแหน่งที่ติดสี,

Sideropharge : การพบ sideropharge

ความน่าเชื่อถือของข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้ ถูกวิเคราะห์จากการคำนวณความสอดคล้องของผลการอ่านขึ้นจากผู้เชี่ยวชาญทั้ง 3 ท่าน โดยพบว่ามีผลความสอดคล้องมากกว่า 80% เป็นส่วนใหญ่ แต่มีผลความสอดคล้องค่อนข้างต่ำในเรื่องของปริมาณและตำแหน่งที่ติดสี Perls (Table 4) เมื่อวิเคราะห์ผลโดยละเอียดจะพบว่า ในด้านคุณลักษณะเรื่องปริมาณการติดสี ในกลุ่ม LCV มีเพียง 2 สไลด์แก้วที่มีการแปลผล แต่เมื่อพิจารณาเรื่องตำแหน่งการติดสี จะพบมีการแปลผลอยู่ 5 สไลด์ (Table 3) ซึ่งความไม่สอดคล้องดังกล่าว เกิดได้จากหลายสาเหตุ ประการสำคัญ เกิดจากการที่เกณฑ์ในการตัดสินใจ เป็นแบบ subjective criteria ซึ่งอาศัยความเชี่ยวชาญของแต่ละบุคคลแม้ว่าผู้เชี่ยวชาญในงานวิจัยนี้จะถูกควบคุมด้วยคุณวุฒิทางการศึกษาและระยะเวลาการปฏิบัติงานก็ตาม นอกจากนี้ทางผู้วิจัยใช้เกณฑ์ในการลงผลเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยความสอดคล้อง 2 จาก 3 ท่าน ส่วนในเรื่องปริมาณและตำแหน่งการติดสี หากผู้เชี่ยวชาญทั้ง 3 ท่านเห็นต่างกันทั้งหมด จะเลือกท่านที่ให้ปริมาณและตำแหน่งการติดสีมากที่สุด และพบว่าบางชิ้นเนื้อ คุณลักษณะบางประการไม่มีการบันทึกอ่านผล เช่น ไม่อ่านผลปริมาณ แต่อ่านผลตำแหน่งการติดสี ด้วยเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมานี้ ทำให้สัมประสิทธิ์ความสอดคล้องในเรื่องของปริมาณ และตำแหน่งการติดสี มีค่าต่ำสุด โดยอยู่ที่ 64.4% และ 63.3% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่ออ้างอิงจากบทความทางตจวิทยาพยาธิวิทยา ก่อนหน้านี้ นิยามว่าเมื่อมีความสอดคล้องที่อยู่ระหว่าง 61%-80% จะถือว่าเป็น substantial agreement หรือความสอดคล้องอย่างมาก⁽²⁵⁾ ดังนั้นความสอดคล้องที่ต่ำที่สุดในงานวิจัยนี้ที่ 63.3% จึงยังคงมีความน่าเชื่อถือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.2 สรุปผลการวิจัย

การติดสีของสี Perls ล้อมรอบเส้นเลือดขนาดเล็ก ปริมาณการติดสี และตำแหน่งที่ติดสี มีความแตกต่างกันระหว่างภาวะ LCV และ PPD แต่ไม่มีความแตกต่างกันในแง่การติดสีที่ เซลล์เอนโดทีเลียม และการพบ siderophage

5.3 จุดแข็งของการวิจัย

จุดแข็งของงานวิจัยนี้คือการมีจำนวนประชากรต่อกลุ่มปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีการนำสิ Perls มาย้อมในภาวะอื่น เช่น ไฟ panniculitis และ stasis dermatosis เป็นต้น ทำให้มีข้อมูลใน ภาวะอื่นๆด้วย

5.4 ข้อจำกัดในการวิจัย

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือเนื่องจากเป็น retrospective study ทำให้ไม่สามารถกำหนดอายุของรอยโรคในแต่ละภาวะได้ และขึ้นเนื้อหลายๆชิ้นที่มีบันทึกผลไว้อย่างน่าสนใจ นั้นได้สูญหายไปแล้ว นอกจากนี้ เกณฑ์การตัดสินบางเกณฑ์ต้องใช้การตัดสินใจส่วนบุคคลซึ่งอาจไม่ใช่ มาตรฐานเดียวกัน ในเรื่องของชิ้นเนื้อที่เป็นกลุ่ม control การเลือกใช้โรค panniculitis อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้เนื่องจากเป็นกลุ่มโรคที่มีการอักเสบของหลอดเลือดได้ และเนื่องจากผู้วิจัยอาศัย กระบวนการตัดย้อมชิ้นเนื้อโดยไม่ใช่เครื่อง automate และมีจำนวนชิ้นเนื้อที่ต้องใช้ศึกษามีปริมาณ มาก เจ้าหน้าที่เทคนิคต้องทำการตัดย้อมหลายครั้ง ซึ่งที่ให้ความชุ่มชื้นความอ่อนของตะกอนสีฟ้าที่ได้ใน แต่ละรอบอาจไม่เท่ากัน แม้ว่าจะถูกควบคุมด้วยการทำวิจัยโดยเจ้าหน้าที่เทคนิคที่เหมือนกัน สี lot เดียวกันและเทคนิคการย้อมเดียวกันก็ตาม

5.5 ข้อเสนอแนะ

หากจะมีการศึกษาในลักษณะเดียวกันนี้ในครั้งต่อไป ทางผู้จัดทำ เสนอแนะให้ทำเป็น prospective study เนื่องจากอายุของรอยโรคนั้นมีผลต่อการศึกษา เลือกกลุ่ม control เป็นโรคที่ ไม่มีโอกาสมีพยาธิสภาพของเส้นเลือด และควรใช้เครื่อง automate ในกระบวนการตัดย้อม เพื่อลด ความผิดพลาดจากมนุษย์ และได้ผลผลิตที่รวดเร็วและมีมาตรฐานเท่ากันในทุกสไลด์มากกว่า



ภาคผนวก ก

Methods of Perls staining ^(26, 27)

Fixation: 10% buffered neutral formalin

Sections: Paraffin, 4 to 8 micrometers

Solutions

- 20% Hydrochloric acid
 - Hydrochloric acid 20 ml
 - Distilled water 80 ml
 - Add the acid to the water
- 10% Potassium Ferrocyanide stock solution
 - Potassium Ferrocyanide 10 gm
 - Distilled water 100 ml
- Hydrochloric acid-Potassium Ferrocyanide working solution
 - Equal part of 20% hydrochloric acid and 10% potassium ferrocyanide solution. Prepare just before use.
- Nuclear fast red solution

Procedure

1. Deparaffinize and hydrate slides to distilled water.
2. Place slide in freshly mixed hydrochloric acid-potassium ferrocyanide working solution for 30 minutes.
3. Rinse slides in distilled water.
4. Counterstain with nuclear fast red solution for 5 minutes.
5. Wash thoroughly in running tap water for 2 minutes.
6. Dehydrate and clear with 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol, and xylene, 2 changes each, for 2 minutes each.
7. Mount with resinous medium.

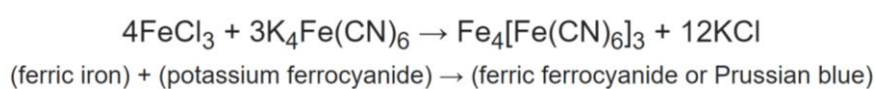
Results

- Hemosiderin and some oxides and salts of iron.....blue
- Nuclei and cytoplasm.....pink to red

ภาคผนวก ข

Mode of action of Perls staining⁽²⁸⁾

Potassium ferrocyanide ใน staining solution ร่วมกับ the ferric iron จะก่อให้เกิด Prussian blue pigment. นอกจากนี้ การใส่ hydrochloric acid เข้าไปจะเพิ่มความสามารถให้ธาตุเหล็กที่อยู่ในชิ้นเนื้อให้เกิดปฏิกิริยากับ potassium ferrocyanide โดยมีปฏิกิริยาเคมีดังแสดง

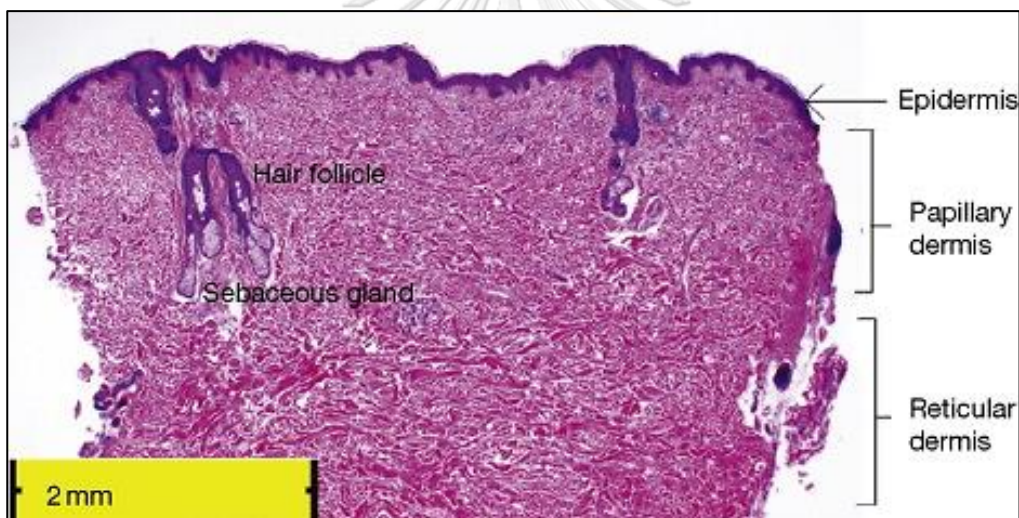


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

Papillary dermis และ reticular dermis⁽²⁹⁾

- Papillary dermis เป็นบริเวณที่มี collagen bundle ขนาดเล็ก (53 ± 3.0 nm) เรียงตัวกันอย่างค่อนข้างหนาแน่น สามารถพบ หลอดเลือด capillary ในชั้นนี้ได้
- Reticular dermis เป็นบริเวณที่อยู่ลึกกว่า papillary dermis มี collagen bundle ขนาดใหญ่กว่า papillary dermis (82 ± 4.9 nm) โดยเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ บริเวณนี้มีหน้าที่เป็นที่ยึดเหนี่ยวให้กับ skin appendage นอกจากนี้ยังมี elastic fiber มาช่วยเสริมความแข็งแรงให้กับบริเวณนี้ด้วย



ตัวอย่าง ชั้นเนื้อจากผิวหนังปกติ⁽²⁹⁾

ภาคผนวก ง

ตัวอย่าง Case record form

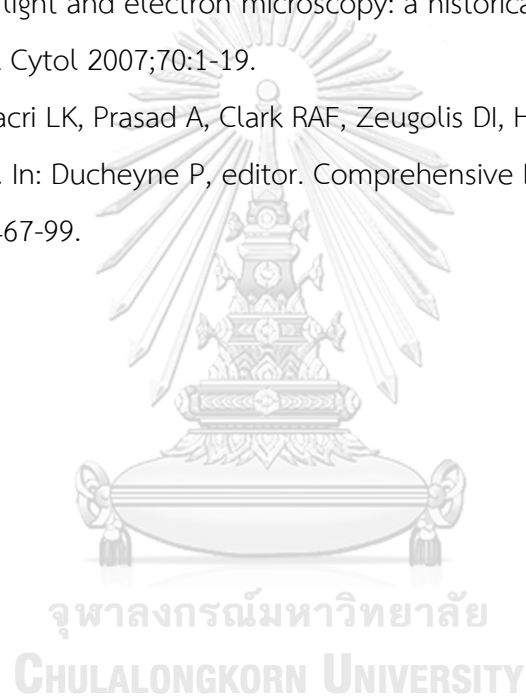
Code No.	Endothelial cell (+/-)	Around vessel (+/-)	Amount (0,1+,2+,3+,4+)	Papillary / Reticular dermis	Sideropharge
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
.					
.					
.					
148					
149					
150					

บรรณานุกรม

1. Wolff K GL, Katz S, Gilchrest B, Paller AS, Leffell D. Systemic necrotizing arteritis. In: Peter A. Merkel PAM, editor. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 9th Edition. Newyork: McGraw-Hill; 2019. p. 2539-58.
2. Evaluation of adults with cutaneous lesions of vasculitis 2020 [Available from: <https://www.uptodate.com/contents/evaluation-of-adults-with-cutaneous-lesions-of-vasculitis>].
3. Wolff K GL, Katz S, Gilchrest B, Paller AS, Leffell D. Pigmented purpuric dermatosis. In: Alexandra Haden DHP, editor. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 9th Edition. Newyork: McGraw-Hill; 2019. p. 2590-8.
4. Pigmented purpuric dermatoses (capillaritis) 2020 [Available from: <https://www.uptodate.com/contents/pigmented-purpuric-dermatoses-capillaritis>].
5. Soter NA. Cutaneous Necrotizing Venulitis. In: Peter A. Merkel PAM, editor. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 9th Edition. Newyork: McGraw-Hill; 2019. p. 2527-38.
6. Elston DM. Inflammatory vascular disease. 2 ed. China: Elsevier 2014.
7. Pigments. In: Drury RAB, Wallington EA, Cameron R, editor. Carleton's histological techniques, 4th Edition. New York: Oxford Unversity Press; 1967. p.225.
8. Orchard GE. Pigments and minerals. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editor. Bancroft's theory and practice of histological techniques, 8th Edition. China:Elsevier Limited; 2019. p. 198-230.
9. Tammie Ferringer CJK. The basics: diagnostic terms, skin anatomy, and stains. 2 ed. Elston DM, editor. China: Elsevier; 2014.
10. Sharma L, Gupta S. Clinicoepidemiological study of pigmented purpuric dermatoses. Indian Dermatology Online Journal 2012;3:17-20.
11. Tolaymat L, Hall MR. Pigmented Purpuric Dermatitits. [Updated 2020 Aug 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519562/>.
12. Rudolph RI. Lichen aureus. J Am Acad Dermatol 1983;8:722-4.

13. Kim DH, Seo SH, Ahn HH, Kye YC, Choi JE. Characteristics and Clinical Manifestations of Pigmented Purpuric Dermatitis. *Ann Dermatol* 2015;27:404-10.
14. Huang Y-K, Lin C-K, Wu Y-H. The pathological spectrum and clinical correlation of pigmented purpuric dermatosis—A retrospective review of 107 cases. *J Cutan Pathol* 2018;45:325-32.
15. Northcutt AD, Tschen JA. The routine use of iron stain for biopsies of dermatoses of the legs. *J Cutan Pathol* 2015;42:717-21.
16. Caggiati A, Rosi C, Casini A, Cirenza M, Petrozza V, Acconcia MC, et al. Skin iron deposition characterises lipodermatosclerosis and leg ulcer. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40:777-82.
17. Miyamoto J, Tanikawa A, Igarashi A, Hataya H, Kobayashi K, Ikegami M, et al. Detection of iron deposition in dermal fibrocytes is a useful tool for histologic diagnosis of nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Dermatopathol* 2011;33:271-6.
18. Al-Daraji W, Gregory AN, Carlson JA. "Macular arteritis": a latent form of cutaneous polyarteritis nodosa? *Am J Dermatopathol* 2008;30:145-9.
19. Gherardi RK, Mhiri C, Baudrimont M, Rouillet E, Berry J-P, Poirier J. Iron pigment deposits, small vessel vasculitis, and erythrophagocytosis in the muscle of human immunodeficiency virus-infected patients. *Hum Pathol* 1991;22:1187-94.
20. Hui M, Meena AK, Rajasekhar L, Sireesha Y, Afshan J, Mridula R, et al. Vasculitic Neuropathy: A Retrospective Analysis of Nerve Biopsies and Clinical Features from a Single Tertiary Care Center. *Ann Indian Acad Neurol* 2019;22:180-6.
21. Ramineni KK, Chandra SR, Mahadevan A, Kulkarni GB, Ramanujam CN. Clinical, electrophysiological and laboratory parameters, and outcome in patients with biopsy proven systemic and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurol India* 2019;67:S62-s70.
22. Kostadinova-Petrova I, Mitevaska E, Janeska B. Histological Characteristics of Bruises with Different Age. *Open Access Maced J Med Sci* 2017;5:813-7.
23. Sabrina A. Newman. Cutaneous Changes in Arterial, Venous, and Lymphatic Dysfunction. In: Kang S, Amagai M, Bruckner AL, Enk AH, Margolis DJ, McMichael AJ, editors. *Fitzpatrick's Dermatology* 9th Ed. USA: McGraw-Hill Education; 2019. 2669-99.
24. Stasis dermatitis 2022. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/stasis-dermatitis>.

25. Shi K, Compres E, Walton KE, Mohan LS, Zhang B, Panah E, et al. Incorporation of dermoscopy improves inter-observer agreement among dermatopathologists in histologic assessment of melanocytic neoplasms. *Archives of Dermatological Research* 2021;313:101-8.
26. Gomori G. Microchemical demonstration of iron. *Am J Pathol.* 1936;12:655.
27. Perls M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen pigmenten. *Virchows Archiv.* 1867;393:42.
28. Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol* 2007;70:1-19.
29. Zeng Q, Macri LK, Prasad A, Clark RAF, Zeugolis DI, Hanley C, et al. 5.534 - Skin Tissue Engineering. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier; 2011. p. 467-99.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสิริวรรณ สุขุมวาท
วัน เดือน ปี เกิด	19 กรกฎาคม 2531
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เกรดเฉลี่ย 3.47
ที่อยู่ปัจจุบัน	49 หมู่ 23 ซอยอินทราวาส 13 ถนนพุทธมณฑลสาย 1 แขวงบางระมาด เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร 10170
ผลงานตีพิมพ์	พ.ศ.2562 -เป็นผู้ประพันธ์หลัก เรื่อง “การเปรียบเทียบคะแนนการจัดสรร ไตจากค่า Panel reactive antibody (PRA) กับคะแนนการจัดสรรไตจาก ค่า calculated PRA (cPRA) ในผู้ป่วยรอปลูกถ่ายไต” ลงในวารสารโลหิต วิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ฉบับเดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2562 พ.ศ.2563 -เป็นผู้ประพันธ์ชื่อที่สอง เรื่อง “Comparison between phenotypic bead assay and single antigen bead assay for determining specificity of HLA antibodies in kidney transplant waiting list” ลงในวารสาร Transplant proceeding