โครงการ CQI ปีงบประมาณ 2564

กลุ่มงานศัลยพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา

ชื่อโครงการ : การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารขจัดแคลเซียม

ชื่อผู้รับผิดชอบโครงการ: นางสาววนันต์ภัทร นพกุล นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มงานศัลยพยาธิวิทยา

หลักการและเหตุผล

โดยทั่วไปแล้วการตรวจวินิจฉัยรอยโรค ต้องอาศัยการตรวจลักษณะทางคลินิก ลักษณะทางภาพรังสีและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เนื้อเยื่อที่จะถูกตรวจลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้นั้นจะต้องได้รับการผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ และการย้อมสีเนื้อเยื่อก่อน โดยเนื้อเยื่อที่ได้รับมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ เนื้อเยื่ออ่อน และ กระดูก โดยปกติแล้วรอยโรคที่เกิดในเนื้อเยื่ออ่อนจะใช้ระยะเวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อและรายงานผลการวินิจฉัยโรค ประมาณ 4-5 วัน ส่วนรอยโรคที่เกิดในกระดูกจะใช้เวลา ประมาณ 15-45 วัน ขึ้นอยู่กับขนาดของกระดูก และรอยโรคที่เกิดในกระดูก จะเห็นได้ว่ารอยโรคที่เกิดในกระดูกใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน ซึ่งส่งผลต่อการรายงานผลการวินิจฉัยโรค เหตุที่รอยโรคที่เป็นกระดูกใช้ระยะเวลานาน เพราะเนื้อเยื่อกระดูกจะต้องนำมาผ่านกระบวนการขจัดแคลเซียมก่อน เนื้อเยื่อจึงจะสามารถผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อและย้อมสี ในขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยาได้

สารที่ใช้ขจัดแคลเซียมแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ สารประเภทกรด (acid) และสารประเภทคีเลต (chelating agents) โดยสารที่เป็นกรดแบ่งได้ เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารที่เป็นกรดแก่ (strong acid) เช่น กรดไนตริก หรือ กรดไฮโดรคลอริก สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น EDTA และสารที่เป็นกรดอ่อน (Weak acid) เช่น กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก หรือ กรดพิคริก โดยสารละลายดังกล่าวเรียกว่า Decalcifying solution

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี ได้แก่

- Nitric acid
- Formic acid
- 5% Acetic acid
- น้ำกลั่น
- บีกเกอร์

1. การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อ

1. กระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยต้องได้รับการรายงานผลการวินิจฉัยโรคมาแล้วอย่างน้อย 1 เดือน สามารถใช้ได้ทั้งกระดูกขากรรไกรบน และกระดูกขากรรไกรล่าง โดยเลือกจากกระดูกขากรรไกรที่เหลือจากการวินิจฉัยโรคหรือรอทำลายเท่านั้น

2. กระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยต้องแช่ในสารละลายฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% neutral buffer formalin)

3. ตัดกระดูกขากรรไกรโดยมีขนาด 1x2 cm. บรรจุลงใน Cassette

2. การขจัดแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ (Decalcification)

หลังจากผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วแบ่งตัวอย่าง เพื่อทดสอบออกเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 5 ตัวอย่าง โดย

กลุ่มที่ 1 กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5

กลุ่มที่ 2 กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10

กลุ่มที่ 3 กรดน้ำส้มความเข้มข้นร้อยละ 5

การขจัดแคลเซียม

1. นำกระดูกขากรรไกรแต่ละชิ้นใส่ในcassette แช่ด้วยสารขจัดแคลเซียมชนิดละ 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. เปลี่ยนสารขจัดแคลเซียมทุกวัน วันละ 1 ครั้ง และทำการทดสอบประสิทธิภาพการขจัดแคลเซียมทางกายภาพ (physical test) โดยการงอกระดูกว่ามีความยืดหยุ่นหรือไม่ หรืออาจใช้เข็มแทง เพื่อดูความอ่อนตัวของเนื้อเยื่อ กรณีที่เข็มยังไม่สามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกรได้ให้ทำการเปลี่ยนสารขจัดแคลเซียมใหม่ เพื่อให้กระดูกขากรรไกรกลับเข้าสู่กระบวนการขจัดแคลเซียมอีกครั้ง จากนั้นทำการทดสอบซ้ำจนกว่ากระดูกจะสามารถบิดงอหรือเข็มสามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกรได้

การเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาและการย้อมสี

เมื่อเข็มสามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกร ได้แล้วแสดงว่ากระดูกขากรรไกรพร้อมที่จะนำไปผ่าน กระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาโดยนำกระดูกขากรรไกร ที่ได้ไปแช่ในน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเจือจางสารขจัดแคลเซียมที่ติดมากับ กระดูกขากรรไกร เมื่อครบกำหนดแล้วให้นำไปแช่ในสารละลายฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการ ทางจุลพยาธิวิทยาโดยมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความ

เข้มข้นร้อยละ 70 (70 % alcohol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 80 (80% alcohol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95 % alcohol) และเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) อย่างละ 2 ชั่วโมงไซลีน (xylene) จำนวน 3 ชั่วโมง และพาราฟินเหลว (hot paraffin) อย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อ (embed) และขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (section) ด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ซึ่งตัดให้ ได้ ความหนาประมาณ 3 ไมโครเมตร และจัดทำเป็นสไลด์แก้วโดยย้อมสี hematoxylene and eosin

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ต่อการอ่อนนุ่มของเนื้อเยื่อ

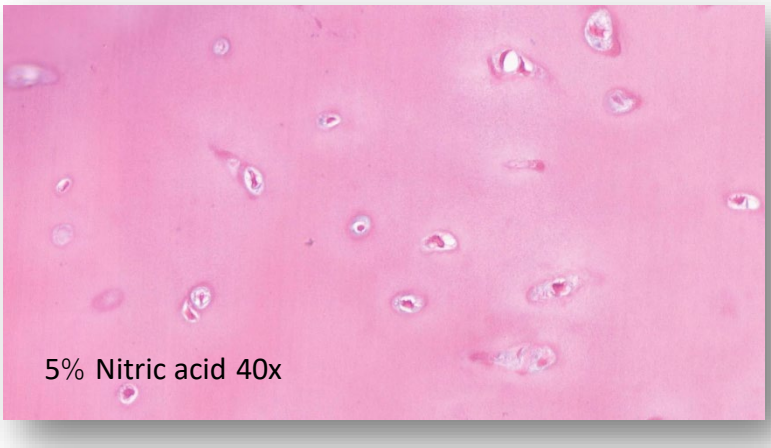
parameter	Decalcifying solution	Date						
		1	2	3	4	5	6	7
Physical property	5% Nitric acid	-	+++ +	+++++ +				
	10% Formic acid	-	-	-	-	++	++++	+++++ +
	5% Acetic acid	-	-	-	++	+++	+++++	+++++ +

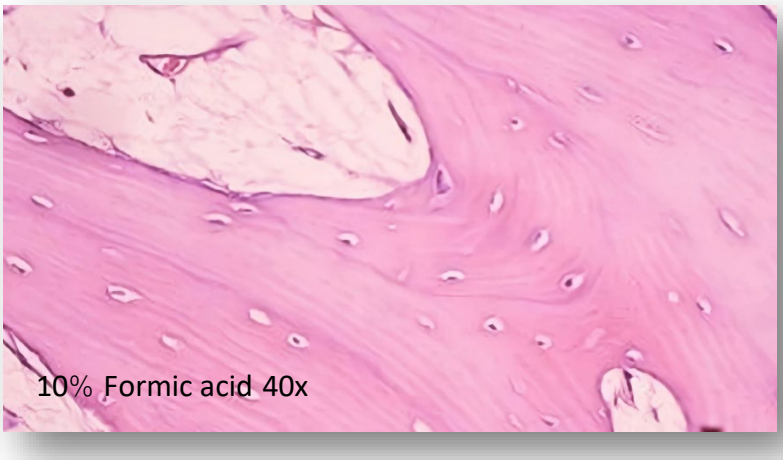
Note; - To +6; grading score of positive physical as hardness.

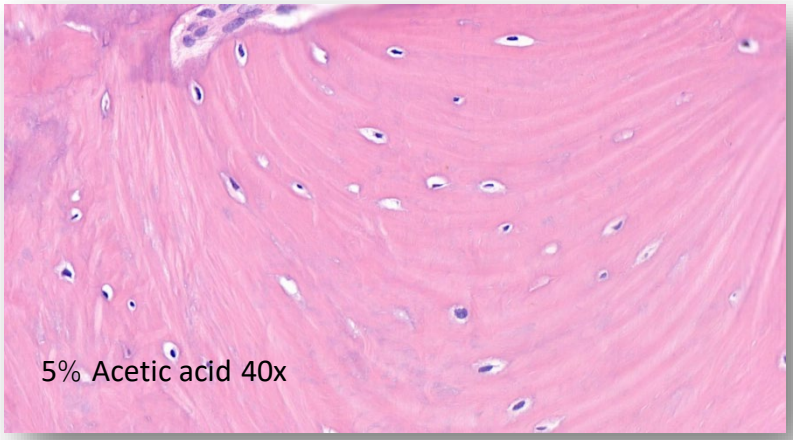
Grading score	Physical property
-	0-10%
+	20%
++	30%
+++	40%
++++	50%
+++++	60%
++++++	70%

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมและความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูกขากรรไกรมนุษย์ ของสารขจัดแคลเซียม 3 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าสารที่ใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมน้อยที่สุดและสามารถตัดเนื้อเยื่อกระดูกได้ง่ายที่สุดคือ กรดไนตริกความเข้มข้น ร้อยละ 5 รองลงมา คือ กรดน้ำส้มความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้ระยะเวลานานที่สุด

รูปที่ 1-6 (Figure1-6) แสดงการติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ







จากการศึกษาพบว่ากรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 และกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกดีกว่ากรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารขจัดแคลเซียม 3 ชนิด ในกระดูกขากรรไกรมนุษย์ โดยศึกษาจากระยะเวลาในการขจัดแคลเซียม ความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูก การติดสี และโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูก การติดสี และโครงสร้างของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูก พบว่า สารขจัดแคลเซียมที่ดีนั้นควรเป็นสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับลักษณะงานที่ใช้ในการศึกษา ถ้าเป็นงานที่ต้องการความรวดเร็วอาจเลือกใช้ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 เพราะใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมน้อยกว่า ส่วนงานที่ต้องการความละเอียดและความถูกต้องในการวินิจฉัยโรค ควรเลือกใช้กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ10 หรือกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 เพราะให้คุณภาพของเนื้อเยื่อที่ดีกว่า