

The comparative study of the effectiveness of decalcifying agents on human jaws

Dusit Bumalee, Ounruean Meesakul

Department of Oral and maxillofacial pathology, Faculty of dentistry, Mahidol University

Objective: To compare the effectiveness of five different decalcifying agents on human jaws.

Material and methods: Human jaws were collected from 6 patients. Each case was cut into 5 pieces and immersed in 5 different decalcifying agents including 5% nitric acid, 5% nitric acid + formaldehyde, 10% formic acid, neutral EDTA, and anna morse. At the end of the decalcification, samples were subjected to routine histopathological process. Decalcification time, the ease of sectioning, the staining, and structures of hard and soft tissues were evaluated and scored.

Results: In terms of decalcification time and the ease of sectioning, the evaluation scores of 5% nitric acid and 5% nitric acid + formaldehyde were higher than other agents ($p < .05$). 10% formic acid and anna morse gave better staining and hard tissue structure than 5% nitric acid and 5% nitric acid + formaldehyde ($p < .05$). All 5 agents did not show differences in the staining and structure of the soft tissue associated with the hard tissue.

Conclusion: A good decalcifying agent must have quality that is suitable for the type of work. In cases requiring urgency, 5% nitric acid and 5% nitric acid + formaldehyde may be selected. For the quality of the tissue, 10% formic acid and anna morse may be the ideal choice.

Keywords: anna morse, decalcifying agents, EDTA, formic acid, human jaw, nitric acid

How to cite: Bumalee D, Meesakul O. The comparative study of the effectiveness of decalcifying agents on human jaws. M Dent J 2017; 37: 327-338.

Correspondence author: Ounruean Meesakul

Department of Oral and maxillofacial pathology, Faculty of dentistry, Mahidol University 6 Yothi street, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand.
E-mail: Ounruean11@gmail.com Tel: 02-200-7829

Received : 26 May 2017

Accepted : 7 August 2017

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารจัดแคลเซียม ในกระดูกขากรรไกรมนุษย์

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารจัดแคลเซียม 5 ชนิด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา: กระดูกขากรรไกรมนุษย์ จำนวน 6 ราย ถูกตัดแบ่งออกรายละเอียด 5 ชิ้น (n=30) นำไปแช่ในสารจัดแคลเซียม 5 ชนิด ดังนี้ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มัลดีไฮด์ กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 นิวทอล อีดีทีเอ แอนนา มอร์ส เมื่อสิ้นสุดกระบวนการจัดแคลเซียมและขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยาแล้ว ระยะเวลาในการจัดแคลเซียม ความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูก การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูกจะถูกประเมินและให้คะแนน

ผลการศึกษา: สารที่ใช้ระยะเวลาในการจัดแคลเซียมน้อยที่สุดและสามารถตัดเนื้อเยื่อกระดูกได้ง่ายที่สุด คือ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งแตกต่างกับสารจัดแคลเซียมชนิดอื่น ($p < .05$) ในขณะที่การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกที่ใช้ กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 และแอนนา มอร์ส มีคุณภาพดีกว่ากรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มัลดีไฮด์ ($p < .05$) ส่วนการติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูกพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างสารจัดแคลเซียมทั้ง 5 ชนิด

บทสรุป: สารจัดแคลเซียมที่ดีควรเป็นสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับลักษณะงาน ถ้าเป็นงานที่ต้องการความรวดเร็ว อาจเลือกใช้กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 หรือกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับ ฟอร์มัลดีไฮด์ ส่วนงานที่ต้องการคุณภาพของเนื้อเยื่อควรเลือกใช้กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 หรือ แอนนา มอร์ส

รหัสคำ: แอนนา มอร์ส, สารจัดแคลเซียม, อีดีทีเอ, กรดฟอร์มิก, กระดูกขากรรไกรมนุษย์, กรดไนตริก

การอ้างอิง: Bumalee D, Meesakul O. The comparative study of the effectiveness of decalcifying agents on human jaws. M Dent J 2017; 37: 327-338.

บทนำ

โดยทั่วไปแล้วการวินิจฉัยรอยโรคในช่องปาก ต้องอาศัยการตรวจลักษณะทางคลินิก ลักษณะทาง ภาพรังสีและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เนื้อเยื่อที่จะ ถูกตรวจลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้นั้นจะต้องได้รับการ ผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อและการย้อมสี เนื้อเยื่อก่อน รอยโรคในช่องปากมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ รอยโรคที่เกิดกับเนื้อเยื่ออ่อนและรอยโรคที่เกิดในกระดูก โดยปกติแล้วรอยโรคที่เกิดในเนื้อเยื่ออ่อนจะใช้ระยะเวลา ในการเตรียมเนื้อเยื่อและรายงานผลการวินิจฉัยโรค ประมาณ 4-5 วัน ส่วนรอยโรคที่เกิดในกระดูกจะใช้เวลา ประมาณ 30-45 วัน ขึ้นอยู่กับขนาดของกระดูกและ รอยโรคที่เกิดในกระดูก [1] จะเห็นได้ว่ารอยโรคที่ เกิดในกระดูกใช้ระยะเวลานานขึ้น ซึ่งส่งผลต่อ การรายงานผลการวินิจฉัยโรค เหตุที่รอยโรคที่เป็น กระดูกใช้ระยะเวลานานเพราะเนื้อเยื่อกระดูกจะต้อง นำมาผ่านกระบวนการขจัดแคลเซียมก่อนเนื้อเยื่อจึงจะ สามารถผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อและย้อมสี ในขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยาได้

การขจัดแคลเซียม (decalcification) คือ การขจัด อนุมูลหรือสารที่มีแคลเซียมในกระดูกออกก่อนที่จะ นำกระดูกไปผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา [2] เนื่องจากเนื้อเยื่อที่เป็นกระดูกจะมีเกลือแคลเซียมอยู่ [3] วิธีการคือ การนำกระดูกไปแช่ในสารขจัดแคลเซียม ที่เรียกว่า decalcifying solution จนกระทั่งกระดูกแข็ง เปลี่ยนสภาพเป็นลักษณะที่อ่อนตัวพอหั่นได้เหมือน เนื้อเยื่ออ่อน [2] สารที่ใช้ขจัดแคลเซียมแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ สารประเภทกรด (acid) และสารประเภท คีเลต (chelating agents) โดยสารที่เป็นกรดแบ่งได้ เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารที่เป็นกรดแก่ (strong acid) เช่น กรดไนตริก (nitric acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ส่วนสารที่เป็นกรดอ่อน (weak acid) เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแอซิติก (acetic acid) กรดพิควิก (picric acid) [4] ซึ่งรูปแบบ การใช้จะผสมกับสารเคมีชนิดอื่นๆ เช่น กรดไนตริก

ผสมกับฟอร์มาลีน (formalin) [5] กรดฟอร์มิกผสมกับ โซเดียมซิเตรต (sodium citrate) [6] ที่เรียกกันว่า แอนนา มอร์ส (anna morse) [7,8] และกรดฟอร์มิก ผสมกับฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) [6] เป็นต้น ส่วนกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid) ที่เรียกชื่อย่อว่า EDTA เป็นสารคีเลตที่นิยมใช้กันหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นนิวทรัล อีดีทีเอ (neutral EDTA) [5,9,10] อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% EDTA) [7,11] อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 10 ผสมกับทริส (10% EDTA+TRIS) [11] หรืออีดีทีเอผสมกับกลีเซอรอล (EDTA+glycerol) [12]

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า มีการใช้สารขจัดแคลเซียมหลากหลายชนิดและ มีการศึกษาในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันดังแสดงใน ตารางที่ 1 (Table 1)

ข้อมูลจากตารางที่ 1 (Table 1) แสดงให้เห็นว่า ยังไม่มีสารขจัดแคลเซียมที่ดีที่สุดสำหรับเนื้อเยื่อ ทุกชนิด โดยอาจกล่าวได้ว่าเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน อาจเหมาะสมกับสารขจัดแคลเซียมที่แตกต่างกัน สำหรับการศึกษานี้กระดูกขากรรไกรมนุษย์พบว่า มี เพียง 1 กลุ่มเท่านั้นซึ่งทำการศึกษาโดย Jimson และ คณะ [15] ซึ่งรายงานว่าสารขจัดแคลเซียมที่ดีที่สุดคือ กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาของ Jimson และคณะ [15] ไม่มีการใช้ แอนนา มอร์ส ซึ่งเป็นสารขจัดแคลเซียมที่ห้องปฏิบัติการ จุลพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียลใช้อยู่ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของสารขจัดแคลเซียม 5 ชนิดในกระดูก ขากรรไกรมนุษย์ โดยเปรียบเทียบระยะเวลาในการขจัด แคลเซียม ความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูก ขากรรไกร การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูก การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูก ซึ่งการศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าสารขจัด แคลเซียมชนิดใดเหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ จุลพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Table 1 The effectiveness of decalcifying agents on hard tissue.

Type of hard tissue	Examined decalcifying agents	The best of decalcifying agents	Results of the best decalcifying agents
1. Rat calvarium bone [13]	1. 10% EDTA + tris 2. 6% acetic acid 3. 5% HCL 4. 25% formic acid	1. 10 % EDTA+ tris and 6 % acetic acid	<u>Advantages</u> - good nuclear and cytoplasmic staining. (Decalcification time is no mentioned.)
2. Rat maxilla [8]	1. 5% nitric acid 2. anna morse	1. anna morse	<u>Advantage</u> - clear characteristics of the epithelial-connective tissue junction and of the periodontal structures. <u>Disadvantage</u> - decalcification time is longer than 5% nitric acid.
3. Dog humerus bone [6]	1. formic acid + formaldehyde I 2. formic acid + formaldehyde II 3,4. 25%, 50% HCL 5. nitric acid	6. anna morse 7. 4% formic acid + 4% HCL 8. HCL + EDTA 9,10,11. EDTA pH 3.2, 7.0 และ pH,10.3	<u>Advantage</u> - good staining with certain solution combinations. - optimal decalcification time.
4. Ostrich bone [14]	1. 5% EDTA 2. 10% EDTA 3. 5% nitric acid 4. 10% nitric acid	1. 10% EDTA 2. 5%,10% nitric acid	<u>Advantage</u> - 10% EDTA has no effect on staining. - both 5% and 10% nitric acid are the best completely decalcified bone. <u>Disadvantage</u> - both 5% and 10% nitric acid has over eosin staining of the tissue.
5. Human mandible [15]	1. 5% nitric acid 2. 10% formic acid 3. 5% nitric acid + EDTA	4. HCL 5. neutral EDTA	<u>Advantage</u> - provides the best ribbon of sections, good nuclear stain and minimal edema.

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (MU-DY/PT-IRB2013/031.2709) กระดูกขากรรไกรมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยที่ภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีเกณฑ์คัดเลือกกระดูกขากรรไกรดังนี้

1. กระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยต้องได้รับการรายงานผลการวินิจฉัยโรคมาแล้วอย่างน้อย 1 เดือนสามารถใช้ได้ทั้งกระดูกขากรรไกรบนและกระดูกขากรรไกรล่าง โดยเลือกจากกระดูกขากรรไกรที่เหลือจากการวินิจฉัยโรคหรือรอทำลายเท่านั้น
 2. กระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยต้องแช่ในสารละลายฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 (10 % neutral buffer formalin)
 3. ขนาดของกระดูกขากรรไกรที่ใช้ต้องมีความยาวมากกว่า 3 เซนติเมตร
- จากเกณฑ์ดังกล่าวนี้ทำให้ได้กระดูกขากรรไกรทั้งสิ้นจำนวน 6 ราย

การเตรียมกระดูกขากรรไกร

แบ่งกระดูกขากรรไกรแต่ละรายออกเป็น 5 ชิ้น โดยใช้ชุดอุปกรณ์ตัดกระดูกให้มีความหนาอย่างน้อยชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำมาฝนด้วยกระดาษทรายหยาบเพื่อให้ได้ขนาด (กว้างXยาว) ของกระดูกขากรรไกรในแต่ละรายมีขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังนั้นจากผู้ป่วยจำนวน 6 รายจึงมีกระดูกขากรรไกรรวมทั้งสิ้น 30 ชิ้น หลังจากนั้นนำกระดูกขากรรไกรมาบรรจุในตลับ (cassette) เพื่อตรึงสภาพกระดูกในสารละลายฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดแล้วแบ่งกระดูกขากรรไกรของคนไข้แต่ละรายและแยกทดสอบกับสารจัดแคลเซียม 5 ชนิด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้

จึงประกอบด้วย 5 กลุ่มการทดลอง โดยแต่ละกลุ่มจะมีกระดูกขากรรไกรกลุ่มละ 6 ชิ้น (n= 30) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5
- กลุ่มที่ 2 กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์
- กลุ่มที่ 3 กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10
- กลุ่มที่ 4 นิวทรอล อีดีทีเอ
- กลุ่มที่ 5 กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 50 ผสมกับสารละลายโซเดียมซิเตรทความเข้มข้นร้อยละ 20 หรือแอนนา มอร์ส

การจัดแคลเซียม

1. นำกระดูกขากรรไกรแต่ละชิ้นใส่ในตลับแช่ด้วยสารจัดแคลเซียมชนิดละ 150 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แขนงด้วยเชือกเพื่อให้ตลับลอยอยู่เหนือบีกเกอร์ ใช้ที่กวน (stirrer) กวนสารละลายวันละประมาณ 7-8 ชั่วโมง
2. เปลี่ยนสารจัดแคลเซียมอาทิตย์ละ 1 ครั้ง และทำการทดสอบประสิทธิภาพการจัดแคลเซียมทางกายภาพ (physical test) โดยการงอกระดูกว่ามีความยืดหยุ่นหรือไม่ หรืออาจใช้เข็มแทงเพื่อดูความอ่อนตัวของเนื้อเยื่อ[3] กรณีที่เข็มยังไม่สามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกรได้ให้ทำการเปลี่ยนสารจัดแคลเซียมใหม่เมื่อครบกำหนด 1 สัปดาห์เพื่อให้กระดูกขากรรไกรกลับเข้าสู่กระบวนการจัดแคลเซียมอีกครั้ง จากนั้นทำการทดสอบซ้ำจนกว่ากระดูกจะสามารถบดงอหรือเข็มสามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกรได้

การเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาและการย้อมสี

เมื่อเข็มสามารถแทงทะลุผ่านกระดูกขากรรไกรได้แล้วแสดงว่ากระดูกขากรรไกรพร้อมที่จะนำไปผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา โดยนำกระดูกขากรรไกรที่ได้ไปแช่ในน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเจือจางสารจัดแคลเซียมที่ติดมากับกระดูกขากรรไกร เมื่อครบกำหนดแล้วให้นำไปแช่

ในสารละลายฟอรัมาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา โดยมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 (70 % alcohol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 80 (80% alcohol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95 % alcohol) และเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) อย่างละ 2 ชั่วโมง ไซลีน (xylene) จำนวน 3 ชั่วโมง และพาราฟินเหลว (hot paraffin) อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อ (embed) และขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (section) ด้วยเครื่องมือไมโครทอม (microtome) ซึ่งตัดให้ได้ความหนาประมาณ 3 ไมโครเมตร และจัดทำเป็นสไลด์แก้วโดยย้อมสี ฮีมาทอกซิดีนและอีโอซิน (hematoxyline and eosin)

การบันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูลแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 The evaluation parameters and criteria for scoring.

Parameters	Score	Criteria
Part I		
1. Decalcification time	1	decalcification time longer than 30 days.
	2	decalcification time between 15-30 days.
	3	decalcification time between 1-14 days.
2. Ease of sectioning	0	can-not section.
	1	section complete with gritting sound when sectioning.
	2	section complete without gritting sound when sectioning.
Part II		
1. Staining of hard tissue	0	no staining.
	1	< 50 % of tissue are stained.
	2	> 50 % of tissue are stained.
2. Staining of soft tissue associated with the hard tissue staining	0	no staining.
	1	< 50 % of tissue are stained.
	2	> 50 % of tissue are stained.
3. Soft tissue attachment	0	> 50 % of soft tissue detach from hard tissue.
	1	< 50 % of soft tissue detach from hard tissue.
	2	no soft tissue detach from hard tissue.
4. Structure of hard tissue	0	distorted /damaged structure.
	1	normal structure.
5. Structure of soft tissue associated with the hard tissue	0	distorted /damaged structure.
	1	normal structure.

ส่วนที่ 1 ประเมินระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมและความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูกขากรรไกรโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจำนวน 1 ท่าน

ส่วนที่ 2 ประเมินการติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกขากรรไกร การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูกขากรรไกรโดยพยาธิแพทย์ช่องปากจำนวน 1 ท่าน โดยการประเมินทั้งสองส่วนนี้ผู้ประเมินจะไม่ทราบว่าเป็นเนื้อเยื่อตัวอย่างใช้สารขจัดแคลเซียมชนิดใด (blind condition) หากคะแนนทุกหัวข้อการประเมินมีคะแนนสูงแสดงว่าผู้ประเมินมีความพึงพอใจต่อการประเมินมาก โดยเกณฑ์ที่ใช้ได้ดัดแปลงจากการศึกษาของ Sanjai และคณะ [5]

การวิเคราะห์ผลการสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16 ที่ระดับนัยสำคัญ p Value < 0.05 โดยใช้ค่าสถิติ Friedman test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสารขจัดแคลเซียมแต่ละชนิดโดย Wilcoxon test

ผลการศึกษา

การประเมินส่วนที่ 1 ซึ่งทำการประเมินโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังตารางที่ 3 (Table 3) ที่แสดงค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมและความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูกขากรรไกรมนุษย์ของสารขจัดแคลเซียม 5 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าสารที่ใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมน้อยที่สุดและสามารถตัดเนื้อเยื่อกระดูกได้ง่ายที่สุดคือ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 รองลงมาคือ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งจากผลการทดลองยังพบว่า

สารขจัดแคลเซียมทั้ง 2 ชนิดนี้มีระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมและความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูกแตกต่างกันกับกรดฟอร์มิคความเข้มข้นร้อยละ 10 นวัตกรรมอิตีทีเอ และแอนนา มอร์ส อย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$)

ตารางที่ 4 (Table 4) แสดงการประเมินในส่วนที่ 2 เป็นการประเมินการติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกขากรรไกรมนุษย์โดยพยาธิแพทย์ช่องปาก จากการศึกษาพบว่ากรดฟอร์มิคความเข้มข้นร้อยละ 10 และแอนนา มอร์ส ให้การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกดีกว่ากรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มาลดีไฮด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) ในรูปที่ 1-6 (Figure 1-6) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของกระดูกในกรดฟอร์มิคความเข้มข้นร้อยละ 10 และแอนนา มอร์สจะดีกว่ากรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5

ตารางที่ 5 (Table 5) แสดงการประเมินการติดสีและตรวจดูการแยกตัวของเนื้อเยื่ออ่อนจากกระดูกและโครงสร้างเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูก โดยพยาธิแพทย์ช่องปากพบว่าสารขจัดแคลเซียม 5 ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > .05$) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากระดูกขากรรไกรจำนวน 1 ราย ที่ไม่สามารถใช้ในการประเมินคุณภาพของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูกได้เนื่องจากกระดูกขากรรไกรรายนั้นมีส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนน้อย ดังนั้นจึงทำให้เหลือจำนวนกระดูกขากรรไกรเพียง 5 รายเท่านั้น อย่างไรก็ตามจากการตรวจเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าการแยกตัวของเนื้อเยื่ออ่อนจากกระดูกของกรดฟอร์มิคความเข้มข้นร้อยละ 10 และแอนนา มอร์ส มีการแยกตัวที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ดังแสดงในรูปที่ 1-6 (Figure 1-6)

Table 3 The average score of decalcification time and ease of sectioning from 5 decalcifying agents.

Evaluation	N	Mean (Min,Max)	p-Value
			0.001*
5% Nitric acid	6	5.00(5,5)	
5% Nitric acid + Formaldehyde	6	4.67(4,5)	
10% Formic acid	6	3.33(2,5) ^{a,b}	
Neutral EDTA	6	3.50(3,4) ^{a,b}	
Anna morse	6	3.17(3,4) ^{a,b}	

a = significant difference compared with 5% nitric acid

b = significant difference compared with 5% nitric acid + formaldehyde

*Statistically significant by Friedman test

Table 4 The average score of staining and the structures of hard tissue from 5 decalcifying agents.

Evaluation	N	Mean (Min,Max)	p-Value
			0.044*
5% Nitric acid	6	1.00(0,3)	
5 % Nitric acid + Formaldehyde	6	1.33(1,2)	
10% Formic acid	6	2.67(2,3) ^{a,b}	
Neutral EDTA	6	1.50(0,3)	
Anna morse	6	2.33(2,3) ^{a,b}	

a = significant difference compared with 5% nitric acid

b = significant difference compared with 5% nitric acid + formaldehyde

*Statistically significant by Friedman test

Table 5 The average score of staining and the structures of soft tissue associated with hard tissue from 5 decalcifying agents.

Evaluation	N	Mean (Min,Max)	p-Value
			0.424
5% Nitric acid	5	1.80(0,3)	
5% Nitric acid + Formaldehyde	5	2.20(1,3)	
10% Formic acid	5	2.00(0,4)	
Neutral EDTA	5	2.20(0,4)	
Anna morse	5	3.80(1,5)	

No statistically significant by Friedman test

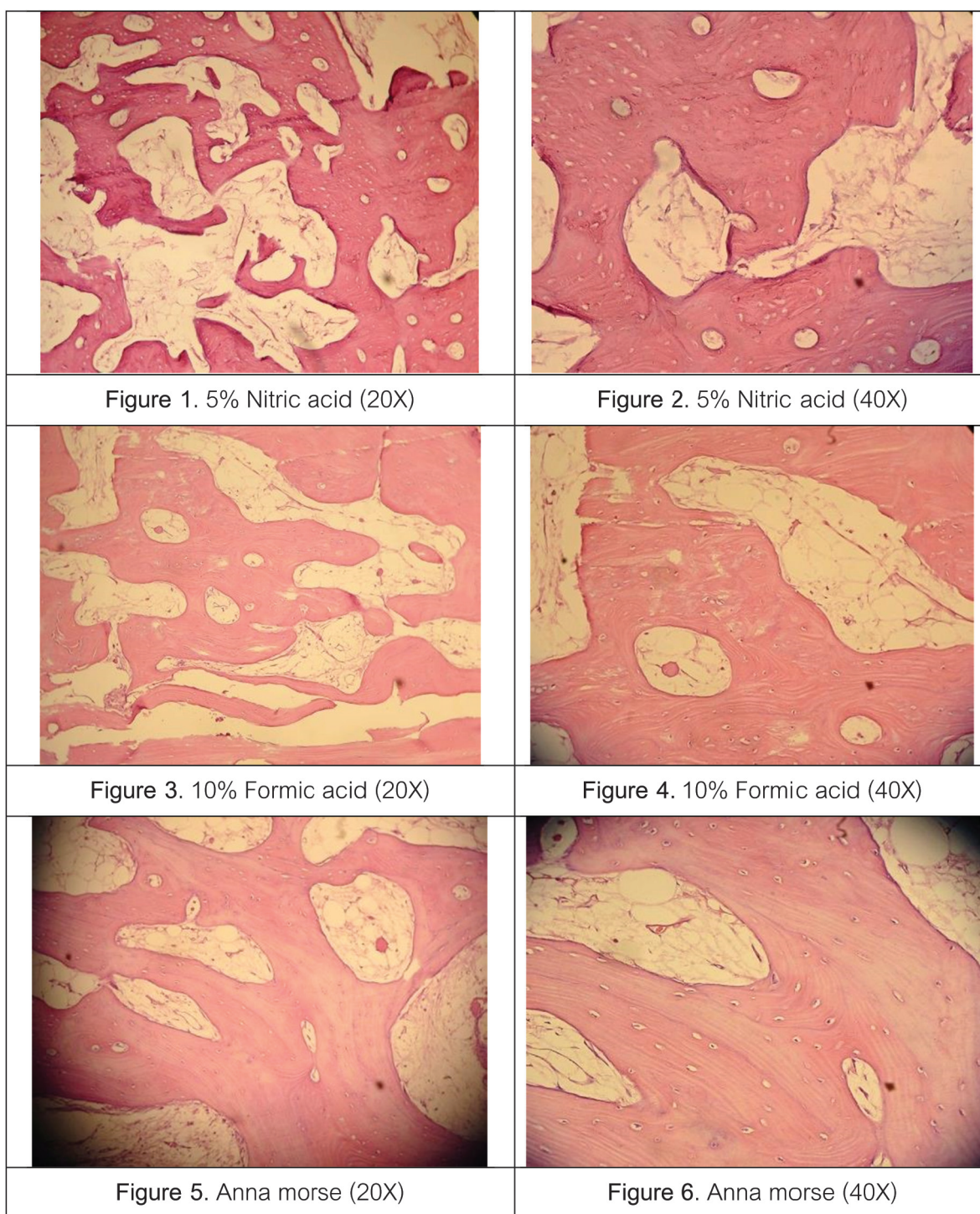


Figure 1-6 Structures of hard tissue and soft tissue associated with hard tissue from 3 decalcifying agents including 5% nitric acid, 10% formic acid and Anna morse. Compared with 10% formic acid and Anna morse, the structure of tissue in 5% nitric acid shows poor quality. Noted that in 10% formic acid and Anna morse the lamellar pattern of bone is well preserved and there is no shrinkage of soft tissue from bone.

บทวิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่ากรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่มีส่วนผสมของฟอร์มาลดีไฮด์และไม่มีส่วนผสมของฟอร์มาลดีไฮด์ใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมของกระดูกขากรรไกรมนุษย์น้อยที่สุดซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาในฟันมนุษย์ [5] กระดูกขากรรไกรหนู [8] กระดูกนกกระเจือกเทศ [14] รวมถึงการศึกษาในกระดูกขากรรไกรมนุษย์ [15] อาจกล่าวได้ว่าสารขจัดแคลเซียมที่เป็นกรดแก่สามารถขจัดแคลเซียมในเนื้อเยื่อแข็งได้เร็วที่สุด แต่เมื่อประเมินการติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกของกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มาลดีไฮด์พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ดีซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในกระดูกขากรรไกรมนุษย์ [15] และการศึกษาในนกกระเจือกเทศ [14]

นอกจากประเภทของสารขจัดแคลเซียมจะมีผลต่อระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อระยะเวลาในการขจัดแคลเซียม เช่น ความเข้มข้นและอุณหภูมิของสารขจัดแคลเซียม รวมทั้งชนิดและขนาดของเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษา [4] อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการบางอย่างจากห้องปฏิบัติการที่สามารถช่วยลดระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมได้ ซึ่งจากการสังเกตพบว่าระหว่างที่ทำการตรวจสอบจุดสิ้นสุดขบวนการขจัดแคลเซียมในห้องปฏิบัติการหากพบว่าเนื้อเยื่อแข็งสามารถบดโค้งงอไปมา เริ่มนิ่ม หรือใช้เข็มแทงทะลุบางส่วนได้แล้วให้ตัดแบ่งเนื้อเยื่อแข็งนั้นๆ เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้สารขจัดแคลเซียมซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อแข็งได้ดียิ่งขึ้นและการเปลี่ยนสารขจัดแคลเซียมอย่างสม่ำเสมอก็เป็น การช่วยลดระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมได้อีกวิธีหนึ่ง

แม้ว่าที่ผ่านมาขบวนการขจัดแคลเซียมในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลจะใช้

ระยะเวลาค่อนข้างนาน ซึ่งส่งผลให้การรายงานผลการวินิจฉัยโรคมีความล่าช้า การหาสารขจัดแคลเซียมที่เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาช่องปาก ควรเป็นสารขจัดแคลเซียมที่ทำให้การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่ออยู่ในเกณฑ์ที่ดี ผู้วินิจฉัยโรคสามารถตรวจลักษณะจุลพยาธิวิทยาและสามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ ตลอดจนสามารถใช้ในการเรียนการสอน งานวิจัยของนักศึกษาทันตแพทย์และบุคลากรในภาควิชาได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 และแอนนา มอร์ส เป็นสารขจัดแคลเซียมที่ให้คุณภาพของเนื้อเยื่อที่ดีที่สุด ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาของ Jimsom และคณะ [15] ที่ทำการศึกษาในกระดูกขากรรไกรมนุษย์โดยเปรียบเทียบคุณภาพของสารขจัดแคลเซียม 5 ชนิด ได้แก่ กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 นิวทรอล อีดีทีเอ และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับอีดีทีเอ ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมอยู่ในระดับปานกลาง การตัดเนื้อเยื่อกระดูกไม่ยากเกินไปในขณะเดียวกันก็ให้การติดของสไลด์เคลียสอยู่ในเกณฑ์ที่ดี

จากการศึกษานี้ยังพบว่ามีข้อจำกัดในงานวิจัยนี้อยู่บ้างกล่าวคือ จำนวนของกระดูกขากรรไกรที่ใช้ศึกษามีน้อยเพราะต้องใช้กระดูกขากรรไกรมนุษย์ที่เหลือจากการส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อีกทั้งกระดูกขากรรไกรที่ใช้ทำการศึกษามีระยะเวลาในการเก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลีนความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่แตกต่างกัน รวมถึงขนาดของกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยแต่ละรายมีขนาดที่แตกต่างกันด้วย จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงทำให้ไม่สามารถเลือกกระดูกขากรรไกรให้มีขนาดเท่ากันทุกๆ ชิ้นทุกกลุ่มการทดลองได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้กระดูกขากรรไกรมนุษย์ในปริมาณที่มากกว่านี้

บทสรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารขจัดแคลเซียม 5 ชนิดในกระดูกขากรรไกรมนุษย์ โดยศึกษาจากระยะเวลาในการขจัดแคลเซียม ความยากง่ายในการตัดเนื้อเยื่อกระดูก การติดสี และโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูก การติดสีและโครงสร้างของเนื้อเยื่ออ่อนในกระดูก พบว่าสารขจัดแคลเซียมที่ได้นั้นควรเป็นสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับลักษณะงานที่ใช้ในศึกษา ถ้าเป็นงานที่ต้องการความรวดเร็วอาจเลือกใช้กรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 หรือกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับฟอร์มัลดีไฮด์ เพราะใช้ระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมน้อย ส่วนงานที่ต้องการความละเอียดและต้องการความถูกต้องในการวินิจฉัยควรเลือกใช้กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 10 หรือแอนนา มอร์ส เพราะให้คุณภาพของเนื้อเยื่อที่ดีกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.จุฬาลักษณ์ โกมลตรี และนางสาวไพรินทร์ ต้นพุ่ม ที่ให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ขอขอบคุณภาควิชาพยาธิวิทยาช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์สถานที่ วัสดุอุปกรณ์สารเคมี และกระดูกขากรรไกรมนุษย์ที่ใช้ทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. รัฐพงษ์ วรวงศ์สุ. พยาธิวิทยาช่องปากศัลยพยาธิวิทยาและการวินิจฉัยแยกโรคทางคลินิก พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: นิติธรรมการพิมพ์; 2557: 349-50.
2. เวคิน นพนิตย์. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพิมพ์ทางขายยาตราณกุง; 2524: 25-6.
3. ศุภลักษณ์ โรมนันท์. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545: 111-2.
4. John D. Bancroft, Alan Stevens. Theory and practice of histological techniques. 4th ed. Hong Kong: Churchill Livingstone; 1996: 314-5.
5. Sanjai K, Kumarswamy J, Patil A, Papaiah L, Jayaram S, Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac pathol* 2012; 16: 222-7.
6. Callis G, Sterchi D. Decalcification of Bone : literature review and practical study of various decalcifying agents, methods, and their effects on bone histology. *The journal of histotechnology* 1998; 21: 49-58.
7. Grando ML, Westphalen BL, Vieira VPF, Borba AF, Medeiro FAC. Comparative analysis of two fixating and two decalcifying solutions for processing of human primary teeth with inactive dentin carious lesion. *Revista odonto ciencia-fac. Odonto/PUCRS* 2007; 22: 99-105.
8. Fernandes MI, Gaio EJ, Rosing CK, Oppermann RV, Rado PV. Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. *Braz Oral Res* 2007; 21: 134-9.
9. Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1967; 15: 542-9.
10. Cook SF, Ezra-cohn HE. A comparison of methods for decalcification bone. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 560-3.
11. Zappa J, Bielecka AC, Adwent M, Cieslik T, Sabat D. Comparison of different decalcification methods to hard teeth tissue morphological analysis. *Dent Med Probl* 2005; 42: 21-6.
12. Bourque WT, Gross M, Hall BK. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissue (Bone, Enamel), yolk amphibian embryos and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1429-34.

13. Klincomhum A, Kengkoom K, Ampawong S. Comparative of decalcification methods for adult rat calvarium bone in relation to histomorphoogical study. *Kasetsat University Annual Conference* 2011; 102-26.
14. Papirom P, Viriyametharoj S, Nopwinyoowong S, Suwannachot N. Comparative study of ethylenediaminetetraacetic acid and nitric acid as bone decalcification agents in ostrich bones. *KKU Veterinary Journal* 2004; 14: 43-8.
15. Jimson S, Balachander N, Masthan KMK, Elumalai R. A comparative study in bone dacalcification using different decalcification agents. *IJRS* 2014; 3: 1226-9.