

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดแคลเซียมผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วยสาร EDTA ในกระดูกต้นขาหลังของกระต่ายสายพันธุ์ Mlac:NZW

Comparative Evaluation of EDTA-Based Surface Decalcification Efficiency in Paraffin-Embedded Femoral Bone Blocks of Mlac:NZW Rabbits

นันทลักษณ์ แก้วสะอาด^{*}, จินนิต งามวงศ์กรณชัย และ ชัชพงษ์ สีแดง

Nuntalak Kaewsard^{*}, Chinnadit Ngamwongronnchai and Chatphong Seedang

หน่วยตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ งานบริการวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

Laboratory Analysis Unit, Academic Service Division, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand

Received: 21 April 2026, Received in revised form: 18 June 2026, Accepted: 19 June 2026

Available online: 30 June 2026

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา: การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของกระดูกจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการขจัดแคลเซียม เนื่องจากเนื้อเยื่อกระดูกมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องมือโครโมให้มีความหนา 4 ไมโครเมตร หากไม่กำจัดแร่ธาตุออกก่อน จะทำให้เกิดข้อจำกัดในการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติงานยังพบว่าบล็อกพาราฟินของชิ้นเนื้อกระดูกบางส่วนยังคงมีความแข็ง แม้ผ่านการแช่สารขจัดแคลเซียม Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ก่อนเข้าสู่กระบวนการ tissue processing เป็นระยะเวลา 7-14 วันแล้ว แต่ยังคงพบความผิดปกติระหว่างการตัดที่กระทบต่อความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อและคุณภาพของสไลด์ซึ่งอาจเกิดจากการขจัดแคลเซียมที่ไม่สมบูรณ์และยังมีแร่ธาตุหลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ แม้ว่า EDTA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคีเลต (chelating agent) จะสามารถจับกับแคลเซียมไอออนและช่วยคงสภาพโครงสร้างของเนื้อเยื่อได้ดี โดยไม่ทำให้คุณภาพการย้อมสีลดลง อีกทั้งยังเหมาะสำหรับการศึกษาทางไขกระดูก มีผลกระทบต่อ lymphoid surface antigens น้อยกว่าสารขจัดแคลเซียมประเภทกรด และสามารถคงสภาพ mRNA ได้ดีกว่า EDTA จึงเป็นสารที่นิยมใช้ในกระบวนการขจัดแคลเซียมเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อแข็งสำหรับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้งาน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดของการขจัดแคลเซียม จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาแนวทางการขจัดแคลเซียมเฉพาะบริเวณผิวหน้าบล็อกพาราฟิน เพื่อทดแทนวิธีเดิมและลดระยะเวลาในการดำเนินงาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการขจัดแคลเซียมบริเวณผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วยสาร EDTA ต่อคุณภาพชิ้นเนื้อกระดูกต้นขาหลังของกระต่ายสายพันธุ์ Mlac:NZW โดยใช้เทคนิค surface decalcification เนื่องจากเป็นกระดูกยาวที่มีโครงสร้างหนาแน่นและปริมาณแร่ธาตุสูง เหมาะสำหรับใช้เป็นตัวแทนในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการขจัดแคลเซียมดังกล่าว ผลการศึกษาจะช่วยกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมและเพิ่มประสิทธิภาพในการเตรียมชิ้นเนื้อกระดูกสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา

วิธีดำเนินการวิจัย: กระดูกต้นขาของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White (Mlac:NZW) จำนวน 24 ตัวอย่าง มาตรึงสภาพด้วยสารละลายร้อยละ 10 นิวทรัล บัฟเฟอร์ ฟอร์มาลิน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และแช่ในน้ำยา EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ก่อนเข้าสู่กระบวนการมาตรฐานการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาหลังจากนั้นบล็อกพาราฟินจำนวน 24 บล็อก ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 บล็อก เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการขจัดแคลเซียมบริเวณ

ผิวหนังบดลอกพาราฟินด้วยสารละลาย EDTA ต่อความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อและคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวร ได้แก่ กลุ่มควบคุม (0 นาที) กลุ่มที่แช่สารละลาย EDTA เป็นเวลา 15 นาที 30 นาที และ 45 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำบดลอกพาราฟินแต่ละกลุ่มตัดเป็นแผ่นบางความหนา 4 ไมโครเมตร และย้อมสีด้วยวิธี Hematoxylin and Eosin (H&E) ทำย้อมที่สไลด์ นำมาประเมินผลความยากง่ายในการตัดชิ้นเนื้อ และคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวร

ผลการวิจัย: ผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการแช่สไลด์เนื้อเยื่อเฉพาะผิวหนังบดลอกพาราฟินด้วยสารละลาย EDTA มีผลต่อทั้งความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อและคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวร โดยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่ EDTA มีคะแนน H-score ต่ำที่สุด แสดงถึงความยากในการตัดชิ้นเนื้อที่ด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการแช่ EDTA ขณะที่การแช่ EDTA เป็นเวลา 15 นาที 30 นาที และ 45 นาทีที่มีความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อมากขึ้นตามลำดับ ในส่วนของคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อถาวร พบว่า กลุ่มที่แช่ EDTA เป็นเวลา 30 นาทีให้ผลดีที่สุด โดยมีการคงสภาพโครงสร้างเนื้อเยื่อและการติดสี H&E ที่ชัดเจนที่สุด ส่งผลให้มีคะแนน H-score รวมสูงสุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่แช่ EDTA เป็นเวลา 45 นาที ($P \leq 0.05$) ในทางตรงกันข้าม การแช่ EDTA เป็นเวลา 45 นาที แม้จะช่วยให้ตัดชิ้นเนื้อได้ง่ายขึ้น แต่มีแนวโน้มทำให้คุณภาพของสไลด์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่เป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กลุ่มการทดลองที่ใช้ EDTA แช่สไลด์เนื้อเยื่อเป็นเวลา 15 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับคะแนนรวมของกลุ่มทดลองที่ใช้เวลา 30 นาที และ 45 นาที

สรุปผลการวิจัย: การแช่สไลด์เนื้อเยื่อเฉพาะผิวหนังบดลอกพาราฟินด้วยสาร EDTA เป็นเวลา 30 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อกระดูกต้นขากระต่ายสายพันธุ์ Miac:NZW และเป็นแนวทางสำหรับการปรับปรุงกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อกระดูกในงานจุลพยาธิวิทยาในห้องปฏิบัติการอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: กระต่าย; กระดูกต้นขา; การแช่สไลด์เนื้อเยื่อ; สารแช่สไลด์เนื้อเยื่อ; อีทีทีเอ

Abstract

Background and Objectives: Histopathological examination of bone tissue requires an effective decalcification process because calcium, the principal mineral component of bone, impedes sectioning by microtomy at the standard thickness of approximately 4 μ m. The presence of residual mineralized tissue can adversely affect specimen preparation. However, sectioning artifacts were still observed, affecting tissue integrity and slide quality. These artifacts may compromise microscopic evaluation and reduce the diagnostic quality of histological sections. In routine histopathology laboratories, bone specimens are commonly decalcified using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) prior to tissue processing and paraffin embedding. EDTA is a calcium ions chelating agent that removes mineralized components while preserving tissue morphology and staining quality more effectively than acidic decalcifying agents. In addition, EDTA is particularly suitable for bone marrow studies because it causes minimal alteration of lymphoid surface antigens and provides superior preservation of nucleic acid integrity, including messenger RNA (mRNA). Although conventional EDTA decalcification is generally performed for 7–14 days and is considered effective for the removal of calcium deposits, some paraffin-embedded bone specimens remain difficult to section. This observation suggests that residual mineral components may persist within the tissue despite prolonged decalcification, thereby affecting

microtomy performance and section quality. Such challenges may lead to increased workload, repeated sectioning attempts, and delayed histopathological evaluation. Despite these advantages, the optimal duration of EDTA treatment required to improve the sectioning quality of previously processed bone paraffin blocks has not been clearly established. Surface decalcification of paraffin blocks has been proposed as a practical and time-efficient alternative technique for improving microtomy performance in incompletely decalcified bone specimens. This approach involves exposing the block surface to a decalcifying solution immediately before sectioning, thereby targeting residual mineral deposits without repeating the entire tissue-processing procedure. Therefore, the present study aimed to determine the optimal duration of EDTA surface decalcification for improving the histological quality of femoral bone sections obtained from Mlac:NZW rabbits. The femur was selected as the experimental model because it is a dense long bone with substantial mineral content, making it suitable for evaluating the effectiveness of surface decalcification. The findings of this study may contribute to the development of standardized protocols for surface decalcification and improve the efficiency and quality of bone tissue preparation for routine histopathological examination.

Methodology: Twenty-four femoral bone specimens obtained from New Zealand White rabbits (Mlac:NZW) were fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 h and decalcified in EDTA solution for 24 h at room temperature (25°C) prior to routine histological tissue processing. The paraffin blocks were randomly assigned to four groups (n = 6 per group) according to the duration of EDTA surface decalcification: 0 min (control), 15 min, 30 min, and 45 min. Following treatment, tissue sections were cut at a thickness of 4 µm, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and evaluated for sectioning ease and histological slide quality.

Main Results: Surface decalcification of paraffin blocks with EDTA improved both sectioning ease and permanent slide quality compared with the untreated control group. Sectioning ease increased with longer EDTA immersion times (15, 30, and 45 min). The 30-min EDTA treatment produced the highest overall H-score, demonstrating optimal preservation of tissue architecture and H&E staining quality, and differed significantly from the control and 45-min treatment groups ($P \leq 0.05$). Although the 45-min treatment further facilitated sectioning, it showed a tendency toward reduced slide quality compared with the 30-min treatment. The 15-min treatment improved sectioning performance and slide quality compared with the control group but yielded lower overall H-scores than the 30-min and 45-min treatment groups.

Conclusions: Surface decalcification of paraffin blocks using EDTA for 30 min was identified as the optimal duration for preparing femoral bone tissue from Mlac:NZW rabbits. This method may serve as a practical approach for improving bone tissue preparation and enhancing the efficiency of routine histopathological procedures.

Keywords : rabbits ;femur ;decalcification ;decalcifying agents; EDTA

Introduction

กระบวนการขจัดแคลเซียม (decalcification) คือ กระบวนการกำจัดแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อแข็งโดยใช้สารขจัดแคลเซียม (decalcifying solution) เพื่อให้ชิ้นเนื้อมีความอ่อนนุ่มเพียงพอสำหรับการเตรียมและตัดชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา (Bumalee & Meesakul, 2017) การเลือกใช้วิธีการขจัดแคลเซียมที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อคุณภาพของสไลด์และการคงสภาพโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (Chow *et al.*, 2019) โดยเฉพาะการขจัดแคลเซียมด้วยการใช้สารเคมีหรือสารละลาย เช่น กรดไนตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถละลายแคลเซียมได้รวดเร็ว เหมาะสำหรับงานที่ต้องการผลในระยะเวลาอันสั้น แต่อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของการย้อมสีและโครงสร้างระดับเซลล์ ทำให้รายละเอียดของเซลล์ลดลง เนื้อเยื่อหดตัว และการติดสีของเนื้อเยื่อไม่สม่ำเสมอ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลการแปลผลทางจุลพยาธิวิทยาได้ (Bogoevski *et al.*, 2019) แต่ปัจจุบันมีการนำสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคีเลต (chelating agent) เพื่อกำจัดแคลเซียมในเนื้อเยื่อไขกระดูก มีข้อดีคือไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการย้อมสีและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ lymphoid surface antigens น้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารละลายกลุ่มกรด (Alers *et al.*, 1999) และยังคงสภาพของ mRNA และ antigenicity ได้ดีกว่ากรดไนตริกและกรดฟอสฟอริก (Walsh *et al.*, 1993; Choube *et al.*, 2018) นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาหลายฉบับที่สนับสนุนประสิทธิภาพของ EDTA ในการขจัดแคลเซียมและการคงสภาพเนื้อเยื่อ โดย Chow *et al.* (2019) รายงานว่าการใช้ EDTA ร่วมกับคลีนอัลตราซาวด์สามารถลดระยะเวลาในการขจัดแคลเซียมของชิ้นเนื้อกระดูกได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพทางจุลพยาธิวิทยาและการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ขณะที่ Bogoevski *et al.* (2019) พบว่า EDTA สามารถคงสภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อและความสามารถในการตรวจหาแอนติเจนได้ดีกว่าสารขจัดแคลเซียมประเภทกรดหลายชนิด ผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า EDTA เป็นสารขจัดแคลเซียมที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการคงสภาพโครงสร้างของเนื้อเยื่อและองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลเพื่อการวิเคราะห์เพิ่มเติม แม้ว่า EDTA จะคงสภาพเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารขจัดแคลเซียมกลุ่มกรด แต่มีข้อจำกัดคือใช้เวลาขจัดแคลเซียมนาน และหากขจัดแคลเซียมไม่สมบูรณ์อาจส่งผลให้ตัดชิ้นเนื้อได้ยากและเกิด artifact ทางจุลพยาธิวิทยาได้

กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White (Miac:NZW) เป็นสัตว์ทดลองที่นิยมใช้ในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และพยาธิวิทยา เนื่องจากมีลักษณะทางสรีรวิทยาและโครงสร้างกระดูกใกล้เคียงกับมนุษย์ รายงานการเจริญเติบโตของกระดูกต้นขาพบว่า กระดูก femur มีการยืดความยาวอย่างรวดเร็วในช่วง 4-8 สัปดาห์แรก และมีการเพิ่มความหนาของ cortical bone รวมถึงการสะสมแร่ธาตุใน bone matrix อย่างต่อเนื่องจนเข้าสู่ระยะคงที่ (Kawebum *et al.*, 1994) จากการศึกษาปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เนื้อเยื่อกระดูกได้รับการขจัดแคลเซียมด้วยสารละลาย EDTA ตามขั้นตอนมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ โดยไม่ได้ใช้สารขจัดแคลเซียมชนิดอื่นมาก่อน เนื่องจาก EDTA เป็นสารขจัดแคลเซียมที่สามารถคงสภาพโครงสร้างเนื้อเยื่อและรายละเอียดทางจุลพยาธิวิทยาได้ดี อย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาดำเนินการนาน นอกจากนี้ ในการปฏิบัติงานประจำยังพบว่าลักษณะการฟุ้งของเนื้อเยื่อกระดูกบางตัวอย่างไม่สามารถตัดชิ้นเนื้อให้ได้ความหนา 4 ไมครอนตามมาตรฐานได้ อันเนื่องมาจากการขจัดแคลเซียมที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อ รอยขีดบนสไลด์ และคุณภาพของชิ้นเนื้อที่ลดลง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการประเมินลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจประยุกต์ใช้เทคนิคการขจัดแคลเซียมเฉพาะบริเวณผิวหน้าปลอกฟาราฟิน (surface decalcification) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทั้งนี้ จากการทบทวน

วรรณกรรมและประสบการณ์การปฏิบัติงานของผู้วิจัย พบว่ายังมีข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ผิวหน้าบล็อกลูกพาราฟินด้วยสารละลาย EDTA ค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะในกระดูกของกระต่ายสายพันธุ์ Mlac:NZW

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมของการแช่ผิวหน้าบล็อกลูกพาราฟินด้วยสารละลาย EDTA ต่อคุณภาพของชิ้นเนื้อกระดูกต้นขาหลังของกระต่ายสายพันธุ์ Mlac:NZW โดยใช้เทคนิค surface decalcification เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อกระดูกที่มีปัญหาในการตัดชิ้นเนื้อ ช่วยลดความเสียหายของชิ้นเนื้อและเพิ่มคุณภาพของสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา ตลอดจนสามารถนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาแนวทางปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาค้นคว้าต่อไปในอนาคต

Methodology

1. สัตว์ทดลองและกลุ่มทดลอง

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการภายใต้หลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs ได้แก่ การทดแทนการใช้สัตว์ทดลองเมื่อเป็นไปได้ (Replacement) การลดจำนวนสัตว์ทดลองให้เหลือน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น (Reduction) และการปรับปรุงวิธีการทดลองเพื่อลดความเจ็บปวดและส่งเสริมสวัสดิภาพสัตว์ (Refinement) ทั้งนี้ โครงการวิจัยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (NLAC-ACUC รหัสโครงการ RA2025-32) ภายใต้มาตรฐาน AAALAC International โดยการออกแบบการทดลองอ้างอิงจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง กลุ่มตัวอย่างคือบล็อกลูกพาราฟินจากกระดูกต้นขาหลังกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White (Mlac:NZW) ซึ่งได้มาจากซากสัตว์ทดลองที่ผ่านการตรวจสุขภาพประจำปีตามระบบของหน่วยงาน โดยมีอายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 24 ตัวอย่าง ขนาดตัวอย่างกำหนดตามความพร้อมของชิ้นเนื้อและหลักการ Reduction ภายใต้ 3Rs และบล็อกลูกพาราฟิน แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ไม่แช่สารละลาย EDTA (0 นาที) และกลุ่มทดลองที่แช่ผิวหน้าบล็อกลูกพาราฟินในสารละลาย EDTA เป็นเวลา 15 นาที 30 นาที และ 45 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีประกอบด้วย สารละลายร้อยละ 10 นิวทรัล บัฟเฟอร์ ฟอร์มาลีน (10% neutral buffered formalin; 10% NBF, 14% EDTA (Osteodec®, Bio-Optica, Italy), ethanol, xylene, paraffin wax, hematoxylin, eosin, bluing reagent, distilled water และ mounting media โดยสารเคมีทั้งหมดเป็น analytical grade

3. การเตรียมชิ้นเนื้อและการหล่อบล็อกลูกพาราฟิน

ชิ้นเนื้อกระดูกถูกตรึงสภาพใน 10% neutral buffered formalin (NBF) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใน 14% EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัดแต่งให้มีขนาดมาตรฐาน $10 \times 10 \times 3$ mm เพื่อลดความแปรปรวนของขนาดชิ้นเนื้อ ซึ่งอาจส่งผลต่อการแพร่ผ่านของสารแช่แข็งและคุณสมบัติของกระบวนการแช่แข็ง และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Tissue Processing) ซึ่งประกอบด้วย dehydration ด้วย ethanol gradient, clearing ด้วย xylene และ infiltration ด้วย paraffin wax แล้วนำชิ้นเนื้อกระดูกไปฝังในพาราฟินด้วยเครื่องหล่อบล็อกลูกพาราฟิน (Paraffin Embedding) เพื่อเตรียมสำหรับการตัดชิ้นเนื้อ เป็นแผ่นบางในขั้นตอนถัดไป

4. การจัดเคลือบเฉพาะผิวหน้าบล็อกพาราฟิน

บล็อกกระดูกที่ฝังพาราฟินแล้วจะถูกลงในสารละลาย EDTA 14% (pH 7.4) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เนื่องจากสามารถจัดเคลือบได้อย่างมีประสิทธิภาพ พร้อมทั้งช่วยคงสภาพโครงสร้างเนื้อเยื่อ รายละเอียดของเซลล์ และคุณภาพการติดสีทางจุลพยาธิวิทยาได้ดี แบ่งเป็น 4 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ไม่แช่สารละลาย EDTA (0 นาที) กลุ่มที่แช่สารละลาย EDTA เป็นเวลา 15 นาที 30 นาที และ 45 นาที ตามลำดับ หลังจากครบเวลาที่กำหนด ผิวหน้าบล็อกพาราฟินถูกล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้แห้งก่อนนำไปตัดสไลด์

5. ขั้นตอนการติดสไลด์และการย้อมสี

บล็อกพาราฟินถูกตัดเป็นแผ่นบางความหนา 4 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องมือไมโครทอม (microtome) จากนั้นนำสไลด์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปย้อมสีด้วยเทคนิค Hematoxylin and Eosin (H&E staining) โดยเริ่มจากการกำจัดพาราฟินด้วยไซลีน (xylene) และนำไปผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นลดหลั่นกันเพื่อคืนสภาพน้ำให้กับเนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมสีนิวเคลียสด้วย hematoxylin ล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลาย acid alcohol ความเข้มข้น 1% และทำการ bluing ด้วย lithium carbonate ต่อด้วยการย้อมไซโตพลาสซึมด้วย eosin หลังจากนั้นกำจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ และทำให้ใสด้วยไซลีน ก่อนปิดแผ่นสไลด์ด้วยสารปิดสไลด์ (mounting media)

6. การประเมินผล

ในการทดลองครั้งนี้สไลด์เนื้อเยื่อแต่ละแผ่นนำมาประเมินผลด้วยการกำหนดมาตรฐานและเกณฑ์ของ Sanjai *et al.* (2012) โดยตัดเกณฑ์การประเมินการหดตัวของเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue shrinkage) และการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (pulpal organization) ออก เนื่องจากไม่เหมาะสมต่อการประเมินเนื้อเยื่อกระดูกต้นขาหลังกระต่าย และแทนที่ด้วยการประเมินความสมบูรณ์ของโครงสร้างเนื้อเยื่อแข็งและเนื้อเยื่ออ่อน จากนั้นแบ่งการประเมินออกเป็น 2 ส่วน คือ (1) ความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อ (ease of sectioning) ให้คะแนนในช่วง 1-3 คะแนน และ (2) คุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อ (staining and structural quality) กำหนดคะแนนในช่วง 0-2 และ 0-1 คะแนน โดยพิจารณาคุณภาพการติดสีของเนื้อเยื่อแข็งและเนื้อเยื่ออ่อน การคงสภาพและการยึดติดของเนื้อเยื่ออ่อนกับสไลด์ ตลอดจนความสมบูรณ์ของโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแข็งและเนื้อเยื่ออ่อนภายหลังการย้อมสี H&E การประเมินคุณภาพสไลด์ดำเนินการแบบปกปิด (blinded assessment) โดยผู้ประเมินไม่ทราบข้อมูลกลุ่มทดลองและระยะเวลาการจัดเคลือบของตัวอย่าง เพื่อลดอคติในการประเมิน จากนั้นนำคะแนนทั้งสองส่วนมารวมเป็นคะแนนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยรายละเอียดแสดงใน Table 1

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ใช้สถิติเชิงพรรณนามาอธิบายข้อมูลที่ได้จากการประเมินความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อ คุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อถาวรของชิ้นเนื้อกระดูก และคะแนนรวมทั้ง 2 ส่วน โดยนำเสนอในรูปแบบของ Median (Interquartile range; IQR) ของคะแนนการประเมินเพื่ออธิบายแนวโน้มของข้อมูลของแต่ละกลุ่มการทดลอง การวิเคราะห์ทางสถิติจะกระทำโดยใช้สถิติแบบ Nonparametric ชนิด Kruskal-Wallis test เพื่อเปรียบเทียบคะแนนรวมคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อถาวร ทั้ง 4 กลุ่มการทดสอบ และชนิด Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบหาคู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผ่านโปรแกรม PASW Statistics (version 18) สำหรับทุกการทดสอบค่า $P\text{-value} \leq 0.05$ จะถือว่าข้อมูลคู่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 1 Histological Quality Score (H-score) Criteria for Decalcified Bone Tissue Samples

(Modified from Sanjai *et al.*, 2012)

Parameters	Score	Criteria
Part I		
1. Ease of sectioning	1	Cannot section.
	2	Section complete with gritting sound when sectioning.
	3	Section complete without gritting sound when sectioning.
Part II		
1. Staining of hard tissue	0	No staining.
	1	< 50 % of tissue is stained.
	2	> 50% of tissue is stained.
2. Staining of soft tissue associated with the hard tissue staining	0	No staining.
	1	< 50 % of tissue is stained.
	2	> 50% of tissue is 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 detached 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

Results

ส่วนที่ 1 การประเมินความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อ (Ease of sectioning)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่า H-score ของชิ้นเนื้อกระดูกภายหลังการขจัดแคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วยสาร EDTA มีค่าที่แตกต่างกันตามระยะเวลาในการแช่สาร โดยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการแช่สาร EDTA มีค่า Median (IQR) ของ H-score เท่ากับ 1 (IQR 1.0-1.8) เมื่อทำการขจัดแคลเซียมด้วยสาร EDTA เป็นเวลา 15 นาที พบว่ามีค่า Median (IQR) ของ H-score เท่ากับ 2.5 (IQR 2.0-3.0) ขณะที่กลุ่มที่แช่สาร EDTA เป็นเวลา 30 นาที มีค่า Median (IQR) ของ H-score เท่ากับ 3 (IQR 3.0-3.0) สำหรับกลุ่มที่ได้รับการขจัดแคลเซียมด้วยสาร EDTA เป็นเวลา 45 นาที พบว่ามีค่า Median (IQR) ของ H-score เท่ากับ 3 (IQR 3.0-3.0) ข้อมูลแสดงดัง Table 2

Table 2 The median (Interquartile range; IQR) of Histological quality score (H-score; part I) of bone tissue sections with/without surface decalcification with EDTA (N = 24)

Groups (animals per group)	Ease of sectioning
Surface EDTA 0 min (6)	1 (IQR 1.0-1.8)
Surface EDTA 15 min (6)	2.5 (IQR 2.0-3.0)
Surface EDTA 30 min (6)	3 (IQR 3.0-3.0)
Surface EDTA 45 min (6)	3 (IQR 3.0-3.0)

ส่วนที่ 2 การประเมินคุณภาพของสไลด์ (Staining and structure quality)

จากการประเมินคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อกระดูกของชิ้นเนื้อกระดูกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ากลุ่มการทดลองที่มีคะแนนโดยภาพรวมของทุกปัจจัยการประเมินดีที่สุดคือกลุ่มที่ขจัดแคลเซียมเฉพาะหน้าบลิ๊อคด้วย EDTA เป็นเวลา 30 นาที (Figure 1C) โดยพบว่าค่า Median (IQR) ของคะแนนการย้อมติดสีเนื้อเยื่อแข็งหรือกระดูกเท่ากับ 2 (IQR 2.0-2.0) ซึ่งมีคะแนนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ใช้เวลา 15 นาที (Figure 1B) และกลุ่มที่ไม่ใช้ EDTA ขจัดแคลเซียมที่หน้าบลิ๊อค (Figure 1A) แสดงให้เห็นถึงการย้อมติดสีของเนื้อเยื่อกระดูกที่ชัดเจน สามารถเห็นขอบเขตของเซลล์กระดูกชนิด Osteocytes เนื้อกระดูก (Bone matrix) และส่วนของ Haversian canals (ท่อที่มีลักษณะตามยาว) อย่างไรก็ตามพบว่ามีความสูงค่ากว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาที ซึ่งมีค่า Median (IQR) เท่ากับ 1.5 (IQR 1.0-2.0) (Figure 1D) ในด้านการย้อมติดสีเนื้อเยื่ออ่อนหรือส่วนของไขกระดูก (Bone marrow) พบว่าค่า Median (IQR) ของกลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที เท่ากับ 2 (IQR 2.0-2.0) (Figure 2C) ซึ่งมีคะแนนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ใช้ EDTA (Figure 2A) และกลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาที (Figure 2D) แสดงให้เห็นถึงการย้อมติดสีกลุ่มเซลล์อ่อนของเม็ดเลือด (Hematopoietic cells) และเซลล์เมกะคาริโอไซต์ (Megakaryocytes) ที่ชัดเจนซึ่งมีคะแนนสูงค่ากว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 15 นาทีเล็กน้อยโดยมีค่า Median (IQR) เท่ากับ 2 (IQR 1.2-2.0) ในส่วนของคะแนนการเกาะติดระหว่างเนื้อเยื่อกระดูกและไขกระดูกในสไลด์เนื้อเยื่อกระดูกไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนในทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง โดยพบว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ EDTA กลุ่มที่ใช้เวลา 15 นาที กลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที และกลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาทีที่มีค่า Median (IQR) เท่ากับ 0, 0 (IQR 0-0.80), 0 (IQR 0-0.80) และ 0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าคุณภาพการติดกันระหว่างเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนของกระดูกยังทำได้ไม่ดีนัก ลำดับถัดไปในส่วนคะแนนการรักษาโครงสร้างเนื้อเยื่อกระดูกไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนในทั้ง 4 กลุ่มการทดลองเช่นเดียวกัน โดยพบว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ EDTA กลุ่มที่ใช้เวลา 15 นาที กลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที และกลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาทีที่มีค่า Median (IQR) เท่ากับ 0, 0, 0 (IQR 0-0.80) และ 0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายังคงพบการบิดเบี้ยวหรือการทำลายโครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกอยู่บ้างในบางพื้นที่ของสไลด์เนื้อเยื่อกระดูก ส่วนสุดท้ายคือคะแนนการรักษาโครงสร้างเนื้อเยื่อไขกระดูกโดยพบว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 15 นาที 30 นาที และ 45 นาที ไม่มีความแตกต่างของคะแนนในส่วนนี้ซึ่งมีค่า Median (IQR) เท่ากับ 1 (IQR 1-1) อย่างไรก็ตามพบว่ามีความสูงค่ากว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ EDTA ซึ่งมีค่า Median (IQR) เท่ากับ 0.5 (IQR 0-1) ข้อมูลแสดงดัง Table 3

Table 3 The median (Interquartile range; IQR) of Histological quality score (H-score; part II) of bone tissue sections with/without surface decalcification with EDTA (N = 24)

Groups(animals per group)	Staining		Attachment (0-2)	Structure	
	Hard tissue	Soft tissue		Hard tissue	Soft tissue
	(0-2)	(0-2)		(0-1)	(0-1)
Surface EDTA 0 min (6)	2 (IQR 2.0-2.0)	2 (IQR 2.0-2.0)	0	0	0.5 (IQR 0-1)
Surface EDTA 15 min (6)	2 (IQR 2.0-2.0)	2 (IQR 1.2-2.0)	0 (IQR 0-0.8)	0	1 (IQR 1-1)
Surface EDTA 30 min (6)	2 (IQR 2.0-2.0)	2 (IQR 2.0-2.0)	0 (IQR 0-0.8)	0 (IQR 0-0.8)	1 (IQR 1-1)
Surface EDTA 45 min (6)	1.5 (IQR 1.0-2.0)	2 (IQR 2.0-2.0)	0	0	1 (IQR 1-1)

คะแนนรวมคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อกระดูก

จากการนำผลการประเมินคะแนนทั้ง 2 ส่วน (คะแนนการตัดสไลด์เนื้อเยื่อกระดูกและคะแนนคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อกระดูก) พบว่าค่า Median (IQR) ของกลุ่มทดลองที่ไม่ใช้ EDTA จัดแคลเซียมที่หน้าบล็อกเท่ากับ 5.5 (IQR 5.0-6.8) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Median (IQR) ของกลุ่มที่ใช้ EDTA จัดแคลเซียมที่หน้าบล็อกเป็นเวลา 15 นาที เป็นเวลา 30 นาที และเป็นเวลา 45 นาที ที่มีค่าเท่ากับ 7.5 (IQR 7.0-8.0), 8 (IQR 8.0-8.8) และ 7 (7.0-7.8) ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ากลุ่มการทดลองที่มีค่า Median (IQR) ของคะแนนการประเมินสูงที่สุดคือกลุ่มทดลองที่ใช้ EDTA จัดแคลเซียมที่หน้าบล็อกเป็นเวลา 30 นาที โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่ใช้เวลาจัดแคลเซียมที่หน้าบล็อกเป็นเวลา 45 นาที อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ของค่า Median (IQR) ของคะแนนการประเมินระหว่างกลุ่มการทดลองที่ใช้ EDTA จัดแคลเซียมที่หน้าบล็อกเป็นเวลา 15 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับคะแนนรวมของกลุ่มทดลองที่ใช้เวลา 30 นาที และ 45 นาที ข้อมูลแสดงดัง Table 4 และ Figure 3

Table 4 The median (Interquartile range; IQR) of Histological quality score (H-score; part I and II) of bone tissue sections with/without surface decalcification with EDTA (N = 24)

H-score (Total score = 11)	Groups (animals per group)			
	Surface EDTA	Surface EDTA	Surface EDTA	Surface EDTA
	0 min (6)	15 min (6)	30 min (6)	45 min (6)
Overall H-score	5.5 (IQR 5.0-6.8) ^a	7.5 (IQR 7.0-8.0) ^{be}	8 (IQR 8.0-8.8) ^{bc}	7 (7.0-7.8) ^{ed}

^{a-e} Superscription within a row indicates the result of pairwise comparison. If there is a common letter, it shows no statistically significant difference ($P < 0.05$).

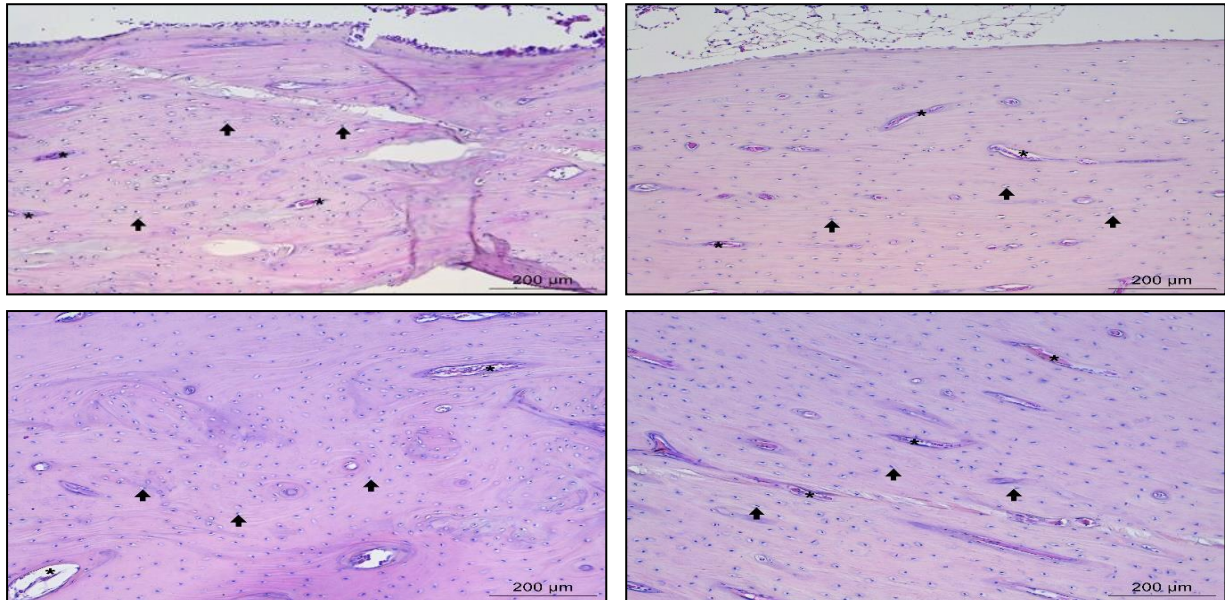


Figure 1 Representative histological images of longitudinal sectioned-rabbit femoral bone. (A) Control without EDTA surface decalcification revealing partially distorted structure of bone tissue; (B) EDTA for 15 min; (C) EDTA for 30 min; (D) EDTA for 45 min. Black arrows indicate osteocytes and asterisks (*) indicate Haversian canals (H&E stain, $\times 10$)

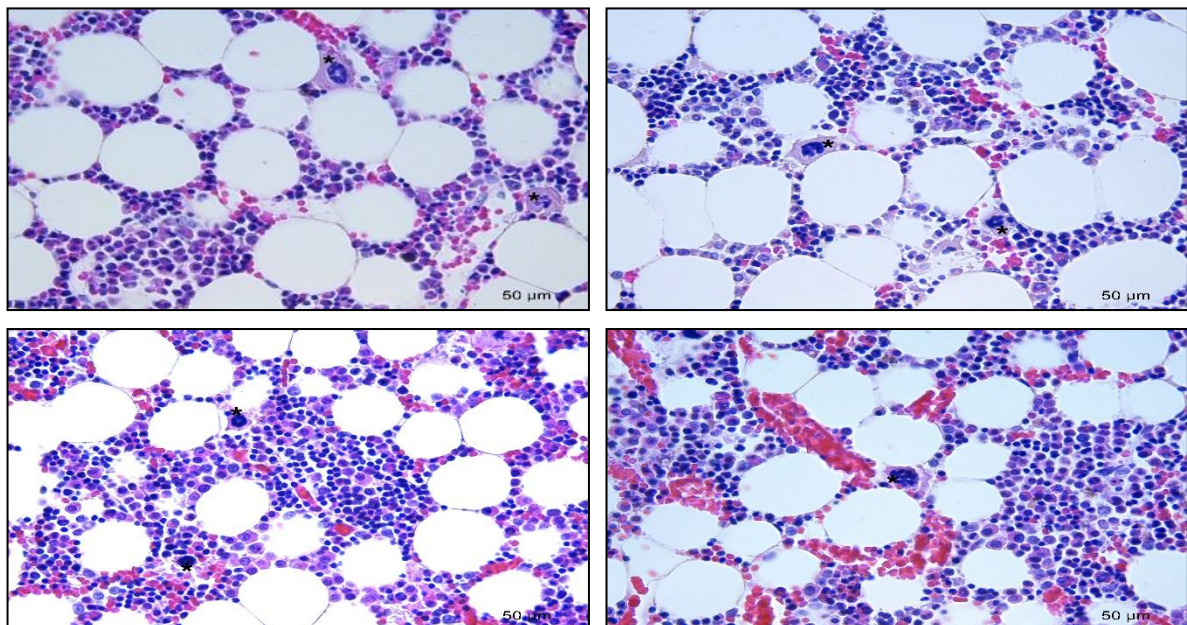


Figure 2 Representative histological images of rabbit femoral bone marrow. (A) Control without EDTA surface decalcification; (B) EDTA for 15 min; (C) EDTA for 30 min; (D) EDTA for 45 min. Asterisks (*) indicate megakaryocytes (H&E stain, $\times 40$)

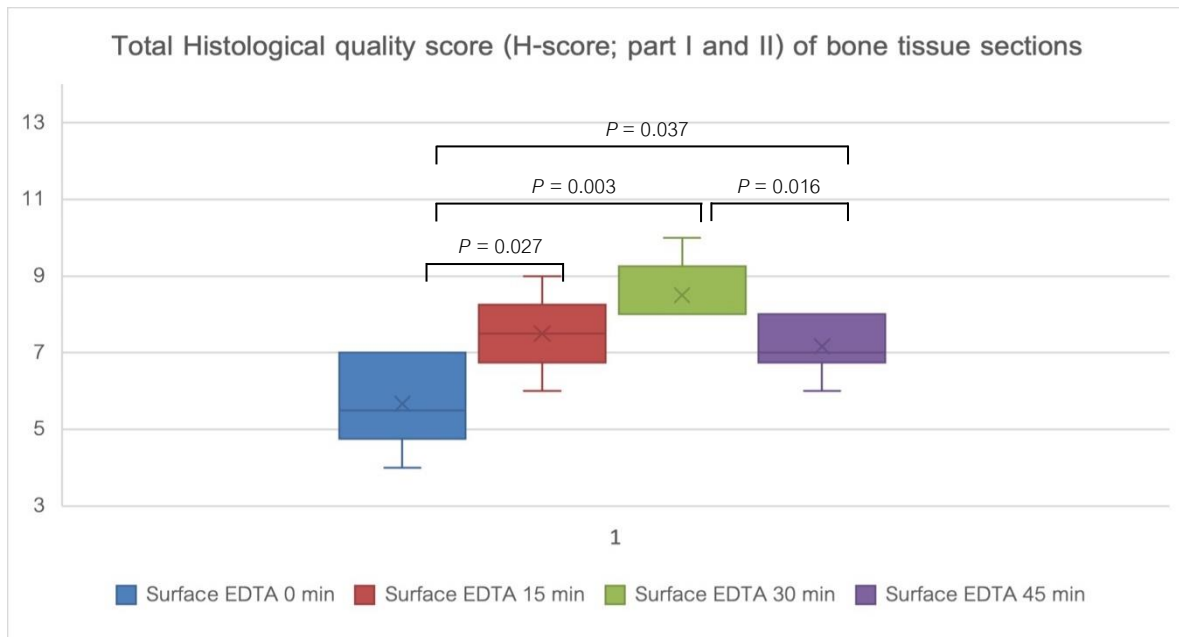


Figure 3 Boxplot of Histological quality score (H-score; part I and II) of bone tissue section with significant bar and P value

Discussion

ระยะเวลาของการขจัดแคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วยสาร EDTA เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อกระดูกด้วยไมโครทอม โดยผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มระยะเวลาในการแช่ EDTA ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตัดชิ้นเนื้อ สะท้อนให้เห็นว่าการลดปริมาณแคลเซียมบริเวณผิวหน้าบล็อกสามารถลดความแข็งของเนื้อเยื่อและแรงต้านต่อใบมีดไมโครทอมได้ ส่งผลให้เกิดปัญหา เช่น การฉีกขาดของชิ้นเนื้อ การเกิด chatter และความไม่สม่ำเสมอของ ribbon ลดลง ผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากกลไกการออกฤทธิ์ของ EDTA ซึ่งเป็นสารขจัดแคลเซียมประเภท chelating agent ที่จับกับแคลเซียมไอออนและค่อย ๆ กำจัดแร่ธาตุออกจากเนื้อเยื่อโดยไม่ทำลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง แตกต่างจากการขจัดแคลเซียมประเภทกรดที่แม้จะทำงานได้รวดเร็วกว่า แต่มีโอกาสส่งผลกระทบต่อรายละเอียดทางจุลพยาธิวิทยาและคุณภาพการย้อมสีมากกว่า ดังนั้น เมื่อปริมาณแคลเซียมบริเวณผิวหน้าบล็อกลดลงอย่างเพียงพอ ความสามารถในการตัดชิ้นเนื้อจึงดีขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Suvana et al. (2013) ที่ระบุว่า การขจัดแคลเซียมอย่างเพียงพอเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากแร่ธาตุที่ตกค้างภายในชิ้นเนื้อสามารถเพิ่มแรงต้านต่อใบมีดไมโครทอม ส่งผลให้เกิดความยากลำบากในการตัดชิ้นเนื้อและนำไปสู่การเกิด artifacts ต่าง ๆ เช่น การฉีกขาดของเนื้อเยื่อ รอยสัน (chatter) และรอยใบมีด (knife marks) ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มที่ได้รับการขจัดแคลเซียมที่ผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วย EDTA เป็นเวลา 30 นาที ให้คุณภาพการตัดชิ้นเนื้อและความสมบูรณ์ของโครงสร้างเนื้อเยื่อดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการขจัดแคลเซียม สะท้อนให้เห็นว่าการลดปริมาณแร่ธาตุที่ตกค้างบริเวณผิวหน้าบล็อกสามารถช่วยลดปัญหาทางเทคนิคระหว่างการตัดสไลด์และเพิ่มคุณภาพของชิ้นเนื้อสำหรับการประเมินทางจุลพยาธิวิทยาได้ นอกจากนี้ มีรายงานว่า EDTA สามารถคงสภาพโครงสร้างทางจุลพยาธิวิทยา ความสมบูรณ์ของแอนติเจน รวมถึง DNA และ RNA ได้ดีกว่าสารขจัดแคลเซียมชนิดกรด เนื่องจากออกฤทธิ์โดยการจับกับ

แคลเซียมไอออน (chelation) โดยไม่ทำลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้คุณภาพของเนื้อเยื่อสำหรับการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลยังคงได้รับการรักษาไว้ (Li *et al.*, 2024)

จุดที่น่าสนใจของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ แม้ว่าการเพิ่มระยะเวลาในการแช่ EDTA จะช่วยเพิ่มความง่ายในการตัดชิ้นเนื้ออย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับคุณภาพสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าการแช่ EDTA เป็นเวลา 30 นาทีให้ผลโดยรวมดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการแช่แคลเซียมที่เหมาะสมอาจมีความสำคัญมากกว่าการแช่แคลเซียมให้มากที่สุด เนื่องจากเป้าหมายของการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อกระดูกไม่ได้จำกัดอยู่เพียงการตัดชิ้นเนื้อให้ได้ง่ายเท่านั้น แต่ยังต้องคงคุณภาพของการย้อมสีและโครงสร้างทางจุลพยาธิวิทยาไว้ให้มากที่สุดด้วย

อย่างไรก็ตาม พบว่าคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อถาวรทั้งในส่วนของการติดสีของเนื้อเยื่อ แข็งและอ่อน การยึดติดระหว่างเนื้อเยื่อ และโครงสร้างของเนื้อเยื่อแข็งและอ่อนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างแต่ละกลุ่มทดลองเนื่องจาก EDTA เป็นสารที่ใช้แช่แคลเซียมที่มีความปลอดภัยต่อตัวอย่างสูง และไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ (Sterchi, 2019) จึงไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจน ในขณะที่การใช้สารกลุ่มที่เป็นกรด (Acid decalcifiers) อาจมีความเสี่ยงในการเกิด Overdecalcification และส่งผลกระทบต่อโครงสร้างเนื้อเยื่อและคุณภาพการย้อมสีของสไลด์เนื้อเยื่อถาวร (Skinner, 2003) ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาค่า H-score part II พบว่าคะแนนทุกหัวข้อการประเมินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือสไลด์มีคุณภาพดีขึ้น เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ 0 จนถึง 30 นาที แต่เมื่อใช้แช่หน้าบล็อกกับ EDTA เป็นเวลา 45 นาที พบว่าคะแนนคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวรในทุกหัวข้อการประเมินมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที

เมื่อพิจารณาคะแนนรวม (Overall H-score) พบว่ากลุ่มที่ใช้แช่แคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกด้วย EDTA เป็นเวลา 30 นาที มีคะแนนสูงกว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาทีและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลา 30 นาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถสร้างสมดุลระหว่างความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อและคุณภาพของสไลด์ได้ดี แม้ว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 45 นาทีจะให้ความง่ายในการตัดสูงที่สุด แต่คะแนนคุณภาพสไลด์โดยรวมกลับลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการแช่แคลเซียมที่นานเกินความจำเป็น ส่งผลต่อความเข้มและคุณภาพของการย้อมสีเนื้อเยื่อกระดูก ดังนั้น ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงสอดคล้องกับคำแนะนำของ Sterchi (2019) ที่เสนอว่าการแช่แคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกด้วย EDTA ควรใช้เวลาประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้ได้คุณภาพสไลด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษานี้ยังมุ่งเน้นการแช่แคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกพาราฟินของตัวอย่างกระดูกต้นขาหลัง (Femur) ในกระต่ายเท่านั้น การศึกษาวิธีการแช่ในกระดูกส่วนอื่นที่มีความหนาแน่นของแคลเซียมแตกต่างกัน จากสัตว์ที่ต่างอายุกัน รวมถึงการเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แคลเซียมในรูปแบบอื่น เช่น สารละลาย 1% hydrochloric acid ใน 70% ethanol สารละลาย 10% formic acid หรือสารละลายสำเร็จรูปอื่น ๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (Proprietary decalcifiers) (Kang *et al.*, 2003; Sterchi, 2019) จะสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการแช่แคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกได้ครอบคลุมและจำเพาะยิ่งขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาต่อไปในอนาคตควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง รวมไปถึงการขยายช่วงเวลาในการแช่สาร EDTA พัฒนาเกณฑ์การประเมินความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อให้มีความละเอียดมากยิ่งขึ้น และเลือกใช้การประเมินแบบปกปิด (Blind assessment) เพื่อลดอคติที่อาจเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนประเมิน

Conclusions

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การแช่แคลเซียมเฉพาะผิวหน้าบล็อกพาราฟินของกระดูกต้นขาหลังกระต่ายด้วยสาร EDTA สามารถลดความแข็งของบล็อกและเพิ่มความง่ายในการตัดสไลด์ โดยไม่กระทบต่อโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

กระดูก เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการแช่ พบว่าการแช่ EDTA เป็นเวลา 30 นาทีมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้สมดุลที่ดีระหว่างความง่ายในการตัดชิ้นเนื้อและคุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวร ส่งผลให้สไลด์มีลักษณะเรียบ การย้อมสีคมชัด และคงสภาพโครงสร้างเนื้อเยื่อได้ดี ขณะที่การแช่เป็นเวลา 45 นาทีมีแนวโน้มทำให้คุณภาพของสไลด์เนื้อเยื่อถาวรแย่กว่ากลุ่มที่แช่ EDTA เป็นเวลา 15 นาที ดังนั้น การแช่ผิวหน้าบล็อกพาราฟินด้วยสาร EDTA เป็นเวลา 30 นาที สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นขั้นตอนเสริมในการเตรียมชิ้นเนื้อกระดูกที่ตัดยาก เพื่อปรับปรุงคุณภาพสไลด์สำหรับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Acknowledgements

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์และการสนับสนุนจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ นายเอกรินทร์ กลิ่นคำหอม รองผู้อำนวยการฝ่ายควบคุมคุณภาพ และนายปัญญา จริยะพงศ์พันธุ์ เจ้าหน้าที่วิจัย (ผู้ชำนาญการพิเศษ) ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี ท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอระลึกถึงคุณประโยชน์และความเสียสละของสัตว์ทดลองทุกชนิด ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

References

- Alers, J. C., Krijtenburg, P.-J., Vissers, K. J., & van Dekken, H. (1999). Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization: EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(5), 703–709. <https://doi.org/10.1177/002215549904700512>
- Bogoevski, K., Woloszyk, A., Blackwood, K., Woodruff, M. A., & Glatt, V. (2019). Tissue morphology and antigenicity in mouse and rat tibia: Comparing 12 different decalcification conditions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 67(8), 545–561. <https://doi.org/10.1369/0022155419850099>
- Bumalee, D., & Meesakul, O. (2017). The comparative study of the effectiveness of decalcifying agents on human jaws. *Mahidol Dental Journal*, 37(3), 327–338. (in Thai)
- Choube, A., Astekar, M., Choube, A., Sapra, G., Agarwal, A., & Rana, A. (2018). Comparison of decalcifying agents and techniques for human dental tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 93(2), 99–108.
- Chow, D. H., Zheng, L., Tian, L., Ho, K.-S., Qin, L., & Guo, X. (2019). Application of ultrasound accelerates the decalcification process of bone matrix without affecting histological and immunohistochemical analysis. *Journal of Orthopaedic Translation*, 17, 112–120.

- Kang, Q. K., LaBreck, J. C., Gruber, H. E., & An, Y. H. (2003). *Histological techniques for decalcified bone and cartilage*. Handbook of histology methods for bone and cartilage.
https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7_13
- Kaweblum, M., Aguilar, M. C., Blancas, E., Kaweblum, J., Lehman, W. B., Grant, A. D., & Strongwater, A. M. (1994). Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the New Zealand white rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*, 12(5), 747–749. <https://doi.org/10.1002/jor.1100120519>
- Li, Z., Wenhart, C., Reimann, A., Cho, Y.-L., Adler, K., & Muench, G. (2024). Hypertonic saline-and detergent-accelerated EDTA-based decalcification better preserves mRNA of bones. *Scientific Reports*, 14(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61459-8>
- Sanjai, K., Kumarswamy, J., Patil, A., Papaiah, L., Jayaram, S., & Krishnan, L. (2012). Evaluation and comparison of decalcification agents on human teeth. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(2), 222–227. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99070>
- Skinner, R. A. (2003). *Decalcification of bone tissue*. Handbook of histology methods for bone and cartilage.
https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7_10
- Sterchi, D. L. (2019). *Bone*. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, Edition 8.
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2013). *Paraffin section cutting*. Bancroft's theory and practice of histological techniques, Edition 7.
- Walsh, L., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (1993). The effect of tissue decalcification on mRNA retention within bone for in situ hybridization studies. *International Journal of Experimental Pathology*, 74(3), 237–241.