

## บทที่ 4

### การดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ

#### เค้าโครงเรื่อง

- 4.1 การเลือกสารเคมีเพื่อการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ
  - 4.1.1 สารเคมีที่เป็นกรด
    - 4.1.1.1 กรดไนตริก
    - 4.1.1.2 กรดไฮโดรคลอริก
    - 4.1.1.3 กรดฟอร์มิก
    - 4.1.1.4 กรดไตรคลอแอสติก
    - 4.1.1.5 กรดซัลฟิวรัส
    - 4.1.1.6 กรดคาร์บอนิก (ฟีนอล)
  - 4.1.2 ไอออน-เอกซ์เชนจ์เรซิน
  - 4.1.3 อีเล็กโทรโฟเรซิส
  - 4.1.4 คีเลทิงเอเจนท์
- 4.2 การดึงแคลเซียมออกพร้อมกับการทำให้คงสภาพ
  - 4.2.1 ลิลลี่'ส ฟลูอิด
  - 4.2.2 แมกนามารา เอท อัล ฟลูอิด
  - 4.2.3 เพเรนยี'ส ฟลูอิด
  - 4.2.4 ชมิดท์'ส ฟลูอิด
- 4.3 การดึงแคลเซียมออกพร้อมกับการดึงน้ำออก
  - 4.3.1 เจนกิน'ส ฟลูอิด
- 4.4 การตรวจสอบผลของการดึงแคลเซียมออก
  - 4.4.1 การตรวจสอบทางฟิสิกส์
  - 4.4.2 การตรวจสอบทางเคมี
  - 4.4.3 การตรวจสอบด้วยรังสีเอกซ์
- 4.5 ผลกระทบของความร้อนต่อการดึงแคลเซียมออก
- 4.6 ข้อพึงระวังสำหรับการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ

### สาระสำคัญ

1. การเลือกสารเคมีเพื่อดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่าง เพื่อเป็นการไม่ขัดขวางระเบียบวิธีขั้นถัดไปเป็นสิ่งจำเป็น สารละลายกรดของธาตุเช่น กรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริกเป็นที่นิยมใช้สำหรับงานประจำ อาจเลือกใช้สารอื่นที่ได้ผลดี เช่น คีเลทิงเอเจนท์ก็ได้
2. สารเคมีที่เลือกใช้ดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่ออาจมีคุณสมบัติอื่นพร้อมกันไปด้วย เช่น เพเรนยี'ส ฟลูอิดช่วยทำให้คงสภาพด้วย เจนกิน'ส ฟลูอิดช่วยดิงน้ำออกได้ด้วย
3. การตรวจสอบความสมบูรณ์ของการดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อมีหลายวิธี วิธีที่ดีที่สุดคือการใช้รังสีเอกซ์ แต่ค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงนิยมใช้วิธีเคมีเพราะสะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายต่ำ

### วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่าสารเคมีชนิดใดบ้างเหมาะสำหรับการดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ
2. นักศึกษาสามารถทำการเตรียมสารที่ใช้เพื่อการดิงแคลเซียมออกได้
3. นักศึกษาสามารถทำการดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่กำหนดให้ทำในกิจกรรมของบทนี้ได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ภายในหนึ่งสัปดาห์

เนื้อเยื่อจากอวัยวะหลายอวัยวะมีส่วนประกอบของกระดูกอ่อนและกระดูกช่วยเสริมโครงสร้าง เมื่อนำมาทำให้คงสภาพเสร็จแล้วมีปัญหาในระเบียบวิธีขั้นต่อไป โดยเฉพาะขั้นตอนการฝังในพาราฟินและการเจียนเป็นแผ่นบาง เนื่องจากแคลเซียมเป็นสารที่ทำให้มีดึบและท้อได้ง่ายและยังทำให้แผ่นบางฉีกขาดไม่สม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ (decalcification) ให้หมด ซึ่งหมายถึงการไอออไนเซชันแคลเซียมให้หลุดออกจากการเป็นสารประกอบ

#### 4.1 การเลือกสารเคมีเพื่อการดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ

สารเคมีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการสำหรับงานประจำเพื่อการดิงแคลเซียมออกมี

หลายชนิด และการดิงแคลเซียมออกก็ทำได้หลายวิธีเช่น ใช้สารละลายที่เป็นกรด สารละลายกรดผสมกับสารอื่น ไอออน-เอ็กซ์เชนจ์เรซิน (ionexchange resin) อีเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) และคีเลติงเอเจนต์ (chelating agent)

สารละลายกรดของแร่ธาตุเป็นที่นิยมใช้สำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติการ สารละลายที่เหมาะสมสำหรับการดิงแคลเซียมออกควรมีคุณสมบัติดังนี้

- ก. สามารถดิงแคลเซียมออกได้หมด
- ข. ไม่มีผลกระทบที่จะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเสียหาย
- ค. ไม่มีผลกระทบต่อระเบียบวิธีของขั้นตอนต่อไปเช่น การย้อมสี โดยเฉพาะสี

ของนิวเคลียส

#### 4.1.1 สารเคมีที่เป็นกรด

สารเคมีที่เป็นกรด (acid reagent) มีหลายชนิด เลือกใช้ตามความเหมาะสม ดังนี้

4.1.1.1 กรดไนตริก (nitric acid) ใช้เป็นสารดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อได้รวดเร็ว แต่ทำลายเนื้อเยื่อมากโดยเฉพาะถ้าใช้ที่ความเข้มข้นสูง แต่สามารถลดความเสียหายได้ ถ้าใช้ร่วมกับแอลกอฮอล์ ซึ่งจะช่วยให้การย้อมสีนิวเคลียสติดดีขึ้น ปกติจะใช้ที่ความเข้มข้น 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหรือของสารละลายอื่น

ข้อพึงระวังสำหรับการใช้กรดไนตริกคือ ต้องเลือกใช้จากแหล่งที่มีความบริสุทธิ์สูง และทำให้เสถียรด้วย ยูเรีย 1-2 กรัม/2000 มิลลิลิตร เมื่อกรดเริ่มเปลี่ยนสี (คือเป็นสีเหลือง) แสดงว่าการดิงแคลเซียมออกเริ่มเกิดขึ้นแล้ว

4.1.1.2 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) โดยทั่วไปดิงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อไม่เร็วเท่ากรดไนตริก และยังคงมีการทำลายเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับกรดไนตริก แต่ช่วยให้การย้อมสีติดได้ดีและไม่จำเป็นต้องล้างกรดออกจากเนื้อเยื่อก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการดิงน้ำออก ปกติใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ และเหมาะสำหรับการดิงแคลเซียมออกจากผิวหนังก่อนเหลื่อมของเนื้อเยื่อ

อย่างไรก็ตาม มอริสและเบนตัน<sup>1</sup> (Morris and Benton 1956) รายงานว่า

- 
1. Morris, Russel E., and Benton, Robert S. "Studies on demineralization of bone II. Evaluation of morphology and staining characteristics of tissues after demineralization" American Journal of Clinical Pathology, 26 (1956), 882-898.

ถ้าใช้ กรดไฮโดรคลอริก 1-2 โมลาร์ สามารถดึงแคลเซียมออกได้เร็วที่สุด (ประมาณ 3 ชั่วโมง) และยังช่วยให้การย้อมสีติดดีด้วย ถ้านำสไลด์ไปแช่ในสารช่วยสีติด 5 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมคลอไรด์ในน้ำ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการย้อมสี

4.1.1.3 กรดฟอร์มิก (formic acid) ให้ปฏิกิริยาปานกลางและมีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อน้อยกว่ากรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริก ถ้าใช้กรดฟอร์มิกจะช่วยให้การย้อมสีนิวเคลียสให้ติดสีดีขึ้นกว่ากรดสองชนิดแรก แต่ไม่แนะนำสำหรับงานที่ต้องการความแรงด่วน เพราะต้องนำมาทำให้เป็นกลาง และต้องล้างก่อนเนื้อเยื่อให้หมดกรดก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออก

4.1.1.4 กรดไตรคลออะซีติก (trichloacetic acid) มีคุณสมบัติในการดึงแคลเซียมออกค่อนข้างต่ำ และเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูงเมื่อเทียบกับกรดฟอร์มิก จึงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณมากและไม่ควรใช้ในงานเร่งด่วน

4.1.1.5 กรดซัลฟิวรัส (sulfurous acid) เป็นกรดอ่อนมาก ใช้ในกรณีที่ต้องการดึงเส้นสไปคูล (spicule) เล็ก ๆ ของกระดูกออก

4.1.1.6 กรดคาร์บอลิกหรือฟีนอล (carbolic acid or phenol) ไม่ใช้เป็นสารดึงแคลเซียมออกที่แท้จริง แต่นำมารวมไว้เพราะมีคุณสมบัติในการทำให้เนื้อเยื่อแข็งจนเกินไป (เช่น ผนังของมดลูก) อ่อนตัวลง หลังจากทำให้คงสภาพ นำเนื้อเยื่อมาล้างให้สะอาดแล้วแช่ในสารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์ฟีนอลในน้ำประมาณ 1-3 วัน จะช่วยให้เนื้อเยื่ออ่อนตัวลงจนสามารถเข้าสู่ขั้นตอนการเจียนได้ง่ายขึ้น และยังไม่มียผลกระทบต่อการย้อมสีแต่อย่างใด

#### 4.1.2 ไอออน-เอ็กซ์เชนจ์ เรซิน

ไอออน-เอ็กซ์เชนจ์ เรซิน (iron-exchange resin) เป็นเรซินที่ใช้เพื่อเคลื่อนย้ายแคลเซียมไอออนออกไปจากสารละลายดึงแคลเซียมออก จึงเป็นการช่วยเร่งปฏิกิริยาของการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ การใช้ต้องไม่ใช้ร่วมกับสารละลายที่มีกรดของแร่ธาตุ แต่จะใช้ได้ผลดีกับกรดอินทรีย์เช่น กรดฟอร์มิก การทดสอบผลควรใช้วิธีทางฟิสิกส์หรือรังสีเอกซ์ เพราะไม่สามารถใช้วิธีทางเคมีได้

#### 4.1.3 อีเล็กโทรโฟเรซิส

ในทางทฤษฎีการดึงแคลเซียมออกโดยวิธีอีเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) มีหลักการที่ต้องดึงแคลเซียมไอออนไปยังขั้วไฟฟ้าลบ ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายแคลเซียมไอออนออกไปจากสารละลายอีเล็กโทรไลต์ ทำนองเดียวกับการทำงานของไอออน-เอ็กซ์เชนจ์ เรซิน

ระยะเวลาการตั้งแคลเซียมออกจะสั้นกว่าวิธีอื่น อาจเนื่องมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากการผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในสารละลายมากกว่าจะเป็นผลเนื่องมาจากปฏิกิริยาของอิเล็กโทรไลต์ ถึงแม้ว่าเป็นการช่วยให้อิเล็กโทรไลต์ปราศจากแคลเซียมไอออน แต่ถ้าอิเล็กโทรไลต์อยู่ในสภาวะเยือกปฏิกิริยาจะช้าลง แต่เมื่อนำเนื้อเยื่อไปย้อมสีกลับติดสีดีขึ้น

อย่างไรก็ตามวิธีอิเล็กโทรฟอเรซิสไม่นิยมใช้ประจำในห้องปฏิบัติการ

#### 4.1.4 คีเลทิงเอเจนท์

คีเลทิงเอเจนท์ (chelating agent) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพันธะกับโลหะบางอย่าง เช่น แคลเซียมและเหล็ก สารที่ใช้เพื่อการตั้งแคลเซียมออกมีหลายชนิด เช่น เวอร์ซีน<sup>1</sup> (versine) หรือ ซีควอสทริน<sup>2</sup> (sequestrene) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตทางการค้าเพื่อใช้ทำน้ำกระด้างให้เป็นน้ำอ่อน เมื่อนำมาใช้ในการตั้งแคลเซียมออก จะดึงเกลือชนิดอื่นออกมาด้วย เช่น เหล็กและแมกนีเซียม โดยทั่วไปรู้จักในนามของชื่อย่อว่า EDTA<sup>3</sup> ซึ่งนำมาใช้กันมากที่สุด มีส่วนประกอบสำหรับการใช้ดังนี้

EDTA

5.5 กรัม

10 เปอร์เซ็นต์นิวทรัลฟอร์มาลิน

100.0 มิลลิลิตร

แช่ก้อนเหลี่ยมเนื้อเยื่อขนาด 40 x 40 x 10 มิลลิเมตร ในสารละลายนี้ 7-20 วัน เปลี่ยนสารละลายทุกสัปดาห์

ข้อดี

ก. ช่วยให้การย้อมสีติดดีขึ้น ถ้าใช้ที่ pH 8.2-8.5 และกับวิธีซิลเวอร์

ข. เนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

ค. สามารถตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตั้งแคลเซียมออกได้โดยวิธีเคมี

ข้อเสีย

ก. การตั้งแคลเซียมออกช้ามาก จึงเหมาะสำหรับงานประจำแต่ไม่เหมาะกับงานเร่งด่วน

ข. ทำให้เนื้อเยื่อแข็งขึ้นกว่าปกติ

---

\*\*\*1. ผลิตโดย Dow Chemical Company

2. ผลิตโดย Geigy Chemical Company

3. disodium salt of ethylene diamine tetraacetic acid

ซาจอวิชและคาบรีนิ<sup>1</sup> (Schajowicz and Cabrini 1955) มีความเห็นว่า ถ้านำเวอร์ซินมาปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก จะได้ผลดีสำหรับการดึงแคลเซียมออก แล้วย้อมสีด้วยสีที่ใช้ในงานประจำคือ ยีมาทอกซิ ลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin stain) แต่ไกลโคเจนจะถูกทำลาย และเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทสก็ถูกยับยั้งด้วย

#### กิจกรรม 4.1

ใช้กรรไกรตัดกระดูก ตัดกระดูกทนต์ขาบริเวณหัวของกระดูกฟีเมอร์ (femur) ทั้งสองท่อนให้ได้ขนาดยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร แล้วใช้มีดผ่าตัดตามแนวยาวเป็น 2 ซีก ทำให้คงสภาพในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ฟอรั่มมาลินตามวิธีในกิจกรรม 3.2 แล้วนำชิ้นกระดูกที่ผ่าซีกชิ้นหนึ่งมาแช่ในเวอร์ซินตามวิธีในข้อ 4.1.4 ส่วนอีกชิ้นหนึ่งเก็บไว้ สำหรับทำกิจกรรม 4.2 ติดตามผลทุกสัปดาห์ติดต่อกัน 3 สัปดาห์

#### 4.2 การดึงแคลเซียมออกพร้อมกับการทำให้คงสภาพ

##### 4.2.1 ลิลลี่'ส ฟลูอิด (Lillie's fluid)

1-2 เปอร์เซ็นต์ กรดฟิกริกในน้ำ

(1-2 กรัม/100 มิลลิตรของน้ำ) 85.0 มิลลิตร

40 เปอร์เซ็นต์ฟอรั่มลิตไฮด์

10-0 มิลลิตร

90-95 เปอร์เซ็นต์กรดฟอรั่มิกในน้ำ

(90-95 มิลลิตร/10-5 มิลลิตร) 5.0 มิลลิตร

เมื่อผสมแล้วใช้สำหรับทำให้คงสภาพและดึงแคลเซียมออกภายในเวลา 1-2 วัน ถ้าต้องการดึงสีเหลืองของกรดฟิกริกออกแช่ใน 70-80 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 2-3 วัน

ลิลลี่'ส ฟลูอิดชนิดดัดแปลง (Lillie's alternate fluid)

น้ำ 90 เปอร์เซ็นต์สารละลายกรดฟอรั่มิกมาเติมลงในเซนเกอร์'ส ฟลูอิด

โดยให้ความเข้มข้นของกรดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายทั้งหมด

1. Schajowicz, F. and Cabrini, R.L. "The effect of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behavior of bone and cartilage" *Journal of Histochemistry and cytochemistry*, 3(1955) 122-129

## 4.2.2 แมคนามารา เอทอัล ฟลูอิด (McNamara et al fluid)

เมอร์คิวริก คลอไรด์	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	300.0 มิลลิลิตร
ละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ในน้ำโดยใช้ความร้อนช่วย แล้วตั้งไว้ให้เย็น	
กรดไตรคลอแอสีติก	30.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร
ละลายแล้วเติม	
กรดไนตริกเข้มข้น	5.0 มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	50.0 มิลลิลิตร
40 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มัลดีไฮด์	40.0 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน แช่เนื้อเยื่อที่ต้องการดิงแคลเซียมออกลง  
ไป เปลี่ยนสารละลายทุกวันติดต่อกัน หมั่นตรวจสอบ ถ้าเป็นกระดูกจะใช้เวลาประมาณ  
7 วัน สารละลายนี้ทำลายนิวเคลียส

## 4.2.3 เพเรนี'ส ฟลูอิด (Perenyi's fluid)

10 เปอร์เซ็นต์กรดไนตริก	4 ส่วน
0.5 เปอร์เซ็นต์กรดโครมิก	3 ส่วน
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	3 ส่วน

การดิงแคลเซียมออกใช้เวลา 2-7 วัน ถ้าเป็นกระดูกขนาดก้อนเหลี่ยม 5  
มิลลิเมตร

## ข้อดี

- เป็นสารดิงแคลเซียมออกที่ดีไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งอาจเนื่องมาจากมีกรดโครมิก  
ผสมอยู่และมีแอลกอฮอล์ช่วยป้องกันการจึกขาด
- ช่วยการย้อมสีนิวเคลียสให้ติดดีขึ้น รวมทั้งให้รายละเอียดของไซโทพลาซึม
- เหมาะสำหรับใช้ในงานประจำสำหรับการดิงแคลเซียมออก โดยเฉพาะอวัยวะ  
พวกหลอดเลือด ต่อม ต่อไทรอยด์ ที่มีการแข็งเพราะมีการสะสมของแคลเซียม
- ไม่จำเป็นต้องทำให้เป็นกลางและล้างเนื้อเยื่อ สามารถนำไปดิงน้ำออกได้ทันที

## 4.2.4 ชมิด'ส ฟลูอิด (Schmidt's fluid)

10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เติมโซเดียมแอซีเตท	1 กรัม
	100.0 มิลลิลิตร
EDCA	4.0 กรัม

สารละลายนี้ใช้ตั้งแคลเซียมออกพร้อมกับการทำให้คงสภาพในเวลา 1-2 วัน สำหรับเนื้อเยื่ออ่อนเหลี่ยมขนาดไม่เกิน 5 มิลลิเมตร โดยปรับ pH อยู่ระหว่าง 7-9 เมื่อตรวจสอบผลแล้ว ทำขั้นตอนต่อไปโดยไม่ต้องผ่านการล้าง

#### 4.3 การตั้งแคลเซียมออกพร้อมกับการดองน้ำออก

##### 4.3.1 เจนกิน'ส ฟลูอิด (Jenkin's fluid)

เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	75.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10.0 มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	10.0 มิลลิลิตร
กรดแอซีติกเข้มข้น	3.0 มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	4.0 มิลลิลิตร

แช่เนื้อเยื่อตัวอย่างที่ทำให้คงสภาพแล้ว (ควรเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ฟิเฟอโรฟอร์มาลิน) ลงในสารละลายเจนกิน'ส ฟลูอิดที่มีปริมาณมากกว่าเนื้อเยื่อ 40-50 เท่า หมั่นตรวจสอบผลการตั้งแคลเซียมออก สารละลายนี้ช่วยป้องกันการบวมพองอันเนื่องมาจากกรดได้ เพราะมีแอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม ซึ่งยังช่วยดูดน้ำออกจากเนื้อเยื่อไปพร้อมกัน เมื่อตั้งแคลเซียมออกหมดแล้วสามารถใส่เนื้อเยื่อลงไปใน 100 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ได้ เปลี่ยนหลาย ๆ ครั้งก่อนทำขั้นตอนต่อไป

#### กิจกรรม 4.2

นำชิ้นหัวกระดูกนิเมอร์ที่ตัดผ่าซีกไว้ในกิจกรรม 4.1 ซึ่งเหลืออีกซีกหนึ่งมาใส่ในซิมิตท์'ส ฟลูอิด ตามวิธีในข้อ 4.2.4 ตรวจสอบผลการตั้งแคลเซียมออกทุก 24 ชั่วโมง ตามวิธีที่จะทำในกิจกรรมต่อไป (กิจกรรม 4.3)

#### 4.4 การตรวจสอบผลของการตั้งแคลเซียมออก

##### 4.4.1 การตรวจสอบทางฟิลิกส์

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการมักอาศัยความชำนาญในการสัมผัสเนื้อเยื่อว่าตั้งแคลเซียมออกไปหมดแล้วหรือไม่ โดยทั่วไปไม่ใช้วิธีงอหรือกดเนื้อเยื่อแต่จะใช้เข็มแทงเข้าไปในก้อนเนื้อเยื่อตัวอย่าง วิธีงอหรือกดนั้นถ้ายังมีแคลเซียมหลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่เป็นกระดูกก็อาจฉีกขาดได้ วิธีใช้เข็มแทงนั้นถึงแม้จะดีกว่าแต่เป็นการทำลายเนื้อเยื่อให้เสียหายผิดไปจากความเป็นจริง ดังนั้นจึงไม่ควรทำ ยกเว้นในกรณี



ที่หลีกเลี่ยงไม่ได้

#### 4.4.2 การตรวจสอบทางเคมี

หลักการคือตรวจสอบหาแคลเซียมในสารละลายที่ใช้ตั้งแคลเซียมออกมาจากเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจไม่พบ หมายความว่า การตั้งแคลเซียมออกสมบูรณ์แล้ว ในช่วงที่มีการตั้งแคลเซียมออกจำเป็นต้องเปลี่ยนสารละลายทุก 24-48 ชั่วโมง โดยเฉพาะในช่วงแรกสุดควรเปลี่ยนเมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่เปลี่ยนเพื่อพร้อมจะทิ้งมาตรวจสอบหาแคลเซียม

##### วิธีทำ

ก. ใส่กระดาษลิตมัสลงในสารละลายที่ใช้ตั้งแคลเซียมออก 5 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมน้ำแอมโมเนียเข้มข้นลงไปที่ละหยด เขย่า ดูการเปลี่ยนแปลงของลิตมัสจนเป็นกลาง

ข. ถ้าในขณะเป็นกลาง สารละลายขุ่นเพราะเกิดแคลเซียมไฮดรอกไซด์แสดงว่าการตั้งแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อยังไม่สมบูรณ์ ไม่ต้องทำขั้นตอนต่อไป

ค. ถ้าไม่ขุ่นให้เติมสารละลายแอมโมเนียออกซาเลตอ้อมตัวในน้ำลงไป 0.5 มิลลิลิตร

ง. ถ้าขุ่นเนื่องจากเกิดแคลเซียมออกซาเลต แสดงว่าการตั้งแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อยังไม่สมบูรณ์

จ. ถ้าสารละลายใส ตั้งไว้ 30 นาที ยังใสอยู่ แสดงว่าการตั้งแคลเซียมออกสมบูรณ์แล้ว

ครอว์ฟอร์ด<sup>1</sup> (Crawford) ได้ดัดแปลงวิธีตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตั้งแคลเซียมออก โดยทำการตรวจสอบหลังจากใช้ เปรินยี'ส ฟลูอิด (ข้อ 4.2.3) ด้วยการละลายตะกอนที่เกิดจากการเติมแอมโมเนียม (ข้อ 2) ด้วยกรดแอสติกเข้มข้นแล้วทำตามขั้นตอนต่อไปเหมือนเดิม

นักปฏิบัติการณ์บางคนใช้สารละลาย 2 นอร์แมล โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสารสำหรับทำให้เป็นกลางสารละลายที่ใช้ตั้งแคลเซียมออก แล้วจึงเติม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมหรือแอมโมเนียออกซาเลตลงไป 1 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายยังคงใสอยู่แสดงว่า

1. Crawford, R.A. A chemical test for the detection of calcium when using Perenyi's fluid. Journal of Medical Laboratory Technology 14 (1957). 111.

การดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อสมบูรณ์แล้ว

#### 4.4.3 การตรวจสอบด้วยรังสีเอกซ์

รังสีเอกซ์ถือว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการตรวจสอบความสมบูรณ์ของการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ เพราะสามารถเห็นได้แม้กระทั่งอนุภาคขนาดเล็กของแคลเซียม ข้อเสียคือ ถ้านำมาใช้ในงานประจำต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมากเพราะแต่ละตัวอย่างต้องทำการตรวจสอบหลายครั้ง

#### 4.5 ผลกระทบของความร้อนต่อการดึงแคลเซียมออก

ความร้อนเป็นตัวช่วยเร่งกระบวนการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ ขณะเดียวกันก็เป็นตัวทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อตัวอย่าง เพราะเมื่อแคลเซียมถูกดึงออกไปเร็ว เนื้อเยื่อก็มะวมและถูกย่อยสลายได้ง่าย จนอาจทำให้ส่วนของเมทริกซ์ถูกย่อยสลายจนหมด

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้านำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปย้อมสี แวน กีสัน (Van Gieson's stain) จะพบว่านิวเคลียสและเส้นใยคอลลาเจนถูกทำลาย

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อทั้งหมดจะถูกทำลายถ้าใช้ (1) 8 เปอร์เซ็นต์ เชนด์กรตไฮโดรคลอริกเป็นสารละลายดึงแคลเซียมออกในเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ถ้าใช้ (2) สารละลายผสมของ 10 เปอร์เซ็นต์ เชนด์กรตฟอรั่มิกในกรดไฮโดรคลอริกเป็นสารละลายดึงแคลเซียมออกในเวลา 24 ชั่วโมง และถ้าใช้ (3) 5 เปอร์เซ็นต์ เชนด์กรตฟอรั่มิกเป็นสารละลายดึงแคลเซียมออกในเวลา 48-72 ชั่วโมง

ดังนั้นการดึงแคลเซียมออกไม่ว่าจะใช้สารชนิดใดจึงควรทำที่อุณหภูมิต่ำ

#### กิจกรรม 4.3

นำเนื้อเยื่อกระดูกฟีมอร์ที่ใช้ในกิจกรรมที่ 4.1 และ 4.2 มาตรวจหาความสมบูรณ์ของการดึงแคลเซียมออกทุก 24 ชั่วโมงตามวิธีมาตรฐานในข้อ 4.4.2 บันทึกผลที่ได้ แล้วเก็บตัวอย่างไว้เพื่อดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

#### 4.6 ข้อพึงระวังในการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ

(1) สารละลายที่ใช้ เป็นกรดแกมมีคุณสมบัติกัดกร่อน โลหะและเนื้อเยื่อสูง จึงจำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เริ่มตั้งแต่วิธีการเตรียมสารละลายจนถึงการใช้โดยยึดหลักวิชาเคมี

- (2) หลีกเลี้ยงการใช้ฝาโลหะปิดภาชนะที่ใส่สารละลายเพื่อการดึงแคลเซียมออก ควรใช้ฝาแก้วหรือจุกยาง ภาชนะควรเป็นแก้วใส
- (3) ควรใช้เชือกด้ายทึบด้วยซี่ผึ้งสำหรับผูกก้อนเหลี่ยมเนื้อเยื่อตัวอย่าง แล้วห้อยให้เนื้อเยื่อจมอยู่ในสารละลายเพื่อการดึงแคลเซียมออก แต่ไม่ให้ถึงก้นภาชนะ เพื่อป้องกันการถูกรบกวนโดยการตกตะกอน
- (4) ควรทำการดึงแคลเซียมออกที่อุณหภูมิห้อง และหมั่นตรวจความสมบูรณ์ทุก 24 ชั่วโมง

### สรุป

การดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อกระดูกหรือเนื้อเยื่อที่มีสารประกอบแคลเซียมมาสะสมอยู่เป็นสิ่งจำเป็น เพราะแคลเซียมเป็นสารที่รบกวนเกือบทุกขั้นตอนของระเบียบวิธีทางไมโครเทคนิค โดยเฉพาะการนำไปเล็อนด้วยไมโครโทม เมื่อดึงแคลเซียมออกหมดแล้วสามารถใช้ระเบียบวิธีประจำ เช่นเดียวกับเนื้อเยื่ออื่น

### แบบฝึกหัดที่ 4

- จงอธิบายหลักการและเหตุผลของการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ  
(ตอบ : ดูความนำ)
- สารละลายเพื่อการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อควรมีคุณสมบัติอย่างไร  
(ตอบ : ดูความนำ)
- สารละลายที่ใช้ในงานประจำในห้องปฏิบัติการ เพื่อการดึงแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อเร็วที่สุดคือ ..... แต่จากรายงานของมอริสและเบนตัน ..... ก็ให้ผลที่ดีทัดเทียมกัน  
(ตอบ : ดู ข้อ 4.1.1.1 และ 4.1.1.2)
- สารที่ไม่ใช่สารเพื่อการดึงแคลเซียมออกที่แท้จริง แต่มีคุณสมบัติพ้องกับแคลเซียมและเหล็กได้เรียก ..... สารชนิดนี้รู้จักกันในชื่อ ..... เมื่อต้องการนำมาใช้ ต้องใช้ ..... สารอื่นด้วย
- สารละลายที่ใช้เพื่อการดึงแคลเซียมออกพร้อมทั้งทำให้คงสภาพด้วยได้แก่สารใด
  - Jenkin's fluid
  - Perenyi's fluid
  - Bouin's fluid
  - Zenker's fluid

6. สารละลายที่ใช้เพื่อการดึงแคลเซียมออกพร้อมทั้งดึงน้ำออกด้วยคือสารใด
1. Lillies's fluid
  2. Schmidt's fluid
  3. McNamara et al fluid
  4. Jenkin's fluid
7. การตรวจสอบเพื่อทราบความสมบูรณ์ของการดึงแคลเซียมออกจากเซลล์ที่ใช้ในงานประจำควรเลือกใช้วิธีใด
1. วิธีทางฟิสิกส์
  2. วิธีทางเคมี
  3. วิธีใช้รังสีเอกซ์
  4. ใช้ได้ทุกวิธี
- (คำตอบ : ข้อ 5 ตอบ 2, ข้อ 6 ตอบ 4, ข้อ 7 ตอบ 2)