ORIGINAL ARTICLE

การย้อมโครงกระดูกทารกด้วยอาลิซารินเรดเอส

The Staining of Human Fetal Skeleton with Alizarin Red S

โดย

ศาสตราจารย์นายแพทย์บุญรักษ์ กาญจนะโภคิน พ.บ.*

นายแพทย์เดวิด เคนนี่ พ.บ.*

นายแพทย์เมืองทอง แขมมณี พ.บ., C.P.E. (MICH.), M.A. (CALIF.)*

คำนำ :– เนื่องจากการย้อมโครงกระดูกของ Human embryos และ fetuses ด้วย Alizarin red S (Sodium 1, 2 - dihydroxyanthraquinone-3-sulfonate) ซึ่งย้อมโดย Mall (1906) มีประโยชน์ในการศึกษา Ossification centers ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญของกระดูก, และเทคนิคการย้อมกระดูกโดยวิธีของ Dawson (1926) กับของ Charles and Eleanor Noback (1944) นั้นกระทำในประเทศที่มีอากาศหนาวผิดกับประเทศไทยซึ่งมีอากาศร้อนกว่า ผู้เขียนได้ทำการทดลองย้อมกระดูกโดยดำเนินตามวิธีของ Charles and Eleanor Noback รวมทั้งได้ดัดแปลงเอาวิธีย้อมกระดูก Fetal rats โดย Wright (1956) มาใช้ ซึ่งปรากฏว่าไม่ได้ผลดีดังที่เขาได้รับ จึงได้คิดดัดแปลงแก้ไขใหม่ในด้านที่คิดว่าจะเหมาะสมกับสภาพอากาศร้อนในประเทศไทย ผลที่ได้รับเป็นที่หน้าพอใจดังจะกล่าวต่อไป

วิธีทำ :–

๑. Human fetus ที่ได้จากการตายคลอด ส่วนใหญ่ดองใน ๙๕% Ethanol ส่วนน้อยดองในฟอร์มาลิน ๑๐% ก่อนแล้วจึงเอาลงดองใน ๙๕% Ethanol ทั้งสองพวกดองไว้นานอย่างน้อย ๒ สัปดาห์

๒. Fetus ที่ใช้ย้อมมีขนาด Crown-rump length 12.7-30 ซม. หรือ Crown-heel length 18.9-48.4 ซม. อายุกะประมาณ ๔ เดือนครึ่งถึงครบกำหนด นำมาชำแหละผิวหนัง, กล้ามเนื้อ, และไขมันออก, แล้วเอาอวัยวะภายในช่องอกและช่องท้องออกให้หมด การชำแหละนี้ต้องระวังอย่า

*แผนกกายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

เอาเอ็นบริเวณข้อต่อต่าง ๆ ออกมากไปมิฉะนั้นข้อต่อจะหลุดจากกันได้ง่าย ต่อจากนั้นเจาะเอาสมองออกทาง Anterior หรือ Posterior fontanelle.

๓. โครงกระดูกที่ชำแหละแล้วแบ่งออกเป็นสองพวก พวกหนึ่งเอาไปแช่น้ำยาฟอกกระดูกประกอบด้วย ๖% Hydrogen peroxide ๑ ส่วนกับ ๙๕% Ethanol ๑๙ ส่วน เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมงจนกระดูกและเนื้อขาว จากนั้นนำไปดองใน ๙๕% Ethanol อีก ๒๔ ชั่วโมง แล้วนำเอาไปแช่ใน ๒% KOH Aqueous solution ต่ออีกหนึ่งถึงสามวัน จนเห็นกระดูกเป็นสีขาวส่วนเนื้ออื่น ๆ ใส เป็นวุ้น การแช่ในน้ำด่างนี้ต้องหมั่นคอยดูบ่อย ๆ มิฉะนั้นข้อต่อและกระดูกจะหลุดจากกัน โครงกระดูกอีกพวกหนึ่งไม่ฟอกให้ขาวก่อนแต่นำไปแช่ใน ๒%KOH aqueous solution เลยโดยใช้เวลานานพอ ๆ กัน

๔. ต่อไปเอาโครงกระดูกที่แช่น้ำด่างแล้วไปใส่ใน Mall's solution (Pure glycerine) ๑ ส่วนผสมกับ ๒% KOH ๔ ส่วน) ระยะนี้จะย้อมกระดูกไปด้วยโดยเติม Alizarin red S Aqueous solution 1:10,000 ลงไปทีละน้อยจนน้ำยาเป็นสีม่วงแดง แก่จัดจนเกือบมองไม่เห็นโครงกระดูกแช่ทิ้งไว้นาน ๑–๗ วันสุดแต่ขนาดและความต้องการให้กระดูกติดสีจัดเพียงใด ระหว่างนั้นอาจเติมน้ำสีเป็นครั้งคราวเพื่อให้กระดูกติดสีดีพอแก่ความต้องการ

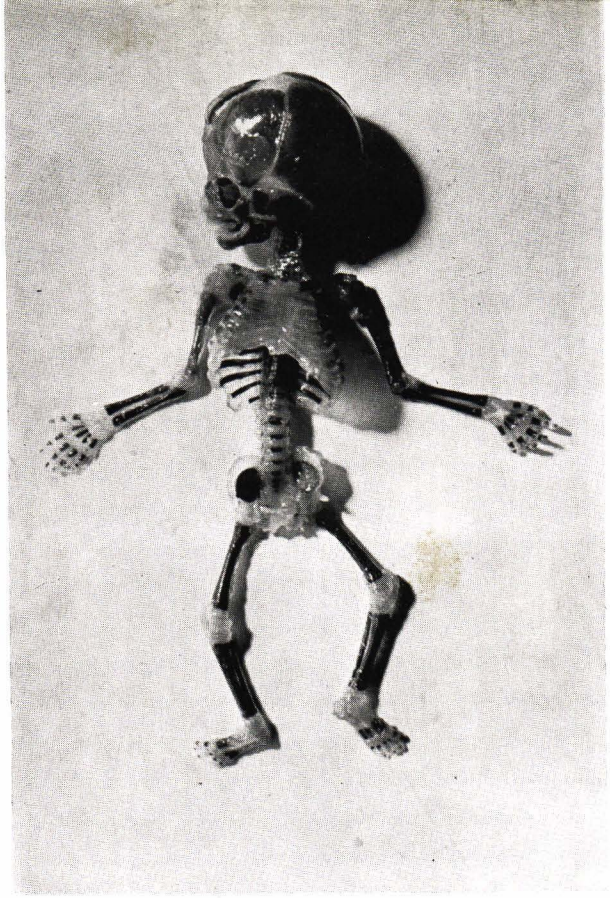
๕. เมื่อโครงกระดูกติดสีม่วงแดงดีแล้วก็เอาออกมาเพื่อเราะเอาเนื้ออื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกอีกแต่ต้องระวังไม่ให้กระดูกหลุดออกจากกัน ถ้าเนื้ออื่น ๆ ยังไม่ใสดีพอก็กลับเอาลงไปแช่ต่อใน Mall's solution อย่างเดียวอีก ๓-๗ วัน

๖. เมื่อการย้อมโครงกระดูกเรียบร้อยดีแล้วควรนำไปเก็บรักษาไว้เป็นการถาวรโดยใส่ไว้ใน Museum jar เติม Pure glycerine ให้ท่วมโครงกระดูกใส่ผง Thymol เล็กน้อยเพื่อกันเชื้อรา (ผง Thymol ควรละลายในน้ำเล็กน้อยเสียก่อนมิฉะนั้นจะละลายยากใน pure glycerine)

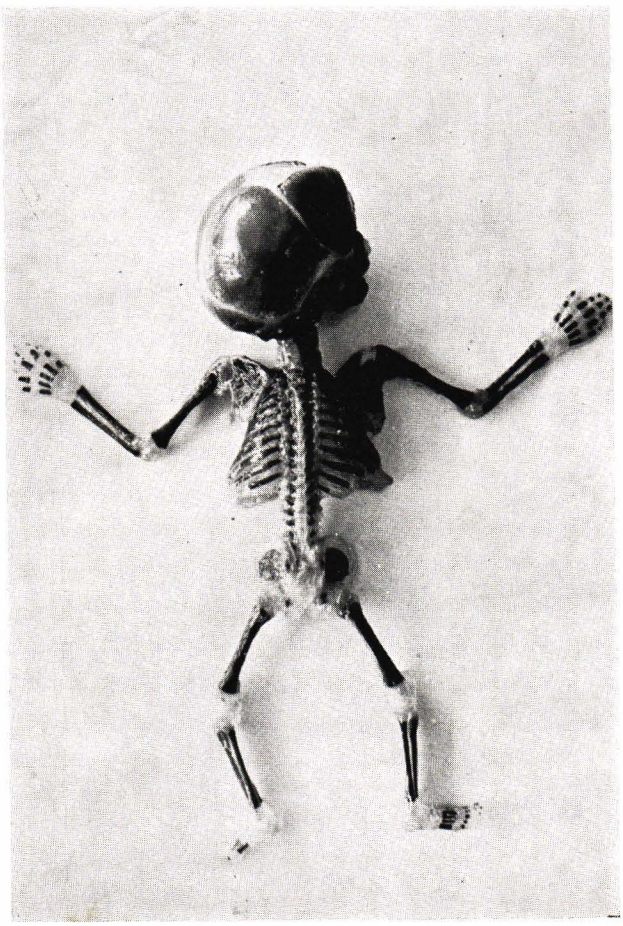
ผล :– จากการทดลองย้อมโครงกระดูกของเรา ผลปรากฏว่า :–

๑. โครงกระดูกจากทารกที่แช่ Formaldehyde ก่อนดองใน ๙๕% Ethanol นั้นชำแหละเนื้อออกยากและย้อมติดสีไม่ค่อยดี (มี ๑๐%)

๒. โครงกระดูกที่แช่ใน ๕% KOH จะหลุดออกเป็นชิ้น ๆ หลังจากแช่เพียง ๓ วันเท่านั้น (๑๐%)

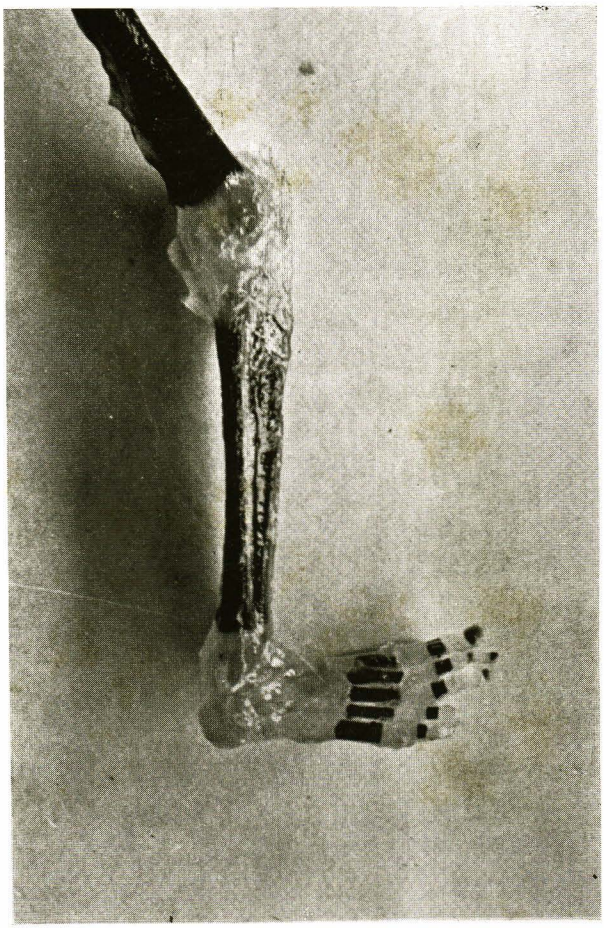


รูปที่ ๑ ก.



รูปที่ ๑ ข

รูปที่ ๒



๓. โครงกระดูกที่ย้อมติดสีดี แต่หลุดเป็นบางส่วนหลังการแช่ Mall's solution ประมาณ ๓ อาทิตย์ (๓๐%)

๔. โครงกระดูกที่ย้อมติดสีดี และไม่หลุด, ที่ดีมาก ๑๐%, ที่ดีพอใช้ได้ (soft tissue) ไม่ใสดีมากพอ) อีก ๔๐%

ในโครงกระดูกที่ย้อมติดสีดี (ดังรูป) จะเห็น Ossified bone ติดสีม่วงแดงและ soft tissue ใสไม่มีสี ส่วนบริเวณที่เป็นกระดูกอ่อน ซึ่งจะกลายเป็นกระดูกต่อไป แต่ยังไม่มี Ossification เกิดขึ้นก็จะไม่ติดสี, เช่นกระดูก Sternum (รูปที่ ๑ ก.), ส่วนขอบของ Hip bone (รูปที่ ๑ ข.), Carpal bones (รูปที่ ๒) และ Tarsal bones (รูปที่ ๓), กระดูกอ่อนนั้นจะเห็นเป็นรูปชัดเจนแต่ไม่ติดสีเช่น Costal cartilage (รูปที่ ๑ ก.), การย้อมแบบนี้สีจะติดเฉพาะ Ossified bone.

วิจารณ์และสรุป :— จากผลที่ได้รับพอจะวิจารณ์และสรุปได้ดังนี้คือ :

๑. โครงกระดูกจากทารกที่ตองด้วยฟอร์มาลินก่อนนั้นย้อมติดสีไม่ค่อยดี อาจเป็นเพราะคุณสมบัติทาง Decalcifying ของ neutral or slightly acidic formalin ดังนั้นจึงไม่เหมาะในการใช้ตองทารกที่จะย้อมโครงกระดูก

๒. การเจาะเอาเนื้อสมองออก (Decerebration) ปรากฏว่าการเจาะเอาออกทาง Posterior fontanelle ดีกว่าที่เจาะเอาออกทาง Anterior fontanelle (Charles and Eleanor Noback) ตรงที่กระโหลกศีรษะคงรูปอยู่ได้ดีกว่าเนื่องจากเนื้อที่ของ membrane เล็กกว่า.

๓. จากการที่ใช้วิธีของ Charles and Eleanor Noback ซึ่งใช้ KOH 4-10% กับ Fetus ที่มี C-R length 15 cm. ขึ้นไปและแช่นาน ๒-๓ สัปดาห์ เราใช้ KOH 5% กับ Fetus ที่มี C-R length 28 cm. ปรากฏว่ากระดูกเริ่มแยกจากกันเมื่อแช่ได้นาน ๑ วัน และหลุดจากกันเป็นชั้น ๆ เมื่อแช่ได้นาน ๓ วัน เข้าใจว่าเป็นเพราะอุณหภูมิในประเทศไทยสูงกว่า, ทำให้ KOH ละลาย soft tissues ได้เร็วกว่าในประเทศที่มีอากาศเย็น, แต่เมื่อเราใช้ KOH 2% และพยายามระวังระยะเวลาในการแช่ก็ปรากฏว่าไม่หลุดในรายอื่น ๆ

๔. ในระยะ Clearing โดยใช้ Mall's solution, ซึ่ง Mall และ Charles and Eleanor Noback. กล่าวว่าใช้แช่ specimen ได้นาน ๒-๓ สัปดาห์หรือกว่านั้น หรือตามที่ Wright ได้ใช้กับ Fetal rat skeleton และกล่าวว่าแช่ไว้นาน ๆ ก็ไม่เป็นอันตราย

แต่จากการทดลองของเราปรากฏว่าโครงกระดูกที่แช่ใน Mall's solution เกินกว่า ๒ สัปดาห์ขึ้นไปจะหลุดออกเป็นชิ้น ๆ (๓๐% ของทั้งหมด) ซึ่งก็น่าจะสันนิษฐานได้เช่นเดียวกับข้อ ๓ ที่กล่าวมาแล้ว

๕. โครงกระดูกที่ผ่านการฟอกขาวด้วยน้ำยาฟอกกระดูกก่อนปรากฏว่าย้อมติดสีได้ดีกว่าพวกที่ไม่ได้ฟอก เป็นการสนับสนุนเทคนิคของCharles and Eleanor Noback.

๖. สำหรับพวกที่ได้ผลดีมากและดีพอใช้ (๕๐% ของทั้งหมด) นั้นได้ใช้เทคนิคซึ่งเราได้ดัดแปลงแก้ไขเสียใหม่ โดยลดความเข้มข้นของ KOH ลงและควบคุมระยะเวลาที่ใช้แช่ specimens ในน้ำยาใด ๆ ที่มี KOH ผสมอยู่ให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้, จึงคิดว่าเทคนิคที่ได้กล่าวไปแล้วน่าจะได้นำมาใช้และทดลองปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้น เพราะการย้อมกระดูกตามวิธีนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษา Ossification ใน Human embryos และ fetuses ในประเทศไทยต่อไป.

ขอบคุณ :—

ผู้เขียนขอขอบคุณ แพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่แผนกวิชาสูติ – นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัยทุกท่านที่กรุณาให้ความร่วมมือในการจัดหา specimens ให้, คุณฉวี ดารานนท์ คุณวิเชียร วาระวิชนีย์ ในด้านความช่วยเหลือด้านเทคนิค, คุณประพัฒน์ สุโพธิทอง ในด้านการถ่ายภาพ, และบรรณาธิการจุฬาลงกรณ์เวชสารในด้านให้ความสะดวกในการพิมพ์บทความนี้.

เอกสารอ้างอิง :—

1. Chaeles R. and Eleanor Noback 1944, Demonstrating the osseous skeleton of Human embryos and fetuses. Stain Techn. 19 No. 2, 51-54.

2. Dawson A. 1926, A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Techn. 1, 123-4.

3. Mall F. 1906, On ossification centers in human embryos less than one hundred days. Amer. J. Anat. 5, 433-58.

4. Wright H. 1956, Modified technique for clearing and staining with Alizarin red. Lab. Sheet, Dept. of Anat., San Francisco Medical Center.

Abstract

Human fetuses whose osseous skeleton are stained by using the technique modified from that of Charles and Eleanor Noback which seemed to suit the climatic condition in Thailand were

successfully prepared. All fetuses were fixed in 95% ethanol, skinned, excess muscles and fat removed, decerebrated, eviscerated, bleached in H_2O_2 and ethanol, cleared in 2% KOH, stained with 1:10,000 Alizarin red S aqueous solution added to Mall's solution until adequately stained. Specimens were further cleared in Mall's solution only for a short period and finally stored in pure glycerine with thymol added as preservative. Ossified bones are well demonstrated by this technique which will be benefit in the study of ossification centers in human embryos and fetuses.