บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากร

ประชากรเป็นแผ่นชิ้นเนื้อ ซึ่งตัดผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบนซี่แรก ซึ่งจัดเตรียมจากหนูวิสตาร์

กลุ่มตัวอย่าง

ประกอบด้วยแผ่นชิ้นเนื้อหนา 7 ไมโครเมตร จำนวน 2144 แผ่น ซึ่งตัดในแนวใกล้กลางไกลกลางผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบนซี่แรกทุกแผ่น ตั้งแต่เริ่มพบรากใกล้แก้มใกล้กลางตามลำดับในแนวใกล้แก้มใกล้ลิ้น

วิธีรวบรวมข้อมูล

1. จัดหาหนูวิสตาร์เพศผู้ซึ่งมีอายุ 60 วัน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิธีสุ่ม จำนวน 4 ครอก ครอกละ 4 ตัว รวม 16 ตัว โดย 2 ครอก ใช้สำหรับการทดลองเมื่อให้แรงเคลื่อนฟัน 1 , 2 , 4 และ 6 วัน อีก 2 ครอก ใช้สำหรับการทดลองเมื่อให้แรงเคลื่อนฟัน 8 , 10 , 12 และ 14 วัน เพื่อลดความแปรปรวนอันอาจจะเกิดจากพันธุกรรม

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนเริ่มการทดลอง

3. นำหนูทั้ง 16 ตัว มาดำเนินการใส่เครื่องมือเพื่อให้แรงเคลื่อนฟันขนาด 40 กรัมโดยการใส่พลาสติกโมดูลความยาว 6 ห่วง โดยพลาสติกโมดูลขนาดดังกล่าว ได้จากการมัดปลายข้างหนึ่งกับฟันกรามบนซ้ายซี่แรกด้วยลวดมัดฟันขนาด 0.010 นิ้ว แล้วดึงห่วงที่ 6 มายังฟันหน้าบนซ้าย วัดขนาดแรงด้วยคอเรกซ์เกจ (Correx Gauge) การใส่เครื่องมือทำเพื่อ เคลื่อนฟันกรามบนซ้ายซี่แรกมาทางด้านหน้าโดยอาศัยฟันหน้าเป็นหลักยึด และใช้ฟันกรามบนขวาซี่แรกซึ่งไม่มีการใส่เครื่องมือเคลื่อนฟันเป็นกลุ่มควบคุม รายละเอียดของการยึดเครื่องมือมีดังนี้

3.1 ใช้ไอระเหยอีเทอร์(ether)อบให้หนูสลบ ตรึงหนูในลักษณะนอนหงายบนแผ่นกระดาน

3.2 สอดลวดมัดฟันขนาด 0.010 นิ้ว ผ่านใต้จุดสัมผัส (contact point)ระหว่างฟันกรามบนซ้ายซี่แรก และซี่ที่สอง มัดปลายลวดเข้ากับปลายห่วงข้างหนึ่งของพลาสติกโมดูลความยาว 5 ห่วง ด้วยคีมมัดฟัน

3.3 ดึงปลายอีกข้างหนึ่งของพลาสติกโมดูลมายังฟันหน้าบนซ้าย แล้วคล้องห่วงที่ 5 ของพลาสติกโมดูลกับฟันหน้าบนซ้ายจนถึงคอฟัน ทำให้เกิดแรงขนาด 40 กรัมดึงฟันกรามบนซ้ายซี่แรกให้เคลื่อนมาทางด้านใกล้กลางแบบทิปปิง แล้วใช้ลวดมัดฟันขนาด 0.010 นิ้ว 2 เส้น มัดรอบคอฟันหน้าบนซ้าย-ขวาเข้าด้วยกัน โดยเส้นหนึ่งมัดใต้ต่อห่วงพลาสติกโมดูล และอีกเส้นหนึ่งมัดเหนือต่อห่วงพลาสติกโมดูล แล้วมัดปลายลวดทั้งสองเข้าด้วยกันด้วยคีมมัดฟัน

3.4 หุ้มทับรอบลวดมัดฟันและห่วงพลาสติกโมดูลรอบคอฟันหน้าบนซ้าย-ขวา ด้วยวัสดุยึดเรซินทางทันตกรรมจัดฟัน

4. ภายหลังจากให้แรง 1, 2, 4, 6 วัน สุ่มหนูจากครอกที่ 1 และ 2 ครอกละ 1 ตัว รวมเป็น 2 ตัวในแต่ละวัน และหลังจากติดเครื่องมือเป็นเวลา 8, 10, 12, 14 วัน สุ่มหนูจากครอกที่ 3 และ 4 ครอกละ 1 ตัว รวมเป็น 2 ตัวในแต่ละวัน ใช้ไอระเหยของอีเทอร์อบให้หนูเสียชีวิต แล้วแยกส่วนของขากรรไกรบนออกมาตรึง (fixing) ในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% buffered formalin solution) เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อดังนี้

4.1 ตัดแบ่งกระดูกขากรรไกรบนซ้ายและขวาออกเป็น 2 ส่วน ในแนวกึ่งกลางเพดาน ขอบเขตด้านใกล้กลางห่างจากผิวฟันด้านใกล้กลางของฟันกรามบนซี่แรก 5 มิลลิเมตร และตัดให้ชิ้นเนื้อหนาประมาณ 7 มิลลิเมตร ทุกระนาบตั้งฉากกัน นำชิ้นเนื้อไปแช่ในกรดไนตริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% Nitric acid) เปลี่ยนกรดไนตริกทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อกำจัดสารแคลเซียม (decalcification)ซึ่งทำให้ชิ้นเนื้ออ่อนตัวลง ชิ้นเนื้อต้องปราศจากแคลเซียมโดยทำการทดสอบดังต่อไปนี้

4.1.1 ผสมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% Ammonium hydroxide) จำนวน 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับแอมโมเนียมออกซาเลทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% Ammonium oxalate) จำนวน 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 ใช้น้ำยาในข้อ 4.1.1 จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกรดไนตริกซึ่งยังคงใช้แช่ชิ้นเนื้อ จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมเป็น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 15-30 นาที ถ้าสารละลายที่ผสมกันขุ่น แสดงว่าสารแคลเซียมในชิ้นเนื้อยังไม่หมด

ต้องเปลี่ยนกรดไนตริกใหม่ และแช่ชิ้นเนื้อในกรดไนตริกต่ออีก 1 วัน แล้วจึงนำมาทดสอบแบบเดิมอีกจนสารละลายผสมไม่ขุ่น แสดงว่าสารแคลเซียมถูกกำจัดหมด

4.1.3 เมื่อกำจัดสารแคลเซียมหมด นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปา 30นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำยาฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 5 ในชั่วโมง

4.1.4 นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 1 คืน

4.2 เตรียมชิ้นเนื้อฝังในแท่งพาราฟินโดยการกำจัดน้ำภายในชิ้นเนื้อเพื่อให้สารพาราฟินเข้าไปแทนที่ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.2.1 นำชิ้นเนื้อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับในช่วงเวลาต่าง ๆ กันดังต่อไปนี้

- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70	1 คืน
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 80	2 ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 (I)	1 ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 (II)	1 ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I)	2 ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (II)	2 ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (III)	1 ชั่วโมง

4.2.2 วิธีการที่ทำให้สารพาราฟิน สามารถเข้าแทนที่ในชิ้นเนื้อทำได้โดย

- แช่ชิ้นเนื้อในไดออกแซน (Dioxan) (I)	1 คืน
- ไดออกแซน (II)	1 ชั่วโมง
- ไดออกแซน (III)	1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำไปแช่สารละลายต่อไปนี้ ในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ได้แก่

- ไดออกแซนผสมพาราฟิน	1 ชั่วโมง
- พาราฟิน (I)	1 ชั่วโมง
- พาราฟิน (II)	1 ชั่วโมง
- พาราฟิน (III)	1/2 ชั่วโมง

4.2.3 นำชิ้นเนื้อออกจากตู้อบ จัดวางบนถาดเหล็กไร้สนิมขนาด 1.5 นิ้ว x 2 นิ้ว โดยให้ด้านใกล้แก้มของฟันกรามวางแนบกับพื้นถาด แล้วเทพาราฟินเหลวจนเต็มถาด ปิดทับด้วยกรอบพลาสติกซึ่งมีแกนสำหรับยึดกับเครื่องมือตัดเนื้อเยื่อ (microtome) เทพาราฟินเหลวลงในกรอบให้เต็ม ทิ้งไว้ให้เย็นก็จะได้ชิ้นเนื้อฝังในแท่งพาราฟิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การตัดแผ่นชิ้นเนื้อ นำแท่งพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่ตรงกลางมาตัดด้วยเครื่องมือตัดเนื้อหนา 7 ไมโครเมตร โดยตัดอย่างเรียงตามลำดับ (serial section) จากด้านใกล้แก้มจนกระทั่งไม่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามซี่แรก ทางด้านใกล้ลิ้น และนำแผ่นชิ้นเนื้อครั้งละ 5 แผ่น ซึ่งเรียงติดต่อกันลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนแผ่นชิ้นเนื้อยืดตัวออกมีขนาดเท่าปกติ วางแผ่นชิ้นเนื้อเหล่านี้บนสไลด์แก้วที่ทาไข่ขาว ซึ่งได้เตรียมไว้ก่อนแล้ว ซับให้แห้งด้วยผ้าละอาด ทำเช่นนี้จนหมดจำนวนแผ่นชิ้นเนื้อที่ได้ตัดไว้ แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

4.4 ย้อมแผ่นชิ้นเนื้อด้วยสี แฮรีสฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Harris Hematoxylin and Eosin) โดยนำสไลด์แก้วที่มีแผ่นชิ้นเนื้อแช่ในสารละลายและสีย้อมต่อไปนี้ตามเวลาที่กำหนด

- ไซลอล (xylol) (I)	5 นาที
- ไซลอล (II)	5 นาที
- ไซลอล (III)	5 นาที
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์	5 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95	3 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 80	3 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70	3 นาที
- น้ำกลั่น	3 นาที
- แฮรีสฮีมาท็อกซิลิน	6-8 นาที
- จุ่มล้างในน้ำประปา	4-6 ครั้ง
- จุ่มในกรดแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1	1-2 ครั้ง
- จุ่มในน้ำผสมแอมโมเนีย	3-6 ครั้ง
- น้ำประปา	3 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70	3 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 80	3 นาที
- อีโอซิน	3-6 นาที
- จุ่มล้างในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 (I)	5-6 ครั้ง
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 (II)	1 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 (III)	2 นาที
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I)	2 นาที
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (II)	2 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ไซลอล (I) 5 นาที
- ไซลอล (II) 5 นาที
- ไซลอล (III) 5 นาท

4.5 ปิดทับแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์แก้วด้วยกระจกคลุม (coverglass) ขนาด 25 มิลลิเมตร x 60 มิลลิเมตร โดยอาศัยเพอเมาท์ (permount)เป็นตัวกลางยึดติด นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที

5. ตรวจแผ่นชิ้นเนื้อที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) โดยเริ่มตั้งแต่แผ่นที่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามซี่แรกจนหมดรากฟันดังกล่าว นับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์และเซลล์ออสติโอคลาสท์ เริ่มจากยอดกระดูกเบ้าฟันระหว่างรากฟันใกล้แก้มไกลกลางและรากฟันใกล้แก้มใกล้กลาง ซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความกว้างของกระดูกระหว่างรากฟัน ไปยังกระดูกบริเวณปลายรากฟัน ซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความหนาของรากฟัน (รูปที่ 11) การนับจำนวนเซลล์กระทำที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้เกณฑ์ตามข้อตกลงเบื้องต้น การนับจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิดมีวิธีการแตกต่างกัน เนื่องจากขนาดและจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองชนิดต่างกันดังนี้

5.1 การนับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ เพื่อหลีกเลี่ยงการนับจำนวนเซลล์ซ้ำซ้อน เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 21 ไมโครเมตร ขณะที่แผ่นชิ้นเนื้อแต่ละแผ่นมีความหนา 7 ไมโครเมตร จึงได้ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกลำดับที่ 3 ขั้นตอนในการคัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อ เพื่อนำมานับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ เป็นดังนี้

5.1.1 จัดเรียงแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์ทั้งหมดตามลำดับก่อนหลังของการตัด คัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งกึ่งกลางนับเป็นลำดับที่หนึ่ง

5.1.2 แผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งถัดจากแผ่นชิ้นเนื้อลำดับที่หนึ่งขึ้นไปทางด้านใกล้แก้ม เป็นลำดับที่ 3, 6, 9,. . .จนหมดรากฟันทางด้านใกล้แก้ม

5.1.3 แผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งถัดจากแผ่นชิ้นเนื้อ ลำดับที่หนึ่งลงไปทางด้านใกล้ลิ้น เป็นลำดับที่ 3, 6, 9,. . .จนหมดรากฟันด้านใกล้ลิ้น

5.1.4 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในชิ้นเนื้อแต่ละแผ่น นำมาหาค่าเฉลี่ยโดยมีหน่วยเป็นจำนวนเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 21 ไมโครเมตร

5.2 การนับจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ เนื่องจากเซลล์ออสติโอคลาสท์มีขนาดไม่แน่นอน (ประมาณ 21-126 ไมโครเมตร) เพื่อป้องกันการนับเซลล์ซ้ำจึงกำหนดวิธีนับเซลล์ต่างจากข้อ 5.1 โดย

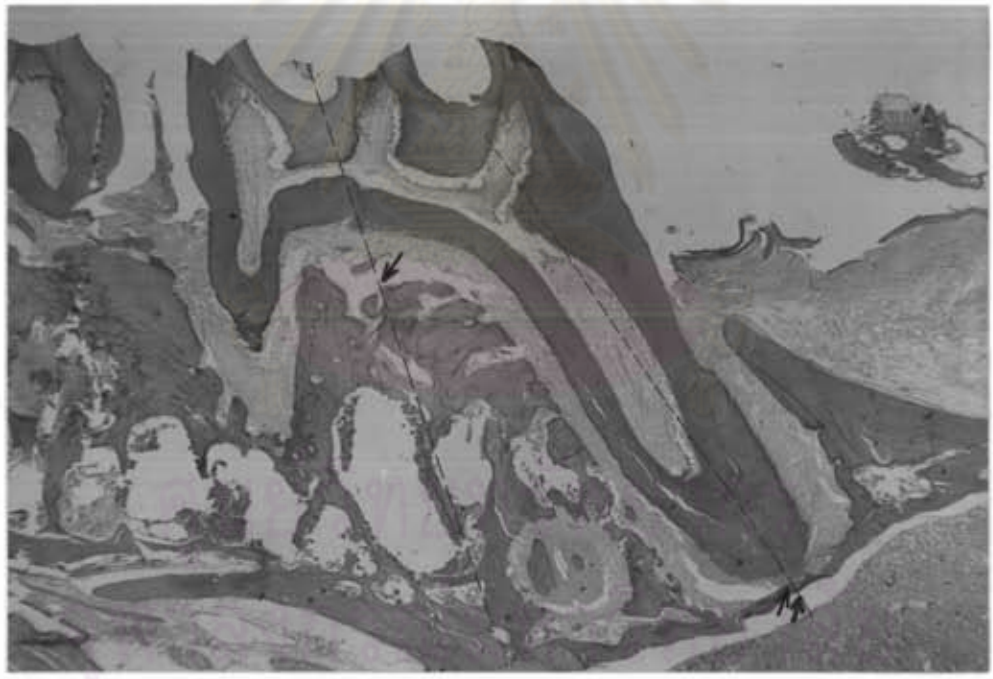
5.2.1 ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกแผ่น เริ่มจากแผ่นที่พบรากฟันใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่แรก ทางด้านใกล้แก้มลงไปทางด้านใกล้ลิ้น จนสิ้นสุดรากฟันดังกล่าว

5.2.2 วาดภาพฟัน ช่องเอ็นยึดปริทันต์ และขอบเขตของกระดูกเบ้าฟัน ซึ่งปรากฏในกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

5.2.3 ใช้กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกตำแหน่งเซลล์ออสติโอคลาสท์ลงบนขอบเขตกระดูกเบ้าฟันที่วาดไว้ พร้อมบันทึกจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ออสติโอคลาสท์แต่ละตัว

5.2.4 ศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อถัดไปด้วยวิธีในข้อ 5.2.2 และ 5.2.3 หากพบเซลล์ออสติโอคลาสท์ซ้ำในตำแหน่งขอบเขตกระดูกเบ้าฟันเดียวกันให้เลือกนับเฉพาะเซลล์มีจำนวนนิวเคลียสสูงสุด ส่วนเซลล์ที่มีนิวเคลียสน้อยกว่าให้ทำเครื่องหมายกากบาทและไม่นับเซลล์นั้น

5.2.5 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในชิ้นเนื้อแต่ละแผ่น ซึ่งได้ตัดเซลล์ที่ซ้ำออกแล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ยโดยมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 7 ไมโครเมตร



รูปที่ 11 แสดงขอบเขตการนับจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์และออสติโอบลาสท์ โดย เริ่มจากยอดกระดูกเบ้าฟันระหว่างรากฟันใกล้แก้มไกลกลางและรากฟันใกล้แก้มใกล้กลางซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความกว้างของกระดูกระหว่างรากฟัน (ลูกศรชี้) ไปยังกระดูกบริเวณปลายรากฟันซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความหนาของรากฟัน (ลูกศรคู่ชี้) (กำลังขยาย 26 เท่า)

ตัวแปรของการวิจัย

1. ตัวแปรอิสระ (Independent Variables)
   ระยะเวลาที่ให้แรงเคลื่อนฟัน
2. ตัวแปรตาม (Dependent Variables)
   2.1 เซลล์ออสติโอบลาสท์
   2.2 เซลล์ออสติโอคลาสท์

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ทดสอบสมมติฐานโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05
- เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์และออสติโอบลาสท์ในด้านทดลองและด้านควบคุมในแต่ละวัน ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยภายหลังการวิเคราะห์ความแปรปรวน หรือการเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple Comparison) โดยวิธีของเชฟเฟ (Scheffe')
- เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์และออสติโอบลาสท์ในด้านทดลองและด้านควบคุม ระหว่างหนูต่างครอก ในแต่ละวัน ด้วยสถิติวิเคราะห์ค่าที (student t-test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย