บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากร (population)

ประกอบด้วย ชิ้นรากฟันที่ได้จากฟันซึ่งเป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยมีหลักเกณฑ์ในการเลือกดังนี้

1. มีการสูญเสียอวัยวะยึดเกาะมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร
2. มีความลึกของร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร
3. ไม่มีฟันผุบริเวณคอฟันหรือในบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งที่จะนำมาใช้ศึกษา

ตัวอย่าง (samples)

กลุ่มที่ 1 ชิ้นรากฟันซึ่งได้จากการเตรียมให้มีขนาด 4x4x1.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (กว้างxยาวxหนา) จำนวน 16 ชิ้น

กลุ่มที่ 2 ชิ้นรากฟันซึ่งได้จากการเตรียมให้มีขนาดเดียวกับกลุ่มที่ 1 และอุดด้วยวัสดุไดแรกต์เอพี ขนาด 1.5x1.5x1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จำนวน 16 ชิ้น

กลุ่มที่ 3 ชิ้นรากฟันซึ่งได้จากการเตรียมให้มีขนาดเดียวกับกลุ่มที่ 1 และอุดด้วยวัสดุเยริสโทร์ ขนาด 1.5x1.5x1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จำนวน 16 ชิ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนและลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวรากฟันพื้นผิววัสดุไดแรกต์เอพีและพื้นผิววัสดุเยริสโทร์

1. การเก็บฟัน

ถอนฟันที่มีลักษณะตรงตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยฉีดยาชาเฉพาะที่ที่เหงือกโดยรอบของฟัน ใช้เครื่องมือถอนฟันออกด้วยความระมัดระวัง ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เครื่องมือทำลายพื้นผิวรากฟันในบริเวณที่ต้องการศึกษา นำฟันที่ได้แช่ในนอร์มัลเซลายน์ทันที

ทำความสะอาดฟันโดยกำจัดหินน้ำลายด้วยเครื่องอัลทราโซนิกส์ขูดหินน้ำลาย (Bobcat; Dentsply, USA) ด้วยหัวขูด P-10 (Dentsply, USA) และเกลารากฟันด้วยเครื่องมือเกลารากฟัน Gracey 7/8 (Hu –Friedy,USA) จนรู้สึกเรียบเมื่อตรวจด้วยเครื่องมือตรวจ (explorer No.5; Hu – Friedy,USA) แช่ฟันที่ทำความสะอาดแล้วในนอร์มัลเซลายน์ ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตัดเตรียมชิ้นรากฟัน โดยเปลี่ยนนอร์มัลเซลายน์ ทุก 2 วัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมชิ้นรากฟัน

กำหนดขอบเขตบริเวณที่จะนำมาศึกษาในฟันที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว โดยใช้ดินสอดำขีดกำหนดรอยต่อเคลือบรากฟันกับเคลือบฟัน (cemento - enamel junction, CEJ) จากนั้นจึงกำหนดขอบเขตบริเวณที่จะใช้ศึกษา โดยขอบเขตแรกอยู่ต่ำกว่า CEJ 1.0 มิลลิเมตร ขอบเขตที่สองอยู่ต่ำกว่า CEJ 5.0 มิลลิเมตร จากนั้นใช้แผ่นกรอกากเพชร (diamond disc # 273 D ; Intensiv Corp., Switzerland) ตัดตามขวางที่ขอบเขตแรกและขอบเขตที่สอง (ภาพที่ 2A)

กำหนดขอบเขตในแนวดิ่งทั้งสองข้าง โดยด้านที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นด้านใกล้กลาง (mesial) และไกลกลาง (distal) ของรากฟัน เนื่องจากจะได้ลักษณะผิวรากฟันที่แบน ใช้แผ่นกรอกากเพชรตัดตามแนวที่กำหนดไว้ (ภาพที่ 2B) และแต่งให้มีขนาดใกล้เคียง 4×4×1.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ภาพที่ 2C)

นำชิ้นรากฟันที่เตรียมได้เก็บไว้ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำชิ้นรากฟันมาศึกษา เปลี่ยน PBS ทุกสัปดาห์

3. การอุดฟันในกลุ่มทดลอง

แบ่งชิ้นรากฟันที่เตรียมได้ตามข้อ 2 โดยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบอิสระ (simple random sampling) ออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 16 ชิ้น โดยเป็นกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม ในกลุ่มทดลองทำการเตรียมโพรงสำหรับการบูรณะด้วยวัสดุคอมโพสิตเรซินชนิดดัดแปลงด้วยสารประกอบของกรด โดยใช้หัวกรอกากเพชรรูปทรงกระบอก (diamond cylinder bur; Intensiv Corp.,Switzerland) กรอโพรงรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ที่มีขนาดความกว้างด้านละ 1.5 มิลลิเมตร และมีความลึกประมาณ 1 มิลลิเมตร ที่บริเวณกึ่งกลางชิ้นรากฟัน จากนั้นทำการอุดโพรงที่เตรียมไว้ด้วยวัสดุอุดไดแรกต์เอพี (DyractAP; Dentsply, USA) และเยริสโทร์ (Geristore; Den-mat Corp., USA) ตามขั้นตอนและคำแนะนำของผู้ผลิต (ภาพที่ 3) แล้วทำการขัดแต่งวัสดุอุดด้วยหัวกรอกากเพชรชนิดละเอียด (Composhape #4255 และ 5255; Intensiv Corp.,Switzerland) ตามลำดับที่ผู้ผลิตกำหนดจนพื้นผิวเรียบ ในขณะที่กลุ่มควบคุมใช้ชิ้นรากฟันที่ไม่ต้องทำการเตรียมโพรงฟันใด ๆ

4. การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์

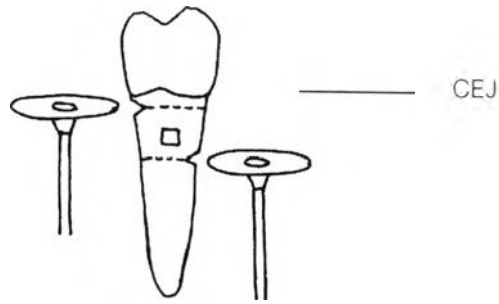
เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่มารับการรักษาด้วยศัลยกรรมปริทันต์ที่ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย โดยเนื้อเยื่อเหงือกที่นำมาใช้ในการศึกษานี้เป็นเนื้อเยื่อปกติ และเป็นส่วนที่เกิน หรือ

ภาพที่ 2 ภาพวาดแสดงวิธีการเตรียมชิ้นรากฟัน

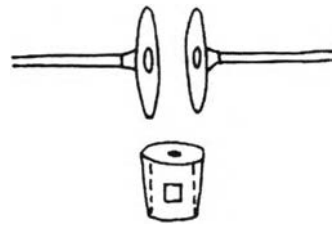
A: กำหนดขอบเขตและตัดฟันตามขวางด้วยแผ่นกรอกากเพชร โดยขอบเขตแรกอยู่ต่ำกว่ารอยต่อระหว่างเคลือบรากฟันและเคลือบฟัน (CEJ) 1 มิลลิเมตร ขอบเขตที่ 2 อยู่ต่ำกว่า CEJ 5 มิลลิเมตร

B: กำหนดและตัดฟันตามขอบเขตตามแนวดิ่ง ทั้งสองข้างของชิ้นฟันด้วยแผ่นกรอกากเพชร

C: แสดงชิ้นตัวอย่างของรากฟัน ที่แต่งให้มีขนาดใกล้เคียงกับ 4x4x1.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



A



B

4x4x1.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

C

ภาพที่ 3 ภาพถ่ายแสดงผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษา

A. วัสดุไดแรกต์เอพี

B. วัสดุเยริสโทร์

A3
Dyract AP
A3
A3
A3
A

Dual Cure
Geristore²
Base Paste
A
8.25 gm. No. 4501
Dry Bond
Geristore
Shade 81
B
2.75 gm. No. 4508
B

ไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของช่องปาก ตัวอย่างเนื้อเยื่อนี้ได้จากผู้ป่วยไม่จำกัดเพศและอายุ จำนวน 4 ราย

นำเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยมีขั้นตอนการเตรียมที่ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (lamina flow; MDH, USA) คือ ล้างเนื้อเยื่อให้สะอาดปราศจากเลือดและน้ำลายด้วยนอร์มัลเซลายน์ นำมาแช่ใน Dulbecco 's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 5 % antibiotic-antimycotic solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงตัดเนื้อเยื่อเหงือกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1×1x1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (culture dish; Falcon, USA) ขนาด 35 มิลลิเมตร แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ให้ท่วมชิ้นเนื้อเล็ก ๆ เหล่านั้น โดยที่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย

DMEM 1x	88%
Antibiotic-antimycotic solution	1%
L-glutamine	1%
Fetal bovine serum	10%

สารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท GIBCO BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา

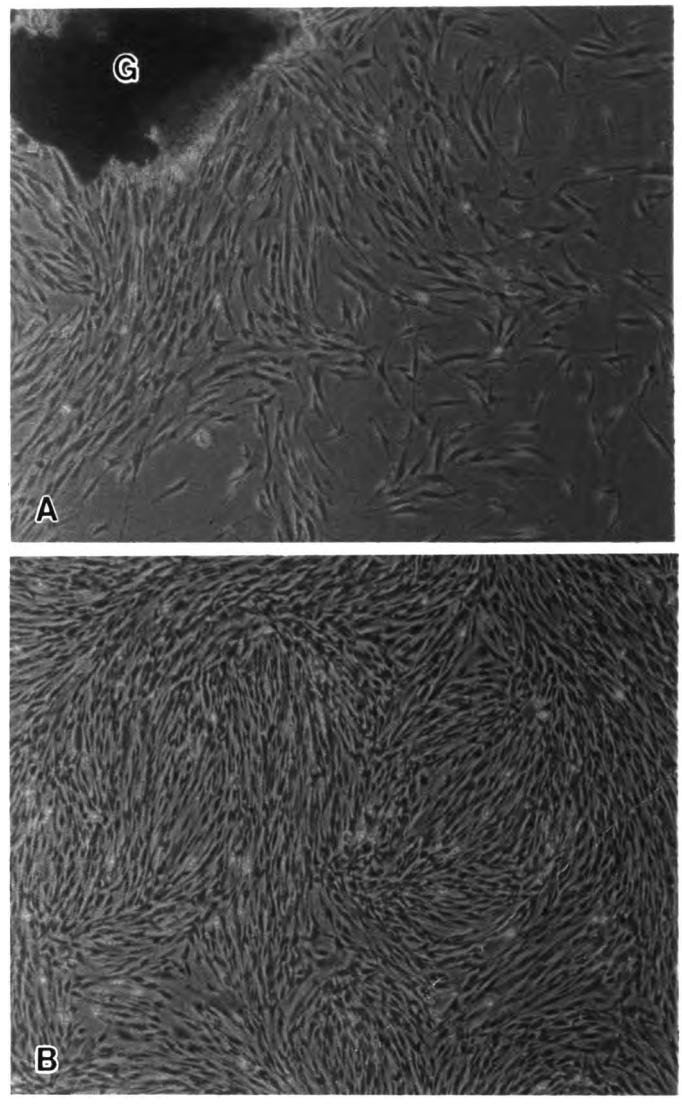
เก็บจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเนื้อเยื่อไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator; SHEL LAB, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน ร่วมกับการศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope ; Olympus, Japan)

ประมาณวันที่ 3-7 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีเซลล์เริ่มคืบคลานออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 4A) เซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดปะปนกันอยู่ เมื่อเซลล์ออกมาอยู่นอกชิ้นเนื้อจนหนาแน่นแล้ว ทำซับคัลเจอร์ (subculture) ซึ่งเป็นการย้ายเซลล์ที่หนาแน่นเหล่านี้ไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่ในจำนวนน้อยลง การย้ายเซลล์เช่นนี้ นอกจากเป็นการลดความหนาแน่นของเซลล์ เพื่อให้ได้รับอาหารเพียงพอแล้ว ยังเป็นการกำจัดเซลล์ชนิดอื่นที่มิใช่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกด้วย โดยอาศัยหลักการว่าไฟโบรบลาสต์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงได้ดีและเร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น การทำซับคัลเจอร์ ทำได้โดยการย่อยโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin - EDTA (GIBCO BRL, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เซลล์จะลอยตัวขึ้นจากพื้นของจานเพาะเลี้ยง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย trypsin inhibitor (Sigma, USA) จากนั้นกรองเซลล์ที่ได้ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ (lens paper) แล้วเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge; Hermle Z 320,

ภาพที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบร-บลาสต์จากชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วย

A. แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์คืบคลานออกมา หลังจากทำการเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน (G หมายถึง ชิ้นเนื้อเยื่อ)

B. แสดงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วนที่ได้จากการทำ subculture ครั้งที่ 4 สังเกตได้จากเซลล์ที่ได้นี้เป็นเซลล์รูปกระสวยลักษณะเดียวกันทั้งหมด


G
A
B

Germany) ที่ 2000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเก่าที่มีเอนไซม์ผสมอยู่ทิ้งและเติมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นับจำนวนเซลล์ที่ได้ จากนั้นใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10,000 เซลล์ ใน 1.0 มิลลิลิตรของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เก็บเซลล์เหล่านี้ในตู้อบและเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน การทำซับคัลเจอร์หลายครั้งพบว่า สามารถทำให้ได้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วนในรอบที่ 3 หรือ 4 ของการทำซับคัลเจอร์ (ภาพที่ 4B) เซลล์ที่นำมาศึกษาเป็นเซลล์ที่ได้จากการทำซับคัลเจอร์ ครั้งที่ 5-8

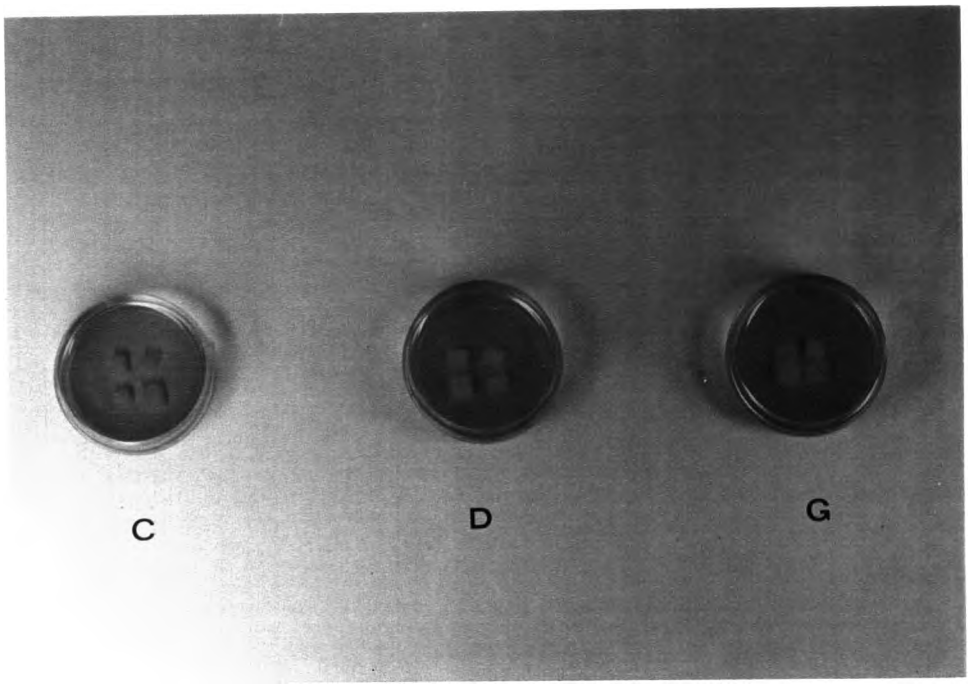
5. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนผิวรากฟันที่ได้รับการอุด และกลุ่มควบคุม

นำชิ้นรากฟันที่ได้รับการเตรียมตามข้อ 3 แช่ในน้ำยาไซเดกซ์ (Cidex; Johnson & Johnson, USA) บนเครื่องเขย่า (orbital shaker; Stuart Scientific SO3, UK) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำชิ้นรากฟันแช่ใน PBS บนเครื่องเขย่า โดยเปลี่ยน PBS ทุก 30 นาที จนครบ 4 ชั่วโมง นำชิ้นฟันไปแช่ใน DMEM ที่มี antibiotic-antimycotic solution 10% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อฆ่าจุลินทรีย์ที่อาจติดมากับรากฟัน ล้างด้วย DMEM ที่ไม่มี antibiotic-antimycotic solution อีกครั้งก่อนนำชิ้นรากฟัน ไปวางบน จานเพาะเลี้ยงเซลล์จานละ 4 ชิ้น โดยแยกตามกลุ่มทดลองในข้อ 3 จากนั้นย้ายเซลล์ที่ได้จากการทำซับคัลเจอร์ ครั้งที่ 5 ลงไปในจานเพาะเลี้ยงที่มีชิ้นรากฟันอยู่ ด้วยความเข้มข้น 100,000 เซลล์ใน 1.0 มิลลิลิตรของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 5) เก็บเซลล์ไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. การเตรียมชิ้นรากฟันสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเซลล์บนชิ้นรากฟัน ทำการดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างชิ้นรากฟันในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นจึงแช่ชิ้นรากฟันใน 2.5% กลูตาร์อัลดีไฮด์ใน 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างชิ้นรากฟันด้วย 0.1 M PB pH 7.2 ก่อนที่จะแช่ต่อใน 2% ออสเมียมเตตรอกไซด์ใน 0.1 M PB pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย PB อีกครั้งก่อนทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยการแช่ตัวอย่างในเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่มีความเข้มข้น 35, 50, 70, 95, 100 และ100% ตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่นาน 15 นาทีในแต่ละความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ นำชิ้นตัวอย่างไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) ก่อนที่จะนำชิ้นรากฟันไปยึดติดบนแท่นทองเหลือง (stub) และเคลือบผิวตัวอย่างด้วยอนุภาคทอง (gold particle) จากนั้นศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; JEOL JSM-5410 LV, Japan)

ภาพที่ 5 ภาพถ่ายแสดงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ที่มีชิ้นรากฟันจำแนกตามกลุ่มที่ทดลอง (C หมายถึง กลุ่มควบคุม ; D หมายถึง กลุ่มที่อุดด้วยวัสดุไดแรกต์เอพี ; G หมายถึงกลุ่มที่อุดด้วยวัสดุเยริสโทร์)


C
D
G

7. การศึกษาลักษณะและนับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ศึกษาผิวรากฟันในกลุ่มควบคุมและที่ผิวของวัสดุอุดไดแรกต์เอพีและเยริสโทร์ที่เตรียมไว้ตามข้อที่ 6 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แล้วถ่ายภาพเซลล์บนผิวรากฟันโดยกำหนดบริเวณที่จะถ่ายภาพของพื้นผิวที่จะทำการศึกษาออกเป็น 4 ส่วน ทำการถ่ายภาพแต่ละส่วน ๆ ละ 1 ภาพ ที่กำลังขยาย 200 เท่า ฉะนั้นในแต่ละพื้นผิวที่ศึกษาจะถ่ายภาพทั้งหมด 4 ภาพ (ภาพที่ 6A) นับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยมีหลักเกณฑ์ในการนับจำนวนเซลล์ดังนี้คือ ให้นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในขอบเขตของรูปภาพ ส่วนเซลล์ที่อยู่บริเวณขอบเขตของรูปภาพ ให้นับเฉพาะขอบบน และขอบด้านซ้ายของภาพ (ภาพที่ 6B) ค่าที่ได้ในแต่ละส่วนคือจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ ชิ้นรากฟัน 1 ชิ้นจะได้ทั้งหมด 4 ค่า ดังนั้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง จะได้ค่าจากการนับทั้งหมด 16 ค่าต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผู้ป่วย 1 คน

ทำการศึกษาซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4 ถึง 7 อีก 3 ครั้ง โดยในแต่ครั้งใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของเนื้อเยื่อผู้ป่วยไม่ซ้ำรายกัน

บันทึกข้อมูลและรวบรวมจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ยึดเกาะบนชิ้นรากฟันและบนพื้นผิววัสดุอุดแต่ละกลุ่ม โดยแบ่งเป็นเซลล์ที่ยึดเกาะดี ที่ยึดเกาะไม่ดี และที่ยึดเกาะทั้งหมด

8. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

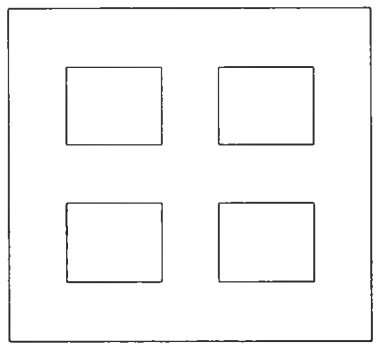
วิเคราะห์ผลจากความแตกต่างของผู้ป่วยและความแตกต่างของกลุ่มทดลอง ว่ามีผลต่อจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงสองทาง (Two Way Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (One Way Analysis of Variance) และหาความแตกต่างแต่ละกลุ่มย่อย โดยใช้เกณฑ์ที่พิจารณาเลือกใช้ตามความเหมาะสมทางสถิติดังนี้

หากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแต่ละกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จะเลือกใช้ Scheffe test เนื่องจากเป็นการทดสอบที่ให้ความแม่นยำสูง แต่หากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแต่ละกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จะเลือกใช้ Tamhane test เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบที่ใช้ได้ดีในกรณีที่ความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างมีความแตกต่างกัน[56] เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลองดังกล่าว

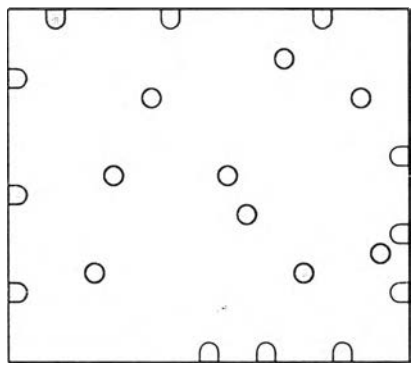
ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดง

A: การกำหนดบริเวณที่ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดบนพื้นผิวที่ต้องการศึกษา 4 บริเวณบนแต่ละชิ้นรากฟัน

B: หลักเกณฑ์การนับจำนวนเซลล์ โดยจะนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในขอบเขตของภาพ เซลล์ที่อยู่บริเวณขอบของภาพ ให้นับเฉพาะขอบบนและขอบด้านซ้ายของภาพ จากตัวอย่างนี้สามารถนับได้ทั้งหมด 15 เซลล์



A



B