บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากร

ประชากรเป็นแผ่นชิ้นเนื้อ (sections) หนา 7 ไมโครเมตร ซึ่งตัดผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบนซี่แรก ซึ่งจัดเตรียมจากหนูวิสตาร์

กลุ่มตัวอย่าง

ประกอบด้วยแผ่นชิ้นเนื้อซึ่งตัดผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบนซี่แรกทุกแผ่น ตั้งแต่เริ่มพบรากใกล้แก้มใกล้กลางตามลำดับในแนวใกล้แก้มใกล้ลิ้น

วิธีรวบรวมข้อมูล

1. จัดหนูวิสตาร์ เพศผู้ซึ่งเพิ่งหย่านมอายุ 30 วัน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดเข้าอยู่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยวิธีสุ่มจำนวนกลุ่มละ 6 ตัว

2. บันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนเริ่มทดลอง หลังจากนั้นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สิ่งแวดล้อมเดียวกัน คือ

2.1 ได้รับอาหารปราศจากฟลูออไรด์ ไม่จำกัดปริมาณ

2.2 น้ำดื่ม

กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่นไม่จำกัดปริมาณ

กลุ่มทดลอง ได้รับน้ำกลั่นผสมโซเดียมฟลูออไรด์ 10 ส่วนในล้านส่วน ไม่จำกัดปริมาณ

3. ภายหลังการเลี้ยงดูเป็นเวลา 30 วัน บันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวอีกครั้งก่อนใส่สปริงชนิดเกลียวปิดเพื่อเคลื่อนที่ฟันกรามบนซ้ายซี่แรกมาทางด้านหน้าในสัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่ม ส่วนฟันกรามบนด้านตรงข้ามซึ่งไม่ได้รับแรงเคลื่อนฟันใช้เป็นด้านควบคุมสำหรับสัตว์ทดลองแต่ละตัว โดยอาศัยฟันหน้าเป็นหลักยึด รายละเอียดในการยึดเครื่องมือเคลื่อนฟันมีดังนี้

3.1 ใช้ไอระเหยอีเทอร์อบให้หนูสลบ ตรึงหนูในลักษณะนอนหงายบนแผ่นกระดาน

3.2 เจาะฟันหน้าใกล้ขอบเหงือกในแนวใกล้กลางไกลกลาง จากด้านไกลกลางของฟันหน้าซ้ายทะลุด้านไกลกลางของฟันหน้าขวาด้วยหัวกรอเหล็กไร้สนิมหมายเลข 001

3.3 ตัดสปริงชนิดเกลียวปิดขนาด 0.009 x 0.030 นิ้ว ยาว 7 มิลลิเมตร ใช้คีมตัดลวดมัดฟันคีบในตำแหน่งห่างจากปลายลวดข้างละ 1 มิลลิเมตร เพื่อให้เกิดช่องสำหรับร้อยลวดมัดฟัน

3.4 สอดลวดมัดฟันขนาด 0.010 นิ้ว ผ่านใต้จุดสัมผัสระหว่างฟันกรามบนซ้ายซี่แรก และซี่ที่สอง มัดปลายลวดมัดฟันกับสปริงชนิดเกลียวปิดด้วยคีมมัดลวด

3.5 สอดลวดมัดฟันขนาด 0.010 นิ้ว อีกเส้นเข้ากับสปริงชนิดเกลียวปิดอีกด้าน ร้อยปลายลวดผ่านฟันหน้าที่เจาะเตรียมไว้ มัดให้สปริงยืดออก 0.4 มิลลิเมตร จากความยาวเดิม 5 มิลลิเมตร ความยาวของสปริงที่เพิ่มขึ้นวัดด้วยเวอร์เนียร์ซึ่งอ่านได้ละเอียด 0.1 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ขนาดแรงเคลื่อนฟัน 40 กรัม (ทัศนีย์ บัณฑราภิวัฒน์, 2529)

4. ในวันที่ 5 ของการเคลื่อนฟัน ใช้ไอระเหยของอีเทอร์อบให้หนูเสียชีวิตตัดหัวหนูและแยกส่วนขากรรไกรบนแช่ในน้ำยาฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 วัน นำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมแผ่นชิ้นเนื้อ ดังนี้

4.1 ตัดกระดูกขากรรไกรบนด้านซ้ายและขวาออกเป็น 2 ส่วน ในแนวกึ่งกลางเพดาน ขอบเขตด้านใกล้กลางห่างจากผิวด้านใกล้กลางของฟันกรามบนซี่แรก 5 มิลลิเมตร และตัดให้ชิ้นเนื้อหนาประมาณ 7 มิลลิเมตร ทุกระนาบตั้งฉากกัน นำชิ้นเนื้อไปแช่กรดไนตริก 5 เปอร์เซนต์ (5% Nitric acid) เปลี่ยนกรดไนตริกใหม่ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อกำจัดสารแคลเซียม (decalcification) ทำให้ชิ้นเนื้ออ่อนตัวลง ชิ้นเนื้อต้องปราศจากแคลเซียม โดยทำการทดสอบดังต่อไปนี้

4.1.1 ผสมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ (5% Ammonium hydroxide) 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรกับแอมโมเนียมออกซาเลท 5 เปอร์เซนต์ (5% Ammonium oxalate) 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ได้น้ำยา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 ใช้น้ำยาในข้อ 4.1.1 จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับกรดไนตริก ซึ่งยังคงใช้แช่ชิ้นเนื้อจำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมเป็น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 15-30 นาที ถ้าสารละลายที่ผสมกันขุ่น แสดงว่าสารแคลเซียมในชิ้นเนื้อยังไม่หมดต้องเปลี่ยนกรดไนตริกใหม่ และแช่ชิ้นเนื้อในกรดไนตริกต่ออีก 1 วัน นำมาทดสอบแบบเดิมอีก จนสารละลายผสมไม่ขุ่น แสดงว่าสารแคลเซียมถูกกำจัดหมด

4.1.3 เมื่อกำจัดสารแคลเซียมหมด นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปา 30 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

4.1.4 นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 1 คืน

4.2 การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อฝังในแท่งแพระฟินโดยการกำจัดน้ำภายในชิ้นเนื้อเพื่อให้สารแพระฟินเข้าไปแทนที่ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.2.1 นำชิ้นเนื้อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ดังต่อไปนี้

- แอลกอฮอล์	70 เปอร์เซนต์	1	คืน
- แอลกอฮอล์	80 เปอร์เซนต์	2	ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์	95 เปอร์เซนต์ (I)	1	ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์	95 เปอร์เซนต์ (II)	1	ชั่วโมง
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I)		2	ชั่วโมง

- แอลกอออล์บริสุทธิ์ (II) 2 ชั่วโมง
- แอลกอออล์บริสุทธิ์ (III) 1 ชั่วโมง

4.2.2 วิธีการที่ทำให้สารแพระฟินสามารถเข้าแทนที่ในชิ้นเนื้อทำได้โดย

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

หลังจากนั้นนำไปแช่สารละลายต่อไปนี้ ในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ได้แก่

- ไดออกแซนผสมแพระฟิน 1 ชั่วโมง
- แพระฟิน (I) 1 ชั่วโมง
- แพระฟิน (II) 1 ชั่วโมง
- แพระฟิน (III) 1/2 ชั่วโมง

4.2.3 นำชิ้นเนื้อออกจากตู้อบจัดวางบนถาดเหล็กไร้สนิม ขนาด 1 1/2 นิ้ว x 1 นิ้ว โดยให้ด้านใกล้แก้มของฟันกรามวางแนบกับพื้นถาดแล้วเทแพระฟินเหลวจนเต็มถาด ปิดทับด้วยกรอบพลาสติกซึ่งมีแกนสำหรับยึดกับเครื่องมือตัดเนื้อ (microtome) เทแพระฟินลงในกรอบให้เต็มทิ้งไว้ให้เย็น ก็จะได้ชิ้นเนื้อฝังในแท่งแพระฟิน

4.3 การตัดแผ่นชิ้นเนื้อ นำแท่งแพระฟินที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่ตรงกลาง ตัดด้วยเครื่องมือตัดเนื้อหนา 7 ไมโครเมตร โดยตัดอย่างเรียงตามลำดับ (serial section) จากด้านใกล้แก้มจนกระทั่งไม่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามซี่แรกทางด้านใกล้ลิ้น และนำแผ่นชิ้นเนื้อครั้งละ 5 แผ่นซึ่งเรียงติดต่อกันลอยในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนแผ่นชิ้นเนื้อยืดตัวออกมีขนาดเท่าปกติ วางแผ่นชิ้นเนื้อเหล่านี้บนสไลด์ที่ทาไข่ขาวที่ได้เตรียมไว้ซับให้แห้งด้วยผ้าสะอาด ทำเช่นนี้จนหมดจำนวนแผ่นชิ้นเนื้อที่ได้ตัดไว้ แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

4.4 ย้อมแผ่นชิ้นเนื้อด้วยสีแอริสฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน (Harris Hematoxylin and Eosin) โดยนำสไลด์ที่มีแผ่นชิ้นเนื้อแช่ในสารละลาย และสีย้อมต่อไปนี้ตามเวลาที่ กำหนด

- ไซลอล (Xylol)(I)	5	นาที
- ไซลอล (II)	5	นาที
- ไซลอล (III)	5	นาที
- แอลกอออล์บริสุทธิ์	5	นาที
- แอลกอออล์ 95 เปอร์เซนต์	3	นาที
- แอลกอออล์ 80 เปอร์เซนต์	3	นาที
- แอลกอออล์ 70 เปอร์เซนต์	3	นาที
- น้ำกลั่น	3	นาที
- แอริสอีมาท็อกซิลิน	6-8	นาที
- จุ่มล้างในน้ำประปา	4-6	ครั้ง
- จุ่มในกรดแอลกอออล์ 1 เปอร์เซนต์	1-2	ครั้ง
- จุ่มในน้ำผสมแอมโมเนีย	3-6	ครั้ง
- น้ำประปา	3	นาที
- แอลกอออล์ 70 เปอร์เซนต์	3	นาที
- แอลกอออล์ 80 เปอร์เซนต์	3	นาที
- อีโอซิน	3-6	นาที
- จุ่มล้างในแอลกอออล์ 95 เปอร์เซนต์ (I)	5-6	ครั้ง
- แอลกอออล์ 95 เปอร์เซนต์ (II)	1	นาที
- แอลกอออล์ 95 เปอร์เซนต์ (III)	2	นาที
- แอลกอออล์บริสุทธิ์ (I)	2	นาที
- แอลกอออล์บริสุทธิ์ (II)	2	นาที
- ไซลอล (I)	5	นาที
- ไซลอล (II)	5	นาที
- ไซลอล (III)	5	นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

5. ตรวจแผ่นชิ้นเนื้อที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มตั้งแต่แผ่นที่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่แรกจนหมดรากฟันดังกล่าว นับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์และเซลล์ออสติโอคลาสท์ เริ่มจากยอดกระดูกเบ้าฟันไปยังกระดูกบริเวณปลายรากฟันซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความหนารากฟัน (รูปที่ 8) นับจำนวนเซลล์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้เกณฑ์ตามข้อตกลงเบื้องต้น การนับจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิดมีวิธีการแตกต่างกัน เนื่องจากขนาดและจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองชนิดต่างกัน ดังนี้

5.1 การนับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ เพื่อหลีกเลี่ยงการนับจำนวนเซลล์ซ้ำซ้อน เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 21 ไมโครเมตร ขณะที่แผ่นชิ้นเนื้อแต่ละแผ่นมีความหนา 7 ไมโครเมตร จึงได้ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกลำดับที่ 3 ขั้นตอนในการคัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อเพื่อนำมานับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ เป็นดังนี้

5.1.1 จัดเรียงแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์ทั้งหมดตามลำดับก่อนหลังของการตัด คัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งกึ่งกลางนับเป็นลำดับที่หนึ่ง

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

5.1.3 แผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งถัดจากแผ่นชิ้นเนื้อลำดับที่หนึ่งลงไปทางด้านใกล้ลิ้น เป็นลำดับที่ 3, 6, 9, ... จนหมดรากฟันทางด้านใกล้ลิ้น

5.1.4 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละแผ่นชิ้นเนื้อ นำมาหาค่าเฉลี่ยมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 7 ไมโครเมตร

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

5.2.1 ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกแผ่นเริ่มจากแผ่นที่พบรากฟันใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่แรกทางด้านใกล้แก้มลงไปทางด้านใกล้ลิ้น จนสิ้นสุดรากฟันดังกล่าว

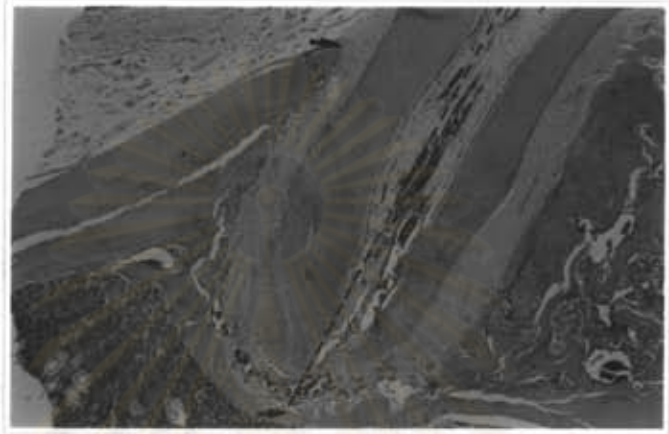
5.2.2 สเก็ตภาพ ฟัน ช่องว่างปริทันต์ และขอบเขตของกระดูกเบ้าฟันซึ่งปรากฏในกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

5.2.3 ใช้กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกตำแหน่งเซลล์ออสติโอคลาสท์ลงบนขอบเขตกระดูกเบ้าฟันที่สเก็ตไว้ พร้อมบันทึกจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ออสติโอคลาสท์แต่ละตัว

5.2.4 ศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อถัดไปด้วยวิธีในข้อ 5.2.2 และ 5.2.3 หากพบเซลล์ออสติโอคลาสท์ซ้ำในตำแหน่งขอบเขตกระดูกเบ้าฟันเดียวกันให้เลือกนับเฉพาะเซลล์มีจำนวนนิวเคลียสสูงสุด ส่วนเซลล์ที่มีนิวเคลียสน้อยกว่าให้ทำเครื่องหมายกากบาท และไม่นับเซลล์นั้น

5.2.5 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละแผ่นชิ้นเนื้อ ซึ่งได้ตัดเซลล์ที่ซ้ำออกแล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ยมีหน่วยเป็นเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 7 ไมโครเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดงขอบเขตการนับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์และออสติโอคลาสท์ โดยเริ่มจากยอดกระดูกเบ้าฟัน (ลูกศรชี้) ไปยังกระดูกบริเวณปลายรากซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความหนารากฟัน (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 32 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวแปรของการวิจัย

1. ตัวแปรอิสระ (Independent Variables)
   - 1.1 ฟลูออไรด์
   - 1.2 แรงเคลื่อนฟัน
2. ตัวแปรตาม (Dependent Variables)
   - 2.1 เซลล์ออสติโอบลาสท์
   - 2.2 เซลล์ออสติโอคลาสท์