บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย

- ประชากรเป็นภาพรังสีกะโหลกศีรษะด้านข้างของหนูวิสตาร์ทั้ง 2 กลุ่มอายุ
- แผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดตามยาว (longitudinal) ผ่านฟันกรามทั้ง 3 ซี่ ทั้งในด้านควบคุมและด้านทดลองของหนูทั้ง 2 กลุ่มอายุ

ประชากรตัวอย่าง

- ประกอบด้วยภาพรังสีกะโหลกศีรษะด้านข้างของหนูวิสตาร์ทั้ง 2 กลุ่มอายุ โดยพิจารณาเฉพาะหนูตัวที่ยังคงมียางแยกฟันอยู่ระหว่างฟันกรามบนซี่แรกและซี่ที่สอง เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์
- แผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดผ่านบริเวณกึ่งกลางฟันกรามบนซี่แรก โดยเลือกจากแผ่นชิ้นเนื้อของหนูตัวที่อยู่ในเกณฑ์ กล่าวคือ ยังคงมียางแยกฟันอยู่ระหว่างฟันกรามบนซี่แรกและซี่ที่สอง เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แผ่นชิ้นเนื้อที่ทำมาศึกษานี้มีลักษณะผ่านกึ่งกลางฟันกรามบนซี่แรก โดยส่วนตัวฟันตัดผ่านแนวกึ่งกลางของโพรงประสาทฟัน ผ่านง่ามรากฟัน และรากฟันมีลักษณะยาวที่สุด

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์ในการเตรียมสารเคมี ได้แก่ เครื่องชั่งสาร, เทอร์โมมิเตอร์, ขวดรูปชมพู่, กระบอกแก้วตวงสาร, บีกเกอร์, hot plate & stirrer, magnetic stirrer, กรวยแก้ว, แท่งแก้วคนสาร, กระดาษกรองและ pH meter
2. อุปกรณ์ในการเตรียมฉีดสารเข้าสู่หัวใจหนู ได้แก่ ชุดสายน้ำเกลือ, ถาดแสตนเลส, กรรไกรผ่าตัด, เข็มแทงน้ำเกลือ, ด้ามมีดและมีดผ่าตัด (disposable blade No.15)
3. อุปกรณ์ในการให้แรงเคลื่อนฟัน ยางแยกฟันขนาด 3/16 นิ้ว 2 ออนซ์ หนา 0.65 มิลลิเมตร ของบริษัท Ormco Corporation ส้อมขนาดเล็กที่บากส่วนปลายเพื่อใช้ในการใส่ยาง

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นชิ้นเนื้อ ได้แก่ เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ยี่ห้อ Spencer รุ่น 820 สหรัฐอเมริกา, อ่างน้ำอุ่น (waterbath), เทอร์โมมิเตอร์ , พู่กัน, hot plate, incubator, สไลด์แก้ว (glass slide) และกระจกคลุม (coverslip)
5. ลูกเหล็กกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.18 มิลลิเมตร
6. ดิจิเมติก คาลิปเปอร์ (digimatic caliper)
7. เครื่องถ่ายภาพรังสีในช่องปาก (GenDex Co. Model 46-158800G4)
8. เครื่องล้างฟิล์มอัตโนมัติ (Dent-X Processor Operation)
9. ฟิล์มถ่ายภาพรังสีในช่องปาก ชนิดออกคลูซอล (occlusal film) ขนาด 57x76 มิลลิเมตร ยี่ห้อโกดัก (Kodak DF49, สหรัฐอเมริกา)
10. โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการวัดจากภาพถ่าย (Image Pro Plus)
11. เครื่องสแกนเนอร์ (color image scanner) ยี่ห้อ Epson Perfection 3200 Photo ใช้ร่วมกับระบบคอมพิวเตอร์ (computer)
12. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
13. สารเคมี ได้แก่
    - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate buffer saline)
    - สารละลายฟอร์มาดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer)
    - สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.9% NaCl in water)
    - สารที่สามารถดึงเอาแคลเซียมอิออนออกจากเนื้อเยื่อ ได้แก่ กรดเอทีลิน ไดเอมีน เตตรา อะซีติก: อีดีทีเอ (Ethylene-diamine tetra-acetic acid: EDTA) โดยเลือกใช้ชนิดเตตราโซเดียม (4Na EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 และมี pH 7.4
    - สารละลายที่ใช้ในการเตรียมชิ้นเนื้อฝังในแท่นพาราฟิน ได้แก่ เอทานอล 100% (absolute ethanol), ไซลีน (xylene) และพาราฟิน (paraffin)
    - สีฮีมาทอกซิลินและอิโอซิน (hematoxylin and eosin), กรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol), น้ำผสมแอมโมเนีย (ammonia water) และเพอเมาท์ (permount)
    - TRAP Solution (ตามวิธีของ Burstone, 1958) โดยใช้ naphtol AS-MX phosphate (Sigma) เป็น substrate และใช้ Fast Red Violet LB salt (Sigma) สำหรับการทำ colour reaction ที่ pH 5.4 ด้วย 50 mM sodium tartrate หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น (distilled water) และ counterstain ด้วย methyl green

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. จัดหาหนูวิสตาร์เพศผู้ซึ่งมี 2 ช่วงอายุ จากสถาบันวิจัยสัตว์ทดลองแห่งชาติ เข้ากลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม ดังนี้

   กลุ่มที่ 1 มีการสร้างรากฟันยังไม่สมบูรณ์ หนูมีอายุประมาณ 9 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว

   กลุ่มที่ 2 มีการสร้างรากฟันสมบูรณ์ หนูมีอายุประมาณ 15 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนเริ่มการทดลอง

3. นำหนูทั้ง 2 กลุ่ม มาดำเนินการใส่ยางขนาด 3/16 นิ้ว 2 ออนซ์ หนา 0.65 มิลลิเมตร ระหว่างฟันกรามบนซี่แรกและซี่ที่สองทางด้านขวา (ตามการทดลองของ Waldo and Rothblatt, 1954) เพื่อให้เกิดการเคลื่อนฟันแบบทิปปิง (tipping movement) รายละเอียดของการใส่เครื่องมือมีดังนี้

   3.1 ใช้ไอระเหยอีเทอร์ (ether) อบหนูให้สงบ จากนั้นจึงฉีดสารเพนโตบาร์บิทอล (pentobarbital) เข้าภายใต้เยื่อบุผนังช่องท้อง (intraperitonium) โดยใช้ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อให้หนูสลบ แล้วตรึงหนูในลักษณะนอนหงายบนแผ่นกระดาน

   3.2 นำยางที่จะทำการใส่มาขึงให้ตึงด้วยส้อมขนาดเล็กที่บากส่วนปลาย เพื่อใช้ในการใส่ยาง ทำการใส่ระหว่างฟันกรามบนซี่แรก และซี่ที่สองทางด้านขวา แล้วตัดยางให้พอดีกับขนาดซอกฟัน จัดเป็นด้านทดลอง (experiment side) ส่วนทางด้านซ้ายให้จัดเป็นด้านควบคุม (control side)

4. หลังจากให้แรง 14 วัน ในหนูกลุ่มอายุ 9 สัปดาห์ ให้นำยางแยกฟันออก แล้วดำเนินการเลี้ยงต่อไปจนถึงอายุ 15 สัปดาห์ แล้วจึงทำให้เสียชีวิต ส่วนหนูกลุ่มอายุ 15 สัปดาห์ ให้ดำเนินการทำให้เสียชีวิตโดยไม่ต้องนำยางออก มีรายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มทดลองและระยะเวลาการทดลอง

Age(wks)	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	จำนวน
Incomplete		⮟		⮝				♥			8 ตัว
Complete								⮟		♥	6 ตัว

⮟ Elastic band insertion

⮝ Elastic band removal

♥ Perfusion

4.1 ชั่งและบันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนทำการวางยาสลบ เพื่อนำมาใช้คำนวณปริมาณยาสลบ

4.2 วางยาสลบหนู โดยการดมสารระเหยอีเทอร์ร่วมกับฉีดสารเพนโตบาร์บิทอลเข้าภายใต้เยื่อบุผนังช่องท้อง (intraperitonium) เมื่อหนูสลบแล้ว จึงตรึงหนูในลักษณะนอนหงายบนแผ่นกระดาน แล้วจึงเปิดช่องอกเพื่อเป็นทางเข้าสู่หัวใจ โดยทำการยกกระดูกซี่โครงและไดอะแฟรม (diaphragm) ขึ้นอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันภาวะเลือดออกอย่างมาก (excessive bleeding)

4.3 ทำการไล่เลือดออก โดยสอดเข็มซึ่งนำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 เข้าสู่หัวใจห้องล่างด้านซ้าย (left ventricle) ถึงหลอดเลือดเออร์ตา (aorta) แล้วตัดหัวใจห้องบนขวา (right atrium) เพื่อเป็นทางออกของสารละลาย จนกระทั่งสารละลายที่ออกมามีลักษณะใส และอวัยวะที่มีเลือดไปเลี้ยงมาก ได้แก่ ตับ ไต ปอด เปลี่ยนสี จากสีแดงเป็นสีเทาขาว จึงหยุดการให้สารดังกล่าว

4.4 ทำการตรึงเนื้อเยื่อ (fixed tissue) ด้วยการนำสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สังเกตปฏิกิริยาของกล้ามเนื้อขาหน้า ขาหลัง ศีรษะ หาง ถ้าได้ผลดี จะมีอาการสั่น รอจนปฏิกิริยานั้นสิ้นสุดลง ให้สารต่อไปอีก 30 นาที สังเกตเห็นสัตว์มีลักษณะแข็ง (stiff) จึงหยุดการให้สาร

5. ตัดแยกศีรษะออกมา แบ่งกะโหลกศีรษะซ้ายและขวาเป็น 2 ส่วน ในแนวกึ่งกลาง แช่ในสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์
6. นำกะโหลกศีรษะที่ตัดออกมา ทั้งด้านซ้ายและขวามาวางบนฟิล์มชนิดออกคลูซอลพร้อมกับลูกกลมเหล็ก ทำการถ่ายภาพรังสีกะโหลกศีรษะทางด้านข้างด้วยเครื่องถ่ายรังสีในช่องปาก ใช้ปริมาณรังสี 50 kVp 10 mA ระยะจากแหล่งกำเนิดแสงถึงวัตถุคงที่ คือ 60 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 5 วินาที แล้วล้างด้วยเครื่องล้างฟิล์มอัตโนมัติ
7. ทำการสแกนฟิล์ม ด้วยเครื่องสแกนเนอร์ (color image scanner) ยี่ห้อ Epson Perfection 3200 Photo กำหนดค่าความละเอียดในการสแกนแต่ละครั้งที่ 9600 ดีพีไอ ดังภาพที่ 14

แอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate) เพื่อแสดงว่าสารแคลเซียมอิออนถูกกำจัดหมด (วิจิตราและคณะ, 2545)

12. เตรียมชิ้นเนื้อฝังในแท่งพาราฟิน โดยกำจัดน้ำภายในชิ้นเนื้อ เพื่อให้สารพาราฟินเข้าไปแทนที่ ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

12.1 นำชิ้นเนื้อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้

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

12.2 วิธีการที่ทำให้สารพาราฟินสามารถเข้าแทนที่ในชิ้นเนื้อ มีวิธีการดังนี้

- แช่ชิ้นเนื้อในไซลีน (I)	เป็นเวลานาน	30	นาที
- แช่ชิ้นเนื้อในไซลีน (II)	เป็นเวลานาน	30	นาที
- แช่ชิ้นเนื้อในไซลีน (III)	เป็นเวลานาน	30	นาที
- ไซลีนผสมพาราฟิน (I)	เป็นเวลานาน	1	ชั่วโมง
- พาราฟิน (II)	เป็นเวลานาน	1	ชั่วโมง
- พาราฟิน (III)	เป็นเวลานาน	1	ชั่วโมง

12.3 นำชิ้นเนื้อออกจากตู้อบ จัดวางบนถาดเหล็กไร้สนิม โดยให้ระนาบด้านบดเคี้ยวขนานกับพื้นถาด แล้วเทพาราฟินเหลวจนเต็มถาด ทิ้งไว้ให้เย็น ทำเครื่องหมายด้านใกล้แก้มเพื่อจะใช้เป็นตำแหน่งในการยึดด้านดังกล่าวเข้าหาแท่งไม้

13. การตัดแผ่นชิ้นเนื้อ นำแท่งพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่ตรงกลางมาตัดด้วยเครื่องมือตัดเนื้อเยื่อหนา 7 ไมโครเมตร โดยตัดอย่างเรียงลำดับ (serial section) ในแนวตั้ง (longitudinal) จากด้านใกล้ลิ้นจนกระทั่งพบรากด้านไกลกลางของฟันกรามบนซี่แรกและรากด้านใกล้กลางของฟันกรามบนซี่ที่สอง นำแผ่นชิ้นเนื้อครั้งละ 4 แผ่น ซึ่งเรียงติดต่อกัน ลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส จนแผ่นชิ้นเนื้อยืดตัวออกมีขนาดเท่าปกติ วางแผ่นชิ้นเนื้อเหล่านี้บนสไลด์แก้วที่ทาไข่ขาว ซับให้แห้งด้วยผ้าสะอาด ทำเช่นนี้จนไม่สามารถมองเห็นรากฟันกรามบนซี่แรกในกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อที่ได้ตัดไว้แล้วไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที

14. ทำการย้อมแผ่นชิ้นเนื้อด้วยสี แฮรีสฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Harris hematoxylin and eosin) โดยนำสไลด์แก้วที่มีแผ่นชิ้นเนื้อแช่ในสารละลายและสีย้อมตามเวลาที่กำหนด ดังนี้

- ไซลีน (I), ไซลีน (II) และไซลีน (III)	อย่างละ	2 นาที
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I), (II) และ (III)	อย่างละ	2 นาที
- น้ำกลั่น	เป็นเวลานาน	2 นาที
- แฮรีสฮีมาทอกซิลิน	เป็นเวลานาน	20-30 วินาที
- จุ่มล้างในน้ำประปา	4-5 ครั้ง	
- จุ่มในกรดแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1	1-2 ครั้ง	
- จุ่มในน้ำผสมแอมโมเนีย	4-5 ครั้ง	
- น้ำประปา	เป็นเวลานาน	2 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70	เป็นเวลานาน	2 นาที
- แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 80	เป็นเวลานาน	2 นาที
- อีโอซิน	เป็นเวลานาน	20-30 วินาที
- จุ่มล้างในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95	4-5 ครั้ง	
- แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I), (II) และ (III)	อย่างละ	2 นาที
- ไซลีน (I), ไซลีน (II) และไซลีน (III)	อย่างละ	2 นาที

15. ปิดทับแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์แก้วด้วยกระจกคลุม โดยอาศัยเพอเมาท์ เป็นตัวกลางในการยึดติด จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที

16. ตรวจแผ่นชิ้นเนื้อที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เลือกศึกษาแผ่นสไลด์ที่ตัดผ่านบริเวณกึ่งกลางฟันกรามบนซี่แรก โดยเลือกจากแผ่นชิ้นเนื้อที่มีส่วนตัวฟันตัดผ่าน ส่วนโพรงประสาทฟัน ผ่านง่ามรากฟัน และรากฟันมีลักษณะยาวที่สุด บริเวณที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ รากฟันด้านไกลกลางของฟันกรามบนซี่แรก ง่ามรากฟันกรามบนซี่แรก รวมทั้งกระดูกเบ้าฟันและอวัยวะปริทันต์โดยรอบ บันทึกลักษณะที่สังเกตได้ บางส่วนของแผ่นชิ้นเนื้อจะทำการย้อมด้วย tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) ตามวิธีของ Burstone (Burstone, 1958) โดยใช้ naphtol AS-MX phosphate (Sigma) เป็น substrate และใช้ Fast Red Violet LB salt (Sigma) สำหรับการทำ colour reaction ที่ pH 5.4 ด้วย 50 mM sodium tartrate หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น (distilled water) และ counterstain ด้วย methyl green เพื่อพิสูจน์ว่าเซลล์ที่อยู่ในบริเวณดังกล่าว เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการละลาย (clast cell) ซึ่งเซลล์เหล่านี้ จะย้อมติดสีแดง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตัวแปรของการวิจัย

ตัวแปรอิสระ (Independent variables) : ระยะการสร้างรากฟัน

ตัวแปรตาม (Dependent variables) : ความยาวฟันกรามบนซี่แรก

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การวัดแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง (ค่าเฉลี่ย) การวัดการกระจาย (ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ค่าต่ำสุดและสูงสุดของข้อมูล
2. ใช้สถิติวิเคราะห์ ได้แก่
   2.1 *สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์* เพื่อดูความสัมพันธ์ของการวัดความยาวฟันในแต่ละครั้ง ก่อนที่จะนำค่าที่ได้จากการวัดนั้นมาหาค่าเฉลี่ย ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์นี้จะไม่มีหน่วย มีค่าสูงสุดเป็น 1 และต่ำสุดเป็น -1 จึงสามารถใช้วัดความสัมพันธ์ของการวัดแต่ละครั้ง (โดยเปรียบเทียบเป็นคู่ๆ ได้แก่ หาความสัมพันธ์ของการวัดครั้งที่ 1 และ 2 หาความสัมพันธ์ของการวัดครั้งที่ 2 และ 3 และหาความสัมพันธ์ของการวัดครั้งที่ 1 และ 3) หากค่านี้มีค่าเข้าใกล้ 1 หมายถึง สัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์กันมาก ถ้าค่านี้เป็น 0 หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์กัน และหากค่านี้เข้าใกล้ -1 หมายถึง สัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม และมีความสัมพันธ์กันมาก
   2.2 *Mann-Whitney U Test* เป็นการทดสอบทางนอนพาราเมตริก (nonparametric test) ใช้แทน Paired T-Test เนื่องจากมีขนาดกลุ่มตัวอย่างเล็ก ไม่แน่ใจว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ เป็นการทดสอบข้อมูล 2 ชุด ว่ามีค่ากลางอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันหรือไม่ โดยใช้เปรียบเทียบความยาวฟันของด้านควบคุมและด้านทดลอง ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05
   2.3 *Kolmogorov-Smirnov Z* เป็นการตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลว่าเป็นแบบปกติหรือไม่ เนื่องจากการทดสอบทางพาราเมตริก (parametric test) โดยใช้ Paired T-Test มีเงื่อนไขว่า ตัวแปรที่จะนำมาวิเคราะห์ จะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05
   2.4 *Paired T-Test* เป็นการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย 2 ประชากรแบบจับคู่ เมื่อทดสอบการแจกแจงของข้อมูลแล้ว จึงทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยความยาวฟันระหว่างด้านควบคุมและด้านทดลองของหนูตัวเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05