บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากร

ประชากรเป็นแผ่นชิ้นเนื้อ (sections) หนา 7 ไมโครเมตร ซึ่งตัดผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งด้านซ้ายและขวา ซึ่งจัดเตรียมจากหนูวิสตาร์

กลุ่มตัวอย่าง

ประกอบด้วยแผ่นชิ้นเนื้อซึ่งตัดผ่านรากใกล้แก้มใกล้กลาง และอวัยวะปริทันต์ของฟันกรามบน-ซี่ที่หนึ่งทุกแผ่น ตั้งแต่เริ่มพบรากใกล้แก้มใกล้กลาง ตามลำดับในแนวใกล้แก้มใกล้ลิ้น

รวบรวมข้อมูล

1. จัดหนูวิสตาร์เพศผู้ ซึ่งมีอายุ 9 เดือน จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จัดเข้าอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยวิธีสุ่มจำนวนกลุ่มละ 3 ตัว รวมเป็น 6 ตัว

2. บันทึกน้ำหนักตัวของหนูทุกตัวก่อนเริ่มทดลองทุกตัว

3. นำหนูกลุ่มที่ 1 ทั้ง 3 ตัว มาใส่แผ่นยางกั้นน้ำลายขนาดความหนา 0.2 มิลลิเมตร เพื่อแทนยางแยกฟัน ระหว่างฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งและซี่ที่สองทั้งด้านซ้ายและขวา ฉีดไอจี-เอฟ-I เข้าใต้ชั้นเยื่อบุด้านแก้ม บริเวณรากฟันใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งด้านซ้าย ปริมาณ 12 ไมโครกรัม และฉีดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.15 โมล/ลิตร บริเวณเดียวกันในฟันกรามบนซี่แรกด้านขวา รายละเอียดสำหรับการฉีดสาร และใส่ยางแยกฟันมีดังนี้

3.1 ใช้ไอระเหยอีเทอร์อบให้หนูสลบ ตรึงหนูในลักษณะนอนหงายบนแผ่นกระดาน

3.2 ใช้แผ่นยางแยกฟันขนาดความหนา 0.2 มิลลิเมตร และสอดให้ผ่านด้านประชิดของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งและสองทั้งด้านซ้ายและขวา ให้อยู่ระหว่างด้านประชิดของฟันทั้งสองซี่นี้

3.3 ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 28 ฉีดเข้าใต้ชั้นเยื่อบุด้านแก้ม บริเวณฟันกรามซี่แรกที่รากฟันใกล้แก้มใกล้กลางทั้งสองด้าน โดยสารต่างชนิดกันดังกล่าวข้างต้น

4. นำหนูกลุ่มที่ 2 ทั้ง 3 ตัว มาดำเนินการด้วยวิธีการตามข้อ 3.1 และ 3.3

5. เมื่อครบ 3 วันแล้วในวันที่ 4 ใช้ไอระเหยของอีเทอร์อบให้หนูเสียชีวิต ตัดหัวหนูและแยกส่วนขากรรไกรบน แช่ในน้ำยาฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 วัน นำไปผ่านขั้นตอนในการเตรียมแผ่นชิ้นเนื้อดังนี้ :-

5.1 ตัดกระดูกขากรรไกรบนด้านซ้ายและขวาออกเป็น 2 ส่วนในแนวกึ่งกลางเพดาน ขอบเขตด้านใกล้กลางห่างจากผิวด้านใกล้กลางของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่ง 5 มิลลิเมตร และตัดให้ชิ้นเนื้อหนาประมาณ 7 มิลลิเมตร ทุกระนาบตั้งฉากกัน นำชิ้นเนื้อไปแช่กรดไนตริก 5 เปอร์เซนต์ (5% nitric acid) เปลี่ยนกรดไนตริกใหม่ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อกำจัดสารแคลเซี่ยม (decalcification) ทำให้ชิ้นเนื้ออ่อนตัวลงและปราศจากแคลเซี่ยม โดยทำการทดสอบดังต่อไปนี้:-

5.1.1 ผสมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ (5% ammonium hydroxide) 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ได้น้ำยา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

5.1.2 ใช้น้ำยาในข้อ 5.1.1 ปริมาตร 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับกรดไนตริก ซึ่งยังคงใช้แช่ชิ้นเนื้อปริมาตร 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมเป็น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 15-30 นาที ถ้าสารละลายที่ผสมกันขุ่น แสดงว่า สารแคลเซี่ยมในชิ้นเนื้อยังไม่หมด ต้องเปลี่ยนกรดไนตริกใหม่ และแช่ชิ้นเนื้อในกรดไนตริกต่ออีก 1 วัน นำมาทดสอบแบบเดิมอีก จนสารละลายผสมไม่ขุ่น แสดงว่า สารแคลเซี่ยมถูกกำจัดหมด

5.1.3 เมื่อกำจัดสารแคลเซี่ยมหมด นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปา 30 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำยาฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

5.1.4 นำชิ้นเนื้อไปผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5.2 การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อฝังในแท่งแพระฟิน โดยการกำจัดน้ำภายในชิ้นเนื้อเพื่อให้สารแพระฟินเข้าไปแทนที่ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้:-

5.2.1 นำชิ้นเนื้อไปแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ตามลำดับในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ดังต่อไปนี้ :-

-แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ 12 ชั่วโมง
-แอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซนต์ 2 ชั่วโมง
-แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ (I) 1 ชั่วโมง
-แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ (II) 1 ชั่วโมง
-แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (I) 2 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (II) 2 ชั่วโมง

-แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (III) 1 ชั่วโมง

5.2.2 วิธีการที่ทำให้สารแพระฟิน สามารถเข้าแทนที่ในชิ้นเนื้อทำได้โดย

-แช่ชิ้นเนื้อในไดออกแซน (Dioxan) (I) 12 ชั่วโมง

-ไดออกแซน (II) 1 ชั่วโมง

-ไดออกแซน (III) 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำไปแช่สารละลายต่อไปนี้ ในตู้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ได้แก่

-ไดออกแซนผสมแพระฟิน 1 ชั่วโมง

-แพระฟิน (I) 1 ชั่วโมง

-แพระฟิน (II) 1 ชั่วโมง

-แพระฟิน (III) 1/2ชั่วโมง

5.2.3 นำชิ้นเนื้อออกจากตู้อบจัดวางบนถาดเหล็กไร้สนิมขนาด 1 1/2 นิ้ว x 1 นิ้ว โดยให้ด้านใกล้แก้มของฟันกรามวางแนบกับพื้นถาด แล้วเทแพระฟินเหลวจนเต็มถาด ทับด้วยกรอบพลาสติกซึ่งมีแกนสำหรับยึดกับเครื่องมือตัดเนื้อ (microtome) เทแพระฟินลงในกรอบให้เต็มทิ้งไว้ให้เย็น ก็จะได้ชิ้นเนื้อฝังในแท่งแพระฟิน

5.3 การตัดแผ่นชิ้นเนื้อนำแท่งแพระฟิน ที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่ตรงกลาง ตัดด้วยเครื่องมือหนา 7 ไมโครเมตร โดยตัดอย่างเรียงตามลำดับ (serial section) จากด้านใกล้แก้ม จนกระทั่งไม่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามซี่ที่หนึ่งทางด้านใกล้ลิ้น และนำแผ่นชิ้นเนื้อครั้งละ 5 แผ่น ซึ่งเรียงติดต่อกันลอยในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จนแผ่นชิ้นเนื้อยืดตัวออกมีขนาดเท่าปกติ วางแผ่นชิ้นเนื้อเหล่านี้บนสไลด์ทำเช่นนี้จนหมด นำแผ่นชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ตัดได้ ไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5.4 ย้อมแผ่นชิ้นเนื้อด้วยสีแฮริสฮีมาท็อกซิลินและอีโอซิน โดยนำสไลด์ที่มีแผ่นชิ้นเนื้อแช่ในสารละลาย และสีย้อมต่อไปนี้ตามเวลาที่กำหนด

-ไซลอล (Xylol) (I) 5 นาที

-ไซลอล (II) 5 นาที

-ไซลอล (III) 5 นาที

-แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 5 นาที

-แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ 3 นาที

-แอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซนต์ 3 นาที

-แอลกอฮลอ์ 70 เปอร์เซนต์ 3 นาที

-น้ำกลั่น	3 นาที
-เฮริสฮีมาท็อกซิลิน	3 - 6 นาที
-จุ่มล้างในน้ำประปา	4 - 6 นาที
-จุ่มในกรดแอลกอฮอร์ 1 เปอร์เซนต์	1 - 2 ครั้ง
-จุ่มในน้ำผสมแอมโนเนีย	3 - 6 ครั้ง
-น้ำประปา	3 นาที
-แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์	3 นาที
-แอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซนต์	3 นาที
-อีโอซีน	3 - 6 นาที
-จุ่มน้ำในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์(I)	5 - 6 นาที
-แอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซนต์ (II)	1 นาที
-แอลกอฮอร์ 80 เปอร์เซนต์ (III)	2 นาที
-แอลกอฮอร์บริสุทธิ์ (I)	2 นาที
-แอลกอฮอร์บริสุทธิ์ (II)	2 นาที
-ไซลอล (I)	5 นาที
-ไซลอล (II)	5 นาที
-ไซลอล (III)	5 นาที

5.5 ปิดทับแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์ด้วยกระจกคลุม (coverglass) ขนาด 25 มิลลิเมตร x 60 มิลลิเมตร โดยอาศัยเพอเมาท์ (permount) เป็นตัวยึดติด นำไปอบในตู้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที

6. ตรวจแผ่นชิ้นเนื้อที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มตั้งแต่แผ่นที่พบรากใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งจนหมดรากฟันดังกล่าว นับจำนวนออสติโอบลาสท์และออสติโอลาสท์ เริ่มจากยอดกระดูกเบ้าฟันไปยังกระดูกบริเวณปลายรากฟัน ซึ่งตรงกับเส้นแบ่งครึ่งความหนารากฟัน นับจำนวนเซลล์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้เกณฑ์ตามข้อตกลงเบื้องต้น การนับจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิดมีวิธีการแตกต่างกัน เนื่องจากขนาดและจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองชนิดต่างกัน ดังนี้:-

6.1 การนับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ เพื่อหลีกเลี่ยงการนับจำนวนเซลล์ซ้ำซ้อน เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 21 ไมโครเมตร ขณะที่แผ่นชิ้นเนื้อแต่ละแผ่นมีความหนา 7 ไมโครเมตร จึงได้ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกลำดับที่ 3 ขั้นตอนการคัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อ เพื่อนำมานับจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสท์ดังนี้

6.1.1 จัดเรียงแผ่นชิ้นเนื้อบนสไลด์ทั้งหมดตามลำดับก่อน/หลังของการตัด คัดเลือกแผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งกึ่งกลางนับเป็นลำดับที่หนึ่ง

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

6.1.3 แผ่นชิ้นเนื้อที่มีตำแหน่งถัดจากแผ่นชิ้นเนื้อลำดับที่หนึ่งขึ้นไปทางด้านใกล้ลิ้น เป็นลำดับที่ 3,6,9 ..... จนหมดรากฟันทางด้านใกล้ลิ้น

6.1.4 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละแผ่นชิ้นเนื้อ นำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 7 ไมโครเมตร

6.2 การนับจำนวนเซลล์ออสติโอคลาสท์ เนื่องจากเซลล์ออสติโอคลาสท์มีขนาดไม่แน่นอน (ประมาณ 21-126 ไมโครเมตร) เพื่อป้องกันการนับเซลล์ซ้ำ จึงกำหนดวิธีการนับเซลล์ต่างจากข้อ 6.1 โดย

6.2.1 ทำการศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อทุกแผ่นเริ่มจากแผ่นที่พบรากฟันใกล้แก้มใกล้กลางของฟันกรามบนซี่ที่หนึ่งทางด้านใกล้แก้มลงไปทางด้านใกล้ลิ้นจนสิ้นสุดรากฟันดังกล่าว

6.2.2 สเก็ตภาพฟัน ช่องว่างปริทันต์ และขอบเขตของกระดูกเบ้าฟันซึ่งปรากฏในกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

6.2.3 ใช้กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกตำแหน่งออสติโอคลาสท์ลงบนขอบเขตของกระดูกเบ้าฟันที่สเก็ตไว้ พร้อมบันทึกจำนวนนิวเคลียสของเซลล์ออสติโอคลาสท์แต่ละตัว

6.2.4 ศึกษาแผ่นชิ้นเนื้อถัดไปด้วยวิธีในข้อ 6.1.2 และ 6.1.3 หากพบออสติโอคลาสท์ซ้ำในตำแหน่งของขอบเขตกระดูกเบ้าฟันเดียวกัน ให้เลือกนับเฉพาะเซลล์จำนวนนิวเคลียสสูงสุด ส่วนเซลล์ที่มีนิวเคลียสน้อยกว่าให้ทำเครื่องหมายกากบาทและไม่นับเซลล์นั้น

6.2.5 บันทึกจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละแผ่นชิ้นเนื้อ ซึ่งได้ตัดเซลล์ที่ซ้ำออกแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อความหนากระดูกเบ้าฟัน 7 ไมโครเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวแปรของการวิจัย

1.ตัวแปรอิสระ (independent variables)

1.1 ไอจีเอฟ-I

1.2 แรงเคลื่อนฟัน

2.ตัวแปรตาม (dependent variables)

2.1 ออสติโอบลาสท์

2.2 ออสติโอคลาสท์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย