บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์ในการทดลอง

1. เลื่อยไฟฟ้า (Black & Decker ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. ใบเลื่อยเบอร์ 25 (Black & Decker ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. ตัวยึดกระดูก
4. ถุงมือ
5. กล้องจุลทรรศน์ (AxioCam Camera Carl Zeiss ประเทศเยอรมันนี)
6. โปรแกรม Axio Vision 4.8.2
7. กระดูกสุนัข
8. กระดูกมนุษย์

3.2 สารเคมีในการทดลอง

1. 10% Formalin
2. 10% nitric acid
3. 95% Alcohol
4. Isopropyl alcohol
5. Xylene
6. Paraplast
7. Harris's hematoxylin
8. 1% Acid alcohol
9. Lithium Carbonate solution
10. 1% Eosin Y
11. Absolute alcohols
12. น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

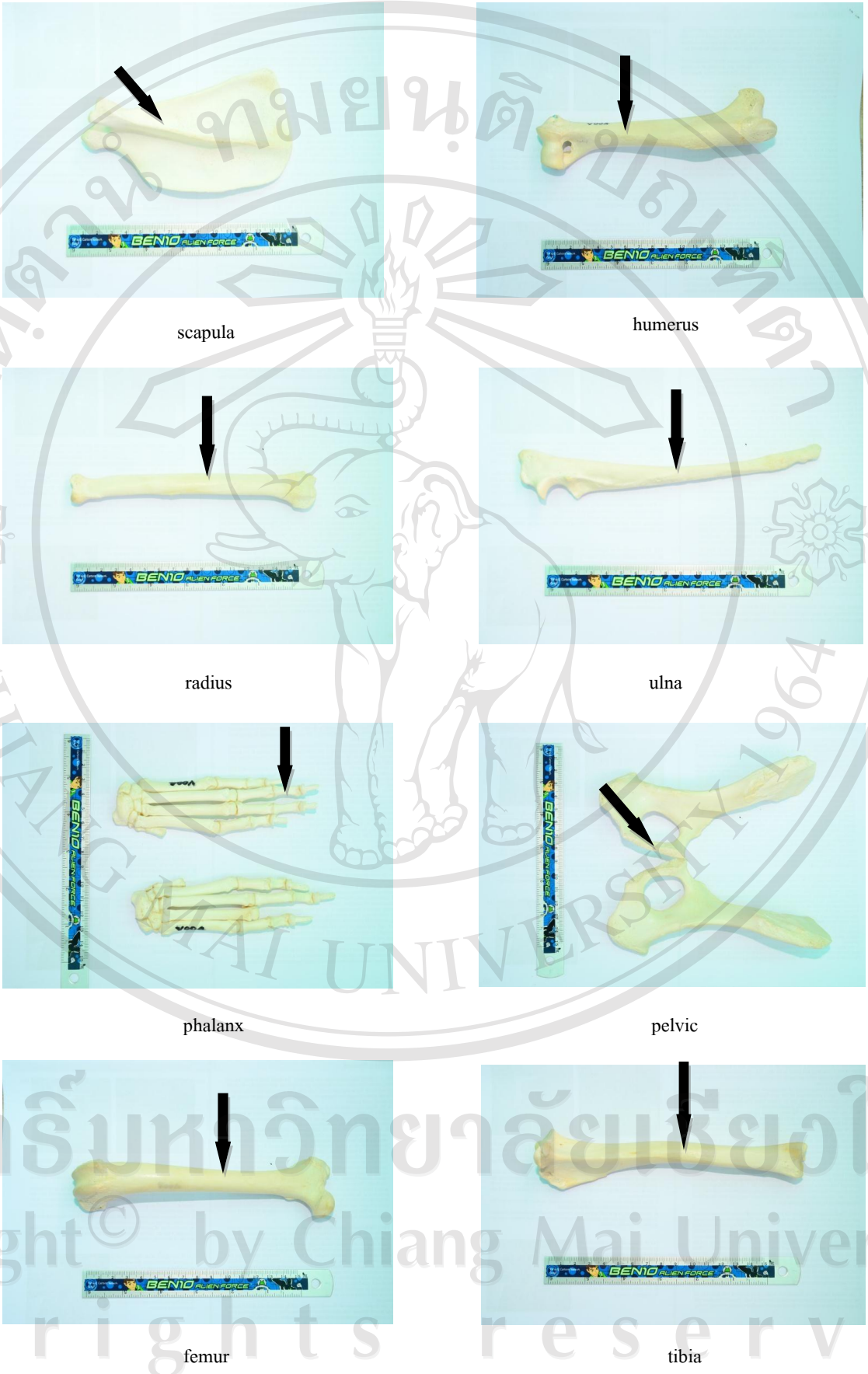
3.3 การเก็บตัวอย่างกระดูกของสัตว์เลี้ยงสุนัขและมนุษย์

กระดูกสุนัขที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยบริการซากสัตว์เพื่อการศึกษา การวิจัย และการฝึกทักษะผ่าตัด ทางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์ และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเป็นกระดูกสุนัขสายพันธุ์โกลเด้นรีทรีฟเวอร์จำนวนทั้งสิ้น 7 ตัว แบ่ง สุนัขโตเต็มวัยเพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 1 ตัว และไม่ทราบเพศอีก 2 ตัว ลูกสุนัข เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 1ตัว (การที่ระบุจำนวนตัวอย่างเป็นเช่นนี้เนื่องจากข้อจำกัดของตัวอย่างกระดูกที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยผู้วิจัยไม่ต้องการให้มีปัจจัยเรื่องของสายพันธ์เข้ามารบกวนการแปลผล จึงเลือกพันธุ์โกลเด้นรีทรีฟเวอร์ เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างค่อนข้างครบถ้วนกว่าสายพันธุ์อื่นๆ) และได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นกระดูกมนุษย์จำนวน 2 คน เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ โดยกระดูกที่ใช้ในการศึกษาจะเลือกกระดูกที่เป็นกระดูกขนาดใหญ่ เนื่องจากกระดูกเหล่านี้จะมีการเสื่อมสลายไปในธรรมชาติช้ากว่ากระดูกขนาดเล็ก จึงทำให้มักพบเศษกระดูกเหล่านี้คงเหลือในที่เกิดเหตุ โดยกระดูกที่เลือกศึกษาประกอบด้วยกระดูกยาว (long bone) และกระดูกแบน (flat bone) โดยใช้กระดูกจาก 8 ตำแหน่ง ได้แก่ scapula, humerus, radius, ulna, phalanx, pelvic, femur และ tibia

3.4 การตัดชิ้นส่วนกระดูกเพื่อนำมาทำสไลด์

นำกระดูกแต่ละชิ้นมาทำการยึดด้วยแท่นยึด จากนั้นใช้เลื่อยไฟฟ้า ตัดลงไปที่ตำแหน่งตรงกลางของกระดูก โดยกำหนดจุดตัดตรงกลางกระดูกทุกชิ้น ตัดกระดูกให้มีลักษณะคล้ายลูกเต๋า ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการทำสไลด์ decalcified

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



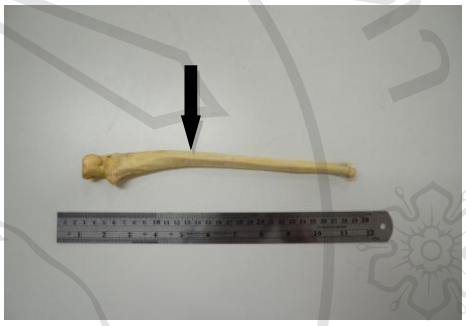
รูปที่ 3.1 ภาพถ่ายแสดงตำแหน่งของการตัดชิ้นส่วนกระดูกสุนัข (ที่ปลายลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

scapula

humerus

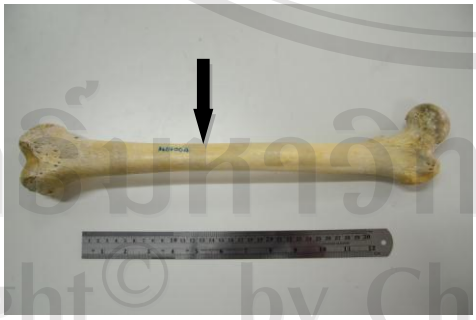
radius



ulna

phalanx

pelvic



femur

tibia

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3.2 ภาพถ่ายแสดงตำแหน่งของการตัดชิ้นส่วนกระดูกมนุษย์ (ที่ปลายลูกศรชี้)

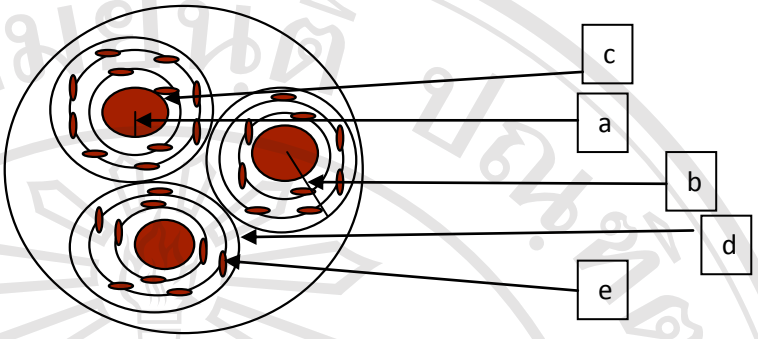
3.5 การทำสไลด์กระดูกแบบเอาแคลเซียมออก

ในการทำสไลด์อ้างอิงวิธีการโดย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อธิบายโดยย่อ เริ่มจากนำชิ้นกระดูกที่ตัดแล้วมาแช่ใน 10% formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลายเอาแคลเซียมออก (decalcified) ด้วยการแช่ใน 10% nitric acid เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจากนั้นจึงนำมาแช่ใน10% formalin 1 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนสารเคมีจำนวน 2 ครั้ง และนำไปแช่ต่อใน 95% alcohol 1 ชั่วโมง และทำการเปลี่ยนน้ำยา 3 ครั้ง ตามด้วยการนำไปแช่ต่อใน isopropyl alcohol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง และนำไปแช่ใน xylene 1 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปแช่ใน paraplast1 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนน้ำยา 3 ครั้ง เมื่อชิ้นกระดูกเริ่มฝังตัวอยู่กับ paraffin จึงทำการตัดให้มีขนาด 5 ไมครอน แล้วจึงทำการเอา paraffin ที่ยึดอยู่กับชิ้นตัวอย่างออกโดย นำไปแช่ใน xylene และทำการดึงเอาน้ำออกโดยใช้ alcohol หลังจากนั้น นำชิ้นตัวอย่างที่ผ่านการตัดแล้ว ไปทำการย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที และนำไปเปิดน้ำให้ไหลผ่านอีก 5 นาที จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปผ่าน 1% acid alcohol 5 วินาที และล้างผ่านน้ำ 5 นาที ตามด้วยการนำไปจุ่มใน lithium carbonate solution 5 วินาที และล้างผ่านน้ำ 5 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมสีด้วย 1% eosin Y นาน 3 นาที และนำไปเปิดน้ำให้ไหลผ่านอีก 5 นาที สุดท้ายนำตัวอย่างไปทำการดึงน้ำออกอีกครั้งด้วยการนำไปผ่าน 95% alcohol และ absolute alcohols แล้วทำให้สไลด์มีความใสด้วยการใช้ xylene และทำการปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์

3.6 ทำการวัดขนาดโครงสร้างในเนื้อกระดูก

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการวัดขนาดของ haversian canal, haversian system และ นับจำนวนของ canaliculi เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ของ AxioCam Camera Carl Zeis และโปรแกรม Axio Vision 4.8.2 ช่วยในการวัด ตำแหน่งที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบไประกอบด้วย (รูปที่ 1)ความยาวรัศมีของ haversian canal ความยาวรัศมีของ harversian system โดยวัดจาก harversian canal ถึงวงนอกสุดของ lacunae ความยาวเส้นรอบวงของ haversian canal ความยาวเส้นรอบวงของ harversian และ จำนวน osteocytes ในแต่ละ harversian system

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3 - 3 ภาพวาดจำลองลักษณะของ ระบบท่อภายในเนื้อกระดูก และตำแหน่งบางจุดที่ใช้วัด a=ความยาวรัศมีของ haversian canal b=ความยาวรัศมีของ harversian system โดยวัดจาก harversian canal ถึงวงนอกสุดของ lacunae c=ความยาวเส้นรอบวงของ haversian canal d=ความยาวเส้นรอบวงของ harversian system e=จำนวน osteocytes ในแต่ละ harversian system

3.7 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดทั้งหมดนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ Independent sample t-test และ One – Way ANOVA (Games – Howell) โดยใช้โปรแกรม SPSS (15) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติในหัวข้อดังต่อไปนี้

- ความแตกต่างระหว่างกระดูกแต่ละชิ้น ในสุนัขช่วงอายุเดียวกัน ใช้การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี One – Way ANOVA (Games – Howell)
- ความแตกต่างในกระดูกตำแหน่งเดียวกัน ในสุนัขต่างช่วงอายุ ใช้การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Independent sample t-test
- ความแตกต่างในกระดูกตำแหน่งเดียวกัน ระหว่าง สุนัขโตเต็มวัย และมนุษย์ ใช้การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Independent sample t-test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved