บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การคัดเลือกผู้ป่วย (patient selection)

3.1.1 คัดเลือกอาสาสมัครจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) จำนวน 20 คน, กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis) จำนวน 20 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุกราน (aggressive periodontitis) จำนวน 10 คน โดยมีหลักเกณฑ์ในการเลือกผู้ป่วยดังนี้

- โรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) (Carranza, 2002)
  - พบขอบเหงือกมีลักษณะบวมน้ำ ผิวเหงือกไม่พบ stripping และมีสีแดง หรือสีแดงคล้ำ กดนิ่ม ในกรณีที่เป็นเหงือกอักเสบเรื้อรัง (chronic gingivitis) อาจจะพบลักษณะแข็ง และแน่น
  - มีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing; BOP)
  - ระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ไม่ถูกทำลาย และคงอยู่ที่รอยต่อเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน
- โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic periodontitis) มีลักษณะดังนี้ (Newman, 2002)
  - มักพบในผู้ป่วยที่อยู่ในวัยผู้ใหญ่ แต่สามารถพบได้ในวัยเด็ก หรือวัยหนุ่มสาว
  - ปริมาณการทำลายอวัยวะปริทันต์มักขึ้นกับการพบปัจจัยเฉพาะที่ เช่น หินน้ำลาย
  - สัมพันธ์กับการติดเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด
  - มีอัตราการดำเนินโรคแบบช้า ๆ แต่อาจพบว่ามีการดำเนินโรคแบบรวดเร็วได้
  - ปัจจัยเฉพาะที่ (local factors) ปัจจัยทางระบบ (systemic factors) หรือปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environment factors) มีผลต่ออัตราการดำเนินโรค
- โรคปริทันต์อักเสบชนิดรุกราน (aggressive periodontitis) มีลักษณะดังนี้ (Newman, 2002)
  - มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์ และกระดูกเบ้าฟันอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณการสะสมคราบจุลินทรีย์ ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค
- พบลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม
- โดยสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ดังนี้
    - กรณีที่เป็นแบบเฉพาะที่ (localized aggressive periodontitis)
        - โรคนี้จะเกิดในช่วงวัยเจริญพันธ์
        - มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ที่ฟันตัดหน้า และ/ หรือฟันกรามแท้ซี่ที่ 1 และอาจจะพบการทำลายฟันแท้ซี่อื่น ๆ ได้ แต่ไม่เกิน 2 ซี่
    - กรณีที่เป็นแบบทั่วปาก (generalized aggressive periodontitis)
        - มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี หรืออาจจะพบในผู้ป่วยอายุมากกว่า 30 ปีได้
        - พบมีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์ที่ฟันตัดหน้า และฟันกรามแท้ซี่ที่ 1 รวมทั้งฟันแท้ซี่อื่น ๆ อย่างน้อย 3 ซี่ หรือมากกว่า

3.1.2 กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่นำมาศึกษา ได้แก่

- ผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อม โรคข้อรูห์มาตอยด์ และโรคกระดูกพรุน
- ผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาก่อนที่จะตรวจโดยการใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe)
- ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาภายใน 3 เดือนที่ผ่านมา ทั้งยาสเตียรอยด์ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressants)
- ผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบ และมีภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยง (risk factor) ของโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ โรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการควบคุม และการสูบบุหรี่
- ผู้ป่วยที่เป็นสตรีมีครรภ์

3.2 การคัดเลือกบริเวณที่จะศึกษา (site selection)

จำแนกบริเวณที่จะทำการศึกษาออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ โดยมีเกณฑ์ในการจำแนกดังนี้

- ตำแหน่งที่ไม่เป็นโรค (normal sites or healthy sites) มีลักษณะดังนี้
    - เหงือกมีลักษณะปกติ เมื่อประเมินด้วย Gingival Index (GI) (Löe, 1967) มีค่า GI $\leq$ 1 และไม่มีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์
- ตำแหน่งที่เป็นโรคเหงือกอักเสบ (gingivitis sites) มีลักษณะดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เหงือกอักเสบ บวม แดง เมื่อประเมินด้วย gingival index (Löe, 1967) มีค่า GI ≥ 2 และมีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์
- ไม่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์หรือกระดูกเบ้าฟัน

- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเล็กน้อย (slight periodontitis) มีลักษณะดังนี้
  - มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์เท่ากับ 1-2 มิลลิเมตร ร่วมกับมีร่องลึกปริทันต์อยู่ในระดับ 3-4 มิลลิเมตร
- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบปานกลาง (moderate periodontitis) มีลักษณะดังนี้
  - มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์เท่ากับ 3-4 มิลลิเมตร ร่วมกับมีร่องลึกปริทันต์อยู่ในระดับ 5-6 มิลลิเมตร
- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง (severe periodontitis) มีลักษณะดังนี้
  - มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป ร่วมกับมีร่องลึกปริทันต์มากกว่า 6 มิลลิเมตรขึ้นไป

โดยตำแหน่งที่นำมาศึกษาต้องมาจากฟันต่างซี่ และฟันแต่ละซี่ไม่อยู่ติดกัน เลือกตำแหน่งที่ลึกที่สุดของฟันซี่นั้น ๆ

3.3 การวัดลักษณะทางคลินิก

3.3.1 วัดลักษณะทางคลินิกดังต่อไปนี้

- ระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level; CAL) วัดจากจุดอ้างอิง คือ รอยต่อระหว่างเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction; CEJ) ถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์
- ร่องลึกปริทันต์ (probing depth; PD) ซึ่งวัดจากขอบเหงือก ถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์
- Gingival index (GI) (Löe, 1967) เพื่อประเมินสภาวะของเหงือกโดยมีเกณฑ์การวัดดังนี้
  - 0 = normal gingival
  - 1 = mild inflammation: slight change in color, slight edema, no bleeding on probing

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- 2 = moderate imflammation: redness, edema and glazing, bleeding on probing
- 3 = severe inflammation: marked redness and edema, ulceration, tendency to spontaneous bleeding

- การมีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (BOP) วัดโดย ใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์สอดลงไปในร่องลึกปริทันต์ด้วยแรง 25 กรัม สังเกตอาการเลือดออก หลังจากยกเครื่องมือตรวจปริทันต์ออกจากร่องเหงือกนาน 15 วินาที

3.3.2 ในการวัดลักษณะทางคลินิก จะใช้ผู้ตรวจสองคน โดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ที่มีขีดแบ่งทุก 1 มิลลิเมตร (UNC-15 probe) และใช้ตำแหน่งของรอยต่อระหว่างเคลือบฟันกับเคลือบรากฟันเป็นจุดอ้างอิง เพื่อให้เกิดความถูกต้องในการวัดตำแหน่งเดิม โดยถ้าเป็นตำแหน่งใกล้กลาง (mesial) หรือไกลกลาง (distal) จะวางแนวแกนของเครื่องมือตรวจปริทันต์ชิดกับจุดสัมผัส (contact point) แล้วขยับปลายเครื่องมือให้หยั่งลงไป จนถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์ ส่วนบริเวณกึ่งกลางฟันด้านใกล้แก้ม (buccal) หรือใกล้ลิ้น (lingual) จะให้แนวแกนของโพรบขนานกับแกนตามยาว (long axis) ของตัวฟัน

3.3.3 การปรับมาตรฐานการวัดค่าทางคลินิกของผู้ตรวจ (calibration of examiners) การหาค่ามาตรฐานจะทำการประเมิน 3 ระดับคือ

- ทำการปรับมาตรฐานการตรวจระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ของผู้ทำการวิจัย กับผู้เชี่ยวชาญทางสาขาวิชาปริทันตวิทยาที่มีประสบการณ์เป็นระยะเวลามากกว่า 5 ปี ในการตรวจวัดระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์
- การทดสอบความเที่ยง (reliability) ระหว่างผู้ตรวจสองคน (extra-examiner calibration) โดยจะยอมให้ค่าที่วัดได้ทั้งหมดมีความคลาดเคลื่อนภายใน 1 มิลลิเมตร จำนวนร้อยละ 90 ขึ้นไป (kappa 90 %)
- การทดสอบความเที่ยง (reliability) ในตัวของผู้ตรวจ (intra-examiner calibration) โดยจะยอมให้ค่าที่วัดได้ทั้งหมดมีความคลาดเคลื่อนภายใน 1 มิลลิเมตร จำนวนร้อยละ 90 ขึ้นไป (kappa 90 %)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง (sample collection)

- ในการเก็บตัวอย่างน้ำเหลืองเหงือกจากร่องลึกปริทันต์ จะเก็บภายหลังจากการตรวจลักษณะทางคลินิก และกำจัดสิ่งสะสมบนตัวฟัน เช่น คราบจุลินทรีย์ และหินน้ำลายเหนือเหงือก (supragingival plaque and calculus) ไปนาน 7-10 วัน เพื่อป้องกันมิให้มีการปนเปื้อนของเลือดลงไปในตัวอย่างน้ำเหลืองเหงือก
- กันน้ำลายบริเวณที่ต้องการจะเก็บของเหลวร่องเหงือกด้วยผ้าก๊อซ (gauze) และกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก โดยใช้ก้อนสำลี หรือคิวเรตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile cotton pellet or curette) โดยไม่ให้มีเลือดออก จากนั้นเป่าลมเบา ๆ ให้แห้ง
- สอดกระดาษซับขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อขนาดกว้าง 2 มม. ยาว 10 มม. (sterile Whatman® No.1 filter paper strip) ลงไปในร่องเหงือกของบริเวณที่เลือกไว้โดยขยับกระดาษซับให้ถึงจุดที่รู้สึกว่ามีแรงต้านปล่อยไว้นาน 30 วินาที
- ดึงกระดาษซับออกมาจากร่องเหงือก และตัดเอาเฉพาะปลายกระดาษซับที่เปียกชุ่มด้วยน้ำเหลืองเหงือก ให้มีขนาด 2x2 มม. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.แล้วเขียนชื่อผู้ป่วย ตำแหน่งฟัน และซี่ฟันที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วย วิธีอีไลซาในแต่ละครั้ง โดยใช้ control standard protein ที่ปรับค่าให้ใกล้เคียงกัน เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นในการตรวจด้วยวิธีอีไลซาแต่ละครั้ง

ภาพที่ 2 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การตรวจวัดคอนโดรอิตินซัลเฟตในน้ำเหลืองเหงือก

การตรวจวัดคอนโดรอิตินซัลเฟตในน้ำเหลืองเหงือก ใช้หลักการคอมเพททิทิพอีไลซา (competitive ELISA) ตรวจหาดับเบิ้ลยูเอฟซิกอิพิโทป โดย ในการวิเคราะห์ดับเบิ้ลยูเอฟซิกอิพิโทป จะใช้โปรติโอไกลแคน ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาฉลามเป็น coating antigen และ competitor ร่วมกับใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีดับเบิ้ลยูเอฟซิกอิพิโทปเป็น primary antibody และใช้ IgM-specific anti-mouse immunoglobulin ที่จับกับ peroxidase เป็น secondary antibody

ขั้นตอนการทำอีไลซาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีดับเบิ้ลยูเอฟซิกอิพิโทปมีวิธีการดังนี้

1. เคลือบ plates (Maxisorp®, Nunc) และละลายสารตัวอย่างก่อนการทดลอง 1 คืน มีขั้นตอนดังนี้
    - เตรียมสารที่ใช้เคลือบ plate (1 plate) โดยนำ A_1 shark (100 µl) ละลายใน coating buffer สำหรับ WF6 ที่ pH 9.6 (ปริมาณ 9,900 µl)
    - เคลือบ plates ปริมาณ 100 µl/well (เว้น A1, B1)
    - ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน
    - ละลายสารตัวอย่าง ใน PBS (Phosphate buffered saline) 300 µl/eppendorf (triplicate)
2. เช้าวันต่อมานำ plates ที่เคลือบไว้มาเขย่าประมาณ 20-30 วินาที แล้วล้างด้วย Tris-IB 150 µl/well 2-3 ครั้ง จากนั้น เป่าให้แห้ง
3. เตรียมสารที่จะใช้ block plate (1 plate) คือ 1%BSA (bovine serum albumin) โดยผสม BSA 0.16 g. กับ Tris-IB 16 mL จากนั้น block plate ด้วย 1% BSA ปริมาณ 150 µl/well แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ขณะที่รอ block plate ให้เตรียม mixture ของ standard และสารตัวอย่าง ดังนี้

การเตรียม standard

- นำ eppendorf 11 อัน (ยกเว้น eppendorf ที่ 2) มาใส่ PBS ปริมาณ 175 µl (ทำ triplicate)
- เตรียม A_1D_1 (Shark PG-A_1D_1 fraction: range 39.06-10,000 ng/ml) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เตรียมจาก A_1D_1 10 µl + PBS 1 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(1,000 µl) จากนั้นนำ A_1D_1 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml (10,000 ng/ml) เติมลงใน eppendorf ที่ 2 ปริมาณ 175 µl

- ทำ two fold dilution จาก eppendorf ที่ 3 – 11

การเตรียม sample

- นำ eppendorf จำนวนเท่ากับ sample ที่ต้องการตรวจ (24 อัน/1 plate) ใส่ sample ปริมาณ 175 µl (ถ้าไม่ dilute)
- ถ้าต้องการ dilute ให้ละลาย sample กับ PBS ดังนี้

  Ex. Dilute 2 เท่า ใส่ PBS = 87.5, sample = 87.5

  Dilute 5 เท่า ใส่ PBS = 140, sample = 35

- เตรียม WF-6 ที่ความเข้มข้น 1:100 (ใช้ ประมาณ 7,000 µl./1 plate) โดยเติม WF-6 70 µl. + Tris-IB 7 ml. ใส่ WF-6 ที่ความเข้มข้นดังกล่าวใน eppendorf ทุกอัน ๆ ละ 175 µl. แล้ว mixed well และทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 hrs.

5. นำ plate ที่ block ด้วย 1%BSA มาล้างด้วย Tris-IB 150 µl/well 3 ครั้ง (แต่ละครั้งเขย่าประมาณ 20-30 วินาที) แล้วเป่าให้แห้ง
6. เติม standard & สารตัวอย่างปริมาณ 100 µl/well โดยเติมจาก well ที่ 12,1,11-2 (จากความเข้มข้นน้อยไปมาก) จากนั้นทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ล้าง plate ด้วย Tris-IB 150 µl/well 3 ครั้ง (แต่ละครั้งเขย่าประมาณ 20-30 วินาที) แล้วเป่าให้แห้ง
8. เตรียม 2^{nd} antibody โดยผสม antibody กับ Tris-IB ดังนี้
   - Anti Mouse IgM peroxidase : Tris-IB

     6 µl : 12 ml = 1/ 2,000

   จากนั้นเติม conjugate Anti-IgM HRP (Horseradish peroxidase) ที่ dilute 1:2,000 ใน ปริมาณ 100/well ทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ล้าง plate ด้วย Tris-IB 150 µl/well 3 ครั้ง (แต่ละครั้งเขย่าประมาณ 20-30 วินาที) แล้วเป่าให้แห้ง
10. เตรียม substrate สำหรับ 1 plate ดังนี้

    ส่วนประกอบคือ

    - OPD (O-phenylene-diamine) 0.008 - 0.001 g
    - Citrat phosphate buffer 12 mL
    - H_2O_2 30 % (catalyse) 7 µ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมโดยใส่ OPD ผสมกับ Citrate phosphate buffer ให้เข้ากันดี จากนั้นเติม H_2O_2 ลงไปเร่งปฏิกิริยาระหว่าง เอนไซม์กับ substrate ให้เร็วขึ้น ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ในที่มืดนานประมาณ 1 นาที แล้วนำมาใส่ใน plate โดยเติม substrate 100 µl/well ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองสวย

Note : HRP จะถูก oxidize ด้วย H_2O_2 กลายเป็น oxidize HRP แล้ว oxodise substrate จะทำให้ substrate เปลี่ยนแปลงสี

11. เตรียมสารที่ใช้หยุดปฏิกิริยาคือ 4 M H_2SO_4 โดย ใช้ conc. H_2SO_4 23 mL ผสมน้ำกลั่น 77 mL หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 M H_2SO_4 ปริมาณ 50 µl/well
12. นำไปอ่านค่าโดยใช้ Titertek Multiskan M 340 multiplate reader ค่าดูดกลืนแสงที่ 492/690 นาโนเมตร

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- ตรวจสอบการกระจายของข้อมูล โดยใช้ Komolgorov-Smirnov one sample test
- เปรียบเทียบระดับคอนโดรอิตินซิกซัลเฟตในน้ำเหลืองเหงือกของแต่ละสภาวะปริทันต์ โดยใช้ Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance test ร่วมกับ Mann-Whitney U test
- หาความสัมพันธ์ของระดับคอนโดรอิตินซิกซัลเฟตในน้ำเหลืองเหงือกกับค่าตรวจวัดทางคลินิกที่ใช้ คือ ร่องลึกปริทันต์ และการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ โดยใช้วิธี Spearman rank order correlation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved