

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

กลุ่มศึกษา

คัดเลือกผู้ป่วยที่มีแผนการจัดฟัน ซึ่งต้องถอนฟันกรามน้อยที่อยู่ด้านตรงข้ามกันในขากรรไกรเดียวกันออกอย่างน้อย 2 ซี่ และยินยอมเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้โดยสมัครใจ โดยโครงการวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว ลักษณะของฟันกรามน้อยที่ใช้ในการศึกษาต้องไม่มีรอยผุ ไม่มีหินน้ำลายบนด้านบดเคี้ยว ไม่เคยเคลือบหลุมร่องฟันมาก่อน และไม่มีความผิดปกติของเคลือบฟัน จากนั้นใช้วิธีการสุ่ม (randomization) แบบจับสลากเพื่อแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพประกอบ 1) ดังนี้

กลุ่ม 1 (กลุ่มคลินิก): กลุ่มนี้ได้รับการเคลือบหลุมร่องฟันในคลินิกบนฟันกรามน้อย หลังเคลือบหลุมร่องฟันนาน 3-6 เดือน แล้วตรวจคุณภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทางคลินิกด้วยเครื่องมือตรวจฟันเอกซพลอเรอร์ ก่อนถอนฟันเพื่อนำมาทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาคโดยการย้อมด้วยสี แบ่งกลุ่มฟันที่ถอนออกมาแล้วโดยการสุ่ม เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม 1.1 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสี เบสิก ฟลูออไรด์ และกลุ่ม 1.2 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสี เมธิลิน บลู ระยะเวลาในการย้อมสีนาน 24 ชั่วโมง จำนวนตัวอย่างฟันของแต่ละกลุ่มย่อย เท่ากับ 22

กลุ่ม 2 (กลุ่มห้องปฏิบัติการ): ใช้ฟันกรามน้อยในขากรรไกรเดียวกันและอยู่ตรงข้าม (contra-lateral) กับฟันกลุ่ม 1 ในผู้ป่วยคนเดียวกัน นำมาเคลือบหลุมร่องฟันในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำฟันที่เคลือบหลุมร่องฟันแล้วไปผ่านการจำลองเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (thermocycling) ที่ 5 และ 55°C จำนวน 1,000 รอบ ก่อนนำมาทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาคโดยการย้อมด้วยสี แบ่งกลุ่มฟันที่ถอนออกมาแล้ว เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม 2.1 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสีเบสิก ฟลูออไรด์ และกลุ่ม 2.2 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสีเมธิลิน บลู ระยะเวลาในการย้อมสีนาน 24 ชั่วโมง จำนวนตัวอย่างฟันของแต่ละกลุ่มย่อย เท่ากับ 22

กลุ่ม 3 (กลุ่มควบคุมของกลุ่มคลินิก): กลุ่มนี้ใช้ฟันกรามน้อยตามข้อกำหนดเหมือนกับกลุ่ม 1 โดยฟันที่ต้องถอนไม่จำเป็นต้องอยู่ในขากรรไกรเดียวกัน กลุ่มควบคุมนี้มีการเคลือบหลุมร่องฟันในคลินิกแล้วจะถอนฟันทันที จากนั้นนำตัวอย่างฟันมาทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาคโดยการย้อมด้วยสี แบ่งกลุ่มฟันที่ถอนออกมาแล้ว เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม 3.1 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสี

เบสิก ฟุสซิน และกลุ่ม 3.2 - ย้อมตัวอย่างฟันด้วยสีเมธิลิน บลู นาน 24 ชั่วโมง ระยะเวลาในการย้อมสีนาน 24 ชั่วโมง จำนวนตัวอย่างฟันของแต่ละกลุ่มย่อย เท่ากับ 20

วิธีการเคลือบหลุมร่องฟัน

การเคลือบหลุมร่องฟันในกลุ่มคลินิก: ใส่แผ่นยางกันน้ำลายในขณะที่เคลือบหลุมร่องฟันเพื่อป้องกันความชื้นและการปนเปื้อนจากน้ำลาย จากนั้นทำความสะอาดผิวฟันโดยใช้หัวขัดยางและผงขัดฟิวมิสผสมน้ำ ใช้กรดฟอสฟอริกกัดผิวเคลือบฟันนาน 20 วินาที เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการยึดติดของสารเคลือบหลุมร่องฟันและฟัน ล้างกรดออกด้วยน้ำจนสะอาด และเป่าลมจนผิวเคลือบฟันแห้งซึ่งสังเกตได้จากเห็นผิวเคลือบฟันมีสีขาวขุ่น ก่อนท้าวัดเคลือบหลุมร่องฟัน Concise[®] (บริษัท 3M ประเทศไทย) บนผิวฟันที่เตรียมเสร็จแล้ว ทำให้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแข็งตัว (polymerization) ด้วยเครื่องฉายแสง Coltolux[®] 75 curing light (บริษัท 3M ประเทศไทย) นาน 40 วินาที เครื่องฉายแสงนี้ให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 430-505 นาโนเมตร และมีความเข้มแสง 800-1,000 mW/cm² ตรวจสอบและแก้ไขไม่ให้มีจุดสลับบนวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน และขีดผิวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันด้วยสำลีชุบน้ำ หลังจากเคลือบหลุมร่องฟันในคลินิกเรียบร้อยแล้ว ให้ผู้ป่วยใช้ฟันเคี้ยวอาหารตามปกติเป็นเวลา 3-6 เดือน เมื่อผู้ป่วยถอนฟันตามแผนการรักษาทางทันตกรรม จัดฟัน นำฟันที่ถูกถอนมาแช่ในน้ำกลั่นทันที และหลังจากล้างทำความสะอาดแล้วเก็บตัวอย่างฟันไว้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกวัน เป็นระยะเวลาไม่เกิน 1 เดือน จนกว่าจะนำไปทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาค

การเคลือบหลุมร่องฟันในกลุ่มห้องปฏิบัติการ: การเคลือบหลุมร่องฟันในห้องปฏิบัติการใช้วิธีเดียว กับการเคลือบหลุมร่องฟันในคลินิกแต่ไม่ต้องมีการกันน้ำลายด้วยแผ่นยางและการตรวจสอบจุดสลับบนวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน หลังจากเคลือบหลุมร่องฟันแล้วเก็บไว้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันก่อนนำฟันผ่านเครื่องเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อเนื่องกันเป็นจำนวน 1,000 รอบ ด้วยเครื่องจำลองการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (thermocycling machine: TC 600 KMIT; ลาดกระบัง ประเทศไทย) โดย 1 รอบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิคือ การแช่ตัวอย่างฟันในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 5 (±2)°C นาน 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 55 (±2)°C นาน 30 วินาที โดยมีเวลาพักระหว่างสองอุณหภูมินาน 15 วินาที จากนั้นเก็บฟันไว้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน ก่อนนำไปทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาคของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันต่อไป

การตรวจคุณภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทางคลินิก

การตรวจคุณภาพวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทางคลินิก ตรวจในเรื่อง การคงอยู่ (clinical retention) และความต่อเนื่องบริเวณขอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน (marginal integrity) โดยมีเกณฑ์การประเมิน ดังนี้

1. เกณฑ์การประเมินการคงอยู่ (clinical retention) ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน แบ่งระดับ

การคงอยู่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน เป็น 3 ระดับ คือ

ระดับ 0: วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันคงอยู่อย่างสมบูรณ์ (complete retention)

ระดับ 1: วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันคงอยู่บางส่วน (partial retention)

ระดับ 2: วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันหลุดหายไปทั้งหมด (total loss of retention)

2. เกณฑ์การประเมินประเมินความต่อเนื่องบริเวณขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน และเคลือบ

ฟัน (marginal integrity) แบ่งระดับความต่อเนื่องบริเวณขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟัน เป็น 2 ระดับ คือ

ระดับ 0: มีความต่อเนื่องบริเวณรอยต่อระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและเคลือบฟัน (marginal integrity)

ระดับ 1: มีความไม่ต่อเนื่องบริเวณรอยต่อระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและเคลือบฟัน (marginal disintegrity)

การตรวจความต่อเนื่องบริเวณขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟัน ทำได้โดยใช้เครื่องมือตรวจฟันเอ็กซ์พลอเรอร์ (explorer No.5; Hu-friedy®) ลากผ่านบริเวณรอยต่อของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและเคลือบฟันโดยรอบ เป็นลักษณะฟันปลา ประมาณ 20-25 ครั้ง และอาศัยความรู้สึกสัมผัส (tactile sense) ในการบ่งชี้ถึงความไม่ต่อเนื่องบริเวณขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและเคลือบฟัน (marginal disintegrity)

การทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาคด้วยสีเบสิก ฟุสซิน และสีเมธิลิน บลู

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาค แสดงในภาพประกอบ 2 ก่อนการทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาค ใช้น้ำยาทาเล็บชนิดใสทาผิวฟันในบริเวณที่ไม่มีวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน โดยทา 2 ชั้น ให้มีระยะห่างจากขอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน 1 มิลลิเมตรโดยรอบ เพื่อป้องกันการซึมผ่านของสีจากส่วนอื่นๆไปยังบริเวณที่ต้องการศึกษา ทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปยึดกับลวดด้วยขี้ผึ้งชนิดเหนียว (sticky wax) ก่อนนำตัวอย่างฟันไปย้อมสี (ภาพประกอบ 3a) ใน

สารละลายซีเบสิก ฟูลซิน ความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งละลายใน เอธิลอัลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (กลุ่ม 1.1, 2.1 และ 3.1) หรือสารละลายซีเมธิลิน บลู ความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งละลายในน้ำกลั่น (กลุ่ม 1.2, 2.2 และ 3.2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้เครื่องคนสารชนิดใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) (ภาพประกอบ 3b) จากนั้นกำจัดสีส่วนเกินออกด้วยการล้างน้ำ 5 วินาที (ภาพประกอบ 4) แล้วลอกน้ำยาทาเล็บ ก่อนนำฟันไปฝังในเรซินชนิดบ่มตัวเอง (ภาพประกอบ 5 และ 6) ตัดบล็อกฟัน 2 ครั้ง ในแนวแก้ม-ลิ้น (bucco-lingual) ของซี่ฟันและขนานกับแนวแกนของฟัน ด้วยเครื่องตัดกระดูก (EXAKT – Cutting grinding system 1993, EXAKT ประเทศเยอรมัน) ได้ชิ้นตัวอย่าง 3 ชิ้น (4 ด้านต่อซี่) (ภาพประกอบ 7) จากนั้นขัดฟันด้วยกระดาษทรายเบอร์ 1000 และ 1200 ตามลำดับ ล้างตัวอย่างฟันด้วยน้ำให้สะอาด และเก็บในน้ำกลั่น ก่อนนำมาประเมินการรั่วซึมระดับจุลภาคจากระยะทางการซึมผ่านของสีระหว่างรอยต่อของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟัน (ภาพประกอบ 8) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereomicroscope) ที่กำลังขยาย 25 เท่า

เกณฑ์ในการประเมินการรั่วซึมระดับจุลภาคของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน แบ่งระดับการแทรกซึมของสีเป็น 3 ระดับ (ภาพประกอบ 8) คือ

ระดับ 0: ไม่มีการซึมผ่านของสี

ระดับ 1: มีการซึมผ่านของสี เข้ามาระหว่างผิวเคลือบฟันและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ไม่ถึงส่วนที่ลึกที่สุดของหลุมร่องฟัน

ระดับ 2: มีการซึมผ่านของสีถึงส่วนที่ลึกที่สุดของหลุมร่องฟัน

การประเมินขนาดช่องว่างระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

สุ่มตัวอย่างจากชิ้นตัวอย่างที่มีระดับการติดสี เท่ากับ 0, 1 และ 2 อย่างละ 10 ด้าน รวมทั้งหมด 30 ด้าน เพื่อนำไปวัดขนาดช่องว่างระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

การเตรียมชิ้นตัวอย่างทำโดยวางชิ้นตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายใต้เครื่องดูดอากาศ (vacuum) อีก 5 นาที ก่อนนำมาเคลือบผิวตัวอย่างด้วยทอง โดยใช้เทคนิคสปัตเตอริง (sputtering coat) จากนั้นประเมินขนาดของช่องว่างระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟันโดยการวัดขนาดช่องว่างที่กว้างที่สุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM รุ่น JSM-5800 JOEL ประเทศญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 700 – 1,000 เท่า

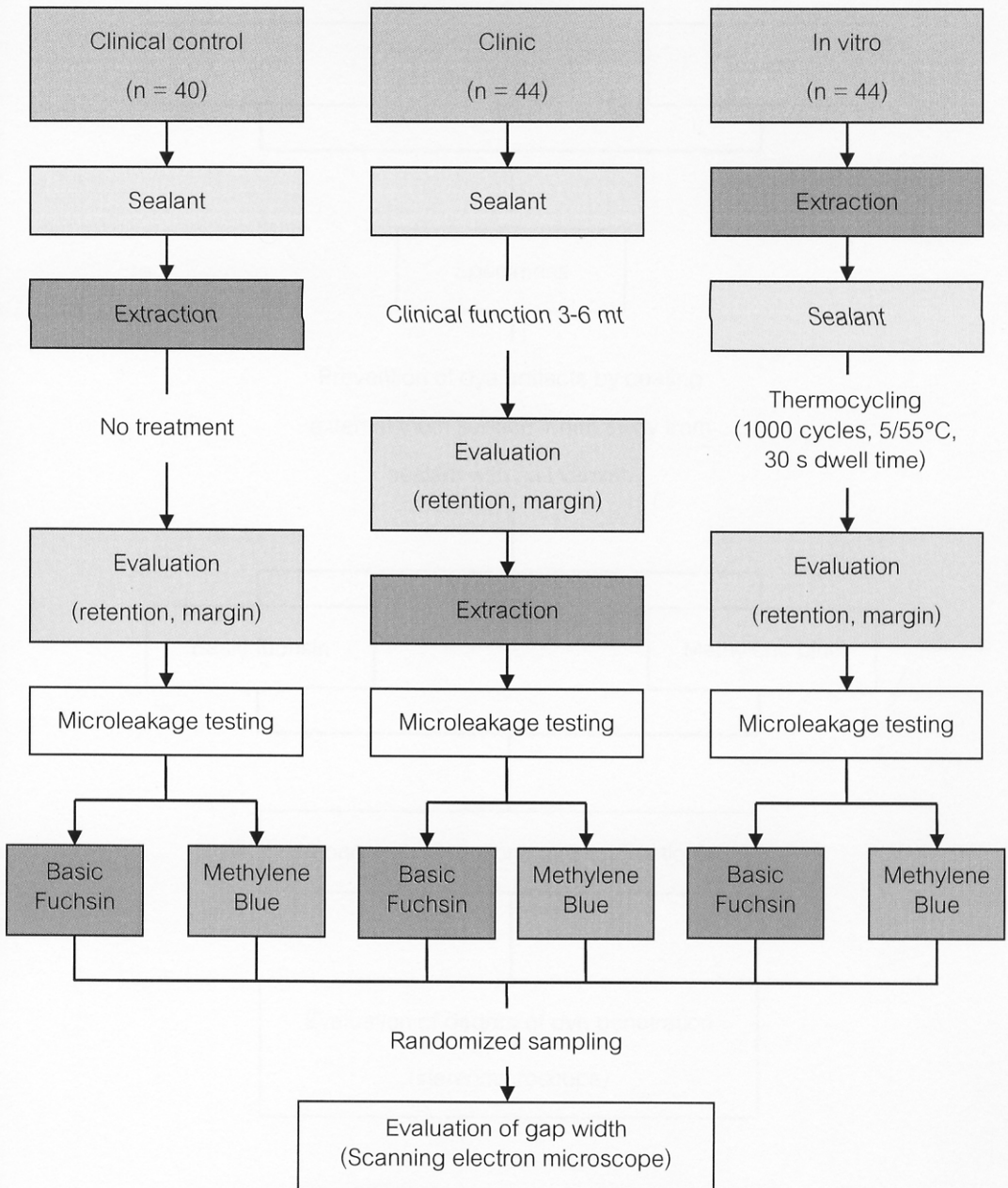
การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. วิเคราะห์ด้วยการแจกแจงความถี่

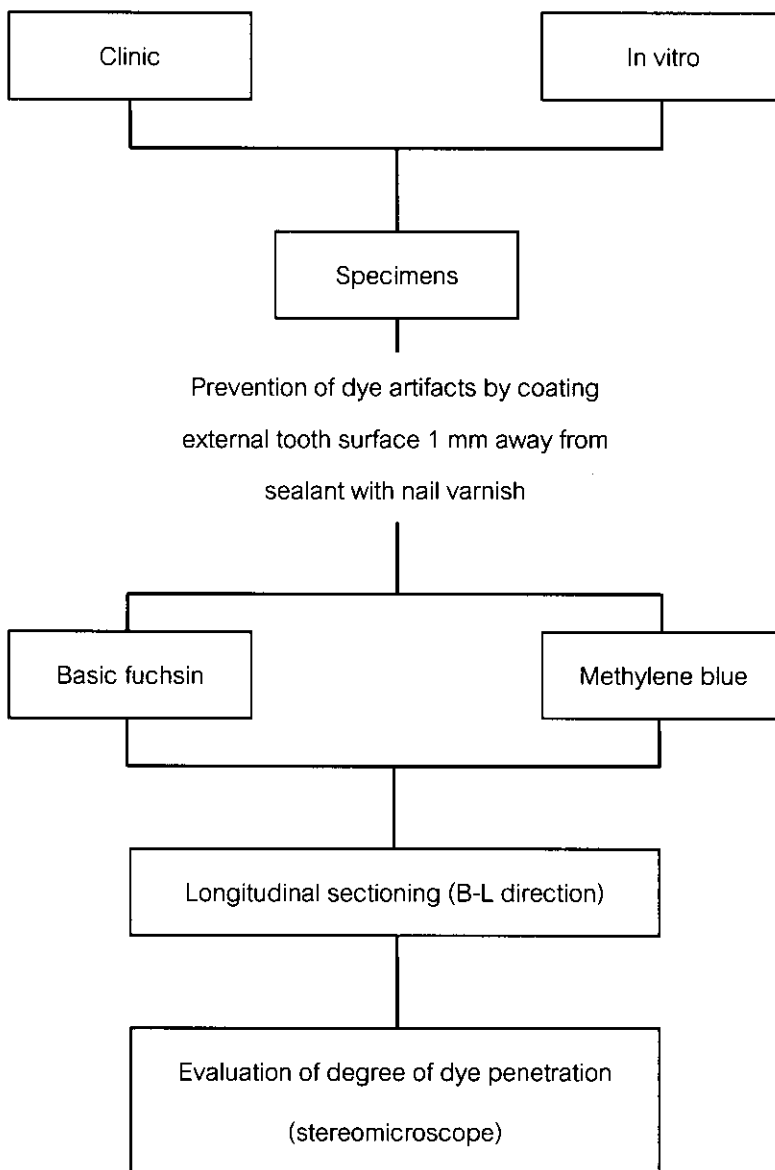
- 1.1. วิเคราะห์ผลการประเมินทางคลินิก ซึ่งได้แก่ การคงอยู่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน การติดสีบริเวณขอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน และความต่อเนื่องบริเวณขอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟัน
- 1.2. วิเคราะห์การรั่วซึมระดับจุลภาคในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน ที่มีความต่อเนื่องบริเวณขอบวัสดุเคลือบ หลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟันต่างกัน
- 1.3. วิเคราะห์ขนาดช่องว่างระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและผิวเคลือบฟัน ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีการรั่วซึมระดับจุลภาคแตกต่างกัน

2. วิเคราะห์ด้วยการแจกแจงความถี่และสถิติไค-สแควร์ (Chi-square)

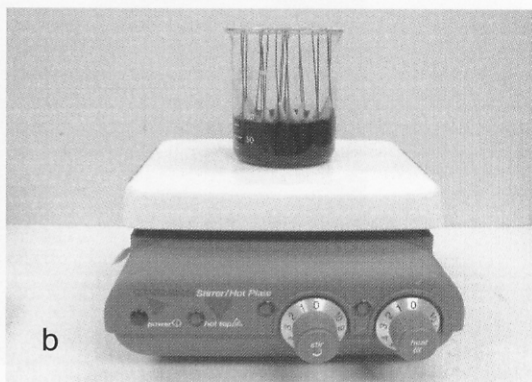
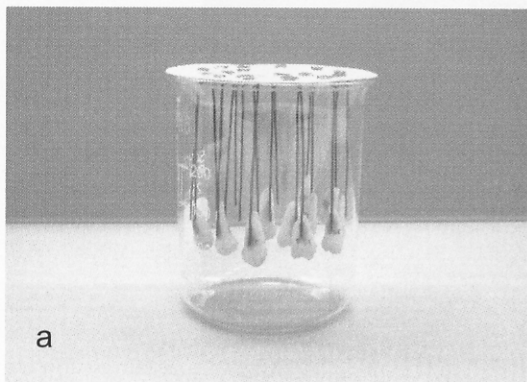
- 2.1. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างการรั่วซึมระดับจุลภาคของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ผ่านการใช้งานในคลินิกและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- 2.2. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างการรั่วซึมระดับจุลภาคของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเมื่อทดสอบด้วยสีเบสิก ฟลูออโรสซินและเมธิลีน บลู ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



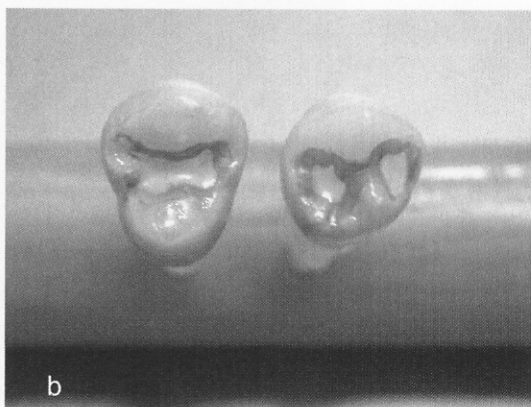
ภาพประกอบ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการทดลอง การศึกษาวิจัยนี้ แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1: กลุ่มคลินิก (clinic) กลุ่ม 2: กลุ่มห้องปฏิบัติการ (in vitro) และกลุ่ม 3: กลุ่มควบคุมของกลุ่มคลินิก (clinical control)



ภาพประกอบ 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบการรั่วซึมระดับจุลภาค



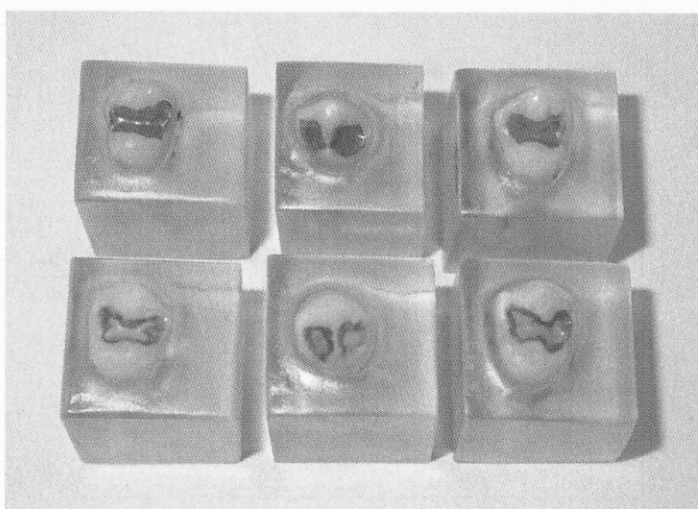
ภาพประกอบ 3 แสดงการยัดฟันกับลวดด้วยซีเมนต์ (a) และการแช่ฟันในสารละลายสี (b) ภายใต้เครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กและห่อด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย



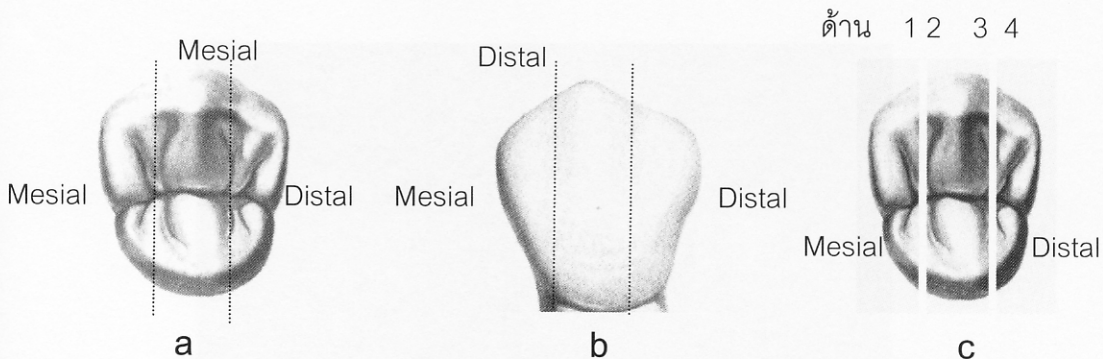
ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะพื้นหลังการแช่สารละลายสีเบสิก ฟลูออไรด์ (a) และดีเมทิลีน บลู (b) ซึ่งมีการติดสีทั้งส่วนที่เป็นน้ำยาทาเล็บ ส่วนที่ไม่ได้ทำน้ำยาทาเล็บ และส่วนผิวนอกของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน



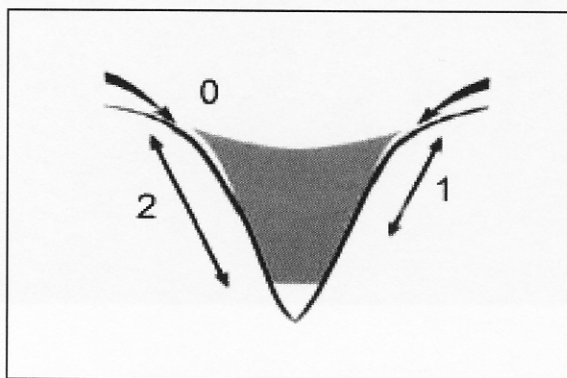
ภาพประกอบ 5 แสดงลักษณะตัวอย่างฟันก่อนลงบล็อกเรซิน หลังจากลอกน้ำยาทาเล็บออกแล้ว จะเหลือตำแหน่งที่ติดสีเฉพาะส่วนที่ไม่ได้ทาน้ำยาทาเล็บ และส่วนผิวนอกของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน



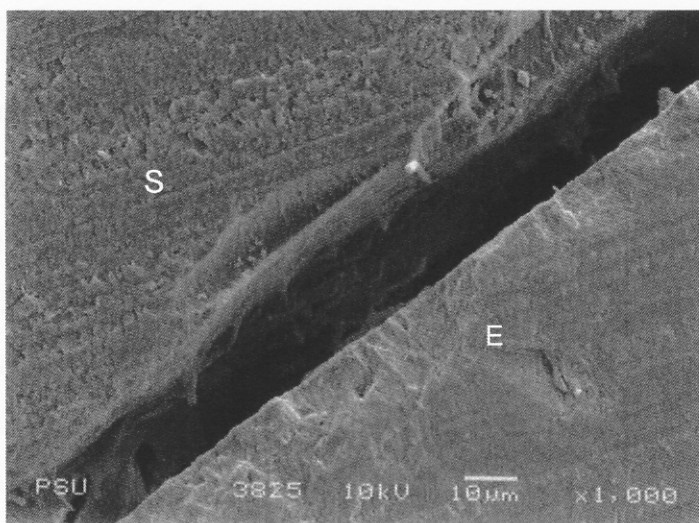
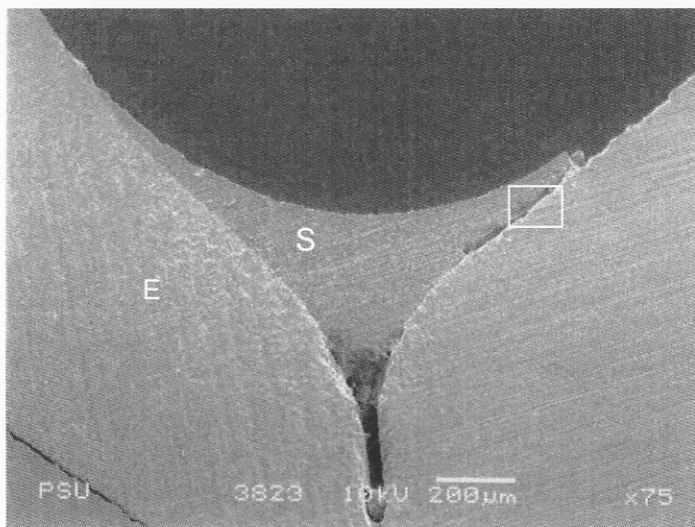
ภาพประกอบ 6 แสดงตัวอย่างฟันที่ฝังในบล็อกเรซิน ซึ่งจัดตำแหน่งให้แนวแกนฟันอยู่ในแนวตั้ง และมีส่วนตัวฟันอยู่เหนือเรซินประมาณครึ่งซี่ เพื่อป้องกันไม่ให้เรซินรบกวนบริเวณที่ต้องการศึกษา



ภาพประกอบ 7 แผนภาพการตัดฟันด้านบดเคี้ยวเส้นประแสดงตำแหน่งการตัดผ่านหลุมร่องฟันส่วนที่ลึกที่สุด (a) แผนภาพการตัดฟันด้านใกล้แก้ม (b) และแผนภาพภายหลังการตัดฟัน (c) ซึ่งได้ฟันทั้งหมด 4 ด้าน และมีเนื้อฟันสูญเสียไปจากการตัดประมาณ 310 ไมครอน



ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดงระดับการรั่วซึมระดับจุลภาคจากการซึมผ่านของสี; 0: ไม่มีการซึมผ่านของสี; 1: มีการซึมผ่านของสี เข้ามาระหว่างผิวเคลือบฟันและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน แต่ไม่ถึงส่วนที่ลึกที่สุดของหลุมร่องฟัน; 2: มีการซึมผ่านของสีถึงส่วนที่ลึกที่สุดของหลุมร่องฟัน



ภาพประกอบ 9 แสดงช่องว่างของตัวอย่างกลุ่มคลินิกเบสิก ฟลูซินที่มีการคงอยู่อย่างสมบูรณ์และมีการ
 รั่วซึมระดับ 2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 75 เท่า (a)
 และ 1,000 เท่า (b) จากตัวอย่างฟันชิ้นเดียวกัน โดยตำแหน่งที่มีการรั่วซึมระดับจุลภาค
 มีช่องว่างขนาด 12-17 ไมโครเมตร เนื่องจากขนาดของช่องว่างกว้างไม่เท่ากัน จึงหา
 ค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาดของช่องว่าง 3 ตำแหน่ง; S = sealant, E = enamel