



การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์

โดย

นางสาวแสงเทียน คงพันธุ์

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์

โดย

นางสาวแสงเทียน คงพันธุ์

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**ESTIMATION OF POST - MORTEM INTERVAL BY USING ODONTOBLASTS IN
HUMAN DENTAL PULP**

By

Sangtean Kongpan

An Independent Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้การค้นคว้าอิสระเรื่อง “ การประมาณ
ระยะเวลาหลังการตายโดยไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์” เสนอโดย นางสาวแสงเทียน คงพันธุ์
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ

รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สีนลอยมา

คณะกรรมการตรวจสอบการค้นคว้าอิสระ

..... ประธานกรรมการ

(พันตำรวจโท ดร.ศฤงค์ สืบพงษ์ศิริ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก นายแพทย์อุทัย ติระวนินทร)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สีนลอยมา)

...../...../.....

52312346 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : โอดอนโตบลาสต์/ การประมาณเวลาตาย/ โพรงฟัน

แสงเทียน คงพันธุ์: การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์.
อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ : รศ. พ.ต.อ.หญิง ดร.พัชรา สีนลอยมา. 68 หน้า.

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยโอดอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตที่แน่นอนและเปรียบเทียบความสอดคล้องของประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย กับผลจากงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือศพของผู้เสียชีวิตที่มายุระหว่าง 18-58 ปีโดยถอนฟันซี่ Molar หรือ Premolar จากศพ ภายหลังการเสียชีวิตจากสาเหตุต่างๆ ยกเว้น โรคมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเรื้อรัง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 20 เดือนธันวาคม 2553 - 10 มิถุนายน 2554 จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสไลด์ด้วยวิธี H&E stain แล้วตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์สถิติที่ใช้ในการทดลอง t-test และ Simple Linear Regression and Correlation Analysis ผลการทดลอง พบว่า

เมื่อนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์จากฟันของศพที่ตายมากกว่า 24 ชั่วโมง จะพบว่าจำนวนของโอดอนโตบลาสต์ลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนโอดอนโตบลาสต์เท่ากับ 7737.50 และนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์จากฟันของศพที่ตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมง จะพบจำนวนของโอดอนโตบลาสต์เท่ากับ 10,680 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร ผลการประเมินระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทยทั้งศพที่เวลามากกว่า 24 ชั่วโมงและน้อยกว่า 24 ชั่วโมงมีความแตกต่างจากผลงานวิจัยของ Vavpotic et al. แม้ผลใน 24 ชั่วโมงแรกมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ยังไม่เหมาะสมในการนำอัตราการลดลงตามผลสรุปจากงานวิจัยของ Vavpotic et al. มาใช้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ

52312346 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE

KEY WORD : ODONTOBLAST/ POSTMORTEM CHANGE/ DENTAL-PULP

SANGTEAN KONGPAN : ESTIMATION OF POST - MORTEM INTERVAL BY USING
ODONTOBLASTS IN HUMAN DENTAL PULP. INDEPENDENT STUDY ADVISOR : ASSOC.
PROF.POL.COL. PATCHARA SINLOYMA,Ph.D. 68 pp.

This research has the purpose to study odontoblast quantity in the tooth cavity. From the tooth sample of Thai people compared the values obtained from the evaluation period after death by odontoblast with real-time from the corpse, which knew the exact time of death. As well as compared the consistency of the estimated time after death from the number of odontoblast left in the tooth cavity of Thai people with the results of the research that was the example of foreigner's tooth by means of Vavpotic et al. The sample group, which used in this experiment was the corpse of the death who had age between 18-58 years by pulling the tooth Molar or Premolar from the corpse after death from different causes, except cancer, immune deficiency, various chronic diseases. Due to starting to collect the samples from December 20, 2553 to June 10, 2554, then bring to prepare a slide by H & E stain method and counted under a microscope, the using statistics in the experimental t-test and Simple Linear Regression and Correlation Analysis, the results found that:

When counted the number of odontoblast from the tooth of the corpse who died more than 24 hours would find that the number of odontoblast reduced with the average number of odontoblast equal to 7,737.50 and counted the number of odontoblast from the tooth of the dead who died less than 24 hours, would find a number of odontoblast equal to 10,680 odontoblast per millimeter square. Evaluation result of the period after the death from odontoblast in the tooth cavity from the teeth of the Thai people both corpses which more than 24 hours and less than 24 hours had the difference from the result of Vavpotic et al. Even the result in the first 24 hours had the similar value, but still not suitable to take the rate of decrease according to a summary of research on the use of Vavpotic et al. Therefore, should have the study further in the future.

Program of Forensic Science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011
Student's signature
Independent Study Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยไอคอนโดบลาสต์ในโพรง
พินมนุษย์ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะได้รับความร่วมมือช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่านที่ได้สละ
เวลา ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ
รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกหญิง ดร.พัชรา สีนลอยมา ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้
คำแนะนำตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้การค้นคว้าอิสระฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัย
รู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก นพ.อุทัย ตีระวนินทร ที่ได้กรุณา
เป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิและ พันตำรวจโท ดร.สฤณี สืบพงษ์ศิริ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบ
และให้คำแนะนำในการแก้ไขค้นคว้าอิสระฉบับนี้จนมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายแพทย์เชาวกิจ ศรีเมืองวงศ์ ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและให้
คำปรึกษาในด้านนิติเวช นายแพทย์สุชาติ พรเจริญพงศ์ หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิชา
รพ.พุทธชินราช พิษณุโลก ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา นายแพทย์ยงยศ จุลกิจวัฒน์
นายแพทย์อรรถพร นาคะปัท ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจนับเซลล์ คุณประพันธ์ เหล็กสุวรรณ
ในการช่วยเก็บตัวอย่างจากศพ ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้
ความรู้ และปลูกฝังให้เห็นคุณค่าของการศึกษา รวมทั้งอาจารย์ เปมิกา สนิทพจน์ ที่ให้การ
สนับสนุนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด

สำหรับคุณประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู
อาจารย์ ผู้ถ่ายทอดวิชาความรู้ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้
ส่งผลให้ผู้วิจัยทำค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมุติฐานของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย	4
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
นิยามคำศัพท์เฉพาะ	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
การวินิจฉัยการตายและการเปลี่ยนแปลงหลังตาย	7
กายวิภาคของฟัน	16
โอคตอนโตบลาสต์.....	23
การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยากายวิภาค.....	28
การคำนวณระยะเวลาการตายจากโอคตอนโตบลาสต์.....	42
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	44
ขั้นตอนการทดลอง.....	44
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	44
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	45
วิธีทำการทดลอง	46

บทที่	หน้า
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	52
ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	52
การศึกษาปริมาณไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย	54
การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์ กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาการเสียชีวิตแน่นอน โดยอ้างอิงตาม วิธีการของ Vavpotic et al.....	55
การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟัน ของคนไทยและตัวอย่างฟันของชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al	58
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	60
สรุปผลการวิจัย.....	60
อภิปรายผลการวิจัย.....	63
ข้อเสนอแนะ.....	64
บรรณานุกรม.....	66
ประวัติผู้วิจัย	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	53
2	แสดงการเก็บรวบรวมข้อมูลไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของ คนไทย.....	54
4	การเปรียบเทียบการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตบลาสต์ ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจาก ฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.	56
5	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและการเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะ เวลาตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพ	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เซลล์ในโพรงฟัน.....	2
2	โอคอนโตบลาสต์ภายหลังการตาย.....	3
3	กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	5
4	Masseter muscle.....	8
5	Livor mortis	11
6	การใช้พลังงาน A.T.P ในกล้ามเนื้อ.....	11
7	Rigor mortis	12
8	Marbling of skin.....	13
9	ศพพบในกองเพลิงตายในท่าขมวญเนื่องจากความร้อน	16
10	กายวิภาคศาสตร์ของฟัน.....	18
11	โครงสร้างของฟัน	19
12	เครื่องหล่อบล็อกชิ้นเนื้อ (Embedding Center).....	31
13	เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Tissue processor)	33
14	บล็อกพลาสติกใส่ชิ้นเนื้อ (cassette ring).....	34
15	เบ้าใส่ชิ้นเนื้อ (Stainless base mold).....	34
16	เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome).....	35
17	อ่างน้ำร้อนสำหรับลอยชิ้นเนื้อ (Electric tissue floating bath).....	37
18	ปฏิกิริยาของการเตรียมสารละลาย hematoxylin.....	38
19	ตัวอย่างฟันแช่ใน 10% nitric acid	46
20	การตัดแบบ longitudinal section.....	47
21	การฝังชิ้นเนื้อ (Embedding).....	48
22	ตัวอย่างฟันและการตัด section	49
23	สไลด์ตัวอย่างฟันที่ย้อม H&E.....	50
24	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระยะเวลาการตายที่แท้จริงกับเวลาที่ได้จากการคำนวณ ในตัวอย่าง 16 รายที่ตายมาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง.....	58
25	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโอคอนโตบลาสต์จากตัวอย่างฟันของ คนไทยและจากของต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.	59

บทที่ 1

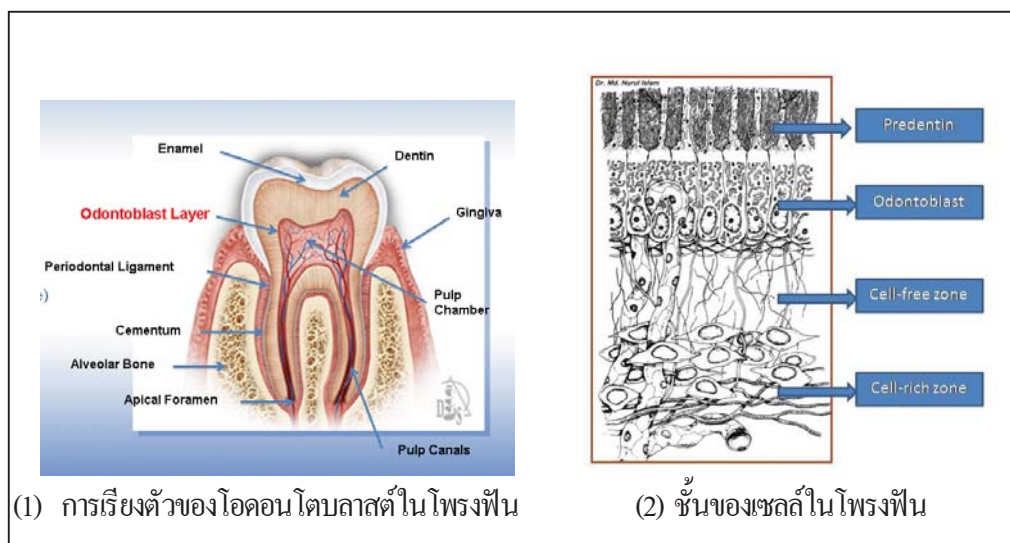
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การประมาณระยะเวลาหลังการตายเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในทางนิติเวชและการสืบสวน สอบสวนการตายจากอาชญากรรม แต่การหาระยะเวลาที่แน่นอน (accuracy) นั้นยังไม่สามารถกระทำได้ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงวิธีเดียว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ซึ่งมีผลในการประมาณค่าระยะเวลาหลังการตาย Knight (1996 : 51) กล่าวว่าวิธีปัจจุบันที่ใช้กันอยู่ในการประมาณระยะเวลาหลังการตายภายใน 1-2 วันแรกนั้น จะใช้อุณหภูมิร่างกาย การแข็งตัวของกล้ามเนื้อหลังการตาย ปฏิกริยาตอบสนองทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อ เศษอาหารในกระเพาะ การเปลี่ยนแปลงของเรตินา ปฏิกริยาของม่านตา ต่อมยา ลักษณะทางเคมีของวุ้นในลูกตา ลักษณะทางเคมีของเลือดจากหัวใจและน้ำไขสันหลัง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ใน Bone marrow

วิธีที่ใช้ในการประมาณระยะเวลาหลังการตายในระยะต้น ๆ (early stage) คือในหนึ่งถึงสองวันแรก จะใช้หลาย ๆ วิธี คือ อุณหภูมิร่างกาย การแข็งตัวของกล้ามเนื้อภายหลังการตาย ปฏิกริยาทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อ เศษอาหารที่หลงเหลือในกระเพาะอาหารการเปลี่ยนแปลงของจอตา ปฏิกริยาของม่านตาต่อยา สภาวะทางเคมีของสารน้ำในร่างกายเช่นเลือด ของเหลวในเยื่อหุ้มหัวใจ น้ำไขสันหลัง (Vavpotic et al. 2009: 122) แต่ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยจะใช้ฟันในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย เนื่องจากฟันเป็นอวัยวะที่แข็งที่สุดในร่างกายซึ่งจะประกอบด้วย ฟันและเนื้อเยื่อรอบ ๆ ฟัน โพรงฟัน (Dental pulp) เป็น เนื้อเยื่อที่อยู่กันอย่างหลวม ๆ (loose connective tissue) ห่อหุ้มด้วยเปลือกแข็งๆคือเนื้อฟัน (Dentin) และเคลือบด้วยเคลือบฟัน (enamel) บนตัวฟัน (crown) และ ซีเมนต์ (cement) ในรากฟันการศึกษาทางHistological ได้เนื้อฟันจะมีชั้นของโอดอนโตบลาสต์อยู่รอบ ๆ ชั้นนอกสุดของโพรงฟัน ถัดจากชั้นโอดอนโตบลาสต์ลงมาบริเวณกลางโพรงฟันจะมีบริเวณที่เรียกว่า cell-free zone และ cell-rich zone และแกนโพรงฟัน

โอดอนโตบลาสต์จัดเป็นเซลล์ประเภท fix post-mitotic cell หลังจากที่มีการพัฒนาไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างสมบูรณ์แล้ว และจะยังไม่ผ่านการแบ่งเซลล์จนกระทั่งถึงขั้นตอน dentinogenesis ทั้งในระยะฟันที่กำลังพัฒนาและในระยะฟันแท้ซึ่งเจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะมากใน dental-pulp complex (Pashley et al. 2006 : 122) ใน glycolytic pathway โพรงฟันจะสามารถสร้างพลังงานผ่าน phosphogluconate shunt (เช่น pentose phosphate) ซึ่งเป็นชนิดของ carbohydrate metabolism



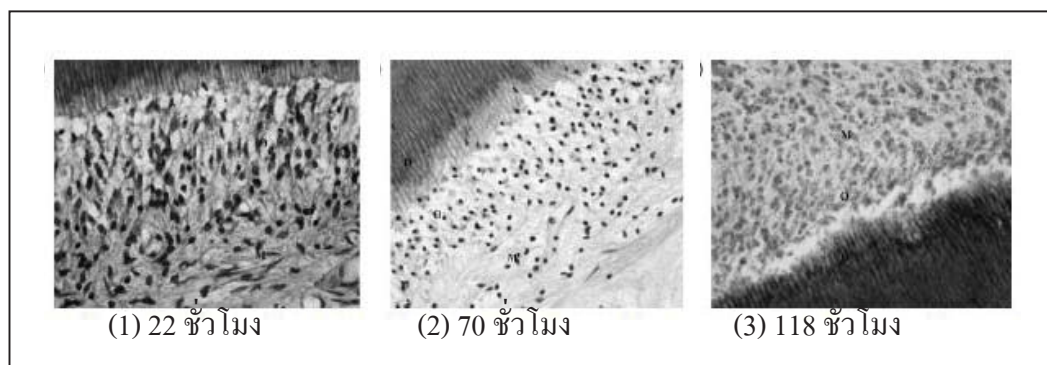
ภาพที่ 1 เซลล์ในโพรงฟัน

ที่มา: Dental-pulp complex [Online], accessed 31 October 2010. Available from <http://www.kck.usm.my/ppsg/Histology/>

ชนิดหนึ่ง ซึ่งบ่งบอกว่า pulp จะยังสามารถ function ได้ภายใต้ภาวะ ischemia (Fisher 1968: 419)

ในทางฮิสโตโลยี ได้เนื้อฟันจะมีชั้นของโอดอนโตบลาสต์เรียงตัวกันอยู่นอกสุดของโพรงฟัน ถัดไปด้านในเป็นส่วนของ cell-free zone , cell-rich zone และแกนโพรงฟัน โอดอนโตบลาสต์จัดเป็นเซลล์ที่คงตัวภายหลังการแบ่งตัวแบบไมโทซิสทันทีที่มีการ differentiate แบบสมบูรณ์แล้ว และดูเหมือนจะไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป เป็นตัวเริ่มกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis) ทั้งในระหว่างการพัฒนาของฟัน และระยะฟันที่เต็มวัยแล้ว และเป็นลักษณะที่จำเพาะอย่างมากของ dental-pulp complex โดยจะมีการสร้าง matrix ที่ประกอบไปด้วยคอลลาเจนไฟบริล โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และ โปรทีโอไกลัยแคนที่สามารถให้แร่ธาตุผ่านได้ ลักษณะโครงสร้างของโอดอนโตบลาสต์จะมี highly ordered RER, กอลจิคอมเพล็กซ์ที่เด่นชัด , secretory granules และปริมาณไมโทคอนเดรียจำนวนมาก นอกจากนั้นยังพบ RNA ในปริมาณมาก ในนิวเคลียสยังมีนิวคลีโอไลด์หนึ่งหรือมากกว่านั้น ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของเซลล์ที่มีการหลั่งโปรตีน (Protein secreting cell) ในทางกลับกันกับโอดอนโตบลาสต์ที่แอคทีฟ (active odontoblast) ในภาวะพักหรือ inactive odontoblast จะมีการลดจำนวนออร์แกเนล ในระหว่างการสร้างเนื้อฟัน(dentinogenesis) โอดอนโตบลาสต์จะสร้าง dentinal tubules และทำให้เนื้อฟันเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิต (living responsive tissue) (Okiji 2002: 101)

เนื่องจากในโพรงฟันมีเซลล์ค่อนข้างบางเบา ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในขณะขั้นตอนการสร้างเนื้อฟัน metabolic activity จะสูง



ภาพที่ 2 โอดอนโตบลาสต์ภายหลังการตาย

ที่มา : Marko Vavpotic et al. "Characteristics of the Number of Odontoblast in Human Dental Pulp Post-mortem," Forensic Science International 193(November 2009): 123.

กว่าภายหลังจากการพัฒนา crown เรียบร้อยแล้ว และจะพบ metabolic activity สูงที่สุดในส่วนของชั้น odontoblast layer และพบ metabolic activity ต่ำสุดในส่วนกลางของโพรงฟัน ซึ่งเป็นที่อยู่ของเส้นประสาทและเส้นเลือดทั้งหมดที่มาเลี้ยงตัวฟัน Yu et al. (2002 : 530) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในโอดอนโตบลาสต์ใน lower incisor pulp ของหนูจะอยู่ในอัตรา 3.2 ± 0.2 ml/นาที/100 กรัมของน้ำหนักเนื้อเยื่อโพรงฟัน นอกเหนือไปจาก glycolytic pathway โพรงฟันจะสามารถสร้างพลังงานได้โดยผ่านทาง phosphogluconate (เช่น pentose phosphate) shunt ซึ่งเป็น carbohydrate metabolism ชนิดหนึ่ง ซึ่งบ่งบอกว่าโพรงฟันอาจจะสามารถทำงานภายใต้การเปลี่ยนแปลงภาวะการขาดเลือดในระดับต่าง ๆ ได้

ความรู้เรื่องการใช้อัตราการใช้ Dental pulp เป็นเนื้อเยื่อที่ใช้บอกระยะเวลาการตายยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก จากการศึกษาของ Fisher (1968 : 48) บ่งบอกว่า pulp อาจจะยังสามารถทำหน้าที่ได้ภายใต้สภาวะขาดเลือด (ischemia) ระดับต่าง ๆ และจากการทดลองของ Vavpotic et al. (2009 : 125) ที่ทำการศึกษาลักษณะของปริมาณ โอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันของมนุษย์ พบว่า ที่อุณหภูมิประมาณ 24 องศาเซลเซียส ปริมาณจะลดลงเรื่อย ๆ หลังการตายจนหมดไปหลังการตาย 5 วัน

จากการศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากในการนำความรู้มาช่วยในการประเมินระยะเวลาหลังการตายในกรณีศพถูกทิ้งไว้ในสภาพที่ผิดปกติ และไม่สามารถใช้การประเมินระยะเวลาการตายทั่วไปได้ เช่น ศพถูกกัดแทะทำลายจากสัตว์ หรือศพถูกแยกชิ้นส่วนและพบเพียงส่วนศีรษะเป็นต้น ประกอบกับสภาพอากาศในประเทศไทย และกลุ่มประชากรที่แตกต่างจากงานวิจัยของ Vavpotic et al. ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าการศึกษาในกลุ่มประชากรไทยและสภาพอากาศในประเทศไทยนั้นมีความจำเป็นเพื่อการนำความรู้เรื่องโอดอนโตบลาสต์ไปใช้ในการประเมินระยะเวลาการตายต่อไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย
- 2.2 เพื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตาย ด้วยโอดอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงจากผลงานวิจัยของ Vavpotic et al.
- 2.3 การเปรียบเทียบความสอดคล้องของการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และผลจากงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. (2009 : 125)

3. สมมติฐานของการวิจัย

- 3.1 การประเมินระยะเวลาหลังการตายของศพจากการนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์โดยวิธีการของ Vavpotic et al. มีความแตกต่างกัน
- 3.2 ผลการเปรียบเทียบค่าปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย แตกต่างจากผลการวิจัยของ Vavpotic et al. (2009 : 125)

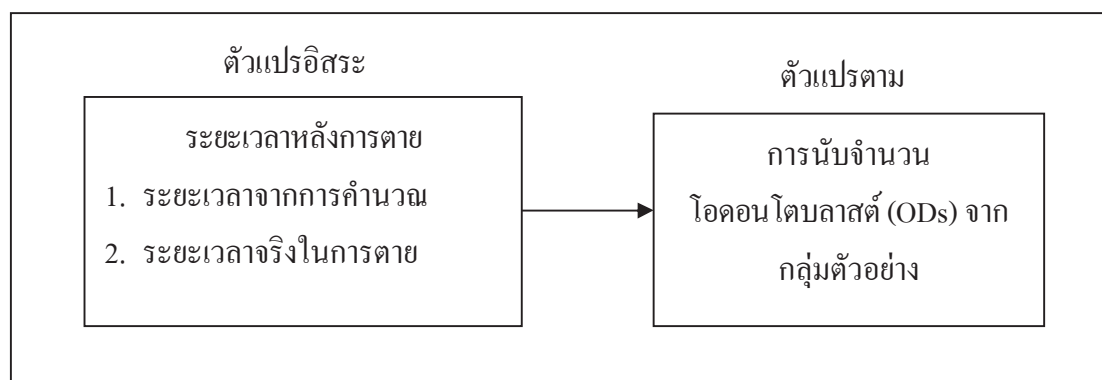
4. ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยการศึกษาจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์ที่เสียชีวิตแล้ว โดยการถอนฟันซี่ Molar หรือ Premolar จากศพภายหลังการเสียชีวิตจากสาเหตุต่าง ๆ ยกเว้น โรคมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เบาหวาน หลังจากถอนฟันแล้วแช่ใน 10% formalin ทันทีเป็นการรักษาสภาพ จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยากายวิภาคเพื่อทำการเตรียมเป็นสไลด์แล้วนำไปนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์เพื่อคำนวณระยะเวลาหลังการตาย โดยการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจากแผนกนิติเวช และจัดเตรียมเป็นสไลด์ที่แผนกพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก การเก็บตัวอย่างจะทำการก็ต่อเมื่อได้รับความยินยอมจากญาติหรือผู้มีสิทธิในศพนั้นอย่างเป็นทางการ

5. กรอบแนวคิดในการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยโอดอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงจากผลงานวิจัยของ Vavpotic et al. และการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจาก

ตัวอย่างฟันของคนไทย และผลของจำนวน โอดอนโตบลาสต์จากงานวิจัยของ Vavpotic et al. (2009 : 125) โดยมีกรอบแนวคิดในการวิจัย ดังนี้



ภาพที่ 3 กรอบแนวคิดในการวิจัย

6. นิยามคำศัพท์เฉพาะ

6.1 โพรงฟันมนุษย์ (Human dental pulp) หมายถึง เนื้อเยื่อที่อยู่ส่วนตรงกลางของฟันมนุษย์ ประกอบไปด้วย เส้นเลือด เส้นประสาทและเซลล์ที่ใช้สร้างเนื้อฟัน เช่น โอดอนโตบลาสต์ (Odontoblast) ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ฟันซี่ Molar หรือ Premolar เนื่องจากเป็นซี่ที่มีโพรงฟันขนาดใหญ่

6.2 โอดอนโตบลาสต์ (Odontoblast) หมายถึง เป็นเซลล์ที่เรียงตัวอย่างบาง ๆ ในโพรงฟันของมนุษย์ ทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อฟันและสามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะขาดเลือด (Ischemia) หรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ลักษณะเฉพาะของโอดอนโตบลาสต์ คือ ถ้ามนุษย์เสียชีวิตแต่โอดอนโตบลาสต์ยังไม่ตายในทันทีและสามารถนำโอดอนโตบลาสต์มาประเมินระยะเวลาในการเสียชีวิตของผู้ตายได้

6.3 Odontoblast หรือ ODs หมายถึง จำนวนโอดอนโตบลาสต์จากศพ หรือ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย จำนวน 20 ราย ที่ผู้วิจัยนำมานับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยกระบวนการทางพยาธิวิทยาภายในภาค

6.4 Odontoblast หรือ ODr หมายถึง จำนวนโอดอนโตบลาสต์จากศพหรือกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย จำนวน 20 ราย ที่ผู้วิจัยนำมาคำนวณด้วยสูตรของ Vavpotic et al. (2009 : 125)

6.5 วิธีของ Vavpotic et al. หมายถึง วิธีการคำนวณระยะเวลาการตายของศพ โดยการนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์จากฟัน แล้วนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์ที่ลดลงในแต่ละวันที่

อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งงานวิจัยของ Vavpotic et al. (2009 : 125) พบว่า ไอคอนโตบลาสต์ จะลดลง 1.025% ต่อชั่วโมง หรือ 130 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้อง และ 1.015% หรือ 120 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนหมดลงที่ประมาณวันที่ 5 ภายหลังการเสียชีวิต

6.5 ระยะเวลาจากการคำนวณ หมายถึง ระยะเวลาที่ได้จากการคำนวณไอคอนโตบลาสต์ ตามวิธีการของ Vavpotic et al. (2009 : 125)

6.6 ระยะเวลาจริง หมายถึง ระยะเวลาที่ผู้ตายเสียชีวิตจนถึงช่วงเวลาที่ทำการเก็บ ตัวอย่างฟันจากศพที่ใช้ในการวิจัย

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำผลการวิจัยโดยทดสอบจากการตรวจจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟัน จากตัวอย่างฟันของคนไทย สามารถนำไปประมาณระยะเวลาหลังการตายของคนไทยได้อย่างมี มาตรฐานและมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vavpotic et al.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการทบทวนทฤษฎีและวรรณกรรมโดยได้เสนอแนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการตาย การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย ลักษณะเฉพาะของโอคอนโตบลาสต์ การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา และการคำนวณ โดยจัดหมวดหมู่ในการนำเสนอ ดังนี้

1. การวินิจฉัยการตายและการเปลี่ยนแปลงหลังตาย
2. กายวิภาคของฟัน
3. โอคอนโตบลาสต์
4. การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา
 - 4.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ
 - 4.2 การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี
 - 4.3 การทำบล็อกชิ้นเนื้อ
 - 4.4 การตัดชิ้นเนื้อ
 - 4.5 การย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธี H & E (Hematoxylin and Eosin staining)
 - 4.6 วิธีการย้อมสีชิ้นเนื้อ
 - 4.7 อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการย้อมสีชิ้นเนื้อ
 - 4.8 ผลที่ได้จากการย้อมสี
5. การคำนวณระยะเวลาตายจากโอคอนโตบลาสต์

1. การวินิจฉัยการตายและการเปลี่ยนแปลงหลังตาย

การตาย คือ การสิ้นสภาพบุคคลตามประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์มาตรา 15 บัญญัติว่า “สภาพบุคคลย่อมเริ่มแต่เมื่อคลอดและอยู่รอดเป็นทารก สิ้นสุดลงเมื่อตาย” แฮลเลย์ (Halley and Harvey 1980: 204) ได้ให้คำจำกัดความการตายไว้ ดังนี้

1. Death is the irreversible cessation of total cerebral function
2. Spontaneous function of respiratory system and spontaneous
3. Function of the circulatory system

1.1 วิธีการปฏิบัติในการวินิจฉัยสมองตาย (พรทิพย์ โรจนสุนันท์ 2545 : 78)

1.1.1 การวินิจฉัยสมองตายต้องกระทำโดยองค์คณะของแพทย์ไม่น้อยกว่า 3 คน โดยคนหนึ่งเป็นแพทย์เจ้าของผู้ป่วย และอีก 1 ใน 2 คนที่เหลือควรเป็นแพทย์สาขาประสาทวิทยา หรือแพทย์สาขาประสาทศัลยศาสตร์ (ถ้ามี)

1.1.2 องค์คณะของแพทย์ผู้วินิจฉัยสมองตาย ต้องไม่ประกอบด้วยแพทย์ผู้กระทำการ ผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะรายนั้น

1.1.3 ผู้อำนวยการโรงพยาบาล หรือผู้ได้รับมอบหมายเป็นลายลักษณ์อักษร จะต้องร่วมเป็นผู้รับรองการวินิจฉัยสมองตายและเป็นผู้ลงนามรับรองการตาย

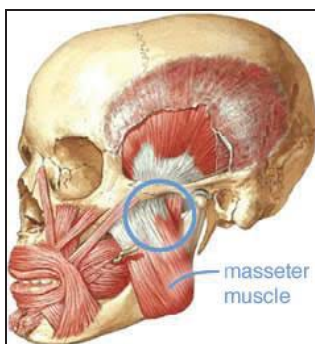
1.2 การเปลี่ยนแปลงหลังตาย (Changes after Death) เป็นการเปลี่ยนแปลงของ ปฏิกริยาหลายอย่าง ซึ่งแพทย์จะต้องนำสิ่งที่ตรวจพบในศพมาประเมินเพื่อหาสาเหตุและระยะเวลาของการ เสียชีวิต

1.2.1 หลักการที่พื้งนำมาใช้ในการประเมินระยะเวลาการเสียชีวิต

1.2.1.1 การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและ ฟิสิกส์ เช่น อุณหภูมิร่างกายที่ลดลง

1.2.1.2 มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อเยื่อ หรือ body fluid ซึ่งอาจนำมากำหนดระยะเวลาตายได้ เช่น ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำในลูกตา หรือ vitreous fluid

1.2.1.3 หลังการตายกล้ามเนื้ออาจมีปฏิกริยาบางอย่างหลงเหลืออยู่เล็กน้อย ในระยะแรก เช่น ปฏิกริยาต่อการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าของกล้ามเนื้อบริเวณขากรรไกรล่าง (masseter muscle) หรือปฏิกริยาต่อสารเคมีของกล้ามเนื้อม่านตา (iris muscle)



ภาพที่ 4 Masseter muscle

ที่มา : Paul Ingraham, Massage Therapy for Bruxism, Jaw Clenching, and TMJ Syndrome [Online], accessed 16 September 2011. Available from <http://saveyourself.ca/articles/perfect-spots/spot-07-masseter.php>

1.2.1.4 การประเมินขบวนการทางสรีรวิทยาของร่างกายบางอย่างที่เกิดขึ้นช่วยให้สามารถประเมินระยะเวลาการเสียชีวิตได้ เช่น คุณลักษณะของอาหารในกระเพาะอาหาร โดยดูทั้งลักษณะ (Nature) ปริมาณ (Amount) และ Appearance ว่ามีการย่อยมากน้อยเพียงไร

1.2.1.6 การประเมินดู survival time หลังการบาดเจ็บ โดยพิจารณาจากการมีเลือดออก การอักเสบ และภาวะแทรกซ้อน

โดยทั่วไปต้องเข้าใจหลักที่สำคัญของการประเมินระยะเวลาหลังตายว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอันหนึ่งอันใดเพียงอย่างเดียว ที่ตรวจพบแล้วสามารถกำหนดระยะเวลาตายได้ชัดเจน การประเมินระยะเวลาการเสียชีวิตควรกะประมาณเป็นช่วงระยะเวลา ไม่ใช่การระบุเวลาที่ชัดเจน และสภาพศพยิ่งน่าเท่าใด ยิ่งประเมินระยะเวลาตายได้แม่นยำน้อยลง

1.3 การเปลี่ยนแปลงหลังการตายจะแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ

1.3.1 การเปลี่ยนแปลงระยะแรก

1.3.1.1 ไม่มีสติสัมปชัญญะ ไม่มี reflex หรือปฏิกิริยาต่อการกระตุ้นใดๆ โดยเฉพาะการตอบสนองต่อความเจ็บปวด

1.3.1.1 Muscular flaccidity กล้ามเนื้ออ่อนปวกเปียก หรือไม่มีการทรงร่าง เช่น แขน ขา คอ ตกตามแรงโน้มถ่วงของโลก

1.3.1.2 หัวใจหยุดเต้น ตรวจโดยการจับชีพจร การฟังเสียงหัวใจ การวัดความดัน รวมถึงการวัดคลื่นหัวใจเป็นเส้นตรง

1.3.1.3 ไม่มีการหายใจ ตรวจโดยการฟังเสียงหายใจ การสังเกตการเคลื่อนไหวของทรวงอก การเอาสำลือที่ปลายจมูก หรือการดูฝ้าไอน้ำที่กระจกเวลาอังที่จมูก

1.3.1.4 ไม่มีปฏิกิริยาแห่งชีวิต (vital reaction) ที่ผิวหนัง ซึ่งผิวหนังคนที่ตายแล้วจะไม่มีปฏิกิริยาต่อความร้อนคือ ไม่แดง หรือพองเป็นตุ่มน้ำใส เป็นต้น

1.3.1.5 ไม่มีปฏิกิริยาแห่งชีวิตที่ลูกตา คือ ไม่มี corneal reflex และ ไม่มี light reflex ม่านตาไม่ตอบสนองต่อแสง กระจกตา (cornea) เริ่มขุ่น

1.3.2 การเปลี่ยนแปลงระยะหลัง

1.3.2.1 Algor mortis หรือ postmortem cooling หลังการตายอุณหภูมิร่างกายลดลงโดยเฉลี่ย 1°C ต่อ 1 ชั่วโมง แต่จะลดลงเป็นลักษณะ S curve โดยในช่วงแรกจะยังมี metabolic process บางอย่างคงอยู่ ซึ่งอาจมีความร้อนปล่อยมาบ้าง การวัดอุณหภูมิควรวัดที่ inner core คือ ที่ทวารหนักมากกว่าวัดที่ periphery คือ ที่ผิวหนัง อุณหภูมิของศพจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงระดับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ซึ่งอัตราการลดลงของอุณหภูมิขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างดังนี้ คือ

1.3.2.1.1 อุณหภูมิเดิมของศพ หากศพมีอุณหภูมิสูงอยู่เดิมก็จะใช้เวลามากในการระบายความร้อน สภาวะที่ทำให้อุณหภูมิสูงก็เช่น การออกกำลังกาย คนที่กำลังมีไข้ หรือมีการชักร่อนเสียชีวิต การได้รับยาบางชนิด คนที่มีภาวะคอปอกเป็นพิษ (Hyperthyroidism)

1.3.2.1.2 Body dimension ศพที่มีรูปร่างอ้วนมาก การสูญเสียความร้อนจะช้า

1.3.2.1.3 Posture ท่าทางของศพมีผลต่อการลดลงของอุณหภูมิ เช่น ศพนอนหงาย เย็นเร็วกว่านอนคุดคู้

1.3.2.1.4 เสื้อผ้าหรือสิ่งที่ห่อหุ้มตัว เช่น ใส่เสื้อผ้าหนา หรือมีผ้าห่มหนาคลุมตัว

1.3.2.1.5 ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิศพกับสภาพแวดล้อมภายนอก อุณหภูมิบางประเทศจะร้อนมาก บางครั้งมีอุณหภูมิสูงกว่าร่างกาย หรือสภาพห้องที่พบศพ หากมีเครื่องปรับอากาศก็จะช่วงเร่งอุณหภูมิให้ลดลงเร็ว

1.3.2.1.6 สภาพการถ่ายเทของอากาศ รวมถึงความชื้นในอากาศ

1.3.2.1.7 สภาวะที่มีการเสียเลือดมากก่อนตายจะทำให้ศพเย็นเร็ว

1.3.2.2 Livor mortis หรือ hypostasis หรือ Lividity เป็นสภาวะที่ผิวหนังร่างกายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง เนื่องจากมีเลือดไหลเทลงไปยังส่วนต่ำของร่างกาย ตามแรงโน้มถ่วงของโลก เส้นเลือดขยายหมดเนื่องจากไม่มีการควบคุมที่กล้ามเนื้อเรียบของเส้นเลือด จากนั้น เม็ดเลือดแดงจะแตก(hemolysis) สีแดงของเม็ดเลือดแดงจะกระจายในน้ำเลือดซึ่งซึมออกจากเส้นเลือดออกสู่เนื้อเยื่อรอบ ๆ หากมีการขยับศพในช่วงแรกที่เม็ดเลือดแดงยังไม่แตก น้ำเลือดยังไม่ซึมออกจากเส้นเลือด livor mortis จะเคลื่อนย้ายได้ แต่หากระยะเวลาผ่านไปนาน น้ำเลือดซึมออกจากเส้นเลือดแล้ว livor mortis จะไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (fixed)

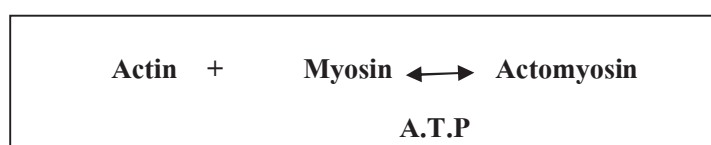
การเปลี่ยนสีนี้เริ่มตั้งแต่ประมาณ 20 นาทีภายหลังกการตาย หลังตาย 8 ชั่วโมงแล้วจะตรึง (fixed) อยู่กับที่ ไม่มีการเปลี่ยนที่ ในคนผิวสีเข้มจะเห็นไม่ชัด คนที่มีสภาวะซีด (anemia) เป็นโรคโลหิตจาง หรือเสียเลือดมากตอนตายก็อาจจะไม่พบ livor mortis นอกจากนั้นยังพึงระวังการแยกระหว่างรอยช้ำ (bruise , contusion) เพราะอาจมีการสับสนได้ กล่าวโดยสรุป livor mortis จะเริ่มสังเกตเห็นได้ในเวลา 1-2 ชั่วโมง มองเห็นได้ชัดตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และจะ fixed ที่เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง และเกิดขึ้นที่เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง พึงระวังในการแยก livor mortis ออกจากรอยรอยเขียวช้ำ จำเลือดจากการถูกทำร้ายก่อนตายด้วย



ภาพที่ 5 Livor mortis

ที่มา : วิกิพีเดีย, รอยเขียวช้ำหลังตาย [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 30 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.malthus.com.br/mg_imagem_zoom.asp?id=1262

1.3.2.3 Rigor mortis หรือ postmortem rigidity เป็นขบวนการทาง physiochemical คือ หลังจากมีการตาย กล้ามเนื้อยังมี metabolism ของขบวนการ glycolysis อยู่ แต่ร่างกายไม่สามารถสร้าง ATP ได้ ATP จึงถูกใช้ไปเหลือน้อยลง ทำให้เกิด Lactic acid เกิดสภาวะเป็นกรดทำให้เกิดการจับยึด หรือ “Locking of chemical bridge” ของใยกล้ามเนื้อ Actin และ Myosin



ภาพที่ 6 การใช้พลังงาน A.T.P ในกล้ามเนื้อ

ที่มา : วิชาญ เปี่ยมน่ม, นิติเวชศาสตร์สำหรับนักศึกษาแพทย์ (กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2553), 29.

การยัดจับนี้ทำให้เกิดการแข็งตัวในท่าเสียชีวิต เมื่อเริ่มนำ bridge ที่ยึดระหว่างไขกระดูกทั้งสองจะเริ่มหลุดจากกัน กล้ามเนื้อก็จะเริ่มอ่อนตัวลงอีกครั้ง การแข็งตัวจะเริ่มต้นเร็วสุด ½ ชั่วโมงแต่จะสังเกตเห็นได้ 4-8 ชั่วโมง เกิดเต็มที่ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยหลังการตาย กล้ามเนื้อจะอ่อนปวกเปียก (Flaccidity) ต่อมาจะมีการแข็งตัวของกล้ามเนื้อ โดยเริ่มพร้อมกันในกล้ามเนื้อทุกมัด มัดใดมีขนาดเล็กจะเห็นได้ก่อน เช่น กล้ามเนื้อบริเวณหน้า ขากรรไกร ลงมาที่คอ ข้อมือ แขน หลัง ขา ไปตามลำดับ และจะยังแข็งตัวต่อไปอีกประมาณ 12 ชั่วโมงจากนั้นจะเริ่มอ่อนตัวลงโดยเห็นชัดเจนในกล้ามเนื้อมัดเล็ก ๆ ก่อนตามลำดับ



ภาพที่ 7 Rigor mortis

ที่มา : Doctors Gates, Explanation of the state of rigor mortis [Online], accessed 16 September 2011. Available from <http://doctorsgates.blogspot.com/2011/02/66-year-old-man-who-lives-alone-has.html>

1.3.2.4 Postmortem decomposition หรือการเน่า ประกอบด้วยกระบวนการสำคัญ

2 ชนิดคือ

1.3.2.4.1 Autolysis หรือกระบวนการเน่าเป็นกระบวนการที่เซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกายถูกย่อยทำลายจากน้ำย่อยภายในสพเอง โดยไม่ได้เกิดจากเชื้อโรค คือ อวัยวะสำคัญได้แก่ lysosome มีการแตก และปล่อย enzyme ออกมาทำลายเนื้อเยื่อรอบ ๆ อวัยวะใดที่มี enzyme มากก็จะเกิดการย่อยสลายเร็ว เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ตับ จะเริ่มมีการเน่าก่อน จากนั้นจะมีการเน่าไล่มาเรื่อย ๆ จากอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้ สังเกตได้จากการเขียวคล้ำก่อนบริเวณอื่น ๆ แสดงว่าอวัยวะนั้นมีการเน่า

1.3.2.4.2 Putrefaction เป็นการย่อยสลายของเนื้อเยื่อจาก enzyme ภายนอกเซลล์ เช่นจากแบคทีเรีย จะเริ่มเกิดประมาณวันที่สามหลังตายในอุณหภูมิปกติ หากร่างกายหรือสิ่งแวดล้อมมีอุณหภูมิสูง การเน่าจะเกิดเร็วขึ้น การเปลี่ยนแปลงจะเริ่มจาก ผงงหน้าท้อง ส่วนล่างด้านขวาเป็นสีเขียว ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดการเน่าในลำไส้ เกิดแก๊ส ทำให้ท้องขยายใหญ่ ใบหน้าและลำคอมีสีบวมคล้ำ เกิด Marbling of skin คือ การที่เส้นเลือดบริเวณผิวหนังเห็นเป็นสีเขียวเข้มคล้ายหินอ่อน ทั้งนี้เกิดจากแบคทีเรียกระจายจากลำไส้ไปตามน้ำเลือดตามเส้นเลือดดำ ทำปฏิกิริยากับเลือดที่สลายตัว เกิด sulfhemoglobin และ hematin สีเข้ม เห็นชัดบริเวณต้นขา ผงงหน้าท้อง แผ่นอก หัวไหล่ จากนั้นจะเกิดตุ่มน้ำพองใสที่ผิวหนัง ทำให้ผิวหนังหลุดลอกออก ดวงตาปูดถลน ลิ้นจุกปากจากแก๊สที่ดันออกมา มีปัสสาวะ อุจจาระไหลตามทวารต่างๆ บางทีมดลูกอาจถูกดันออกมาภายนอกเพราะมีแรงดันจากช่องท้อง จากนั้นมีหนองแมลงวันและไข่เริ่มจากบริเวณที่มีเลือดหรือของเหลวอยู่และระยะสุดท้ายคือเนื้อหลุดออกจากกระดูกจนเหลือแต่โครงกระดูก ในที่สุด การเน่าในประเทศไทยจะเกิดขึ้นเร็ว เนื่องจากอุณหภูมิสูง การเน่าของศพยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักคือสภาพแวดล้อม ได้แก่อุณหภูมิและสิ่งที่อยู่รอบตัวศพ โดยศพจะเน่าเร็วในอากาศ รองลงมาคือในน้ำ และช้าที่สุดคือในดิน



ภาพที่ 8 Marbling of skin

ที่มา : Springer Images, Marbling of the skin [Online], accessed 16 September 2011. Available from <http://deformutilation.tumblr.com>

1.3.2.5 การประเมินระยะเวลาการตายจากอาหารในกระเพาะอาหาร ทำได้โดยการวิเคราะห์ลักษณะของอาหารในกระเพาะอาหาร (stomach content) โดยใช้หลักทางสรีรวิทยาเดียวกับ gastric emptying time ซึ่งกระเพาะอาหารจะมีการย่อยอาหารแล้วส่งผ่านอาหารที่ย่อยไปยังลำไส้เล็กตอนต้น การย่อยของกระเพาะอาหารมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ ชนิดของอาหาร อาหารแข็ง เนื้อแน่น เนื้อมาก จะย่อยช้ากว่าอาหารเหลว ซึ่งทำให้ emptying time ยาว ปริมาณแป้งและไขมันในอาหารหากมีมากก็ทำให้เวลายาวออกดังจะพบว่า Light meal อาหารอยู่ในกระเพาะ 1.5-2 ชั่วโมง , Medium meal อาหารอยู่ในกระเพาะ 3-4 ชั่วโมง , Heavy meal อาหารอยู่ในกระเพาะ 4-6 ชั่วโมง และยังมีปัจจัยในเรื่องของยาหรือสารที่มีอิทธิพล เช่น แอลกอฮอล์ ทำให้ emptying time นานขึ้นเนื่องจากกล้ามเนื้อบริเวณ pylorus มีการหดตัว อาหารจึงผ่านช้าลง เฮโรอิน atropine diazepam ก็มีอิทธิพลต่อกระเพาะอาหารในลักษณะเดียวกับแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นคือสภาพร่างกายและจิตใจ อารมณ์มีผลกับระยะเวลาการย่อยอาหาร สำหรับการออกกำลังกายพอสมควรจะเร่งการย่อยให้เป็นไปได้เร็วขึ้น แต่หากออกกำลังกายหนักเกินไปจะกลายเป็นยืดเวลาออกไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ gastric content เพื่อประมาณระยะเวลาการเสียชีวิตมีข้อพึงระวัง ซึ่งการดำเนินการมีแนวทางดังนี้คือ

1.3.2.5.1 บรรยายลักษณะอาหารที่ตรวจพบ ได้แก่ ชนิด (Nature) ปริมาณ (Amount) ขนาดของชิ้นอาหาร (Size) ลักษณะการย่อย (Condition)

1.3.2.5.2 ดูลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ในบางครั้งเพื่อดูประเภทอาหาร

1.3.2.5.3 ตรวจดู content ในลำไส้เล็ก

1.3.2.5.4 ตรวจหาสารพิษจากจากเลือด รวมถึงแอลกอฮอล์และยา

1.3.2.6 การประเมินระยะเวลาการตายจากวิธีอื่น เช่น

1.3.2.6.1 Vitreous Potassium ภายหลังการเสียชีวิตระดับโปแตสเซียมในน้ำของลูกตาจะเพิ่มขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ไม่น่าเชื่อถือ (unreliable) เพราะมีปัจจัยที่มีอิทธิพลมากมาย

1.3.2.6.2 การประมาณเวลาตายจากระบบขับถ่ายปัสสาวะ จำนวนปัสสาวะในกระเพาะปัสสาวะอาจพอประมาณเวลาตายได้ในรายที่พบศพยังไม่เน่า โดยที่พบศพในตอนเช้า ถ้าตรวจพบปัสสาวะมากก็พอประมาณได้ว่า คนตายตอนหลังเที่ยงคืนมาจนถึงรุ่งเช้า เป็นต้น

1.3.2.6.3 การประมาณเวลาตายจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่มีหลักทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนโดยมากอาศัยดูกิจวัตรประจำวันของผู้ตาย เช่นการเปิดไฟ ปิดไฟ การสวมใส่เสื้อผ้า หนังสือพิมพ์หรือจดหมาย ใบเสร็จซื้อของ เป็นต้น

1.4 Postmortem Artifact สิ่งที่เราจะระวังเมื่อตรวจศพ เป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งอาจไม่เกี่ยวข้องการตายเลย และอาจทำให้เกิดการแปรผลผิดพลาดได้ ประกอบด้วยลักษณะดังนี้

1.4.1 ความผิดพลาดทางเทคนิค (Faulty autopsy technique) ที่เกิดขณะทำการผ่าศพ

1.4.2 ความผิดพลาดในการแปรผลศพที่เริ่มเน่าลักษณะที่พบบ่อย คือ

1.4.2.1 ศพเน่าพองอาจทำให้ประมาณรูปร่างว่าเป็นคนอ้วน

1.4.2.2 การพบน้ำสีแดงคล้ายเลือดออกจากปาก จมูก และหู ในศพที่เน่า อาจทำให้สันนิษฐานว่ามีการบาดเจ็บ (trauma) ก่อนตาย

1.4.2.3 การตรวจพบน้ำสีแดงในช่องปอดของศพที่เน่า ไม่ใช่เป็นการเกิดการบาดเจ็บที่ทำให้มีเลือดในช่องออก (hemothorax)

1.4.2.4 Gastromalacia คือ การเน่า (Autolysis) ของกระเพาะอาหารหลังตาย ซึ่งอาจทะลุได้ ทำให้สันนิษฐานผิดว่ามีแผลในกระเพาะอาหาร (Peptic ulcer) ทะลุ

1.4.2.5 จุดแดง ๆ จากการที่เม็ดเลือดแดงออกมาจากเส้นเลือดภายหลังการเสียชีวิต โดยเฉพาะบริเวณใบหน้า ลำคอ ในระยะเริ่มเน่าอาจทำให้คิดว่าผู้ตายเสียชีวิตจากสภาวะการขาดอากาศหายใจ (asphyxia)

1.4.2.6 ดับอ่อนมีขบวนการเน่า (autolysis) จึงเกิดจุดของเนื้อตาย หรือจุดเลือดออก (Hemorrhage) อาจเข้าใจผิดว่าเป็นดับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน

1.4.2.7 การตรวจสารพิษบางอย่างอาจทำให้แปรผลผิดพลาด เช่น ในศพเน่าระดับแอลกอฮอล์อาจสูงขึ้นได้ ขณะที่ cocaine จะสลายไปเร็ว

1.4.3 สภาวะแวดล้อมทำลายศพทำให้แปรผลผิดพลาด

1.4.3.1 สัตว์แทะศพ (Scavenger) เช่น หนู แมลงสาบ มด ทำให้เกิดแผลใหญ่ คล้ายแผลถูกกระทำ

1.4.3.2 การวางไข่ของแมลงชนิดต่าง ๆ ขึ้นกับสภาพแวดล้อม แล้วมีการฟักเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ทำให้ชั้นเนื้อของศพหายไป

1.4.3.3 ศพจมน้ำอาจถูกใบพัดเรือหรือชิ้นส่วนของเรือกระแทกเป็นแผล ที่ทำให้สับสนว่าเป็นแผลที่เกิดขึ้นก่อนตาย

1.4.3.4 ศพพบในกองเพลิง จะมีลักษณะพิเศษเนื่องจากความร้อนทำให้กล้ามเนื้อหดตัวรุนแรง อาจทำให้กระดูกแขนขาหักคล้ายคนพยายามจะสู้อะไร ซึ่งเรียกว่าท่าชกมวย (Pugilistic) หรือที่ศีรษะอาจพบรอยแตกที่เรียกว่า Heat fracture และเลือดออกใต้เยื่อหุ้มสมองที่เรียกว่า Heat hematoma ซึ่งมีลักษณะคล้าย epidural hematoma ซึ่งพบในการบาดเจ็บที่ศีรษะก่อนตาย เป็นต้น



ภาพที่ 9 ศพพบในกองเพลิงตายในท่าชกมวยเนื่องจากความร้อน

ที่มา : Clark McAvoy, Pugilistic attitude/pose [Online], accessed 1 October 2011. Available from <http://criminalprofiler.tumblr.com/post/7096141984/ramirez-dahmer-bundy-pugilisticattitude-pose>

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การตรวจศพเพื่อหาสาเหตุการเสียชีวิต หรือเพื่อประมาณระยะเวลาการเสียชีวิต ไม่ใช่เรื่องง่าย มีรายละเอียดข้อพึงระวังมากมาย ไม่มีขบวนการหรือวิธีการใด หรือ parameter ใดที่แม่นยำและเที่ยงตรงเพียงอย่างเดียว หากต้องใช้ร่วมกัน แล้วหาค่าเฉลี่ยหรือพิจารณาประกอบกัน เนื่องจากข้อมูลรายละเอียดเหล่านี้มีความสำคัญกับคดี พึงระมัดระวังความผิดพลาดอันอาจทำให้รูปการณ์ทุกอย่างเปลี่ยนแปลงไปได้

2. กายวิภาคของฟัน (สุชนิภา วงศ์ทองศรี 2538 : 5)

ฟันของมนุษย์ เรียกว่า heterodont คือ ประกอบด้วยฟันรูปร่างต่าง ๆ กันและทำหน้าที่ในการบดเคี้ยวต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ homodont ฟันทั้งปากจะมีรูปร่างเหมือนกัน พบในพวกมีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ ฟันมนุษย์มี 2 ชุด คือ ฟันน้ำนมและฟันแท้

2.1 Heterodont dentition

ฟันที่มีมากกว่า 1 ชนิดในปากในแต่ละ quadrant ของฟันแท้จะประกอบด้วยฟัน 8 ซี่ มีรูปร่างและหน้าที่ต่าง ๆ กันคือ

2.1.1 Incisor มี 2 ซี่ในแต่ละ quadrant ฟันที่อยู่ใกล้ midline มากที่สุดเรียกว่า central incisor และฟัน lateral incisor อยู่ถัดมา ในขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างจึงมีฟันชนิดนี้ 4 ซี่ รวมทั้งปากมี 8 ซี่ หน้าที่ ตัดอาหาร ปลายฟันที่ใช้ตัดอาหารเรียกว่า incisal edge ด้าน lingual มีรูปร่างคล้ายพลั่ว (shovel) ช่วยนำอาหารเข้าสู่ช่องปาก

2.1.2 Canine เป็นฟันซี่ที่ 3 จาก midline ในแต่ละ quadrant อาจเรียกชื่ออีกชื่อว่า cuspid ในขากรรไกรบนหรือล่างมี 2 ซี่ ในปากมี 4 ซี่ หน้าที่ จับและฉีกอาหาร (holding or grasping and tearing) ซึ่งฟันซี่นี้มีความสำคัญในสัตว์ เช่น สุนัข ใช้เป็นอาวุธ หรือใช้ต่อสู้ ใช้กัดเหยื่อ และใช้ฉีกอาหาร

ฟัน Canines เป็นฟันที่ยาวที่สุดในช่องปากมนุษย์ จึงใช้เป็นหลักยึดที่ดีที่สุด และมีเสถียรภาพ (stable) มากที่สุด รากฟัน canines เมื่อตัด cross section จะมีรูปร่างเป็นรูปสามเหลี่ยม การที่รากฟันเป็นรูปสามเหลี่ยม จึงทำให้ฟัน canines อยู่ที่ยึดแน่นได้โดยไม่เกิดการเคลื่อนย้าย (displacement) อันเนื่องมาจากแรงทางด้านหน้าและทางด้านหลัง ขณะเดียวกันก็สามารถต้านต่อแรงที่จะหมุนฟันในเบ้ากระดูก (bony socket)

2.1.3 Premolars เป็นฟันซี่ที่ 4 และ 5 จาก midline ในแต่ละ quadrant มี 2 ซี่ในขากรรไกรบนหรือล่างมี 4 ซี่ ในปากมี 8 ซี่ เรียกชื่อฟันเหล่านี้ว่า first premolar และ second premolar ตามลำดับเป็นฟันที่อยู่กึ่งกลางระหว่างฟัน canines และฟัน molars ความยาวของฟันซี่นี้น้อยกว่า canine มักมีอย่างน้อย 2 cusps หน้าที่ ช่วยฟัน canine ในการจับอาหาร ขณะเดียวกันก็ช่วยบดอาหาร (grind) โดย buccal cusp ซึ่งแหลมจะช่วยในการจับอาหาร ส่วน lingual cusp จะทำหน้าที่บดอาหาร ทำให้หน้าที่คล้ายกับฟัน molars

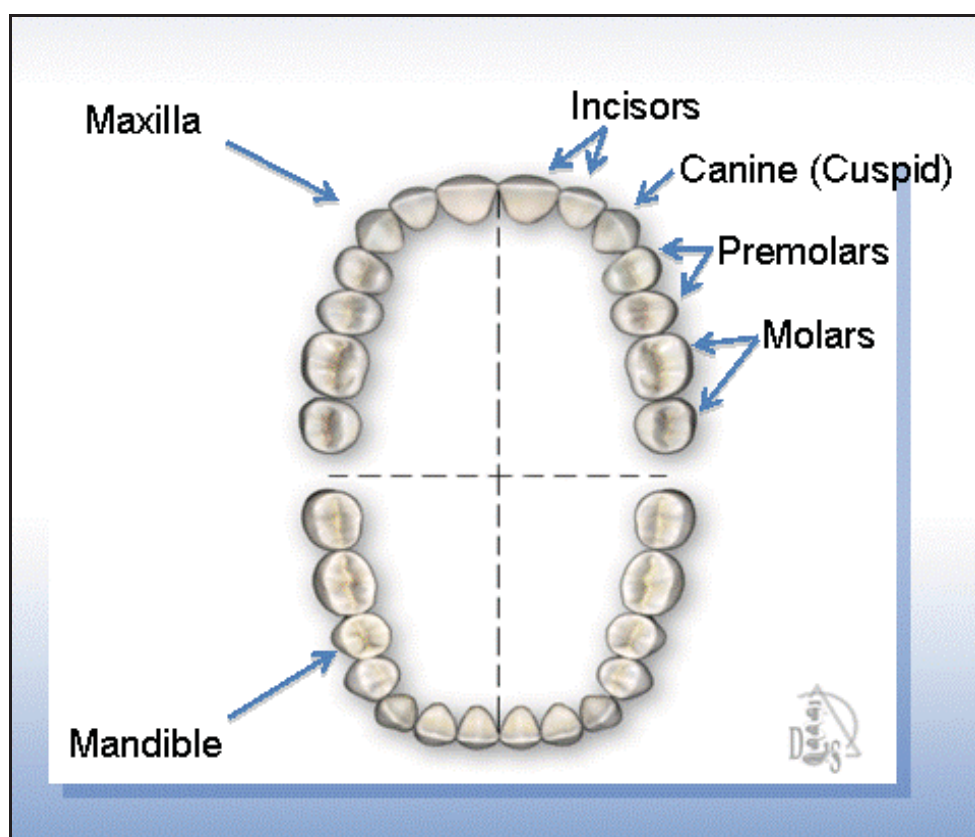
ฟัน premolar บางครั้งอาจเรียกว่า bicuspids แต่คำว่า bicuspid ไม่ครอบคลุมทั้งหมด เพราะฟัน premolar บางซี่มี 3 cusps ดังนั้นคำว่า “Premolar” จึงเหมาะสมกว่า

2.1.4 Molars เป็นฟันซี่ที่ 6, 7 และ 8 จาก midline ในแต่ละ quadrant เรียกว่าฟัน first, second และ third molar อาจเรียกอีกอย่างว่า six-year molar , twelve-year molar และ wisdom tooth ตามลำดับ ในขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างมีฟัน molar 6 ซี่ ในปากจึงมีฟันเหล่านี้ 12 ซี่

ฟัน molars ขนาดใหญ่กว่าฟัน premolars มักมี 4 cusps หรือมากกว่า อยู่ทางด้าน posterior ของฟัน premolars หน้าที่ ใช้เคี้ยวอาหาร หรือบดอาหาร ไม่ใช่ตัดอาหาร ฟัน

molar เหมือนกับฟัน premolar คือไม่มี incisal edge แต่มี cusps ซึ่งสับสลับกัน (interlock) ระหว่าง ฟันกรามบนและล่าง

ฟัน molars บนและล่าง มีความแตกต่างกันมากทั้งในเรื่องรูปร่าง , ขนาด , จำนวนของ cusp และจำนวนของรากฟัน ฟัน incisors และ ฟัน canines รวมเรียกว่า anterior teeth เพราะฟันเหล่านี้อยู่ทางด้านหน้าของโค้งขากรรไกร (dental arch) ฟัน premolars และ ฟัน molars อยู่ทางด้านหลังของโค้งขากรรไกร จึงเรียกว่า posterior teeth

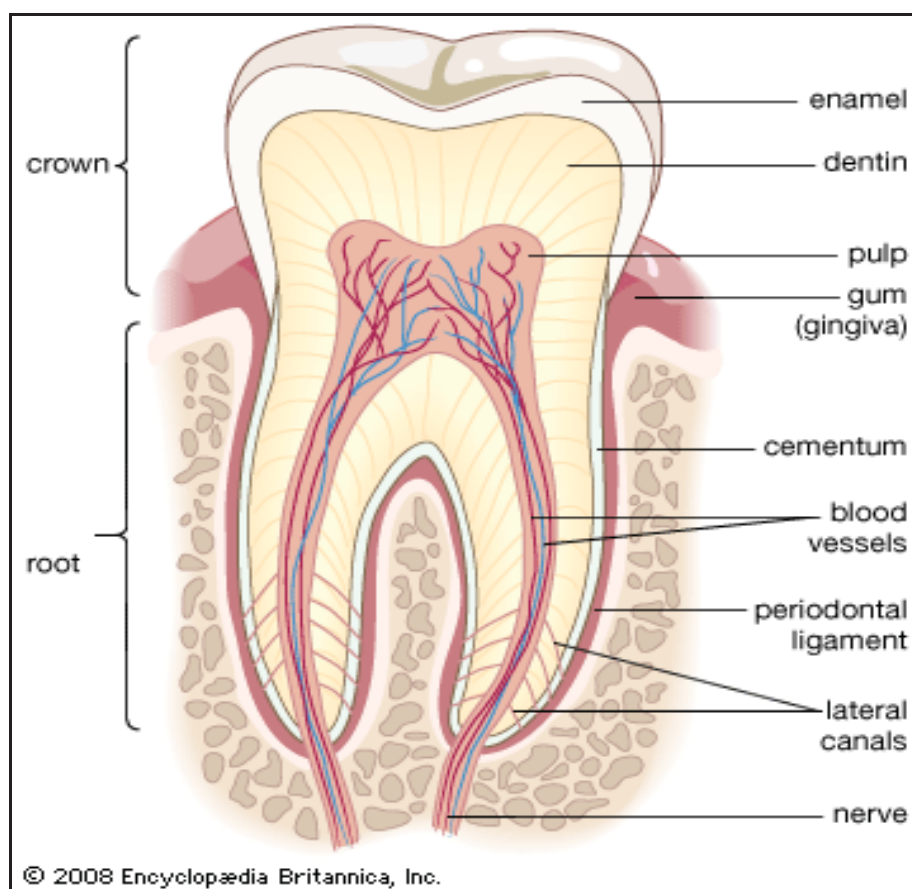


ภาพที่ 10 กายวิภาคศาสตร์ของฟัน

ที่มา : [Dental anatomy physiology](http://www.docstoc.com/docs/42552079/DENTAL-ANATOMY-PHYSIOLOGY) [Online], accessed 15 November 2010. Available from <http://www.docstoc.com/docs/42552079/DENTAL-ANATOMY-PHYSIOLOGY>

2.2 General Oral and Dental Anatomy

ฟันทุกซี่ในปากจะถูกล้อมรอบและพุงไว้ด้วยกระดูก (bone) เรียกกระดูกนี้ว่า Alveolar Process ส่วนเบ้ากระดูก (bony socket) หรือส่วนของ alveolar process เป็นที่อยู่ของรากฟันเรียกว่า Alveolus พหูพจน์เรียก alveoli (ทศพล ปิยะปัทมินทร์ 2539: 55)



ภาพที่ 11 โครงสร้างของฟัน

ที่มา : Britanica, Tooth: cross section an adult human molar [Online], accessed 16 September 2011. Available from [http:// www.britannica.com/EBchecked/media /112882/ Cross-section-of-an-adult-human-molar](http://www.britannica.com/EBchecked/media/112882/Cross-section-of-an-adult-human-molar)

2.2.1 Crown (ตัวฟัน)

2.2.1.1 Anatomical crown เป็นส่วนของฟันที่มีเคลือบฟัน (enamel) คลุม

2.2.1.2 Clinical crown เป็นส่วนของฟันที่มองเห็นได้ในช่องปาก หรือ ส่วนของฟันที่อยู่เหนือเหงือกอาจจะยาวเท่ากับหรือยาวกว่า หรือสั้นกว่า anatomical crown ในกรณีเหงือก ร่น clinical crown อาจยาวเท่ากับ anatomical crown รวมกับส่วนของ anatomical root ที่เห็นในช่องปาก หรือ clinical crown อาจเป็นเพียงส่วนหนึ่งของ anatomical crown หากบริเวณ cervical part ของ crown ยังคงปกคลุมด้วยเหงือก (ในรายที่ฟันเพิ่งงอกขึ้นมาใหม่) ความยาวของ clinical crown จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดชีวิต ส่วน anatomical crown มีความยาวคงที่

2.2.2 Root (รากฟัน)

2.2.2.1 Anatomical crown เป็นส่วนของฟันที่มีซีเมนต์ (Cementum) คลุม

2.2.2.2 Clinical root เป็นส่วนหนึ่งของฟันที่อยู่ใต้เหงือก มองไม่เห็นในช่องปาก clinical root อาจยาวเท่าหรือไม่เท่ากับ anatomical root เช่นเดียวกับ crown ในกรณี clinical root ยาวกว่า anatomical root จะพบในฟันที่เพิ่งงอกขึ้นมาใหม่ และมีส่วนของ crown บางส่วนที่ยังไม่งอกพ้นเหงือกขึ้นมาจึงรวมเป็นส่วนหนึ่งของ clinical root ส่วนในคนสูงอายุซึ่งมีเหงือกร่น clinical root จะสั้นกว่า anatomical root เพราะส่วนของรากฟันที่โผล่พ้นเหงือกถูกจัดเป็นส่วนหนึ่งของ clinical crown ฟันอาจมีรากเดียว (single root) หรือหลายราก (multiple-root) ส่วนของรากฟันก่อนที่จะแยกออกเป็นหลายรากเรียก root trunk บริเวณที่แยกเป็นหลายรากเรียกว่า Furcation ถ้ามี 2 รากเรียก Bifurcation ถ้ามี 3 รากเรียก Trifurcation ที่บริเวณปลายรากฟันแต่ละรากเรียกว่า root apex

2.2.3 Tooth tissues

2.2.3.1 เคลือบฟัน (Enamel) เป็น hard mineralized tissue ซึ่งคลุมเนื้อฟัน (Dentin) ของ anatomical crown ของฟัน เป็นส่วนที่แข็งที่สุดของร่างกาย แต่เพราะถ้าไม่มีส่วน dentin รองรับอยู่ข้างล่าง ส่วนที่หนาที่สุดอยู่บริเวณ tip ของ crown และจะค่อย ๆ บางลงจนถึง cervical line สีของ enamel จะขึ้นอยู่กับความหนาของ enamel และแร่ที่เป็นส่วนประกอบ (mineralization) enamel ยิ่งหนาสีจะยิ่งขาว เมื่อ enamel บางขึ้น สีจะเปลี่ยนไป โดยจะมีสี grayish white ที่ cusps หรือ edge จะมีสีขาวบริเวณตอนกลางฟัน และจะมีสีขาวยellowish white ที่บริเวณคอฟัน (cervical line) เนื่องจาก enamel โปร่งแสง ถ้า enamel บางจะทำให้เห็นสีเหลืองของ dentin ที่อยู่ข้างใต้ การ Mineralize ของ enamel ยิ่งมากจะยิ่งโปร่งแสงมากยิ่งขึ้น Enamel เป็น most densely mineralized และแข็งที่สุดของร่างกายมนุษย์ (hardest tissue) ส่วนประกอบทางเคมีของ enamel ประกอบด้วย 96% เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic structure) ประกอบด้วยผลึก แคลเซียมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (crystals of calcium hydroxyapatite) เป็นจำนวนหลายล้านผลึก และ อีก 4% เป็นสารอินทรีย์ (organic matter) และน้ำ ซึ่งโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นไฟบรัส (fibrous in structure) โครงสร้างพื้นฐานของ enamel เรียกว่า enamel rod มีลักษณะเป็นแท่ง (column of enamel) เรียงตัวตั้งฉากกับ dentinoenamel junction กับพื้นผิวภายนอกของตัวฟัน ดังนั้นส่วนของ enamel จึงประกอบด้วย 2 ส่วนคือ rod และ rod sheath ในส่วนของ rod จะประกอบด้วยผลึกของ hydroxyapatite ส่วน rod sheath จะล้อมรอบ rod ประกอบด้วย organic fibrous structure เป็นส่วนใหญ่การที่ enamel เป็น dense mineralization จึงช่วยป้องกันพื้นผิวด้านนอกของ anatomical crown จากการสึกกร่อนเมื่อใช้งาน และการที่ผิวของ enamel เรียบจึงเป็น self-cleaning ability ทำให้เศษอาหาร , bacteria , อาหารแป้งเหนียว ๆ ฯลฯ เกาะได้ยาก

2.2.3.2 เนื้อฟัน (Dentin หรือ Dentine) เป็น hard, dense , calcified tissue อ่อนกว่า enamel แต่แข็งกว่า cementum และ bone เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของตัวฟัน (main body of the tooth) โดยล้อมรอบ pulp cavity ไว้ จะถูกคลุมด้วย enamel ในส่วนของ anatomical crown และถูกคลุมด้วย cementum ในส่วนของ anatomical root แม้ dentin จะเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของตัวฟันแต่อยู่ภายในจึงมองไม่เห็นจากภายนอกในฟันปกติ ยกเว้นในกรณีถ่ายภาพรังสีของฟัน หรือการตัดฟันเป็นชิ้นๆ (a sectioned tooth) หรือ กรณีที่ฟันสึกอย่างมาก dentin มีสีเหลือง ยืดหยุ่นได้ มีส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ คือ 70% เป็นสารอนินทรีย์ calcium hydroxyapatite (inorganic calcified) และ 30% เป็นสารอินทรีย์ (organic) และน้ำ โดยสารอินทรีย์นี้ประกอบด้วย collagen และ mucopolysaccharide ground substance โดย dentine จะมีความต่างจาก enamel คือ สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ได้เรียกส่วนที่สร้างขึ้นมาใหม่นี้ว่า secondary dentine โครงสร้างพื้นฐานของ dentine ประกอบด้วย

2.2.3.2.1 Dentinal tubule มีลักษณะเป็นท่อ (tube) ยาวโยงระหว่าง dentinoenamel junction หรือ dentinocemental junction ไปยัง pulp ซึ่งภายในท่อนี้จะมีส่วน cellular extension ของ odontoblast อยู่เรียกว่า odontoblastic process

2.2.3.2.2 Pretubular dentin เป็นบริเวณที่มี crystalline content มากกว่าอยู่ล้อมรอบ dentinal tubules

2.2.3.2.3 Intertubular dentin เป็นบริเวณส่วนใหญ่ของ dentine

2.2.3.3 เคลือบรากฟัน (Cementum) เป็น bonelike substance, hard tissue ซึ่งคลุมเนื้อฟันส่วนล่างของ anatomical root ของตัวฟันไว้ มีหน้าที่เป็นตัวกลาง (medium) ให้ periodontal ligament ยึดฟันกับ alveolar bone โดย Cementum จะแข็งน้อยกว่า enamel หรือ dentine แต่แข็งกว่ากระดูก (bone) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันทางสรีระศาสตร์ ส่วนประกอบทางเคมีของ cementum ประกอบด้วย 45-50% เป็นสารอนินทรีย์ calcium- hydroxyapatite (inorganic calcified) ,50-55% เป็นสารอินทรีย์ (collagen fibers) และน้ำ Cementum จะค่อนข้างบางที่บริเวณ cervical line แต่จะหนาขึ้นเล็กน้อยบริเวณปลายราก มีความหนาเพียง 50-100 ไมครอน รอยต่อระหว่าง cementum และ dentine เรียกว่า dentinocemental junction Cementum มี 2 ชนิดคือ Cellular cementum และ Acellular cementum

2.2.3.4 โพรงฟัน (Pulp) เป็น soft tissue ที่อยู่ในช่องว่างกลางฟัน (central cavity of tooth) ซึ่งมี dentin ล้อมรอบ ประกอบด้วยเส้นเลือด (blood vessels) ท่อน้ำเหลือง (lymph vessels) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ประกอบด้วย fibroblasts และ collagen fibers เส้นประสาท (nerve tissue) และเซลล์พิเศษสำหรับสร้าง dentine เรียก Odontoblasts ซึ่งจะเรียงบุผนังของ pulp cavity หน้าที่ของ odontoblast คือ สร้าง primary และ secondary dentine โดยจะสร้าง secondary dentine เมื่อฟัน

ได้รับอันตรายจากสารเคมี (chemical causes) เครื่องจักรกล (mechanical cause) หรือจากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial causes) เส้นเลือดมีหน้าที่นำอาหารมาเลี้ยงฟัน ซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง secondary dentine ขณะเดียวกันเส้นเลือดที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells) ซึ่งทำหน้าที่ต่อต้านการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาใน pulp ส่วนเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymph tissues) จะเป็นตัวกรองของเหลวภายในฟัน เนื้อเยื่อประสาทจะทำหน้าที่รับความรู้สึก และจะตอบสนองต่อความเจ็บปวดเท่านั้น

2.2.3.5 โพรงประสาทฟัน (Pulp cavity) เป็นช่องว่างที่อยู่กลางตัวฟัน ภายในมี pulp อยู่ผนังของ pulp cavity จะบุด้วย odontoblasts ซึ่งมีหน้าที่สร้าง secondary dentine pulp cavity ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

2.2.3.5.1 Pulp canal หรือ root canal เป็นส่วนของโพรงประสาทฟัน (pulp cavity) ที่อยู่ในรากฟัน รูเปิดของ pulp canal ที่บริเวณปลายรากฟัน ซึ่งเป็นทางเข้าออกของ pulp tissue เรียกว่า apical foramen

2.2.3.5.2 Pulp chamber เป็นส่วนที่กว้างที่สุดของโพรงประสาทฟัน ส่วนใหญ่จะอยู่ตอนกลาง anatomical Crown

2.2.3.5.3 Pulp horn เป็นส่วนที่ยื่นมาจาก pulp chamber เข้าไปใน cusp หรือ lobes

2.2.4 Cervical line เป็นเส้นที่มองเห็นได้ที่ผิวด้านนอกของฟัน เป็นรอยต่อของ enamel กับ cementum อาจเรียกอีกชื่อว่า cemento-enamel junction (CEJ) เป็นเส้นแบ่งระหว่าง anatomical crown กับ anatomical root เส้นนี้จะอยู่รอบ neck หรือ cervix ของฟัน cervix หรือ neck เป็นบริเวณที่แคบ หรือคอดของฟัน ซึ่งจะอยู่ที่รอยต่อระหว่างตัวฟัน (crown) กับรากฟัน (root)

2.2.5 Dentino-enamel junction (DEJ) เป็นเส้นที่อยู่ภายใน anatomical crown เป็นรอยต่อของ dentine กับ Enamel

2.2.6 Periodontal ligament or membrane เป็นเส้นใย fibrous attachment ยึด cementum ของฟันกับกระดูก

2.2.7 เหงือก (Gingiva or gum) เป็น fibrous tissue ที่ถูกคลุมด้วย mucous membrane โดยจะอยู่รอบๆ กอฟัน และคลุมอยู่บน alveolar processes

2.2.8 Periodontium เป็นคำที่ใช้เรียก supporting and investing structures ของฟัน ส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น gingival, alveolar bone, cementum และ periodontium ligaments

2.3 สรุปรูปหน้าที่ของ dental pulp

2.3.1 Formative-dentine producing cells (Odontoblasts) จะทำหน้าที่สร้าง dentin ตลอดชีวิต ของฟันชิ้นนี้เรียกว่า dentine นี้ว่า secondary dentine

2.3.2 Sensory-nerve endings ที่ฟันนี้จะรับรู้ความรู้สึกเกี่ยวกับความเจ็บปวด อันเนื่องมาจากความร้อน ความเย็น การเจาะ (drilling) ของหวาน ฟันผุ การบาดเจ็บ (trauma) หรือการติดเชื้อ (infection)

2.3.3 Nutritive อาหารที่มาเลี้ยงจะมากับเส้นเลือดที่เข้ามายัง pulp และไปยัง dentine

2.3.4 Defensive or protective มีการตอบสนองต่ออันตรายที่เกิดกับตัวฟัน เช่น ฟันผุ โดยมีการสร้าง dentine มาซ่อมแซม (Reparative dentine) ด้วยเซลล์ที่เรียกว่า Odontoblasts

จะเห็นได้ว่า ลักษณะทางกายวิภาคของฟัน มีความสลับซับซ้อน อีกทั้งยังมีลักษณะที่พิเศษคือมีความแข็งแรงที่ห่อหุ้มเป็นเปลือกนอก และมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายใน โดยมีระบบเส้นประสาทและหลอดเลือดทำหน้าที่ให้เซลล์นั้นมีชีวิตอยู่ และเนื่องจากส่วนที่แข็งที่สุดห่อหุ้มส่วนที่มีชีวิตอยู่นี้เองทำให้ฟันมีการรักษาสภาพได้เป็นอย่างดี เมื่อมีการตายเกิดขึ้นเซลล์ในโพรงฟันจึงเสื่อมสลายและตายตามอายุขัยที่แท้จริงของมัน ไม่ได้เกิดจากสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ช่วยเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ ต่างจากเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายที่นำมาใช้ในการหาระยะเวลาการตายดังที่เคยใช้มาโดยทั่ว ๆ ไป ฟันจึงเป็นอวัยวะหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาช่วยในประเมินระยะเวลาหลังการตาย

3. โอดอนโตบลาสต์

โอดอนโตบลาสต์ เป็นเซลล์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis) โดยโอดอนโตบลาสต์ ผลิต organic complex ออกมานอกเซลล์ และในเวลาต่อมาเกิด mineralization บน organic matrix นั้น แล้วกลายเป็นเนื้อฟัน (dentine) (Dental anatomy 2541 : 65)

โอดอนโตบลาสต์ มี differentiation มาจาก ecto-mesenchyme ของ dental papilla ตามกลไกดังนี้

1. กลุ่มเซลล์ที่อยู่ใต้ inner enamel epithelium เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว
2. เซลล์ที่ได้สัมผัสกับ basement membrane จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิด differentiation จาก preodontoblast ซึ่งเป็นเซลล์รูปไข่ หรือ polygonal ไปเป็น โอดอนโตบลาสต์ ซึ่งมีรูปร่าง high cuboid หรือ columnar
3. โอดอนโตบลาสต์มี basal end อยู่ใกล้กับ pulp cavity และมี apical process ทางด้านที่สัมผัสกับ basement membrane
4. กระบวนการดังกล่าวเกิดจากหลายปัจจัย แต่มีหลักฐานว่า fibronectin ซึ่งเป็น extracellular matrix ที่สำคัญชนิดหนึ่งในชั้น basement membrane นั้นมีบทบาทด้วย
5. จากการศึกษาพบว่า ผิวเซลล์ของ preodontoblast มี fibronectin receptor จำนวนมาก

6. preodontoblast ที่ได้จับกับ fibronectin จะถูกกระตุ้นให้เกิด differentiation และมี polarization แล้วในที่สุดเจริญเป็น odontoblast

3.1 โอดอนโตบลาสต์กับการสร้างเนื้อฟัน (dentine) การสร้าง dentine แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ

ระยะที่หนึ่ง ได้แก่ การสร้าง organic matrix ของ dentine

ในระหว่างที่เซลล์เกิด differentiation นั้น โอดอนโตบลาสต์จะเกิด polarization ขึ้น Polarization หมายถึงกระบวนการตามเหตุการณ์ดังนี้คือ

3.1.1 นิวเคลียสของเซลล์เคลื่อนไปอยู่ ณ ตำแหน่ง basal pole

3.1.2 organelle โดยเฉพาะอย่างยิ่ง mitochondria, rough endoplasmic reticulum และ golgi body จะไปอยู่ที่ apical pole (หรือเรียกว่า secretory pole) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่า odontoblast กำลังผลิตโปรตีน Organic matrix ของ dentine มีลักษณะดังนี้ คือประกอบด้วย collagen type I (86%) และ non-collagenous protein อื่น ๆ (14%) และถูกสร้างบน ribosome ของ rough endoplasmic reticulum และถูกรวบรวมไว้ที่ golgi body แล้วขนย้ายออกสู่ด้านนอกทาง apical end ของ odontoblast ในลักษณะ transport vesicle ผ่านทาง odontoblast process Organic matrix ถูกหลั่งออกมาในรูปของ collagen แล้วในระยะต่อมาจึงเกิด mineralization Organic matrix ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการ mineralization เรียกว่า predentin

ขณะที่การสร้าง organic matrix กำลังดำเนินไปอยู่นั้น โอดอนโตบลาสต์ จะลอยห่างออกจาก Dentoenamel junction (DEJ) เข้าไปสู่ pulp ที่ละน้อย แต่ส่วนปลายของ odontoblast process จะยังคงอยู่ที่เดิม ทำให้ odontoblast process มีความยาวขึ้น เมื่อเกิด mineralization ใน predentine แล้ว จะมีผลให้ odontoblast process อยู่ใน dental tubule อย่างไรก็ตาม ส่วนปลายของ odontoblast process บางส่วนอาจแทรกไปถึงชั้นของ inner enamel epithelium ทำให้เห็นเป็น enamel spindle ในชั้น enamel ของฟันที่เคี้ยวโตเต็มที่แล้ว

ระยะที่สอง ได้แก่ การเกิด mineralization ใน organic matrix ที่ถูกสร้างขึ้น ก่อนที่จะเกิด mineralization นั้น odontoblast จะผลิตโปรตีนชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น phosphoprotein, osteocalcin และ dentin sialoprotein

Calcium ion และ phosphate ion จะเกิดการตกตะกอนเป็น hydroxapatite crystal ใน organic matrix ของ predentin ทำให้เกิดเป็นเนื้อฟัน hydroxapatite crystal มีสูตรโครงสร้างเป็น $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ และมีมิติ (กว้าง x ยาว x สูง) เฉลี่ยประมาณ 65x425x25 นาโนเมตร

3.2 โอดอนโตบลาสต์กับการสร้างรากฟัน (root formation) เซลล์ในชั้นของ Hertwig's epithelial root sheath จะเหนี่ยวนำเซลล์ของ dentin pulp ให้เกิด differentiation เป็น odontoblast แล้ว

odontoblast นั้นจะหลั่ง organic matrix ออกมาอย่างต่อเนื่อง ต่อมาเมื่อเกิด mineralization ที่ชั้นแรกของ root dentin แล้ว Hertwig's epithelial root sheath ที่ขาดออกมาเรียกว่า เศษเยื่อหุ้มมาลาเซ (epithelial rests of Malassez หรือ Debris of Malassez) ส่วน mesenchymal cell ของ dental sac ที่ล้อมรอบ root dentin ซึ่งไม่มี Hertwig's epithelial root sheath นั้น จะเคลื่อนตัวเข้าไปสู่บริเวณผิวของ root dentin แล้วเกิด differentiation เป็นเซลล์ที่สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast)

3.3 โอดอนโตบลาสต์กับโครงสร้างของ Dentin เนื้อฟันประกอบด้วยโอดอนโตบลาสต์ ซึ่งให้ odontoblastic process ทอดไปใน dentinal tubule แล้วแตกแขนงเป็น network ที่ dentinoenamel และ dentinocemental junction การเรียงตัวของ collagen fibril ซึ่งเป็น dentinal matrix ไม่เป็นระเบียบซึ่ง collagen fibril จะถูกหุ้มด้วย hydroxyapatite crystals เมื่อมี calcification ซึ่งมองเห็นได้จาก electron micrograph

3.3.1 Dentinal tubule ทอดจาก pulpal surface ของ dentine ออกไปสู่ DE junction ลักษณะทอดตัวเป็นรูปตัว S โดยเริ่มโค้งแรกขึ้นไปทาง cusp หรือ incisal edge แต่ละ tubule จะตั้งฉากกับ DE และ DC junction สำหรับบริเวณ cusp และ incisal edge จะทอดเกือบเป็นเส้นตรง ลักษณะเป็นช่องแคบ ซึ่งมีความกว้างประมาณ 3-4 ไมโครเมตร และแคบลงที่บริเวณ periphery จะประมาณ 5:1 จำนวนของ tubule ที่ใกล้ pulp กับที่ periphery เมื่อคิดต่อเนื้อที่เท่ากันจะมีอัตราส่วน 4:1 โดยบริเวณใกล้ pulp มีจำนวนประมาณ 30,000 ถึง 75,000 tubules ต่อตารางมิลลิเมตร และบริเวณตัวฟันมี tubule มากกว่าบริเวณราก สำหรับแขนงของ tubule มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร

3.3.2 Odontoblastic process เป็น cytoplasmic process ของโอดอนโตบลาสต์ ซึ่งทอดไปใน dentinal tubule ขนาดของ process จะใหญ่ที่บริเวณใกล้กับตัวเซลล์โอดอนโตบลาสต์ และเล็กลงไปทาง periphery ภายใน process ประกอบด้วย organelle พวก microtubule, microfilament, mitochondria, dense body คล้าย lysosome และ coated vesicle ซึ่งจะเปิดออกสู่ extracellular space แต่ไม่มีพวก ribosome และ endoplasmic reticulum Odontoblastic process จะแตกแขนงให้ terminal branch ที่ใกล้ DE junction และแขนงของ process จะพันไปรอบ ๆ tubule และไปรวมกับแขนงของ process ข้างเคียงใน peripheral tubule อาจจะมี extracellular fluid ถ้า process นี้ทอดเข้าไปใน enamel ระหว่างที่มีการเจริญเติบโตเรียกว่า enamel spindle

3.3.3 Peritubular dentin (Intratubular dentin) จากการศึกษาคross ground section ด้วย transmitted light เห็นเป็นวงใส ๆ รอบ odontoblastic process เรียกว่า peritubular dentin สำหรับเนื้อฟันระหว่าง peritubular dentin เรียกว่า intertubular dentin เมื่อศึกษาด้วย X-rays diffraction และ electron microscopy แสดงให้เห็นว่า Peritubular dentin มีสารอนินทรีย์สูงกว่าใน intertubular dentin บริเวณรอยต่อระหว่าง Peritubular dentin และ intertubular dentin เห็นเป็น

ขอบเขตชัดเจน เรียกว่า Sheath of Newmann ซึ่งไม่ได้รับการยืนยันจาก electron microscopy แต่มีการติดต่อกันระหว่าง organic fibril ของ peritubular dentin และ intertubular dentin

3.3.4 Intertubular dentin เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ dentin แม้ว่าจะมี highly mineralized แต่องค์ประกอบมากกว่าครึ่งหนึ่งก็เป็น organic matrix ซึ่งประกอบด้วย collagen fibrils ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.05-0.2 ไมโครเมตร จำนวนมาก ห่อหุ้มด้วย amorphous ground substance ลักษณะของ collagen fibril คือ มี crossband ซึ่งห่างกันประมาณ 640 Å โดย fibril จะรวมตัวกันเป็น bundle และทอดอย่างไม่มีระเบียบไปรอบ ๆ dentinal tubule ออกสู่พื้นผิวของเนื้อฟัน dentin ที่เริ่มสร้างครั้งแรกได้ชั้นของ enamel และ cementum จะประกอบด้วย bundle ของ fibril ซึ่งหยาบ และทอดตั้งฉากกับพื้นผิวของเนื้อฟัน ทำให้เกิดเป็นชั้นซึ่งมีลักษณะต่างออกไปเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เรียกว่า Mendtal dentin และเรียก dentin ที่สร้างตามมาเป็นส่วนใหญ่ของเนื้อฟันว่า Circumpulpal dentin

3.4 การเปลี่ยนแปลงของ dentin หลังการใช้งานและอายุมากขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงใน dentin ได้เนื่องจาก dentin ถูกสร้างตลอดชีวิต และ dentin ก็เหมือนเนื้อเยื่อที่มีชีวิตทั่ว ๆ ไป ซึ่งจะมีปฏิกิริยาโต้ตอบต่อ Physiological และ pathological stimuli เมื่อฟันถูกใช้งานแม้ในเวลาอันสั้นก็จะมี dentin ที่ถูกสร้างขึ้นอย่างช้า ๆ เรียกว่า secondary dentin แต่ถ้ามีพยาธิสภาพ ก็จะมีปฏิกิริยาตอบสนองโดยการสร้าง transparent dentin, reparative dentin หรือมีการเปลี่ยนแปลงเป็น dead tract

3.4.1 Secondary dentin เมื่อฟันเริ่มถูกใช้งานและโอดอนโตบลาสต์ยังคง active อยู่ จึงทำให้เกิดการสร้าง dentin ขึ้นมาเสริมเป็น Secondary dentin โดย dentinal tubule จะมีทิศทางที่หักเหไปจาก dentin เดิมซึ่งเป็น primary dentin ทำให้เห็น Secondary dentin แยกจาก primary dentin ได้โดย demarcation line และ dentin ที่ถูกสร้างใหม่นี้ dentinal tubule จะมีจำนวนน้อยกว่าปกติ และการเรียงตัวไม่ค่อยเป็นระเบียบนัก อย่างไรก็ตาม dentin formation ก็ไม่สม่ำเสมอในทุกบริเวณ โดยเฉพาะบริเวณ floor และ root ของ pulp chamber จะหนากว่าบริเวณอื่นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ primary และ secondary dentin อาจจะเป็นเพราะ โอดอนโตบลาสต์เรียงตัวกันแน่น เมื่อเริ่มใช้งานจะมีบางเซลล์ตายไป ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่สำหรับเซลล์ที่เหลืออยู่

3.4.2 สาเหตุจาก wear, erosion, caries และ operative procedure ทำให้มีอันตรายไปถึง odontoblastic process อาจทำให้โอดอนโตบลาสต์บางตัวตายไป บางเซลล์ที่เหลือรอดอยู่ก็จะสร้าง dentin ต่อไป ในขณะที่เดียวกันก็จะมี migration ของ undifferentiated cells จาก pulp เมื่อเซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้นก็จะสร้าง hard tissue ขึ้นมาคลุมด้านใน (pulpal surface) ของบริเวณที่ถูกทำลายเรียกว่า Reparative dentin ซึ่งบริเวณนี้ dentinal tubule จะขดพันกันและจำนวนน้อย แล้วเซลล์ซึ่งทำหน้าที่สร้าง reparative dentin นี้ก็จะฝังตัวอยู่ใน intercellular substance ต่อไปเซลล์ก็จะ degenerate

3.4.3 เมื่อ dentin ถูกทำลายจะมีการตกตะกอนของ calcium salt มา deposit ภายในหรือรอบ odontoblastic process สุดปลายก็จะอุดตัน dentinal tubule อาจจะพบในฟันของผู้สูงอายุ มองเห็น transparent จากการศึกษาค้นด้วย X-ray absorption test และ permeability study พบว่า transparent dentin แข็งกว่าและเหนียวกว่า dentin ปกติ อาจศึกษาโดยใช้ SEM หรือ transmitted light จะเห็นเป็นสีจาง ๆ และเห็นเป็นสีดำใน reflected light อาจจะเกิดรอบ ๆ enamel lamella

3.4.4 เกิดจากการสูญเสีย odontoblastic process ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นตั้งแต่ฟันยังมีชีวิตอยู่ สาเหตุจาก caries, erosion, attrition, abrasion หรือ cavity preparation ทำให้เกิด degeneration ของ odontoblastic process โดยเฉพาะบริเวณ pulp horn ซึ่งมี odontoblast เบียดกันแน่น ทางด้าน pulpal cell ของ dentin ก็จะมี reparative dentin มาปิด dentinal tubule ภายใน tubule จึงจะมี fluid หรือ gas เมื่อทำ ground section พบว่า fluid หายไปและ tubule ก็จะมีเฉพาะ gas อยู่ภายใน เมื่อดูด้วย transmitted light จะเห็นเป็นสีดำ แต่จะเป็นสีขาวใน reflected light เรียกกลุ่มของ dentinal tubule นี้ว่า Dead tract ซึ่งแทบไม่มี sensation

โอคตอนโตบลาสต์จัดเป็นเซลล์ประเภท fixed post-mitotic cell หลังจากที่มีการ differentiate แบบสมบูรณ์แล้ว และดูเหมือนจะไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป เป็นตัวเริ่มกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis) ทั้งในระยะเวลาการพัฒนาดังฟัน และระยะที่ฟันโตเต็มที่แล้ว ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะอย่างมากของ dental-pulp complex (Pashley et al. 2006: 196) โดยจะมีการสร้าง matrix ที่ประกอบไปด้วย คอลลาเจนไฟบริน โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และโปรตีนไกลิโคโปรตีนที่สามารถให้แร่ธาตุผ่านได้ ลักษณะโครงสร้างของโอคตอนโตบลาสต์จะมี high ordered RER, Golgi complex ที่เด่นชัด, secretory granule และปริมาณ ไมโทคอนเดรียจำนวนมาก นอกจากนั้นยังพบ RNA ในปริมาณมาก ในนิวเคลียสยังมีนิวคลีโอไลต์หนึ่งหรือมากกว่านั้น ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์ที่มีการหลั่งโปรตีน (Protein secreting cell) ในทางกลับกันกับโอคตอนโตบลาสต์ที่แอคทีฟ (active odontoblast) ในภาวะพักหรือ inactive odontoblast จะมีการลดจำนวน ออร์แกเนล ในระยะการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis) โอคตอนโตบลาสต์จะสร้าง dentinal tubule และทำให้เนื้อฟันเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิต (living responsive tissue) (Okiji 2002: 108)

เนื่องจากในโพรงฟัน มีเซลล์ค่อนข้างบางเบา ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติในเรื่องของความสามารถในการทำงานในสภาวะขาดเลือดได้ระยะเวลาหนึ่ง เมื่อพิจารณาพร้อมกับลักษณะทางกายภาพที่มีเปลือกแข็งหุ้มภายนอกแล้ว ฟันจึงเป็นอวัยวะที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาเพื่อนำไปใช้ในการหาระยะเวลาหลังการตายเป็นอย่างมาก แต่การศึกษาเพื่อนำฟันมาใช้เป็นตัวช่วยในการบอกระยะเวลาการตายยังมี

อยู่น้อยมาก Duffy et al. (1991 : 1499) ได้เคยทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเน่าของเซลล์ในโพรงฟันพบว่าจะมีการเน่าและเสื่อมสลายจนหมดไปภายในเวลา 96-336 ชั่วโมง หรือ 4-14 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพสิ่งแวดล้อม และจากการทดลองของ Vaypotic et al. (2009 : 125) ที่ทำการศึกษาลักษณะของปริมาณ โอคอนโทบลาสต์ในโพรงฟันของมนุษย์ พบว่า ที่อุณหภูมิประมาณ 24 องศาเซลเซียส ปริมาณจะลดลงเรื่อย ๆ หลังการตายจนหมดไปหลังการตาย 5 วัน

4. การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยาการวิภาค (วิธีปฏิบัติงานทางพยาธิวิทยาการวิภาค 2546:1)

การปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อจากผู้ป่วย จะประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ๆ ดังนี้

4.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ (Preparation of tissue)

4.2 การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue processing)

4.3 การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin section)

4.4 การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Tissue staining)

4.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการตรวจ (Preparation of tissue)

หมายถึง การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำหัตถการด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะนำไปตรวจ และให้การวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจะแบ่งเป็นกระบวนการดังนี้

4.1.1 การแช่น้ำยาเพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อ (Fixation of Tissue) เมื่อนำเนื้อเยื่อต่าง ๆ ออกมาจากร่างกาย จำเป็นต้องมีการรักษาสภาพของชิ้นเนื้อนั้นให้มีโครงสร้างและรูปร่างลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงหรือเหมือนเมื่อขณะมีชีวิตอยู่มากที่สุด และสามารถที่จะเตรียมเป็น section บาง ๆ และย้อมติดสีได้ดี ป้องกันหรือหยุดการเน่าสลาย (Autolysis) ของเซลล์และเนื้อเยื่อ ปกป้องเบดที่เรียกที่จะทำให้เกิดการเน่าสลาย ช่วยทำให้เนื้อเยื่อแข็งตัวและป้องกันไม่ให้สูญเสียสารที่ซึมผ่านออกจากเซลล์ได้ง่าย ทำให้เนื้อเยื่อมีสภาพทนทานต่อกระบวนการต่าง ๆ ในการเตรียม section เช่น dehydration, clearing และ paraffin infiltration และยังทำให้เนื้อเยื่อติดสีดีขึ้น

น้ำยารักษาสภาพ คือ น้ำยาเคมีที่ใช้เก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อให้มีสภาพเหมือนกับอยู่ในร่างกายได้มากที่สุด ซึ่งคุณสมบัติของน้ำยารักษาสภาพที่ดีควรมีดังนี้

4.1.1.1 สามารถแทรกซึม (penetrate) เข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างรวดเร็ว

4.1.1.2 ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งคงรูปได้เมื่อผ่านขั้นตอนกรรมวิธีต่าง ๆ

4.1.1.3 รักษาชิ้นเนื้อไม่ให้เกิดการ autolysis พร้อมทั้งทำลายเบดที่เรียกได้อย่าง

รวดเร็ว

4.1.1.4 ทำให้การย้อมติดสีดีขึ้น โดยไม่ทำให้ชิ้นเนื้อหดตัว (shrinkage) หรือขยายตัว (swelling)

4.1.1.5 ไม่ทำลายหรือละลายส่วนหนึ่งส่วนใดของเนื้อเยื่อ

4.1.1.6 หยุคปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ต่าง ๆ

4.1.1.7 ภายหลังการตรึงชิ้นเนื้อ (fix) แล้ว สามารถย้อมสีได้หลายวิธี ทั้งการย้อมธรรมดาและย้อมพิเศษ

4.2 การตรวจด้วยตาเปล่าและการตัดชิ้นเนื้อ

Decalcification คือ การเอาเกลือแคลเซียมออกไปจากตัวอย่างที่มีเกลือแคลเซียมอยู่ เช่น กระดูก หรือ เนื้อเยื่อที่มีแคลเซียมพอกอยู่ (calcified tissue) เพื่อให้ตัวอย่างมีความอ่อน สะดวกต่อการตัดเป็นแผ่นบาง ๆ เช่นเดียวกับเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป เมื่อทำให้อ่อนตัวแล้วจึงทำการ process ตามขั้นตอนต่อไป

วิธีการเอาเกลือแคลเซียมออกไปจากตัวอย่างมีหลายวิธี ที่นิยมทำกันในห้องปฏิบัติการมี 2 วิธี คือ

4.2.1 วิธีกรดไนตริก (Nitric acid method)

4.2.1.1 นำตัวอย่างแช่ลงในสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 10% จนกระทั่งมีการเอาเกลือแคลเซียมออกไปจากตัวอย่างสมบูรณ์แล้วควรเปลี่ยนสารละลายทุกครั้งเมื่อใช้แล้ว เพื่อให้ได้ผลดี ไม่ควรเก็บไว้ใช้ต่อ

10% Nitric acid solution

Nitric acid, concentrated	10.0 ml
Distilled water	90.0 ml

4.2.1.2 ล้างน้ำประปาที่ไหล 30 นาทีเป็นอย่างน้อย

4.2.1.3 ทำให้เป็นกลางโดยแช่ใน 10% formalin อย่างน้อย 5 ชั่วโมง

4.2.1.4 นำตัวอย่างไปทำการย้อมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อต่อไป

วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถเอาเกลือแคลเซียมออกไปได้อย่างค่อนข้างรวดเร็ว ดังนั้น จึงต้องระมัดระวังพอสมควรอย่าให้ตัวอย่างอยู่ในกรดไนตริกนานเกินไป เพราะจะทำให้การติดสีนิวเคลียสเสียไป นิยมเอาตัวอย่างออกจากสารละลายก่อนตัวอย่างจะถูก decalcified อย่างสมบูรณ์

4.2.2 วิธีกรดฟอร์มิก-โซเดียม ซิเตรต (Formic acid – sodium citrate method) วิธีนี้ทำให้ผลดีกว่าวิธีกรดไนตริก การติดสีดีกว่า เพราะไม่ทำลายคุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์

4.2.2.1 แช่ตัวอย่างในสารละลายกรดฟอร์มิก-โซเดียม ซิเตรต จนกระทั่งตัวอย่างถูก decalcified อย่างสมบูรณ์ ผสม Solution A กับ Solution B อัตราส่วนเท่ากันก่อนจะใช้สารละลายควรจะเปลี่ยนทุกครั้งที่ใช้เพื่อให้ได้ผล

Solution A

Sodium citrate	50.0 gm
Distilled water	250.0 ml

Solution B

Formic acid, 90%	125.0 ml
Distilled water	125.0 ml

4.2.2.2 ล้างน้ำประปาที่ไหล 4-8 ชั่วโมง

4.2.2.3 นำตัวอย่างไปทำกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อต่อไป

วิธีนี้ทำให้ผลดีกว่ากรดไนตริก การติดสีดีกว่า เพราะไม่ทำลายคุณสมบัติของเซลล์ แม้ว่าตัวอย่างจะอยู่ในสารละลายดังกล่าวมานานกว่าปกติ ก็ไม่ทำให้การติดสีเสียไป

4.3 การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue processing)

ตัวอย่างหรือชิ้นเนื้อที่จะนำมาศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ หรือจุลกายวิภาคเคมี ส่วนใหญ่จะต้องตัดให้เป็น section บาง ๆ ขนาด 5-10 ไมครอน แล้วนำไปย้อมสีหรือทำปฏิกิริยาต่างๆทางเคมี เพื่อให้เห็นรายละเอียดหรือทราบส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อต่างดังกล่าว การที่จะตัดให้ได้ section บาง ๆ ตัวอย่างหรือชิ้นเนื้อนั้นจะต้องแข็งพอ และมีดที่ใช้ตัดจะต้องคมมาก

วิธีทำให้ตัวอย่างแข็งเพื่อที่จะตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ ด้วยเครื่องตัด microtome และมีด microtome knife มี 2 วิธี คือ embedding ด้วย embedding media ต่าง ๆ และ freezing ตัวอย่างหรือชิ้นเนื้อให้แข็ง การทำตัวอย่างให้แข็งโดยการแช่แข็ง (freezing) และตัดในเครื่องตัดตัวอย่างชนิดที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryostat หรือ freezing microtome) การทำตัวอย่างให้แข็งโดยการ embed ใน embedding media นั้น ตัวอย่างจะต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนี้ (ปราโมทย์ วนิชย์ธนาคม 2530 : 13)

- 4.3.1 การล้าง (Washing)
- 4.3.2 การตรึง (Fixative)
- 4.3.3 การเอาน้ำออก (Dehydration)
- 4.3.4 Clearing
- 4.3.5 Infiltration
- 4.3.6 Embedding



ภาพที่ 12 เครื่องหล่อบล็อกชิ้นเนื้อ (Embedding Center)

ที่มา : Medical Equipment source ,Embedding center [Online], accessed 16 September 2011.

Available from <http://medequipsources.com/microm-ec-350-embedding-center/>

4.3.1 การล้าง (Washing) ตัวอย่างหรือชิ้นเนื้อที่ได้ผ่านการดองมาอย่างดีแล้ว จะต้องผ่านการล้างด้วยน้ำหรือสารละลาย ทั้งนี้เพราะน้ำยารักษาภาพบางชนิดอาจทำให้เกิดตะกอนขึ้น ภายในชิ้นเนื้อซึ่งทำให้รบกวนต่อการตัด การติดสี และการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นผลทำให้การแปลผลผิดพลาดไปได้ เช่น ชิ้นเนื้อที่รักษาภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลินเป็นเวลานาน จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลในชิ้นเนื้อได้

ระยะเวลาของการล้างขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำยารักษาภาพ และเวลาที่ใช้ ซึ่งจะทราบได้จากรายละเอียดและข้อแนะนำของการใช้น้ำยารักษาภาพแต่ละชนิด เช่น ถ้าเป็นฟอร์มาลินเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะต้องล้างใน running water 10-20 นาที

4.3.2 การตรึง (Fixative) สำหรับประโยชน์และวัตถุประสงค์การตรึง (Fixative) ดังที่กล่าวมาแล้วในเรื่องการรักษาภาพแล้ว แต่ในขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อยังคงต้องมีขั้นตอนการตรึงอยู่เพื่อรักษาภาพให้ดียิ่งขึ้นไปอีก เวลาที่ใช้สำหรับขั้นตอนนี้ประมาณ 4-8 ชั่วโมง ช่วงเวลาดังกล่าวนี้จะไม่ทำให้ชิ้นเนื้อได้รับผลกระทบจากน้ำยา fixative มากเกินไปและยังช่วยตรึงให้เนื้อเยื่อมีสภาพดียิ่งขึ้นไปอีกด้วย

4.3.3 การเอาน้ำออก (Dehydration) เป็นวิธีการเอาน้ำออกจากตัวอย่าง โดยใช้สารเคมีที่มีหน้าที่ดูดน้ำ ทั้งนี้เพื่อเตรียมตัวอย่างให้พร้อมที่จะยอมให้ embedding media ซึมผ่านเข้าไปได้ สารเคมีที่ใช้ในการเอาน้ำออกเรียกว่า Dehydrant ได้แก่ ethyl alcohol, methyl alcohol, buthyl alcohol, isopropyl alcohol, acetone, dioxane, tetrahydrofuran, cellusolve (ethylene glycol monoethyl ether) และ triethyl phosphate โดยทั่วไปนิยมใช้ ethyl alcohol และรองลงมาคือ acetone Ethyl alcohol เป็น dehydrant ที่ดูดเอาน้ำออกจากตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำให้ชิ้นเนื้อแข็งเปราะ และไม่ปนเปื้อนต่อสุขภาพ แต่มีข้อเสียคือทำให้เนื้อเยื่อเหี่ยว干了 เนื่องจากปฏิกิริยาของ alcohol และน้ำ ข้อควรระวังคือ ถ้าแช่ชิ้นเนื้อใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 80% นานๆ จะทำให้ชิ้นเนื้อแข็งและเปราะ ถ้าแช่ใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 70% นาน ๆ จะทำให้ชิ้นเนื้อละลาย และนอกจากนี้ การแช่ไว้ใน ethyl alcohol นานกว่าปกติ จะทำให้การติดสีด้อยลงไป Acetone เป็น dehydrant ที่สามารถดูดเอาน้ำออกจากตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วมาก จึงมักนิยมใช้ในงานเร่งด่วน ข้อดีของ acetone คือมีราคาถูก และดูดน้ำออกได้อย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือ ทำให้ชิ้นเนื้อเหี่ยว干了และแข็ง จึงทำให้ตัด section ยาก การเอาน้ำออก กระทำโดยผ่านตัวอย่างลงไป ใน dehydrant ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปมากคือ 70%, 80% , 95% ไปจนถึง 100%

4.3.4 Clearing คำนี้นิยามรูปศัพท์แปลว่า ทำให้ใส แต่ความหมายตามวิธีของ tissue processing คือ การนำสารเคมีใหม่เข้ามาแทนที่ dehydrant และสารเคมีนี้เป็นตัวกลางที่ยอมให้ embedding media แทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ ตัวกลางนี้เรียกว่า clearing agent ได้แก่ xylene, chloroform, toluene, benzene, dioxane , cedarwood oil, amyl acetate, terpineol และ carbol-xylol คุณสมบัติของ clearing agent คือจะต้องเข้ากันได้กับ dehydrant และ embedding media โดยทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม Clearing agent จะไปดูดเอาแอลกอฮอล์ออกจากตัวอย่างก่อน เรียกว่า Dealccoholization หลังจากนั้น จึงเอาตัวอย่างเข้าสู่ embedding media เหตุที่ต้องทำเช่นนี้เพราะ dehydrant ไม่สามารถเข้ากันได้กับ embedding media ได้ Clearing agent ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการคือ xylene

4.3.5 Infiltration (Impregnation) คือ การ remove เอา clearing agent ออกจากตัวอย่าง แล้วแทนที่ด้วย embedding media ซึ่ง embedding media เป็นสารที่จะช่วยนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตลอดจนโครงสร้างภายในเซลล์และเนื้อเยื่อคงรูป และแข็งพอที่จะตัดเป็นแผ่นบาง ๆ ได้ Embedding media สำหรับงานเกี่ยวกับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา มักนิยมใช้ พาราฟิน ส่วนงานที่เกี่ยวข้องกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ transmission จะใช้ plastic embedding media เช่น EPON 812 และ alraldite ซึ่งเป็นสารพวก epoxy resin เป็นต้น พาราฟินเป็นสารที่ได้มาจากการสกัดปิโตรเลียมดิบ เป็น long-chain hydrocarbon ของ methane series ละลายที่อุณหภูมิ 56-58°C ปกติเป็นของแข็งที่

อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะใช้ต้องทำให้เป็นของเหลวเสียก่อน พาราฟินที่เหลวจะแทรกซึมเข้าไปใน เซลล์และเนื้อเยื่อ

พาราฟินที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีหลายชนิด แต่ที่นิยมและถือว่าดีที่สุด คือ parplast รองลงมาคือ bioloid และ tissue-mat การทำให้พาราฟินละลายเป็นของเหลวอาจใช้ ตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 56-58°C หรือใช้ electric paraffin dispenser ซึ่งเป็นหม้อไฟฟ้าละลาย พาราฟินและมีก๊อกเปิด-ปิด ให้พาราฟินเหลวไหลออกมาได้ จึงสะดวกต่อการใช้



ภาพที่ 13 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Tissue processor)

4.3.6 Embedding คือ การเอาตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ที่ผ่านมาแล้ว ข้างต้น มาฝังใน embedding media ที่เหลว และหล่อด้วยแม่พิมพ์ (mold) เมื่อทำให้อุณหภูมิของ embedding media ลดลง บล็อกที่ได้จะมีความแข็งพอที่จะตัดเป็น section ได้ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) การ embed ตัวอย่าง อาจทำได้โดยการหล่อแต่ละตัวอย่างในแม่พิมพ์ หรือหล่อหลาย ๆ ตัวอย่างในถาดเดียวกันแล้ว จึงแยกแต่ละตัวอย่างหลังจากที่ embedding media แข็งตัวแล้ว

แม่พิมพ์สำหรับหล่อตัวอย่างมีหลายชนิด เช่น shallow pan (ขนาด 10x8x2 นิ้ว), L-shaped metal, Paper boat และ tissue tech cup.

วิธีการ embed กระทำโดยเอาตัวอย่างออกจาก embedding medium ที่เหลว วาง ตัวอย่างลงในแม่พิมพ์หรือถาด โดยวางด้านที่ต้องการจะตัดอยู่ด้านล่าง และควรที่จะกดตัวอย่างให้ ผิวหน้าแบนราบติดกับพื้นไม้ของแม่พิมพ์ เสร็จแล้วหล่อด้วย embedding medium เหลว ให้เต็ม

แม่พิมพ์ใส่สลากระบายเลขของตัวอย่าง ปล่อยให้เย็นลง เมื่อ medium แข็งตัว จะได้บล็อกที่มีตัวอย่างอยู่ตรงกลาง



ภาพที่ 14 บล็อกพลาสติกใส่ชิ้นเนื้อ (cassette ring)



ภาพที่ 15 แม่พิมพ์ใส่ชิ้นเนื้อ (Stainless Base Mold)

ที่มา : Bimedical Marketing Associates , Base mold&Biopsy pads [Online] , accessed 16 September 2011.

Available from <http://www.biomedicalmarketing.com/Simport/Histology/MoldsPads.html>

4.4 การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin section) การตัดตัวอย่างให้เป็นแผ่นบางด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) นับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญยิ่งในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง เพราะ

ตัวอย่างที่ตัดได้บางพอเท่านั้น (บางน้อยกว่า 7 ไมครอน) จึงจะสามารถนำไปดูและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ แผ่นตัวอย่างที่หนาเกินไป จะทำให้ดูยาก ยากต่อการเห็นรายละเอียดของเซลล์ และทำให้เกิดปัญหาในการถ่ายรูป จะได้ภาพที่ไม่ชัดเจน ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการบันทึกภาพและรายงานผล วิธีการตัดตัวอย่างให้เป็นแผ่นบางด้วย microtome เรียกว่า microtomy หรือ sectioning ชิ้นเนื้อที่ตัดได้เรียกว่า section หรือ tissue section การที่จะตัดให้ได้ section ที่บางและดี ขึ้นอยู่กับความรู้และความชำนาญในการใช้เครื่องมือตัดชิ้นเนื้อ



ภาพที่ 16 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary Microtome)

ที่มา : Maikadara medical, Histopathology [Online], accessed 16 September 2011. Available from <http://mkdmedical.com/histopath.html>

Paraffin section การเตรียมตัวอย่างเป็นแผ่นบาง โดยวิธี embed ตัวอย่างในพาราฟินและตัดบล็อกพาราฟินด้วยเครื่อง microtome เป็นวิธีที่นิยมทำเป็นงานประจำวันทั่วไป ขั้นตอนการทำ paraffin section มีดังนี้

4.4.1 Trimming คือ การตัดเอาพาราฟินที่อยู่รอบ ๆ ตัวอย่างทิ้งสี่ด้านออกไป โดยเฉพาะด้านซ้าย-ขวา เมื่อวางบล็อกให้ด้านยาวขนานกับใบมีด (microtome knife) เหตุที่ต้อง trim

พาราฟินออกไป ก็เพื่อให้การตัด section ง่ายขึ้น ทำให้ได้ section เต็มที่โดยไม่มีพาราฟินคอยดึงอยู่ทั้งสองด้าน และทำให้สะดวกในการแผ่ตัวอย่างบน water bath

การ trim บล็อกพาราฟิน ทำโดยใช้ใบมีดบาง ๆ หรือ ปลายของปากคีบปลายแหลม (fine point forcep) กรีดขนานกับชิ้นเนื้อด้านซ้ายและขวาให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เพราะทำให้ตัด section ได้ง่ายและ section ที่ได้จะเกิดเป็นแถบต่อเนื่องกัน (ribbon)

4.4.2 Facing คือวิธีนำพาราฟินบล็อกที่ได้จากการ trim แล้ว มาใส่ในช่องสำหรับยึดตัวอย่าง (block holder) แล้วปรับหน้าตัดของบล็อกให้ด้านยาวขนานกับใบมีดของเครื่อง microtome เมื่อปรับได้เหมาะสมดีแล้ว จึงหมุนสกรูที่ block holder เพื่อยึดบล็อกตัวอย่างให้แน่นพอที่จะตัดด้วยเครื่องต่อไปได้

4.4.3 Sectioning คือ การตัดบล็อกตัวอย่างด้วย microtome ก่อนจะตัดได้ต้องหมุนปุ่มปรับความหนาของ section ให้ได้ตามต้องการเสียก่อน ในงานประจำวันจะปรับความหนาของ section ประมาณ 3-7 ไมครอน

การตัดต้องทำด้วยความประณีตและความเร็วสม่ำเสมอ ผู้ตัดจะต้องเรียนรู้การใช้และรักษา microtome อย่างดี รู้วิธีการปรับมุมมีดที่กระทำต่อบล็อก (clearance angle) ซึ่งมีผลต่อการทำให้เกิดแถบของ section ปกติ clearance angle จะปรับระหว่าง 5-10 องศา รู้วิธีการควบคุมอัตราความเร็วของการตัด ตลอดจนรู้วิธีการทำความสะอาดใบมีดของ microtome และรู้วิธีลับใบมีดให้คมอยู่เสมอ ใบมีดที่คมเท่านั้นจึงจะตัด section ได้บาง

4.4.4 Picking up section คือการนำเอา section ที่ตัดได้ไปวางไว้บนแผ่นกระจกสไลด์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ลอย section บนผิวน้ำอุ่นในหม้อ (water bath หรือ floatation bath) ซึ่งปรับอุณหภูมิของน้ำประมาณ 45-50 ° C อุณหภูมิที่อุ่นจะช่วยให้ section ขยายตัวออกได้เต็มที่ ถ้า section ขยายออกไม่เต็มที่อาจใช้ฟุ้งกัน และ forcep ช่วยแยก section ออกเป็นแผ่น ๆ เลือกเอาแผ่นที่ดีที่สุดโดยใช้กระจกสไลด์จุ่มในน้ำอุ่น เลื่อนกระจกสไลด์ไปแตะติดกับแผ่น section โดยให้ด้านข้างของแผ่น section ติดกับผิวหน้าของกระจกสไลด์ จากนั้นค่อยเลื่อนกระจกเฉียงเป็นมุม 45 องศา ขึ้นจากน้ำอุ่น แผ่น section จะเกาะติดกับกระจกสไลด์ขึ้นมา อนึ่ง การที่จะให้ section ยึดติดกับกระจกให้แน่น และไม่มีปัญหาเรื่องการหลุดของ section ในระหว่างการย้อมสี สามารถทำได้โดยใส่ gelatin ผงลงไปในน้ำอุ่นให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5% สารละลาย gelatin จะช่วยให้ section ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ได้ดียิ่งขึ้น

4.4.5 Drying slide คือการทำให้ section ที่ติดอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์แห้ง โดยปล่อยวางไว้ให้แห้งเองในบรรยากาศอุณหภูมิห้อง หรือถ้าต้องการรวดเร็ว ก็นำไปเป่าด้วยลมร้อน

หรือวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) หรือใส่ในตู้อบที่ต้งอุณหภูมิไว้ไม่เกินจุดหลอมตัวของ พาราฟิน เมื่อสไลด์เนื้อเยื่อแห้งสนิทแล้ว จึงนำไปย้อมสีได้



ภาพที่ 17 อ่างน้ำร้อนสำหรับลอยชิ้นเนื้อ (Electric tissue floating bath)

ที่มา : Milesco Scientific ,Tissue Floating Bath [Online], accessed 16 September 2011.

Available from <http://www.tissuefloatingbath.com/>

4.5 การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Tissue staining)

การย้อมสีทั่วไปและการย้อมสีในงานประจำ (General stains and routine stains)

การย้อมสีทั่วไป (Routine stains) มีจุดประสงค์เพื่อต้องการให้เห็นรายละเอียดต่างๆ ทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งให้เห็นนิวเคลียส และไซโตพลาสซึม การย้อมสีดังกล่าว จึงต้องใช้สีสำหรับย้อมนิวเคลียส และสีสำหรับย้อมไซโตพลาสซึม

4.5.1 การย้อมสีนิวเคลียส (Nuclear stain) สีที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 พวกคือ

4.5.2 Mordant dyes เป็นสีที่ต้องนำไปทำปฏิกิริยากับสาร mordant เพื่อให้การติดสีย้อมดีขึ้น สีชนิดนี้ได้แก่ สี hematoxylin, alizarin, carmine, purpurin และ brazilin เป็นต้น สาร mordant เป็นเกลือของโลหะที่มีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ basic dyes ให้เป็น chelate complex , chelate complex จะทำปฏิกิริยากับ nucleus ผลทำให้การติดสีของนิวเคลียสดีขึ้น สาร mordant ได้แก่ เกลืออะลูมิเนียม เกลือโครเมียม เกลือเหล็ก และเกลือทองแดง เป็นต้น

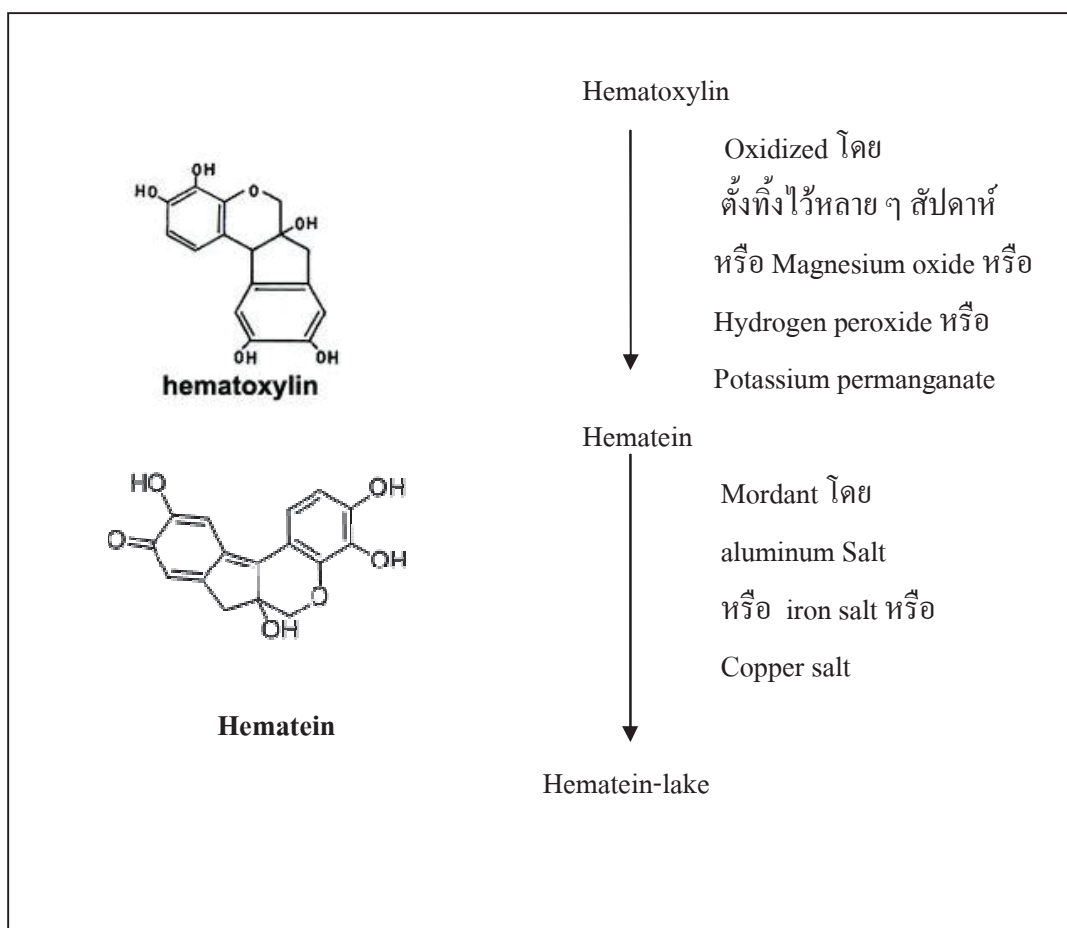
4.5.3 Basic dyes (cationic dyes) เป็นสีที่มีฤทธิ์เป็นด่าง จะทำปฏิกิริยากับกรด นิวคลีอิกในนิวเคลียส หรือ acid tissue เกิดเป็นเกลือของสีขึ้น สีพวกนี้ได้แก่ azyro, crystal violet, methylene blue, methylene violet RR, methyl violet, neutral red, pyronin G, Y, safranin O, thionine, toluidine blue เป็นต้น

4.5.4 การย้อมสีไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic stain or plasma stain) สีที่ใช้ย้อมไซโตพลาสซึม ส่วนใหญ่จะเป็นพวก acid dyes ตัวอย่างเช่น acid fushin, amido black 10B, aniline blue, congo red, eosin Y, methyl yellow, metanil yellow, และ orange G เป็นต้น

การย้อมสีในงานประจำ (Routine stains)

การย้อม tissue sections ด้วยวิธี hematoxylin และ eosin เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในงานประจำทั่วไป โดยใช้ hematoxylin ย้อมนิวเคลียส และ eosin ย้อมไซโตพลาสซึม

Hematoxylin เป็น basic dye ที่สกัดจากต้น logwood มีความสามารถในการย้อมต่ำ ดังนั้น จึงต้องเอามาทำปฏิกิริยากับสาร mordant เสียก่อน จึงจะนำไปย้อมสีได้ ปฏิกิริยาของการเตรียมสารละลาย hematoxylin มีดังนี้คือ



ภาพที่ 18 ปฏิกิริยาของการเตรียมสารละลาย hematoxylin

ที่มา : ปราโมทย์ วนิชย์ธนาคม, จุลกายวิภาคเคมี (เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2530), 120.

Eosin เป็น acid dye จะทำปฏิกิริยากับ basic tissue โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสม ทำให้เกิดเป็นสีชมพูหรือชมพูแกมแดง บางทีเรียกการย้อมสีด้วย eosin ว่าเป็นการย้อมสีทุติยภูมิ (secondary stain) หรือ counterstain เพราะเป็นการย้อมสีครั้งที่สอง หรือครั้งสุดท้าย

วิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปมี 2 วิธีคือ

Mayer's hematoxylin and eosin stain (Progressive stain) เป็นวิธีการย้อมของ Mayer โดยใช้หลักการเตรียมสารละลาย hematoxylin ให้มีฤทธิ์เป็นกรดด้วยกรดซิตริก (citric acid) ทำให้ย้อมสีนิวเคลียสได้ดีขึ้น และไม่มีการติดสีมากเกินไป วิธีนี้จึงจัดเป็นวิธีที่สะดวก

Mayer's hematoxylin and eosin stain

(Progressive stain)

FIXATION : Any well fixed tissue.

TECHNIQUE : Paraffin, celloidin, or frozen.

SOLUTION

Mayer's Hematoxylin

Hematoxylin crystals	1.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
Sodium iodate	0.2	gm.
Ammonium or potassium alum	50.0	gm.
Citric acid	1.0	gm.
Chloral hydrate	50.0	gm.

ละลาย alum ในน้ำโดยไม่ต้องใช้ความร้อน เดิมและละลาย hematoxylin จากนั้นเติม sodium iodate ,citric acid และ chloral hydrate เขย่าจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี จะได้สี reddish-violet

Eosin solution

Stock 1% Aqueous Eosin Solution

Eosin Y, water soluble	10.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
ละลาย Eosin Y ในน้ำกลั่นแล้วเติม :		
Glacial acetic acid	2.0	ml.

Stock 1% Alcoholic Eosin Solution

Eosin, 1% stock solution	1	part
--------------------------	---	------

Alcohol, 80% 3 part

Results

- Nuclei - blue-with some metachromasia.
- Cytoplasm - various shades of pink-identifying different tissue components.

Harris hematoxylin and eosin stain (Regressive stain) เป็นวิธีการย้อมของ Harris โดยใช้หลักการเตรียมสารละลาย hematoxylin ให้มีฤทธิ์เป็นกลาง ทำให้นิวเคลียสถูกย้อมมากเกินไป ต้องล้างสีที่ติดมากเกินไปออกด้วย acid alcohol และนำมา differentiated ด้วยสารละลายล้าง lithium carbonate water หรือ Ammonia water วิธีนี้จึงมีความยุ่งยากมากกว่าวิธีแรก

Harris hematoxylin and eosin stain

(Regressive stain)

FIXATION : May be used after any fixation

TECHNIQUE : Paraffin, celloidin, or frozen. Cut paraffin sections at 6 microns.

Harris' Hematoxylin

Hematoxylin crystals	5.0	gm.
Alcohol, 95%	50.0	ml.
Ammonium or potassium alum	100.0	gm.
Distilled water	1000.0	gm.
Mercuric oxide	2.5	gm.

ละลาย hematoxylin ในแอลกอฮอล์ , alum ในน้ำ ด้วยความร้อน ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ทำให้เดือดอย่างรวดเร็วก่อนนำความร้อนออกไปแล้วเติม mercuric oxide ให้ความร้อนแก่สารละลายอีกครั้งจนกว่าจะกลายเป็นสีม่วงเข้ม ประมาณ 1 นาที จากนั้นดับไฟแล้วจุ่มภาชนะลงในอ่างน้ำเย็นให้สารละลายเย็นตัวลงพร้อมใช้งาน เติม glacial acetic 2-4 ml. ต่อสารละลาย 100 ml. ก่อนนำไปใช้งาน

Acid alcohol

70% alcohol	1,000	ml.
Hydrochloric acid, concentrated	10.0	ml.

Ammonia water

Tap water	1,000.0	ml.
Strong ammonia water	2 to 3	ml.

Saturated lithium carbonate

Lithium carbonate	1.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.

Counterstains for hematoxylin stains

Stock 1% alcoholic eosin solution

Eosin Y, water soluble	1.0	gm.
Distilled water	20.0	ml.
ละลาย แล้วเติม		
Alcohol, 95%	80.0	ml.

Working eosin solution

Eosin, 1% stock solution	1	part
Alcohol ,80%	3	part

หากต้องการเจดสีที่เข้มข้นให้เติม glacial acetic 0.5 ml. ต่อสารละลาย 100 ml.

Results

Nuclei	-	blue
Cytoplasm	-	pink

4.6 การปิดสไลด์ด้วยกระจก (Mounting) คือการใช้ mountants เป็นตัวกลางเชื่อมระหว่างชิ้นเนื้อ sections บางๆ ที่อยู่บนกระจกสไลด์กับ cover slip เพื่อปิดและป้องกัน section ที่ได้จากการย้อมสีแล้ว ทำให้เหมาะสมที่จะนำไปตรวจและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และสะดวกต่อการเก็บรักษาตัวอย่างในสภาพของ section ที่ย้อมแล้วไว้เป็นการถาวรต่อไป

Mountants หรือ mounting media เป็นของเหลวเหนียวข้นใส (syropy fluid) ที่ใส่ระหว่าง section และ cover slip ส่วนใหญ่จะช่วยยึดให้ cover slip ให้ติดกับแผ่นสไลด์อย่างแน่นหนาและป้องกัน cover slip ไม่ให้เคลื่อนที่ สาร mountant นี้จะมีค่าดัชนีหักเหของแสงใกล้เคียงกับกระจกคือประมาณ 1.518 (ปราโมทย์ วัฒนัยธนาคม 2530 : 152)

Mountant แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ได้แก่ Water-insoluble mountants คือพวกที่ไม่ละลายในน้ำ และ Water-soluble mountants คือพวกที่ละลายในน้ำ

Water-insoluble mountants

Mountants ที่ไม่ละลายในน้ำเป็นพวกที่ได้มาจากยางไม้ธรรมชาติ (natural resins) หรือยางสังเคราะห์ (synthetic resin) มีลักษณะใส และมีดัชนีหักเหของแสงต่ำมาก บางทีเรียกว่า Resinous

media ใช้สำหรับการ mount section หลังจากที่ได้ dehydrate ในแอลกอฮอล์ และ clearing ใน xylene แล้ว mountants ที่ไม่ละลายน้ำที่นิยมใช้มากที่สุดได้แก่ Permount ซึ่งประกอบไปด้วย β -pinene polymer ความเข้มข้น 60% ละลายใน toluene มีค่าดัชนีหักเหของแสง = 1.5144

การเลือก mountant เพื่อใช้ mount section เป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับ

1. วัตถุประสงค์ของการเก็บ section ว่าต้องการเก็บแบบถาวรหรือชั่วคราว ถ้าต้องการเก็บแบบถาวร นิยมใช้ resinous media
2. สีที่ใช้ย้อม mountant บางชนิดช่วยรักษาสีที่ย้อมไว้ได้ดี แต่บางชนิดทำให้สีที่ย้อมซีดจางหรือหายไป
3. วิธีการย้อมสี การย้อมสีบางชนิดเมื่อย้อมเสร็จแล้ว section ต้องถูก dehydrate และ clearing ด้วยสารละลายบางอย่างเช่น xylene mountant ที่เลือกใช้จะต้องเข้ากันได้ดีกับ clearing agent นั้น ๆ หรือถ้าเป็น section ที่หลังจากย้อมสีเสร็จแล้ว ไม่ต้องผ่าน section นั้นใน dehydrating agent และ clearing agent ก็สามารถจะ mount section นั้นได้โดยตรงด้วย aqueous media

วิธีการ mount ทำโดยหยด mountant ลงบน section ที่ย้อมแล้ว ในขณะที่ section ยังชุ่มอยู่ด้วย clearing agent หรือน้ำ แล้วแต่วิธีที่ใช้ย้อมสี จากนั้นจึงใช้ cover slip ปิดทับบน section ใช้ forcep กดไล่ฟองอากาศออก ในกรณีที่มีฟองอากาศอยู่ใต้ cover slip

งานวิจัยนี้จะดำเนินการในการเตรียมสไลด์ฟันเพื่อใช้ในการนับโอดอนโตบลาสต์ตามขั้นตอนนี้

5. การคำนวณระยะเวลาตายจากจำนวนโอดอนโตบลาสต์

หลังจากการถอนฟันออกมาแล้ว จะแช่ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อเป็นการ fix เนื้อเยื่อ หลังจากทำการ decalcification และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการทางสัลยพยาธิแล้วจะทำการตัด section ให้มีความหนา 4 ไมโครเมตร ตามยาวให้ผ่านถึงกลางซี่ฟัน ตรงกลางฟันที่ถูกถือว่าเป็นส่วนของ dentinal tubule จะให้ลักษณะ s-shaped coarse section จากนั้นนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin และดูด้วยกำลังขยาย 10x และ 40x เซลล์ใน โอดอนโตบลาสต์จะถูกสังเกตรูปร่าง นับ และวิเคราะห์

ด้วยวิธีการนับด้วยการส่องกล้อง ในแต่ละตัวอย่างจะนับ 10 วงกลิ้งในส่วน coronal part ของโพรงฟันด้วยกำลังขยาย 40x จะประเมินเนื้อที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์จากนั้นนับโอดอนโตบลาสต์ที่มี nuclei ครอบถ้วน มีcondense chromatin หรือ pyknotic จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ยสัมบูรณ์ (average absolute) (หรือ ปริมาณ โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางไมโครเมตรจากนั้นแปลงเป็นต่อตารางมิลลิเมตร) ของ

ความหนาแน่นของโอคอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง ค่าประมาณ 11,000 โอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรหลังจากการเตรียมตามวิธีของ Vavpotic et al. (2001: 482)

การวิจัยในครั้งนี้จะทำการเตรียมตัวอย่าง และนับจำนวนโอคอนโตบลาสต์ตามวิธีของ Vavpotic et al.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อนับจำนวนโอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันของคนไทย มีวิธีดำเนินการวิจัยเป็นลำดับขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนการทดลอง

1. ศึกษาเทคนิค วิธีการเก็บตัวอย่างฟัน การเตรียมสไลด์ การตรวจและนับด้วยกล้องจุลทรรศน์
2. ศึกษากลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสม
3. เมื่อมีศพที่เสียชีวิตมา มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ทำการขออนุญาตผู้มีสิทธิในศพนั้น โดยให้อ่านเอกสารชี้แจงและลงชื่อในใบยินยอมให้ทำการศึกษา จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างฟันจากศพ
4. บันทึกข้อมูลเบื้องต้นแล้วจัดเตรียมตัวอย่างฟันตามกระบวนการทางพยาธิวิทยาภาค
5. ตรวจนับโอคอนโตบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์
6. วิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

2. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างฟันซี่ Molar หรือ Premolar จำนวน 20 ซี่ จากผู้เสียชีวิตที่ส่งมายังแผนกนิติเวช โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก โดยจะเก็บจากศพที่ทราบระยะเวลาการตายที่แน่นอนภายหลังการเสียชีวิตจากสาเหตุต่าง ๆ ยกเว้น โรคมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เบาหวาน หลังจากถอนฟันศพแล้วแช่ใน 10% formalin ทันทีเป็นการรักษาสภาพ จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาภาคเพื่อทำการเตรียมเป็นสไลด์ตามขั้นตอนวิธีการทางพยาธิวิทยาภาค จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปนับจำนวนโอคอนโตบลาสต์เพื่อคำนวณระยะเวลาหลังการตาย โดยการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจากแผนกนิติเวช และจัดเตรียมเป็นสไลด์ที่แผนกพยาธิวิทยาภาค โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก การเก็บตัวอย่างจะทำการก็ต่อเมื่อได้รับความยินยอมจากญาติหรือผู้มีสิทธิในศพนั้นอย่างเป็นทางการเป็นลายลักษณ์อักษร

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary Microtome)	1	เครื่อง
3.1.2 เครื่องหล่อบล็อกชิ้นเนื้อ (Embedding Center)	1	เครื่อง
3.1.3 อ่างน้ำร้อนสำหรับลอย paraffin section	1	เครื่อง
3.1.4 ตู้อบความร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิได้	1	เครื่อง
3.1.5 บล็อกพลาสติกใส่ชิ้นเนื้อ (cassette ring)	20	อัน
3.1.6 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Tissue processor)	1	เครื่อง
3.1.7 เบ้าใส่ชิ้นเนื้อ (Stainless Base Mold)	20	อัน
3.1.8 ใบมีดตัดชิ้นเนื้อ (microtome knives)	20	อัน
3.1.9 ปากคีบปลายแหลม (fine point forcep)	2	อัน
3.1.10 แปรงขนอ่อน (soft hair brush)	1	อัน
3.1.11 สไลด์ผ้า	1	กล่อง
3.1.12 ดินสอเขียนสไลด์	1	แท่ง
3.1.13 ที่ใส่สไลด์สำหรับย้อมสีชิ้นเนื้อ (slide rack)	1	อัน
3.1.14 ถาดใส่น้ำแข็ง	1	อัน
3.1.15 ถุงมือ	1	กล่อง
3.1.16 surgical blade	1	กล่อง
3.1.17 ตู้เย็นสำหรับแช่ชิ้นเนื้อ	1	เครื่อง
3.1.18 กระดาษกรอง	20	แผ่น
3.1.19 ลูกกลิ้ง	1	อัน
3.1.20 นาฬิกาจับเวลาแบบดิจิทัล	2	เครื่อง
3.1.21 เกรียงสำหรับขูดเศษพาราฟิน	1	อัน

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับรักษาสภาพชิ้นเนื้อ

10% formalin

3.2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมชิ้นเนื้อ

3.2.2.1 10% nitric acid

3.2.2.2 Absolute ethanol

3.2.2.3 95% alcohol

3.2.2.4 xylene

3.2.2.5 Paraplast

3.2.3 สารเคมีสำหรับย้อมสีชิ้นเนื้อ

3.2.3.1 Absolute ethanol

3.2.3.2 95% alcohol

3.2.3.3 xylene

3.2.3.4 Bluing (Lithium solution)

3.2.3.5 Hematoxylin stain

3.2.3.6 Eosin stain

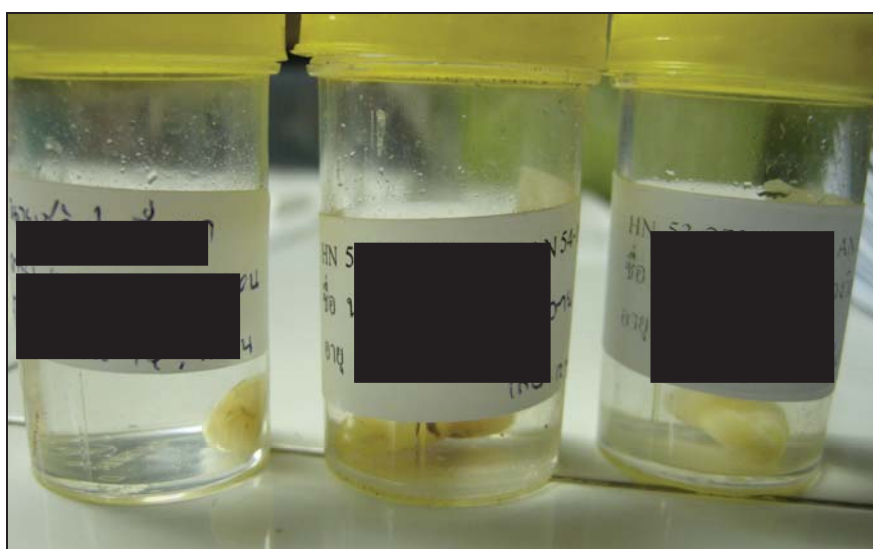
3.2.4 สารเคมีสำหรับการปิดกระจกสไลด์

3.2.4.1 Xylene

3.2.4.2 Permount

4. วิธีทำการทดลอง

4.1 การตรวจด้วยตาเปล่า และการตรวจชิ้นเนื้อ (Gross examination and decalcification) เมื่อได้รับตัวอย่างฟันที่แช่มาใน 10% formalin แล้ว ตรวจสอบความสมบูรณ์ของตัวอย่าง ใส่หมายเลข รายละเอียดต่างๆ จดบันทึกไว้ จากนั้นนำไปแช่ใน 10% nitric acid เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้ฟันนิ่ม (decalcification) สามารถตัดเป็นแผ่นบาง ๆ ได้ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ



ภาพที่ 19 ตัวอย่างฟันแช่ใน 10% nitric acid

เมื่อครบ 5 วัน ใช้มีดตัดชิ้นเนื้อกึ่งกลางตามยาวตลอดซี่ฟัน (Longitudinal) ตัดให้มีความหนาประมาณ 0.3 เซนติเมตร นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้ใส่ตลับชิ้นเนื้อ ใส่หมายเลขกำกับไว้ แล้วปิดฝาตลับให้แน่นล้างกรดออกด้วยวิธีการให้น้ำประปาไหลเข้าผ่าน (run) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 20 การตัดแบบ longitudinal section

4.2 การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue processing) นำตลับชิ้นเนื้อใส่ตะกร้าชิ้นเนื้อ นำเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Automatic tissue processor) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

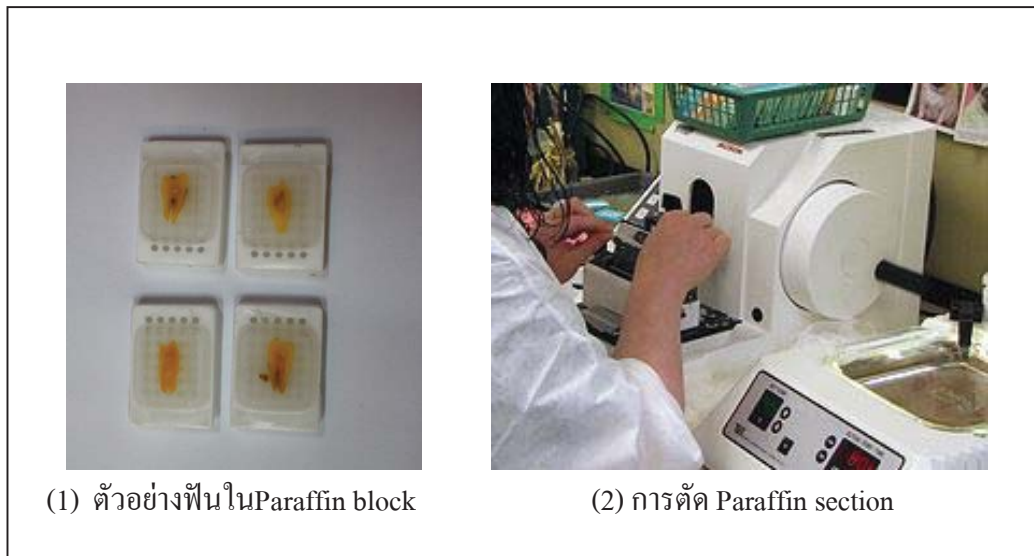
4.3 การทำบล็อกชิ้นเนื้อ นำตลับใส่ชิ้นเนื้อออกจากเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อ วางบนแท่นร้อนของ embedding center นำชิ้นเนื้อมาใส่ลงในเบ้าชิ้นเนื้อ (Mold) กดชิ้นเนื้อให้แนบไปกับเบ้าชิ้นเนื้อกดสวิตช์ให้ paraplast ไหลลงมาท่วมให้ท่วมชิ้นเนื้อเล็กน้อย นำ base mold วางลงบนแท่นเย็นใช้ปากคีบ (Forcep) ปลายแหลมจับชิ้นเนื้อ วางด้านที่ถาดลงไป ด้านล่างกดเบาๆ เพื่อให้ชิ้นเนื้อเรียบสม่ำเสมอ วางตลับที่มีหมายเลขกำกับลงบนชิ้นเนื้อจากนั้นนำ cassette ring วางบน base mold แล้วกดสวิตช์ปล่อยให้ paraplast เหลวไหลลงใน cassette ring จนเกือบเต็ม แล้ววางแบบลงบนถาดเย็นของเครื่อง embedding รอให้เย็น แล้วแกะออกจากแบบ ชูดเศษพาราฟิน ด้านข้างทุกด้านออกให้เรียบร้อยนำไปแช่ตู้เย็นเพื่อหีบบล็อกเย็นจัด เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำมาตัด section ด้วยเครื่อง microtome ต่อไป



ภาพที่ 21 การฝังชิ้นเนื้อ (Embedding)

4.4 การตัด Paraffin section (Paraffin Section Cutting or Sectioning) วาง paraffin block ในถาดน้ำแข็งนำ paraffin block ใส่ในช่องยึด block ปรับตำแหน่งให้เหมาะสม ด้านยาวขนานกันทั้ง 2 ด้านปรับปุ่มตั้งความหนา 3 ไมครอน ปรับมุมมีดที่กระทำต่อ paraffin block ประมาณ 5-10 องศาหมุนตัดแต่งหน้า paraffin block ซึ่งเป็นการตัดเลื่อยอย่างหยาบ โดยใช้ disposable blade ที่ใช้แล้วตัดจนกระทั่งเห็นทุกส่วนของชิ้นเนื้อ เลื่อน block holder เข้าสู่ด้านตัวเครื่องจนเกือบสุด ใส่ knife holder เลื่อนเข้าใกล้ block holder เว้นระยะห่างประมาณ $\frac{1}{2}$ นิ้ว แล้วล็อก knife holder เข้ากับฐานของเครื่องให้แน่น ใส่ใบมีด (microtome knife) เข้ากับ knife holder แล้วล็อกใบมีดให้แน่นตั้งไมครอนสเกลไว้ที่ 3 ไมครอน การตัด paraffin section นำบล็อกชิ้นเนื้อออกมาจากตู้เย็นใส่ไปใน block holder ทำการ trim ชิ้นเนื้อ (Trimming of tissue block) โดยใช้การกดปุ่ม coarse feed เลื่อนบล็อกชิ้นเนื้อเข้าหา มีด พร้อมกับการหมุน hand wheel ไปด้วยจนกระทั่งชิ้นเนื้อเต็มหน้าตัดในบล็อก หลังจาก trim จนเต็มหน้าตัดแล้ว ปลดปุ่ม coarse feed ใช้ปากคีบปลายแหลมกรีดเป็น รอยขนานกับชิ้นเนื้อทั้งด้านซ้ายและขวาโดยกรีดจากด้านบนจนถึงด้านล่างบล็อก เริ่มตัด section โดยหมุน hand wheel จนได้เป็นแถบยาวคล้ายริบบิ้น ใช้ปากคีบปลายแหลมคีบแถบริบบิ้นไปลอยบนผิวน้ำร้อนที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 50°C โดยระวังไม่ให้ยับ ใช้สไลด์ฝ้าซ้อน section จากอ่างน้ำร้อนโดยเลือกเฉพาะชิ้นที่สมบูรณ์ไม่ยับและมีความบางตามที่ต้องการเท่านั้น โดยเลือกซ้อนประมาณ 3 section ใช้ดินสอเขียนหมายเลขบนสไลด์

ด้านฝ่า ใช้กระดาษกรองที่เปียกน้ำหมาด ๆ ซับน้ำ ส่วนเกินออกแล้วใช้ลูกกลิ้งรีดให้เรียบนำสไลด์ใส่ใน rack อบด้วยตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 15-20 นาที



ภาพที่ 22 ตัวอย่างพินและการตัด section

4.5 การย้อมสีสไลด์ (Staining) ปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

4.5.1 Deparaffinization

- ขั้นตอนที่ 1 จุ่ม (dip) ใน xylene 1 เป็นเวลาประมาณ 1 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 จุ่มใน xylene 2 เป็นเวลาประมาณ 1 นาที
- ขั้นตอนที่ 3 จุ่มใน absolute ethanol 1 เวลาประมาณ 1 นาทีหรือ
- ขั้นตอนที่ 4 จุ่มใน absolute ethanol 2 เวลาประมาณ 1 นาที
- ขั้นตอนที่ 5 จุ่มใน 95% alcohol 1 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ
- ขั้นตอนที่ 6 จุ่มใน 95% alcohol 2 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ
- ขั้นตอนที่ 7 ล้างด้วยน้ำ running water เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที

4.5.2 Hematoxylin staining จุ่มในสี hematoxylin เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อย้อมสีนิวเคลียส แล้วล้างด้วยน้ำ running water เพื่อล้างสี Hematoxylin ออก

4.5.3 Decolorization (Bluing) ใน Lithium carbonate ซึ่งอิมมิดในตัวในน้ำ เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที หรือ 5-10 dip เพื่อล้างสี Hematoxylin ส่วนเกินออกจากชิ้นเนื้อ ให้ติด

เฉพาะส่วนที่เป็นนิวเคลียส แล้วล้างด้วยน้ำ running water เป็นเวลา 10-20 วินาที เพื่อล้าง Lithium carbonate ออกจากเนื้อเยื่อ

4.5.4 Counterstaining (Eosin staining) จุ่มใน 95% alcohol เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที แล้วจุ่มในสี eosin เป็นเวลาประมาณ 30-45 วินาทีเพื่อย้อมสี cytoplasm แล้วล้างด้วยน้ำ running water ประมาณ 1-2 นาทีเพื่อล้างสี eosin ส่วนเกินออกจาก cytoplasm

4.5.5 Dehydration เป็นขั้นตอนการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อและทำให้ชิ้นเนื้อแห้งขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 จุ่มใน 95% alcohol 1 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ

ขั้นตอนที่ 2 จุ่มใน 95% alcohol 2 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ

ขั้นตอนที่ 3 จุ่มใน absolute ethanol 1 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ

ขั้นตอนที่ 4 จุ่มใน absolute ethanol 2 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ

ขั้นตอนที่ 5 จุ่มใน xylene 1 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ 10 dip

ขั้นตอนที่ 6 จุ่มใน xylene 2 เวลาประมาณ 1 นาที หรือ 10 dip mounting

โดยหยด mounting medium บนสไลด์ แล้วปิดด้วย cover slip ที่มีขนาดพอดี ปิดชิ้นเนื้อได้หมด กดเล็กน้อยเพื่อให้ติดแน่นยิ่งขึ้นและไล่ฟองอากาศออก เช็ดทำความสะอาดสไลด์ให้เรียบร้อย



ภาพที่ 23 สไลด์ตัวอย่างพื้นที่ย้อม H&E

4.6 การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำสไลด์ที่ได้ไปทำการนับโอคอนโทบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูด้วยกำลังขยาย 10x และ 40x โดยจะดูรูปร่าง นับ และวิเคราะห์ด้วยการส่องกล้อง ในแต่ละตัวอย่างจะนับ 10 วงกล้องในส่วน coronal part ของโพรงฟันด้วยกำลังขยาย 40x จากนั้นนับโอคอนโทบลาสต์ที่มี nuclei ครอบถ้วน จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ยสัมบูรณ์ (average absolute) (หรือ ปริมาณโอคอนโทบลาสต์ต่อตารางไมโครเมตรเมตร จากนั้นแปลงเป็นต่อตารางมิลลิเมตร)ของความหนาแน่นของโอคอนโทบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้กับระยะเวลาหลังการตายของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับผลของ Vavpotic et al. ด้วยโปรแกรมคำนวณทางสถิติสำเร็จรูป

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาเรื่อง การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยโอคอนโตบลาสต์ในโพรงพินมนุษย์ ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างจากผู้เสียชีวิต จำนวน 20 ราย ที่ถูกส่งมายังแผนกนิติเวช โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก โดยจะเก็บฟันซี่ premolar จากศพที่ทราบระยะเวลาการตายที่แน่นอนภายหลังการเสียชีวิตจากสาเหตุต่าง ๆ ยกเว้น โรคมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เบาหวาน หลังจากถอนฟันแล้วแช่ใน 10% formalin ทันทีเป็นการรักษาสภาพ จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาภาคเพื่อทำการเตรียมเป็นสไลด์แล้วนำไปนับจำนวนโอคอนโตบลาสต์เพื่อคำนวณระยะเวลาหลังการตาย โดยการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจากแผนกนิติเวช และจัดเตรียมเป็นสไลด์ที่แผนกพยาธิวิทยาภาค โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก การเก็บตัวอย่างจะทำการติดต่อเมื่อได้รับความยินยอมจากญาติหรือผู้มีสิทธิในศพนั้นอย่างเป็นลายลักษณ์อักษร ผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลและบันทึกข้อมูลตั้งแต่วันที่ 20 เดือนธันวาคม 2553 จนถึงวันที่ 10 มิถุนายน 2554 ผลการวิเคราะห์ปรากฏผลดังนี้

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง
2. การศึกษาปริมาณโอคอนโตบลาสต์ในโพรงพินจากตัวอย่างฟันของคนไทย
3. การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยโอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงจากผลงานวิจัยของ Vaypotic et al.
4. การเปรียบเทียบค่าปริมาณโอคอนโตบลาสต์ในโพรงพินจากตัวอย่างฟันของคนไทย และผลจากงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากฟันของชาวต่างชาติ

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

จากการเก็บข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ผู้เสียชีวิตด้วยสาเหตุต่าง ๆ ได้แก่ ถูกยิง อุบัติเหตุ โรคหัวใจ เป็นต้น ยกเว้น โรคมะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือโรคเรื้อรังเช่น จำนวน 20 ราย โดยเริ่มเก็บข้อมูลตั้งแต่วันที่ 20 เดือนธันวาคม 2553 จนถึงวันที่ 10 มิถุนายน 2554 รวมทั้งสิ้นเป็นระยะเวลา 6 เดือนกับ 10 วัน ผลการเก็บข้อมูลพบว่ากลุ่มตัวอย่างเป็นเพศชาย จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 70 และเป็นเพศหญิง จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 30 อายุ โดยเฉลี่ยมีอายุ 37 ปี อายุต่ำสุด 18 ปี และอายุสูงสุด 58 ปี ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

รายที่	วัน/เดือน/ปี	เพศ	อายุ	สาเหตุการเสียชีวิต
1.	20/12/10	ผู้ชาย	25 ปี	ขาดแคลนกระสุนปืนลูกโคคที่ศีรษะทะลุเข้าสมอง
2.	29/12/10	ผู้ชาย	25 ปี	ขาดแคลนกระสุนลูกปรายบริเวณหน้าอกทะลุปอด หัวใจ และตับ
3.	03/01/11	ผู้ชาย	29 ปี	ขาดแคลนนิกลวดขอบเรียบบริเวณคอทำให้หลอดลม และหลอดเลือดบริเวณคออุดตัน
4.	10/01/11	ผู้ชาย	50 ปี	โรคหัวใจ (coronary artery disease)
5.	13/01/11	ผู้หญิง	42 ปี	หลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจแข็งและตีบ
6.	27/01/11	ผู้ชาย	30 ปี	ถูกแทงที่หน้าอกทะลุเข้าหัวใจห้องล่างซ้าย
7.	08/02/11	ผู้ชาย	20 ปี	ภาวะขาดอากาศหายใจ
8.	17/02/11	ผู้ชาย	56 ปี	ปอดอักเสบ (pulmonary congestion)
9.	20/02/11	ผู้ชาย	46 ปี	การทำงานของหัวใจล้มเหลว
10.	05/03/11	ผู้ชาย	56 ปี	ภัยอันตรายจากศีรษะถูกของแข็งกระทบกระแทก
11.	19/03/11	ผู้หญิง	35 ปี	เลือดออกในสมอง (Acute Left subdural hemorrhage)
12.	25/03/11	ผู้หญิง	25 ปี	ตายจากการจมน้ำ
13.	07/04/11	ผู้ชาย	18 ปี	ภาวะขาดอากาศหายใจ
14.	14/04/11	ผู้ชาย	38 ปี	MCA หัวใจ ปอด ตับ ม้ามนิกลวดจากภัยอันตรายรุนแรงบริเวณหน้าอกและช่องท้อง
15.	14/04/11	ผู้หญิง	22 ปี	MCA ศีรษะถูกของแข็งกระทบกระแทก
16.	22/04/11	ผู้หญิง	29 ปี	ตายจากขาดแคลนกระสุนปืนลูกโคคบริเวณคอ หน้าอก และช่องท้อง
17.	11/05/11	ผู้ชาย	55 ปี	หัวใจขาดเลือด (ischemic stroke)
18.	12/05/11	ผู้ชาย	39 ปี	เลือดออกในสมอง (subdural hemorrhage)
19.	19/05/11	ผู้ชาย	35 ปี	ถูกแทงหลังด้านขวาทะลุเข้าช่องท้อง ไตข้างขวานิกลวด
20.	10/06/11	ผู้หญิง	58 ปี	หัวใจล้มเหลว (congestive heart failure)

2. การศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย

จากการศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย โดยมีการบันทึกระยะเวลาจากเวลาตายจนถึงเวลาที่เก็บตัวอย่างฟัน และบันทึกอุณหภูมิในวันที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไปเตรียมเป็นสไลด์แล้วนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลเป็น ODs (Odontoblast sample) และคำนวณปริมาณ โอดอนโตบลาสต์ (ODr, Odontoblast reference) โดยใช้ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างมาคำนวณโดยตามสรุปผลในงานวิจัยของ Vavpotic et al. (ที่อุณหภูมิห้อง โอดอนโตบลาสต์จะลดลงโดยเฉลี่ย 130 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมง หรือ 1.025% ต่อชั่วโมง) พบว่า 16 ราย เก็บตัวอย่างใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการเสียชีวิต และมี 4 รายที่เก็บตัวอย่างเมื่อผ่านไปมากกว่า 24 ชั่วโมงภายหลังการเสียชีวิต ในจำนวนสำรายนั้เมื่อนำมาคำนวณ ODr ได้ 7574, 9697, 9697 และ 10,317 ตามลำดับ และเมื่อนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์จากสไลด์ ได้ ODs ดังนี้ 5420, 7980, 8300 และ 9250 ตามลำดับ ส่วนใน 16 ราย ที่เก็บตัวอย่างภายใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการตาย จะมีค่า ODr เป็น 11000 และค่า ODs ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเก็บรวบรวมข้อมูลปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย

รายที่	เวลา	เวลาเก็บ	ระยะเวลา (ชม.)	อุณหภูมิ	จำนวน ODs	จำนวน ODr
9.	N/A	8:00 AM	60	26.6	5,420	7,574
10.	N/A	8:30 AM	36	26.4	7,980	9,697
20	N/A	8:30 AM	36	28.1	8,300	9,697
5.	N/A	8:00 AM	30	24.1	9,250	10317
1.	1:00 AM	8:00 AM	4	25.4	10,590	11,000
2.	2:30 AM	8:00 AM	6	25.4	10,725	11,000
3.	11:00 PM	8:00 AM	9	24.1	10,200	11,000
4.	6:00 PM	11:00 PM	4	24.1	11,240	11,000
6.	11:00 PM	11:00 PM	12	24.1	10,150	11,000
7.	4:00 AM	8:00 AM	4	26.6	9,985	11,000
8.	5:00 AM	1:00 PM	8	26.6	10,650	11,000
11.	6:30 AM	11:00 AM	5	26.4	11,200	11000
12.	8:00 AM	10:00 PM	10	26.4	10,420	11000

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รายที่	เวลา	เวลาเก็บ	ระยะเวลา (ชม.)	อุณหภูมิ	จำนวน ODs	จำนวน ODr
13.	9:00 AM	3:00 PM	6	29.2	10,600	11,000
14.	6:00 PM	8:00 AM	14	29.2	11,500	11,000
15	6:00 PM	10:00 AM	16	29.2	10,100	11,000
16	10:00 AM	2:00 PM	4	29.2	10,150	11,000
17	10:00 AM	2:00 PM	5	28.9	11,240	11,000
18	3:00 AM	9:00 AM	6	28.9	10,330	11,000
19	9:00 PM	1:30 PM	16	28.9	11,800	11,000

3. การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al.

3.1 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al.

ค่าที่ได้จากการประเมินเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์จะแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ กลุ่มที่มีระยะเวลาหลังการตายมากกว่า 24 ชั่วโมง และ น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายมากกว่า 24 ชั่วโมง มีดังนี้คือ 60 ชั่วโมง 1 ราย 36 ชั่วโมง 2 ราย และ 30 ชั่วโมง 1 ราย เมื่อนำมาคำนวณตามอัตราการสลายตัวของไอคอนโตบลาสต์ตามวิธีการของ Vavpotic et al. จะได้จำนวนไอคอนโตบลาสต์ 7574 , 9697 , 9697 และ 10137 ตามลำดับ แต่ค่าที่ได้จริงจากการนับไอคอนโตบลาสต์ในตัวอย่างฟันที่เก็บจากศพ ได้ 5420, 7980, 8300 และ 9250 ตามลำดับในทางกลับกัน หากนำจำนวนไอคอนโตบลาสต์ที่นับได้จากตัวอย่างฟัน มาคำนวณหาระยะเวลาหลังการตายจะพบว่า ได้ระยะเวลาหลังการตายเป็น 75 , 51 , 48 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่เวลาหลังการตายที่แท้จริงเป็น 60 , 36, 36, 40 ชั่วโมงตามลำดับ

ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงนั้น Vavpotic et al. ได้ผลสรุปว่ามีค่าเฉลี่ยคือ 11,000 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร ผลที่ได้จากการนับไอคอนโตบลาสต์ในกลุ่มนี้เฉลี่ย 10,680 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรเมื่อพิจารณาระยะเวลาตายที่แท้จริง กับระยะเวลาตายที่ได้จากการคำนวณ พบว่า ส่วนใหญ่ใกล้เคียงกัน แตกต่างกันโดยเฉลี่ย 5 ชั่วโมง ส่วนกลุ่ม

ตัวอย่างที่มีค่าที่แตกต่างเกิน 8 ชั่วโมง คือ รายที่ 14 และ 19 ซึ่งมีค่าระยะเวลา แตกต่าง 13 และ 15 ชั่วโมง เป็นค่าที่มีความโด่งแตกต่างจากรายอื่น ๆ อย่างมาก เมื่อผู้วิจัยไปค้นหาสาเหตุของความแตกต่างของค่านี้ พบว่าตัวอย่างทั้งสองราย มีตัวแปรอื่นที่ทำให้ค่าแตกต่างออกไป เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างทั้งสองรายเป็นเพศชาย อายุ 38 และ 35 ปี ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะมีอุณหภูมิ 29.2 และ 28.9 องศาเซลเซียส สาเหตุการตายคือ ถูกยิงและ อุบัติเหตุทางรถจักรยานยนต์

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟัน จากตัวอย่างฟันของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.

รายที่	จำนวน ODr ตามวิธีการของ Vavpotic et al.	ระยะเวลา ตามวิธีการ ของ Vavpotic et al.	ระยะเวลา จริง	จำนวน ODs	การประเมิน ระยะเวลาของกลุ่ม ตัวอย่าง
9	7,574	75	60	5,420	มากกว่า 24 ชั่วโมง
10	9,697	51	36	7,980	มากกว่า 24 ชั่วโมง
20	9,697	48	36	8,300	มากกว่า 24 ชั่วโมง
5	10,317	36	30	9,250	มากกว่า 24 ชั่วโมง
1	11,000	3.7	4	10,590	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
2	11,000	2.5	6	10,725	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
3	11,000	7	9	10,200	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
4	11,000	1	4	11,240	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
6	11,000	7.7	12	10,150	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
7	11,000	9.2	4	9,985	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
8	11,000	3.2	8	10,650	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
11	11,000	1	5	11,200	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
12	11,000	5.3	10	10,420	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รายชื่อ	จำนวน ODr ตามวิธีการของ Vavpotic et al.	ระยะเวลา ตามวิธีการ ของ Vavpotic et al.	ระยะเวลา จริง	จำนวน ODs	การประเมิน ระยะเวลาของกลุ่ม ตัวอย่าง
13	11,000	3.6	6	10,600	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
14	11,000	1	14	11,500	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
15	11,000	8.2	16	10,100	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
16	11,000	7.7	4	10,150	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
17	11,000	1	5	11,240	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
18	11,000	6.1	6	10,330	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง
19	11,000	1	16	11,800	ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง

3.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิต

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิต พบว่า การเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่มากกว่า 24 ชั่วโมง จะทำให้จำนวนของไอคอนโตบลาสต์ลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไอคอนโตบลาสต์เท่ากับ 7,737.50 เมื่อทำการเก็บตัวอย่างฟันในช่วงเวลาที่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง มีจำนวนของไอคอนโตบลาสต์เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไอคอนโตบลาสต์เท่ากับ 10,680.00 ดังแสดงในตารางที่ 4

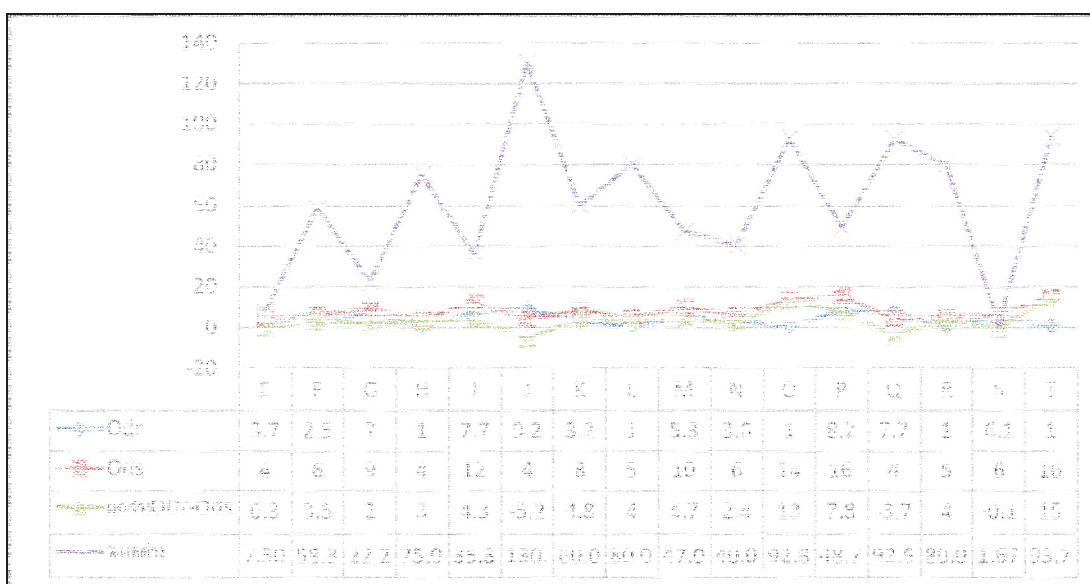
ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพ

ระยะเวลาการตรวจ ODs		$\bar{X}$	S.D	t	Sig.
จำนวน ODs	1. มากกว่า 24 ชั่วโมง	7737.50	1636.43	-6.272	0.035
	2. ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง	10680.00	556.39		

4. การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไอคอนโตนโบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.

จากการเปรียบเทียบการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตนโบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. พบว่า ในการวิจัยครั้งนี้ได้ผลการประเมินระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตนโบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทยสอดคล้องและใกล้เคียงกับวิธีการของ Vavpotic et al. ซึ่งจากกลุ่มตัวอย่างรายที่ 9 10 20 และ 5 ที่มีระยะเวลาในการเก็บมากกว่า 24 ชั่วโมงขึ้นไปจะมีจำนวนไอคอนโตนโบลาสต์ลดลงเหมือนกัน ซึ่งถึงแม้ว่าการประเมินระยะเวลาของกลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้จะมีจำนวนไอคอนโตนโบลาสต์ลดลงมากกว่าของ Vavpotic et al. ก็ตาม แต่ก็ยังลดลงในระดับที่ยอมรับได้และใกล้เคียงกัน

และเมื่อพิจารณาจากกลุ่มที่ตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักหากพิจารณาเป็นชั่วโมงการตายแต่เมื่อนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว ค่าที่ได้จากการคำนวณมีความแตกต่างจากค่าจริงมาก

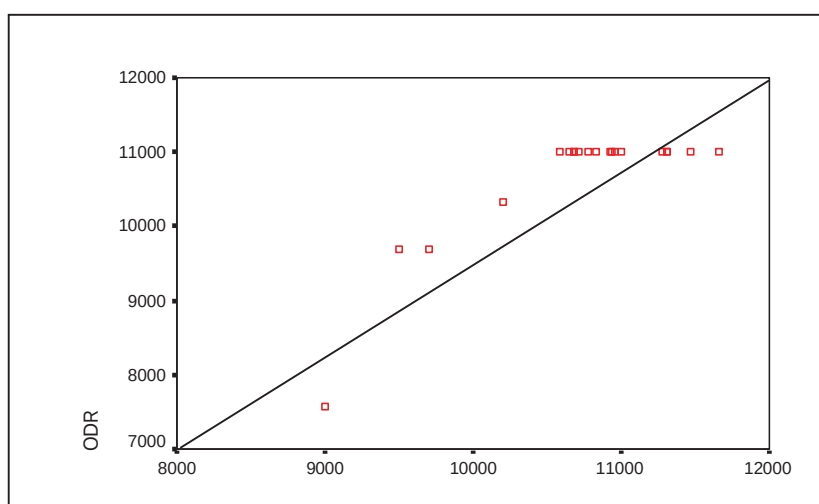


ภาพที่ 24 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระยะเวลาการตายที่แท้จริงกับระยะเวลาที่ได้จากการคำนวณในตัวอย่าง 16 รายที่ตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมง

จากกราฟจะเห็นได้ว่า แม้จำนวนชั่วโมงจากระยะเวลาการตายที่แท้จริงกับระยะเวลาที่ได้จากการคำนวณแม้จะไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เพื่อ

เปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ 1.67% - 130% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการประมาณระยะเวลาตายในคนไทยด้วยการนับจำนวนโอคอนโตบลาสต์นั้น ไม่สมควรนำผลสรุปจากงานวิจัยของ Vavpotic ที่สรุปว่า ภายหลังการตายจะมีการลดลงของจำนวนโอคอนโตบลาสต์ 1.025% หรือ 130 โอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องมาใช้ ควรมีการศึกษาวิจัยในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นคนไทยอย่างละเอียดและควบคุมตัวแปรต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบเพิ่มเติม เพื่อหาอัตราการลดลงของจำนวนโอคอนโตบลาสต์ของคนไทย ก่อนนำมาใช้ร่วมในการประเมินระยะเวลาหลังการตายต่อไป

และเมื่อหาความสัมพันธ์ ระหว่างจำนวนโอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และจากตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (Simple Linear Regression and Correlation Analysis) ผลการหาความสัมพันธ์ครั้งนี้ พบว่า ได้ค่า $R^2 = 0.933$ ค่า $t = 11.021$ ค่า $\text{Sig.} = 0.001$ เมื่อนำมาหาเป็นกราฟเพื่อแสดงทิศทาง พบว่า ทิศทางความสัมพันธ์ของจำนวนโอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และจากตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. เป็นไปในทิศทางเดียวกัน



ภาพที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโอคอนโตบลาสต์จากตัวอย่างฟันของคนไทย และจากของต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยเรื่อง การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย เพื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al. (2009 : 125) โดยทำการเก็บตัวอย่างจากผู้เสียชีวิต จำนวน 20 ราย ที่ถูกส่งมายังแผนกนิติเวช โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก โดยจะเก็บฟันซี่ premolar หรือ molar จากศพที่ทราบระยะเวลาการตายที่แน่นอนภายหลังจากการเสียชีวิตจากสาเหตุต่าง ๆ ยกเว้น โรคมะเร็ง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เบาหวาน หลังจากถอนฟันแล้วแช่ใน 10% formalin ทันทีเป็นการรักษาสภาพ จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยากายวิภาคเพื่อทำการเตรียมเป็นสไลด์แล้วนำไปนับจำนวนไอคอนโตบลาสต์ เพื่อคำนวณระยะเวลาหลังการตาย โดยการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจากแผนกนิติเวช และจัดเตรียมเป็นสไลด์ที่แผนกพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก การเก็บตัวอย่างจะทำการก็ต่อเมื่อได้รับความยินยอมจากญาติหรือผู้มีสิทธิในศพนั้นอย่างเป็นทางการเป็นลายลักษณ์อักษร ผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลและบันทึกข้อมูลตั้งแต่วันที่ 20 เดือนธันวาคม 2553 จนถึงวันที่ 10 มิถุนายน 2554 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ t-test สรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. สรุป

จากการเก็บข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ผู้เสียชีวิตด้วยสาเหตุต่าง ๆ ได้แก่ การถูกยิง โรคปอดอักเสบ โรคหัวใจ ถูกแทง เป็นต้น ยกเว้นโรคมะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เบาหวาน เป็นต้น จำนวน 20 ราย โดยเริ่มเก็บรวบรวมข้อมูลตั้งแต่วันที่ 20 เดือนธันวาคม 2553 จนถึงวันที่ 10 มิถุนายน 2554 รวมทั้งสิ้นเป็นระยะเวลา 5 เดือนกับ 10 วัน ผลการเก็บรวบรวมข้อมูล พบว่า กลุ่มตัวอย่างเป็นเพศชาย จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 70 และเป็นเพศหญิง จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 30 อายุ โดยเฉลี่ยมีอายุ 37 ปี อายุต่ำสุด 18 ปี และอายุสูงสุด 58 ปี

1.1 การศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย พบว่า จากการศึกษาปริมาณโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย โดยจะมีการบันทึกระยะเวลาจากเวลาตายจนถึงเวลาที่เก็บตัวอย่างฟันจากศพ และบันทึกอุณหภูมิในวันที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไปเตรียมเป็นสไลด์แล้วนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลเป็น ODs (Odontoblast sample) และคำนวณปริมาณโอดอนโตบลาสต์ (ODr ,Odontoblast reference) โดยใช้ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างมาคำนวณโดยตามสรุปผลในงานวิจัยของ Vavpotic et al. (ที่อุณหภูมิห้อง โอดอนโตบลาสต์จะลดลงโดยเฉลี่ย 130 โอดอนโตบลาสต์ หรือ 1.025% ต่อชั่วโมง) พบว่า 16 ราย เก็บตัวอย่างใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการเสียชีวิต และมี 4 รายที่เก็บตัวอย่างเมื่อผ่านไปมากกว่า 24 ชั่วโมงภายหลังการเสียชีวิต ในจำนวนสิ่รายนั้นเมื่อนำมาคำนวณ ODr ได้ 7574, 9697, 9697 และ 10317 ตามลำดับ และเมื่อนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์จากสไลด์ ได้ ODs ดังนี้ 5420, 7980, 8300 และ 9250 ตามลำดับ ส่วนใน 16 ราย ที่เก็บตัวอย่างภายใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการตาย จะมีค่าเฉลี่ยจำนวนโอดอนโตบลาสต์เป็น 10,680 โอดอนโตบลาสต์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

1.2 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยโอดอนโตบลาสต์ กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al.

1.2.1 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยโอดอนโตบลาสต์ กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al.

ค่าที่ได้จากการประเมินเวลาหลังการตายด้วยโอดอนโตบลาสต์จะแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ กลุ่มที่มีระยะเวลาหลังการตายมากกว่า 24 ชั่วโมง และ ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง

ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายมากกว่า 24 ชั่วโมง มีดังนี้คือ 60 ชั่วโมง 1 ราย 36 ชั่วโมง 2 ราย และ 30 ชั่วโมง 1 ราย เมื่อนำระยะเวลานี้มาคำนวณตามอัตราการสลายตัวของโอดอนโตบลาสต์ตามวิธีการของ Vavpotic et al. จะได้จำนวนโอดอนโตบลาสต์ 7574 , 9697 ,9697 และ 10137 ตามลำดับ แต่ค่าที่ได้จริงจากการนับโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างฟันที่เก็บจากศพ ได้ 5420, 7980,8300 และ 9250 ตามลำดับ

ในทางกลับกัน หากนำจำนวนโอดอนโตบลาสต์ที่นับได้จากตัวอย่างฟัน มาคำนวณหาระยะเวลาหลังการตายจะพบว่า ได้ระยะเวลาหลังการตายเป็น 75 , 51 , 48 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่เวลาหลังการตายที่แท้จริงเป็น 60 , 36, 36, 40 ชั่วโมงตามลำดับ

ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงนั้น Vavpotic et al. ได้ผลสรุปว่า มีค่าเฉลี่ยคือ 11,000 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร ผลที่ได้จากการนับโอดอนโตบลาสต์ในกลุ่มนี้เฉลี่ย 10,680 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร

เมื่อพิจารณาระยะเวลาตายที่แท้จริง กับระยะเวลาตายที่ได้จากการคำนวณ พบว่า ส่วนใหญ่แล้วใกล้เคียงกันแตกต่างกันโดยเฉลี่ย 5 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าที่แตกต่างกัน 10 ชั่วโมง คือ รายที่ 14 และ 19 ซึ่งมีค่าระยะเวลาแตกต่างกัน 13 และ 15 ชั่วโมง เป็นค่าที่มีความโด่งและแตกต่างจากรายอื่น ๆ อย่างมาก เมื่อผู้วิจัยไปค้นหาสาเหตุของความแตกต่างของค่าดังกล่าวพบว่า ตัวอย่างทั้งสองรายนี้ มีตัวแปรอื่นๆ ที่ทำให้ค่าระยะเวลาแตกต่างออกไป เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างทั้งสองรายเป็นเพศชาย อายุ 38 และ 35 ปี ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างพินมีอุณหภูมิ 29.2 และ 28.9 องศาเซลเซียส สาเหตุการตายคือ ถูกยิงและ อุบัติเหตุทางรถจักรยานยนต์

1.2.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตปลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิต

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตปลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิต พบว่า เมื่อนับจำนวนไอคอนโตปลาสต์จากพินศพที่เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง จะพบว่าจำนวนของไอคอนโตปลาสต์นั้นลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไอคอนโตปลาสต์เท่ากับ 7,737.50 และนับจำนวนไอคอนโตปลาสต์จากพินจากศพที่เวลาที่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง จะพบจำนวนของไอคอนโตปลาสต์เท่ากับ 10,680.00

1.3 การเปรียบเทียบความสอดคล้องการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตปลาสต์ในโพรงพินจากตัวอย่างพินของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากพินชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al.

จากการเปรียบเทียบการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตปลาสต์ในโพรงพินจากตัวอย่างพินของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากพินชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. พบว่า ในการวิจัยครั้งนี้ได้ผลการประเมินระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตปลาสต์ในโพรงพินจากตัวอย่างพินของคนไทยสอดคล้องและใกล้เคียงกับวิธีการของ Vavpotic et al. ซึ่งจากกลุ่มตัวอย่างรายที่ 9 10 20 และ 5 ที่มีระยะเวลาในการเก็บมากกว่า 24 ชั่วโมงขึ้นไปจะมีจำนวนไอคอนโตปลาสต์ลดลงเหมือนกัน ซึ่งถึงแม้ว่าการประเมินระยะเวลาของกลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้จะมีจำนวนไอคอนโตปลาสต์ลดลงมากกว่าของ Vavpotic et al. ก็ตาม แต่ก็ยังลดลงในระดับที่ยอมรับได้และใกล้เคียงกัน

และเมื่อพิจารณากลุ่มที่ตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักหากพิจารณาเป็นชั่วโมงการตายแต่เมื่อนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว ค่าที่ได้จากการคำนวณมีความแตกต่างจากค่าจริงมาก แม้จำนวนชั่วโมงจากระยะเวลาการตายที่แท้จริงกับระยะเวลาที่ได้จากการคำนวณแม้จะไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เพื่อเปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ 1.67% - 130% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการประมาณ

ระยะเวลาตายในคนไทยด้วยการนับจำนวนไอคอนโตบลาสต์นั้น ไม่สมควรนำผลสรุปจากงานวิจัยของ Vavpotic et al. (2009 : 125) ที่สรุปว่า ภายหลังการตายจะมีการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ 1.025% หรือ 130 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องมาใช้ ควรมีการศึกษาวิจัยในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นคนไทยอย่างละเอียดและควบคุมตัวแปรต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบเพิ่มเติม เพื่อหาอัตราการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ของคนไทย ก่อนนำมาใช้ร่วมในการประเมินระยะเวลาหลังการตายต่อไป

และเมื่อหาความสัมพันธ์ ระหว่างจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และจากตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (Simple Linear Regression and Correlation Analysis) ผลการหาความสัมพันธ์ครั้งนี้ พบว่า ได้ค่า $R^2 = 0.933$ ค่า $t = 11.021$ ค่า $Sig. = 0.001$ เมื่อนำมาหาเป็นกราฟเพื่อแสดงทิศทาง พบว่า ทิศทางความสัมพันธ์ของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันของคนไทย และจากตัวอย่างจากฟันชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

2. อภิปรายผลการวิจัย

2.1 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการประเมินระยะเวลาหลังการตายด้วยไอคอนโตบลาสต์กับเวลาจริงจากศพที่ทราบเวลาในการเสียชีวิตแน่นอนโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Vavpotic et al. ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายมากกว่า 24 ชั่วโมง จำนวนไอคอนโตบลาสต์ที่ได้จากการคำนวณของทั้ง 4 ราย มีค่าสูงกว่าจำนวนไอคอนโตบลาสต์ที่ได้จากการนับจากสไลด์ตัวอย่าง และเมื่อพิจารณาในด้านระยะเวลาหลังการตายที่ได้จากการคำนวณก็มีค่ามากกว่าระยะเวลาหลังการตายที่เกิดขึ้นจริง สาเหตุเนื่องจากเป็นคนละกลุ่มตัวอย่าง และ พบว่าทั้งสี่ราย มีอายุ 42, 46, 56 และ 48 ปี ซึ่งแตกต่างจากในงานวิจัยของ Vavpotic ที่กำหนดกลุ่มตัวอย่างในช่วงอายุ 18-40 ปี นอกจากนั้น 3 ใน 4 ราย ล้วนตายด้วยสาเหตุเกี่ยวกับโรคหัวใจ คือ หลอดเลือดแดงหัวใจตีบ การทำงานของหัวใจล้มเหลว และสภาวะหัวใจล้มเหลว ควรจะมีการศึกษาต่อถึงปัจจัยทั้งสามนี้ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับจำนวนไอคอนโตบลาสต์หรือไม่ อย่างไร

ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระยะเวลาหลังการตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงพบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวนไอคอนโตบลาสต์จากการคำนวณใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยจำนวนไอคอนโตบลาสต์จากการทดลอง (11,000 และ 10,680 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร) แต่เมื่อคำนวณระยะเวลาหลังการตายเปรียบเทียบกับระยะเวลาหลังการตายที่แท้จริงแล้ว พบว่ามีสองรายที่มีค่าที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกลุ่มตัวอย่างทั้งสองรายเป็นเพศชาย อายุ 38 และ 35 ปี ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างฟันมีอุณหภูมิ 29.2 และ 28.9 องศา

เซลล์เสียชีวิต สาเหตุการตายคือ ภาวะช็อกและ ภาวะติดเชื้อทางระบบหายใจ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากปัจจัยทางด้านสุขภาพคือทั้งสองรายอยู่ในวัยชรามากและน่าจะมีความแข็งแรงมาก และอีกสาเหตุคือเนื่องจากสาเหตุการตายที่เป็นอุบัติเหตุและฆาตกรรม อีกทั้งอุณหภูมิที่สูงก็อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองรายนี้แตกต่างจากรายอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด

2.2 การเปรียบเทียบความสอดคล้องการประมาณระยะเวลาหลังการตายจากจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในโพรงป็นจากตัวอย่างป็นของคนไทย และผลงานวิจัยที่เป็นตัวอย่างจากป็นชาวต่างชาติตามวิธีการของ Vavpotic et al. พบว่าเมื่อระยะเวลาหลังการตายผ่านไปมากกว่า 24 ชั่วโมงนั้น จำนวนไอคอนโตบลาสต์จะลดลงอย่างสอดคล้องกัน โดยจะมีค่าเฉลี่ยของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ของคนไทยต่ำกว่าเล็กน้อยแต่ก็อยู่ในระดับที่ยอมรับได้และใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณากลุ่มที่ตายน้อยกว่า 24 ชั่วโมงพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักหากพิจารณาเป็นชั่วโมงการตายแต่เมื่อนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว ค่าที่ได้จากการคำนวณมีความแตกต่างจากค่าจริงมาก แม้จำนวนชั่วโมงจากระยะเวลาการตายที่แท้จริงกับระยะเวลาที่ได้จากการคำนวณแม้จะไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เพื่อเปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนแล้วพบที่มีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ 1.67% - 130% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการประมาณระยะเวลาตายในคนไทยด้วยการนับจำนวนไอคอนโตบลาสต์นั้น ไม่สมควรนำผลสรุปจากงานวิจัยของ Vavpotic et al. (2009 : 125) ที่สรุปว่า ภายหลังกการตายจะมีการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ 1.025% หรือ 130 ไอคอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องมาใช้ ควรมีการศึกษาวิจัยในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นคนไทยอย่างละเอียดและควบคุมตัวแปรต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบเพิ่มเติม เพื่อหาอัตราการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ของคนไทย ก่อนนำมาใช้ร่วมในการประเมินระยะเวลาหลังการตายต่อไป

3. ข้อเสนอแนะ

3.1 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

3.1.1 ในการวิจัยครั้งนี้พบว่างานวิจัยในครั้งนี้มีผลใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Vavpotic et al. ในส่วนของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ภายหลังกการตายในระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ซึ่งนักนิติวิทยาศาสตร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้

3.1.2 การนำจำนวนไอคอนโตบลาสต์ไปประเมินเวลาหลังการตายยังไม่ควรนำไปใช้ ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เพื่อหาอัตราการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ในคนไทยก่อน

3.2 ข้อเสนอแนะครั้งต่อไป

3.2.1 ควรทำการศึกษาวิจัยอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อเป็นการศึกษาอัตราการลดลงของไอคอนโตบลาสต์ ซึ่งจะมีผลต่อการประเมินระยะเวลาตายในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างออกไปจากงานวิจัยในครั้งนี้

3.2.2 ควรทำการศึกษาวิจัยในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคที่พบได้บ่อยในประเทศไทย เช่น โรคหัวใจ ไขมันสูง โรคเบาหวาน เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องกับการลดลงของจำนวนไอคอนโตบลาสต์ภายหลังการตาย

3.2.3 เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย ควรมีการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้น เพื่อใช้เป็นตัวแทนสำหรับกลุ่มประชากรได้ นำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคต

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะทันตแพทยศาสตร์. Dental anatomy. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

ทศพล ปิยะปัทมินทร์. Oral histology. พิษณุโลก : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2539.

ปราโมทย์ วัฒนชัยนาคม. จุลกายวิภาคเคมี (Histochemistry). เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2530.

พรทิพย์ โรจนสุนันท์. นิติเวชศาสตร์การชันสูตรศพ. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์วิญญูชน, 2545.

วิกิพีเดีย. รอยเขียวช้ำหลังตาย [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อ 30 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.malthus.com.br/mg_imagem_zoom.asp?id=1262

วิชาญ เปี้ยวนิม. นิติเวชศาสตร์สำหรับนักศึกษาแพทย์. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี, 2553.

สุนิภา วงศ์ทองศรี, สุปราณี วิเชียรเนตร และ สีมพูน นรภูมิพิทักษ์. ทันตกายวิภาคศาสตร์. ม.ป.ท., 2539.

ภาษาอังกฤษ

Bimedical Marketing Associates. Base mold&Biopsy pads [Online]. Accessed 16 September 2011.

Available from <http://www.biomedicalmarketing.com/Simport/Histology/MoldsPads.html>

Britanica. Tooth: cross section an adult human molar [Online]. Accessed 16 September 2011.

Available from <http://www.britannica.com/EBchecked/media/112882/Cross-section-of-an-adult-human-molar>

Clark McAvoy [pseud]. Pugilistic attitude/pose [Online]. Accessed 1 October 2011. Available from <http://criminalprofiler.tumblr.com/post/7096141984/ramirez-dahmer-bundy-pugilistic-attitude-pose>

Dental anatomy physiology [Online]. Accessed 15 November 2010. Available from

<http://www.docstoc.com/docs/42552079/DENTAL-ANATOMY-PHYSIOLOGY>

Dental-pulp complex [Online]. Accessed 31 October 2010. Available from <http://www.kck.usm.my/ppsg/Histology/>

Doctors Gates [pseud]. Explanation of the state of rigor mortis [Online]. Accessed 16 September

2011. Available from <http://doctorsgates.blogspot.com/2011/02/66-year-old-man-who-lives-alone-has.html>
- Duffy, J.B., M.F. Skinner, and J.D. Waterfield. "Rates of putrefaction of dental pulp in the northwest coast environment." Journal of Forensic Science 36 (1991) : 1492–1502.
- Fisher, Alton K., and Christian Schwabe. "Respiration and Glycolysis in Bovine." Dental Pulp Journal 48 (1969) : 439.
- Halley, M.M., and Harvey W.F. "Legal definition of death." J.A.M.A. (1980) : 204-243.
- Knight B. Forensic pathology. 2 nd ed. London : Arnold,1996.
- Maikadara medical, Histopathology[Online]. Accessed 16 September 2011. Available from <http://mkdmedical.com/histopath.html>
- Medical Equipment source. Embedding center [Online]. Accessed 16 September 2011. Available from <http://medequipsource.com/microm-ec-350-embedding-center>
- Milescio Scientific. Tissue Floating Bath [Online]. Accessed 16 September 2011. Available from <http://www.tissuefloatingbath.com>
- Murray, P.E. et al. "Age-related odontometric changes of human teeth." Oral Surgery, Oral Medicology, Oral Pathology and Oral Radiology 93 (2001) : 474-82.
- Murray, P.E. et al. "Restorative pulpal and repair responses." Journal of American Dentistry Association 132 (2001) : 482–491
- Okiji, T. "Pulp as a connective tissue." Seltzer and Bender's Dental Pulp (2002) : 95–110.
- Pashley, D.H.,and F.R. Liewehr. "Structure and functions of the dentin–pulp complex." Pathways of the Pulp 9 (2006) : 122.
- Ingraham, Paul. Massage Therapy for Bruxism, Jaw Clenching, and TMJ Syndrome [Online]. Accessed 16 September 2011. Available from <http://saveyourself.ca/articles/perfect-spots/spot-007-masseter.php>
- Springer images. Marbling of the skin [Online]. Accessed 16 September 2011. Available from <http://www.deformutilation.tumblr.com>
- Vavpotic, Marko et al. "Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem." Forensic Science International 193 (2009) : 122–126.
- Yu, C.Y. et al. "Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp," Archaeology and Oral Biology 47 (2002) : 529–536.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวแสงเทียน คงพันธุ์
ที่อยู่	449/30 ม.หรรษนันท์ 7 ต.บ้านคลอง อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
ที่ทำงาน	โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2545	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยนเรศวร
พ.ศ.2552	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ.2545-2546	นักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธนบุรี-อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี
พ.ศ.2546-2549	นักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลบางระกำ จ.พิษณุโลก
พ.ศ.2549- ปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก จ.พิษณุโลก