บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การออกแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกในรูปแบบ parallel ชนิด Simple randomized controlled และมีการปิดบังข้อมูลสองระดับ (double-blinded) โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ซึ่งการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบข่อยร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน ในการรักษาผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

2. ขั้นตอนและวิธีการเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

การเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย การตรวจสอบคุณภาพสารสกัดจากใบข่อยและเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย มีวิธีดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

2.1.1 เตรียมสกัดสารจากใบข่อยตามวิธีที่รายงานโดยโสพิศ วงศ์คำ และคณะ [12] โดยการนำใบข่อยแห้งบดให้ละเอียด และแช่ใน 50% เอธานอลเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กวนส่วนผสมนี้เป็นระยะ นำมาแยกส่วนใสออกโดยการกรองและการปั่นเหวี่ยง กำจัดเอธานอลในส่วนที่เป็นสารละลายโดยการระเหยในเครื่อง rotar evaporator และระเหิดแห้งโดยเครื่องปั่น lyophilizer จากนั้นนำสารในรูปแบบผงที่ได้มาเตรียมเป็นสารละลาย

2.1.2 เตรียมสารสกัดจากใบข่อยให้ได้ความเข้มข้นตั้งต้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายสารสกัดข่อยในน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้การละลายสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9410 กรัม) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องกรองหยาบเบอร์ 1 และผ่านเครื่องกรองเชื้อแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อให้ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และนำสารละลายนี้ไปตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในสภาวะไร้ออกซิเจน (ดังที่จะกล่าวไว้ต่อไปในหัวข้อ 2.2) ก่อนทำการเตรียมเป็นรูปแบบเจล

2.1.3 เตรียมเจลพื้นเพื่อเป็นต้นตำรับของยาในรูปแบบเจล เมื่อต้องการเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยปริมาณ 50 กรัม ทำการผสมส่วนประกอบของยาพื้นสำหรับเตรียมเจลดังต่อไปนี้

1.	Hydroxyethyl cellulose	2	กรัม
2.	Methyl paraben	0.1	กรัม
3.	Sodium metabisulfite	0.05	กรัม
4.	Ethylenediamine tetra acetate	0.01	กรัม
5.	Purified Water	47.85	กรัม

2.1.4 เตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยนำสารสกัดข่อยให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 24 โดยใช้สารสกัดจากใบข่อยที่มีความเข้มข้นตั้งต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมรวมกับปริมาณของเจลพื้นในตำรับ โดยหากผสมรวมกับเจลพื้น 50 กรัม จะต้องใส่สารสกัดจากใบข่อย 24 มิลลิลิตร ทำการผสมส่วนผสมทั้งสองส่วนในโกร่งผสมยาภายใต้วิธีไร้เชื้อ (aseptic technique) และนำตำรับยาที่ได้ในรูปแบบเจลบรรจุในหลอดฉีดยาพลาสติกปลอดเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 ± 1 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในสภาวะไร้ออกซิเจนดังที่จะกล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3 ต่อไป

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากใบข่อยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในสภาวะไร้ออกซิเจน

2.2.1 เตรียมเชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบคือ เชื้อ *A.actinomycetemcomitans* สายพันธุ์ ATCC 43718 ที่นำมาจากห้องทดลองของ Isao Ishikawa มหาวิทยาลัยโตเกียวประเทศญี่ปุ่น เลี้ยงเชื้อใน Brain heart infusion broth เจือจางเชื้อจุลชีพให้ได้ความขุ่นของเชื้อโดยมีค่าการดูดกลืนแสง (OD) เท่ากับ 0.1 (ประมาณ $1x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.2.2 ตรวจสอบความเข้มข้นของสารสกัดข่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (MIC) เจือจางสารสกัดข่อยด้วย Brain heart infusion broth ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละครึ่ง (two fold serial dilution) ในถาดหลุม (micro-titre plate) โดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* หลุมละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเลี้ยงต่อใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี *A.actinomycetemcomitans* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารสกัดข่อยเป็นตัวควบคุมผลบวก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ อ่านผลการเจริญของเชื้อจุลชีพโดยสังเกตตะกอนขุ่นของเชื้อที่ตกอยู่ก้นหลุมซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวก หากสารสกัดข่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* ได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีตะกอนของเชื้อให้เห็น

2.2.3 การตรวจสอบความเข้มข้นของสารสกัดข่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลชีพ (MBC) ที่สารสกัดจากใบข่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้จะถูกนำมาทดสอบต่อว่าผลลบที่เห็นนั้น เนื่องจากเชื้อนั้นถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือถูกทำลาย โดยการนำส่วนผสมจากหลุมที่ให้ผลลบทุกหลุมหยดลงบน Tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin agar และเลี้ยงเชื้อต่อใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน หากสารสกัดข่อยสามารถทำลายเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* ได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีโคโลนีของเชื้อให้เห็น

2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยในการทำลายการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ

2.3.1 ชั่งน้ำหนักเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเชื้อ *A.actinomycetemcomitans* ลงในหลอดทดลองหลอดละ 500 ไมโครลิตร ($0.5 * 10^8$ CFU) เขย่าให้ผสมกัน นำไปเลี้ยงต่อในตู้อบไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2 นำส่วนผสมของเชื้อและเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยมา 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในวันที่ 1 โดยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูโคโลนีของเชื้อ

จุลชีพต่อไป หลังจากนั้นเติมเชื้อจุลชีพลงในหลอดทดลองเดิมปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำกลับไปเลี้ยงต่อเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในวันที่ 2 ทำเช่นนี้จนครบ 7 วัน

นอกจากนี้ การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยทำได้โดยตรวจสอบลักษณะปรากฏของเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย ควรมีสีน้ำตาลใส มีการรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น และมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ

3. การคำนวณขนาดประชากรที่ศึกษา

การคำนวณขนาดประชากรที่ศึกษา (sample size) โดยทำการหาขนาดตัวอย่างของงานวิจัย 2 กลุ่ม สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างสองกลุ่มที่มีการแจกแจงปกติและจำนวนเท่ากัน โดยใช้สูตร [38]

$$\text{ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม} = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \text{ คน}}{\Delta^2}$$

$Z_{1-\alpha/2}$ เท่ากับ 1.96 เป็นค่าที่ได้จากตารางแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด type I error ให้มีขนาดเท่ากับ 0.05

$Z_{1-\beta}$ เท่ากับ 0.524 เป็นค่าที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด type II error ให้มีขนาดไม่เกิน 0.30

σ_1 เท่ากับ 0.99 เป็นค่าความแปรปรวนของค่าร่องลึกปริทันต์เมื่อเวลา 3 เดือนภายหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันร่วมกับการฉีดล้างภายในร่องเหงือกด้วยสารสกัดจากใบข่อย [17]

σ_2 เท่ากับ 1.3 เป็นค่าความแปรปรวนของค่าร่องลึกปริทันต์เมื่อเวลา 3 เดือนภายหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันเพียงอย่างเดียว [39]

Δ เท่ากับ 0.91 มิลลิเมตร (4.61-3.70 มิลลิเมตร) เป็นค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์ระหว่างกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์และค่าความแปรปรวนของการศึกษาที่ใช้อ้างอิงในการหาขนาดตัวอย่าง

ชนิดของการศึกษา	ค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์ ± ค่าความแปรปรวน
ค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์เมื่อเวลา 3 เดือนภายหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันร่วมกับการฉีดล้างภายในร่องเหงือกด้วยสารสกัดจากใบข่อย [17]	4.61 ± 0.99
ค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์เมื่อเวลา 3 เดือนภายหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันเพียงอย่างเดียว [39]	3.7 ± 1.3

ทำการแทนค่าลงในสูตรและคำนวณ

$$\text{ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม} = \frac{(0.99^2 + 1.3^2)(1.96 + 0.524)^2}{0.91^2}$$

$$= 19.89 \text{ คน}$$

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงกำหนดให้คัดเลือกอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังของภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวนทั้งหมด 40 คน แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองกลุ่มละ 20 คน

4. การคัดเลือกประชากรศึกษา

4.1 ข้อกำหนดในการคัดประชากรศึกษาเข้าร่วมการวิจัย (inclusion criteria)

4.1.1 ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังที่เข้ารับการรักษาในภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มีความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง อายุมากกว่า 30 ปีขึ้นไป จำนวน 40 คน โดยผู้ป่วยแต่ละคนจะต้องมีฟันอย่างน้อย 10 ซี่ในช่องปาก มีร่องลึกปริทันต์ที่อยู่ในช่วง 5-8 มิลลิเมตร จำนวนอย่างน้อย 4 ตำแหน่งที่ไม่อยู่ในฟันซี่เดียวกันและไม่ใช่ตำแหน่งที่อยู่ติดกัน โดย 4 ตำแหน่งนั้นต้องตรวจพบเลือดออกภายหลังการตรวจด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing) รวมทั้งตรวจพบเชื้อ *P.gingivalis* ณ สัปดาห์ที่ 0

4.1.2 ผู้ป่วยปฏิเสธการรักษาด้วยวิธีการทำศัลย์ปริทันต์

4.1.3 ผู้ป่วยมีสุขภาพทั่วไปแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ

4.1.4 ผู้ป่วยมีความเต็มใจในการเข้าร่วมโครงการวิจัย ตลอดจนสามารถมาตามนัดและติดตามผลการรักษาได้ตลอด ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการวิจัย

4.2 ข้อกำหนดในการไม่คัดประชากรศึกษา (exclusion criteria)

4.2.1 ผู้ป่วยมีโรคทางระบบที่อาจส่งผลต่อสภาวะโรคปริทันต์อักเสบ เช่น โรคตับ โรคเบาหวาน โรคเอดส์ โรคไต โรคมะเร็ง ภาวะขาดสารอาหาร ภาวะติดแอลกอฮอลล์และติดยา รวมทั้งผู้ป่วยที่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ระยะให้นมบุตร หรือรับประทานยาคุมกำเนิด

4.2.2 ได้รับน้ำยาบ้วนปากในช่วง 2 เดือนก่อนรักษา

4.2.3 ได้รับการรักษาโรคปริทันต์ในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา

4.2.4 ได้รับการใส่ยาหรือสารใดๆลงในร่องเหงือกในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา

4.2.5 รับประทานยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตียรอยด์ (NSAIDs) ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา รับประทานยาต้านมะเร็ง (anticancer agent) ในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา

4.2.6 ฟันที่มีอาการเสียวฟัน มีรอยร้าว ใส่ครอบฟัน อุดฟันขนาดใหญ่ อุดคอฟัน หรือมีตะขอวาง มีฟันผุมากกว่า 5 ตำแหน่งซึ่งต้องรักษาแบบฉุกเฉิน

4.2.7 ใส่เครื่องมือจัดฟัน

4.2.8 มีรากเทียมอยู่ติดกับฟันที่ศึกษา

4.2.9 ผู้ที่สูบบุหรี่ ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคปริทันต์อักเสบ

4.3 ข้อกำหนดในการให้เลิกจากการศึกษา (discontinuation criteria)

4.3.1 เกิดผลเสียหรืออาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ อันอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพทั่วไปของอาสาสมัคร และในครั้งแรกที่ตรวจพบอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ในสัปดาห์ใดก็ตามภายหลังจากการรักษา คณะผู้วิจัยจะหยุดทำการทดลองในตัวอาสาสมัครทันที ดังมีอาการต่อไปนี้

1. มีอาการเจ็บเหงือกเพิ่มมากขึ้นอย่างผิดปกติ
2. ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารและลำไส้
3. ปวดศีรษะภายหลังการรักษา
4. อาการตัวร้อนมีไข้
5. มีลักษณะอาการแพ้ยาที่เหงือก
6. มีเหงือกบวม มีหนองจากร่องเหงือก มีรูเปิดหนอง
7. มีการโยกของฟันมากขึ้น
8. พบลักษณะแผลร้อนใน
9. ติดเชื้อราซ้ำ
10. เกิดผื่นแดงที่แขนหรือที่อื่นๆ

4.3.2 เกิดการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์หรือร่องลึกปริทันต์เพิ่มขึ้นในระหว่างการศึกษามากกว่า 1 มิลลิเมตร รวมถึงความผิดปกติอื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการวิจัย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าหากยังคงดำเนินการทดลองต่อไปจะไม่เป็นผลดีต่อประชากรศึกษา คณะผู้วิจัยจะแจ้งให้อาสาสมัครทราบและนำอาสาสมัครเข้ารับการรักษาด้วยวิธีทางการแพทย์และทางทันตกรรมที่เหมาะสมต่อไป

5. ขั้นตอนการดำเนินการศึกษาทางคลินิก

5.1 การแบ่งกลุ่มอาสาสมัครและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วว่า การศึกษานี้เป็นชนิด Simple randomized controlled trial แบบ parallel design และ double-blinded การแบ่งกลุ่มศึกษาทำโดยการสุ่มอายุและเพศของกลุ่มอาสาสมัคร การทดสอบผลของเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบข่อยจะทำในรูปแบบ parallel โดยแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มทดสอบ

<u>กลุ่มควบคุม</u> จำนวน 20 คน 80 ตำแหน่ง ได้รับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน ซึ่งเป็นการรักษาตามมาตรฐานสำหรับผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

<u>กลุ่มทดสอบ</u> จำนวน 20 คน 80 ตำแหน่ง ได้รับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันร่วมกับการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 24 จนเต็มร่องลึกปริทันต์ แต่ปริมาณไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟัน 1 ซี่

ในอาสาสมัครแต่ละคนจะต้องมีฟันที่ใช้ศึกษาเป็นฟันที่มีร่องลึกปริทันต์อยู่ในช่วง 5-8 มิลลิเมตร จำนวนอย่างน้อย 4 ตำแหน่งที่ไม่อยู่ในฟันซี่เดียวกันและไม่ใช่ตำแหน่งที่อยู่ติดกัน โดย 4 ตำแหน่งนั้นต้องตรวจพบเลือดออกภายหลังการตรวจด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing) รวมทั้งตรวจพบเชื้อ *P.gingivalis* ณ สัปดาห์ที่ 0 โดยหากมีบริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์อยู่ในช่วง 5-8 มิลลิเมตรมากกว่า 4 ตำแหน่งในช่องปาก ให้เลือกตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ลึกมากเป็นตำแหน่งศึกษา โดยต้องไม่อยู่ในฟันซี่เดียวกันและไม่ใช่ตำแหน่งที่อยู่ติดกัน เป็นจำนวน 4 ตำแหน่ง การขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันทั้งปากรวมทั้งตำแหน่งศึกษาใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงต่อคนและให้การรักษาภายในการนัด 1 ครั้ง

ผู้ทำการวิจัย มีหน้าที่ดังต่อไปนี้

<u>ผู้วิจัยหลัก</u> มีจำนวน 1 คน มีหน้าที่ วัดค่าความปลอดภัยทางคลินิก ตรวจช่องปาก ทำการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน และวัดค่าทางคลินิกในอาสาสมัครทุกคนตลอดการวิจัย รวมทั้งการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ตรวจวัดปริมาณเชื้อ *P.gingivalis* และวิเคราะห์ข้อมูล โดยไม่ทราบว่าอาสาสมัครแต่ละคนถูกสุ่มอยู่ในกลุ่มทดลองหรือกลุ่มควบคุม

<u>ผู้วิจัยรอง</u> มีจำนวน 6 คน มีหน้าที่สุ่มอาสาสมัครและใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยลงในร่องลึกปริทันต์ของอาสาสมัครกลุ่มทดลอง โดยผู้วิจัยรองทั้ง 6 คนได้รับการฝึกปฏิบัติการใส่เจลตามวิธีการดังนี้

1. ตรวจสอบชื่อและกลุ่มของอาสาสมัคร (หรือทำการสุ่มอาสาสมัครในกรณีที่ใส่เจลครั้งแรก)
2. ใช้ผ้าเจาะกลางคลุมใบหน้าอาสาสมัครเพื่อไม่ให้อาสาสมัครทราบว่าตนเองได้รับเจลข่อยหรือไม่
3. กั้นน้ำลายบริเวณที่เป็นตำแหน่งศึกษาโดยใช้ก้อนสำลี และเป่าฟันให้แห้ง
4. การปฏิบัติในอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ผู้วิจัยรองนำหลอดยาพลาสติกเปล่า และใช้ปลายเข็มวางไว้บริเวณขอบเหงือกของตำแหน่งศึกษาและวนรอบซี่ฟันนั้นสักครู่ (โดยไม่ต้องฉีด) ทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที และใช้ก้อนสำลีเช็ดฟันให้สะอาด ทำซ้ำเช่นเดิมจนครบทุกตำแหน่งศึกษา
5. การปฏิบัติในอาสาสมัครกลุ่มทดสอบ ผู้วิจัยรองนำหลอดยาพลาสติกบรรจุเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย สอดปลายเข็มลงไปในตำแหน่งศึกษาจนเกือบสุดความลึกของร่องลึกปริทันต์ หรือจนกว่ารู้สึกว่ามีแรงต้านจึงหยุด และค่อยๆฉีดเจลลงในร่องลึกปริทันต์ โดยค่อยๆถอนปลายเข็มพร้อมๆกับฉีดเจลไปด้วย จนกระทั่งเจลเต็มล้นออกมานอกร่องลึกปริทันต์เล็กน้อย และค่อยๆฉีดวนในร่องลึกปริทันต์รอบๆซี่ฟันเดียวกันนั้น จนกระทั่งเจลเต็มร่องลึกปริทันต์ของฟันซี่นั้น โดยตรวจสอบปริมาณเจลที่ใส่ไม่ให้เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟัน 1 ซี่ ทิ้งไว้ 10 วินาที และนำก้อนสำลีเช็ดเจลที่เกินออกมาจากร่องลึกปริทันต์ให้สะอาด เพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยกลืนเจลที่ล้นออกมา ทำซ้ำเช่นเดิมจนครบทุกตำแหน่งศึกษา
6. ห้ามอาสาสมัครบ้วนน้ำหรือรับประทานอาหาร เครื่องดื่มใดๆ อย่างน้อยครึ่งชั่วโมง

หมายเหตุ : เกี่ยวกับความปลอดภัยในเรื่องของปริมาณการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยในมนุษย์ การใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 24 ปริมาณไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟัน 1 ซี่ ในอาสาสมัคร 1 คน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แสดงว่าภายในเวลา 5 สัปดาห์ผู้ป่วยจะได้รับสารสกัดข่อยทั้งหมดไม่เกิน 468.75 มิลลิกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจากการศึกษาของโสพิศ วงศ์คำและคณะ [12] ที่ได้ทำการศึกษาผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดจากใบข่อยในหนูขาว พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดใบข่อยทางปากในปริมาณ

50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมวันละครั้ง ทุกวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (รวมทั้งสิ้น 2,100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมภายใน 6 สัปดาห์) ทุกตัวมีพฤติกรรมปกติและไม่มีหนูตัวใดตายในระหว่างการทดลอง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้อาสาสมัครได้รับสารสกัดข่อยเพียง 9.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมภายใน 5 สัปดาห์ (หากใช้น้ำหนักเฉลี่ยของอาสาสมัครเท่ากับ 50 กิโลกรัมต่อคน) จะเห็นได้ว่าปริมาณของสารสกัดข่อยที่ใช้ในการศึกษานี้น้อยกว่าการศึกษาในหนูขาวประมาณ 224 เท่า จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณของสารสกัดข่อยที่ใช้ในการศึกษานี้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่ออาสาสมัคร

5.2 ขั้นตอนการเก็บข้อมูลในอาสาสมัคร

<u>ในวันที่รับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (สัปดาห์ที่ –2 ถึง –4)</u> มีการดำเนินงานดังนี้

1. อธิบายขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยแก่อาสาสมัคร ให้อาสาสมัครลงชื่อในแบบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
2. อาสาสมัครได้รับการวัดสัญญาณมีชีพ (vital sign) ประกอบไปด้วย ความดันโลหิต (blood pressure) อุณหภูมิร่างกาย (body temperature) อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) อัตราการหายใจ (respiration rate) ทำการบันทึกข้อมูลไว้
3. ทำการตรวจช่องปากเพื่อเก็บข้อมูลก่อนการรักษา ซึ่งประกอบด้วย
   - 3.1 ร่องลึกปริทันต์ (probing depth; PD)
   - 3.2 ค่าดัชนีการเลือดออกของเหงือก (gingival bleeding index ; GBI)
   - 3.3 ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level; CAL)

   ซึ่งผู้เก็บข้อมูลเป็นคนเดียวกันตลอดการดำเนินงานวิจัย
4. สอนวิธีดูแลอนามัยช่องปาก
5. หากมีหินน้ำลายเหนือเหงือก ทำการขูดหินน้ำลายเหนือเหงือกทั้งปากให้กับอาสาสมัคร โดยใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง
6. ขัดฟันด้วยผงขัดฟัน (pumice) เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก
7. นัดอาสาสมัครเพื่อเข้าร่วมการวิจัยในครั้งต่อไปหลังจากนี้ 2 ถึง 4 สัปดาห์

<u>ในการนัดครั้งที่ 2 หลังจากการนัดครั้งแรก 2 ถึง 4 สัปดาห์ (นับเป็นสัปดาห์ที่ 0)</u> อาสาสมัครได้รับการรักษาตามลำดับดังต่อไปนี้

1. วัดสัญญาณมีชีพ
2. ทำการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัยในอาสาสมัครทุกคน เพื่อนำไปทดสอบเชื้อ *P.gingivalis*
3. เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม โดยแบ่งเป็นสองส่วน
   - 3.1 การเก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์
   - 3.2 การเก็บข้อมูลโดยการตรวจและประเมินทางคลินิกโดยทันตแพทย์
4. ทำการตรวจช่องปากเพื่อเก็บข้อมูลก่อนการรักษาในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัย ซึ่งประกอบค่าด้วยต่างๆ ดังต่อไปนี้ ตามลำดับ
   - 4.1 ค่าดัชนีเหงือกอักเสบ (gingival inflammation index ; GI)

4.2 ค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์ (axial plaque extension index ; APEI)

4.3 ร่องลึกปริทันต์

4.4 ค่าดัชนีการเลือดออกของเหงือก

4.5 ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์

5. ทำการขูดหินน้ำลายใต้เหงือกและเกลารากฟันให้สะอาดทั้งปากภายในการนัดครั้งเดียวโดยใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 1 ชั่วโมงต่ออาสาสมัคร 1 คน

6. ขัดฟันด้วยผงขัดฟัน (pumice) เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก

7. ใส่เจลข่อยในร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัยของฟันกลุ่มทดลองโดยใส่ให้เต็มร่องลึกปริทันต์ แต่ไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟันหนึ่งซี่ โดยผู้ใส่เจลเป็นคนเดียวกันตลอดการดำเนินงานวิจัยและมิใช่คนเดียวกันกับผู้เก็บข้อมูล

8. นัดอาสาสมัครเพื่อดำเนินการศึกษาในครั้งต่อไป

<u>สัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 หลังการนัดครั้งที่ 2</u> อาสาสมัครจะได้รับการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. วัดสัญญาณมีชีพ

2. เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม โดยแบ่งเป็นสองส่วน

2.1 การเก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์

2.2 การเก็บข้อมูลโดยการตรวจและประเมินทางคลินิกโดยทันตแพทย์

3. ขัดฟันด้วยผงขัดฟัน เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก

4. ใส่เจลข่อยในร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัยของฟันกลุ่มทดลองโดยใส่ให้เต็มร่องลึกปริทันต์ แต่ไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟันหนึ่งซี่

5. นัดอาสาสมัครเพื่อดำเนินการศึกษาในครั้งต่อไป

ในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 หลังการนัดครั้งที่ 2 อาสาสมัครจะได้รับการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. วัดสัญญาณมีชีพ

2. ทำการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัยในอาสาสมัครทุกคน เพื่อนำไปทดสอบเชื้อ *P.gingivalis*

3. เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม โดยแบ่งเป็นสองส่วน

3.1 การเก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์

3.2 การเก็บข้อมูลโดยการตรวจและประเมินทางคลินิกโดยทันตแพทย์

4. ทำการตรวจช่องปากเพื่อเก็บข้อมูลก่อนการรักษาในตำแหน่งที่เลือกใช้ทำการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ ตามลำดับ

4.1 ค่าดัชนีเหงือกอักเสบ

4.2 ค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์

4.3 ร่องลึกปริทันต์

4.4 ค่าดัชนีการเลือดออกของเหงือก

4.5 ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์

5. ขัดฟันด้วยผงขัดฟัน เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก

6. หลังการนัดในสัปดาห์ที่ 12 แล้วให้ส่งตืนอาสาสมัครเข้าสู่ขั้นตอนการรักษาในคลินิกภาควิชาปริทันตวิทยาต่อไป

5.3 การวัดความปลอดภัยทางคลินิก

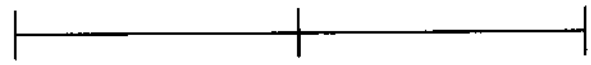
การติดตามการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาจะถูกบันทึกตลอดทุกครั้งก่อนที่จะให้การรักษาในแต่ละสัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 6) โดยการเก็บข้อมูลจะแบ่งเป็น 2 ส่วน

<u>ส่วนที่ 1</u> การเก็บข้อมูลโดยทันตแพทย์เป็นผู้ถามแบบสอบถาม

<u>ส่วนที่ 2</u> การเก็บข้อมูลโดยการตรวจและประเมินทางคลินิกโดยทันตแพทย์

ส่วนที่ 1 การเก็บข้อมูลโดยทันตแพทย์เป็นผู้ถามแบบสอบถาม ข้อมูลแบบสอบถามประกอบด้วย

1. อาการเจ็บเหงือก ด้วย Visual analog scale สอบถามถึงอาการเจ็บเหงือกตั้งแต่ครั้งแรกที่ยังไม่ได้ให้การรักษา โดยขีดค่าระดับความเจ็บเหงือกบนกระดาษที่มีเส้นความยาวตั้งแต่ 0 ถึง 10 เซนติเมตร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ผู้ป่วยใช้เปรียบเทียบกับครั้งต่อไป ก่อนให้การรักษาในแต่ละสัปดาห์ต่อๆมาอาสาสมัครจะถูกสอบถามถึงอาการเจ็บเหงือก ซึ่งในการขีดค่าระดับความเจ็บเหงือกในครั้งต่อมาอาสาสมัครจะได้ดูเส้นที่เคยขีดไว้ในครั้งก่อน



ไม่เจ็บ — เจ็บจนทนไม่ได้

0 เซนติเมตร — 10 เซนติเมตร

ในทุกสัปดาห์ที่ทดสอบจะทำการบันทึกผลเป็นอาการเจ็บเหงือกโดยรวมทั้งปาก หากอาสาสมัครมีอาการเจ็บเหงือกเกิดขึ้นในระหว่างการทดสอบและสามารถระบุได้ว่าตรงกับฟันซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยจริง จะทำการบันทึกผลการทดสอบว่ามีอาการเจ็บเหงือกเกิดขึ้น หากอาสาสมัครระบุซี่ที่มีอาการเจ็บเหงือกไม่ตรงกับซี่ที่ถูกทดสอบ แสดงว่าอาการเจ็บเหงือกที่เกิดขึ้นเกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อย จะไม่ทำการบันทึกอาการเจ็บเหงือก

2. การเปลี่ยนแปลงการรับรสหมายถึงการรับรสที่เปลี่ยนไป เช่น อาการขมลิ้น, ลิ้นรับรสอาหารไม่ได้

0 หมายถึง รับรสปกติ

1 หมายถึง รับรสเปลี่ยนไป

3. มีกลิ่นปาก หมายถึงอาสาสมัครรู้สึกมีกลิ่นปากเพิ่มมากขึ้นภายหลังการรักษา

0 หมายถึง ไม่มีกลิ่นปาก

1 หมายถึง มีกลิ่นปากเพิ่มขึ้น

4. ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารและลำไส้เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย

0 หมายถึง ไม่มีอาการผิดปกติของระบบลำไส้

1 หมายถึง มีอาการผิดปกติของระบบลำไส้

5. ปวดศีรษะภายหลังการรักษา

0 หมายถึง ไม่มีอาการปวดศีรษะภายหลังการรักษา

1 หมายถึง มีอาการปวดศีรษะภายหลังการรักษา

6. อาการตัวร้อน มีไข้ภายหลังการรักษา

0 หมายถึง ไม่มีอาการตัวร้อน มีไข้

1 หมายถึง มีอาการปวดตัวร้อน มีไข้

7. อาการ ไม่พึงประสงค์อื่นๆ (ให้ผู้ป่วยระบุ)

ส่วนที่ 2 การวัดค่าทางคลินิกและการประเมินทางคลินิกโดยทันตแพทย์ ดังต่อไปนี้

1. การติดสีที่ฟัน ตรวจการเปลี่ยนสีที่เหงือกและฟัน วัดผลจากฟัน 4 ซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย โดยใช้ดัชนี Discoloration index system (DI)

0 หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนสี ผิวฟันสะอาด มีสีฟันตามธรรมชาติ

1 หมายถึง มีสีเหลืองเล็กน้อยที่ผิวฟัน

2 หมายถึง ติดสีปานกลางที่บริเวณซอกฟันและ1/3 ของคอฟัน

3 หมายถึง ติดสีตลอดผิวฟัน และที่ซอกฟัน

2. มีลักษณะอาการแพ้ยาที่เหงือก วัดผลจากฟัน 4 ซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

0 หมายถึง ไม่พบลักษณะอาการแพ้ยาที่เหงือก

1 หมายถึง พบลักษณะอาการแพ้ยาที่เหงือก

3. มีเหงือกบวม หรือมีหนองจากร่องเหงือก หรือฝีที่เหงือก หรือรูเปิดหนอง วัดผลจากฟัน 4 ซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

0 หมายถึง ไม่มีลักษณะดังกล่าว

1 หมายถึง มีลักษณะดังกล่าว

4. การโยกของฟัน วัดผลจากฟัน 4 ซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

0 หมายถึง ลักษณะปกติ

1 หมายถึง ฟันโยกในแนวแก้มลิ้นไม่เกิน 1 มิลลิเมตร

2 หมายถึง ฟันโยกในแนวแก้มลิ้นในช่วง 1-2 มิลลิเมตร

3 หมายถึง ฟันโยกในแนวแก้มลิ้นมากกว่า 2 มิลลิเมตรร่วมกับมีการขุบในแนวดิ่ง

5. เกิดลักษณะแผลร้อนในบริเวณที่รักษาวัดผลจากเหงือกที่อยู่ใกล้บริเวณฟัน 4 ซี่ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

0 หมายถึง ไม่มีลักษณะแผลร้อนใน

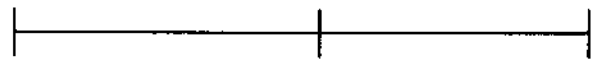
1 หมายถึง มีลักษณะแผลร้อนใน

6. ระดับการเสียวฟัน วัดด้วย Visual analog scale ตั้งแต่ครั้งแรกที่ยังไม่ได้ให้การรักษา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้อาสาสมัครใช้เปรียบเทียบกับครั้งต่อไป ภายหลังจากให้การรักษาอาสาสมัครจะถูกสอบถามถึงอาการเสียวฟันโดยอาสาสมัครจะได้ดูค่าของระดับการเสียวฟันในครั้งก่อนแล้วจึงขีดค่าระดับการเสียวฟันในครั้งถัดมาลงบนกระดาษที่มีเส้นความยาวตั้งแต่ 0 ถึง 10 เซนติเมตร

- เลือกซี่ฟันศึกษาจากฟันซี่ที่มีอาการเสียวฟันมากที่สุด 1 ซี่จากฟัน 4 ซี่ ที่ถูกทดสอบด้วยเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย หากไม่พบอาการเสียวฟันในฟันที่ทดสอบทั้ง 4 ซี่ ตั้งแต่เริ่มต้นทดสอบ จะทำการทดสอบและบันทึกผลจากฟันที่ทดสอบทั้ง 4 ซี่

- วัดระดับการเสียวฟันจากการลากเครื่องมือบนผิวฟัน (tactile method) โดยใช้เอ็กซพลอเรอร์ (explorer) ลากที่เนื้อฟันหรือเคลือบรากฟันใต้รอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน แล้วลากตามผิวฟันจากด้านใกล้กลางมาด้านไกลกลาง แล้วให้อาสาสมัครขีดค่าความเสียวฟันบนกระดาษที่มีความยาว 10 เซนติเมตร

- วัดระดับการเสียวฟันจากการเป่าลมบนผิวฟัน (thermal sensitivity) ภายหลังจากการทดสอบระดับการเสียวฟันจากการลากเครื่องมือประมาณ 2 นาที จึงทดสอบระดับการเสียวฟันจากการเป่าลมโดยใช้ท่อเป่าลม (triple syringe) เป่าลมอุณหภูมิ 21–27 องศาเซลเซียส ลงบนผิวฟันเป็นเวลาประมาณ 1 วินาที โดยให้ปลายท่อเป่าลมห่างจากผิวฟันประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แล้วให้อาสาสมัครขีดค่าความเสียวฟันในฟันที่มีอาการลงบนกระดาษที่มีเส้นความยาว 10 เซนติเมตร



ไม่เสียวฟัน
0 เซนติเมตร

เสียวฟันจนทนไม่ได้
10 เซนติเมตร

7. ติดเชื้อราซ้ำ วัดผลโดยรวมในช่องปาก
0 หมายถึง ไม่มีลักษณะติดเชื้อราในปาก
1 หมายถึง มีลักษณะติดเชื้อราในปาก

8. เกิดผื่นแดงที่แขน หรือที่อื่นๆ
0 หมายถึง ไม่มีผื่นแดงที่แขน หรือที่อื่นๆ
1 หมายถึง มีผื่นแดงที่แขน หรือที่อื่นๆ

5.4 การวัดค่าพารามิเตอร์ทางคลินิก (clinical parameters)

ทำการวัดค่าทางคลินิกตามตารางแสดงค่าทางคลินิกที่วัดในสัปดาห์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ทางคลินิกที่วัดในสัปดาห์ต่างๆ

ค่าทางคลินิก	สัปดาห์ที่-2 ถึง -4	สัปดาห์ที่ 0, 6 และ 12
ความลึกของร่องลึกปริทันต์	ทั้งปาก	เฉพาะตำแหน่ง
ระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์	ทั้งปาก	เฉพาะตำแหน่ง
ค่าดัชนีการเลือดออกของเหงือก	ทั้งปาก	เฉพาะตำแหน่ง
ค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์	-	เฉพาะตำแหน่ง
ค่าดัชนีโรคเหงือกอักเสบ	-	เฉพาะตำแหน่ง

5.4.1 ความลึกของร่องลึกปริทันต์ (probing pocket depth) ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level) โดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) ชนิด PCPUNC 15 ของบริษัท Hu-Friedy (Chicago, USA) และบันทึกค่าเป็นจำนวนเต็ม

5.4.2 ดัชนีการมีเลือดออกของเหงือก (Gingival bleeding index; GBI) ใช้ดัชนีของ Ainamo and Bay (1975) โดยบันทึกค่าดัชนีเป็นค่าลบและบวก

ลบ (Negative) หมายถึง ไม่มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ลากตามร่องลึกปริทันต์ อ่านผลเมื่อเวลาผ่านไป 10 วินาที

บวก (Positive) หมายถึง มีเลือดออกหลังจากใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ลากตามร่องลึกปริทันต์ อ่านผลเมื่อเวลาผ่านไป 10 วินาที

วัดค่าโดยนับจำนวนบริเวณที่มีเลือดออก หารด้วยจำนวนของบริเวณที่วัดทั้งหมด และคูณด้วย 100 เพื่อให้ได้ค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์

5.4.3 ค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์ (Plaque index, PI) ของ Turesky modification of Quigley & Hein โดยมีค่าดัชนีตั้งแต่ 1 ถึง 5 ดังนี้

0 คือ ไม่พบคราบจุลินทรีย์

1 คือ มีคราบจุลินทรีย์เป็นแถบที่ไม่ต่อเนื่องกันที่ขอบเหงือก

2 คือ มีคราบจุลินทรีย์เป็นแถบบางๆต่อเนื่องกันไม่เกิน 1 มม.ที่ขอบเหงือก

3 คือ มีคราบจุลินทรีย์เป็นแถบติดต่อกันกว้างอย่างน้อย 1 มม. แต่คลุมฟันน้อยกว่า 1/3 ของตัวฟัน

4 คือ มีคราบจุลินทรีย์คลุมมากกว่า 1/3 แต่ไม่เกิน 2/3 ของตัวฟัน

5 คือ มีคราบจุลินทรีย์คลุมมากกว่า 2/3 ของตัวฟัน

5.4.4 ค่าดัชนีเหงือกอักเสบ (Gingival inflammation index; GI) ตามดัชนี Loe & Sillness (1963)

0 คือ เหงือกปกติ

1 คือ เหงือกอักเสบเล็กน้อย มีการเปลี่ยนแปลงสีเหงือก เหงือกบวมเล็กน้อย และไม่พบอาการเลือดออกหลังตรวจด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์

2 คือ เหงือกอักเสบปานกลาง เหงือกมีสีแดง บวมและมันวาว พบอาการเลือดออกภายหลังการตรวจด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์

3 คือ เหงือกอักเสบรุนแรง สีเหงือกเป็นสีแดงเห็นได้อย่างชัดเจน เหงือกบวม และพบแผลหลุดลอกของหงือก พบอาการเลือดออกโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์

สัปดาห์ที่ -2 ถึง -4

- วัดสัญญาณมีชีพ
- วัดค่าทางคลินิก ได้แก่ PD, GBI, CAL ทั้งปาก และเก็บข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร
- ให้การรักษาประกอบด้วยการสอนวิธีดูแลอนามัยช่องปากและขูดหินน้ำลายเหนือเหงือกทั้งปากเฉพาะในกรณีที่มีหินน้ำลายเหนือเหงือก โดยใช้เวลาขูดหินน้ำลายเหนือเหงือกทั้งปากไม่เกิน 1 ชั่วโมง

สัปดาห์ที่ 0

- วัดสัญญาณมีชีพ
- ทำการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ตำแหน่งที่เลือกทำการศึกษา
- เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม
- วัดค่าทางคลินิกตามลำดับ ได้แก่ GI, APEI, PD, GBI, CAL จากตำแหน่งที่เลือกทำการศึกษา
- ให้การรักษาอาสาสมัคร
  - กลุ่มทดลอง ให้การรักษาด้วยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันร่วมกับการใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยลงในร่องลึกปริทันต์ให้เต็ม แต่ไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟันหนึ่งซี่
  - กลุ่มควบคุม ให้การรักษาด้วยการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันอย่างเดียว

*การขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันทั้งปากรวมทั้งตำแหน่งฟันที่ศึกษาใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง

สัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4

- วัดสัญญาณมีชีพ
- เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม
- อาสาสมัครได้รับการขัดฟันและในกลุ่มทดลองได้รับการใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยลงในร่องลึกปริทันต์ให้เต็ม ไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตรต่อฟันหนึ่งซี่

สัปดาห์ที่ 6 และ 12

- วัดสัญญาณมีชีพ
- ทำการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์
- เก็บข้อมูลความปลอดภัยทางคลินิกตามแบบสอบถาม
- วัดค่าทางคลินิกตามลำดับ ได้แก่ GI, APEI, PD, GBI และCAL

แผนภูมิแสดงการให้การรักษาและติดตามผลการรักษา

5.5 การวิเคราะห์ความเชื่อถือได้ (reliability analysis) ของค่าพารามิเตอร์ทางคลินิก

การวัดค่าทางคลินิกกระทำโดยผู้ตรวจคนเดียวกันตลอดการศึกษาวิจัย ทำการวิเคราะห์ความเชื่อถือได้ วิธีการทำโดยการวัดค่าทางคลินิกซ้ำ ณ จุดเดิม 2 ครั้ง (เว้นระยะเวลาห่างกันอย่างน้อย 10-15 นาที) ในอาสาสมัครอย่างน้อย 10 คน (คิดเป็นจำนวนร้อยละ 25 ของอาสาสมัครทั้งหมด) ทำการวิเคราะห์ความเชื่อถือได้ของค่าทางคลินิกในสัปดาห์ที่ 0, 6 และ 12 โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ชนิด Spearman correlation ค่าที่วัดซ้ำได้แก่ ค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์ ค่าระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ ค่าดัชนีการมีเลือดออกของเหงือก และค่าดัชนีเหงือกอักเสบ หากมีค่า correlation coefficient ใกล้เคียง 1 แสดงว่ามีความเชื่อถือได้

หมายเหตุ : ค่าที่นำมาใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์นั้น ให้ใช้ค่าที่วัดได้ในครั้งแรก

5.6 การวัดผลทางจุลชีววิทยา

ทำการตรวจเชื้อ *P.gingivalis* โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี real-time polymerized chain reaction (real-time PCR) ดำเนินวิธีการเก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

5.6.1 กั้นบริเวณที่จะเก็บเชื้อให้แห้งด้วยสำลีปลอดเชื้อ

5.6.2 ใช้สำลีปลอดเชื้อเช็ดเพื่อกำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกออกจากซี่ฟันนั้นและเป่าลมเบาๆให้แห้ง

5.6.3 ใช้แท่งกระดาษซับ (paper point) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่เข้าไปในร่องลึกปริทันต์ที่ลึกที่สุดของซี่ฟันที่ศึกษาเพียงตำแหน่งเดียวจำนวน 1 แท่งจนถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในเอพเพนดอร์ฟ (eppendorf) ปราศจากเชื้อ

5.6.4 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ในน้ำกลั่นมาสั่นด้วยเครื่องผสมวอร์เท็กซ์ (Vortex mixer) เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อแยกเชื้อออกจากกระดาษซับ

5.6.5 หากไม่ได้นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ทันที ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างมาเข้าสู่ขบวนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อต่อไป

5.6.6 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้ Instagene DNA purifica matrix ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (extracted DNA) ในปฏิกิริยา real-time PCR

การเลือกสายไพรเมอร์ (primer) สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR อ้างอิงจากการศึกษาของ Maeda และคณะ [40,41] ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับของสายไพรเมอร์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR

Target	PCR primer (5'-3')
P.gingivalis 16S rDNA	5'-cttgacttcaagtggcggcag-3' 5'-agggaagacggttttcacca-3'

ระบบที่ใช้ทำ real-time PCR ใช้เป็นระบบสารเรืองแสงไซเบอร์กรีน วัน (SYBR Green I dye) ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งย่อยๆ (minor groove) ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อไซเบอร์กรีน วัน เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่นที่ยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real-time thermocycler

ทำการผสมดีเอ็นเอแม่แบบ 5 ไมโครลิตรและไพรเมอร์ (ทั้ง forward และ reverse) 20 พิกโคโมล ลงในพีซีอาร์มาสเตอร์มิกซ์ (SYBR Green PCR Master Mix : PE Applied Biosystems) 2 เท่า ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำเข้าเครื่องเทอร์โมไซเคลอโดยเลือกโปรแกรมเทอร์โมไซคลิง (thermocycling program) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 40 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้วงจรเริ่มต้น (initial cycle) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ทำการอ่านค่าที่ได้และบันทึกผล

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบข้อมูลของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใน 3 ช่วงเวลา คือช่วงเริ่มต้นการศึกษาการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อย (สัปดาห์ที่ 0) หลังการรักษาในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 ข้อมูลที่นำมาทำการวิเคราะห์คือค่าพารามิเตอร์ทางคลินิกได้แก่ ค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์ ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ ค่าดัชนีการมีเลือดออกของเหงือก ค่าดัชนีคราบจุลินทรีย์ ค่าดัชนีเหงือกอักเสบรวมทั้งทำการแปลงข้อมูลเหล่านี้เป็นร้อยละการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ทางคลินิก และปริมาณของเชื้อ *P.gingivalis* ค่าความปลอดภัยทางคลินิก วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าที่วัดในแต่ละดัชนีโดยใช้สถิติ Repeated-measures ANOVA ที่ significant level ร้อยละ 0.5

7. เครื่องมือ

7.1 อุปกรณ์ในการวิจัยคลินิก

7.1.1 ชุดตรวจฟันประกอบด้วย กระจกส่องปาก (mouth mirror) ที่คีบสำลี (forceps) เอ็กซพลอเรอร์ EXD 11-12 ของบริษัท Hu-Friedy (Chicago, Illinois,USA) เครื่องมือตรวจปริทันต์หรือโพรบชนิด PCPUNC 15 ของบริษัท Hu-Friedy (Chicago, Illinois. USA)

7.1.2 เครื่องมือขูดหินน้ำลายรูปช้อนแบบเกรซี่ (Gracey curette) หมายเลข 3/4, 7/8, 11/12, 13/14 ของบริษัท Hu-Friedy (Chicago, Illinois. USA)

7.1.3 หัวยางรูปถ้วย กับผงขัดฟัน

อุปกรณ์เก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ ประกอบด้วย

7.1.4 กระดาษรูปกรวยและสำลีที่ปราศจากเชื้อ

7.1.5 เอพเพนดอร์ฟที่ปราศจากเชื้อ

7.1.6 ตะเกียงแอลกอฮอลล์

7.2 อุปกรณ์ในการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

7.2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมสารสกัดจากใบข่อยและอุปกรณ์ในการสกัด ดังที่แสดงไว้ในขั้นตอนการเตรียมและวิธีการเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

7.2.2 สารเคมีสำหรับการผสมสูตรตำรับยาเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยและอุปกรณ์ในการผสม ดังที่แสดงไว้ในขั้นตอนการเตรียมและวิธีการเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย

7.2.3 สารอาหารและอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A.actinomycetemcomitans*

7.2.4 อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบคุณภาพสารสกัดจากใบข่อยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพในสภาวะไร้ออกซิเจน

7.2.5 อุปกรณ์ชุดปฏิบัติการทางเซลล์และอณูชีววิทยา ชุดอุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ จากเชื้อ *P.gingivalis* ประกอบด้วยคอลัมน์สำหรับยึดดีเอ็นเอ และสารเคมีต่าง ๆ

7.2.6 ไมโครปิเปต (micropipette, Gilson Pip-Dil®, France)

7.2.7 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer, Model DV-III, Brookfield Co.,Ltd.,Germany)

7.2.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

7.2.9 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง

7.2.10 ชุดสำเร็จรูปสำหรับการแยกดีเอ็นเอของบริษัทผู้ผลิต

7.2.11 สารตั้งต้นและอุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ของบริษัทผู้ผลิต

7.2.12 เอพเพนดอร์ฟและพีซีอาร์ทิวบ์ (PCR tube) ที่ปราศจากเชื้อ

8. รายละเอียดงบประมาณ

ตารางที่ 5 รายละเอียดงบประมาณของงานวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน	
ก. หมวดค่าจ้างชั่วคราว		
ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย 1 คน วุฒิวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคนิคการแพทย์) เพื่อช่วยในการทดสอบ real-time PCR	10,000	บาท
ข. หมวดค่าวัสดุ ค่าสาร และอุปกรณ์เคมี		
1. สารเคมีสำหรับการเตรียมสารสกัดจากใบข่อย	2,500	บาท
2. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยและตรวจสอบคุณภาพ	30,000	บาท
3. สารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *A.actinomycetemcomitans*	17,000	บาท
4. ยาปฏิชีวนะสำหรับการเลี้ยงเชื้อ	3,000	บาท
5. กระดาษซับคลองราก	5,000	บาท
6. ชุดวัสดุและสารเคมีสำหรับการทำ real-time PCR	100,000	บาท
ค. หมวดค่าเดินทางสำหรับอาสาสมัคร		
ค่าเดินทางสำหรับอาสาสมัคร 8 ครั้ง ครั้งละ 80 บาท จำนวน 40 คน รวม	25,600	บาท
ง. หมวดอื่นๆ		
ค่าถ่ายเอกสาร และวัสดุสำนักงาน	500	บาท
ค่าจัดทำรายงานและตีพิมพ์รูปเล่ม	400	บาท
ค่าอุปกรณ์ใช้ทำความสะอาดช่องปาก ได้แก่ ไหมขัดฟัน แปรงซอกฟัน และแปรงสีฟัน สำหรับอาสาสมัคร จำนวน 40 คน คนละ 150 บาท รวม	6,000	บาท
รวมงบประมาณที่นำเสนอ	200,000	บาท

9. แผนการดำเนินการเกี่ยวกับกิจกรรมและระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย 12 เดือน

ตารางที่ 6 แผนการดำเนินการเกี่ยวกับงานวิจัย

แผนงาน / เดือนที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
การเตรียมเจลสารสกัดจากใบข่อยและตรวจสอบคุณภาพ	←	—	—	—	—	→						
คัดเลือกผู้ป่วย วัดค่าพารามิเตอร์ทางคลินิกและเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์	←	—	—	→								
ดำเนินการวิจัยและเก็บรวบรวมข้อมูล	←	—	—	—	—	—	—	→				
การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย									←	—	→	
เขียนรายงานการวิจัย											←	— →