Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem

ลักษณะจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์ภายหลังการตาย

บทคัดย่อ

การประมาณระยะเวลาหลังการตายเป็นสิ่งที่สำคัญทางนิติเวช และจนถึงขณะนี้ยังไม่เป็นที่รู้กันมากนักในการนำประโยชน์ของโพรงฟันมาใช้ในการนี้ ฟันเป็นอวัยวะที่แข็งที่สุดในร่างกายมนุษย์ โดยมีเนื่อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่กันอย่างหลวม ๆ อยู่ภายในบรรจุในสิ่งห่อหุ้มแข็ง และมีแร่ธาตุในเนื้อเยื่อรอบ ๆ โดยศึกษาจาก 31 ศพมนุษย์ที่ตายโดยอุบัติเหตุทางรถยนต์และรถไฟ และต้องมีสุขภาพช่องปากที่แข็งแรง ตัวอย่างได้ถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ขณะที่ทำการผ่าศพพิสูจน์ ได้ตัดกรามออกมาเพื่อทำการทดลองแบบ in situ โดยจะถอนฟันออกมาทุกวันวันละซี่ ภายหลังการลดปริมาณแคลเซียมในฟัน (decalcification)แล้ว ทำการตัดขวางเป็นแผ่นบาง ๆ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินแอนด์อีโอซิน (Hematoxylin and eosin : H&E) จากนั้นนับปริมาณโอดอนโตบลาสต์และทำการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณโอดอนโตบลาสต์จะลดลงเรื่อย ๆ ภายหลังการตายจนไม่หลงเหลือในโพรงฟันอีกเลยภายหลังการตาย 5 วัน

1. บทนำ

การประมาณระยะเวลาหลังการตายเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในการสืบสวนคดีอาชญากรรม ซึ่งการหาระยะเวลาหลังการตายที่แน่นอนก็ยังพบปัญหาและอุปสรรคอยู่เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่รบกวนการหาเวลาที่แน่นอนได้

วิธีที่ใช้ในการประมาณระยะเวลาหลังการตายในระยะต้น ๆ (early stage) คือในหนึ่งถึงสองวันแรก จะใช้หลาย ๆ วิธี คือ อุณหภูมิร่างกาย การแข็งตัวของกล้ามเนื้อภายหลังการตาย ปฏิกิริยาทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อ เศษอาหารที่หลงเหลือในกระเพาะอาหาร การเปลี่ยนแปลงของจอตา ปฏิกิริยาของม่านตาต่อยา สภาวะทางเคมีของสารน้ำในร่างกายเช่นเลือด ของเหลวในเยื้อหุ้มหัวใน น้ำไขสันหลัง (1)

ภายหลังการหยุดปฏิกิริยาชีวิต ภาวะขาดเลือด(ischemia)จะทำให้เกิดการขาดออกซิเจน(hypoxia) ซึ่งจะไปรบกวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนของเซลล์ ภาวะขาดออกซิเจนทำให้เกิดการเข้าสู่ภาวะการตายแบบไม่สามารถคืนสภาพได้ (point of no return) เข้าสูภาวะการตายอย่างถาวรและเซลล์ตายในที่สุด ลักษณะสำคัญสองประการของการตายแบบถาวรคือ 1) โมโตคอนเดรียสูญเสียสภาพ (ไม่มีปฏิกิริยา oxidative phosphorelation และ หยุดการสร้าง ATP) 2) มีการรบกวนการทำงานของผนังเซลล์อย่างรุนแรง การบาดเจ็บของผนังไลโซโซมส่งผลให้เกิดการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่าเนื้อตาย (necrosis)ขึ้น สิ่งที่กำหนดว่าการบาดเจ็บนั้นเป็นการบาดเจ็บแบบถาวรและนำไปสู่ขั้นตอนการตายของเซลล์นั้นยังไม่เป็นที่เข้าในอย่างชัดแจ้ง (2)

ฟันเป็นอวัยวะที่แข็งที่สุดในร่างกายมนุษย์ ประกอบไปด้วยฟันและเนื้อเยื่อรอบ ๆ ฟัน โพรงฟันเป็นที่ซึ่งมีเนื้อเยื้อเกี่ยวพันอยู่กันอย่างหลวม ๆ บรรจุในเนื้อฟันที่มีแร่ธาตุและห่อหุ้มด้วยเปลือกแข็งของเคลือบฟันด้านบน (crown)และด้านรากฟัน(cement)

ในทางฮีสโทโลยี ใต้เนื้อฟันจะมีชั้นของโอดอนโตบลาสต์เรียงตัวกันอยู่นอกสุดของโพรงฟัน ถัดไปด้านในเป็นส่วนของ cell-free zone , cell-rich zone และแกนโพรงฟัน (3)

โอดอนโตบลาสต์จัดเป็นเซลล์ที่คงตัวภายหลังการแบ่งตัวแบบไมโตซิสทันทีที่มีการ differentiate แบบสมบูรณ์แล้ว และดูเหมือนจะไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป เป็นตัวเริ่มกระบวนการสร้างเนื้อฟัน (dentinogenesis)ทั้ง

ในระยะการพัฒนาของฟัน และระยะฟันที่เต็มวัยแล้ว และเป็นลักษณะที่จำเพาะอย่างมากของ dental-pulp complex โดยจะมีการสร้าง matrix ที่ประกอบไปด้วยคอลลาเจนไฟบริล โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน และ โปรทีโอกลัยแคนที่สามารถให้แร่ธาตุผ่านได้ ลักษณะโครงสร้างของโอดอนโตบลาสต์จะมี highly ordered RER, กอลจิคอมเพล็กซ์ที่เด่นชัด , secretory granules และปริมาณไมโตคอนเดรียจำนวนมาก นอกจากนั้นยังพบ RNA ในปริมาณมาก ในนิวเคลียสยังมีนิวคลีโอไลหนึ่งหรือมากกว่านั้น ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของเซลล์ที่มีการหลั่งโปรตีน (Protein secreting cell) ในทางกลับกันกับโอดอนโตบลาสต์ที่แอคทีฟ (active odontoblast) ในภาวะพักหรือ inactive odontoblast จะมีการลดจำนวนออร์แกเนล ในระยะการสร้างเนื้อฟัน(dentinogenesis) โอดอนโตบลาสต์จะสร้าง dentinal tubules และทำให้เนื้อฟันเป็นเนื้อเยื้อที่มีชีวิต (living responsive tissue)(4)

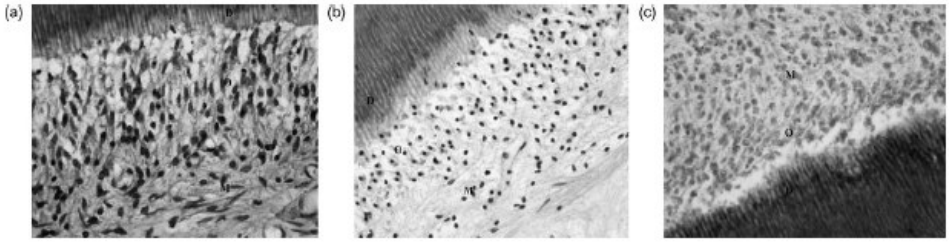

Fig. 1. The layer of odontoblasts in human dental pulp 7 h (a), 55 h (b) and 103 h (c) after death at room temperature. D; dentin, O; layer of odontoblasts, M; middle part of the dental pulp. Hematoxylin and eosin, 40×.

และเนื่องจากในโพรงฟันมีเซลล์ค่อนข้างบางเบา ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในขณะขั้นตอนการสร้างเนื้อฟัน metabolic activity จะสูงกว่าภายหลังจากการพัฒนา crown เรียบร้อยแล้ว และจะพบ metabolic activity สูงที่สุดในส่วนของชั้น odontoblast layer และพบ metabolic activity ต่ำสุดในส่วนกลางของโพรงฟัน ซึ่งเป็นที่อยู่ของเส้นประสาทและเส้นเลือดทั้งหมดที่มาเลี้ยงตัวฟัน Yu และคณะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในโอดอนโตบลาสต์ใน lower incisor pulp ของหนูจะอยู่ในอัตรา 3.2±0.2 ml/นาที/100กรัมของน้ำหนักเนื้อเยื่อโพรงฟัน(5) นอกเหนือไปจาก glycolytic pathway โพรงฟันจะสามารถสร้างพลังงานได้โดยผ่านทาง phosphogluconate (เช่น pentose phosphate) shunt ซึ่งเป็น carbohydrate metabolism ชนิดหนึ่ง (6) ซึ่งบ่งบอกว่าโพรงฟันอาจจะสามารถทำงานภายใต้การเปลี่ยนแปลงภาวการณ์ขาดเลือดในระดับต่าง ๆ ได้

เป็นที่รู้จักกันไม่มากในการนำโพรงฟันมาใช้เป็นเนื้อเยื่อสำหรับประมาณระยะเวลาหลังการตาย Duffy และคณะ (7) ได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการเน่าเปื่อยของโพรงฟันในสภาพอากาศของฝั่งตะวันตกเฉียงเหนือของแคนาดาในการสกัดฟันจากมนุษย์และหมู in situ เซลล์ในโพรงฟันได้ถูกเก็บรักษาไว้ 96-336 ชั่วโมง หรือ4-14 วัน ตามสภาพสิ่งแวดล้อม และทำ flow cytometric evaluation ของการย่อยสลายของ DNA ของโพรงฟันแสดงให้เห็นปริมาณ DNA น้อยที่สุดที่ย่อยสลายในเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ 144 ชั่วโมงภายหลังการผ่าตัดนำฟัน third molar ของมนุษย์ออกมา ดังนั้นเนื้อเยื่อในโพรงฟันจึงไม่น่าเชื่อถือในการนำมาประเมินระยะเวลาการตายในระยะ early stage จากนั้นนำมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ที่ 144 ชั่วโมงภายหลังการตัดฟันออกมาไม่ได้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะแบบ autolysis (8) จากการศึกษาของ Caviedes-Bucheli และคณะ (9) แสดงให้เห็นว่า เนื้อเยื่อโพรงฟัน 41%ยังคงมีชีวิตใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการตาย

ขณะนี้ก็ยังมีไม่มากที่บันทึกไว้เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโพรงฟันภายหลังการตายที่ทำการศึกษาแบบ in situ ใน alveolar bone (jaw) และเมื่อคำนึงถึงว่า โอดอนโตบลาสต์เป็นเซลล์ที่มี differentiate สูง ซึ่งมักจะไวต่อปริมาณออกซิเจน และจำเพาะกับโพรงฟัน และข้อเสนอแนะของ Fisher and Walters (6) ว่าโพรง

ฟันอาจจะสามารถทำหน้าที่ได้ในสภาวะขาดออกซิเจนในระดับต่างๆ คณะผู้วิจัยตัดสินใจที่จะวิเคราะห์ลักษณะจำเพาะพื้นฐานของจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันภายหลังการตาย

งานวิจัยนี้จะเน้นเรื่องพลวัตการเปลี่ยนแปลงจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในโพรงฟันมนุษย์ in situ โดยเป็นตัวแปรตามของระยะเวลา จุดประสงค์เพื่อตรวจสอบและยืนยันลักษณะเฉพาะของกระบวนการนี้ จำนวนเคสของชุดข้อมูลนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์แบบ simple แต่มันค่อนข้างต่ำเกินไปในการสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวัดทางสถิติ

2. วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้ได้ดำเนินการตามความต้องการ ของ Institute of Forensic Medicine at the University of Ljubljana medical faculty เกี่ยวกับการจัดการและดำเนินการทดลองงานวิจัยต่ออวัยวะหรือเนื้อเยื่อจากร่างกายผู้ตาย และด้วยความเห็นชอบของ The National Medical ethics Committee of the Republic of Slovenia, No.114/12/03

วัสดุได้จากศพ 32 ราย ที่มีอายุระหว่าง 18-40 ปี ตายด้วยอาการบาดเจ็บส่วนใหญ่จากอุบัติเหตุทางรถยนต์และรถไฟ โดยที่ส่วนศีรษะถูกทำให้เสียหายเกินยอมรับ หากมีฟันผุไม่ควรลึกเกิน 3 มม. เพื่อจะได้ไม่ต้องนำมาคำนวณ ระหว่างทำดำเนินการผ่าศพ จะตัดส่วนกรามออกมาและเก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่เปิดไว้ ให้มีอากาศเข้าได้เพื่อเป็นการจำลองอาการของศพที่มักจะมีลักษณะอ้าปากเล็กน้อย ทุก ๆ วันจะถอนฟันออกมา (sample) โดยเริ่มจากฟันรากเดี่ยวคือ Canine โดยเร็วที่สุดเมื่อศพมาถึง Institute of Forensic Medicine จากนั้นต่อด้วยฟันซี่ premolar ทุก ๆ 24 ชั่วโมงหลังจากฟันซี่แรกได้ถูกถอนออกไป แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่ม : 15 รายที่อุณหภูมิห้อง (23ºC) และ 17 รายที่อุณหภูมิแช่เย็น (4ºC)

2.1 Control

เพื่อเหตุผลทางด้าน orthodontic จะใช้ฟันPremolar ซี่แรกจาก intact mandible จากวัยรุ่นที่ถอนโดยการฉีดยาชาเฉพาะที่ (Ultracain D-S forte, 2 ml ampoule, Hoechst AG) และใช้เป็นคอนโทรล ตัวอย่างได้ถูกเตรียมสำหรับการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ระยะเวลาหลังจากการใช้ยาชา จนถึงขั้นตอนการ fixative ใช้เวลา 5 นาที

2.2 Light microscopy

หลังจากการถอนฟันออกมาแล้ว จะทำการสกัด ¾ ของรากด้วยสิ่วเพื่อให้น้ำยา 10% neutral buffered formalin ได้ทำการ fix เนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิห้อง หลังจากทำการ decalcification และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการทางศัลยพยาธิแล้วจะทำการตัดsection ให้มีความหนา 4 ไมโครเมตร ตามยาวให้ผ่านกึ่งกลางซี่ฟัน ตรงกลางฟันที่ถูกถือว่าเป็นส่วนของ dentinal tubule จะให้ลักษณะ s-shaped coarse section ส่วนที่ดีที่สุดจะนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin และดูด้วยกำลังขยาย 10x และ 40x ด้วยกล้อง Nikon Eclipse E600 ถ่ายรูปด้วย CCD-1300 CD device camera เซลล์ในโอดอนโตบลาสต์จะถูกสังเกตรูปร่าง นับและวิเคราะห์

ด้วยวิธีการนับด้วยการส่องกล้อง ในแต่ละตัวอย่างจะนับ 10 วงกล้องในส่วน coronal part ของโพรงฟันด้วยกำลังขยาย 40x หลังจากถ่ายรูปด้วยกล้องแล้ว (รูปที่ 1 และ 2) จะประเมินเนื้อที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนับโอดอนโทบลาสต์ที่มี nuclei ครบถ้วน มีcondense chromatin หรือ pyknotic จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ยสัมบูรณ์ (average absolute) (หรือ ปริมาณโอดอนโตบลาสต์ต่อตารางไมโครเมตรจากนั้นแปลงเป็นต่อ

ตารางมิลลิเมตร) ของความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง และเพื่อวินิจฉัย necrosis ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะต้องปล่อยให้เวลาผ่านพ้นไป แม้จะมากกว่า 12 ชม. (10)

3. ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์

โดยการนับจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างที่นำมาใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการตาย คณะผู้วิจัยได้ประมาณค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของโอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรในฟันที่มีชีวิตของผู้ใหญ่คอเคเชี่ยนอายุ 18-40 ปี ผลที่ได้คือ 11,764 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรในค่าเฉลี่ยของทุกเคส ซึ่งสอดคล้องกับค่าประมาณ 11,000 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรหลังจากการเตรียมตามวิธีของ Murray et al. (11) และในการศึกษาอื่นรายงานว่า 350 โอดอนโตบลาสต์ต่อ ความยาว 1 มม.ของ pulp dentin border (12) การศึกษาเพื่อการหาความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ได้ถูกจัดทำขึ้นในหนู Wistar หลาย ๆ ช่วงอายุ (13) และลิง Rhesus Macaca อายุระหว่าง 4-5 ปี(14)

3.2 Linear regression model for absolute values of density of odontoblasts

โมเดลการถดถอยเชิงเส้นสำหรับค่าความหนาแน่นสมบูรณ์ของโอดอนโตบลาสต์ หลังจากประเมินความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง คณะผู้วิจัยได้คำนวณค่าพารามิเตอร์ของโมเดลสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression model) สำหรับการประเมินระยะเวลาหลังการตาย (ตาราง 1)

Table 1
Parameters of the linear regression model for estimating the time since death according to the density of odontoblasts per μm^2.

Group	Room temperature	Refrigerated temperature
OD' mean	0.01225	0.01139
OD' S.D.	0.00264	0.00267
Adjusted R^2	0.844	0.759
F-test (P value)	130.388 (0.000)	120.559 (0.000)
a (t-test, P value)	0.00990 (8.563, 0.000)	0.01056 (9.121, 0.000)
b_t (t-test, P value)	−0.00013 (−15.742, 0.000)	−0.00012 (−15.486, 0.000)
$b_{OD'}$ (t-test, P value)	0.34372 (4.023, 0.000)	0.19931 (2.127, 0.037)

ตาราง 1

คณะผู้วิจัยใช้สมการ linear regression model ดังนี้

$$OD_s = a + \beta_{OD'} OD'_c + \beta_t t_s + u_s \qquad (1)$$

ซึ่ง OD_s เป็นค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่าง s OD'_c เป็นค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส cและt_s เป็นจำนวนชั่วโมงที่ล่วงเลยไปนับตั้งแต่การตายจนกระทั่งนำตัวอย่างฟันมาจากศพ α, $\beta_{OD'}$ และ β_t แทนค่าพารามิเตอร์ของ regression model โดย α เป็นค่า intercept $\beta_{OD'}$ เป็นค่า regression coefficient ของค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง β_t เป็นค่า regression coefficient ซึ่งเป็นค่าผันแปรของความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ตามเวลาที่ผ่านไปหลังการตาย

ค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่าง (OD_s) เป็นตัวแปรตาม คณะผู้วิจัยใช้เวลา t_s ค่าโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส (OD'_c) เป็นตัวแปรต้น แต่ละตัวอย่างจะมีลักษณะเฉพาะของตัวเอง รวมทั้งความหนาแน่นหรือปริมาณของโอดอนโตบลาสต์ในตลอดระยะเวลาการมีชีวิต u_s เป็น disturbance term ซึ่งเป็นตัวแทนความแตกต่างระหว่าง regression model และความเป็นลักษณะเฉพาะบุคคลในแต่ละตัวอย่าง (OD_s)

ค่า regression coefficient แสดงความไม่เป็นอิสระของตัวแปรตาม (ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในกรณีนี้) และตัวแปรต้น (ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส และเวลาที่ผ่านไปภายหลังการตายแล้วเก็บตัวอย่างมา) สมการที่ 1 (Eq1) ดังนั้นสภาวะที่ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง s จึงขึ้นอยู่กับค่าเฉลี่ยของจำนวนโอดอนโตบลาสต์ในเวลาตาย (intercept α) ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส c (OD'_c) เวลาที่ผ่านไปหลังการตายจนกระทั่งนำตัวอย่างมาจากศพ (t_s) และค่า stochastic disturbance (u_s) ซึ่งเป็นอิสระจากตัวแปรอื่น ๆ

การวิเคราะห์ regression analysis ทดลองเพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ (regression coefficients) ของ regression model ตามที่ linear regression model (1) คณะผู้ทดลองใช้สมการที่ 2 (Eq2) เพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ของโมเดล

$$\bar{OD}_s = a + b_{OD'} OD'_c + b_t t_s \qquad (2)$$

โดยที่OD_s เป็นค่าประมาณความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่าง s และเนื่องจากเป็นค่าประมาณไม่ใช่เป็นค่าที่ได้จากการวัดที่แท้จริง ดังนั้นจึงไม่ต้องมี disturbance term (u_s) ในสมการ 2 คณะผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนสัญลักษณ์ในสมการจาก α และ β เป็น a และ b ตามลำดับ เพื่อแสดงความจริงที่ว่าค่านี้เป็นค่าประเมินไม่ใช่ค่าที่เป็นจริงเหมือนกับค่าในสมการที่ 1

จาก model แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยลดลง 130 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 120 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่สภาวะอุณหภูมิตู้เย็น และโดยการเปรียบเทียบค่า $b_{OD'}$ ของทั้งสองกลุ่ม สามารถสรุปได้ว่า ลักษณะเฉพาะตัวของบุคคลจะแสดงให้เห็นเด่นชัดมากกว่าในกลุ่มอุณหภูมิห้อง

เพื่อดูว่า regression coefficient ของทั้งสองกลุ่มเพื่อระยะเวลาหลังการตายจะเกี่ยวหรือไม่กับอุณหภูมิ คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานดังนี้ H_0 : $\beta_{tRoom}=\beta_{tRefridge}$ ค่า *t*-test แสดงให้เห็นว่าเราไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานนี้ได้ (*t*= -t.0937, *P*=0.276)

หลังจากได้ประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) สำหรับ regression model (2) มันค่อนข้างง่ายในการคำนวณเวลาเฉลี่ยของการคงอยู่ของโอดอนโตบลาสต์ภายหลังการตาย หลังจากเวลาได้ผ่านไป ค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ OD เป็น ศูนย์ เวลาเฉลี่ยของกลุ่มประชากรที่ได้จากการสังเกตสามารถคำนวณได้โดยตรงจากรูป 3 และ 4 เป็นเวลาที่ regression curve ตัดแกน x ของทั้งสองกราฟ

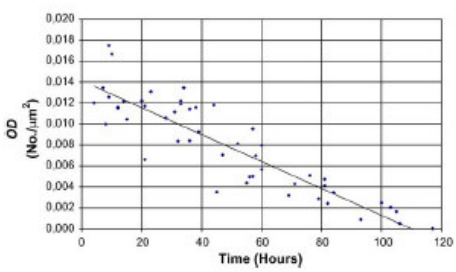

Fig. 3. Density of odontoblasts vs. time of death for cases at room temperature.

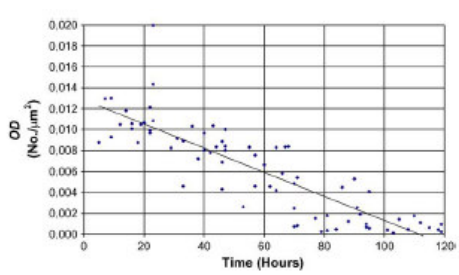

Fig. 4. Density of odontoblasts vs. time of death for cases at 4 °C.

(ตรรกะเดียวกันสำหรับการทดสอบที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°C ณ จุดบนกราฟ ค่าความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ OD เป็น ศูนย์ ดังนั้นจาก regression model (2) ซึ่ง $\bar{OD}_s = a + b_{OD'} OD'_c + b_t t_s$ เราจะได้

$$0 = a + b_{OD'} OD'_c + b_t t_s$$

เนื่องจากใช้การคำนวณระยะเวลาการคงอยู่ของโอดอนโตบลาสต์เป็นค่าเฉลี่ย (สำหรับทุกเคสและทุกตัวอย่าง) แทนที่จะใช้ความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส c (OD'_c) ดังนั้นจึงควรใช้ค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกacrossกับทุกเคส (OD') :

$$0 = a + b_{OD'}\bar{OD'} + b_t\bar{t}$$

ในลักษณะนี้เราจะไม่ได้เวลาสำหรับแต่ละตัวอย่าง t_s แต่ได้ค่าเฉลี่ยของเวลาของการคงอยู่ของโอดอนโตบลาสต์หลังการตาย t, ดังนั้นเราจึงนำสมการข้างต้นมาเรียงใหม่เป็น $-b_t\bar{t} = a + b_{OD'}\bar{OD'}$ จากนั้นจะได้สูตรนี้

$$\bar{t} = \frac{a + b_{OD'}\bar{OD'}}{-b_t} \qquad (3)$$

จากสมการ 3 จะสามารถคำนวณค่าความคงอยู่ของโอดอนโตบลาสต์ด้วยค่า 95% confidence interval (ช่วงความเชื่อมั่น) ซึ่งได้เป็น 110.03±14.12 ชั่วโมง หรือ 4.58±0.59 วันที่อุณหภูมิห้อง และ 111.53±9.35 ชั่วโมง หรือ 4.64±0.38 วันที่ 4°C (รูปที่ 3 และ 4)

3.3 Linear regression model for relative values of odontoblast density

ความเป็นไปได้อื่น ๆ ในการคำนวณลักษณะเฉพาะบุคคลสำหรับแต่ละเคส เพื่อนำมาคำนวณความสัมพันธ์ของความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละตัวอย่าง(ความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ของแต่ละคนต่อความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ในฟันที่นำมาเป็นตัวอย่างซี่แรกของคน ๆ นั้น) จาก linear regression model (1) คณะผู้วิจัยได้ รวมในโมเดลที่เป็นค่า absolute value ของความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคส (OD'_c) เพื่อคำนวณลักษณะ characteristic ของแต่ละเคส ซึ่งความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ในแต่ละเคสจะมีความสัมพันธ์กับตัวอย่างแรกของแต่ละเคส

Linear regression model และค่า absolute value ของความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ จะนำไปสู่ข้อควรพิจารณาที่ว่าลักษณะ personal characteristics ของแต่ละเคส เป็นตัวแปรอิสระที่เพิ่มขึ้นมา linear regression model ได้ทำการปรับค่านี้ให้สามารถตัดลักษณะ personal characteristic ออกไปจากการคำนวณได้ คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยน linear regression model เป็นดังนี้

$$ODR_s = a + \beta_t t_s + u_s \qquad (4)$$

โดยที่ ODR_s เป็นค่าของ relative density of odontoblasts คณะผู้วิจัยแยกความหนาแน่นโอดอนโตบลาสต์ในตัวอย่างแรกของแต่ละเคสออกไปจากโมเดลนี้

Table 2
Parameters of the linear regression model for estimating the time since death according to relative density of odontoblasts per μm².

Group	Room temperature	Refrigerated temperature
Adjusted R^2	0.884	0.792
F-test (*P* value)	365.223 (0.000)	289.583 (0.000)
a (*t*-test, *P* value)	1.14462 (37.292, 0.000)	1.14500 (27.758, 0.000)
b_t (*t*-test, *P* value)	−0.01025 (−19.111, 0.000)	−0.01015 (−17.017, 0.000)

จาก table 2 ผลการวิเคราะห์แดสงให้เห็นความสัมพันธ์ของเวลาและการลดลงของโอดอนโตบลาสต์ภายหลังการตายด้วยค่า 1.025% ต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 1.015% ที่อุณหภูมิตู้เย็น

ตาม regression model ที่คณะผู้วิจัยได้ประมาณค่า absolute density ของโอดอนโตบลาสต์ คณะผู้วิจัยได้ทดสอบสมมติฐาน $H_0 : B_{tRoom} = B_{tRefrig}$ สำหรับ relative density of odontoblast จุดประสงค์ของการทดสอบสมมติฐานเพื่อหาค่า regression coefficient แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาหลังการตายจะมีผลมากกว่าอุณหภูมิ ค่า *t*-test แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถ reject สมมติฐานนี้ได้ (t = -0.1071, P = 0.915)

4. สรุป

ค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของโอดอนโตบลาสต์ในฟันที่แข็งแรงดีของมนุษย์เชื้อสายคอเคเซี่ยนวัยผู้ใหญ่ที่มีอายุระหว่าง 18-40 ปี มีค่าสัมพันธ์และสนับสนุนกับงานวิจัยของ Murray et al (11)

ค่าการลดลงเฉลี่ยของความหนาแน่นของโอดอนโตบลาสต์คือ130โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 120 โอดอนโตบลาสต์ต่อตารางมิลลิเมตร ต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิตู้เย็น เปรียบเทียบความผันแปรของค่า β_{OD}' ของทั้งสองกลุ่มนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่าลักษณะ personal characteristic จะแสดงชัดเจนกว่าในกลุ่มอุณหภูมิห้อง ค่า *t*-test สำหรับสมมติฐาน $H_0 : B_{tRoom} = B_{tRefrig}$ สำหรับค่า absolute density of odontoblast แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาหลังการตายจะมีผลมากกว่าอุณหภูมิ เราไม่สามารถ reject สมมติฐานได้

การประมาณระยะเวลาการคงอยู่ (หรืออายุขัย)ของโอดอนโตบลาสต์ด้วยค่า confidence interval 95% เป็น 110.03±14.12 ชั่วโมง หรือ 4.58±0.59 วันที่อุณหภูมิห้อง และ 111.53±9.35 ชั่วโมงหรือ 4.64±0.38 วันที่ 4ºC จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่ำไม่ได้ทำให้มีการสลายตัวของโอดอนโตบลาสต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ค่า relative density of odontoblast ภายหลังการตายจะมีค่าลดลงโดยเฉลี่ย 1.025% ต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 1.015% ที่อุณหภูมิตู้เย็น

คณะผู้วิจัยสรุปว่า บนพื้นฐานของการเก็บข้อมูลและผลจากการวิเคราะห์ จำนวนโอดอนโตบลาสต์และลักษณะแสดงทาง histological อาจจะสามารถนำมาร่วมใช้ในการประมาณระยะเวลาหลังการตายในระยะแรกเริ่มจนถึง 5 วันหลังการตายได้ และเพื่อการประมาณที่มีช่วงค่าความเชื่อมั่นที่สูงขึ้นควรมีการทดลองในจำนวนเคสที่มากขึ้น นอกจากนั้นการวิจัยเรื่องโอดอนโตบลาสต์เสื่อมสลายได้อย่างไร รวมทั้งกลไกการเกิดการเสื่อมสลายยังสามารถเป็นประเด็นในการวิจัยครั้งต่อไปอีกด้วย