บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา

กลุ่มตัวอย่าง

ประชากรและตัวอย่างประชากร (Target Population and Sample Population)

ประชากร (Target Population) เส้นประสาทซูรัลของคนไทย

ตัวอย่างประชากร (Sample Population) เส้นประสาทซูรัลจากผู้อุทิศร่างกายเพื่อการศึกษาแพทย์และจากนิติเวช

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างประชากรเข้าศึกษาคือ

1. มาจากผู้ที่เสียชีวิตแล้วภายใน 24 ชั่วโมง
2. มีอายุอยู่ระหว่าง 15-60 ปี
3. ไม่มีประวัติเป็นโรคที่เกิดความผิดปกติของเส้นประสาท เช่น โรคเบาหวาน โรคพิษสุราเรื้อรัง
4. ไม่มีประวัติได้รับยาที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเส้นประสาท เช่น ยาต้านมะเร็ง
5. ชิ้นเนื้อเส้นประสาทที่ผ่านขบวนการตัดเนื้อเยื่อแล้ว ต้องได้รับการตรวจสอบเบื้องต้นแล้วว่าไม่มีความผิดปกติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก่อนที่จะทำการวัดเชิงโครงสร้าง

การกำหนดกลุ่มประชากรตัวอย่าง

คำนวณประชากรตัวอย่างจากสูตร $n = Z^2_{\alpha/2}\,\delta^2/\Delta^2$

กำหนดให้ความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูลที่ 95 %

$Z_{\alpha/2}$ = 1.96 (α =0.05)

Δ^2 = acceptable error ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของค่าเฉลี่ย

δ^2 = ความแปรปรวน (variance)

(ค่า จาก pilot study)

แทนค่าในสูตร $n = (1.96)^2(2.845)^2 / (0.6315)^2$

$n = 78$ เส้น

วิธีการเลือกกลุ่มประชากรตัวอย่าง

เลือกโดยความจงใจ (Purposive Sampling) โดยใช้เส้นประสาทซูรัลทุกเส้นเข้ามาศึกษาวิจัยตามเกณฑ์การคัดเลือกที่กล่าวมาข้างต้น

ขั้นตอนการวิธีดำเนินการวิจัย

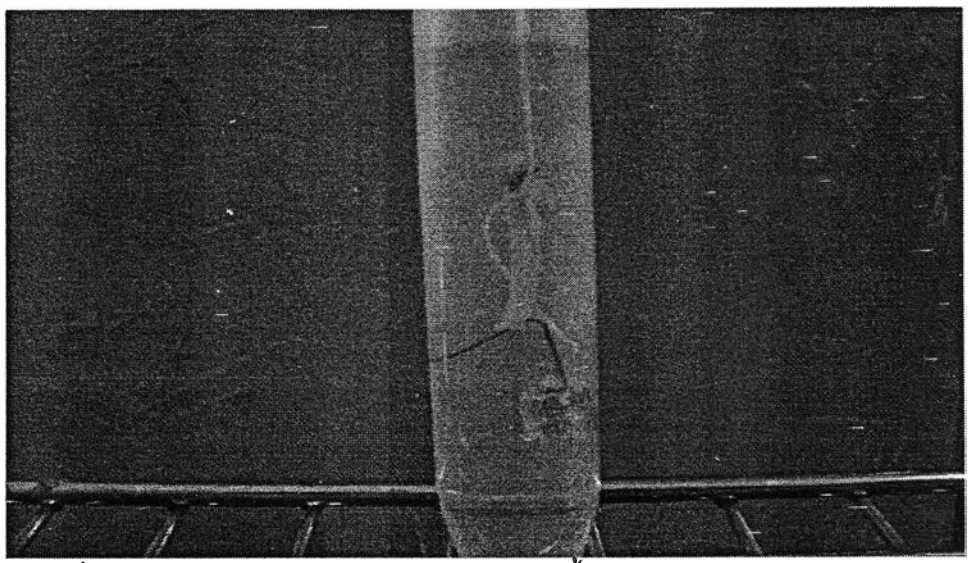
ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักคือ

1. **การเก็บตัวอย่างเส้นประสาทซูรัล** (nerve necropsy)

1.1 เส้นประสาทซูรัล วางตัวอยู่ระหว่าง บริเวณข้อตาตุ่มเท้าด้านนอกและเอ็นร้อยหวาย ดังนั้นเราจะเก็บจากบริเวณข้อเท้าใกล้ตาตุ่ม ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยเปิดผ่าบริเวณใกล้กับจุดที่กำหนดจะมีส่วนของเส้นเลือด ไขมันปะปนอยู่อย่างหนาแน่นรวมทั้งเส้นเอ็นด้วย ให้ใช้อุปกรณ์ดังรูปที่ 6 เปิดตามยาวขนานกับข้อตาตุ่มและ ควาญหาส่วนของเส้นเลือดให้พบก่อนจะพบว่ามีสีดำของเลือดที่เสียแล้วคั่งอยู่ภายในเส้น อย่าทำเส้นเลือดแตกให้ให้ปากคีบและคีมหนีบเส้นเลือดค่อยๆ แยกไขมันออกจะเห็นเส้นประสาทมีสีขาวขุ่นอยู่ใกล้กับบริเวณดังกล่าว อย่าออกแรงดึงเนื่องจาก ส่วนของ myelin ในเส้นใยประสาทมีลักษณะเป็นสารกึ่งของเหลวที่ผสมระหว่างไขมันและโปรตีน ซึ่งจะไม่ทนต่อการยืดดึง จะก่อให้เกิดความเสียหายได้ ดังนั้นต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก ในการเอาเส้นประสาทออก ซึ่งสามารถทำได้คือผูกตัวเส้นประสาทที่มีส่วนของ epineurium คลุมอยู่ในด้านที่ใกล้ต้นขาและเลาะจนได้ขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรจึงใช้กรรไกรตัดออก

รูปที่ 6 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บเส้นประสาทเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

1.2 เมื่อได้เส้นประสาทซูรัลมาแล้วจะต้องถ่วงตุ้มน้ำหนักที่มีน้ำหนักเหมาะสม เพื่อให้เส้นประสาทยืดตรง แล้วถึงจะ ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกขนาดยาว 6 นิ้ว เพื่อให้น้ำยาท่วมเส้นประสาททั้งเส้นที่ตัดมา แช่ใน 2.5 % Glutaraldehyde ที่เย็น 12 นาที ตามขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งพบว่าเส้นประสาทจะมีสีครีมเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม

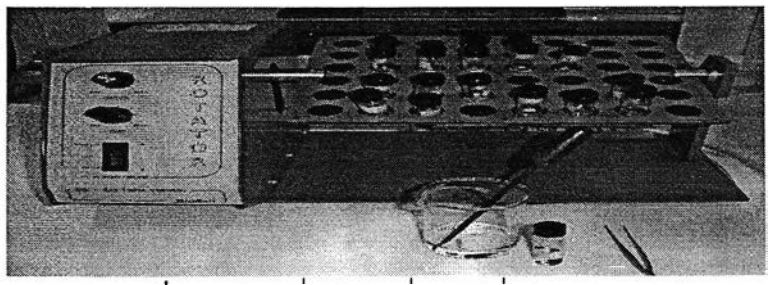


รูปที่ 7 แสดงการตรึงเส้นประสาทซูรัลทันทีด้วยน้ำยา 2.5 % Glutaraldehyde

1.3 เมื่อครบเวลาแล้วก็จะเอาตุ้มน้ำหนักออกแล้วนำมาตัดออกเป็นท่อนๆ ท่อนละ 2-3 มิลลิเมตร แช่ใน 2.5 % Glutaraldehyde ต่อไป นาน 12-24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นให้นำเส้นประสาทไปแช่ใน 0.1M Phosphate Buffer 7.4 แล้วใส่ตู้เย็นจะสามารถคงสภาพได้ดีหลายสัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างให้ครบหรือมากกว่าจำนวนที่เรากำหนดกลุ่มประชากรตัวอย่าง

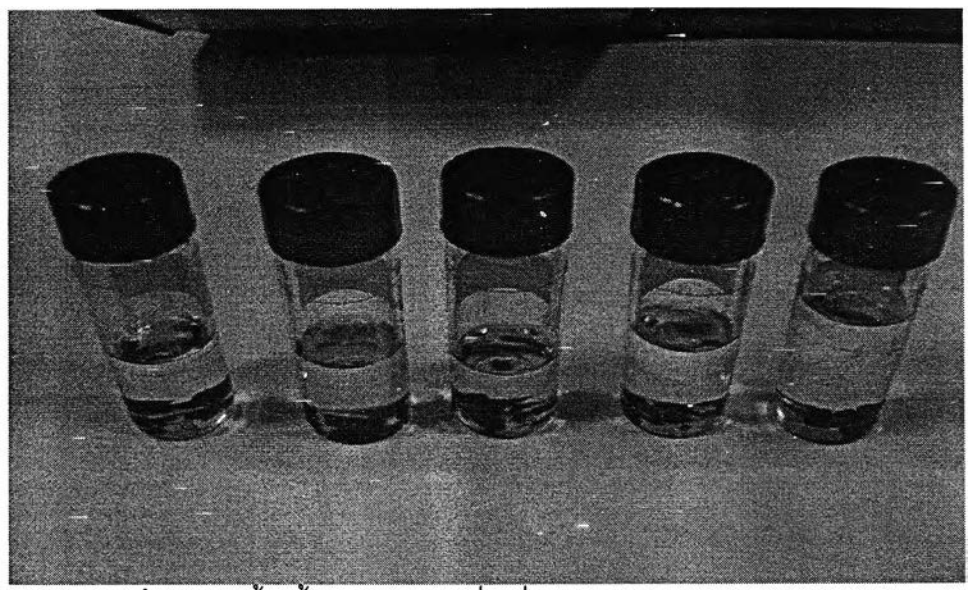
2. การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อเส้นประสาท

2.1 นำเส้นประสาทตัวอย่างซูรัล ที่เก็บสะสมอยู่ใน 2.5% Glutaraldehyde 4^{o}C ในตู้เย็นออกมาทำตามขั้นตอนของโปโตคอลคือล้างด้วย 0.1 M Cacodylate Buffer pH 7.4 (3 ครั้ง ครั้งละ 10 mins) โดยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงสารให้เข้ากันช่วยในการทำงานให้น้ำยาเข้าได้มากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8 ด้านล่างนี้



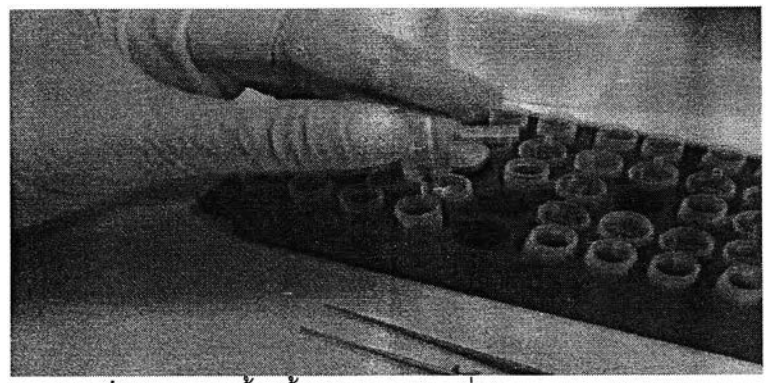
รูปที่ 8 แสดงเครื่องมือเหวี่ยงสารชื่อ rotrator

2.2 ต่อจากนั้นเปลี่ยนน้ำยาเป็น 1% Osmium tetraoxide (OsO_4) แช่ต่อไปจนครบ 2 ชั่วโมงโดยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงสารให้เข้ากันช่วยในการทำงานให้น้ำยาเข้าได้มากขึ้น จะพบว่าตอนนี้ชิ้นเนื้อเส้นประสาทจะเปลี่ยนเป็นสีดำสนิทแล้ว ดังแสดงในรูปที่ 9 ด้านล่างนี้

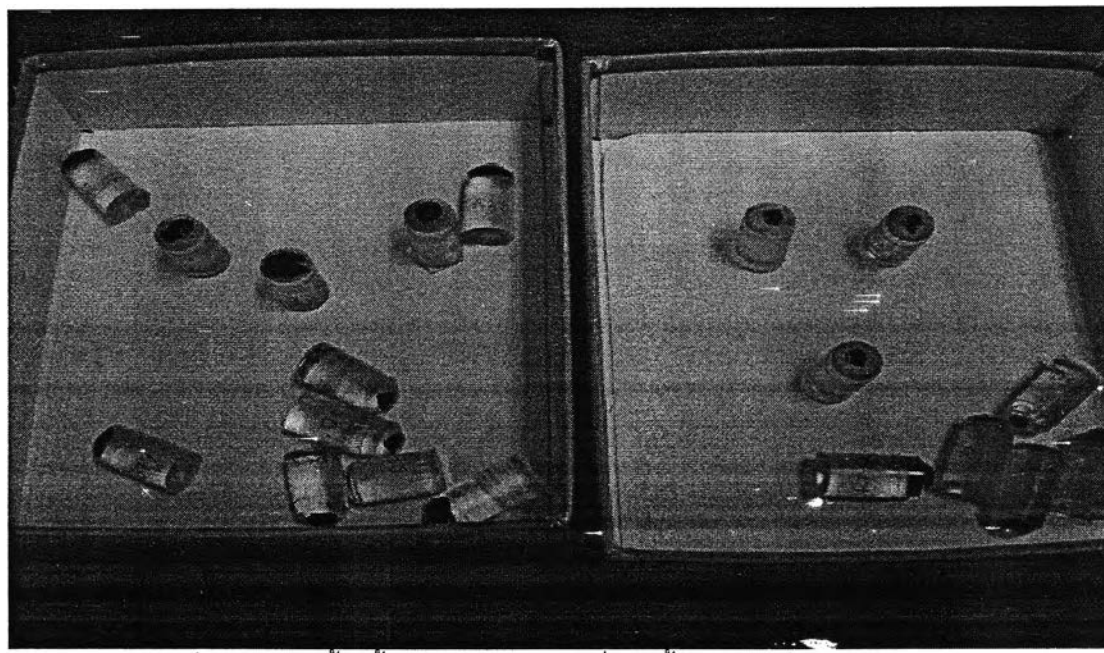


รูปที่ 9 แสดงชิ้นเนื้อเส้นประสาทที่เปลี่ยนสีเป็นสีดำสนิทจาก osmium

2.3 ต่อจากนั้นนำชิ้นเนื้อเส้นประสาทมาล้างด้วย 0.1 M Cacodylate Buffer pH 7.4 (3 ครั้งครั้งละ 10 นาที โดยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงสารให้เข้ากันช่วยในการทำงานให้น้ำยาเข้าได้มากขึ้นเช่นเดิม ต่อจากนั้นนำไป ดึงน้ำออกด้วยการใช้ความเข้มข้นของ แอลกอฮอล์ ตามลำดับ ซึ่งใช้ความเข้มข้นแรกที่ 70 % alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และแช่ ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง วันต่อมาก็มาดึงน้ำออกด้วย ความเข้นข้นของ 80 % alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ,95 % alcohol2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และ 100 % alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีตามลำดับ จากนั้นทำการแทรกด้วยน้ำยา Propylene oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ต่อจากนั้นแทรกด้วยน้ำยา 2 ตัวผสมกันในอัตราส่วนที่พอเหมาะดังนี้คือ Propylene oxide : Epoxy resin ครั้งที่ 1(อัตราส่วน 1:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ครั้งที่ 2 (อัตราส่วน 1:2) 12-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ลงใน 100% Epoxy resin 1-2 ชั่วโมงเพื่อจะทำการฝังในแคปซูลที่พอเหมาะดังรูปที่ 10,11 และอบต่อไปที่อุณหภูมิ 60°C 2-3 วัน ซึ่งในช่วงแรกก่อนที่ส่วนของเรซิ่นจะแข็งตัวต้องจัดให้ชิ้นเนื้ออยู่ตั้งตรงและอยู่ในแนวที่ดีเพื่อเอื้อต่อการตัดชิ้นเนื้อต่อไป



รูปที่ 10 แสดง ชิ้นเนื้อเส้นประสาทที่นำไปใส่ลงในแคปซูล



รูปที่ 11 แสดง ชิ้นเนื้อเส้นประสาทซูรัลที่ผ่านขั้นตอน จนได้บล๊อกลงเรซิน

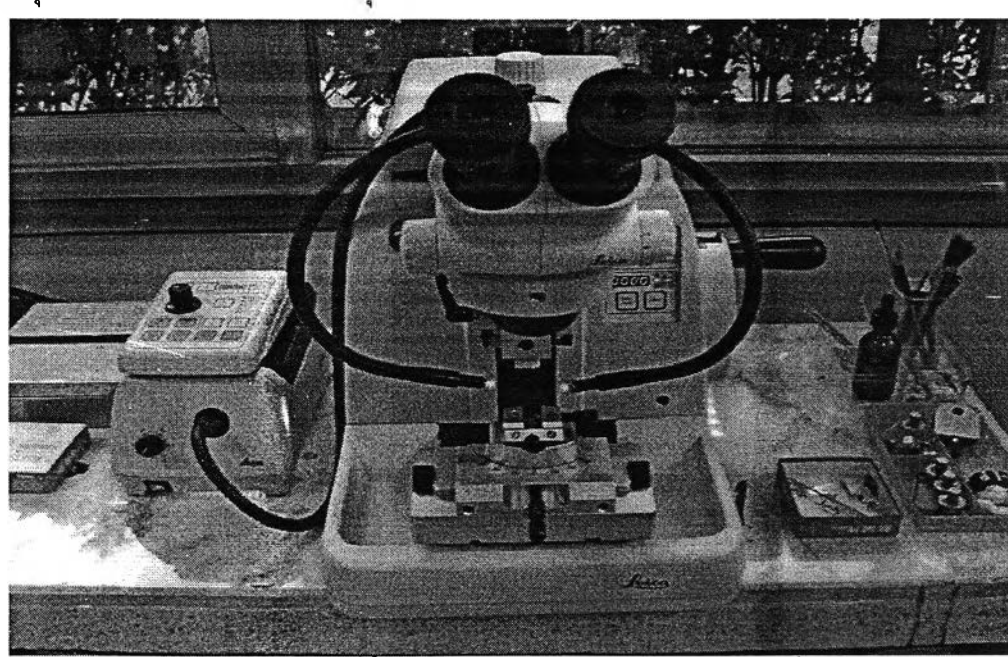
3. การตัดเนื้อเยื่อเส้นประสาทตามขวาง

นำบล็อกเส้นประสาทที่แสดงในรูปที่ 11 ด้านบนนี้ ไปตัดด้วยเครื่อง Ultramicrotome ความหนา 1 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วย 1 % Para-phenylenediamine

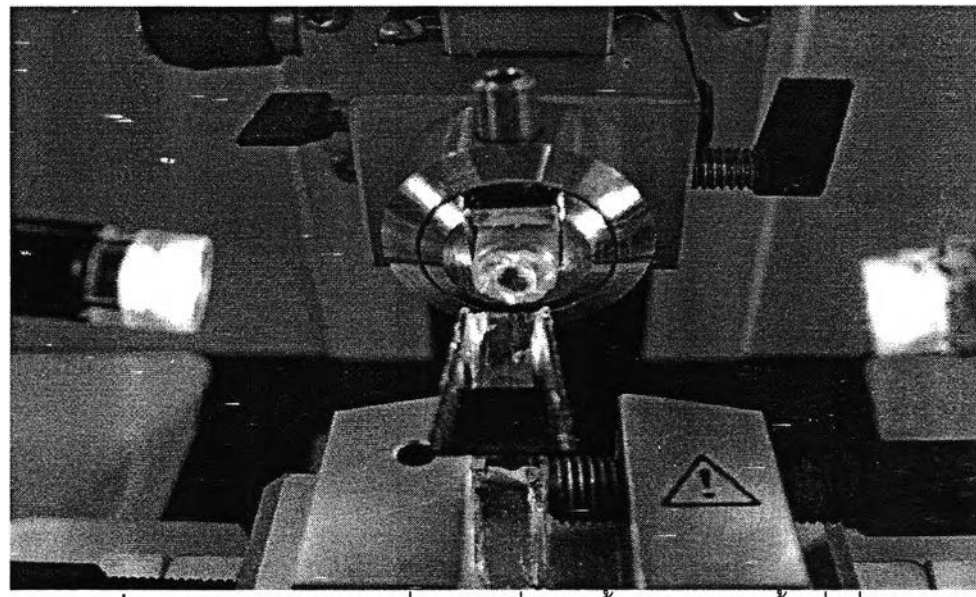
3.1 เตรียมมีดสำหรับการตัดเนื้อเยื่อซึ่งจะต้องใช้กระจกตัดให้เป็นมีดโดยใช้เครื่องมือตัดแสดงในรูปที่ 12 โดยทำตามขั้นตอนของเครื่องซึ่งต้องระมัดระวังในการทำแต่ละขั้นตอนและรอจนกระจกร้าวในมุมที่ต้องการต่อจากนั้นนำใบมีดไปใส่พลาสติกเพื่อ ทำเป็นโป๊ทไว้ใส่น้ำลอยเนื้อเยื่อที่ตัดได้

รูปที่ 12 แสดงเครื่องมือตัดกระจกให้เป็นมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ

3.2 เตรียมสารย้อม 1 % Para-phenylenediamine โดยการชั่งสาร 0.3 mg ผสมน้ำกลั่น 30 ml ใส่แท่งแม่เหล็กช่วยกวนสารและตั้งบน hot plate เพื่อทำให้การละลายดีขึ้นต่อจากนั้นนำมากรองจนได้สารย้อมที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ได้ติดต่อกัน 2-3 วันและต้องเปลี่ยนใหม่ทุกครั้งมิเช่นนั้นเนื้อเยื่อจะมีตะกอนจับทำให้เกิดสารปนเปื้อนในเนื้อเยื่อ นำบล๊อกที่ได้จากการทำขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อมาคัดเลือกเอาอันที่วางตัวในแนวตรงที่สุดเพื่อง่ายต่อการทำงาน โดยเปิดเครื่องตัด ultramicrotome พร้อมกับอุปกรณ์ที่ต้องใช้ร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 13 ตั้งค่าการตัดไปที่ขนาด 1 ไมครอน และเริ่มจากการ นำบล๊อกมา Trim จนถึงเนื้อเยื่อก็ใช้มีดกระจกตัดจนเห็นส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อ ก็เปลี่ยนตัวมีดเป็น ตัวมีดที่มีโบ๊ทเพื่อจะให้เนื้อเยื่อเส้นประสาทที่ตัดลอยตัวลงในโบ๊ทที่มีน้ำ จากนั้นใช้ที่ตักตักเนื้อเยื่อที่ได้วางบนสไลด์ที่ใส่หยดน้ำรอไว้เพื่อให้เนื้อเยื่อขึงตรึงต้องแน่ใจทุกขั้นตอนว่าต้องสะอาดไม่มีฝุ่นตะกอนปะปนเพื่อที่เนื้อเยื่อจะได้ออกมาดี

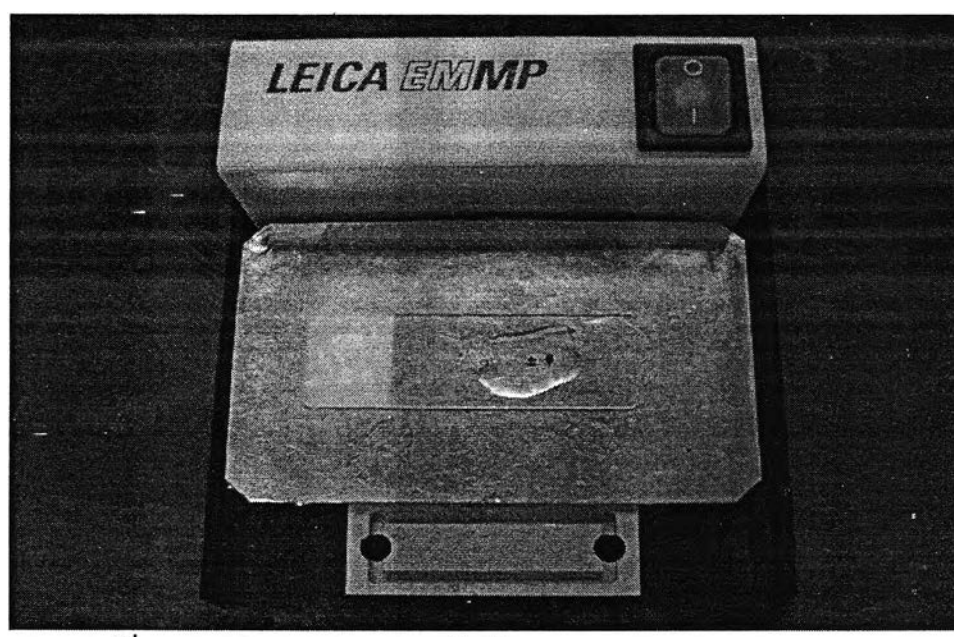


รูปที่ 13 แสดง เครื่องตัดเนื้อเยื่อ ultramicrotome และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ร่วมกัน

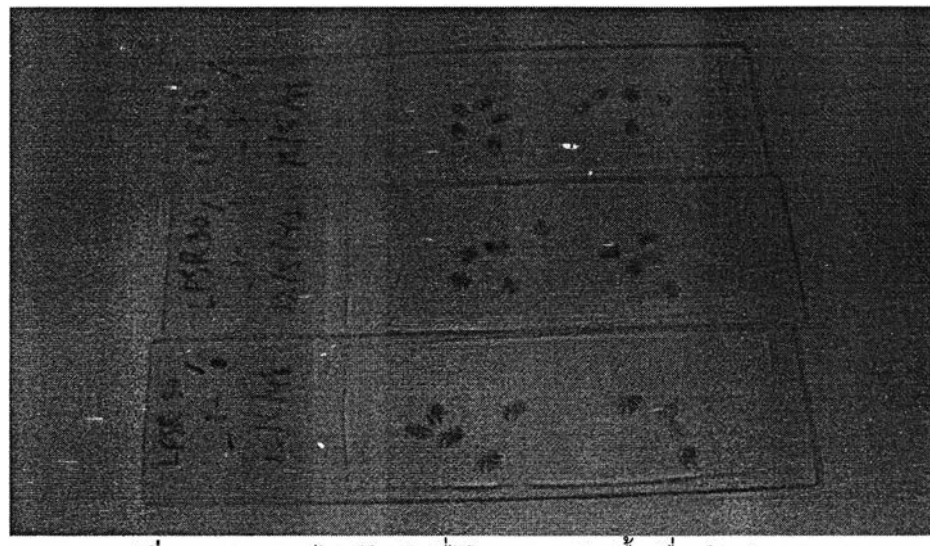


รูปที่ 14 แสดง การใช้ใบมีดที่ติดโบ๊ทเพื่อไว้ใส่น้ำสำหรับลอยเนื้อเยื่อที่ตัดได้

3.3 ต่อจากนั้นต้องเลเบลชื่อตัวอย่างทุกอันบนสไลด์ และนำไปวางไว้บน hot plate ดังรูปที่ 15 ตั้งอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส (หรือจะใช้ 80 องศาเซลเซียสก็ได้) วางจนเนื้อเยื่อแห้งแนบสไลด์ดีแล้ว ต่อจากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนสไลด์เย็น ย้อมด้วย1 % Para-phenylenediamine จับเวลาประมาณ 1 นาทีแล้วล้างออก ผึ่งบน hot plate อีกครั้งหนึ่งจนสไลด์แห้งดีแล้ว (ประมาณ 45 วินาที) นำสไลด์ที่ได้ ดังรูปที่ 16 มาเม้าส์ด้วยน้ำยา per-mount เพื่อเก็บสไลด์ เมื่อแห้งดีแล้วใส่กล่องสไลด์



รูปที่ 15 แสดง hot plate วางสไลด์



รูปที่ 16 แสดง สไลด์สำเร็จที่ได้จากการตัดเนื้อเยื่อเส้นประสาท

4. การวัดเชิงโครงสร้างของเส้นประสาทซูรัล

นำสไลด์สำเร็จที่ได้ไปตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อว่าเป็นเนื้อเยื่อปกติหรือไม่ ซึ่งจะคัดเฉพาะที่เป็นส่วนปกติ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscropic) แล้วพบว่าใยประสาทมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ ไม่พบว่ามีความผิดปกติของ การลดลงหรือการงอกใหม่ของ axon ต่อจากนั้นนำสไลด์ที่คัดเลือกอย่างดีแล้วทำการ CCD capture ภาพจากกล้อง import เข้าสู่คอมพิวเตอร์เพื่อใช้โปรแกรม Image –Pro Plus* ทำการวัดข้อมูลเชิงโครงสร้างของเส้นประสาท (*Image Proplus **เป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ภาพ โดยอาศัยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์มาช่วยในการนับให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น**)

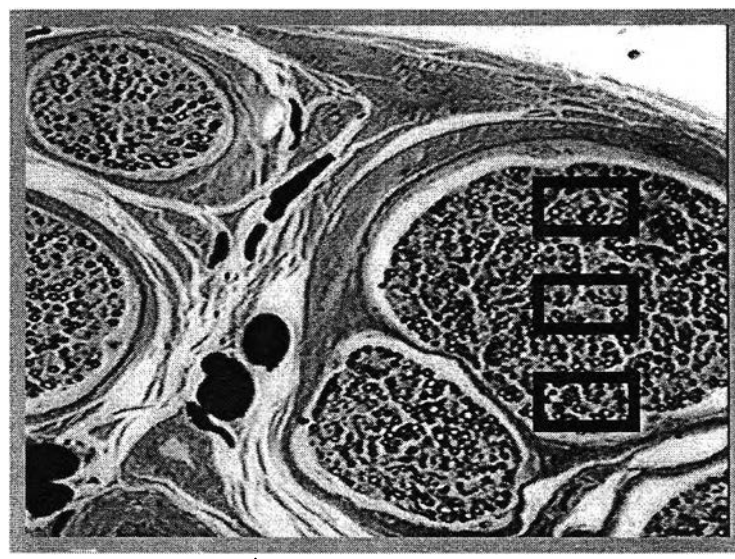
การนับเชิงโครงสร้างของเส้นประสาท (Nerve morphometry by Image Proplus Analysis) แบ่งออกเป็น 2 วิธี

1. **นับด้วยวิธีนับทั้งหมด** (Total count) ให้ทำหมดทุกหน้าตัดของเส้นประสาทซูรัลที่ตัดตามขวางทั้งหมดซึ่งต้องครอบด้วยสี่เหลี่ยมขนาด 0.012 mm^2 จนครบหมดทุก fascicle

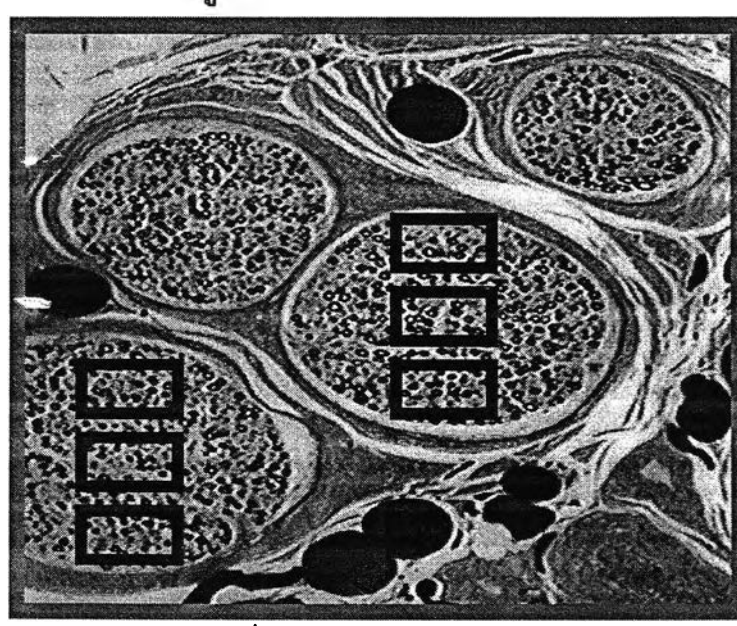
2. **นับแบบ** Three –window method จะใช้เฉพาะ fascicle ที่มีขนาดที่จะสามารถครอบได้ 3 บานหน้าต่างเรียงกัน และต้องผ่านจุดศูนย์กลางทุกครั้งในการครอบกรอบที่ 2 ซึ่งพบว่าจะเป็น fascicle ที่มีขนาดใหญ่พื้นที่มากในเส้นประสาทซูรัลนั้นๆ เมื่อเทียบกลับมาจะได้ลักษณะที่เป็นพื้นที่ ต่อสามหน้าต่างดังนี้คือ

1 Three-win **มีพื้นที่** 0.036	2 Three-win **มีพื้นที่** 0.072	3 Three-win **มีพื้นที่** 0.108
4 Three-win **มีพื้นที่** 0.144	5 Three-win **มีพื้นที่** 0.180	6 Three-win **มีพื้นที่** 0.216

ซึ่งพบว่าในเส้นประสาทซูรัล 1 เส้นจะสามารถครอบได้อย่างน้อย 1 fascicle (ซึ่งจะมีพื้นที่ 1 Three-win มีพื้นที่ 0.036) และอย่างมากสุดคือ 6 fascicles (ซึ่งจะมีพื้นที่ 6 Three-win มีพื้นที่ 0.216) แสดงตัวอย่างในรูปที่ 17 ที่การครอบ 1 fascicle และการครอบ 2 fascicle ในรูปที่ 18



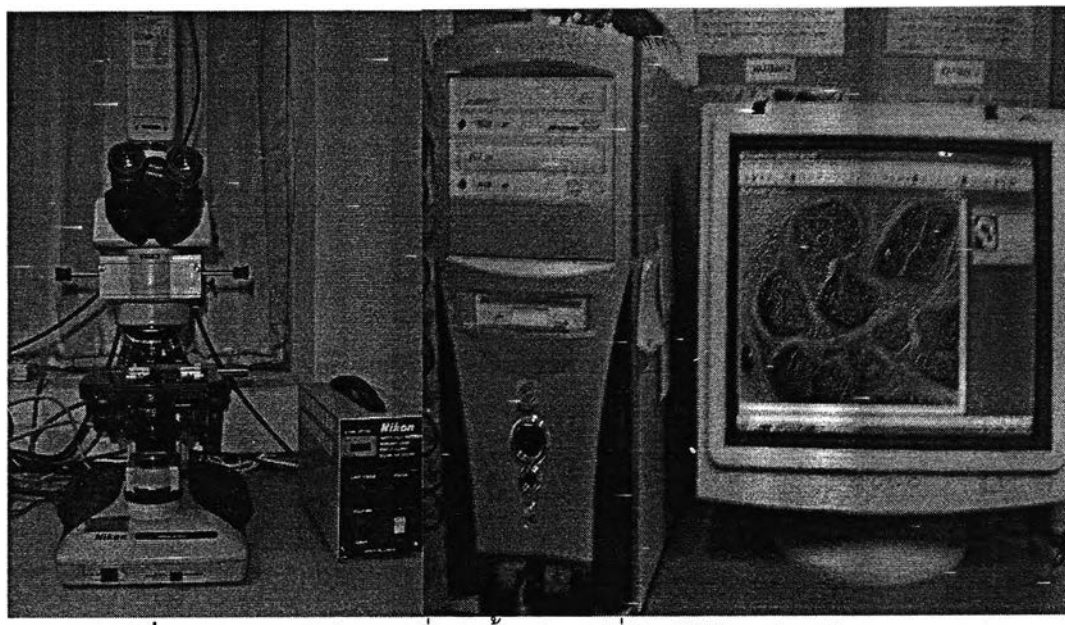
รูปที่ 17 แสดงการครอบ 1 fascicle



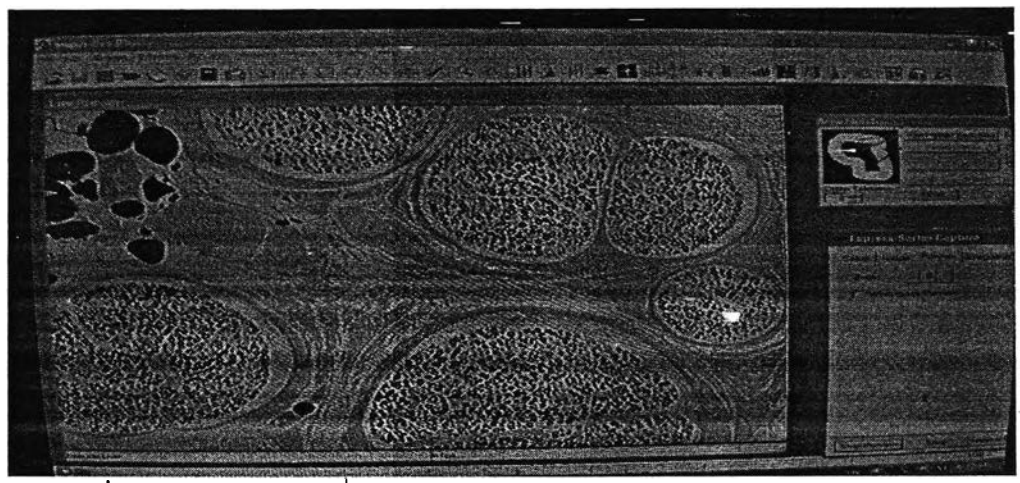
รูปที่ 18 แสดงการครอบ 2 fascicle

ขั้นตอนการ Import ภาพจากกล้องจุลทรรศน์เข้าโปรแกรม Image proplus

1. เปิดโปรแกรม image proplus โดยมีกล้องจุลทรรศน์ คอมพิวเตอร์ และโปรแกรม ดังรูปที่ 19
2. ที่ toolbar เลือกปุ่มรูปกล้อง วีดีโอ จะได้หน้าต่าง Express-series capture ในรูปที่ 20
3. กดปุ่ม start preveiw แล้วปรับกล้องจนได้ภาพที่ต้องการแล้ว snap หรือจับภาพนิ่ง



รูปที่ 19 แสดงการทำงานเมื่อจัดตั้งอุปกรณ์ที่ต่อเข้าใช้งานร่วมกัน



รูปที่ 20 แสดงหน้าต่างที่ส่งภาพมาจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 4x)

ขั้นตอนการหาพารามิเตอร์

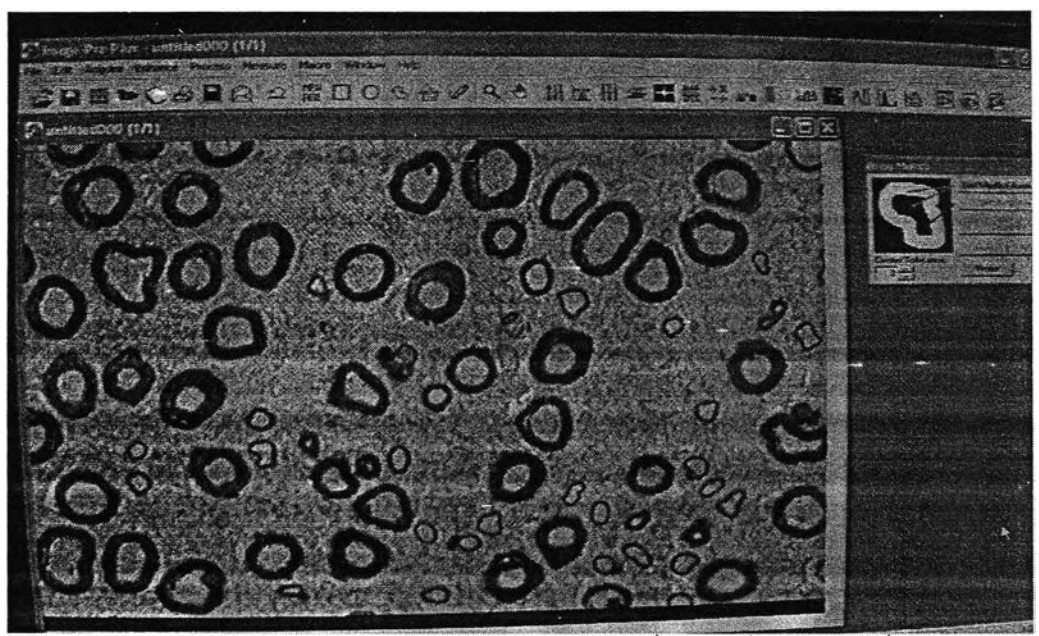
1. **ขั้นตอนการหาค่าพารามิเตอร์กลุ่มที่** 1 ในสองตัวแรกก่อน (FA,NF) โดยเริ่มจากจำนวน fascicle ต่อ 1 เส้นประสาท (NF) ซึ่งใช้กำลังขยายที่ 4x จะสามารถทำการนับได้ บันทึกค่าต่างๆ ลงในสมุดข้อมูลจนครบ 78 ตัวอย่าง ต่อจากนั้นหา FA ใช้กำลังขยายที่ 4x ขั้นตอนการหาจะเป็นการเข้าสู่โปรแกรม

- เลือก fascicle ที่ต้องการ (calibration เป็นกำลังขยาย 4x ที่ปุ่ม measure)
- เลือก measurements ปุ่มรูปวงเวียนและไม้บรรทัดบน toolbar
- เลือก polygon AOI (ปุ่มรูปหลายเหลี่ยมบน toolbar)

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ลาก mouse รอบแต่ละ fascicle ที่ต้องการวัดพื้นที่ทีละอัน (คลิกซ้ายลาก หยุดคลิกขวา) เครื่องจะแสดงผลของแต่ละ fascicle แยกกัน ค่าที่ได้เป็นพื้นที่มีหน่วยเป็น ตารางไมโครเมตร (μm^2) ส่งข้อมูลไป Excel

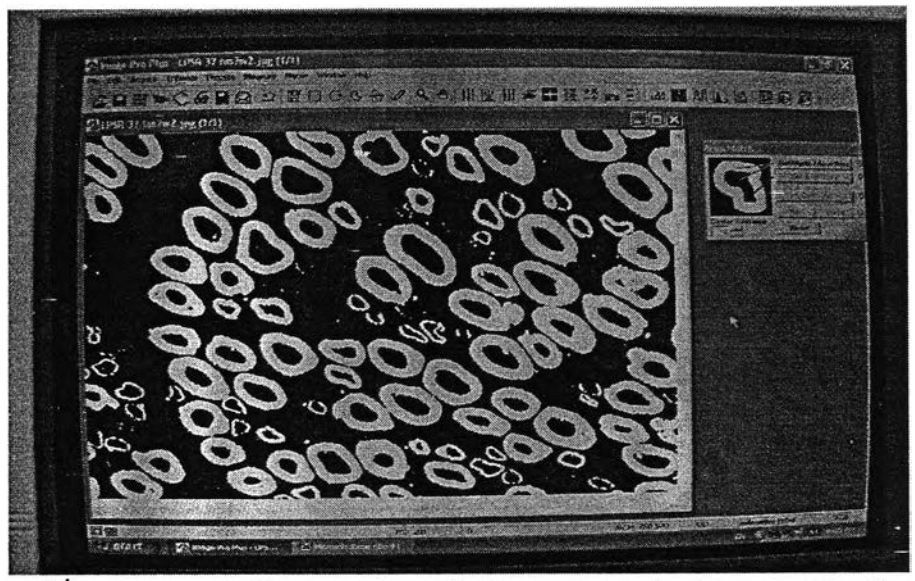
2. **ขั้นตอนการหาค่าพารามิเตอร์กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2** (MF,DMF,Ds,Da) ประกอบไปด้วยจำนวน myelinated fiber , ความหนาแน่นของจำนวน myelinated fiber , ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ myelinated fiber และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ axon โดยใช้ Image proplus ทำตามขั้นตอนโดยต้องขยายรูปไปที่กำลังขยาย 40x จะได้ภาพดังรูปที่ 21 ด้านล่างนี้ ต่อจากนั้นจะใช้รูปขาวดำ (calibration `40x) ดังแสดงในรูปที่ 22 ด้านล่างนี้เนื่องจากตัวโปรแกรมออกแบบให้วัดขนาดที่แน่นอนได้จากภาพขาวดำ



รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างภาพเส้นประสาทตัดตามขวาง ที่ (กำลังขยาย 40x) ที่ snap แล้ว

<u>การทำภาพขาวดำ</u>

เริ่มจากขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ snap รูปที่กำลังขยาย 40x , process → color channel →extract , process→filter→enhancement เลือก median → apply →close ทำให้ภาพดีขึ้นแต่อาจไม่ต้องทำก็ได้ถ้าตัดสไลด์ออกมาได้ดีแล้ว , process → Threshold จะมี segmentation window ขึ้นมาให้กดปุ่มรูปกราฟทางขวามือ →apply mask →close ภาพออกมาเป็นขาวดำ ชัดเจน check ว่า range ต้องเป็น 128-255 แล้วปิด



รูปที่ 22 แสดงภาพตัดตามขวางของเส้นประสาท 40x ช่วงทำภาพขาวดำเสร็จ

2.1 การหาค่าข้อมูลที่วัดจากเครื่องทำได้โดย

- ไปที่ menu bar คลิก count /size ต้องมีการเลือก 2 แบบคือ

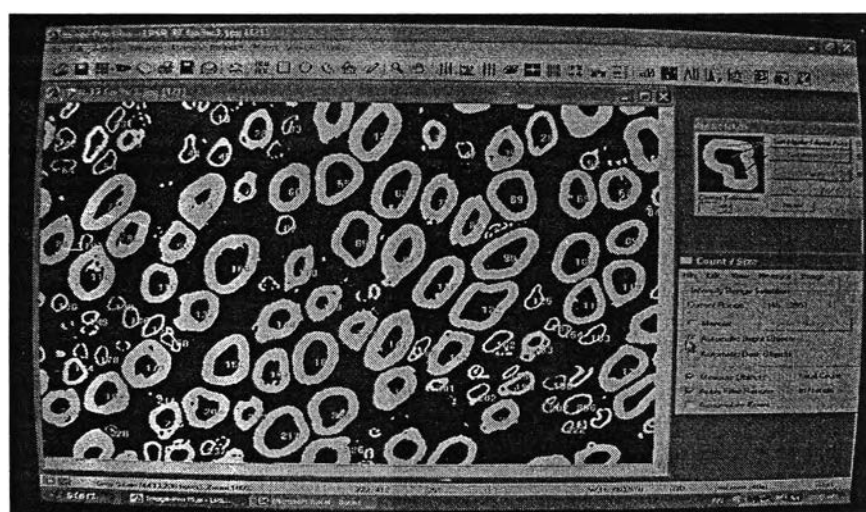
1. เลือก automatic bright object ดังแสดงในรูปที่ 23

- เลือก select measurements โดยจะต้องมีการเลือกส่วนต่างๆ ดังนี้ area ,center x ,center y, diameter mean ,hole area ,hole (เริ่มที่ 1)

- ไปที่ options เลือก with hole ,object , green , 8 connect , none

- count และตรวจภาพอีกครั้ง ถ้าต้องการเอาออกให้เลือกที่ toggle on/off หรือ spit object (ลากซ้าย คลิกขวา)

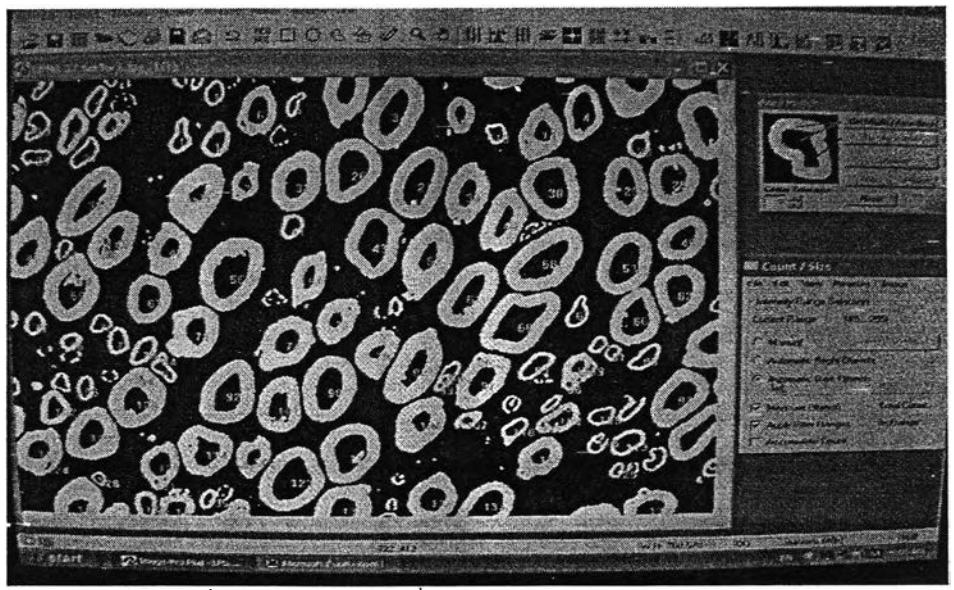
- เปิดโปรแกรมช่วยการทำงานจับคู่คือ Area match ไปกดที่ get myelin & axon area จะได้ค่าที่โปรแกรม เก็บสำรองไว้ก่อน



รูปที่ 23 แสดง ภาพที่ได้จากการ เลือก automatic bright object

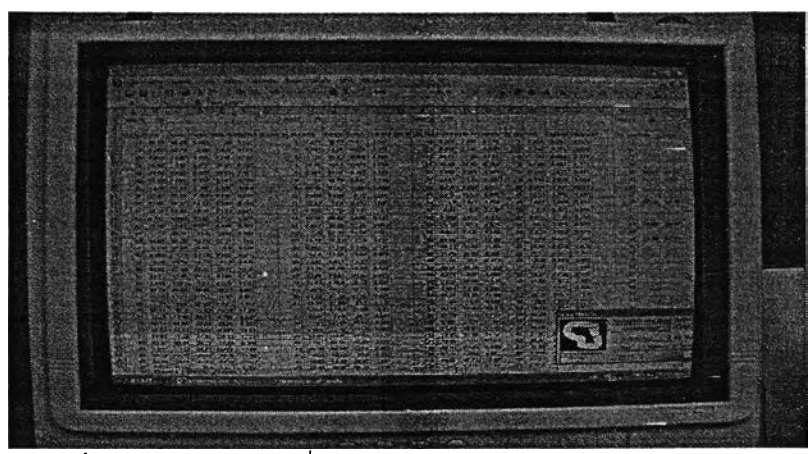
2. เลือก automatic dark object

- เลือก select measurements โดยจะต้องมีการเลือกส่วนต่างๆ ดังนี้ area ,center x ,center y, diameter mean ดังแสดงในรูปที่ 24
- ไปที่ options เลือก out line ,object , green , 8 connect , all border
- count และตรวจภาพอีกครั้ง ถ้าต้องการเอาออกให้เลือกที่ toggle on/off
- โปรแกรม Area match ที่ใช้กับ bright ไปกดที่ get axon area จะได้ค่าที่โปรแกรม เก็บไว้ก่อน



รูปที่ 24 แสดง ภาพที่ได้จากการ เลือก automatic dark object

2.2 ต่อจากนั้นคลิกไปที่การคำนวณข้อมูลจะได้ข้อมูลที่จับคู่กันแล้ว โดยแบ่งเป็นส่วนของข้อมูลเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 เป็นข้อมูลดิบจากวิธีการใช้ bright ,dark ดังแสดงในรูปที่ 25 กลุ่มที่ 2 เป็นข้อมูลที่จับคู่กันได้ตรงกันหมดแล้ว และกลุ่มสุดท้ายเป็นข้อมูลที่ยังไม่สามารถจับคู่กันได้ (การจับคู่กันของข้อมูลใช้ส่วนของ hole area ในวิธีการของ bright และ area ในวิธีการของ dark มาจับคู่กันโดยใช้โปรแกรมช่วยซึ่งจะต้องตั้งค่าของ center Tolerance ที่ 2 เสมอ)



รูปที่ 25 แสดง ข้อมูลที่ได้จากภาพในการจับคู่ของโปรแกรม area match

2.3 การรวบรวมข้อมูลของทั้ง 2 วิธีคือวิธีสุ่มตัวอย่าง Three-window sampling และนับทั้งหมด จะได้ค่าจำนวน myelinated fiber (MF), ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ myelinated fiber (Ds), ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ axon (Da) นำมาวิเคราะห์ผลและสถิติ โดยใช้คอมพิวเตอร์

- คำนวณหาค่าความหนาแน่นของ myelinated fibers ต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (DMF)
- คำนวณหาค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ myelinated fibers และ axon
- คำนวณหาค่าเฉลี่ย g-ratio
- Histogram แสดงการกระจายของขนาดต่างๆ ของเส้นผ่าศูนย์กลางของ myelinated fibers
- หาค่าความสอดคล้อง (agreement) ทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยจากกลุ่มข้อมูลทั้ง 2 แบบ โดยใช้ Intraclass correlation (ICC)