บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย
(Materials and Method)

ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง โดยมีการเลี้ยงดูสัตว์และมีการจัดการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองอย่างเคร่งครัด ตามระเบียบของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลองแล้ว ตามหนังสือลำดับที่: จส. มข.42/2551 เลขที่: ศธ 0514.1.12.2/51

1. อุปกรณ์และวิธีการ

1.1 ทำการศึกษาโดยเก็บรังไข่จำนวน 45 รังไข่ จากแพะที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (อายุ 1-3 ปี) พันธุ์พื้นเมืองไทย โดยแพะที่ใช้มีวงรอบการเป็นสัดที่ปกติและมีความสมบูรณ์ของร่างกายที่ดี แบ่งกลุ่มการทดลองโดยอาศัยข้อมูลทาง morphology เพื่อเป็นตัวแปรในการประเมินประเภทของการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 มีรูปแบบการเสื่อมสลายเป็น Type 1 degenerated follicles (พบการเสื่อมสลายของโอโอไซต์เพียงอย่างเดียว)

กลุ่มที่ 2 มีรูปแบบการเสื่อมสลายเป็น Type 2 degenerated follicles (พบการเสื่อมสลายทั้งในโอโอไซต์และ granulosa cell

1.2 ศึกษาทางด้าน morphology โดยเมื่อเก็บรวบรวมรังไข่มาได้แล้วก็ทำการตัดเอาเนื้อเยื่อไขมันและเอ็นที่อยู่รอบๆ รังไข่ออก หลังจากนั้นนำไปล้างใน 70% alcohol ประมาณ 10 วินาที แล้วล้างต่ออีกสองครั้งในสารละลาย 0.9% saline หลังจากนั้นทำการวาดติดสัญลักษณ์ไว้ด้านล่าง ทำการศึกษาลักษณะของฟอลลิเคิลต่อโดยทำการตัดแยกรังไข่ในแต่ละข้างแล้วทำการ fixed ในสารละลาย Carnoy เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำให้เนื้อเยื่อของรังไข่เกิดการ dehydrated ในสารละลาย ethanol หลังจากนั้นนำไปใส่ไว้ใน xylol และตรึงไวในพาราฟิน (paraffin wax) หลังจากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อรังไข่ (หนาประมาณ 7μm) มาทำการย้อมสีโดยใช้ Periodic Acid Shiff-hematoxyline (Lucci et al, 1999) เนื้อเยื่อรังไข่แต่ละส่วนที่ตัดได้นำมาขจัดเอาพาราฟินออกโดยใช้ alcohol แล้วนำมาตรวจสอบโดยใช้ light microscopy การพิจารณาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์กรานูโลซาซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ในการวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล

1.3 ทำการแยกประเภทของ preantral follicle ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ primordial follicle (ภายในมีโอโอไซต์ที่ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ squamous epithelium เพียงชั้นเดียว) primary follicle (ภายในมีโอโอไซต์ที่ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ cuboidal epithelium เพียงชั้นเดียว) และ secondary follicle (ภายในมีโอโอไซต์ที่ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น หรือมากกว่า 2 ชั้น) ลักษณะทาง morphology ของฟอลลิเคิลจะพิจารณาจากลักษณะของ basement membrane ความหนาแน่นของเซลล์ เปอร์เซ็นต์การพบหรือการเกิด Pyknotic Nuclei และความสมบูรณ์ของโอโอไซต์ เพื่อใช้ข้อมูลดังกล่าวเป็นตัวแปรในการประเมินประเภทของการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิล

1.4 ศึกษาปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิล โดยประเมินจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-6 มม.) กลาง (7-10 มม.) และใหญ่ (มากกว่า 10 มม.) นอกจากนั้นแล้วฟอลลิเคิลทั้งหมดจำแนกตามลักษณะความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลได้เป็น ฟลอลิเคิลที่สมบูรณ์ (healthy follicle) และฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ (unhealthy follicle) ปริมาณเส้นเลือดวิเคราะห์โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรีแบบฟลูออเรสเซนต์โดยใช้โปรตีน (factor VIII) จากนั้นคำนวณหาปริมาณเส้นเลือดโดยคำนวณจากพื้นที่ของชั้นทีกาที่ย้อมติดสารฟลูออเรสเซนต์ของ factor VIII (จับกับเซลล์เอนโดทีเลียม)

2. การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การประเมินความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์โดยการพิจารณาจาก morphology

2.2 เปอร์เซ็นต์การเกิด Pyknotic Nuclei ในฟอลลิเคิลแต่ละระยะ

2.3 เปอร์เซ็นต์การเกิด Type 1 degenerated หรือ Type 2 degenerated ของฟอลลิเคิลแต่ละประเภท

2.4 เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสลายของ preantral follicle (percentage of degenerated preantral follicles)

2.5 ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก กลาง ใหญ่ สมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่เกี่ยวกับการการเสื่อมสลายของ preantral follicle ที่ได้จากการศึกษาในรังไข่จะนำมารวมกัน เปอร์เซ็นต์การเกิด Pyknotic Nuclei และเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสลายฟอลลิเคิลที่พบใน primordial primary และ secondary follicle จะมีการเปรียบเทียบข้อมูลโดย Chi-square test (SAS, 2001) และปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลทั้ง 3 ขนาดจะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New multiple range test (SAS, 2001) นอกจากนั้นปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์จะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student *t*-test (SAS, 2001)