

เอกสารอ้างอิง (References)

- วินัย ประถมภ์กาญจน์. 2545. พันธุ์และการผสมพันธุ์ของแพะ หลักสูตรเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สาส์นได้วิเคราะห์. ปีที่ 2 ฉบับที่ 20 ประจำเดือนมีนาคม 2545 สำนักวิชาเทคโนโลยี
การเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.
- Austin, E. J., M. Mihm, A. C. O. Evans, P. G. Knight, J. L. H. Ireland, J. J. Ireland, and J. F.
Roche. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during
selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*
64: 839-848.
- Bedaiwy, M. A., and M. R. Hussein. 2004. Histological evaluation and in situ localization of
apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East. Ferti. Soc. J.* 9: 163-
171.
- Blondin, P., K. Coenen, L. A. Guilbaultl, and M. A. Sirardlya. 1996. Superovulation can reduce
the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology* 46: 1191-1203.
- Boundy, T., and J. Cox. 1996. Vasectomyintheram. *In Pract.* 18: 330-334.
- Boone, D. L., and B. K. Tsang. 1998. Caspase 3 in the rat ovary: localization and possible role in
follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.* 58: 1533-1539.
- Bras, M., B. Queenan, and A. Susin. 2005. Programmed cell death via mitochondrin: different
models of dying. *Biochemistry.* 70: 284-293.
- Braw, R. H., and A. Tsafiriri. 1980. Effects of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J.*
Reprod. Fertil. 59: 267-72.
- Bruno, J. B., M. H. T. Matos, R. N. Chaves, J. J. H. Celestino, M. V. A. Saraiva, I. B. Lima-
Verde, V. R. Araújo, and J. R. Figueiredo. 2009. Angiogenic factors and ovarian follicle
development. *Anim. Reprod.* 6: 371-379.
- Chun, S. Y., K. Eisenhauer, S. Minami, H. Billig, E. Perlas, and A. J. W. Hsueh. 1996. Hormonal
regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major
survival factor. *Endocrinology.* 137: 1447-1456.
- Chun, S. Y., K. Eisenhauer, S. Minami, H. Billig, E. Perlas, and A. J. W. Hsueh. 1996. Hormonal
regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major
survival factor. *Endocrinology.* 137: 1447-1456.



- Chun, S. Y., and A. J. W. Hsueh. 1998. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J. Reprod. Immunol.* 39:63-75.
- Chun, S. Y., and A. J. W. Hsueh. 1998. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J. Reprod. Immunol.* 39:63-75.
- Clarke, N., P. Germain, L. Alltucci, and H. Gronemeyer. 2004. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* 6:1-23.
- Cooke, J. P. 2003. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis Supplements.* 4 53-60.
- de Thonel, A., and J. E. Eriksson. 2005. Regulation of death receptors-relevance in cancer therapies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207:123-132.
- Duda DG, Fukumura D & Jain RK 2004 Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol. Med.* 10:143-145.
- Evans, A. C. O., J. L. H. Ireland, M. E. Winn, P. Lonergan, G. W. Smith, P. M. Coussens, and J. Ireland. 2004. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol. Reprod.* 70: 1475-1484.
- FAO. 2004. Agriculture Data. (28 Aug 2007). <http://apps.fao.org/page/collections>.
- Fraser, H. M. 2006. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 418. (doi:10.1186/14777827-4-18)
- Grazul-Bilska, A. T., C. Navanukraw, M. L. Johnson, D. A. Arnold, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2006. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction* 132: 579-587.
- Grazul-Bilska, A. T., C. Navanukraw, M. L. Johnson, K. A. Vonnahme, S. P. Ford, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* 85: 1914-1922.
- Greenwald, G. S. 1989. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol. Reprod.* 41: 175-181.
- Hanahan, D. 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 277: 55-60.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.
- Hunter, M. G. R. S. Robinson, G. E. Mann, and R. Webb. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 461-477.

- Ireland, J. J., and J. F. Roche. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112: 150-156.
- Jablonka-Shariff, A., and L. M. Olson. 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 412-421.
- Lucci, C. M., Amorim, C. A. Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R., Bao, S. N., Silva, J. R. V., Goncalves, P. B. D., 1999. Study of preantral follicles population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 223-236.
- Mattioli, M., B. Barboni, M. Turriani, G. Galeati, A. Zannoni, G. Castellani, P. Berardinelli, and P. A. Scapolo. 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol. Reprod.* 65: 1014-1019.
- Mihm, M., E. J. Austin, T. E. M. Good, J. L. H. Ireland, P. G. Knight, J. F. Roche, and J. J. Ireland. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 63: 811-819.
- Mihm, M., P. J. Baker, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, P. M. Coussens, A. C. O. Evans, and J. J. Ireland. 2006. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol. Reprod.* 74: 1051-1059.
- Navanukraw, C. and S. Guntaprom. 2006. Mitotic activity of bovine preovulatory follicles on day 2 or day 3 of the first follicular wave. *J. Sci. Technol. and Human.* 4: 25-30.
- Pinto, C. R., D. L. Paccamonti, B. E. Eilts, C. S. Venugopal, C. R. Short, L. R. Gentry, D. L. Thompson, and R. A. Godke. 2003. Concentrations of nitric oxide in equine preovulatory follicles before and after administration of human chorionic gonadotropin. *Theriogenology*. 60: 819-827.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, R. M. Harman, C.L. Hu, and D. A. Porter. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82: 40-52.

- Redmer, D. A., J. D. Kirsch, and L. P. Reynolds. 1991. Production of mitogenic factors by cell types of bovine large estrogen-active and estrogen-inactive follicles. *J. Anim. Sci.* 69: 237-245.
- Redmer, D. A., and L. P. Reynolds. 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1: 182-192.
- Redmer, D. A., V. Doraiswamy, B. J. Bortnem, K. Fisher, A. Jablonka-Shariff, A. T. Grazul-Bilska, and L. P. Reynolds. 2001. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 65: 879-889.
- Reynolds, L. P., and D. A. Redmer. 1998. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.* 76: 167-1681.
- Reynolds, L. P., A. T. Grazul-Bilska, and D. A. Redmer. 2002. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int. J. Exp. Pathol.* 83: 151-163.
- SAS Institute, Inc., SAS System (Release 8.2), Cary, NC. 2001.
- Silva, J. R. V., M. A. L. Ferreira, S. H. F. Costa, R. R. Santos, F. C. A. Carvalho, A. P. R. Rodrigues, C. M. Lucci, S. N. Bao, J. R. Figueiredo. 2002. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Rumin. Res.* 43:203-209.
- Stouffer, R. L., J. C. Martínez-Chequer, T. A. Molskness, F. Xu, and T. M. Hazzard. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch. Med. Res.* 32: 567-575.
- Terranova, P. F. 1981. Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: a shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology.* 108: 1885-1890.
- Thomas, F. H., D. G. Armstrong, and E. E. Telfer. 2003. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 76: 1-7.
- Tilly, J. L., K. I. Tilly, M. L. Kenton, and A. L. Johnson. 1995. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 136: 232-241.
- Tilly, J. L. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 838-848.
- Turzillo, A. M., and J. E. Fortune. 1993. Effect of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98: 113-119.

- Wandji, S. A., J. J. Eppig, and J. E. Fortune. 1995. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*. 45: 817-832.
- Wolfenson, D., G. Inbar, Z. Rotha, M. Kaim, A. Blocha, and R. Braw. 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 62: 1042–1055.
- Xu, Z., H. A. Garverick, G. W. Smith, M. F. Smith, S. A. Hamilton, and R. S. Youngquist. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53: 951-957.
- Yang, M. Y., and R. Rajamahendran. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 62: 1209-1217.
- Zeleznik, A. J. 2001. Follicle selection in primates: “many are called but few are chosen”. *Biol. Reprod.* 65: 655-659.
- Zhou H, Zhang Y. 2005. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28: 235-242.



ภาคผนวก
(Appendix)

1. การตรวจสอบการเป็นสัด

การตรวจสอบการเป็นสัดในแพะเพศเมีย โดยการใช้แพะเพศผู้ที่ผ่าตัดท่อนำเชื้อออกแล้ว (vasectomize buck) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ ซึ่งแพะเพศผู้ที่ได้รับการผ่าตัดท่อนำเชื้อนี้สามารถใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิด “buck effect” และใช้ในการตรวจสอบแพะเพศเมียแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดก่อนที่จะได้รับการผสมพันธุ์ (Boundy and Cox, 1996)



ภาพผนวกที่ 1 แสดงพฤติกรรมของแพะเพศผู้ที่ผ่าตัดท่อนำเชื้อออกแล้ว (vasectomize buck) ตรวจสอบอาการเป็นสัดในฝูงด้วยการเขคจมูกและสูดดมกลิ่นในอากาศ

ภาพผนวกที่ 2 แสดงพฤติกรรมของแพะเพศเมียที่เป็นสัดเต็มที่และยืนนิ่ง (standing heat) ให้ตัวผู้ขึ้นทับและยอมให้ผสมพันธุ์

2. การผ่าตัดเปิดช่องท้อง (Laparotomy)

การผ่าตัดเปิดช่องท้องแพะทำตามวิธีการของ Jarell and Dziuk (1991) ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง หลังจากการฉีด hCG เพื่อตรวจนับจำนวนของ CH (corpora haemorrhagica) เปรียบเทียบกับจำนวน CL (corpora luteum) ที่ปรากฏอยู่บนรังไข่ เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการตกไข่ในแต่ละระยะเวลา โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 จำนวนผู้ปฏิบัติหน้าที่ ได้แก่ ผู้ผ่าตัด ผู้ช่วยผ่าตัด ผู้ช่วย 1 และ ผู้ช่วย 2 โดยผู้ช่วยที่ทำหน้าที่ในการวางยาสลบ มีสมุดบันทึกขนาดของยา Zylaxine hydrochloride (Rompun) และ ยาชาเฉพาะที่ (lidocaine) ที่ใช้โดยต้องบันทึกขนาดที่ใช้ และเวลาที่ฉีดทุกครั้ง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผ่าตัด

2.2.1 อุปกรณ์ผ่าตัดและถาดผ่าตัด 2 ถาด



2.2.2 ยา zylaxine (Rompun), ยาชาเฉพาะที่ (Lidocaine)

2.2.3 น้ำยาฆ่าเชื้อโรค ได้แก่ dettol, povidone แอลกอฮอล์ 70%

2.2.4 น้ำยา PBS หรือ Normal Saline

2.2.5 ซองควบคุม หรือ cradle พร้อมเชือกตรึงสัตว์

2.2.6 กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 1 มล. และ 5 มล.

2.2.7 เข็ม (needle) เบอร์ 21, เบอร์ 23

2.2.8 อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ needle holder, tissue forcep, เข็มเย็บภายใน, เข็มเย็บภายนอก ไหมละลาย (cat gut) ขนาดยาวกว่า 1 ม. และ ไหมไม่ละลาย ขนาดยาวกว่า 1.5 ม.

2.2.9 sterilized gauze จำนวน 6 ชิ้น หรือใช้สำลีพันด้วย sterilized gauze

2.2.10 อุปกรณ์ทำความสะอาดบริเวณผ่าตัด ได้แก่ แปรง, มีดโกน, สำลีก้อน

2.2.11 สารป้องกันแมลงวัน หรือ Negasant®

2.2.12 ยาปฏิชีวนะ และ ยาระงับอาการปวด เช่น Fentanyl

2.2.13 อื่นๆ ได้แก่ นาฬิกาจับเวลา ถุงมือ หน้ากาก (mask) เสื้อกาวน์ ผ้าม้วนที่ก

2.3 วิธีการ

2.3.1 ผู้ช่วย 1 หรือ 2 ทำการอดอาหารและน้ำของสัตว์อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด เพื่อป้องกัน regurgitation ระหว่างการให้ยาและการผ่าตัด

2.3.2 เตรียมอุปกรณ์ให้ครบถ้วน ในตำแหน่งที่สะดวกในการปฏิบัติงาน จากนั้นทำความสะอาดสถานที่บริเวณที่จะทำการผ่าตัด ผู้ช่วยในการผ่าตัดเตรียมน้ำยา dettol เจือจางไว้ในถาดผ่าตัด จากนั้นผู้ช่วย 1 และ 2 ช่วยกันจับสัตว์ เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 7 ml ที่ jugular vein

2.3.3 ผู้ช่วย 1 จับควบคุมสัตว์โดยการยกขาหน้าขึ้น ผู้ช่วย 2 ฉีด Anesthetic drugs (dose ที่ใช้ตามขนาดข้างขวด 0.03 มล. ต่อน้ำหนักตัว 10 กก. สัตว์ขนาด 20 กก. ใช้ 0.06 มล.) ฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณขาหน้าของสัตว์ สังเกตอาการตอบสนองของสัตว์ เมื่อสัตว์มีการขยับเขยื้อนน้อยลงแล้ว จับสัตว์หางท้องแล้วให้ทำการมัดติดที่ cradle ด้วยเชือกที่เตรียมไว้ขนาดประมาณ 1-2 เมตร จำนวน 4 เส้น

2.3.4 ผู้ช่วย 1 หรือ 2 ทำความสะอาดบริเวณที่ต้องการผ่าตัดโดยใช้สบู่และแปรงขัดที่บริเวณรอบๆ ท้อง หากมีขนให้โกนขนออกให้เรียบร้อย จากนั้นพ่นด้วย povidone ให้ทั่วบริเวณที่ต้องการผ่าตัด (ตรวจสอบการตอบสนองของร่างกายสัตว์ ซีพจร และการหายใจของสัตว์อย่างสม่ำเสมอ) จากนั้นใช้ lidocaine 2% ขนาด 1 มล./น.น. 5 กก. เป็น Local anesthesia แล้วใช้เข็มเบอร์ 23 ฉีดยาชา รอบๆ บริเวณที่ผ่าตัด เพื่อลดความเจ็บปวด (Borer, 2006) ก่อนการผ่าตัดเปิดช่องท้อง

2.3.5 ผู้ผ่าตัดเตรียมตัวใส่ถุงมือ หน้ากาก เสื้อกาวน์ด์ จากนั้นผู้ช่วย 1 หรือ 2 พัน แอลกอฮอล์ที่มือทั้งสองข้างของผู้ผ่าตัด จากนั้นผู้ช่วยในการผ่าตัดเตรียมอุปกรณ์การผ่าตัด เข็ม catgut ใหม่ไม่ละลาย แฉ่งลงในถาดผ่าตัด

2.3.6 ผู้ผ่าตัดกรีดเปิดปากแผลยาวประมาณ 3 นิ้ว เพื่อเปิดช่องท้อง ตรวจหารังไข่ และนับจำนวนของ CH และ CL เสร็จแล้วปิดปากแผลทันทีโดยการเย็บปิดหน้าท้อง และฉีดยาปฏิชีวนะ ชนิด Penstrep 5 มล. เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย

2.3.7 ฉีดยาระงับอาการปวด 2 มล. แล้วพ่นด้วย povidone จากนั้นโรย Negasant® เพื่อป้องกันมิให้แมลงวันวางไข่ซึ่งจะทำให้เกิดการติดเชื้อ

2.3.8 ผู้ดูแลสัตว์ทำความสะอาดแผล และฉีดยาปฏิชีวนะติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 3 วัน และตัดไหมไม่ละลาย ออกหลังจากผ่าตัด 7 วัน



ภาพผนวกที่ 3 แสดงการกรีดเปิดปากแผล ยาวประมาณ 3 นิ้ว เพื่อเปิดช่องท้อง



ภาพผนวกที่ 4 การตรวจหารังไข่ และนับ จำนวนของ CH และ CL



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะของมดลูกเมื่อผ่าตัด เปิดช่องท้องแพะ



ภาพผนวกที่ 6 ลักษณะของฟอลลิเคิล (วงกลมสีแดง) บนรังไข่

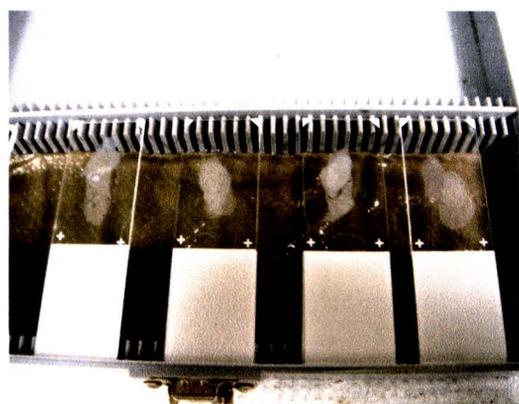
3. การวิเคราะห์ทาง Immunohistochemistry โดยวิธี Periodic Acid-Schiff's Hematoxylin

การวิเคราะห์ทาง Immunohistochemistry โดยวิธี Periodic Acid-Schiff's Hematoxylin เพื่อต้องการวิเคราะห์หาลักษณะการเกิด Pyknotic Nuclei ของเซลล์กรานูโลซา โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 3.1 เตรียมตัวอย่างสไลด์เนื้อเยื่อรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลขนาด 7 μm (ภาพผนวกที่ 7 และ 8)
- 3.2 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลเพื่อนำเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้แช่สไลด์ในสารละลาย cleaning reagent จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 3.3 ทำการ dehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ethanol ความเข้มข้นจากมากไปน้อย คือ 100 100 95 95 และ 70% ตามลำดับ โดยแช่ครั้งละ 5 นาที
- 3.4 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ใน dH_2O เป็นเวลา 5 นาที
- 3.5 ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย Periodic Acid เป็นเวลา 10 นาที
- 3.6 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ใน dH_2O เป็นเวลา 5 นาที
- 3.7 ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย Schiff's เป็นเวลา 15 นาที
- 3.8 ล้างสารย้อมส่วนเกินออกโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านสไลด์เนื้อเยื่อ เป็นเวลา 5 นาที
- 3.9 ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย Hematoxylin เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.10 ล้างสารย้อมส่วนเกินออกโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านสไลด์เนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 นาที
- 3.11 แช่สไลด์เนื้อเยื่อใน 0.3% Ammonium Hydroxide เป็นเวลา 2 นาที
- 3.12 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ใน dH_2O เป็นเวลา 1 นาที
- 3.13 ทำการ Rehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ethanol จากความเข้มข้นน้อยไปมาก 70 70 95 95 100 และ 100% ตามลำดับโดยแช่ครั้งละ 5 นาที
- 3.14 ทำความสะอาดโดยแช่สไลด์ในสารละลาย cleaning reagent เป็นเวลา 5 นาที
- 3.15 ปิดสไลด์เนื้อเยื่อ โดยใช้ coverslip No. 1



ภาพผนวกที่ 7 ลักษณะของบอลลูกเนื้อเยื่อรังไข่



ภาพผนวกที่ 8 ลักษณะของสไลด์เนื้อเยื่อรังไข่

4. การวิเคราะห์ทาง Fluorescent Immunohistochemistry โดยใช้โปรตีน Factor VIII

การวิเคราะห์ทาง Fluorescent Immunohistochemistry โดยใช้โปรตีน Factor VIII เพื่อต้องการวิเคราะห์ปริมาณเส้นเลือดในฟอลลิเคิล โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 4.1 เตรียมตัวอย่างสไลด์เนื้อเยื่อรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลขนาด 7 μm (ภาพผนวกที่ 7 และ 8)
- 4.2 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลเพื่อนำเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้แช่สไลด์ในสารละลาย cleaning reagent จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 4.3 ทำการ dehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ethanol จากความเข้มข้นจากมากไปน้อย คือ 100 100 95 95 และ 70% ตามลำดับ โดยแช่ครั้งละ 5 นาที
- 4.4 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ใน dH_2O เป็นเวลา 5 นาที
- 4.5 แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย 10 mM PBS ที่มี 0.3% Triton X-100 เป็นเวลา 10 นาที
- 4.6 แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย 10 mM PBS เป็นเวลา 10 นาที (ภาพผนวกที่ 10)
- 4.7 ทำการป้องกันการเกิด Non-specific Staining โดยใช้สารละลาย Blocking buffer คือ 0.2% goat serum ใช้ปริมาณ 100 μl ต่อสไลด์ เป็นเวลา 20 นาที (ภาพผนวกที่ 9)
- 4.8 บ่มสไลด์เนื้อเยื่อโดยใช้ Primary antibody คือ Rabbit anti-factor VIII IgG (rabbit polyclonal; Sigma) ใช้ความเข้มข้น 1:100 และใช้ 0.2% goat serum เป็นตัวทำลาย ใช้ปริมาณ 100 μl ต่อสไลด์ บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4.9 แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย 10 mM PBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 4.10 บ่มสไลด์เนื้อเยื่อโดยใช้ Secondary antibody คือ Goat anti rabbit IgG (goat anti-rabbit IgG with Alexa Fluor Green 488; Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ใช้ความเข้มข้น 1:250 และใช้ 0.2% goat serum เป็นตัวทำลาย ใช้ปริมาณ 100 μl ต่อสไลด์ บ่มเป็นเวลา 45 นาที
- 4.11 ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ใน dH_2O เป็นเวลา 5 นาที
- 4.12 ปิดสไลด์เนื้อเยื่อโดยใช้ coverslip กับ mounting medium คือ Vectashield Hard Set with DAPI และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือด (Vascularity quantification)

การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือดโดยวิเคราะห์ทาง Fluorescent Immunohistochemistry โดยใช้โปรตีน Factor VIII ขั้นตอนดังนี้

- 5.1 นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการบ่มกับ Primary และ Secondary antibody มาถ่ายภาพโดยใช้กล้อง Zeiss Axiovert 200 fluorescent microscope (Zeiss, Thornwood, NY) เนื้อเยื่อ (ภาพผนวกที่

11) ใช้กำลังขยาย 5X โดยคัดเลือกถ่ายภาพเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณที่พบพอลลิเคิล ซึ่งต้องถ่ายให้ครอบคลุมทั้งชั้นเซลล์ทีกา และกรานูโลซา

5.2 สไลด์เนื้อเยื่อที่ถ่ายได้จากกล้อง fluorescent microscope จะมี 2 ภาพ คือ ภาพโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (ภาพผนวกที่ 12) และภาพฟลูออเรสเซนส์ที่ย้อมติดโปรตีน Factor VIII (ภาพผนวกที่

13) โดยภาพทั้งสองเป็นภาพแบบขาว-ดำ

5.3 ใช้โปรแกรม Axiovision version 4.8.1 software เพื่อใช้ในการนำภาพขาว-ดำ ทั้งสองภาพมาประกอบกัน (combine) เป็นภาพแบบสี ซึ่งมีทั้งโครงสร้างของเนื้อเยื่อ และภาพฟลูออเรสเซนส์สีเขียวที่ย้อมติดโปรตีน Factor VIII (ภาพผนวกที่ 14)

5.4 ภาพที่ผ่านการประกอบกัน (combine) จะมีขนาดประมาณ 0.025 mm^2 ต่อไฟล์ภาพ

5.5 นำภาพที่ถ่ายได้มาวิเคราะห์หาสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สีเขียวซึ่งจะย้อมติดโปรตีน Factor VIII โดยการวิเคราะห์จะพิจารณาจากฟลูออเรสเซนส์สีเขียวที่ย้อมติดเส้นเลือดที่บริเวณชั้นเซลล์ทีกาเท่านั้น (ในชั้น Stroma ไม่ได้นำมาวิเคราะห์) เนื่องจากในชั้นเซลล์กรานูโลซาจะไม่มีเส้นเลือด ดังนั้นจะไม่ติดฟลูออเรสเซนส์เขียวของ Factor VIII (ภาพผนวกที่ 15)

5.6 วิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือดจากการปรากฏของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สีเขียวที่ย้อมติด Factor VIII โดยใช้โปรแกรม Image-Pro Plus, version 4.5.1 software (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) ซึ่งมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

5.6.1 บันทึกไฟล์รูปภาพเป็นนามสกุล JPEG

5.6.2 เปิดโปรแกรม Image-Pro Plus และดาวน์โหลดไฟล์รูปภาพเพื่อเตรียมสำหรับการวิเคราะห์

5.6.3 กำหนดขอบเขตของเซลล์ชั้นทีกา และกรานูโลซา เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยอาศัยระบบปฏิบัติการในโปรแกรม Image-Pro Plus ในการเขียนเส้นขอบเขตของชั้นเซลล์ (ภาพผนวกที่ 16)

5.6.4 ตั้งค่าคำสั่งจากระบบปฏิบัติการในโปรแกรม Image-Pro Plus เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณที่ปรากฏของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สีเขียว

5.6.5 หลังจากนั้นทำการสั่งโปรแกรม Image-Pro Plus เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณพื้นที่ของเซลล์ชั้นทีกา และบริเวณเซลล์ชั้นทีกาที่มีเส้นเลือดที่ปรากฏของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เขียว โดยจากการประมวลผลของโปรแกรมจะแสดงผลออกมาเป็นค่าต่างๆ (ภาพผนวกที่ 17 และ 18) ดังนี้

(1) Range Statistics ประกอบด้วย

- 1) พื้นที่ทั้งหมด (Total Area) ของเซลล์ชั้นทีกา (พื้นที่สีเหลือง)
- 2) พื้นที่ทั้งหมด (Total Area) ของเส้นเลือดที่ปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สีเขียว (พื้นที่สีแดง)

(2) Locate the object ประกอบด้วย

- 1) เส้นรอบวง (Range)
- 2) จำนวนเส้นเลือดที่ปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สีเขียว (Samples)

5.6.6 นำค่าที่ได้จากโปรแกรม Image-Pro Plus มาคำนวณหาปริมาณของเส้นเลือดโดยมีค่าที่คำนวณดังนี้

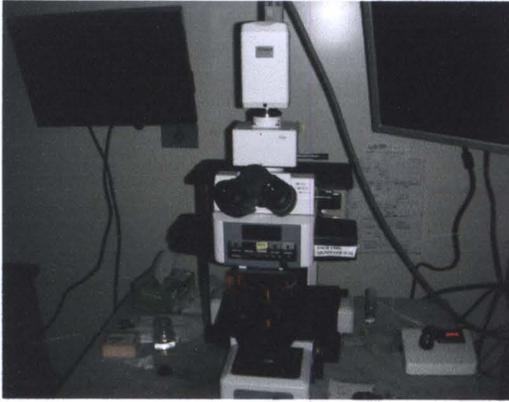
- (1) ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด (Capillary area density) (%) คำนวณจากพื้นที่เส้นเลือด (%) / พื้นที่ของชั้นทีกา (%)
- (2) ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด (Capillary number density) (no./ μm^2) คำนวณจาก จำนวนเส้นเลือด (no.) / พื้นที่ของชั้นทีกา (μm^2)
- (3) ความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด (Capillary surface density) ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) คำนวณจาก เส้นรอบวงของเส้นเลือด (μm) / พื้นที่ของชั้นทีกา (μm^2)
- (4) พื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด Area per capillary ($\mu\text{m}^2/\text{no.}$) คำนวณจากพื้นที่เส้นเลือด (μm^2) / จำนวนของเส้นเลือด (no.)



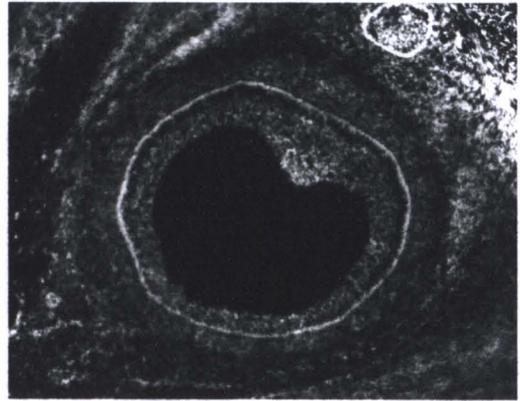
ภาพผนวกที่ 9 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียแบบฟลูออเรสเซนส์



ภาพผนวกที่ 10 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียแบบฟลูออเรสเซนส์



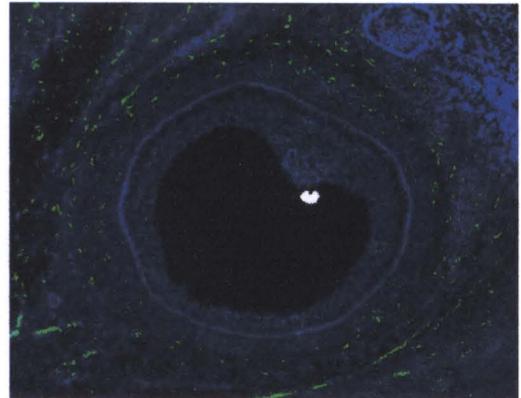
ภาพผนวกที่ 11 กล้องจุลทรรศน์ fluorescent microscope



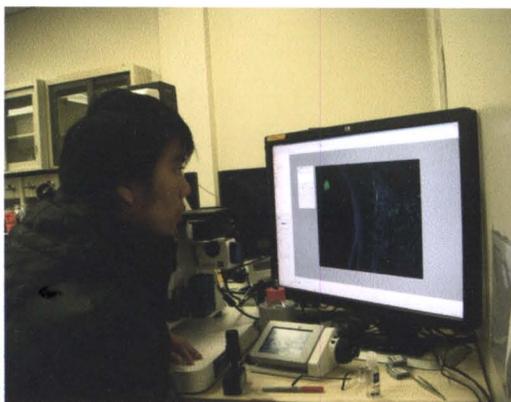
ภาพผนวกที่ 12 โครงสร้างของเนื้อเยื่อรังไข่



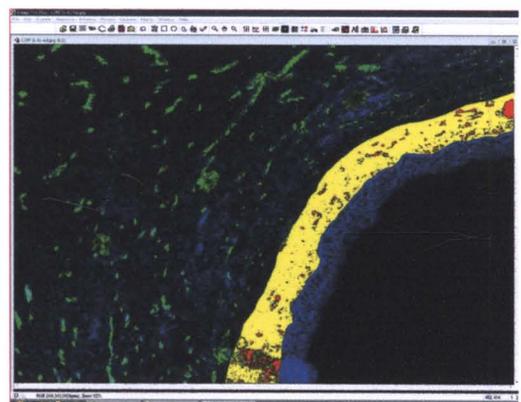
ภาพผนวกที่ 13 ฟลูออเรสเซนซ์ที่ย้อมติดโปรตีน Factor VIII



ภาพผนวกที่ 14 ภาพที่ผ่านการประกอบกันโดยใช้โปรแกรม Axiovision version 4.8.1



ภาพผนวกที่ 15 การวิเคราะห์การย้อมติด Factor VIII โดยสารฟลูออเรสเซนซ์ โดยโปรแกรม Axiovision version 4.8.1



ภาพผนวกที่ 16 การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Image-Pro Plus



