บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

รูปแบบการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างรกของหญิงตั้งครรภ์ที่มีการสะสมแคดเมียมในเลือด และรกในระดับต่ำเปรียบเทียบกับ โครงสร้างรกของหญิงตั้งครรภ์ที่มีการสะสมแคดเมียมในเลือด และรกในระดับสูงซึ่งเป็นการวิจัยเชิงทดลอง

กลุ่มตัวอย่างประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้มาจากกลุ่มของหญิงที่ฝากครรภ์ และคลอดภายในโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตากโดยมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกหญิงตั้งครรภ์ดังนี้

1. มีอายุระหว่าง 15 – 40 ปี
2. มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง
3. ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรม ได้แก่ ธาลัสซีเมีย เบาหวาน และกลุ่มอาการดาวน์
4. ไม่มีโรคประจำตัวได้แก่ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิตสูง โรคต่อมธัยรอยด์ และโรคมะเร็ง
5. ไม่มีโรคติดเชื้อขณะตั้งครรภ์ได้แก่ โรคเอดส์ ไวรัสตับอักเสบ หนองใน และวัณโรค
6. ไม่มีโรคแทรกซ้อนขณะตั้งครรภ์
7. ไม่สูบบุหรี่ และดื่มแอลกอฮอร์ขณะตั้งครรภ์

หญิงตั้งครรภ์ทุกคนมีคุณสมบัติตามเกณฑ์การคัดเลือก ต้องแสดงเจตน์จำนงว่ายินดีเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อเป็นหลักฐานในใบแสดงความยินยอม ที่ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ก่อนการดำเนินการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิจัย

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ขั้นตอนแรก รกที่ใช้ในการศึกษาต้องผ่านเกณฑ์ทั้งหมดดังที่กล่าวข้างต้น และทำการแบ่งกลุ่มโดยใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม มีปริมาณการสะสมแคดเมียมในเลือดมารดา ไม่เกิน 0.6 ไมโครกรัมต่อลิตร ($\leq$0.6μg/L) และปริมาณแคดเมียมในรก ไม่เกิน 8.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\leq$ 8.5μg/kg) เรียกว่ากลุ่ม low–Cd

2. กลุ่มทดลอง มีปริมาณการสะสมแคดเมียมในเลือดมารดามากกว่า 0.8 ไมโครกรัมต่อลิตร (≥0.8μg/L) และปริมาณแคดเมียมในรกมากกว่า 12 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (>12μg/kg) เรียกว่า กลุ่ม high–Cd

เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือ

1.1 ตู้ดูดควัน (fume hood) (Easy lab, Thailand)

1.2 เครื่องทำมีดแก้ว (glass knife maker) (LKB bromma, USA)

1.3 กล้องสเตอริโอ (stereo microscope) (Olympus, Japan)

1.4 แท่นทำความร้อน (hot plate) (Kunz instrument, USA)

1.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (analytical balance) (AND, Japan)

1.6 กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา (light microscope) (Olympus, Japan)

1.7 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบบางพิเศษ (ultra microtome) (Lieca, Germany)

1.8 เครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying machine; CPD) (Hitachi, Japan)

1.9 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Memmart, Germany)

1.10 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

1.11 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope)

1.12 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) (Shandon, England)

1.13 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อแบบอัตโนมัต (automatic tissue processor) (Shandon, England)

1.14 อ่างลอยชิ้นเนื้อ (floating tissue bath) (Shandon, England)

1.15 เครื่องขึ้นรูปพาราฟิน (paraffin embedding tissue machine) (Kunz instrument, USA)

1.16 เครื่องฉาบโลหะ (metal coating machine)

2. วัสดุไม่สิ้นเปลือง

2.1 เบ้ายาง (flat embedding mold)

2.2 แท่งไม้หรือเหล็กสำหรับวางบล็อค (BEEM capsule holder)

2.3 ช้อนหรือพายตักสารเคมี (stainless spatula)

2.4 ปากคีบปลายแหลมคม (fine-point forcep)

2.5 พู่กันเบอร์ 0 (hair brush no.0)

2.6 เลื่อยขนาดเล็ก (small bone saw/hand saw)

2.7 ตัวกรองขนาดเล็ก (filter holder unit)

2.8 แท่นวางชิ้นเนื้อแห้ง (stub)

2.9 ที่ใส่แผ่นสไลด์สำหรับการย้อมสี (staining rack)

2.10 โถสำหรับการย้อมสี (staining jar)

2.11 ฝาปิดเนื้อเยื่อ (metal lid)

2.13 บล็อกขึ้นรูป (bio mold)

2.14 ตะเกียงแอลกอฮอร์ (alcohol burner)

2.15 ถาดวางสไลด์ (slide tray)

2.16 นาฬิกาจับเวลา (timer)

3. วัสดุสิ้นเปลือง

3.1 พาราฟิล์ม (parafilm)

3.2 กระดาษกรอง (filter paper)

3.3 กระดาษไขสำหรับชั่ง (wax paper)

3.4 แผ่นอลูมินัม (aluminum wrapping foil)

3.5 แบบขึ้นรูปเรซิน (BEEM capsule)

3.6 กริดทองแดง (copper grid) ขนาด 100, 150 และ 200 ช่อง

3.7 หลอดฉีดยาพลาสติก (plastic syring grade) ขนาด 10–20 ซีซี

3.8 ขวดใส่ตัวอย่างขนาดเล็ก (sample bottle)

3.9 ใบมีดโกนแบบสองคม (razor blade, double-edged)

3.10 ไม้จิ้มฟัน (tooth pit)

3.11 เครื่องดูดสารด้วยแรงดัน (pressure pipette)

3.12 แผ่นสไลด์แบบฝ้า (glass slide)

3.13 กระจกปิดสไลด์ (cover slit)

3.14 ใบมีดสำหรับเครื่องไมโครโตม (microtome blade)

3.15 ดินสอ (pencil)

3.16 บล็อกสำหรับงาน LM (microtome block)

4. **เครื่องแก้ว** (Glassware)

4.1 volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

4.2 erlenmeyer flask ขนาด 100, 500, 2000 มิลลิลิตร

4.3 cylinder ขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร

4.4 ขวดแก้วสีน้ำตาลฝาเกลียว ขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร

4.5 ขวดแก้วใสฝาเกลียว ขนาด 100, 500 มิลลิลิตร

5. **สารเคมี**

5.1 2, 4, 6 tridomethyllamino methyl phenol (DMP-30) (EMS, USA)

5.2 25% Glutaraldehyde ($OHCC_3H_6CHO$) (EMS, USA)

5.3 absolute ethanol (CH_3CH_2OH) (EMS, USA)

5.4 amyl acetate ($CH_3COO(CH_2)_4CH_3$) (Fisher, Germany)

5.5 araldite 502 (EMS, USA)

5.6 calcium chloride (CaCl) (EMS, USA)

5.7 disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.H_2O$) (Merck, Germany)

5.8 dodencenyl succinic anhydride (DDSA) (EMS, USA)

5.9 eosin (Histological stain, Thailand)

5.10 epon 812 (EMS, USA)

5.11 formaldehyde (CH_2O) (Labscan, Belgium)

5.12 glucose ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)

5.13 hematoxylin (Histological stain, Thailand)

5.14 hydrochloride acid (HCL) (Merck, Germany)

5.15 lead citrate ($Pb(NO_3)_2$) (Unilab, UK)

5.16 nadic methyl anhydride (NMA) (EMS, USA)

5.17 osmium trioxide (OsO_4) (EMS, USA)

5.18 paraformaldehyde ($HO(CH_2O)nH$) (Sigma, USA)

5.19 permount (Fisher, England)

5.20 potassium chloride (KCl) (Merck, Germany)

5.21 propylene oxide (CH_3CHCH_2O) (Fluca, USA)

5.22 sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)

5.23 sodium citrate ($Na_3(C_6H_5O_7.H_2O)$) (Merck, Germany)

5.24 sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) (Merck, Germany)

5.25 sodium hydroxide (NaOH) (Sigma, USA)

5.26 sodium tetraborate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) (Merck, Germany)

5.27 sulphuric acid concentrate (H_2SO_4) (Merck, Germany)

5.28 toludine blue (Fluka, USA)

5.29 uranyl acetate ($UO_2(CH_3OCO)_2.H_2O$) (EMS, USA)

5.30 xylene ($C_6H_4C_2H_6$) (Merck, Germany)

วิธีการศึกษาวิจัย

ขั้นตอนการปฏิบัติการในเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope; LM)

1. นำชิ้นเนื้อรกที่ได้จากการเก็บตัวอย่างโดยตัดเป็นชิ้นขนาดไม่เกิน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (≤ 1 ซม^3)

2. คงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 10 % nutrient buffer formalin เป็นเวลา 4 ชั่วโมงขึ้นไป (> 4 ชม.)

3. ดึงน้ำออกด้วย 70 % alcohol นาน 2 ชั่วโมง

4. ดึงน้ำออกด้วย 80 % alcohol นาน 2 ชั่วโมง

5. ดึงน้ำออกด้วย 90 % alcohol นาน 2 ชั่วโมง

6. ดึงน้ำออกด้วย 95 % alcohol นาน 2 ชั่วโมง

7. ดึงน้ำออกด้วย absolute alcohol นาน 2 ชั่วโมง

8. แช่ในสารตัวกลางโดยใช้ xylene นาน 4 ชั่วโมง

9. แช่ใน paraffin เหลว นาน 4 ชั่วโมง

10. นำชิ้นเนื้อที่ได้นำไปขึ้นรูป (embedding) ด้วย paraffin เป็นพาราฟินบล็อกตามขนาดที่ต้องการ

11. นำพาราฟินบล็อกที่ได้นำไปวางบนแท่นเย็น และนำไปใส่ที่ตัวจับบล็อกที่เครื่อง microtome

12. ทำการปาดหน้า (trimming) พาราฟินบล็อกเพื่อให้ชิ้นเนื้อเต็มหน้าสไลด์

13. ทำการตัดชิ้นเนื้อพาราฟินบล็อกที่ความหนา 4 ไมโครเมตร แล้วนำมาลอยในอ่างลอยชิ้นเนื้อ

14. นำแผ่นสไลด์แก้วมาช้อนแผ่นเนื้อเยื่อที่ลอยอยู่ในอ่างลอยชิ้นเนื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง

15. วางสไลด์แก้วบนแท่นร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

16. ทำการย้อมเนื่อเยื่อในสไลด์แก้ว โดยเริ่มจากการละลาย paraffin ที่ติดมากับสไลด์แผ่นชิ้นเนื้อโดยแช่ใน xylene นาน 5 นาที

17. นำน้ำเข้าสู่ชิ้นเนื้อเยื่อโดยจุ่มสไลด์แก้วใน absolute alcohol 2 รอบ ๆ ละ 10 ครั้ง (dip)

18. จุ่มสไลด์แก้วใน 95 % alcohol 2 รอบ ๆ ละ 10 ครั้ง (dip)

19. แช่สไลด์แก้วในน้ำกลั่นนาน 1 นาที

20. แช่สไลด์แก้วใน hematoxylin นาน 5 นาที

21. ล้างสีส่วนเกินในชิ้นเนื้อเยื่อโดยจุ่มสไลด์แก้วในน้ำปะปา (tap water) จนสีส่วนเกินออกหมด

22. จุ่มสไลด์แก้วใน 1% lithium carbonate 10 ครั้ง (dip)

23. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วด้วยน้ำประปา 1 นาที

24. ย้อมสีเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์แก้วในสี eosin นาน 20 วินาที

25. ล้างสี eosin ส่วนเกิน โดยจุ่มสไลด์แก้วในน้ำประปา จนสีส่วนเกินออกหมด

26. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์แก้วใน 95 % alcohol 2 รอบ ๆ ละ 5 ครั้ง (dip)

27. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์แก้วใน absolute alcohol 2 รอบ ๆ ละ 5 ครั้ง (dip)

28. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์แก้วใน xylene นาน 1 นาที

29.ทำการปิด cover slip โดยใช้ permount เป็นตัวเชื่อมติดแล้วรอให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้อง LM

ขั้นตอนการปฏิบัติการในเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

1. คงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 2% glutaraldehyde เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง (> 4 ชม.)
2. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (buffered solution) นาน 15 นาที จำนวน 4 ครั้ง
3. คงสภาพชิ้นเนื้อส่วนที่เป็นไขมันด้วย osmium tetraoxide นาน 1–2 ชั่วโมง
4. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (buffered solution) นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง
5. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 50% ethyl alcohol นาน 10 นาที
6. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 70% ethyl alcohol นาน 10 นาที
7. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 80% ethyl alcohol นาน 10 นาที
8. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 95% ethyl alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

9. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย absolute alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
10. แช่ชิ้นเนื้อในสารที่เป็นตัวกลาง โดยใช้ เอมิลอะซีเตท (amyl acetate) นาน 20 นาที
11. ทำให้แห้งโดยเครื่อง CPD
12. ติดตัวอย่างบนแท่นวางชิ้นเนื้อ (stub)
13. นำตัวอย่างที่ติดบน stub ไปเคลือบด้วยโลหะโดยเครื่องฉาบโลหะ (metal coating)
14. ศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้อง SEM

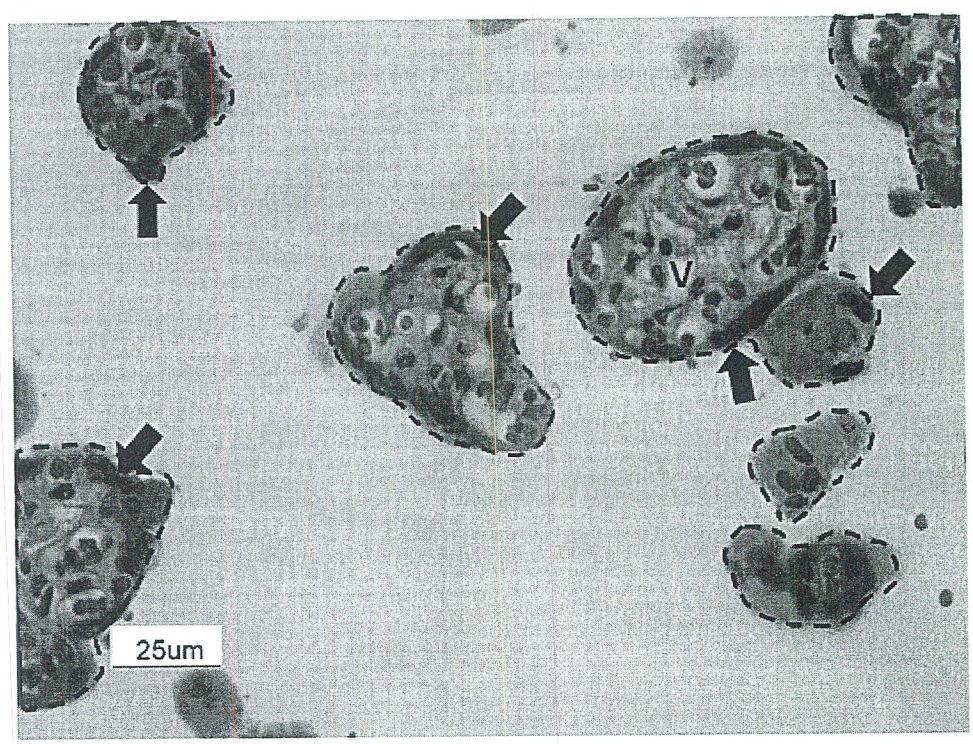
ขั้นตอนการปฏิบัติการในเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)

1. คงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 2% glutaraldehyde เป็นเวลา 4 ชั่วโมงขึ้นไป (> 4 ชม.)
2. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นาน 15 นาที จำนวน 4 ครั้ง
3. คงสภาพชิ้นเนื้อส่วนที่เป็นไขมันด้วย osmium tetraoxide นาน 1–2 ชั่วโมง
4. ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง
5. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 50% ethyl alcohol นาน 10 นาที
6. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 70% ethyl alcohol นาน 10 นาที
7. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 80% ethyl alcohol นาน 10 นาที
8. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย 95% ethyl alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
9. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย absolute alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
10. เตรียมตัวอย่างในตัวกลาง เพื่อนำพลาสติกเข้าสู่ชิ้นเนื้อด้วย propylene oxide เวลา 10 นาที
11. นำพลาสติกเข้าสู่ชิ้นเนื้อ อัตราส่วน embedding 1 ส่วนต่อ propylene oxide 3 ส่วน (1: 3) เวลา 1 ชั่วโมง
12. นำพลาสติกเข้าสู่ชิ้นเนื้อ อัตราส่วน embedding 1 ส่วนต่อ propylene oxide 1 ส่วน (1: 1) เวลา 1 ชั่วโมง
13. นำพลาสติกเข้าสู่ชิ้นเนื้อ อัตราส่วน embedding 3 ส่วนต่อ propylene oxide 1 ส่วน (3: 1) เวลา 1 ชั่วโมง
14. นำพลาสติกเข้าสู่ชิ้นเนื้อ โดยแช่ในสาร embedding ทิ้งไว้ 1 คืน
15. ขึ้นรูปชิ้นเนื้อด้วยสาร embedding เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
16. นำชิ้นเนื้อที่ขึ้นรูปมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแบบบางพิเศษ ที่ความหนาประมาณ 90 นาโนเมตร
17. ย้อมชิ้นเนื้อตัดบางด้วย uranyl acetate และ lead citrate

18. นำไปศึกษาภายใต้กล้อง TEM

วิธีการศึกษาจำนวน syncytial knot **ต่อพื้นที่** villus

1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง LM ที่กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 30 ภาพต่อกลุ่ม
2. ใช้โปรแกรม imageJ ในการวัดพื้นที่จากภาพถ่ายจากกล้อง LM
3. นับจำนวน syncytial knot ทั้งหมดที่เห็นในภาพ (ลูกศรในภาพ 12) จดบันทึกไว้
4. ใช้โปรแกรมวัดพื้นที่ของ villus ทั้งหมด (ภาพ 12) ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นตารางพิกเซล
5. แปลงค่าหน่วยจากตารางพิกเซล เป็นตารางไมโครเมตร โดยใช้อัตราส่วนที่ปรากฏบนภาพถ่าย
6. เมื่อได้ค่าแล้วนำมาพิจารณาค่าการแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาความแตกต่างที่ $p<0.05$



ภาพ 12 แสดงการหาพื้นที่ทั้งหมดของ villus (V, พื้นที่ในเส้นประ) และ syncytial knot (ลูกศรชี้)

วิธีการศึกษาพื้นที่ syncytial knot **ต่อพื้นที่** villus

1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง LM ที่กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 30 ภาพต่อกลุ่ม
2. ใช้โปรแกรม imageJ ในการวัดพื้นที่จากภาพถ่ายจากกล้อง LM

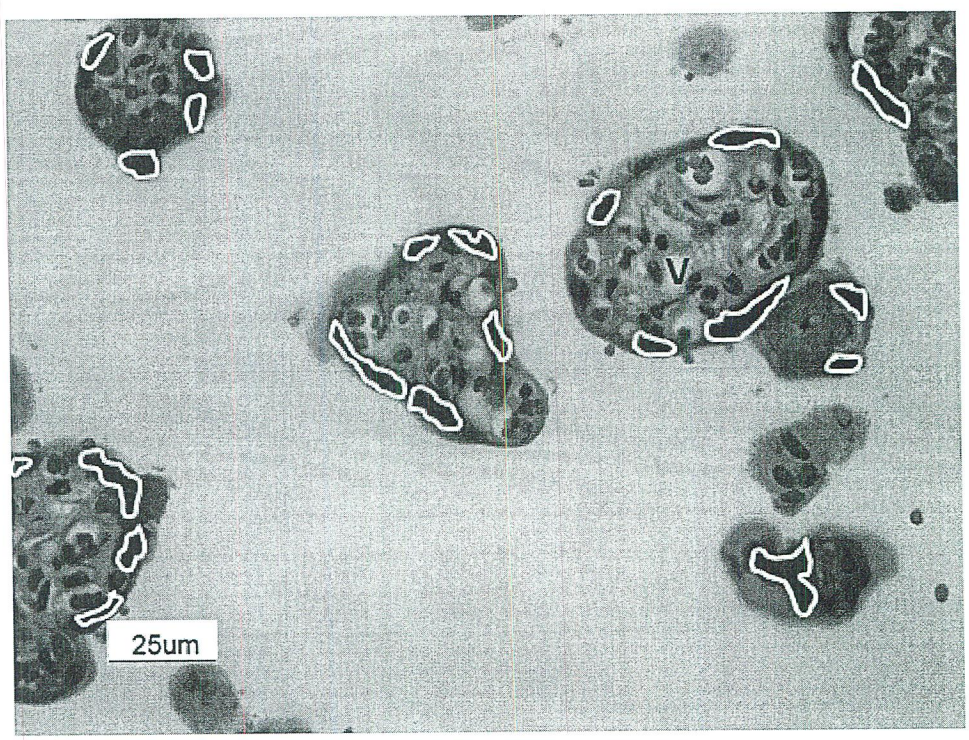
3. ใช้โปรแกรมวัดพื้นที่ของ syncytial knot ทั้งหมด (ภาพ 13) ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นตารางพิกเซล

4. ใช้โปรแกรมวัดพื้นที่ของ villus ทั้งหมด (ภาพ 12) ค่าที่ได้จะเป็นหน่วย ตารางพิกเซล

5. แปลงค่าหน่วยจากตารางพิกเซล เป็นตารางไมโครเมตร โดยคำนวณจากอัตราส่วนที่ปรากฏบนภาพถ่าย LM ทั้งพื้นที่ของ syncytial knot และ villus

6. นำพื้นที่ syncytial knot มาคำนวณเป็นค่าร้อยละต่อพื้นที่ villus

7. นำค่าที่คำนวณได้มาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$



ภาพ 13 แสดงการหาพื้นที่ทั้งหมดของ syncytial knot **(ที่เส้นล้อมรอบ) ที่พบใน** villus (V)

วิธีการศึกษาพื้นที่ fibrinoid material **ต่อพื้นที่** villus

1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง LM ที่กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 30 ภาพต่อกลุ่ม
2. ใช้โปรแกรม imageJ ในการวัดพื้นที่จากภาพถ่ายจากกล้อง LM

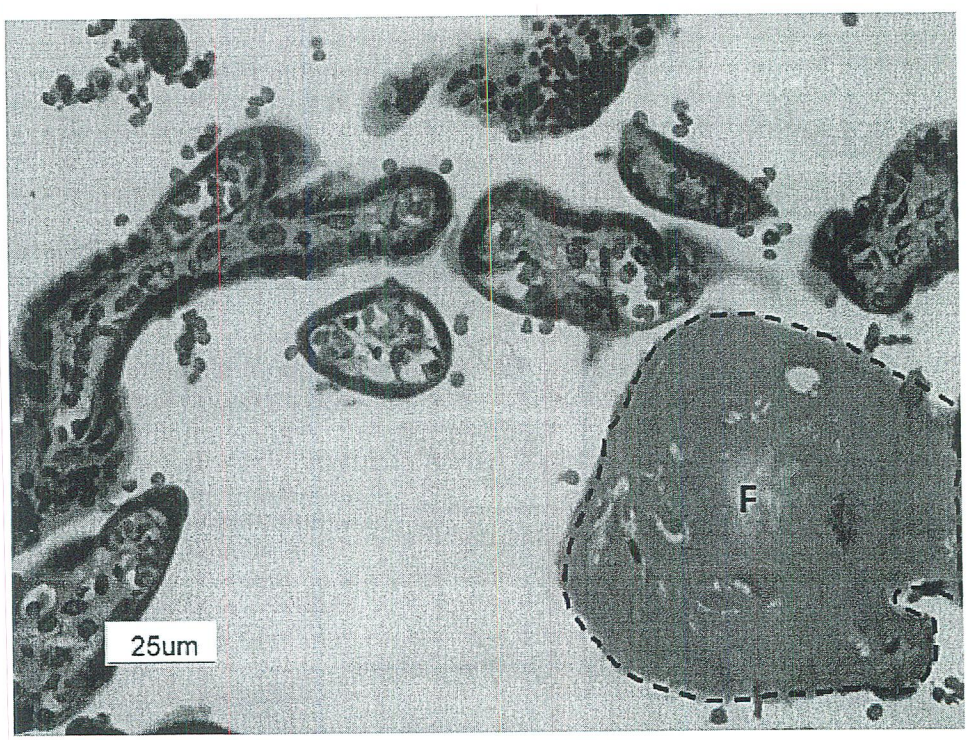
3. ใช้โปรแกรมวัดพื้นที่ของ fibrinoid material ทั้งหมด (ภาพ 14) ค่าที่ได้จะเป็นหน่วยตารางพิกเซล

4. ใช้โปรแกรมวัดพื้นที่ของ villus ทั้งหมด (ภาพ 12) ค่าที่ได้จะเป็นหน่วย ตารางพิกเซล

5. แปลงค่าหน่วยจากตารางพิกเซล เป็นตารางไมโครเมตรโดยใช้อัตราส่วนที่ปรากฏบนภาพถ่าย ทั้งพื้นที่ของ syncytial knot และ villus

6. นำพื้นที่ fibrinoid material มาคิดค่าร้อยละต่อพื้นที่ villus

7. เมื่อได้ค่าแล้วนำมาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$



ภาพ 14 แสดงการหาพื้นที่ทั้งหมดของ fibrinoid material (F, พื้นที่ในส้นปะ)

วิธีการศึกษาความยาว และความกว้างของ terminal villus

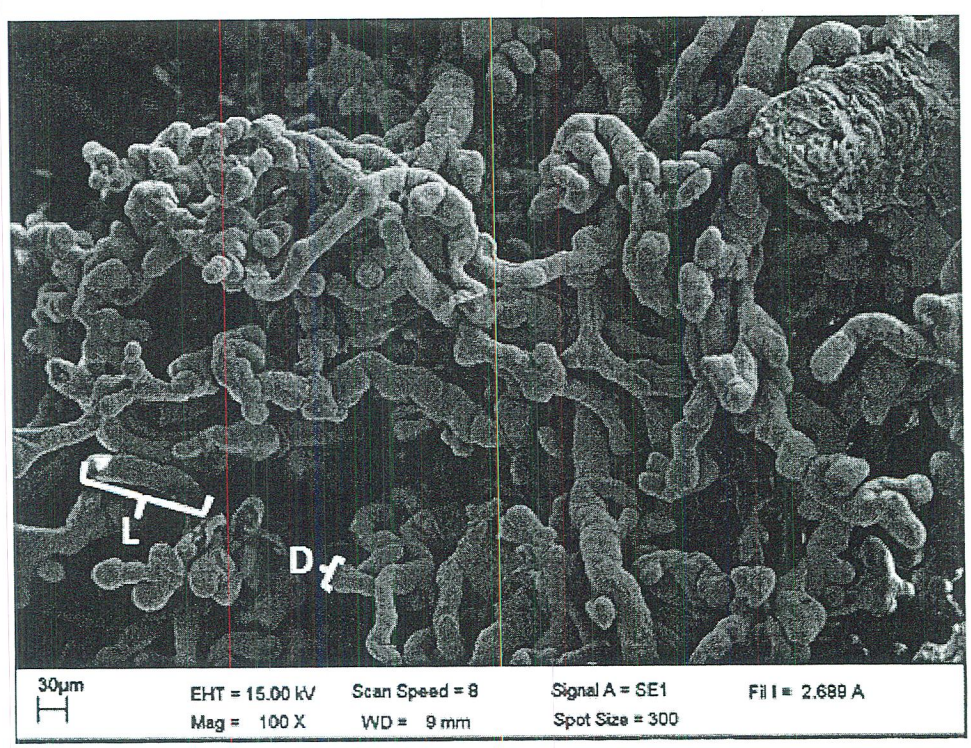
1. ใช้ถ่ายภาพ SEM ที่กำลังขยายเท่ากันทุกภาพ จำนวน 54 ภาพต่อกลุ่ม โดยแต่ละภาพทำการวัดความกว้าง และความหนา 10 terminal villi ต่อภาพ

2. ใช้โปรแกรม imageJ ในการวัดพื้นที่จากภาพถ่าย SEM

3. ใช้โปรแกรมวัดความยาวและความกว้างของ terminal villus โดยเลือกจากภาพที่ไม่มีการแตกแขนงอีก การวัดความยาววัดตั้งแต่จุดที่มีการแตกแขนงสุดท้ายจนถึงปลายสุดของ terminal villi และการวัดความกว้างก็ใช้หลักเกณฑ์เดียวกันในการเลือก terminal villi ดังภาพ 15 ค่าที่ได้จะมีหน่วยความยาวพิกเซล

4. แปลงค่าหน่วยจากตารางพิกเซล เป็นตารางไมโครเมตร โดยคำนวณจากอัตราส่วนที่ปรากฏบนภาพถ่าย

5. นำค่าที่คำนวณได้ทั้งหมดของความยาว และความหนาของ terminal villus มาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$



ภาพ 15 แสดงการวัดความยาว (L) และความหนา (D) ของ terminal villus

วิธีการศึกษาความหนาของ placenta barrier

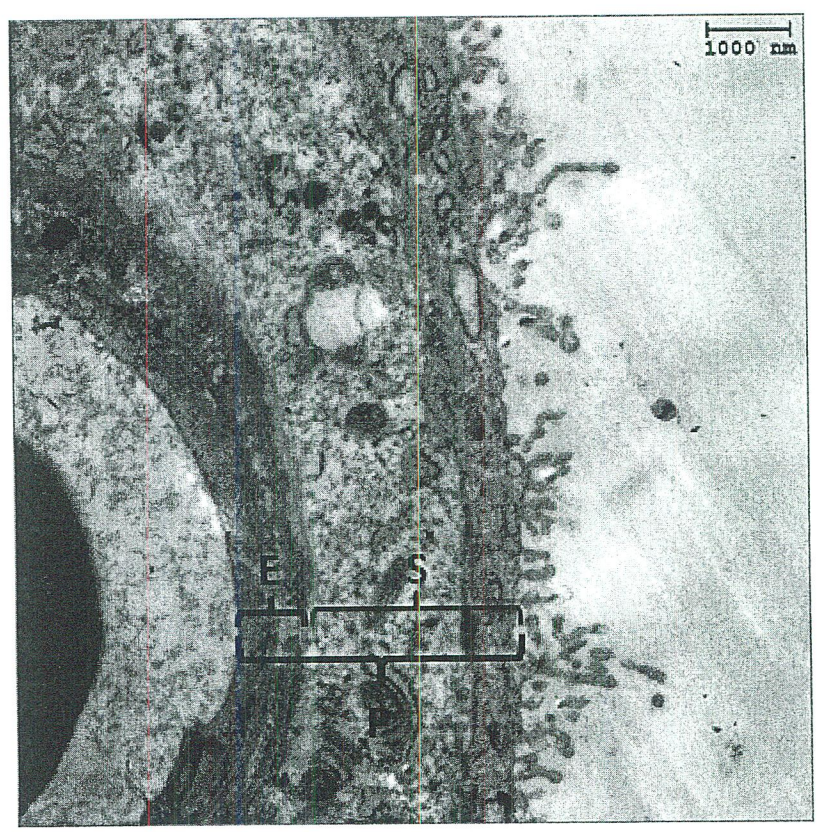
1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 2500 เท่า จำนวน 60 ภาพต่อกลุ่ม

2. ใช้โปรแกรม imageJ วัดระยะความหนาจากภาพถ่ายจากกล้อง TEM

3. เลือกบริเวณของ placental barrier ที่บางที่สุด และไม่มีส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ปรากฏอยู่ในบริเวณนั้น

4. วัดระยะจากขอบด้านในสุดของ endothelial cell จนถึงขอบด้านนอกของเซลล์ syncytiotrophoblast โดยไม่รวมส่วนของ microvilli ตามที่แสดงในภาพ 16

5. เมื่อได้ค่าความหนาของ placental barrier นำมาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$



ภาพ 16 แสดงการวัดความหนาของ placental barrier (P) syncytial layer (S) **และ** endothelial cell (E)

วิธีการศึกษาความหนาของ syncytial layer

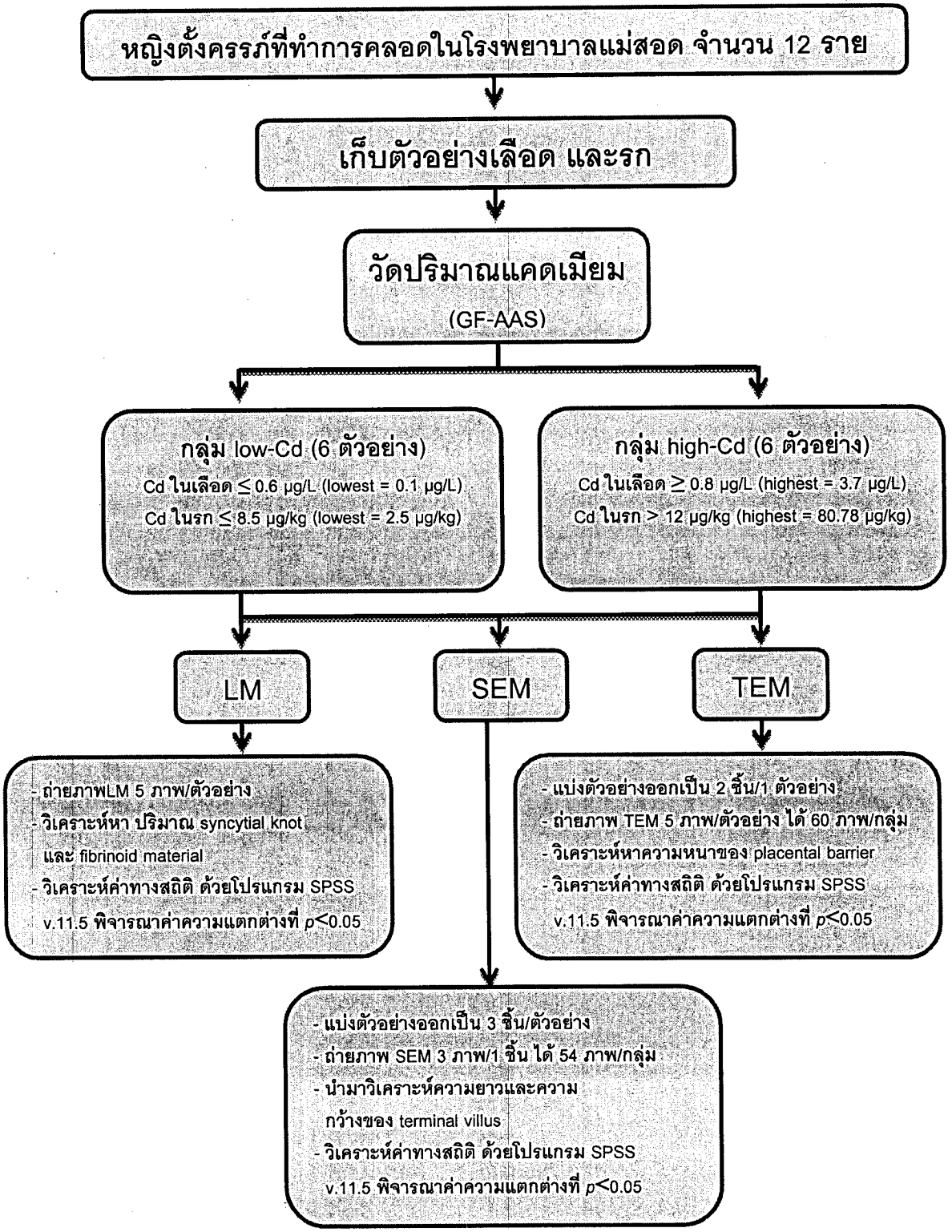
1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 2500 เท่า จำนวน 60 ภาพต่อกลุ่ม
2. ใช้โปรแกรม imageJ วัดระยะความหนาจากภาพถ่ายจากกล้อง TEM
3. เลือกบริเวณเดียวกับการวัดความหนาของ placental barrier
4. วัดระยะจาก basement membrane จนถึงขอบด้านนอกของ เซลล์ syncytiotrophoblast โดยไม่รวมส่วนของ microvilli ตามที่แสดงในภาพ 16
5. นำค่าที่คำนวณได้มาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$

วิธีการศึกษาความหนาของ endothelium ของ fetal capillary

1. ใช้ภาพถ่ายจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 2500 เท่า จำนวน 60 ภาพต่อกลุ่ม
2. ใช้โปรแกรม imageJ วัดระยะความหนาจากภาพถ่ายจากกล้อง TEM
3. เลือกบริเวณเดียวกับการวัดความหนาของ placental barrier
4. วัดระยะจากขอบด้านในสุดของ endothelial cell จนถึงขอบด้านนอกของ endothelial cell โดยไม่รวมส่วนของรอยต่อระหว่างเซลล์ของ endothelial cell กับ cytotrophoblast ตามภาพ 16
5. นำค่าที่คำนวณได้มาพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม low-Cd และกลุ่ม high-Cd ด้วยโปรแกรม SPSS V.11.5 เปรียบเทียบโดยใช้ t-test และพิจารณาค่าความแตกต่างที่ $p<0.05$

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. ใช้โปรแกรม SPSS V.11.5 ในการวิเคราะห์
2. ใช้ค่า mean±SEM โดยเปรียบเทียบแบบ t-test ในการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม
3. ใช้ independent t-test ในการวิเคราะห์
4. การเปลี่ยนแปลงจะพิจารณาที่ $p<0.05$



ภาพ 17 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย