บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือปลักไทยเพศเมีย จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยตรวจสอบประวัติของสัตว์ เช่น อายุ การตั้งท้อง หรือการมีลูก (ถ้ามี) จากเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 40 ตัว โดยอวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือปลักไทยเพศเมียแต่ละตัวจะแยกเก็บใส่ในถุงพลาสติก ติดเบอร์ แล้วใส่กล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ซึ่งสามารถเก็บรักษาสภาพของอวัยวะให้สดตลอดเวลา จนมาถึงสถานที่ที่ทำการชันสูตรภายใน 30-45 นาที หลังจากนั้นจะแยกรังไข่ (ovaries) ทั้งสองข้างของกระบือปลักไทยเพศเมียแต่ละตัว เพื่อตรวจสภาพโดยทั่วไปและตรวจสอบระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด โดยแบ่งเป็น 2 ระยะที่สำคัญคือ ระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) จำนวน 20 ตัว และระยะลูเทียลช่วงกลาง (mid-luteal phase) จำนวน 20 ตัว จำแนกตามลักษณะและขนาดของคอร์ปัสลูเทียม รวมทั้งขนาดของถุงฟอลลิเคิลเด่น (dominant follicle) ที่ปรากฏอยู่บนผิวของรังไข่ตามที่ได้มีการศึกษาผ่านมาโดย Ali และคณะ (2003)

ตรวจสภาพทางมหกายวิภาคทั่วไปของท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียที่เก็บมา เมื่อไม่พบความผิดปกติใดๆ จึงตัดเก็บท่อนำไข่ทั้งสองข้าง และแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) อิสธ์มัส (isthmus) แอมพูลลา (ampulla) และอินฟันดิบูลัม (infundibulum) โดยตัดแต่ละส่วนให้มีความยาวประมาณ 2 ซม. โดยข้างหนึ่งเก็บไว้ใน 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ สำหรับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาทั่วไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยการย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) การตรวจสอบหา GAGs ชนิดต่างๆ รวมทั้ง Fas และ FasL ด้วยวิธีฮิสโตเคมีและวิธีทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี ส่วนท่อนำไข่อีกข้างหนึ่งจะบรรจุไว้ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อแล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างในกลุ่มควบคุมบวกสำหรับการวิจัยที่เกี่ยวกับ Fas และ FasL จะใช้ต่อมน้ำเหลืองของกระบือเพื่อเป็นสไลด์ในการตรวจสอบ

การศึกษาด้วยวิธีฮิสโตเคมีและอิมมูนโนฮิสโตเคมี

เลือกท่อนำไข่ส่วนต่างๆ คือ UTJ อิสธ์มัส แอมพูลลา และอินฟันดิบูลัม ของกระบือปลักทั้ง 2 ระยะๆ ละ 10 ตัว มาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ตามวิธีมาตรฐานทั่วไป โดยใส่ตัวอย่างท่อนำไข่ทั้ง 4 ส่วน วางลงใน 1 บล็อกพาราฟิน และตัดชิ้นตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร แล้วนำมาวางลงบนสไลด์แก้ว แต่ละสไลด์จะนำมาผ่านกระบวนการดังต่อไปนี้

- นำย้อมด้วยสี H&E เพื่อการตรวจสอบความสมบูรณ์ทางสัณฐานวิทยาทั่วไป
- นำมาผ่านกระบวนการทางฮิสโตเคมี เพื่อตรวจการปรากฏของไฮยาลูโรแนน
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูน์โนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจการปรากฏของซัลเฟตไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์ (S-GAGs) ในรูปของเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอไกลแคนส์ซึ่งประกอบด้วย syndecan-1 และ syndecan-2
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูนโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจสอบหาตัวรับของไฮยาลูโรแนน CD44
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาโปรตีน Fas
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาโปรตีน FasL

ใช้กระบวนการฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาการปรากฏของไฮยาลูโรแนนโดยใช้ biotinylated hyaluronan binding protein (HABP) (Seikagaku Corp., Japan) ที่ความเข้มข้น 1:100 (5 µg/ml) และผ่านเทคนิค avidin biotin complex (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) สำหรับสไลด์ negative control จะใช้ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ incubate ด้วย biotinylated HABP แต่จะใช้ phosphate buffer saline (PBS) buffer แทนที่ หรืออาจนำมา incubate ด้วย *Streptomyces hyaluronidase* (Sigma, St. Louis, MO, USA) ก่อนที่จะมา incubate ด้วย biotinylated HABP

กระบวนการทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี ใช้เทคนิค avidin-biotin-peroxydase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ซึ่งเป็นเทคนิคในการศึกษาการปรากฏของ syndecans, Fas และ FasL ที่อาจปรากฏในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักไทย โดยชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วจะนำมาวางลงบนสไลด์แก้ว Super-Frost นำมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี โดยใช้ primary antibody ที่แตกต่างกันไป

สำหรับการตรวจหา syndecans ซึ่งจะใช้ syndecan-1 (monoclonal mouse anti-human antibody, DL-101, sc-12765, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 1:100 และ syndecan-2 (monoclonal mouse anti-human antibody, 1F10/b8, sc-73516, Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:100 เป็น primary antibodies สำหรับ control slides จะใช้ normal horse serum ทดแทนการ incubate ด้วย primary antibody

ในการศึกษาการปรากฏของ CD44 จะใช้ monoclonal mouse anti-human CD44 (phagocytic glycoprotein-1, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:50 เป็น primary antibody สำหรับ control slides จะใช้ normal horse serum ทดแทนการ incubate ด้วย primary antibody

ในขณะที่การตรวจหาการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL จะใช้ primary antibody คือ Fas (monoclonal mouse anti-human antibody, B-10, Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:100 ในการตรวจหาการปรากฏของ Fas ขณะที่ Fas Ligand (polyclonal rabbit anti-rat antibody, N-20; Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:200 นำมาใช้ในการตรวจหา FasL สำหรับสไลด์ negative controls จะใช้การแทนที่ primary antibodies ด้วย mouse IgM (Serotec, Oxford, UK) สำหรับ Anti-Fas และแทนที่ด้วย mouse IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) ขณะที่ ชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากต่อมน้ำเหลืองของโคจะนำมาใช้เป็น positive controls สำหรับ Fas และ FasL

กระบวนการขั้นต่อไปของเทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมีนี้ คือ การใช้ secondary antibodies ที่จำเพาะและขั้นตอนของ avidin-biotin-peroxydase (Vectastain ABC-Elite, Vector Laboratories) จากนั้น ชิ้นเนื้อที่ได้ทั้งหมดจะผ่านการ incubate ด้วย 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DAKO, Glostrup, Denmark) ใน 3% hydrogen peroxide จากนั้น นำมาด้วยด้วย hematoxylin และปิดทับชิ้นเนื้อด้วย gelatin-glycerin สไลด์ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมด นำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) ซึ่งมีกล้องดิจิตอลสำหรับการถ่ายภาพติดตั้งพร้อมโปรแกรมการถ่ายภาพ (ImagePro6, Tokyo, Japan)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 8 ส.ค. 2556
เลขทะเบียน 245507
เลขเรียกหนังสือ

การแสดงออกของ FasL mRNA ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำท่อนำไข่กระบือปลักไทยอีกข้างหนึ่งทั้งระยะฟอลลิคูลาร์ (n=5) และระยะลูเทียลช่วงกลาง (n=5) ที่เก็บรักษาไว้ที่ -20°C แบ่งออกเป็น UTJ อิสธ์มัส แอมพูลลา อินฟันดิบูลัม ทำการเปิดผ่าตามยาวและขูด (scratch) เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ออกด้วยสันของใบมีดผ่าตัด นำเซลล์เยื่อบุที่ได้จากท่อนำไข่แต่ละส่วนมาสกัดเพื่อให้ได้ RNA โดยใช้ Rneasy mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) สำหรับการสังเคราะห์ cDNA และ PCR จะใช้ Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) ในส่วนของ primers ที่ใช้ designed สำหรับ bovine FasL (Sigma-Genosoys Ltd., Pampisford, Cambridgeshire, UK) โดย sense และ anti-sense-specific primers คือ sense 5'-TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CA-3' และ anti-sense 5'-ACT GCC CCC AGG TAG CTG CTG-3' (Genebank accession number U95844) สำหรับ beta-actin เพื่อใช้เป็น internal positive control และใช้ในการคำนวณความสัมพันธ์ในการปรากฏของ FasL จะใช้ primer คือ 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GACC-3' และ reverse primer 5'-ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCAG-3' number U95844) แถบความเข้มที่ได้จะนำมาตรวจสอบโดยใช้ densitometric scanning using NIH Image, version 1.62, free software (NIH, Bethesda, MD, USA) และความสัมพันธ์ในการปรากฏของ FasL จะแปรผลในรูปสัดส่วนของ FasL : β-actin

การประเมินและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในกลุ่มของชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยวิธีฮิสโตเคมีและอิมมูนโนฮิสโตเคมี จะนำมาวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างด้วยกำลังขยายต่างๆ กัน เพื่อสังเกตและประเมินผลความเข้ม (intensity) ของการติดสีบวก (positive staining) ในส่วนต่างๆ ของท่อนำไข่ จะใช้การประเมินแบบ semi-quantitative evaluation ดังนี้ เกรด - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)

สำหรับระดับความเข้มของ Fas และ FasL จะนำมาเปลี่ยนเป็นตัวเลข รวมทั้ง ความเข้มของ FasL จะประเมินโดยการใช้สัดส่วนของความเข้มของ FasL: beta-actin ซึ่งจะออกมาเป็นตัวเลขเช่นเดียวกัน จากนั้น นำข้อมูลที่ได้ไปประเมินผลและวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลทางสถิติจะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance (PROC MIXED หรือ GLM) จากโปรแกรม SAS version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) และวิธีอื่นๆ ที่เหมาะสมตามลักษณะของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จากผู้เชี่ยวชาญทางด้านสถิติชีวภาพโดยตรง โดยค่า *P*-values<0.05 จะนำมาพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ