

วิธีดำเนินการศึกษา

(Methods)



1. การตรวจดูลักษณะภายนอก

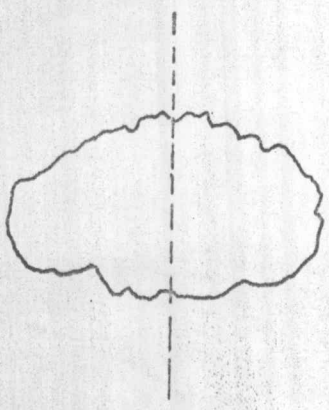
แมื่อถึงทุกตัวได้รับการตรวจดูลักษณะภายนอก เช่น การปรากฏของ sexual skin และประจำเดือนตลอดเวลาที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลอง ส่วนดูถึงนับจำนวนพันไว้

2. การ Autopsy

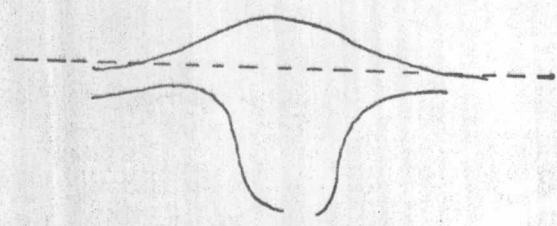
ถึงทุกตัวถูกฉีดด้วยสารละลายของ Sodium barbital ที่เตรียมใหม่ ๆ ให้เกินขนาดประมาณ 400 - 500 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักตัวเข้าที่บริเวณของท้องหรือเข้ากล้ามเนื้อบริเวณใกล้ ๆ โคนหางเพื่อให้ตาย ชั่งน้ำหนักตัวของแม่อู ลูก บันทึกไว้ แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตรวจดูลักษณะภายนอกของรังไข่ มดลูก ตักรังไข่ มดลูกไว้ศึกษาโครงสร้างภายใน แล้วเปิดหนังที่บริเวณใกล้หัวนม ไขกระดูกและปากคืบเลาะคอมม่านมที่อยู่ใต้ผิวหนังบริเวณนั้น ตัดออกมาศึกษาโครงสร้างภายในด้วย

3. การทำ Serial section ของรังไข่ มดลูก และคอมม่านม

นำรังไข่ มดลูก คอมม่านมที่ต้องการศึกษา fix ในน้ำยา Kahle's AFA (ethyl alcohol 70% 90 ml + formaldehyde 40% 5 ml + glacial acetic acid 5 ml) เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน 70% alcohol อีกประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป dehydrate ใน 80% alcohol, 95% alcohol, 95% alcohol + butyl alcohol, butyl alcohol 1, butyl alcohol 2, butyl alcohol + xylool, xylool 1, xylool 2 ตามลำดับขั้นละ 2 ชั่วโมง นำ tissue ไปใส่ในส่วน



Ovary



Uterus

Diagram of x-section.

ผสมของ xylo1 + paraplast ที่หลอมเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้บ
 สูญญากาศ ที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซนติเกรด แล้วเปลี่ยน paraplast
 2 ครั้ง ครั้งแรก 12 ชั่วโมง ครั้งที่สอง 2 ชั่วโมง ในตู้บสูญญากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ
 35 องศาเซนติเกรด หลังจากนั้นนำ tissue มา embed ใน paraplast

การตัด section สำหรับรังไข่ตัดหนา 8 ไมครอนตามแนวขวางกึ่งแผน
 ภาพและทำเป็น serial section มดลูกตัดหนา 6 ไมครอน ตามแนวขวางเช่นกัน
 ค้อมนํานมตัดหนา 6 ไมครอน ย้อมด้วย Ehrlich acid haematoxylin และ
 eosin นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะและขนาดของ follicle,
 corpus luteum ของรังไข่ เนื้อเยื่อ endometrium ของมดลูก และลักษณะ
 alveoli ของค้อมนํานม แล้วทำ photomicrograph

4. การศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่

เนื้อเยื่อรังไข่ที่ศึกษาได้มุ่งตรวจดูลักษณะที่เปลี่ยนแปลงของ follicles
 ขนาดใหญ่และ corpus luteum

4.1 Follicles

ศึกษารายละเอียดภายใน follicles ที่มี antrum พบว่าเป็น
 atretic follicle ทั้งหมดตามเกณฑ์พิจารณาลักษณะของ atretic
 follicle ที่พบในรังไข่ของ rhesus monkey อธิบายโดย Sturgis (1949)

ระยะ atresia ของ follicle แบ่งออกได้ 3 ระยะ

1. ระยะแรกของ atresia ระยะนี้พบว่าเริ่มมี

pycnotic nuclei เกิดขึ้นที่บริเวณของค่านในของชั้น granulosa ก่อน แล้ว
 เกิด chromatolysis ตามมา คั้งนั้นจะพบ granulosa cell ที่สลายตัว
 แล้วโดยเฉพาะบริเวณ cumulus oophorus ลอยอยู่ใน antrum จากนั้นจะเกิด

chromatolysis ขึ้นในทุก ๆ ส่วนของชั้น granulosa รวมทั้งบริเวณที่ติดกับ
ฐานของ follicle กว้าง ส่วนบริเวณ theca interna พบว่าหนาและมี
ลักษณะ hypertrophic

2. ระยะที่สองของ atresia เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลง
เกิดขึ้นในไข่ เริ่มด้วย zona pellucida อาจแตกออก ไข่มีลักษณะหีบและหด
ตัว ทั้งที่รูปร่างไม่แน่นอนและไม่สม่ำเสมอ พบ granulosa cell ที่สลายตัว
แล้วกระจายอยู่ใน antrum บริเวณ theca interna เกิด grass
membrane หรือ hyaloid membrane ขึ้น

3. ระยะที่สามของ atresia เริ่มต้นด้วยการสลายตัวของไข่
มีมากขึ้น และต่อมา follicle มีการหดตัว hyaloid membrane เกิดการพับตัว
ขึ้น fibroblastic network ที่อยู่ภายใน cavity ของ follicle ถูก
กลืนหายไปหมดเหลือแต่ hyaloid band ที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเท่านั้น

การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและปริมาตรของ follicles

ตรวจดูทุก 10 section แล้ววัดขนาดของ follicle จาก
section ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicle ที่ใหญ่ที่สุดด้วย ocular
micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer โดยวัดเป็นสองแนวตั้งฉาก
กันจากขอบ theca externa ด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง นำค่าที่ได้เฉลี่ยกันเป็นขนาด
ของเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicle ที่ต้องการ follicle ที่มีขนาดเส้นผ่า
ศูนย์กลางตั้งแต่ 0.8 มิลลิเมตร ถึง 1.00 มิลลิเมตรขึ้นไป วัดความลึกโดยการนับ
จำนวน section แล้วคำนวณหาปริมาตรของ follicle จากสูตร

$$\text{ปริมาตร} = \left(\frac{4}{3} \pi\right) ab^2$$

$$a = \frac{\text{ความลึก}}{2}$$

$$b = \text{รัศมี}$$

4.2 Corpus luteum

ศึกษาลักษณะทั่ว ๆ ไปของ corpus luteum โดยเทียบกับลักษณะของ corpus luteum ที่พบในรังไข่ของ rhesus monkey อธิบายโดย Corner et al (1942, 1945) และวัดขนาดของ corpus luteum ค่าย

Corpus luteum ที่พบในรังไข่ของ rhesus monkey มี 4 ชนิด

1. Corpus luteum of cycle เป็น corpus luteum ที่เกิดขึ้นหลังจากตกไข่ ในระยะ 1 - 12 วันหลังจากตกไข่ granulosa lutein cell มีขนาดเล็กถึง มี cytoplasm น้อย nuclei ที่พบ lipid vacuole ขนาดเล็กรวมกันอยู่หนาแน่น บริเวณผนัง lutein cell พบเส้นเลือดกระจายตลอด และเกิด connective tissue ขึ้นใน cavity เมื่อไม่มีการตั้งครรภ์เกิดขึ้น corpus luteum จะเริ่มสลายตัวประมาณ วันที่ 13 หลังจากตกไข่ เกิด lipid vacuole ขนาดใหญ่มากขึ้นใน granulosa luteum cell เส้นเลือด collapse ในระยะ menstrual พบว่าเกิด pycnotic nuclei และมีการแตกเกิดขึ้น ต่อมาเกิดการสลายตัวของ cytoplasm ในระยะสุดท้ายพบว่ามีแต่ cytoplasmic debris เล็กน้อยเท่านั้นที่คงเหลืออยู่ในช่องว่างของ cell

2. Corpus luteum of pregnancy เป็น corpus luteum of cycle ที่เปลี่ยนไปเป็น pregnancy type เมื่อเกิดการตั้งครรภ์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นประมาณวันที่ 19 - 24 หลังจากตกไข่ ขนาดของ lutein cell เล็กน้อยกว่าเดิม cytoplasm เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่พบ lipid vacuole เลย พบเส้นเลือดฝอยกระจายเป็นร่างแห ที่ cell ของ theca interna เห็นได้ชัดเจน typical pregnancy ของ corpus luteum จะคงอยู่จนถึง 146 วัน ของการตั้งครรภ์ หลังจากนั้นจะเริ่มสลายตัว

3. Corpus aberran เป็น corpus luteum อีกแบบหนึ่งที่พบในรังไข่ของ rhesus monkey เกิดจาก corpus luteum of cycle ที่ไม่สลายตัว Corner (1942) แบบนี้พบว่าไม่สร้างฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน ลักษณะของ lutein cell แตกต่างจาก lutein cell ของ corpus luteum of pregnancy คือ ผนังของ lutein cell พับเนื่องจากการหดตัวของ lutein tissue cell ของ theca interna เห็นได้ชัดที่ฐานพับและที่ขอบของ corpus พบเส้นเลือดที่ขยายตัวเป็นจำนวนมาก อายุของ corpus aberran นี้ไม่ทราบแน่นอน

4. Accessory corpora lutea เป็น corpus luteum อีกแบบหนึ่งที่พบในรังไข่ของ rhesus monkey เช่นกัน เกิดจาก follicle ที่ไม่แตกออกมี luteinization ขึ้น ดังนั้นอาจพบไข่ที่สลายตัวแล้วคงอยู่ แบบนี้พบว่าอาจสร้างฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนได้ แต่มีปริมาณน้อย เกิดขึ้นพร้อม ๆ กับ corpus luteum of cycle

5. การศึกษาเนื้อเยื่อของมดลูก

5.1 ลักษณะเนื้อเยื่อ endometrium ศึกษาโดยเปรียบเทียบกับลักษณะเนื้อเยื่อ endometrium ของ rhesus monkey ที่อธิบายโดย Bartelmez (1951) และวัดความหนาของ endometrium ง่าย

Endometrial cycle มี 4 ระยะ คือ

1. Proliferative phase เป็นระยะครั้งแรกของ cycle เริ่มตั้งแต่ระยะปลายของ menstrual flow ในระยะเริ่มแรกของ follicular phase ซึ่งไม่พบ follicle ขนาดใหญ่ในรังไข่ endometrium หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เป็นอย่างมากประกอบด้วย epithelial cell แบบ columnar

พบ mitosis เกิดขึ้นทั้งใน epithelium cell และใน stroma. uterine gland ล้วน ตรง แคบ เมื่อมี graafian follicle เกิดขึ้น endometrium มีความหนาประมาณ 3 - 4 มิลลิเมตร uterine gland ยาว ลึก เนื่องจากมี secretion พวก mucin และ glycogen สะสมอยู่

2. Secretory phase เป็นระยะหลังจากที่มีการตกไข่เกิดขึ้นแล้ว epithelium ที่ผิวและที่ gland สูง และเป็น pseudostratified ใน ระยะปลายของ luteal phase ซึ่งพบ corpus luteum เจริญโตเต็มที่ใน รังไข่ endometrium จะหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ถึง 5 มิลลิเมตร epithelium ที่ผิวบางลง แต่ uterine gland ยาว และขดไปมา (tortuous) บาง gland ยาวมาก พบว่ามี glycogen อยู่ภายใน

3. Menstrual phase เป็นระยะต่อจาก luteal phase ความหนาของ endometrium ลดลงมากอาจน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร เนื่องจากเกิดการสลายตัวขึ้น ดังนั้นจะพบเส้นเลือดที่ collapse และเนื้อเยื่อที่ สลายแล้วเป็นจำนวนมากภายใน uterine lumen บริเวณผิวของ epithelium มีลักษณะ denuded

4. Repair phase เป็นระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นก่อนสิ้นสุด external bleeding เริ่มควาระยะ arrest ก่อนจากนั้นบริเวณผิวของ epithelium ตรงปาก gland จะมี cell แบบ squamous หรือ columnar เดี่ยว ๆ เกิดขึ้นไม่พบ mitosis เลยในระยะนี้

5.2 การตรวจ glycogen ในเนื้อเยื่อ endometrium ของมดลูก

นำเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษามา fix ทันทีใน Lillie's neutral buffered formalin (sodium acid phosphate monohydrate 4.0 กรัม + disodium phosphate anhydrous 6.5 กรัม + commercial

formalin 100 ml + น้ำกลั่น 900 ml) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา
 ประมาณ 72 ชั่วโมง นำไป dehydrate ใน alcohol เช่นเดียวกับการทำ
 serial section ในข้อ 2 นำ tissue มา embed ใน paraplast
 ตัดหนา 6 ไมครอน ย้อมสี Periodic Acid Schiff reagent, alcian
 blue, best carmine เพื่อตรวจสอบความมี glycogen ในเนื้อเยื่อ
 endometrium หรือไม่

6. การศึกษาเนื้อเยื่อของต่อมน้ำนม

ศึกษาลักษณะและขนาดของ alveoli กับเปรียบเทียบปริมาณ
 secretion ภายใน alveoli ของต่อมน้ำนม ระหว่าง lactation
 119 วัน ถึง 200 วัน

001446

การศึกษา

การศึกษารังไข่ซึ่งตัวเมียทั้งหมด 25 ตัว เป็นสิ่งที่อยู่ในระหว่าง lactation 23 ตัว และถึงปกติที่ตรวจพบประจำเดือนครั้งแรก 2 ตัว แบ่งการศึกษาเป็นกลุ่มดังนี้

1. ศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่หลังจากตรวจพบประจำเดือนครั้งแรก

ใช้ถึงปกติ 2 ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

- 1.1 ศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่ 6 - 7 วัน ของ follicular phase จำนวน 1 ตัว
- 1.2 ศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่ 10 - 11 วัน ของ follicular phase จำนวน 1 ตัว

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ follicle ขนาดใหญ่กับปริมาณของ follicle ที่พบในรังไข่แม่ถึงระหว่าง lactation 1 - 200 วัน ว่ามีความแตกต่างเกิดขึ้นหรือไม่

2. ศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่ เนื้อเยื่อ endometrium ในมดลูก ระหว่าง lactation

ใช้ถึงทั้งสิ้น 23 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

- 2.1 ศึกษาระหว่าง lactation 1 วัน ถึง 4 วัน จำนวน 5 ตัว
- 2.2 ศึกษาระหว่าง lactation 10 วัน ถึง 12 วัน จำนวน 3 ตัว
- 2.3 ศึกษาระหว่าง lactation 41 วัน ถึง 51 วัน จำนวน 6 ตัว



- 2.4 ศึกษาระหว่าง lactation 85 วัน ถึง 119 วัน จำนวน 2 ตัว
- 2.5 ศึกษาระหว่าง lactation 145 วัน ถึง 155 วัน จำนวน 4 ตัว
- 2.6 ศึกษาระหว่าง lactation 180 วัน ถึง 200 วัน จำนวน 3 ตัว

หมายเหตุ กลุ่มที่ 2.4 ถึง 2.6 ศึกษาลักษณะ ขนาด alveoli และปริมาณ secretion ภายใน alveoli ของต่อมน้ำนมด้วย

ในการศึกษาเพื่อตรวจดูลักษณะ ปริมาตรของ follicle ขนาดใหญ่ ลักษณะ ขนาดของ corpus luteum of pregnancy ขึ้นในรังไข่ระหว่าง lactation 1 วัน ถึง 200 วัน ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรบ้าง โดยเปรียบเทียบ กับลักษณะ ความหนาของเนื้อเยื่อ endometrium ในมดลูก