สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สุกรสาวและการจัดการ

สุกรสาวพันธุ์ LY ที่ยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์และถูกคัดทิ้งเนื่องจากปัญหาการไม่เป็นสัดจำนวน 30 ตัว จากฟาร์มสุกรขนาด 900-3,500 แม่ จำนวน 4 แห่ง ในจังหวัด ชลบุรี จันทบุรี สระบุรี และอุดรธานี สุกรสาวในการศึกษาทุกตัวมีข้อมูล เบอร์หู พันธุ์ วันเกิด อายุ น้ำหนักที่คัดทิ้ง วันที่นำเข้าฝูง ประวัติการทำวัคซีน ประวัติการเป็นสัด วันที่และสาเหตุการคัดทิ้ง

สุกรสาวได้รับการนำเข้าฝูงที่น้ำหนัก 80-100 กิโลกรัม เลี้ยงจำนวน 6-15 ตัวต่อคอก มีพื้นที่ต่อตัว 1.5-2.0 ตารางเมตร ให้อาหารปริมาณ 3 กิโลกรัม/ตัว/วัน (วันละ 2 ครั้ง) อาหารมีส่วนประกอบหลักของข้าวโพด ถั่วเหลือง และปลาป่น (โปรตีนหยาบ 16-18% ไลซีน 0.85-1.10% พลังงาน 3,000-3,250 กิโลแคลอรี/กิโลกรัม) ได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร โรคปากและเท้าเปื่อย โรคพิษสุนัขบ้าเทียม และโรคติดเชื้อพาร์โวไวรัส ที่อายุประมาณ 22-30 สัปดาห์ และบางฟาร์มมีการทำวัคซีนป้องกันโรคโพรงจมูกอักเสบ โรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบติดต่อ และโรคติดเชื้อมัยโคพลาสมาในสุกร ร่วมด้วย นำสุกรสาวเข้าทดแทนฝูงแม่พันธุ์ที่อายุประมาณ 32 สัปดาห์ แสดงอาการเป็นสัดมาแล้วอย่างน้อย 2 ครั้ง และน้ำหนักตัวอย่างน้อย 130 กิโลกรัม สุกรสาวได้รับการตรวจสัดวันละ 2 ครั้งโดยใช้พ่อสุกรร่วมกับวิธี back pressure test

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ดำเนินการวิจัยโดยวิธี observational retrospective study ทำการชันสูตรซากสัตว์ทางพยาธิวิทยา (post-mortem examination) และเตรียมชิ้นเนื้อตามกระบวนการทางพยาธิวิทยาเพื่อตรวจลักษณะทางจุลกายวิภาค ศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุโพรงมดลูกทางจุลกายวิภาค และตรวจระดับฮอร์โมน E_2 และ P_4 ในซีรั่มของสุกรสาวที่ศึกษาทุกตัว

การเก็บรวบรวมข้อมูลและตัวอย่าง

นำอวัยวะระบบสืบพันธุ์สุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ ส่งเข้าห้องปฏิบัติการชันสูตรที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใน 24 ชั่วโมง มีการขนส่งโดยการบรรจุภายในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งเพื่อปรับอุณหภูมิระหว่างการขนส่งให้อยู่ประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส ทำการ

ตรวจชันสูตรเบื้องต้นทางมหพยาธิวิทยา (gross pathology) แยกอวัยวะระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ออกเป็น รังไข่ ท่อนำไข่ มดลูก และคอมดลูก ตรวจความผิดปกติต่างๆ บันทึก ขนาด (ความยาว) และ น้ำหนัก เปิดผ่าภายในตามแนวยาวเพื่อตรวจความผิดปกติของเนื้อเยื่อบุโพรงมดลูก และคอมดลูก ด้วยตาเปล่า ทำการบันทึกลักษณะปรากฏ เช่น การบวมน้ำ การคั่งเลือด การพบสิ่งคัดหลั่งหรือหนองภายในโพรงมดลูก และคอมดลูก ตรวจช่องคลอด อวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก และกระเพาะปัสสาวะ ตรวจการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะทุกชิ้นจากลักษณะทางมหพยาธิวิทยาและทางจุลพยาธิวิทยา

จากการตรวจลักษณะของรังไข่ แบ่งกลุ่มสุกรสาวออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ10 ตัวอย่าง คือ

กลุ่มที่ 1 สุกรสาวระยะฟอลลิเคิล (follicular phase) พบฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ขนาด ≥7 มิลลิเมตรบนรังไข่ และมีคอร์ปัสอัลบิแคน (CA)

กลุ่มที่ 2 สุกรสาวระยะลูเตียล (luteal phase) พบ CL บนรังไข่

กลุ่มที่ 3 สุกรสาวระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ (pre-puberty) ที่ไม่พบ CL บนรังไข่

กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาด 1X3 เซนติเมตร จากส่วนต้น กลาง และท้ายของผนังปีกมดลูกทั้งสองข้าง ตัวมดลูก และคอมดลูก ตำแหน่งละ 1 ตัวอย่าง ทำการดองชิ้นเนื้อใน 10% neutral buffer formalin เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อให้ใกล้เคียงกับสภาพเมื่อยังมีชีวิตที่สุด จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการล้าง (washing) ด้วยน้ำประปาที่เปิดให้ไหลผ่านตลอดเวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อล้าง 10% neutral buffer formalin จากนั้นเข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ที่เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง การเคลียริ่ง (clearing) เพื่อทำให้เนื้อเยื่อแข็งแรงและเตรียมพร้อมก่อนการแทรกซึมของพาราฟินโดยใช้ไซลีน จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) โดยกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเหล่านี้ใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) (REICHERT JUNG HISTOKINETTE 2000®, Cambridge Instruments company, UK) ทำการฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (embedding) ทำการตัดชิ้นเนื้อ (sectioning) โดยใช้ไมโครโตม (microtome) (SHANDON AS 325 RETRACTION®, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) ให้ได้ความหนาของชิ้นเนื้อประมาณ 5 ไมโครเมตร จากนั้นทำการติดชิ้นเนื้อบนสไลด์

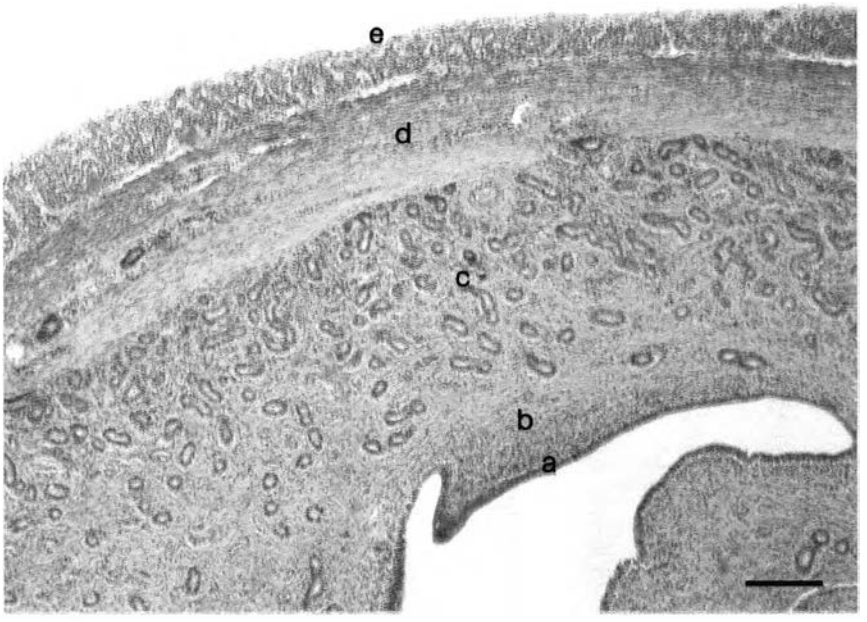
(affixing) เมื่อชิ้นเนื้อแห้งสนิท นำเข้าสู่กระบวนการย้อมสี (staining) ด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (H&E) และปิดด้วย cover glass (mounting)

การเก็บซีรั่มและการตรวจฮอร์โมน

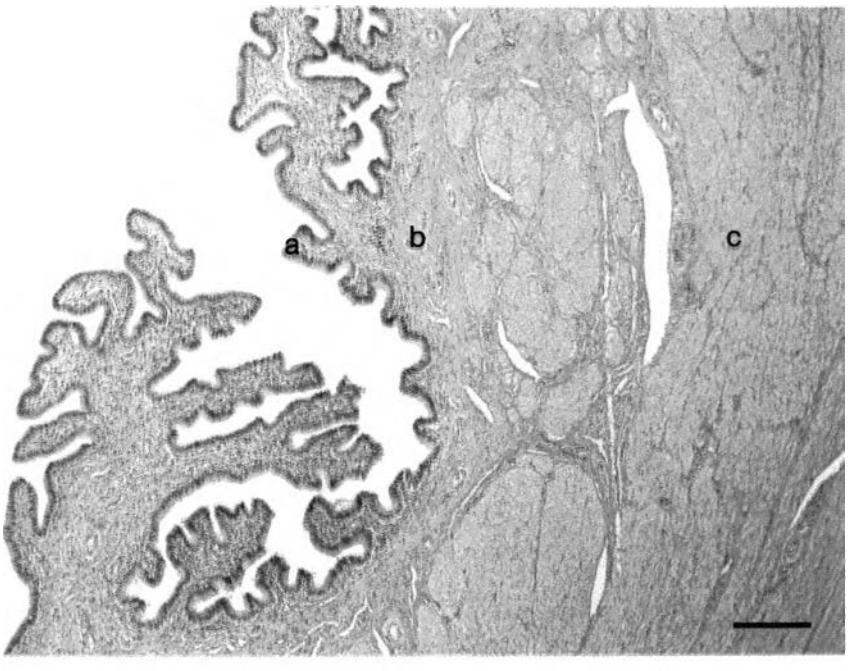
เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ก่อนทำการคัดทิ้งสุกรสาวทุกตัว ประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บเลือดในหลอดทดลองโดยไม่ใช้สารกันเลือดแข็งตัว นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่งโมง นำเลือดที่แข็งตัวแล้วไปปั่นเพื่อแยกซีรั่มด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (1,160 x g) เป็นเวลา 10 นาที เก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปตรวจระดับ E_2 ในซีรั่มด้วยวิธี electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys Cobas®, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) ตามวิธีการที่รายงานโดย Johnson และคณะ (1993) ระดับของ P_4 ในซีรั่ม ตรวจด้วยวิธี solid-phase ^{125}I-radioimmunoassay โดยใช้ชุดตรวจ (Coat-A-Count®, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA) ตามวิธีการที่รายงานโดย Tummaruk และคณะ (2004)

ลักษณะทางจุลกายวิภาค

ดำเนินการตรวจและศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคทั้งหมดที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยสุกรแต่ละตัวอย่างจะทำการศึกษาทั้งหมด 8 ตำแหน่งของมดลูก คือ ส่วนต้น กลาง ท้าย ของปีกมดลูกทั้งสองข้าง ตัวมดลูกและคอมดลูก ในแต่ละชิ้นเนื้อจะตรวจ 20 พื้นที่ (microscopic fields) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope) กำลังขยาย 100X และ 400X ร่วมกับการใช้ ocular micrometer (ocular reticule) ชนิด 25 ช่อง ในการนับจำนวนเซลล์ โดยมีพื้นที่ขนาด 15,625 ตารางไมโครเมตร (กำลังขยาย 400X) และพื้นที่ขนาด 250,000 ตารางไมโครเมตร (กำลังขยาย 100X) เนื้อเยื่อบุโพรงมดลูกที่นำมาศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นเยื่อบุผิว ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิว และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของต่อมมดลูก (รูปที่ 4) และแบ่งส่วนของเนื้อเยื่อบุคอมดลูกออกเป็น 2 ชั้นคือ ชั้นเยื่อบุผิว และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิว (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ลักษณะชั้นต่างๆ ของผนังมดลูกสุกร, (a) surface epithelium; (b) subepithelial layer; (c) glandular layer; (d) myometrium; (e) perimetrium (กำลังขยาย 40X), แถบ= 200 μm



รูปที่ 5 ลักษณะชั้นต่างๆ ของผนังคอมดลูกสุกร, (a) surface epithelium; (b) subepithelial layer; (c) myometrium (กำลังขยาย 40X), แถบ= 200 μm

โดยในแต่ละพื้นที่ ทำการศึกษาและบันทึกข้อมูลในชั้นต่างๆ ของเนื้อเยื่อบุโพรงมดลูกและคอมดลูกตามพารามิเตอร์ ดังนี้

1. ลักษณะของเยื่อบุผิวโพรงมดลูกและคอมดลูก ได้แก่ เยื่อบุแบบ pseudostratified columnar, simple columnar หรือ simple cuboidal และลักษณะ mitotic figure
2. ความสูงของเยื่อบุผิวโพรงมดลูกและคอมดลูก วัดตั้งแต่ basement membrane ถึงชั้น surface บนสุด โดยใช้โปรแกรม Image-Pro Plus version 6.0 (Media Cybernatics Inc., MD, USA) ทำการวัด 20 ตำแหน่ง ที่กำลังขยาย 400X
3. จำนวนต่อมมดลูกภายในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของต่อมมดลูก นับ 20 พื้นที่ กำลังขยาย 100X
4. จำนวนหลอดเลือดตัดตามขวางของมดลูกและคอมดลูก นับ 20 พื้นที่ กำลังขยาย 400X
5. จำนวน secretory vesicle ภายในต่อมมดลูก กำลังขยาย 400X โดยให้คะแนนเป็น
   - 0 = ไม่พบ
   - 1 = พบเล็กน้อย
   - 2 = พบปานกลาง
   - 3 = พบมาก
6. ลักษณะการบวมน้ำของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิว กำลังขยาย 100X โดยให้คะแนนเป็น
   - 0 = ไม่พบ
   - 1 = พบเล็กน้อย
   - 2 = พบปานกลาง
   - 3 = พบมาก
7. จำนวนลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิลและ แมคโครฟาจ ภายในชั้นเยื่อบุผิวโพรงมดลูกและคอมดลูก นับ 20 พื้นที่ กำลังขยาย 400X
8. จำนวนลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ อิโอซิโนฟิล และพลาสมาเซลล์ ที่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิวโพรงมดลูกและคอมดลูก นับ 20 พื้นที่ กำลังขยาย 400X
9. จำนวนลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ อิโอซิโนฟิล และพลาสมาเซลล์ ที่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของต่อมมดลูก นับ 20 พื้นที่ กำลังขยาย 400X

บันทึกรูปตามพารามิเตอร์ที่กล่าวมาข้างต้น โดยกล้องถ่ายรูปชนิดต่อกับกล้องจุลทรรศน์ (MicroPublisher RTV camera®, QImaging, BC, Canada)

คำจำกัดความลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว

ลักษณะของเซลล์ และลักษณะทางจุลกายวิภาค ที่ย้อมสีด้วยสี H&E และวิธี Wright-Giemsa stain มีคำจำกัดความ ดังนี้

ลิมโฟไซต์ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง มี 2 ขนาด คือ ขนาดเล็ก 6-9 μm และขนาดใหญ่ 9-15 μm มีขนาดเล็กกว่านิวโทรฟิล เซลล์รูปร่างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม รูปไข่ หรือมีรอยเว้าเล็กน้อย ติดสีเข้ม น้ำเงิน-ม่วง โครมาตินมีหลายลักษณะตั้งแต่แน่นไปจนถึงลักษณะกระจาย มีลักษณะหยาบ ไซโตพลาสมล้อมรอบน้อยมาก ติดสีฟ้าซีด N:C ratio สูงมาก และมากขึ้นเมื่อเซลล์มีขนาดเล็กลง บางเซลล์อาจพบแกรนูลขนาดเล็กสีชมพู-ม่วงได้ (รูปที่ 1)

นิวโทรฟิล คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 μm ใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงประมาณ 2.0-2.5 เท่า รูปร่างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ แน่น ติดสีฟ้า-น้ำเงิน-ม่วง แบ่งเป็นหลายพู (multilobed nucleus) นิวโทรฟิลที่เจริญเต็มที่ พื้นที่ส่วนคอดระหว่างแต่ละพูจะน้อยกว่า 2 ใน 3 ของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณอื่น โครมาตินติดสีม่วงเข้ม ไซโตพลาสมไม่ติดสี แต่อาจพบติดสีชมพูซีด-ฟ้าอ่อน หรือ basophilic ภายในไซโตพลาสมพบแกรนูลละเอียดเรียบคล้ายฝุ่น (smooth finely granule) จำนวนมากไม่ติดสีหรือพบลักษณะเป็นแท่ง (rod) ติดสีชมพูอ่อน (รูปที่ 2)

แมคโครฟาจ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง มีขนาด 15-20 μm อาจพบขนาดเล็กกว่าหรือใกล้เคียงกับนิวโทรฟิล แต่ใหญ่กว่า ลิมโฟไซต์ ขอบเขตของไซโตพลาสมไม่เรียบ ไซโตพลาสมมีมาก ติดสีฟ้าหรือแดง มีแกรนูลมาก มีแวคิวโอลมาก ภายในพบ organells หรือเศษเซลล์และเศษนิวเคลียสที่กลืนทำลายเข้าไป นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ มีรูปร่างกลม รูปถั่ว หรือมีรอยเว้าแหว่ง รูปร่างไม่แน่นอน (รูปที่ 2)

อิโอซิโนฟิล คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง มีขนาด 12-20 μm มีขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับนิวโทรฟิล นิวเคลียสแบ่งเป็นพูคล้ายนิวโทรฟิลแต่น้อยกว่า เป็นรูปเม็ดถั่วหรือคล้ายแว่นตา โครมาตินสีม่วงเข้ม ลักษณะแน่น แกรนูลมีจำนวน ขนาด รูปร่างที่หลากหลาย พบแกรนูลขนาดใหญ่ มีลักษณะกลม ติดสีส้ม-แดง หรือชมพู มีคุณสมบัติสะท้อนแสง (high lightening) ไซโตพลาสมติดสีฟ้าซีด (faintly blue) (รูปที่ 3)

พลาสมาเซลล์ เป็นเซลล์ขนาดใหญ่รูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดประมาณ 15-20 μm มี N:C ratio ต่ำ ปริมาณไซโตพลาสมมาก ติดสี basophilic มากกว่าลิมโฟไซต์ ไซโตพลาสมรอบนิวเคลียสบริเวณที่เป็น clear zone (hallow area) มีสีฟ้าซีด นิวเคลียสใหญ่ กลม ติดสีเข้ม อยู่ชิดริมขอบเซลล์ด้านหนึ่ง (round eccentrically placed nucleus) และโครมาตินเป็นกลุ่มหยาบ

ลักษณะ clumped heterochromatin distributed chromatin หรือ centrally converging strand ทำให้นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายล้อเกวียน หรือหน้าปัดนาฬิกา (รูปที่ 3)

หลอดเลือด ประกอบด้วย หลอดเลือดฝอย (capillary) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-9 μm (เม็ดเลือดแดงขนาด 5-7 μm) มักพบเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 50 μm ผนังหลอดเลือดฝอยเป็นเซลล์ชนิด endothelium แบบ simple squamous epithelium หลอดเลือดดำขนาดเล็ก (venules) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-30 μm ลักษณะผนังคล้ายเส้นเลือดฝอย ส่วนหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก (arterioles) มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร มีช่องว่างภายในหลอดเลือดแคบ ผนังหนาและมีเซลล์ endothelium มากกว่าหนึ่งชั้น

ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ลักษณะเซลล์มีขนาดใหญ่กว่า ไฟโบรไซต์ มีรูปร่างไม่แน่นอน แต่มักพบเป็นรูปร่างยาว (elongated) คล้ายกระสวย (spindle-shaped) ตัวเซลล์แตกเป็นสาขา (branch) มากมาย นิวเคลียสใหญ่ รูปไข่ ติดสีอ่อน ไซโตพลาสมมากกว่าไฟโบรไซต์ ติดสี basophilic เป็นเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์คอลลาเจนไฟเบอร์ และ ground substance ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (รูปที่ 2)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.0 (SAS Inst Cary NC USA, 2002) วิเคราะห์การกระจายแบบปกติของข้อมูล (normal distribution) ด้วยวิธี UNIVARIATE procedure (option NORMAL) ในกรณีที่ข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ ทำการเปลี่ยนข้อมูลให้อยู่ในรูป logarithm วิเคราะห์ จำนวนของเม็ดเลือดขาว หลอดเลือด และ ต่อมมดลูกตัดตามขวางใน 20 พื้นที่ในแต่ละชิ้นเนื้อที่ทำการศึกษา (312,500 ตารางไมโครเมตร) ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้ MIXED model procedure โมเดลทางสถิติประกอบด้วย 2 โมเดล ได้แก่

โมเดลที่ 1 ศึกษาตัวแปรตาม (dependent variable) ได้แก่ จำนวนลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ อิโอซิโนฟิล และพลาสมาเซลล์ ตัวแปรอิสระ (independent variable) ได้แก่ กลุ่มสุกร (3 กลุ่ม) ชั้นของเยื่อบุโพรงมดลูก และคอมดลูก ตัวแปรสุ่ม (random effect) ได้แก่ เบอร์สุกร และชิ้นเนื้อ

โมเดลที่ 2 ศึกษาตัวแปรตาม ได้แก่ ความสูงของเยื่อบุผิวโพรงมดลูกและคอมดลูก จำนวนต่อมมดลูกภายในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของต่อมมดลูก และจำนวนหลอดเลือดตัดตามขวางของมดลูกและคอมดลูก ตัวแปรอิสระ ได้แก่ กลุ่มสุกร (3 กลุ่ม) ตัวแปรสุ่ม ได้แก่ เบอร์สุกร และชิ้นเนื้อ

ทำการคำนวณค่าเฉลี่ย Least square means จากโมเดลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Bonferroni ตัวแปรตามที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่ ลักษณะของเยื่อบุผิวโพรงมดลูก และคอมดลูก วิเคราะห์ด้วยวิธี Frequency analysis โดยใช้ FREQ procedure ลักษณะการบวมน้ำของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิว และจำนวน secretory vesicle ภายในต่อมมดลูก วิเคราะห์ด้วยวิธี Kruskal Wallis และ Wilcoxon rank-sum test โดยใช้ NPAR1WAY procedure ของโปรแกรม SAS ความสัมพันธ์ระหว่าง ฮอร์โมน E_2 P_4 และ ตัวแปรตามต่างๆ ที่ทำการศึกษาวิเคราะห์ด้วยวิธี Pearson correlation โดยใช้ CORR procedure ค่า $P<0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ