

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การตรวจดูลักษณะและ เซลของเยื่อของคลอด

ใช้แท่งแก้วปลายมน smear ของคลอดนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะของเซลล์ที่ได้เป็นพวกเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocyte) มีขนาดเล็กกลม และ cornified cell มีลักษณะเป็นเซลล์โปร่งแสงขนาดใหญ่ รูปร่างไม่สม่ำเสมอ ไม่มีนิวเคลียส

2. การ Autopsy

กระแตทุกตัวได้รับการฉีด Sodium Barbital .05 มิลลิลิตร ตั้งใจจับมาจากฟาร์ม SIAM ZOO ซึ่งส่งมาจากธรรมชาติไม่เกิน 3 วัน เข้าทางบริเวณของท้องเพียงเพื่อให้สลบ ชั่งน้ำหนักตัว ตัดคอเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตรวจดูลักษณะภายนอกของรังไข่ มดลูก และของคลอด จึงตัดรังไข่ มดลูก และของคลอด fix ไว้ด้วย Bouin's Fluid ไว้ศึกษาโครงสร้างลักษณะภายใน ซึ่งทั้งรังไข่และมดลูกแยกศึกษาเป็นค้ำข้ายและขวา และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของมดลูกไว้แล้วนำรังไข่ มดลูกซึ่งแบ่งเป็น horn และ body และของคลอดไปชั่งน้ำหนัก ในกรณีที่กระแตตัวใดท้องแก่ก็แยกคั่งเอาลูกมาชั่งน้ำหนักไว้ต่างหาก

3. การเตรียมน้ำยาเคมี

3.1 Fixative

ใช้ Bouin's Fluid

Picric acid (saturated solution)

75 มิลลิลิตร

Formaldehyde (40%)	25 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร

ผสมรวมกัน

3.2 สีที่ ๒๒ สีที่ ๒๒

3.2.1 Harris Hematoxylin

Hematoxylin	5 กรัม
Ethyl alcohol 95%	50 มิลลิลิตร
Aluminium ammonium sulfate	100 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร
Mercuric oxide (yellow)	2.5 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50 มิลลิลิตร

- ละลาย Hematoxylin ใน 95% Ethyl alcohol ขณะบด

- เติ Al Aluminium ammonium sulfate ใส่ในน้ำตั้งบนเตาจนใกล้เดือดทำให้เย็นลงเล็กน้อย แล้วเติม

Hematoxylin Solution

- นำ mixture ทั้งหมดไปต้มทันที

- เอลดจากเตา แล้วเติม Mercuric oxide นำไปต้มประมาณ 1 - 2 นาที จนกระทั่งเป็นสีชมพู

- ทำให้เย็นโดยเทลงใน basin ที่มี ice water แล้วเติม Glacial acetic acid

- กรอง



3.2.2 Eosin

Eosin	0.5 กรัม
Ethyl alcohol 95%	100 มิลลิลิตร
ผสมรวมกัน	

4. การทำ serial section ของรังไข่ มดลูก และของคลอด

นำรังไข่ มดลูก และของคลอด ที่ต้องการศึกษา fix ใน Bouin's Fluid ทันทีที่ตัดออกจากตัวกระแต เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol 24 ชั่วโมง เพื่อล้าง picric acid ออกจากนั้นนำไป dehydrate ใน 80% ethyl alcohol 90% alcohol 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น 95% alcohol ทั้งไวซามคืน (โดยเปลี่ยน 2 ครั้ง) แล้วนำไป dehydrate ต่อใน 95% alcohol+n-butyl alcohol, n-butyl alcohol, n-butyl alcohol + xylol ตามลำดับ ชั้นละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน xylol เพื่อ clearing อีก 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ tissue ไปใส่ในส่วนผสมของ xylol + paraplast (1:1) ที่หลอมเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่ไว้ในตู้บที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส แล้วจึงเปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ในตู้บเช่นกัน หลังจากนั้นนำ tissue มา embed ใน paraplast เมื่อเย็นจนแข็งนำมา trim ให้เหลือส่วนของ tissue เพื่อติด block 002288

การตัด section สำหรับรังไข่ตัดหนา 4 ไมครอน ตามแนวขวาง โดยทำเป็น serial section ส่วนมดลูกและของคลอดตัดหนา 6 ไมครอน ตามแนวขวางเช่นกัน แล้วนำไปติดบน slide ย้อมด้วยสี Harris Hematoxylin และ Eosin นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะ ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง ปริมาตร และจำนวนของ vesicular follicles และ corpus luteum ของรังไข่ เนื้อเยื่อ endometrium ของมดลูกระหว่างกระแตตั้ง

ครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะความหนาของเนื้อเยื่อของคลอดในสัตว์ที่สำรวจทุกตัวตลอดทั้งปีด้วย เพื่อที่จะได้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับระบบสืบพันธุ์อื่น ๆ มากน้อยเพียงไร โดยมีสัตว์ที่ถูกตัดรังไข่ 2 อาทิตย์เป็นข้อย่างอิงสำหรับเปรียบเทียบ

5. การตัดรังไข่

นำกระแตเพศเมียที่โตเต็มวัย ให้ดมยาสดยเปิดหน้าท้อง ตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง โดยก่อนตัดขังน้ำหนักตัวไว้ก่อน จากนั้นเย็บแผล นำกระแตไปเลี้ยงไว้ประมาณ 1 - 2 อาทิตย์ แล้วนำมาทำ autopsy ตรวจดูอวัยวะสืบพันธุ์อื่น ๆ ที่เหลืออยู่คือ มดลูก และของคลอด ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากผลของการตัดรังไข่

6. การประมาณอายุของการตั้งครรภ์

โดยเปรียบเทียบกับที่ Kuhn และ Schwaier (1973) ได้รายงานไว้ ศึกษาก่อนผ่าศูนย์กลางของมดลูกและความยาวของ embryos แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. Early pregnancy

ระยะตั้งครรภ์ 6 - 9 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางมดลูกวัดได้

3.4 - 4.9 มิลลิเมตร

2. Early placentation

ระยะตั้งครรภ์ 10 - 15 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางมดลูกวัดได้

6.5 - 8.1 มิลลิเมตร

3. Mid pregnancy

ระยะตั้งครรภ์ 22 - 29 วัน ความยาวของ embryo

วัดได้ 12.7 - 18 มิลลิเมตร

4. Full term pregnancy

ระยะตั้งครรภ์เกินกว่า 30 วัน ความยาวของ embryo วัคไค้ 61 - 99 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นระยะครรภ์แก่ใกล้คลอด

7. การศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่

เนื้อเยื่อรังไข่ที่ศึกษาได้จากการทำ serial paraffin section ของรังไข่ขนาด 4 ไมครอน เพื่อตรวจดูลักษณะของ

7.1 Vesicular follicles ขนาดใหญ่ มี antrum เป็นช่องว่าง ขนาดใหญ่ที่ติดต่อกัน และยังคงพบมีไข่อุคควย

7.2 Corpora lutea เพื่อตรวจหาว่ามีในกระแตที่อยู่ในสภาวะใดบ้าง จำนวนมากน้อยเท่าไร เกิดโตถึงขีดสุดและเสื่อมสลายในช่วงใดบ้าง

8. การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและปริมาตรของ vesicular follicles และ corpus luteum

ตรวจทุก ๆ 10 sections แล้ววัดขนาดของ follicles จาก section ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicles และ corpus luteum ที่ใหญ่ที่สุดควย ocular micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer โดยวัดเป็นสองแนวตั้งฉากกันจากขอบ theca externa ด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง นำค่าที่ได้เฉลี่ยกันเป็นขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicles และ corpus luteum ที่ต้องการ วัดความลึกของ follicles และ corpus luteum โดยการนับจำนวน section แล้วคำนวณหาปริมาตรของ follicles และ corpus luteum จากสูตร

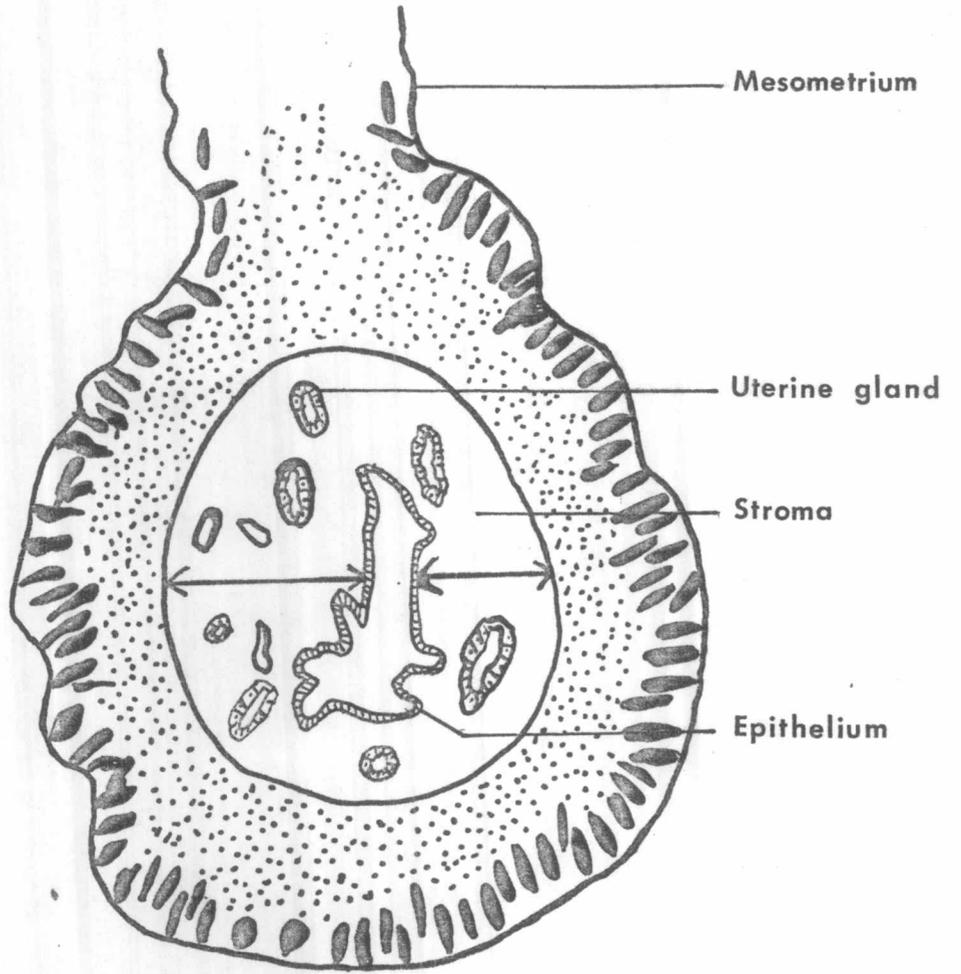
$$\text{ปริมาตร} = \left(\frac{4}{3}\pi\right) ab^2$$

$$a = \frac{\text{ความลึก}}{2}$$

$$b = \text{รัศมี}$$

แผนภาพที่ 3

แสดงการวัดความหนาเอ็นโคมีเทรียมของมดลูก



9. การศึกษาเนื้อเยื่อของมดลูก

9.1 ลักษณะเนื้อเยื่อเอ็นโคมิเทรียม

ตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อเอ็นโคมิเทรียมจากสไลด์ โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูถึงลักษณะความหนาของเยื่อบุผิวเอ็นโคมิเทรียมทั้งส่วน epithelium และ stroma ความหนาของเอ็นโคมิเทรียมลักษณะของ uterine gland ขนาด จำนวน การขมุกขมอของต่อม ช่องว่างภายใน lumen ของ uterine gland และลักษณะของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงมดลูก

9.2 การวัดความหนาของเอ็นโคมิเทรียมมดลูก

ตรวจดูทุก ๆ 10 sections แล้ววัดความหนาของเอ็นโคมิเทรียมจาก section กลาง ๆ ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดบริเวณคานข้างทั้งสองข้าง (แผนภาพที่ 3) ด้วย ocular micrometer เทียบกับ stage micrometer โดยวัดทั้งสองข้าง ข้างชายและขวาภายใน section เดียวกัน นำค่าที่ได้เฉลี่ยเป็นความหนาของเอ็นโคมิเทรียมมดลูก

9.3 การศึกษาเนื้อเยื่อของ Uterine body

ตรวจดูลักษณะเยื่อบุผิวของ uterine body ดูลักษณะการ fold มากน้อย ซึ่งขึ้นกับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนและอีสโตรเจน เพื่อสัมพันธ์กับการมีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่หรือการมีคอร์ปัส ลูเทียม ในรังไข่

10. การศึกษาเนื้อเยื่อของเยื่อบุของคลอด

ตรวจดูลักษณะ จำนวน ความหนาของเยื่อบุของคลอด ซึ่งเป็นแบบ stratified squamous ขึ้นกับระดับฮอร์โมนอีสโตรเจน ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่าง ๆ ของวงการสืบพันธุ์ เพื่อสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่หรือคอร์ปัส ลูเทียม ในรังไข่

11. การตรวจสอบภาวะ lactation

ผ่าเปิดหน้าอกตลอดถึงหน้าทรวงคบริเวณหนึ่งว่ามี branch ของคอม
 น้านมที่มี secretion มากน้อยแค่ไหน ถ้ามีมากจนเห็นซัคก็ถือว่ามี lactation
 และดู milk secretion จาก alveoli ของ mammary gland
 เพื่อแบ่งเป็น early และ late lactation (เรื่องมณีไพฑูรย์, 2519)



การแบ่งกลุ่มสัตว์ที่สำรวจ

การศึกษารังไข่ใช้กระแตเพศเมียที่โตเต็มวัยที่ไถ่มาในแต่ละเดือนตลอดปี
รวมทั้งหมด 61 ตัว แบ่งการศึกษาเป็นกลุ่ม ๆ ที่ตรวจพบ ดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่ตั้งครรรภ์

1.1 ไม่มี vesicular follicles จำนวน 6 ตัว

1.1.1 มี lactation

จำนวน 1 ตัว

1.1.2 ไม่มี lactation

จำนวน 5 ตัว

1.2 มี vesicular follicles จำนวน 30 ตัว

1.2.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicles น้อยกว่า
0.5 มิลลิเมตร จำนวน 4 ตัว

1.2.2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicles ระหว่าง
0.5 - 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 14 ตัว

1.2.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ follicles มากกว่า
0.7 มิลลิเมตร จำนวน 12 ตัว

2. กลุ่มที่ตั้งครรรภ์

2.1 6 - 9 วัน จำนวน 5 ตัว

2.1.1 มี lactation

จำนวน 2 ตัว

2.1.2 ไม่มี lactation

จำนวน 3 ตัว

2.2 10 - 15 วัน จำนวน 2 ตัว

2.2.1 มี lactation

จำนวน 1 ตัว

2.2.2 ไม่มี lactation

จำนวน 1 ตัว

2.3 22 - 29 วัน จำนวน 7 ตัว

2.3.1 มี lactation

จำนวน 6 ตัว

2.3.2 ไม่มี lactation

จำนวน 1 ตัว

2.4 เกินกว่า 30 วัน (lactation)

จำนวน 3 ตัว

3. กลุ่มมี lactation

3.1 เพิ่งคลอดลูกใหม่ (< 72 ชั่วโมง)

จำนวน 7 ตัว

3.2 Early lactation จำนวน 9 ตัว

3.2.1 ไม่มีคอร์ปัส ลูเตียม

จำนวน 8 ตัว

3.2.2 มีคอร์ปัส ลูเตียม

จำนวน 1 ตัว

3.3 Late lactation

จำนวน 3 ตัว

4. กลุ่ม Control

ใช้กระแตเพศเมียที่โตเต็มวัยจำนวน 3 ตัว คัดรังไข่นาน 2 สัปดาห์ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของโครงร่างของมดลูกในสภาพทาง สรีรวิทยาที่ไม่เหมือนกัน

กลุ่มตัวสำรวจ	จำนวน ตัว	น้ำหนักตัว (mg.) M ± SE (พิสัย)	Corpus Luteum (CL)			Vesicular Follicle (VF)			น้ำหนักมดลูก (มก.)			ความหนา ชั้นไขโพรงมดลูก (mm.) M ± SE (พิสัย)		
			จำนวน		เส้นผ่าศูนย์กลาง (mm.) M ± SE (พิสัย)	จำนวน		เส้นผ่าศูนย์กลาง (mm.) M ± SE (พิสัย)	M ± SE (พิสัย)					
			L	R	M ± SE (พิสัย)	L	R	horn	body	รวมน้ำหนักมดลูก				
1. Non-Pregnancy														
1.1 ไม่มี lactation														
1.1.1 มี lactation	1	3.33	-	-	-	-	-	-	-	135.3	91.7	227.0	0.599	
1.1.2 ไม่มี lactation	5	5.07±0.5 (2.65-10.8)	-	-	-	-	-	-	-	91.95±39.1 (17.5-211.0)	79.2±21.5 (44.2-215.7)	171.15±31.59 (72.9-351.0)	0.49±0.05 (0.27-0.75)	
1.2 มี VF														
1.2.1 VF < 0.5 mm.	4	5.58±0.53 (4.35-8.9)	-	-	-	-	4	2	0.386±0.06 (0.25-0.493)	0.032±0.05 (0.013-0.048)	99.14±10.01 (38.7-111.4)	78.88±20.7 (49.0-140.0)	176.18±29.3 (87.7-235.9)	0.43±0.06 (0.275-0.533)
1.2.2 VF 0.5-0.7mm.	14	5.8±0.4 (1.75-11.2)	-	-	-	-	23	20	0.607±0.02 (0.5-0.698)	0.128±0.04 (0.055-0.182)	153.34±23.9 (91.3-298.3)	96.16±14.61 (49.0-182.3)	250.17±23.9 (137.3-410.8)	0.59±0.04 (0.275-0.924)
1.2.3 VF > 0.7 mm.	12	5.82±0.55 (4.2-8.9)	-	-	-	-	10	11	0.76±0.03 (0.713-0.809)	0.235±0.03 (0.086-0.285)	201.1±21.4 (47.8-303.1)	109.11±19.67 (59.8-203.3)	310.81±28.4 (123.3-499.5)	0.64±0.05 (0.375-1.049)
2. Pregnancy														
2.1 6-9 วัน														
2.1.1 มี lactation	2	4.65±0.6 (4.05-5.25)	3	1	0.981±0.03 (0.941-1.044)	0.382±0.03 (0.309-0.454)	1	1	0.578±0.07 (0.471-0.684)	0.345±0.05 (0.159-0.53)	174.59±29.92 (140.6-210.5)	168.6±19.92 (128.8-208.4)	344.15±19.4 (269.4-418.9)	0.774
2.1.2 ไม่มี lactation	3	10.37±2.51 (5.55-14.0)	4	2	1.185±0.1 (0.551-1.213)	0.707±0.13 (0.071-0.881)	-	1	0.669	0.191	131.03±27.45 (189.8-299.5)	124.47±8.55 (114.0-141.4)	353.5±17.6 (307.8-441.9)	0.775
2.2 10-15 วัน														
2.2.1 มี lactation	1	5.4	2	3	0.921±0.05 (0.793-1.831)	0.299±0.04 (0.066-0.328)	-	-	-	-	589.9	231.2	821.1	0.786
2.2.2 ไม่มี lactation	1	10.54	1	1	1.096±0.1 (1.088-1.103)	0.746±0.07 (0.726-0.766)	1	1	0.665±0.08 (0.632-0.698)	0.182±0.03 (0.157-0.227)	349.0	207.7	556.7	-
2.3 22-29 วัน														
2.3.1 มี lactation	6	5.88±1.17 (2.5-10.4)	8	6	0.908±0.03 (0.75-1.103)	0.293±0.03 (0.181-0.62)	6	2	0.684±0.14 (0.52-0.845)	0.142±0.05 (0.074-0.219)	1029.1±95.7 (599.0-1209.1)	597.1±34.05 (134.4-1251.3)	1624.9±34.5 (744.4-2415.7)	-
2.3.2 ไม่มี lactation	1	10.4	2	-	1.036±0.01 (1.036)	0.68±0.07 (0.63-0.729)	1	1	0.662±0.12 (0.595-0.742)	0.156±0.07 (0.08-0.232)	2589.5	967.6	3557.1	-
2.4 ใกล้เคียง 30 วัน (มี lactation)														
	3	7.55±1.88 (3.8-9.5)	4	1	0.528±0.06 (0-0.662)	0.099±0.02 (0-0.115)	4	3	0.588±0.08 (0.448-0.735)	0.085±0.05 (0.041-0.142)	1204.6±59.3 (69.41-2719.4)	604.8±42.26 (282.2-526.7)	1809.4±55.7 (934.7-3243.4)	-
3. Lactation														
3.1 New Delivery (< 72 hr.)														
3.1.1 Early lactation	7	8.4±1.53 (5.15-13.85)	-	-	-	-	7	3	0.672±0.07 (0.588-0.735)	0.121±0.08 (0.09-0.149)	1254.01±49.7 (797.6-2616.9)	901.03±41.9 (654.3-754.2)	2155.66±31.4 (499.5-3370.4)	0.801±0.02 (0.739-0.845)
3.2 Early lactation														
3.2.1 ไม่มี CL	8	7.07±1.79 (3.55-11.2)	-	-	-	-	9	5	0.614±0.06 (0.49-0.79)	0.186±0.09 (0.04-0.9)	197.43±20.5 (31.75-503.1)	125.4±31.1 (86.2-203.3)	322.83±0.1 (123.3-706.4)	0.84±0.06 (0.4-1.08)
3.2.2 มี CL	1	7.5	1	1	1.077±0.06 (1.03-1.125)	0.458±0.05 (0.363-0.739)	1	-	0.632	0.195	422.9	221.6	644.5	0.783
3.3 Late lactation														
	3	6.25±1.1 (5.7-7.1)	-	-	-	-	3	4	0.71±0.05 (0.54-0.82)	0.19±0.05 (0.11-0.29)	197.5±23.4 (40.7-262.3)	136.8±17.9 (79.7-182.3)	334.17±26.7 (161.1-430.7)	0.68±0.04 (0.47-0.79)