บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

1 สัตว์ทดลอง

กระแตเพศผู้โตเต็มวัย น้ำหนัก 120 - 150 กรัม จำนวนเดือนละ 4 - 5 ตัว ในระยะต้นเดือนของทุกเดือนในหนึ่งปี เป็นกระแตที่ส่งมาใหม่ๆ จากภาคใต้ของประเทศไทย

2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร

- Pricric acid
- Glacial acetic acid
- Formaldehyde
- Mercuric oxide (yellow)
- Ethyl alcohol
- Butyl alcohol
- Xylene
- Paraplast (Arthur, H. Thomas)
- Lugol iodine
- Sodium thiosulphate
- Aluminium ammonium sulphate
- Hydrochloric acid
- Eosin
- Harris Hematoxylin
- Orange G
- Carmoisine L
- Wool green S

3 อุปกรณ์

Microtome (AO Model 815)

Slides, cover glass

Light microscope

Electrical balance

เครื่องมือผ่าตัด

วิธีดำเนินการทดลอง

1 สัตว์ทดลอง นำมาชั่งน้ำหนักตัว บันทึก นำไปผ่า ด้วยการรมอีเทอร์ ผ่าบริเวณคอ ตัดต่อมไทรอยด์ ชั่งน้ำหนัก เจาะกระโหลกศีรษะ ตัดต่อมใต้สมอง ชั่งน้ำหนัก แล้ว fix ใน sublimate formol ตัดอัณฑะ เอปิดิไดมิส ชั่งน้ำหนัก fix ใน Bouin ต่อมใต้สมอง fix นานสองชั่วโมง แล้วล้างด้วย น้ำประปาไหลผ่าน เป็นเวลาสองชั่วโมง จึงนำไปใส่ ใน ขวดที่มี 70% ethyl alcohol นำไป dehydrate ด้วย ethyl alcohol จากเปอร์เซนต์ต่ำไปสูง clear ด้วย xylene แล้ว embed ใน paraplast

2 วิธีเตรียมสารเคมี

2.1 Fixatives

2.1.1 Bouin

Picric acid (saturated solution)	75 ml.
Formaldehyde (40%)	25 ml.
Glacial acetic acid	5 ml.

2.1.2 Sublimate formol

Mercuric chloride (saturated soln.)	90 ml.
Formaldehyde (40%)	10 ml.

2.2 Reagents

2.2.1 Harris Hematoxylin

Hematoxylin	5	gm.
Ethyl alcohol (95%)	50	ml.
Aluminium ammonium sulphate	100	gm.
Distilled water	1000	ml.
Mercuric oxide (yellow)	2.5	gm.
Glacial acetic acid	50	ml.

ละลาย hematoxylin ด้วย 95 % ethyl alcohol และละลาย alum ด้วยน้ำ โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย นำสารละลาย alum ซึ่งเกือบจะเดือด มาทำให้เย็นลงเล็กน้อย แล้วเติมสารละลาย hematoxylin ลงไป นำส่วนผสมนี้ไปต้มอย่างรวดเร็ว แล้วยกลง ค่อยๆ เติม mercuric oxide ต้มต่อไปอีกสักหนึ่งหรือสองนาที จนกว่าสารละลาย จะเป็นสีม่วงเข้ม ยกลงจากไฟ แล้วทำให้เย็น โดยรวดเร็วด้วยการแช่ลงในอ่างน้ำเย็น เติม glacial acetic acid แล้วกรองก่อนใช้

2.2.2 0.5%Eosin

Eosin	0.5	gm.
Ethyl alcohol 95 %	100	ml.

2.2.3 10% aqueus solution $CuSO_4$ (mordant)

$CuSO_4$	10	gm.
distilled water	100	ml.

2.2.4 1% Carmoisine L in 1% Acetic acid

1% Acetic acid 100 ml.

Carmoisine L 1 gm.

2.2.5 0.5 % Orange G in 2 % Phosphotungstic acid in 95 % alcohol

2 % Phosphotungstic in 95 % alcohol 100 ml.

Orange G 0.5 gm.

2.2.6 2 % Phosphotungstic acid in 95 % ethyl alcohol

95 % ethyl alcohol 100 ml.

Phosphotungstic acid 2 gm.

2.2.7 0.5 % Wool green S in 0.5 % acetic acid

0.5 % acetic acid 100 ml.

3การทำ sections ของอัณฑะและเอปิดิไดมิส และต่อมไทรอยด์

อัณฑะและเอปิดิไดมิส และต่อมไทรอยด์ fix ใน Bouin นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนมาอยู่ใน 70 % ethyl alcohol ค้างคืน

3.1 Dehydration โดยเปลี่ยนมาอยู่ใน 90% ethyl alcohol นานสองชั่วโมง

3.2 เปลี่ยนมาอยู่ใน 95 % ethyl alcohol ค้างคืน

3.3 เปลี่ยนเป็น 95 % ethyl alcohol + butyl alcohol (อย่างละหนึ่งส่วน) 1 ชั่วโมง

3.4 Butyl 1 ชั่วโมง

3.5 Butyl + xylene 1 ชั่วโมง

3.6 Xylene 1 ชั่วโมง

3.7 Xylene + wax (อย่างละหนึ่งส่วน) 1 ชั่วโมง

3.8 Wax 1 1 ชั่วโมง

3.9 Wax 2 1 ชั่วโมง

3.10 Embed

เมื่อ embed แล้ว ทิ้งไว้ให้แข็ง จึงนำมา trim แล้วนำไปตัด cross section หนาประมาณ เจ็ด ไมครอน ไม่ต้องทำ serial section เมื่อติดบนสไลด์ด้วย albumin แล้วทิ้งค้างคืนไว้ แล้วจึงนำมาย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin

4 การย้อมสี Hematoxylin & Eosin

4.1 clear wax ด้วย xylene 1 และ xylene 2 ขั้นละสามนาที

4.2 hydrate โดยให้ผ่าน ethyl alcohol จากเปอร์เซนต์สูงไปต่ำ ขั้นละ สาม นาที จนถึง 70 % ethyl alcohol

4.3 นำไปล้างน้ำ โดยให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา สาม นาที

4.4 นำไปย้อมใน hematoxylene สามนาที

4.5 differentiate โดยจุ่มลงใน 70 % ethyl alcohol ที่มี 0.5 % hydrochloric acid

4.6 นำไปล้างน้ำ โดยให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา สาม นาที

4.7 dehydrate โดยให้ผ่าน ethyl alcohol จากเปอร์เซนต์ต่ำไปสูง จนถึง 95 % ethyl alcohol

4.8 ย้อมใน Eosin 95 % นานห้านาที

4.9 95 % ethyl alcohol หนึ่งนาที

4.10 butyl alcohol สามนาที

4.11 butyl + xylene สามนาที

4.12 xylene สามนาที

4.33mount ด้วย harleco synthetic resin

5 การตรวจอสุจิ ภายในอัณฑะ และ เอปิดิไดมิส

นำ sections ของอัณฑะ และ เอปิดิไดมิส ทั้งส่วน head และส่วน tail ไปตรวจดู ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการสร้างตัวอสุจิ ว่ามีมากน้อยอย่างไร ด้วยการกำหนดดังนี้

ถ้ามีอสุจิทุกๆ sections ของหลอดสร้างอสุจิ หรือมีอสุจิอยู่ระหว่าง 75-100 เปอร์เซนต์ ให้เป็น ++++

ถ้ามีตัวอสุจิ ประมาณ ¾ ของหลอดสร้างอสุจิ หรือมีตัวอสุจิ อยู่ระหว่าง 50 -75 % ให้เป็น +++

ถ้ามีอสุจิ ประมาณ 1/2 ของหลอดสร้างอสุจิ หรือมีตัวอสุจิอยู่ระหว่าง 25 - 50 % ให้เป็น ++

ถ้ามีตัวอสุจิ ประมาณ 1/4 ของหลอดสร้างอสุจิ หรือมีอสุจิน้อยกว่า 25 % ให้เป็น +

ถ้าไม่พบ ตัวอสุจิอยู่เลย ในหลอดสร้างอสุจิ ให้เป็น o

สำหรับการตรวจตัวอสุจิ ใน เอปิดิไดมิส ทั้งส่วน head และส่วน tail ก็กำหนดเช่นเดียวกันกับในอัณฑะ

และถ้ามีอสุจิตั้งแต่ 75 เปอร์เซนต์ ขึ้นไป ถือว่า active ทางสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ ถ้าต่ำกว่า 50 เปอร์เซนต์ ถือเป็น inactive ทางสรีรวิทยาการสืบพันธุ์

6 การตรวจหาเซลชนิดต่างๆ ของต่อมใต้ส องส่วนหน้า

ต่อมใต้สมอง ที่ embed แล้ว นำมาทำ serial sections ตัดตามแนวนอน หนา สี่ ไมครอน แล้วย้อมสี โดย Brookes ' stain ซึ่งย้อมด้วยสี Carmoisine L , Wool green S , & Orange G

6.1 เอา paraplast ออกจาก tissue โดยแช่ใน xylene แล้ว hydrate ด้วย ethyl alcohol จากเปอร์เซนต์สูง ไปสู่เปอร์เซนต์ต่ำ ขั้นละ สาม นาที จนถึง

6.2 เอา mercuric chlorideออก โดยแช่ใน 0.5% Lugol iodine สามนาที

6.3 น้ำกลั่น สาม นาที

6.4 5 % โซเดียมไทโอซัลเฟต ห้า นาที

6.5 น้ำประปา สิบ นาที

6.6 นำไปแช่ในน้ำประปา ที่ไหลตลอดเวลา ยี่สิบ นาที rinse ด้วย น้ำกลั่น

6.7 ย้อมใน 1 % carmoisine L ใน 1 % acetic acid นาน สามสิบนาที

6.8 rinse ด้วย น้ำกลั่น และ 95 % ethyl alcoholตาม ลำดับ

6.9 rinse ใน 2 % phosphotungstic acid in 95 %alcohol

6.10ย้อมใน 0.5 % orange G in 2 % phosphotungatic acid in 95 % alcohol สามสิบ นาที

6.11 ล้างในน้ำกลั่น อย่างรวดเร็ว

6.12 นำกลับไปย้อมใน 1 % carmoisine L อีกครั้งเป็นเวลา สิบ นาที

6.13 ล้างในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

6.14 ย้อมใน Wool green S ใน 0.5 % acetic acid ห้านาที

6.15 ผ่านใน absolute alcohol สามครั้ง อย่างรวดเร็ว

6.16 clear ด้วย xylene และ mount ด้วย harleco resin นำไปตรวจดูชนิดของเซล ะได้ดังนี้

Somatotropes (Growth hormone secreting cell) ติดสีส้ม

Lactotropes (Prolactin secreting cell) ติดสีแดง

Gonadotropes ติดสีฟ้าจาง รูปร่างเซลกลมหรือรี

Thyrotropes ติดสีฟ้าจาง รูปร่างเซลเป็น เหลี่ยม

นิวเคลียสของเซลทุกชนิด และเซลเม็ดเลือดแดงติดสีแดง

7วิธีการนับเซลของต่อมใต้สมอง

นำต่อมใต้สมอง ซึ่งทำ paraplast serial sections หนา สี่ ไมครอน ย้อมสีด้วยวิธีดังกล่าว ข้างต้นมาสาม sections โดยเลือกจากระดับ ต่างๆ ดังนี้ คือ ที่ตำแหน่ง ¼,½ และ ¾ ของต่อมตามลำดับ (เช่น ถ้าตัด sections ได้ 100 sections ก็จะเป็นตำแหน่ง sections ที่ 25 , 50 และ 75) มานับ เซลด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1500 เท่า นับแยกเซลออกตามลักษณะ ที่ติดสี และรูปร่างของเซล ให้เป็น somatotropes , thyrotropes , prolactin cells , gonadotropes & chromophobes ทั้งหมดรวมกัน ประมาณ 2000 เซล จาก sectionsในแต่ละระดับ ซึ่ง ในการนับเซลนี้ ได้นับแบบสุ่มตัวอย่าง ในบริเวณที่เดียวกันทุก sections

จำนวนเซลแต่ละชนิดที่นับได้ใน sections สาม ระดับ ที่เลือก มานั้น นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วหาจำนวนเซลแต่ละชนิด ให้เป็นร้อยละ ของจำนวนเซลทุกชนิด รวมกันจะเป็นตัวแทน ของเซลชนิดต่างๆ ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า

8 วิธีการวัดขนาดของเซลของต่อมใต้สมองส่วนหน้า

สุ่มตัวอย่าง paraplast serial sections ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า ของสัตว์แต่ละตัว มาทุก สิบ sections วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลชนิดที่ ต้องการด้วย occular micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer

โดยวัดเป็นแนวตั้งฉากกัน จากขอบด้านหนึ่งของเซล ไปยังอีกด้านหนึ่ง ค่าที่ได้ เฉลี่ยกันเป็น ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง ของเซลต่อมใต้สมองส่วนหน้า ของสัตว์แต่ละตัว แล้วนำค่าเฉลี่ย ของเส้นผ่าศูนย์กลาง ของเซล ต่อมใต้สมองส่วนหน้า ของ สัตว์ทุกตัว มา เฉลี่ยกันอีกครั้งหนึ่ง จะเป็นขนาด ของ เซลต่อมใต้สมองที่ต้องการ

9 วิธีการนับ Leydig cell nucleus

สุ่มตัวอย่าง paraplast sections ของอัณฑะ ของสัตว์แต่ละตัวมา สิบ sections นับจำนวนนิวเคลียส ของ Leydig cells ด้วย occular grid ซึ่งมีพื้นที่ 0.0006 มิลลิเมตร^2 จำนวนที่ได้ เฉลี่ยกัน เป็น จำนวนของ Leydig cell ต่อ 0.0006 ตารางมิลลิเมตร ของสัตว์แต่ละตัว แล้วนำ ค่าเฉลี่ย นี้มา เฉลี่ย เป็นแต่ละเดือน จะเป็น จำนวน Leydig cell nuclei ต่อเนื้อที่ ในแต่ละ เดือน ตามต้องการ

10 วิธีการวัดความสูงของ thyroid epithelial cells ในต่อมไทรอยด์

สุ่มตัวอย่าง paraplast section ของต่อมไทรอยด์ ของสัตว์แต่ละตัว มา สิบ sections วัดขนาดความสูงของเซล thyroid epithelium โดยการ สุ่มตัวอย่าง ด้วย occular micrometer เปรียบเทียบกับ stage m. นำค่าที่ได้ เฉลี่ยกัน เป็นขนาดความสูงของ thyroid epithelial cells ของแต่ละตัว แล้วจึงนำ ค่าเฉลี่ย ของแต่ละตัว นี้มา เฉลี่ยกัน อีกครั้ง เป็นค่าเฉลี่ยของ กระแตแต่ละกลุ่ม

11 การตัดอัณฑะของกระแตออกสองข้าง เป็นเวลา หนึ่งถึงสอง สัปดาห์

กระแตที่นำมาตัดอัณฑะ มีจำนวน สี่ ตัว ตัดอัณฑะ ออก เหลือ เอปิดิไดมิส ไว้หนึ่งข้าง เลี้ยงต่อไปนาน หนึ่งถึงสอง สัปดาห์ แล้วฆ่า ตัดเอปิดิไดมิส ต่อมใต้สมอง นำมาทำ ทางฮิสโตโลยี่

12 วิธีการทำสไลด์ถาวร ของตัวอสุจิ

นำเอปิดิไดมิส ส่วน cauda มาแช่ใน น้ำเกลือ 0.85 % ใช้ ปาก

ตับหนู เอปิดิไดมิส ให้ขาด แล้วนำไปแช่ใน ตู้เย็น อุณหภูมิ สี่ องศาเซนติเกรด นำแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทาด้วย albumin บางๆ หยดน้ำอสุจิ ลงไป แช่ใน 70 % ethyl alcohol แล้วนำไปย้อมสี hematoxylin & eosin

13 การทดสอบทางสถิติ

ในการทดสอบค่าทางสถิติ ทดสอบโดย t - test ทดสอบเป็นคู่ๆ ทำแบบ two tail test โดยนำค่าเฉลี่ย แต่ละเดือน ของ น้ำหนักอัณฑะ เอปิดิไดมิส ต่อมใต้สมอง ต่อมไทรอยด์ จำนวนเซลล์ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบเป็นคู่ๆ ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือน ธันวาคม