

วัสดุและวิธีดำเนินการทดลอง



1. หนูขาวที่ใช้ในการทดลอง

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองเป็นหนูขาวเพศเมียพันธุ์ Wistar บริสุทธิ์ ซึ่งถูกเลี้ยงไว้ที่ แผนกชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส และควบคุมแสงสว่าง โดยให้แสง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 6.00 น.-20.00 น.) และมีมืด 10 ชั่วโมง (ระหว่างเวลา 20.00 น.-6.00 น.) มีอาหารสำเร็จรูปและน้ำประปาให้กินและกั้นตลอดเวลา หนูที่ใช้ในการทดลองเป็นหนูที่โตเต็มที่แล้ว มีอายุประมาณ 2 เดือน และหนูทุกตัวจะต้องผ่านการตรวจสอบคว้ามิวเจอร์สืบพันธุ์ปกติมาแล้ว อย่างน้อย 2 วงจร

2. ฮอริโมนและสารเคมี

โปรเจสเทอโรน (Mann Research Laboratories Inc.)

คีออกซีคอกติคอสเทอโรน (Sigma Chemical Company)

น้ำมันมะกอก (องค์การเกษตรกรรม)

เกททอล (May & Baker Ltd.)

อีเทอร์ (May & Baker Ltd.)

โซเดียมคลอไรด์ (May & Baker Ltd.)

3. วิธีตรวจหาวงจรสืบพันธุ์ของหนูทดลองโดยการทำ vaginal smear

ไข่แห่งแก้วปลายมน จุ่มน้ำเกลือซึ่งมีความเข้มข้น 0.85% และ
 ใช้น้ำล้างในช่องของหลอดของหนู แล้วนำมาป้ายบนสไลด์ นำมาตรวจดูด้วยกล้อง
 จุลทรรศน์ โดยอาศัยลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏอยู่บนแผ่นสไลด์ ซึ่งจะเปลี่ยนแปลง
 ไปตามระยะต่างๆ ของวงจรสืบพันธุ์ อาจแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้คือ

- 1) โปรอีสตรัส ถือเป็นวันแรกของวงจรสืบพันธุ์ จะพบ
 เซลล์ที่มีรูปร่างกลมและมีนิวเคลียส (nucleated
 cell) ที่ผนังของเยื่อของหลอด การเกิดเซลล์นี้
 เกิดจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (oestrogen) จาก
 รังไข่ทำให้ผนังของหลอดหนาเพิ่มขึ้น และในระยะ
 นี้มดลูกก็ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนเช่นเดียวกัน
 เป็นผลให้มดลูกมีลักษณะบวม น้ำ ระยะนี้กินเวลาประมาณ
 20-24 ชั่วโมง (Long และ Evans, 1922.)
- 2) อีสตรัส เป็นวันที่ 2 ของวงจรสืบพันธุ์ จะพบเซลล์ที่มี
 ขนาดใหญ่ที่ผนังเยื่อของหลอดจำนวนมากเรียกว่า
 cornified cell ระยะนี้เป็นระยะที่สัตว์เป็นสัด
 (heat) พร้อมทั้งจะผสมพันธุ์กับเพศผู้ได้ อาจพบเซลล์
 เม็ดเลือดขาว (leucocyte cell) ปนอยู่ด้วย
 ระยะนี้กินเวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง
- 3) ไคอีสตรัส 1 เป็นวันที่ 3 ของวงจรสืบพันธุ์ ซึ่งจากการ
 ทำ vaginal smear จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน
 มาก และอาจมี cornified cell ปนอยู่ด้วย

4) โคอีสตรัส 2 เป็นวันที่ 4 ของวงจรสืบพันธุ์ จะพบ
แคเซลล์เม็กเลือกขาวในช่องคลอด

4. วิธีเตรียมหนูกอง

นำหนูที่ต้องการผสมเพื่อใช้ในการทดลอง ซึ่งขณะนั้นเมื่่วงจรสืบพันธุ์
เป็นระยะโปรอีสตรัส แยกใส่กรงที่มีตัวผู้ในตอนเย็นของวันที่เป็นโปรอีสตรัส อาจ
ใช้ 1 กรงที่มีตัวผู้ 1 ตัว ต่อตัวเมีย 2 ตัว ในเช้าวันรุ่งขึ้นก็แยกหนูเพศเมียออกจาก
กรงที่มีหนูเพศผู้ แล้วตรวจว่ามีสเปิร์ม (sperm) หรือกลุ่มของสเปิร์ม
(sperm plug) ในช่องคลอดของหนูเพศเมียหรือไม่ ถ้าพบว่ามี ก็นับเอาวัน
ที่พบสเปิร์มเป็นวัน L_0 หรือวันแรกของการตั้งครรภ์ วันต่อไปนับเป็นวัน L_1 ,
 L_2 , L_3 ... ตามลำดับ

5. วิธีการเตรียมฮอร์โมน

ซึ่งโปรเจสเตอโรน หรือคือออกซีคorticosteroid ในจำนวนที่ต้องการ
การละลายอย่างละเอียด ใส่ในโกรงบดยาแล้วกให้ละเอียด ละลายฮอร์-
โมนใน absolute alcohol หรือ อาซีโตน จำนวนเล็กน้อย แล้วจึงเติม
น้ำมันมะกอกในปริมาณที่ต้องการลงไป จากนั้นนำสารละลายฮอร์โมนที่ได้ไป
ระเหยเอาแอลกอฮอล์ออก การเติม absolute alcohol หรือ อาซีโตน ใน
การละลายนี้ก็เพื่อช่วยให้ฮอร์โมนผสมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันมะกอกดียิ่งขึ้น

6. การตัดคอมหมวกไต (adrenalectomy)

สดมหนูด้วยอีเทอร์ แล้วใช้กรรไกรขลิบขนทั้งสองข้างลำตัวของ
หนูบริเวณใกล้ซี่โครงงูสุดท้ายกับกระดูกสันหลังออก แล้วใช้คัตว่น้ำยาเคททอล
2.5% ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและเนื้อบริเวณนั้นเปิดให้เป็นช่องเล็กประมาณ

2/3 เซนติเมตร ใช้ปากคีบค่อยๆ ดึงเอาไขมันที่ติดกับต่อมหมวกไตออกมา แล้วใช้กรรไกรปลายงอตัดต่อมหมวกไตออก ระวังอย่าให้ต่อมแตกและไม่ให้เป็นอันตรายต่อไต หลังจากตัดแล้วเอาอวัยวะส่วนที่ดึงออกมานั้นใส่เข้าไปควย แล้วเย็บแผลให้เรียบร้อยโดยเย็บกล้ามเนื้อปีกของท้องควยใหม่ แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกอีกทีหนึ่ง

7. การตัดรังไข่ (ovariectomy)

ผสมหนูควยอีเทอร์ ใช้กรรไกรขลิบขนข้างลำตัวหนูข้างที่ต้องการตัดรังไข่ออก เช็ดบริเวณดังกล่าวด้วยน้ำยาเคททอล 2.5% แล้วใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อข้างลำตัวด้านหลังโครงไปทางด้านหลัง เปิดให้เป็นช่องเล็กประมาณ 1/2 เซนติเมตร แล้วใช้ปากคีบปลายงอดึงเอาไขมันที่ติดกับรังไข่ออกมา รังไข่จะติดขึ้นมาควย ใช้กรรไกรปลายงออันเล็กตัดเฉพาะส่วนที่เป็นรังไข่ออกโดยไม่ให้ส่วนของรังไข่เหลือค้างอยู่อีกและระวังมิให้ถูกท่อนำไข่ เมื่อตัดออกแล้วใช้ปากคีบปลายงอ หยิบไขมันที่ติดส่วนของมดลูกกลับเข้าไปอยู่ในลำตัวตามเดิม เย็บกล้ามเนื้อปีกของท้อง และเย็บหนังชั้นนอกอีกทีหนึ่ง ในกรณีที่ต้องการตัดต่อมหมวกไต และตัดรังไข่ออกหนึ่งข้างควย จะตัดรังไข่พร้อมกับการตัดต่อมหมวกไตได้

8. วิธีหาและนับจำนวนไข่ที่ตก

ในกรณีที่ต้องการหาและนับจำนวนไข่ที่ตกในหนูทดลอง ระยะของวงจรสืบพันธุ์ที่หนูจะมีการตกไข่จากรังไข่ลงสู่ท่อนำไข่ และยังคงรวมกลุ่มกันเห็นได้ชัด คือระยะที่หนูทดลองอยู่ในระยะอีสตรัสของวงจรสืบพันธุ์ วิธีหาไข่และนับจำนวนไข่ที่ตกทำดังนี้คือ ในเช้าของวันอีสตรัส นำหนูที่ตรวจพบว่ามีระยะวงจรสืบพันธุ์เป็นอีสตรัสแน่นอนแล้ว มาฆ่าโดยใช้อีเทอร์ หรือใช้วิธีดังข้อต่อที่คือกรณีที่ต้องการหาไข่ในรังไข่ทั้งสองข้าง ให้ใช้กรรไกรผ่าบริเวณหน้าท้องออก

เป็นแผลยาว แล้วใช้ปากคีบดึงเอาส่วนไขมันที่ติดกับส่วนของมดลูกออกมา วิธีนี้จะทำให้ส่วนของรังไข่โผล่ออกมาให้เห็น ส่วนในกรณีที่ต้องการหาไข่ในรังไข่ข้างที่เหลือในหนูทดลองที่ถูกคีบรังไข่ออก 1 ข้าง ก็ใช้วิธีผ่าบริเวณใกล้กับที่ผาคอนดัคตอมหวนวกไตข้างที่มีรังไข่เหลืออยู่ หลังจากที่ยังรังไข่แล้ว จะเห็นส่วนของท่อนำไข่ (oviduct) ใช้กรรไกรปลายงอขนาดเล็ก ตัดส่วนของท่อนำไข่ออกไปใส่ในสไลด์คลุมที่มีน้ำเกลือ 0.85% อยู่แล้วเล็กน้อย แล้วนำสไลด์คลุมไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 80 เท่า ทำให้ไข่หลุดออกมาจากท่อนำไข่ แล้วนับจำนวนไข่

9. วิธีผ่าหน้าท้องเพื่อตรวจการฝังตัวของ blastocyst (laparotomy)

สลบหนูด้วยอีเทอร์ ทาน้ำยาเคททอล 2.5% บริเวณกลางลำตัว (midventral line) แยกออกมาทางช่องกลอด แล้วใช้กรรไกรปลายตรง ตัดหนังบริเวณนั้นให้แยกออกแล้วจึงตัดกล้ามเนื้อเพื่อเปิดช่องท้องกว้างประมาณ 2/3 เซนติเมตร แล้วใช้ปากคีบปลายงอค่อยๆ ดึงเอาไขมันที่ติดกับมดลูกออกมา ซึ่งจะทำให้มดลูกออกมามากๆ ตรวจดูว่ามี การฝังตัวของ blastocyst เป็นจำนวนเท่าใด โดยนับจำนวน implantation site ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีลักษณะเป็นตุ่มเห็นไค้ชัดเจน คอจากนั้นใช้ปากคีบจับไขมันที่ติดกับมดลูกสอดเข้าไปในช่องท้องตามเดิมและกลับเข้าสู่ที่เดิม เย็บปิดปากแผลโดยเย็บกล้ามเนื้อก่อน แล้วจึงเย็บหนังตามเดิม ในกรณีที่ทำการผ่าหน้าท้องจะกระทำในวันที่หนูทดลองตั้งครภ์ในระยะ L₇

10. วิธีฉีดฮอร์โมนให้กับหนูทดลอง

ในกรณีที่ต้องการฉีดฮอร์โมนให้กับหนูทดลองภายหลังที่มีการตัดคอมหวนวกไตใช้วิธีฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ในปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 4 มิลลิกรัมในสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร หรือ 1 มิล-

มิลลิกรัมในสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร หรือ ฮอร์โมนแก๊ออกซีคอกติคอสเตอโรน
4 มิลลิกรัม ในสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร ทอหนูทดลอง 1 ตัว

11. วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเพื่อหาความแตกต่าง
ทางสถิติ เนื่องจากการทดลองต้องเปรียบเทียบภายในกลุ่มมากกว่า 2 กลุ่มยอม
ในการวิเคราะห์จึงใช้แบบ analysis of variance และ **lsd**

หมายเหตุ ในกรณีที่ตัดคอมหมวกไตออกจากตัวหนู หนูทดลองดังกล่าวจะต้อง
ได้รับน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% แทนน้ำประปา คัมภายหลัง
จากการตัดคอมหมวกไตออกแล้ว ตลอดการทดลอง