บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทพันธุ์ Wistar อายุ 90-120 วัน น้ำหนักตัว 80-220 กรัม เลี้ยงในห้องทดลองภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 22-25 °C ควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00) ได้รับอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดของบริษัทซีพี และน้ำตลอดเวลา และเลือกหนูเพศเมียที่มีวงจรการสืบพันธุ์ปกติอย่างน้อย 2 วงจรมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 สารเคมี

Albumin

Canada balsam

Dimethylsulfoxide (DMSO)

0.5% Eosin

70%, 90%, 95% Ethyl alcohol

Haematoxylin

N-Butyl alcohol

Paraffin wax

Xylene

3.1.3 ใบถอบแถบน้ำ บริเวณป่าชายเลน เขตบางขุนนนท์ กรุงเทพฯ

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตู้อบอุณหภูมิ 37-60°C

เครื่องตัดเนื้อเยื่อ Rotary Microtome

มีดโกน สไลด์แก้วและแผ่นปิดสไลด์

vial ขนาด 30 มิลลิลิตร

ปากคีบปลายมน
ขวดน้ำยาสำหรับสารละลายชนิดต่างๆ
ใบมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ
กล่องกระดาษสำหรับเก็บเนื้อเยื่อ
ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ 1 ชุด
โหลแก้ว
กระดาษกรอง
เครื่อง evaporator
Driblock heater

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การสกัดใบถอบแถบน้ำ

นำใบถอบแถบน้ำที่ตากแห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในเอทานอล ในอัตราส่วนชิ้นใบถอบแถบน้ำบด 1 กรัม ต่อเอทานอล 2 มล. เป็นเวลา 2-3 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง และนำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้สารสกัดด้วยเอทานอล มีลักษณะเป็นสารที่มีลักษณะเหนียวหนืดสีเขียวเข้ม

การเตรียมสารละลายสกัดใบถอบแถบน้ำ โดยนำสารสกัดไปทำให้แห้งด้วย Driblock heater ที่อุณหภูมิ 40-45 $^{\circ}$C และนำมาละลายด้วยสารละลาย DMSO อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับสัตว์ทดลองต่อไป

3.2.2 การตรวจวงสืบพันธุ์ของหนูแรท

โดยวิธี vaginal smear ดัดแปลงจากวิธีของ Long&Evan (1922) โดยใช้แท่งแก้วปลายมนทำความสะอาดด้วย 70%alcohol แล้วจุ่มใน 0.9%NaCl นำมาสอดเข้าไปในช่องคลอด ป้ายบริเวณผนังช่องคลอดเบาๆ แล้วนำแท่งแก้วนั้นมาป้ายบนสไลด์สะอาดที่บรรจุ 0.9%NaCl เล็กน้อย ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า โดยจะตรวจดูในเวลา 0.700-9.00 น. ปกติหนูแรทจะมีวงสืบพันธุ์สั้นๆระยะเวลา 4-5 วัน ประกอบด้วยระยะต่างๆดังนี้

Proestrus ระยะนี้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เป็นระยะก่อนที่จะเป็นสัด (heat) และการตกไข่ครั้งต่อไป ในรังไขจะมี follicles ขนาดใหญ่ที่จะมีการตกไข่ (preovulation swelling) เริ่มมีน้ำในมดลูก และมดลูกเริ่มหดตัวมากขึ้น เกิดการหนาตัวของ epithelium cell ที่ vagina ในการทำ vaginal smear จะพบเซลล์ค่อนข้างกลม เห็นนิวเคลียสชัดเจน เรียกว่า nucleated cell ซึ่งอาจจะพบอยู่เดี่ยวๆหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาว

Estrus ระยะนี้เวลาประมาณ 9-15 ชั่วโมง เป็นระยะเดียวที่หนูแรทเป็นสัด และยอมให้หนูตัวผู้เข้าผสมพันธุ์ได้ ในระยะนี้ follicles ในรังไข่จะเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการกระตุ้นของ follicle stimulating hormone (FSH) จากต่อมใต้สมอง ที่ถูกกระตุ้นโดย gonadotrophin releasing hormone (Gn-RH) จากสมองส่วน hypothalamus อีกทีหนึ่ง follicles จะหลั่ง estrogen ออกมามาก เป็นผลให้หนูแรทแสดงพฤติกรรมทางเพศออกชัดเจน เพื่อดึงดูดเพศผู้ พฤติกรรมดังกล่าวประกอบด้วยอาการตื่นตระหนก วิ่งตลอดเวลา หูสั่น และ อาการ iordosis ที่หมายถึง การโก่งตัวเพื่อสะดวกในการที่จะให้ตัวผู้ขึ้นขี่ (copulation) นอกจากนี้มดลูกจะมีขนาดโต ขยายใหญ่ เพราะมีปริมาณน้ำมาก เซลล์ที่ vaginal mucosa แบ่งตัวแบบ mitosis อย่างรวดเร็วทำให้เซลล์ใหม่เกิดขึ้นมาก ดันให้เซลล์ที่อยู่ผิวนอกเปลี่ยนเป็นเซลล์แบบ squamous และ cornified หลุดออกมาที่ vaginal lumen ดังนั้นเมื่อทำ vaginal smear ในช่วงต้นของระยะ estrus จะพบ cornified cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะบางและมักไม่มีนิวเคลียส อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกระจุก ส่วนในช่วงปลายของระยะ estrus จะพบ cornified cell ที่นิวเคลียสสลายไปรวมกันเป็นก้อนแข็งๆที่ vagina และอาจพบเม็ดเลือดขาว (leucocyte)บ้างเล็กน้อย การตกไข่(ovulation) เกิดในช่วงต้นของระยะ estrus นี้ หลังการตกไข่จะเกิด luteinization ของ follicle เปลี่ยนเป็น corpus luteum ขณะเดียวกันมดลูกจะมีขนาดเล็กลง เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ

Metaestrus เป็นระยะที่เกิดขึ้นหลังการตกไข่ กินเวลาประมาณ 10-14 ชั่วโมง และเป็นระยะที่อยู่ระหว่างระยะ estrus กับ diestrus ระยะนี้หนูจะไม่ยอมผสมพันธุ์กับเพศผู้ ภายในรังไข่มี corpora lutea และ follicles ขนาดเล็ก ขณะที่มดลูกมีการหดตัวน้อยลงและมีเลือดไปเลี้ยงน้อยลง ที่ vaginal lumen จะมีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากและมี corniified cells บ้างเล็กน้อย

Diestrus ระยะนี้ใช้เวลา 60-70 ชั่วโมง เป็นระยะก่อนที่ corpus luteum ในรังไข่สลายตัว (functional regression) มดลูกมีขนาดเล็ก เลือดไปเลี้ยงน้อยและหดตัวเล็กน้อย vaginal mucosa บาง ทำให้เมล็ดเลือดขาวผ่านออกมาสู่ vaginal lumen ได้ง่าย ในระยะนี้จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวในการทำ vaginal smear

บันทึกผลการทำ vaginal smear ทุกวันลงในตารางบันทึกผล โดยให้สัญลักษณ์ ดังนี้

L คือ Leucocytes หมายถึงระยะ diestrus และ metaestrus

O คือ Nucleated cell หมายถึงระยะ proestrus

Co คือ Cornified cell หมายถึงระยะ estrus

3.2.3 การเตรียมหนูตั้งครรภ์

นำหนูแรทเพศเมียไปผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศผู้ โดยตรวจดูวงอีสตรัสจนถึงวัน proestrus ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่ใกล้กับเวลาตกไข่ นำหนูแรทตัวเมียไปใส่ในกรงของหนูแรทเพศผู้ โดยใช้อัตราส่วนพ่อพันธุ์ : แม่พันธุ์ 1 : 1 ทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นนำหนูแรทตัวเมียมาตรวจดูสเปิร์มโดยวิธี vaginal smear ถ้าพบsperm plug จะนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (D1)

3.2.4 การทำ laparotomy

มีขั้นตอนดังนี้ สลบหนูด้วย diethyl ether แล้วนำมานอนหงายทำความสะอาดหน้าท้องด้วยน้ำยา dettol เปิดหน้าท้องโดบใช้กรรไกรตัดผิวหนังและกล้ามเนื้อหน้าท้องแนวกลางลำตัวเป็นแนวยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร นับจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน การสูญสลายของตัวอ่อน ในกลุ่มหนูแรทที่เลี้ยงถึงวันที่คลอดให้นำมดลูกใส่คืนช่องท้อง แล้วเย็บปิดด้วยไหมเบอร์ 3/0 ส่วนหนูที่จะนำไปศึกษาเนื้อเยื่อจะเก็บตัวอย่างมดลูกดองในน้ำยา Bouin

3.2.5 การทำสไลด์ถาวร

ในวันที่ 7 และ 13 ของหนูแรทที่ตั้งครรภ์นำเนื้อเยื่อมดลูกจากการทดลอง ในข้อ 3.1.1.1 ทุกกลุ่มๆละ 3 ตัว มาดองและผ่านขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อและย้อมสีด้วย Haematoxylin และ Eosin ตามวิธีมาตรฐาน แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และบันทึกภาพ

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำมดลูกหนูแรทมาดองในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. แช่ชิ้นเนื้อใน ethyl alcohol เปอร์เซ็นต์ต่างๆ เพื่อดึงน้ำออกโดยแช่ใน 70% ethyl alcohol นาน 6 ชั่วโมง 90% alcohol นาน 6 ชั่วโมง 95% alcohol นานครั้งละ 6 ชั่วโมง 2 ครั้ง และ n-butanol 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. แช่ชิ้นเนื้อใน xylene 1 ชั่วโมง

4. แล้วมาแช่ในสารละลายที่มี xylene + wax ที่ละลายในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ภายในตู้อบอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส แล้วย้ายลงใน wax 1 จากนั้นย้ายลงใน wax 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ฝังชิ้นเนื้อลงใน paraplast

6. นำชิ้นเนื้อที่ฝัง paraplast มาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ตัดหนา 6 ไมโครเมตร

7. ติดบนแผ่นสไลด์แก้ว โดยใช้ albumin นำ slide ไปอุ่นบน warm plate เพื่อให้ section มีการแผ่ตัวออกเต็มที่ เมื่อ slide แห้งดีแล้วจึงนำไปย้อมสีต่อไป

ขั้นตอนการย้อมสี Haematoxylin และ Eosin

1. นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อแช่ใน xylene 2 ครั้งๆละ 5 นาที

2. แช่ใน alcohol เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จาก 100% butanol, 95%, 90% และ 70% ethanol ตามลำดับ เป็นเวลา 3 นาที ทุกขั้นตอน

3. นำสไลด์จากขั้นตอนที่ 7 มาย้อมด้วยสี haematoxylin นาน 12 นาที แล้วจึง differentiate ในสารละลายที่ประกอบด้วย 70% ethyl alcohol 100 มล. + 2-3 หยด HCL(conc.)

4. จากนั้นแช่ในน้ำประปา 10 นาทีจนเห็นนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม

5. นำมาดูดน้ำออกจากสไลด์ด้วย 70%, 90% ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาที

6. ย้อมด้วยสี eosin นาน 2 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% ethyl alcohol นาน 3 นาที

7. ดึงน้ำออกโดยแช่ใน n-butyl alcohol นาน 3 นาที

8. แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้งๆละ 6 นาที แล้ว mount สไลด์ด้วย canada balsam

9. ผึ่งหรืออบสไลด์ให้แห้ง เพื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3.2.6 การวิเคราะห์ผล

3.2.6.1 วิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าทางสถิติหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้ Student T-test

3.2.6.2 วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อมดลูกหนูแรทที่ได้รับสารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 150 มก./กก.นน.ตัว 300 มก./กก.นน.ตัว และ600 มก./กก.นน.ตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมบันทึกผลและถ่ายภาพ

3.3 แผนการทดลอง

ตารางที่ 3-1 แสดงแผนการให้สารสกัดใบถอบแถบน้ำ

Treatment (n)	No. of Rats	Days of Treatment	Days of Laparotomy
กลุ่มที่ 1 สาร DMSO 1 มล./กก.นน.ตัว	10	D 1-6	D 7, D 13
กลุ่มที่ 2 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 150 มก./กก.นน.ตัว	10	D 1-6	D 7, D 13
กลุ่มที่ 3 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 300 มก./กก.นน.ตัว	10	D 1-6	D 7, D 13
กลุ่มที่ 4 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 600 มก./กก.นน.ตัว	10	D 1-6	D 7, D 13
กลุ่มที่ 5 สาร DMSO 1 มล./กก.นน.ตัว	10	D 6-11	D 13
กลุ่มที่ 6 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 150 มก./กก.นน.ตัว	10	D 6-11	D 13
กลุ่มที่ 7 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 300 มก./กก.นน.ตัว	10	D 6-11	D 13
กลุ่มที่ 8 สารสกัดใบถอบแถบน้ำ ขนาด 600 มก./กก.นน.ตัว	10	D 6-11	D 13

หลังจากหนูแรทได้รับสารละลาย DMSO และ สารสกัดใบถอบแถบน้ำ นำหนูแรทกลุ่มที่ 1-4 ทำ laparotomy เพื่อนับจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมดลูก ในวันที่ 7 ของการตั้งครรภ์ กลุ่มละ 3 ตัว นำหนูแรทกลุ่มที่ 2-4 ที่เหลือกลุ่มละ 7 ตัว ทำ laparotomy ในวันที่ 13 ของการตั้งครรภ์ เพื่อนับจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน จำนวนการสูญสลายของตัวอ่อน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมดลูก กลุ่มละ 3 ตัว คงเหลือหนูในกลุ่มที่ 1 จำนวน 7 ตัว กลุ่มที่ 2-4 จำนวน 4 ตัว เลี้ยงต่อจนกระทั่งคลอด

ส่วนหนูแรทกลุ่มที่ 5-8 ทำ laparotomy ในวันที่ 13 ของการตั้งครรภ์ เพื่อนับจำนวนการฝังตัว และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมดลูก กลุ่มละ 3 ตัว มาทำการศึกษาทางมิญชวิทยาเช่นกัน คงเหลือหนูในกลุ่มที่ 5-8 จำนวน 7 ตัว เลี้ยงต่อจนกระทั่งคลอด

นำหนูแรทที่เหลือของกลุ่มทดลองมาเลี้ยงต่อจนถึงวันที่ 20 ของการตั้งครรภ์ จึงแยกเลี้ยงกรงละ 1 ตัว จนถึงวันคลอด (ช่วงวันที่ 21-23) นับจำนวน ชั่งน้ำหนัก ความผิดปกติของลูกหนู และชั่งน้ำหนักของหนูตั้งครรภ์ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันสุดท้ายของการคลอด