บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้หนูเมาซ์ พันธุ์ CD-1 เพศเมียอายุระหว่าง 2-4 เดือน และเพศผู้อายุ 5-6 เดือน เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย โดยควบคุมให้มีแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00 น) และมืด 10 ชั่วโมง (20.00-06.00 น) อุณหภูมิห้องประมาณ 24 $\pm$ 1° เซลเซียส ให้อาหารหนูสำเร็จรูปและน้ำดื่มอย่างไม่จำกัดตลอดเวลา

1. การตรวจวงจรการเป็นสัด

หนูเมาซ์จะมีวงจรเป็นสัดที่เป็นรอบ (cycle) โดยพบว่ามีการตกไข่ทุก ๆ 4 วัน แต่ช่วงเวลาดังกล่าวอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปได้บ้างขึ้นกับฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมใต้สมอง นั้นคือ เอฟ เอส เอช (FSH, Follicle Stimulating Hormone) และ แอล เอช (LH, Lutenizing Hormone) นอกจากนี้ยังอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อวงจรการเป็นสัด เช่น แสงสว่าง อุณหภูมิ อาหารหรือแม้แต่การเลี้ยงดู จำนวนหนูต่อกรงมากเกินไปก็มีผลต่อการเป็นสัด

การทำ vagina Smear

1. ใช้แท่งแก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มาลนไฟให้ร้อนแล้วบีบส่วนปลายที่ร้อนให้แบนคล้ายช้อน หรือรูปวงรีขนาดเล็กเพื่อที่จะเก็บเซลล์ให้ได้จำนวนมาก ปรับปรุงมาจากวิธีของ Long และ Evan (1922)

2. ก่อนทำการตรวจให้ทำความสะอาด แท่งแก้วตอนปลายด้วยแอลกอฮอล์ 70% เช็ดให้แห้งจุ่มในน้ำเกลือ (0.9% NaCl)

3. นำหนูเพศเมียที่จะตรวจวงจรการเป็นสัดมา แล้วสอดแท่งแก้วเข้าไปในช่องคลอดให้ปลายแท่งแก้วแตะกับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะบนหยดน้ำเกลือที่เตรียมไว้บนแผ่นสไลด์

4. ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นเซลล์ชนิดใด รายละเอียดการตรวจเซลล์โดย Vagina Smear แสดงในตารางที่ 2.2

5. บันทึกผล

คัดเลือกหนูเพศเมียที่มีวงจรปกติ 4 วัน ติดต่อกันอย่างน้อย 2 วงจร แยกเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของช่องคลอดที่ปรากฏ

ระยะของวงจรการเป็นสัด	ลักษณะเซลล์ของช่องคลอดที่ปรากฏ
Diesturs	ปากช่องคลอดเปิดเล็กน้อย เนื้อเยื่อมีลักษณะเปียกชื้น smear จะพบ leucocyte จำนวนมากอาจพบ nucleated epithelium cell บ้าง
Proestrus	ปากช่องคลอดเปิดกว้างขึ้น เนื้อเยื่อมีสีชมพูแกมแดง smear จะพบ nucleated cell จำนวนมาก
Estrus	ปากช่องคลอดเปิดกว้างขึ้น เนื้อเยื่อมีสีชมพูอ่อนและไม่เปียกชื้นมาก smear พบ cornified cell เป็นช่วงที่เกิด heat และมีการตกไข่ หนูเพศเมียจะยินยอมผสมกับเพศผู้ในระยะนี้เท่านั้น
Metestrus	เนื้อเยื่อช่องคลอดมีสีซีดและแห้งลง smear พบ leucocyte cornified cell และอาจพบ nucleated cell

2. การชักนำให้หนูเมาซ์ ตกไข่จำนวนมากโดยฮอร์โมน PMSG และ HCG

พี เอ็ม เอส จี (PMSG, Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) เป็นโกนาโดโทรปินจากซีรัมของม้าท้อง พี เอ็ม เอสจีนี้สามารถสกัดแยกออกมาได้จากปัสสาวะของม้าท้องและมีฤทธิ์คล้ายกับ เอฟ เอส เอช และ แอล เอช ดังนั้นจึงใช้ พี เอ็ม เอส จี กระตุ้น ให้มีการเจริญเติบโตของ

ฟอลลิเคิล ในรังไข่ให้มากกว่าปกติ

เอช ซี จี (HCG, Human Chorionic Gonadotropin) สามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะของผู้หญิงที่ตั้งท้อง ฮอร์โมนนี้ผลิตขึ้นมาจาก ซินไซติโอโทรโฟบลาสติกเซลล์ (Syncytiotrophoblastic cell) ซึ่งอยู่ที่ รก เอช ซี จี มีฤทธิ์ คล้าย แอล เอช ในการทำให้เกิดการตกไข่ จึงใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่

3. การเตรียมหนูเพื่อเก็บเอ็มบริโอ

1. <u>จากหนูที่ตกไข่ตามธรรมชาติ</u>

นำหนูเพศเมียที่ตรวจพบเซลล์นิวคลีเอต (nucleated cell) (เวลาที่เหมาะสมในการตรวจหาเซลล์นิวคลีเอต มักพบมากในช่วงเช้า) แสดงว่าหนูอยู่ในช่วง Proestrus ซึ่งเป็นระยะที่ใกล้จะมีการตกไข่ และยินยอมให้เพศผู้ผสม มาขังรวมกับหนูเพศผู้ที่เคยผสมและให้ลูกมาแล้ว และเก็บแยกไว้กรงละ 1 ตัว ในอัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมีย = 1:1 ตรวจดูก้อนสเปิร์ม (Sperm plug) ในช่องคลอดในเช้าวันต่อมา ถ้าพบก้อนสีขาวบริเวณช่องคลอด หรือพบสเปอร์มจากการทำ Vaginal Smear ให้เป็นวันแรกของการตั้งท้อง (Day-1)

2. <u>จากหนูที่กระตุ้นให้ตกไข่มากกว่าปกติ (Superovulation)</u>

นำหนูตัวเมียอายุมากกว่า 2-4 เดือน มาชักนำให้เกิดการตกไข่จำนวนมากโดย ฉีดฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี (PMSG) 5 iu เข้าช่องท้อง (intra peritoneal injection) และฉีดฮอร์โมน เอช ซี จี (HCG) 5 iu เข้าช่องท้อง หลังจากฉีด พี เอ็ม เอส จี 36-48 ชั่วโมง นำไปขังรวมกับหนูเพศผู้ที่เคยผสมและให้ลูกมาแล้วในอัตราส่วน 1:1 เช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าตรวจพบก้อนสเปอร์มสีขาวบริเวณช่องคลอด หรือพบสเปอร์มเมื่อทำ vagina smear ให้ถือเป็นวันแรกของการตั้งท้อง (Day-1)

4. การเก็บเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ที่ระยะ 2-เซลล์

ฆ่าหนูเพศเมียที่ตั้งท้องในวันที่ 2 หลังจากตรวจพบก้อนสเปอร์ม (Vaginal plug) โดยวิธีดึงคอต่อ (cervical dislocation) ทำความ

สะอาดหน้าท้องด้วยแอลกอฮอล์ 70% เปิดหน้าท้องตัดแยกท่อนำไข่ใส่ลงบล็อกแก้ว (emgryological watch glass) ที่มีสารละลาย Phosphate buffer Saline (PBI : Whittingham, 1971) อยู่ประมาณ 1.5-2 มิลลิลิตร นำบล็อกแก้วไปตรวจดูท่อนำไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่มีกำลังขยาย 10-40 เท่า ใช้หลอดฉีดยาพลาสติก (Plastic Syring) ขนาด 1 ซีซี บรรจุ PBI ที่ส่วนปลายมีเข็มฉีดยาปลายทู่เบอร์ 30 สอดเข้าทางปากแตรของท่อนำไข่ ฉีด PBI ไล่เอ็มบริโอภายในท่อนำไข่ลงในบล็อกแก้ว เก็บเอ็มบริโอด้วย Capillary pipette ล้างใน PBI 1 ครั้ง แล้วนำเอ็มบริโอที่ได้ไปเก็บในหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก (Plastic Culture dish) โดยมีพาราฟินเหลว (liguid paraffin) ปิดคลุมแล้วนำไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยง (incubator) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การเตรียมหนูเพศเมียเป็นตัวรับโดยวิธีตั้งท้องเทียม (Pseudo-pregnant recipients)

นำหนูเพศเมีย อายุ 2-4 เดือน มาทำ vagina smear เมื่อตรวจพบเซลล์นิวคลีเอต (nucleated cell) แสดงว่าหนูอยู่ในช่วง proestrus ซึ่งพร้อมจะให้ตัวผู้เข้าผสม จึงนำไปขังรวมกับหนูตัวผู้ที่ทำหมันแล้ว (vasectomized male) ซึ่งเตรียมไว้ไม่ต่ำกว่า 1 เดือน เพื่อให้ตัวอสุจิ ไม่ติดค้างในท่อสืบพันธุ์ เช้าวันต่อมา ถ้าตรวจพบ vaginal plug สีขาวที่บริเวณช่องคลอดให้ถือเป็นวันแรกของการท้องเทียม

6. การเตรียมหนูเพื่อการย้ายฝากเอ็มบริโอ

วางยาสลบหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมเป็นวันที่ 3 (ซึ่งจะตรงกับอายุเอ็มบริโอที่จะถ่ายฝาก) ด้วยอีเธอร์ ทำความสะอาดด้านข้างลำตัว ระดับใต้ชายโครงด้านหนึ่งให้ทั่วด้วยน้ำยาเดตทอลความเข้มข้น 2% ผ่าเปิดผิวหนังและกล้ามเนื้อด้านข้าง (dorsalateral incission) ผ่ายาวประมาณ 1 เซนติเมตรบริเวณต่ำจากชายโครงเล็กน้อย ใช้ปลายแหลมของ Watch-Maker forceps ดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกออกมา เก็บเอ็มบริโอ ที่อยู่

ในน้ำยาเพาะเลี้ยงด้วย pipette ที่ทำขึ้นมาอย่างพิเศษ โดยทำมุมงอ ประมาณ 45° มีความยาวพอเหมาะไม่สั้นหรือยาวเกินไป ดูดเก็บเอ็มบริโอมา 5 ตัว เอ็มบริโออยู่ใน Pipette แสดงในรูปที่ 2.1 ต่อมาใช้ปลายแหลมของ Watch-Maker forceps จับส่วนต้นของมดลูกเอาไว้ แล้วใช้เข็มแหลมเจาะผนังมดลูกให้เป็นช่องเล็ก ๆ ต่ำจากท่อนำไข่ประมาณ 5 มิลลิเมตร สอดปลาย pipette ที่เก็บเอ็มบริโอเตรียมไว้ เข้าไปในมดลูกลึกประมาณ 1 เซนติเมตร เป่าดันเบา ๆ ให้เอ็มบริโอ เข้าสู่มดลูก เย็บบาดแผลปิดชั้นกล้ามเนื้อ และผิวหนัง แล้วทำความสะอาด บาดแผลด้วย น้ำยาเดตทอล 2% ทำการย้ายฝากเอ็มบริโอเข้าในมดลูกอีกข้างหนึ่งด้วยวิธีเดียวกัน แยกเลี้ยงตัวรับเหล่านี้ไว้ดูผลต่อไปในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง (หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอ 5 วัน) วิธีการย้ายฝาก แสดงในรูปที่ 2.2

<u>อุปกรณ์</u>

1. Laminar Flow	:	Model GLG-48, Gensa Company Limited. Bangkok, Thailand.
2. Water Jacket CO_2 incubator	:	Model 3030 Forma Scientific, Ohio, U.S.A.
3. Advanced Osmometer	:	Model 3 D2, 1000 Highland avenue, Massachusetts, U.S.A
4. pH Meter	:	Cole Parmer, DigipH ase, Medico. Bangkok, Thailand.

5. Phase contrast Microscope : Model IMT-2,
Olympus Optical Co.,Ltd.
Tokyo, Japan.

6. Dissecting Microscope : Olympus, Japan

7. Electric Pressure Steam Sterilizer : Model No.25x
All American.

8. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด : JP - 160 Chyo Balance,
Corporation, Tokyo,
Japan.

9. ตะเกียงอัลกอฮอล์

10. Plastic tissue culture dish : Nunclon, Roskildi,
Denmark

11. Plastic Syring 1 ml, 10 ml : Terumo Corporation,
Tokyo, Japan.

12. Glenco-Microsyringes : Spectrum laboratories. Inc.
size 10 ml Los Angeles. California.

13. Embryological Watchglass : Griffin & George Co.
HLJ-630-S.

14. Millipore Filter
Plastic Swinney adaptor type
และ Millipore Membrane : Filter type HA. Pore size 0.22
Micron. Millipore Corporation,
Bedford, Massachusetts, U.S.A.

15. Hypodermic needles : Size G 30x3/4"
Stainless steel Lure
Mounts. England.

16. Mouth Pieces

I16700272

17. Pasteur pipette

18. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง

- กรรไกรปลายตรง 1 ด้าม
- กรรไกรปลายโค้ง 1 ด้าม
- Watch-Mader forceps 2 คู่
- Non tooth forceps 1 คู่
- Needle holder และ Curved surgical needle 1 อัน
- Surgical Silk

* ตั้งแต่หมายเลข 14 เป็นอุปกรณ์เครื่องแก้ว โลหะและพลาสติกที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ และการผ่าตัดสัตว์ทดลอง ล้างทำความสะอาดด้วย 2% 7X แล้วล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่งก่อนนำไปอบแห้งที่ตู้อบแห้ง (hot air oven) ด้วยความร้อน 70-80 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง แยกเครื่องแก้ว โลหะ และพลาสติกออกจากกัน

สำหรับ เครื่องมือที่เป็นพลาสติกนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

เครื่องมือที่เป็นโลหะและเครื่องแก้วนำไปฆ่าเชื้อในตู้อบแห้ง (hot air oven) ด้วยความร้อน 150 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

<u>สารเคมี</u>

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Modified Krebs Ringer Solution (M-16) และ phosphate buffer Saline (PBI)

* 1. Bovine Serum albumin : Fraction V No. A-9647 Lot 95 F-0143 Sigma Chemical Company.

2. Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl. 2H_2O$)

3. Disodium hydrogen phosphate 7-hydrate reinst ($Na_2HPO_4 . 7H_2O$)

4. D-Glucose ($C_6H_{12}O_6 . H_2O$)

5. Magnesium Chloride hexahydrate ($MgCl_2 . 6H_2O$)

6. Magnesium Sulphate ($MgSO_4 . 7H_2O$)

7. Potassium Chloride (KCl)

8. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

9. Penicillin G. Sodium

10. Phenol red ($C_{19}H_{14}O_5S$)

11. Sodium Chloride (NaCl)

12. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

13. Sodium Pyruvate (Na pyruvate)

14. Sodium Lactate (Na Lactate 60% Syrup)

: No L-1375 Lot 102F-5048

Sigma Chemical Company

St. Louis, Mo. U.S.A.

หมายเหตุ * สารเคมีจาก Sigma Chemical Company

2-13 สารเคมีจาก E.Merck Dermstadt, Germany

2. Liquid paraffin colourless : BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

3. ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ของสัตว์ทดลอง

3.1 Chorionic Gonadotropin Human Pregnancy Urine HCG.No CG-10)

3.2 Gonadotropin (Pregnant Mare's Serum, PMSG NO. G-4877) สารทั้ง 2 เป็นของ Sigma Chemical Company St.Louis, Mo.U.S.A.

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

4.1 Oleic acid (Cis-9-octadecenoic acid)

Lot 38 F 84685

4.2 Linoleic acid (Cis-9-Cis-12 Octadecadienoic acid) Lot 33 HO 4235

4.3 Arachidonic acid

Lot 112 H 78035

สารทั้ง 3 ชนิด เป็นของ Sigma Chemical Company st. Louis. Mo U.S.A.

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

น้ำยา PBI และน้ำยาเพาะเลี้ยง M 16 เป็น Simple Medium ที่เตรียมขึ้นเอง การเตรียมทำโดยชั่งสารเคมีตามน้ำหนักที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.3 โดยเริ่มต้นเป็นข้อ ๆ ตามลำดับดังนี้

1. เตรียมน้ำกลั่นที่ได้จากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ Elgastat UHQ (เทียบเท่ากับน้ำที่ได้จากการกลั่น 3 ครั้ง) ตามที่ต้องการ ลงใน flask ในการเตรียม M-16 จะต้องแยกปริมาณน้ำทั้งหมด ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งใช้ละลาย $NaHCO_3$ เพียงอย่างเดียว ถ้าละลายพร้อมกับสารอื่นๆ อาจทำให้เกิดการตกตะกอนของสารในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้ น้ำอีกส่วนหนึ่งใช้ละลายสารอื่น ๆ ที่เหลือยกเว้น บี เอส เอ แล้วจึงนำสารละสายทั้ง 2 Flask มาผสมกับ

2. นำไป equilibrate ด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนถึงจุดอิ่มตัวสีของน้ำยาเพาะเลี้ยงเปลี่ยนจากสีชมพูแก่มาเป็นสีชมพูเรื่องๆ หรือสีส้มเหลืองอ่อน ๆ

3. ปรับระดับ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.3 ด้วยสารละลาย 1N NaOH หรือ 1 N HCl

4. เติม BSA ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 3 mg/ 1 ml

5. นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน ฟิลเตอร์ (Membrane filters) ขนาด 0.22 ไมครอน

6. นำน้ำยาเพาะเลี้ยงไปวัดค่า Osmolality ด้วยเครื่อง Advanced Osmometer ซึ่งปกติจะอยู่ที่ระดับ 285-295 mosm/kg

7. บรรจุน้ำยาลงในภาชนะสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

8. เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 15 วัน

เมื่อต้องการใช้น้ำยาในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนำน้ำยามา equilibrate ด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ก่อนเพื่อปรับ pH ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ (7.2-7.4) จากนั้น จึงหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก (Plastic culture dish) ขนาด 35x10 มิลลิเมตร เป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ตามวิธีของ Brinster (1963) ที่เรียกว่า Microdrop method แล้วใช้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) ปิดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าว แล้วนำจานเพาะเลี้ยงเก็บในตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส ความชื้น อยู่ในระดับอิ่มตัวและมีอากาศที่มีก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (5% CO_2)

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยา เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหนูเมาส์ Modified-kerbs-Ringer Solution (M-16) และน้ำยา Phosphate Buffer Saline (PBI)

ส่วนประกอบ	M-16 (Mg/1000 ml)	PBI (Mg/1000Ml)
NaCl	5534	8000
KCl	356	356
$CaCl_2\ 2H_2O$	250	250
KH_2PO_4	162	162
$Na_2HPO_4 . 7H_2O$	-	1150
$MgSO_4 . 7H_2O$	294	-

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	M-16 (Mg/1000 ml)	PBI (Mg/1000Ml)
$NaHCO_3$	2106	-
$MgCl_2.6H_2O$	-	100
Glucose	1000	1000
Na lactate	3.5 Ml	-
Na Pyruvate	36	27.5
BSA	3000	3000
Penicillin G. Sodium	60	60
Streptomycin	50	-
Phenol red	10	10
pH	7.2	7.2
Osmolality (mOsmol/Kg)	288-292	290

Whittingham, 1971

วิธีทดลอง

1. การศึกษาผลของกรดไขมันที่มีบนเปื้อนอยู่ในซีรัมอัลบูมินปกติ (normal BSA) เปรียบเทียบกับ BSA ชนิดปราศจากกรดไขมัน (defatted BSA) และผลของเอธานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายกรดไขมัน ต่อการเจริญของเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์

แบ่งเอ็มบริโอระยะ 2 เซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่	ชนิดของ BSA ในน้ำยาเพาะเลี้ยง M-16
1	ซีรัมอัลบูมินปกติ เป็นกลุ่มควบคุม
2	ซีรัมอัลบูมินชนิดปราศจากกรดไขมัน
3	ซีรัมอัลบูมินชนิดปราศจากกรดไขมัน+เอธานอล
4	ซีรัมอัลบูมินปกติ+เอธานอล

ตรวจดูการเจริญ และนับจำนวนเอ็มบริโอ ที่เจริญในระยะต่าง ๆ ทุกๆ 24 ชั่วโมง ไปจนถึงบลาสโตซีสและหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา (hatching) ใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน

2. ศึกษาผลของกรดไขมัน 3 ชนิด คือ ลิโนเลอิก (linoleic) อะราคิโดนิก (arachidonic) และ โอเลอิก (oleic) ต่อการเจริญและการดหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา

แบ่งเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ ออกเป็น 10 กลุ่ม เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมซีรัมอัลบูมินชนิดปราศจากกรดไขมันร่วมกับกรดไขมันที่ศึกษา

กลุ่มที่	ชนิดของกรดไขมันที่ศึกษา	ความเข้มข้นของกรดไขมัน (mM)
1	ethanol (กลุ่มควบคุม)	0
2	linoleic	0.18
3	linoleic	0.09
4	linoleic	0.045
5	arachidonic	0.18

กลุ่มที่	ชนิดของกรดไขมันที่ศึกษา	ความเข้มข้นของกรดไขมัน (mM)
6	arachidonic	0.09
7	arachidonic	0.045
8	oleic	0.18
9	oleic	0.09
10	oleic	0.045

ตรวจดูการเจริญและนับจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะต่าง ๆ ทุก 24 ชั่วโมง ติดตามจนกระทั่งถึงระยะบลาสโตซีส และหลุดออกจากโซดาเพลลูซิดา (hatching)

3. ศึกษาผลต่อเนื่องของกรดไขมัน ต่อการฝังตัวและการอยู่รอดของเอ็มบริโอ

แบ่งเอ็มบริโอที่ระยะ 2 เซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยเลือกกรดไขมันที่สนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอดีที่สุด และกลุ่มที่ไม่มีกรดไขมันใน BSA + ethanol เปรียบเทียบกับ น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติม BSA ธรรมดา ติดตามการเจริญของเอ็มบริโอจนถึงระยะ 8 เซลล์ จากนั้นแยกถ่ายฝากเอ็มบริโอเข้าไปในมดลูกทั้ง 2 ข้างของหนูตัวเมียที่ตั้งท้องเทียม (Pseudopregnant Mice) ในวันที่ 3 ของการตั้งท้องเทียม ข้างละ 5 ตัว กลุ่มละ 10 ตัว

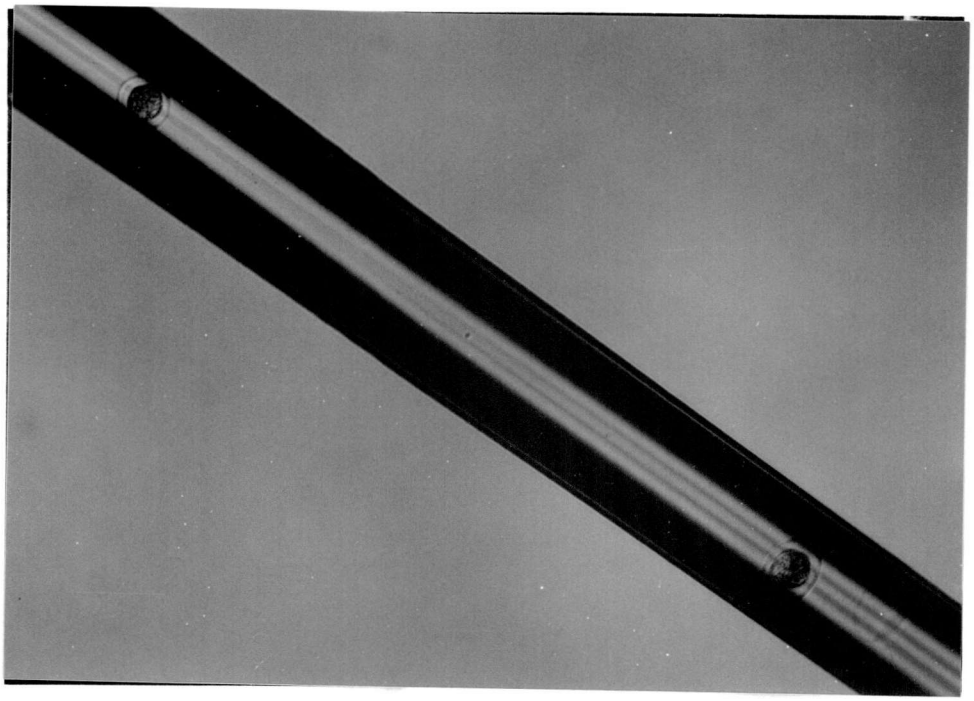
กลุ่มที่	เอ็มบริโอที่ระยะ 8 เซลล์ ที่ถ่ายฝากไปยังตัวรับ
1	ซีรัมอัลบูมินปกติ เป็นกลุ่มควบคุม
2	ซีรัมอัลบูมินชนิดบราศจากรอไขมัน+เอธานอล
3	กรดไขมันที่สนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอดีที่สุด

ในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง (5 วันหลังการถ่ายฝาก) นำหนูเมาซ์ที่ได้รับการย้ายฝากเอ็มบริโอมาวางยาสลบด้วยอีเธอร์ ทำความสะอาดหน้าท้องด้วยน้ำยาเดททอล 2% ก่อนผ่าเปิดหน้าท้อง (Mid-Ventral incision) ใช้ปากคีบดึงปีกมดลูกออกมา เพื่อตรวจดูระดับการเจริญจากขนาดและนับจำนวนฟีตัสในมดลูกแต่ละข้างของตัวรับ จากนั้นเก็บปีกมดลูกเข้าไปในช่องท้องเย็บปิดกล้ามเนื้อและหน้าท้องแล้วทำความสะอาดด้วยน้ำยาเดททอล 2% หลังจากนั้นแยกเลี้ยงเดียวเพื่อรอให้ครบกำหนดคลอด นับจำนวนลูกที่คลอด (young born) เปรียบเทียบกับจำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝากและฟีตัสที่พบในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง

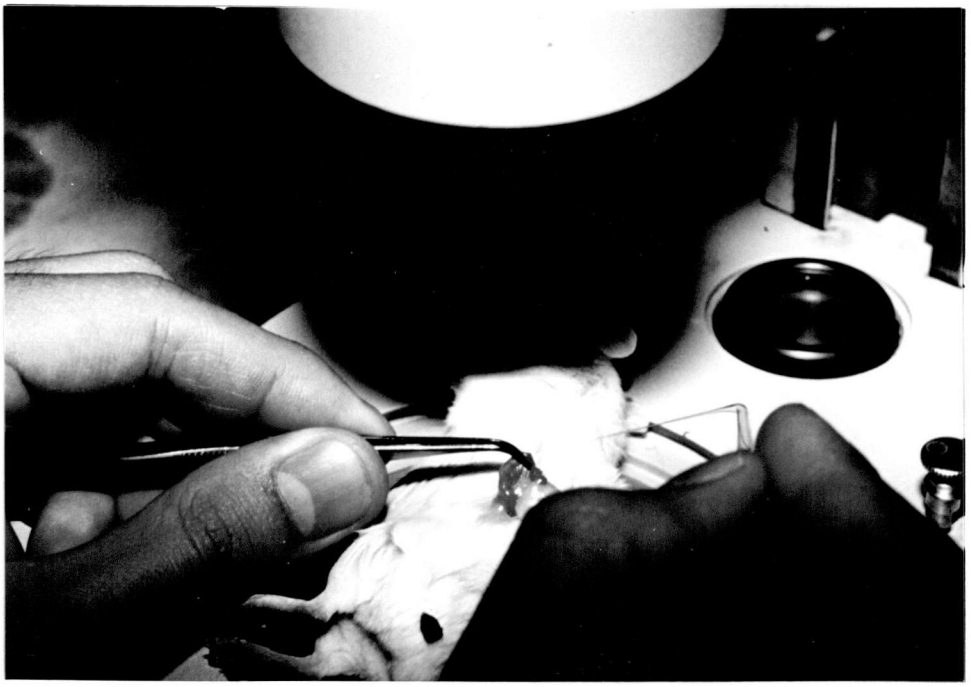
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมโดยใช้ One-Way analysis of Varience (F-test)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 แสดงให้เห็นเอ็มบริโอใน Pipette



รูปที่ 2.2 แสดงการย้ายฝากเอ็มบริโอ เข้าตัวรับ