บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเลี้ยงหนูที่ใช้ในการทดลอง

หนูขาวที่นำมาใช้ทดลองเป็นหนูตัวเมีย พันธุ์ wistar ซึ่งได้ทำการผสมพันธุ์ที่แผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หนูทุกตัวที่ใช้ในการทดลองเป็นหนูตัวเมียที่ยังไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อน (virgin) เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 – 26 °C และควบคุมแสงสว่าง ให้มีแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 06.00 – 20.00 น.) และกลางคืน 10 ชั่วโมง (ระหว่าง 20.00 – 6.00 น.) เลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานสำเร็จรูป ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท F.E. Zuelling (Gold Coil Mills) น้ำที่เลี้ยงใช้น้ำประปาธรรมดา หนูที่ใช้ทดลองโตเต็มที่อายุ 90 วันขึ้นไป มีน้ำหนักประมาณ 150 กรัม หนูทุกตัวที่ทดลองจะต้องผ่านการตรวจสอบดูว่ามีวงสืบพันธุ์ (oestrous cycle) เป็นปกติ (4 – 5 วัน) แล้ว 2 รอบ

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ (oestrous cycle) ของสัตว์ทดลอง

นำหนูที่ใช้ในการทดลองมาทำการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวัน โดยใช้แท่งแก้วปลายมนจุ่มน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85% แตะที่เยื่อด้านในของ vagina นำมาป้ายบนสไลด์ ตรวจดูเซล ด้วยกล้องจุลทัศน์ ลักษณะเซล ที่ปรากฏใช้กำหนดแบ่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ของหนูขาว (Rat) ออกเป็น 4 ระยะ คือ

2.1 Diestrus เป็นระยะนานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณครึ่งหนึ่งของ cycle (2 วัน) ระยะนี้รังไข่ไม่สร้างฮอร์โมน oestrogen และประกอบไปด้วย non-functional corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งหลังสุด มดลูกมีขนาดเล็ก vagina มี epithelium บางกว่าระยะอื่น ทำ vaginal smear จะพบเซล เม็ดเลือดขาว (leucocyte) มาก อาจมี epithelial cells ปนอยู่บ้างเล็กน้อย

แผนภาพที่ 2

แสดงเซลจาก Vaginal smear ในระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ (Oestrous cycle) ของหนู (ถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ชนิด Phase contrast)

รูปที่ 2a แสดงเซลเม็ดเลือดขาว (leukocyte) ระยะ diestrus ของวงสืบพันธุ์ของหนู

กำลังขยาย X 320

รูปที่ 2b แสดง nucleated cell ระยะ proestrus ของวงสืบพันธุ์ของหนู

กำลังขยาย X 320

รูปที่ 2c แสดง cornified cell ระยะ estrus ของวงสืบพันธุ์ของหนู

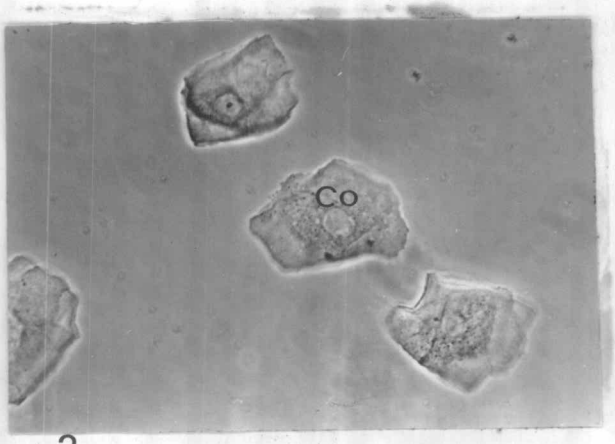
กำลังขยาย X 320

อักษรย่อ

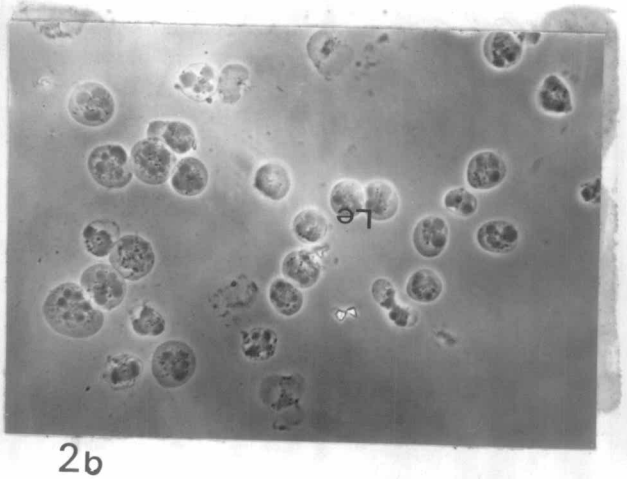
Co = Cornified cell

Le = Leukocyte

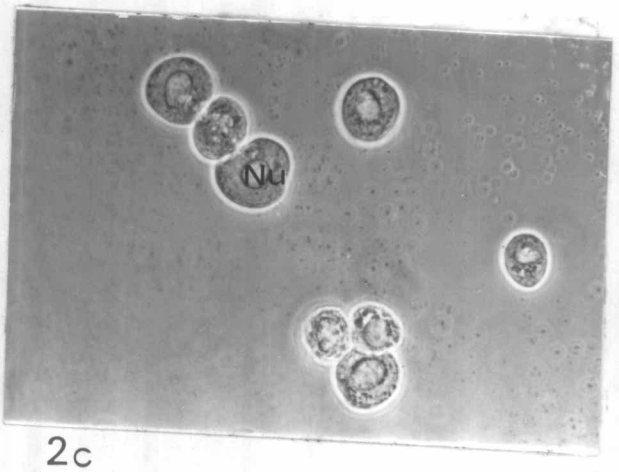
Nu = Nucleated cell



2a



2b



2c

2.2 Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ กินเวลา 12 ชั่วโมง ระยะนี้ follicles จะเจริญเติบโตขึ้น (preovulatory swelling) และสร้างฮอร์โมน oestrogen จำนวนมาก เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก (hyperemia) ที่ vagina จะเกิดการเพิ่มความหนาของชั้นเซล บุผิว (stratification of vaginal epithelium cells) ทำvaginal smear จะพบเซล บุผิวที่เพิ่งสร้างขึ้นใหม่เป็นเซลล์ค่อนข้างกลม เห็นนิวเคลียสภายในชัดเจน เรียกว่า nucleated cell ไม่พบมีเซล เม็ดเลือดขาวอยู่เลย ในตอนปลายระยะนี้หนูจะมี heat ยินยอมให้ตัวผู้ผสมในเวลาใกล้เคียงกับที่จะตกไข่

2.3 Estrus เป็นระยะต่อจาก proestrus ตอนต้นระยะนี้จะมีฮอร์โมน oestrogen ระดับสูงแล้วมีการตกไข่ heat จะหมดไปหลังจากมีการตกไข่ ต่อมาระดับของ oestrogen จะลดลง มดลูกมีการเสียน้ำและขนาดเล็กลง เซล บุผิวช่องคลอดยังคงหนา และเกิด cornification เซล ชั้นนอกจะหลุดเข้าสู่ lumen ของ vagina เป็นจำนวนมาก เรียกว่า cornified cell รูปร่างหลายเหลี่ยม, แบน, นิวเคลียส degenerate ระยะนี้จะกินเวลา 30 ชั่วโมง

2.4 Metestrus เป็นระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นภายหลังจากการตกไข่ กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ระดับฮอร์โมน oestrogen จะลดต่ำมาก เซล บุผิว vagina จะมี leucocytes ปนกับ cornified cell

3. การตั้งครรภ์ของหนู (Pregnancy)

ขังหนูตัวเมียซึ่งมีวงสืบพันธุ์ระยะ proestrus ไว้กับตัวผู้ทั้งคืน (ตัวผู้ 1 ตัว ต่อตัวเมีย 1 – 2 ตัว) เช้าวันรุ่งขึ้นแยกตัวผู้ออก ตรวจ vaginal smear ดู spermatozoa หรือดูจาก sperm plug ที่ช่องเปิดของ vagina ว่ามีหรือไม่ ถ้าพบ spermatozoa ก็เริ่มนับจากวันที่พบเป็นวันที่ศูนย์ของการตั้งครรภ์ (L_0) และนับวันต่อ ๆ ไปเป็น L_1, L_2, L_3 ..... ตามลำดับ

แผนภาพที่ 3

แสดงวิธีใส่ห่วงโพลี่เอทธีลีนในมดลูกหนู และวิธีผูกไหมเพื่อกันห่วงหลุดจากมดลูก

รูปที่ 3 a แสดงวิธีการใส่ห่วงโพลี่เอทธีลีนในมดลูกหนู

รูปที่ 3 b แสดงวิธีผูกไหมมดลูกทางด้านปลายห่วงที่ออกสู่ cervix เพื่อกันห่วงหลุด (ตรงศรชี้)

อักษรย่อ

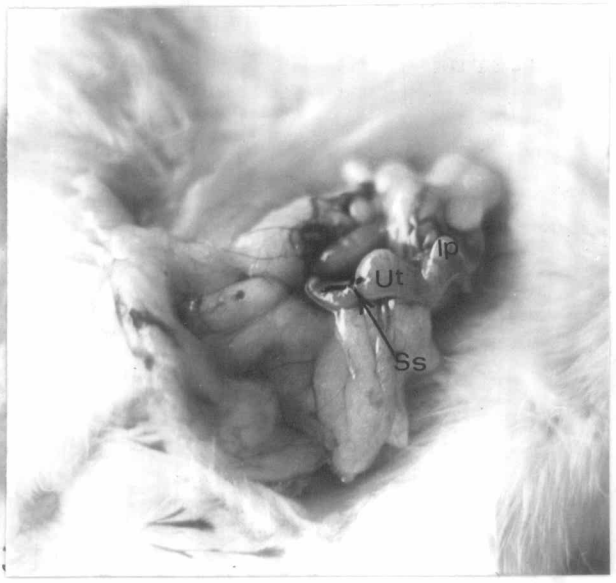
Hn_{20} = Hypodermic needle

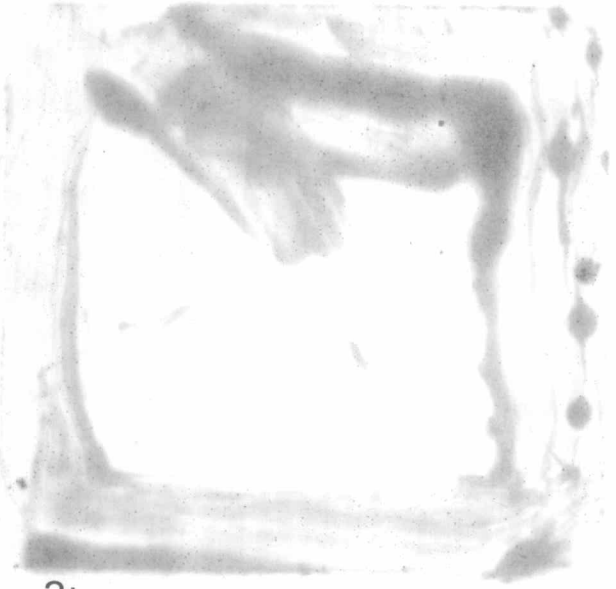
Ip = Intrauterine polyethylene device

Ot = Otoscope

Ss = Silk suture

Ut = Uterus





3b

4. วิธีใส่ห่วงคุมกำเนิด

4.1 วิธีใส่ห่วงชนิด โพลี่เอทธีลีน (Wrenn, Wood and Bitman, 1968)

นำหนูตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์ปกติอายุ 90 – 120 วัน น้ำหนักประมาณ 150 กรัม และอยู่ในวงสืบพันธุ์ระยะ diestrus มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ เครื่องมือใส่ห่วงทุกชิ้น และห่วงโพลี่เอทธีลีนที่ทำเป็นรูป double S. ขนาดความยาว 12 ม.ม. กว้าง 5 ม.ม. แช่ในน้ำยา benzalkonium chloride ซึ่งเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่มีความเข้มข้น 1 : 1250 สอดเครื่องมือ otoscope ที่มี aural speculum ขนาด 5 ม.ม. เข้าทาง vagina ส่องไฟเพื่อให้เห็นปากช่อง cervix ทำความสะอาดปาก cervix ด้วย cotton swab ที่ชุบ benzalkonium chloride แล้วสอดเข็มขนาด 20 gauge ยาว 4 นิ้ว ปลายตัด ซึ่งภายในเข็มสอดห่วงโพลี่-เอทธีลีนไว้ค่อย ๆ ดันเข็มผ่านช่อง cervix เข้าในมดลูกข้างใดข้างหนึ่งยาวประมาณ 32 – 35 ม.ม. โดยทำเครื่องหมายระดับความลึกไว้ที่เข็ม ดันห่วงให้เข้าไปในมดลูกด้วยเครื่องแทง

เนื่องจากห่วงที่อยู่ในมดลูกหลุดออกมาทาง vagina เสมอ จึงต้องผ่าหน้าท้องให้เปิดเป็นช่องกว้างประมาณ 2 ซ.ม. ดูว่าห่วงอยู่ในมดลูกข้างไหน ใช้ไหมเย็บแผลผูกมดลูกบริเวณปลายของห่วงด้านที่จะออกสู่ cervix ให้แน่นพอควร แล้วเย็บปิดช่องท้องตามเดิม

4.2 วิธีใส่ห่วงทองแดง (Chang , Tatum and Kincl 1970)

4.2.1 วิธีใส่ห่วงทองแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.14 ม.ม.

นำลวดทองแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.14 ม.ม. สอดในเข็มฉีดยาเบอร์ 26 ให้ปลายของลวดทองแดงอยู่เสมอระดับปลายเข็ม ทำความสะอาดฆ่าเชื้อโรคโดยหุ้มเข็มที่มีลวดทองแดงด้วยพลาสติกทนความร้อน ผนึกโดยรอบให้สนิท แล้วนำไปอบใน autocave ที่ใช้ความดัน 0.7 กิโลกรัมต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120 ^{o}C เวลา 20 นาที

นำหนูตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์ปกติอายุ 90 วัน ซึ่งจะโตมีน้ำหนักประมาณ 150 กรัม และอยู่ในวงสืบพันธุ์ระยะ diestrus มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (2.5% Dettol) ผ่าหน้าท้องวิธีเหมือนกับที่กล่าวมาแล้ว ใส่ห่วงคล้องที่มดลูกข้างซ้าย โดยแทงเข็มฉีดยาที่มีห่วงทองแดงสอดอยู่ภายในเข้าทางด้าน antimesometrium ห่างจาก uterotubal junction 5 ม.ม. ผ่านเข็มเข้าไปใน lumen ประมาณ 5 ม.ม. จากจุดเริ่มต้นที่แทง ให้เข็มทะลุผนังมดลูกออกมา ดันปลายลวดทองแดงข้างหนึ่งให้ปลายลวดทองแดงอีกข้างผ่านปลายเข็มออกมา ใช้ปากคีบยึดปลายลวดไว้ แล้วดึงเข็มถอยหลังออก ส่วนลวดทองแดงจะค้างอยู่ใน lumen ของมดลูก ผูกปลายลวดทองแดงทั้งสองทำเป็นรูปวงแหวน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 – 7 ม.ม. มดลูกข้างขวาเป็น control ทำ sham operation โดยใช้เข็มฉีดยาแทงผนังมดลูกในตำแหน่งเกี่ยวกับข้างที่ใส่ห่วง แล้วเย็บปิดช่องท้องตามเดิม

5. <u>วิธีผูกมดลูกด้วยไหมเย็บแผล</u>

นำหนูตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์ปกติอายุ 90 – 120 วันขึ้นไป น้ำหนักประมาณ 150 กรัม มาทำการผ่าตัดหน้าท้องตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ผูกกึ่งกลางมดลูกข้างซ้ายของหนูด้วยไหมเย็บแผลให้แน่นพอควร แล้วเย็บหน้าท้องปิดตามเดิม

6. <u>วิธีการฆ่า</u> (Autopsy)

ใช้วิธีทำลายประสาทไขสันหลังโดยดึงคอต่อให้สมองและประสาทสันหลังขาดออกจากกันจะตายทันที แล้วใช้กรรไกรปลายตรง เปิดหน้าท้องตรวจดูลักษณะการฝังตัวของตัวอ่อน ตรวจดู implantation ในมดลูกทั้งสองข้าง

ตัดมดลูกขสิบเยื่อไขมันออก แบ่งมดลูกซีกซ้ายและขวาออกจากกัน แบ่งมดลูกแต่ละข้างออกเป็นส่วน ๆ นำส่วนที่ 1 มาศึกษาทาง histochemistry ของคอลลาเจนหรือทองแดง ส่วนที่ 2 นำมาศึกษาลักษณะทาง histology ของผนังมดลูกที่มีการใส่ห่วงและไม่มี ส่วนที่ 3 นำไปหาปริมาณคอลลาเจนหรือทองแดงทางเคมี

7. วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical Analysis)

7.1 วิธีหาปริมาณคอลลาเจน ซึ่งจะหาในรูปของ Hydroxyproline

หลักการ

สกัดมดลูกหนู (ข้างที่ใส่ห่วงและ control) ซึ่งบดกับทรายละเอียดที่ฆ่าเชื้อโรคแล้วด้วย 20% urea เพื่อสกัด noncollagenous proteins hydrolyse ตะกอนที่เหลือด้วย 1.25 N. NaOH ในน้ำเดือดเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อจะเปลี่ยนคอลลาเจนในตะกอนให้เป็น soluble gelatin ต่อจากนั้นทำสารละลายส่วนบน (hydrolysate) ให้เป็นกลางด้วย 3.75 N. HCl เติม 6% H_2O_2 ลงไป oxidize hydroxyproline ให้เป็น pyrrole-2-carboxylic acid ซึ่งจะรวมกับ p-dimethylamino benzaldehyde เกิด red chromogen (Jackson and Cleary, 1967) วัดความเข้มข้นของสีด้วย Spectrophotometer (Spectronic-20) ความยาวคลื่นแสง 560 mμ (visible light) ค่าที่ได้เป็นค่าของ hydroxyproline ซึ่งคำนวนเปลี่ยนเป็นคอลลาเจน โดยคูณด้วยค่าคงที่ 7.46 (Neuman and Logan, 1950)

วิธีทำ

7.1.1 วิธีสกัดคอลลาเจนในผนังมดลูก (Morrione and Ru, 1964)

นำมดลูกหนูทั้งสองข้างมาชั่งน้ำหนักเปียก ซึ่งจะอยู่ในจำนวนประมาณ 60 – 90 mg. แล้วนำมาใส่โกร่ง (mortar) บดกับทรายละเอียดที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนมดลูก 10 mg./ทราย 20 mg. ละลายมดลูกด้วย 20% urea ในน้ำ ซึ่งใช้อัตราส่วนมดลูก 10 mg./20% urea 1 ml. ตั้ง tissue homogenate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วนำมา centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 RPM เวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แต่ละครั้ง centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 RPM เวลา 5 นาที ดูดสารละลาย

ส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 1.25 N. NaOH ในอัตราส่วนมคลูก 10 mg./NaOH 1.5 ml. ต้มในน้ำเดือดเวลา 8 ชั่วโมง

7.1.2 วิธีวัดปริมาณคอลลาเจน (Neuman and Logan, 1950 Miyada and Tappel, 1956)

นำสารละลายส่วนบนที่ต้มในน้ำเดือด 8 ชั่วโมง ซึ่งทำให้เย็นในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที ทำให้เป็นกลางด้วย 3.75 N. HCl ดูดสารละลายที่เป็นกลาง 0.5 ml. เติม 0.5 ml. 0.01 $CuSO_4$ 0.5 ml. 2 N. NaOH และ 0.5 ml. 6 % H_2O_2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วอุ่นใน 80 °C water bath 5 นาที พร้อมทั้งเขย่า ทำให้เย็นใน running water 5 นาที เติม 2 ml. 3 N. H_2SO_4 และ 1 ml. 5 % p-dimethylaminobenzaldehyde ใน propanol เขย่าให้เข้ากัน อุ่นใน 80 °C water bath 30 นาที สารละลายจะเกิดเป็นสีชมพู ทำให้เย็นใน running water 5 นาที นำไปวัดความเข้มของสีด้วย Spectrophotometer (Spectronic-20) ความยาวคลื่นแสง 542 mμ

7.2 วิธีหาปริมาณทองแดง (Evans, Lind and Wiederanders, 1967)

หลักการ

เผา fluid หรือผนังมดลูกใน flask ขนาด 50 ml. ที่มี conc^{n} HNO_3 บนตะเกียง Bunsen ให้ไหม้เพื่อสกัดสาร organic เติม conc^{n} HNO_3, conc^{n} H_2SO_4 และ 70 % perchloric acid พร้อมทั้งใส่ glass bead ลงไปด้วย เผาด้วยไฟอ่อน ๆ โดยให้อยู่เหนือเปลวไฟ 4 ซ.ม. สารที่ไหม้จะถูก oxidized เผาจนกระทั่งสารละลายใส และเหลือปริมาตรปริมาณ 6 ml. ซึ่งปริมาณส่วนใหญ่ของ nitric และ chlorine oxide หายไป เหลือ conc^{n} H_2SO_4 ไว้ สารละลายที่เหลือจะใช้ได้หรือไม่ สังเกตจากการ

หยุดเต้นของ glass bead หรือเทียบปริมาตรสารละลายที่เหลือกับ 0.6 ml. ของน้ำ ใน flask ที่มีขนาดเดียวกัน และมี glass bead เท่ากัน (ถ้าใช้ไฟแรงจะทำให้ conc^{n} H_2SO_4 สูญเสียไปในรูปของ sulphur trioxide สารละลายจะเป็นสีดำ ถ้าเป็นเช่นนี้ต้องตั้ง flask ไว้ให้เย็น แล้วเติม conc^{n} HNO_3 และ 70 % perchloric acid ปริมาตรเท่ากรั้งแรกลงไป เผาซ้ำด้วยไฟอ่อน ๆ ให้ได้สารละลายใสเหมือนที่กล่าวมาแล้ว) เติม ammonium citrate ลงไปเพื่อ deionization เหล็ก, ammonia-ammonium chloride ที่มี pH 10.2 – 10.4 เพื่อให้สารละลายเป็นด่าง, oxalyldihydrazide เป็นตัวที่ทำให้เกิดสี และ acetaldehyde ช่วยทำให้สีเข้มขึ้นและ stable incubate 11 นาที ใน water bath ที่ 60^{o}C จะเกิด coloured complex ของทองแดงที่ทำปฏิกริยากับ oxalyldihydrazide และ acetaldehyde สารละลายจะเป็นสีม่วง (Beale and Croft, 1964) นำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วย spectrophotometer (spectronic-20) ความยาวคลื่นแสง 542 mμ (visible light)

<u>วิธีทำ</u>

นำมดลูกทั้งสองข้างมาชั่งน้ำหนักเปียก ซึ่งจะอยู่ในจำนวนประมาณ 90 – 350 mg. ใช้กรรไกรผ่าเปิดช่องของมดลูก ใช้น้ำเกลือ (0.85 %) จำนวน 5 ml. ล้างมดลูก เก็บสารละลายใส่ใน flask ขนาด 50 ml. ที่มี 0.5 ml. ของ conc^{n} HNO_3 เพื่อนำมาศึกษาทองแดงใน fluid ของมดลูก

สำหรับผนังมดลูกนำมาชั่งน้ำหนักใหม่ ใช้ผนังมดลูกซึ่งมีน้ำหนักระหว่าง 85 – 190 mg. ใส่ใน flask ที่มี 0.5 ml. conc^{n} HNO_3 นำ flask ทั้งสองตั้งบนตะเกียง Bunsen เผา fluid และผนังมดลูกให้ไหม้ด้วยไฟอ่อน ๆ ตั้ง flask ให้เย็น 5 นาที เติม 2.5 ml. conc^{n} HNO_3, 0.6 ml. conc^{n} H_2SO_4 และ 0.5 ml. 70 % perchloric acid พร้อมทั้งใส่ glass bead จำนวนเท่า ๆ กัน เผาบนตะเกียง Bunsen เหนือเปลวไฟ 4 ซ.ม. เพื่อ

oxidized กรด nitric และ perchloric ที่มากเกินพอออก สารละลายครั้งสุดท้ายจะใสและไม่มีสี โดยสังเกตได้จากการหยุดเต้นของ glass bead สารละลายจะมีปริมาตรเหลือประมาณ 0.6 ml. ตั้ง flask ให้เย็น 10 นาที แล้วเติม 4.4 ml. 50% ammonium citrate อุ่นให้เพียงพอเพื่อละลาย residue เติม 4ml ammonia-ammonium chloride, 0.4 ml. oxalyldihydrazide และ 0.6 ml. 40% ice cold acetaldehyde incubate 11 นาที ที่ 60°c ใน water bath สารละลายเกิดสีม่วง ทำให้เย็นในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา นำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วย Spectrophotometer (Spectronic-20) ความยาวคลื่นแสง 560 mμ

8. การทำ Paraffin section ของมดลูก

8.1 การทำ Paraffin section ของมดลูก เพื่อศึกษาทองแดงในชั้นต่าง ๆ ของมดลูก ตามวิธีของ Uzman (Zugibe, 1970)

นำมดลูกหนูขนาด 2 – 3 ม.ม. fix ในน้ำยา rubeanic acid 10 นาที ต่อมาเติม sodium acetate (200 mg/rubeanic acid 100 ml.) เขย่าให้เข้ากันดี เพื่อให้สารละลายเป็นด่าง ตั้งทิ้งไว้ 24 – 48 ชั่วโมง จะเกิด granule สีดำของ copper rubeanate dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70% alcohol $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 70% alcohol อีกครั้ง แช่ไว้ 24 ชั่วโมง ⟶ absolute alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ xylene 1 ชั่วโมง ⟶ xylene + melted wax $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ wax_1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ wax_2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง นำมา embed ใน paraffin wax ตัด section หนา 15 μ ⟶ ติด section บนสไลด์ ⟶ dewax และ clear ด้วย xylene ⟶ mount ใน Permount

8.2 การทำ Paraffin section ของมดลูก

นำมดลูกหนู 2 – 3 ม.ม. fix ในน้ำยา Zenker's นาน 24 ชั่วโมง ⟶ ล้างในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 24 ชั่วโมง ⟶ dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70 % alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ 80 % alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ 90 % alcohol 12 ชั่วโมง ⟶ 95 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 6 ชั่วโมง ⟶ absolute alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ xylene 1 ชั่วโมง ⟶ xylene + melted wax $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ wax_1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ wax_2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง embed ใน Paraffin wax ตัด sectionหนา 8 μ ติด section บนสไลด์ โดยติด section ของมดลูกข้างใส่ห่วงคู่กับมดลูกข้าง control ของแต่ละชนิดแล้วติด section ทั้งหมดลงบนสไลด์เดียวกัน นำมาย้อมสีดังวิธีต่อไปนี้

8.2.1 Ehrlich's Acid Haematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Drury และ Wallington

(Drury and Wallington, 1967) เพื่อศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของมดลูก โดยย้อมใน haematoxylin 10 – 15 นาที ⟶ differentiate ใน acid alcohol (2 – 3 หยด HCl ใน 100 ml. 70 % alcohol) ให้ cytoplasm ใส ล้างในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที เพื่อให้นิวเคลียสเป็นสีม่วงน้ำเงิน ⟶ counter stain ใน Eosin 15 วินาที ให้ cytoplasm ติดสีแดงของ Eosin ⟶ dehydrate ใน ethyl alcohol ⟶ clear ใน xylene ⟶ mount ใน Permount

8.2.2 Lillie's Azure A. Eosin B. ตามวิธีของ Lillie

(Lillie, 1967) เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวในชั้นต่าง ๆ ของมดลูก โดยย้อมใน Lillie's Azure A. Eosin B. 1 ชั่วโมง เนื่องจากสีของ Azure A. Eosin B. จะเปลี่ยนใน acetone ดังนั้น

ต้อง dehydrate ใน acetone ในช่วงเวลาสั้น ๆ ประมาณ 1 นาที ⟶ acetone + xylene 1 นาที ⟶ clear ใน xylene ⟶ mount ใน Permount

8.2.3 Masson's Trichrome stain ตามวิธีของ Pantin (Pantin, 1959) เพื่อศึกษาคอลลาเจนในชั้นต่าง ๆ ของมดลูก โดยย้อมใน Hansen's iron trioxyhaematin 5 นาที ⟶ Differentiate ใน Sat picric acid จน cytoplasm ไม่มีสี เหลือสีดำเฉพาะที่นิวเคลียส ⟶ ย้อมใน Xylidene Ponceau 5 นาที cytoplasm จะติดสีแดง ⟶ Differentiate ใน 1 % Phosphomolybdic acid ให้สีแดงใน connective tissue หมดไป ซึ่งจะกินเวลา 3 นาที counterstain ใน light green 30 วินาที connective tissue จะติดสีเขียว ⟶ ล้าง light green ที่มากเกินพอใน 1 % Phosphomolybdic acid ⟶ dehydrate ใน 90 % alcohol ⟶ 95 % alcohol ⟶ buthyl alcohol ช่วงละ 10 วินาที ⟶ clear ใน xylene ⟶ mount ใน Permount

แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูตัวเมียรวมทั้งสิ้น 77 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น

1. ศึกษาประสิทธิภาพของห่วงคุมกำเนิด ชนิดโพลี่เอทธีลีน ทำการศึกษาดังนี้

1.1 ศึกษาการฝังตัวของตัวอ่อน

1.2 ศึกษาปริมาณคอลลาเจนของผนังมดลูกหนู โดยการวิเคราะห์ทางเคมี

1.3 ศึกษาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณคอลลาเจนในผนังมดลูกหนู ทาง Histochemistry โดยวิธีย้อม Masson's Trichrome

จัดหนูที่ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม โดยศึกษาเปรียบเทียบข้าง control กับข้างใส่ห่วง ดังนี้

1. หนูใส่ห่วง 14 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้
2. หนูใส่ห่วง 14 – 16 วัน และผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาผลระยะ L_{10}
3. หนูใส่ห่วง 46 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้
4. หนูใส่ห่วง 43 – 46 วัน และผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาผลระยะ L_{10}

เนื่องจากห่วงโพลี่เอทธีลีนที่ใส่ในมดลูกหนู หลุดออกจากมดลูกเสมอ จึงต้องใช้ไหมผูกมดลูกทางด้านปลายห่วงที่ออกสู่ cervix เพื่อป้องกันไม่ให้ห่วงหลุด ดังนั้นจึงต้องศึกษาปริมาณเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจน และการฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูกซึ่งอาจมีผลมาจากการผูกไหม เปรียบเทียบกับข้าง control ที่ไม่ผูก เพิ่มอีก 4 กลุ่ม คือ

1. ศึกษาปริมาณคอลลาเจนในผนังมดลูกหนูที่ผูกไหม 14 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้

2. ศึกษาปริมาณคอลลาเจนในผนังมดลูกหนูที่ผูกไหม 46 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้

3. ศึกษาการฝังตัวของตัวอ่อนระยะ L_{10} ในผนังมดลูกหนูที่ผูกไหม 14 – 16 วัน

4. ศึกษาการฝังตัวของตัวอ่อนระยะ L_{10} ในผนังมดลูกหนูที่ผูกไหม 43 – 46 วัน

2. ศึกษาประสิทธิภาพของห่วงคุมกำเนิดชนิดทองแดง ทำการศึกษาดังนี้

2.1 ศึกษาการฝังตัวของตัวอ่อน

2.2 ศึกษาปริมาณทองแดงใน fluid และผนังมดลูกหนูโดยการวิเคราะห์ทางเคมี

2.3 ศึกษาตำแหน่งที่มีทองแดงในผนังมดลูกหนู ทาง Histochemistry โดยวิธีย้อม Rubeanic Acid

จักหนูที่ทดลองใส่ห่วงทองแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.14 ม.ม. ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยศึกษาเปรียบเทียบข้าง control กับข้างใส่ห่วง ดังนี้

1. หนูใส่ห่วง 14 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้
2. หนูใส่ห่วง 14 – 16 วัน และผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาผลระยะ L_{10}
3. หนูใส่ห่วง 46 วัน และไม่ผสมกับตัวผู้
4. หนูใส่ห่วง 43 – 46 วัน และผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาระยะ L_{10}

3. ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ทาง Histology ของผนังมดลูกหนูทุกกลุ่ม โดยเปรียบเทียบข้าง control กับข้างใส่ห่วง แบ่งการศึกษาออกเป็น

3.1 ย้อม Ehrlich's Acid Haematoxylin และ Eosin เพื่อศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อในชั้นต่าง ๆ ของมดลูก

3.2 ย้อม Lillie's Azure A Eosin B เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวในชั้นต่าง ๆ ของมดลูก

นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกอลลาเจนในผนังมดลูกหนูที่ใส่ห่วงโพลี่เอทธีลีน กับห่วงทองแดง ทาง Histochemistry โดยวิธีย้อม Masson's Trichrome ด้วย