



อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ในการวิจัย ใช้หนูเพศเมีย สายพันธุ์วีสตาร์ (Wistar strain) จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเติบโตเต็มที่ที่จะเจริญพันธุ์ได้ (Sexual maturity) คือ ตรวจพบวงจรรังไข่โดยใช้หนูที่มีอายุประมาณ 60 วัน มีน้ำหนัก 100-150 กรัม ทั้งนี้เพราะการป้องกันยาคิดเทียบอัตราส่วนกับน้ำหนักของสัตว์ และป้องกันขนาดคงที่เดียวกันหมด (fixed dose) ในสัตว์ทดลองทุกตัว เช่นเดียวกับที่สัตว์ที่มีน้ำหนักต่าง ๆ กัน 40-60 กิโลกรัม ก็รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดที่มีฮอร์โมนในขนาดคงที่เดียวกัน ในงานวิจัยนี้คติน้ำหนักมาตรฐานของหนูเป็น 150 กรัม และคติน้ำหนักมาตรฐานของสัตว์เป็น 50 กิโลกรัม

การที่เลือกใช้หนูซึ่งยังไม่เคยผสมพันธุ์และคลอดลูกมาก่อน เพื่อตัดปัญหาความแตกต่างเรื่องจำนวนลูกหนูต่อท้อง ซึ่งพบเสมอว่า เมื่อแม่หนูมีอายุมากขึ้น จำนวนลูกหนูต่อท้องจะเพิ่มขึ้น

หนูเพศผู้ เป็นหนูสายพันธุ์วีสตาร์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเช่นกัน แต่เป็นหนูพ่อพันธุ์ซึ่งเคยผสมพันธุ์กับหนูเพศเมียและให้ลูกมาแล้ว เพราะหนูเพศเมียจะยินยอมให้ผสมพันธุ์เมื่อหนูเพศผู้มีอายุมากกว่า

2. ยาเม็ดคุมกำเนิด ใช้ 2 ขนาด

2.1 ไมโครโกนอน 30 อี.ดี. (Microgynon 30 E.D.) ของเชอริง เอ.ซี. (Schering A.G.) ซึ่งในเม็ดยา 21 เม็ด แต่ละเม็ดประกอบด้วยลีโวนอร์เจสเตรล (Levonorgestrel) 150 ไมโครกรัม และเอธินิล เอสตราไดออล 30 ไมโครกรัม ส่วนอีก 7 เม็ดในแผงยาเป็นยาหลอก (placebo) คือ แล็คโตส (lactose) เพื่อ

ช่วยให้สะดวกในการรับประทาน โดยรับประทานยาติดต่อกันไปไม่ต้องหยุด

2.2 ไมโครโกนอน 50 ฮี.ดี. ของเซอริง เอ.จี. ในเม็ดยา 21 เม็ด แต่ละเม็ดประกอบด้วย สิวอนอร์เลสเตรล 125 ไมโครกรัม และเอริณีล เอลส์ตราไดออล 50 ไมโครกรัม ส่วนอีก 7 เม็ด เป็นยาหลอก

3. ยาหลอก

ใช้ยาหลอกของยาเม็ดคุมกำเนิดสำหรับป้อนหนูในกลุ่มที่จัดเป็นกลุ่มควบคุม (control group) และหนูในกลุ่มอื่น ๆ ในวันที่หยุดป้อนยาคุมกำเนิด

4. แอมพิซิลลิน

ใช้แอมพิซิลลินชนิดแคปซูลขนาด 250 มิลลิกรัม ของบริษัทโอสถ จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตในประเทศที่มีผลการวิเคราะห์ การควบคุมคุณภาพที่ได้มาตรฐานเชื่อถือได้ บริษัทหนึ่ง และเป็นยาที่บรรจุอยู่ในเภสัชตำรับของแผนกยาทุนหมุนเวียน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สำหรับจ่ายแก่ผู้ป่วย การป้อนแอมพิซิลลินแบ่งเป็น 2 ขนาด โดยที่ขนาดรับประทานของแอมพิซิลลินตั้งแต่ 1-4 กรัม ต่อวัน⁽¹⁸⁾ แต่ในทางปฏิบัติ แพทย์นิยมให้รับประทานแอมพิซิลลินในขนาด 1-2 กรัมต่อวัน ขนาดที่มากกว่านี้ นิยมใช้วิธีฉีดเพราะเป็นขนาดที่ให้แก่ผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคสูง

4_1 ขนาดน้อย คิดจากขนาดรับประทาน 1 กรัมต่อวัน ในสัตว์หนัก 50 กิโลกรัม

4_2 ขนาดมาก คิดจากขนาดรับประทาน 2 กรัมต่อวัน ในสัตว์หนัก 50 กิโลกรัม

เนื่องจากเมื่อคิดเทียบอัตราส่วนน้ำหนักของหนู 150 กรัม กับน้ำหนักสัตว์ 50 กิโลกรัมแล้ว ปริมาณยาที่จะป้อนให้แก่หนูมีขนาดน้อยมาก ไม่สะดวกต่อการแบ่งและการป้อน ดังนั้น จึงต้องทำเป็นสารละลายเจือจาง (dilution) ดังนี้

สำหรับยาเม็ดคุมกำเนิด ลู่มยาเม็ดคุมกำเนิดออกจากแผงยา 10 เม็ด ชั่งน้ำหนัก บด และชั่งออกมาเท่ากับน้ำหนักเฉลี่ยของยา 1 เม็ด นำไปเตรียมเป็นยาน้ำกระจายตะกอน โดยใช้โพลีซอร์เบท 80 (Polysorbate 80) ร้อยละ 0.4 เป็นตัวกระจายตะกอน และ น้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 เป็นน้ำกระจาย (vehicle)⁽¹⁹⁾ ตามรายงานการ วิจัยเปรียบเทียบเอสโตรเจนในยาเม็ดคุมกำเนิด

ยาหลอก ลู่มออกมาจากยาหลอกของแผงยาเม็ดคุมกำเนิด ชั่งน้ำหนัก บด แล้วชั่ง ผงยาออกมาเท่ากับน้ำหนักเฉลี่ยของยาหลอก 1 เม็ด เช่นกัน แล้วทำเป็นยาน้ำกระจายตะกอน โดยวิธีเดียวกันกับยาเม็ดคุมกำเนิด

แอมพิซิลลินนั้น เนื่องจากผงยามีจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องเพิ่มปริมาณของตัวกระจายตะกอนที่ใช้ให้สูงขึ้น โดยที่ยังคงอยู่ในขนาดที่รับประทานได้ ใช้โพลีซอร์เบท 80 ร้อยละ 8 ใช้น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 เป็นน้ำกระจายเช่นเดียวกัน

การที่เลือกใช้โพลีซอร์เบท 80 และน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ในการ เตรียมแอมพิซิลลินนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับการเตรียมยาน้ำกระจายตะกอนของยาเม็ดคุมกำเนิด แต่การที่ต้องเพิ่มปริมาณโพลีซอร์เบท 80 ขึ้นเป็นร้อยละ 8 นั้น เพราะพบว่าการ เตรียมยาน้ำกระจายตะกอนของแอมพิซิลลิน ถ้าใช้ตัวกระจายตะกอนน้อยกว่านี้ เมื่อเก็บยาไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ใน 1 สัปดาห์ ผงยาจะจับกันเป็นก้อนมาก กระจายตัวได้ยาก ทำให้ปริมาณ ผงยาไม่สม่ำเสมอทั่วกันในยาเตรียมนั้น

เนื่องจากวงจรอีลัสตราสของหนูเป็นส่วนสำคัญของงานวิจัย ซึ่งวงจรอีลัสตราสนี้อาจ เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะปกติของหนูแต่ละตัวได้ โดยอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม เช่น แสง- สว่าง อุณหภูมิ สถานที่ อาหาร และความแออัด เป็นต้น ดังนั้นก่อนที่จะเริ่มดำเนินงานวิจัย ต้องเลี้ยงหนูในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิและแสงสว่างคงที่เป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้หนูแต่ละ ตัวคุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมที่จะทำงานวิจัยต่อไป และเกิดวงจรอีลัสตราสธรรมชาติของแต่ละ ตัว มิฉะนั้นหากหนูเกิดท้องเทียม (pseudo pregnancy) จะกินเวลาถึง 13 วัน จึงจะสามารถเริ่มงานวิจัยได้ การวิจัยครั้งนี้เลี้ยงหนูในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิและแสงสว่างตาม ธรรมชาติ

เมื่อหนูปรับตัวเข้ากับสภาวะของห้องทดลองแล้ว ดำเนินการทดลองโดยทำการ
 ป้ายช่องคลอดทุกวัน ระหว่างเวลา 7-9 นาฬิกา ใช้หลอดหยดยาดูดน้ำเกลือหยดบนช่อง
 คลอดของหนู ดูดออก แล้วนำมาหยดบนแผ่นสไลด์ ใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจเซลล์ที่พบในช่อง
 คลอดหนู ทำการป้ายช่องคลอดจนพบว่าหนูมีวงจรอีสโตรลส์ครั้งที่ 2 วงจร บางตัวอาจเป็น 4
 วัน บางตัวอาจเป็น 5 วัน ชั่งน้ำหนักหนูทุก 4 วัน

แบ่งหนูออกเป็น 11 กลุ่ม โดยวิธีลุ่มดังนี้

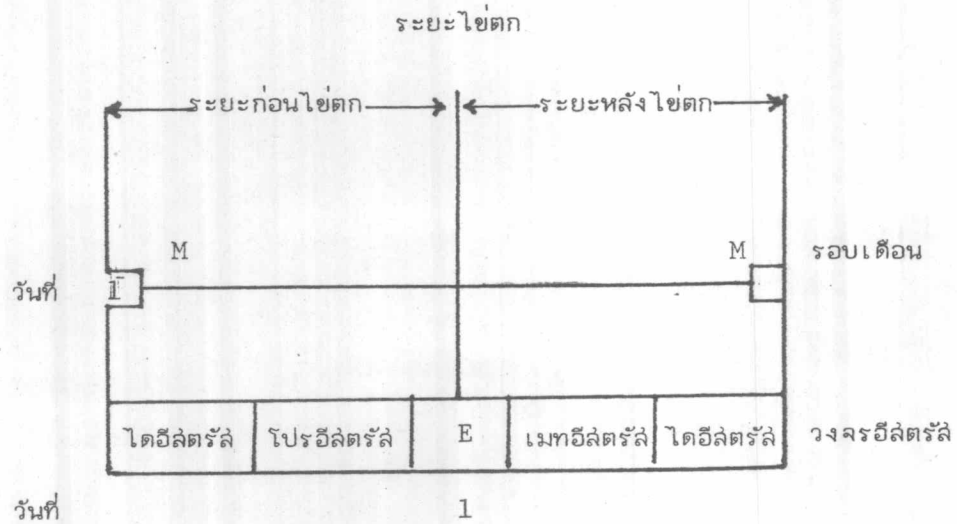
1. กลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ได้รับประทานแต่ยาหลอก
2. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.06 ไมโครกรัม และสโวนอร์เจสเตรล 0.30 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
3. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.06 ไมโครกรัม สโวนอร์เจสเตรล 0.30 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 2 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
4. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.06 ไมโครกรัม สโวนอร์เจสเตรล 0.30 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 4 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
5. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.10 ไมโครกรัม และ สโวนอร์เจสเตรล 0.25 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
6. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.10 ไมโครกรัม สโวนอร์เจสเตรล 0.25 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 2 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
7. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 0.10 ไมโครกรัม สโวนอร์เจสเตรล 0.25 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 4 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
8. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 5.0 ไมโครกรัม และ สโวนอร์เจสเตรล 12.5 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม
9. กลุ่มที่ได้รับประทาน เอริซัล เอสตราไดออล 5.0 ไมโครกรัม สโวนอร์เจสเตรล 12.5 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 4 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

10. กลุ่มที่ได้รับประทานเอรินิล เอล์ตราไดออล 10.0 ไมโครกรัม และสโวนอร์-
เจล์เตรล 25.0 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

11. กลุ่มที่ได้รับประทานเอรินิล เอล์ตราไดออล 10.0 ไมโครกรัม สโวนอร์-
เจล์เตรล 25.0 ไมโครกรัม และแอมพิซิลลิน 4 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

ในคนนั้น รอบเดือนเริ่มเมื่อมีเลือดประจำเดือน เนื่องจากเป็นระยะที่มีการ
เปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัด การรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดจะเริ่มในระบะนี้ ส่วนในคนนั้น
ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ชัดของวงจรอีส์ตรรัลนั้น คือระยะอีส์ตรรัล ซึ่งเป็นระยะที่
มีไข่ตก ดังนั้น เพื่อเป็นการเลียนแบบการรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดของสตรี จะเริ่มป้อน
ยาหนูในระยะเมทาอีส์ตรรัล ซึ่งเป็นระยะหลังจากที่มีไข่ตก คือวันหลังจากวันที่เป็นระยะอีส์ตรรัล
นั่นเอง ในสตรีเราถือว่ารอบเดือนหนึ่งกินเวลา 28 วัน การรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดจะ
รับประทาน 21 วัน หยุด 7 วัน ดังนั้นในหนูเราจะป้อนยา 3 วัน หยุด 1 วัน ในหนูที่มีวงจร
อีส์ตรรัล 4 วัน และป้อนยา 4 วัน หยุด 1 วัน ในหนูที่มีวงจรอีส์ตรรัล 5 วัน (ดูภาพประกอบ
ที่ 1)

ภาพประกอบที่ 1 เปรียบเทียบวงจรอีลด์ร็ลและรอบเดือน



M : เลือดประจำเดือน

E : อีลด์ร็ล หรือ ฮีท

หมายเหตุ วันแรกของรอบเดือน คือ วันแรกที่มีเลือดประจำเดือน ส่วนวันแรกของวงจรอีลด์ร็ล คือ วันแรกของฮีท

จาก Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 6th. ed., Canada : Lange Medical publication., 1973 หน้า 331.

ล่วนแอมพิซิลลินนั้นแบ่งป้อนให้แก่หนูเป็นวันละ 3 ครั้ง เข้า กลางวัน และเป็น โดยเริ่มต้นให้แอมพิซิลลินไปพร้อมกับยา เม็ดคุมกำเนิด หยุดป้อนในวันที่เป็นระยะฮีสตรัส แล้วเริ่มป้อนใหม่ตั้งนี้ จนครบ 3 วงจรฮีสตรัส เช่นกัน

การป้อนยา ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เพราะมีปริมาณของผงยามาก ถ้าใช้หัวเข็ม ขนาดเล็ก ผงยาจะทำให้เกิดการอุดตัน สัตปปลายเข็มให้ตรงแล้วฝนให้เรียบเพื่อเวลาป้อน ยาจะได้ไม่ทำอันตรายต่อปากของหนู ซึ่งจะทำให้การป้อนยาในครั้งต่อ ๆ ไปลำบากขึ้น ลวาม ทัปลายเข็มฉีดยาด้วยสายยาง โพลีเอธิลีน ยาวประมาณ $1\frac{1}{2}$ นิ้ว สำหรับสอดเข้าสู่หลอด อาหาร (esophagus) ของหนู ทำให้หนูได้รับยาในปริมาณที่ครบถ้วน หลอดฉีดยา (Syringe) ใช้ขนาดที่มีความจุ 1 มิลลิลิตร เพราะจำนวนยาที่ป้อนมีขนาดน้อยมาก การใช้ กระบอกฉีดยาที่มีความจุน้อย จะช่วยให้ปริมาณของยาที่ป้อนแต่ละครั้งใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการ และมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด ป้อนยาให้แก่หนู 3 วงจรฮีสตรัส ซึ่งน้ำหนักหนูแต่ละ ตัวในวันแรกที่ป้อนยา และทุก ๆ 4 วันต่อไป โดยถ้านับวันที่เริ่มป้อนยาเป็นวันที่ 1 ของ การทดลอง จะต้องชั่งน้ำหนักในวันที่ 1, 5, 9 และ 13 ของการทดลอง

เมื่อป้อนยาครบ 3 วงจรฮีสตรัสแล้ว ตรวจหาระยะโปรฮีสตรัส โดยในระยะนี้ ยังคงป้อนยาอยู่ วันที่พบว่าเป็นระยะโปรฮีสตรัส ให้ผสมกับหนูเพศผู้แล้วหยุดป้อนยา ทั้งนี้ เพราะหนูเพศเมียจะยอมให้หนูเพศผู้ผสมพันธุ์ในระยะฮีสตรัส ซึ่งระยะฮีสตรัสนี้เป็นระยะสั้น ๆ 9-15 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องให้หนูผสมพันธุ์ในวันที่พบว่าเป็นระยะโปรฮีสตรัส ในวันรุ่ง ขึ้นแยกหนูเพศผู้ออกแล้วตรวจหาเชื้อเพศผู้ (sperm) จากการป้ายช่องคลอด ถ้าพบเชื้อเพศผู้ นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้อง ซึ่งเป็นวิธีการที่ยอมรับสำหรับงานวิจัยในหนู ชั่งน้ำหนักวันที่ 1, 5, 9, 13, 17, และ 21 ของการตั้งท้อง หนูมีระยะเวลาการตั้งท้อง 20-22 วัน

ถ้าการผสมครั้งแรกตรวจไม่พบเชื้อเพศผู้ ให้ป้อนยาต่อ 1 วงจรฮีสตรัส แล้ว ตรวจหาระยะโปรฮีสตรัส เพื่อให้ผสมกับหนูเพศผู้ซ้ำอีกครั้ง เปรียบเทียบผลการตั้งท้อง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อท้อง ระยะเวลาการตั้งท้อง และอัตราส่วนเพศผู้และเมีย (sex ratio) แต่ละท้อง ระหว่างหนูในแต่ละกลุ่ม

ในหนูที่ผสมและตรวจพบเชื้อเพศผู้แล้ว แต่ไม่ตั้งท้องโดยที่ภายหลังที่ผสมแล้ว น้ำหนักไม่เพิ่มขึ้น หรือเมื่อผสมแล้วน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่ไม่คลอดลูกหรือแท้ง จะทำการผ่าตัด ตรวจดูภายในมดลูกให้แน่นอนว่ามีการตั้งท้องเกิดขึ้นหรือไม่

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ มีข้อจำกัดสำหรับการดำเนินการวิจัยในแต่ละขั้นตอน ดังนั้น หนูที่ขาดคุณสมบัติที่จะดำเนินการวิจัยในแต่ละขั้นต่อไปจะถูกคัดออก โดยมีข้อกำหนดในการคัดออกดังนี้

กฎเกณฑ์ในการคัดออก

1. เมื่อทำการป้ายช่องคลอดเป็นเวลา 3 วงจรอีส์ตรรัลแล้ว หนูตัวนั้นยังคงมี วงจรอีส์ตรรัลไม่คงที่ (irregular estrus cycle) ทั้งนี้เพราะวงจรอีส์ตรรัลของหนูเพศเมียนั้นไวต่อเอสโตรเจนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอสโตรเจนที่ออกฤทธิ์เป็นระยะเวลา นาน (long acting estrogen) เช่น เอสโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ เอริซิล เอสตราไดออล นั้น พบว่าถ้าฉีดให้หนูเพศเมียในขนาด 10 ไมโครกรัม จะทำให้วงจร อีส์ตรรัลเสียไป ดังนั้น ถ้าใช้หนูที่มีวงจรอีส์ตรรัลไม่คงที่ จะไม่ทราบว่าเกิดจากเอริซิล เอสตราไดออล ที่ป้อนให้ หรือเป็นธรรมชาติเฉพาะหนูตัวนั้นเอง ซึ่งจะมีผลต่อการดำเนินการวิจัยขั้นต่อไปที่จะให้ผสมกับหนูเพศผู้
2. หนูที่มีระยะอีส์ตรรัล 2 วัน ในวงจรอีส์ตรรัล จัดเป็นพวกที่มีวงจรอีส์ตรรัลไม่คงที่ เพราะโดยปกติหนูควรจะมีระยะอีส์ตรรัลเพียง 1 วัน ในรอบวงจรหนึ่ง และการป้อนยา กำหนดว่าจะเริ่มในวันที่เป็นระยะเมทอีส์ตรรัล คือวันที่ถัดจากระยะอีส์ตรรัล เมื่อหนูมีระยะ อีส์ตรรัล 2 วัน จะทำให้ไม่สามารถตัดสินได้ว่าควรจะเริ่มป้อนยาในวันใด
3. เมื่อป้อนยาไปแล้ว 1 วงจรอีส์ตรรัล ตรวจไม่พบระยะโปรอีส์ตรรัล แสดงว่า ยาที่ป้อนให้มิผลทำให้วงจรอีส์ตรรัลของหนูเพศเมียดังนั้นเสียไป จะไม่สามารถให้ผสมกับหนู เพศผู้ ทำให้ไม่สามารถติดตามผลของยาได้

4. ในการผล้มกับหนูเพศผู้ครั้งแรก ตรวจไม่พบเชื้อเพศผู้ และเมื่อป้อนยาต่อ 1 วงจรอีลัสตรัลแล้ว ให้ผล้มซ้ำอีกครั้ง ก็ยังคงตรวจไม่พบเชื้อเพศผู้เช่นเดิม ทั้งนี้เพราะ หนูเพศเมียตัวนั้นจะได้รับยาในเวลาที่เนิ่นนานกว่าหนูตัวอื่นในกลุ่ม ซึ่งจะทำให้ผลที่ได้จากการวิจัยขาดความแน่นอน