บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเลี้ยงหนูที่ใช้ในการทดลอง

หนูขาวที่นำมาใช้ทดลองเป็นหนูตัวเมีย Wistar Strain ซึ่งได้ทำการผสมพันธุ์ที่แผนกวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย หนูทุกตัวที่ใช้ในการทดลองเป็นหนูตัวเมียที่ยังไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อน (Virgin Female) เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 – 26°C และควบคุมแสงสว่างให้มีแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 6.00 – 20.00 น.) และกลางคืน 10 ชั่วโมง (ระหว่าง 20.00 น. – 6.00 น.) เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่สั่งซื้อจากบริษัท F.E. Zuelling (Gold Coil Mills) น้ำที่ใช้เลี้ยง ใช้น้ำประปาธรรมดา หนูที่ใช้ทดลองโตเต็มที่อายุ 90 วันขึ้นไป มีน้ำหนักประมาณ 145 – 150 กรัม หนูทุกตัวที่ทดลองจะต้องผ่านการตรวจสอบดูว่ามีวงสืบพันธุ์ (Oestrous Cycle) เป็นปกติ (4 – 5 วัน ต่อหนึ่งวงสืบพันธุ์) แล้ว 2 รอบ

005413

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ (Estrous Cycle) ของสัตว์ทดลอง

นำหนูที่ใช้ในการทดลองมาทำการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวัน โดยใช้แท่งแก้วปลายมนจุ่มน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85% แตะที่เยื่อค้านในของ Vagina นำมาป้ายบนสไลด์ ตรวจดูเซลด้วยกล้องจุลทัศน์ ลักษณะเซลที่ปรากฏใช้กำหนดแบ่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ของหนูขาว (Rats) ออกเป็น 4 ระยะ คือ

2.1 Diestrus เป็นระยะนานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณครึ่งหนึ่งของ cycle (2 วัน) ระยะนี้รังไข่ไม่สร้างฮอร์โมน estrogens และประกอบไปด้วย non-functional corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งหลังสุด มดลูกมีขนาดเล็ก vagina มี epithelium บางกว่าระยะอื่น

i 17910651

ทำ vaginal smear จะพบเซลเม็ดเลือดขาว (leucocytes) มาก อาจมี epithelial cellsปนอยู่บ้างเล็กน้อย

2.2 Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ กินเวลา 12 ชั่วโมง ระยะนี้ follicles จะเจริญเติบโตขึ้น (Preovulatory Swelling) และสร้างฮอร์โมน estrogens มาก เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก (hyperemia) ที่ vagina จะเกิดการเพิ่มความหนาของชั้นเซลบุผิว (Stratification of vaginal epithelial cells) ทำ vaginal smearจะพบเซลบุผิวที่เพิ่งสร้างขึ้นใหม่เป็นเซลค่อนข้างกลม เห็นนิวเคลียสภายในชัดเจน เรียกว่า nucleated cell ไม่พบมีเซลเม็ดเลือดขาวอยู่เลย ในตอนปลายระยะนี้หนูจะมี heat ยินยอมให้ตัวผู้ผสมในเวลาใกล้เคียงกับที่จะตกไข่

2.3 Estrus เป็นระยะต่อจาก proestrus ตอนต้นระยะนี้จะมีฮอร์โมน estrogens ระดับสูง แล้วมีการตกไข่ heat จะหมดไปหลังจากมีการตกไข่ ต่อมาระดับของ estrogens จะลดลง มดลูกมีการเสียน้ำและขนาดเล็กลง เซลบุผิวช่องคลอดยังคงหนาและเกิด Cornification เซลชั้นนอกจะหลุดเข้าสู่ lumen ของ vagina เป็นจำนวนมาก เรียกว่า Cornified Cell รูปร่างหลายเหลี่ยม แบน นิวเคลียสจะ degenerate ระยะนี้จะกินเวลา 30 ชั่วโมง

2.4 Metestrus เป็นระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นภายหลังจากการตกไข่ กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ระดับฮอร์โมน estrogens จะลดต่ำมาก เซลบุผิว vagina จะมี leucocytes ปนกับ Cornified cells

3. การตั้งครรภ์ของหนู (Pregnancy)

ขังหนูตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์ระยะ proestrus ไว้กับตัวผู้ทั้งคืน (ตัวผู้ 1 ตัว ต่อตัวเมีย 1 – 2 ตัว) เช้าวันรุ่งขึ้นแยกตัวผู้ออก ตรวจ vaginal smear ดู

spermatozoa หรือดูจาก vaginal plug ที่ช่องเปิดของ vagina ว่ามีหรือไม่ ถ้าพบ spermatozoa ก็เริ่มนับจากวันที่พบเป็นวันที่ศูนย์ของการตั้งครรภ์ (Lo) และนับวันต่อ ๆ ไปเป็น L_1, L_2, L_3, ... ตามลำดับ

4. วิธีใส่ห่วงคุมกำเนิด

4.1 วิธีใส่ห่วงทองแดง (Chang, Tatum and Kincl 1970)

นำลวดทองแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.14 ม.ม. สอดในเข็มฉีดยาเบอร์ 25 ให้ปลายของลวดทองแดงอยู่เสมอระดับปลายเข็ม ทำความสะอาดฆ่าเชื้อโรคโดยหุ้มเข็มที่มีลวดทองแดงด้วยพลาสติกทนความร้อน ผนึกโดยรอบให้สนิท แล้วนำไปอบใน autoclave ที่ใช้ความดัน 0.7 กิโลกรัมต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120 °C เวลา 30 นาที

นำหนูตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์ปกติอายุ 90 วัน น้ำหนักประมาณ 145 – 150 กรัม และอยู่ในวงสืบพันธุ์ระยะ Early Diestrus มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (2.5% Dettol) ผ่าหน้าท้องเปิดเป็นช่องกว้างประมาณ 2 ซ.ม. แล้วใส่ห่วงคล้องในมดลูกข้างซ้าย โดยแทงเข็มฉีดยาที่มีห่วงทองแดงสอดอยู่ภายในเข้าทางด้าน antimesometrium โดยจุดเริ่มต้นแทงอยู่กึ่งกลางของความยาวของมดลูกผ่านเข็มเข้าไปใน lumen ประมาณ 5 ม.ม. จากจุดที่เริ่มต้นแทง ใช้เข็มทะลุผนังมดลูกออกมา ดันปลายลวดทองแดงข้างหนึ่งให้ปลายลวดทองแดงอีกข้างผ่านปลายเข็มออกมา ใช้ปากคีบยึดลวดไว้ แล้วดึงเข็มถอยหลังออก ส่วนลวดทองแดงจะค้างอยู่ใน lumen ของมดลูก ผูกปลายลวดทองแดงทั้งสองทำเป็นรูปวงแหวนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 – 7 ม.ม. มดลูกข้างขวาเป็น control ทำ Sham Operation โดยใช้เข็มฉีดยาแทงผนังมดลูกในตำแหน่งเดียวกับข้างที่ใส่ห่วงแล้วเย็บปิดช่องท้อง

5. วิธีการฆ่า (Autopsy)

ใช้ฆ่าด้วยอีเทอร์ เมื่อตายแล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดหน้าท้องตรวจดูลักษณะการฝังตัวของตัวอ่อน และมดลูกทั้งสองข้าง แล้วตัดมดลูก รังไข่ ต่อมหมวกไต และตับ ออกมา ชลิบไขมันออกให้หมด ชั่งน้ำหนัก แล้วนำมาหาปริมาณทองแดง แบ่งเนื้อเยื่อมดลูกออกแล้วนำไป fix ให้น้ำยา Rubeanic acid เพื่อศึกษาทาง histochemistry ด้วย ตัด Intestine ออกมาใช้กรรไกรเปิดช่องของ Intestine ออก ล้างด้วย saline solution แล้วนำมาตรวจดู ulcer ภายใน ตัดเอาส่วนที่ผิดปกติมา fix ใน Zenker's fixative เพื่อนำไปศึกษาทาง histology ต่อไป

6. วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical Analysis)

วิธีหาปริมาณทองแดง (Evans, Lind and Wiederanders, 1967)

หลักการ

เผาเนื้อเยื่อหรือ Tissue fluid ใน flask ขนาด 50 ml. ที่มีกรดไนตริกเข้มข้น ให้ไหม้เพื่อสะกัดสารอินทรีย์ แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น, ซัลฟุริกเข้มข้น และ 70% เปอร์คลอริกพร้อมทั้งใส่ glass bead ลงไป แล้วเผาโดยให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 250 °C (ซึ่งสูงกว่า boiling point ของ 70% เปอร์คลอริก) กับ 300 °C (ซึ่งต่ำกว่า boiling point ของกรดซัลฟุริกเข้มข้น) เพื่อให้ 70% เปอร์คลอริกระเหยไป แต่กรดซัลฟุริกยังคงอยู่ สารที่ถูกเผาไหม้จะถูก oxidized จนกระทั่งสารละลายใสและเหลือปริมาตรประมาณ 0.6 ml. ซึ่งปริมาตรส่วนใหญ่ของไนตริกและ Chlorine oxide หายไป เหลือแต่ conc. H_2SO_4 ไว้ จุดสิ้นสุดของการเผา สังเกตจากการหยุดเต้นของ glass bead หรือเทียบปริมาตรสารละลายที่เหลือกับ 0.6 ml. ของน้ำใน flask ขนาดเดียวกันที่มี glass bead เท่ากัน (ถ้าใช้ไฟแรงจะทำให้ conc. H_2SO_4 สูญเสียไปในรูปของ

sulphur Trioxide สารละลายจะเป็นสีดำ ถ้าเป็นเช่นนี้ต้องตั้ง flask ไว้ให้เย็น แล้วเติม conc. HNO_3 และ 70% เปอร์คลอริก ปริมาตรเท่าครั้งแรกลงไป เผาซ้ำด้วยไฟอ่อน ๆ ให้ได้สารละลายที่ใสดังกล่าวแล้ว) จากนั้นเติม ammonium citrate ลงไปเพื่อ deionize เหล็ก, ammonia-ammonium chloride ที่มี pH 10.2 – 10.4 เพื่อให้สารละลายเป็นด่าง, Oxalyldihydrazide เป็นตัวที่ทำให้เกิดสี และ acetaldehyde ช่วยให้สีเข้มขึ้นและ stable แล้ว incubate 11 นาทีใน water bath ที่ 60 °C จะเกิด coloured complex ของทองแดงที่ทำปฏิกริยากับ Oxalyldihydrazide และ acetaldehyde สารละลายจะเป็นสีม่วง (Beale and Croft, 1964) นำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วย Spectrophotometer (spectronic-20) ที่ความยาวคลื่นแสง 542 mμ (Visible light)

<u>วิธีทำ</u>

นำมดลูกทั้งสองมาชั่งน้ำหนักเปียก ซึ่งจะอยู่ในจำนวนประมาณ 100 – 350 mg. ใช้กรรไกรผ่าเปิดช่องของมดลูก ใช้น้ำเกลือ (0.85%) จำนวน 5 ml. ล้างมดลูกแล้วเก็บสารละลายใส่ใน flask ขนาด 50 ml. ที่มี 0.5 ml. ของกรดไนตริกเข้มข้น เพื่อนำมาหาปริมาณทองแดงใน fluid ของมดลูก

สำหรับผนังมดลูกและเนื้อเยื่ออื่น ๆ นำมาชั่งหาน้ำหนักเปียกที่แน่นอน ให้มีน้ำหนักประมาณ 100 – 250 mg. ใส่ใน flask 50 ml. ที่มี 0.5 ml. กรดไนตริกเข้มข้น แล้วนำ flask ทั้งหมดตั้งบน Hot plate เผาด้วยไฟอ่อน ๆ (60 – 80 °C) แล้วตั้งทิ้งให้เย็น 5 นาที เติม 2.5 ml. conc. HNO_3, 0.6 ml. conc. H_2SO_4 และ 0.5 ml. 70% perchloric acid พร้อมทั้งใส่ glass bead จำนวนเท่า ๆ กัน เผาบน Hot plate อุณหภูมิระหว่าง 250 – 300°C เพื่อ Oxidized กรดไนตริกและเปอร์คลอริกที่มากเกินพอออก สารละลายครั้งสุดท้ายจะใสและไม่มีสี โดยสังเกตการหยุดเต้นของ glass bead สารละลายจะมีปริมาตร

เหลือประมาณ 0.6ml. ตั้ง flask ทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที แล้วเติม 4.4 ml. 50% Ammonium Citrate อุ่นให้เพียงพอที่ 60°C ประมาณ 5 นาที เพื่อละลาย residues เติม 4 ml. ammonia-ammonium chloride, 0.4 ml. Oxalyldihydrazide และ 0.6 ml. 40% ice-cold acetaldehyde แล้ว incubate 11 นาที ที่ 60°C ใน water bath สารละลายเกิดสีม่วง ทำให้เย็นในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา นำไปวัดความเข้มข้นของสี

7. <u>การศึกษาปริมาณทองแดงในชั้นต่าง ๆ ของมดลูกโดยวิธีทาง Histochemistry</u>

ตามวิธีของ Uzman (Zugibe, 1970)

fix มดลูกขนาด 1 – 2 ม.ม.ใน 0.1% Rubeanic acid ทิ้งไว้ 10 นาที เติม Sodium Acetate (200 mg./100 ml.) แล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 24 – 48 ชั่วโมง แล้วแช่ใน 70% Ethyl alcohol $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง แล้วเปลี่ยน 70% Ethyl alcohol อีกครั้งหนึ่ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แช่ใน absolute alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ Xylene 1 ชั่วโมง ⟶ Xylene + melted wax (1:1) $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ Wax_1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ Wax_2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง embed ใน Paraffin แล้วตัด Section หนา 15μ ติด section บน slides, dewax โดยผ่าน Xylene แล้วจึง mount ดูด้วยกล้องจุลทัศน์ (Light Microscope)

8. <u>การศึกษา Histology ของมดลูก, ตับ, ไต, ลำไส้</u>

8.1 <u>การทำ Paraffin Section</u>

ตัดเนื้อเยื่อขนาด 2 mm^3 fix ใน Zenker's fixative 24 ชั่วโมง (เก็บไว้ในที่มืด) แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 24 ชั่วโมง dehydrate โดยผ่าน 70% ethyl alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ 80%

ethyl alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ 90% ethyl alcohol 6 ชั่วโมง⟶ 95% ethyl alcohol เปลี่ยน 2 ครั้ง ทิ้งข้ามคืน ⟶ n-butyl alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ Xylene 1 ชั่วโมง ⟶ Xylene + melted wax(1:1) $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง⟶ Wax_1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ Wax_2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ⟶ embed ใน Paraffin wax แล้วตัด section หนา 6 µ ติด section บนสไลด์ โดยติดมดลูกข้างใส่ห่วงกับข้าง control แล้วนำไปย้อมสี

8.2 Masson's Trichrome Stain โดยวิธีของ Pantin (Pantin, 1959)

โดยนำ sections ที่ติดบนสไลด์มา dewax และ hydrate โดยผ่าน Xylene และ Ethyl alcohol (95% ⟶ 90% ⟶ 80% ⟶ 70% ⟶ 50% ⟶ น้ำ ขั้นละ 3 นาที) แล้วล้างใน Lugol Iodine 0.5% ผ่านน้ำ และ Sodium sulfite 3% เพื่อล้าง Mercuric Chloride ออก ล้างน้ำ ย้อมใน Heidenhain iron haematoxylin 1 ชั่วโมง ⟶ differentiate ใน saturated Picric acid 5 นาที ⟶ ล้างในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 15 นาที ⟶ ย้อม Xylidene Ponceau 5 – 10 นาที ⟶ ล้างน้ำ ⟶ differentiate ใน 1% Phosphomolybdic acid ให้สีแดงของ Xylidene Ponceau ใน connective tissue หมดไป ⟶ ล้างน้ำ ⟶ counterstain ด้วย light green 5 นาที ⟶ ล้างสีที่มากเกินพอออก ด้วย 1% phosphomolybdic acid แล้ว dehydrate อย่างเร็วโดยผ่าน 95% ethyl alcohol 2 วินาที ⟶ n-butyl alcohol 5 วินาที ⟶ Xylene 5 นาที ⟶ Xylene 5 – 10 นาที แล้ว mount ใน Balsam

8.3 Lillie's Azure A Eosin B ตามวิธีของ Lillie (Lillie, 1967) เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาว

dewaxและ hydrate sectionตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 8.2 แล้วย้อมในสี Lillie's Azure A Eosin B 2 - $2\frac{1}{2}$ ชั่วโมง โดยให้สีเข้มกว่าที่ต้องการเล็กน้อย แล้ว dehydrate ใน acetone (ต้องผ่าน acetone อย่างเร็ว เพราะสีจะเปลี่ยนใน acetone) ⟶ acetone - Xylene (1:1) 1 นาที ⟶ Xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 - 10 นาที แล้ว mount ใน Balsam

8.4 Heidenhain's'Azan' Technique Modified after Konoff, 1938 (Humason, 1967) เพื่อศึกษาเซลของตับ, ไต และ Intestinal mucosa

1. dewax และ hydrate ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 8.2

2. ย้อมใน Azocarmine ที่ $56^{o}C$ 45 นาที ทิ้งให้เย็น ล้างน้ำซับให้แห้ง differentiate ใน Aniline alcohol จนกระทั่ง nuclei เป็นสีแดง และ cytoplasm เป็นสีชมพูจาง ⟶ ล้างน้ำ

3. หยุดการ differentiate โดยจุ่มใน Acetic acid alcohol เป็นเวลาประมาณ 1 - 2 นาที ⟶ ล้างน้ำ

4. แช่ใน Phosphotunstic acid solution (เตรียมขณะที่จะใช้) ซึ่งเป็น mordant ประมาณ 2 ชั่วโมง ⟶ ล้างน้ำ

5. Counterstainใน AzanE (ซึ่งมีส่วนผสมของ Aniline blue และ Orange G) ซึ่ง dilute ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 8 ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง โดยขึ้นกับชนิดของ tissues และความเข้มข้นของสีที่ใช้ ตรวจดูสีด้วยกล้องจุลทัศน์ตลอดเวลา แล้ว dehydrate จาก 95% ethyl alcohol 2 วินาที ⟶ n-butyl 5 วินาที ⟶ Xylene 5 - 10 นาที ⟶ Xylene 10 นาที แล้ว mount ใน Balsam

การคำนวณทางสถิติ

ใช้วิธี Randomized complete block test

แผนการทดลอง

การทดลองนี้ใช้หนูเพศเมีย Wistar Strain อายุประมาณ 90 – 100 วัน น้ำหนักประมาณ 145 – 150 กรัม จำนวนทั้งหมด 190 ตัว จัดแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ฆ่าหลังจากใส่ห่วงทองแดง 5 – 8 วัน
กลุ่มที่ 2 ฆ่าหลังจากใส่ห่วงทองแดง 13 – 16 วัน
กลุ่มที่ 3 ฆ่าหลังจากใส่ห่วงทองแดง 43 – 46 วัน
กลุ่มที่ 4 ฆ่าหลังจากใส่ห่วงทองแดง 58 – 61 วัน

และในแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นพวกย่อย ๆ อีกคือ

1. ผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาผลเมื่อตั้งครรภ์ได้ 10 วัน (L_{10})
2. ไม่ผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาผลในระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ คือ
   - 2.1 ระยะ Proestrus
   - 2.2 ระยะ Oestrus
   - 2.3 ระยะ Early Diestrus
   - 2.4 ระยะ Diestrus

ใช้หนูพวกละ 6 ตัว และได้แบ่งการศึกษาออกเป็น

1. ศึกษาประสิทธิภาพของห่วงทองแดงโดยดูการฝังตัวของตัวอ่อน
2. ศึกษาปริมาณทองแดงในมดลูกโดยดูทั้งใน fluid และผนังมดลูก
3. ศึกษาปริมาณทองแดงในรังไข่ ต่อมหมวกไต ตับ และไต
4. ศึกษาปริมาณทองแดงในผนังมดลูกหนูทาง Histochemistry โดยวิธีย้อม Rubeanic acid*
5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลง Histology ของผนังมดลูกหนูโดย

5.1 ศึกษาปริมาณคอลลาเจนในผนังมดลูกโดยวิธีย้อม Masson's Trichrome*

5.2 ศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาว (leucocytes) ในผนังมดลูกชั้นต่าง ๆ โดยวิธีย้อม Lillie's Azure A Eosin B*

6. ศึกษาการเปลี่ยนแปลง Histology ของตับ ไต และผนังลำไส้ โดยวิธีย้อม Heidenhain's Azan*

7. ศึกษาปริมาณทองแดงในมดลูก ตับ ไต ต่อมหมวกไตและรังไข่ในหนูปกติทั้งที่ผสมกับตัวผู้ ฆ่าศึกษาระยะ L_{10} และไม่ผสม ฆ่าศึกษาในระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์

---

* ใช้หนูกลุ่มที่ 2 (ฆ่าหลังจากใส่ห่วงได้ 13 – 16 วัน) เป็นตัวแทนของหนูทุกกลุ่ม เพราะจากการศึกษาปริมาณทองแดงในมดลูกโดยวิธีทางเคมี พบว่าหนูกลุ่มนี้มีการสะสมของทองแดงใน fluid และผนังมดลูกอยู่สูงและระยะเวลาที่ใส่ห่วง 13 – 16 วัน นี้เป็นระยะเวลาสั้นที่เชื่อว่าละลายออกจากห่วงจะสูญเสียไปภายนอกตัวสัตว์ยังไม่มากนัก