



บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีทดลอง

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้แฮมสเตอร์ที่เลี้ยงขยายพันธุ์ไว้ในอาคารเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นห้องปรับอากาศอุณหภูมิห้อง 25 ± 1 °ซ มีช่วงได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง คือระหว่างเวลา 6.00-20.00 น. และมีมืด 10 ชั่วโมง คือระหว่างเวลา 20.00-6.00 น. โดยใช้สวิทช์ไฟฟ้าอัตโนมัติควบคุมการเปิดปิดไฟ แยกเลี้ยงสัตว์ทดลองเพศผู้และเพศเมียเป็นกลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ในกรงสเตนเลสขนาด $18 \times 10 \times 8$ นิ้ว ให้กินอาหารสำเร็จรูปมาตรฐานของบริษัทโภชนภัณฑ์อาหารสัตว์และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา

1.2 สัตว์ไอโซลด์

ใช้สารสัตว์ไอโซลด์ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 90% จากบริษัท Choli, Japan

1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น AR Grade ทั้งหมด

canada balsm (permount)	: จาก Fisher Scientific company, U.S.A.
diethyl ether	: จาก E. Merck, Germany
eosin	: จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
ethyl alcohol	: จาก E. Merck, Germany
formalin 40%	: จาก E. Merck, Germany
glacial acetic acid	: จาก E. Merck, Germany
hematoxylin	: จาก E. Merck, Germany
n-butyl alcohol	: จาก E. Merck, Germany
paraffin (จุดหลอมเหลว 56-58 °ซ)	: จาก Shurwood Medical Co., U.S.A.
picric acid	: จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
xylene	: จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

2. อุปกรณ์

เครื่องชั่งละเอียด

เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome)

แผ่นความร้อนไฟฟ้า (Warm plate)

ช้อน

เครื่องลับมีด

กล้องจุลทรรศน์

สไลด์และกระจกปิด

ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ

กระดาษเขียนป้าย

แม่พิมพ์โลหะรูปตัวแอล

เครื่องมือผ่าตัด กรรไกรขนาดกลาง, ขนาดเล็ก, ปากคีบปลายแหลม, เข็มเขี่ย

3. วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1

เพื่อศึกษาว่าสตีวีโอไซด์มีผลต่อการเจริญพันธุ์ในระยะยาวของสัตว์ทดลองในรุ่นลูกหลานหรือไม่ จึงทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. ใช้แฮมสเตอร์อายุ 30 วัน ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า "breeders" เป็นเพศผู้ 40 ตัว และเพศเมีย 40 ตัว แบ่งแฮมสเตอร์ทั้งหมดออกเป็น 8 กลุ่ม เพศผู้ 4 กลุ่ม เพศเมีย 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ให้กินสารสตีวีโอไซด์ทุกวันตามตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของสารสตีวีโอไซด์ที่ให้แฮมสเตอร์กิน

สตีวีโอไซด์ ก./กก. น้ำหนักตัว/วัน	จำนวน	
	เพศผู้	เพศเมีย
0.0	10	10
0.5	10	10
1.0	10	10
2.5	10	10

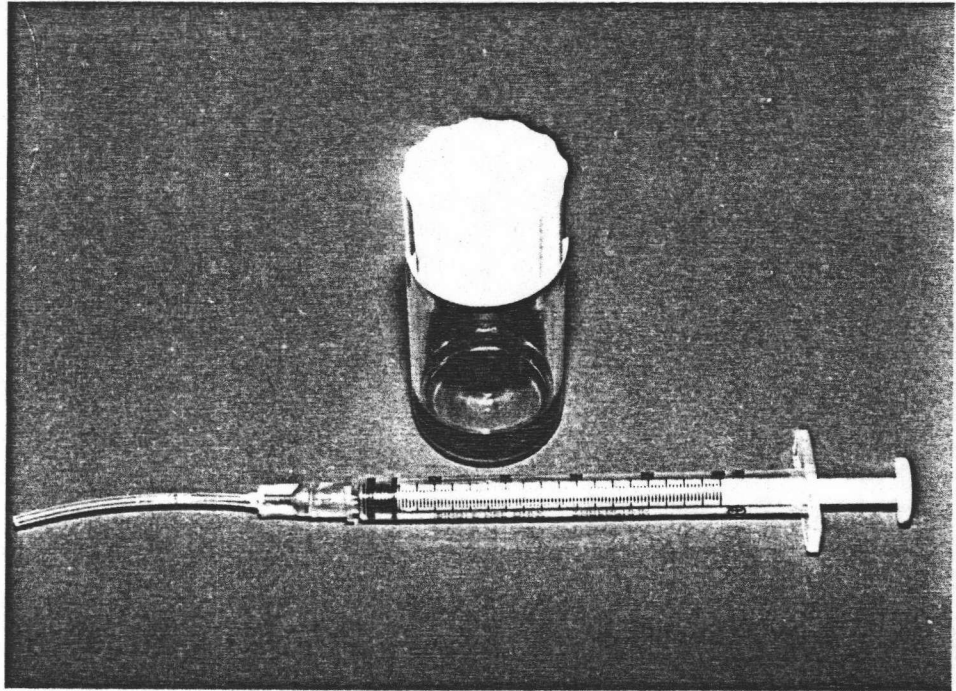
ละลายสตีวีโอไซด์ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5 กรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 2) กรอกให้แฮมสเตอร์กินตามขนาดน้ำหนักตัวที่กำหนดไว้ทุกวัน (รูปที่ 3) บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของแฮมสเตอร์เพศผู้ระหว่างอายุ 30-120 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนเพศเมียบันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉพาะในช่วงอายุ 30-60 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่ได้มีการผสมพันธุ์ หลังจากเริ่มผสมพันธุ์แล้ว การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวจะผันแปรไปตามสภาวะของการตั้งท้อง ในช่วงนี้ตรวจวงจรการเป็นสัดทุกวันเพื่อควบคุมปกติของรอบการเป็นสัด

เริ่มผสมแฮมสเตอร์หลังจากให้กินสารสตีวีโอไซด์ 1 เดือน โดยนำเพศเมียที่อยู่ในระยะ oestrus (ระยะที่มีการตกไข่และเพศเมียมอบให้เพศผู้ผสม) ชั่งกับเพศผู้เป็นคู่ ๆ ตรวจดูการผสมในวันรุ่งขึ้น เพศเมียที่ตั้งท้องแยกให้อยู่ในกรงเดี่ยวขนาด $8 \times 10 \times 8$ นิ้ว ตอนใกล้คลอด ตั้งแต่วันที่ 15 ของการตั้งท้องจนถึงวันที่ 10 หลังคลอด แม่แฮมสเตอร์จะได้รับสารสตีวีโอไซด์ที่ละลายในน้ำดื่ม (แฮมสเตอร์ที่คลอดลูกค้ำน้ำโดยเฉลี่ยวันละประมาณ 20 มล./ตัว) หลังจากนั้นกลับไปใช้วิธีป้อนให้กินอย่างเดิม บันทึกจำนวนวันของการตั้งท้องและจำนวนลูกที่คลอดแต่ละครอก ให้แม่แฮมสเตอร์เลี้ยงลูกจนครบ 30 วัน จึงให้หย่านม พักแม่แฮมสเตอร์ไว้ 2 อาทิตย์ แล้วจึงเริ่มตรวจวงจรการเป็นสัดเพื่อเตรียมผสมพันธุ์ใหม่

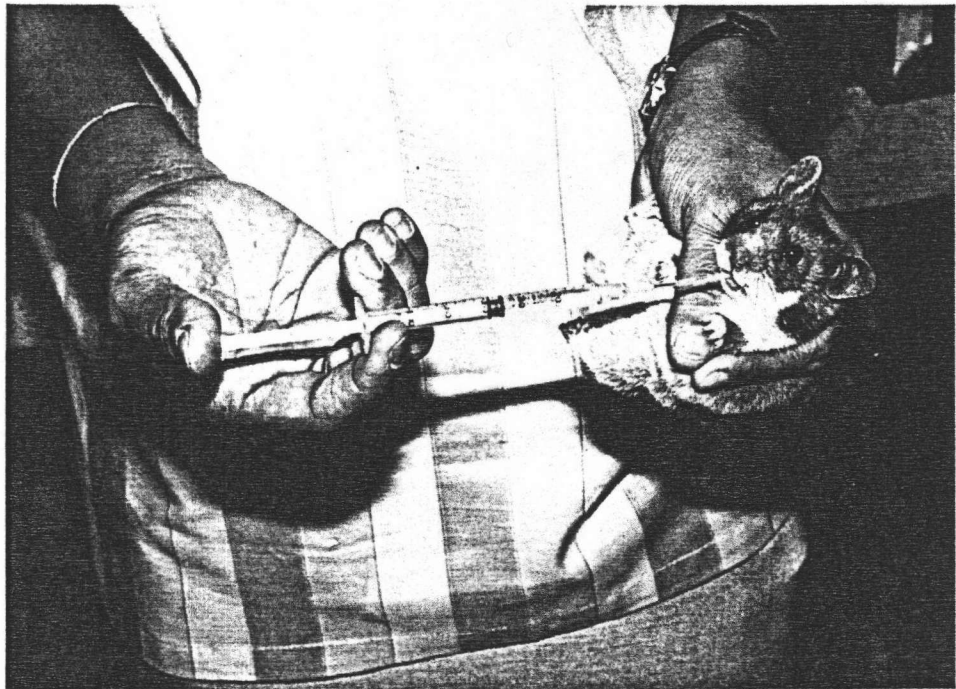
2. สุ่มเลือกลูกแฮมสเตอร์รุ่นที่ 1 (F_1) ของแต่ละกลุ่มมาเพศละ 10 ตัว จัดเป็นกลุ่มตามปริมาณสารสตีวีโอไซด์ที่ให้กินเหมือนเดิม เช่น ลูกจากกลุ่มแม่ที่กินสตีวีโอไซด์ 0.5 ก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ก็ให้กินสตีวีโอไซด์ 0.5 ก./กก. น้ำหนักตัว/วัน อย่างเดิม เริ่มป้อนให้ตั้งแต่วันแรกที่หย่านม ทำการทดลองเหมือนชุด 1

3. สุ่มเลือกลูกแฮมสเตอร์รุ่นที่ 2 (F_2) จากแม่ F_1 ของแต่ละกลุ่มมาเพศละ 10 ตัว ดำเนินการทดลองด้วยวิธีเดียวกับในชุด 2

หลังจาก breeders, F_1 และ F_2 เพศเมียหย่านมลูกครอกที่ 3 ให้กินสตีวีโอไซด์ต่อไปอีกประมาณ 2 สัปดาห์ ก็ฆ่าสตีวีโอไซด์ในระยะเวลา post oestrous (เพื่อให้สัตว์ทดลองอยู่ในระยะเดียวกันของรอบการเป็นสัด) พร้อมกับแฮมสเตอร์เพศผู้ ตัดอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งสองเพศ ได้แก่ รังไข่, มดลูก, ท่อนำไข่ ในเพศเมียและอัณฑะ, อพิติไคมิส, วาส เดเฟอเรนส์, ท่อมโพรสเตต ในเพศผู้ไปศึกษาผลทางเนื้อเยื่อวิทยา



รูปที่ 2 แสดงภาพสารละลายสตีวีโอไซด์พร้อมกับเข็มฉีดยาที่ใส่สายพลาสติก
เพื่อใช้สำหรับบ่อนสารละลายสตีวีโอไซด์ให้แฮมสเตอร์กิน



รูปที่ 3 แสดงภาพวิธีการบ่อนสารละลายสตีวีโอไซด์ให้แฮมสเตอร์กิน

การเตรียมชิ้นเนื้อและทำสไลด์เพื่อใช้ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาคัดแปลงตามวิธีของเวกิน นพินิตย์ (2524) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้ หลังจากฆ่าแฮมสเตอร์ด้วยการให้เคมีเค เอทิลเอเธอร์แล้วเปิดหน้าท้องเป็นช่องกว้าง ตัดอวัยวะต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาออกมาเลาะไขมันออกให้หมดแล้วตัดชิ้นเนื้อที่ต้องการให้เป็นชิ้นเล็กหรือเป็นแผ่นบางที่มีความหนาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร นำลงแช่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ทันทีก่อนเพื่อชำระล้างเลือดหรือของเหลวชนิดอื่นที่ล่องออกมาจากผลของการตัดชิ้นเนื้อให้มีปริมาณน้อยที่สุดจะได้ไม่ไปเจือจางน้ำยาแดง คือ Bouin หรือเป็นมันกันไม่ให้ น้ำยา Bouin ซึมเข้าสู่ภายในชิ้นเนื้อได้ ต่อจากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ใส่ลงในน้ำยา Bouin ซึ่งมี ปริมาตร 20-25 เท่าของปริมาตรของชิ้นเนื้อ ถ้าเห็นว่ามีเลือดหรือของเหลวออกมาจากชิ้นเนื้อ มากก็ถ่ายน้ำยา Bouin เก้าทิ้งแล้วใส่น้ำยา Bouin ใหม่แทนที่เพื่อให้การคงมีประสิทธิผลยิ่งขึ้น

หลังจากแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยา Bouin เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง แล้วล้างน้ำยา Bouin ออกด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์หลาย ๆ ครั้ง จนสีเหลืองของกรดพิริคจึงลงใน น้ำยาแอลกอฮอล์ จึงนำไปคังน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อต่อไป โดยแช่ชิ้นเนื้อลงในเอทิลแอลกอฮอล์ จากที่มีความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ

เริ่มจาก 70%	เอทิลแอลกอฮอล์	นาน	3	ชั่วโมง	
90%	"	"	6	"	
95%	"	"	12	"	(2 ครั้ง)
แล้วแช่ใน	เอทิลแอลกอฮอล์	"	1	"	

ต่อมาแช่ชิ้นเนื้อในไซลีนนาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เนื้อเยื่อใส หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อ ไปแช่ในไซลีนผสมพาราฟินในอัตราส่วน 1:1 นาน 0.5 ชั่วโมง

พาราฟิน 1	"	0.5	"
พาราฟิน 2	"	1	"

ขั้นตอนหลังทั้งสามนี้ทำในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ประมาณ 65 °ซ

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านขั้นตอนสุดท้ายแล้วไปใส่ในพาราฟินเหลวใหม่ (พาราฟิน 3) ในแม่พิมพ์ ตั้งทิ้งไว้จนพาราฟินแข็งตัว นำแท่งพาราฟินนี้มาตัดแต่งเป็นบล็อก นำไปเข้าเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ตัดชิ้นเนื้อเยื่อหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ติดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไป ย้อมสีฮีมาต็อกไซลีนและอีโอซินแล้วปิดด้วยกระจกปิดโดยใช้คานาคา บาลซึม เก็บไว้ศึกษาเนื้อเยื่อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

การทดลองที่ 2

เนื่องจากจำนวนลูกของแฮมสเตอร์ที่คลอดออกมามีน้อยกว่าจำนวนตัวอ่อนที่พบมีการฝังตัวที่ผนังมดลูก (วิทยา ยศยิ่งยวด, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) อีกประการหนึ่งแฮมสเตอร์มีพฤติกรรมอมลูกไว้ในปากเมื่อตกใจจากการถูกรบกวนในระยะแรก ๆ หลังคลอด เป็นเหตุให้ลูกตายแล้วแม่แฮมสเตอร์ก็กักกินทำลายซากไป ดังนั้นจำนวนลูกที่นับได้หลังคลอดจึงไม่สอดคล้องกับจำนวนไข่ที่ตกและได้รับการผสม เพื่อศึกษาว่าสตีวีโอไซด์จะมีผลต่อจำนวนไข่ที่ผสมและฝังตัวเจริญเป็นตัวอ่อนที่ผนังมดลูกในการตั้งท้องแต่ละครั้งหรือไม่ จึงทำการทดลองที่ 2 ควบคู่ไปด้วย

นำลูก F_1 และ F_2 ที่ได้จากการทดลองที่ 1 แต่ละกลุ่มมาเพศละ 10 ตัว หลังจากให้กินสตีวีโอไซด์และผสมพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จนแฮมสเตอร์เพศเมียตั้งท้องแล้วในวันที่ 8 ของการตั้งท้องจึงสลบแฮมสเตอร์ด้วยไคเอทิลอีเธอร์ ผ่าเปิดหน้าท้อง (laparotomy) และตรวจนับจำนวนตัวอ่อนที่มดลูกทั้งสองข้าง เสร็จแล้วเย็บปิดหน้าท้องและเลี้ยงแฮมสเตอร์ไว้จนคลอด ตรวจนับจำนวนลูกที่ได้อีกครั้งหนึ่ง