บทที่ 3
วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุและสารเคมีที่ใช้

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (rat) สายพันธุ์ Charles Foster ดังนี้

1.1 เพศผู้ น้ำหนักตัว 330-350 กรัม

1.2 เพศเมีย น้ำหนักตัว 180-200 กรัม

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 กรงสแตนเลส ขนาด 30 x 30 x 15 ซม. พร้อมฝาปิด

2.2 ขวดน้ำ

2.3 ขี้กบ

2.4 อาหารหนูชนิดเม็ดของบริษัท F.E. Zuellig

3. สมุนไพรที่ให้สัตว์ทดลอง

ผงกวาวขาว (Pueraria mirifica)

4. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับป้อนสารแก่สัตว์ทดลอง

4.1 กระบอกฉีดยาชนิดแก้ว ขนาด 2 มล. ของ Top Surgical Manufacturing Co., Ltd.

4.2 เข็มฉีดยาเบอร์ 15 ตัดปลายให้ทู่แล้วทำให้โค้ง

4.3 Polyethylene catheter no.240 (Clay Adams)

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมผงกวาวขาวสำหรับป้อนสัตว์ทดลอง

5.1 มีด

5.2 เขียง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 ตู้อบ

5.4 กระดาษชั่งสาร

5.5 ขวดพร้อมฝาปิดขนาด 20 มล.

5.6 Pipette filler

5.7 Pipette ขนาด 10 มล.

5.8 เครื่องชั่งละเอียดของ E.Mettler B6 ; B6H26

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดรังไข่หนูเพศเมีย

6.1 ยาสลบ Vetanarcol (Veterinaria AG Zurich)

6.2 สารละลาย sodium chloride 0.85 %

6.3 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 1.0 มล.

6.4 แอลกอฮอล์ 70 %

6.5 สำลี

6.6 กรรไกรผ่าตัด

6.7 ปากคีบ

6.8 เข็มโค้ง (curved needle)

6.9 กรรไกรสำหรับจับเข็มเย็บแผล (needle holder)

6.10 ด้าย

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดหนูเพศผู้

7.1 ยาสลบ Vetanarcol (Veterinaria AG Zurich)

7.2 สารละลาย sodium chloride 0.85 %

7.3 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 1 มล.

7.4 แอลกอฮอล์ 70 %

7.5 สำลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.6 กรรไกรผ่าตัด

7.7 ปากคีบ

7.8 กระดาษกรอง

7.9 กระดาษชั่งสาร

7.10 กระดาษชำระ

7.11 เครื่องชั่งละเอียดของ Mettler model P.165

7.12 กรรไกรตัดกระดูก

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนตัวอสุจิ, การเคลื่อนไหว และขนาดตัวอสุจิ

8.1 กรรไกรผ่าตัด

8.2 ปากคีบ

8.3 เข็มฉีดยาเบอร์ 22

8.4 บีกเกอร์ขนาด 50 มล.

8.5 Petridish

8.6 น้ำกลั่น

8.7 Hank's Balanced Salt Solution

8.8 Haemacytometer (Weber Scientific International Ltd. England)

8.9 Ocular และ Stage micrometer

8.10 หลอดหยด (dropper)

8.11 กล้องจุลทรรศน์

9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ อัณฑะ ต่อมหมวกไต และตับ

9.1 Formaldehyde neutral buffer (Buffer neutral formalin)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9.2 แอลกอฮอล์ 70 %, 80 %, 90 % และ 95 % (grading alcohol)

9.3 Xylene

9.4 Paraffin (Paraplast plus tissue embedding medium)

9.5 กระจกสไลด์ และ cover slip

9.6 Haematoxylin (BDH Chemicals Ltd.)

9.7 Eosin (BDH Chemicals Ltd.)

9.8 Microtome

9.9 cassettes

9.10 rack

9.11 hot air oven

9.12 water bath

9.13 1 % acid alcohol

9.14 Lithium CO_3

9.15 Per-mount

9.16 กล้องจุลทรรศน์

9.17 ถาดอลูมิเนียม ขนาด 8 x 12 x 2 นิ้ว

9.18 ขาตั้ง

9.19 ตะเกียงบุนเซน

9.20 coupling jar

9.21 กระดาษ label

9.22 ดินสอเขียนแก้ว

10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าท้องหนูเพศเมีย ในวันที่ 11 ของการตั้งครรภ์

10.1 ยาสลบ Vetanarcol (Veterinaria AG Zurich)

10.2 สารละลาย sodium chloride 0.85 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10.3 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 1.0 มล.

10.4 แอลกอฮอล์ 70 %

10.5 สำลี

10.6 กรรไกรผ่าตัด

10.7 ปากคีบ

10.8 เข็มโค้ง

10.9 กรรไกรสำหรับจับเข็มเย็บแผล (needle holder)

10.10 ด้าย

10.11 Vernier

11. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเกตพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของสัตว์ทดลอง

11.1 กรงตาข่ายลวด ขนาด 12 x 18 x 10 นิ้ว

11.2 ขี้กบ

11.3 นาฬิกาจับเวลา

11.4 กล้องถ่ายรูป

12. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูเพศเมีย และตรวจ Vaginal plug

12.1 หลอดหยด (dropper)

12.2 สารละลาย sodium chloride 0.85 %

12.3 กระจกสไลด์

12.4 บีกเกอร์ ขนาด 50 มล.

12.5 กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. เครื่องชั่งสำหรับชั่งน้ำหนักกวาวขาว น้ำหนักตัวหนู และอวัยวะที่จะศึกษา

13.1 เครื่องชั่ง Triple beam balance

13.2 เครื่องชั่งละเอียดของ Mettler

14. อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกผลการทดลอง

14.1 กล้องถ่ายรูป

14.2 ฟิล์มสไลด์สี

14.3 กล้องจุลทรรศน์เลนซ์ประกอบ

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมกวาวขาวให้เป็นผงละเอียดที่จะใช้ในการวิจัย

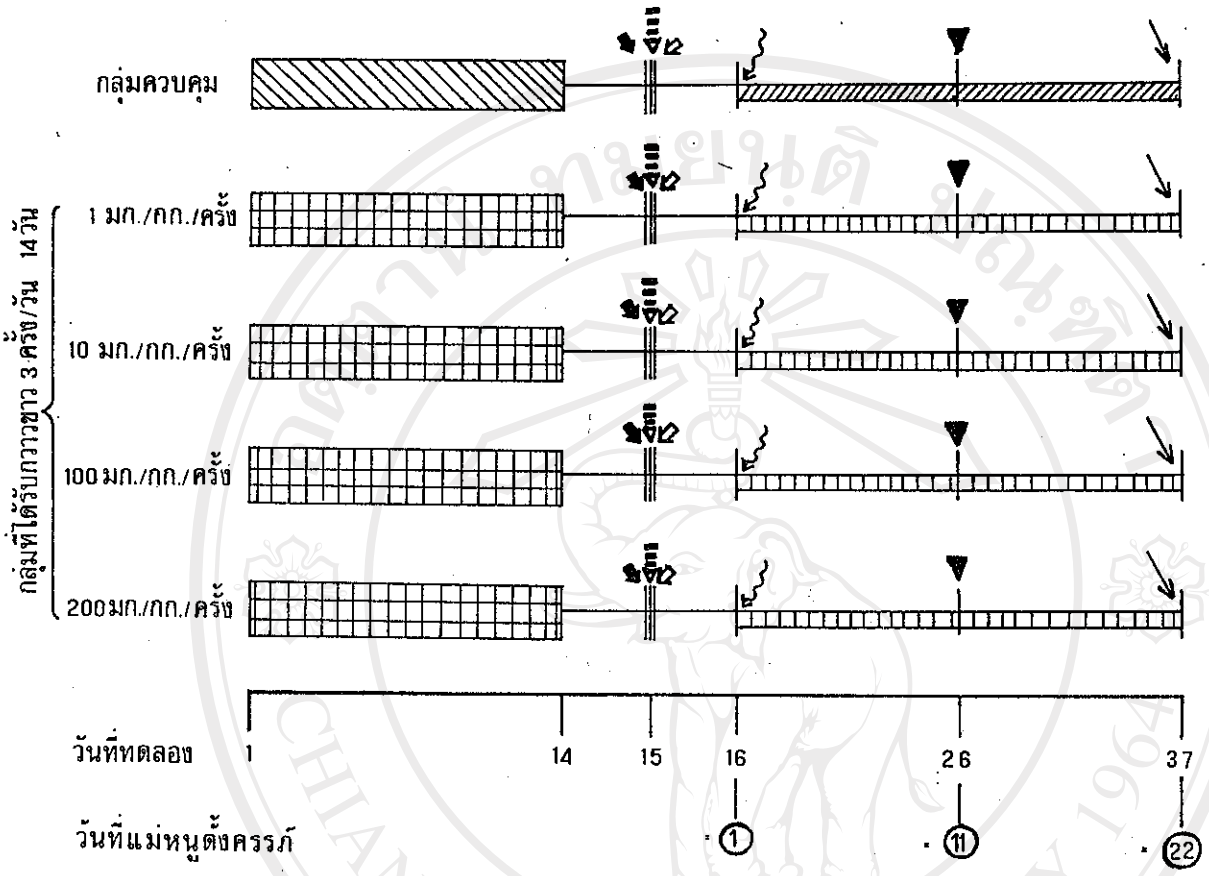
หัวกวาวขาว (Pueraria mirifica) ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้มาจากการขุดที่บ้านปางแหว ตำบลแม่แรม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ขุดเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2526 นำหัวกวาวขาวที่ขุดได้มาล้างน้ำทำความสะอาดชะเอาดินโคลนที่ติดออกให้หมดแล้วนำมาปอกเปลือกออก หั่นเป็นแว่นบาง ๆ หนาประมาณ 2-3 มม. นำไปผึ่งแดดให้น้ำระเหยและแห้งพอสมควร ต่อจากนั้นจึงนำไปอบในตู้อบเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45°C จะได้แผ่นกวาวขาวที่แห้งสนิทและกรอบ นำไปบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรตามร้านที่จำหน่ายยาสมุนไพรแผนโบราณ เก็บผงกวาวขาวที่ได้ไว้ในถุงพลาสติกรัดปากถุงให้มิดชิดเก็บในกล่องพลาสติกอีกทีหนึ่ง

2. การศึกษาพิษของกวาวขาว (Pueraria mirifica) ที่มีต่ออวัยวะสืบพันธุ์ ต่อมหมวกไต และตับในหนูขาวเพศผู้

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 แสดงแผนผังการดำเนินงานวิจัย



ป้อนน้ำกลั่น 14 วัน

ป้อนกาวขาว 14 วัน

ฆ่าและผ่าตัดอวัยวะ กลุ่มละ 12 ตัว

สังเกตพฤติกรรมการสืบพันธุ์ทดลองกับหนูตัวเมียที่ตัดรังไข่ กลุ่มละ 12 ตัว

ผสมพันธุ์กับหนูตัวเมียปกติโดยทิ้งไว้ข้ามคืน กลุ่มละ 6 ตัว

ตรวจอสุจิจากช่องคลอดของหนูตัวเมีย

ผ่าเปิดช่องท้องตรวจนับและวัดขนาดตัวอ่อนที่ฝังตัวในมดลูก

สังเกตการคลอด ตรวจนับจำนวนและชั่งน้ำหนักลูกหนูรวมทั้งลักษณะผิดปกติภายนอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้หนูขาวเพศผู้ (rat) สายพันธุ์ Charles Foster ที่โตเต็มวัยมีน้ำหนักตัวระหว่าง 330-350 กรัม จำนวน 60 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว ดังนี้

2.1.1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นครั้งละ 1 มล.

2.1.2 กลุ่มกวาวขาว 1 มก./กก./ครั้ง ป้อนกวาวขาวผสมน้ำกลั่นขนาด 1 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.ต่อครั้ง

2.1.3 กลุ่มกวาวขาว 10 มก./กก./ครั้ง ป้อนกวาวขาวผสมน้ำกลั่นขนาด 10 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.ต่อครั้ง

2.1.4 กลุ่มกวาวขาว 100 มก./กก./ครั้ง ป้อนกวาวขาวผสมน้ำกลั่นขนาด 100 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.ต่อครั้ง

2.1.5 กลุ่มกวาวขาว 200 มก./กก./ครั้ง ป้อนกวาวขาวผสมน้ำกลั่นขนาด 200 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.ต่อครั้ง

ทุกกลุ่มจะทำการป้อนวันละ 3 ครั้ง ระหว่างเวลา 6.00-7.00 น., 12.00-13.00 น. และ 18.00-19.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน (วันแรกที่ป้อนถือเป็นวันที่ 1 ของการทดลอง)

2.2 การเตรียมสารและวิธีป้อนสารแก่สัตว์ทดลอง

2.2.1 การเตรียมสาร

ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกวันก่อนที่จะทำการป้อนสารในแต่ละวันเพื่อนำค่าน้ำหนักตัวหนูไปคำนวณหาน้ำหนักของกวาวขาวตามขนาดต่าง ๆ

สมมุติชั่งน้ำหนักตัวหนูได้ 340 กรัม

ดังนั้น หนูกลุ่มกวาวขาว 1 มก./กก./ครั้ง จะชั่งกวาวขาวหนัก $= \frac{340 \times 1}{1000} =$ 0.34 มก. เพื่อผสมน้ำกลั่น 1 มล. แต่เวลาเตรียมจะเตรียมครั้งละ 10 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น ต้องชั่งกวาวขาวหนัก 0.34 x 10 = 3.4 มก.

กลุ่มกวาวขาว 10 มก./กก./ครั้ง จะชั่งกวาวขาวหนัก = $\frac{340 \times 10}{1000}$ = 3.4 มก. เตรียม 10 มล. จะชั่งกวาวขาวหนัก = 3.4 x 10 = 34 มก.

กลุ่มกวาวขาว 100 มก./กก./ครั้ง จะชั่งกวาวขาวหนัก = $\frac{340 \times 100}{1000}$ = 3.4 มก. เตรียม 10 มล. จะชั่งกวาวขาวหนัก = 34 x 10 = 340 มก.

กลุ่มกวาวขาว 200 มก./กก./ครั้ง จะชั่งกวาวขาวหนัก = $\frac{340 \times 200}{1000}$ = 68 มก. เตรียม 10 มล. จะชั่งกวาวขาวหนัก = 68 x 10 = 680 มก.

เมื่อชั่งกวาวขาวตามน้ำหนักที่คำนวณได้แก้ว นำผงกวาวขาวที่ชั่งได้ใส่ลงใน vial ขนาด 20 มล. แล้วใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดน้ำกลั่น 10 มล. ใส่ลงไปผสมกับผงกวาวขาว ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากันเก็บไว้

2.2.2 วิธีการป้อนสารแก่สัตว์ทดลอง

ก่อนจะป้อนสารเขย่าขวดกวาวขาวที่ผสมน้ำกลั่นให้มองเห็นว่าผงกวาวขาวเป็นสารแขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นไม่ตกตะกอนจึงใช้กระบอกฉีดยาขนาด 2 มล. ต่อเข้ากับเข็มเบอร์ 15 ที่ตัดปลายทู่และทำให้โค้งแล้วต่อเข้ากับท่อ polyethylene catheter เบอร์ 240 (Clay Adams) ยาวประมาณ 2 ซม. ดูดสารเข้าไปให้ได้ปริมาตร 1 มล. ใช้มือซ้ายจับต้นคอหนูให้แน่น หนูจะอ้าปากเล็กน้อย จึงสอดปลายท่อ polyethylene catheter เข้าไปทางมุมปากข้างซ้ายของหนูแล้วสอดเข้าไปในหลอดอาหารให้ลึกพอประมาณอย่างระมัดระวังและรวดเร็ว ทั้งนี้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดบาดแผลกับหลอดอาหาร และไม่ให้สารทะลักออกมาทางปาก หรือจมูกของหนูได้ แล้วจึงป้อนสารลงไป

2.3 การบันทึกผลการทดลอง

2.3.1 บันทึกน้ำหนักตัวและอาหารที่หนูกินในแต่ละวันทุกวันของการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 ในวันที่ 15 ของการทดลอง หลังจากทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูแล้ว ทำการสลบด้วยยาสลบ Vetanarcol โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มล. ดูดยาสลบ 0.04 มล. เจือจางด้วยสารละลาย sodium chloride 0.85 % จนได้ปริมาตร 0.2 มล. ฉีดเข้าช่องท้อง ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หนูจะสลบตามต้องการ จับหนูที่สลบนอนหงายท้องขึ้นใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดผิวหนังบริเวณด้านหน้าท้องทั้งหมด ใช้คีมปากคีบจับหนังด้านท้องขึ้น แล้วใช้กรรไกรตัดไปตามความยาวของลำตัวตั้งแต่โคนลึงค์ไปจนถึงบริเวณอก แล้วตัดผนังลำตัวด้านข้างทั้งซ้ายและขวาออก ต่อจากนั้นทำการตัดอวัยวะส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ดึงเอาส่วนของอัณฑะออกมาทั้งข้างซ้ายและข้างขวา ซึ่งจะมี epididymis ติดออกมาด้วย เลาะเนื้อเยื่อไขมันที่อยู่ระหว่างอัณฑะ และ epididymis ออก ใช้กรรไกรตัดระหว่างรอยต่อของอัณฑะกับ caput epididymis ออกจากกัน นำส่วนของอัณฑะ และ epididymis วางบนกระดาษกรองทำการเลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดออกให้หมดอีกครั้งหนึ่งแล้วจึงนำอวัยวะแต่ละส่วนไปวางบนกระดาษชั่งสารที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

ใช้คีมปากคีบยกต่อมลูกหมากขึ้น ค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อที่ติดระหว่างต่อมลูกหมากกับกระเพาะปัสสาวะออก แล้วใช้กรรไกรตัดต่อมลูกหมากออกมาวางบนกระดาษกรอง ทำการเลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดออกให้หมดอีกครั้ง นำไปวางบนกระดาษชั่งสารที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้คีมปากคีบยก seminal vesicles ขึ้นทั้งซ้ายและขวา ใช้กรรไกรตัดตรงรอยต่อระหว่าง seminal vesicles กับปลายท่อนำอสุจิ วาง seminal vesicles ลงบนกระดาษชั่งสารซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

ใช้คีมปากคีบดึงต่อมหมวกไตขึ้นเล็กน้อย แล้วใช้กรรไกรตัดตรงรอยต่อระหว่างต่อมหมวกไตกับไต วางต่อมหมวกไตลงบนกระดาษกรอง เลาะเนื้อเยื่อไขมันออกให้หมด นำไปวางบนกระดาษชั่งสารซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

ใช้กรรไกรค่อย ๆ ตัดเลาะเนื้อเยื่อที่ยึดตับกับส่วนต่างๆ ของอวัยวะทางเดินอาหารออกแล้วตัดส่วนของตับทั้งหมดออกมาวางบนกระดาษกรอง เลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดออกให้หมดอีกครั้ง แล้วนำไปวางบนกระดาษชั่งสารซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

การชั่งน้ำหนักของอวัยวะต่าง ๆ ดังกล่าว เมื่อทำการเลาะเนื้อเยื่อไขมันต่าง ๆ ออกหมดแล้ว จะนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทันที และบันทึกน้ำหนักเป็น มก.

2.3.3 นำส่วนของอัณฑะ ต่อมหมวกไต และตับใส่ใน Formaldehyde neutral buffer ทันที หลังจากชั่งน้ำหนักเสร็จแล้ว เพื่อใช้ในการตัดเนื้อเยื่อทำสไลด์ต่อไป (Formaldehyde neutral buffer : 37-40 % Formalin 500 ml ; H_2O 450 ml, Na_2HPO_4 32.5 gm, $NaH_2PO_4.2H_2O$ 20.0 gm)

2.3.4 นำส่วนของ epididymis ใส่ลงใน Hank's Balanced Salt Solution ทันที หลังจากชั่งน้ำหนักแล้ว เพื่อใช้ในการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกี่ยวกับจำนวน ความยาว และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิต่อไป (Hank's Balanced Salt Solution : 138 mM NaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4, 4.2 mM $NaHCO_3$, 5.4 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4, 1.3 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, 5.6 mM Glucose, 4 % BSA ; pH 7.7)

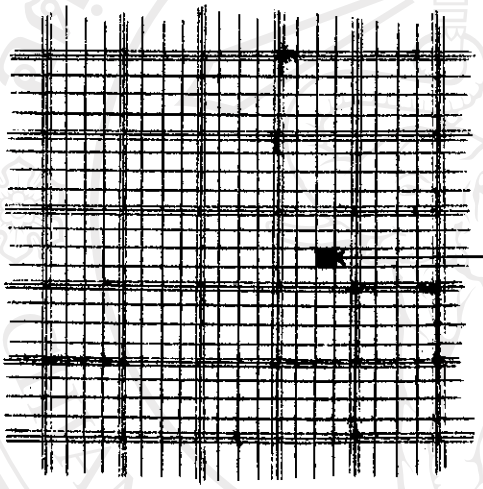
2.4 การศึกษาเกี่ยวกับจำนวนตัวอสุจิ ความยาวของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

2.4.1 วิธีการนับจำนวนตัวอสุจิโดยใช้ Haemacytometer

ใช้ส่วนของ epididymis ที่แช่อยู่ใน Hank's Balanced Salt Solution ข้างใดข้างหนึ่งมาศึกษาและทำการศึกษาทีละส่วนโดยตัดแบ่งครึ่งระหว่างส่วน caput และ cauda epididymis นำส่วนที่จะศึกษามาวางบน petridish ใช้ปลายเข็มฉีดยาเบอร์ 22 จิ้มแทงลงไปในที่ส่วนของ epididymis นั้นโดยพยายามแทงให้ตรงกับท่อของ seminiferous tubules ที่ขดไปมาอยู่ภายในซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะพบว่ามีของเหลวสีขาวขุ่นทะลักออกมา จากนั้นใช้ปิเปตของเครื่องมือ haemacytometer ชนิดที่ใช้นับเม็ดเลือดแดงซึ่งจะเห็นเม็ดพลาสติกสีแดงอยู่ภายในกระเปาะ ดูดของเหลวสีขาวขุ่นดังกล่าวขึ้นมาให้ถึงขีดเลข 1 แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยดูดน้ำกลั่นเข้าไปจนของเหลวภายในขึ้นถึงขีด 11 ซึ่งจะเป็นการเจือจาง 10 เท่า แล้วจึงเขย่าให้ของเหลวดังกล่าวเข้ากันกับน้ำกลั่น เขย่านานประมาณ 1-2 นาที หยดของเหลวออกจากปลายปิเปตก่อน 4-5 หยด แล้วจึงนำของเหลวที่เหลือไปหยดลงบน haemacytometer แล้วนำไปตรวจนับดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 10 x 40 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การนับจำนวนอสุจินั้นจะนับจำนวนอสุจิที่มีอยู่ในตารางขนาด $\frac{1}{20} \times \frac{1}{20}$ x 0.02 ของ haemacytometer ซึ่งมีทั้งหมด 16 ช่องเล็ก (เป็น 1 ช่องใหญ่) นับทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ แล้วนำไปคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อ ลบ.ซม. แล้วจึงคำนวณหาค่าเฉลี่ยจากหนูทั้งหมด 12 ตัว ในแต่ละกลุ่มอีกครั้ง พร้อมกับบันทึกภาพด้วย phase contrast microscope



ภาพที่ 5 แสดงตารางของ haemacytometer

วิธีการคำนวณหาจำนวนอสุจิ

ก. สมมุติว่านับจำนวนอสุจิในตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $\frac{1}{20} \times \frac{1}{20}$ มม.^{2}
16 ตารางได้ = 20 ตัว

ข. ดังนั้น พื้นที่ 1 มม.^{2} จำมีจำนวนอสุจิ = $\frac{20 \times 400}{16}$ = 500 ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. ช่องใส่สารละลายของ haemacytometer มีความลึก 0.02 มม. ดังนั้นปริมาตร 1 ลบ.มม. จะมีจำนวนอสุจิ $\frac{500 \times 1}{0.02} = 25 \times 10^3$ ตัว

ง. คิดเป็นจำนวนอสุจิต่อ 1 ลบ.ซม. ใช้ 10^3 คูณ ดังนั้นใน 1 ลบ.ซม. จะมีจำนวนอสุจิ $= 25 \times 10^3 \times 10^3 = 25 \times 10^6$ ตัว

จ. และจากการเจือจางด้วยน้ำกลั่นได้เจือจางเป็น 10 เท่า ดังนั้นจำนวนอสุจิใน 1 ลบ.ซม. จะมี $= 25 \times 10^6 \times 10 = 25 \times 10^7$ ตัว

2.4.2 วิธีการวัดความยาวของตัวอสุจิโดยใช้ ocular และ stage micrometer

ขั้นแรกให้เทียบอัตราส่วนของ ocular และ stage micrometer ที่จะใช้โดยวาง stage micrometer บน stage ของกล้องจุลทรรศน์ นำเอา ocular micrometer ใส่ใน ocular lens ข้างใดข้างหนึ่งแล้วปรับกำลังขยายและภาพให้เห็นขีดมาตราทั้งสองอย่างชัดเจน ด้วยกำลังขยาย 10x40 เท่า ให้ขีดเริ่มต้นของทั้ง ocular และ stage micrometer คือ ขีด 0 ตรงกัน แล้วจึงดูว่าขีดต่อไปในขีดที่เท่าไรที่เส้น 2 เส้นระหว่าง ocular กับ stage micrometer ทับกันพอดี สมมุติว่าขีดที่ 78 ของ ocular ตรงกับขีดที่ 20 ของ stage micrometer ก็จะนำไปคำนวณดังนี้

สมมุติจากที่เทียบพบว่า 78 ช่องของ ocular เท่ากับ 20 ช่องของ stage

ดังนั้น 1 ช่องของ ocular จะเท่ากับ $\frac{20}{78}$ ช่องของ stage

เนื่องจาก 1 ช่องของ stage micrometer มีค่าเท่ากับ 0.01 มม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น $\frac{20}{78}$ ช่องของ stage (คือ 1 ช่อง ของ ocular) จะมีค่าเท่ากับ $0.01 \times \frac{20}{78} = 0.0025$

นั่นคือ 1 ช่องของ ocular micrometer จะมีความยาวเท่ากับ 0.0025 มม.

ในการวัดความยาวของตัวอสุจิให้ใช้ ocular micrometer ใส่ไว้ใน ocular lens ข้างใดข้างหนึ่ง ส่วน stage micrometer นั้นเมื่อเทียบเสร็จแล้วนำออกจาก stage ของกล้องจุลทรรศน์ ต่อจากนั้นจะทำการวัดความยาวของตัวอสุจิจากที่มองเห็นในการนับจำนวนอสุจิด้วย haemacytometer นั่นคือเมื่อนับจำนวนอสุจิแล้วก็จะทำการวัดความยาวของตัวอสุจิจาก haemacytometer นั้นเช่นกัน โดยวัดความยาวตั้งแต่ส่วนหัวของตัวอสุจิจนถึงปลายหางสุดที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์โดยเลือกตัวอสุจิที่เหยียดตรงมากที่สุด และวัดด้วย ocular micrometer ว่าแต่ละตัวมีความยาวเท่ากับกี่ช่องของ ocular micrometer ทำการวัดทั้งหมด 15 ตัว ของอสุจิ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยอีกทีหนึ่งจากหนูทั้งหมด 12 ตัว สมมุติว่าค่าเฉลี่ยความยาวของตัวอสุจิจาก 15 ตัว อสุจิมีความยาวเท่ากับ 70 ช่อง ocular จากที่คำนวณเทียบได้ว่า 1 ช่อง ocular จะมีความยาวเท่ากับ 0.0025 มม. ดังนั้น ความยาวของตัวอสุจิจึงมีค่าเท่ากับ $70 \times 0.0025 = 0.175$ มม. เทียบเป็นหน่วยไมครอน (μ) จาก $\frac{1}{1000}$ มม. = 1 ไมครอน (μ) ดังนั้น ความยาวของตัวอสุจิจึงเท่ากับ $0.175 \times 1000 = 175$ ไมครอน (μ)

2.4.3 วิธีการหาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

ทำตามวิธีการนับจำนวนอสุจิโดยใช้ haemacytometer ในข้อ 2.4.1 ทั้งหมด แต่ใช้ Hank's Balanced Salt Solution แทนน้ำกลั่นและนับจำนวนอสุจิทั้งหมดจากตารางเช่นเดียวกันพร้อมกับนับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวด้วย จากนั้นนำค่าที่นับได้มาคำนวณจากสูตรดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ = $\frac{\text{จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนไหว}}{\text{จำนวนตัวอสุจิทั้งหมด}}$ x100

2.5 การทำสไลด์อัณฑะ ต่อมหมวกไต และตับ (วิธีการละเอียดดูในภาคผนวก ก)

เมื่อทำการชั่งน้ำหนักของอัณฑะ ต่อมหมวกไต และตับเสร็จแล้ว นำไป fix ใน Formaldehyde neutral buffer ทันที แล้วนำไป dehydrate ด้วย grading alcohol และ embed ด้วย paraffin จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่อง microtome หนา 6 micron (μ) แล้วติด sections บนสไลด์แก้ว ทำการ paraffinization แล้วผ่านขบวนการย้อมสี Haematoxylin และ Eosin แล้ว dehydrate ต่อจากนั้นจึง mount ด้วย per-mount นำไปอ่านผลดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมกับบันทึกเป็นภาพถ่าย

3. การศึกษาผลของกวาวขาว (Pueraria mirifica) ที่มีต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้

3.1 การเตรียมและแบ่งกลุ่มกนูทดลองเพศผู้

ใช้หนูขาว (rat) เพศผู้ สายพันธุ์ Charles Foster ที่โตเต็มวัย และมีน้ำหนักตัวระหว่าง 330-350 กรัม จำนวน 60 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว แล้วทำการทดลองป้อนสารตามการทดลองข้อ 2.1

3.2 การเตรียมหนูขาวเพศเมียที่จะใช้ในการทดลอง

ใช้หนูขาว (rat) เพศเมีย สายพันธุ์ Charles Foster ที่โตเต็มวัย และมีน้ำหนักตัวระหว่าง 180-200 กรัม จำนวน 12 ตัว มาทำการผ่าตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง และทิ้งไว้ 14 วัน เพื่อให้แผลเป็นปกติก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง และในการผ่าตัดรังไข่ของหนูเพศเมียออกทั้ง 2 ข้างนี้ก็เพื่อให้หนูเพศเมียทั้งหมดอยู่ในสภาพเดียวกันคือ ไม่มีวงจรการเป็นสัด (estrus cycle)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 วิธีการผ่าตัดรังไข่หนูเพศเมีย

ทำการสลบหนูโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มล. ดูดยาสลบ Veta-narcol 0.03 มล. แล้วเจือจางด้วยสารละลาย sodium chloride 0.85 % จนได้ปริมาตร 0.2 มล. ฉีดเข้าช่องท้อง ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที หนูจะสลบตามต้องการ จับหนูที่สลบแล้วนอนตะแคงข้าง ใช้กรรไกรชลิบขนบริเวณข้างลำตัวระหว่างกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายถึงปลายหน้าสุดของกระดูก ilium ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดบริเวณที่ชลิบขนออก ใช้ปากคีบคีบหนังบริเวณข้างลำตัวที่ชลิบขนออกดังกล่าวยกขึ้นเล็กน้อยใช้กรรไกรตัดชั้นกล้ามเนื้อออกแล้วใช้ปากคีบดึงส่วนที่เป็นเยื่อคลุม mesentery ในช่องท้องออกมาจะพบว่ามีรังไข่และมดลูกติดมาด้วย ใช้กรรไกรตัดส่วนรังไข่ออกให้หมด คีบเยื่อคลุม mesentery และมดลูกกลับคืนเข้าช่องท้อง จากนั้นเย็บบาดแผลชั้น peritonium และชั้นกล้ามเนื้อก่อนแล้วจึงเย็บชั้นผิวหนังโดยใช้เข็มโค้ง เมื่อเย็บปิดแผลเสร็จทำความสะอาดแผลอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ต่อจากนั้นจึงทำการผ่าตัดรังไข่อีกข้างหนึ่งด้วยวิธีการเดียวกันนี้ หนูที่ผ่าตัดรังไข่นี้ต้องทำการผ่าล่วงหน้าก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 14 วัน เพื่อให้บาดแผลหายสนิทและอาการเป็นปกติดีก่อนที่จะใช้ทดลอง

3.3 วิธีการทดลองเพื่อสังเกตพฤติกรรมการสืบพันธ์ของหนูขาวเพศผู้

ทำการศึกษาทีละคู่ โดยปล่อยหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ตามข้อ 3.2 จำนวน 1 ตัว ใส่ไปในกรงหนูตัวผู้จากข้อ 3.1 จำนวน 1 ตัว แล้วแต่ว่าจะศึกษากลุ่มใดเป็นเวลา 15 นาที ทำการสังเกตและบันทึกจำนวนครั้งของพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ พร้อมบันทึกภาพถ่าย ประกอบการทดลองด้วย ซึ่งพฤติกรรมของหนูเพศผู้นี้จะได้ทำการแบ่งเป็นลักษณะอาการหรือท่าทางที่แสดงออกเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพที่ 40-44)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 หนูตัวผู้จะเริ่มต้นด้วยการดมที่อวัยวะเพศของตัวเมีย (ภาพที่ 40)

3.3.2 ต่อจากนั้นจะมีการดม หรือกัดแทะขนเบา ๆ ที่บริเวณคอและหัวของตัวเมียแล้วพยายามใช้ขาคู่หน้าตะกุยต้นคอทางด้านหลังของตัวเมีย (ภาพที่ 41)

3.3.3 ต่อมาก็จะพยายามใช้ขาคู่หน้าขึ้นขี่คร่อมหลังตัวเมียอยู่หลายครั้ง (ภาพที่ 42)

3.3.4 เมื่อตัวเมียยอมและร้อมที่จะให้ผสมซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปตัวเมียจะมีอาการที่เรียกว่า lordosis (ภาพที่ 43) แล้วตัวผู้ซึ่งขึ้นขี่คร่อมหลังอยู่ก็จะสอดอวัยวะเพศผ่านเข้าไปในช่องคลอด (intromission) พร้อมกับขับน้ำอสุจิ (ejaculate) ซึ่งจะใช้เวลาอย่างรวดเร็วมาก (ภาพที่ 44) เสร็จแล้วหนูตัวผู้ก็จะผละออกจากตัวเมีย

พฤติกรรมที่หนูเพศผู้แสดงออกแต่ละครั้งจะถูกบันทึกเป็นจำนวนครั้งภายในเวลา 15 นาที ของการสังเกตการทดลองดังกล่าว

4. การศึกษาผลของกวาวขาว (Pueraria mirifica) ที่มีต่อการสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้

4.1 การเตรียมและแบ่งกลุ่มหนูทดลองเพศผู้

ใช้หนูขาว (rat) เพศผู้ สายพันธุ์ Charles Foster ที่โตเต็มวัย น้ำหนักระหว่าง 330-350 กรัม จำนวน 30 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว แล้วทำการทดลองตามการทดลองข้อ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การเตรียมหนูเพศเมีย

ใช้หนูขาว (rat) เพศเมีย สายพันธุ์ Charles Foster ที่โตเต็มวัย น้ำหนักระหว่าง 180-200 กรัม และยังไม่เคยได้รับการผสมมาก่อน ในตอนเช้าระหว่างเวลา 8.00-10.00 น. ทำการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูดังกล่าว โดยใช้หลอดหยด (dropper) ดูดสารละลาย sodium chloride 0.85 % เพียงเล็กน้อย แล้วสอดปลายเข้าไปในช่องคลอดให้ลึกประมาณ 0.5 มม. บีบสารละลายให้ไหลเข้าไปในช่องคลอดแล้วดูดกลับมา นำสิ่งที่ได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 10 เท่า ซึ่งจะพบเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในระยะต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัดของหนูในแต่ละตัวต่าง ๆ กัน เลือกใช้เฉพาะหนูตัวที่พบเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเป็นระยะ proestrous (O)

4.3 การผสมหนูทดลอง

นำหนูเพศเมียที่ตรวจพบเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเป็นระยะ proestrous (O) ในตอนเช้าจากข้อ 4.2 จำนวน 1 ตัว ไปใส่ในกรงหนูเพศผู้จากข้อ 4.1 จำนวน 1 ตัว ในตอนเย็น แล้วปล่อยทิ้งไว้ข้ามคืนรุ่งขึ้นจึงมาทำการตรวจเชื้ออสุจิจากช่องคลอดของหนูตัวเมีย โดยใช้วิธีการเดียวกับการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ซึ่งถ้าตรวจพบเชื้ออสุจิจากช่องคลอดของหนูเพศเมียตัวนั้นก็นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์แล้วแยกหนูเพศผู้ออก และทำการเลี้ยงแม่หนูที่ตั้งครรภ์นี้ต่อไป โดยแยกเลี้ยงกรงละ 1 ตัว ใช้อาหารหนูชนิดเม็ดสำเร็จรูปของบริษัท F.E.Zuellig

4.4 การบันทึกผลการทดลอง

4.4.1 ในวันที่ 11 ของการตั้งครรภ์ของแม่หนูในข้อ 4.3 จะทำการผ่าเปิดช่องท้องของแม่หนูดังกล่าวโดยทำการสลบแม่หนูก่อน โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 มล. ดูดยาสลบ Vetanarcol 0.03 มล. เจือจางด้วยสารละลาย sodium chloride 0.85 % จนได้ปริมาตร 0.2 มล. ฉีดเข้าช่องท้อง ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที หนูจะสลบตามต้องการ จับหนูที่สลบนอนหงายท้องขึ้น ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดบริเวณหน้าท้องให้ทั่วและสะอาด จากนั้นใช้คีมปากคีบดึงหนังหน้าท้องห่างจากช่องคลอดขึ้นมาประมาณ 3 ซม. แล้วใช้กรรไกรตัดชั้นผิวหนังออกยาวประมาณ 1.5 ซม. แยกรอยแผลออกจะพบชั้นกล้ามเนื้ออยู่ลึกลงไป ใช้กรรไกรตัดชั้นกล้ามเนื้อออก ใช้คีมปากคีบค่อย ๆ ดึงส่วนที่เป็น mesentery ออกมา จะเห็นมีมดลูกที่มีตัวอ่อนฝังอยู่มองดูคล้ายลูกประคำอยู่ 2 ข้าง เมื่อดึงออกมาแล้วทำการนับจำนวนตัวอ่อนที่ฝังอยู่ในแต่ละข้างทั้งหมดพร้อมทั้งวัดขนาดของตัวอ่อนที่ฝังตัวอยู่ในมดลูกนี้ด้วยเวอร์เนีย (vernier) เป็น มม. ตลอดจนบันทึกสิ่งที่สังเกตพบทั้งหมดด้วย เมื่อเสร็จแล้วคีบ mesentery และมดลูกที่มีตัวอ่อนฝังอยู่ดังกล่าวกลับเข้าช่องท้อง จากนั้นจึงเย็บแผลชั้น peritonium และชั้นกล้ามเนื้อก่อนแล้วจึงเย็บชั้นผิวหนังโดยใช้เข็มโค้ง เมื่อเย็บแผลเสร็จทำความสะอาดแผลอีกครั้งหนึ่งด้วยแอลกอฮอล์ 70 % และนำไปใส่กรง เลี้ยงไว้อย่างเดิมเพื่อรอคลอด

4.4.2 ในวันที่ 22 ของการตั้งครรภ์จะทำการเฝ้าแม่หนูอยู่ตลอดเวลาเพื่อรอและสังเกตการคลอด เมื่อแม่หนูคลอดทำการจดบันทึกระยะเวลาการตั้งครรภ์เป็นวันนับตั้งแต่ตรวจพบเชื้ออสุจิจนกระทั่งแม่หนูคลอดลูกตัวแรก และเวลาตั้งแต่ลูกหนูตัวแรกคลอดจนกระทั่งตัวสุดท้ายจะได้ช่วงเวลาในการคลอดเป็นชั่วโมง เมื่อแม่หนูคลอดเสร็จแล้วแยกแม่หนูออก ทำการตรวจนับจำนวนลูกหนูแยกเพศและชั่งน้ำหนักเป็นกรัม และบันทึกด้วยว่าลูกหนูเป็นหรือตายเท่าใด ตลอดจนสังเกตหาลักษณะความผิดปกติภายนอก หรือความพิการแต่กำเนิดที่อาจตรวจพบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้วิธีวิเคราะห์แวเรียนซ์ (Analysis of Variance) แบบ Completely Randomized Design

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved