บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว (albino rat) สายพันธุ์ Charles Foster เพศเมีย 3 ระดับอายุคือ

ระดับอายุ 7 วัน

ระดับอายุ 15 วัน

ระดับอายุ 21 วัน

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 กรงสแตนเลสขนาด 30 x 30 x 15 เซนติเมตร พร้อมฝาปิดที่มีตะแกรงใส่อาหารเม็ด

2.2 ขวดน้ำ

2.3 ขี้กบหรือขี้เลื่อย

2.4 ที่เจาะหูหนูเพื่อทำเครื่องหมายหนู

2.5 อาหารหนูชนิดเม็ด ของบริษัท F.E. Zuellig

3. สารที่ให้แก่สัตว์ทดลอง

3.1 น้ำกลั่น

3.2 ผงชูรสที่ซื้อขายตามท้องตลาด 1 ยี่ห้อ ราคากิโลกรัมละ 44 บาท

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายผงชูรส

4.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียดของ Mettler model P165

4.2 บีกเกอร์

4.3 แท่งแก้วสำหรับคน

4.4 กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการป้อนสารละลายผงชูรส

5.1 กระบอกเข็มฉีดยาชนิดพลาสติก ขนาด 1.0 มิลลิลิตร

5.2 เข็มฉีดยาเบอร์ 15 ตัดปลายให้ทู่ แล้วทำให้โค้ง

5.3 polyethylene catheter Clay Adam No.240

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ผ่าตัดหนู

6.1 ภาชนะสำหรับสลบหนู

6.2 กรรไกรผ่าตัด ขนาดใหญ่และเล็ก

6.3 ถาดผ่าตัด

6.4 ปากคีบ

6.5 สำลี

6.6 กระดาษชำระ

6.7 aluminum foil

6.8 ขวด specimen tubes ขนาด 50 x 25 มิลลิเมตร

6.9 กระดาษเลเบล

6.10 แอลกอฮอล์ 70 %

6.11 diethyl ether (BDH Chemicals Ltd.)

7. อุปกรณ์ที่ใช้บันทึกผล

7.1 เครื่องชั่งหนูแบบ triple beam balance

7.2 เครื่องชั่งอย่างละเอียดของ Mettler model P.165

7.3 กล้องถ่ายรูป

7.4 ฟิล์มสไลด์สี และฟิล์มสี Fuji

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. อุปกรณ์ที่ใช้ฉีดเนื้อเยื่อมดลูก

8.1 ตู้อบอุณหภูมิ 65°c

8.2 petri dish

8.3 aluminum foil

8.4 ปากกาเมจิกเขียนแก้วสำหรับเอาเบล

9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ตัดเนื้อเยื่อรังไข่

9.1 Bouin's solution

9.2 ethyl alcohol (BDH Chemical Ltd.)

9.3 butyl alcohol (BDH Chemical Ltd.)

9.4 xylol (BDH Chemical Ltd.)

9.5 paraplast

9.6 haematoxylin

9.7 eosin

9.8 piccolyte

9.9 น้ำกลั่น

9.10 albumin

9.11 aluminum foil

9.12 needle

9.13 forceps

9.14 หม้อหลอม paraplast

9.15 rotary microtome model 820 (American Optical Company)

9.16 slide และ cover slip

9.17 slide warmer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.18 beaker

9.19 dropper

9.20 ใบมีดโกน

9.21 block

9.22 ทะเกียงแอลกอฮอล์

9.23 กระดาษชำระ

9.24 couplin jar

9.25 ดินสอเขียนแก้ว

9.26 กระดาษเลเบล

9.27 ถาดใส่สไลด์

9.28 กล้องจุลทรรศน์

10. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่

10.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

10.2 ocular และ stage micrometer

วิธีการวิจัย

1. การเลี้ยงแม่หนูและคัดเลือกลูกหนู Charles Foster เพศเมีย สำหรับใช้ในการทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) พันธุ์ Charles Foster ที่สมบูรณ์เป็นแม่พันธุ์ทำการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด โดยวิธี vaginal smear ให้ได้หนูที่มีวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) ปกติ จากนั้นนำหนูที่อยู่ในระยะ proestrus ไปผสมกับหนูพ่อพันธุ์ในตอนเย็นแล้วทำการตรวจหา sperm ของตัวผู้จากช่องคลอดของตัวเมียในเช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าตรวจพบ sperm ถือเอาวันที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจพบ sperm เป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้อง หลังจากนั้นประมาณ 22-23 วัน หนูก็จะออกลูก หลังจากวันที่ออกลูก 3-4 วัน ให้แยกลูกหนูเพศผู้ออกคัดเอาแต่เพศเมีย เลี้ยงไว้จนลูกหนูมีอายุครบตามจำนวนวันที่ต้องการใช้ในการทดลองดังนี้

ก. ลูกหนูอายุครบ 7 วัน คัดเอาเฉพาะที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 16 ± 4 กรัม จำนวน 20 ตัว

ข. ลูกหนูอายุครบ 15 วัน คัดเอาเฉพาะที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 23 ± 4 กรัม จำนวน 20 ตัว

ค. ลูกหนูอายุครบ 21 วัน คัดเอาเฉพาะที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 32 ± 4 กรัม จำนวน 20 ตัว

2. การแบ่งกลุ่มหนูทดลอง

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับอายุ และแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ I กลุ่มระดับอายุ 7 วัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น จำนวน 10 ตัว

2 กลุ่มป้อนสารละลายผงชูรส ในปริมาณ 4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักตัว/วัน จำนวน 10 ตัว

กลุ่มที่ II กลุ่มระดับอายุ 15 วัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น จำนวน 10 ตัว

2 กลุ่มป้อนสารละลายผงชูรส ในปริมาณ 4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักตัว/วัน จำนวน 10 ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ III กลุ่มระดับอายุ 21 วัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น จำนวน 10 ตัว

2 กลุ่มป้อนสารละลายผงชูรส ในปริมาณ 4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักตัว /วัน จำนวน 10 ตัว

3. การเตรียมสารละลายผงชูรส

ทำการเตรียม stock solution ของผงชูรสให้มีความเข้มข้น 60 % โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายแล้วทำตารางเปรียบเทียบระหว่างน้ำหนักหนู ปริมาณผงชูรสที่หนูได้รับ และจำนวนมิลลิลิตรของ stock solution ที่ป้อนหนู

4. วิธีป้อนสารละลายผงชูรสและน้ำกลั่น

ชั่งน้ำหนักหนูทุกเช้าก่อนที่จะทำการป้อนสารละลายผงชูรส หรือน้ำกลั่น เพื่อนำน้ำหนักหนูไปเทียบกับตารางเปรียบเทียบระหว่างน้ำหนักหนู ปริมาณผงชูรสที่หนูได้รับ และจำนวนมิลลิลิตรของ stock solution ที่จะป้อนหนู (ตารางที่ได้จากการคำนวณในข้อ 3) ส่วนหนูกลุ่มควบคุมปริมาตรของน้ำกลั่นที่ป้อนจะเท่ากับจำนวนมิลลิลิตรของ stock solution ที่จะป้อนหนูกลุ่มทดลองที่มีน้ำหนักเท่ากัน เมื่อหาปริมาณมิลลิลิตรของ stock solution และน้ำกลั่นที่จะป้อนหนูแล้ว จึงป้อนให้กินทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง จนกระทั่งหนูทุกระดับอายุมีอายุครบ 60 วัน แล้วจึงนำหนูเหล่านั้นมาศึกษาผล

วิธีป้อน ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเข็มฉีดยาเบอร์ 15 ที่ตัดปลายให้หู่ และทำให้โค้ง สวมปลายเข็มฉีดยาด้วย polyethylene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

catheter เบอร์ 240 ดูดสารละลายผงชูรส (น้ำกลั่น) ไว้เข้าไปให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการป้อนแล้วใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือซ้าย จับลูกหนูบริเวณต้นคอ โดยหนีบหางอยู่ระหว่างนิ้วก้อยกับนิ้วนางและตัวลูกหนูอยู่ในอุ้งมือ มือขวาค่อย ๆ สอดปลายเข็มเข้าไปในปากลูกหนูให้ลึกพอสมควร ค่อย ๆ ป้อนจนหมดหลอด การป้อนต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดบาดแผลต่อลูกหนู และสารละลายผงชูรส (น้ำกลั่น) ต้องเข้ากระเพาะหมด

สำหรับลูกหนูกลุ่มอายุน้อยมากคือ ระดับอายุ 7 วัน การป้อนจะต้องระมัดระวังอย่างยิ่งที่จะไม่ให้ลูกหนูได้รับอันตราย โดยจะสอดปลายเข็มเข้าไปในปากให้ลึกเท่าที่จะทำได้ และปลายเข็มจะต้องไม่ทำให้เกิดบาดแผลที่คอแล้วจึงค่อย ๆ ป้อนที่ละหยดรอให้ลูกหนูกลืนลงไปทีละหยด จนกระทั่งลูกหนูอายุมากขึ้นและแข็งแรงขึ้น จึงป้อนตามปกติได้

วิธีศึกษาผล

1. การศึกษาผลของสารละลายผงชูรสต่อการเปิดของช่องคลอด (vaginal opening)

ในระหว่างป้อนสารละลายผงชูรส (น้ำกลั่น) ให้ตรวจดู การเปิดของช่องคลอดของหนูทดลองทุกตัว โดยใช้เกณฑ์ที่ว่าช่องคลอดจะต้องเปิดหมดแล้วบันทึกวันที่ไว้เพื่อนำมาคำนวณหาอายุของหนูเมื่อช่องคลอดเปิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่องคลอดเปิด

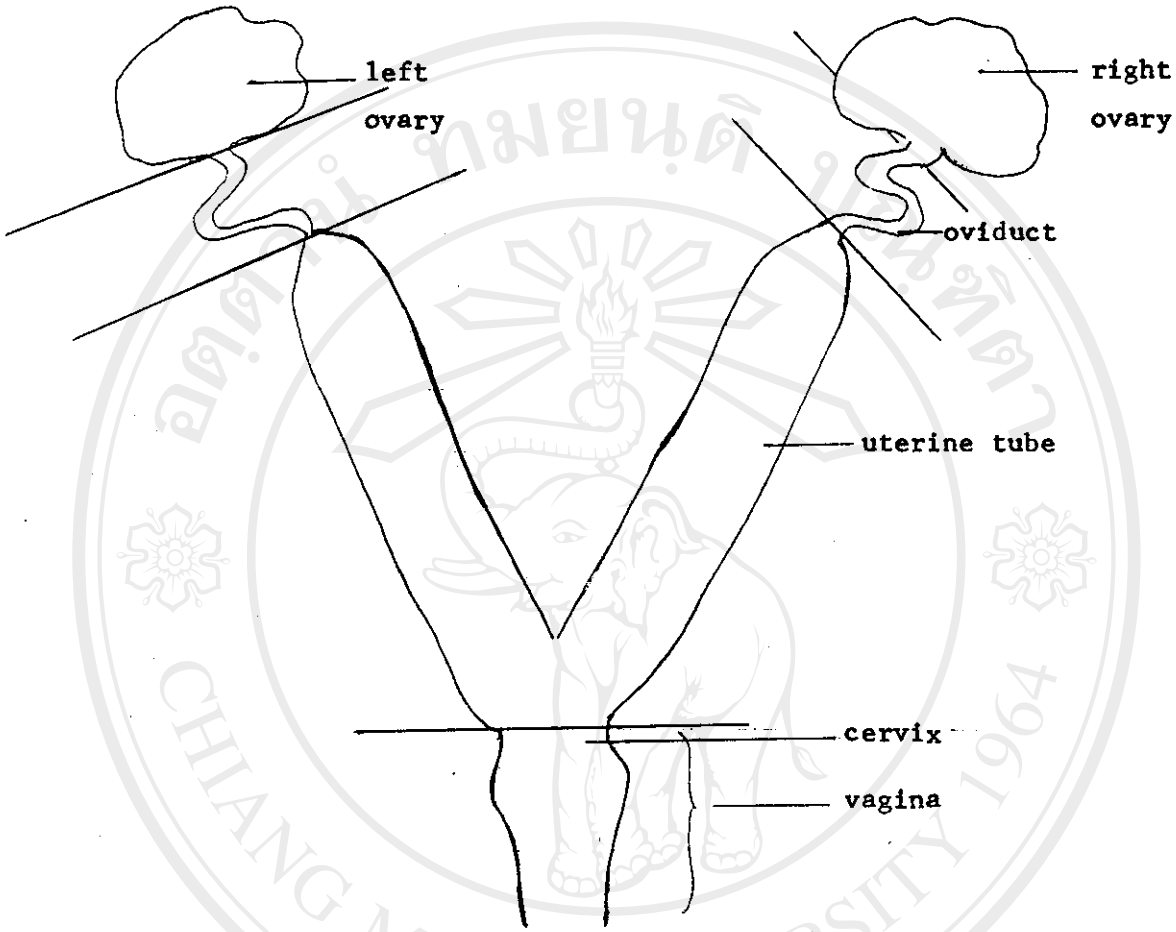
ช่องคลอดปิด

ภาพที่ 2 แสดงช่องคลอดของหนูที่เปิดเปรียบเทียบกับช่องคลอดหนูที่ปิด

2. การศึกษาผลของสารละลายผงชูรสต่อส่วนต่าง ๆ ของระบบสืบพันธุ์

นำหนูที่ครบกำหนดที่จะนำอวัยวะมาศึกษาใส่ในโถที่มี diethyl ether อยู่ บันทึกน้ำหนักและหมายเลขหนูแล้วจึงนำหนูนอนหงายด้านหน้าท้องขึ้นในถาดผ่าตัด ใช้คีมปากคีบจับหนังด้านท้องขึ้นแล้วใช้กรรไกรตัดไปตามความยาวของลำตัวจากบริเวณใกล้ช่องคลอดจนถึงบริเวณอกแล้วตัดผนังลำตัวด้านข้างทั้งซ้ายและขวาออก ยกทางเดินอาหารบริเวณช่องท้องจะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีไขมันติดอยู่ ใช้กรรไกรเล็กตัดไขมันออกจากรังไข่และมดลูก แล้วตัดอวัยวะทั้ง 2 ส่วน วางบนกระดาษกรอง ตัดไขมันออกให้หมด ทำการแยกอวัยวะทั้ง 2 ส่วนออกจากกัน โดยแยกเฉพาะรังไข่โดยไม่รวมท่อ oviduct และแยกส่วนมดลูกโดยไม่รวมท่อ oviduct และส่วนของช่องคลอด (ตัดตามแผนผังดังภาพที่ 3) นำอวัยวะเหล่านั้นมาศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงตำแหน่งที่แยกส่วนรังไข่และมดลูกนำไปศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 ศึกษาผลของสารละลายผงชูรสต่อน้ำหนักมดลูก

นำเอาส่วนของมดลูกที่ตัดไขมันออกหมด มาอบเพื่อหาค่าน้ำหนักแห้งโดยวางส่วนของมดลูกลงบนจานเพาะเชื้อที่สะอาดพร้อมทั้งติดเลเบลระบุหมายเลข จากนั้นนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 65°c ข้ามคืน แล้วจึงนำมาชั่งด้วยตาชั่งละเอียด จากนั้นนำไปอบต่ออีกระยะหนึ่งและนำมาชั่งอีกครั้ง ถ้าน้ำหนักที่

ชั่งได้ไม่เปลี่ยนแปลง ก็ถือว่ามดลูกแห้งสนิท ค่าที่ได้คือ ค่าน้ำหนักแห้งของมดลูกที่ต้องการ บันทึกน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมแล้วจึงนำค่าไปคำนวณน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยคิดดังนี้

$$\text{น้ำหนักอวัยวะ (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะ (มิลลิกรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวของหนู (กรัม)}}$$

2.2 ผลต่อน้ำหนักรังไข่

นำส่วนของรังไข่ที่ตัดไขมันออก ไปวางบนกระดาษชั่งสารที่หราบน้ำหนักแน่นอน จากนั้นเอาไปชั่งด้วยตาชั่งละเอียดทันที บันทึกผลน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมแล้วจึงนำค่าที่ได้ไปคิดน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

2.3 ผลต่อจำนวน Graafian follicle และจำนวน corpus luteum

หลังจากชั่งน้ำหนักรังไข่แล้วให้นำรังไข่ไปทำ serial section โดยใช้ paraffin เป็นสื่อ

2.3.1 วิธีการทำ section

2.3.1.1 นำรังไข่ไป fixed ด้วย Bouin's solution 1 วัน

2.3.1.2 dehydrate ด้วยชุดของ alcohol (grading alcohol)

2.3.1.3 embed ใน paraffin

2.3.1.4 ตัด section ด้วย rotary microtome ขนาด 5-7 μ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.1.5 นำ section ที่ได้ติดกับ slide

2.3.1.6 นำไปย้อมสี haematoxylin & eosin

2.3.2 วิธีการย้อมสี haematoxylin & eosin

2.3.2.1 นำ paraffin section มาแช่ใน xylol 5 นาที แล้วผ่านไปยังสารละลาย n-butyl 95 % alcohol, 90 % alcohol, 80 % alcohol, 70 % alcohol, 50 % alcohol, 30 % alcohol น้ำกลั่น โดยทิ้งไว้ในสารละลายแต่ละอย่าง 3 นาที

2.3.2.2 แช่ในสี haematoxylin 1 นาที

2.3.2.3 ล้างในด้วยน้ำประปา 3 นาที

2.3.2.4 ย้อมใน eosin 0.5 % 3 นาที ล้างน้ำอย่างเร็ว

2.3.2.5 ผ่านสารละลาย alcohol 70 %, 90 %, 95 %, absolute alcohol อย่างเร็ว

2.3.2.6 แช่ใน Xylol I, Xylol II อย่างละ 5 นาที

2.3.2.7 mount ด้วย piccolyte

จากนั้นนำ section ที่ได้ไปอ่านผล นับจำนวน Graafian follicle และจำนวน corpus luteum ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พร้อมทั้งบันทึกภาพถ่ายด้วย และในการนับ Graafian follicle นั้นใช้เกณฑ์ในการนับโดยนับเฉพาะ follicle ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 250 μ ขึ้นไปเท่านั้น และการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางให้วัดช่วงที่กว้างที่สุดของ Graafian follicle 2 ค่าคือ x_1, x_2 ดังภาพแล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย

3. สถิติที่ใช้วิเคราะห์

Analysis of variance

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 แสดงวิธีวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Graafian follicle ภายในรังไข่

X_1 = เส้นผ่าศูนย์กลางช่วงที่กว้างที่สุดของ Graafian follicle ค่าที่ 1

X_2 = เส้นผ่าศูนย์กลางช่วงที่กว้างที่สุดของ Graafian follicle ค่าที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved