บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินการวิจัย

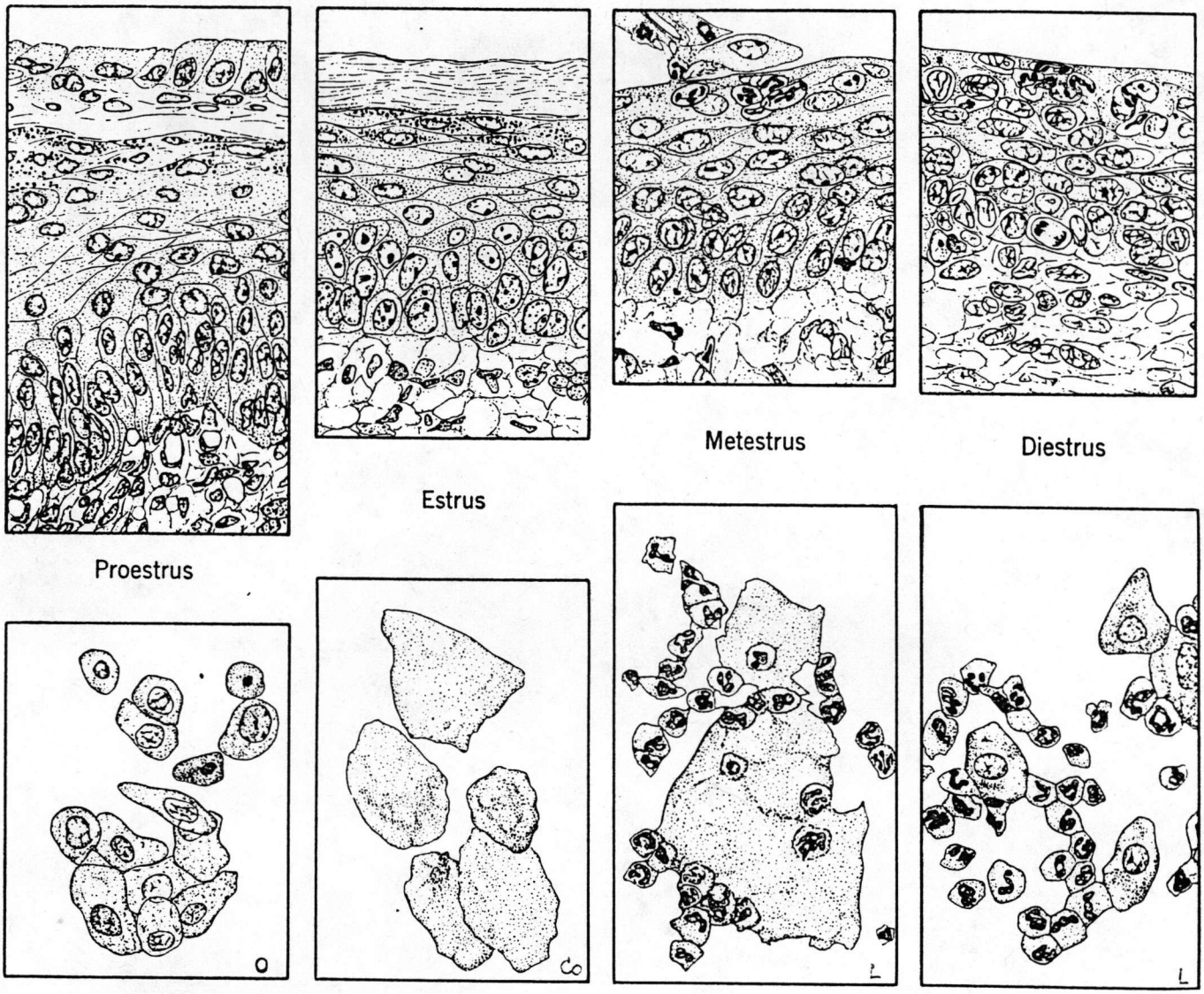
สัตว์ทดลอง

ใช้หนูเมาส์ (Mus musculus) พันธุ์ CD-1 เพศเมียอายุระหว่าง 2-5 เดือน และหนูเมาส์เพศผู้อายุระหว่าง 3-6 เดือน เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมให้มีแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (20.00-06.00 น.) อุณหภูมิห้องประมาณ 24±1 C ให้อาหารหนูสำเร็จรูป (เจริญโภคภัณฑ์) และน้ำดื่มอย่างไม่จำกัดตลอดเวลา สำหรับหนูเพศเมียก่อนนำมาใช้ทำการทดลองจะตรวจวงจรการเป็นสัด ให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ (4-5 วัน) ติดกันอย่างน้อย 2 วงจร

019201

ตารางที่ 2.1 แสดงวงจรการเป็นสัดของหนูเมาส์

ระยะของวงจรการเป็นสัด	ลักษณะของช่องคลอดที่ปรากฏ
Diestrus	ปากช่องคลอดเปิดเล็กน้อย เนื้อเยื่อมีลักษณะเปียกชื้น smear จะพบ leucocyte อาจพบ nucleated epithelium cell บ้าง
Proestrus	ปากช่องคลอดเปิดกว้างขึ้น เนื้อเยื่อมีสีชมพูแกมแดง smear จะพบ nucleated cell
Estrus	ปากช่องคลอดเปิดกว้างขึ้น เนื้อเยื่อมีสีชมพูอ่อนและไม่เปียกชื้นมาก smear พบ cornified cell เป็นช่วงที่เกิด heat และมีการตกไข่ หนูเพศเมียจะยินยอมผสมกับเพศผู้ในระยะนี้เท่านั้น
Metestrus 1	เนื้อเยื่อช่องคลอดมีสีซีดและแห้งลง ไม่อิ่มน้ำเหมือนระยะ estrus
Metestrus 2	เหมือน metestrus 1 แต่เนื้อเยื่อแห้งกว่า อาจมีเศษเซลสีขาวบนผนังชั้นในของช่องคลอดหรืออยู่ในช่องคลอด smear พบ leucocyte cornified cell และอาจพบ nucleated cell



รูปที่ 2.1 แสดงเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัดที่ตรวจพบจากการทำ vagina smear

O = nucleated cell ที่ตรวจพบในระยะ Procstrus

C_o = cornified cell ที่ตรวจพบในระยะ Estrus

L = leucocyte cell ที่ตรวจพบในระยะ Metestrus และ Diestrus

หนูเมาส์จะมีวงจรการเป็นสัดที่เป็นรอบ (cycle) โดยพบว่ามีการตกไข่ทุก ๆ 4 วัน แต่ช่วงเวลาดังกล่าวอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปได้บ้างขึ้นกับฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมใต้สมอง (pituitary) นั่นคือ FSH (Follicle Stimulating Hormone) และ LH (Lutenizing Hormone) (Buckland et al, 1981) นอกจากนี้ยังอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อวงจรการเป็นสัด เช่น แสงสว่าง อุณหภูมิ อาหาร หรือแม้แต่การเลี้ยงดู โดยพบว่าการเลี้ยงเพศเมียรวมไว้กรงเดียวกันจำนวนมาก จะทำให้เกิด Lee Boot Effect (Billet และ Wild, 1975) ระยะเวลาวงจรการเป็นสัดยาวขึ้น หรือทำให้เกิดการตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) หรือไม่มีวงจรการเป็นสัด (anestrus)

การตรวจวงจรการเป็นสัด ทำโดยใช้แท่งแก้วขนาดเล็กทำ vagina smear ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long and Evan (1922) โดยใช้แท่งแก้วปลายมนที่สะอาดจุ่มใน 0.9%NaCl สอดเข้าไปในช่องคลอดให้ปลายแท่งแก้วแตะกับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นเซลล์ชนิดใดและบันทึกผล คัดเลือกหนูเพศเมียเฉพาะตัวที่มีเซลล์ช่องคลอดเป็น nucleated cell (แสดงว่าหนูอยู่ในระยะ proestrus) ซึ่งเป็นระยะที่ใกล้จะมีการตกไข่และยินยอมให้เพศผู้ผสม ในเวลาต่อมานำไปผสมกับเพศผู้ ในวันรุ่งขึ้นทำ vagina smear หรือตรวจดูก้อนอสุจิสีขาว (sperm plug)ในช่องคลอด ถ้าพบ plug สีขาวบริเวณช่องคลอดถือเป็นวันแรกของการตั้งท้อง ระยะและตำแหน่งที่จะพบเอมบริโอของหนูเมาส์ในการเจริญในตัวสัตว์ทดลอง (in vivo) แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงระยะและตำแหน่งที่จะพบเอมบริโอของหนูเมาส์ในการเจริญในสัตว์ทดลอง

ระยะตั้งครรภ์		ระยะของเอมบริโอ	ตำแหน่ง
วันที่	เวลา (น.)		
1	9.00-18.00	1-เซลล์	ท่อนำไข่
	19.00-	2-เซลล์	ท่อนำไข่
2		2-เซลล์	ท่อนำไข่
3	-10.00	4-เซลล์	ท่อนำไข่
	10.00-13.00	4-8 เซลล์	ท่อนำไข่/มดลูก
	13.00-18.00	4-8 เซลล์	มดลูก
	18.00-19.00	8-เซลล์	มดลูก
		มอรูลา	
		บลาสโตซิสระยะแรก	
4	-9.00	บลาสโตซิสเริ่มเข้าเกาะติดผนังมดลูก	มดลูก

ห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการ Embryo culture laboratory ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. Laminar Flow hood : Model GLH-48,
Gensa Company Limited.
Bangkok, Thailand.

2. Water jackete incubator : Model 3030
Forma Scientific,
Ohio, U.S.A.

3. Phase Contrast Microscope : Model IMT-2,
Olympus Optical Co.,Ltd.
Tokyo, Japan.

4. Dissecting Microscope : Olympus, Japan.

5. Electric Pressure Steam Sterilizer
: Model No. 25X
All American.

6. The Advanced Osmometer : Model 3 D2,
1000 Highland avenue,
Massachusetts, U.S.A.

7. pH meter : Cole Parmer,
Digi PH ase, Medico,
Bangkok, Thailand.

8. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด : JP-160 Chyo Balance, Corporation, Tokyo, Japan.

9. Embryological watchglass : Griffin & George Co, HLJ-630-S.

10. Millipore Filter, Plastic swinney adaptor type และ Millipore membrane : Filter type HA. pore size 0.45 micron, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, U.S.A.

11. Plastic tissue culture dish # 3001 : Falcon Div. Becton, Dickinson and Co., California, U.S.A.

12. Plastic tissue culture dish : Nunclon, Roskildi, Denmark.

13. Plastic syringe 1 ml : Terumo Corporation, Tokyo, Japan.

14. Hypodermic needles : size G 30x3/4" stainless steel Lure mounts, England.

15. Glenco-microsyringes size 10 µl : Spectrum laboratories, Inc. Los Angeles, California.

16. Mouth Pieces

17. Pasteur pipette

18. ตะเกียงอัลกอฮอล์

19. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง

- กรรไกรปลายตรง 1 อัน
- กรรไกรปลายโค้ง 1 อัน
- Watch-maker forceps 2 อัน
- Non tooth forceps 1 อัน
- Needle holder & Curved surgical needle 1 อัน
- Surgical silk (size 3-0)

หมายเหตุ

อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องโลหะทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอและการผ่าตัดสัตว์ทดลองล้างทำความสะอาดด้วย 2% 7X แล้วล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่งก่อนนำไปฆ่าเชื้อในตู้อบแห้ง (hot air oven) ด้วยความร้อน 160 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง สำหรับเครื่องมือที่เป็นพลาสติกนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Modified Krebs Ringer solution (M16) และ phospate buffer saline (PBI)

1.1. Sodium Chloride (NaCl)

1.2. Potassium Chloride (KCl)

1.3 Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl.2H_2O$)

1.4 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

1.5 Disodium hygrogen phosphate 7-hydrate reinst ($Na_2HPO_4.7H_2O$)

1.6 Magnesium Chloride hexahydrate ($MgCl_2.6H_2O$)

1.7 Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)

1.8 Sodiumbicarbonate ($NaHCO_3$)

1.9 D Glucose ($C_6H_{12}O_6.H_2O$)

1.10 Sodium pyruvate (Na pyruvate)

1.11 Penicillin G. Sodium

1.12 Phenol red ($C_{19}H_{14}O_5S$)

1.13 Bovine Serum albumin : Fraction V No. A-9647 Lot 95F-0143 Sigma Chemical Company.

1.14 Sodium Lactate (Na Lactate 60% Syrup)

: No. L-1375 (DL-Lactic Acid) Lot 102F-5048 Sigma Chemical Company

St. Louis, Mo. U.S.A.

2. ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ของสัตว์ทดลอง

2.1 Gonadotropin (Pregnant Mare's Serum, PMSG. No. G-4877

2.2 Chorionic Gonadotropin (Human Pregnancy Urine HCG. No CG-10)

3. Liquid paraffin colourless : BDH Chemicals Ltd., Poole, England.

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

4.1 Lectin ชนิด Concanavalin A : No. C-5275 Lot 49F-8822

4.2 Lectin ชนิด Wheat germ agglutinin : No. L-0636 Lot 38F-8824

หมายเหตุ

1.1-1.12 สารเคมีจาก E. Merck Dermstadt, Germany

2, 4 สารเคมีจาก Sigma Chemical Company St. Louis, Mo. U.S.A.

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

น้ำยา PBI และน้ำยาเพาะเลี้ยง M16 เป็น simple medium ที่เตรียมขึ้นเอง การเตรียมทำโดยชั่งสารเคมีตามน้ำหนักที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.3 นำมาละลายในน้ำจากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ Elgastat UHQ (ความบริสุทธิ์ของน้ำเทียบเท่ากับน้ำที่ได้จากการกลั่น 3 ครั้ง) ยกเว้น BSA ความเข้มข้นของสารละลาย (osmolality) น้ำยาเพาะเลี้ยงอยู่ในระดับ 285-295 mosmol/kg ปรับระดับ pH ของน้ำยาให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.3 (โดยวัดหลังจากการ equilibrate ด้วยอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5) ด้วยสารละลาย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl หลังจากนั้นจึงเติม BSA (3 มิลลิกรัมต่อซีซี) ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filters) ขนาด 0.45 ไมครอน บรรจุลงในภาชนะสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสใช้ได้นาน 2 อาทิตย์

เมื่อใช้น้ำยาแต่ละครั้งจะ equilibrate น้ำยาเพาะเลี้ยงด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ก่อนเพื่อปรับ pH ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ (7.2-7.4) จากนั้นจึงหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก (plastic culture dish) ขนาด 35x10 มิลลิเมตรหรือ 60x15 มิลลิเมตร เป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ตามวิธีของ Brinster (1963) ที่เรียกว่า microdrop method แล้วใช้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) ปิดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวแล้วนำจานเพาะเลี้ยงเก็บในตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 37 ± 0.2 องศาเซลเซียส ความชื้นอยู่ในระดับอิ่มตัวและมีอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ($5\%CO_2$) ตลอดเวลาอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมงก่อนทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาส์ Modified-Krebs-Ringer solution (M16) และน้ำยา Phosphate Buffer Saline (PBI) (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ส่วนประกอบ	M16	PBI*
NaCl	5534	8000
KCl	356	356
$CaCl_2 2H_2O$	250	250
KH_2PO_4	162	162
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	1150
$MgSO_4.7H_2O$	294	-
$NaHCO_3$	2106	-
$MgCl_2.6H_2O$	-	100
Glucose	1000	1000
Na lactate	3.5 ml	-
Na Pyruvate	36	27.5
BSA	3000	3000
Penicillin G. Sodium	60	60
Streptomycin	50	-
Phenol red	10	10
pH	7.2	7.2
osmolality (mOsM/kg)	288-292	290

* Whittingham, 1971

วิธีทำการทดลอง

1. การศึกษาผลของเลคตินต่อการเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอในจานเพาะเลี้ยง

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อเก็บเอมบริโอ

การกระตุ้นให้เกิดการตกไข่จำนวนมากในหนูเมาส์ทำโดยการฉีด PMSG 5 iu เข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) 36-48 ชั่วโมงต่อมาฉีด HCG เข้าช่องท้องตัวละ 5 iu หลังจากนั้นนำไปขังรวมกับหนูเพศผู้ในอัตราส่วนเพศผู้:เพศเมีย 1:1 เช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าตรวจพบ plug สีขาวบริเวณ vagina หรือทำ vagina smear พบ sperm ในช่องคลอดให้ถือเป็นวันแรกของการตั้งท้อง (D_1)

1.2 การเก็บเอมบริโอของหนูเมาส์

ฆ่าหนูเพศเมียที่ตั้งท้องโดยวิธีดิงคอต่อ (cervical dislocation) เปิดหน้าท้องแล้วตัดแยกเฉพาะท่อนำไข่และมดลูกทั้งสองข้าง (รูปที่ 2.2) โดยถ้าต้องการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ให้เก็บจากท่อนำไข่ของสัตว์ทดลองในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง(D_2) ส่วนเอมบริโอระยะ 8-เซลล์เก็บจากมดลูกของสัตว์ทดลองในเย็นวันที่ 3 ของการตั้งท้อง (D_3) ซับเลือดบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปใส่ในบล็อกแก้ว (embryological watch glass) ที่มีสารละลาย phosphate buffer saline (PBI : Whittingham, 1971) อยู่ประมาณ 1.5-2 มิลลิลิตร นำท่อนำไข่หรือมดลูกที่อยู่ใน PBI ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10-40 เท่า ใช้ plastic syringe ขนาด 1 ซีซี บรรจุ PBI ที่ส่วนปลายมีเข็มฉีดยาขนาดเล็กสวมอยู่ฉีดไล่เอมบริโอภายในท่อนำไข่หรือมดลูกลงในบล็อกแก้ว เก็บเอมบริโอด้วย capillary pipette ล้างใน PBI 2 ครั้ง จากนั้นนำเอมบริโอที่ได้ไปแบ่งกลุ่มทดลองต่อไป

1.3 การแบ่งกลุ่มทดลองและการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

แบ่งเอมบริโอระยะ 2-เซลล์และ 8-เซลล์ออกเป็นกลุ่มระยะละ 7 กลุ่มๆ ละ 100 เอมบริโอ ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงใน M16

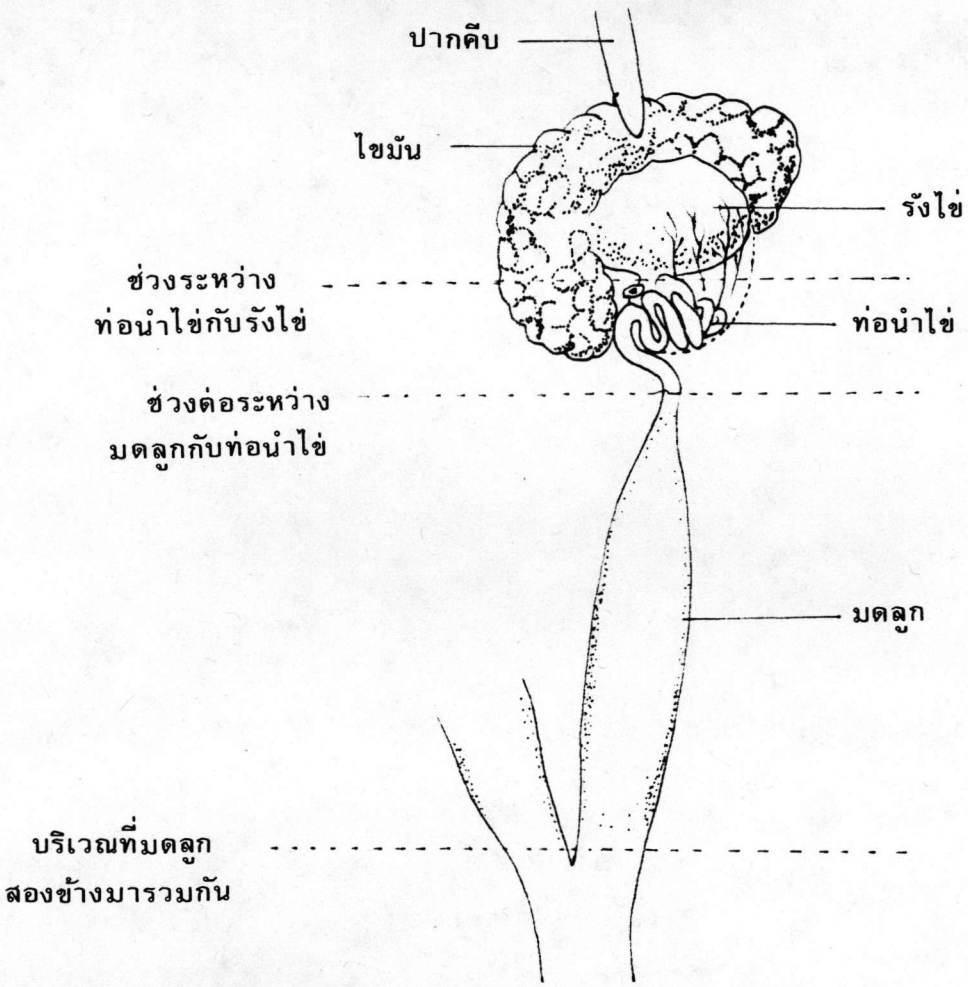
กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง เลี้ยงใน M16 + Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

กลุ่มที่ 5, 6 และ 7 เป็นกลุ่มทดลอง เลี้ยงใน M16 + WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงใช้วิธี microdrop ของ Brinster (1963) ตามที่กล่าวมาแล้ว

1.4 วิธีวัดผล

ตรวจดูการเจริญและนับจำนวนเอมบริโอที่เจริญในระยะต่าง ๆ ทุก 24 ชั่วโมง จนถึงระยะ blastocyst และติดตามดูการออกจากโซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอภายใน 48 ชั่วโมงต่อมา



รูปที่ 2.2 แสดงตำแหน่งของท่อนำไข่, มดลูก และบริเวณที่ตัดแยกท่อนำไข่และมดลูก

2. การศึกษาการฝังตัวและความอยู่รอดหลังย้ายฝากของเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในเลดติน

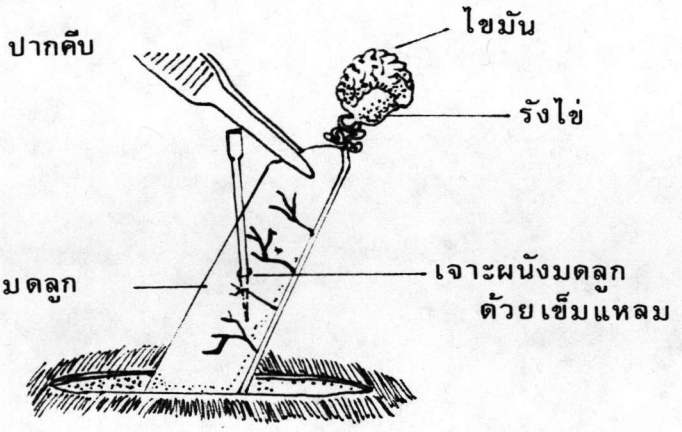
2.1 วิธีเตรียม pseudopregnant recipients

ใช้หนูเมาส์เพศเมียอายุ 2-4 เดือน ที่มีวงจรการเป็นสัดปกติซึ่งอยู่ในช่วงพร้อมที่จะผสม ไปขังรวมกับหนูเพศผู้ที่ทำหมันแล้ว (vasectomized male) รุ่งเช้าถ้าตรวจพบ plug สีขาวบริเวณ vagina ให้ถือเป็นวันแรกของการตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy)

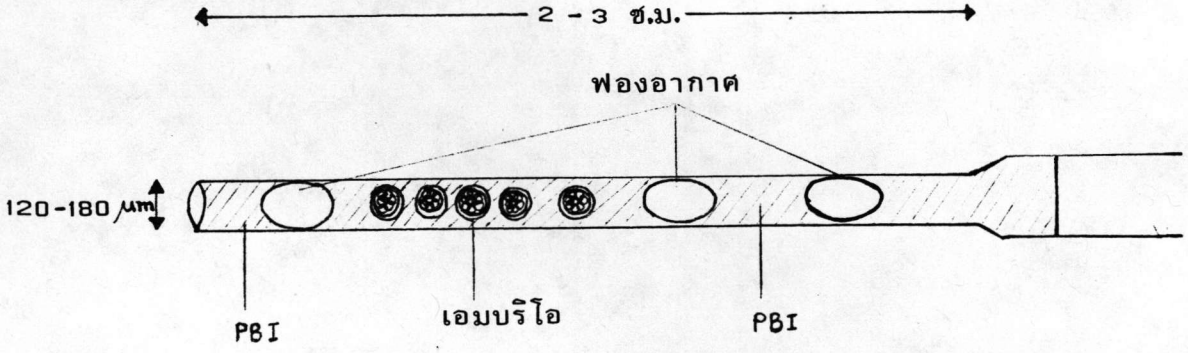
2.2 วิธีเตรียมและย้ายฝากเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเลดติน

เก็บเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ที่ได้จากหนูเพศเมียที่กระตุ้นให้เกิดการตกไข่จำนวนมากในวันที่ 3 (D_3) ของการตั้งท้อง นำไปเพาะเลี้ยงโดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.3 นาน 1 ชั่วโมงก่อนนำไปย้ายฝากบริเวณมดลูก (uterus) แต่ละข้างของหนูเมาส์ที่ตั้งท้องเทียม โดยวางยาสลบตัวรับที่ตั้งท้องเทียมในวันที่ 3 ด้วยอีเทอร์ (diethylether) ทำความสะอาดด้านข้างลำตัวระดับใต้ชายโครงด้านหนึ่งให้ทั่วด้วยน้ำยาเดททอล 2% ผ่าเปิดผิวหนังและกล้ามเนื้อด้านข้าง (dorsalateral incission) เป็นช่องกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตรบริเวณต่ำจากชายโครงเล็กน้อยใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps ดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกออกมา ใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps จับส่วนต้นของมดลูกเอาไว้ แล้วใช้เข็มแหลมเจาะผนังมดลูกให้เป็นช่องเล็ก ๆ (รูปที่ 2.3) สอดปลาย pipette ที่เก็บเอมบริโอเตรียมไว้ย้ายฝากเข้าไปในมดลูกลึกประมาณ 1 เซนติเมตร เป่าดันเบา ๆ ให้เอมบริโอเข้าสู่มดลูก การประเมินว่าเอมบริโอเข้าสู่มดลูกของตัวรับจริง โดยดูจากการเคลื่อนที่ของฟองอากาศที่ทำไว้เป็นเครื่องสังเกตุ ซึ่งทำไว้ที่ส่วนปลายของ pipette และเหนือตำแหน่งที่ดูดเก็บเอมบริโอ (รูปที่ 2.4) เสร็จแล้วเก็บมดลูกเข้าไปในช่องท้องดังเดิม เย็บแผลปิดชั้นกล้ามเนื้อและผิวหนัง แล้วทำความสะอาดแผลด้วยน้ำยาเดททอล 2% ทำการย้ายฝากเอมบริโอเข้าในมดลูกอีกข้างหนึ่งด้วยวิธีเดียวกัน โดยแต่ละข้างจะย้ายฝากเอมบริโอจำนวน 5 ตัว เสร็จแล้วแยกเลี้ยงตัวรับเหล่านี้ไว้ดูผลต่อไปในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง (หลังการย้ายฝากเอมบริโอ 5 วัน) นำหนูเมาส์ที่ได้รับการย้ายฝากเอมบริโอมาวางยาสลบด้วยอีเทอร์

ทำความสะอาดหน้าท้องด้วยน้ำยาเดททอล 2% ก่อนผ่าเปิดหน้าท้อง (Mid-ventral incision) ใช้ปากคีบดึงปีกมดลูกออกมา เพื่อตรวจดูระดับการเจริญจากขนาดและนับจำนวนพีดัสในมดลูกแต่ละข้างของตัวรับ จากนั้นเก็บปีกมดลูกเข้าไปในช่องท้อง เย็บปิดกล้ามเนื้อและหน้าท้องแล้วทำความสะอาดด้วยน้ำยาเดททอล 2% อีกครั้งก่อนจะแยกเลี้ยงเดี่ยว เพื่อรอให้ครบกำหนดคลอด (ประมาณ 20 วัน) นับจำนวนลูกที่คลอด (young born) เปรียบเทียบกับจำนวนเอมบริโอที่ย้ายฝากและพีดัสที่พบในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง



รูปที่ 2.3 แสดงการย้ายฝากทางมดลูก



รูปที่ 2.4 แสดงปิเปตที่ใช้ย้ายฝากเอมบริโอ

3. การศึกษาการฝังตัวและความอยู่รอดของเอมบริโอในมดลูกที่ฉีดเลคตินเข้าในช่องว่างมดลูก

3.1 มดลูกที่ฉีดด้วยเลคตินในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง

แบ่งหนูเมาส์เพศเมียที่ตกไข่และผสมพันธุ์ตามธรรมชาติออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว ฉีดสารเข้าในช่องมดลูกในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง โดยสลบและผ่าตัดดึงมดลูกออกมาเหมือนวิธีย้ายฝากเอมบริโอ ใช้ปากคีบจับส่วนต้นของมดลูกไว้แทงเข็ม microsyringe เข้าในช่องว่างมดลูกลึกประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ฉีดสารเข้าในช่องมดลูกทั้งสองข้าง ๆ ละ 5 ไมโครลิตร โดย

- กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีด PBI 5 ไมโครลิตร
- กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีด Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ
- กลุ่มที่ 5, 6 และ 7 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีด WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ

ผ่าตัดเปิดหน้าท้องเก็บมดลูกจากทุกกลุ่มในวันที่ 5 ของการตั้งท้องกลุ่มละ 5 ตัว และวันที่ 6 ของการตั้งท้องอีกกลุ่มละ 5 ตัว ในวันที่ 8 ของการตั้งท้องวางยาสลบและผ่าเปิดหน้าท้องตรวจดูระดับการเจริญจากขนาด และนับจำนวนพีตัสในมดลูกของหนูที่เหลือในทุกกลุ่ม แล้วเย็บปิดหน้าท้องเลี้ยงไว้จนครบกำหนดคลอด นับจำนวนลูกที่คลอดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและในระหว่างกลุ่มทดลองด้วยกัน

3.2 มดลูกที่ฉีดด้วยเลคตินในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง

ทำการทดลองอย่างเดียวกับในข้อ 3.1 โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ฉีดสารต่าง ๆ ในปริมาณเดียวกันกับข้างต้นเข้าในมดลูกในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง ตรวจดูระดับการเจริญจากขนาดและจำนวนพีตัสในวันที่ 8 ของการตั้งท้องและจำนวนลูกที่คลอดเมื่อครบกำหนดคลอด

4. การศึกษาผลของเลคตินต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมดลูก

นำมดลูกที่ตัดเก็บในวันที่ 5 และ 6 ของการตั้งท้องในข้อ 3.1 มาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบกับมดลูกของหนูเมาส์ที่ตั้งท้องปกติเป็นวันที่ 5 และ 6

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบผลของเลคตินต่อจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัวที่ผนังมดลูกและจำนวนลูกที่คลอดของหนูเมาส์ที่ฉีดเลคตินเข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 2 และ 3 ของการตั้งท้องเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเลคตินใช้ one-way analysis of varience (F-test) และ least significant difference (LSD) เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบค่า mean แต่ละ treatment สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนเอมบริโอและจำนวนลูกที่คลอดระหว่างกลุ่มที่ฉีดเลคตินในวันที่ 2 และ 3 ของการตั้งท้องนั้นใช้ unpaired t-test และการเปรียบเทียบจำนวนลูกที่คลอดกับจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัวระหว่างกลุ่มทดลองในกลุ่มที่ฉีดเลคตินในวันเดียวกันใช้ pair t-test กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$ และ $P<0.01$