

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

(MATERIALS AND METHODS)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง



๑. เครื่องมือผ่าตัด
  ๑. ชุด ประกอบด้วย
    - กรรไกรขนาดกลาง
    - กรรไกรขนาดเล็กปลายตรง และปลายโค้ง
    - ปากคีบปลายแหลมชนิดปลายตรง และปลายโค้ง
    - ปากคีบจับเส้นเลือด (Artery forcep)
    - เข็มและไหมสำหรับเย็บแผล
    - ขามเกลือบสำหรับแซ่เครื่องมือ
๒. หลอดฉีดยา และ เข็มฉีดยาเบอร์ต่าง ๆ
๓. Progesterone (Mann)
๔. Oestradiol benzoate (Sherring)
๕. Perphenazine hydrochloride (สามัคคีเภสัช)
๖. Acetylcholine dichloride (Hoffmann - Roche)
๗. Trichloroacetic acid - TCA (Bristish Drug House)
๘. Cortisone (Mann)
๙. Ethamoxy triphetol or MER - 25 (Wm.S. Merrell)
๑๐. Dettol antiseptic
๑๑. Ether
๑๒. 0.85 % Saline solution
๑๓. Microscope
๑๔. Slide and spatula

วิธีเตรียมสาร ไมนส์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Progesterone ซึ่งผง progesterone มาใหญ่หนัก  
ที่แน่นอน เอาลงโกรงบกลีอะเอียค แลวนำมาละลายในน้ำมันมะกอก (Olive oil) ให้ได้  
ความเข้มข้น 5 mg./0.1 ml. ก่อนละลายในน้ำมัน อาจเติม absolute alcohol  
ลงไปเล็กน้อย เพื่อช่วยให้ละลายในน้ำมันได้ขึ้น

Oestradiol benzoate ใช้สารละลาย oestradiol benzoate  
ที่มีความเข้มข้นเดิม 5 mg./1 ml. นำมาเติมด้วย pure olive oil จนมีความ  
เข้มข้น 0.1 µg./0.1 ml.

Perphenazine hydrochloride ซึ่งผง perphenazine.HCl  
ใหญ่หนักที่แน่นอน แลวนำมาละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg./0.1 ml.

Acetylcholine dichloride ใช้ผง Acetylcholine  
dichloride ซึ่งหนัก 100 mg ต่อ 1 ampule ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (aqueous  
solution) ให้ได้ความเข้มข้น 5 mg/ 0.1 ml.

10 % Trichloroacetic acid ซึ่งผง Trichloroacetic  
acid ๑๐๐ กรัม นำมาละลายใน deionized and distilled water  
ให้ได้สารละลายที่มีปริมาตร 1000 ml. แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (4° c)

Cortisone ซึ่งผง cortisone มาใหญ่หนักแน่นอน บกลี  
อะเอียค แลวนำมาละลายใน olive oil ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg./0.1 ml.

Ethamoxy triphetol (MER - 25) ซึ่งผง MER - 25  
ใหญ่หนักแน่นอน เอาลงโกรงบกลีอะเอียค แลวนำมาละลายใน olive oil ให้ได้  
ความเข้มข้น 20 mg./0.5 ml. อุณหภูมิห้องเล็กน้อย เพื่อให้ละลายได้ขึ้น (ก่อนใช้ทุกครั้ง  
ต้องอุ่นให้ร้อน และเขย่าให้เข้ากันดีเสียก่อน)

0.85 % Saline solution ซึ่งผง NaCl หนัก ๘๕ กรัม  
นำมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้สารละลายทั้งหมด 1000 ml.



## วิธีดำเนินการทดลอง

### การเลี้ยงและระวังรักษาหนูขาวที่ใช้ทดลอง

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นหนูตัวเมียพันธุ์ Wistar ที่ยังไม่เคยผ่านการผสมมาก่อน อายุตั้งแต่ ๕๐ วันขึ้นไป น้ำหนักตัวระหว่าง ๑๐๐ ถึง ๑๒๐ กรัม เลี้ยงในกรงอะลูมิเนียมขนาดปานกลาง (1x1x2/3 ft.) ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1° C ให้น้ำกินและได้รับแสงสว่างประมาณวันละ ๑๔ ชั่วโมง มีค ๑๐ ชั่วโมง อาหารที่ใช้เลี้ยงหนูเป็นอาหารมาตรฐาน ส่วนน้ำให้รับประทานปราศจากยา แต่สำหรับหนูที่ทำการ adrenalectomy ให้กินน้ำเกลือ 0.85 % NaCl Solution

หนูที่ได้รับการฉีกรadiol benzoate ถูกแยกเลี้ยงต่างหาก โดยไม่ให้ปะปนกับพวกอื่น เพื่อป้องกันการติดของสารไอโซโทป (contaminate) ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองผิดไปจากความเป็นจริงได้

### การเตรียมหนูเพื่อใช้ทดลอง

๑) Vaginal smear เป็นการตรวจระยะต่าง ๆ ของ reproductive cycle ในหนูขาว โดยตรวจทุก ๆ เช้า ตลอดจนการทดลอง โดยกำหนดได้จากลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏใน vaginal smear (Long and Evans, 19๕๒) ดังนี้

Proestrus : เป็นระยะก่อนที่จะถึง oestrus เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม เล็ก มี nucleus อยู่ภายใน เป็น nucleated epithelial cells ไม่มี leucocytic cell อยู่เลย ระยะนี้แทนด้วย " 0 "

Oestrus : เป็นระยะที่มี heat การผสมจะเกิดขึ้นในระยะนี้ ซึ่งลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่ที่ปรากฏ เป็น cornified epithelial cells ระยะนี้แทนด้วย " Co "

Dioestrus : เป็นระยะหลัง oestrus แล้ว ช่วงเวลายาว ๒ - ๓ วัน ระยะนี้จะพบแต่ leucocytes เป็นส่วนใหญ่ ระยะนี้แทนด้วย " L "

๒) การตั้งครรภ์ ซึ่งหนูตัวเมียที่พบว่ามี reproductive cycle เป็นปกติ (๔ - ๕ วัน) มาอย่างน้อย 2 cycles และกำลังอยู่ในระยะ proestrus ไว้ในกรงเดียวกับหนูตัวผู้ทั้งกัน (ตัวเมีย ๒ - ๓ ตัว ต่อตัวผู้ ๑ ตัว) แล้วตรวจดูโดยทำ vaginal smear ในเช้าวันรุ่งขึ้น ภาพ sperm plug หรือพบ spermatozoa ใน vaginal smear นับวันที่พบ sperm นี้ เป็นวัน 0 (L<sub>0</sub>) ของการตั้งครรภ์ และวันต่อ ๆ ไป ก็เป็น L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>... ตามลำดับ หนูที่ใช้สำหรับทดลองเป็นหนูตั้งครรภ์ ใช้หนูที่ตรวจพบ sperm แล้วทุกตัว

### การผ่าตัด

การผ่าตัดทุกครั้ง กระทำในขณะที่หนูถูกดมยาผสม ether เครื่องมือทุกชิ้นที่ไว้ในกรงผ่าตัด ทำ semi-sterile โดยแช่ใน 2.5 % Dettol solution

๑. การตัดรังไข่ (Ovariectomy) ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อตรงกลางของลำตัว ให้เปิดเป็นช่องเล็กน้อย โดยให้ช่องที่เปิดขึ้นเยื้องไปทางก้านบนต่ำลงมาจากบริเวณไต บริเวณที่จะผ่าตัด โคนขนออกและทาควายาฆ่าเชื้อพวก dettol solution แล้วใช้ปากคีบดึงเอาไขมันที่ติดกับรังไข่ขึ้นมา รังไข่จะติดขึ้นมาด้วยสอดปลายกรรไกรปลายโค้งทะลุไขมันเข้าไปใต้ท่อนำไข่ แล้วตัดตรงส่วนต่อระหว่างรังไข่กับส่วนต้นของท่อนำไข่ โดยให้รังไขหลุดออก แต่ให้ท่อนำไข่คงเหลืออยู่ และพยายามให้ส่วนนี้เป็นอันตรายน้อยที่สุด เสร็จแล้วเอาส่วนที่เหลืออยู่ทั้งหมด ใส่กลับเข้าไปในช่องท้อง แล้วเย็บปิดช่องท้องควายใหม่ โดยเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกันชั้นหนึ่งก่อน แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอก หรือใช้ clip เย็บหนังให้ติดกันก็ได้

๒. การตัดท่อมเหนือไต (Adrenalectomy) วิธีการ เปิดปิดช่องท้อง ทำเช่นเกี่ยวกับการตัดรังไข่ แต่ช่องท้องที่เปิดต้องให้คนไปทางก้านบน คือ ตัดตรงบริเวณส่วนต้นของไต แล้วใช้ปากคีบปลายโค้งค่อย ๆ ซอนไตขึ้นมา โดยไม่ให้เนื้อเยื่อของไตถูกทำลาย ทำให้มองเห็นท่อมเหนือไตได้ชัด แล้วใช้ปากคีบอีกอันหนึ่งคีบเยื่อที่ติดกับส่วนต้นของท่อมเหนือไตไว้ แล้วสอดปลายกรรไกรตัดเยื่อมันรอบ ๆ ท่อมเหนือไตให้หลุดออกมา พยายามไม่ให้เนื้อเยื่อของท่อมเหนือไตนั้นหลงเหลืออยู่

๓. Laparotomy ตัดหนังและกล้ามเนื้อหน้าท้องกลาง บริเวณ  
 กึ่งลำตัว (Mid - ventral line) ทรงเห็นช่อง vagina ขึ้นไปเล็กน้อย  
 ไขปากคีมดึงเอาไขมันที่เกาะอยู่รอบ ๆ มดลูกขึ้นมา มดลูกก็จะตึงขึ้นมาด้วย ทั่วทุกมุมมดลูก  
 ทั้งสองข้างว่า มีการฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูกหรือไม่ หลังจากตรวจแล้ว ใส่น้ำล้าง ๆ  
 กลับเข้าไปในช่องท้อง แล้วเย็บปากช่องท้อง โดยวิธีเกี่ยวกับการเย็บตอตะกรังไข

๔. Autopsy ใช้วิธีดึงกอดของหนูให้หลุดออกจากกัน เพื่อให้หนูตาย  
 อย่างรวดเร็ว แล้วจึงเปิดหน้าท้อง เพื่อตรวจดูการฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูก  
การฉีดสาร ไมนส์และสาร เกมที่ไซทอลอง ต่อไปนี้ เป็นรายการของสารที่ใช้สำหรับฉีด  
 ทดลอง, Vehicles และ routes ที่ใช้ฉีด :-

<u>Materials :</u>	<u>Vehicles :</u>	<u>Routes of Injection:</u>
Progesterone	Olive oil	Intramuscular
Oestradiol benzoate	Olive oil	Intramuscular
Perphenazine.HCl	H <sub>2</sub> O	Subcutaneous
TCA	H <sub>2</sub> O	Subcutaneous
Acetylcholine dichloride	H <sub>2</sub> O	Subcutaneous
Cortisone	Olive oil	Subcutaneous
MER - 25	Olive oil	Subcutaneous

#### การทดลอง

๑) การทดลองใช้ Perphenazine.HCl เพื่อชักนำให้เกิด Delayed Nidation

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ตั้งแต่ระยะ L<sub>2</sub> - L<sub>5</sub>  
 ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม คอนำหนักตัว ๑๐๐ กรัม โดยฉีดในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน  
 คือ ๑๑.๐๐ - ๑๓.๐๐ น. ทุกวัน ระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อตรวจดูผล  
 nidation ถ้าไม่มี nidation เลี้ยงหนูต่อไป โดยไม่ต้อง treat อะไรเลยจน  
 ถึง L<sub>11</sub> ทั้งนี้ เพื่อให้หนูมีเวลาการสร้าง gonadotrophins ที่จำเป็นสำหรับ  
 กระตุ้นรังไข่ให้ผลิต oestrogen ที่จำเป็นสำหรับ nidation (Varavudhi, 1969 a)  
 แล้วจึงทำ autopsy เพื่อดูผล nidation อีกครั้ง

๒) การทดลองผลของ Cholinergic neurohormone ชนิด Acetylcholine ในหนูที่ฉีด Perphenazine.HCl

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ L<sub>2</sub>-L<sub>5</sub> ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม คอน้ำหนักตัวหนู ๑๐๐ กรัม ในระยะ L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> ฉีด Acetylcholine วันละ ๒ ครั้ง เช้า - บ่าย ครั้งละ ๒๕ มิลลิกรัม คอน้ำหนักตัว ๑๐๐ กรัม ระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อตรวจผลของ nidation ถ้าไม่มี nidation เลี้ยงหนูต่อไปโดยไม่ treat อะไรเลยจนถึง L<sub>11</sub> ทำ autopsy ตรวจผล nidation อีกครั้ง เช่นเดียวกับ (๑)

๓) การทดลองผล TCA ในหนูที่ฉีด Perphenazine.HCl

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ระยะ L<sub>2</sub>-L<sub>5</sub> ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม คอน้ำหนักตัวหนู ๑๐๐ กรัม ในระยะ L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> ฉีด TCA โดยใช้ doses ต่าง ๆ กันในหนูแต่ละ group คือ ๕๐, ๗๕ และ ๑๐๐ มิลลิกรัม/วัน เพื่อทดลอง dose ที่จะให้ผลในการเกิด nidation ใกล้เคียงที่สุดในระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อตรวจดู nidation ถ้าไม่มี nidation เลี้ยงหนูโดยไม่ treat อะไรเลยจนถึง L<sub>11</sub> ทำ autopsy ตรวจผล nidation อีกครั้ง เช่นเดียวกับ (๑)

๔) การทดลองผลของ TCA ในหนูที่ตัดรังไข่ และฉีด Perphenazine.HCl

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ L<sub>2</sub>-L<sub>5</sub> ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม คอน้ำหนักตัวหนู ๑๐๐ กรัม ทำ bilateral ovariectomy ในตอนเช้าของระยะ L<sub>2</sub> และ L<sub>3</sub> ในหนูอย่างละพวก ฉีด progesterone ทุกวัน ๆ ละ ๔ มิลลิกรัม หลังจากทำ ovariectomy แล้ว ฉีด TCA ครั้งละ ๕๐ มิลลิกรัม ในระยะ L<sub>3</sub> และ L<sub>4</sub> ในระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อตรวจnidation ถ้าไม่มี nidation ฉีด 0.1 µg.oestradiol benzoate แล้ว treat ควบ progesterone ไปทุกวันจนถึง L<sub>11</sub> ทำ autopsy ดู nidation อีกครั้ง



๕) การทดลองผลของ TCA ในหนูที่ตัดต่อ adrenals และฉีด Perphenazine.HCl

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ระยะ L<sub>2</sub>- L<sub>5</sub> ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักหนู ๑๐๐ กรัม ทำ bilateral adrenalectomy ในตอนเช้าของระยะ L<sub>3</sub> หลังตัดต่อ adrenals แล้วฉีดคอร์ติโซน cortisone ครั้งละ ๐.๕ มิลลิกรัม ทุกวัน จาก L<sub>3</sub>- L<sub>5</sub> ในระยะ L<sub>3</sub>- L<sub>4</sub> ฉีด TCA ครั้งละ ๕๐ มิลลิกรัม ในระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อควบคุม nidation ถ้าไม่มี nidation เลี้ยงหนูต่อไปโดยไม่ treat อะไรเลยจนถึง L ทำ autopsy เพื่อตรวจผล nidation อีกครั้งเช่นเดียวกับ (๑)

(ภายหลังจากตัดต่อ adrenals แล้วให้หนูกินน้ำเกลือ ๐.๕% แทนน้ำประปา เพื่อช่วยไม่ให้หนูที่ตัดต่อ adrenals ตายก่อนที่จะสิ้นสุดการทดลอง)

๖) การทดลองผลของ TCA ในหนูที่ตัดรังไข่ และฉีดด้วย Progesterone

ทำ Bilateral ovariectomy ในหนูตั้งครรภ์ตอนเช้าของระยะ L<sub>2</sub> หลังจากทำ ovariectomy แล้วฉีด progesterone ทุกวัน ๆ ละ ๔ มิลลิกรัม ระยะ L<sub>3</sub>- L<sub>4</sub> ฉีด TCA วันละ ๕๐ มิลลิกรัม ระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อควบคุม nidation ถ้าไม่มี nidation ฉีด 0.1 µg. oestradiol benzoate พร้อมทั้งฉีด progesterone ต่อไปทุกวัน ๆ ละ ๔ มิลลิกรัม จนถึง L ทำ autopsy เพื่อควบคุม nidation อีกครั้ง

๗) การทดลองผลของ TCA และ MER - 25 ในหนูที่ฉีด Perphenazine.HCl

ฉีด Perphenazine.HCl ในหนูตั้งครรภ์ในระยะ L<sub>2</sub>- L<sub>5</sub> ทุกวัน วันละ ๑ มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักตัว ๑๐๐ กรัม ตอนเช้าของระยะ L และ L<sub>4</sub> ฉีด MER - 25 ครั้งละ ๐.๕ มิลลิกรัม ตอนบ่ายของระยะ L<sub>3</sub> และ L<sub>4</sub> ฉีด TCA ครั้งละ ๕๐ มิลลิกรัม โดยเว้นระยะห่างจากการฉีด MER - 25 แล้วประมาณ ๓ ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้ TCA เข้าไปมีผลต่อ nidation ก่อน MER - 25 เพราะ MER - 25 ละลายในน้ำมัน ซึ่งอาจจะ absorb เข้าไปช้ากว่า TCA ซึ่งละลายใน aqueous solution

ในระยะ L<sub>6</sub> ทำ laparotomy เพื่อดู nidation ถ้าไม่มี nidation  
เลี้ยงหนูต่อไปโดยไม่ตอง treat อะไรเลยจนถึง L<sub>11</sub> ทำ autopsy เพื่อดู  
nidation อีกครั้ง

๔) การเตรียมมดลูกที่ฝัง Implantation sites สำหรับศึกษาในระยะเริ่มแรกของการฝังตัวของตัวอ่อน

เมื่อตรวจพบว่า มดลูกของหนูขาว มี implantation ในระยะ L<sub>6</sub>  
ก็ทำการผ่าหนูนั้นแล้ว remove เอาส่วนทั้งหมดของ reproductive tracts  
รวมทั้งส่วน mesenteries ออกมาทำให้ใสเพื่อเก็บไว้ศึกษา implantation sites  
ในระยะเริ่มแรกของมดลูกหนูขาว โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการทำให้ใสตามวิธีของ  
Orsini (1961) โดยทำเป็นขั้น ๆ ดังนี้

004413

- ๑) Fixation นำส่วนทั้งหมดของมดลูก ที่ remove ออกมาล้างด้วย Physiological  
saline เพื่อล้างเลือดที่คลออยู่ออกให้หมด แล้วใช้เข็มหมุดปักครึ่งส่วน mesometrium  
บน supporting card ที่ผูกด้วยกระดาษตะกั่ว โดยจึกให้มดลูกทั้งสองข้างอยู่ใน  
ตำแหน่งตามต้องการ แล้วแช่ในน้ำยา AFA (30 c.c. 95 % alcohol, 10 c.c.  
commercial formalin, 10 c.c. glacial acetic acid  
และ 50 c.c. water) เพื่อ fix ให้มดลูกคงรูปอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการ  
ศึกษา คือ ยึดตรงตลอด tract การแช่ AFA ต้องแช่ในภาชนะที่มีขนาดใหญ่พอที่จะ  
ไม่ทำให้ tract ของมดลูก โกงงอ และน้ำยาที่แช่จะต้องท่วมตลอดทุกส่วนของมดลูก
- ๒) Dehydration and Bleaching เมื่อแช่ AFA จนมดลูก fix ก็แล้ว  
ปลดออกจาก supporting card แล้ว label ไว้ แล้วจึงนำมา dehydrate  
โดยผ่าน alcohols ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตามลำดับ คือ 50 %, 70 %, 80 %  
95 % และ 100 % alcohol โดยเปลี่ยนผ่านแต่ละชั้น ๆ ละ ๒ ครั้ง ในชั้น 50 %  
70 % และ 80 % เติม 30% hydrogen peroxide ลงไปเล็กน้อยเพื่อ  
ฟอกสี specimen ให้ขาว



๓) จาก 100 % alcohol ผ่านต่อไปยังส่วนผสมของ 100 % alcohol  
 + benzol จากนั้นผ่านต่อไปยัง benzol อีก ๒ ครั้ง และครั้งสุดท้ายแช่ไว้ใน  
 benzyl benzoate เพื่อเก็บไว้ทำการศึกษาต่อไป ในระยะนี้ จะเห็น uterine  
 tract ได้ จนสามารถมองเห็น implantation sites ภายในมดลูกได้

การทำ uterine tracts ให้ได้โดยวิธีนี้ ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ  
 ๑๐ วัน โดยกำหนดเวลาการแช่ในน้ำยาแต่ละชนิด ตามที่เห็นสมควร โดยใช้การตั้งอุณหภูมิ  
 ควบคุมตามเวลา.