บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

1. การเลี้ยงและระวังรักษาสัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์สีทอง (Mesocricetus auratus) เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อยู่ในห้องปรับอากาศที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซนติเกรด ให้ได้แสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 06.00 น. ถึง 20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 20.00 น. - 06.00 น.) โดยใช้สวิตซ์อัตโนมัติ กินอาหารมาตรฐาน ซึ่งสั่งจากบริษัท F.E. Zeullig (Gold Coil Mills) และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา เลือกใช้แต่เฉพาะสัตว์ตัวเมียที่ไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อน และเติบโตเต็มที่แล้ว อายุ 45-75 วัน มีน้ำหนักประมาณ 90 ± 20 กรัม สัตว์ทดลองทุกตัวต้องผ่านการตรวจว่ามีวงสืบพันธุ์เป็นปกติ (4 วัน) ไม่น้อยกว่า 3 วงติดต่อกันก่อน จึงจะนำมาทดลอง

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ของสัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์ที่มีวงสืบพันธุ์ปกติ จะกินเวลานาน 4 วันต่อ 1 วงสืบพันธุ์ โดยกำหนดให้วันที่พบเมือกเหนียวสีนวลขับออกมาจากช่องคลอด ซึ่งสามารถใช้แท่งแก้วแตะแล้วยืดออกมาเป็นสายได้ (Postestrous discharge) เป็นวัน Day 2 ซึ่งอยู่ในระยะอีสตรัสเป็นวันที่มีการตกไข่แล้ว วันต่อ ๆ มา คือ Day 3 จะอยู่ในระยะเมตาอีสตรัส และ Day 4 ซึ่งจะอยู่ในระยะไดอีสตรัส เป็นระยะหลังการตกไข่ ซึ่งกินเวลา 2 วัน จากนั้นจึงเริ่มวงสืบพันธ์ใหม่ในวันรุ่งขึ้น จะเป็น Day 1 เป็นระยะก่อนตกไข่ที่เรียกว่าระยะโปรอีสตรัส กินเวลานาน 1 วัน รวมเป็น 4 วัน ใน 1 วงสืบพันธ์นั่นเอง (Ward 1946, Orsini, 1961, Kent, 1968)

3. การเตรียมฮอร์โมนสำหรับฉีดให้สัตว์ทดลอง

3.1 การเตรียมเมลาโตนิน

ชั่งเมลาโตนินด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านละเอียดได้ถึง 0.1 มิลลิกรัม ละลายใน 95% เอธิลอัลกอฮอล์ 1 ส่วน แล้วเติมน้ำเกลือ 0.85% 9 ส่วน (Ota & Hsieh, 1968) ให้มีความเข้มข้น 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน ต่อการละลาย 1 ครั้ง

3.2 การเตรียม 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล และ 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล

ทำแบบเดียวกับเมลาโตนิน ให้ได้ความเข้มข้น 30 และ 50 ไมโครกรัม ต่อ 5 ไมโครลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้ในการทดลอง

3.3 การเตรียม FSH

ชั่ง FSH ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำเกลือ 0.85% 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 10 ug./0.1 ml. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้ในการทดลอง

4. การเตรียมท่อเหล็กสเตนเลสขนาดเล็กสำหรับฝังเข้าช่องว่างในสมอง

ใช้ท่อเหล็กสเตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรอบนอก 0.028 $\pm$ 0.005 (ท่อใหญ่) ตัดเป็นท่อน ๆ ด้วยคีมสำหรับตัดตะปู ยาวท่อนละ 2 เซนติเมตร จะได้ท่อเหล็กที่ปลายทั้ง 2 ข้างปิดงุ้มเข้าหากัน ใช้คีมปากตะเข้จับตรงกลางของท่อให้เหลือปลายทั้งสองข้างไว้ นำไปจ่อบนหินไฟที่ใช้หมุนด้วยมอเตอร์ เพื่อขจัดส่วนปลายที่ปิดงุ้มเข้าหากันออกไป เมื่อขจัดปลายงุ้มออกทั้งสองปลายแล้ว ใช้ท่อเหล็กขนาดเล็กกว่าสอดเข้าไปในท่อเพื่อดันให้เศษเหล็กที่อาจติดอยู่ในท่อออกมาให้หมด (ดูรูปที่ 1.1 (C))

5. การเตรียมเข็มหมุดท่อเหล็กสเตนเลสสำหรับใช้ปิดท่อเหล็กที่ฝังอยู่ในสมองของสัตว์

ใช้ท่อเหล็กขนาดเล็กกว่าท่อฝัง ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางรอบนอก 0.023 ± 0.0005 นิ้ว ตัดเป็นท่อน ๆ ยาวท่อนละ 2 เซ็นติเมตร บัดกรีที่ปลายข้างหนึ่งด้วยตะกั่วให้ติดเป็นตุ่มเหมือนเข็มหมุด (ดูรูป 1.1 (b)) ฝนปลายด้านที่เหลือด้วยหินไฟที่หมุนด้วยมอเตอร์ เมื่อขจัดปลายงุ้มออกไปแล้ว สอดปลายเข็มหมุดนี้เข้าไปในท่อที่เตรียมไว้สำหรับฝังลงในสมอง จะได้ความยาวของเข็มหมุดเท่ากับท่อฝังพอดี (ดูรูป 1.1 (d)) นำเอาทั้งชุดนี้เก็บไว้ใน 70% เอธิลอัลกอฮอล์ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลอง

6. การเตรียมเข็มท่อเหล็กสเตนเลสสำหรับใช้ฉีดฮอร์โมนเข้าช่องว่างภายในสมอง

ใช้ท่อเหล็กขนาดเดียวกับที่ทำเข็มหมุด ตัดเป็นท่อน ๆ ยาวท่อนละ 3 เซ็นติเมตร ฝนปลายทั้งสองข้างออกเช่นเดียวกับท่อสำหรับฝัง บัดกรีตรงกลางของท่อ ให้ปลายข้างหนึ่งยาวเท่ากับความยาวของท่อสำหรับใช้ในการฝังลงบนสมอง (ดูรูป 1.1 (a))

7. การฝังท่อเหล็กสเตนเลสลงในช่องว่างภายในสมอง

เอาท่อเหล็กสำหรับฝัง (เอาเข็มหมุดที่สอดเอาไว้ออกก่อน) สอดเข้าไปในที่สำหรับจับท่อเหล็กที่จะฝังของเครื่อง Stereotaxic หมุนเกลียวให้ท่อติดกับเครื่องให้แน่น ปรับปลายของท่อเหล็กให้ชิดกับปลายของ ear bar ทางด้านซ้าย ซึ่งติดแน่นอยู่กับที่ จดระยะบนสเกลของเครื่อง ทั้งทางด้านที่สำหรับหมุนไปซ้าย-ขวา และด้านที่สำหรับหมุนสเกลไปทางหน้า-หลัง จดเอาไว้ คิดเป็นจุด 0, 0 เลื่อนท่อเหล็กให้ออกห่างจาก ear bar เพื่อสะดวกในการที่จะนำเอาสัตว์ทดลองมาวางบนเครื่อง

นำแฮมสเตอร์มาทำให้สลบ โดยให้ดมอีเธอร์ แล้วใช้กรรไกรปลายแหลมตัดหูชั้นนอกตรงส่วนที่ติดกับลำตัวออกจากกันเล็กน้อย เพื่อให้เห็นรูหูชั้นนอกได้ชัด ใช้ ear clips สอดเข้าไปในช่องรูหูชั้นนอกนี้ทั้งสองข้าง แล้วนำสัตว์เข้าเครื่อง Stereotaxic โดยให้นอนคว่ำ โดยที่ช่องของ ear clips ติดกับ ear bars ของเครื่อง

Stereotaxic ทั้งสองข้าง ส่วนฟันหน้าซี่บนวางอยู่บน Palate bar ของเครื่องซึ่งจะอยู่เหนือ interaural line 5 มิลลิเมตร ใส่ nose clamp บนจมูกของแฮมสเตอร์ เพื่อป้องกันไม่ให้ส่วนหัวเคลื่อนเวลาสัตว์ทดลองดิ้น ใช้สำลีชุบอีเธอร์ให้คมตลอดเวลาที่ทำ ตัดขนบริเวณหัวส่วนบนออก ใช้สำลีชุบน้ำยาเดททอลฆ่าเชื้อโรคบริเวณนี้ก่อนจึงใช้กรรไกรตัดหนังตรงกลางศีรษะ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้คลิบเล็ก ๆ หนีบหนังมาไว้ด้านข้าง ใช้เข็มปลายโค้งเขี่ยฟังผืดบนกระโหลกออกให้หมด ปรับปลายท่อเหล็กให้ตรงกับตำแหน่ง 0,0 ที่จดเอาไว้ จากจุดนี้ ปรับสเกลของเครื่องทางด้านที่เลื่อนไปซ้าย หรือขวา ให้ปลายของท่อเหล็กตรงกับแนวกลางของลำตัว จากจุดนี้เลื่อนไปทางด้านหน้า 3.8 มิลลิเมตร และจากจุด 3.8 นี้เลื่อนสเกลไปทางซ้าย หรือขวาข้างใดก็ได้ (แต่ในการทดลองนี้ ใช้เลื่อนไปทางขวาทุกตัว) เป็นระยะ 1.5 มิลลิเมตร ใช้ดินสอดำจุดตำแหน่งนี้ไว้เป็นจุด T และให้จุดอีกจุดหนึ่งตรงบริเวณที่ห่างจากจุด T สักเล็กน้อย เป็นจุด S (ดูรูป 1.3) ใช้สว่านไฟฟ้าสำหรับเจาะกระโหลก กรอกระโหลกที่จุด S ให้ลึกพอประมาณ สำหรับขันสกรูยึดท่อเหล็ก แล้วจึงเจาะจุด T ให้ทะลุ ขันสกรูตรงจุด S และฝังท่อเหล็กลงไปที่จุด T ให้ลึกจากส่วนของเยื่อหุ้มสมอง 1.9 มิลลิเมตร ใช้สำลีแตะผงเททราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ทาบริเวณกระโหลก รอบ ๆ ท่อเหล็กที่ฝังเพื่อกันเชื้อโรค จากนั้นละลาย Dentex cement ให้เหลวพอเหมาะยาลงบนกระโหลก โดยพยายามปิดแปลให้หมด เมื่อ Dentex cement แข็งตัวก็จะยึดท่อเหล็กให้ติดกับสกรูบนกระโหลก จากนั้นจึงสอดท่อเหล็กเข็มหมุดลงไปในท่อที่ฝังอยู่เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเลี้ยงสมอง (CSF) ไหลออกมา (ดูรูปที่ 1.4)

8. <u>การผ่าตัดเอารังไข่ออก 1 ข้าง</u>

นำแฮมสเตอร์ที่ฝังท่อเหล็กสเตนเลสลงในสมองเรียบร้อยแล้ว มาทำให้สลบด้วยอีเธอร์ ใช้กรรไกรตัดขนบริเวณสีข้างตรงบริเวณซี่โครงชิ้นสุดท้ายกับกระดูกสันหลังทางด้านขวาออก ใช้สำลีชุบน้ำยาเดททอลเช็ดฆ่าเชื้อบริเวณนี้ จะเห็นส่วนของผนังท้อง

นูนออกมาต่างจากบริเวณอื่น ๆ ใช้กรรไกรขลิบหนังบริเวณนี้ให้ขาดออกจากกัน แผลยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วตัดชั้นกล้ามเนื้อซึ่งอยู่ลึกลงไป โดยใช้ฟอร์เซ็บปลายโค้งช่วยใช้สำลีเช็ดเลือดบริเวณปากแผลให้สะอาด เช็ดด้วยเดททอลเพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้ง แล้วจึงใช้ฟอร์เซ็บดึงเอาส่วนของไขมันที่ติดกับรังไข่ออกมาข้างนอก ตัดเอาเฉพาะส่วนของรังไข่ออกมาชั่งน้ำหนัก จดเอาไว้ เช็ดบริเวณแผลด้วยน้ำยาเดททอลอีกครั้ง แล้วดันส่วนที่ดึงออกมานี้กลับเข้าไปในช่องท้อง เย็บแผลชั้นกล้ามเนื้อให้ติดกันก่อน แล้วจึงเย็บชั้นของผิวหนังให้ติดกันอีกครั้งหนึ่ง

9. <u>การเตรียมเข็มสำหรับฉีดฮอร์โมนเข้าไปในช่องว่างภายในสมอง</u>

ใช้ไมโครไซริงจ์ขนาด 10 ไมโครลิตร ดูดฮอร์โมนที่ละลายเตรียมไว้แล้วฉีดเข้าไปในท่อโปลีเอธิลีน ซึ่งตัดยาวประมาณ 10 เซนติเมตร และที่ปลายอีกข้างหนึ่งมีเข็มหมุดสำหรับฉีดยาเสียบไว้แล้วให้เต็มเสียก่อน ถอดไมโครไซริงจ์ออกมาดูดฮอร์โมนให้เต็มอีกครั้ง แล้วจึงนำไปต่อกับท่อโปลีเอธิลีน จากนั้นจึงนำไปฉีดให้แก่สัตว์ทดลอง (ดูรูป 1.2)

10. <u>การฉีดฮอร์โมนเข้าช่องว่างภายในสมอง</u>

ถอดหมุดออกจากท่อบนกระโหลกของสัตว์ทดลองออก แล้วใช้ปลายท่อเหล็กสำหรับฉีดที่เตรียมเอาไว้สอดเข้าไปในท่อบนกระโหลกให้สุดถึงตะกั่วที่ตรึงเอาไว้ ซึ่งความยาวที่สอดเข้าไปจะเท่ากับความยาวของท่อเหล็กที่ฝังอยู่พอดี จากนั้นค่อย ๆ ปล่อยน้ำยาลงไป กินเวลาประมาณ 1 นาที ต่อน้ำยา 5 ไมโครลิตร เมื่อฉีดเสร็จแล้วเอาหมุดสอดเอาไว้เช่นเดิม เมื่อจะฉีดครั้งต่อ ๆ ไป ก็นำเอาหมุดออกเสียก่อน แล้วจึงฉีดแบบเดียวกัน

11. การฆ่าสัตว์ทดลอง

การฆ่าสัตว์ทดลอง ใช้วิธีดมด้วยอีเธอร์ แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตัดส่วนของท่อนำไข่บริเวณที่พองบวมน้ำออกมาใส่ในสไลด์หลุมที่มีน้ำเกลือ 0.85% ใส่ไว้แล้ว เพื่อนำไปนับจำนวนไข่ด้วยกล้อง Stereomicroscope ตัดส่วนของรังไข่ไปชั่งแล้วจดน้ำหนักเอาไว้ นำรังไข่ไป Fixed ด้วย Bouin เก็บเอาไว้เพื่อทำ Paraffin section เพื่อนับจำนวนคอร์ฟัส ลูเตียม ในตัวที่มีการตกไข่จำนวนน้อย เพื่อเป็นการยืนยันว่าการนับจำนวนไข่จากท่อนำไข่ไม่ผิดพลาด ใช้กิลโลตินตัดหัวของแฮมสเตอร์ออกมา แล้วแกะเอาเฉพาะส่วนของสมองมาดองในน้ำยาฟอร์มาลิน 10% เก็บไว้ทำ Frozen section เพื่อดูตำแหน่งที่ฝังท่อเหล็กลงไปว่า ตรงกับตำแหน่งช่องว่างในสมองหรือไม่ ถ้าตรงจึงเก็บรวมไว้ในการทดลอง (ดูรูป 1.5 และ 1.6)

12. การหา และนับจำนวนไข่จากท่อรังไข่

นำส่วนของท่อรังไข่ที่ตัดใส่ไว้ในสไลด์หลุม มาส่องดูด้วยกล้อง Stereomicroscope กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อดูบริเวณต่าง ๆ ในท่อรังไข่ที่มีไข่อยู่ แล้วใช้เข็มเขี่ยบริเวณนั้นให้ฉีกออก จะมีเมือกเหนียว ๆ พุ่งออกมา ซึ่งจะมีไข่ติดอยู่ แล้วนับจำนวนไข่ทั้งหมดที่ตกออกมา

13. การทำ Paraffin section ของรังไข่

13.1 Fixative

ใช้ Bouin's Fluid ซึ่งประกอบด้วย

Picric acid (สารละลายอิ่มตัว)	75 มิลลิลิตร
Formaldehyde (40%)	25 มิลลิลิตร
เกรเซียล อซีติค แอซิค	5 มิลลิลิตร

ผสมรวมกัน

13.2 สีที่ใช้ย้อม

13.2.1 Ehrlich's acid haematoxylin

Haematoxylin	8	กรัม
เอธิลอัลกอฮอล์ (หรือ absolute alcohol)	400	กรัม
โปรแตส อลัม	8	กรัม
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร
กลีเซอรีน	400	มิลลิลิตร
เกรเซียล อซีติค แอซิค	40	มิลลิลิตร

- ละลาย Hematoxylin ใน95 % เอธิลอัลกอฮอล์ อุ่นบน Water Bath จนละลายเข้าด้วยกัน
- ละลาย โปรแตส อลัม ในน้ำกลั่น
- นำสารละลายของ Hematoxylin และโปรแตส อลัม มาผสมกัน แล้วเติมกลีเซอรีน และเกรเซียล อซีติค แอซิค คนให้เข้ากัน ใส่ขวดอุดด้วยสำลีอย่างหลวม ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้ถูกแดดประมาณ 6 อาทิตย์

13.2.2 อีโอซิน (Eosin in alcohol)

Eosin y	0.5	กรัม
เอธิลอัลกอฮอล์	100	มิลลิกรัม

ผสมรวมกัน

13.3 การทำสไลด์

นำรังไข่ที่ตัดเอาเนื้อเยื่อไขมันรอบ ๆ ออกแล้ว มาใส่ในสารละลาย Bouin ประมาณ 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 70 % เอธิลอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง แล้วแช่ใน 70 % อัลกอฮอล์ 24 ชั่วโมง เพื่อล้าง picric acid ออก จากนั้นนำไปดูดน้ำ ออกใน

000524

90 % เอธิลอัลกอฮอล์ 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น 95 % เอธิลอัลกอฮอล์ ทิ้งไว้ข้ามคืน (โดยเปลี่ยน 2ครั้ง) แล้วนำไปดูดน้ำออก ต่อในบิวทิลอัลกอฮอล์ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในไซรอล 1 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อใส ต่อจากนั้นนำไปแช่ในส่วนผสมของไซรอลและพาราพลาสอย่างละเท่า ๆ กัน ในตู้อบ ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซนติเกรด เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนพาราพลาส 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง ทำในตู้อบเช่นกัน แล้วนำมา Embed ในพาราพลาส หลังจากทิ้งไว้ให้แข็งดีแล้ว นำมาตัด section หนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ด้วย egg albumin โดยจะติดเฉพาะทุก ๆ section ที่ 6 จนหมด แล้วจึงนำไปย้อมสี Ehrlich's acid hematoxylin และอีโอซิน

14. การทำ Frozen section ของสมอง

14.1 Fixative

ใช้น้ำยาฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 10 %

ฟอร์มาดีไฮด์	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ผสมรวมกัน

14.2 สารละลายที่ใช้สำหรับติด section กับสไลด์

ใช้ Albrecht's alcoholic gelatin (Albrecht,1954)

เจลาติน	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	120	มิลลิลิตร
absolute alcohol	80	มิลลิลิตร

ตั้งน้ำกลั่นบน Water bath ที่มีอุณหภูมิ 50-55 องศาเซนติเกรด ค่อย ๆ โรยผงเจลาตินลงไป คนให้เข้ากันประมาณ 10 นาที แล้วจึงเติม absolute alcohol ลงไปอย่างช้า ๆ คนให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

14.3 สีที่ใช้ย้อม

ใช้ 0.5 % Cresyl violet

Cresyl violet	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
เกรเซียล อซีติค แอซิค (dilule 1:10)	4	หยด

ละลายผง Cresyl violet กับน้ำกลั่น นำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงเติมเกรเซียล อซีติค แอซิค

14.4 การตัด และติด section บนสไลด์

เอาส่วนของสมองที่ต้องการตัด section ซึ่ง Fixed ไว้ในน้ำยาฟอร์มาลิน 10% มาติดบนแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง Cryostat , I.E.G. โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยา Cryoform แล้วทำให้เย็นจัด โดยใส่ในเครื่อง Cryostat ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซนติเกรดทันที ทิ้งไว้ในเครื่องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อแข็งและเย็นจัดทั่วกันหมด แล้วจึงตัด section หนา 24 ไมครอน ตัดแล้วนำแต่ละ section ไปใส่ใน Albrecht's alcoholic gelatin อย่างน้อย 5 นาที แล้วใช้ฝูกันขนอ่อนช้อนขึ้นมาวางบนสไลด์ ปล่อยให้ระเหยจนเกือบแห้ง ใช้กระดาษซับช่วยซับ เมื่อแห้งดีแล้วนำทั้งสไลด์แช่ใน 95% เอธิลอัลกอฮอล์ section จึงติดแน่นกับสไลด์ด้วยเจลาตินที่เหลืออยู่ หลังจากนั้นนำไป hydrate ต่อจนถึงน้ำ แล้วจึงนำไปย้อมสี Cresyl Violet

14.5 การย้อมสี Cresyl Violet (Fernstrom, 1958)

นำ section ที่ติดอยู่บนสไลด์แช่ใน 0.5 % Cresyl Violet (3-10 นาที) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นใส่ใน 70% เอธิลอัลกอฮอล์ เพื่อให้สีหลุดออกจากเนื้อเยื่อไปบ้าง แล้วผ่าน 95% เอธิลอัลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว จากนั้นแช่ในคลอโรฟอม อย่างน้อย 20 นาที differentiate ใน 95 % เอธิลอัลกอฮอล์ จนได้สีที่ต้องการ dehydrate ในบิวทิลอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง ทำให้เนื้อเยื่อใสในไซรอล แล้ว mount ด้วย Canada balsm

15. การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะนำมาคิดหาค่าความแตกต่างในทางสถิติ โดยใช้วิธีทดสอบที่แตกต่างกัน 2วิธีคือ

15.1 Unpaired t-test ใช้หาความแตกต่างของข้อมูลที่มีกลุ่มเปรียบเทียบกันเพียง 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มที่ทำการทดลองอีก 1 กลุ่ม ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองที่ 1 ในกลุ่ม 1.1, 1.2 และ 1.3

15.2 Analysis of variance and LSD ใช้หาความแตกต่างของข้อมูลที่มีกลุ่มเปรียบเทียบกันตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งจะนำมาใช้วิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของกลุ่มการทดลองในกลุ่ม 1.4 ของการทดลองที่ 1 และในกลุ่ม 2.1 และ 2.2 ของการทดลองที่ 2

แผนภาพที่ 1

รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะของท่อเหล็กสเตนเลสขนาดเล็กที่เตรียมไว้สำหรับใช้ในการฝัง และการฉีดสารเข้าไปในช่องว่างภายในสมองของสัตว์ทดลอง

a. เป็นเข็มหมุดที่ใช้สำหรับฉีดสารเข้าไปในช่องว่างภายในสมอง

b. เป็นเข็มหมุดท่อเหล็กที่ใช้สำหรับอุดท่อเหล็กสเตนเลสที่ฝังอยู่ในสมอง

c. เป็นท่อเหล็กสเตนเลสที่ใช้ฝังในสมอง

d. แสดง b และ c ขณะที่ฝังในสมอง

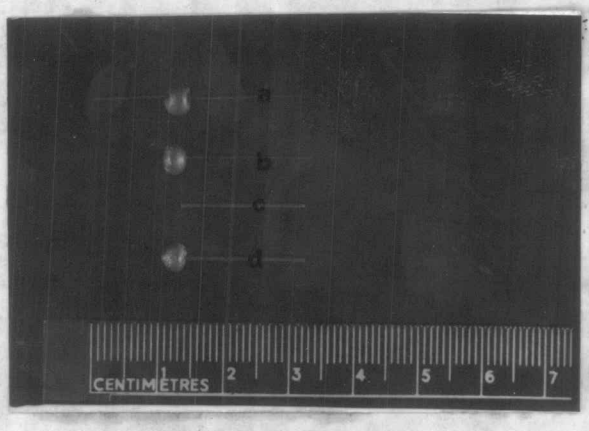
รูปที่ 1.2 แสดงภาพของไมโครไซริงจ์ (บน) และท่อโปลีเอธีลีน (ล่าง) ที่มีเข็มหมุดสำหรับฉีดยา (a) เสียบติดอยู่

รูปที่ 1.3 แสดงภาพของแฮมสเตอร์ในขณะที่อยู่บนเครื่อง Stereotoxic เปิดหนังบริเวณหัวส่วนบนออก พร้อมทั้งจุดตำแหน่งที่จะฝังท่อเหล็ก (T) ซึ่งเป็นจุดที่ห่างจาก interaural line ไปทางด้านหน้า 3.8 มิลลิเมตร และห่างจากแนวกลางหัวไปทางข้างขวา 1.5 มิลลิเมตร เป็นจุดที่ตรงกับตำแหน่งแลเทอรัลเวนตริเคิลพอดีและตำแหน่งที่จะขันสกรู (S) ซึ่งห่างจากจุด T เล็กน้อย

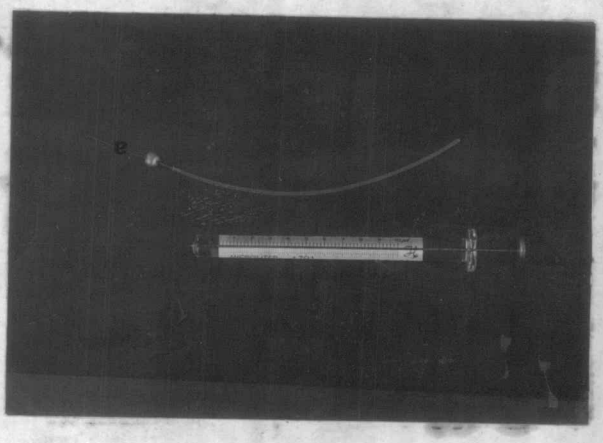
รูปที่ 1.4 แสดงภาพของแฮมสเตอร์หลังจากที่ฝังท่อเหล็ก สกรู พร้อมทั้งยาด้วย Dentex cement (D) และสอดท่อเหล็กเข็มหมุด (P) ลงในท่อที่ฝังเอาไว้เรียบร้อยแล้ว

รูปที่ 1.5 แสดงลักษณะของสมองที่แกะดองเอาไว้ จะเห็นรู (H) ที่ฝังท่อเหล็กลงไปอย่างชัดเจน

รูปที่ 1.6 แสดงภาพของ section ของสมองที่ตัดผ่านรูที่ฝังท่อเอาไว้ (ตัดตามขวางในแนวลูกศรของรูป 1.4) ซึ่งจะตรงกับตำแหน่งช่องว่างภายในสมองพอดี (L.V.)

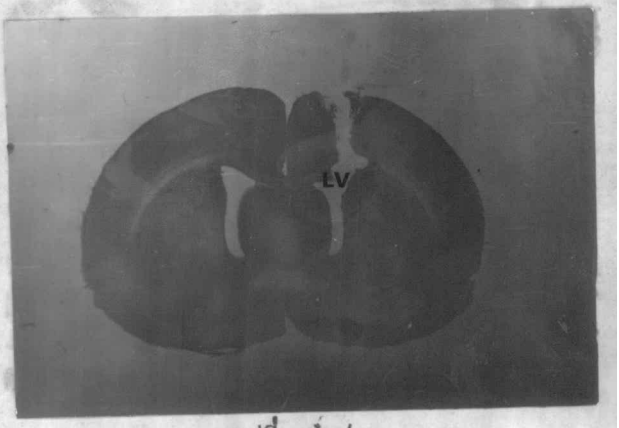


รูปที่ 1.1

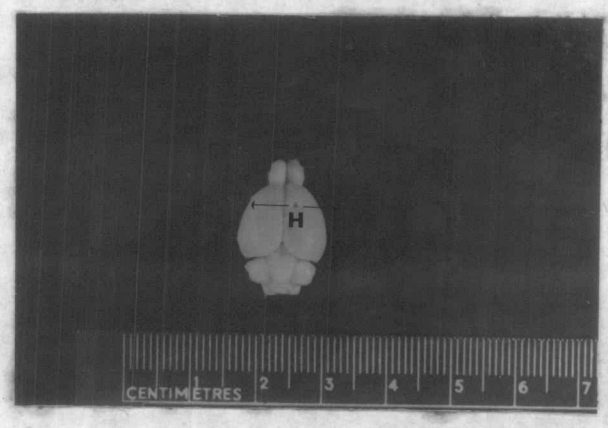


รูปที่ 1.2

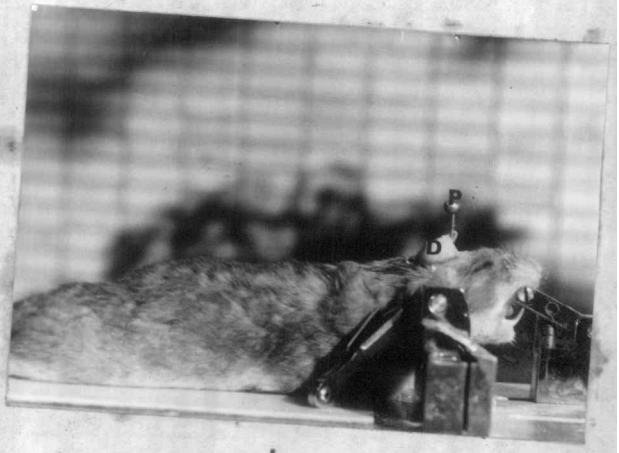
รูปที่ 1.3



รูปที่ 1.4



รูปที่ 1.5



รูปที่ 1.6

16. การทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ ใช้แฮมสเตอร์สีทองเพศเมียจำนวน 254 ตัว โดยฉีดตัวละลายฮอร์โมน vehecle = 95 % เอธิลอัลกอฮอล์ +0.85 % NaCl อัตราส่วน 1:9) เมลาโตนิน 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล หรือ 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล เข้าทางช่องว่างภายในสมองส่วนแลเทอรัล เวนตริเคิล (lateral ventricle) โดยผ่านทางท่อเหล็กสเตนเลสขนาดเล็กที่ฝังลงในสมองในตำแหน่งนี้ โดยอาศัยเครื่องStereotaxic เตรียมไว้ก่อนแล้ว 1 วัน และในกลุ่มที่ฉีด FSHร่วมด้วย ได้ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังหลังจากฉีดสารดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว นำสัตว์ไปเลี้ยงในห้องทดลองเช่นเดิม พร้อมทั้งตรวจดู postestrous discharge ในวงสืบพันธุ์ที่จะถึง ซึ่งจะเป็นวันที่มีไข่ตกอยู่ในท่อรังไข่ ฆ่าสัตว์ทดลองในวันนี้ นับจำนวนไข่จากท่อรังไข่ตัดเอาเฉพาะรังไข่ไปชั่ง และจดน้ำหนักเอาไว้ เก็บรังไข่เอาไว้โดยการ fix ด้วย Bouin's fluid . เพื่อนำมาศึกษาทางฮีสโตโลยี่ ตรวจดูจำนวนคอร์พัส ลูเตียมในสัตว์ทดลองที่มีการตกไข่จำนวนน้อย เพื่อเป็นการยืนยันว่าการนับจำนวนไข่จากท่อรังไข่ไม่ผิดพลาด ตัดเอาส่วนหัวมาแกะเอาเฉพาะส่วนของสมองมาดองเอาไว้ในน้ำยาฟอร์มาลิน 10% นานไม่น้อยกว่า 5 วัน เพื่อให้เนื้อเยื่อแข็งพอที่จะมาทำ frozen section ตรวจดูตำแหน่งที่ฝังท่อเหล็กสเตนเลสว่าตรงกับตำแหน่งแลเทอรัล เวนตริเคิลหรือไม่ สัตว์ที่ฝังปลายท่อเหล็กอยู่ในตำแหน่งของแลเทอรัล เวนตริเคิลเท่านั้น จึงจะรวมอยู่ในกลุ่มที่ใช้ทดลองศึกษา การทดลองแบ่งออกเป็นสองเรื่องใหญ่ คือ

1. ผลของการปรากฏของฮอร์โมนจากต่อมไพเนียลในน้ำเลี้ยงสมองในช่วงต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ที่มีต่อการควบคุมการตกไข่

เพื่อศึกษาผลของเมลาโตนิน 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล และ 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล ที่ฉีดเข้าทางช่องว่างภายในสมองของแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย ในแต่ละวันของวงอีสตรัส เพื่อที่จะดูว่าวันใดของวงอีสตรัสที่เมลาโตนินจะสามารถมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไข่ที่ตกได้มากน้อยเพียงใดโดยแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดสารให้แก่สัตว์ทดลองในวันโปรอีสตรัส (D_1) ตัวละ 3 ครั้ง ในเวลา 08.00 น.,12.00 น. และ 16.00 น.

ก. ฉีดตัวละลายฮอร์โมนครั้งละ 5 ไมโครลิตร เป็นกลุ่มควบคุม ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

ข. ฉีดสารละลายเมลาโตนินในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารให้แก่สัตว์ทดลองในวันอีสตรัส (D_2) ตัวละ 3 ครั้ง ในเวลา 08.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น.

ก. ฉีดตัวละลายฮอร์โมนครั้งละ 5 ไมโครลิตร เป็นกลุ่มควบคุม ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

ข. ฉีดสารละลายเมลาโตนินในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

กลุ่มที่ 3 ฉีดสารให้แก่สัตว์ทดลองในวันเมตาอีสตรัส (D_3) ตัวละ 3 ครั้ง ในเวลา 08.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น.

ก. ฉีดตัวละลายฮอร์โมน ครั้งละ 5 ไมโครลิตร เป็นกลุ่มควบคุม ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

ข. ฉีดสารละลายเมลาโตนิน ในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

<u>กลุ่มที่ 4</u> ฉีดสารให้แก่สัตว์ทดลองในวันไดอีสตรัส (D_4) ตัวละ 3 ครั้ง ในเวลา 08.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น.

ก. เป็นกลุ่มควบคุม ใช้แฮมสเตอร์ 16 ตัว โดยฉีดตัวละลายฮอร์โมนในขนาดดังนี้

(1) 5 µl x 3 ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

(2) 10 µl x 3 ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

ข. (1) ฉีดสารละลายเมลาโตนิน ในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

(2) ฉีดสารละลายเมลาโตนิน ในขนาดครั้งละ 100 µg/10 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

ค. (1) ฉีดสารละลาย 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล ในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

(2) ฉีดสารละลาย 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล ในขนาดครั้งละ 100 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว

ง. (1) ฉีดสารละลาย 5- มีธอกซีทริฟโตฟอล ในขนาดครั้งละ 30 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

(2) ฉีดสารละลาย 5- มีธอกซีทริฟโตฟอล ในขนาดครั้งละ 50 µg/5 µl ใช้แฮมสเตอร์ 11 ตัว

(3) ฉีดสารละลาย 5- มีธอกซีทริฟโตฟอล ในขนาดครั้งละ 100 µg/10 µl ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

2. ศึกษาผลของการปรากฏของฮอร์โมนจากต่อมไพเนียล ที่มีต่อการตกไข่ชดเชยในแฮมสเตอร์ที่ตัดรังไข่ออก 1 ข้าง

2.1 ตัดรังไข่ออก 1ข้าง ในเวลา 16.00น. ของวันไดอีสตรัส (D_4)

ก. เป็นกลุ่มควบคุม โดยฉีดตัวละลายของฮอร์โมนหลังทำการผ่าตัด ใช้แฮมสเตอร์ 24 ตัว โดยฉีดให้ในขนาดดังนี้

(1) 5 µl x 2 (16.00 น. และ 20.00 น.ของ D_4 ใช้แฮมสเตอร์ 12 ตัว

(2) 5 µl x 5 (16.00 น., 20.00 น. ของ D_4 และ 08.00 น., 12.00 น., 16.00 น. ของ D_1) ใช้แฮมสเตอร์ 12 ตัว

ข. (1) ฉีดสารละลายเมลาโตนินในขนาด 30 µg/5µl x 2 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

(2) ฉีดสารละลายเมลาโตนินในขนาด 30 µg/5µl x 5 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

ค. ฉีดสารละลาย 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอลในขนาด 30 µg/5µl x 5 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

ง. (1) ฉีดสารละลาย 5-มีธอกซีทริฟโตฟอลในขนาด 30 µg/5µl x 2 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

(2) ฉีดสารละลาย 5-มีธอกซีทริฟโตฟอลในขนาด 30 µg/5µl x 2 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

2.2 ตัดรังไข่ออก 1 ข้างในเวลา 01.00 น. ของวันโปรอีสตรัส (D_1)

ก. เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดตัวละลายฮอร์โมนหลังจากทำการผ่าตัดในขนาด 5 µl x 5 (01.00 น., 04.00 น., 08.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น. ของวันโปรอีสตรัส) ใช้แฮมสเตอร์ 14 ตัว

ข. เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดตัวละลายฮอร์โมนหลังจากทำการผ่าตัดในขนาด 5 µl x 5 และฉีด FSH ในขนาด 10 µg/0.1 ml x 2 (01.00 น. และ 08.00 น. ของวันโปรอีสตรัส) ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

ค. ฉีดสารละลายเมลาโตนินในขนาด 30 µg/5 µl x 5 ใช้แฮมสเตอร์ 14 ตัว

ง. ฉีดสารละลาย 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล ในขนาด 30 µg/5 µl x 5 ใช้แฮมสเตอร์ 14 ตัว

จ. ฉีดสารละลาย 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล ในขนาด 30 µg/5 µl x 5 ใช้แฮมสเตอร์ 14 ตัว

ฉ. ฉีดสารละลาย 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล ในขนาด 30 µg/5 µl x 5 และฉีด FSH ในขนาด 10 µg/0.1 ml x 2 ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว

ตารางที่ 1

ผลการทดลอง ผลของการฉีดฮอร์โมนจากต่อมไพเนียลเข้าในช่องของสมองส่วนแลเทอรัล เวนตริเคิล ที่มีต่อการตกไข่ในสัตว์ปกติ และการตกไข่ชดเชยในสัตว์ที่ถูกตัดรังไข่ข้างขวา

กลุ่มสัตว์ทดลอง	จำนวนสัตว์ทดลอง	น้ำหนักรังไข่ มก. ค่าเฉลี่ย ± S.E	การตกไข่ในวัน Postestrous discharge							
			จำนวนสัตว์ที่ไม่ตกไข่ (%)		จำนวนสัตว์ที่ตกไข่ ≤ 6 (%)		จำนวนสัตว์ที่ตกไข่ ≥ 7 (%)		จำนวนไข่ตก ค่าเฉลี่ย ± S.E	(พิสั
1. กลุ่มสัตว์ทดลองที่ไม่ตัดรังไข่ แบ่งฉีด 3 ครั้ง									ซ้าย + ขวา	
1.1 ฉีดในวันโปรอีสตรัส (D_1)										
ก. ละลายฮอร์โมน	8	25.95 ± 1.16	0	(0.0)	0	(0.0	8	(100)	10.50 ± 0.64	(8-13)
ข. เมลาโตนิน 90 µg.	8	25.91 ± 1.32	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	8.88 ± 0.41	(7-10)
1.2 ฉีดในวันอีสตรัส (D_2)										
ก. ตัวละลายฮอร์โมน	8	23.15 ± 1.08	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	10.12 ± 0.54	(8-12)
ข. เมลาโตนิน 90 µg.	8	26.95 ± 0.74	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	10.00 ± 0.43	(9-12)
1.3 ฉีดในวันเมตาอีสตรัส (D_3)										
ก. ตัวละลายฮอร์โมน	8	28.26 ± 1.16	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	11.38 ± 0.35	(10-13
ข. เมลาโตนิน 90 µg.	8	28.40 ± 0.98	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	11.20 ± 0.40	(9-13)
1.4 ฉีดในวันไดอีสตรัส (D_4)										
ก. ตัวละลายฮอร์โมน	16	27.13 ± 0.85	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	10.12 ± 0.32	(7-12)
ข. เมลาโตนิน i) 90 µg.	8	26.58 ± 0.55	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	8.88 ± 0.41	(7-11)
ii) 300 µg.	8	23.24 ± 0.16**	1	(12.5)	1	(12.5)	6	(75.0)	7.00 ± 1.23	(0-11)
ค. 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล										
i) 90 µg.	8	29.38 ± 1.04	0	(0.0)	0	(0.0)	8	(100)	8.63 ± 0.53	(8-12)
ii) 300 µg.	7	23.90 ± 0.52**	1	(14.3)	3	(42.9)	3	(42.9)	6.14 ± 0.55	(0-8)*
ง. 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล										
i) 90 µg.	8	25.70 ± 1.31	0	(0.0)	1	(12.5)	7	(77.5)	8.12 ± 0.82	(6-11)
ii) 150 µg.	11	24.98 ± 0.67	2	(18.2)	1	(10.0)	8	(62.6)	6.73 ± 0.99	(0-9)*
iii) 300 µg.	8	25.81 ± 1.26	2	(25.0)	3	(37.5)	3	(37.5)	4.88 ± 1.00	(0-7)*
2. กลุ่มสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่ข้างขวา		น้ำหนักรังไข่ข้างที่เหลือ							ซ้าย	
2.1 ตัดรังไข่ 16.00 น. ในวันไดอีสตรัส แบ่งฉีด 2-5 ครั้ง										
ก. ตัวละลายฮอร์โมน	24	14.07 ± 0.40	4	(16.7)	5	(20.8)	15	(62.5)	6.82 ± 0.78	(10-12
ข. เมลาโตนิน i) 60 µg.	10	15.50 ± 0.42	1	(10.0)	3	(30.0)	6	(60.0)	6.20 ± 0.85	(0-9)
ii) 150 µg.	10	13.52 ± 0.47	1	(10.0)	1	(10.0)	8	(80.0)	7.00 ± 0.97	(0-11)
ค. 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล 150 µg.	10	14.50 ± 0.57	2	(20.0)	2	(20.0)	6	(60.0)	7.00 ± 1.47	(0-13)
ง. 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล										
i) 60 µg.	10	13.88 ± 0.80	0	(0.0)	3	(30.0)	7	(70.0)	8.10 ± 0.79	(4-12)
ii) 150 µg.	10	13.52 ± 0.47	0	(0.0)	0	(0.0)	10	(100)	8.60 ± 0.45	(7-11)
2.2 ตัดรังไข่ 01.00 น. ในวันโปรอีสตรัส แบ่งฉีด 5 ครั้ง										
ก. ตัวละลายฮอร์โมน	14	13.66 ± 0.53	0	(0.0)	3	(21.4)	11	(78.5)	7.36 ± 0.50	(3-10)
ข. ตัวละลายฮอร์โมนและ FSH 20 µg.	10	(12.36 ± 0.93)[1] 13.90 ± 0.81	0	(0.0)	1	(10.0)	9	(90.0)	8.10 ± 0.41	(6-10)
ค. เมลาโตนิน 150 µg.	14	15.34 ± 0.60	1	(7.1)	11	(78.6)	2	(14.3)	5.50 ± 0.63	(0-10)*
ง. 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล 150 µg.	14	15.26 ± 0.38	3	(21.4)	4	(29.6)	7	(49.0)	5.00 ± 0.91	(0-10)*
จ. 5-มีธอกซีทริฟโตฟอล 150 µg.	14	14.01 ± 0.36	1	(7.1)	6	(42.9)	7	(50.0)	5.57 ± 0.68	(0-9)*
ฉ. 5-ไฮดรอกซีทริฟโตฟอล 150 µg. และ FSH 20 µg.	10	(13.15 ± 0.76)[1] 12.41 ± 0.43	3	(30.0)	4	(40.0)	3	(30.0)	3.30 ± 1.02	(0.9)**

หมายเหตุ

1 น้ำหนักของรังไข่ข้างขวา

a แตกต่างจากกลุ่มที่ฉีดให้ 90 µg. ($P < 0.05$)

* แตกต่างกับกลุ่มที่ฉีดตัวละลายฮอร์โมน ($P < 0.05$)

** แตกต่างกับกลุ่มที่ฉีดตัวละลายฮอร์โมน ($P < 0.01$)