

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร (mice) พันธุ์ Swiss Albino จากโครงการสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่

- เพศผู้ น้ำหนัก 25 - 30 กรัม และ 30 - 35 กรัม
- เพศเมีย น้ำหนัก 22 - 30 กรัม อายุ 6 และ 8 สัปดาห์

1.2 เคมีภัณฑ์และแหล่งที่มา

- Thinner 100 % ตราปลาฉลามน้ำ จาก หจก. ต.แสงเจริญเทรดดิ้ง ประเทศไทย
- Toluene AR จาก May & Baker LTD. Dagenham, England.
- Alcohol 95% จาก บริษัทเคมีเอสจำกัด, ประเทศไทย
- Absolute Alcohol AR จาก E. Merck, darmstadt, F.R.Germany
- Acetone AR จาก Fluka, Garantie.
- Glycerine AR จาก BHD Limited, Poole, England
- Propylene Glycol GPR จาก BDH Limited, poole, England.
- Acetic acid Solution จาก Mallinckrodt Inc., St. louis, Missouri, U.S.A.
- Formaldehyde Solution GPR จาก BDH Limited, Poole, England.
- Potassium Hydroxide จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.
- Alizarin red จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.
- Alcian blue 8GX จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.

1.3 เครื่องมือ

- ไมโครสโคป ของบริษัทเมจิ ซึ่งมีกำลังขยายสูงสุดเท่ากับ 80 เท่า
- เครื่องชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองซาร์โทเรียล (Sartorius)
- กล้องดำและกล้องขาว สำหรับทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้ และความสามารถในการจดจำ มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 30x30x30 ซม. สีดำหนึ่งกล่อง และสีขาวหนึ่งกล่อง ระหว่างกล้องดำและกล้องขาวมีทางเดินขนาด 8x30x20 ซม. ภายในกล่องดำจะบุด้วยกระดาษสีดำทั้ง 4 ด้าน ส่วนพื้นล่างของกล่อง จะมีเส้นลวดซึ่งตลอดโดยแต่ละเส้นห่างกัน 1 ซม. ซึ่งต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้าขนาด 1.25 mA., 60 Hz. ac ส่วนภายในกล่องขาวบุด้วยกระดาษสีขาว 3 ด้าน ด้านบนเปิดโล่ง

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ทดลองหาค่าแอลดี 50 ซึ่งเป็นขนาดความเข้มข้นของกินเนอร์และโทลูอินที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 (LD50) ในหนูถีบจักร (Litchfield and Wilcoxon, 1949)

2.1.1 แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ใช้เป็นกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม ในกลุ่มทดลองให้กินเนอร์โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.040, 0.082, 0.124, 0.165, 0.250 มล./กก.น.ตัว กลุ่มควบคุมฉีดด้วยตัวทำละลายคือ โพรพิลีนไกลคอลปริมาตร 0.1 มล. คุ่อตราการตายของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มภายในหนึ่งสัปดาห์ แล้วนำผลที่ได้มาแสดงในรูปกราฟเพื่อนำไปหาค่าแอลดี 50 โดยวิธีลิทฟิลด์และวิลโคซัน (Litchfield and Wilcoxon test)

2.1.2 แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ใช้เป็นกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม ในกลุ่มทดลองให้โทลูอินโดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.012, 0.029, 0.058, 0.087, 0.115 มล./กก.น.ตัว กลุ่มควบคุมฉีดด้วยโพรพิลีนไกลคอลปริมาตร 0.1 มล. คุ่อตราการตายของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มภายใน 1 สัปดาห์ แล้วนำผลที่ได้มาแสดงในรูปกราฟ เพื่อนำไปหาค่าแอลดี 50 โดยวิธีลิทฟิลด์และวิลโคซัน

2.2 ศึกษาถึงผลของกินเนอร์และโทลูอินที่มีต่อกระบวนการสร้างตัวอสุจิ และสภาวะหน้าที่ของตัวอสุจิ (Spermatogenesis and Functional State of Spermatozoa)

วิธีการศึกษาทำโดยแบ่งสัตว์ทดลองเพศผู้ออกเป็น 3 กลุ่ม (Fomenko, 1984)

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้กินเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศผู้จำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.02 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน

ข. กลุ่มที่สอง ให้โกลูอินกับสัตว์ทดลองเพศผู้จำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.005 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน

ค. กลุ่มที่สาม ให้โพรนิลีนไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศผู้จำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในปริมาตร 0.05 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน

เมื่อครบ 60 วันแล้ว นำสัตว์ทดลองเพศผู้ไปผสมพันธุ์กับสัตว์ทดลองเพศเมียปกติในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำผลการตั้งท้องของเพศเมียปกติมาคำนวณหา दरชนีของความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ (Fertility Index) และ दरชนีของการตั้งครรภ์ (Gestation Index)

2.3 ศึกษาถึงผลของทินเนอร์และโกลูอินที่มีต่อสภาวะหน้าที่ของรังไข่ (Functional State of Ovaries)

วิธีการศึกษาทำโดยแบ่งสัตว์ทดลองเพศเมียออกเป็น 3 กลุ่ม

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้ทินเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.04 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

ข. กลุ่มที่สอง ให้โกลูอินกับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.01 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

ค. กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มควบคุมโดยให้โพรนิลีนไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว ในปริมาตร 0.1 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

เมื่อครบ 14 วันแล้ว นำสัตว์ทดลองเพศเมียทั้ง 3 กลุ่ม ไปผสมพันธุ์กับสัตว์ทดลองเพศผู้ปกติ แล้วนำผลการตั้งท้องของสัตว์ทดลองเพศเมียทั้ง 3 กลุ่ม มาคำนวณหา दरชนีของความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์และ दरชนีของการตั้งครรภ์

2.4 ศึกษาถึงผลของทินเนอร์และโกลูอินที่มีต่ออัตราการเกิดมีชีวิต (life birth) และการเกิดไร้ชีพ (death birth) ของหนูถีบจักร

วิธีการศึกษาแบ่งสัตว์ทดลองเพศเมียออกเป็น 3 กลุ่ม

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้ทินเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.02 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

ข. กลุ่มที่สอง ให้โกลูอินกับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.01 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

ค. กลุ่มที่สาม ให้โพรนิลีนไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยฉีดเข้าช่องท้องในปริมาตร 0.05 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน

เมื่อครบ 14 วันแล้ว นำสัตว์ทดลองเพศเมียทั้ง 3 กลุ่มไปผสมพันธุ์กับสัตว์ทดลองเพศผู้ในข้อ 2.2 ในแต่ละกลุ่ม แล้วนำผลการตั้งท้องของสัตว์ทดลองเพศเมียมาคำนวณหาธรรมชาติของความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์และธรรมชาติของการตั้งครรภ์ และทำการผ่าท้องของสัตว์ทดลองที่ตั้งท้องก่อนถึงกำหนดคลอด 1 วัน (วันที่ 19 ของการตั้งท้อง) เพื่อตรวจดูความผิดปกติ การมีชีพและไร้นชีพของลูกสัตว์ทดลอง

2.5 การศึกษาถึงศักยภาพในการเกิดพิษต่อคัพภะ (Embryotoxic potential) ของทินเนอร์และโทลูอินในหนูถีบจักร (Manson, Zenick and Costlow, 1982)

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ช่วงดังนี้

2.5.1 ผลของทินเนอร์และโทลูอินที่มีต่อพัฒนาการของคัพภะ

วิธีการศึกษาโดยนำสัตว์ทดลองเพศเมียปกติไปผสมพันธุ์กับสัตว์ทดลองเพศผู้ปกติ และแบ่งสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้ทินเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.04 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตลอดช่วงของการตั้งท้อง

ข. กลุ่มที่สอง ให้โทลูอินกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.01 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตลอดช่วงของการตั้งท้อง

ค. กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มควบคุม ให้โพรมิซีนไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในปริมาตร 0.1 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง ตลอดช่วงของการตั้งท้อง

ในช่วงกึ่งกลางของการตั้งท้อง (mid pregnancy) แบ่งครึ่งของสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องในแต่ละกลุ่มมาตรวจหาความผิดปกติของคัพภะ ที่เหลืออีกครั้งหนึ่งปล่อยให้ท้องและคลอดตามธรรมชาติ ให้เลี้ยงลูกต่อไปจนหย่านม นำผลมาหาธรรมชาติของการมีชีวิตรอด (Survival Index) และธรรมชาติของภาวะการหลั่งน้ำนม (Lactation Index) และศึกษาดูความผิดปกติในการเจริญเติบโตของลูกสัตว์ทดลอง

2.5.2 ผลของทินเนอร์และโทลูอินที่มีต่อการสร้างอวัยวะ (Organogenesis)

วิธีการศึกษาโดยนำสัตว์ทดลองเพศผู้และสัตว์ทดลองเพศเมียมาผสมพันธุ์กัน และแบ่งสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้ทินเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.04 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ข. กลุ่มที่สอง ให้โทลูอินกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.01 มล./กก.น.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ค. กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มควบคุม ให้โพรนิสอินไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 0.01 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ผ่าท้องของสัตว์ทดลองที่ตั้งท้องก่อนถึงกำหนดคลอด 1 วัน (วันที่ 19 ของการตั้งท้อง) นำลูกสัตว์ทดลองมาตรวจหาความผิดปกติ และนำไปย้อมสีโครมกระดูกเพื่อดูความผิดปกติของโครมกระดูก ส่วนตัวแม่นำมาตรวจหาตำแหน่งที่มีการดูดซึมกลับ (resorption site)

2.5.3 ผลของทีนเนอร์และโกลูอินที่มีต่อการเจริญเติบโตในช่วงหลังของฟีตัส (late maturation of fetus) และต่อการเจริญเติบโตหลังคลอด

วิธีการศึกษาโดยนำสัตว์ทดลองเพศผู้และสัตว์ทดลองเพศเมียมาผสมพันธุ์ให้ตั้งท้อง และแบ่งสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องออกเป็น 3 กลุ่ม

ก. กลุ่มที่หนึ่ง ให้ทีนเนอร์กับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องจำนวน 10 ตัว โดยฉีดในขนาด 0.04 มล./กก.นน.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ข. กลุ่มที่สอง ให้โกลูอินกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องจำนวน 10 ตัว โดยฉีดในขนาด 0.01 มล./กก.นน.ตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ค. กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มควบคุม ให้โพรนิสอินไกลคอลกับสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้องจำนวน 10 ตัว โดยฉีดในปริมาตร 0.1 มล. ต่อสัตว์ทดลองหนึ่งตัว วันละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 15 ของการตั้งท้อง

ให้ฉีดทุกวันจนกระทั่งสัตว์ทดลองคลอด และฉีดต่อไปจนถึงระยะที่ลูกสัตว์ทดลองหย่านม ศึกษาดูความผิดปกติในการเจริญเติบโตของลูกสัตว์ทดลอง และนำผลมาคำนวณหา दरชนีของการมีชีวิตรอด (Survival Index) และ दरชนีของภาวะการหลั่งน้ำนม (Lactation Index)

ในการศึกษาความผิดปกติในลูกสัตว์ทดลอง ศึกษาโดย

1. ชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์
2. สังเกตพัฒนาการต่าง ๆ ของลูกสัตว์ทดลอง ได้แก่ การเปิดของใบหู (Pinna detachment) การเปิดของรูหู (Ear opening) การเปิดของตา (eye opening) การเปิดของช่องคลอด (Vagina opening) การเคลื่อนของลูกอัณฑะลงสู่ถุง (Testis descensus)

3. การทดสอบทางด้านพฤติกรรม ได้แก่

- 3.1 ทดสอบการว่ายน้ำ (Swimming test) โดยนำลูกสัตว์ทดลอง อายุ 14 วัน ลงว่ายน้ำในอ่างน้ำขนาด 40x40 ซม. น้ำลึก 5 ซม. สังเกตท่าทางการว่ายน้ำ โดยส่วนหัวจะโผล่พ้นน้ำในระดับเหนือใบหู ลำตัวตรง ขาทั้งสี่ตะกุกน้ำ บันทึกจำนวนของ



ลูกสัตว์ทดลองที่มีการว่ายน้ำผิดปกติ

3.2 ทดสอบการเรียนรู้ (Learning test) โดยนำลูกสัตว์ทดลองอายุ 27 วัน มาทดสอบในกล่องดำและกล่องขาว โดยในธรรมชาติของสัตว์ฟันแทะชอบอยู่ในที่มืดและหลีกเลี่ยงที่สว่าง (Squire, 1976) สัตว์ทดลองจะเกิดการเรียนรู้ที่จะไม่เข้ากล่องดำ ซึ่งมีการช็อตของไฟฟ้าที่เท้าของสัตว์ทดลอง เมื่อก้าวเข้าไปในกล่องดำ บันทึกจำนวนครั้งของการเข้ากล่องดำ ภายในเวลา 10 นาที

3.3 ทดสอบความจำ (Memory test) โดยนำลูกสัตว์ทดลองอายุ 34 วัน ซึ่งได้ผ่านการเรียนรู้มาแล้ว มาทดสอบความจำโดยนำมาทดสอบในกล่องดำและกล่องขาว จับเวลาภายใน 5 นาที ถ้าสัตว์ทดลองไม่เข้ากล่องดำ แสดงว่าสัตว์ทดลองนั้นมีความจำที่ดี

4. การย้อมสีโครงกระดูกลูกสัตว์ทดลอง (McLeod, 1980) มีขั้นตอนดังนี้

4.1 หลังการผ่าสัตว์ทดลองเพศเมียที่ตั้งท้อง นำลูกสัตว์ทดลองมาผ่าท้องเอาอวัยวะภายในท้องและอวัยวะภายในช่องอกออกจนหมดและลอกหนังออกทั้งตัว

4.2 นำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% , 95% และแอลกอฮอล์บริสุทธิ์อย่างละ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ

4.3 แช่ในอะซิโตน 1 สัปดาห์

4.4 ย้อมสีด้วยอะลิซาลีนเรดและอัลเซียนบลูเป็นเวลา 3 วัน ในอัตราส่วน ดังนี้

อัลเซียนบลู 3 %	ในแอลกอฮอล์ 70 %	1	ปริมาตร
อะลิซาลีนเรด 0.1 %	ในแอลกอฮอล์ 95 %	1	ปริมาตร
กรดอะซิติก (36-37 %)		1	ปริมาตร
แอลกอฮอล์ 70 %		17	ปริมาตร

4.5 ล้างด้วยน้ำกลั่น

4.6 แช่ในสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1 % 24-48 ชั่วโมง

4.7 แช่ในสารละลายต่อไปตามลำดับ

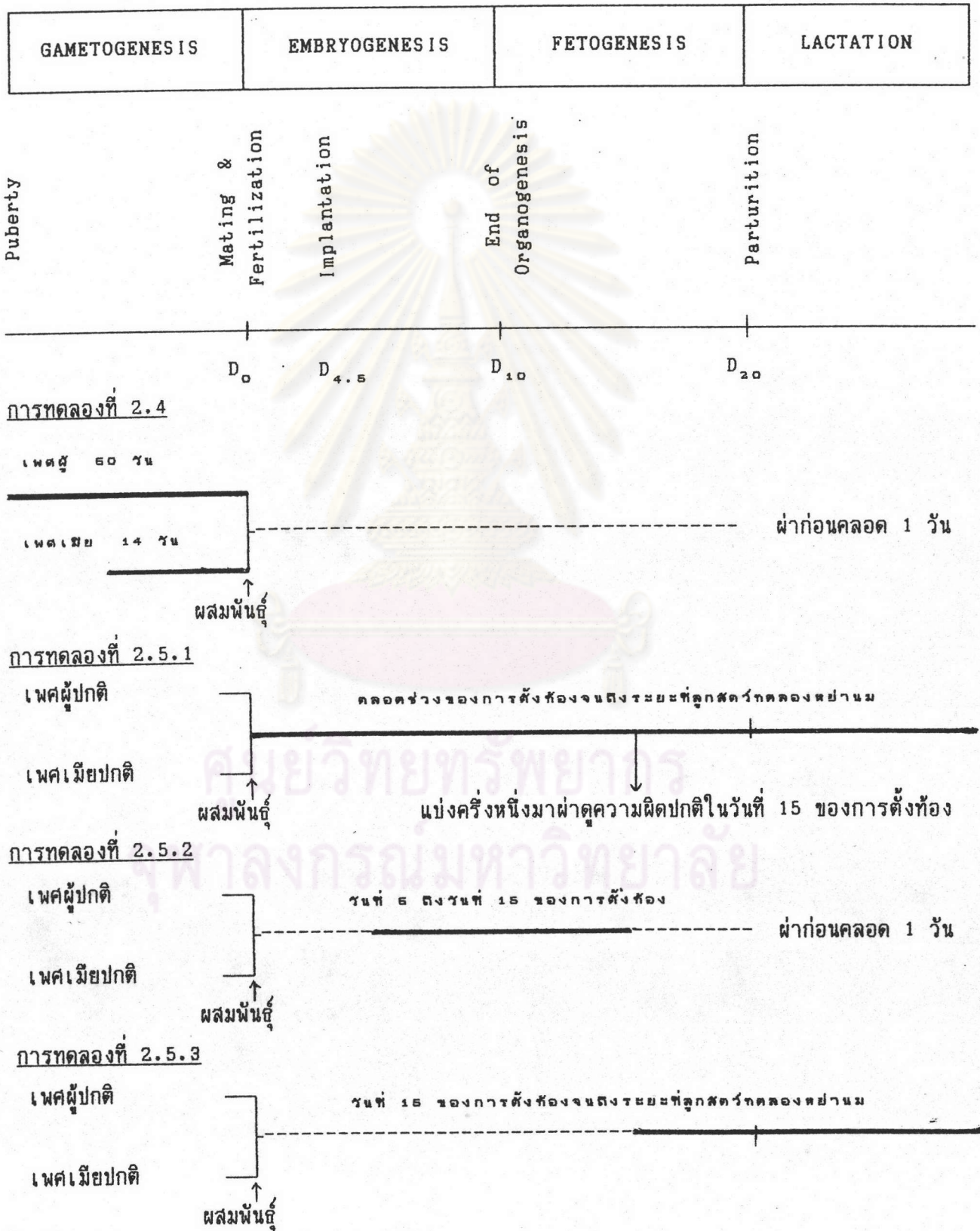
กลีเซอริน 20 % : KOH 1 % = 1:4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

กลีเซอริน 50 % : KOH 1 % = 1:1 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

กลีเซอริน 80 % : KOH 1 % = 4:1 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.8 เก็บโครงกระดูกลูกสัตว์ทดลองที่ย้อมสีแล้วในกลีเซอริน

แผนภาพแสดงช่วงระยะเวลาของการให้กินเนอร์และโทลูอินแก่หนูสืบจักรของการทดลองที่ 2.4 และ 2.5



3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ Student's test, Chi - square test, Mann - Whitney U test และ Fisher's exact test.

การคำนวณหาครรชนีต่าง ๆ (Fomenko, 1984)

$$\text{ครรชนีของความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ถูกผสมพันธุ์} \times 100}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมดที่นำมาผสมพันธุ์}}$$

$$\text{ครรชนีของการตั้งครรภ์} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ตั้งท้อง} \times 100}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ถูกผสมพันธุ์}}$$

$$\text{ครรชนีของการมีชีวิตรอด} = \frac{\text{จำนวนของลูกสัตว์ทดลองหลังเกิดได้ 5 วัน} \times 100}{\text{จำนวนของลูกสัตว์ทดลองที่เกิดใหม่ทั้งหมด}}$$

$$\text{ครรชนีของภาวะการหลังน้ำนม} = \frac{\text{จำนวนของลูกสัตว์ทดลองหลังเกิดได้ 21 วัน} \times 100}{\text{จำนวนของลูกสัตว์ทดลองหลังเกิดได้ 5 วัน}}$$

การผสมพันธุ์สัตว์ทดลอง

วิธีการโดยการนำสัตว์ทดลองเพศผู้และสัตว์ทดลองเพศเมียที่ต้องการผสมพันธุ์กัน ไว้ในกรงเดียวกัน ตั้งแต่เวลา 18.00 น. ถึง 6.00 น. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในช่วงกลางวัน ในตอนเช้าของวันที่สัตว์ทดลองได้ทำการผสมพันธุ์แล้ว ซึ่งสามารถสังเกตว่า สัตว์ทดลองเพศเมียถูกผสมพันธุ์ได้จากการสำรวจร่องรอยการผสมพันธุ์แล้วที่ช่องคลอด หรือวาไจนาปลั๊ก (Vagina plug) ของสัตว์ทดลองเพศเมีย ถ้าพบร่องรอยดังกล่าว แสดงว่ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น (Bennett and Vickery, 1970) วันที่พบวาไจนาปลั๊กนับเป็นวันแรกของการตั้งท้อง