หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยงและระวังรักษาแฮมสเตอร์

แฮมสเตอร์สีทองพันธุ์ Mesocricetus auratus เลี้ยงในห้องทดลองภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิภายในห้องทดลองให้เท่ากับ 25 ± 1 °ซ. ให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมงและมืด 10 ชั่วโมง สัตว์ทดลองเหล่านี้กินอาหารมาตรฐานซึ่งสั่งจากบริษัท F.E. Zuellig (Gold Coin Mills) และให้น้ำประปาดื่มตลอดเวลา แฮมสเตอร์ที่จะใช้ในการทดลองเป็นเพศเมียที่ไม่เคยผ่านการสืบพันธุ์มาก่อน และมีอายุระหว่าง $1\frac{1}{2}$ ถึง 2 เดือน จะเลือกใช้แฮมสเตอร์เฉพาะตัวที่มีวงอีสตรัสเป็นปกติ (4 วัน) ทั้งนี้จะต้องตรวจวงสืบพันธุ์ไม่น้อยกว่า 2 วงติดต่อกันก่อนจะนำมาทดลอง

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ของแฮมสเตอร์

แฮมสเตอร์เพศเมียจะมีวงสืบพันธุ์ปกติ 4 วัน เมื่อใช้มือกดเบา ๆ บริเวณด้านข้างของช่องคลอด จะสังเกตเห็นลักษณะสิ่งที่ขับออกมาจากช่องคลอดแตกต่างกันไปในแต่ละวันของวงจรสืบพันธุ์ ดังต่อไปนี้คือ

D_1 สิ่งที่ขับออกจากช่องคลอดเป็นเมือกใส แฮมสเตอร์เพศเมียจะผสมพันธุ์ใน D_1 นี้

D_2 เมือกสีขาวข้นและหนียวหนืด เมื่อแตะด้วยแท่งแก้วสามารถยืดได้ประมาณ 2 ถึง 8 นิ้ว ตามติดแท่งแก้วขึ้นมา เรียกว่า Postestrus discharge ในตอนบ่าย, เย็น ของ D_2 เมือกจะมีความหนืดลดลง และอาจมีลักษณะผสมระหว่าง postestrus discharge กับสารที่คล้ายขี้ผึ้ง

D_3 เมือกที่ออกมาเปลี่ยนเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง สีเหลืองอ่อน

D_4 ไม่พบลักษณะพิเศษใด แต่ถ้าสารขี้ผึ้งไม่ถูกขับออกในวัน D_3 ก็จะขับออกมาใน D_4 ได้

ลักษณะดังกล่าวนี้จะเกิดวนเวียนทุก ๆ 4 วันเรื่อยไป (Orsini, 1961)

3. การชักนำให้เกิดท้องเทียม และเกิดเดซิดัวไลเซชั่น

3.1 การชักนำให้เกิดท้องเทียม

แฮมสเตอร์ทุกตัวที่จะนำมาทดลองต้องอยู่ในระยะท้องเทียม โดยการนำไปผสมกับแฮมสเตอร์ตัวผู้ที่ตัดท่อนำเชื้ออสุจิออกทั้ง 2 ข้าง (vasectormized male) ในคืนวันไข่ตก (D_1) ตามวิธีของ Orsini, (1961) วันรุ่งขึ้นตรวจดู vaginal plug และเริ่มนับเป็นวัน L_0 ของท้องเทียม และวันต่อไปเป็น L_1, L_2, L_3... ตามลำดับ สัตว์ที่เกิดท้องเทียมและจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไปจะต้องไม่ตรวจพบ post estrous discharge เกิดขึ้นอีกภายใน 4 วัน หลังจากที่แยกออกมาจากตัวผู้ที่ถูกตัดท่ออสุจิ

3.2 การชักนำให้เกิดเดซิดัวไลเซชั่นโดยวิธีทำลายเนื้อเยื่อมดลูก (trauma)

นำแฮมสเตอร์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมที่อยู่ในระหว่างวัน L_3 และ L_4 มาทำให้สลบด้วยอีเธอร์ แล้วใช้เดททอล 2.5% ทาบริเวณด้านข้างของลำตัวในตำแหน่งที่มีรังไข่และมดลูกอยู่ ใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อโดยเปิดเป็นช่องกว้างประมาณ $\frac{3}{4}$ ซม. ใช้ปากคีบปลายโค้งคีงไขมันรอบมดลูกขึ้นมา ส่วนของมดลูกจะตามออกมาด้วย ดึงมดลูกออกมาจนเห็นส่วนที่ต่อระหว่างมดลูกกับท่อนำไข่ ใช้เข็มปลายแหลมยาวประมาณ 2 นิ้วสอดเข้าไปจากส่วนต่อของมดลูกกับท่อนำไข่ โดยสอดให้ลึกสุดถึงปากมดลูก ค่อย ๆ ดึงเข็มกลับออกมาโดยให้ปลายครูดเข็มผนังมดลูกทางด้านแอนติมีโซมีเทรียม (antimesometrium) จนตลอดความยาวมดลูก เสร็จแล้วนำส่วนต่าง ๆ ที่ดึงออกมากลับเข้าลำตัวตามเดิม ใช้ด้ายเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้ง

4. การเตรียมฮอร์โมนและสารทดลองที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดเดซิดูอะไลเซชั่น

4.1 โปรเจสเตอโรน

ละลายโปรเจสเตอโรนซึ่งบดละเอียดแล้วด้วยน้ำมันมะกอก คนให้ละลายเข้ากันโดยอุ่นบน hot plate จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อนและใส ทั้งนี้ให้มีความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 อินโดเมธาซิน

ละลายสารอินโดเมธาซินด้วยน้ำมันมะกอก ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 การเตรียมไพราไซอะซีน

ละลายไพราไซอะซีนด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ละลายเฉพาะใช้ครั้งหนึ่ง ๆ เท่านั้น

5. การตัดรังไข่

นำแฮมสเตอร์มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ ใช้สำลีจุ่มเดททอลเช็ดบนหนังในตำแหน่งที่เป็นที่ตั้งของรังไข่และมดลูก ตัดหนังชั้นนอกและกล้ามเนื้อให้เป็นช่องกว้างประมาณ $\frac{3}{4}$ ซม. ด้วยกรรไกร ใช้ปากคีบปลายโค้งค่อย ๆ ดึงไขมันออกมา ในลักษณะเช่นนี้จะทำให้มดลูกตามติดขึ้นมาด้วย ค่อย ๆ ดึงมดลูกออกมาจนเห็นส่วนต่อของมดลูกกับท่อนำไข่และรังไข่ ใช้กรรไกรตัดรังไข่ออกทิ้งไป นำส่วนต่าง ๆ กลับเข้าไปในช่องท้องตามเดิม แล้วเย็บปิดกล้ามเนื้อและหนังชั้นนอกอีกครั้ง การตัดรังไข่นี้จะต้องทำทั้งข้างซ้ายและขวาควบคู่กันไป

6. การฆ่า (autopsy)

ใช้วิธีให้คมอีเธอร์ แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตัดส่วนมดลูกมาชั่ง

โดยแยกชั่งมดลูกซ้าย ขวา แล้วลอกเฉพาะเนื้อเยื่อชั้นเอ็นโดมิเทรียมแต่ละข้างของมดลูกมาชั่งด้วย การลอกเนื้อเยื่อเอ็นโดมิเทรียมนั้นทำได้โดยการผ่ามดลูกแต่ละข้างตามแนวความยาวของมดลูก ใช้แผ่นสไลด์ค่อย ๆ ขูดลอกเอาเนื้อเยื่อเอ็นโดมิเทรียมออกมา ชั่งน้ำหนักแล้วบันทึกไว้

7. การทำฮิสโตโลยีของมดลูก

7.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

7.1.1 เออริช แอซิด ฮีมาทอกไซลิน (Ehrlich's acid haematoxylin) ชั่งฮีมาทอกไซลิน 8 กรัม ลงใน 95% เอ็ทธิล อัลกอฮอลล์ (หรือแอบโซลูด อัลกอฮอลล์) 400 มิลลิลิตร อุ่นบนวอเตอร์ บาธ (water bath) จนละลายเข้าด้วยกัน แล้วชั่งโปแตส อะสัม (Potash alum) 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองนี้มาผสมกัน แล้วเติมกลีเซอรีน (glycerine) 400 มิลลิลิตร, กลาเซียล อะซีติค แอซิด (glacial acetic acid) 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่โปตัสเซียม เปอร์มังกาเนต 0.4 กรัมที่ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงไป

7.1.2 0.5% อีโอซิน (Eosin)

ชั่งอีโอซิน (Eosin) y 0.5 กรัม ละลายด้วย 95% เอ็ทธิล อัลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร

7.2 การทำสไลด์

นำมดลูกที่ตัดไขมันออกให้เกลี้ยงมาแช่ในสารละลายบูแอง (Bouin solution) ซึ่งประกอบด้วย กลาเซียลอะซีติค แอซิด และ พิคริค แอซิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ใน 70% เอ็ทธิล อัลกอฮอลล์ 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปผ่านกรรมวิธีดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยเปลี่ยนแช่ใน เอ็ทธิล อัลกอฮอลล์ 80%, 90%

ตามลำดับขั้นตอนละ 2 – 4 ชั่วโมง เปลี่ยนแช่ใน 95% เอ็ทธิล อัลกอฮอลล์ ตลอดคืน แล้วนำไปผ่านใน 95% เอ็ทธิลอัลกอฮอลล์ผสมกับบิวทานอล, บิวทานอล, บิวทานอลผสมกับไซลอล, ไซลอล ขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้พาราฟฟินซึมเข้าไปในเซล.. ของเนื้อเยื่อโดยผ่านเนื้อเยื่อลงใน ไซลอลลที่ผสมกับพาราพลาสท์ด้วยอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปลี่ยนเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสท์ 1. 1 ชั่วโมง และพารา–พลาสท์ 2. ครึ่งชั่วโมง กรรมวิธี infiltration นี้ทำให้ตู้อบอุณหภูมิ 60 – 62°ซ.

เสร็จแล้วนำเนื้อเยื่อไปฝังลงในพาราพลาสท์ (embedding) โดยเทพาราพลาสท์ใหม่ ๆ ลงในบลอกโลหะรูปสี่เหลี่ยม คีบชิ้นเนื้อเยื่อใส่ลงไปตรงกลาง ปล่อยให้เย็น เมื่อเย็นแล้วค่อย ๆ ตัดให้เป็นรูปแท่งสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้มีความหนา 8 ไมครอน

เมื่อตัดเนื้อเยื่อได้แล้วก็นำไปติดบนแผ่นสไลด์โดยใช้ egg albumin ช่วยให้ติดแน่นและใช้ความร้อนจาก warm plate ช่วยให้ section ยืดตัว แล้วนำมาย้อมด้วยฮีมาทอกไซลิน และอีโอซิน เพื่อย้อมนิวเคลียสและไซโตปลาสซึม ตามลำดับ ตามกรรมวิธีในการย้อมโดยนำสไลด์ไปแช่ในไซลอลล 1, 2 เปลี่ยนแช่ใน บิวทานอล 95%, 90%, 70% เอ็ทธิลอัลกอฮอลล์ขั้นตอนละ 3 – 5 นาที แล้วนำไปย้อมโดยแช่ลงในฮีมาทอกไซลิน เป็นเวลา 10 – 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา นำไป differentiate ในกรด (0.5% HCl) ครึ่งนาทีแล้วล้างน้ำ เมื่อ section ติดสีพอดีแล้ว แช่ในน้ำประปา 5 นาที จะเห็นนิวเคลียสของเซลติดสีน้ำเงิน และไซโตปลาสซึมใสไม่มีสี นำสไลด์ใส่ใน 70%, 80%, 90% และ 95% อัลกอฮอลล์ขั้นละ 1 นาที นำไปย้อมด้วยอีโอซินเป็นเวลา 15 – 60 วินาที แล้วล้างด้วย 95% เอ็ทธิลอัลกอฮอลล์, บิวทานอล ขั้นละ 1 นาที เสร็จแล้วทำให้เนื้อเยื่อที่ย้อมสีใสโดยใส่ในไซลอล หยดเมาทิงมีเดียมบน section แล้วปิดด้วย cover glass

การทดลอง

การทดลองนี้ใช้แฮมสเตอร์เพศเมียรวมทั้งสิ้น 281 ตัว มุ่งศึกษาส่วนใหญ่ดังต่อไปนี้คือ

1. ศึกษาช่วงที่มีการตอบสนองสูงสุดต่อตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดเคชิดูอะไลเซชั่น โดยวิธีทำ trauma ในมดลูกข้างซ้าย

2. ศึกษาผลของไพราไซอะซีน อินโดเมธาซิน และพรอสตาแกลนดิน $F_{2\alpha}$ ที่มีต่อการเกิดเคชิดูอะไลเซชั่น

3. ศึกษาผลของการตัดรังไข่ ร่วมกับสารเคมีในข้อ 2 ที่มีต่อการเกิดเคชิดูอะไลเซชั่น

โดยทำการศึกษาในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน และแบ่งการทดลองเป็นกลุ่มย่อยดังนี้ คือ

1. <u>ศึกษา maximum uterine sensitivity โดยการทำ trauma มดลูกข้างซ้าย</u>

ใช้แฮมสเตอร์ทั้งหมด 92 ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย คือ

ก. <u>L_3 9.00 น.</u>

ไม่ตัดรังไข่	จำนวน	11 ตัว
ตัดรังไข่	จำนวน	11 ตัว

ข. <u>L_3 12.00 น.</u>

ไม่ตัดรังไข่	จำนวน	12 ตัว
ตัดรังไข่	จำนวน	10 ตัว

ก. L_3 15.00 น.

ไม่ตัดรังไข่ จำนวน 12 ตัว

ตัดรังไข่ จำนวน 9 ตัว

ง. L_4 9.00 น.

ไม่ตัดรังไข่ จำนวน 9 ตัว

จ. L_4 12.00 น.

ไม่ตัดรังไข่ จำนวน 9 ตัว

ฉ. L_4 15.00 น.

ไม่ตัดรังไข่ จำนวน 9 ตัว

2. ศึกษาการกระตุ้นการเกิดเคซิดูอะไลเซชั่นโดยฉีดสารไพราโซอะซีนและ $PGF_{2\alpha}$ เข้าช่องท้อง

ใช้แฮมสเตอร์ทั้งหมด 121 ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย คือ

ก. vehicle 0.4 มล. 9.00 – 15.00 น. จำนวน 9 ตัว

ข. ไพราโซอะซีน

L_3 9.00 น.

ไพราโซอะซีน 15 มก. จำนวน 7 ตัว

ไพราโซอะซีน 15 มก. จำนวน 9 ตัว

ตัดรังไข่ + ไพราโซอะซีน 20 มก. จำนวน 8 ตัว

L_3 12.00 น.

ไพราโซอะซีน 15 มก. จำนวน 7 ตัว

ไพราโซอะซีน 20 มก. จำนวน 4 ตัว

L_3 15.00 น.

ไพราไซอะซีน 20 มก. จำนวน 10 ตัว

ตัดรังไข่ + ไพราไซอะซีน 20 มก. จำนวน 8 ตัว

L_4 9.00 น.

ไพราไซอะซีน 20 มก. จำนวน 7 ตัว

L_4 15.00 น.

ไพราไซอะซีน 20 มก. จำนวน 9 ตัว

ค. $PGF_{2\alpha}$

1. $PGF_{2\alpha}$ 50 ไมโครกรัม L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว
2. $PGF_{2\alpha}$ 50 ไมโครกรัม 2 ครั้ง L_3 9.00 น. และ 15.00 น. จำนวน 8 ตัว
3. $PGF_{2\alpha}$ 50 ไมโครกรัม 3 ครั้ง L_3 9.00, 12.00 น. และ 15.00 น. จำนวน 8 ตัว

ง. $PGF_{2\alpha}$ + ไพราไซอะซีน

1. $PGF_{2\alpha}$ 50 ไมโครกรัม + ไพราไซอะซีน 10 มก. L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว
2. $PGF_{2\alpha}$ 50 ไมโครกรัม + ไพราไซอะซีน 20 มก. L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว

3. ศึกษาการเกิดเคซิกูอะไลเซชั่นในสัตว์ที่ทำ trauma พร้อมกับให้สารอินโดเมธาซินทางช่องท้อง

ใช้แฮมสเตอร์ทั้งหมด 69 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยคือ

000537

ก. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 0.15 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน $L_1 - L_4$ ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 8 ตัว

ข. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 0.15 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน $L_3 - L_8$ ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว

ค. อินโดเมธาซิน 0.6 มก. L_3 10.00 น. ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว

ง. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 0.6 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน L_3 ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 11 ตัว

จ. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน L_3 ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 11 ตัว

ฉ. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 2 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน L_3 ในสัตว์ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 9 ตัว

ช. อินโดเมธาซิน 2 ครั้ง ๆ ละ 0.6 มก. เวลา 9.00 น. และ 15.00 น. วัน L_3 ในสัตว์ตัดรังไข่ที่ทำ trauma L_3 12.00 น. จำนวน 12 ตัว

ในสัตว์ทดลองทั้งหมดนั้นเมื่อถึงระยะ L_8 ของท้องเทียมนำมาฆ่า ตรวจดูการตอบสนองต่อการเกิดเคซิดูอะไลเซชั่น โดยแบ่งเกรดของการตอบสนองตามแบบ Shelesnyak and Kraicer (1961) ดังนี้

เกรด 0 = ไม่เกิดเคซิดูโอมาเลย

เกรด 1 = เกิดเคซิดูโอมาไม่เกิน $\frac{1}{4}$ ของความยาวของมดลูกแต่ละข้าง

เกรด 2 = เกิดเคซิดูโอมามากกว่า $\frac{1}{4}$ แต่น้อยกว่า $\frac{3}{4}$ ของแต่ละข้าง

เกรด 3 = เกิดเคซิดูโอมาตั้งแต่ $\frac{3}{4}$ ขึ้นไป แต่ไม่เกิดตลอดความยาวของมดลูก

เกรด 4 = เกิดเคซิดูโอมาตลอดความยาวของมดลูกแต่ละข้าง

สำหรับกลุ่มที่ตัดรังไข่จะให้โปรเจสเตอโรน 4.0 มก.ต่อวัน ตั้งแต่ L_3 - L_7 โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และจะฉีดสาร $PGF_{2\alpha}$, ไพราไซอะซีนเข้าทางช่องท้อง ส่วนอินโดเมธาซินเข้าใต้ผิวหนัง

<u>หมายเหตุ</u> การบันทึกผลแยกบันทึกผลมดลูกเอ็นโดมิเทรียมในกลุ่มที่ทำ trauma และฉีดอินโดเมธาซินร่วมกับทำ trauma แต่สำหรับกลุ่มที่ฉีดไพราไซอะซีนและ $PGF_{2\alpha}$ ให้รวมน้ำหนักมดลูก, เอ็นโดมิเทรียมทั้งสองข้างไว้ด้วยกัน