บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์เพศเมียไม่เคยผ่านการผสมมาก่อน อายุประมาณ 50 -- 90 วัน น้ำหนักประมาณ 95 – 150 กรัม เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปรับอุณหภูมิห้องประมาณ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ควบคุมโดยสวิทช์อัตโนมัติ ให้ได้รับแสงวันละ 14 ชั่วโมง (ระหว่างเวลา 06.00 – 20.00 น.) ให้อาหารมาตรฐานของบริษัท F.E.Zeullig (Gold Coil Mills) มีน้ำประปากินตลอดเวลา และสัตว์ทดลองทุกตัวจะต้องได้รับการตรวจวงสืบพันธุ์เป็นปกติติดต่อกันไม่น้อยกว่า 3 วง การทดลองทุกครั้งต้องชั่งน้ำหนักตัวก่อนเสมอ

2. การตรวจวงสืบพันธุ์สัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์ที่มีวงสืบพันธุ์ปกติจะมีวงสืบพันธุ์กินเวลานาน 4 วัน ต่อ 1 วง โดยกำหนดให้วันที่พบมีเมือกเหนียวสีนวลซึมออกจากช่องคลอด สามารถใช้แท่งแก้วแตะแล้วยืดออกเป็นสายได้ เรียกว่า post estrus discharge เป็นวัน Day 2 (D_2) ซึ่งอยู่ในระยะอีสตรัส (estrus) ซึ่งเป็นวันที่มีการตกไข่แล้ว ส่วนวันต่อมาคือ Day 3 (D_3) และ Day 4 (D_4) อยู่ในระยะไดอีสตรัส (diestrus) (ระยะหลังการตกไข่) ซึ่งกินเวลานาน 2 วัน จากนั้นจึงเริ่มวงสืบพันธุ์ใหม่ คือ Day 1 (D_1) ซึ่งอยู่ในระยะที่เรียกว่าโปรอีสตรัส (proeatrus) ระยะก่อนการตกไข่ซึ่งกินเวลานาน 1 วัน รวมเป็น 4 วัน (Ward, 1946; Orsini, 1961; Kent, 1968; ศิญญาวัฒน์, 2513)

3. การเตรียมฮอร์โมนสำหรับฝังในสมองและยาสำหรับฉีดในการทดลอง

3.1 การเตรียมและบรรจุฮอร์โมน

เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้มีลักษณะเป็นผงผลึกเล็กๆ นำมาบรรจุในหลอดแก้วแคพพิลารี โดยจิ้มปลายข้างหนึ่งลงในฮอร์โมนดังกล่าว กดให้แน่นหลายๆครั้ง จนกระทั่งฮอร์โมนถูกอัดแน่นที่ปลายหลอด และมีระดับสูงจากปลายประมาณ 3 – 4 มิลลิเมตร (แผนภาพที่ 1 หน้า 23) น้ำหนักฮอร์โมนประมาณ 0.0003 – 0.0004 กรัม จากนั้นจึงเช็ดรอบนอกของหลอดแก้วด้วยสำลีจนสะอาดดี

3.2 การเตรียมพีนอบาร์บิทอลสำหรับฉีดทดลอง

เนื่องจากพีนอบาร์บิทอลละลายในน้ำมัน (Sharpless, 1971) จึงนำมาบดให้ละเอียดดี จากนั้นจึงนำไปผสมกับน้ำมันมะกอกให้มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร และจะต้องเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งที่ใช้

4. การหาตำแหน่งต่างๆในสมองเพื่อใช้ในการฝังหลอดแก้วที่บรรจุฮอร์โมน

จากการศึกษาตำแหน่งต่างๆในสมองของแฮมสเตอร์โดย Knigge และ Joseph (1968) ซึ่งกำหนดจุดหลักสำคัญในการหาตำแหน่งต่างๆในสมอง โดยกำหนด horizontal zero plane (H 0.0) คือแนวระนาบที่ขนานกับลำตัวของสัตว์ทดลอง และสัมผัสส่วนบนของ incisor bar (ส่วนที่ใช้ฟันบนของแฮมสเตอร์วางพาด เมื่อยึดกับเครื่องมือ Stereotaxic) ปรับให้ incisor bar นี้สูงกว่า ear bar (ส่วนที่ยึด ear clip ที่สอดเข้าในช่อง external meatus ของหูแฮมสเตอร์) เป็นระยะทาง 5 มิลลิเมตร และกำหนดให้เส้นแนวระนาบที่ผ่าน ear bar นี้เป็น Interaural Line ส่วน Vertical Zero Plane (A 0.0) เป็นเส้นแนวดิ่งที่ผ่านปลายของ ear bar ตัดกับเส้น H 0.0 ที่จุด (0,0) (ดังแผนภาพที่ 1 หน้า 22) ซึ่งเป็นจุดหลักในการหาตำแหน่งต่างๆได้ ดังนี้

1. <u>บริเวณมีเดียนอีมิแนนซ์</u> (ME) คือตำแหน่งที่ห่างจากจุด (0,0) ไปทางด้านหน้าของหัวแอมสเตอร์เป็นระยะทาง 3.8 มิลลิเมตร และลึกลงจากจุด (0,0) เป็นระยะทาง 2.5 – 2.6 มิลลิเมตร อยู่ในแนวเกือบกึ่งกลางแนวต่อของกระโหลก

2. <u>บริเวณตอนกลางของพรีออพติค</u> (medial POA) คือตำแหน่งที่ห่างจากจุด (0,0) ไปทางด้านหน้าของหัวแอมสเตอร์เป็นระยะทาง 5.7 มิลลิเมตร และลึกลงจากจุด (0,0) เป็นระยะทาง 2 มิลลิเมตร อยู่ในแนวเกือบกึ่งกลางของรอยต่อของกระโหลก

3. <u>บริเวณส่วนข้างของพรีออพติค</u> (lateral POA) คือตำแหน่งที่ห่างจากจุด (0,0) ไปทางด้านหน้า ของหัวแอมสเตอร์เป็นระยะทาง 5.7 มิลลิเมตร และลึกลงจากจุด (0,0) เป็นระยะทาง 2 มิลลิเมตร ห่างจากแนวต่อของกระโหลกไปทางด้านซ้ายหรือขวาเป็นระยะทาง 1 – 1.5 มิลลิเมตร

4. <u>บริเวณส่วนกลางของเอมิกดาลอยด์นิวเคลียส</u> (amygdaloid nucleus) คือตำแหน่งที่ห่างจากจุด (0,0) ไปทางด้านหน้าของหัวแอมสเตอร์เป็นระยะทาง 4.1 มิลลิเมตร และลึกลงจากจุด (0,0) เป็นระยะทาง 1.3 มิลลิเมตร ห่างจากแนวต่อของกระโหลกไปทางซ้ายหรือขวาเป็นระยะทาง 3.1 มิลลิเมตร

5. <u>บริเวณเวนโทรมีเดียน ไฮโปทาลามิคนิวเคลียส</u> (ventromedial hypothalamic nucleus) คือตำแหน่งที่ห่างจากจุด (0,0) ไปทางด้านหน้าของหัวแอมสเตอร์เป็นระยะทาง 4.1 มิลลิเมตร และลึกลงจากจุด (0,0) เป็นระยะทาง 2.3 มิลลิเมตร อยู่ในแนวเกือบกึ่งกลางแนวต่อของกระโหลก

5. <u>การฝังหลอดแก้วแคพพิลารี่ในสมองบริเวณต่างๆ</u>

ใส่หลอดแก้วที่บรรจุฮอร์โมนเข้าในที่ยึดในเครื่องมือ Stereotaxic โดยยึดให้แน่นจนแน่ใจว่าไม่มีการเคลื่อนขึ้นลงได้อีก เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้มีปลายแหลมเฉพาะ ear bar เท่านั้น จึงจำเป็นต้องอ่านตำแหน่งปลายของหลอดแก้วที่บรรจุฮอร์โมนในแนวดิ่งให้ตรงกับตำแหน่งของ ear bar แทน incisor bar และอ่านตำแหน่งในแนวระนาบของหลอดแก้วจาก scale ด้านข้างด้วย จดตำแหน่งทั้งสองไว้ จากนั้นจึงเลื่อนหลอดแก้วขึ้นเพื่อสะดวกในการจัดสัตว์ทดลองเข้าในเครื่องมือ

โดยนำแฮมสเตอร์มาทำการสลบด้วย ether ใช้สำลีชุบ 70% ethyl alcohol เช็ดฆ่าเชื้อบริเวณหูและหัวส่วนบน ใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็กตัดหูส่วนนอกตรงบริเวณที่ติดกับลำตัวให้ขาดออกจากกันเล็กน้อย เพื่อสะดวกในการสอด ear clip เข้าไปในช่อง external meatus ทั้งสองข้าง (แผ่นภาพที่ 2ก และ 2ข หน้า 24) แล้วนำสัตว์ทดลองเข้ายึดกับเครื่องมือที่ ear bar จิกฟันบนด้านหน้าของแฮมสเตอร์ให้วางพาดบน incisor bar ซึ่งปรับระดับให้สูงกว่า ear bar 5 มิลลิเมตร แล้วใส่ nose clamp เพื่อยึดส่วนหน้าของแฮมสเตอร์ให้อยู่นิ่งไม่สามารถเคลื่อนไปมาได้ ใช้สำลีชุบ ether ให้ดมตลอดเวลาการผ่าตัดด้วย (แผ่นภาพที่ 3ก หน้า 25) ใช้กรรไกรตัดหนังที่หัวตอนบนเป็นแนวยาวขนานกับลำตัวยาวประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตร ขูดเนื้อเยื่อบางๆที่หุ้มกระโหลกออกให้เกลี้ยง ใช้คลิปหนีบหนังที่ปากแผลให้เปิดกว้าง จะสามารถมองเห็นรอยต่อของกระโหลกเป็นแนวยาวตรงกึ่งกลางได้ชัดเจน จากนั้นเลื่อนปลายหลอดแก้วลงไปจุดตำแหน่งต่างๆที่ต้องการฝังด้วยดินสอที่บนกระโหลก ใช้สว่านไฟฟ้าเจาะกระดูกกระโหลกบริเวณที่เยื่องกับจุดแรก เจาะพอเป็นหลุมเล็กๆเพื่อสำหรับขันสกรูยึดหลอดแก้วและ dental cement จากนั้นจึงเจาะที่ตำแหน่งที่ต้องการให้ทะลุกระดูกลงไป ใช้สำลีชุบ alcohol เช็ดฆ่าเชื้อและซับเลือดบริเวณแผลที่เปิดให้สะอาด เลื่อนหลอดแก้วลงไปลึกตามต้องการที่ตำแหน่งต่างๆ (แผ่นภาพที่ 3ข หน้า 25) แล้วใช้คีมปลายแหลมตัดหลอดแก้วที่พ้นส่วนกระโหลกให้ขาดจากที่ยึด โรยผง tetracyclin ลงในบริเวณแผลเพื่อกันการอักเสบ ละลาย dental cement ให้เหลวกำลังดี ทาลงบนกระโหลกให้กระจายทั่วปากแผล เมื่อ dental cement แข็งตัวจะสามารถยึดสกรูและหลอดแก้วให้ติดบนกระโหลกได้โดยไม่หลุด (แผ่นภาพที่ 3ค หน้า 25) และฉีดยากดประสาทฟีนอบาร์บิทอลปริมาณ 10 มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าใต้ผิวหนังหลังการผ่าตัดนี้ทันที ซึ่งจะตรงกับเวลาประมาณ 13.30 – 13.45 น. ของวันโปรอีสตรัส

6. <u>การฆ่าสัตว์ทดลอง</u>

สัตว์ทดลองที่ทำการฝังฮอร์โมน เมื่อฟื้นจากสลบจะถูกแยกกรงเลี้ยงไว้ต่างหากเป็นเวลา 1 คืน ในวันรุ่งขึ้นเวลา 10.00 – 11.00 น. นำสัตว์ทดลองนี้มาตรวจหา post estrus discharge จากนั้นจึงนำไปฆ่าโดยให้ดม ether เปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้างเพื่อตัดรังไข่และท่อนำไข่ออกมาทั้งสองข้าง โดยส่วนรังไข่จะถูกนำไปเตรียม

ทำ section บนสไลด์ ท่อนำไข่ใช้ตรวจนับจำนวนไข่ที่ตกจากรังไข่ สำหรับส่วนหัวของสัตว์ทดลองนำมาแกะเอาสมองกองในน้ำยา formalin ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ เพื่อตรวจตำแหน่งที่ถูกต้องในการฝังฮอร์โมนทุกตัว

7. การตรวจดูผลการทดลองจากการนับไข่ในท่อนำไข่

ตัดท่อนำไข่ตรงส่วนที่อยู่ติดกับรังไข่ ซึ่งสังเกตเห็นว่าจะบวมโตกว่าส่วนอื่นๆ (แผ่นภาพที่ 4 หน้า 26) นำท่อนำไข่ที่ตัดนี้ใส่ในสไลด์หลุมที่ใส่น้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ นำไปส่องดูด้วยกล้องStereomicroscope กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อตรวจนับจำนวนไข่ใน oviduct ถ้าใน oviduct ที่มีไข่อยู่จะสามารถมองเห็นไข่ได้ และสามารถนับจำนวนโดยใช้ปลายเข็มเขี่ยผนังท่อนำไข่ให้แตกออก จะมีเหมือกใสเหนียวๆ พุ่งออกมาและมีไข่ติดอยู่ การนับจำนวนไข่ที่ตก สามารถจะวินิจฉัยว่ามีการตกไข่ปกติ (normal ovulation) เมื่อมีไข่ตกตั้งแต่ 6 ฟองขึ้นไป ส่วนถ้ามีการตกไข่จำนวนน้อยกว่า 6 ฟอง จัดเป็นการตกไข่ไม่สมบูรณ์ (partial ovulation) (Alleva and Umberger, 1966; วชิโรดม, 2515)

005849

8. การทำ Serial paraffin section ของรังไข่

การตรวจนับไข่จากท่อนำไข่มีโอกาสผิดพลาดจากความเป็นจริงได้บ้าง ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่ามีการตกไข่จำนวนจริงกี่ใบ หรือในกรณีที่การตรวจนับไข่ได้น้อยมากหรือตรวจไม่พบเลยนั้น แต่จากการสังเกตลักษณะบางอย่างที่ทำให้คาดว่าน่าจะมีการตกไข่ เช่น มี post estrus discharge หรือรังไข่ดูจากภายนอกสีแดงจัดกว่าปกติ และมีเลือดมาเลี้ยงมาก (hyperemia) หรือท่อนำไข่มีลักษณะบวมใสอย่างชัดเจน เป็นต้น จึงจำเป็นต้องทำการตัดเนื้อเยื่อของรังไข่เพื่อตรวจนับจำนวนคอร์ปัสลูเตียม (Corpus lutium) ที่เกิดใหม่ๆ ในกรณีที่มีการตกไข่ และตรวจดูกราเฟียนฟอลลิเคิล (Graafian follicle) ที่ยังคงค้างอยู่ในกรณีที่ไม่มีการตกไข่ โดยเฉพาะในแฮมสเตอร์ที่ตรวจนับจำนวนไข่ที่ตกได้ 5 – 7 ฟอง เมื่อตรวจดูทางฮีสโตโลยีของรังไข่ หากยังคงพบมีกราเฟียนฟอลลิเคิลเหลืออยู่ สามารถ

i 17993350

วินิจฉัยได้ว่ามีการตกไข่ไม่สมบูรณ์ หรือพบเฉพาะคอร์ปัสลูเตียมในรังไข่ ไม่ปรากฏมีกราเฟียนฟอลลิเคิลเหลืออยู่ แสดงว่ามีการตกไข่ปกติ

8.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

8.1.1 Bouin' Fluid

ผสม Saturated picric acid solution ปริมาณ 70 มิลลิลิตร, 40% formadehyde ปริมาณ 25 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid ปริมาณ 5 มิลลิลิตร คนเข้าด้วยกัน เทเก็บใส่ขวดแก้วปิดฝาจุกให้เรียบร้อย

8.1.2 Ehrlich's acid haematoxylin

ชั่ง haematoxylin หนัก 8 กรัม ละลายใน 95% ethyl alcohol (หรือabsolute alcohol) ปริมาณ 400 มิลลิลิตร อุ่นใน water bath จนละลายเข้าด้วยกันดี จากนั้นชั่งpotash alum หนัก 8 กรัมละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน เติม glycerine 400 มิลลิลิตร และglacial acetic acid 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่ขวดอุดด้วยสำลีอย่างหลวมๆ ตั้งทิ้งให้ถูกแสงนาน 6 สัปดาห์ แต่ถ้าต้องการใช้ได้ทันทีให้เติม potassium permanganate 0.4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

8.1.3 0.5% Eosin in alcohol

ชั่ง Eosin Y หนัก 0.5 กรัม นำไปละลายใน 95% ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเทเก็บใส่ขวดแก้วปิดฝาจุกให้สนิท

8.2 การทำสไลด์

นำรังไข่ที่ fix เรียบร้อยแล้วในน้ำยา Bouin นาน 24 ชั่วโมง และแช่ใน 70% alcohol นาน 24 ชั่วโมง นำมา dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ในน้ำยา 80%

alcohol, 95% alcohol, 95% alcohol + n-butyl alcohol (50 : 50 ส่วน), n-butyl alcohol, n-butyl alcohol + xylol (50 : 50 ส่วน), xylol 1, xylol 2 ตามลำดับชั้นละ 1 ชั่วโมง ต่อมานำรังไข่ไปแช่ในส่วนผสมของ xylol กับ paraplast (50 : 50 ส่วน) ซึ่งหลอมเหลวอยู่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ย้ายต่อไปใน paraplast 2 ครั้งๆละ 1 ชั่วโมง และเก็บอยู่ในตู้อบเช่นเดิม นำรังไข่มา embeded ใน paraplast ทิ้งให้ paraplast แข็งตัวในอุณหภูมิห้องดีแล้ว จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่เตรียมนี้ไปทำการตัดด้วยเครื่อง microtome นำ section ที่ตัดออกมาเป็นสายยาวหนาชิ้นละ 8 ไมครอน ติด section ด้วย egg albumin โดยเลือกเอาเฉพาะ section เป็นช่วงๆ ใช้มีดบางๆตัดเอา section ชิ้นแรกของแถว จากนั้นเว้นช่วงไป 6 ชิ้นและตัดเอา section ชิ้นที่ 7 ทำเช่นนี้ตลอดจนหมด นำ section ที่ติดบนสไลด์แช่ใน xylol นาน 30 นาที เพื่อละลาย paraplast จากนั้น hydrate จนถึงน้ำตามลำดับชั้นละ 5 นาที นำไปย้อมสี Ehrlich's acid haematoxylin และ Eosin และ dehydrate ตามลำดับชั้นจนถึง n-butyl alcohol แช่ในxylol จนเนื้อเยื่อใส และ mount ด้วย permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์หาระยะที่สูงเตียมที่เกิดใหม่มีจำนวนเท่าไร และตรวจหาว่ามีกราเฟียนฟอลลิเคิลเหลือค้างอยู่มากน้อยเท่าไร

9. <u>การทำ Frozen section ของสมองเพื่อตรวจสอบหาบริเวณที่ฝังหลอดแก้ว</u>

9.1 <u>การเตรียมน้ำยาเคมี</u>

9.1.1 <u>Albrecht's alcoholic gelatin</u> (Albrecht, 1954)

ชั่งผง gelatin หนัก 1.5 กรัม ละลายในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียส 120 มิลลิลิตร โดยค่อยๆโรยผง gelatin ลงไป คนให้เข้ากันประมาณ 10 นาที เมื่อละลายดีแล้วจึงเติม absolute alcohol 80 มิลลิลิตร ลงไปช้าๆคนให้เข้ากัน เทใส่ขวดแก้วปิดฝาจุกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9.1.2 0.5% Cresyl Violet

ชั่ง cresyl violet หนัก 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บเอาไว้เป็น stock solution เมื่อจะใช้จึงกรองและเติม glacial acetic acid (dilute 1 : 10)4 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร

9.2 การตัดและติด sections บนสไลด์

นำส่วนสมองที่แกะจากสัตว์ทดลองและดองใน 10% formalin จนแข็งดีแล้ว มาติดบนแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง Cryostat, IEC โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยา cryoform แล้วทำให้เย็นจัดโดยใส่ในเครื่อง cryostat ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสทันที ทิ้งไว้ในเครื่องนานประมาณ 1 คืน เพื่อให้เนื้อเยื่อสมองแข็งและเย็นจัดทั่วกันตลอดทั้งชิ้น แล้วตัด sections หนา 24 ไมครอน นำแต่ละ section ที่ตัดได้ใส่ใน Albrecht's alcoholic gelatin นาน 5 นาที แล้วใช้ภู่กันช้อนช้อน section วางบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้น้ำระเหยจนแห้ง ซับด้วยกระดาษจนเนื้อเยื่อแห้งดีแล้ว section จะติดบนสไลด์ด้วย gelatin ที่เหลืออยู่ จากนั้นนำไปแช่ใน 95% ethyl alcohol แล้ว hydrate ต่อจนถึงน้ำ นำไปย้อมสี cresyl violet

9.3 การย้อมสี cresyl violet (Fernstrom, 1958)

นำ sections ที่ติดบนสไลด์แช่ใน 0.5% cresyl violet นาน 3 – 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปใส่ใน 70% ethyl alcohol เพื่อให้สีหลุดออกจากเนื้อเยื่อบ้าง นำไปผ่านใน 95% ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว แล้วแช่ใน chloroform นานอย่างน้อย 20 นาที differentiate ใน 95% ethyl alcohol จนได้สีตามความต้องการ dehydrate ใน n-butyl alcohol 2 ครั้ง จากนั้นแช่ให้เนื้อเยื่อนี้ใสใน xylol และ mount ด้วย permount

10. <u>การทดลองเปรียบเทียบผลของฮอร์โมนทั้ง 5 ชนิด ที่มีต่อสมองตำแหน่งต่างๆที่ควบคุมการหลั่งโกนาโดโทรฟินฮอร์โมนโดยเฉียบพลัน ซึ่งสังเกตผลจากการตกไข่</u>

การทดลองใช้แฮมสเตอร์ทั้งสิ้น 248 ตัว โดยใช้เฉพาะเพศเมียที่มีวงสืบพันธุ์ปกติติดต่อกัน 3 วงเป็นอย่างน้อย และอยู่ในระยะโปรอีสตรัส ชั่งน้ำหนักตัวก่อนทำการฝังฮอร์โมน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟีนอบาร์บิทอลที่ฉีก พบว่าในแฮมสเตอร์ที่ฉีดฟีนอบาร์บิทอลปริมาณ 10 มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าทางใต้ผิวหนัง เวลา 13.30 น. ของวันโปรอีสตรัส สามารถยับยั้งการตกไข่ได้ดีที่สุด (Norman, Blake and Sawyer, 1973a; วชิโรดม, 2515) การทดลองนี้แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆได้ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> (Control) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1ก</u> (Control 1) ฝังหลอดแก้วแคพพิลารีซึ่งไม่ได้บรรจุฮอร์โมนและฉีดฟีนอบาร์บิทอล ใช้แฮมสเตอร์ทั้งสิ้น 24 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 5 กลุ่ม ตามตำแหน่งในสมองที่ใช้ฝังหลอดแก้วดังกล่าว คือ

1. บริเวณ ME ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว
2. บริเวณ medial POA ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
3. บริเวณ lateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
4. บริเวณ amygdaloid nucleus (ด้านซ้าย) ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
5. บริเวณ ventromedial hypothalamic nucleusใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

<u>กลุ่มที่ 1ข</u> (Control 2) ฝังหลอดแก้วแคพพิลารีซึ่งไม่ได้บรรจุฮอร์โมนและฉีดน้ำมันมะกอก 0.33 มิลลิลิตร ต่อ น้ำหนักตัว 100 กรัม ใช้แฮมสเตอร์ทั้งสิ้น 24 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 5 กลุ่ม คือ

1. บริเวณ ME ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว
2. บริเวณ medial POA ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

3. บริเวณ lateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 5 ตัว

4. บริเวณ amygdaloid nucleus (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 5 ตัว

5. บริเวณ ventromedial hypothalamic nucleus ใช้แอมสเตอร์ 5 ตัว

กลุ่มที่ 2 (โปรเจสเตอโรน) ฝังหลอดแก้วแคพพิลารีซึ่งบรรจุฮอร์โมนโปรเจส - เตอโรนและฉีดฟีนอบาร์บิทอล ใช้แอมสเตอร์ทั้งสิ้น 52 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 5 กลุ่ม คือ

1. บริเวณ ME ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

2. บริเวณ medial POA ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

3. บริเวณ lateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 11 ตัว

4. บริเวณ amygdaloid nucleus (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 11 ตัว

5. บริเวณ ventromedial hypothalamic nucleus ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

กลุ่มที่ 3 (ดีออกซีคอร์ติคอสเตอโรน อะซิเตท) ฝังหลอดแก้วแคพพิลารีซึ่งบรรจุฮอร์โมนดีออกซีคอร์ติคอสเตอโรน อะซิเตท และฉีดฟีนอบาร์บิทอล ใช้แอมสเตอร์ทั้งสิ้น 45 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 5 กลุ่ม คือ

1. บริเวณ ME ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

2. บริเวณ medial POA ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

3. บริเวณ lateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

4. บริเวณ amygdaloid nucleus(ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 11 ตัว

5. บริเวณ ventromedial hypothalamic nucleus ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

กลุ่มที่ 4 (คอร์ติซอล) ฝังหลอดแก้วแคพพิลารีซึ่งบรรจุฮอร์โมนคอร์ติซอล และฉีดฟีนอบาร์บิทอล ใช้แอมสเตอร์ 43 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 4 กลุ่ม คือ

1. บริเวณ medial POA ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

2. บริเวณ lateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

3. บริเวณamygdaloid nucleus (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 15 ตัว

4. บริเวณ ventromedial hypothalamic nucleus ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

กลุ่มที่ 5 (เมลาโตนิน) ฝังหลอดแก้วแคพิลารีซึ่งบรรจุฮอร์โมนเมลาโตนินและฉีดฟีนอบาร์บิทอล ใช้แอมสเตอร์ 44 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 5 กลุ่ม คือ

1. บริเวณ ME ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

2. บริเวณmedial POA ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

3. บริเวณlateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

4. บริเวณamygdaloid nucleus (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

5. บริเวณventromedial hypothalamic nucleus ใช้แอมสเตอร์ 10 ตัว

กลุ่มที่ 6 (17 แอลฟาไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน) ฝังหลอดแก้วแคพิลารีซึ่งบรรจุฮอร์โมน 17 แอลฟาไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน และฉีดฟีนอบาร์บิทอลใช้แอมสเตอร์ทั้งสิ้น 16 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1. บริเวณME ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

2. บริเวณlateral POA (ด้านซ้าย) ใช้แอมสเตอร์ 8 ตัว

แผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 แผนผังแสดงจุดหลัก (0,0) และตำแหน่งสำคัญในสมองที่ทำการฝังฮอร์โมน

อักษรย่ออธิบายภาพ

AP = Anterior lobe of pituitary gland

ARC = Arcuate nucleus

DMH = Dorsomedial hypothalamic nucleus

MAM = Mammilary nucleus

PH = Posterior hypothalamic nucleus

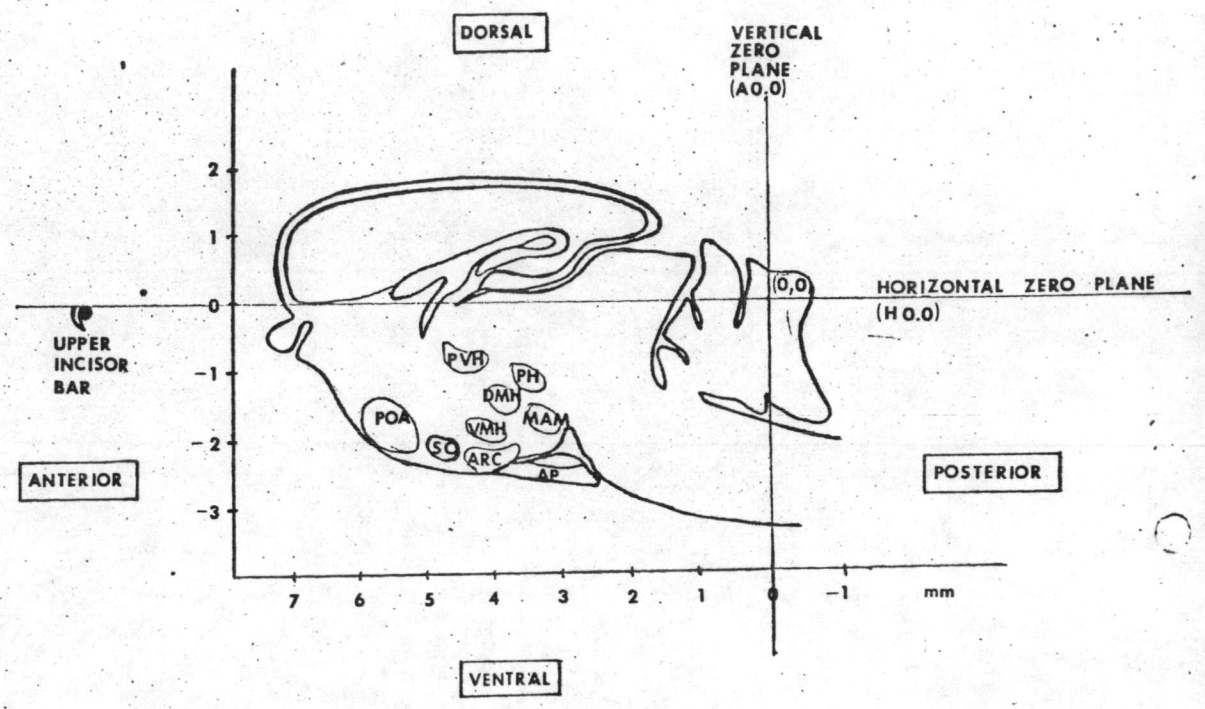
POA = Preoptic area

PVH = Paraventricular hypothalamic nucleus

SO = Supraoptic nucleus

VMH = Ventromedial hypothalamic nucleus

แผนภาพที่ 1


DORSAL
VERTICAL ZERO PLANE (A0.0)
HORIZONTAL ZERO PLANE (H0.0)
(0,0)
UPPER INCISOR BAR
ANTERIOR
POSTERIOR
VENTRAL
PVH
PH
DMH
MAM
POA
VMH
SO
ARC
AP
2
1
0
−1
−2
−3
7
6
5
4
3
2
1
0
−1
mm

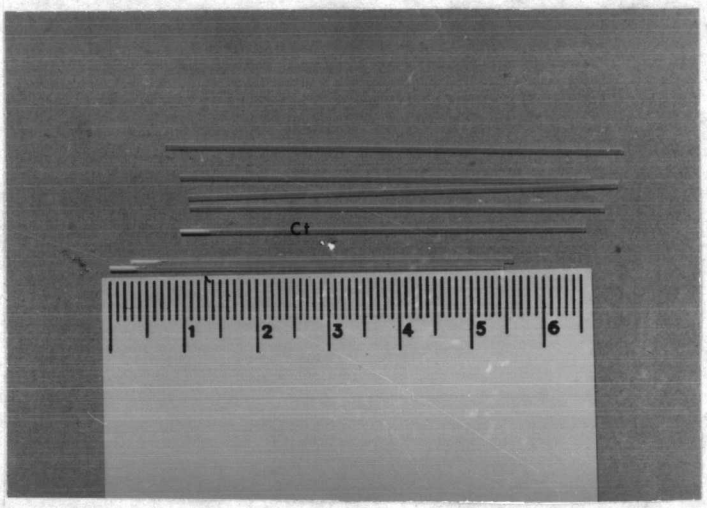
แผ่นภาพที่ 1

รูปที่ 1 แสดงหลอดแก้วแคพพิลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงนอก 0.7 – 0.8 มิลลิเมตร ยาว 5.0 – 5.5 เซนติเมตร ซึ่งใช้สำหรับฝังลงไปในสมองของแฮมสเตอร์ 4 หลอดบนเป็นหลอดเปล่า ส่วน 3 หลอดล่างบรรจุฮอร์โมนที่ต้องการฝังสูงจากปลายหลอดแก้วประมาณ 3 – 4 มิลลิเมตร

อักษรย่ออธิบายภาพ

Ct = Capillary tube

แผนภาพที่ 1



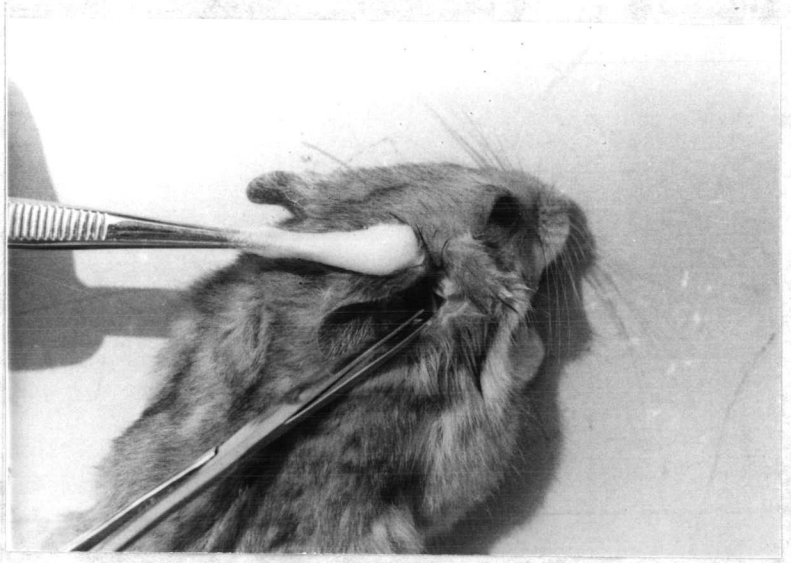
รูปที่ 1

แผนภาพที่ 2

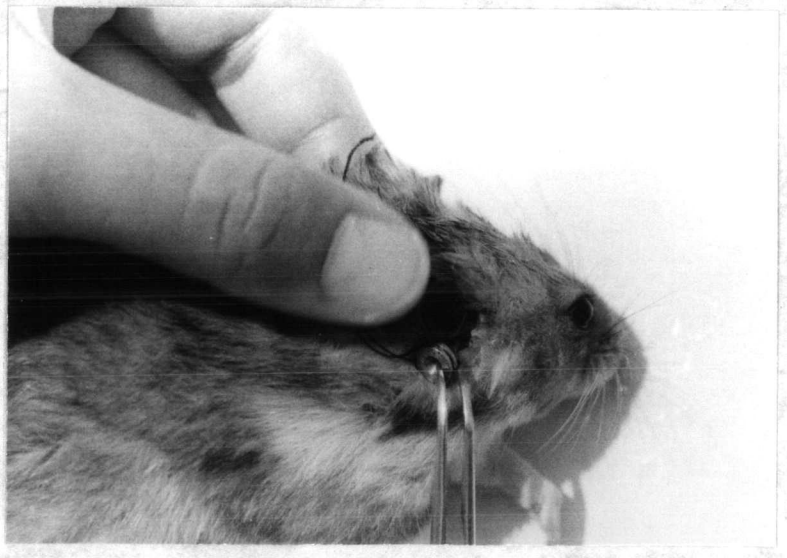
รูปที่ 2ก แสดงการใช้กรรไกรปลายแหลมขลิบหูส่วนนอกตรงบริเวณที่ติดกับลำตัวให้ขาดออกจากกันเล็กน้อย เพื่อสะดวกในการสอด ear clip

รูปที่ 2ข แสดงการสอด ear clip เข้าในช่อง external meatus

แผนภาพที่ 2



รูป 2ก



รูป 2ข

แผ่นภาพที่ 3

แสดงการฝังฮอร์โมนในสมองที่บริเวณต่างๆ

รูปที่ 3ก การจัดแฮมสเตอร์เข้ายึดกับเครื่องมือสเตอริโอแทคซิส

รูปที่ 3ข การเลื่อนหลอดแก้วแคพพิลารีลงในสมองตำแหน่งต่างๆที่ต้องการฝัง

รูปที่ 3ค การปิดบาดแผลภายหลังการฝังฮอร์โมนด้วยเดนทอลซีเมนต์ (ชนิดนัมเบอร์ 45) ในภาพเห็นสกรู 1 ตัวสำหรับยึดหลอดแก้วและเดนทอลซีเมนต์ให้อยู่กับที่

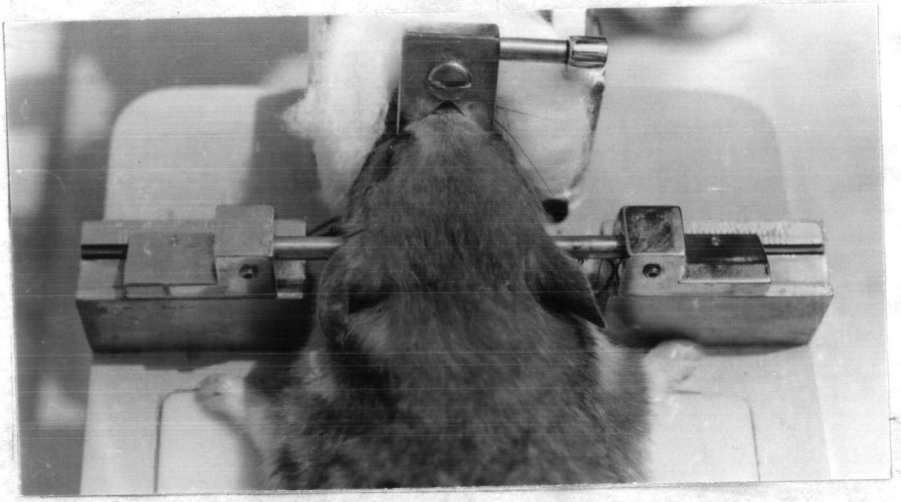
กำลังขยาย รูป 3ค x 2.5

อักษรย่อในภาพ

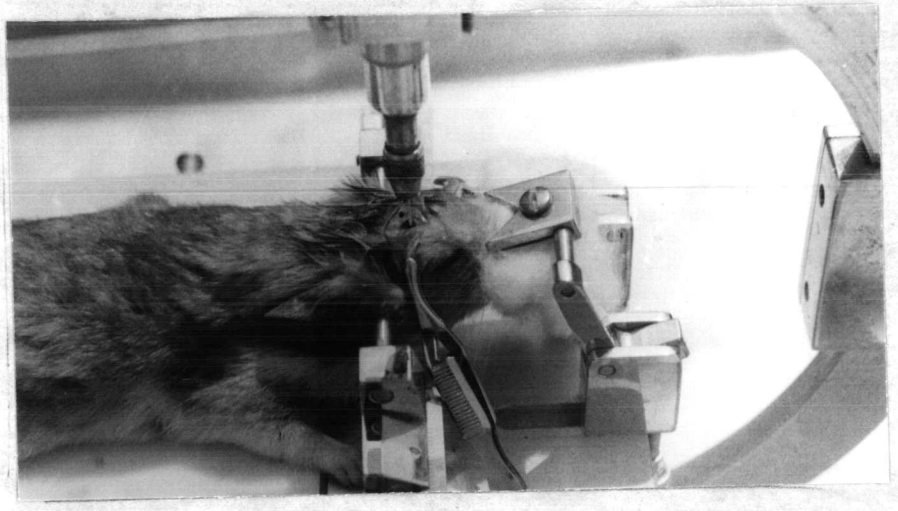
Dc = Dental cement

S = Screw

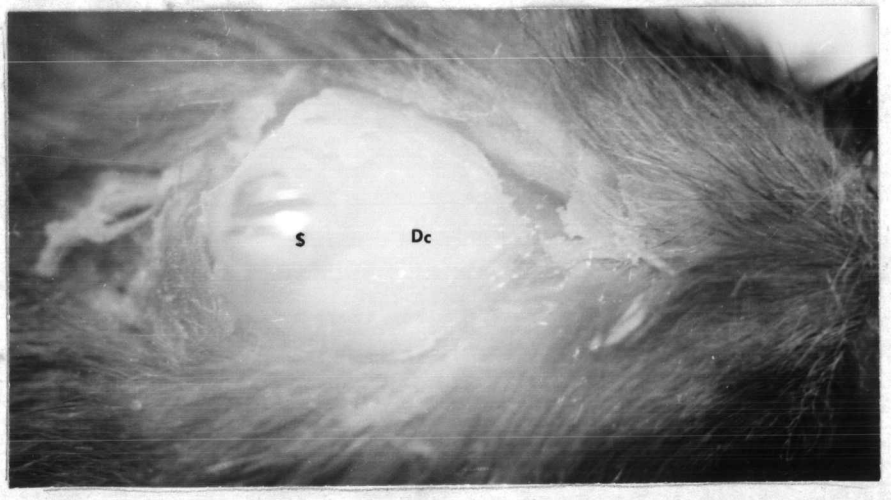
แผนภาพที่ 3



รูป 3ก



รูป 3ข



รูป 3ค

แผนภาพที่ 4

รูปที่ 4 แสดงท่อนำไข่ ส่วนที่ติดกับรังไข่จะมีลักษณะบวมใหญ่กว่าส่วนอื่น

กำลังขยาย x 2.5

อักษรย่ออธิบายภาพ

Od = Oviduct

Ut = Uterus

แผ่นภาพที่ 4

รูปที่ 4