บทที่ ๓

วิธีดำเนินการทดลอง

๑. วิธีเลี้ยงกระแตที่ใช้ในการทดลอง

กระแตทุกตัวที่ใช้ในการทดลองนี้เลือกใช้เฉพาะตัวผู้ที่โตเต็มวัยแล้ว โดยรับซื้อจากพ่อค้าที่นำมาขายบริเวณตลาดนัดสนามหลวง แล้วนำมาเลี้ยงในห้องที่ได้รับแสงสว่างและอุณหภูมิตามธรรมชาติ อาหารคือกล้วยน้ำว้าสุก และให้ดื่มน้ำประปาธรรมดา.

๒. วิธีการตอน (Castration)

การผ่าตัดกระทำในขณะที่สัตว์ถูกให้ดมยาสลบ (ether) เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (๒.๕ % Dettol) ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังที่ถุงอัณฑะเหนือ penis ให้เปิดเป็นช่องกว้างประมาณ ๐.๕ ซ.ม. ทาน้ำยา Dettol บริเวณหนังและขนบริเวณรอบช่องที่เปิด ใช้ปากคีบดึงเยื่อไขมันและเยื่อที่หุ้มอัณฑะออกมา อัณฑะและ epididymis จะติดขึ้นมาด้วย ใช้กรรไกรตัดถุงที่หุ้มออก แล้วใช้ปากคีบเล็กดึงเอาอัณฑะออกมา ใช้ไหมผูกเส้นเลือดที่เชื่อมต่อระหว่างอัณฑะและ epididymis เพื่อป้องกันไม่ให้เสียเลือดมาก จากนี้จึงใช้กรรไกรปลายโค้งขนาดเล็กค่อย ๆ ตัดเอาอัณฑะออก ใช้ปากคีบเล็กเก็บ epididymis กลับเข้าไปในถุงอัณฑะตามเดิม ใช้ไหมเย็บหนังที่ถุงอัณฑะให้ติดกันแล้วทาน้ำยา Dettol บริเวณแผลอีกครั้งหนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อโรค

๓. วิธีการฆ่า (Autopsy)

006130

ใช้วิธีให้ดม ether จนตาย แล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดถุงอัณฑะ ตัดอัณฑะและ epididymis ข้างขวา เล็มเยื่อไขมันออก แล้วเปิดหน้าท้องเหนือถุงอัณฑะ ตัดเอาต่อม prostate และ seminal vescicle ออก นำเนื้อ

เยื่อทั้งหมดนี้มาศึกษาทาง histochemistry ส่วน testis และ epididymis ข้างซ้ายนำมาแช่ในน้ำยา Heidenhain's Susa เพื่อศึกษาลักษณะทาง histology ต่อไป.

๔. การทำ cryostat section เพื่อศึกษา activity ของ acid phosphatase, alkaline phosphatase, adenosine, triphosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, succinic dehydrogenase, ตามวิธีทาง histochemistry.

นำ testis และ epididymis ข้างขวา รวมทั้ง prostate gland และ seminal vesicle มาทำให้เย็นจนแข็งทันที ด้วยน้ำแข็งแห้งหลังจากตัดจากตัวสัตว์ แล้วใช้เครื่อง cryostat (IEC Model CTD) ตัด section หนา ๘ u ติดบน cover glass นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ -๔๐° C โดยใช้เครื่อง high vacuum (Edwards Model EPTD 3) ทำการทดลองตามวิธีต่อไปนี้

๔.๑ วิธีการศึกษา histochemistry ของ acid phosphatase (Gomori, 1950)

หลักการ

เมื่อ Incubate section กับ acid phosphatase substrate (pH 5.0) acid phosphatase จะ hydrolyse sodium β-glycerophosphate โดยมี Pb^{++} ion เป็นตัวจับกับ phosphate ที่เกิดขึ้นกลายเป็น lead phosphate ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ yellow ammonium sulphide เกิดเป็น lead sulphide เป็นตะกอนสีน้ำตาลตรงบริเวณที่มี acid phosphatase activity

วิธีการทดลอง

Incubate section ใน acid phosphatase substrate ที่อุ่นใน waterbath ที่มีอุณหภูมิ ๓๗° C เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง นำเอา section มาล้างน้ำ เสร็จแล้วนำไปจุ่มใน ๑ % yellow ammonium sulphide ๑ นาที ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น mount ด้วย glycerine jelly บน slide ที่สะอาด ใช้ยาทาเล็บยาขอบเพื่อป้องกันไม่ให้ section แห้ง นำมาตรวจดู acid phosphatase activity ด้วยกล้องจุลทัศน์ จะเห็นสีน้ำตาลของ lead sulphide ตรงบริเวณที่มี acid phosphatase activity.

๔.๒ วิธีการศึกษา histochemistry ของ alkaline phosphatase (Gomeri, 1950)

หลักการ

เมื่อ incubate section กับ alkaline phosphatase substrate (pH 9.2-9.8) alkaline phosphatase จะ hydrolyse sodium β-glycerophosphate โดยมี Ca^{++} ion เป็นตัวจับ phosphate มี Mg^{++} ion เป็นตัว activator และเมื่อเอามาจุ่มใน Cobalt nitrate cobalt ion จะแลกเปลี่ยนกับ Ca^{++} ion กลายเป็น cobalt phosphate ซึ่งเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ yellow ammonium sulphide จะเกิดตะกอนสีดำของ cobalt sulphide ตรงบริเวณที่มี alkaline phosphatase activity.

วิธีการทดลอง

Incubate section ใน alkaline phosphatase substrate ที่อุ่นใน waterbath อุณหภูมิ ๓๗° C เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ๑ นาที จุ่มใน ๒ % cobalt nitrate ๕ นาที ล้าง

ด้วยน้ำประปา ๑ นาที แล้วนำไปจุ่มในน้ำ ๑ % yellow ammonium sulphide ๑ นาที ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น mount ด้วย glycerine jelly บน slide ที่สะอาด ใช้ยาทาเล็บยาขอบ นำเอา section ที่ย้อมสีเสร็จแล้วมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะเห็นสีดำของ cobalt sulphide ติดอยู่ตรงบริเวณที่มี alkaline phosphatase activity.

๔.๓ วิธีการศึกษา histochemistry ของ adenosine triphosphatase (Padykula and Herman, 1955)

นำ frozen section มา incubate ใน substrate medium ประกอบด้วย ATP (disodium salt) เป็น substrate ของ enzyme, Barbiturate buffer pH 9.4 และมี calcium chloride เป็น activator จะเกิดตะกอน calcium phosphate ใช้โลหะ cobalt จาก cobaltous chloride แทนที่ calcium ion ใน calcium phosphate นำ cobalt phosphate มาทำปฏิกิริยากับ ammonium sulphide จะเกิดตะกอน cobalt sulphide สีดำที่บริเวณที่มีเอนไซม์ ATP ase ปรากฏอยู่เดิมบน tissue (Pearse, 1961)

วิธีการทดลอง

Incubate section ใน substrate medium ที่ประกอบด้วย ๒๐ ml. ๐.๑ M. sodium barbiturate, ๑๐ ml. ๐.๑๘ M. calcium chloride, ๓๐ ml. distilled water, ๑๕๒ mg. ATP (disodium salt) ปรับ pH เป็น ๙.๔ โดยใช้ ๐.๑ M. NaOH เติมน้ำให้ครบ ๑๐๐ ml. (เตรียมทันทีก่อนใช้) incubate ใน waterbath อุณหภูมิ ๓๗° C เป็นเวลา ๑๕ นาที แล้วล้างด้วย ๑ % calcium chloride ๓ ครั้ง ผ่านลงในสารละลาย ๒ % cobaltous chloride ๓ นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ ๑ % yellow ammonium sulphide ๑ นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้น

dehydrate ด้วย alcohol clear ด้วย xylene แล้ว mount ด้วย caedex

๔.๔ วิธีการศึกษา histochemistry ของ glucose-6-phosphate dehydrogenase (Nachlas, Walker and Seligman, 1958)

หลักการ

เมื่อนำ frozen section มา incubate ใน substrate medium ที่ประกอบด้วย glucose-6-phosphate (sodium salt) เป็น substrate ของ enzyme อยู่ใน veronal buffer pH ๗.๔ nitro blue tetrazolium salt (nitro-BT) เป็น electron acceptor และ NADP เป็น co-enzyme ในตอนต้น nitro-BT ที่อยู่ในสภาพปกติของ ditetrazolium salt จะไม่มีสี เมื่อถูกนำมาใช้เป็น electron acceptor จะเปลี่ยนสภาพมาอยู่ในรูป diformazan เป็นผลึกสีน้ำเงิน

วิธีการทดลอง

Imcubate section ใน substrate medium ที่ประกอบด้วย veronal buffer pH 7.4 (เตรียมจาก veronal acetate solution ๕ ml, ๐.๑ M. HCl ๕ ml, น้ำกลั่น ๑๕ ml.) ๕ ml., nitro-BT ๒.๕ mg., glucose-6-phosphate ๑๕ mg. และ NADP ๒.๕ mg) incubate ใน waterbath อุณหภูมิ ๓๗°C เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้ว fix tissue ด้วย ๑๐ % formal saline ๑๐ นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ๒ ครั้ง นำ section บน cover glass มาติดบน slide โดยใช้ glycerine jelly เป็น mounting media

๔.๕ วิธีการศึกษา histochemistry ของ succinic dehydrogenase (Nachlas et al., 1957)

หลักการ

นำ frozen section มา incubate ใน substrate medium ประกอบด้วย sodium succinate เป็น substrate ของเอนไซม์อยู่ใน phosphate buffer pH ๗.๖ และ nitro blue tetrazolium salt (nitro-BT) เป็น electron acceptor (Pearse, ๑๙๖๑) ในตอนต้น nitro-BT ที่อยู่ในสภาพปกติของ ditetrazolium salt จะไม่มีสี เมื่อถูกนำมาใช้เป็น electron acceptor จะเปลี่ยนสภาพมาอยู่ในรูป diformazan เป็นผลึกสีน้ำเงิน

วิธีการทดลอง

Incubate section ใน substrate medium ที่ประกอบด้วย buffer succinate (เตรียมจาก ๐.๒๕ M. phosphate buffer pH ๗.๖ ปริมาณเท่า ๆ กับ ๐.๒๕ M. sodium succinate) ๕๐ ml. รวมกับ ๑๐ ml. aq. nitro-BT (๑ mg/ml.) incubate ใน waterbath อุณหภูมิ ๓๗°C เป็นเวลา ๑๕ นาที ล้าง section ด้วย ๐.๘๗ % saline และ fix tissue ด้วย ๑๐ % formal saline ๑๐ นาที dehydrate ด้วย ๑๕ % ethyl alcohol นาน ๕ นาที นำ section บน cover glass มาติดบน slide โดยใช้ glycerine jelly เป็น mounting media.

๕. การทำ paraffin section ของ testis และ epididymis เพื่อศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อ

นำ testis และ epididymis ข้างซ้ายมาแช่ในน้ำยา Heidenhain's Zusa นาน ๔๘ ชั่วโมง dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน ๗๐ % alcohol ๒๔ ชั่วโมง ๘๐ % alcohol ๑ ชั่วโมง ๘๐ % alcohol ๑๒ ชั่วโมง ๙๕ % alcohol ๒ ครั้ง ๆ ละ ๖ ชั่วโมง absolute alcohol ๖ ชั่วโมง $xylene_1$ ๑ ชั่วโมง $xylene_2$ ๑ ชั่วโมง xylene + melted wax ๑ ชั่วโมง wax_1 ๑ ชั่วโมง wax_2 ๑ ชั่วโมง นำมา embed

ใน paraffin wax ตัด section หนา ๘ μ ย้อมสี Ehrlich's acid haematoxylin และ ๐.๕ % alc. eosin dehydrate ด้วย alcohol clear ด้วย xylene แล้ว mount ใน caedex.

แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้กระแตเพศผู้ที่เติบโตเต็มวัยแล้วรวมทั้งสิ้น ๗๔ ตัว ทำการศึกษาในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๑๘ ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. ๒๕๑๙ แบ่งการทดลองออกเป็น

๑. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ acid phosphatase, alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase, succinic dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase ใน testis, epididymis, prostate gland และ seminal vesicle โดยวิธีวิเคราะห์ทาง histochemistry

๑.๑ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะปกติ

๑.๒ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากฉีด normal saline ๑ วัน

๑.๓ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากฉีด olive oil ๓ วัน

๑.๔ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากฉีด CA ๒๕ mg/day เป็นเวลา ๓ วัน

๑.๕ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากฉีด TP ๓ mg/day เป็นเวลา ๓ วัน

๑.๖ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากฉีด α-chlorohydrin ๖ mg/day เป็นเวลา ๑ วัน

๑.๗ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายหลังจากการ castration เป็นเวลา ๑๐ วัน

๒. ศึกษาลักษณะทาง histology ของ testis และ epididymis

ศึกษาลักษณะทาง histology เพื่อประกอบภาพที่ได้จากทาง histochemistry และใช้สัตว์ทดลองชุดเดียวกันกับการทดลองในข้อ ๑.