

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุประมาณ 6 สัปดาห์ที่มี น้ำหนักตัวระหว่าง 120-150 กรัม ซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต. ศาลายา จ. นครปฐม



ภาพ 3 แสดงลักษณะภายนอกของหนูขาวสายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

- 2.1 กรงสเตนเลสขนาด 36 x 22 x 15 ซม.
- 2.2 อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด
- 2.3 ขวดน้ำพร้อมจุกยางพร้อมหลอดให้อาหาร
- 2.4 ขี้เลื่อย
- 2.5 ถังพลาสติกสีดำ
- 2.6 เทปกาวยใส

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้กับสัตว์ทดลอง

- 3.1 เข็มป้อนสาร
- 3.2 กระบอกเข็มฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร
- 3.3 น้ำกลั่น
- 3.4 สารสกัดจากหนอนตายหยาก

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากรากหนอนตายหายาก

- 4.1 แท่งแก้วคนสาร
- 4.2 บีกเกอร์
- 4.3 กระบอกตวง
- 4.4 กระดาษชั่งสาร
- 4.5 น้ำกลั่น
- 4.6 เครื่องระเหย Rotary evaporator
- 4.7 ช้อนตักสาร



5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดและชั่งน้ำหนักตัว, น้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์และต่อมช่วยสืบพันธุ์ของหนู

- 5.1 โกลบ
- 5.2 เครื่องชั่ง
- 5.3 สำลี
- 5.4 Chloroform
- 5.5 เครื่องมือผ่าตัด
- 5.6 ถาดรองผ่าตัด
- 5.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น AB204-S

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับความหนาแน่นของอสุจิ

- 6.1 กรรไกรผ่าตัด
- 6.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
- 6.3 หลอดหยอด
- 6.4 Haemocytometer
- 6.5 NaCl 0.85%
- 6.6 Micropipette ยี่ห้อ Finnpiptette รุ่น FP Focus 10-100 ul Long
- 6.7 Micropipette ยี่ห้อ Finnpiptette รุ่น FP Focus 100-1,000 ul Long
- 6.7 Petri dish
- 6.8 Cell counter

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดระดับ Malondialdehyde ใน testis

- 7.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น AB204-S
- 7.2 เครื่องมือผ่าตัด
- 7.3 pH Buffer
- 7.4 Micropipette ยี่ห้อ Finnpiptette รุ่น FP Focus 10-100 ul Long
- 7.5 เครื่อง High Speed Microcentrifuge ยี่ห้อ Labogene รุ่น ScanSpeed 1730 MR
- 7.6 กระดาษชั่งน้ำหนัก
- 7.7 เครื่อง Homogenize ยี่ห้อ MP รุ่น FastPrep-24
- 7.8 หลอดบดสารพร้อมเม็ด beat
- 7.9 Appendorf ยี่ห้อ Hycon ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 7.10 หลอดทดลอง
- 7.11 หม้อต้มน้ำ
- 7.12 Micropipette ยี่ห้อ Finnpiptette รุ่น FP Focus 100-1,000 ul Long
- 7.13 เครื่องวัดความเข้มข้นของสารละลายโดยใช้แสง รุ่น Thermo Scientific ; Genesys 20
- 7.14 เครื่อง Direct Freezer -40°C ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-U5410
- 7.15 Normal Saline 0.85%
- 7.16 Trichloroacetic acid (TCA)
- 7.17 Thiobarbituric (TBA reagent)
- 7.18 น้ำกลั่น
- 7.19 เครื่อง Vortex Mixer ยี่ห้อ Gemmy Industrial Corp. รุ่น VM300

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อวิทยา

- 8.1 ขวดเก็บตัวอย่าง
- 8.2 อ่างพาราฟิน
- 8.3 เข็มเย็บ (needle)
- 8.4 ปากคีบ (forceps)
- 8.5 กระดาษอะลูมิเนียม
- 8.6 Petri dish
- 8.7 น้ำประปา

- 8.8 คัตเตอร์
- 8.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
- 8.10 บล็อกพลาสติก
- 8.11 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแข็งอัตโนมัติ (SLEE 5062, MAINZ, Germany)
- 8.12 พู่กัน
- 8.13 Slides
- 8.14 Cover glass
- 8.15 Hot plate
- 8.16 กล่องสำหรับเก็บ Slides ขนาด 100 แผ่น
- 8.17 ชุดย้อมสี
- 8.18 นาฬิกาจับเวลา
- 8.19 กล้องจุลทรรศน์
- 8.20 Ethanol ที่ความเข้มข้น 70, 85 และ 95%
- 8.21 Bouin's solution
- 8.22 Xylene (ACI Labscan)
- 8.23 Hematoxylin (Fluka)
- 8.24 Eosin (Fluka)
- 8.25 น้ำยา permount
- 8.26 Destain (1% acid alcohol)
- 8.27 Stop-destain (70% alcohol)

9. อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกผลการทดลอง

- 9.1 สมุดบันทึก
- 9.2 กล้องถ่ายภาพ
- 9.3 ปากกา

10. สถานที่ในการทำการวิจัย

- 10.1 อาคารสัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 10.2 หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช (Plant Natural Product Research unit)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัดและการป้อนสารให้กับหนูทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดหนอนตายหยาก

รากหนอนตายหยากทั้ง 2 ชนิดถูกเก็บรวบรวมจากจังหวัดลำปาง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช (Plant Natural Product Research unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับรากหนอนตายหยากที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และได้รับความกรุณาจาก Mr. James F. Maxwell ในการจำแนกชนิดของหนอนตายหยาก โดยตัวอย่างของพืชนั้นจะเก็บไว้ใน CMU herbarium ภายใต้หมายเลข 09-111

การสกัดสารสำคัญที่อยู่ในรากของหนอนตายหยากทั้ง 2 ชนิดนั้น ขั้นตอนแรกนำรากหนอนตายหยากแต่ละชนิดมาสับให้ละเอียดและนำไปอบแห้งภายใต้อุณหภูมิ 50°C เพื่อให้ได้อุณหภูมิที่คงที่ หลังจากนั้นแช่รากหนอนตายหยากที่อบแห้งแล้วใน 95% ethanol (สารสกัด) ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 3 วัน เพื่อสกัดสารที่อยู่ในราก เมื่อครบกำหนดนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ซึ่งสารสกัดที่กรองได้จะนำไประเหยด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่ 50°C และนำไปทำ freeze dry ผลลัพธ์สุดท้ายจะได้สารสกัดหยากเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้มที่เก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

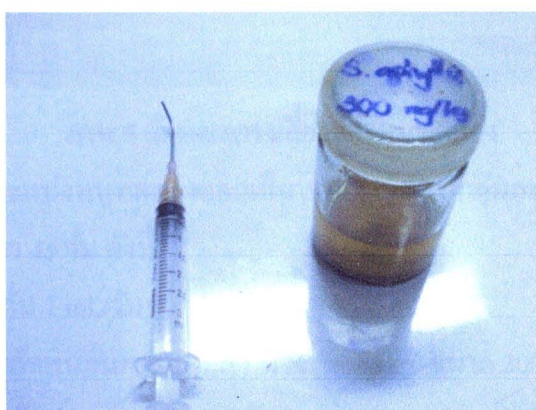
สำหรับสารสกัดจากรากหนอนตายหยากที่ใช้ป้อนให้กับหนูทดลองนั้น นำสารสกัดหยากที่เตรียมไว้ข้างต้นไปละลายในน้ำกลั่น (ตัวทำละลาย) ให้มีระดับความเข้มข้น 36 (เท่ากับขนาด 300 มก/กก นน. ตัว) และ 60 mg/ml (เท่ากับขนาด 500 mg/kg BW) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมจริงใช้ในการกำจัดแมลง (100 g/l) (อำนวย, 2535) โดยกำหนดที่ความเข้มข้นต่ำมากกว่าระดับที่ใช้จริง เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากรากหนอนตายหยากต่อระบบสืบพันธุ์ที่อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำได้ ในวิธีการสกัดสารจากรากหนอนตายหยากในงานวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช (Plant Natural Product Research unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. วิธีการป้อนสารให้กับหนูทดลอง

การป้อนน้ำกลั่น ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 15 ที่ตัดปลาย ลบคมให้ทุทุ ทำให้โค้งเพื่อสะดวกในการป้อนและต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร

การป้อนสารสกัด

การป้อนสารสกัดในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากหนอนตากหยากนั้นใช้กระบอกฉีดยา ขนาดเดียวกันกับการป้อนน้ำกลั่น ใช้กระบอกฉีดยาคูสารปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้น้ำโป๊งและน้ำมือซ้ายจับรวบบริเวณคอกหนู เพื่อบังคับปากมีช่องว่างเพื่อป้อนสารเข้าไป ส่วนนิ้วที่เหลือใช้บังคับและพยุงหนูให้นิ่ง โดยสอดท้ายหนูจะอยู่ในลักษณะอ้าปากเล็กน้อย ค่อยๆ สอดเข็มเข้าไปมุมปากทางด้านซ้ายให้ถึงหลอดอาหารลึกพอประมาณแล้วจึงป้อนสารเข้าไปอย่างรวดเร็วและระวังอย่าให้เข็มสอดผิดเข้าไปในบริเวณหลอดลม ซึ่งอาจทำให้หนูสำลักได้



ภาพ 4 ลักษณะเข็มป้อนสารสกัดแก่หนูทดลอง (ซ้าย) และสารสกัดจากหนอนตากหยากที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ในการเลี้ยงหนูทดลองจะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง คือช่วงสว่างตั้งแต่เวลา 7.00 น. ถึง 19.00 น. และช่วงมืดตั้งแต่เวลา 19.00 น. ถึงเวลา 7.00 น. ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำตามปกติตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

ระบบเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลองของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (หมายเลข Re. 002/10)



ภาพ 5 ลักษณะกรงเลี้ยงของหนูทดลอง

โดยการทำวิจัยจะแบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ใช้หนูกลุ่มละ 8 ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับสารทางปากเป็นระยะเวลา 45 วัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่น 1 ml./วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดหนอนตายหยากรชนิด *Stemona* sp. ขนาด 300 mg./kg. BW

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดหนอนตายหยากรชนิด *Stemona* sp. ขนาด 500 mg./kg. BW

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดหนอนตายหยากรชนิด *S. aphylla* ขนาด 300 mg./kg. BW

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดหนอนตายหยากรชนิด *S. aphylla* ขนาด 500 mg./kg. BW

ซึ่งตลอดระยะเวลาการทดลองจะชั่งน้ำหนักหนูสัปดาห์ละครั้ง เมื่อครบระยะเวลา 45 วันของการให้สาร จะทำให้หนูหมดความรู้สึกด้วย chloroform แล้วผ่าตัดแยกเอาส่วนของ อัณฑะ, prostate gland, seminal vesicle และ epididymis เพื่อนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระบบสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้ต่อไป

4. การตรวจสอบผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบผลทางเนื้อเยื่อ

หลังจากชั่งน้ำหนักของอัณฑะ, prostate gland, seminal vesicle และ epididymis นำตัวอย่างของอวัยวะทั้งหมด ได้แก่ อัณฑะ (ซ้าย), prostate gland, seminal vesicle และ epididymis (ซ้าย) มาตรึงสภาพในสารละลาย Bouin's จากนั้นนำไป dehydrate ด้วย grading ethanol ทำการ clearing ด้วย xylene แล้วนำไปผ่านขบวนการ infiltration ด้วย paraffin จากนั้นนำมาทำ paraffin section โดยตัดที่ความหนา 6 ไมโครเมตร และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ Eosin และ

ตรวจสอบความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพ ทั้งนี้จะแยกอวัยวะด้านขวาสำหรับตรวจสอบระดับ MDA และ epididymis ด้านขวาเพื่อตรวจสอบความหนาแน่นของอสุจิต่อไป

4.2 การตรวจวัดระดับ Malondialdehyde

นำเนื้อเยื่ออวัยวะ 0.5 g มาบดในสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) ที่ pH 7.00 ปริมาตร 5 มล. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที 30 นาที ดูดเอาส่วนใส 0.1 มล. ไปรวมกับ 0.85% Normal saline ปริมาตร 0.45 ml และเติม Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 0.2 ml และ Thiobarbituric reagent (TBA) ปริมาตร 1.0 ml หลังจากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 95-100°C เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 3 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g นาน 10 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 nm ด้วยเครื่อง spectrometer รุ่น Thermo Scientific ; Genesys 20 คัดแปลงจากวิธีของ Armagan *et al.* (2006)

4.3 การตรวจสอบความหนาแน่นของอสุจิ

นำ cauda epididymis ใส่ในขวดแก้วที่มีสารละลาย NaCl 0.85% อยู่ 10 ml ทันที ใช้กรรไกรตัดให้ละเอียด จนพบว่าไม่มีของเหลวสีขาวขุ่นทะลักออกมา ดูดเอาของเหลวที่หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Neubauer Hemocytometer) เพื่อตรวจนับตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงผลเป็นจำนวนเซลล์/ml.

4.4 การทดสอบทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง มาหาค่าทางสถิติโดยคำนวณให้อยู่ในรูปของ Mean $\pm$ SD และทดสอบโดยใช้ one – way ANOVA และตรวจสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้การทดสอบแบบ LSD