

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สัตว์ทดลองและอุปกรณ์สำหรับป้อนสัตว์ทดลอง

- 1.1 หนูแรท สายพันธุ์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศัลยา มหาวิทยาลัยมหิดล
- 1.2 เข็มฉีดยาชนิดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
- 1.3 เข็มป้อนยาเบอร์18 (Nipro, Thailand)

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดกวางเครือแดง

- 2.1 กวางเครือแดง (Phrae Provinces, Thailand)
- 2.2 เอธิลแอลกอฮอล์ 95 % (Merck, Germany)
- 2.3 Rotary evaporation (Eyela, Tokyo Rikakihai, Japan)
- 2.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.5 ตู้อบ (Contherm Scientific, New Zealand)
- 2.6 บีกเกอร์ (Sigma, Germany)
- 2.7 กรวยกรอง (Pyrex, Germany)
- 2.8 กระดาษกรอง (Whatman, England)
- 2.9 แ่งแก้วคนสาร (Pyrex, Germany)
- 2.10 water bath (Heto Lab Equipment, Denmark)

3. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจนับเซลล์อสุจิ

- 3.1 น้ำยาสำหรับนับเซลล์อสุจิ (Sperm count solution)
- 3.2 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
- 3.3 หลอดหยด (Nipro, Thailand)
- 3.4 เครื่องมือสำหรับนับเซลล์อสุจิ (Neubaur hemocytometer)

Fischer Scientific, Germany)

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจุลกายวิภาคของ Pancrease, Prostate gland, Seminal vesicle, Epididymis, Testis

- 4.1 เอธิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95%, 100% (Merck, Germany)
- 4.2 Acetone (Fisher Scientific, USA)

- 4.3 Xylene (Lab Scan, Thailand)
- 4.4 Paraplast (Whatman, England)
- 4.5 Hematoxylin (Sigma, St Louis, MO, USA)
- 4.6 น้ำกลั่น (ELGA Ultra Analytic, UK)
- 4.7 Permount (Sigma, St Louis, MO, USA)
- 4.8 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อแบบอัตโนมัติ (Lecica, Germany)
- 4.9 บล็อกตัดชิ้นเนื้อ
- 4.10 Slide (Menzel-glaser, Germany)
- 4.11 Cover slide (Menzel-glaser, Germany)
- 4.12 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome)(Shandon, UK)
- 4.13 Water bath (Heto Lab Equipment, Denmark)
- 4.14 Staining jars
- 4.15 Staining rack
5. อุปกรณ์และเครื่องมือ
 - 5.1 กล้องถ่ายรูป (DXM 1200c, Nikon, Japan)
 - 5.2 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ(Olympus, Japan)
 - 5.3 กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereomicroscope (Olympus, Japan)
 - 5.4 Inverted microscope (Olympus, Japan)
 - 5.5 CO₂ Incubator (Sanyo Electric, Japan)
 - 5.6 Laminar Flow (Faster S.R.L., Italy)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดกวางเครือแดง

ทำการเก็บส่วนรากของกวางเครือแดงที่ อ.สูงเม่น จ.แพร่ ช่วงเดือนธันวาคม จากนั้นนำส่วนรากของกวางเครือแดงที่ได้หลังจากผ่านการตรวจสอบโดย รศ.ยุพธนา สมิตสิริ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วนำไปบดเป็นผงละเอียดแล้วสกัดด้วยเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เป้าหมายที่คาดว่าจะได้ในขั้นตอนนี้คือ ได้สารสกัดกวางเครือแดงที่มีคุณภาพ และถูกต้องเพื่อทำการวิจัยขั้นต่อไป

2. สัตว์ทดลอง

หนูแรท เพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200–250 กรัม จำนวน 50 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติสาธิต มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงโดยให้อาหารและน้ำตลอดเวลาในห้องควบคุมแสง Light-Dark Cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 °C

3. การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน

ทำการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานด้วยการใช้สาร Streptozotocin ที่ความเข้มข้น 55 mg/kg BW เพียงครั้งเดียว โดยการฉีดสารเข้าทางหลอดเลือด (Intravenous injection) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด โดยนำหนูมาทำการเก็บเลือดโดยการตัดหางหนูด้านปลายออกเล็กน้อย แล้วจึงนำเลือดที่ได้มาวัดหาระดับน้ำตาลโดยใช้ Glucose test kit จากนั้นทำการคัดเลือกหนูในกลุ่มที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 300 mg/dl เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

4. การได้รับสารสกัดกวางเครือแดง

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) เป็นหนูที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน จะได้รับน้ำกลั่นในปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร/ตัว/วัน เป็นเวลานาน 1 เดือน กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุมที่เป็นเบาหวาน) จะได้รับน้ำกลั่นในปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร/ตัว/วัน เป็นเวลานาน 1 เดือน กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 (กลุ่มทดลองที่เป็นเบาหวาน) จะได้รับสารสกัดกวางเครือแดงในน้ำกลั่น ปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร/ตัว/วัน ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัม/ตัว/วัน เป็นเวลานาน 1 เดือน โดยวิธีป้อนทางปาก เป้าหมายที่คาดว่าจะได้ในขั้นตอนนี้คือจะได้สัตว์ทดลองที่มีความแตกต่างกัน 5 กลุ่มจากการได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเพื่อที่จะดำเนินงานวิจัยขั้นต่อไป

5. ศึกษาน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการชั่งน้ำหนักหนูทุกกลุ่ม แล้วทำการสลบหนูด้วย Pentobarbitol sodium (Nembutal® , 35 มล./กก. ต่อน้ำหนักตัว) โดยการฉีดเข้าทางหน้าท้อง จากนั้นนำอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ได้แก่ testis, epididymis, prostate glands, seminal vesicle มาชั่งน้ำหนัก

6. ศึกษากการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในกระแสเลือด

โดยนำหนูทุกกลุ่มมาทำการเก็บเลือดโดยการตัดหางหนูด้านปลายออกเล็กน้อย แล้วจึงนำเลือดที่ได้มาวัดหาระดับน้ำตาลโดยใช้ Glucose test kit ทำการวัดทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

7. ศึกษาคุณภาพของเซลล์อสุจิ [81]

ศึกษานับจำนวนเซลล์อสุจิ ทำการตัดในส่วนของ cauda epididymis ออกมาแล้วใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเพื่อให้เซลล์อสุจิไหลออกมา ทำการเจือจางน้ำอสุจีก่อนนับโดยใช้น้ำยาที่ประกอบด้วยโซเดียมโบคาร์บอเนต 50 กรัม ฟอรัมาลิน 35% 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำจืด 1,000 มิลลิลิตร เจือจางน้ำอสุจิ 20 เท่า โดยใช้น้ำอสุจิ 50 ไมโครลิตร ผสมน้ำยาเจือจาง 950 ไมโครลิตร หยดน้ำอสุจิที่เจือจางแล้วเข้าไปในเครื่องนับ hemocytometer count cell ปิดด้วย cover slip ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200-400 เท่า

ศึกษาการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิทำการตัดในส่วนของ cauda epididymis ออกมาใส่พลาสติกเลี้ยงเชื้อที่มี TALP (Tyrode albumin lactate phosphate) medium อยู่แล้ว ใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเพื่อเซลล์อสุจิไหลออกมาที่ขอบพลาสติกเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำเซลล์อสุจิไปใส่น้ำยาเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูดเซลล์อสุจิมา 5 μ l เพื่อทำการประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิใน 100 μ l ของ TALP medium ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ แล้วทำการศึกษาใต้กล้อง inverted microscope แล้วบันทึกเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและคุณภาพของเซลล์อสุจิเป็นชั่วโมงเริ่มต้น แล้วทำซ้ำทุก 2 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง โดยบันทึกการเคลื่อนที่แบบรายกลุ่มเทียบจาก 100 % และรายเดี่ยวเทียบจาก 4 ระดับ (0 ไม่เคลื่อนไหว, 1 เคลื่อนไหวอยู่กับที่, 2 เคลื่อนที่ช้า, 3 เคลื่อนที่เข้าไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว)

8. การศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะ Prostate gland, Seminal vesicle, Epididymis, Testis

ทำการตัดอวัยวะ Pancrease, Prostate gland, Seminal vesicle, Epididymis, Testis ซึ่งน้ำหนักและนำมาแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน ผ่านขั้นตอนการเตรียมฟาราฟิน จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 5 ไมครอน และนำไปย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) แล้ว mount ด้วย mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

9. การศึกษา Immunohistochemistry ของ insulin และ glucagon ของตับอ่อน

ทำการตัดอวัยวะ Pancrease ซึ่งน้ำหนักและนำมาแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน ผ่านขั้นตอนการเตรียมฟาราฟิน จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 3-5 ไมครอน ทำการ Deparaffinization และทำการ Retrieve Antigen ด้วย Microwave 500 watt นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ทิ้งให้เย็น หยด 3% H₂O₂ ท่วมชิ้นงาน แล้วปิดฝากล่อง ทิ้งไว้ 10 นาที ต่อจากนั้นล้างด้วย PBS buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยด anti insulin, anti glucagon antibody นาน 30 นาที

ต่อจากนั้นล้างด้วย PBS buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยอด Anti Rabbit mouse IgG นาน 30 นาที ต่อจากนั้นล้างด้วย PBS buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยอด DAB ประมาณ 5-10 นาที ล้างน้ำและทำการ Counterstaining ย้อมด้วย Hematoxylin จากนั้นนำไป mount ด้วย mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าและวิเคราะห์ลักษณะของภาพโดยใช้โปรแกรม Image J (Wayne Rasband ,Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ One way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Duncann Test ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ และค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$

สถานที่ทำการทดลอง ดำเนินงานวิจัย วิจัยและเก็บข้อมูล

สถานที่ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง : คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชากายวิภาค คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ห้องปฏิบัติการของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย

นเรศวร

ห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร