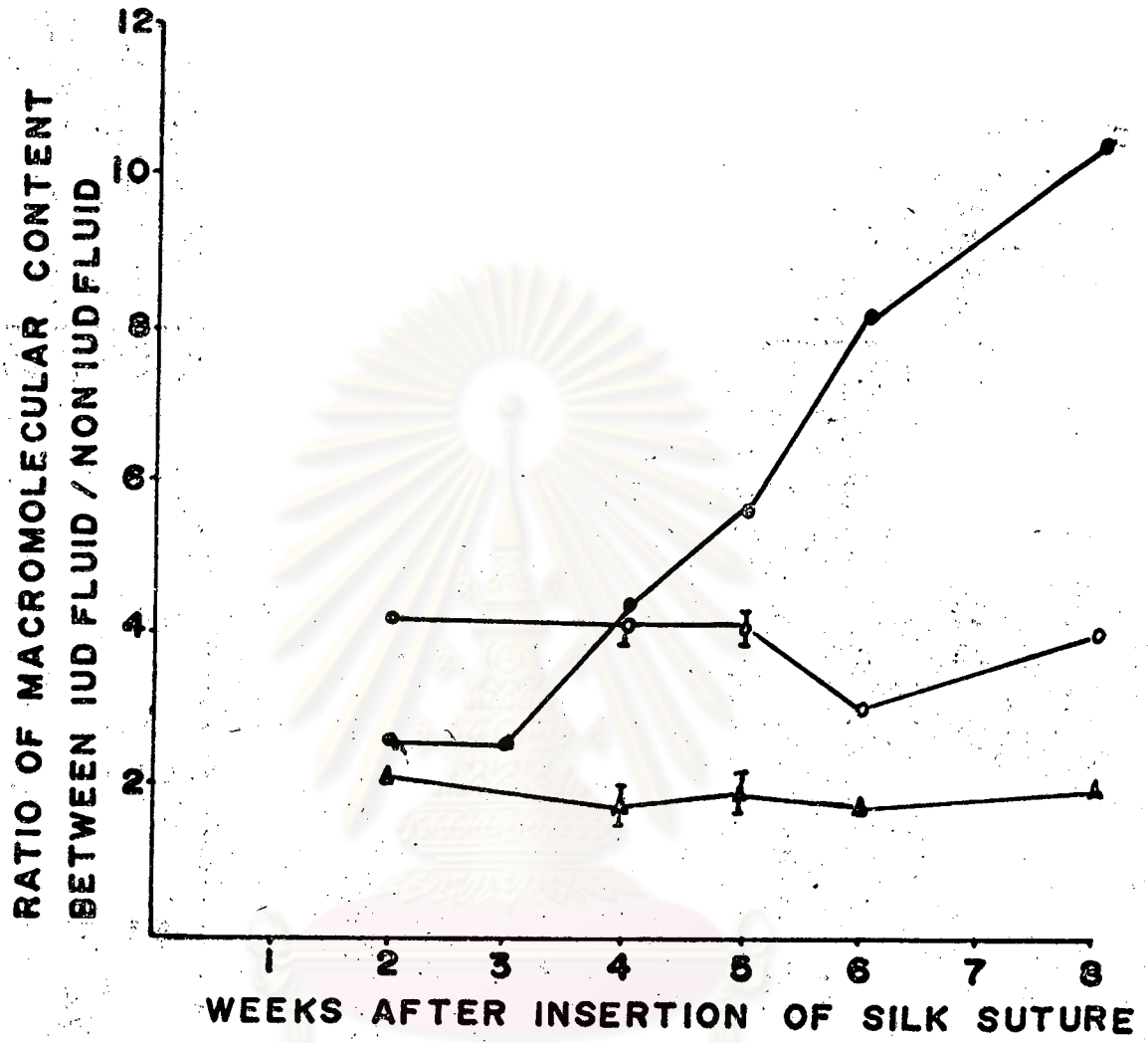
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ปริมาณโปรตีน RNA และ DNA ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

เพื่อศึกษาความแตกต่างของปริมาณมหโมเลกุลในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูในสภาวะไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด ใส่ห่วงคุมกำเนิด และถอดห่วงคุมกำเนิด จึงเก็บของเหลวนั้นไปหาปริมาณโปรตีน RNA และ DNA ตามวิธีในข้อ 2.4.2.1 2.4.2.4 2.4.2.3 ตามลำดับ รูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะสูงกว่าของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดเสมอ และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาของการใส่ห่วงคุมกำเนิด ดังจะเห็นได้จากค่าอัตราส่วนเปรียบเทียบระหว่างปริมาณโปรตีนของของเหลว จากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดกับด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการใส่ห่วงเนิ่นนานออกไป ในทำนองเดียวกันการใส่ห่วงคุมกำเนิดก็จะเป็นผลให้ปริมาณ RNA และ DNA ในของเหลวจากโพรงมดลูกสูงขึ้นเช่นเดียวกัน (1.84 ± 0.41 และ 4.03 ± 0.59 เท่าตามลำดับ) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการใส่ห่วงคุมกำเนิดเป็นระยะเวลานาน ๆ ไม่ได้ทำให้อัตราความแตกต่างของปริมาณ RNA และ DNA ระหว่างของเหลวจากโพรงมดลูกทั้ง 2 ด้านเปลี่ยนไป

ถ้าหากนำหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดชุดเดียวกันนี้ไปถอดห่วงคุมกำเนิดออก แล้วหาปริมาณโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกภายหลังที่ถอดห่วงคุมกำเนิดออกไปแล้ว 2 สัปดาห์ จะพบว่าปริมาณโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ถอดห่วงคุมกำเนิดจะลดจากเดิมอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด 4-5 สัปดาห์ (ตารางที่ 3) แต่ไม่ปรากฏว่าลดลงในหนูที่ถอดห่วงคุมกำเนิดก็ยังคงมีมากกว่ามดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 9 อัตราส่วนเปรียบเทียบระหว่างปริมาณโปรตีน RNA และ DNA ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

———— โปรตีน

A———A RNA

o———o DNA

IUD. fluid = ของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

non - IUD fluid = ของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ผลการทดลองแต่ละจุดได้จากหนูทดลอง 15 ตัว

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณ โปรตีน DNA และ RNA ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูด้านที่ใส่และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

pooled fluid ครั้งที่	ระยะเวลาหลังจากใส่ห่วง (สัปดาห์)	ปริมาณโปรตีน(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร		ปริมาณ DNA มิลลิกรัม/มิลลิลิตร		ปริมาณ RNA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	
		ด้านไม่ใส่ห่วง	ด้านใส่ห่วง	ด้านไม่ใส่ห่วง	ด้านใส่ห่วง	ด้านไม่ใส่ห่วง	ด้านใส่ห่วง
1	2	6.30	16.60	1.00	4.20	0.21	0.46
2	3	6.60	17.20	-	-	-	-
3	4	2.72	11.90	*0.84±.19	*3.35±1.3	*0.30±.14	*0.52±.12
4	5	2.55	14.40	*0.41±.12	*3.76±.14	*0.42±.17	*0.70±.28
5	6	3.50	28.80	0.94	2.80	0.26	0.64
6	8	2.24	23.70	0.88	3.80	0.42	0.54

*Mean ± S.D. จากหนูที่ทำการทดลอง 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 15 ตัว) สำหรับผลการทดลองอื่น ๆ ได้จากหนูทดลอง 1 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนจากของเหลวในโพรงมดลูกหนูเมื่อใส่ห่วงคุมกำเนิด ถอดห่วงคุมกำเนิด และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

จำนวนหนูทดลอง	ระยะเวลาของการใส่ห่วงคุมกำเนิด(อาทิตย์)	ปริมาณโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		ขณะใส่ห่วง	หลังจากถอดห่วง 2 ซัปดาห์	*เมื่อไม่ใส่ห่วง
15	3	11.90	13.80	7.37
15	4	14.40	9.90	3.00
15	5	28.80	16.20	2.24

* จากหนูทดลองชุดเดียวกับที่ถอดห่วง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 pH ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

เมื่อนำของเหลวจากโพรงมดลูกหนูไปหาค่า pH ปรากฏว่า ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดมีค่า pH เฉลี่ย 9.0 ± 0.25 ในขณะที่ด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดมีค่า pH เฉลี่ย 9.4 ± 0.4 (ตารางที่ 4) ไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งทั้งสองด้านนี้ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญ (P > 0.05) แสดงว่าห่วงคุมกำเนิดทำให้ pH ของของเหลวในโพรงมดลูกเปลี่ยนแปลงไป แต่หลังจากที่ถอดห่วงคุมกำเนิดออกไป 2 สัปดาห์ จะลดลงเหลือเพียง 8.5 เท่านั้น

ตารางที่ 4 pH ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูขณะที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และถอดห่วงคุมกำเนิด

สภาวะ	จำนวนหนูที่ทำการทดลอง	pH
เมื่อใส่ห่วงคุมกำเนิด		
มดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	15	*9.4 ± 0.40
มดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	15	*9.0 ± 0.25
หลังจากถอดห่วงคุมกำเนิดออก 2 สัปดาห์		
มดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	15	9.5
มดลูกด้านที่ถอดห่วงคุมกำเนิดออก	15	8.5

*Mean ± S.D.

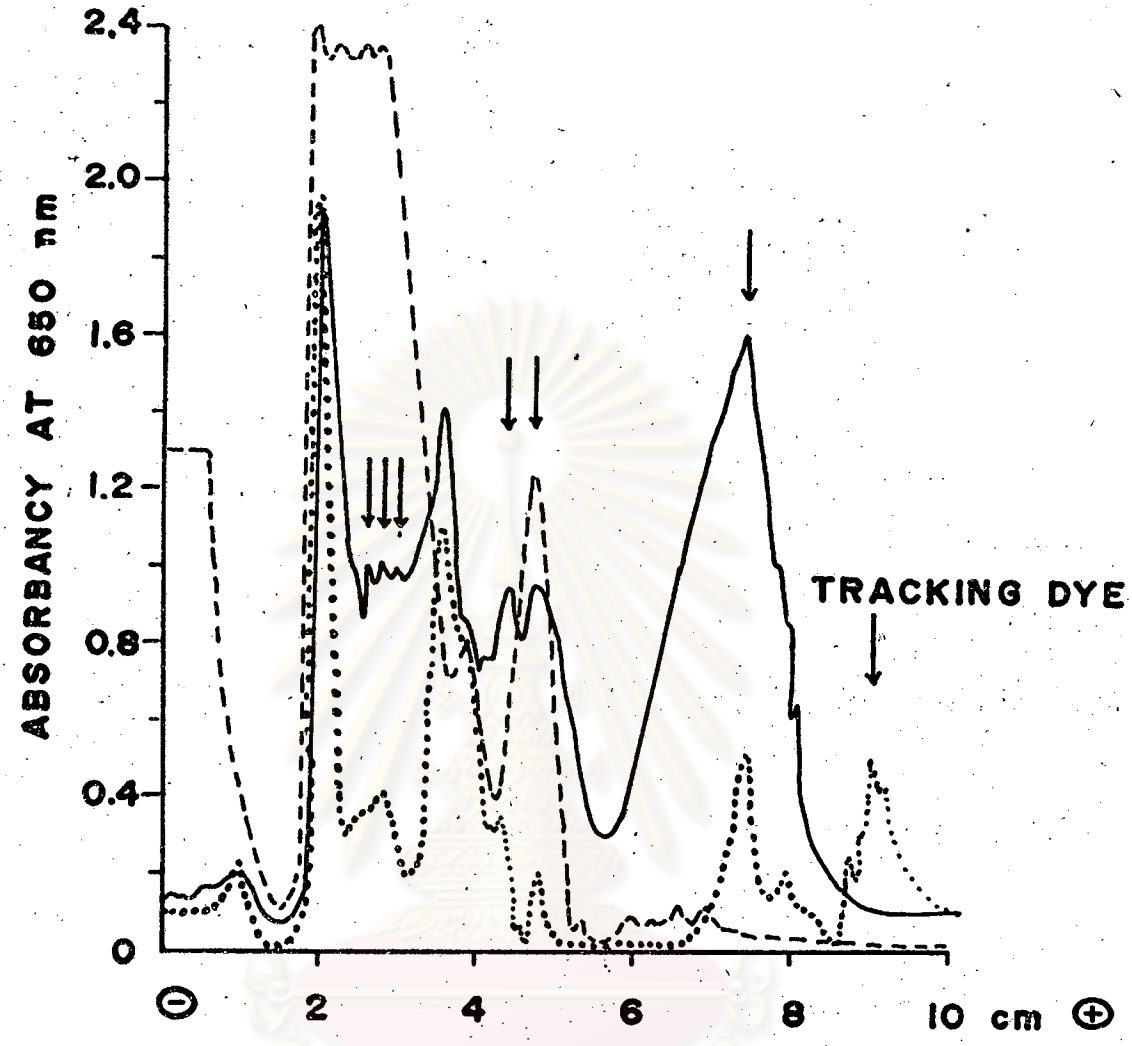
3.3 การเคลื่อนที่ของโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองในสนามไฟฟ้า

เมื่อทำการทดลองโดยการใช้ gel เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันคือ 5.6% 7% 7.5% และ 10% และด้วยกระแสไฟฟ้าปริมาณ 5 mA/gel หรือ 3 mA/gel ในระบบSDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน 0.01M tris-glycine buffer pH 8.3 เราพบว่า

โปรตีนในซีรัม และของเหลวจากโพรงมดลูกหนูจะแยกจากกันได้ดีที่สุดเมื่อใช้ระบบ 7.5% และ 5 mA/gel โดยเราสามารถแยกโปรตีนจากซีรัมของหนูออกเป็นอย่างน้อย 10 ชนิด จากของเหลวในโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดอย่างน้อย 9 ชนิด และจากของเหลวในโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดอย่างน้อย 9 ชนิด (รูปที่ 10) ส่วน % gelอื่น ๆ จะให้แถบโปรตีนที่แยกออกจากกันไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกใช้ 7.5% polyacrylamide gel ในสนามไฟฟ้า 5 mA/gel ในการศึกษาการแยกโปรตีนในระบบบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ต่อไป

จากรูปที่ 10 โปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกที่มีค่าสัมประสิทธิ์การเคลื่อนที่ (electropheretic mobility) เหมือนกับโปรตีนในซีรัมส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เครื่องหมายลูกศรในแผนภาพแสดงถึงโปรตีนในโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงและด้านที่ไม่ใส่ห่วงมีความแตกต่างชัดเจน

เนื่องจากการทดลองแยกโปรตีนด้วย 0.01 M tris glycine บัฟเฟอร์ที่ pH 8.3 ยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เพราะมีแถบโปรตีนหลายแบบที่ยังแยกออกจากกันได้ไม่ดีจึงเปลี่ยนระบบบัฟเฟอร์ใหม่โดยใช้ 0.005 M tris-hydrochlorideบัฟเฟอร์ที่pH 7.1 แทน ปรากฏว่าระบบนี้จะแยกโปรตีนในซีรัมของหนูทดลองได้ประมาณ 5 ชนิดเท่านั้น และมีโปรตีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่แยกได้ดี และเห็นแถบชัดเจนในแท่งgel(peak ที่มีลูกศรชี้) (รูปที่11) ส่วนของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดนั้นมี peak เด่น ๆ เพียง 4 ชนิด ซึ่งแต่ละ peak ยังประกอบด้วย peak ย่อยที่ไม่แยกออกจากกันอีก ในทำนองเดียวกันโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดก็แยกออกจากกันไม่ได้ดีในระบบนี้ (รูปที่11) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรตีนในโพรงมดลูกหนูด้านที่ใส่ และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะเห็นว่า peak A มีเฉพาะในของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และpeak B ก็จะพบแต่ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดเท่านั้น

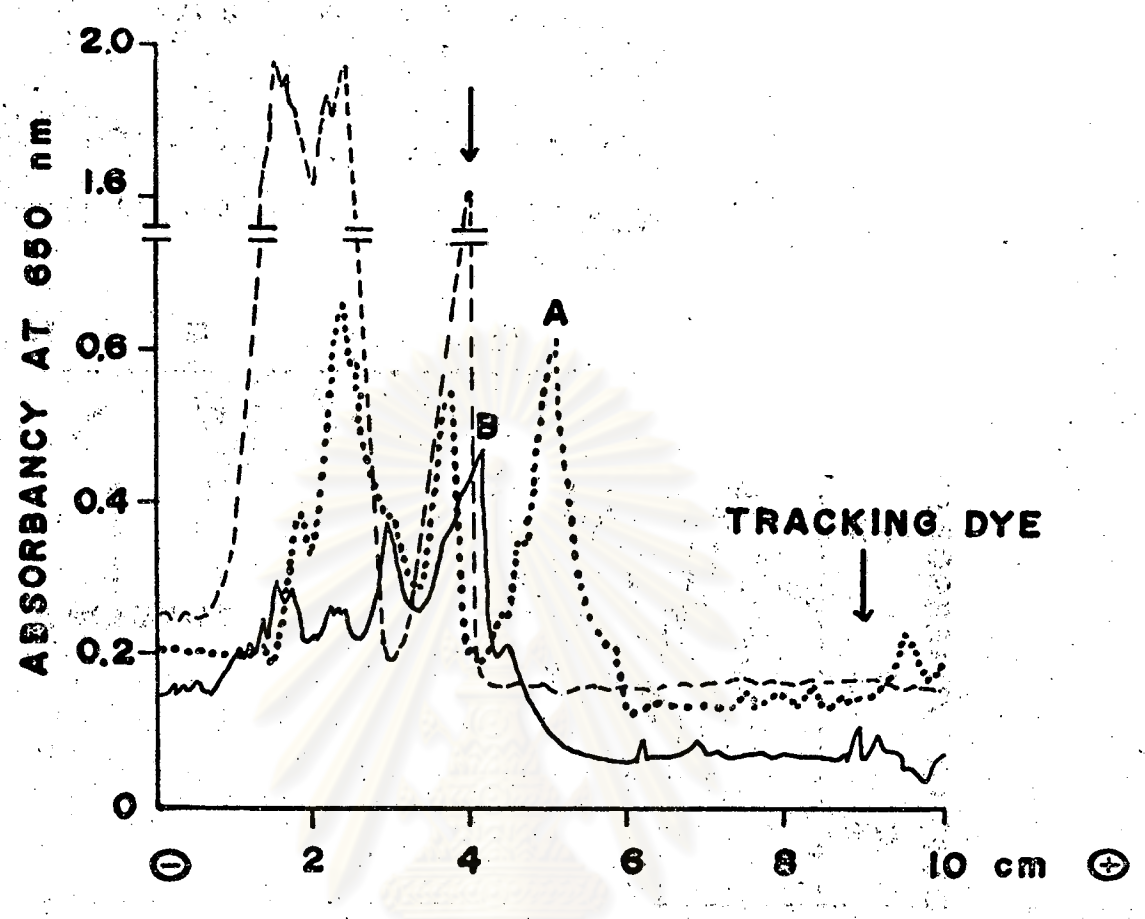


รูปที่ 10 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ 7.5% gel ใน 0.01 M tris-glycine pH 8.3 และผ่านกระแสไฟฟ้า 5 mA/gel จากขั้วลบไปยังขั้วบวก

- - - - ซีรัมของหนูทดลอง

. . . . ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

——— ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 11 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ 7.5 % gel ใน 0.005 M tris-hydrochloride pH 7.1 และผ่านกระแสไฟฟ้า 5 mA/gel จากขั้วอบไปยังขั้วบวก

- - - - ซีรัมของหนูทดลอง

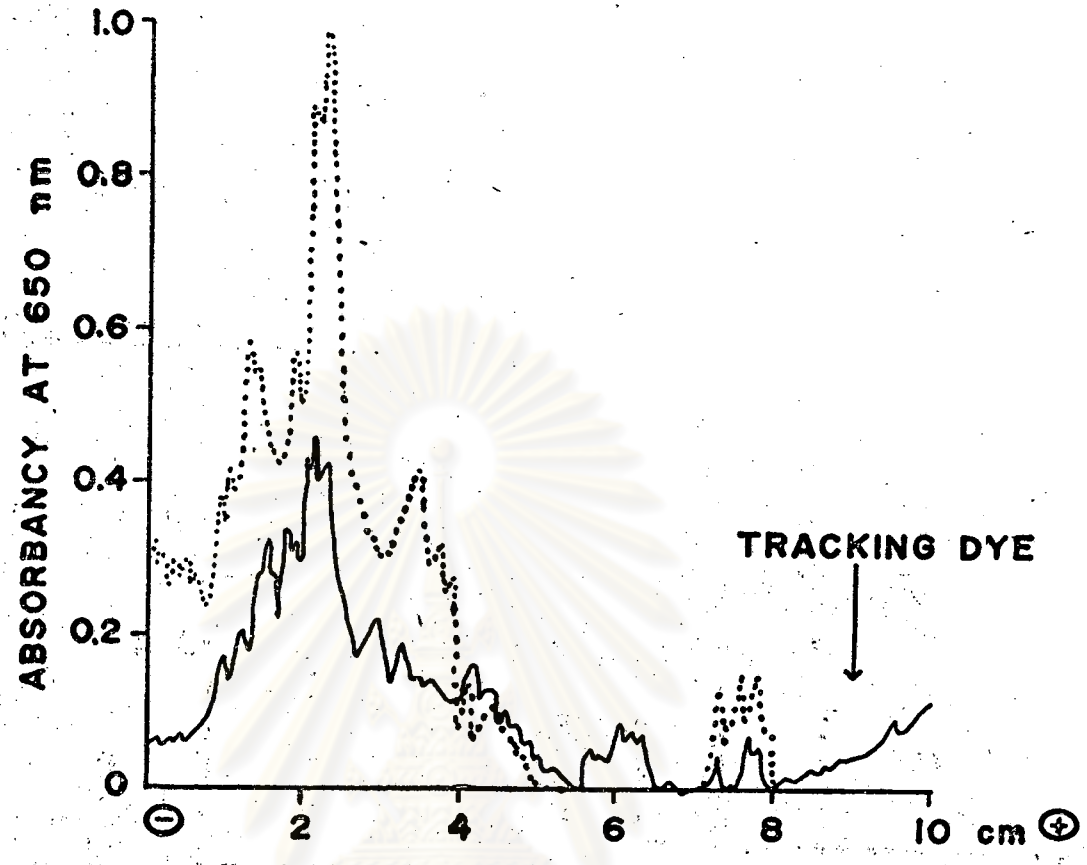
. . . . ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

——— ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทดลองต่อไปโดยเปลี่ยนระบบอีเล็คโตรโฟรีซีสให้เป็น 7.5% polyacrylamide gel ใน 0.1M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 เราก็ยังไม่สามารถแยกโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง หรือในซีรัมให้ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 12 เมื่อการแยกโปรตีนด้วย polyacrylamide gel ไม่ได้ผล ในที่สุดจึงทดลองเปลี่ยนชนิด polymer เป็น cyanogum 41 แทน

ในการทดลองแยกโปรตีนด้วย cyanogum 41 ตามวิธีของ Denari และคณะ, 1976 เราสามารถแยกโปรตีนจากซีรัมของหนูทดลองได้ประมาณ 6 ชนิด และชนิดเหล่านี้แยกออกจากกันค่อนข้างดีและเห็นเป็น peak ชัดเจน ส่วนโปรตีนจากของเหลวในโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดแยกได้ประมาณ 10–13 ชนิดและของเหลวในโพรงมดลูกหนูด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดแยกได้ประมาณ 8 ชนิด ตามแผนภาพในรูปที่ 13 จะเห็นว่าโปรตีนที่มีพบในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูส่วนใหญ่จะมีพบในซีรัมด้วย เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของprofile ในแผนภาพจะเห็นว่ามี 2 peak ที่แตกต่างกันมากคือ peak X จะพบเฉพาะในของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด ในทำนองเดียวกัน peak Y จะพบในของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดเท่านั้น จากการทดลองนี้เราพบว่าระบบนี้สามารถแยกชนิดของโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูออกจากกันได้ดีกว่าวิธีอื่น ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการทดลองต่อไปเพื่อวิเคราะห์คุณลักษณะ ของโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกหลังจากที่ถอดห่วงคุมกำเนิดออกไปเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงว่าในของเหลวจากมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด เมื่อถอดห่วงออกแล้ว peak X ซึ่งเดิมไม่มีจะมีปริมาณสูงขึ้นจนคล้ายกับที่พบในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และถึงแม้โปรตีน จะยังคงมีปริมาณเท่ากับในหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด แต่เมื่อเปรียบ เทียบปริมาณ Y/Z จะเห็นว่ามีค่าลดลงจากเดิมคือจาก 1.08 เท่าเป็น 0.77 เท่า (รูปที่ 14) นอกจากนี้ยังปรากฏว่าลักษณะ profile ของการเคลื่อนที่ของโปรตีนในของเหลวที่เก็บจากโพรงมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดและหลังจากถอดห่วงคุมกำเนิดออกไปเป็นเวลานานถึง 45 วัน จะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก และ peak Y ในหนูที่ถอดห่วงคุมกำเนิดจะหายไป (รูปที่ 15) เมื่อนำหนูทดลองที่ถอดห่วงออกไปนี้ไปทำการผสมพันธุ์กับเพศผู้ก็ปรากฏว่ามันสามารถตั้งครรภ์และคลอดลูกได้ตามปกติ

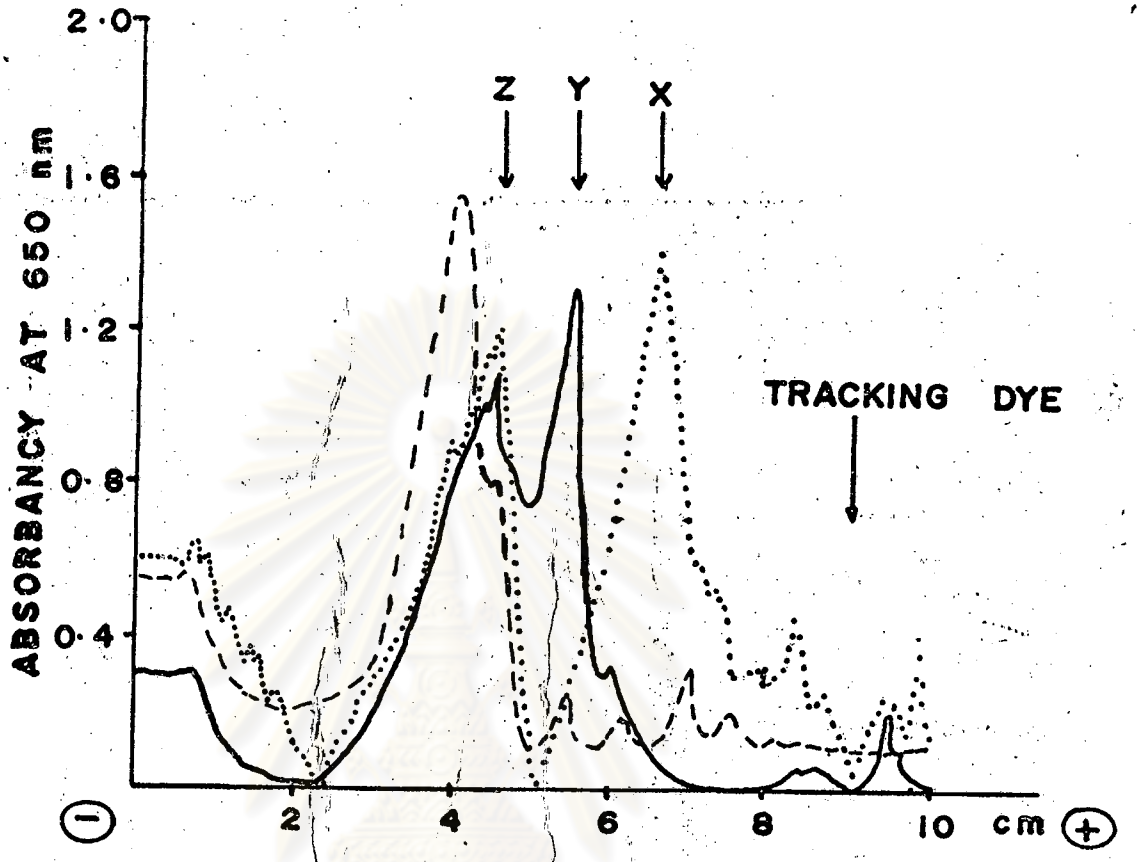


รูปที่ 12 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน 0.1 M ฟอสเฟต pH 7.0 และผ่านกระแสไฟฟ้า 5 mA/gel จากขั้วลบไปยังขั้วบวก

. . . . ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

——— ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

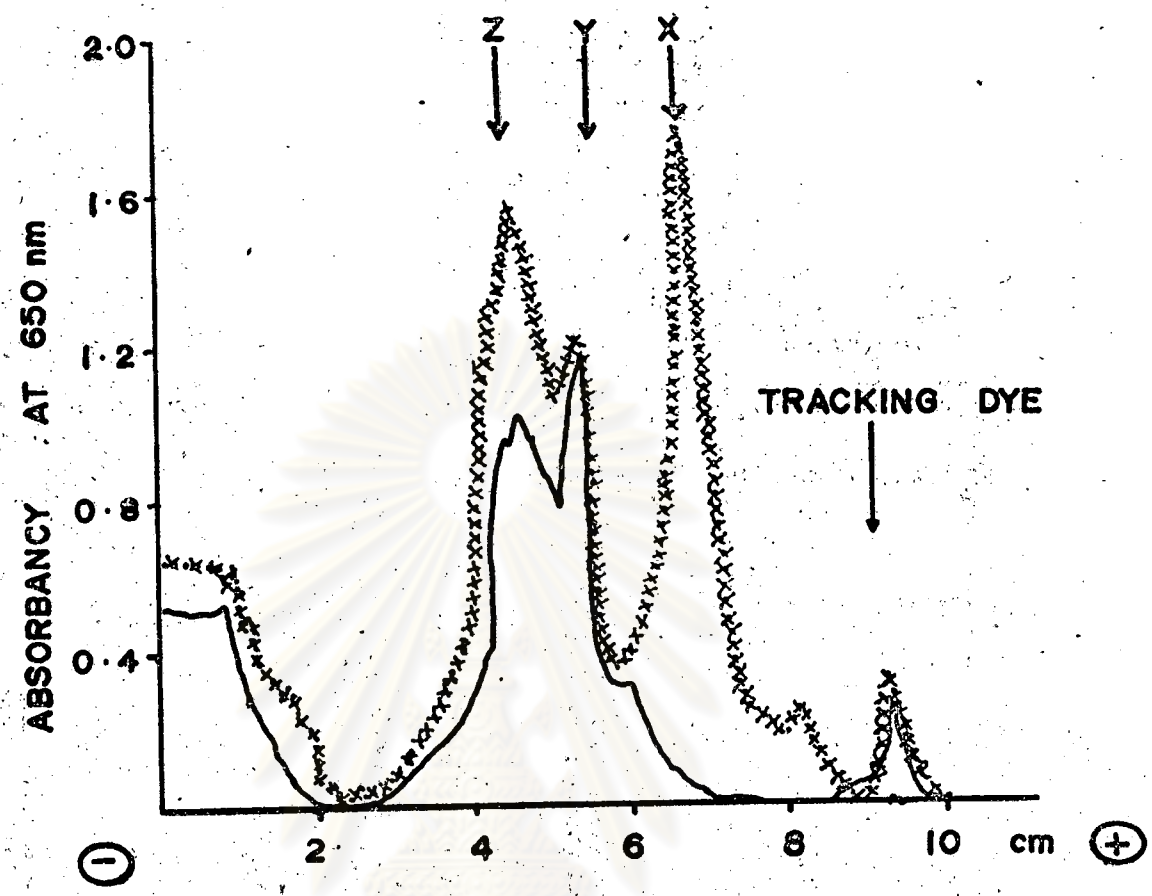


รูปที่ 13 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ cyanogum 41 gel electrophoresis โดยใช้ 6% gel ใน 0.066 M tris 0.02 M boric acid 0.003 M Na_2EDTA บัฟเฟอร์ pH 8.6 และผ่านกระแสไฟฟ้า 1 mA/gel 30 นาที และ 5 mA/gel จากขั้วลบไปยังขั้วบวก

– – – – ซีรัมของหนูทดลอง

. . . . ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

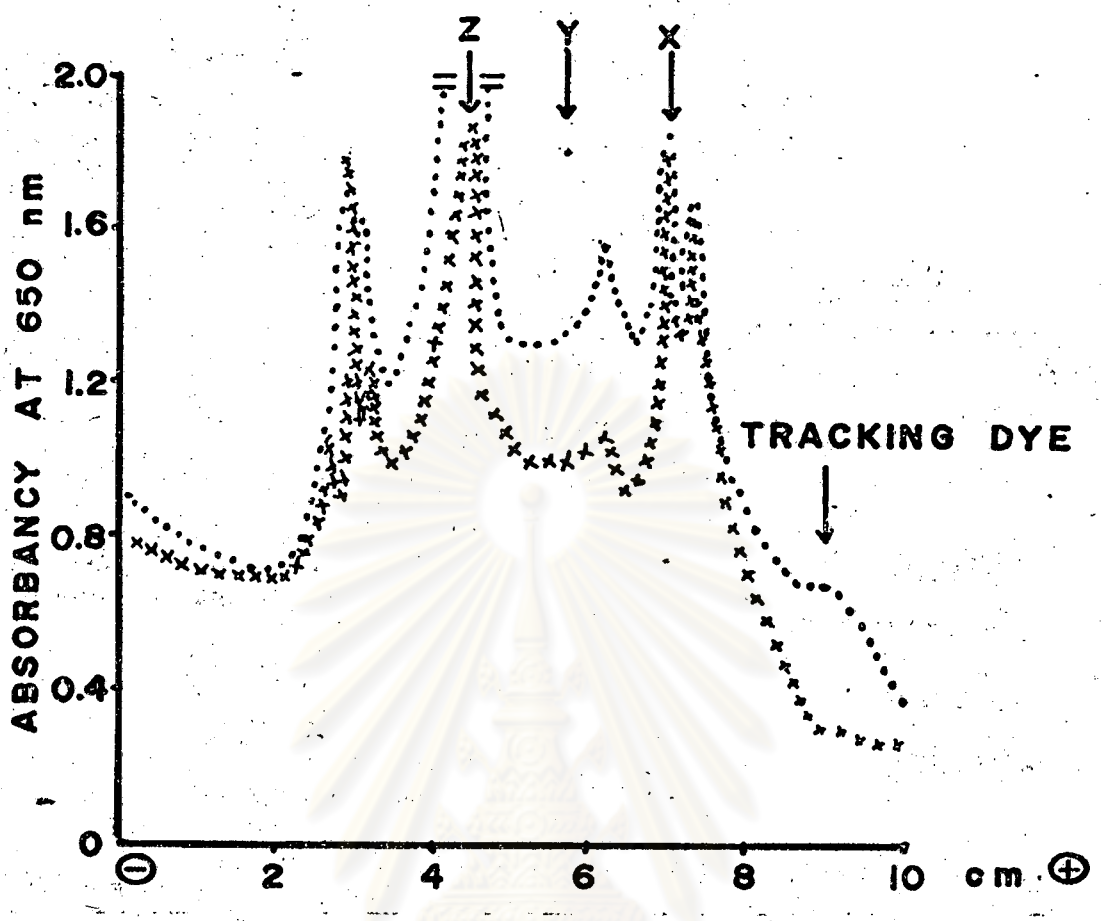
——— ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 14 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ cyanogum 41 gel electrophoresis โดยใช้ 6 % gel ใน 0.066 M tris 0.02 M boric acid 0.003 M Na_2EDTA บัฟเฟอร์ pH 8.6 และผ่านกระแสไฟฟ้า 1 mA/gel 30 นาที และ 5 mA/gel จากขั้วลบไปยังขั้วบวก

x x x x ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ถอดห่วงคุมกำเนิด 2 สัปดาห์

——— ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 15 แผนภาพการแยกโปรตีนในระบบ cyanogum 41 gel electrophoresis โดยใช้ 6% gel ใน 0.066M tris 0.02 M boric acid 0.003 M Na_2EDTA บัฟเฟอร์ pH8.6 และผ่านกระแสไฟฟ้า 1 mA/gel 30 นาที และ 5 mA/gel จากขั้วลบไปยังขั้วบวก

x x x x ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ถอดห่วงคุมกำเนิด 45 วัน

. . . . ของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การทดลองทำ Autoradiography

เพื่อทำการทดสอบว่าโปรตีนชนิดใหม่ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่หรือไม่ จึงทำการทดสอบโดยการตรวจแถบรังสีของโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย ^{3}H-leucine ใน autoradiograph

จากการทดลองเมื่อนำของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ฉีด ^{3}H-leucine 25 µCi ใน 0.2 มิลลิลิตร 0.85% โซเดียมคลอไรด์ทางช่องท้องในระยะเอสตรัส ไปแยกชนิดโปรตีนด้วย 6% cyanogum gel แล้วนำไปทำ autoradiograph และทิ้งให้ expose เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน เมื่อนำฟิล์มไปล้าง ปรากฏว่าไม่มีแถบรังสีของโปรตีนเลย เมื่อทำการทดลองแบบเดียวกันอีกแต่เปลี่ยนสารกัมมันตรังสี ^{14}C-leucine ปริมาณ 5 µCi หรือ 25 µCi ใน 0.2 มิลลิลิตรของ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ก็ปรากฏว่าไม่มีแถบรังสีปรากฏบนแผ่นฟิล์มเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าว่า gel เหล่านั้นจะมีแถบโปรตีนที่ย้อมเกิดสี comassie brilliant blue ก็ตาม

3.5 การติดฉลากมดลูกหนูที่ใส่และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดด้วย ^{3}H-leucine

เพื่อที่จะศึกษาแบบแผนการสังเคราะห์โปรตีนของมดลูกหนูเมื่อใส่ห่วงคุมกำเนิดว่าจะแตกต่างจากเมื่อไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดหรือไม่ จึงทำการทดลองติดฉลากโปรตีนด้วยตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 2.4.5

3.5.1 การติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในมดลูกแบบ confine loop

จากการทดลองฉีด ^{3}H-leucine ที่โพรงมดลูกหนูทดลองแบบ confine loop ข้างละ 12.5 µCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรที่ระยะเอสตรัส แล้ววัดปริมาณ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง 1 วัน 2 วัน 3 วัน 4 วัน และ 5 วันตามลำดับ ผลการทดลองแสดงว่าการติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในเยื่อบุมดลูก (endometrium) ของหนูทดลองที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 แล้วจากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 4 แต่ด้วยปริมาณ

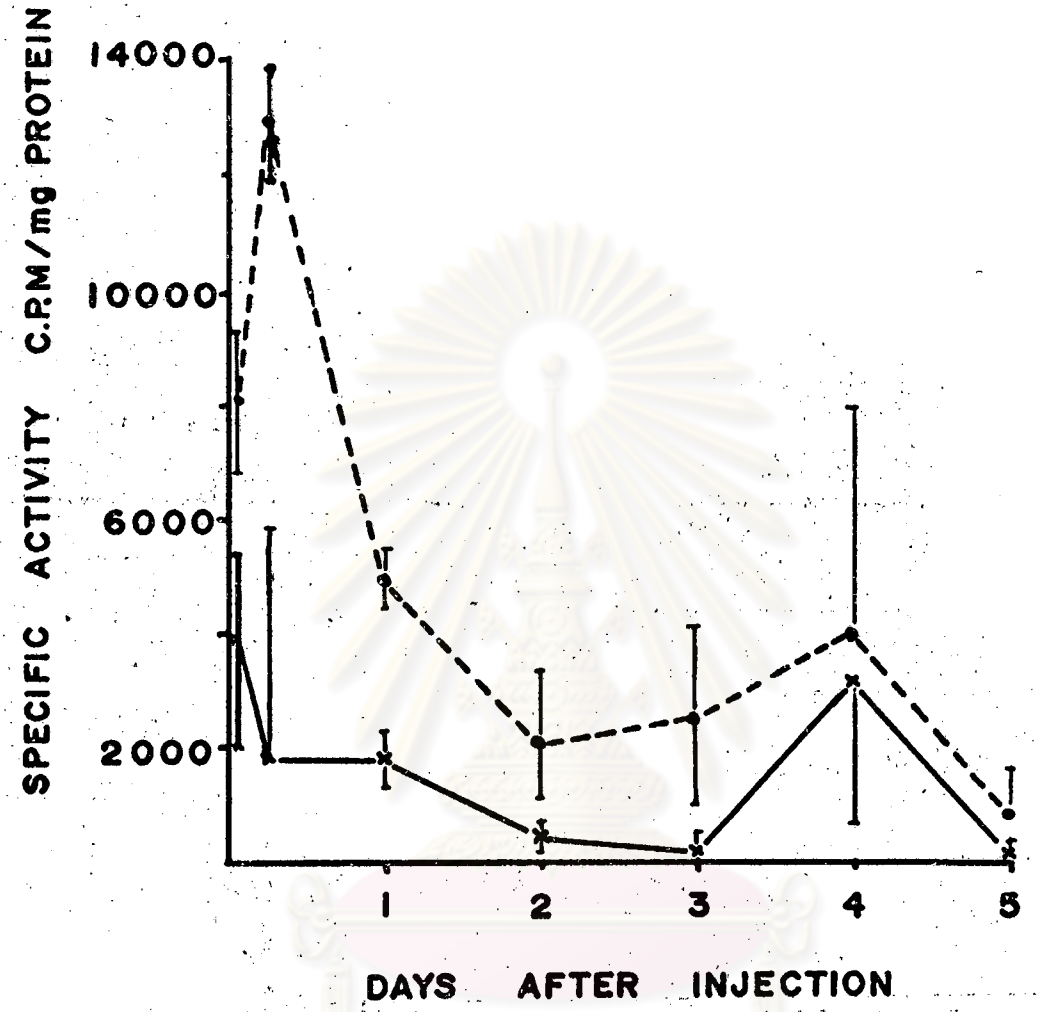
$\frac{1}{4}$ ของชั่วโมงที่ 6 ส่วนเยื่อบุมดลูกของหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะมีการติดฉลากของ ^{3}H-leucine สูงสุดใน 1 ชั่วโมงแรก ตอจากนั้นก็จะค่อย ๆ ลดลง และจะมี peak ปรากฏอีกครั้งในวันที่ 4 เช่นกัน แต่หนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีได้สูงกว่าในทุก ๆ จุดที่ทำการทดลอง (รูปที่ 16)

เมื่อศึกษาการติดฉลากโปรตีนของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองด้วย ^{3}H-leucine โดยวิธีการทดลองแบบเดียวกัน พบว่าของเหลวจากโพรงมดลูกหนูด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะมีการติดฉลากของ ^{3}H-leucine เข้าไปในโปรตีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 6 และจะค่อย ๆ ลดลงแล้วกลับเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 3 (รูปที่ 17) ส่วน ^{3}H-leucine จะติดฉลากเข้าไปในโปรตีนของของเหลวจากโพรงมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดน้อยมาก ปริมาณกัมมันตภาพรังสีจะมี peak ที่ชั่วโมงที่ 1 และวันที่ 3

ปริมาณกัมมันตภาพรังสีในโปรตีนของมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะต่ำกว่าด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกรณีของเยื่อบุมดลูกและของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง

3.5.2 <u>การศึกษาการติดฉลากโปรตีนโดยการฉีด ^{3}H-leucine เข้าทางช่องท้องในระยะเอสตรัส</u>

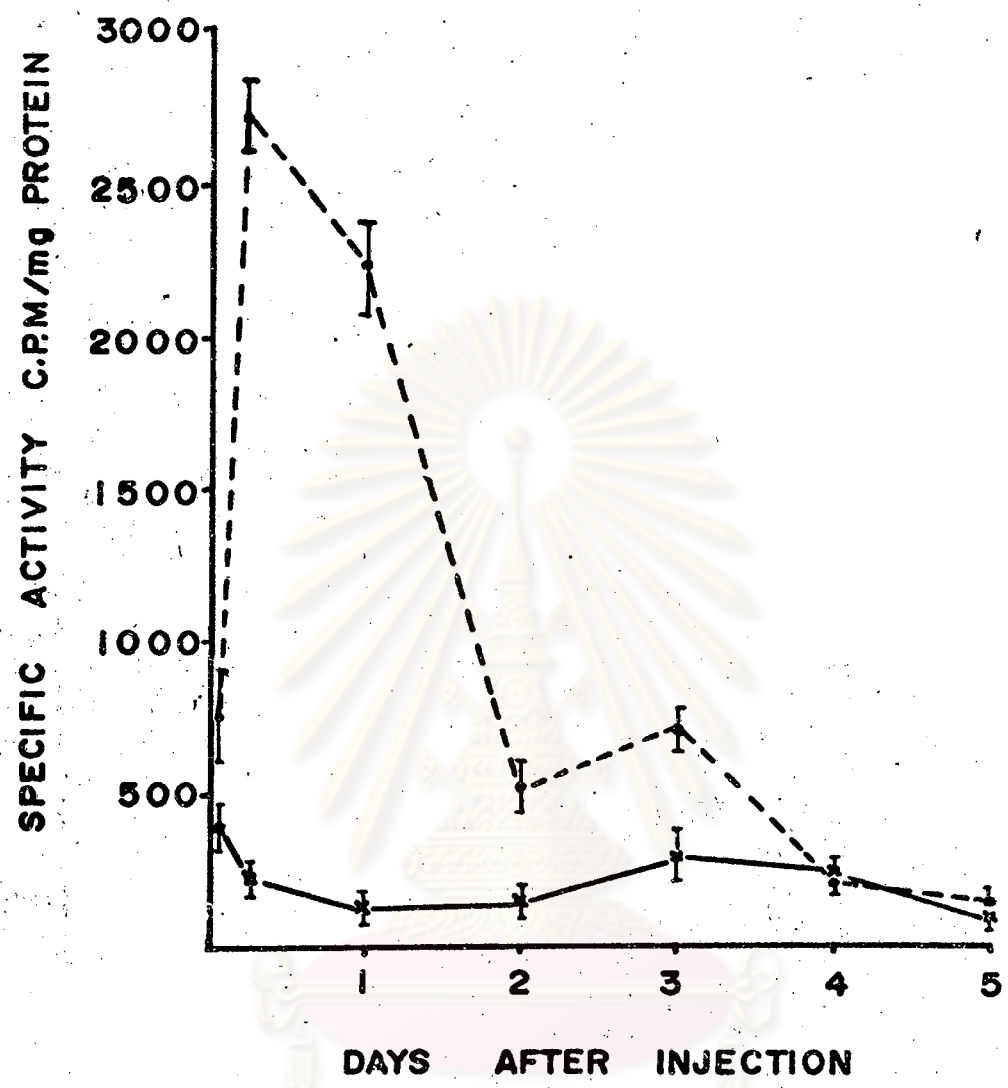
จากการทดลองปรากฏว่า ถ้าฉีด ^{3}H-leucine ปริมาณ 25 μCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวจะมีการติดฉลากเข้าไปในเยื่อบุมดลูกและในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูน้อยมาก และปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ ^{3}H-leucine ที่วัดได้จะยิ่งลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลานานขึ้นดังแสดงในตารางที่ 5 แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าปริมาณ ^{3}H-leucine ในของเหลวจากโพรงมดลูกหรือเยื่อบุมดลูกด้านที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะสูงกว่าด้านที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 16 การดิดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA ของเยื่อบุมดลูกหนูทดลอง โดยฉีด ^{3}H-leucine 12.5 µCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าไปในโพรงมดลูกหนูที่ทำ confined loop ที่ระยะเอสตรัส ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้นตามเวลาที่กำหนด ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

●- - - - ● เยื่อบุมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

×———× เยื่อบุมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 17 การติดฉลาก ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองโดยฉีด ^{3}H-leucine 12.5 µCi ใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าไปในโพรงมดลูกหนูที่ทำ confined loop ที่ระยะเอสตรัสฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้นตามเวลาที่กำหนด ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

●- - - -● เยื่อบุมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

×———× เยื่อบุมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ตารางที่ 5. การติดฉลากของ ^{3}H-leucine เข้าไปในเยื่อบุมดลูก และในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองเมื่อฉีด ^{3}H-leucine 25 µCi ใน 0.2 มิลลิลิตร 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ทางช่องท้อง 1 ครั้ง

รอบเอสตรัสภายหลังการฉีด ^{3}H-leucine	ปริมาณ ^{3}H-leucine ในของเหลวจากโพรงมดลูก (c.p.m. ± S.D./0.1ml)		ปริมาณ ^{3}H-leucine ในเยื่อบุมดลูก (c.p.m. ± S.D./0.1ml)	
	ด้านที่ไม่ใส่หวง	ด้านที่ใส่หวง	ด้านที่ไม่ใส่หวง	ด้านที่ใส่หวง
1	87.8 ± 2.5	144.1 ± 2.5	80.6 ± 2.5	363.6 ± 1.5
	(P < 0.05)		(P < 0.05)	
2	43.0 ± 3.5	88.6 ± 2.5	50.3 ± 2.5	113.0 ± 2.5
	(P < 0.05)		(P < 0.05)	
3	24.1 ± 4.5	47.3 ± 3.5	47.3 ± 3.5	104.3 ± 2.5
	(P > 0.05)		(P < 0.05)	

การทดลองทุกค่าได้จากหนูทดลอง 2 ตัว

เมื่อทำการทดลองโดยฉีด ^{3}H-leucine ปริมาณ 25 µCi ใน 0.2 มิลลิลิตร 0.85% โซเดียมคลอไรด์ทางช่องท้องหนูทดลองทุก ๆ ระยะเอสตรัส และฆ่าหนูในรอบเอสตรัสที่ 1, 2 และ 3 ดังวิธีที่อธิบายในข้อ 2.4.5.2 จะพบว่าการฉีด ^{3}H-leucine เข้าไปหลายครั้งจะทำให้ปริมาณการติดฉลาก ^{3}H สูงกว่าวิธีการฉีดเพียงครั้งเดียว ปริมาณการติดฉลาก ^{3}H-leucine จะแปรตามระยะเวลาและปริมาณกัมมันตภาพรังสีในของเหลวหรือเนื้อเยื่อบุมดลูกด้านที่ใส่หวงคุมกำเนิดจะสูงกว่าด้านที่ไม่ใส่หวงคุมกำเนิดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อฉีดซ้ำเป็นรอบที่ 3 (ตารางที่ 6)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในเยื่อบุมดลูก และของเหลวในโพรงมดลูกหนูทดลองภายหลังการฉีด ^{3}H-leucine 25 µCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าทางช่องท้องหนูในทุก ๆ ระยะเอสตรัสรวม 3 รอบ

รอบเอสตรัสของหนูทดลอง	ปริมาณ ^{3}H-leucine ในของเหลวจากโพรงมดลูก (c.p.m. ± S.D./0.1ml)		ปริมาณ ^{3}H-leucine ในเยื่อบุมดลูก (c.p.m. ± S.D./0.1ml)	
	ด้านที่ไม่ใส่หวง	ด้านที่ใส่หวง	ด้านที่ไม่ใส่หวง	ด้านที่ใส่หวง
	36.6 ± 4.5	68.6 ± 2.5	101.4 ± 2.5	115.7 ± 2.5
	(P > 0.05)		(P > 0.05)	
2	39.9 ± 4.5	123.9 ± 2.5	221.1 ± 2.5	251.4 ± 2.5
	(P < 0.05)		(P > 0.05)	
3	153.1 ± 2.5	255.6 ± 2.5	427.4 ± 1.5	368.9 ± 1.5
	(P < 0.05)		(P < 0.05)	

การทดลองทุกค่าได้จากหนูทดลอง 2 ตัว

เราจะเปรียบเทียบปริมาณการติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในสภาวะที่ใส่หวงคุมกำเนิด และไม่ใส่หวงคุมกำเนิดตามผลในตารางที่ 3 และ 4 ไม่ถูกต้องนัก เนื่องจากปริมาณโปรตีน/มิลลิลิตรในหนูที่ใส่หวงคุมกำเนิดสูงกว่าในหนูที่ไม่ใส่หวงคุมกำเนิด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้ ^{3}H-leucine มีโอกาสติดฉลากมากกว่าในมดลูกด้านที่ใส่หวงคุมกำเนิด ดังนั้นจึงเปรียบเทียบจากค่า specific activity ของการติดฉลาก (c.p.m./mg โปรตีน) แทน ผลการทดลองในรูปที่ 18 แสดงว่าของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่หวงคุมกำเนิดจะมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่หวงคุมกำเนิดจะลดลง

3.5.3 การศึกษาการติดฉลากโปรตีนแบบ pulse labelling ^{3}H-leucine เข้าทางของท้อง

เมื่อทำการ pulse labelling ^{3}H-leucine เข้าทางของท้องหนูเป็นเวลา 2 ชั่วโมงตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.4.5.3 ผลการทดลองปรากฏว่าการติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในเยื่อบุมดลูกจะสูงที่สุดในระยะไดเอสตรัสในหนูทั้ง 3 สภาวะ คือ หนูปกติ หนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดและทำ sham และหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (รูปที่ 19) ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ทำ sham จะมีปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ ^{3}H มากที่สุดในระยะเอสตรัส แล้วค่อย ๆ ลดลงในระยะเริ่มแรกของไดเอสตรัส และไดเอสตรัสก่อนที่จะเพิ่มอีกครั้งเมื่อถึงระยะเอสตรัสที่ถัดไป ส่วนของเหลวจากมดลูกหนูทดลองปกติและใส่ห่วงคุมกำเนิดจะมีแบบแผนการติดฉลากโปรตีนคล้ายกัน กล่าวคือ การติดฉลากต่ำสุดในระยะโปรเอสตรัส แล้วจะค่อย ๆ เพิ่มจนมีปริมาณสูงสุดในระยะเริ่มแรกของไดเอสตรัส และไดเอสตรัสดังแสดงในรูปที่ 20 นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่า ปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนในหนูที่ใส่ห่วงจะสูงกว่าหนูที่ไม่ใส่ห่วงทุก ๆ ระยะ นอกจากระยะโปรเอสตรัส

รูปที่ 21 แสดงผลการติดฉลากโปรตีนด้วย ^{3}H-leucine ของเยื่อบุมดลูกในหนูตั้งท้องเทียม หนูท้องปกติ หนูที่ทำsham และหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด จะเห็นว่าหนูท้องปกติและหนูที่ทำsham มีลักษณะการติดฉลากคล้ายกัน แต่หนูที่ทำsham จะมีปริมาณกัมมันตภาพรังสีต่ำกว่า เป็นที่น่าสังเกตว่า ในวันที่ 3 ของการตั้งครรภ์ซึ่งเป็นวันที่หนูท้องปกติจะมีปริมาณการติดฉลากสูงสุด แต่หนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะมีการติดฉลากต่ำที่สุด และเมื่อpeak ของการติดฉลากในหนูที่ใส่ห่วงเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 5 ของการตั้งครรภ์นั้น จะเป็นเวลาที่การติดฉลากในหนูท้องปกติลดลงจนถึงระดับต่ำสุด การติดฉลากในหนูตั้งท้องเทียมจะแตกต่างออกไป กล่าวคือ ปริมาณกัมมันตภาพรังสีจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 และ 4 ของการตั้งครรภ์แล้วจึงลดลงในวันที่ 5 เมื่อเราติดตามผลการติดฉลาก ^{3}H-leucine ในของเหลวจากโพรงมดลูกในหนูต่าง ๆ ดังกล่าว (รูปที่ 20) จะเห็นว่าหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดจะมีการติดฉลากต่ำและปริมาณการติดฉลากจะค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาคล้ายหนูที่ทำ sham แต่หนูท้องปกติ จะมีปริมาณการติด

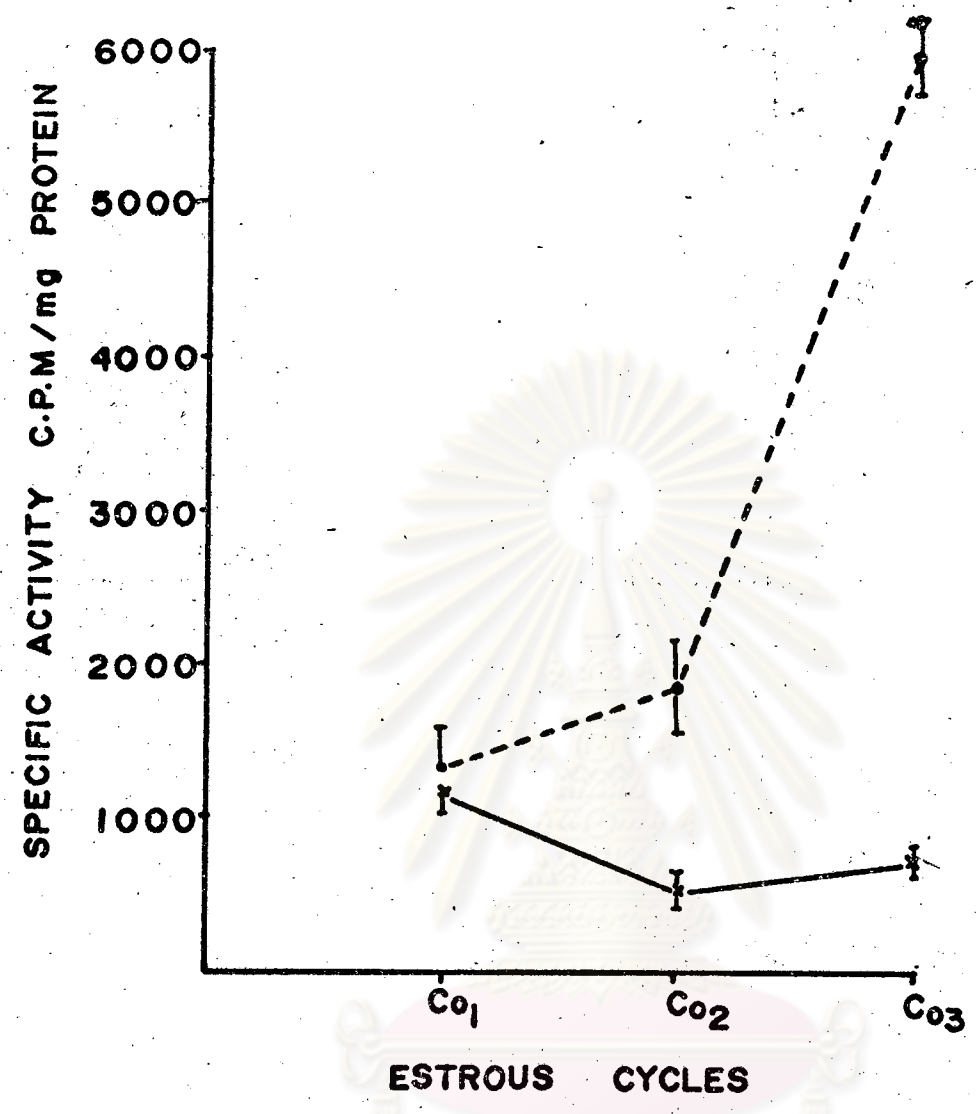
ฉลากสูงกว่าและปรากฏ peak ของการติดฉลากในวันที่ 3 ของการตั้งครรภ์ แล้วจึงลดลงตามลำดับ ส่วนหนูตั้งท้องเทียมจะมี peak ในวันที่ 2 ของการตั้งครรภ์แล้วจึงลดลงในวันที่ 3 4 และ 5 ของการตั้งครรภ์

3.6 อิทธิพลของ cyclohexiมide ต่อการฝังตัวของบลาสโตซีสต์

การศึกษาแบบแผนการสังเคราะห์โปรตีนในหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดโดยวิธีการติดฉลากโปรตีนด้วย ^{3}H-leucine หรือวิธี autoradiography ยังไม่ให้ความกระจ่างในข้อสงสัยที่ว่า ห่วงคุมกำเนิดไปมีอิทธิพลเปลี่ยนแปลงแบบแผนการสังเคราะห์โปรตีนในโพรงมดลูกหรือไม่ เพราะเราไม่ทราบปริมาณที่แท้จริงของ leucine pool ในมดลูกหรือในกระแสโลหิตของหนูที่ทำการทดลอง ทำให้เราไม่แน่ใจว่าปริมาณกัมมันตภาพรังสี ที่วัดได้จะสะท้อนถึงภาวะการสร้างโปรตีนที่แท้จริงได้มากน้อยเพียงไร จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ต่อไปโดยการฉีด cyclohexiมide เข้าไปในหนูทดลอง แล้วติดตามดูผลการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูทดลอง

เพื่อหาปริมาณ cyclohexiมide ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองโดยการฉีด cyclohexiมide ปริมาณต่าง ๆ กันเข้าไปทางช่องท้องของหนูทดลองปกติ ผลจากการทดลองนี้ (ตารางที่ 7) ทำให้เราเลือกใช้ cyclohexiมide ขนาด 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในการศึกษาอื่น ๆ เพื่อดูอิทธิพลของ cyclohexiมide ต่อการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ต่อไป

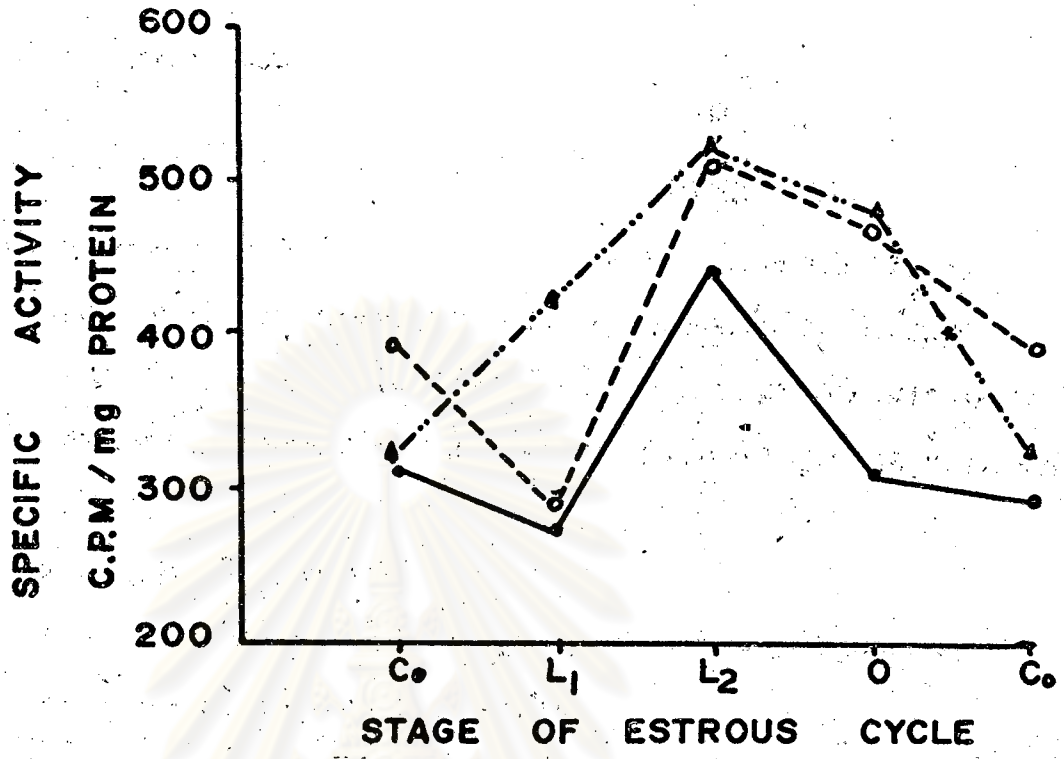
เมื่อทดลองฉีด cyclohexiมide 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนูเข้าไปทางหน้าท้องของหนูทดลองในระยะเอสตรัสตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.4.6.1 แล้วเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกนั้นไปฉีดแก่หนูท้องปกติ 4 วัน และตรวจผลของการทดลองเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน ปรากฏว่า cyclohexiมide อาจมีผลในการยับยั้งการสร้างโปรตีนบางอย่างที่มีคุณสมบัติในการคุมกำเนิดในมดลูกทดลอง จึงทำให้ของเหลวที่เก็บได้จากโพรงมดลูกด้านใส่ห่วงคุมกำเนิดไม่สามารถไปยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในหนูได้ (ตารางที่ 8 และรูปที่ 23) แต่ cyclohexiมide ขนาด200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนูทดลองจะไม่มีผลกระทบกระเทือนต่อคุณภาพของของเหลวจากโพรง มดลูกด้านไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (ตารางที่ 9 และรูปที่ 24) residual masses ในตารางหมายถึงปุ่มเล็ก ๆ ลักษณะกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซ็นติเมตร สีแดงกล่ำติดอยู่กับผนังมดลูกซึ่งอาจจะเป็นตัวอ่อนผิดปกติที่กำลังสลายตัวซึ่งมีพบอยู่บ่อยครั้ง จำนวน 1-5 ปุ่ม



รูปที่ 18 การดิดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลอง โดยฉีด 25 µCi ^{3}H-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าไปทางช่องท้องทุก ๆ ระยะเอสตรัสในรอบเอสตรัสที่ 1 2 และ 3 ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว (C_o หมายถึง ระยะเอสตรัส)

●– – –● ของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

×———× ของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 19 การติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA แบบ pulse labelling ของเยื่อบุมดลูกหนูทดลองในระยะต่าง ๆ ของวงจรสืบพันธุ์ โดยฉีด 25 µCi ^{3}H-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร เข้าไปทางช่องท้อง ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

▲–·–·–▲ เยื่อบุมดลูกหนูปกติ

●– – –● เยื่อบุมดลูกหนูไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

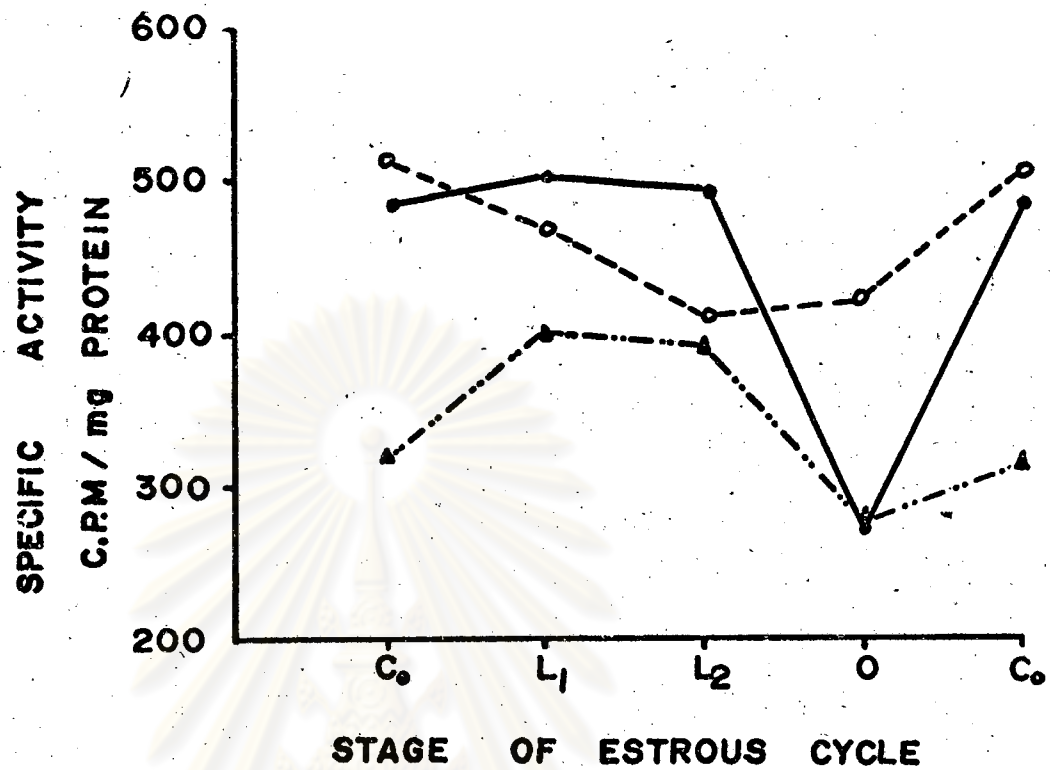
●———● เยื่อบุมดลูกหนูใส่ห่วงคุมกำเนิด

O หมายถึง ระยะโปรเอสตรัส

C_o หมายถึง ระยะเอสตรัส

L_1 หมายถึง ระยะเริ่มแรกของไดเอสตรัส

L_2 หมายถึง ระยะหลังของไดเอสตรัส



รูปที่ 20 การดิดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA แบบ pulse labelling ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองในระยะต่าง ๆ ของวงจรสืบพันธุ์ โดยฉีด 25 µCi ^{3}H-leucine ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าไปทางช่องท้อง ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

▲-..-..-▲ เยื่อบุมดลูกหนูปกติ

●- - - -● เยื่อบุมดลูกหนูไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

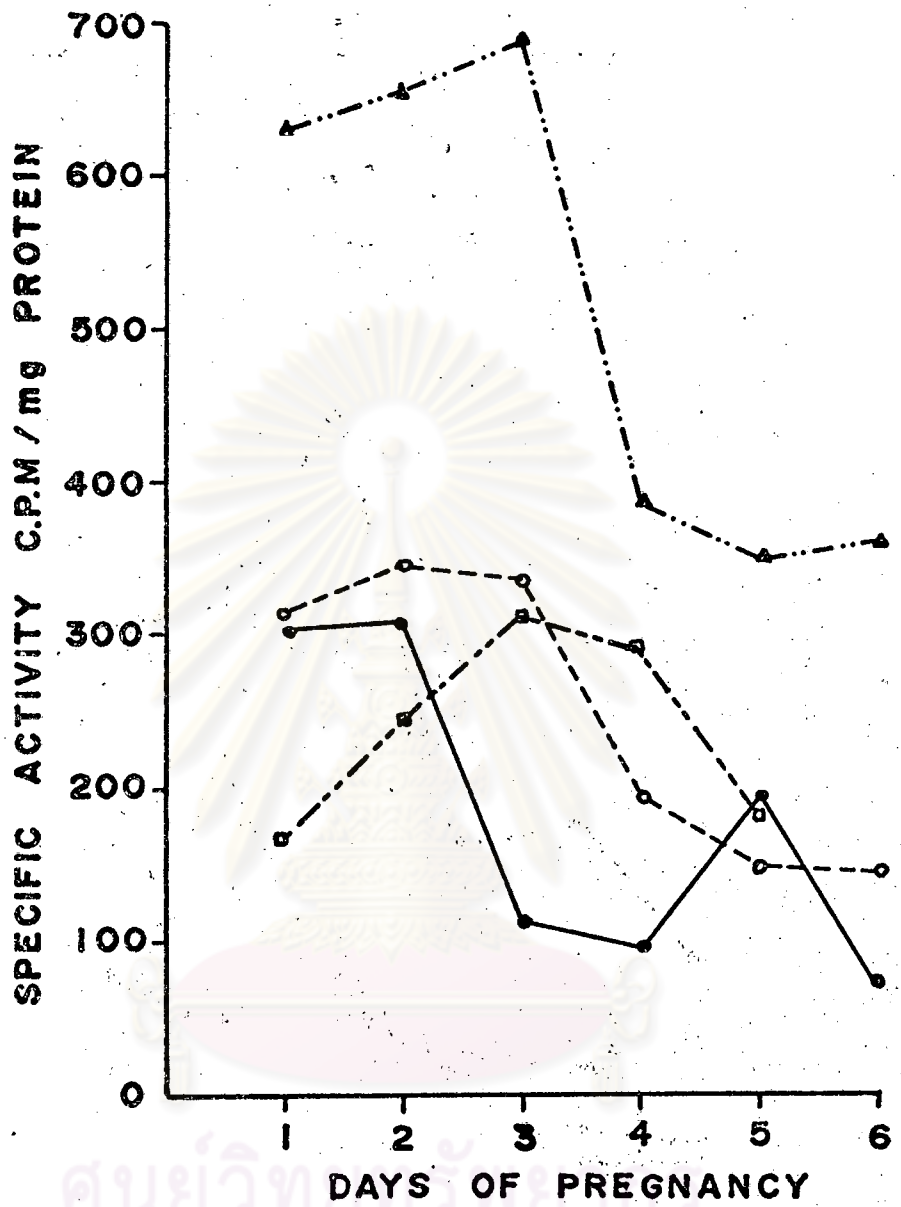
●———● เยื่อบุมดลูกหนูใส่ห่วงคุมกำเนิด

0 หมายถึง ระยะโปรเอสตรัส

C_0 หมายถึง ระยะเอสตรัส

L_1 หมายถึง ระยะเริ่มแรกของไดเอสตรัส

L_2 หมายถึง ระยะหลังของไดเอสตรัส



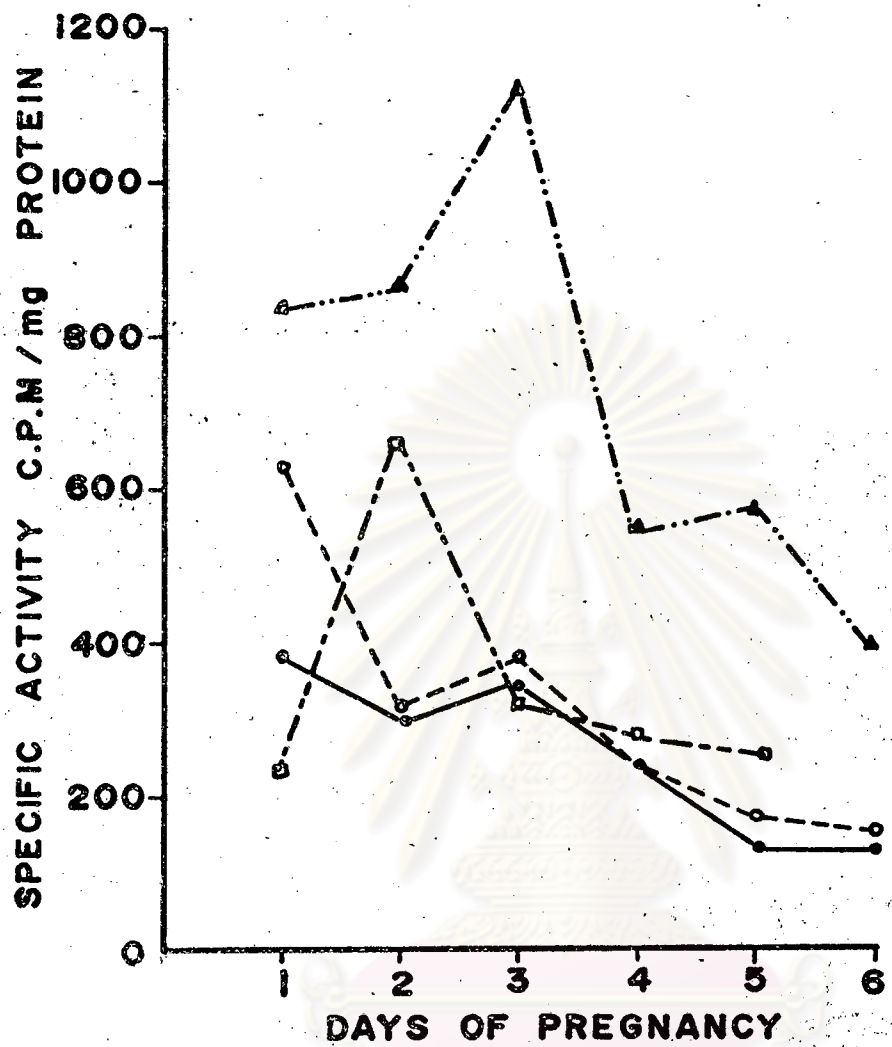
รูปที่ 21 การติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA แบบ pulse labelling ของเยื่อบุมดลูกหนูทดลองตั้งท้อง 1-6 วัน โดยฉีด ^{3}H-leucine 25 μCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตรเข้าไปทางช่องท้อง ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

▲–·–·–▲ เยื่อบุมดลูกหนูท้องปกติ

■– – – –■ เยื่อบุมดลูกหนูตั้งท้องเทียม

●– – – –● เยื่อบุมดลูกหนูตั้งท้องที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

●————● เยื่อบุมดลูกหนูตั้งท้องที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด



รูปที่ 22 การติดฉลากของ ^{3}H-leucine ในตะกอน TCA แบบ pulse labelling ของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองตั้งท้อง 1-6 วัน โดยฉีด ^{3}H-leucine 25 µCi ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร เข้าไปทางช่องท้อง ฆ่าหนูทดลองหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากหนูทดลอง 4 ตัว

▲-..-..-▲ ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูตั้งท้องปกติ

●——— ———●ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูตั้งท้องเทียม

●- - - -●ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูตั้งท้องที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และทำ sham operation

●————●ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูตั้งท้องที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณ cyclohexiมide ที่เหมาะสมในการฉีดทางช่องท้องแก่หนูทดลอง

จำนวนหนูทดลอง	ปริมาณที่ฉีด cyclohexiมide (ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนูทดลอง)	ผลการทดลอง
7	500	หนูตาย 5 ตัวภายใน 1 วัน เมื่อถึงวงจรสืบพันธุ์ต่อมาเก็บของเหลวจากมดลูกหนูทดลองที่เหลืออีก 2 ตัวไปศึกษา แล้วฉีด cyclohexiมide ปริมาณเท่าเดิมซ้ำอีก ปรากฏว่าหนูตายภายใน 1 วัน
2	400	หนูตายทั้ง 2 ตัวภายในเวลา 48 ชั่วโมง
2	300	หนูทั้ง 2 ตัวมีอาการไม่สบายในวันต่อมา และตายภายใน 3 วัน
2	200	หนูมีอาการปกติ ถึงแม้ว่าของเหลวที่เก็บได้จากมดลูกจะน้อยกว่าปกติ

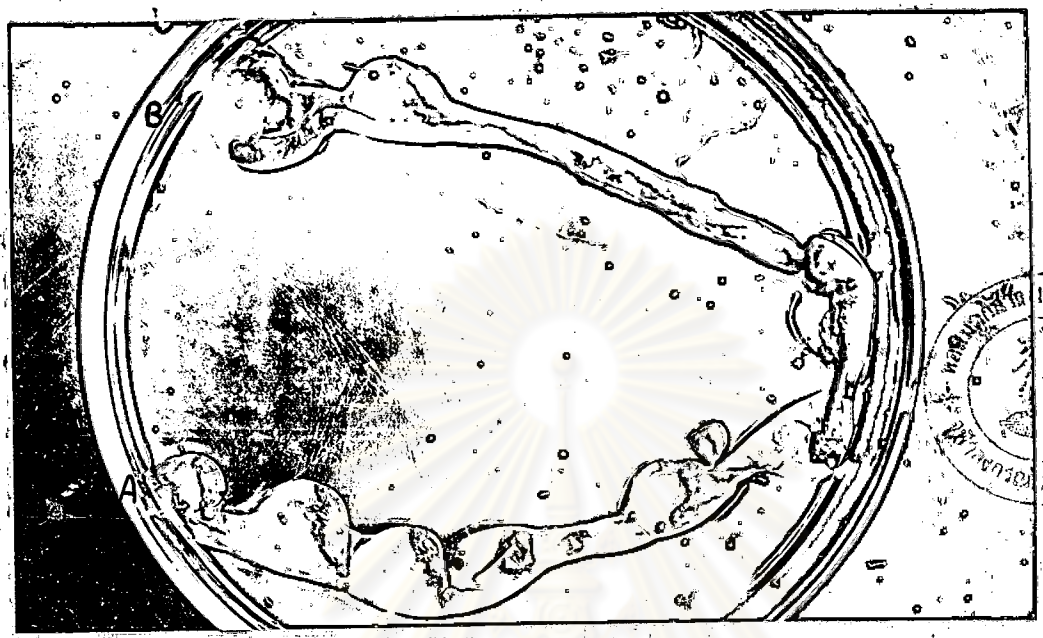
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ และมดลูกที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดภายหลังฉีด cycloheximide 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หนูทดลองทางช่องท้อง

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านท้องปกติ	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกใส่ห่วงคุมกำเนิดที่ได้รับการฉีด cycloheximide
1	7	3
2	7	4
3	3	5
4	2	2 (3 residual masses)
Mean ± S.D.	4.75 ± 2.62	3.25 ± 1.29

ตารางที่ 9 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ และมดลูกที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดภายหลังฉีด cycloheximide 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หนูทดลอง ทางช่องท้อง

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านท้องปกติ	มดลูกที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดที่ได้รับการฉีด cycloheximide
1	5	8
2	3	3
3	4	5
Mean ± S.D.	4.00 ± 1.00	5.30 ± 2.52



รูปที่ 23 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ (A) และมดลูกที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดที่ได้รับการฉีด cycloheximide (B)

รูปที่ 24 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ (A) และมดลูกที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดที่ได้รับการฉีด cycloheximide (B)

แต่ถ้าเราฉีด cyclohexiมide ให้แก่หนูท้องปกติโดยตรงในปริมาณ 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ไม่สามารถยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูทดลองได้ โดยจะพบ residual mass ที่ไม่เจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนปกติ สำหรับมดลูกหนูตั้งครรภ์ที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และได้รับการฉีดด้วย cyclohexiมide ปริมาณเดียวกัน เราจะไม่พบresidual mass ใด ๆ เลย (ตารางที่10)

ตารางที่ 10 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูใส่ และไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด ภายหลังที่ได้รับการฉีด cyclohexiมide (CH) 200 ไมโครกรัม/กิโลกรัมหนทดลองทางช่องท้อง

	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกดานไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด +CH	มดลูกดานใส่ห่วงคุมกำเนิด +CH
1	0 (1 residual mass)	0
2	0 (3 residual masses)	0
3	0 (2 residual masses)	0
Mean ± S.D.	0 (2.0 ± 1.0)	0

3.7 คุณสมบัติของชีวโมเลกุลที่แยกโดยวิธี Dyalysis

เพื่อทดสอบว่าตัวออกฤทธิ์ในการคุมกำเนิดของของเหลวในโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

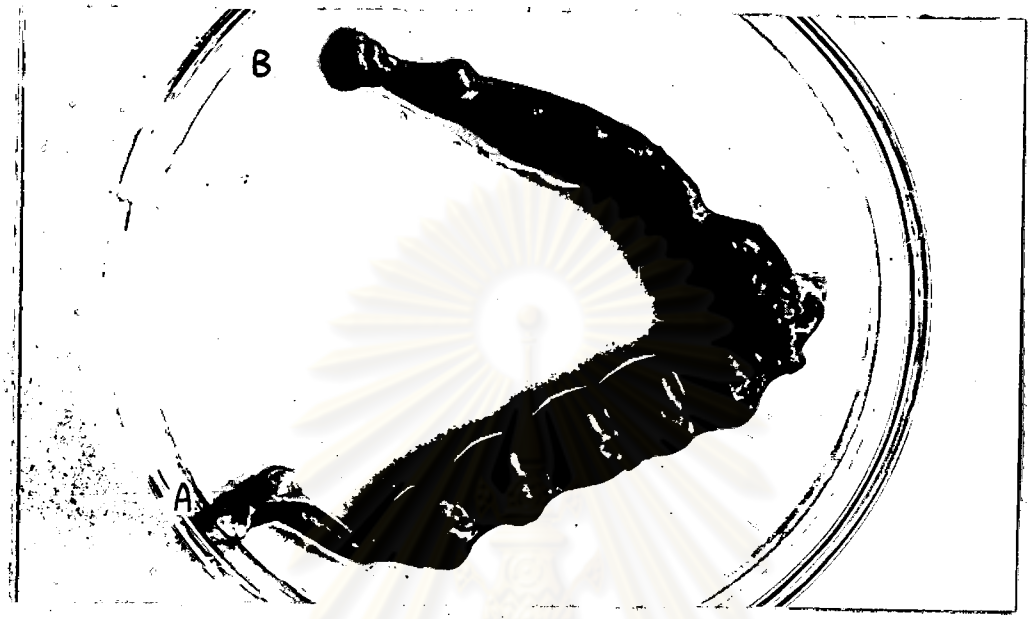
3.7.1 คุณสมบัติการคุมกำเนิด

ผลการทดลองเพื่อทดสอบคุณสมบัติการคุมกำเนิดของของเหลวส่วน non-dialysate และ dialysate โดยสังเกตดูผลการเจริญเป็นตัวอ่อนของบลาสโตซีสต์ภายหลังการฉีดของเหลวส่วน non-dialysate และ dialysate ที่ได้จากการ dialyse ของ

เหลวจากโพรง มดลูกหนูใส่ห่วงคุมกำเนิดใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าไปในโพรงมดลูกหนูท้องปกติ 4 วัน แสดงในตารางที่ 11 และตารางที่ 12 ตามลำดับ เราจะเห็นว่าส่วน non-dialysate ไม่มีคุณสมบัติการคุมกำเนิดเพราะสามารถไปยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ ดังจะเห็นได้จากการที่เรายังตรวจพบตัวอ่อนได้ และมีจำนวนเฉลี่ยใกล้เคียงกับด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกหนูปกติ (ตารางที่ 11 และรูปที่ 25) แต่ส่วน dialysate จะมีคุณสมบัติในการคุมกำเนิดเราจะไม่พบตัวอ่อนในมดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวส่วน dialysate เลย (ตารางที่ 12 และรูปที่ 26)

ตารางที่ 11 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิดและส่วน non-dialysate ที่ได้จากการ dialyse ใน0.85% โซเดียมคลอไรด์

หนูทดลองที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	มดลูกด้านที่ฉีดส่วน non-dialysate
1	2 (3 residual mass)	5 (1 residual mass)
2	5 (1 residual mass)	1 (5 residual mass)
3	5	6
Mean ± S.D.	4.00± 1.73	4.00± 2.65



รูปที่ 25 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (A) และส่วน non-dialysate (B)

ตารางที่ 12 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และส่วน dialysate ที่ได้จากการ dialyse ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	มดลูกด้านที่ฉีดส่วน dialysate
1	5	0
2	9	0
3	3 (1 residual masses)	0
Mean ± S.D.	5.60 ± 3.05	0

รูปที่26 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (A) และส่วน dialysate (B)

ตารางที่ 13 และ 14 แสดงผลเมื่อทดลองฉีดของเหลวที่ได้จากการ lyophilize ภายหลังที่ dialyse ของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดในน้ำกลั่นเข้าไปในมดลูกหนูท้องปกติ 4 วัน เราจะเห็นว่าผลการทดลองคล้ายคลึงกับของเหลวที่ได้จากการ dialyse ใน0.85% โซเดียมคลอไรด์ กล่าวคือส่วน non-dialysate จะสูญเสียคุณสมบัติการคุมกำเนิดแต่ส่วน dialysate ยังแสดงคุณสมบัติการคุมกำเนิด (หนูตัวที่ 2 และ3)บ้าง แต่มีผลน้อยกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 13 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และส่วน non-dialysate ที่ได้จากการ dialyse ในน้ำกลั่น

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เคลื่อนไปเป็นปกติ	
	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	มดลูกด้านที่ฉีดส่วน non-dialysate
1	5	4(1 residual mass)
2	8	3(3 residual masses)
3	4(2 residual masses)	3(2 residual masses)
4	5	4(5 residual masses)
5	2	7
6	7	7
7	5	5(1 residual mass)
Mean $\pm$ S.D.	5.10 $\pm$ 0.95	4.30 $\pm$ 2.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และส่วน dialysate ที่ได้จากการ dialyse ในน้ำกลั่น

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยของเหลวจากมดลูกหนูที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	มดลูกด้านที่ฉีด dialysate
1	3	0(5 residual masses)
2	2	1(2 residual masses)
3	5	0
4	4(2 residual masses)	0
5	2	0
6	5	0
Mean ± S.D.	3.50 ± 2.24	0.80 ± 1.43

3.7.2 คุณสมบัติการคงตัวต่อความร้อน

เมื่อนำส่วน non-dialysate และ dialysate ที่แยกได้ไป lyophilize แล้วนำมาละลายใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำแต่ละส่วนไปฉีดในโพรงมดลูกหนูท้องปกติ 4 วัน ผลการทดลอง(ตารางที่ 15 และรูปที่ 27 แสดงว่าตัวออกฤทธิ์ในส่วน dialysate มีสภาพคงทนต่อความร้อน คือ ไม่สูญเสียคุณสมบัติการยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ ถึงแม้จะได้รับการต้มที่ 100องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แต่ส่วน non-dialysate จะสูญเสียคุณสมบัติการคุมกำเนิดหลังจากการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 16 และรูปที่ 28)

ตารางที่ 15 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยส่วน dialysate ที่ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที และมดลูกหนูตั้งท้องปกติ

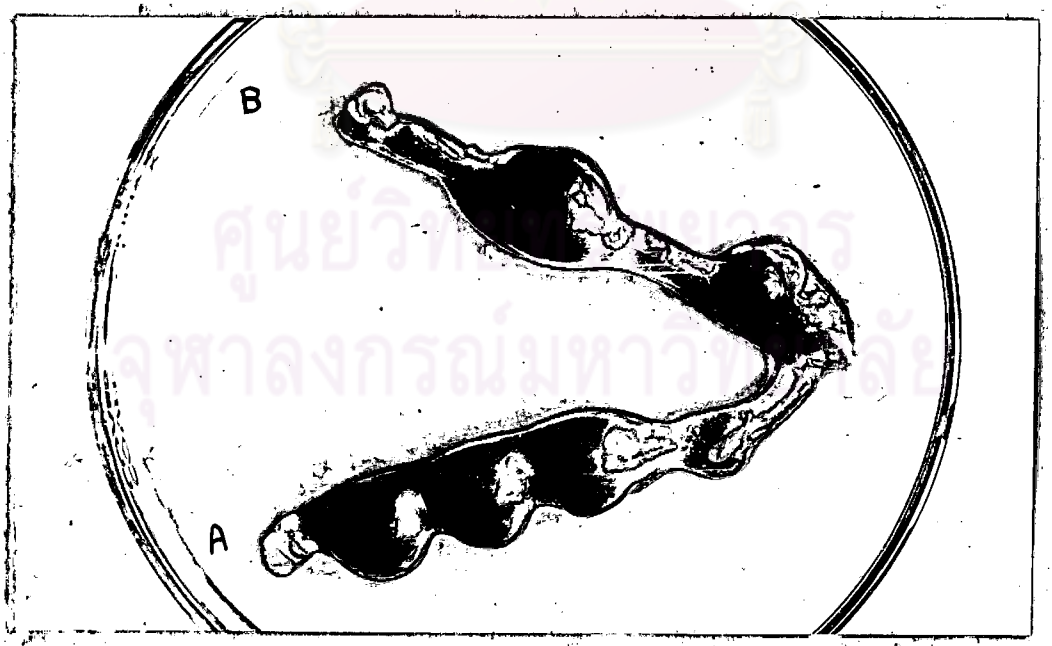
หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านท้องปกติ	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยส่วน dialysate
1	5(2 residual masses)	0
2	5	0
3	0(3 residual masses)	0
4	3	0
Mean $\pm$ S.D.	3.25 $\pm$ 1.44	0

ตารางที่ 16 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยส่วน non-dialysate ที่ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที และมดลูกหนูตั้งท้องปกติ

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านท้องปกติ	มดลูกด้านที่ฉีดด้วยส่วน non-dialysate
1	7	3(2 residual masses)
2	4	3(1 residual mass)
3	3(1 residual mass)	1(2 residual masses)
4	4(1 residuall mass)	1
Mean $\pm$ S.D.	4.50 $\pm$ 1.73	3.00 $\pm$ 1.63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ (A) และที่ฉีดด้วยส่วน dialysate ที่ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที (B)



รูปที่ 28 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ (A) และที่ฉีดด้วยส่วน non-dialysate ที่ต้ม 100 องศาเซลเซียส 10 นาที (B)

3.7.3 คุณสมบัติการคืนรูป (reconstitution) ของชีวโมเลกุลภายหลังจากที่แยกโดยวิธี Dialysis

เมื่อนำแต่ละของเหลวที่แยกได้จากการ dialyse ด้วยน้ำกลั่นมารวมกันอีกครั้งก่อนที่จะฉีดเข้าไปในโพรงมดลูกหนูท้องปกติ 4 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 29 จะเห็นว่าการรวมชีวโมเลกุลที่แยกโดยวิธี dialysis เข้าใหม่นี้จะยังคงยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ได้ตามปกติ คล้ายกับไม่ได้สูญเสียคุณสมบัติการคุมกำเนิด สรุปว่าของเหลวจากโพรงมดลูกที่แยกโดยวิธี dialysis สามารถคืนรูปได้

ตารางที่ 17 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวที่รวมเข้าใหม่ของของเหลวส่วน non-dialysate และส่วน dialysate และมดลูกหนูท้องปกติ

หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านท้องปกติ	มดลูกด้านที่ฉีดของเหลวที่รวมเข้าใหม่ของของส่วน non-dialysate และ dialysate
1	6	0
2	7	0
3	5	0
4	0(5 residual masses)	0
Mean ± S.D.	4.50 ± 1.71	0

รูปที่ 29 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูท้องปกติ (A) และในมดลูกหนูที่ฉีดด้วยของเหลวที่รวมเข้าใหม่ของของ เหลวส่วน non-dialysate และส่วน dialysate (B)

3.8 คุณสมบัติในการยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูทดลองของเม็ดเลือดขาว

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบว่า เม็ดเลือดขาวเป็นปัจจัยสำคัญในการคุมกำเนิด ตัวที่นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มเชื่อถือกันหรือไม่จึงทำการทดสอบดูผลการยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในหนูทดลองเมื่อได้รับการฉีดเม็ดเลือดขาวหรือไม่

เมื่อแยกเม็ดเลือดขาวจากเลือดของหนูทดลองตามที่อธิบายในข้อ 2.4.8.1 แล้วนำไปฉีดเข้าไปในโพรงมดลูกท้องปกติ 4 วันตามวิธีในข้อ 2.4.8.3 และดูผลเมื่อหนูตั้งท้อง 15 วัน เปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ฉีดด้วยของเหลวจากโพรงมดลูกปกติ เราจะเห็นว่าเม็ดเลือดขาวไม่มีผลในการยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูทดลอง (ตารางที่ 18 และรูปที่ 30)

ตารางที่ 18 การฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด และเมื่อฉีดด้วยเม็ดเลือดขาว 75 มิลลิกรัมโปรตีนใน 0.2 มิลลิลิตร 0.85% โซเดียมคลอไรด์

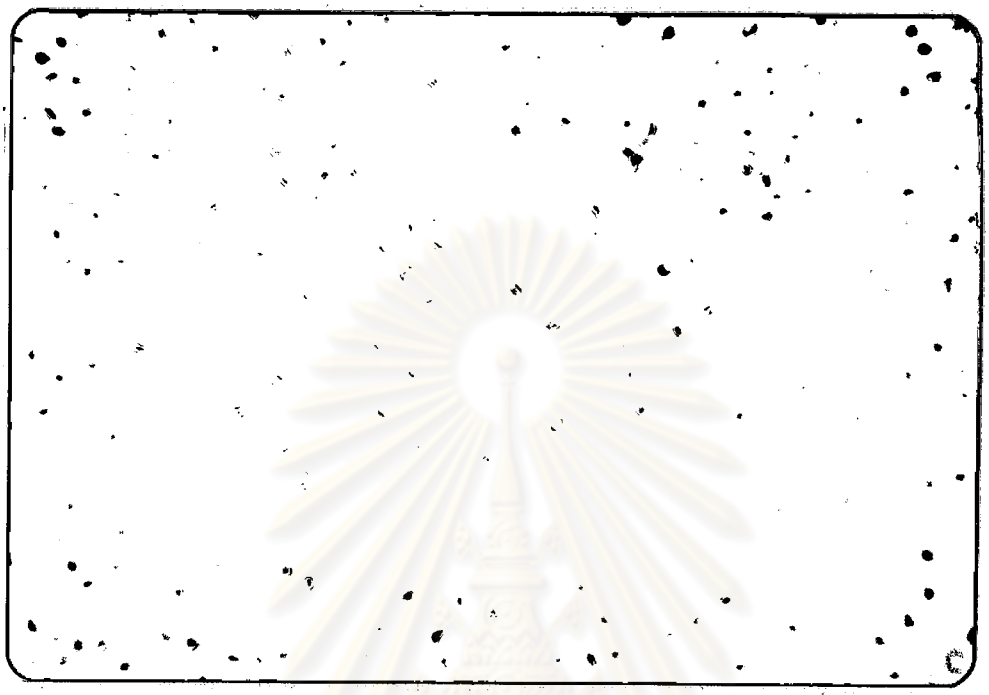
หนูทดลองตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกด้านที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด	มดลูกด้านที่ฉีดเม็ดเลือดขาว
1	5(1 residual mass)	4(2 residual masses)
2	3(1 residual mass)	2
3	7	3(5 residual masses)
4	2	3
Mean ± S.D.	4.25 ± 2.21	3.00 ± 0.82

รูปที่ 30 ภาพการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในมดลูกหนูที่ฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกที่ไม่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (A) และเมื่อฉีดด้วยเม็ดเลือดขาว 75 มิลลิกรัมโปรตีน (B) ใน 0.2 มิลลิลิตร 0.85 โซเดียมคลอไรด์

เพื่อยืนยันว่าเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทดลองข้างต้นเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีประสิทธิภาพจึงทำการทดลองต่อไปโดยการแยกเม็ดเลือดขาวจากหนูทดลองด้วยวิธีเช่นเดียวกัน แล้วนำเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ไปย้อมสีด้วย 0.2% Trypan blue ปรากฏว่าเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทดลองยังมีชีวิตอยู่เพราะไม่ติดสี trypan blue (Kissmeyer - Nielsen , 1970) ดังแสดงในรูปที่ 31 แต่หากทิ้งเม็ดเลือดขาวไว้เป็นระยะเวลานานประมาณ 1 สัปดาห์ แม้จะเป็นที่ 4 องศาเซลเซียสก็จะทำให้มันสูญเสียสภาพไป (รูปที่ 31) การทดลองที่ฉีดเม็ดเลือดขาวเข้าไปในโพรงมดลูกตามที่กล่าวในข้างต้นเป็นเม็ดเลือดขาวที่เก็บไว้นานไม่เกิน 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงยังไม่น่าเสียสภาพ ผลการทดลองทั้งสองนี้แสดงว่าเม็ดเลือดขาว (ปริมาณ 75 มิลลิกรัมโปรตีน) ไม่สามารถยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซีสต์ในหนูทดลองได้

รูปที่ 31 ภาพแสดงเม็ดเลือดขาวแยกได้ และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงจะไม่ติดสีของ Trypan blue
(ถ่ายด้วยระบบ phase contrast , 10 x 100)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 ภาพแสดงเม็ดเลือดขาวแยกได้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 สัปดาห์จะติดสีของ trypan blue
(ถ่ายด้วยระบบ phase contrast 10 x 100)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย