บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยงและระวังรักษาหนูขาวที่ใช้ในการทดลอง

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นหนูตัวเมียพันธุ์ Wistar ที่ยังไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อน อายุตั้งแต่ 50 วันขึ้นไป น้ำหนักตัวระหว่าง 100 ถึง 150 กรัม เลี้ยงในกรงอะลูมิเนียมขนาดปานหลาง ($1 \times 1 \times 2/3$ ฟุต^3) ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ $24 \pm 1^{o}C$ และได้รับแสงสว่างประมาณวันละ 14 ชั่วโมง (6.00 – 20.00 น.) มืด 10 ชั่วโมง (20.00 – 6.00 น.) อาหารที่ใช้เลี้ยงหนูเป็นอาหารมาตรฐาน ส่วนน้ำให้น้ำประปาธรรมดา

หนูที่ได้รับการฉีด oestradiol benzoate ถูกแยกเลี้ยงต่างหากโดยไม่ให้ปะปนกับพวกอื่น เพื่อป้องกันการติดต่อของฮอร์โมน (Contaminate) ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองผิดไปจากความจริงได้

2. การตรวจวงจรของรังไข่ (Oestrus cycle) ของหนูขาว

ระยะต่าง ๆ ของวงจรการตกไข่ในหนูขาวกำหนดได้จากลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏในการศึกษา vaginal smear (Long and Evans, 1922; Turner, 1960) ดังนี้

Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะถึง oestrus ในการศึกษา vaginal smear พบเซลล์รูปรี ๆ เล็ก มี nucleus อยู่ด้วย เป็น nucleated epithelium cells ไม่มี leucocytic cell อยู่เลย ระยะนี้แทนด้วย "O"

Oestrus เป็นระยะที่มี heat การผสมจะเกิดขึ้นในระยะนี้ มีการผลิต oestrogen มาก เกิดการแบ่งตัวในชั้นของ vaginal mucosa เซลล์ชั้นบนสุด (superficial layer) มีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม ไม่มี nucleus เรียก cornified epithelial cells เซลล์เหล่านี้จะหลุดเข้าไปอยู่ในช่องว่างใน vagina ในการทำ vaginal smear พบเซลล์เหล่านี้มาก ระยะนี้แทนด้วย "Co"

Metaoestrus เป็นระยะระหว่าง oestrus กับ dioestrus ระยะนี้สั้นมาก ในการทำ vaginal smear พบ leucocytic cells จำนวนมาก และมี cornified epithelial cells เล็กน้อย

Dioestrus เป็นระยะต่อจาก metaoestrus ช่วงเวลายาว 2 – 3 วัน ระยะนี้จะพบแต่ leucocytic cell เท่านั้น ระยะนี้แทนด้วย "L"

3. การตั้งครรภ์ (Pregnancy) ในหนูขาว

ช่วงหนูตัวเมียที่พบว่า reproductive cycle เป็นปกติ (4 – 5 วัน) มาอย่างน้อย 2 cycles และกำลังอยู่ในระยะ proestrus ไว้ในกรงเดียวกับหนูตัวผู้ทั้งคืน (ตัวเมีย 2 – 3 ตัว ต่อตัวผู้ 1 ตัว) ตรวจดู sperm plug หรือ spermatozoa โดยการทำ viginal smear ในเช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าพบ sperm plug หรือ spermatozoa นับวันที่พบ sperm นี้เป็นวัน 0 (Lo) ของการตั้งครรภ์ และวันต่อ ๆ ไปเป็น L_1, L_2..... ตามลำดับ หนูที่พบ sperms ในการทำ vaginal smear เท่านั้นที่ใช้ในการทดลองนี้

4. การเลี้ยงและระวังรักษา hamster ที่ใช้ในการทดลอง

Golden hamster ที่ใช้ในการทดลอง ได้มาจากแหล่งเลี้ยงของ Seato Lab. เลี้ยงในกรงอะลูมิเนียม ขนาด 1 x 1 x 2/3 ฟุต^3 ซึ่งรองด้วย

ขี้เลื่อยที่ผ่านการอบด้วยความร้อนให้แห้ง เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 24 ± 1°C และได้รับแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (6.00 – 20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (20.00 – 6.00 น.) เลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานของบริษัท F.E.Zeullic และดื่มน้ำประปาธรรมดา ในสัปดาห์หนึ่งให้ผัก เช่น แตงกวา หรือ มันเทศ 2 ครั้ง ในวันรุ่งขึ้นจะต้องเก็บเอาเศษผักที่เหลือทิ้ง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการบูดเน่าขึ้นในกรงที่เลี้ยง เมื่อตัวเมียอายุได้ประมาณ 5 อาทิตย์ เริ่มตรวจดู oestrous cycle ประมาณ 2 – 3 cycles แล้วผสมกับตัวผู้ที่มีขนาดโตกว่าตัวเมียเล็กน้อย โดยขังตัวเมีย 2 ตัวต่อตัวผู้ 1 ตัว ในกรงเดียวกัน ตรวจดู sperms หรือ sperm plug โดยการทำ vaginal smear ในวันรุ่งขึ้น เมื่อพบ sperms หรือ sperm plug แล้วแยกตัวเมียไว้ต่างหากกรงละ 1 ตัว ในราววันที่ 12 หลังจากพบ sperms ใส่สำลีลงไปในกรงเพื่อที่ hamster จะได้ทำรังสำหรับลูกอ่อน hamster มีระยะการตั้งครรภ์ประมาณ 16 วัน ในระหว่างที่มีลูกอ่อนจะเปลี่ยนกรงไม่ได้และจะต้องหลีกเลี่ยงการแตะต้องลูกอ่อน เพราะจะทำให้แม่ hamster กินลูกของมันถ้ามันถูกรบกวน เมื่อลูก hamster อายุ 30 วัน จึงแยกจากกรงแม่และแยกตัวผู้และตัวเมียไม่ให้ปะปนกัน hamster ที่เกิดครอกเดียวกันให้เลี้ยงในกรงเดียวกันได้ ถ้าแยกตัวหนึ่งตัวใดออกไปแล้วจะใส่เข้ากรงเดิมไม่ได้ต้องเลี้ยงต่างหาก

5. การตรวจ Oestrus cycle ของ hamster

5.1 วิธีการทำ Vaginal smear

ใช้มือซ้ายจับ hamster โดยจับหนังตั้งแต่บริเวณคอด้านหลังจนถึงลำตัวหงายท้องขึ้น ใช้แท่งแก้วปลายข้างที่แบนล้างด้วย 70% alcohol เช็ดให้แห้ง จุ่มใน physiological saline แตะที่บริเวณ vagina แล้วตรวจดูสิ่งที่ติดออกมากับแท่งแก้วด้วยตาเปล่าและตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์ ซึ่งจะพบว่า oestrus

cycle ของ hamster มีแบบ 4 วัน เพียงชนิดเดียว โดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้ (Ward,1946; Orsini,1961)

Day 1. (proestrus) vaginal smear พบน้ำเมือกใส ๆ เป็นสายยาวติดแท่งแก้ว ดูด้วยกล้องจุลทัศน์พบเซลล์รูปเหลี่ยม ๆ จำนวนมาก ซึ่งมีทั้ง non-nucleated และ nucleated epithelial cell และยังพบเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocyted) จำนวนเล็กน้อย ระยะนี้ hamster จะมี heat

Day 2. (oestrus) เวลาทำ vaginal smear พบเมือกสีขาวขุ่นข้น ๆ ติดแท่งแก้วออกมาเป็นสายซึ่งเรียก post oestrous discharge (Orsini,1961)ซึ่งเป็นลักษณะที่เห็นชัดที่สุดใน oestrus cycle ของ hamster hamster ตัวเมียจะขับ post oestrous discharge ออกมาภายหลังจากมี heat และอยู่ในระหว่างเวลาที่กำลังจะมีการตกไข่

Day 3. (metestrus A) ทำ vaginal smear พบน้ำใส ๆ บางครั้งอาจจะพบ waxy plug ด้วย ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะเห็นเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว มี epithelical cells ปะปนอยู่น้อยมาก

Day 4. (metestrus B) vaginal smear พบน้ำใส ๆ คล้าย Day 3 ไม่เป็นเมือก ตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์จะพบเซลล์ทั้งสามชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดขาว, epithelial cells ชนิดเหลี่ยม ๆ และ epithelial cells ชนิดกลมรูปไข่อยู่ปะปนกัน

6. การตั้งครรภ์ (Pregnancy) ใน hamster

การผสม hamster อาศัยดูจาก post oestrus discharge เป็นหลักเนื่องจากสามารถสังเกตุได้ง่ายและแตกต่างจากวันอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน จากการที่ทราบว่าpost oestrus dicharge นั้นถูกขับออกมาหลังจากที่ hamster ตัวเมียมี heat แล้ว ดังนั้นจึงต้องขังตัวเมียและตัวผู้ไว้ด้วยกัน 1 วัน ก่อนที่จะมี post oestrus discharge คือ ใส่ตัวผู้รวมกับตัวเมียภายหลังจาก 10.00 น. ของ Day 1 จึงจะได้ผลดีตามรายงานของ Greenwald (1963) พบว่า hamster สามารถผสมกันได้แม้ว่าตัวเมียยังไม่ถึงระยะมี heat ถ้าใส่ตัวผู้และตัวเมียรวมกันตั้งแต่ Day 3 หรือ Day 4 แล้วถ้ามีการผสมเกิดขึ้นในระหว่างนี้จะทำให้ corpora lutea ซึ่งอยู่ในสภาพ inactive เปลี่ยนเป็น functional corpora lutea ของการท้องเทียม ทำให้ไม่มีการตกไข่ใน oestrous cycle นั้น เวลาที่ดีที่สุดที่จะเกิด fertile mating นั้นอยู่ระหว่าง 18.00 น. ของ Day 1 จนถึง 9.30 น. ของ Day 2 (Ward,1946) ตรวจดู sperm หรือ sperm plug ใน vagina ของ hamster ตัวเมียนั้น ถ้าพบ sperm หรือ sperm plug ก็นับวันที่พบ sperm เป็นวัน 0 ของการตั้งครรภ์ (Lo) วันต่อไปนับเป็น $L_1, L_2 \ldots\ldots$ ตามลำดับ hamster ที่ตรวจพบ sperm ในการศึกษา vaginal smear เท่านั้นที่ใช้ในการทดลอง

7. การผ่าตัด (Operations)

การผ่าตัดทุกครั้งกระทำให้ขณะที่สัตว์ทดลองถูกดมยาสลบ (ether) เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าตัดทุกชิ้น semi-sterile โดยแช่ใน 2.5% Dettol solution ภายหลังเสร็จจากการผ่าตัดล้างเครื่องมือทุกชิ้นให้สะอาดแล้วเช็ดด้วยน้ำยา acetone อีกครั้งหนึ่งเพื่อป้องกันการติดต่อของยา ในกรณีที่ใช้ oestrogen

8. การตัดรังไข่ (Ovariectomy)

ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังซึ่งได้โกนขนออกและทาด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ Dettol solution และกล้ามเนื้อด้านข้างของลำตัวตรงบริเวณถัดจากกระดูกชี่โครงซี่สุดท้ายมาทางด้านหลังเล็กน้อย และต่ำลงมาจากระดับที่ไตอยู่ เปิดเป็นช่องยาวประมาณ 8 m.m. ใช้ปากคีบดึงเอาไขมันที่ติดอยู่กับรังไข่ขึ้นมา รังไข่จะติดขึ้นมาด้วย สอดปลายโค้งของกรรไกรให้ทะลุมันเข้าไปใต้ท่อนำไข่ ตัดตรงส่วนต่อระหว่างรังไข่กับส่วนต้นของท่อนำไข่ให้ขาดออกจากกัน ตัดรังไข่พร้อมทั้งไขมันที่อยู่รอบ ๆ บางส่วนออก เสร็จแล้วใส่ส่วนอื่น ๆ กลับเข้าไปในช่องท้องอย่างเดิม ใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกันก่อนชั้นหนึ่ง แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกให้ติดกัน

9. Autopsy

วางยาสลบสัตว์ทดลอง แล้วจึงเปิดหน้าท่องออกเป็นช่องกว้าง ตรวจดูลักษณะของมดลูกและเส้นเลือดที่มาเลี้ยงมดลูก ดูการฝังตัวของตัวอ่อน ตำแหน่งที่ตัวอ่อนฝังติดกับมดลูก และจำนวนของ blastocyst

10. การตรวจหา Activities ของ Acid และ Alkaline phosphatases ทาง Biochemical Analysis

ตัดมดลูกข้างขวาของสัตว์ทดลองมาบดให้ละเอียดด้วยทรายที่สะอาด 0.1 mg ในโกร่งที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ $-20^{\circ}C$ ละลายด้วย 0.25 M Sucrose ที่เก็บไว้ที่ $4^{\circ}C$ โดยใช้เนื้อเยื่อของมดลูก 0.1 mg ต่อ 0.25 M Sucrose 1 ml เก็บ homogenate tissue พักไว้ในที่อุณหภูมิประมาณ $-20^{\circ}C$ เพื่อป้องกันการสูญเสีย activities ของ enzymes เสร็จแล้วนำมาทดลองดังนี้

10.1 การตรวจทาง Biochemical Analysis ของ Acid และ Alkaline phosphatase. (Fiske and Subba Row, 1925)

หลักการ Incubate tissue homogenate กับ Acid phosphatase substrate pH 5.0 หรือ alkaline phosphatase substrate pH 9.3 เกิด phosphate ขึ้น molybdate ion ในสารละลายที่เป็นกรด จะจับกับพวก phosphate เกิดเป็น phosphomolybdic acid และถูก reduced โดย 1, 2, 4-aminonaphthol-sulfonic acid เกิดสีน้ำเงินของ molybdenum blue (Vogel, 1969) วัดความเข้มของสีด้วย spectrophometer (Spectronic 20) ที่ความยาวของคลื่นแสง 715 mμ

10.2 การตรวจทาง Biochemical Analysis ของ Acid phosphatase (Fiske and Subba Row, 1925)

10.2.1 Incubate Sample ใช้ pipette ดูด acid phosphatase substrate (pH 5.0) ที่เตียมไว้สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีตามข้อ 1.2 จำนวน 9 ml ใส่ลงใน volummetric flask ขนาด 25 ml ปิดฝาจุกแก้ว อุ่นใน water-bath ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่ง acid phosphatase substrate มีอุณหภูมิ 37°C แล้วดูด homogenate tissue 1 ml ใส่ลงไป เขย่าแล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งและหยุดปฏิกริยาของ enzyme โดยเติม 30% TCA เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 นาที กรองแล้วดูดมา 8 ml ใส่ในหลอดแก้วแล้วเติม molybdate reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากัน เติม amino-naphtholsulfonic acid reagent 0.4 ml เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml พอดี ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนเกิดสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัด optical density (O.D.) โดยเครื่อง Spectronic 20

10.2.2 Blank ใช้ pipette ดูด 5% TCA จำนวน 8 ml. ใส่ในหลอดทดลอง เติม molybdate reagent เขย่าจนเข้ากัน เติม aminonaphthosulfonic acid reagent 0.4 ml. เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

10.2.3 Control Sample ดูด acid phosphatase substrate 9 ml. ใส่ใน volummetric flask ขนาด 25 ml. เติม 30% TCA 2 ml. เขย่าจนเข้ากันแล้วเติม homogenate tissue 1 ml. เขย่าแล้วกรอง ดูด filtrate มา 8 ml. ใส่ในหลอดทดลอง เติม molybdate reagent 1 ml. เขย่าจนเข้ากัน เติม amino-naphtholsulfonic acid reagent 0.4 ml. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีจนเกิดสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัด O.D. ด้วยเครื่อง Spectronic 20

005174

10.2.4 Standard phosphate solution ดูด standard phosphate solution ที่มี phosphorus 0.04 mg/8 ml. 5% TCA จำนวน 8 ml. ลงในหลอดทดลอง เติม molybdate reagent 1 ml. เขย่าจนเข้ากันแล้วเติม aminonaphtholsulfonic acid reagent 0.4 ml. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนเกิดสีน้ำเงิน นำไปวัด O.D. ด้วยเครื่อง spectronic 20 ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.630

10.3 การตรวจทาง Biochemical Analysis ของ Alkaline phosphatase (Fiske and Subba Row,1925)

10.3.1 Incubated Sample วิธีเหมือนการตรวจของ acid phosphatase ทุกอย่าง เพียงแต่เปลี่ยน acid phosphatase substrate

17679230

เป็น alkaline phosphatase substrate ที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีตามข้อ 1.3

10.3.2 Blank วิธีการเหมือนการตรวจของ acid phosphatase ทุกประการ

10.3.3 Control Sample วิธีการเหมือนของ acid phosphatase ทุกอย่าง เพียงแต่เปลี่ยน acid phosphatase substrate เป็น alkaline phoaphatase substrate

10.4 การคำนวณหาปริมาณของ Inorganic phosphate

นำเอา O.D. มาคำนวณหาปริมาตรของ inorganic phosphate จากสูตร mg inorganic phosphate ใน 100 ml. ของ homogenate tissue

(Control หรือ incubated sample)

$$= \frac{\text{Density of Unknow}}{\text{Density of Standard}} \times 0.04 \times 100$$

phosphatase activity เท่ากับปริมาณของ inorganic phosphate ของ incubated sample ลบด้วย ของ control sample หน่วยออกมาเป็น mg ต่อ 100 ml. ของ homogenate tissue เท่ากับหน่วย Bodansky/100 ml. homogenate

11. การวัด Activities ของ Acid และ Alkaline phosphatases ทาง Histochemistry. (Comori,1950)

ตัดมดลูกข้างซ้ายของสัตว์ทดลองยาว ประมาณ 3 – 5 m.m. freeze ให้เย็นจัดจนแข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ในตู้ cryostate (IEC)

ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ $-20^{\circ}C$ แล้วเอา tissue ติดบนแป้นเหล็กสำหรับใช้ตัด section ด้วยน้ำยา cryoform ภายในตู้ cryostate (IEC) ตัด section ด้วยเครื่อง cryostate (IEC) ให้ section หนา 12 μ วาง section บน cover glass ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหา activities ของ acid และ alkaline phosphatases ทันที

11.1 Lead Nitrate Method for 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 ซึ่งเมื่อทำปฏิกริยากับ yellow ammonium sulphide เกิดเป็น lead sulphide ตะกอนสีน้ำตาลตรงบริเวณที่มี acid phosphatase activity

วิธีการทดลอง Incubate section ของมดลูกที่มีความหนา 12 μ ใน acid phosphatase substrate ที่อุ่นใน water-bath ที่มีอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเอา section มาล้างน้ำ เสร็จแล้วนำไปจุ่มใน 2% yellow ammonium sulphide 1 นาที ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น mount ด้วย glycerine jelly บน slide ที่สะอาด ใช้ยาทาเล็บยาขอบเพื่อป้องกันไม่ให้ section แห้ง นำมาตรวจดู acid phosphatase activity ด้วยกล้องจุลทัศน์ จะเห็นสีน้ำตาลของ lead sulphide ตรงบริเวณที่มี acid phosphatase activity

11.2 The Calcium Co-balt Method for Alkaline phosphatase (Gomori, 1950)

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

วิธีการทดลอง นำเอา section ของมดลูกของสัตว์ทดลองซึ่งหนา 12 μ ที่ติดบน cover glass มา incubate ใน alkaline phosphatase substrate ที่อุ่นใน water-bath ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง เสร็จแล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที จุ่มใน 2% Co-balt nitrate 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปา 1 นาที แล้วนำไปจุ่มใน 2% yellow ammonium sulphide 1 นาที ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น mount ด้วย glycerine jelly บน slide ที่สะอาด ใช้ยาทาเล็บยาขอบ นำเอา section ที่ย้อมสีเสร็จแล้วมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ จะเห็นสีดำของ Co-balt sulphide ติดอยู่ตรงบริเวณที่มี alkaline phosphatase activity

12. การตรวจลักษณะโครงสร้างของมดลูกของสัตว์ทดลองทาง Histology

ตัดมดลูกข้างซ้ายยาวประมาณ 3 – 5 m.m. fix ด้วย Kahles' FAA. นาน 24 ชั่วโมง ⟶ dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70% alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ 80% alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ 90%

alcohol 12 ชั่วโมง ⟶ 95% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 6 ชั่วโมง ⟶ absolute alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ $Xylene_1$ 1 ชั่วโมง ⟶ $Xylene_2$ 1 ชั่วโมง ⟶ Xylene + Melted wax ครึ่งชั่วโมง ⟶ wax_1 ครึ่งชั่วโมง ⟶ wax_2 ครึ่งชั่วโมง ⟶ นำมา embed ใน parraffin wax ตัด serial section หนา 6 μ ย้อมสี Ehrlich's acid Haematoxylin และ 0.5% alcohol Eosin ⟶ dehydrate ด้วย alcohol ⟶ clear ด้วย Xylene ⟶ mount ใน caedex นำไปตรวจลักษณะโครงสร้างของมดลูกของสัตว์ทดลองด้วยกล้องจุลทัศน์

แผนการทดลอง

หนูขาวตัวเมียพันธุ์ Wistar ที่ใช้ในการทดลอง อายุตั้งแต่ 50 วันขึ้นไป และยังไม่เคยผ่านการผสมมาก่อน จำนวน 100 ตัว และ golden hamster ตัวเมียที่ใช้ในการทดลอง อายุตั้งแต่ 6 – 8 อาทิตย์และยังไม่เคยผ่านการผสมมาก่อน จำนวน 25 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น การศึกษาในระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4) และระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6) แล้วแบ่งเป็นหมู่ย่อย ดังนี้

1. <u>ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์และแอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูก โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี</u>

   1.1 แบ่งการศึกษาย่อยลงเป็น 2 ระยะ ทำการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

      1.1.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะ L_4

      1.1.2 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะ L_6

      1.1.3 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ระยะ L_6

      1.1.4 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะ L_4

      1.1.5 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะ L_6

      1.1.6 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ระยะ L_6

1.2 แบ่งการทดลองในหนูระยะ L_4 และ L_6 ออกเป็นหมู่ตามตารางที่ 1

1.2.1 หมู่หนูท้องปกติ L_1- L_4 ดูผลการทดลอง L_4

1.2.2 หมู่หนูท้องปกติ L_1- L_6 ดูผลการทดลอง L_6

1.2.3 หมู่หนูท้อง L_3 - ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_4

1.2.4 หมู่หนูท้อง L_3 - ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_6

1.2.5 หมู่หนูท้องฉีด stelazine L_1- L_3 ดูผลการทดลอง L_4

1.2.6 หมู่หนูท้องฉีด stelazine L_1 - L_5 ดูผลการทดลอง L_6

1.2.7 หมู่หนูท้อง L_3- ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_4

1.2.8 หมู่หนูท้อง L_3- ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_6

1.2.9 หมู่หนูท้อง L_3- ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone + oestradiol benzoate ดูผลการทดลอง L_4

1.2.10 หมู่หนูท้อง L_3- ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone + oestradiol benzoate ดูผลการทดลอง L_6

1.3 แบ่งการทดลองในแฮมสเตอร์ ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6) (L_6) ออกเป็นหมู่ตามตารางที่ 2

1.3.1 หมู่แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1 - L_6 ดูผลการทดลอง L_6

1.3.2 หมู่แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_3- ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_6

1.3.3 หมู่แฮมสเตอร์ท้องฉีด stelazine L_1 - L_5 ดูผลการทดลอง L_6

1.3.4 หมู่แฮมสเตอร์ท้อง L_3 - ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_6

1.3.5 หมู่แฮมสเตอร์ท้อง L_3 - ตัดรังไข่แล้วฉีด progesterone + oestradiol bezoate ดูผลการทดลอง L_6

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการแบ่งหมู่การทดลอง ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์และแอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4) และระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง		ฮอร์โมนและยากดประสาทที่ใช้ทดลอง			วันที่ฆ่าดูผล
หมู่ที่	ทดลอง	Treatment	Dose mg/100g.	Route	
1	หนูท้องปกติ L_1-L_4	-	-	-	L_4
2	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	-	-	-	L_4
3	หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_3	Stelazine	4.0	Subcutaneous	L_4
4	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_4
5	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone + Oestradiol benzoate (E.B.)	4.0 0.1µg/100 g.	Intramuscular Intramuscular	L_4
1	หนูท้องปกติ L_1-L_6	-	-	-	L_6
2	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	-	-	-	L_6
3	หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	Stelazine	4.0	Subcutaneous	L_6
4	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_6
5	หนูท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone + Oestradiol benzoate (E.B.)	4.0 0.1µg/100g.	Intramuscular Intramuscular	L_6

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการแบ่งหมู่การทดลองศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์และแอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง		ฮอร์โมนและยากดประสาทที่ใช้ทดลอง			วันที่
หมู่ที่	ทดลอง	Treatment	Dose mg/100g.	Route	ฆ่าดูผล
1	แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_6	-	-	-	L_6
2	แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	-	-	-	L_6
3	แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	Stelazine	4.0	Subcutaneous	L_6
4	แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_6
5	แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	Progesterone + Oestradiol benzoate (E.B.)	4.0 / 0.1µg/100g.	Intramuscular / Intramuscular	L_6 / L_6

2. <u>ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์และแอสิดฟอสฟาเตส ในผนังมดลูก โดยวิธีวิเคราะห์ทาง Histochemistry</u>

วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาในข้อ 1
ใช้สัตว์ทดลองชุดเดียวกันกับการทดลองในข้อ 1 และ
แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นหมู่ ๆ เช่นเดียวกันกับข้อ 1

3. <u>ศึกษาลักษณะทาง Histology ของผนังมดลูก เพื่อดูสมรรถภาพของการฝังตัวของตัวอ่อนของหนูและแฮมสเตอร์</u>

3.1 ศึกษาลักษณผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4)

3.1.1 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องปกติ ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวออน (L_4)

3.1.2 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ L_3 ดูผลระยะ L_4

3.1.3 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องฉีด stelazine ตั้งแต่ระยะ L_1 ถึง L_3 ฆ่าดูผลระยะ L_4

3.1.4 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ L_3 แล้วฉีด progesterone ภายหลังจากตัดรังไข่ ฆ่าดูผลระยะ L_4

3.1.5 ผนังมกลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ L_3 แล้วฉีด progesterone oestradiol benzoate ภายหลังจากตัดรังไข่ ฆ่าดูผลระยะ L_4

3.2 ศึกษาลักษณะผนังมดลูกหนูระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

3.2.1 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องปกติ ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวออน L_6

3.2.2 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ ระยะ L_3 ดูผลระยะ L_6

3.2.3 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องฉีด stelazine ตั้งแต่ระยะ L_1 ถึง L_5 ฆ่าดูผล L_6

3.2.4 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ระยะ L_3 แล้วฉีด progesterone ภายหลังจากตัดรังไข่จนถึงระยะ L_5 ฆ่าดูผล L_6

3.2.5 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ระยะ L_3 แล้วฉีด progesterone + oestradiol benzoate ภายหลังจากตัดรังไข่จนถึงระยะ L_5 ฆ่าดูผล L_6

3.3 ศึกษาลักษณะผนังมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

3.3.1 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ท้องปกติ ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

3.3.2 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ระยะ L_3 ฆ่าดูผลระยะ L_6

3.3.3 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ท้องฉีด stelazine ตั้งแต่ระยะ L_1 ถึง L_5 ฆ่าดูผล L_6

3.3.4 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ระยะ L_3 แล้วฉีด progesterone ภายหลังจากตัดรังไข่จนถึงระยะ L_5 ฆ่าดูผล L_6

ผลการทดลอง

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนในผนังมดลูกหนูระยะ L_6

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน implantation sites										ค่าเฉลี่ย implantation sites + S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	
1 หนูท้องปกติ L_1-L_6	13	13	11	12	12	12	11	12	10	14	12 ± 0.36
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	0	0	0	13	13	14	11	0	0	11	6.2 ± 2.08
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	0	5	5	0	0	1	0	0	2	0	1.3 ± 0.65

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนในผนังมดลูก hamster ระยะ L_6

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน implantation sites					ค่าเฉลี่ยของ implantation sites ± S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	
1 แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_6	13	12	13	14	16	13.6 ± 0.68
2 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	0	0	0	0	0	0
3 แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	14	15	14	16	15	14.8 ± 0.37
4 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	13	11	13	13	11	12.2 ± 0.48
5 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	13	11	11	13	1	9.8 ± 2.25

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 gm/day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 5 แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาค่าของ Inorganic Phosphate

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	จำนวน mg% Inorganic phosphate										Mean±S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	
1 หนูท้องปกติ L_1-L_4	0.191	0.210	0.210	0.343	0.295	0.229	0.219	0.191	0.276	0.286	0.245 ± 0.016
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.257	0.381	0.552	0.429	0.562	0.562	0.267	0.267	0.543	0.410	0.423 ± 0.040**
3 หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_3	0.248	0.314	0.295	0.229	0.371	0.381	0.276	0.267	0.238	0.400	0.302 ± 0.020*
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3	0.229	0.286	0.295	0.305	0.171	0.229	0.343	0.238	0.191	0.286	0.257 ± 0.017
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3	0.248	0.248	0.352	0.286	0.248	0.333	0.200	0.238	0.181	0.229	0.256 ± 0.017

* significant different เปรียบเทียบ Control เมื่อ ($P < 0.05$)

** significant different เปรียบเทียบ Control เมื่อ ($P < 0.01$)

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของหนูระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ Inorganic Phosphate

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน mg % Inorganic phosphate										Mean ± S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	
1 หนูท้องปกติ L_1-L_6	0.762	0.667	0.667	0.943	1.162	0.943	1.210	1.238	0.905	1.143	0.964 ± 0.069
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.762	0.381	0.371	0.362	0.429	0.381	0.324	0.467	0.476	0.581	0.453 ± 0.041**
3 หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	0.191	0.238	0.381	0.571	0.619	0.571	0.724	0.362	0.210	0.657	0.452 ± 0.063**
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	0.381	0.286	0.571	0.210	0.371	0.286	0.210	0.552	0.200	0.248	0.332 ± 0.043**
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	0.191	0.229	0.257	0.191	0.238	0.333	0.267	0.210	0 286	0.276	0.248 ± 0.014**

** significant different เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.01$)

oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 7 แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของแฮมสเตอร์ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ Inorganic Phosphate

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน mg % Inorganic phosphate					Mean ± S.E.
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	
1 แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_5	0.448	0.238	0.476	0.905	0.943	0.602±0.138
2 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	0.295	0.238	0.714	0.429	0.200	0.375±0.093 *
3 แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	0.857	0.867	1.000	0.943	1.019	0.937±0.033
4 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	0.676	0.495	0.695	0.743	0.686	0.659±0.042
5 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	0.781	0.971	1.143	1.143	0.476	0.903±0.126

* Significan different เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.05$)

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 8 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ Inorganic Phosphate

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	จำนวน mg % Inorganic phosphate										Mean ± S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	
1 หนูท้องปกติ L_1-L_4	0.267	0.381	0.352	0.638	0.324	0.381	0.381	0.286	0.391	0.676	0.408 ± 0.044
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.381	0.419	0.781	0.714	0.638	0.762	0.571	0.343	0.467	0.381	0.546 ± 0.053
3 หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_3	0.543	0.695	0.695	0.591	0.476	0.429	0.391	0.591	0.476	0.467	0.535 ± 0.033*
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3	0.562	0.429	0.381	0.410	0.333	0.410	0.276	0.305	0.333	0.305	0.374 ± 0.027
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3	0.381	0.419	0.381	0.429	0.438	0.343	0.362	0.333	0.305	0.295	0.369 ± 0.016

* Significant different เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.05$)

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 9 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ Inorganic phosphate

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน mg % Inorganic phosphate										Mean ± S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	
1 หนูท้องปกติ L_1-L_6	0.286	0.276	0.286	0.257	0.333	0.381	0.438	0.191	0.333	0.286	0.307 ± 0.022
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.286	0.238	0.429	0.667	0.429	0.333	0.324	0.181	0.714	0.714	0.432 ± 0.063
3 หนูท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	0.381	0.381	0.429	0.352	0.286	0.305	0.286	0.410	0.324	0.476	0.363 ± 0.020
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	0.495	0.610	0.448	0.333	0.476	0.305	0.381	0.610	0.571	0.429	0.466 ± 0.034**
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	0.429	0.391	0.533	0.410	0.288	0.191	0.457	0.200	0.152	0.448	0.350 ± 0.042

** Significan different เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.01$)

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. dose 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 10 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิคฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของแฮมสเตอร์ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ Inroganic Phosphate

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน mg % Inorganic Phosphate					Mean ± S.E.
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	
1 แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_6	0.114	0.362	0.162	0.114	0.095	0.169±0.049
2 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	0.200	0.143	0.714	0.200	0.095	0.270±0.112
3 แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine L_1-L_5	0.219	0.133	0.143	0.171	0.162	0.166±0.015
4 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3-L_5	0.048	0.057	0.038	0.086	0.210	0.088±0.031
5 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen L_3-L_5	0.200	0.181	0.429	0.333	0.286	0.286±0.045

Oestrogen ที่ใช้คือ E.B. 0.1 µg/100 g./day

Progesterone dose 4 mg/100 g./day

Stelazine dose 4 mg/100 g./day

ตารางที่ 11 แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน ย้อมด้วยวิธี Calcium Co-balt Methode

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	Luminal epi-thelium	Stroma	Glandu-lar epi-thelium	Capillary & vein	Large blood vessel	Circular muscle	Longitudinal muscle
1 หนูท้องปกติ L_1-L_4 (Fig. 4a)	+	+	+ +	+ + + +	+	+	+
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 (Fig. 4b)	+ + + +	+	+ +	+ + + +	+	+	+
3 หนูท้องฉีด Stelazine 4 mg./100 g./day L_1-L_3 (Fig. 4c)	+ +	+	+ +	+ + + +	+	+	+
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./ 100 g./day L_3 (Fig. 4d)	+ + +	+	+ +	+ + + +	+	+	+
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./100 g./day + E.B. 0.1 µg/100 g./day L_3 (Fig. 4e)	+ + +	+	+ +	+ + + +	+	+	+

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด

+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก

+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง

+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย

ตารางที่ 12 - แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของหนูระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ย้อมด้วยวิธี Calcium Co-balt Methode

หนูหนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	Luminal epithelium	Stroma or Decidua	Glandular epithelium	Capillary & Vein	Large blood vessel	Circular muscle	Longitudinal muscle
1 หนูท้องปกติ L_1-L_6							
Implantation site	- (Fig. 5a)	+ + + + (Fig.5a,6a)	+ (Fig.5a,6d)	+ + + + (Fig.5a,6a)	- (Fig.6d)	- (Fig.5a,6a)	- (Fig.5a,6a)
Interimplantation site	+ (Fig.5b,6c)	+ (Fig.5b,6b,6c)	+ + + (Fig.5b,6b)	+ + + + (Fig.5b,6b,6c)	0	+ (Fig.5b,6b)	+ (Fig.5b)
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 (Fig. 5c)	+ + + (Fig.5c)	+ (Fig. 5e)	+ + + (Fig. 5c)	+ + + + (Fig. 5c)	0	+ (Fig. 5c)	+ (Fig.5c)
3 หนูท้องฉีด Stelazine 4 mg./100 g./day L_1-L_5	+ + + + (Fig.5d,6e)	+ (Fig.5d,6e)	+ + + (Fig.5d,6e)	+ + + + (Fig.5d,6c,6f)	+ (Fig.6f)	+ (Fig.5d,6f)	+ (Fig.5d,6f)
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./100 g./day L_3-L_5 (Fig. 5e)	+ + +	+	0	+ + + +	0	+	+
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./100 g./day + E.B. 0.1 ug/100 g./day L_3-L_5 (Fig.5f)	+	+	+	+ + + +	0	+	+

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด
+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก
+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง
+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย
- ไม่มีเอนไซม์
0 ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากตัด section แล้วไม่ผ่านส่วนนี้

ตารางที่ 13 แสดงการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของแฮมสเตอร์ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ย้อมด้วยวิธี Calcium Co-balt Methode

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	Luminal epithelium	Stroma or Decidua	Glandular epithelium	Capillary & Vein	Monocyte	Muscle
1 แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_6						
Implantation site	+ (Fig. 7b)	+ + + + (Fig. 7b)	o	+ + + + (Fig. 7b)	+ + + + (Fig. 8b)	- (Fig. 7b)
Interimplantation site	+ (Fig. 7c)	+ + + + (Fig. 7c)	+ (Fig. 7c)	+ + + + (Fig. 7e)	o	- (Fig. 7c)
2 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	+ + + + (Fig.7a,8c)	+ + + + (Fig.7a,8c)	+ (Fig. 8d)	+ + + + (Fig. 8d)	o	- (Fig. 7a)
3 แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine 4 mg./ 100 g./day L_1-L_5						
Implantation site	+ (Fig.7d,8e)	+ + + + (Fig.7d,8e)	+ (Fig. 7d)	+ + + + (Fig. 7d)	+ + + + (Fig. 8f)	- (Fig. 7d)
Interimplantation site	+ (Fig. 7e)	+ + + + (Fig. 7e)	+ (Fig. 7e)	+ + + + (Fig. 7e)	o	- (Fig. 7e)

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด
+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก
+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง
+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย
- ไม่มีเอนไซม์
o ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากเวลาตัด section แล้วไม่ผ่านส่วนนี้

ตารางที่ 14 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน ย้อมด้วยวิธี Lead Nitrate Methode

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	Luminal epithelium	Stroma	Glandular epithelium	Large blood vessel	Circular muscle	Longitudinal muscle
1 หนูท้องปกติ L_1-L_4 (Fig. 9a)	+ + +	+	+	+	+	+
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 (Fig. 9b)	+ + +	+ +	+ +	+	+ +	+ +
3 หนูท้องฉีด Stelazine 4 mg/100g./day L_1-L_3 (Fig. 9 c)	+ + +	+	+ + +	0	+	+
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4mg/100 g./day L_3 (Fig. 9d)	+ + + +	+ +	+ + +	0	+ +	+ +
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 4 mg/100 g./day + E.B. 0.1 µg/ 100g./day L_3 (Fig. 9e)	+ + +	+	+	+	+	+

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด
+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก
+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง
+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย
0 ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากเวลาตัด section แล้วไม่ผ่านส่วนนี้

ตารางที่ 15 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนูระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ย้อมด้วยวิธี Lead Nitrate Methode

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	Luminal epithelium	Stroma or Decidua	Glandular epithelium	Large blood vessel	Circular muscle	Longitudinal muscle
1 หนูท้องปกติ L_1-L_6						
Implantation site	+ + + (Fig.10a,11a)	+ (Fig.10a,11b)	+ + (Fig.10a,11b)	+ (Fig.11c)	+ (Fig.10a,11b)	+ (Fig.10a,11c)
Interimplantation site	+ (Fig. 10b)	- (Fig. 10b)	+ (Fig. 10b)	o	- (Fig. 10b)	- (Fig. 10b)
2 หนูท้องตัดรังไข่ L_3	+ (Fig. 10c)	+ (Fig. 10c)	+ + (Fig. 10c)	o	+ (Fig. 10c)	+ (Fig. 10c)
3 หนูท้องฉีด Stelazine 4 mg./100 g./day L_1-L_5	+ + + (Fig. 10d)	+ (Fig. 10d)	+ + + (Fig. 10d)	o	+ + (Fig. 10d)	+ + (Fig. 10d)
4 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./100 g./day L_3- L_5	+ + + + (Fig. 10e)	+ + (Fig. 10e)	+ + + + (Fig. 10e)	o	+ + + (Fig. 10e)	+ + (Fig. 10e)
5 หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone 4 mg./100 g./day + E.B. 0.1 µg/100 g./day L_3-L_5	+ + + + (Fig. 10f)	+ + (Fig. 10f)	+ + (Fig. 10f)	o	+ + (Fig. 10f)	+ + (Fig. 10f)

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด
+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก
+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง
+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย
- ไม่มีเอนไซม์
o ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากเวลาตัด section แล้วไม่ผ่านส่วนนี้

ตารางที่ 16 แสดงการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกของแฮมสเตอร์ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนย้อมด้วยวิธี Lead Nitrate Methode

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	Luminal epithelium	Stroma or Decidua	Glandular epithelium	Large blood vessel	Muscle
1 แฮมสเตอร์ท้องปกติ L_1-L_6					
Implantation site	+ + + (Fig. 12a)	+ (Fig. 12a)	+ + + + (Fig. 12a)	0	+ (Fig. 12a)
Interimplantation site	+ + + + (Fig. 12b)	+ + (Fig. 12b)	+ + + + (Fig. 12b)	0	+ (Fig. 12b)
2 แฮมสเตอร์ท้องตัดรังไข่ L_3	+ + (Fig. 12f)	+ + (Fig. 12f)	+ + (Fig. 12f)	0	+ + (Fig. 12f)
3 แฮมสเตอร์ท้องฉีด Stelazine 4 mg./100 g./day L_1-L_5					
Implantation site	+ + (Fig.12c,12e)	+ (Fig.12c,12e)	+ + + + (Fig. 12c)	+ (Fig. 12c)	+ (Fig. 12c,11e)
Interimplantation site	+ + + + (Fig. 12d)	+ + (Fig. 12d)	+ + + + (Fig. 12d)	0	+ (Fig. 12d)

+ + + + มีการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด
+ + + มีการทำงานของเอนไซม์มาก
+ + มีการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง
+ มีการทำงานของเอนไซม์น้อย
0 ไม่ได้ศึกษาเนื่องจากเวลาตัด section แล้วไม่ผ่านส่วนนี้

อักษรย่ออธิบายกราฟ

C = Control

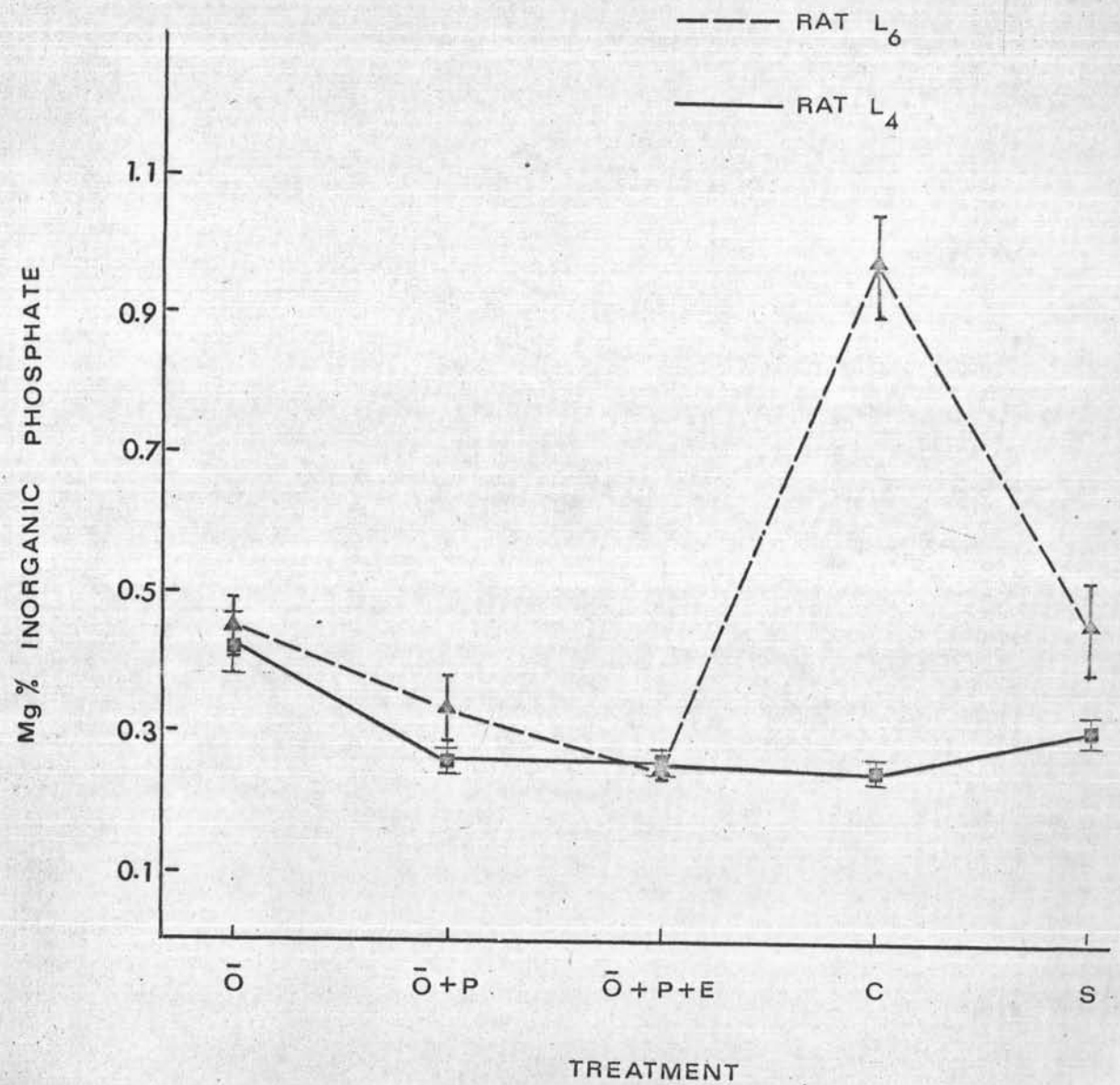
$\bar{O}$ = Ovariectomy

$\bar{O}$ + P = Ovariectomy + Progesterone

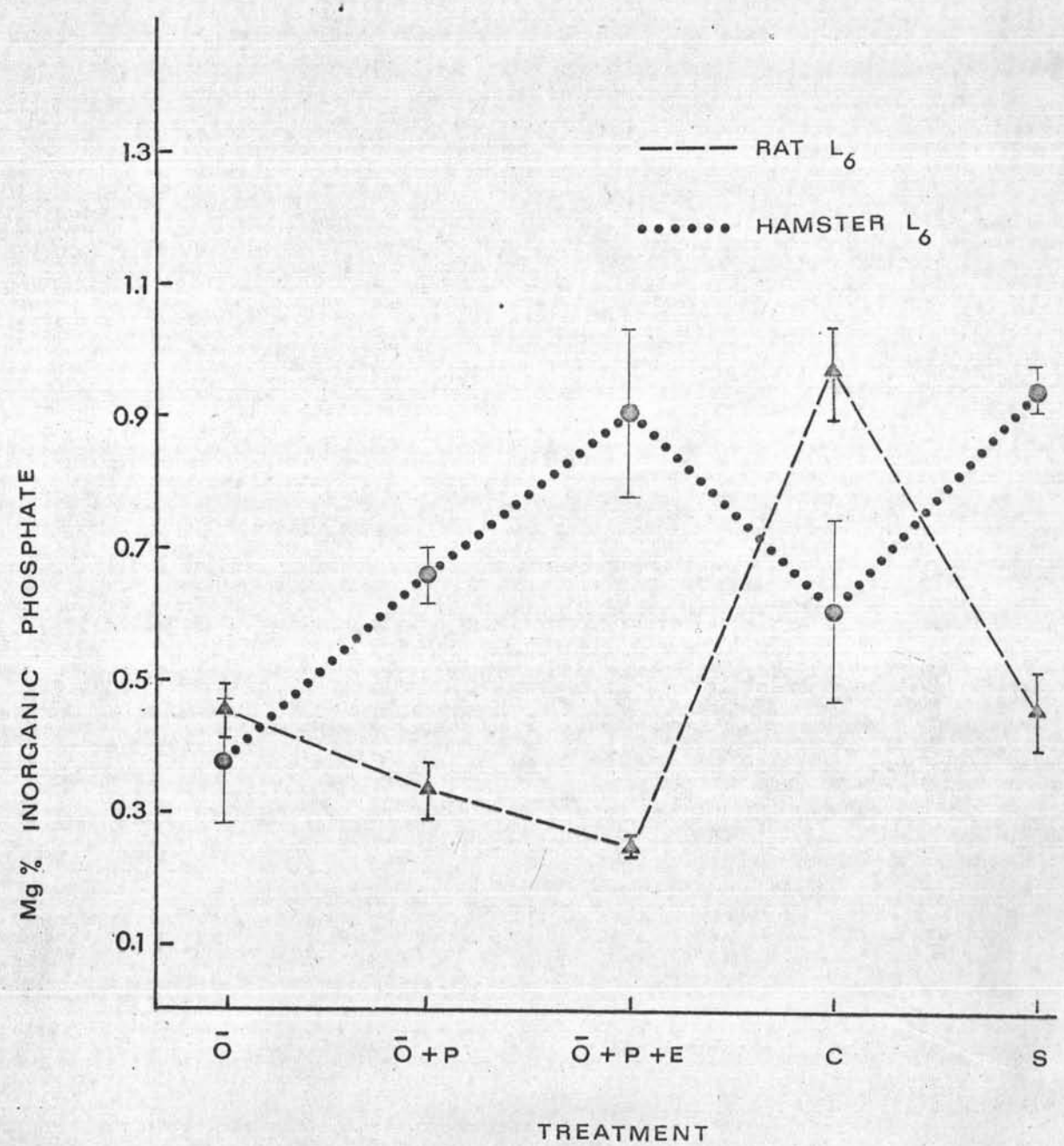
$\bar{O}$ + P + E = Ovariectomy + Progesterone + E.B.

S = Stelazine

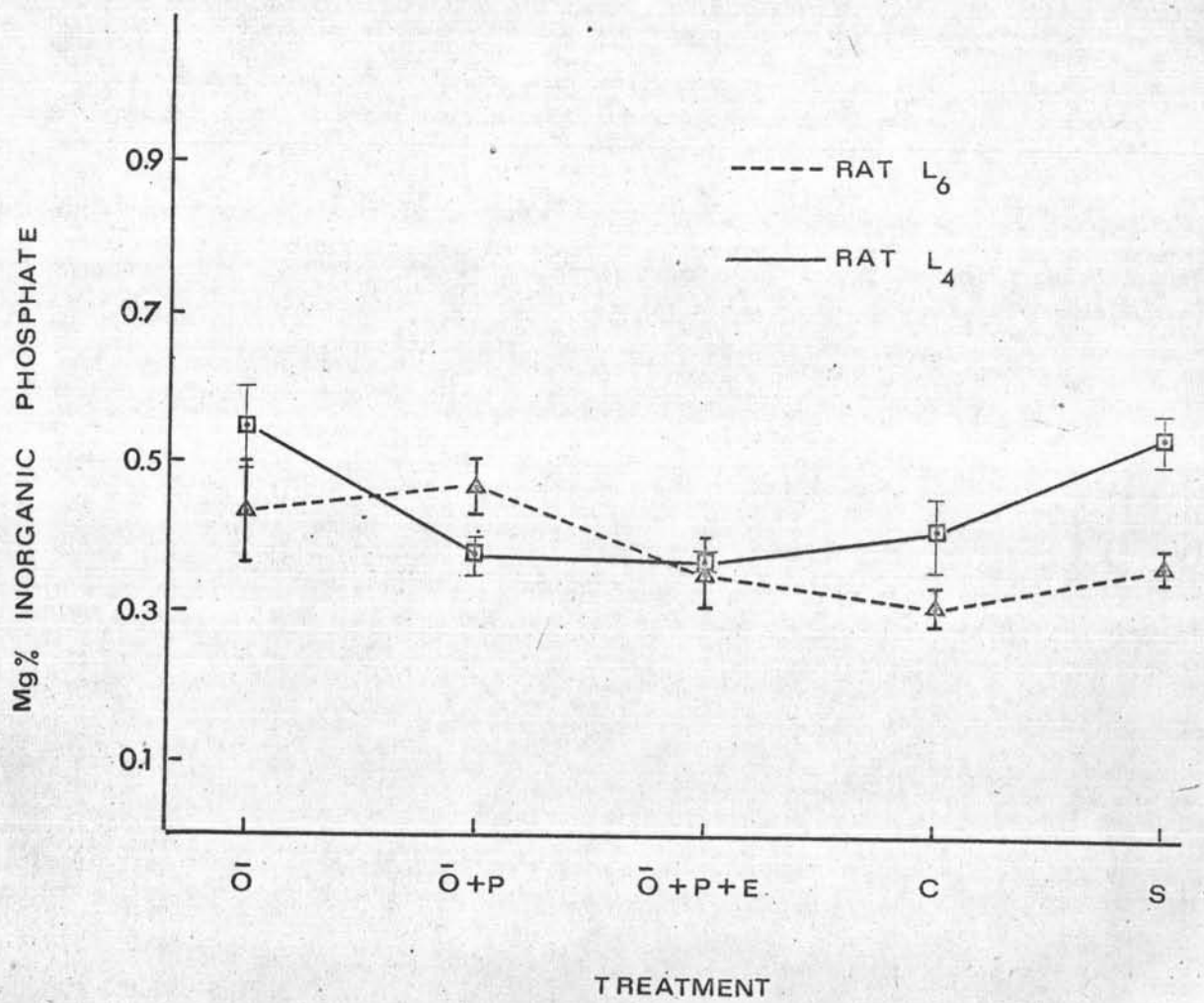
กราฟที่ 1 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนและระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



กราฟที่ 2 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนู และแฮมสเตอร์ระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



กราฟที่ 3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนและระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



กราฟที่ 4 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในผนังมดลูกหนู และแฮมสเตอร์ในระยะแรกเริ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี