วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเลี้ยงและระวังรักษาหนูขาวที่ใช้ในการทดลอง

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นหนูตัวเมีย พันธุ์ Wistar บริสุทธิ์ ซึ่งได้ทำการผสมพันธุ์ที่แผนกชีววิทยา จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัยติดต่อกันมาเป็นเวลา 3 ปี หนูทุกตัวที่ใช้ในการทดลอง เป็นหนูที่ไม่เคยถูกผสมมาก่อน (Virgin) เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ คือ ประมาณ 25° – 26° C และควบคุมแสงสว่างให้มีเวลากลางวัน 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 06.00 น.– 20.00 น) และกลางคืน 10 ชั่วโมง (ระหว่าง 20.00 น – 06.00 น) มีอาหารสำเร็จรูปซึ่งซื้อจากบริษัทสงเคราะห์สัตว์คลินิคและน้ำประปาให้กินและดื่มตลอดเวลา หนูที่ใช้ในการทดลองเป็นหนูที่เติบโตเต็มที่ มีอายุตั้งแต่ 50 วันขึ้นไป และน้ำหนักตัวประมาณ 150 กรัม ทุกตัวที่ทดลองจะต้องผ่านการตรวจสอบดูว่ามี reproductive cycle เป็นปกติ (มี Oestrus ทุก ๆ 4 หรือ 5 วัน)

2. วิธีตรวจหา Reproductive cycle โดยการทำ Vaginal smear

ใช้แท่งแก้วปลายมนจุ่มน้ำเกลือซึ่งมีความเข้มข้น 0.85% แตะที่ผนังด้านในของ vagina ของหนู แล้วป้ายบน slide นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ Long & Evans (1922) พบว่าเซลล์ที่ปรากฏอยู่บนแผ่น slide จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่าง ๆ ของ reproductive cycle (มักเรียก Oestrous cycle ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ไม่มี menstruation) ซึ่งอาจแบ่งออกได้อย่างหยาบ ๆ 3 ระยะคือ

Proestrus พบแต่ epithelium cells เล็ก ๆ รูปร่างกลมและมีนิวเคลียสอยู่ด้วย ไม่มี leucocytes เลย ใช้สัญญลักษณ์ว่า "O"

Oestrus ส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่จำนวนมาก รูปร่างไม่แน่นอน (Cornified cells) เป็นระยะที่สัตว์มี heat พร้อมที่จะทำการผสมพันธุ์ได้ ใช้สัญญลักษณ์ว่า "Co" ระยะนี้ยังไม่พบ leucocytes

Diocstrus พบ leucocyte มาก ใช้สัญญลักษณ์ว่า "L" เป็นระยะที่นานที่สุดของ cycle (ประมาณ 48 – 72 ชั่วโมง)

3. วิธีผสมหนู

นำหนูที่ใช้ในระยะ proestrus แยกไปใส่กรงต่างหากและใส่ตัวผู้ลงไปในตอนเย็นวันเดียวกัน (กรง 1 กรงใช้ตัวผู้ 1 ตัวกับตัวเมีย 2 ตัว) เช้าวันรุ่งขึ้นก็แยกหนูตัวผู้ออก แล้วตรวจดูว่ามี sperm หรือ sperm plug ใน vagina ของหนูตัวเมียนั้นหรือไม่ ถ้ามีก็นับเอาวันที่พบ sperms เป็นวัน 0 ของการตั้งครรภ์ (L_0) วันต่อไปนับเป็นวัน L_1, L_2, L_3.....ตามลำดับ หนูที่พบ spermsใน vaginal smear เท่านั้นที่ใช้ในการทดลองได้

4. วิธีการเตรียมฮอร์โมน

Progesterone ชั่ง progesterone (บริษัท Mann, U.S.A.) มาจำนวนหนึ่งด้วยตาชั่งอย่างละเอียดใส่โกร่งบดยาแล้วบดให้ละเอียด เมื่อละเอียดแล้วผสมกับน้ำมันมะกอก (Olive Oil) ให้ได้ความเข้มข้น 4 mg ต่อ 0.1 ml ก่อนใส่น้ำมันมะกอกอาจเติม absolute alcohol เล็กน้อย เพื่อช่วยให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันดีขึ้น

Testosterone propionate (บริษัท Mann, U.S.A.) เตรียมโดยวิธีเดียวกันโดยให้มีความเข้มข้น 2.5 mg ต่อ 0.125 ml

Dehydroepiandrosterone acetate(บริษัท Mann, U.S.A.) และ Androstenedione (บริษัท Mann, U.S.A.) เตรียมวิธีเดียวกันกับ Progesterone และ Testosterone ให้มีความเข้มข้น 2.5 mg ต่อ 0.125 ml เช่นกัน

Oestradiol benzoate (บริษัท Organon, Holland) นำ concentrated solution มา dilute กับ Olive Oil ให้มีความเข้มข้น 0.1 μg ต่อ 0.1 ml

5. วิธีทำการผ่าตัด (Surgery)

ก. การตัดรังไข่ (Ovariectomy)

ใช้ปัตตาเลี่ยน (clipper) โกนขนทั้งสองข้างลำตัวของหนู บริเวณ dorso-lateral แล้วสลบหนูด้วยอีเทอร์ ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อข้างลำตัวถัดชายโครงไปทางด้านหลังเปิดให้เป็นช่องเล็กน้อยประมาณ $\frac{1}{3}$ นิ้ว ใช้ปากคีบปลายงอ ๆ คีงเอาไขมันที่ติดอยู่กับรังไข่ขึ้นมา รังไข่จะติดขึ้นมาด้วย ใช้กรรไกร

เล็กปลายงอตัดเฉพาะรังไข่ออก รวมทั้งก้อนไขมันบริเวณใกล้เคียงด้วย พยายามระมัดระวังมิให้มีส่วนของเนื้อเยื่อของรังไข่เหลือติดอยู่เป็นอันขาด และระวังมิให้กระทบกระเทือนไข่ที่ถูกผสมที่อยู่ในรังไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะสองวันแรกของการตั้งครรภ์ ($L_1 - L_2$) เมื่อตัดเสร็จแล้วก็ใช้ปากคีบปลายงอคอย ๆ หยิบไขมันที่ติดกับมดลูกสอดเข้าไปในลำตัวตามเดิม เมื่อเรียบร้อยแล้ว เย็บกล้ามเนื้อปิดช่องท้องด้วยไหมแล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกอีกทีหนึ่ง

ข. <u>การตัดต่อมเหนือไต</u> (Adrenalectomy)

ใช้ปัตตาเลี่ยน (Clipper) โกนขนทั้งสองข้างลำตัวของหนูเช่นเดียวกับการตัดรังไข่ ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อบริเวณ dorso-lateral แต่ติดกับชายโครงและค่อนไปทางด้านหลังมากกว่าตำแหน่งที่ตัดรังไข่ ตัดกว้างประมาณ $\frac{1}{3}$ นิ้ว ใช้ปากคีบในมือซ้ายจับกล้ามเนื้อยกขึ้นเล็กน้อย สอดปากคีบในมือขวาเข้าไปคอย ๆ จับและดึงไขมันที่ติดอยู่กับต่อมเหนือไตออกมา แล้วใช้กรรไกรปลายงอตัดต่อมเหนือไตออก ระวังอย่าให้ต่อมแตก เมื่อตัดเสร็จแล้วเอาอวัยวะส่วนที่ดึงออกมานั้นใส่เข้าไปที่เดิม แล้วเย็บแผลให้เรียบร้อยเช่นเดียวกับการตัดรังไข่

ค. <u>วิธีตัดตับออกบางส่วน</u> (Partial Hepatectomy)

เมื่อสลบหนูด้วยอีเทอร์แล้ว ใช้กรรไกรปลายตรงตัดตรงกลางลำตัวบริเวณใต้ลิ้นปี่โดยตัดหนังออกก่อน แล้วจึงตัดกล้ามเนื้อให้เป็นแผลกว้างประมาณ $\frac{3}{4}$ นิ้ว จะมองเห็นตับอยู่ใต้กระบังลม ใช้ปากคีบปลายงอคอย ๆ ยกตับทีละพู (ระวังอย่าให้ปากคีบทำอันตรายตับเพราะจะทำให้เลือดออกมา ทำให้มองเห็นไม่ชัด) แล้วใช้กรรไกรตัดตับออกกลาง ๆ พู (ระวังอย่าตัดใกล้ขั้วตับมากเกินไป เพราะเลือดจะออกมากทำให้หนูตายได้) ตัดประมาณ 2 พู รวมน้ำหนักประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำหนักตับทั้งหมด พอมิให้หนูตาย และพยายามใช้สำลีที่ชุบ dettol และบีบจนแห้งแล้วคอยซับเลือด เพื่อมิให้เลือดตกค้างในช่องท้อง เสร็จแล้วรีบเย็บแผลให้เรียบร้อย โดยเย็บชั้นกล้ามเนื้อก่อนแล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกด้วยวิธีเดียวกับการตัดรังไข่ดังกล่าวแล้วข้างต้น แต่แผลโตกว่าอาจเย็บประมาณ 3 เข็ม

ง. วิธีผ่าหน้าท้องเพื่อตรวจดูการฝังตัวของตัวอ่อน (Laparotomy)

เมื่อดมสลบหนูแล้วใช้กรรไกรปลายตรงตัดตรงกลางลำตัว (mid ventral line) ตลอดมาทาง vagina โดยใช้กรรไกรตัดหนังก่อนแล้วจึงตัดกล้ามเนื้อเพื่อเปิดช่องท้องตัดกว้างประมาณ $\frac{3}{4}$ นิ้ว แล้วใช้ปากคีบปลายงอคอย ๆ ดึงเอาไขมันที่ติดกับมดลูกออกมา ซึ่งจะดึงเอามดลูกออกมาด้วยทั้ง 2 ข้าง ตรวจดูว่ามีการฝังตัวของตัวอ่อนหรือไม่ และสังเกตดูลักษณะของมดลูก และนับจำนวน implantation sites เสร็จแล้วใช้ปากคีบจับไขมันที่ติดกับมดลูกสอดเข้าไปในช่องท้องตามเดิมและกลับเข้าสู่ที่เดิมด้วย แล้วเย็บปิดแผลให้เรียบร้อยโดยเย็บชั้นกล้ามเนื้อก่อน แล้วจึงเย็บหนังตามลำดับ เช่นเดียวกับการผ่าตัดรังไข่

หนูที่ทำการทดลองเมื่อถึงระยะ L_6 ทำ Laparotomy เพื่อตรวจการฝังตัวของตัวอ่อนนี้ ถ้าไม่มีการฝังตัว (Nidation) เกิดขึ้น ก็ฉีด Oestradiol benzoate 0.1 μg โดยฉีด progesterone ด้วยทุกวัน แล้วเลี้ยงต่อไปโดยแยกมาใส่กรงไว้ต่างหากจากพวกที่ไม่ได้ฉีด Oestrogen จนถึงวัน L_{10} ก็นำหนูนั้นมาฆ่าเพื่อตรวจดู Nidation ต่อไป แต่ถ้าระยะ L_6 พบมี implantation sites ก็ฆ่าทันที

จ. วิธีฆ่าหนู (Autopsy)

ใช้มือขวาจับบริเวณข้อต่อที่คอให้แน่น มือซ้ายจับที่หาง ออกแรงดึงให้ข้อต่อที่คอหลุดออกจากกัน ด้วยวิธีนี้หนูจะตายทันที แล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดหน้าท้องตรวจและสังเกตการฝังตัวของตัวอ่อนและนับจำนวน implantation sites

6. วิธีฉีดฮอร์โมนเข้าสู่กล้ามเนื้อ

จับหนูใส่ในกรงสำหรับฉีดยา ดึงขาหลังข้างหนึ่งออกมา แล้วใช้เข็มเบอร์ 22 และหลอดฉีดยาขนาด 1 ml ดูดฮอร์โมนที่ต้องการจะฉีดตามปริมาณที่ต้องการ คือ TP , DHA หรือ Androstenedione อย่างละ 2.5 mg แล้วใช้เข็มแทงเข้าไปในกล้ามเนื้อขนอง แล้วค่อย ๆ ฉีดฮอร์โมนเข้าไปให้หมด ระวังอย่าให้สารที่ฉีดรั่วออกมาภายนอก

7. วิธีฉีด Local Testosterone propionate

นำหนูที่ดมสลบด้วยอีเทอร์มาผ่าตรงบริเวณ mid ventral line ค่อนมาทาง vagina บริเวณเดียวกับการทำ laparotomy และปฏิบัติเช่นเดียวกันคือใช้กรรไกรตัดหนังก่อน แล้วจึงตัดกล้ามเนื้อเพื่อเปิดช่องท้อง ตัดกว้างประมาณ $\frac{3}{4}$ นิ้ว แล้วใช้ปากคีบปลายงอคีงไขมันที่ติดกับมดลูกออกมา ซึ่งจะดึงเอามดลูกออกมาด้วยทั้ง 2 ข้าง ใช้ microsyringe ขนาด 10 Mg ฉีด Testosterone propionate (TP) เข้าไปในเยื่อของไขมันติดกับเส้นเลือดใกล้ส่วน mesometrium ของมดลูกตามวิธีของ Yoshinaga (1961) ฉีดข้างละ 100 Mg ระวังอย่าให้สารที่ฉีดเข้าไปรั่วออกมา พยายามให้เป็นหยดน้ำยาอยู่ในไขมัน เสร็จแล้วใช้ปากคีบค่อย ๆ จับไขมันและมดลูกสอดเข้าไปในลำตัวตามเดิม แล้วใช้เข็มเย็บแผลให้เรียบร้อย โดยเย็บชั้นกล้ามเนื้อก่อนแล้วจึงเย็บหนังให้ติดกันตามวิธีเดียวกับการผ่าตัดรังไข่

8. วิธีฉีด Testosterone propionate เข้าสู่ม้าม (spleen)

หลังจากดมสลบหนูด้วยอีเทอร์และหลังจากโกนขนหนูตรงบริเวณใกล้ ๆ กับที่ตัดรังไข่ แต่ค่อนมาทางด้านท้อง (ventral side) ด้านข้างซ้ายของลำตัว แล้วใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อเป็นแผลกว้างประมาณ 1 นิ้ว ใช้ปากคีบในมือซ้ายจับกล้ามเนื้อที่ปากแผลข้างขวายกขึ้น แล้วใช้ปากคีบในมือขวาค่อย ๆ ดึงเยื่อที่ติดกับม้ามออกมาซึ่งจะดึงเอาม้ามออกมาด้วย ใช้เข็มเบอร์ 27 ฉีด Testosterone propionate 0.125 ml (1mg) เข้าสู่ม้าม โดยให้ปลายเข็มฝังลึกเข้าไปในเนื้อม้าม เพื่อป้องกันมิให้สารที่ฉีดเข้าไปรั่วออกมา แล้วใช้ปากคีบค่อย ๆ ดึงเยื่อที่ติดกับม้ามสอดเข้าไปในตัวตามเดิม ซึ่งจะดึงเอาม้ามกลับเข้าไปด้วย แล้วเย็บปิดแผลโดยเย็บชั้นกล้ามเนื้อก่อนแล้วจึงเย็บชั้นหนังต่อมาตามลำดับ

9. วิธีทำ Paraffin sections เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อของมดลูก

ตัดมดลูกบริเวณที่ต้องการจะศึกษาไป fix ในน้ำยา AFA (Alcohol-Formalin-Acetic acid) dehydrate ด้วย alcohol % ต่าง ๆ, clear ด้วย Xylol แล้ว embed ด้วย Paraplast (Arther H. Thomas) นำมาตัด sections หนาประมาณ 7 μ แล้วย้อมสีด้วย Haematoxylin และ Eosin และ mount ด้วย Helaco synthetic Resin (Arther H. Thomas)

Experimental Design

หนูที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 97 ตัว หลังจากผสมกับตัวผู้แล้วแบ่งออกทำการทดลองเป็นพวก ๆ ดังนี้คือ

I. พวกที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

เพื่อจะศึกษาดูว่าในภาวะที่ไม่มีรังไข่จะมีอวัยวะอื่นใดที่สามารถจะเปลี่ยน Androgens ชนิดต่าง ๆ ให้เป็น Oestrogens หรือสารที่ทำหน้าที่คล้าย Oestrogens ที่จำเป็นต่อการฝังตัวของตัวอ่อนกับผนังมดลูกหรือไม่ โดยทำการผ่าตัดรังไข่ตอนเช้าของวัน L_1, L_2 & L_3 ระหว่างเวลา 10.00 น.– 12.00 น.ซึ่งเป็นเวลาก่อนที่รังไข่จะหลั่ง Oestrogen ออกมา ดังนั้นหลังจากตัดรังไข่จึงต้องฉีด Progesterone 4 mg ทุกวันเข้ากล้ามเนื้อ แล้วฉีด Androgens ชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการจะศึกษา คือ Testosterone propionate (TP), Dehydroepiandrosterone acetate (DHA) และ Androstenedione ตอนบ่ายวัน L_3 ของการตั้งครรภ์ ระหว่าง 14.00 – 16.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกับการหลั่ง Oestrogens ของรังไข่ในระหว่างตั้งครรภ์ปกติ (Shelesnyak, 1960; Zeilmaker, 1963) ผ่าตรวจดู Nidation โดยการทำ Laparotomy วัน L_6 ถ้ามี Nidation เกิดขึ้น ก็นับจำนวน implantation sites ว่ามีจำนวนเท่าไร ถ้าไม่มี Nidation ก็ treat ด้วย Oestradiol benzoate 0.1 Mg และฉีด Progesterone ให้ด้วยจนถึงวัน L_{10} จึงผ่าตรวจดู Nidation อีกที่หนึ่ง ใช้หนูทั้งหมด 63 ตัว

สำหรับ Control animals ฉีด Olive Oil ด้วยปริมาณเท่ากับปริมาณของ Olive Oil ที่ใช้ละลายฮอร์โมน แอนโดรเจนส์ เพื่อเปรียบเทียบกับพวกที่ฉีด Androgens เพื่อที่จะยืนยันว่า ผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นผลของฮอร์โมนจริง ๆ ใช้หนูทั้งหมด 9 ตัว

002106

II. พวกที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและตัดต่อมเหนือไตทั้งสองข้างด้วย

เพื่อที่จะศึกษาดูว่าในภาวะปกติที่ไม่มีรังไข่และต่อมเหนือไต Androgens (TP) จะสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้หรือไม่ และต่อมเหนือไตเป็นอวัยวะสำคัญที่สามารถเปลี่ยน Androgens เป็น Oestrogens หรือสารที่ทำหน้าที่คล้าย Oestrogens ใช่หรือไม่ (ถ้าเกิด nidation ได้ แสดงว่ามีอวัยวะอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่นี้ได้) ศึกษาโดยการตัดรังไข่และต่อมเหนือไตออกทั้ง 2 ข้างเช้าวัน L_2, L_3 (10.00 น – 12.00 น) แล้วฉีด Testosterone propionate ในตอนบ่ายของวัน L_3 (14.00น – 16.00 น) โดยให้ 4 mg progesterone เข้ากล้ามเนื้อทุกวัน นับจากวันผ่าตัดจนถึงวันสุดท้ายก่อนฆ่า ทำ Laparotomy เพื่อตรวจดู Nidation ในวัน L_6 ตัวที่ไม่มี Nidation ก็ฉีด Oestradiol benzoate 0.1 Mg แล้วเลี้ยงต่อไป ฆ่าตรวจดู Nidation อีกครั้งในวัน L_9 ของการตั้งครรภ์ ใช้หนู 11 ตัว

III. พวกที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและตัดตับบางส่วนออก

เพื่อที่จะศึกษาดูว่าตับเป็นอวัยวะที่อาจ metabolize Androgens ให้เป็น Oestrogenic substances หรือสารที่ทำหน้าที่คล้าย Oestrogens ใช่หรือไม่ โดยตัดตับออกบางส่วน (มากเท่าที่จะมีชีวิตอยู่ได้ ประมาณ $\frac{1}{2}$ ของเนื้อตับทั้งหมด) ก่อนที่จะฉีด Androgens แล้วดูว่ามีผลกระทบกระเทือนต่อการฝังตัวของตัวอ่อนหรือไม่ ทดลองโดยใช้หนู 8 ตัว ทำการผ่าตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้างในเช้าวัน L_3 ระหว่างเวลา 10.00 น – 12.00 น พร้อม ๆ กับตัดตับบางส่วนออกด้วย แล้วฉีด Testosterone propionate 2.5 mg เข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 (14.00 – 16.00 น) โดยให้ Progesterone 4 mg ทุกวัน หลังจากวันผ่าตัดจนกระทั่งถึงวันก่อนฆ่าโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ แล้วทำ Laparotomy เพื่อตรวจดู Nidation ในวัน L_6 ตัวที่ไม่มี Nidation ก็ฉีดด้วย Oestradiol benzoate 0.1 Mg แล้วทำ Autopsy L_{10} เพื่อตรวจดู Nidation อีกครั้งหนึ่ง

ผลของการทดลอง

ก. <u>พวกที่ตัดรังไข่ทั้งสองข้างในวัน L_1 ของการตั้งครรภ์</u>

ในหนูที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างวัน L_1 พร้อมกับฉีด Progesterone 4 mg ทุกวัน เข้ากล้ามเนื้อขา ตั้งแต่วันผ่าตัดจนกระทั่งวันก่อนฆ่า แล้วฉีด Testosterone propionate (TP) ในบ่ายวัน L_3 2.5 mg. สามารถชักนำให้ไข่ที่ผสมแล้วฝังตัวกับผนังมดลูกได้น้อยมากเพียง 2 ตัว จากทั้งหมด 8 ตัว ได้พยายามหาบทบาทของตับในการ metabolize androgens ไปเป็น Oestrogen โดยการฉีด T.P. 0.1 mg เข้าสู่ spleen ในบ่ายวัน L_3 ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้เลยจากหนูทั้งหมด 7 ตัว พวก control ที่ฉีด vehicle (Olive Oil) เข้า spleen แทน TP 0.125 ml. เท่าปริมาณ Olive Oil ที่ใช้ละลาย TP ในวัน L_3 ไม่มี Nidation เกิดขึ้นเลย ลักษณะของมดลูกที่เกิด Nidation มีเลือดมาเลี้ยงมาก ในพวกที่ฉีด TP และไม่พบ Nidation ลักษณะของมดลูกบางตัวมีลักษณะพองตัว (edema) และมีเลือดมาเลี้ยงมากกว่าปรกติ

ข. <u>พวกที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างในวัน L_2 ของการตั้งครรภ์</u>

หลังจากฉีด Testosterone propionte 2.5 mg. เข้ากล้ามเนื้อขาในบ่ายวัน L_3 โดยฉีด progesterone 4 mg. ทุกวัน ตั้งแต่วันผ่าตัดจนกระทั่งวันก่อนฆ่า ผลปรากฏว่าสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับพวกที่ตัดรังไข่ในเช้าวัน L_3 คือ เกิด 2 ตัวจาก 16 ตัว

ค. <u>พวกที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างและตัดต่อมเหนือไตทั้ง 2 ข้างในเช้าวัน L_2 ของการตั้งครรภ์</u>

ผลของการฉีด Testosterone propionate 0.1 mg. ที่บริเวณไขมันใกล้เส้นเลือดที่ uterine mesometrium บ่ายวัน L_3 โดยให้ progesterone 4 mg. ทุกวันตั้งแต่วันผ่าตัดจนถึงวันก่อนฆ่า ดื่มน้ำเกลือ (0.85%) แทนน้ำธรรมดา เพื่อ

ขดเชยการศูนย์เสียต่อมเหนือไต ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้เลย ลักษณะมดลูกลีบเล็กกว่าปรกติ และมีเลือดมาเลี้ยงน้อย

ง. พวกที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างวัน L_3 ของการตั้งครรภ์

ผลของการฉีด Testosterone propionate 2.5 mg เข้ากล้ามเนื้อในบ่ายวัน L_3 โดยให้ progesterone 4 mg. ทุกวันตั้งแต่วันผ่าตัดจนกระทั่งวันก่อนฆ่า ปรากฏว่าสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ 10 ตัวจาก 16 ตัว ประมาณ 62.50% ส่วนพวกที่ฉีด Dehydroepiandrosterone Acetate 2.5 mg เข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 แทนที่ TP ผลปรากฏว่าสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้เช่นกัน แต่น้อยมากเมื่อเทียบกับ TP คือ เกิด Nidation 2 ตัวจาก 10 ตัว ประมาณ 22.2 % ส่วนในพวกที่ฉีด Androstenedione 2.5 mg. เข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 เช่นกัน ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้เลยจากหนูทั้งหมด 6 ตัว เช่นเดียวกับพวก control ที่ฉีด vehicle (Olive Oil) 0.125 ml. เข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 เท่าปริมาณสารที่ใช้ละลาย Androgens ปรากฏว่าไม่มี Nidation เกิดขึ้นเลย ลักษณะของมดลูกที่ treat androgens และเกิด Nidation มีเลือดมาเลี้ยงมาก ตัวที่ไม่เกิด Nidation มดลูกของบางตัวเกิด edema เลือดมาเลี้ยงมาก แต่บางตัวก็มีลักษณะปรกติ พวกที่ฉีด vehicle มดลูกลีบเล็ก และเลือดมาเลี้ยงน้อยกว่าปรกติ

จ. พวกที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างและตัดต่อมเหนือไตเช้าวัน L_3

ผลจากการฉีด TP 2.5 mg. เข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 ปรากฏว่าสามารถชักนำให้เกิด nidation ได้ 7 ตัว จาก 11 ตัว ประมาณ 63.6% พอ ๆ กับพวกที่ตัดรังไข่อย่างเดียวในวัน L_3

ฉ. ผลจากการศึกษา Histology โดยการตัดมดลูกส่วนที่ตัวอ่อนทำการฝังตัวมาทำ sections ให้บางประมาณ 7 μ และย้อมสีด้วย Haematoxylin และ Eosin ในพวกที่ฉีด TP 2.5 mg (ภาพที่ 2) และ DHA (ภาพที่ 3) ตามลำดับ

ปรากฏว่า section ที่ตัดตามยาวและตามขวางของตัวอ่อนขณะเริ่มทำการฝังตัวที่ผนังมดลูก ตัวอ่อนมีรูปร่างค่อนข้างยาว เซลล์ผนังมดลูกรอบตัวอ่อนเปลี่ยนแปลงมาเป็น decidual cells.

ตารางแสดงผลของ Androgens ต่อการฝังตัวของตัวอ่อนกับผนังมดลูก ในหนูที่ตั้งครรภ์ ที่ตัดรังไข่, รังไข่และต่อมเหนือไต, รังไข่และตับบางส่วน โดยให้ progesterone 4 mg. ทุกวัน ตั้งแต่วันผ่าตัดจนกระทั่งถึงวันก่อนฆ่า

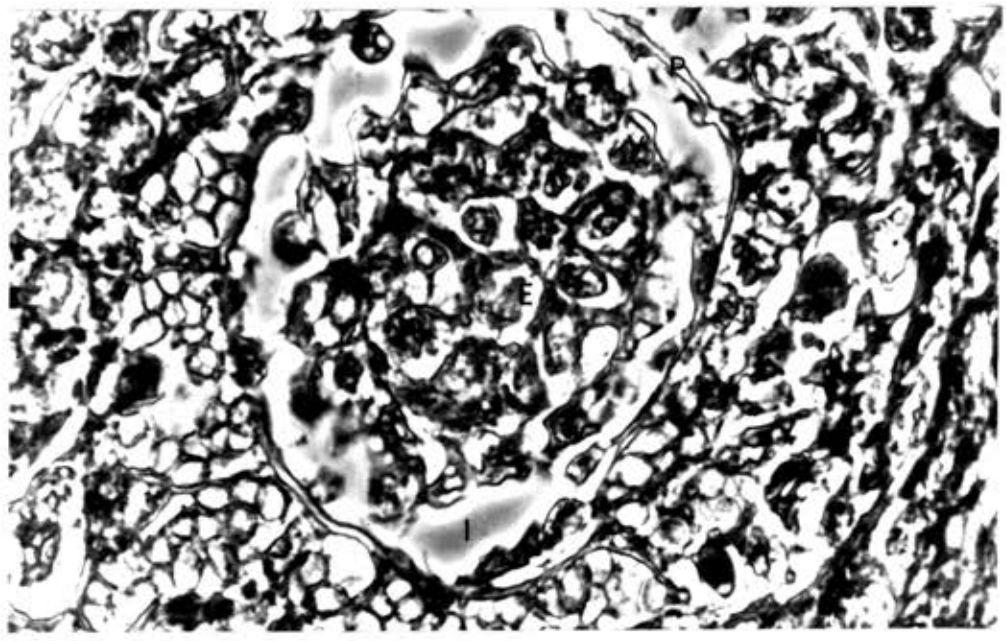
Experimental animals	Androgen Treatment			ผลของ L_6 Laparotomy				ผลของ L_{10} Autopsy หลังฉีด Oestradiol benzoate 0.1 µg			
	Androgens*	Dose (mg)	Route	Nidation / Group	%	ค่าเฉลี่ยจำนวน implantation sites	Range	Delayed Nidation / Group	%	ค่าเฉลี่ยจำนวน implantation sites	Range
1 L_1 Ovariectomy ก	-	0.0	i.spleenic	0/3	0	0	0	3/3	100	4.7	3-8
ข	TP**	1.0	i.spleenic	0/7	0	0	0	5/7	71.43	6.2	2-9
ค	TP	2.5	i.m.	2/8	25.00	8.5	7-10	5/6	83.33	8	1-10
2 L_2 Ovariectomy	TP	2.5	i.m.	2/16	12.50	6.2	5-8	10/14	71.43	6.1	4-11
3 L_2 Ovariectomy Adrenalec.	TP	0.1	ut. mesome-trium	0/6	0	0	0	4/5	80.00	6.2	5-7
4 L_3 Ovariectomy ก	-	0.0	i.m.	0/6	0	0	0	6/6	100	6.7	6-8
ข	TP	2.5	i.m.	10/16	62.50	5.7	3-8	4/6	66.60	9	7-11
ค	DHA***	2.5	i.m.	2/10	22.20	4.5	3-6	7/8	87.50	7.1	3-10
ง	Androstenedione	2.5	i.m.	0/6	0	0	0	6/6	100	7.8	3-10
5 L_3 Ovariectomy Adrenalect.	TP	2.5	i.m.	7/11	63.60	6.3	3-10	3/3	100	6.7	4-9
6 L_3 Ovariectomy Partial Hepatectomy	TP	2.5	i.m.	4/8	50.00	7.5	6-8	3/4	75	6.0	1-10

* Androgens หรือ Vehicle ฉีดให้บ่ายวัน L_3 ระหว่าง 14.00 - 16.00 น.

** อักษรย่อของ Testosterone propionate

*** อักษรย่อของ Dehydroepiandrosterone Acetate

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2. รูปมดลูกตัดตามขวาง (กำลังขยาย X 1000) Phase Contrast Microscope กลางลำตัว ขณะเริ่มฝังตัวกับผนังมดลูกในวัน L_6 74 ช.ม. หลังจากฉีดด้วย Dehydroepiandrosterone acetate 2.5 mg. ในหนูที่ตัดรังไข่วัน L_3 (10.30 น.) โดยฉีด progesterone ทุกวัน นับจากวันผ่าตัดจนกระทั่งถึงวันก่อนฆ่า : E - Extra-embryonic ectoderm ; D - Decidual tissue ; I - implantation chamber ; P - Parietal ectoderm ; V - Visceral endoderm.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3. รูปมดลูกตัดตามยาว (กำลังขยาย X 300) แสดงตัวอ่อนที่เริ่มฝังตัวกับผนังมดลูกวัน L_6 72 ช.ม. หลังจากฉีดด้วย Testosterone propionate 2.5 mg. เข้ากล้ามเนื้อบ่าย L_3 ในหนูที่ตัดรังไข่เช้า L_3 (10.00 น.) โดยฉีด progesterone 4 mg. ทุกวันตั้งแต่วันผ่าตัดจนกระทั่งถึงวันฆ่า : a -ด้าน Anti mesometrium. d - Decidual tissue; e - Extra-embryonic ectoderm; i - implantation chamber; v - Visceral endoderm.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลและสรุปผลการวิจัย

จากการทดลองครั้งนี้ได้ผลว่า TP 2.5 mg ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบ่ายวัน L_3 สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ในหนูที่ตัดรังไข่และฉีด progesterone 4 mg ทุกวัน แต่เฉพาะพวกที่ตัดรังไข่วัน L_3 เท่านั้น การตัดตอมเหนือไตหรือตัดตับบางส่วนออกไม่สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงผลของ TP ที่ชักนำให้เกิด Nidation ได้ในสัตว์ที่ตัดรังไข่, ตัดรังไข่และตอมเหนือไต, ตัดรังไข่และตับบางส่วนออก พบมี Nidation 62.50% , 63.6% , และ 50% ตามลำดับ (ตารางข้อ 4ข, ค, ง ข้อ 5 และข้อ 6) ถ้ารังไข่ถูกตัด L_1,L_2 หรือตัด L_1 แล้วฉีด TP 1.0 mg เข้าสู่ portal circulation ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด nidation ได้ (ตารางข้อ 1ค, ข้อ 2, ข้อ 1ข ตามลำดับ) พวกที่ฉีด TP 0.1 mg เข้าสู่เปลวมันใกล้กับ blood vessel ที่ supply มดลูกส่วน mesometrium โดยฉีด progesterone ให้ด้วยทุกวัน 4 mg ในหนูที่ตัดรังไข่วัน L_2 และตัดตอมเหนือไตวันเดียวกัน ปรากฏว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้เลย การที่ TP ไม่สามารถชักนำให้เกิด Nidation เมื่อฉีดเข้ามดลูกโดยตรงนี้ แสดงว่า TP มิได้มีผลโดยตรงต่อ blastocysts ในการฝังตัวกับผนังมดลูกอย่างกรณีของ Oestrogen และยังชักนำให้เกิดได้ประมาณ 60% เท่านั้นเมื่อฉีด TP เข้ากล้ามจึงผิดกับผลของ 0.1 µg Oestradiol benzoate ที่ฉีดเข้าไปในพวกที่ไม่เกิด Nidation หลังจากฉีดด้วย Androgens และ vehicle (น้ำมันมะกอก) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิด delayed nidation ทุกกรณี เกือบ 100%

การที่ TP ชักนำให้เกิด nidation เฉพาะในพวกที่ตัดรังไข่วัน L_3 แต่ไม่เกิดในพวกที่ตัดรังไข่วัน L_1 และ L_2 เนื่องจากระยะ L_3 ไข่เคลื่อนมาอยู่ในมดลูกเรียบร้อยแล้ว ระยะนี้แม้ไม่มี Oestrogen surge พอที่จะชักนำให้เกิด Nidation ได้ แต่ก็ใกล้กับระยะที่มดลูกมี sensitivity ถึงขีดสุดคือระหว่าง 8.00 – 12.00 น. ของ L_4 (Shelesnyak & Kraicer, 1961; Yochim & De Feo, 1963) ส่วนระยะ L_1 และ L_2 เป็นระยะที่ไข่กำลังอยู่ในท่อนำไข่ การตัดระยะต้น ๆ อาจไป interfere กับการเคลื่อนที่ของไข่ในท่อรังไข่

(Psychoyos & Alloiteau, 1962) ยิ่งไปกว่านั้นที่พรรณิภา (1967) พบว่าตัดรังไข่ L_2 สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้โดย TP (2 – 3 mg) แม้ว่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด Nidation ค่อนข้างสูงก็จริงแต่จาก data จะพบว่า Nidation มักจะเกิดไม่ complete ส่วนใหญ่เกิดเพียงข้างเดียว และมีหลายตัวพบมี implantation sites เพียง 1 หรือ 2 เท่านั้น เป็นการยืนยันว่าการตัดรังไข่ในระยะที่ไข่ยังอยู่ในท่อนำไข่จะมีผลไป interfere กับการเคลื่อนตัวของไข่ลงมาสู่มดลูกช้ากว่าปกติ (Psychoyos & Alloiteau, 1962) และเมื่อฉีด TP เช้าไปตามกำหนดที่จะมี Oestrogen surge หลั่งออกมาจากรังไข่ในสัตว์ปกติก็ค่อนเย็นของวัน L_3 (Shelesnyak, 1962) จึงไม่อาจกระตุ้นไข่ที่เคลื่อนตัวลงสู่มดลูกช้ากว่าปกติได้ดีเหมือนสัตว์ที่ถูกตัดรังไข่เมื่อเช้า L_3 ซึ่งในระยะนั้นไข่ได้เคลื่อนตัวลงมาสู่มดลูกเรียบร้อยแล้ว (Huber, 1915) สำหรับผลของ TP ที่ชักนำให้เกิด Nidation ค่อนข้างต่ำแม้จะตัดรังไข่ในวัน L_3 (ประมาณ 60%) อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของต่อม adrenals ที่อาจสร้างฮอร์โมนในระดับสูงและไป interfere กับ androgens ที่จะเปลี่ยนไปเป็น Oestrogens ที่จำเป็นสำหรับชักนำให้เกิด Nidation (Harper, 1967; Varavudhi, 1969 b) จากการทดลองครั้งนี้เมื่อตัดรังไข่เช้า L_3 และฉีด TP 2.5 mg เช้าก่อนเที่ยงวัน L_3 โดยฉีด progesterone ควบทุกวันยังสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ถึง 62.50% แสดงว่ายังมีอวัยวะอื่นที่สามารถเปลี่ยน Androgen (TP) ให้เป็น Oestrogen ได้ นอกจากนี้จากการตัดรังไข่และต่อมเหนือไตพร้อมกันวัน L_3 ปรากฏว่ายังเกิด Nidation ได้ถึง 63.6% แสดงว่าต่อมเหนือไตมิได้เป็นอวัยวะในการเปลี่ยน TP ให้เป็น Oestrogen ผลที่ได้นี้สนับสนุนผลของ Varavudhi (1969 a) ที่ได้ทำการทดลองตัดต่อมเหนือไตวัน L_3 ในสัตว์ทดลองที่ฉีด Stelazine ($L_2 - L_5$) เพื่อไปป้องกันมิให้ต่อมใต้สมองผลิตฮอร์โมนมากระตุ้นรังไข่ให้สร้าง Oestrogen แต่ยังสามารถสร้าง Progesterone ได้เป็นปกติ ซึ่งปรากฏว่า TP (2mg) ยังคงสามารถชักนำให้เกิด nidation ได้ถึง 100%

จากการหาแหล่งอวัยวะที่จะเปลี่ยน TP ให้เป็น Oestrogen โดยการฉีด TP 1 mg วัน L_3 เข้าสู่ spleen โดยตรงในสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่ในวัน L_1 ปรากฏว่าไม่มีผลแสดงว่าในสัตว์ที่ตัดรังไข่นั้นตับไม่ได้ metabolized TP ให้เป็น Oestrogen ปล่อยออกมาสู่ general circulation มากพอที่จะทำให้เกิด Nidation ได้ ยิ่งไปกว่านั้นจากการที่ตัดรังไข่พร้อมกับตัดตับวัน L_3 ประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วฉีด TP 2.5 mg บ่ายวัน L_3 ยังสามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ถึง 50% ซึ่งเปอร์เซนต์ของการเกิดไม่แตกต่างกับในสัตว์ที่ตัดรังไข่หรือตัดรังไข่กับต่อมเหนือไต ประกอบกับ Varavudhi (1969 b) ทำในสัตว์ทดลองที่ตัดต่อมใต้สมองส่วนหน้าวัน L_2 ที่ตัดรังไข่และตับบางส่วนวัน L_9 ปรากฏว่า TP เพียง 1 mg ก็ชักนำให้เกิด Nidation ได้ ทำให้เป็นที่สงสัยว่าตับคงมิได้เป็นอวัยวะสำคัญในการเปลี่ยน Androgen (TP) ให้เป็น Oestrogen ครั้งนี้ แต่การทดลองอาจตัดตับน้อยเกินไป (ประมาณครึ่งหนึ่งของเนื้อตับทั้งหมด) จึงทำให้ส่วนที่เหลืออยู่ยังสามารถที่จะเปลี่ยน TP ให้เป็น Oestrogenได้เพียงพอที่จะชักนำให้เกิด Nidation ได้ เพราะ Oestrogen ที่จำเป็นต่อการฝังตัวของตัวอ่อนนี้ ต้องการปริมาณเพียงเล็กน้อย คือ 0.002 μg (local) เท่านั้น (Yoshinaga, 1961) ก็สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ ถ้าสามารถตัดตับหรือทำลายเซลล์ของตับได้หมดโดยสัตว์ทดลองไม่ตาย จึงจะทราบผลที่แน่นอนได้หลักฐานเท่าที่ทราบเวลานี้จึงยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด

อย่างไรก็ตามน่าจะเป็นไปได้ว่า ยังมีอวัยวะอื่นนอกเหนือไปจากรังไข่และต่อมเหนือไตที่สามารถเปลี่ยน TP ให้เป็น Oestrogen ที่จำเป็นต่อการฝังตัวของตัวอ่อนได้ Mac Donald et al (1967) พบว่าหลังจากฉีด 4 - C^{14} - Δ^4 Androstenedione ในหญิงที่ตัดรังไข่และต่อมเหนือไต ปรากฏว่ายังคงพบ Oestrogens อยู่ในปัสสาวะได้เช่นกัน เขาเสนอแนะว่าอาจมีต่อมอื่น ๆ ที่นอกเหนือไปจากรังไข่และต่อมเหนือไตที่เป็นแหล่งเปลี่ยน Androgen ให้เป็น Oestrogen ในคนได้

ผลการทดลองเปรียบเทียบ Androgens ชนิดต่าง ๆ TP,DHA และ Androstenedione การที่ TP 2.5 mg ในหนูที่ตัดรังไข่ L_3 สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ แต่เมื่อทดลองกับ DHA และ Androstenedione 2.5 mg เท่ากัน

ไม่มีผลทั้ง ๆ ที่ Androgens ทั้ง 3 ชนิดนี้เป็น immediate precursor ของ Oestrogen (Ryan, 1963; Ryan & Smith, 1965) ยิ่งไปกว่านั้น Androgens ทั้ง 3 ชนิด นี้ยังสามารถชักนำให้เกิด Nidation ถึง 100% ใน dose ที่ต่ำกว่ามาก (0.05 – 0.1 mg) ในหนูทดลองที่มีรังไข่ที่ฉีด Stelazine (Varavudhi, 1969 a) ทำให้สรุปได้ว่าในภาวะที่ไม่มีรังไข่ TP อาจเป็นสารที่ถูกเปลี่ยนให้เป็น Oestrogensได้ง่ายกว่า Androgen ชนิดอื่นรวมทั้ง Androstenedione และ Dehydroepiandrosterone สาเหตุที่น่าเป็นไปได้ ก็อ 1. adrenal hormones interfere กับการเปลี่ยน DHA & Androstenedione ให้เป็น Oestrogen ได้ดีกว่า TP 2. DHA และ Androstenedione เปลี่ยนเป็น Estradiol ยากกว่า Oestrone DHA และ Androstenedione จะเปลี่ยนเป็น Oestrone ได้โดยตรง แต่ถาจะเปลี่ยนเป็น Estradiol จะต้องเปลี่ยนไปเป็น Testosterone เสียก่อน หรือเปลี่ยนเป็น Oestrone ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็น Estradiol อีกทีหนึ่ง (Ryan, 1965) นอกจากนี้ Jensen & Jacobson (1962) ทำการทดลองในหนู พบว่าหลังจากฉีด H^3Oestrone 2 ชั่วโมงจะพบ H^3 oestradiol ในมดลูก แต่ได้ปริมาณเพียง $\frac{1}{10}$ ของจำนวนเดิม และ Oestradiol ที่เกิดจาก Oestrone นี้มีผลเหมือน Oestradiol ในปริมาณที่เท่ากัน ยิ่งไปกว่านั้น ศันสนีย์ (1967) ศึกษาผลของ Oestradiol และ Oestrone ที่มีต่อ Nidation ในสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่วัน L_2 แล้วฉีดวัน L_3 ปรากฏว่าอัตราส่วนของ dose ที่ทำให้เกิด Nidation ของ Oestrone ต่อ Oestradiol = 5 : 1 และใช้ Oestrone สูงถึง 2.5 และ 3 (Nutting & Meyer, 1963) ในขณะที่ Oestradiol ใช้เพียง 0.05 เท่านั้นก็เกิดได้ ยิ่งไปกว่านั้น Yoshinaga (1961) สามารถชักนำให้เกิด Nidation ได้ด้วย Oestradiol ปริมาณเพียง 0.002 เท่านั้น เมื่อฉีดที่เปลวมันใกล้เส้นเลือดของผนังมดลูกโดยตรง จึงอาจจะเป็นไปได้ที่มีผลทำให้ DHA และ Androstenedione ชักนำให้เกิด nidation ได้น้อยกว่า TP โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่