บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

(METHODS)

1. การเตรียมหนูเพื่อใช้ทดลอง

1.1 การตรวจวงสืบพันธุ์

หนูที่นำมาใช้ทดลอง ได้ผ่านการตรวจวงสืบพันธุ์มาแล้วไม่น้อยกว่า 3 วง โดยการทำ vaginal smear ทุกเช้า ใช้ spatula จุ่มในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) แล้วสอดเข้าไปที่เยื่อบุภายในของคลอด ป้ายลงบนสไลด์ ตรวจดูลักษณะของเซลที่ปรากฏด้วยกล้องจุลทัศน์ จากลักษณะของเซลที่พบสามารถจะกำหนดได้ว่าอยู่ในระยะใดของวงสืบพันธุ์ ซึ่งตามปรกติหนูขาวจะมีวงหนึ่ง ๆ กินเวลา 4 - 5 วัน (Long & Evans,1922) ระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ในหนูขาว (estrous cycle) แบ่งได้ดังนี้

1. Dioestrus เป็นระยะที่นานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณครึ่งหนึ่งของวง ระยะนี้รังไข่จะไม่สร้างฮอร์โมน estrogen ภายในประกอบด้วย non-functional corpora lutea จากการตกไข่ครั้งล่าสุด vaginal epithelium บางกว่าระยะอื่น จะพบเซลเม็ดเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่จาก vaginal smear หรืออาจมีเซลของ epithelium ปะปนอยู่เป็นส่วนน้อย

2. Proestrus ระยะนี้กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง follicle จะเจริญจนถึงขั้น preovulatory swelling มีการสร้างฮอร์โมน estrogen สูง เป็นผลให้มดลูกพองน้ำ (edema) มีเส้นเลือดไปเลี้ยงมากขึ้น เซลของ vaginal epithelium เกิด stratification หนาขึ้น ระยะนี้จะพบเซลค่อนข้างกลม มี nucleus เห็นชัดเจน เรียกว่า nucleated cells ไม่พบเซลเม็ดเลือดขาวอยู่เลย ในการทำ vaginal

smear ตอนปลายของระยะนี้ หนูจะมี heat[1] พร้อมที่จะผสมกับตัวผู้ได้

3. Oestrus เป็นระยะที่ต่อจาก proestrus ตอนต้นของระยะนี้จะมี estrogen ออกมาในระดับสูงที่สุด หลังจากนี้จะมีการตกไข่เกิดขึ้น และ heat ก็จะหมดไปหลังจากตกไข่แล้ว นอกจากนั้นระดับ estrogen จะลดลง มดลูกจะสูญเสียน้ำทำให้ขนาดเล็กลง vaginal epitheleum ยังคงหนาอยู่แต่เกิด cornification. ทำให้ตัวเซลผนังช่องคลอดหลุดออกมาใน lumen มากมาย เรียก cornified cell เซลมีลักษณะirregular และมักจะไม่พบ nucleus ตอนต้น ๆ ของระยะจะพบ cornified cells ในการทำ vaginal smear แต่ในตอนปลายจะเริ่มพบว่ามีเม็ดเลือดขาวปะปนอยู่เล็กน้อย ระยะนี้กินเวลาประมาณ 30 ชั่วโมง ข้อที่น่าสังเกตก็คือตอนก่อนที่จะมีการตกไข่นั้น นอกจากรังไข่จะสร้าง estrogen ออกมาในระดับที่สูงมากแล้วยังสร้าง progesterone ออกมามากด้วย (Eto et al, 1962) โดยที่ progesterone ที่ได้ในตอนนี้มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น LH-surge สำหรับการตกไข่

4. Metoestrus เป็นระยะสั้น ๆ เกิดต่อจาก oestrus กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ระยะนี้ระดับ estrogen ในเลือดจะลดต่ำลงมาก เมื่อทำ vaginal smear จะพบว่า เซลเม็ดเลือดขาวที่ปะปนอยู่กับ cornified cell ในระยะ oestrus ตอนปลาย จะเพิ่มมากขึ้น

1.2 การตั้งครรภ์และการเลี้ยงลูกอ่อน

หนูขาวตัวเมียที่มีวงสืบพันธุ์สม่ำเสมอ ขณะที่อยู่ในระยะ proestrus (พบ nucleated cell) จับขังไว้กับตัวผู้ซึ่งได้พิสูจน์ fertility มาแล้ว ทิ้งไว้ตลอดคืน

---

[1]heat หมายถึง ช่วงเวลาสั้น ๆ ที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกับเวลาที่มีการตกไข่ เป็นช่วงเวลาที่ตัวเมียยินยอมให้ตัวผู้ผสมพันธุ์ ใช้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีวงสืบพันธุ์แบบ estrus

รุ่งเช้าของวันต่อมานำมาตรวจดูสเปอร์ม โดยทำ vaginal smear ถ้าพบก้อนของสเปอร์ม (sperm plug) หรือสเปอร์ม แสดงว่าหนูตัวนั้นเริ่มตั้งครรภ์ นับวันพบสเปอร์ม เป็นวันที่ 0 ของการตั้งครรภ์ (L_0) และวันต่อ ๆ มาก็เป็น L_1 - L_2 - L_3 -L_4... ตามลำดับ โดยปรกติระยะเวลาของการตั้งครรภ์ในหนูขาวคือ 21 - 22 วัน หลังจากคลอดลูกแล้วก็จะนับวันที่คลอดเป็นวันที่ 0 ของการเลี้ยงลูก (Lactation) และต่อจากนั้นก็เป็นวันที่ 1, 2, 3 ตามลำดับ หนูที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นหนูที่มีครรภ์ ซึ่งได้ตรวจพบสเปอร์มมาแล้วทุกตัว

1.3 <u>การตั้งครรภ์หลังคลอดขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม</u> (Lactating pregnancy)

เมื่อหนูที่ทดลองตั้งครรภ์เป็นเวลา 21 หรือ 22 วัน ใกล้จะคลอดต้องคอยสังเกตดูว่าคลอดเมื่อไร ทำอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง คือประมาณ 12:00 น. ครั้งหนึ่ง และ และ 18:00 น. อีกครั้งหนึ่ง แต่เพื่อที่จะให้ทราบเวลาอย่างใกล้เคียงที่สุด ต้องคอยสังเกตอยู่บ่อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ถ้าพบว่าคลอดก่อน 12:00 น. ต้องแยกแม่หนูไปผสมกับตัวผู้ภายในเย็นวันเดียวกันนั้น เพราะว่าภายใน 24 ชั่วโมง หลังคลอดเท่านั้นที่หนูเพิ่งคลอดจะมี heat (postpartum estrus) และสามารถผสมพันธุ์ได้อีกครั้งหนึ่ง (Nalbandov,1958) ถ้ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นภายในเย็นวันที่คลอด นับวันรุ่งขึ้นเป็นวันที่ 0 ของการตั้งครรภ์ (L_0) แต่ถ้าพบว่าคลอดหลัง 12:00 น. เช้าวันรุ่งขึ้น (ไม่เกิน 7:00 น.) จึงนำไปผสม ถ้ามีการผสมเกิดขึ้น นับวันนั้นเป็นวันที่ 0 (L_0) (ประกับ, 2509) ถ้าพบว่าคลอดตอนกลางคืน นับเวลาคลอดเป็น 7:00 น. ของวันรุ่งขึ้น (Krehbiel, 1941) หลังจากที่มีการผสมพันธุ์แล้วก็จะเอากลับไปเลี้ยงลูกตามเดิม และจัดจำนวนลูกที่ให้ดูดนมเป็น 8 ± 1 ตัว ในแต่ละครอก

2. <u>การผ่าตัด</u>

2.1 <u>การเปิดหน้าท้อง</u> (Laparotomy)

เมื่อถึงวันที่ 6 ของการตั้งครรภ์ (L_6) นำแม่หนูไปเปิดหน้าท้องออกเพื่อตรวจดู implantation site ที่มีลูก โดยให้ดมยาสลบ (anesthetic ether) ทาน้ำยาฆ่าเชื้อ (antiseptic) ที่บริเวณหน้าท้องส่วนล่างเหนือช่องคลอดเล็กน้อย ใช้กรรไกร

ปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อที่บริเวณกึ่งกลางลำตัวด้านยาว (mid-ventral line) ในระดับ mammary gland คู่ที่ 2 จาก posterior end เปิดเป็นช่องยาวประมาณ 1 ซม. ใช้ปากคีบปลายโค้งค่อย ๆ ดึงไขมันที่อยู่รอบ ๆ มดลูกขึ้นมาก่อน มดลูกก็จะติดขึ้นมาด้วย ตรวจแต่ละข้างของมดลูกว่ามีส่วนที่โป่งนูนขึ้นมาหรือไม่ (implantation site) ถ้ากดดูจะพบว่าเป็นก้อนแข็ง รู้สึกพองอยู่ข้างใน ต่างจากรอยเดิม (scar) ซึ่งเป็นรอยแผลที่เกิดจากการฝังตัวของลูกรุ่นที่เกิดก่อนจะพบว่ามีสีขาวออกเหลืองอ่อน ๆ หลังจากนั้นก็จะใส่ส่วนต่าง ๆ ที่ดึงออกมากลับคืนเข้าไปในช่องท้องอย่างเดิม แล้วเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกันด้วยไหมสำหรับเย็บแผลและยึดหนังให้ติดกันด้วย surgical clip

2.2 Autopsy

เมื่อถึงวันที่ 16 ของการตั้งครรภ์ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม (Lactating pregnancy) นำหนูทดลองนั้นไปฆ่าเพื่อศึกษาต่อไป (autopsy) โดยการดึงคอต่อให้หลุดออกจากกัน (dislocation) เพื่อให้ตายทันที แล้วเปิดหน้าท้องออกให้เป็นช่องกว้าง ตรวจหา implantation site นับดูว่ามีจำนวนเท่าไรในแต่ละข้างของมดลูก วัดขนาดของ implantation site ไว้ทุกอัน พร้อมกับตรวจดูสภาพของ implantation site ที่ปรากฏภายนอกว่าเป็นปรกติหรือไม่ เก็บรังไข่ 2 ข้าง, ต่อมน้ำนม ไว้สำหรับกรณีที่แสดงให้เห็นความแตกต่างจากพวกอื่น ๆ อย่างชัดเจน เพื่อศึกษา histology ประกอบการทดลอง

005995

3. การเตรียมสารละลายจากยาที่ใช้ทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย Monoamine oxidase inhibitors

3.1.1 Marsilid

ชั่งผง marsilid มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วย 0.85 % normal saline ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองแกมเขียวอ่อน ๆ เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

i 18030026

3.1.2 Marplan

ชั่งผง marplan มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 95 % ethyl alcohol 1 ส่วน จนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 0.85 % normal saline 9 ส่วน จนมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร สารละลายใส ไม่มีสี เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.2 การเตรียมสารละลายโมโนอมีนส์ (อินโดลามีนส์)

3.2.1 Serotonin

ชั่ง serotonin มาจำนวนหนึ่ง ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.85 % normal saline จนเป็นเนื้อเดียวกัน ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร สารละลายใส ไม่มีสี เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.2.2 Melatonin

ชั่ง melatonin มาจำนวนหนึ่ง ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 95 % ethyl alcohol 1 ส่วน แล้วเติม 0.85 % normal saline ลงไป 9 ส่วน ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.3 การเตรียมสารละลายสารตัวกำเนิดโดปามีน (dopamine precursor)

3.3.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้เป็น vehicle สำหรับ dopamine precursor

ชั่ง NaCl 0.9 กรัม polyserbate 80 (Tween USP) 0.4 กรัม, CMC 0.5 กรัม ใส่รวมกัน แล้วเติม benzyl alcohol 0.9 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำข้าว เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

ชั่ง L-dopa มาจำนวนหนึ่ง ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม นำมาผสมกับ vehicle ที่เตรียมไว้ ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าขวดก่อนใช้ทุกครั้ง สารละลายมีสีขาวขุ่น ป้องกันไม่ให้ถูกแสง โดยการหุ้มรอบ ๆ ขวดด้วยกระดาษตะกั่ว เพราะแสงจะไปมีผลทำให้ยาเสื่อมคุณภาพลงก่อนเวลาที่ต้องการ เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.4 การเตรียม Fixative

Kahle's AFA fixative

70 % ethyl alcohol 90 มิลลิลิตร glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร, formaldehyde 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น จนถึงเวลาใช้

3.5 การเตรียมสี

3.5.1 Ehrlich's acid haematoxylin

ชั่ง haematoxylin 8 กรัม ละลายด้วย 95 % ethyl alcohol 400 มิลลิลิตร อุ่นใน water bath แล้วนำมาผสมกับสารละลายของโปแตสเซี่ยม 8 กรัม ที่เติมน้ำกลั่นลงไป 400 มิลลิกรัม เช่นกัน อุ่นให้ละลายและเข้ากันดีแล้ว เติมกลีเซอรีน 400 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่ลงในขวดแล้วอุดปากขวดด้วยสำลีอย่างหลวม ๆ นำไปตากแดดประมาณ 6 สัปดาห์ (อาจทำให้สุกเร็วขึ้นได้ด้วยการเติม potassium permanganate 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงไป)

3.5.2 Eosin (0.5 % in alcohol)

ชั่ง eosin 0.5 กรัม ละลายด้วย 95 % ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

4. การฉีดยาที่ใช้ในการทดลอง

Material	Vehicles	Routes of Injection
Marsilid	0.85 % Normal saline	intraperitonial (ip)
Marplan	95 % ETOH : 0.85 % Normal saline 1 : 9	intraperitonial (ip)
serotonin	0.85 % normal saline	intraperitonial (ip)
melatonin	95 % ETOH : 0.85 % normal saline 1 : 9	intraperitonial (ip)
L-dopa	NaCl 0.9 %, polyserbate 80 0.4 %, CMC 0.5 %, benzyl alc. 0.9 % in distilled water	intraperitonial (ip)

5. การทำ serial section ของรังไข่และต่อมน้ำนม

นำเนื้อเยื่อรังไข่ และต่อมน้ำนมที่ต้องการศึกษา fix ในน้ำยา Kahle's AFA fixative ประมาณ 48 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้เย็น หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำยาเป็น 70 % ethyl alcohol 24 ชั่วโมง แล้วผ่านการ dehydrate โดยเปลี่ยนน้ำยาเป็น 80 %, 90 %, 95 %, 95 % ethyl alcohol + n-butyl alcohol, n-butyl alcohol + xylene และ xylene ตามลำดับ โดยใช้เวลาขั้นละ 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเปลี่ยนไปแช่ในส่วนผสมของ xylene กับ paraplast ที่หลอมเหลว เป็นเวลาประมาณ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้อบสูญญากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 65° เซ็นติเกรด แล้วเปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้อบเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นจึงนำเอาเนื้อเยื่อแต่ละชนิดที่ต้องการศึกษาดังกล่าวมา embed ใน paraplast แล้วตัด serial section หนา 8 ไมครอน ด้วยเครื่อง microtome ย้อมสีด้วย Ehrlich's acid haematoxylin และ eosin นำไปตรวจ

และศึกษา histology ของโครงสร้างภายในรังไข่ (whole structure) ลักษณะของเซลและ secretion ใน alveoli ของต่อมน้ำนม โดยใช้กล้องจุลทัศน์

การทดลอง

การทดลองครั้งนี้ ใช้หนูขาวตั้งครรภ์ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนมอยู่ (Lactating pregnant rats) ทั้งหมด 122 ตัว ตัวผู้ 20 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 2 พวก ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาเปรียบเทียบขนาดของ implantation site ในวันต่าง ๆ ของการตั้งครรภ์ ตั้งแต่ L_6 ถึง L_{16}

การทดลองชุดนี้ทำขึ้นเพื่อใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบค่าของเส้นผ่าศูนย์กลาง implantation site ที่ได้จากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ (normal pregnant rats) และเคยได้รับการผสมมาแล้ว กับหนูที่ทดลอง เพื่อที่จะประมาณวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนที่ล่าช้าออกไปจากปรกติในหนูที่ทดลอง ทำโดยสุ่มตัวอย่างหนูที่ตั้งครรภ์อยู่ในขณะนั้นจากห้องปฏิบัติการของแผนกชีววิทยาฯ โดยที่ใช้หนูทั้งหมดในการศึกษาชุดนี้ 22 ตัว และตรวจดู implantation site เวลาเดียวกันในทุก ๆ กลุ่มของวันที่ตั้งครรภ์

2. การศึกษาผลเปรียบเทียบของยาชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวันที่ 6 และการเจริญของตัวอ่อนในวันที่ 16 ของการตั้งครรภ์

แบ่งการทดลองนี้ออกเป็นกลุ่มย่อย ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ทำเป็น control ไว้เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ

นำหนูตัวเมียที่พบว่าได้มีการผสมพันธุ์หลังคลอดแล้ว และมีลูกอ่อนดูดนมอยู่ ฉีดสารละลาย (vehicle) ของยาชนิดต่าง ๆ เข้าไปดังนี้

a. 0.85 % normal saline ฉีดเข้าทางช่องท้อง (ip) 0.1 มิลลิลิตรต่อวัน

5 วัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 4 ตัว
1 วัน ในวัน L_1 จำนวน 3 ตัว
1 วัน ในวัน L_3 จำนวน 3 ตัว

b. 95 % ethyl alcohol : 0.85 % normal saline 1:9 (vehicle ของ marplan และ melatonin) ฉีดเข้าช่องท้อง ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร ต่อวัน ในวัน L_1 - L_5 จำนวน 6 ตัว

c. สารละลายของ NaCl 0.9 %, Tween USP 0.4 %, CMC 0.5 %, benzyl alcohol 0.9 % ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (vehicle ของ L-dopa) ฉีดเข้าช่องท้อง ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตรต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 2 MAOI treatment

นำ lactating pregant rats มาฉีดด้วยยาห้ามการทำงานของเอนไซม์โมโนอมีนออกซิเดส (MAOI) ดังต่อไปนี้

a. Marsilid
1) 5 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว
2) 10 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 จำนวน 7 ตัว
3) 25 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 จำนวน 7 ตัว
4) 10 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_3 จำนวน 6 ตัว
5) 25 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_3 จำนวน 6 ตัว

b. Marplan
2 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3 Monoamines (indoleamine) treatment

นำ lactating pregnant rat มาฉีดด้วยยาประเภทโมโนอมีนส์ ดังต่อไปนี้

1. Serotonin

a. 1 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว

b. 2 มิลลิกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 5 ตัว

2. Melatonin

1) 100 ไมโครกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว

2) 200 ไมโครกรัม ต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4 Dopamine precursor treatment

นำ lactating pregnant rats มาฉีดด้วย L-dopa เข้าทางช่องท้อง ด้วยปริมาณต่าง ๆ กัน ดังต่อไปนี้

i) 2.5 มิลลิกรัมต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 7 ตัว

ii) 5 มิลลิกรัมต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 6 ตัว

iii) 10 มิลลิกรัมต่อวัน ในวัน L_1 ถึง L_5 จำนวน 7 ตัว

ผลการทดลอง

1. ผลการประมาณค่าวันของการฝังตัวของตัวอ่อนในหนูทดลองที่ล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ (estimated date of delay nidation)

จากการเปรียบเทียบค่าของเส้นผ่าศูนย์กลาง implantation site กับวันของการตั้งครรภ์ในหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ จะได้ความสัมพันธ์ ดังในกราฟที่ 1

จากตารางที่ 2

กลุ่ม I ฉีด vehicle control พบว่า วันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ คือ 7.53 ± 0.3 วัน อยู่ในช่วง 5 - 10 วัน

กลุ่ม II MAOI treatment

a) marsilid

a.i) ฉีด marsilid วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ คือ 6.8 ± 0.4 วัน อยู่ในช่วง 6 - 9 วัน

a.ii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่าวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ คือ 6.64 ± 0.8 วัน อยู่ในช่วง 3 - 9 วัน

a.iii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่าวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ คือ 6.70 ± 0.3 วัน อยู่ในช่วง 6 - 8 วัน

a.iv) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่าวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติคือ 7.16 ± 0.2 วัน อยู่ในช่วง 6 - 7 วัน

a.v) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่าวันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ คือ 7.15 ± 0.4 วัน อยู่ในช่วง 7 - 9 วัน

จะเห็นได้ว่า จำนวนวันที่ล่าช้าของทุก ๆ treatment ในกลุ่มกับ control มีค่าใกล้เคียงกัน

b. marplan

ฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า วันที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนล่าช้าออกไปจากกลุ่มหนูที่ตั้งครรภ์อย่างปรกติ 5.89 ± 1.1 วัน อยู่ในช่วง 3 - 11 วัน จะเห็นได้ว่าจำนวนวันที่ล่าช้า (เฉลี่ย) น้อยกว่า control และกลุ่มที่ฉีดด้วย marsilid แต่พิสัยกว้างมาก ไม่ต่างจาก control หรือกลุ่มที่ฉีดด้วย marsilid

กลุ่ม III Monoamines (indoleamines) treatment

a. serotonin

a.i) ฉีด serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 8.1 ± 0.3 วัน อยู่ในช่วง 7 - 9 วัน

a.ii) ฉีด serotonin วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 7.41 ± 1.2 วัน อยู่ในช่วง 3 - 10 วัน

จะเห็นได้ว่ากลุ่ม III a.i, a.ii, มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่ม I (vehicle control) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$, CRD test)

b. melatonin

b.i) ฉีด melatonin วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าล้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 5.88 ± 0.1 วัน อยู่ในช่วง 5 - 7 วัน

b.ii) ฉีด melatonin วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 6.09 ± 0.3 วัน อยู่ในช่วง 5 - 7 วัน

จะเห็นว่า กลุ่มที่ฉีดด้วย melatonin ให้ผลไม่ต่างกันใน dose ทั้ง 2 ที่ใช้ในการทดลอง

กลุ่ม IV Dopamine precursor (L-dopa) treatment

i) ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 6.35 ± 0.2 วัน อยู่ในช่วง 5-7 วัน

ii) ฉีด L-dopa วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวัน

ที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปกติ 5.65 ± 1.0 วัน อยู่ในช่วง 3 - 10 วัน จะเห็นได้ว่ามีจำนวนวันที่ล่าช้าใกล้เคียงกับกลุ่มที่ฉีดด้วย marplan (II.b.i) กับ melatonin 100 Mg. L_1-L_5(III.b.i) แต่มีช่วงใกล้เคียงกับกลุ่ม II a.ii, II b.i และ III b.i ตามลำดับ (ดังในตารางที่ 2)

iii)ฉีด L-dopa วันละ 10 mg. ในวัน L_1-L_5 พบว่าจำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้าออกไปจากหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ 6.68 ± 0.6 วัน อยู่ในช่วง 5-9 วัน

ผลจากการเปรียบเทียบจำนวนวันที่ล่าช้าของทุก ๆ กลุ่มที่ทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$, CRD-test)

2. <u>ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลของยาห้ามการทำงานของ enzyme monoamine oxidase, monoamines (indoleamines), dopamine precursor ที่มีต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ในวันที่ 6 ของการตั้งครรภ์ (L_6)</u>

จากตารางที่ 2

<u>กลุ่มที่ I ฉีด vehicle control</u> พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

<u>กลุ่มที่ II Monoamine oxidase inhibitor treatment</u>

<u>a. marsilid</u>

a.i) ฉีด marsilid วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1- L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

a.ii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ในวัน L_6 1 ตัว ใน 7 ตัว

a.iii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6 1 ตัว ใน 7 ตัว, ตัวที่พบว่ามี implantation site เล็กลูกน้อยกว่าตัวอื่น ๆ พบว่าลูกตายในวัน L_2 3 ตัว, L_3

3 ตัว, L_4 ไม่มีลูกดูดหมเหลืออยู่เลย

a.iv) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่าไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

a.v) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่าไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ในวัน L_6

b. marplan

ฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

กลุ่มที่ III Monoamine treatment

a. serotonin

a.i) ฉีด serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่าไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

a.ii) ฉีด serotonin วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ในวัน L_6 เช่นกัน

b. Melatonin

b.i) ฉีด melatonin วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

b.ii) ฉีด melatonin วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ในวัน L_6

กลุ่มที่ IV Dopamine precursor (L-dopa) treatment

i) ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่ามีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6 1 ตัว จากทั้งหมด 7 ตัว ตัวที่พบว่ามีผลนั้นมีลูกดูดหม

อยู่เพียง 5 ตัว ในวัน L_3, ไม่แข็งแรง และตายหมดในวัน L_6

ii) ฉีด L-dopa วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

iii) ฉีด L-dopa วันละ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ไม่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลของยาห้ามการทำงานของ enzyme monoamine oxidase, monoamines, dopamine precursor ที่มีต่อการฝังตัวและการเจริญของตัวอ่อน ในวันที่ 16 ของการตั้งครรภ์ (L_{16})

3.1 ผลที่มีต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_{16}

จากตารางที่ 2

กลุ่มที่ I ฉีด vehicle control ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่ามีอยู่ 3 ตัวที่ไม่พบ implantation site จากทั้งหมด 24 ตัว

กลุ่มที่ II

a. marsilid treated

a.i) ฉีด marsilid วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ในวัน L_{16} ทุกตัวมีการฝังตัวเกิดขึ้นแล้ว

a.ii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า ในวัน L_{16} ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อนเกิดขึ้นแล้ว

a.iii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลกรัม ในวัน L_1 พบว่า ในวัน L_{16} ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อนเกิดขึ้นแล้ว

a.iv) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่า มี 1 ตัว ที่ไม่พบว่ามี implantation site ในวัน L_{16} จากทั้งหมด 6 ตัว

a.v) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3

พบว่า ในวัน L_{16} ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อนเกิดขึ้นแล้ว

b. ฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ในวัน L_{16} ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อนเกิดขึ้นแล้ว

กลุ่มที่ III Monoamine (indoleamines) treatment

a. serotonin

a.i) ฉีด serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า มี 2 ตัว ใน 6 ตัว ที่ไม่พบ implantation site ในวัน L_{16}

a.ii) ฉีด serotonin วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่า ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อน

b. Melatonin

b.i) ฉีด melatonin วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่าทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อน

b.ii) ฉีด melatonin วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่าทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อน

กลุ่มที่ IV Dopamine precursor (L-dopa)treatment

1. ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่า มี 1 ตัว ใน 7 ตัว ที่ไม่พบว่ามี implantation site เกิดขึ้น

2. ฉีด L-dopa วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่า ทุกตัวมีการฝังตัวของตัวอ่อน

3. ฉีด L-dopa วันละ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่า มี 1 ตัว ใน 7 ตัว ที่ไม่มี implantation site เกิดขึ้น

3.2 ผลที่มีต่อการเจริญของตัวอ่อนในวัน L_{16}

3.2.1 ผลที่มีต่อความมีชีวิตรอดของตัวอ่อนที่พบในวัน L_{16}

จากตารางที่ 2

กลุ่ม I ฉีด vehicle control พบว่ามีจำนวน lived implantation site 86.8%หรือ เกิด resorbed implantation site 13.2 %

กลุ่ม II MAOI treatment

a. marsilid

a.i) ฉีด marsilid วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation site 96.4 % หรือ เกิด resorbed implantation site 3.6 %

a.ii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation site 86.8%หรือเกิด resorbed implantation site 13.2 % ค่าที่ได้เท่ากับ control

a.iii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation site 84.2 % หรือเกิด resorbed implantation site 15.8 %ใกล้เคียงกับ control

a.iv) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation site 90 % หรือเกิด resorbed implantation site 10 %

a.v) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation site 50.0 % หรือเกิด resorbed implantation site ถึง 50 % แสดงให้เห็นว่าการฉีด marsilid เพียงครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 มีผลต่อความมีชีวิตรอด (viability) ของ blastocyst ได้ถึง 50 %

b. marplan

b.i) ฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ในวัน L_{16} พบว่า จำนวน lived implantation site 43.5 % หรือเกิด resorbed implantation site 56.5 % แสดงให้เห็นว่าการฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 -L_5 มีผลต่อ viability ของ blastocyst

กลุ่ม III monoamines (indoleamines) treatment

a. serotonin

a.i) ฉีด serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 92 % หรือ resorbed implantation site 8 %

a.ii)ฉีด serotonin วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 87.8% หรือ resorbed implantation site 12.2 % ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับ control

b. melatonin

b.i) ฉีด melatonin วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1 -L_5 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 84.6 % หรือ resorbed implantation sites 15.4 % ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับ control

b.ii) ฉีด melatonin วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 78.4%หรือ resorbed implantation sites 21.6 % ค่าที่ได้มากกว่า control

กลุ่ม IV Dopamine precursor (L-dopa) treatment

i) ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5พบว่า ในวัน L_{16} จำนวน lived implantation sites 83.1 % หรือ resorbed implantation sites 16.9 %

ii) ฉีด L-dopa วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 88.2 % หรือ resorbed implantation sites 11.8 %

iii) ฉีด L-dopa วันละ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่าในวัน L_{16} มีจำนวน lived implantation sites 91.8 % หรือ resorbed implantation sites 8.2 %

จากการเปรียบเทียบผลของยาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า การฉีดยาห้ามการทำงานของเอนไซม์โมโนอมีน ออกซิเดส ได้แก่ marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 กับ marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 มีผลต่อ viability ของ blastocyst มากที่สุด โดยที่จะทำให้เกิด resorbed implantation sites ได้ถึง 50 และ 56.5 % ตามลำดับ

3.2.2 ผลที่มีต่อขนาดของ implantation site ในวัน L_{16}

จากตารางที่ 2

กลุ่ม I ฉีด vehicle control พบว่า ในวัน L_{16} ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ implantation sites = 5.4 ± 0.3 มิลลิเมตร ขนาดที่เล็กที่สุดในกลุ่มคือ 3.3 มิลลิเมตร ใหญ่ที่สุดคือ 8.0 มิลลิเมตร จากการศึกษา histology โครงร่างภายในรังไข่ พบว่าประกอบด้วย corpora lutea ที่ active มีขนาดใหญ่ และ follicles ขนาดต่าง ๆ ที่เจริญเติบโตขึ้น จนถึงที่มีขนาดใหญ่ มี antrum ใหญ่, โครงร่างภายในต่อมน้ำนม พบว่าประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่ และเต็มไปด้วย secretory material อยู่ภายใน (รูปที่ 2.1, 2.2 แผ่นภาพที่ 2; 1.1, 1.2 แผ่นภาพที่ 1 ตามลำดับ)

กลุ่ม II MAOI treatment

a. marsilid

a.i) ฉีด marsilid วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation sites มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 ± 0.4 มิลลิเมตร ไม่แตกต่างจาก control มากนัก ขนาดที่เล็กที่สุดที่พบในกลุ่มนี้ คือ 4.3 มิลลิเมตร และขนาดที่ใหญ่ที่สุดคือ 6.9 มิลลิเมตร

a.ii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.8 ± 0.5 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดที่พบในกลุ่มนี้คือ 4.2 มิลลิเมตร และขนาดใหญ่ที่สุดคือ 8.1 มิลลิเมตร

a.iii) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 ± 0.3 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดที่พบในกลุ่มนี้คือ 5.8 มิลลิเมตร และขนาดใหญ่ที่สุดคือ 7.0 มิลลิเมตร จากการศึกษาโครงร่างทาง histology ของต่อมน้ำนม พบว่า มี alveoli ขนาดเล็กกว่ากลุ่ม control (รูปที่ 1.3 แผ่นภาพที่ 1)

a.iv) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_3 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.9 ± 0.8 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม = 2.1 มิลลิเมตร ขนาดใหญ่ที่สุดคือ 6.2 มิลลิเมตร

a.v) ฉีด marsilid ครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.8 ± 0.3 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดและใหญ่ที่สุดในกลุ่มได้แก่ 4.3 และ 6.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการศึกษา histology โครงร่างของรังไข่ของตัวแทนกลุ่มนี้ พบว่า ประกอบด้วย oorpora lutea ที่ active และเต็มไปด้วย follicles ขนาดต่าง ๆ ที่กำลังเจริญ มี antrum ขนาดใหญ่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.3 แผ่นภาพที่ 2)

b. <u>marplan</u>

i) ฉีด marplan วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 - L_5

ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.0± 1.4 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่ามีขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม control ขนาดที่เล็กที่สุดและใหญ่ที่สุดที่พบในกลุ่มนี้คือ 2.0 และ 10.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาโครงร่างทางhistology ของรังไข่ จากตัวแทนของกลุ่ม พบว่าประกอบด้วย corpora lutea จำนวนมาก ซึ่งยัง active และเต็มไปด้วย follicles ที่กำลังเติบโตจนถึง follicles ที่มี antrum ขนาดใหญ่ (ดังแสดงในรูป 3.3 แผ่นภาพที่ 3)

กลุ่ม III Monoamines (indoleamines) treatment

a. serotonin

a.i) ฉีด serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 ± 0.4 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดที่พบในกลุ่มได้แก่ 3.8 มิลลิเมตร ขนาดใหญ่ที่สุดได้แก่ 6.6 มิลลิเมตร จากการศึกษา histology โครงร่างของรังไข่จากตัวแทนของกลุ่ม พบว่าประกอบด้วย corpora lutea และ follicles ขนาดเล็กอยู่ทั่ว ๆ ไป (รูปที่ 3.4, แผ่นภาพที่ 3)

a.ii) ฉีด serotonin วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.6 ± 1.1 มิลลิเมตร โดยที่ขนาดเล็กที่สุดที่พบในกลุ่ม ได้แก่ 3.4 มิลลิเมตร ใหญ่ที่สุดมีขนาด 10 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่า มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่ฉีดด้วย serotonin วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5; marsilid 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3, 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 และ control เมื่อศึกษา histology โครงร่างภายในของต่อมน้ำนมจากตัวแทนของกลุ่ม พบว่าประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่พอสมควร และมี secretion อยู่ภายในค่อนข้างมาก (รูปที่ 1.5 แผ่นภาพที่ 1)

b. melatonin

i) ฉีด melatonin วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1 -L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

7.0 ± 0.2 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุด = 6.5 มิลลิเมตร, ใหญ่ที่สุด = 7.9 มิลลิเมตร จากการศึกษาโครงร่างทาง histology ของรังไข่ที่ได้จากตัวแทนของกลุ่มนี้ พบว่าประกอบด้วย active corpora lutea และ follicle ขนาดเล็ก ๆ ที่เจริญเติบโตมีขนาดต่าง ๆ กัน แต่ไม่ถึงขั้น preovulatory stage นอกจากนั้น โครงร่างภายในของต่อมน้ำนม ก็พบว่ามี alveoli ขนาดใหญ่ แต่มี secretion ภายในน้อยมาก (รูปที่ 3.1 แผ่นภาพที่ 3 และรูปที่ 1.6 แผ่นภาพที่ 1 ตามลำดับ)

ii) ฉีด melatonin วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1 - L_5 ผลที่ได้ ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.8 ± 0.3 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุด 6.1 มิลลิเมตร, ใหญ่ที่สุด 7.7 มิลลิเมตร เมื่อศึกษาโครงร่างทาง histology ภายในรังไข่ของตัวแทนกลุ่มนี้ พบว่ามี active corpora lutea และ follicles ที่มี antrum ขนาดใหญ่ (รูป 3.2 แผ่นภาพที่ 3)

กลุ่ม IV dopamine precursor treatment

i) ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 ±0.3 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุด 5.8 มิลลิเมตร, ใหญ่ที่สุด 7.4 มิลลิเมตร

ii) ฉีด L-dopa วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.3 ± 1.1 มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุด 2.3, ขนาดใหญ่ที่สุด 10.1 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่า มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่มที่ treat ด้วย marplan, melatonin 100 ไมโครกรัม ในวันL_1-L_6 จากการศึกษาทาง histology ของโครงร่างของต่อมน้ำนม ในวัน L_{16} พบว่า ประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่ และมี secretion ภายในมาก ใกล้เคียงกับกลุ่ม control (รูปที่ 1.4 แผ่นภาพที่ 1)

iii) ฉีด L-dopa วันละ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1- L_5 ผลที่ได้ในวัน L_{16} พบว่า implantation site มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.1 ± 0.6

มิลลิเมตร ขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม = 4.3 มิลลิเมตร, ใหญ่ที่สุด 7.7 มิลลิเมตร จากการศึกษา histology โครงร่างภายในรังไข่ในวัน L_{16} พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea ที่มีขนาดใหญ่ และ follicles ที่กำลังเจริญเติบโต ภายในมี antrum ใหญ่ (รูปที่ 2.4 แผ่นภาพที่ 2)

3.2.3 ผลของยาที่มีต่อการเกิด asynchronus implantation

จากตารางที่ 2 พบว่า กลุ่มที่มีผลต่อการเกิด asynchronus implantation ได้แก่

กลุ่ม I control พบว่ามีผลทำให้เกิด asynchronus implantation 4.7 %

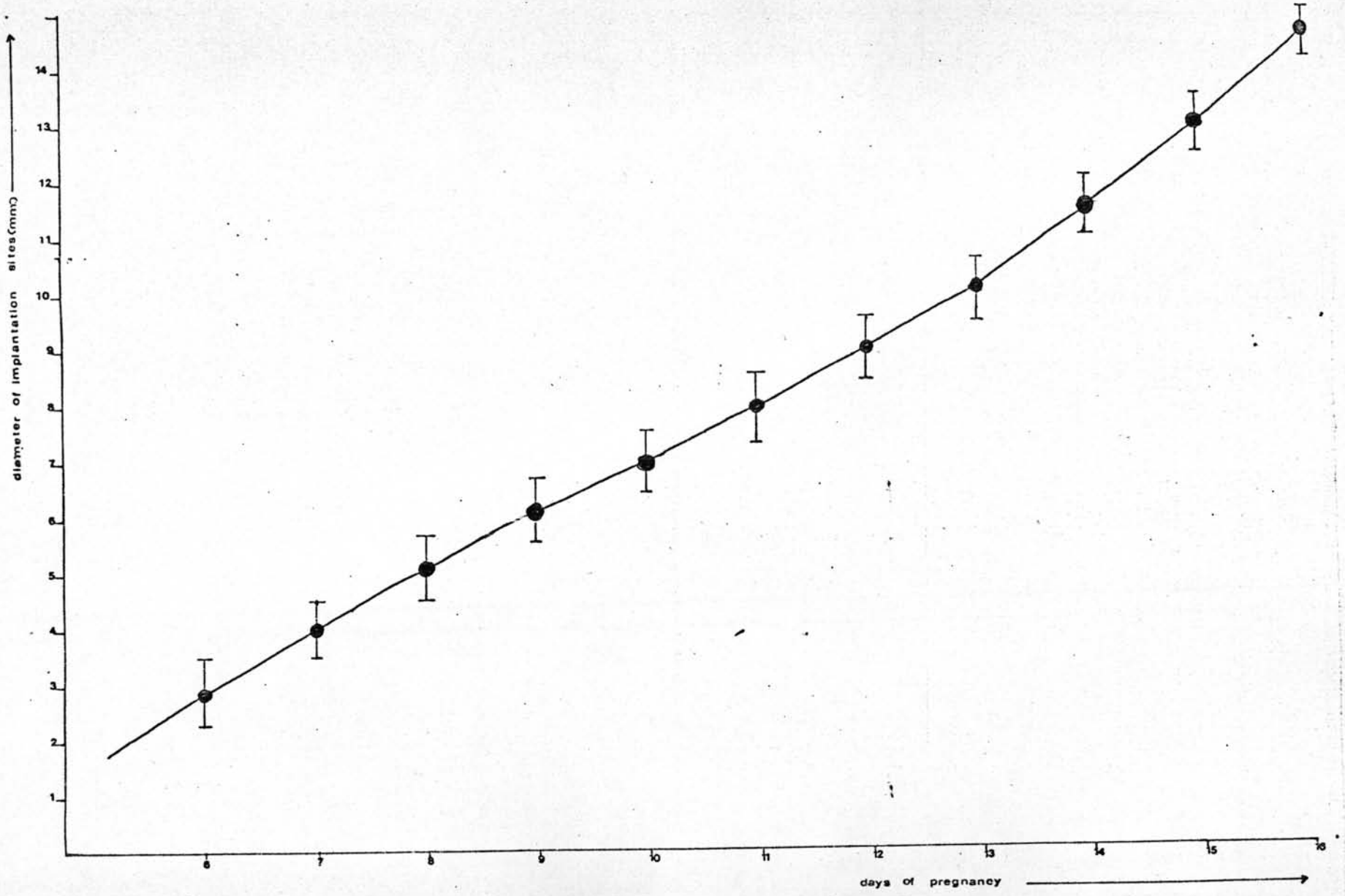
กลุ่ม II พวกที่ฉีดด้วย marsilid ครั้งเดียว 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 พบว่า มีผลทำให้เกิด asynchronus implantation 14.3 %

กลุ่ม IV พวกที่ฉีด L-dopa วันละ 2.5 มิลลิกรัม และ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 - L_5 พบว่ามีผลทำให้เกิด asynchronus implantation ได้มากที่สุด คือ 42.9 และ 14.3 % ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ implantation site ในวันต่าง ๆ ของการตั้งครรภ์ปรกติ

จำนวนสัตว์ทดลอง	วันของการตั้งครรภ์	จำนวน implantation site	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.) ค่าเฉลี่ย ± SE
2	6	18	2.9 ± 0.07
2	7	16	3.9 ± 0.07
2	8	15	5.1 ± 0.06
2	9	16	6.1 ± 0.08
2	10	18	6.8 ± 0.12
2	11	16	7.2 ± 0.05
2	12	24	8.0 ± 0.87
2	13	20	9.2 ± 0.47
2	14	19	12.8 ± 0.27
2	15	15	13.2 ± 0.95
2	16	17	14.4 ± 0.18

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของ implantation sites กับจำนวนวันของการตั้งครรภ์ ในหนูที่ตั้งครรภ์ปรกติ (normal pregnant rat)


diameter of implantation sites (mm)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
days of pregnancy

ตารางที่ 2 แสดงผลเปรียบเทียบระหว่างยาห้ามการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase, monoamines ชนิด indoleamines และ dopamine precursor (L - dopa) ที่มีต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในวัน L_6 และการเจริญของตัวอ่อนในวัน L_{16} ตามลำดับ

กลุ่มหนูทดลอง	ผล Laporotomy L_6 †	ผล A U T O P S Y L_{16} †				
	จำนวนหนูที่พบ implantation / จำนวนหนูทดลองทั้งหมด	จำนวนหนูที่พบ implantation / จำนวนหนูทดลองทั้งหมด	จำนวน implantation sites: มีชีวิต / จำนวนทั้งหมด[3] (%)	เส้นผ่าศูนย์กลาง implantation site (มม.) ค่าเฉลี่ย M ± S.E.* (พิสัย)	จำนวนวันที่มีการฝังตัวล่าช้า โดยประมาณ ค่าเฉลี่ย M ± S.E.* (พิสัย)	จำนวนหนูที่พบ asynchronus / จำนวนทั้งหมด (%)
I. Control						
a. 0.85% normal saline	0/10	10/10	61/78 (78.2)	4.7 ± 0.3 (3.1- 6.2)	8.37 ± 0.3 (7.15- 9.0)	1/10 (10.0)
b. 95% EtOH:normal saline 1:9	0/6	5/7	41/41 (100.0)	6.8 ± 0.4 (5.8- 8.0)	6.05 ± 0.4 (4.67- 7.25)	0/7 (0)
c. Vehicle L-dopa	0/7	6/7	51/57 (89.5)	5.1 ± 0.6 (3.5- 7.6)	7.69 ± 0.7 (5.32- 9.62)	0/7 (0)
Overall Control	0/23	21/24	153/176 (86.8)	5.4 ± 0.3 (3.3- 8.0)	7.53 ± 0.3 (4.67- 9.62)	1/21 (4.7)
II. Monoamine oxidase inhibitor (MAOI)						
a. marsilid						
i) 5 mg $L_1 - L_5$	0/6	6/6	53/55 (96.4)	6.0 ± 0.4 (4.3- 6.9)	6.84 ± 0.4 (6.05- 8.5)	0/6 (0)
ii) 10 mg L_1	1/7	7/7	59/68 (86.8)	5.8 ± 0.5 (4.2- 8.1)	6.64 ± 0.8 (3.22- 8.98)	1/7 (14.3)
iii) 25 mg L_1	1/7[1]	7/7	48/57 (84.2)	6.5 ± 0.3 (5.8- 7.0)	6.70 ± 0.3 (5.5 - 7.57)	0/7 (0)
iv) 10 mg L_3	0/5	5/6	18/20 (90.0)	4.9 ± 0.8 (2.1- 6.2)	7.16 ± 0.2 (6.30- 7.25)	0/6 (0)
v) 25 mg L_3	0/6	6/6	19/38 (50.0)	5.8 ± 0.3 (4.3- 6.3)	7.15 ± 0.4 (6.50- 8.50)	0/6 (0)
b. marplan						
i) 2 mg $L_1 - L_5$	0/6	6/6	10/23 (43.5)	7.0 ± 1.4 (2.0-10.0)	5.89 ± 1.1 (3.0 -10.7)	0/6 (0)
III. Monoamines (MA)						
a. serotonin						
i) 1 mg $L_1 - L_5$	0/4	4/6	23/25 (92.0)	5.0 ± 0.4 (3.8- 6.6)	8.10 ± 0.3 (7.37- 8.92)	0/6 (0)
ii) 2 mg $L_1 - L_5$	0/5	5/5	36/41 (87.8)	5.6 ± 1.1 (3.4-10.0)	7.41 ± 1.2 (3.1 - 9.55)	0/5 (0)
b. melatonin						
i) 100 µg $L_1 - L_5$	0/6	6/6	44/52 (84.6)	7.0 ± 0.2 (6.5- 7.9)	5.88 ± 0.1 (4.95- 6.5)	0/6 (0)
ii) 200 µg $L_1 - L_5$	0/6	6/6	40/51 (78.4)	6.8 ± 0.3 (6.1- 7.7)	6.09 ± 0.3 (5.20- 6.95)	0/6 (0)
IV. Dopamine precursor (L - dopa)						
i) 2.5 mg $L_1 - L_5$	1/7[2]	6/7	49/59 (83.1)	6.7 ± 0.3 (5.8- 7.4)	6.35 ± 0.2 (5.45- 7.25)	3/7 (42.9)
ii) 5 mg $L_1 - L_5$	0/6	6/6	45/51 (88.2)	7.3 ± 1.1 (2.3-10.1)	5.65 ± 1.0 (2.95-10.45)	0/6 (0)
iii) 10 mg $L_1 - L_5$	0/6	6/7	45/49 (91.8)	6.1 ± 0.6 (4.3- 7.7)	6.68 ± 0.6 (5.20- 8.50)	1/7 (14.3)

† นับวัน L_1 เป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์

* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) - CRD test

1 ตัวที่พบ implantation ลูกตายในวัน L_2 4 ตัว, L_3 3 ตัว, L_4 ไม่มีลูกดูดนมและไม่ได้ใส่ลูกแทนให้

2 ตัวที่พบ implantation ลูกตายในวัน L_2 2 ตัว, เหลือลูกในวัน L_3 5 ตัว, ลูกไม่แข็งแรงและตายหมดในวัน L_6, หลังจากนั้นไม่ได้ใส่ลูกแทนให้

3 จำนวนทั้งหมด = มีชีวิต + resorbed implantation sites

แผ่นภาพที่ 1

section ของต่อมน้ำนม แสดงผลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ฉีดด้วย vehicle control กับกลุ่มที่ฉีดด้วยยาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ marsilid, L-dopa, serotonin, และ melatonin. X320. Eosin & Haematoxylin

<u>รูปที่ 1.1</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนม จากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนมในวัน L_{16} จากกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย vehicle ของ L-dopa เข้าช่องท้อง วันละ 0.1 มิลลิลิตร ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่าประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่และเต็มไปด้วย secretion อยู่ภายใน

<u>รูปที่ 1.2</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนม จากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนม ในวัน L_{16} จากกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย vehicle ของ melatonin เข้าช่องท้อง วันละ 0.1 มิลลิลิตร ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่าประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่ และเต็มไปด้วย secretion อยู่ภายใน

<u>รูปที่ 1.3</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนม จากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนม ในวัน L_{16} จากกลุ่มที่ฉีดด้วย marsilid เข้าทางช่องท้อง เพียงครั้งเดียว 25 มิลลิลิตร ในวัน L_1 พบว่า ประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดเล็กกว่า control และมี secretion อยู่พอสมควร

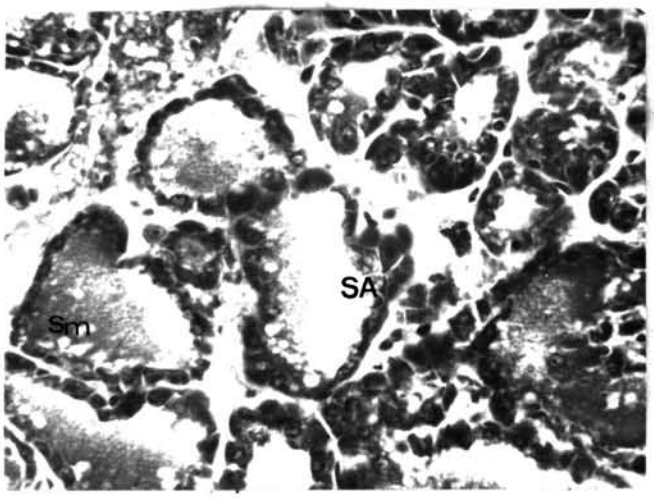
<u>รูปที่ 1.4</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนมจากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนม ในวัน L_{16} จากกลุ่มที่ฉีดด้วย L-dopa เข้าช่องท้อง วันละ 5 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่ และมี secretion มาก ไม่ต่างจาก control

<u>รูปที่ 1.5</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนม จากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนม ในวัน L_{16} จากกลุ่มที่ฉีดด้วย serotonin เข้าช่องท้อง วันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ control และมี secretion อยู่ภายในพอสมควร

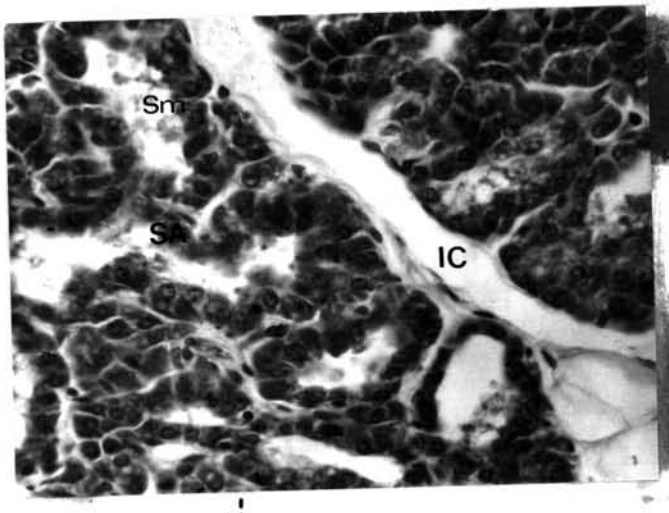
<u>รูปที่ 1.6</u> ตัวอย่างโครงร่างภายในของต่อมน้ำนม จากหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ขณะมีลูกอ่อนดูดนม ในวัน L_{16} จากกลุ่มที่ฉีดด้วย melatonin เข้าช่องท้อง วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1-L_5 พบว่า ประกอบด้วย alveoli ที่มีขนาดใหญ่มาก แต่มี secretion ภายในน้อยกว่า control

<u>คำอธิบายอักษรย่อ</u> SA = secreting alveoli ; Sm = secretory material
IC = interlobular connective tissue

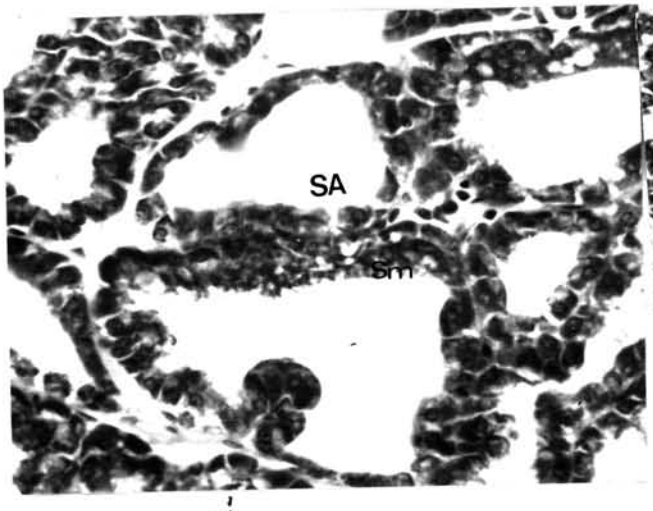
แผ่นภาพที่ 1



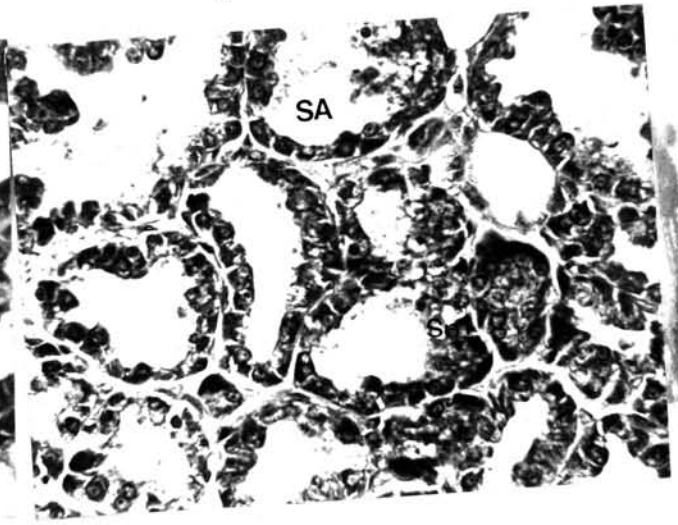
รูปที่ 1.1



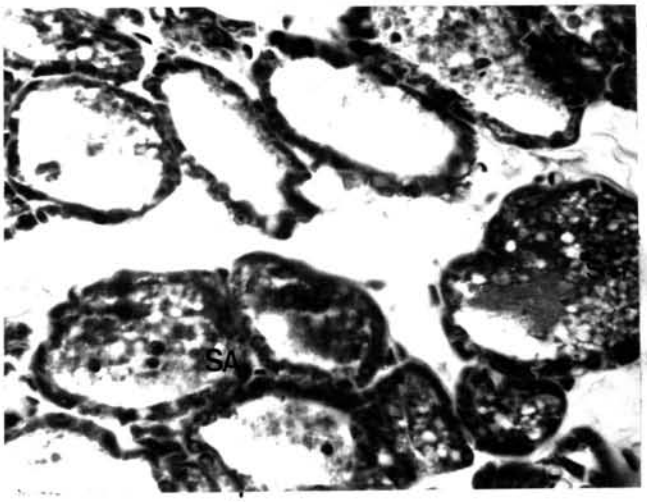
รูปที่ 1.2



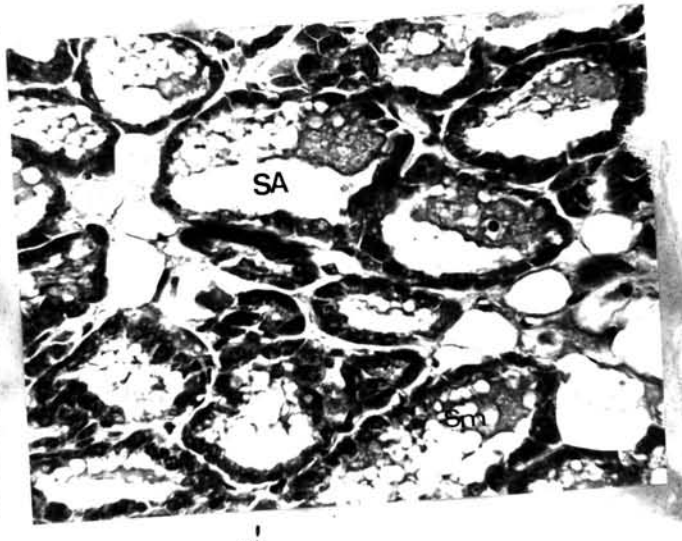
รูปที่ 1.3



รูปที่ 1.4



รูปที่ 1.5



รูปที่ 1.6

แผ่นภาพที่ 2

รังไข่ตัดตามขวาง แสดงผลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ฉีดด้วย marsilid, L-dopa, melatonin, marplan และ serotonin ตามลำดับ X32. Eosin & Haematoxylin

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย vehicle ของ L-dopa เขาชองทองวันละ 0.1 มิลลิลิตร ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่ามี corpora lutea ที่มีขนาดใหญ่ และ active แสดงว่า ในขณะนั้นมี progesterone หลั่งออกมาในระดับสูง และ growing follicles ขนาดต่าง ๆ แต่ไม่พบว่าเจริญถึงขั้น preovutatory stage

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย vehicle ของ melatonin เขาชองทองวันละ 0.1 มิลลิลิตร ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งหลังสุด มีขนาดใหญ่และ active แสดงว่าในขณะนั้นมี progesterone ถูกหลั่งออกมาในระดับสูง และมี growing follicles ที่มี antrum ขนาดใหญ่

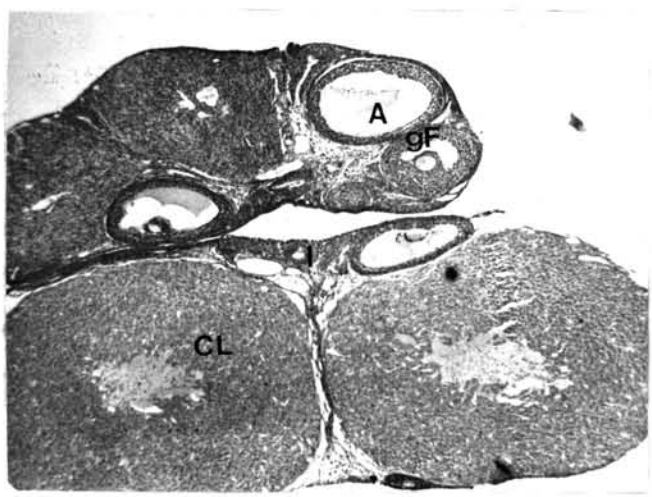
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนมจากกลุ่มที่ฉีดด้วย marsilid เขาชองทองเพียงครั้งเดียว 25 มิลลิกรัม ในวัน L_3 พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea, follicles ที่กำลังเติบโต และ follicles ที่มี antrum ขนาดใหญ่

รูปที่ 2.4 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่มที่ฉีดด้วย L-dopa เขาชองทอง วันละ 10 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า corpora lutea มีขนาดใหญ่, follicles ที่กำลังเติบโต และ follicles ที่มี antrum ใหญ่

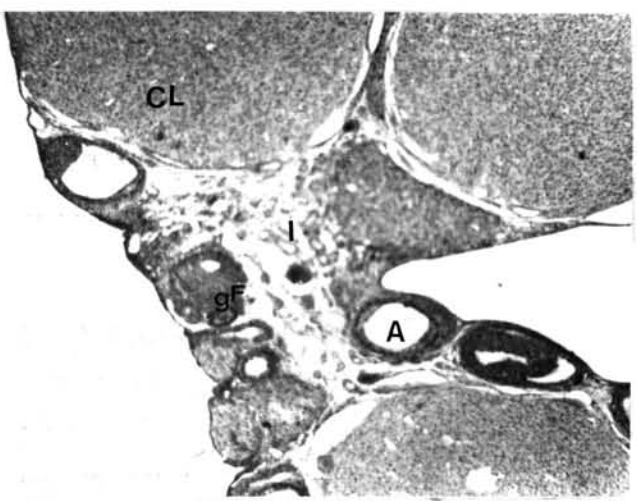
คำอธิบายอักษรย่อ

CL = Corpora lutea
gF = Growing follicles
I = Interstitial tissue
A = Antrum

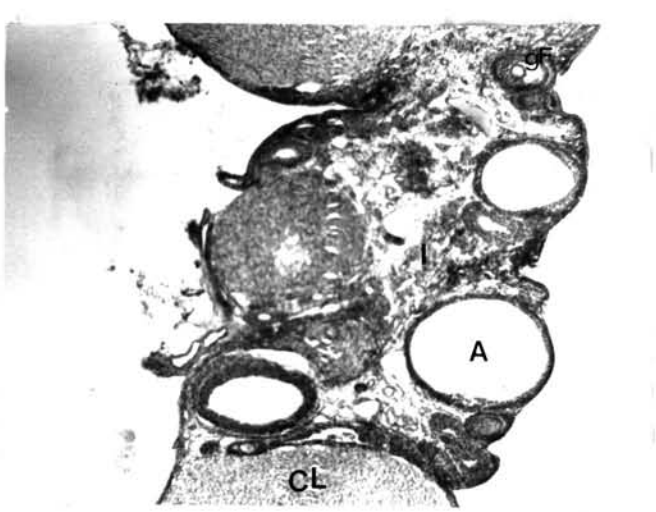
แผ่นภาพที่ 2



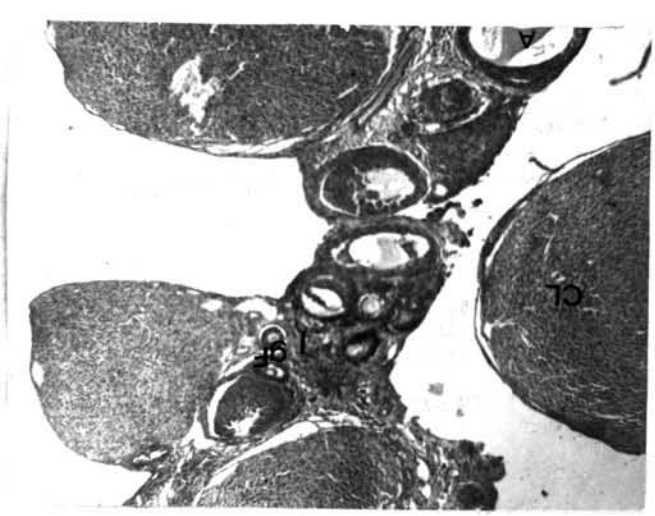
รูปที่ 2.1



รูปที่ 2.2



รูปที่ 2.3



รูปที่ 2.4

แผ่นภาพที่ 3

รังไข่ตัดตามขวาง แสดงผลเปรียบเทียบระหว่าง melatonin 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1- L_5, melatonin200 ไมโครกรัม ในวัน L_1-L_5, marplan 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1-L_5 และ serotonin 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 -L_5 รูปที่ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 X 32. รูปที่ 3.2 X 320. Eosin & Haematoxylin

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่มที่ฉีดด้วย melatonin เข้าช่องท้อง วันละ 100 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea ที่มีขนาดใหญ่ และ active และพบ small follicles มากมาย

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่มที่ฉีดด้วย melatonin เข้าช่องท้อง วันละ 200 ไมโครกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า corpora lutea ยังคง active และ follicles ที่มี antrum ใหญ่

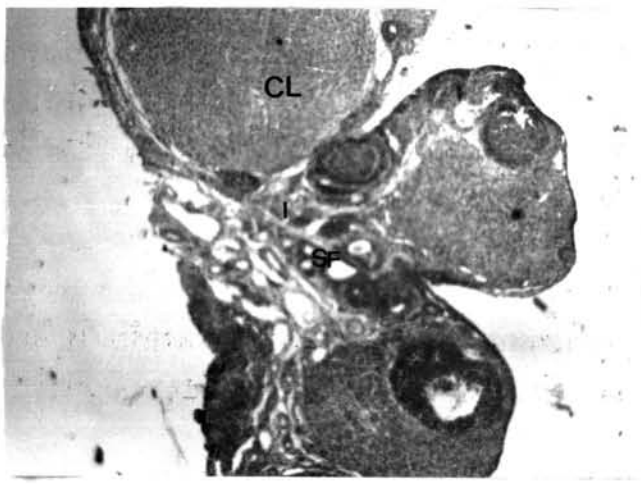
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่มที่ฉีดด้วย marplan เข้าช่องท้องวันละ 2 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea ที่ active เป็นส่วนใหญ่ และgrowing follicles ที่กำลังเติบโต ขนาดต่าง ๆ จนถึงที่มี antrum ใหญ่ แต่ไม่พบว่ามีการเจริญเติบโตไกลถึงขั้น preovulatory stage

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะโครงร่างของรังไข่หนูขาวที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน ขณะที่มีลูกอ่อนดูดนม จากกลุ่มที่ฉีดด้วย serotonin เข้าช่องท้อง วันละ 1 มิลลิกรัม ในวัน L_1 ถึง L_5 พบว่า ประกอบด้วย corpora lutea ที่ active, มีขนาดใหญ่ และพบ small follicles มาก

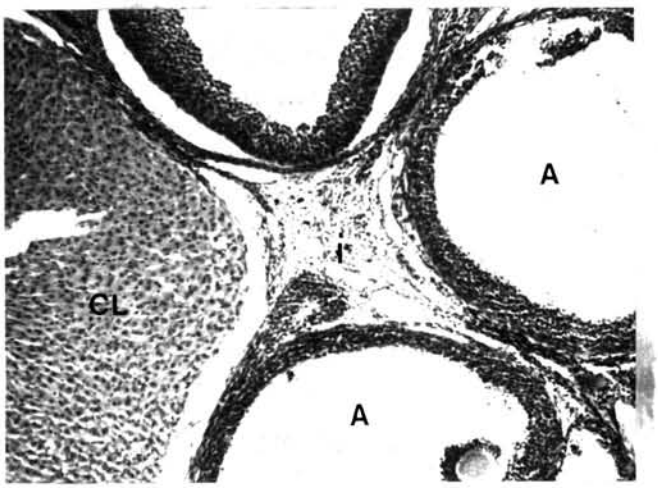
คำอธิบายอักษรย่อ

CL = Corpora lutea
SF = Small follicles
gF = Growing follicle
I = Interstitial tissue
A = Antrum

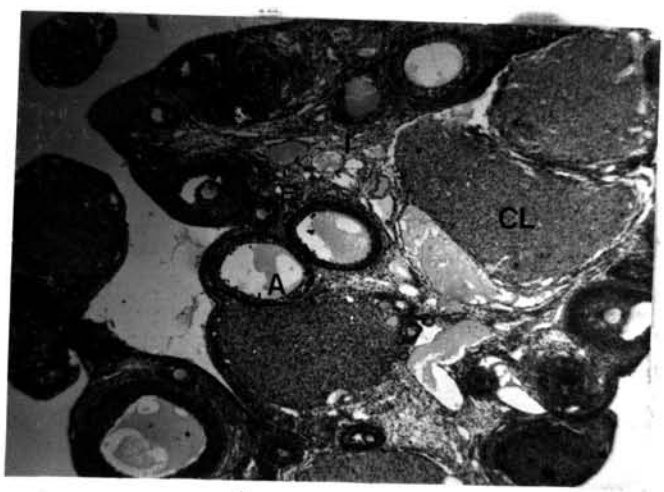
แผ่นภาพที่ 3



รูปที่ 3.1



รูปที่ 3.2



รูปที่ 3.3

รูปที่ 3.4