

บทบาทของพล পেটอนินทรีย์ในของเหลวจากโพรงมคลูกหนูที่ไลหวงคุมกำเนิด



นางสาว กมลทิพย์ ปลื้มมนัส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
006756
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2524

ROLE OF INORGANIC PHOSPHATE IN RAT INTRA-UTERINE FLUID
WITH INTRA-UTERINE DEVICE



Miss Kamolthip Phlummanus

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1981

หัวข้อวิทยานิพนธ์ บทบาทของพอส เพตอไนทรีย์ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วง
 คูกำเน็ค
 ชื่อนิสิต นางสาวกมลทิพย์ ปลื้มมนัส
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. จริยา บุญอุวัจน์
 ภาควิชา ชีวเคมี
 ปีการศึกษา 2523



บทคัดย่อ

การศึกษารอบบาทของพอส เพตอไนทรีย์ที่พบว่าเพิ่มมากขึ้น (15 เท่า) ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงคูกำเน็ค (IUD) ชนิด silk thread ทำโดยฉีด 40 ไมโครกรัม พอส เพตอไนทรีย์ เข้ามดลูกข้างขวาของแม่หนูที่ตั้งครรภ์ระยะเวลาต่าง ๆ และฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกข้างควบคุมปริมาณเท่ากัน เข้ามดลูกข้างซ้ายของแม่หนูตัวเดียวกันเพื่อเป็น control ปรากฏว่าพอส เพตอไนทรีย์ให้ผลในการต้านความสมบูรณ์พันธุ์รุนแรงที่สุดเมื่อฉีดในแม่หนูที่ตั้งครรภ์วันที่ 5 เนื่องจากจำนวนตัวอ่อนปกติในมดลูกทั้งสองข้างลดลงเป็นศูนย์ และพบตัวอ่อนขนาดเล็กผิดปกติและก้อนเลือดในมดลูกทั้งสองข้าง พอส เพตอไนทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 20-60 ไมโครกรัม/มดลูก ให้ผลเหมือนกัน การฉีดน้ำเกลือหรือของเหลวจากโพรงมดลูกควบคุมแทนที่พอส เพตอไนทรีย์ในแม่หนูที่ตั้งครรภ์วันที่ 5 ไม่ยับยั้งการฝังตัวและพัฒนาการของตัวอ่อนปกติโดยสมบูรณ์ เช่น การฉีดพอส เพตอไนทรีย์ แต่ทำให้จำนวนตัวอ่อนปกติลดลงกว่าเมื่อไม่ได้ฉีดอะไรเลย การผสมพอส เพตองในของเหลวจากโพรงมดลูกควบคุมก่อนฉีด เข้ามดลูกข้างขวาของแม่หนูที่ตั้งครรภ์วันที่ 5 จะให้ผลต้านความสมบูรณ์พันธุ์รุนแรงกว่าการฉีดพอส เพตอไนทรีย์ร่วมกับการฉีดของเหลวจากโพรงมดลูกควบคุมหรือน้ำเกลือ เข้าในมดลูกข้างซ้าย

การศึกษาโดยใช้พอส เพตอไนทรีย์ที่ติดฉลากพอสพอร์ด-32 ($^{32}\text{P-P}_i$) ฉีดเข้าร่างกายหนูทดลอง ปรากฏว่า $^{32}\text{P-P}_i$ ที่ฉีดเข้าไปในโพรงมดลูกข้างขวาถูกเคลื่อนย้าย

เข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นกล้ามเนื้อของมดลูกข้างขวาและซ้ายสูงสุดภายในเวลา 10 นาที และคงอยู่ในส่วนมดลูกนี้ค่อนข้างคงที่ จนถึง 4 วัน ภายหลังจากฉีด

เมื่อศึกษาการจับตัวระหว่าง $^{32}\text{P-P}_i$ กับของเหลวจากโพรงมดลูกทั้งข้างควบคุมและข้างใส่ห่วงและกับ BSA โดยผสม $^{32}\text{P-P}_i$ กับสารที่ละชนิด บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 0-2 ชม. แล้วแยกของผสมนั้นบนคอลัมน์ Sephadex G-25 ผลการทดลองแสดงว่า $^{32}\text{P-P}_i$ ถูกจับโดยเฉพาะกับมโหรีเลกุลขนาดประมาณ 5,000 คาลตัน ที่อยู่ในโพรงมดลูกทั้งข้างควบคุมและข้างที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดแต่ไม่ถูกจับโดย BSA การจับตัวระหว่าง $^{32}\text{P-P}_i$ กับมโหรีเลกุลตัวนี้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม และไม่ถูกยับยั้งสิ้นเชิงเมื่อทำให้ร้อน 100°C เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ $^{32}\text{P-P}_i$ ที่ถูกจับไว้แล้วสามารถถูกแลกเปลี่ยนโดยฟอสเฟตอินทรีย์ปราศจากรังสีในบีฟเพอร์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 เท่าได้ การใช้ฟอสเฟตอินทรีย์ปราศจากรังสีใส่ลงไปก่อนตามด้วย $^{32}\text{P-P}_i$ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เมื่อนำแฟรคชันจากคอลัมน์ Sephadex G-25 ที่แสดงปริมาณรังสีสูงมาแยกศึกษาโดยวิธี เอล-ดี-เอล โพลีอะครีลาไมด์ เจลอีเลคโตรโฟรีซิสให้ผลสนับสนุนว่า การจับตัวระหว่าง $^{32}\text{P-P}_i$ กับโปรตีนในของเหลวจากโพรงมดลูกนั้นไม่ใช่เนื่องจากปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้อาจตั้งสมมติฐานได้ว่า การใส่ห่วงคุมกำเนิดในมดลูก ทำให้มีการสะสมของฟอสเฟตอินทรีย์ และโปรตีนบางชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 คาลตัน การจับตัวระหว่างฟอสเฟตอินทรีย์กับโปรตีนนี้มีลักษณะจำเพาะและไม่ใช้พันธะโควาเลนต์ ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนที่มีผลต้านความสมบูรณ์พันธุ์ โดยน่าจะเข้าไปกระทำต่อเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก เป็นผลให้การฝังตัวและพัฒนาการของตัวอ่อนล้มเหลว

Thesis Title Role of Inorganic phosphate in Rat Intra-uterine
 Fluid with Intra-uterine Device

Name Miss Kamolthip Phlummanus

Thesis Advisor Assistant Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1980



ABSTRACT

In order to study the role of inorganic phosphate (P_i), increased tremendously (15 fold) in the uterine fluid of the rats inserted with a silk thread intra-uterine device (IUD), 40 ug P_i was injected into the right uterus of recipient pregnant rats, while control uterine fluid was injected in the left uterus serving as control in the same rat. P_i injection resulted in the most drastic antifertility effect when injected on day 5 of pregnancy, by diminishing the number of normal fetuses to nil in both uteri, and causing instead the presence of abnormally small fetuses and clotting materials. Variation of P_i content from 20-60 ug/uterine horn showed similar effect. Replacement of P_i injection on day 5 with the same volume of normal saline or control fluid allowed implantation and development of normal fetuses to occur, although the number of normal fetus was lower than without injection. The antifertility effect of P_i injected into the right uterus of the recipient rats on day 5 of pregnancy was most intensified when premixed with control uterine fluid, or with subsequent

injection into the left horn, comparing to injection of merely control fluid or physiological saline.

A study with $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ in vivo demonstrated that $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ injected intraluminally into the right uterus of day 5 pregnant rat was translocated maximally into the muscular tissue of both uteri within 10 min and retained there at a rather constant level upto 4 days after injection.

The binding study of $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ with either control or IUD fluid and BSA at 37°C , 0-2 hr followed by separation on Sephadex G-25 column showed that, $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ specifically bound to some macromolecular components with the M.W. about 5,000 daltons present in both control and IUD fluid, but did not bind with BSA. This binding was increased with the incubation time and was not completely inhibited by heating the mixture at 100°C for 10 min. Bound $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ could be exchanged with cold P_i and vice versa.

The SDS gel electrophoresis experiment of pooled ^{32}P -labelled fractions from Sephadex G-25 column also confirmed that the binding of $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ with the protein component in uterine fluid was not occurred by phosphorylation.

From all these results, it was postulated that the presence of IUD caused the accumulation of P_i and some proteins of rather low molecular weight, about 5,000 daltons. Specific noncovalent binding between P_i and this protein fraction could mediate the antifertility effect of the IUD by interacting with the smooth muscle of the uterus to result in failure of implantation and normal development of the fetuses.



ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her deepest gratitude to Dr. Jariya Boonjawat for her keen supervision and heartily guidance during the course of this investigation and particularly in the preparation of this thesis.

Her deep appreciation is also expressed to Assistant Professor Sunsern Suptosok, Dr. Peerada Sirijintakarn and Dr. Prokong Tangpraprutigul for serving as thesis committees.

She is indebted to the Faculty of Science, and the Graduate School, Chulalongkorn University for funding supports, and to the Department of Biochemistry for providing of the facilities.

The author wishes to acknowledge Mr. Chumras Sapsamarnwong and Miss Wilai Yaovapolkul for their great help during this study and thank to other members of the Department of Biochemistry for assistance at various times in the course of this research.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	ii
ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENT	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	4
MATERIALS	4
METHODS	6
III. RESULTS	13
1. Total protein and inorganic phosphate in the uterine fluid	13
2. Number of normal fetuses observed in control pregnant rats	13
3. Bioassay for the contraceptive activity of inorganic phosphate	13
3.1 Effect of P_i injected on various days of pregnancy	16
3.2 Effect of P_i at different concentrations in combination with control fluid	18



3.3	Effect of P_i at different concentrations in combination with normal saline	20
3.4	Effect of injection on day critical	20
4.	Translocation of $^{32}P-P_i$ <u>in vivo</u>	23
5.	Binding of $^{32}P-P_i$ with uterine fluid <u>in vitro</u>	23
5.1	Gel filtration profile of sole $^{32}P-P_i$ and uterine fluid	28
5.2	Binding of $^{32}P-P_i$ at various times of incubation	28
5.3	Replacement of uterine fluid with BSA	30
5.4	Chasing with cold P_i	30
5.5	SDS-gel electrophoresis	30
IV.	DISCUSSION	35
	REFERENCES	42
	BIOGRAPHY	46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Concentration of total protein and inorganic phosphate in the uterine fluid	14
2. Number of fetuses in control pregnant rats (day 15 of pregnancy)	15



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Insertion of Intra-uterine device	7
2. Difference sizes of normal fetus, abnormal fetus, and clotting material	9
3. Effect of 40 ug P_i injected on various days of pregnancy	17
4. Effect of P_i at different concentrations in combination with control fluid	19
5. Effect of P_i at different concentrations in combination with normal saline	21
6. Effect of injection on day critical	22
7. Long term study on the distribution of $^{32}P-P_i$ injected into the right uterus	25
8. Short term study on the distribution of $^{32}P-P_i$ injected into the right uterus	26
9. The kinetics of $^{32}P-P_i$ translocation <u>in vivo</u> ---	27
10. The gel filtration profiles of $^{32}P-P_i$ and uterine fluid <u>in vitro</u>	29
11. The gel filtration profiles of $^{32}P-P_i$ and BSA ---	31
12. Exchange of P_i bound to the component in uterine fluid	32
13. The SDS-gel electrophoretic profiles of the ^{32}P - associated fractions eluted from Sephadex G-25 column	34

ABBREVIATIONS

B	Blue dextran 2000
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclic phosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
IUD	Intra-uterine device
K	Potassium chromate
MBq	Megabecquerel (1 MBq = 27.027 μ Ci)
P _i	Inorganic phosphate
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Sodium lauryl sulphate)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย