บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเลี้ยงหนูและแฮมสเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง

หนูทดลองที่นำมาใช้เป็นหนูขาวตัวเมียพันธุ์ Wistar ส่วนแฮมสเตอร์เป็นแฮมสเตอร์ชนิด Golden hamster ที่เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย หนูและแฮมสเตอร์ทุกตัวที่ใช้ในการทดลองเลือกใช้เฉพาะตัวเมียซึ่งยังไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อน (virgin) เลี้ยงในห้องปรับอากาศ มีอุณหภูมิประมาณ 25 – 26° C ในแต่ละวันควบคุมให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 06.00 น. – 20.00 น.) ควบคุมด้วยสวิตช์อัตโนมัติ เลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานสำเร็จรูปซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท F.E. Zuellig (Gold Coil Mills)คั่มน้ำประปาธรรมดา หนูที่ใช้ทดลองโตเต็มที่ อายุ 55 วันขึ้นไป มีน้ำหนักประมาณ 150 กรัม ทุกตัวจะต้องทดสอบแล้วว่ามีวงสืบพันธุ์ (oestrous cycle) เป็นปกติ (4 – 5 วัน) ส่วนแฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลองเค็บโตเต็มที่มีอายุ 5 – 9 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 100 กรัม ตรวจสอบว่ามีวงสืบพันธุ์ปกติ

หนูและแฮมสเตอร์ที่นำมาทดลองฉีดสาร Oestradiol benzoate จะแยกเลี้ยงในกรงพิเศษต่างหาก ไม่ให้ปะปนกับหนูและแฮมสเตอร์ปกติ เพื่อป้องกันมิให้เกิด contamination ของ oestrogen และ product พวก derivative ของ oestrogen กับหนูและแฮมสเตอร์ปกติอื่น ๆ

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ (oestrous cycle)ของสัตว์ทดลอง

2.1 การตรวจวงสืบพันธุ์ของหนู

นำหนูที่ใช้ในการทดลองมาทำการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวัน นับจากวันที่vagina เปิด ตรวจโดยใช้แท่งแก้วปลายมนแบนจุ่มน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) smear ที่เยื่อบุภายในของ vagina นำมาป้ายบนไสลด์ ตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทัศน์ ลักษณะเซลล์ที่ปรากฏจะใช้กำหนดแบ่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ (Long and Evans, 1922) วงสืบพันธุ์ของหนูขาว (rat) แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ

2.1.1 Diestrus ระยะนานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาครึ่งหนึ่งของ cycle (2 วัน) ระยะนี้รังไข่ไม่สร้างฮอร์โมน oestrogen ภายในรังไข่ประกอบด้วย non functional corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งหลังสุด มดลูกมีขนาดเล็ก และ vagina มี epithelium บาง พบเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocyte) มากปน ด้วย epithelium บ้างเล็กน้อย

2.1.2 Proestrus ระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ กินเวลา 12 ชั่วโมง ในระยะนี้ follicle จะเจริญเติบโตขึ้น (preovulatory swelling) และสร้าง ฮอร์โมน oestrogen จำนวนมาก เป็นผลให้มดลูกพองน้ำ (edema) มีเส้นเลือดมา หล่อเลี้ยงมาก (Hyperemia) ที่ vagina จะเกิดการหนาตัวของเซลล์ epithelium (stratification of vaginal epithelial cells) พบเซลล์รูปร่างกลม ภายใน เห็นนิวเคลียสชัดเจน เรียกว่า nucleated cell ในตอนปลายระยะนี้หนูจะมี heat ยินยอมให้ตัวผู้ผสมในเวลาใกล้เคียงกับที่จะตกไข่

2.1.3 Estrus ระยะต่อจาก proestrus จะมีฮอร์โมน oestrogen ระดับสูงแล้วมีการตกไข่ ตอมาระดับของ oestrogen จะลดลง มดลูกมีการเสียน้ำและ ขนาดเล็กลง เซลล์บุผิวช่องคลอดยังคงหนาและเกิด cornification และชั้นนอก ๆ จะหลุดเข้ามาสู่ lumen ของ vagina มีชื่อว่า cornified cell รูปร่างหลายเหลี่ยม, แบน, นิวเคลียส degenerate ระยะนี้กินเวลา 30 ชั่วโมง

2.1.4 Metaestrus ระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นภายหลังการตกไข่ กินเวลา ประมาณ 6 ชั่วโมง ระดับฮอร์โมน oestrogen จะลดต่ำมาก เซลล์บุผิว vagina จะมี leucocytes ปนกับ cornified cell.

2.2 การตรวจวงสืบพันธุ์ของแอมสเตอร์

น้ำแอมสเตอร์ที่ใช้ในการทดลองมาทำการตรวจวงสืบพันธุ์ ภายหลังจาก วันที่ vagina เปิด ตรวจโดยใช้แท่งแก้วปลายมนจุ่มน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) smear เยื่อบุภายในของ vagina นำมาป้ายบนสไลด์ตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทัศน์ ลักษณะ เซลล์ที่ปรากฏจะใช้กำหนดแน่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ของแอมสเตอร์ ซึ่งมีวงสืบพันธุ์

ครบทุก 4 วัน (Ward, 1946., Orsini, 1961) วงสืบพันธุ์ของแฮมสเตอร์แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ

2.2.1 Proestrus (Day.1) vaginal smear มีลักษณะเป็นน้ำเมือกใส ๆ ค่อนข้างเหนียว เซลล์เยื่อบุภายในของ vagina จะมีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยม ชนิด non nucleated epithelial cells มีขนาดใหญ่และเป็นแผ่นบาง ปะปนด้วยเซลล์รูปร่างกลม ภายในเห็นนิวเคลียสชัดเจน ชนิด nucleated epithelial cells จำนวนเล็กน้อย และไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาว leucocytes ระยะนี้กินเวลา 1 วัน

2.2.2 Estrus (Day.2) vaginal smear มีลักษณะเป็นเมือก สีขาวขุ่นข้นและเหนียว คิดที่ปลายแท่งแก้ว เรียกชื่อว่า post estrous discharge (Orsini, 1961) ถูกขับออกมาจาก vaginal lips ภายหลังจากที่แฮมสเตอร์ตัวเมียมี heat และกำลังตกไข่ เซลล์เยื่อบุ vagina มีลักษณะเป็นเซลล์ที่ภายในเห็นนิวเคลียสชัดเจน nucleated epithelial cells มีรูปร่างหลายแบบ คือ สี่เหลี่ยมสูง (columna), รูปยาวรี, รูปกลม และมีเซลล์ชนิด non nucleated epithelial cells ปะปนน้อยมาก ระยะนี้กินเวลา 1 วัน

2.2.3 Metestrus A. (Day.3) vaginal smear มีลักษณะเป็นน้ำใส ในตอนต้นของระยะนี้จะพบ Waxy plug (white vaginal discharge) เซลล์เยื่อบุ vagina มีลักษณะเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว leucocytes และมีเซลล์เยื่อบุ ชนิด oval-epithelial cells ปะปนอยู่เล็กน้อย ระยะนี้กินเวลา 1 วัน

2.2.4 Metestrus B. (Day.4) vaginal smear มีลักษณะเป็นน้ำใส คล้ายระยะ Metestrus A. เซลล์เยื่อบุ vagina มีลักษณะเป็นเซลล์ปะปนกันทั้ง nucleated และ non nucleated epithelial cells และเซลล์เม็ดเลือด leucocytes จะลดจำนวนลง ระยะนี้กินเวลา 1 วัน

3. การตั้งครรภ์ (Pregnancy)

3.1 การตั้งครรภ์ของหนู

ช่วงหนูตัวเมียซึ่งมีวงสืบพันธุ์ ระยะ Proestrus ไว้กับหนูตัวผู้ทั้งคืน

(ตัวผู้ 1 ตัว ต่อ ตัวเมีย 1 – 2 ตัว) เช้าวันรุ่งขึ้นแยกตัวผู้ออก ตรวจ vaginal smear ดู spermatozoa หรือดูจาก sperm plug ที่ช่องเปิดของ vagina ว่ามีหรือไม่ ถ้าหากพบ spermatozoa ก็เริ่มนับจากวันที่พบเป็นวันที่ศูนย์ของการตั้งครรภ์ (L_0) และนับวันต่อ ๆ ไปเป็น L_1, L_2, L_3, ... ตามลำดับ

3.2 การตั้งครรภ์ของแฮมสเตอร์

ขังแฮมสเตอร์ตัวเมีย (ซึ่งอยู่ในระยะวันที่ 4 ภายหลังจากวันที่มี Post estrous discharge) ระยะ estrus ไว้กับแฮมสเตอร์ตัวผู้ทั้งคืน (ตัวผู้ 1 ตัว ต่อ ตัวเมีย 2 – 3 ตัว) เช้าวันรุ่งขึ้นแยกตัวผู้ออก ทำการตรวจ spermatozoa เช่นกันเหมือนหนู นับวันการตั้งครรภ์ในแบบเดียวกัน

4. การผ่าตัดรังไข่ (Ovariectomy)

การผ่าตัดกระทำในขณะที่สัตว์ถูกให้คมยาสลบ (ether) เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (2.5 % Dettol) ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อบริเวณด้านข้างของลำตัวเยื้องไปทางด้านบน (dorso - lateral) ตรงระดับล่างของกระดูกที่ชี่โครงให้เปิดเป็นช่องกว้าง ประมาณ 2 ซ.ม. ทาน้ำยา dettol บริเวณหนังและขนบริเวณรอบช่องที่เปิด ใช้ปากคีบดึงเยื่อไขมันที่ติดอยู่กับรังไข่ขึ้นมาแล้วรังไข่จะติดขึ้นมาด้วย สอดปลายข้างหนึ่งของกรรไกรปลายโค้งขนาดเล็กตะลุเยื่อไขมันตรงบริเวณใกล้ท่อนำไข่ ตัดตรงรอยต่อระหว่างรังไข่กับส่วนต้นของท่อนำไข่ให้ขาดจากกัน ตัดรังไข่พร้อมทั้งเยื่อไขมันรอบ ๆ ออก ใช้ปากคีบเล็กเก็บส่วนอื่น ๆ กลับเข้าในช่องท้องตามเดิม ใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อ ชั้นต่าง ๆ ให้ติดกัน แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอก ในกรณีที่ทำการผ่าตัดรังไข่แล้วจะฆ่าดูผลในวันรุ่งขึ้น ใช้ clip โลหะ เย็บหนังให้ติดกัน

5. วิธีการฆ่า (Autopsy)

ใช้วิธีดึงคอต่อให้หลุดออกจากกัน ใช้มือขวาจับบริเวณคอต่อให้แน่น มือซ้ายจับตางออกแรงดึงคอต่อ ให้สมองและประสาทสันหลังหลุดออกจากกัน จะตายทันที แล้วใช้กรรไกรปลายตรงเปิดหน้าท้องตรวจดูลักษณะการฝังตัวของตัวอ่อน, นับจำนวน

implantation sites ทั้งมดลูกปีกขวา, ซ้าย วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง blastocyst วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมดลูกส่วนปกติ (ไม่มีการฝังตัว) ดูบริเวณเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยง, ดูบริเวณเยื่อไขมัน ตัดมดลูกเล็มเยื่อไขมันออก แบ่งปีกซ้ายออกเป็นส่วน ๆ นำส่วนหนึ่งมาศึกษาทาง Histochemistry อีกส่วนหนึ่งนำมาศึกษาลักษณะทาง Histology ของผนังมดลูกในสภาวะก่อนที่จะมีการฝังตัว และภายหลังจากที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน นำปีกขวาทั้งปีกมาบดทำ tissue homogenate ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทางชีวเคมี.

6. วิธีการวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical Analysis)

นำเอามดลูกปีกขวาทั้งหมดมาชั่งน้ำหนักเปียก ซึ่งจะอยู่ในจำนวนประมาณ0.1–0.3 g. แล้วนำมาใส่โกร่ง (mortar) บดกับทรายละเอียดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 1 mg. ละลายด้วย 0.25 Molar Sucrose ในอัตราส่วน 0.1 g./ 1 ml. หรือ 10 % Tissue homogenate แล้วนำไปทำการทดลองต่าง ๆ ดังนี้

6.1 การวัด activity ของ succinic dehydrogenase (Kun and Abood, 1949)

หลักการ

Incubate Tissue homogenate กับ Sodium succinate ปรับ pH ของ incubating medium ด้วย Phosphate buffer pH 7.4 ใช้ Trichlorophenyl Tetrazolium Chloride (TTC) เป็นตัวจับ electron จากผลของปฏิกริยาการย่อย (Pearse, 1961) และใช้เป็นเครื่องแสดงผลของปฏิกริยาด้วย โดย H^+ จากผลของปฏิกริยาจะไปเปลี่ยนสีของ oxidize form ของ TTC ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน ๆ ให้เกิดเป็นตะกอนสีแดงของ Formozan ซึ่งสะกัดออกมาวัดความเข้มของสีได้ โดยให้ละลายใน acetone วัดความเข้มของสีด้วย Spectrophotometer(Spectronic 20) ความยาวของคลื่นแสง = 485 mμ (visible light) เนื่องจากปฏิกริยาของ enzyme Succinic dehydrogenase ใน Tissue homogenate เกิดขึ้นไม่สูงมากจนเห็นได้ชัดเจน จึงต้องนำไปใส่ใน Thunberg tube และทำให้เป็นสูญญากาศ เพื่อป้องกันมิให้ oxygen ในอากาศไปแย่งรับ electron แทน TTC (Patinawin, 1967)

วิธีการทดลอง

นำ 1 ml. 10 % Tissue homogenate มา incubate กับ substrate medium ที่ประกอบด้วย 0.5 ml. 0.1 M. Phosphate buffer pH 7.4, 0.5 ml. Sodium succinate, 1 ml.0.1% TTC.(ซึ่งเตรียมทันทีก่อนใช้) นำไป incubate ใน waterbath อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที สกัดสีแดงของ Formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 7 ml. acetone เขย่าจนสีแดงอยู่ในชั้นของ acetone นำไป centrifuge นาน 15 นาที นำชั้นสารละลาย Formazan ใน acetone ไปวัดความเข้มข้นของสีแดงด้วย Spectrophotomater (Spectronic - 20)

6.2 การวัด activity ของ Adenosine Triphosphatase (Fiske and SubbaRow, 1925)

หลักการ

Incubate Tissue homogenate กับ Adenosine - 5 - Triphosphoric acid disodium dihydrogen salt (ATP) ปรับ pH ของ incubating medium ด้วย Tris-acetate buffer pH 7.2 ใช้ magnesium sulphate เป็น activator ของ enzyme หยุดปฏิกริยา hydrolysis ด้วย Trichloroacetic acid ซึ่งจะdenature โปรตีน ใช้ Molybdate agent จับ phosphate ionที่เกิดขึ้น กลายเป็น molybdophosphoric acid แล้ว reduce ด้วย Aminonaphtho sulfonic acid จะได้สารละลายสีน้ำเงินของ "molybdenum blue" (Vogel, 1969) วัดความเข้มของสีด้วย Spectrophotometer (Spectronic - 20) ความยาวคลื่นแสง = 715 mμ (infrared light)

วิธีการทดลอง

นำ substrate medium ที่ประกอบด้วย 0.3 ml. 0.02 M.ATP (disodium salt),1.5 ml.0.08 M.Tris-acetate buffer pH 7.2,0.3 ml.0.1 M. Magnesium sulphate อุ่นใน waterbath อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที เติม 0.6 ml.0.1% Tissue homogenate (1 mg/ml Tissue homogenate) incubate ต่ออีก 15 นาที หยุดปฏิกริยาด้วย 2.7 ml.10% TCA (Trichloroacetic acid) นำไป centrifuge

ด้วยความเร็ว 3,000 g. เป็นเวลา 30 นาที pipett ดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) 5 ml, เติม 1 ml. Molybdate agent, 0.4 ml. aminonaphtho sulfonic acid เขย่าและตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที สารละลายจะเกิดเป็นสีน้ำเงิน นำไปวัดความเข้มของสีด้วย Spectrophotometer (Spectronic - 20)

7. การทำ Cryostat section เพื่อศึกษา activity ของ Succinic dehydrogenase และ Adenosine triphosphatase ตามวิธี Histochemical analysis.

นำมดลูกปีกซ้ายที่ตัดออกเป็นช่วงสั้น ยาว 2 – 3 mm. หรือประมาณช่วงของหนึ่ง blastocyst นำมาทำให้เป็นจนแข็งที่อุณหภูมิ – 20 °C ทันทีหลังจากตัดจากตัวสัตว์โดยใช้เครื่อง Cryostat (IEC Model CTD) แล้วตัด section หนา 8 μ ติดบน cover glass ทำการทดลองตามวิธีต่อไปนี้

7.1 วิธีการศึกษา Histochemistry ของ Succinic dehydrogenase. NaChlas. et al, (1961)

หลักการ

นำ Frozen section ของมดลูกมา incubate ใน substrate medium ประกอบด้วย Sodium succinate เป็น substrate ของ enzyme อยู่ใน Phosphate buffer pH 7.6 และ Nitro blue tetrazolium salt (Nitro - BT) เป็น electron acceptor (Pearse, 1961) ในตอนต้น Nitro - BT ที่อยู่ในสภาพปกติของ Ditetrazolium salt จะไม่มีสี เมื่อถูกนำมาใช้เป็น electron acceptor จะเปลี่ยนสภาพมาอยู่ในรูป Diformazan จะเป็นผลึกสีน้ำเงิน

วิธีการทดลอง

นำ Frozen uterus ตัดด้วย Cryostat (IEC Model CTD) หนา 8 μ ติดบน cover glassนำมา incubate ใน substrate medium ที่ประกอบด้วย Buffer succinate เตรียมจาก (0.25 M. Phosphate buffer pH 7.6 ปริมาณเท่า ๆ กับ 0.25 M. Sodium succinate) 50 ml. รวมกับ 10 ml. aq. Nitro - Bt (1 mg/ml.)

incubate ใน waterbath อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ล้าง section ด้วย 0.87 % Saline และ fix tissue ด้วย 10 % Formal saline 10 นาที dehydrate ด้วย 15 % ethyl alcohol นาน 5 นาที นำ section บน cover glass มาติดบน slide โดยใช้ Glycerine jelly เป็น mounting media.

7.2 วิธีการศึกษา Histochemistry ของ Adenosine triphosphatase (Padykula and Herman, 1961)

หลักการ

นำ Frozen section ของมดลูกมา incubate ใน substrate medium ประกอบด้วย ATP (disodium salt) เป็น substrate ของ enzyme, Barbiturate buffer pH 9.4 และมี Calcium chloride เป็นactivator จะเกิดตะกอน Calcium phosphate ใช้โลหะ Cobolt จาก Coboltous chloride แทนที่ Calcium ion ใน Calcium phosphate นำ Cobolt phosphate มาทำปฏิกริยากับ Ammonium sulphide จะเกิดตะกอน Cobolt sulphide สีดำที่บริเวณที่มี enzyme ATPase ปรากฏอยู่เดิมบน tissue (Pearse, 1961)

วิธีการทดลอง

นำ Frozen uterus ตัดด้วย Cryostat (IEC Model CTD) หนา 8 μ นำมา incubate ใน substrate medium ประกอบด้วย 20 ml. 0.1 M. Sodium barbiturate; 10 ml. 0.18 M. Calcium chloride; 30 ml. Tridistilled water; 152 mg. ATP (disodium salt); ปรับ pH เป็น 9.4 โดยใช้ 0.1 M. NaOH เติมน้ำให้ครบ 100 ml. (เตรียมทันทีก่อนใช้) incubate ใน waterbath อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย 1 % Calcium chloride 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 % Coboltous chloride 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปทำปฏิกริยากับ Ammonium sulphide 5 วินาที โดยเอา section ไปวางบนที่ปากขวด เพื่อให้ไอระเหยของ Ammonium sulphide ขึ้นมาทำปฏิกริยากับ section แล้วนำมาล้างด้วยน้ำ จากนั้น dehydrate ด้วย alcohol clear ด้วย Xylene แล้ว mount ด้วย Caedex.

8. การทำ Paraffin section ของมดลูกเพื่อศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อ ดูสมรรถภาพของ nidation ในหนูและแฮมสเตอร์ท้องปกติ ระยะ Pre implantation (L_4) และ Early implantation (L_6).

นำมดลูกปีกซ้าย ขนาด 2–3 mm. มาแช่ในน้ำยา Kahles'F.A.A. นาน 24 ชั่วโมง ⟶ dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70 % alcohol 24 ชั่วโมง ⟶ 80 % alcohol 1 ชั่วโมง ⟶ 90 % alcohol 12 ชั่วโมง ⟶ 95 % alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 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 Paraffin wax ตัด serial section หนา 8 μ ย้อมสี Ehrlich's acid Haematoxylin และ 0.5 % alc. Eosin ⟶ dehydrate ด้วย alcohol ⟶ clear ด้วย Xylene ⟶ mount ใน caedex.

แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ ใช้หนูตัวเมียรวมทั้งสิ้น 100 ตัว และแฮมสเตอร์ตัวเมียรวมทั้งสิ้น 24 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น การศึกษาในระยะก่อนหน้าที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4) และระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6) แล้วแบ่งลงไปอีกเป็นหมู่ย่อย ๆ ดังนี้

1. <u>ศึกษาการทำงานของ เอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส และ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูก โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.</u>

1.1 <u>แบ่งการศึกษาย่อยลงเป็น 2 ระยะ</u> ทำการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดดังนี้

1.1.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4)

1.1.2 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในผนังมดลูกหนู ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

1.1.3 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

1.1.4 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4)

1.1.5 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนู ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

1.1.6 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

1.2 <u>แบ่งการทดลองในระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน และระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนL_6ออกเป็นหมู่เมื่อทดลองกับหนู</u> ดูจากตารางที่ 1

1.2.1 หมู่ใช้หนูท้องปกติ $L_1 - L_4$ ดูผลการทดลอง L_4

1.2.2 หมู่ใช้หนูท้องปกติ $L_1 - L_6$ ดูผลการทดลอง L_6

1.2.3 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_4

1.2.4 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_6

1.2.5 หมู่ใช้หนูท้องฉีด Stelazine L_1 - L_3 ดูผลการทดลอง L_4

1.2.6 หมู่ใช้หนูท้องฉีด Stelazine L_1 - L_3 ดูผลการทดลอง L_6

1.2.7 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_4

1.2.8 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_6

1.2.9 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone + oestradiol benzcate ดูผลการทดลอง L_4

1.2.10 หมู่ใช้หนูท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone + oestradiol benzcate ดูผลการทดลอง L_6

1.3 <u>แบ่งการทดลองในระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ออกเป็นหมู่เมื่อทดลองกับแอมสเตอร์</u> ดูตารางที่ 2

1.3.1 หมู่ใช้แอมสเตอร์ท้องปกติ L_1 – L_6 ดูผลการทดลอง L_6

1.3.2 หมู่ใช้แอมสเตอร์ท้อง L_3 – ตัดรังไข่ ดูผลการทดลอง L_6

1.3.3 หมู่ใช้แอมสเตอร์ท้อง ฉีด Stelazine L_1 - L_5 ดูผลการทดลอง L_6

1.3.4 หมู่ใช้แอมสเตอร์ท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone ดูผลการทดลอง L_6

1.3.5 หมู่ใช้แอมสเตอร์ท้อง L_3 – ตัดรังไข่ และฉีด progesterone + oestradiol benzoate ดูผลการทดลอง L_6

2. <u>ศึกษาการทำงานของ เอนไซม์ ซัคซินิลดีไฮโดรจิเนส และอดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูก โดยวิธีวิเคราะห์ทาง Histochemistry.</u>

วิธีการศึกษาทำเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาในข้อ 1 ใช้สัตว์ทดลองชุดเดียวกันกับการทดลองในข้อ 1 และแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นหมู่ ๆ เช่นเดียวกับ.

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการแบ่งหมู่การทดลองศึกษาการทำงานของเอนไซม์ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส และอคีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4) และระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

หมู่สัตว์ที่ใช้ทดลอง		ฮอร์โมนและยาคประสาทที่ใช้ทดลอง			วันที่ฆ่าดูผล
หมู่ที่	ทดลอง	Treatment	Dose mg/100g. bw.	Route	
1. หนู	ท้องปกติ L_1 - L_4	–	–	–	L_4
2. หนู	ตัดรังไข่ L_3	–	–	–	L_4
3. หนู	ฉีด Stelazine L_1-L_3	Stelazine	2.0	Subcutaneous	L_4
4. หนู	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_4
5. หนู	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone +	4.0	Intramuscular	L_4
		Oestradiol-benzoate	0.1µg/100g.bw.	Intramuscular	
1. หนู	ท้องปกติ L_1 - L_6	–	–	–	L_6
2. หนู	ตัดรังไข่ L_3	–	–	–	L_6
3. หนู	ฉีด Stelazine L_1-L_3	Stelazine	2.0	Subcutaneous	L_6
4. หนู	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_6
5. หนู	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone +	4.0	Intramuscular	L_6
		Oestradiol-benzoate	0.1µg/100gbw.	Intramuscular	

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการแบ่งหมู่การทดลองศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส และอดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

หมู่สัตว์ที่ใช้ทดลอง		ฮอร์โมนและยาที่ใช้ทดลอง			วันที่ฆ่าดูผล
หมู่ที่	ทดลอง	Treatment	Dose mg/100g bw.	Route	
1.แฮมสเตอร์	ท้องปกติ L_1 - L_6	–	–	–	L_6
2.แฮมสเตอร์	ตัดรังไข่ L_3	–	–	–	L_6
3.แฮมสเตอร์	ฉีด Stelazine L_1-L_5	Stelazine	2.0	Subcutaneous	L_6
4.แฮมสเตอร์	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone	4.0	Intramuscular	L_6
5.แฮมสเตอร์	ตัดรังไข่ L_3	Progesterone + Oestradiolbenzoate	4.0 0.1 µg/100 g. bw.	Intramuscular Intramuscular	L_6

3. ศึกษาลักษณะทาง Histology ของผนังมดลูก เพื่อดูสมรรถภาพของการฝังตัวของตัวอ่อนของหนูและแฮมสเตอร์

3.1 ศึกษาลักษณะผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_4)

3.1.1 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องปกติ ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน

3.1.2 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่และฉีด progesterone + oestrogen.

3.2 ศึกษาลักษณะผนังมดลูกหนูระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

3.2.1 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องปกติ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

3.2.2 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ L_3

3.2.3 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องและฉีด stelazine

3.2.4 ผนังมดลูกของตัวแทนหนูท้องตัดรังไข่ และฉีด progesterone

3.3 ศึกษาลักษณะผนังมดลูกของแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6)

3.3.1 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

3.3.2 ผนังมดลูกของตัวแทนแฮมสเตอร์ตัดรังไข่ L_3

ผลการทดลอง

ตารางที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในเนื้องมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการยังตัวของตัวอ่อน(L_4)โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

หนูหนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	จำนวน mg % Formazan										Mean ± S.E.	Range
	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	0.2859	0.4084	0.4702	0.4094	0.3631	0.3894	0.3349	0.2768	0.4039	0.3086	0.3651 ± 0.0197	0.1934
2. หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.2914	0.4720	0.2641	0.4094	0.5900	0.4402	0.5264	0.3948	0.3676	0.1189	0.3875 ± 0.0431	0.4711
3. หนูท้องฉีด Stelazine L_1 - L_3	0.2442	0.3631	0.3676	0.3676	0.2950	0.2496	0.3041	0.3485	0.2832	0.2133	0.3036 ± 0.0179	0.1543
4. หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone	0.4402	0.3041	0.2442	0.4402	0.2986	0.5283	0.2269	0.4266	0.4221	0.4221	0.3753 ± 0.0313	0.3014
5. หนูท้องตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone+Oestrogen	0.5083	0.4720	0.4366	0.4556	0.4702	0.3649	0.5255	0.6444	0.4910	0.2532	0.4622 ± 0.0322*	0.3912

* เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.05$)

อักษรย่ออธิบายกราฟ

C = Control

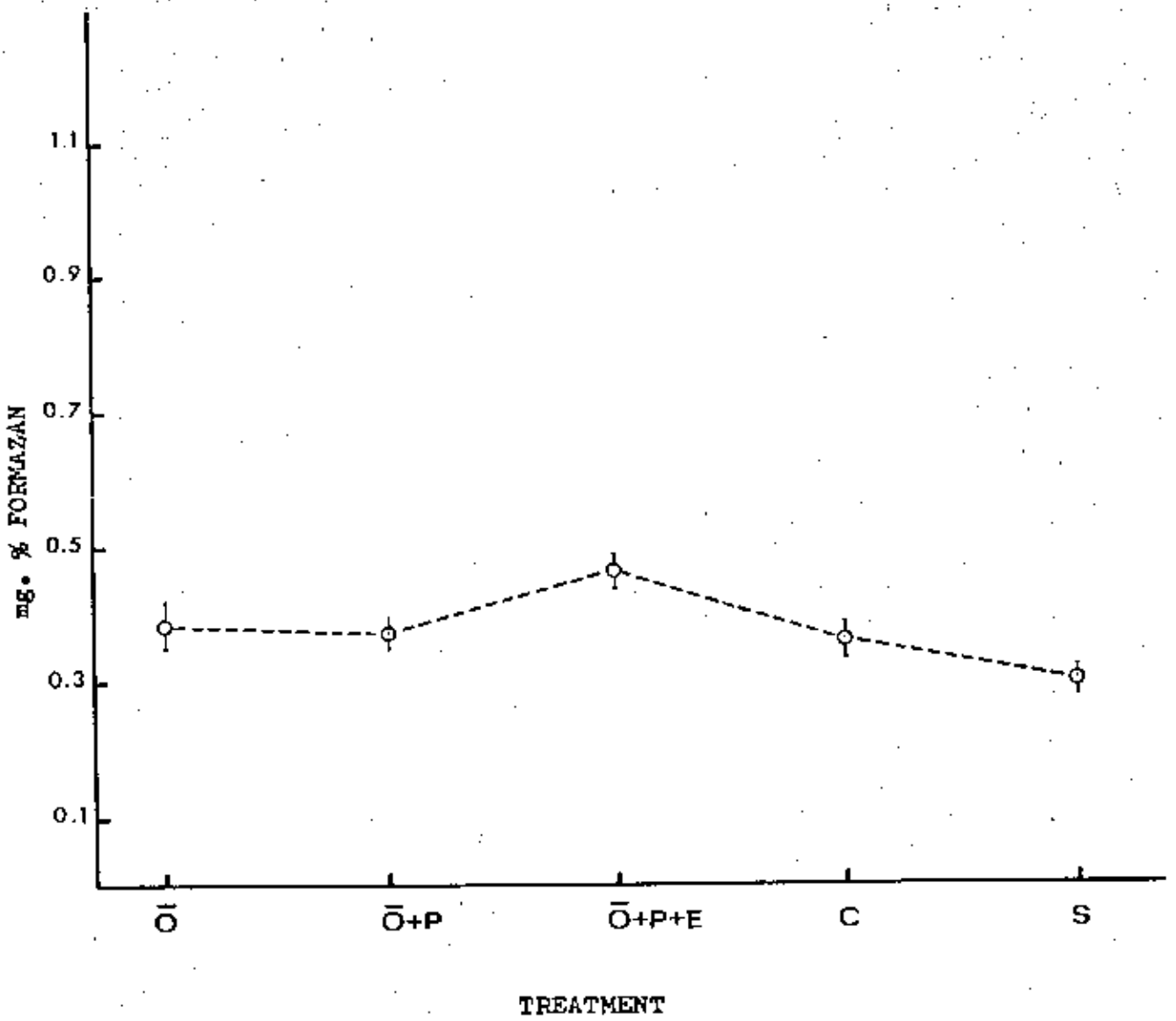
$\bar{O}$ = Ovariectomy

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

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

S = Stelazine

กราฟที่ 1 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนส ในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี

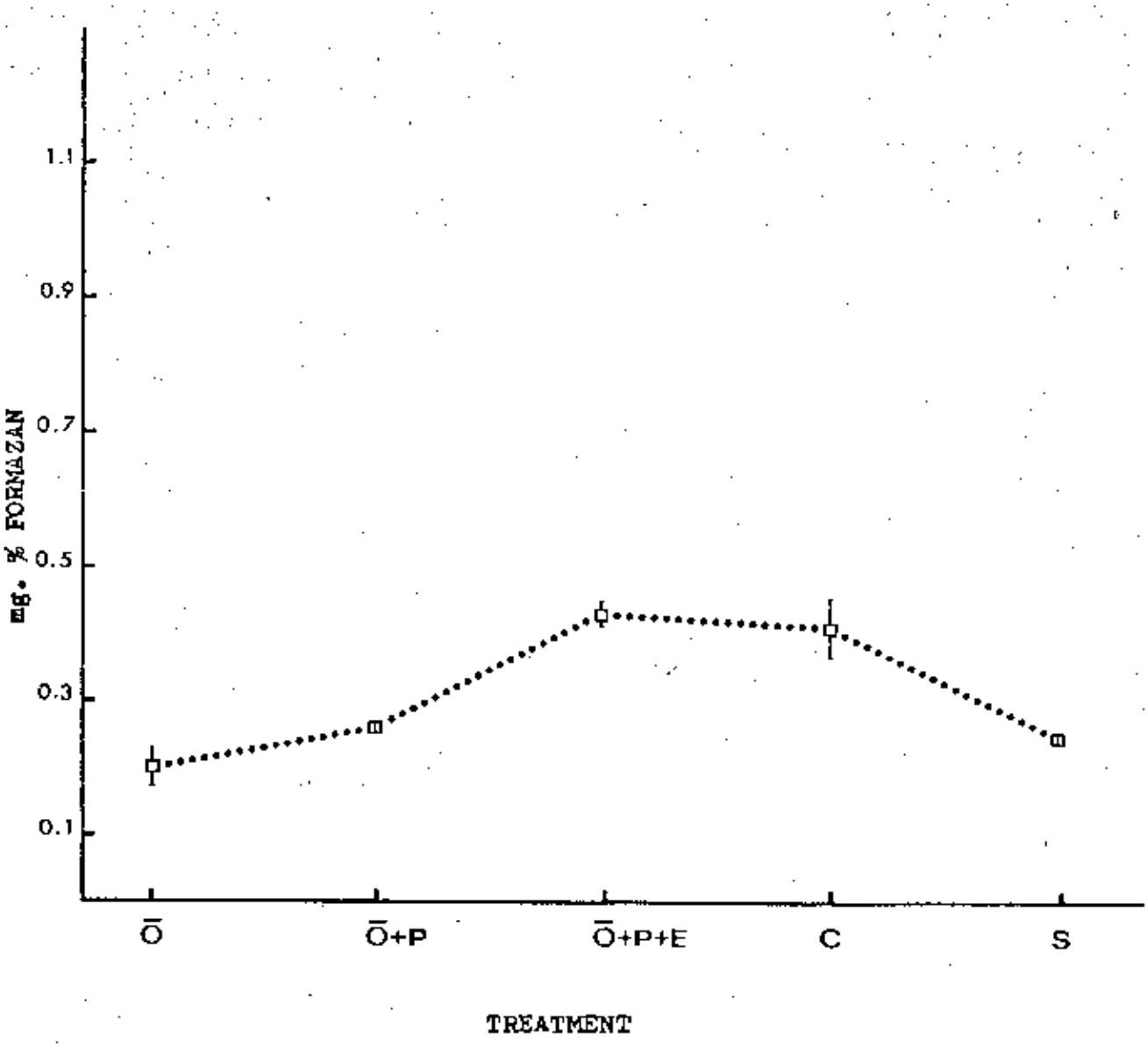


ตารางที่ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในผนังมดลูกหนูระยะที่มีการยังกัวของตัวอ่อน(L_6)โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

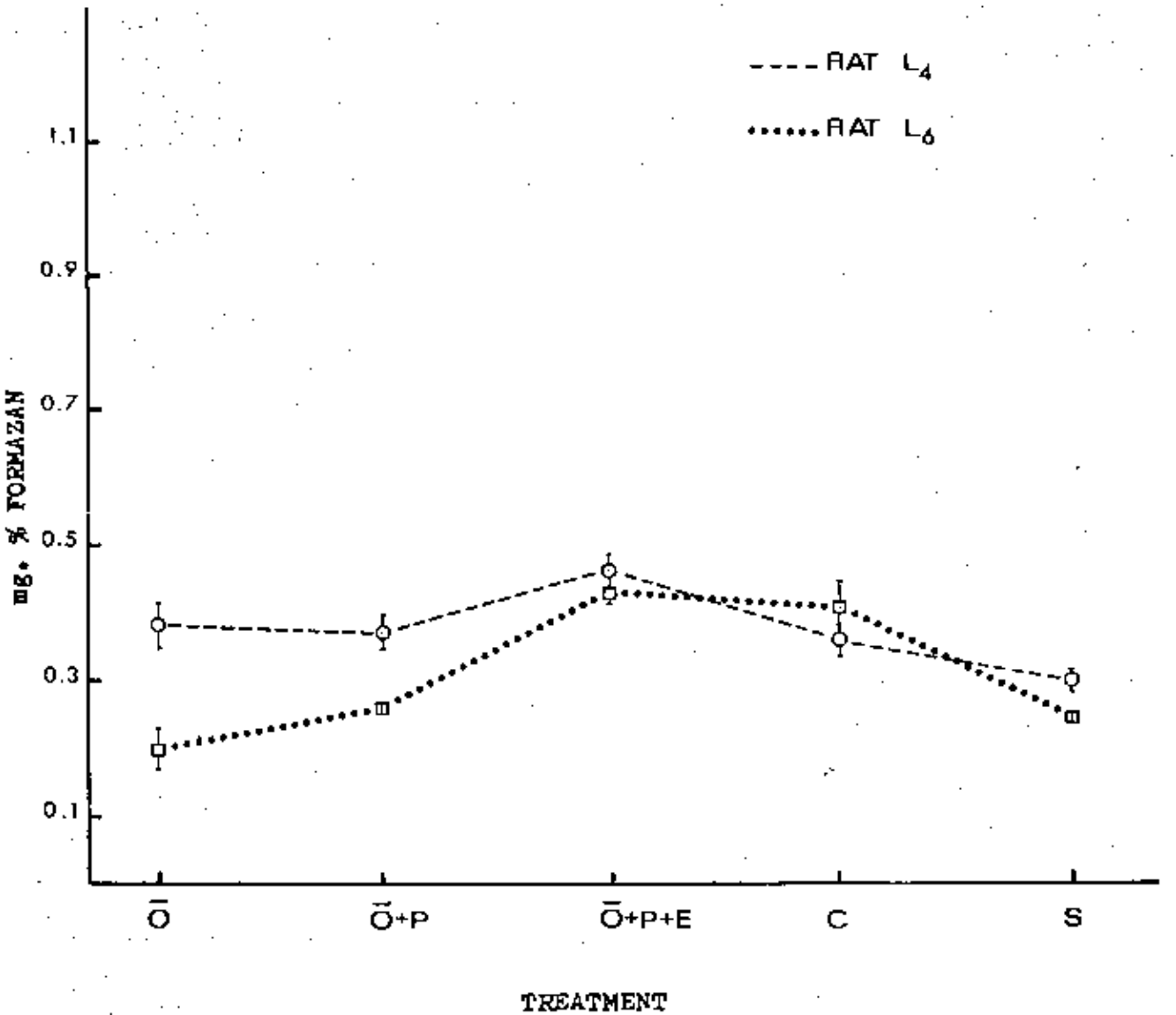
หนูหนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	จำนวน mg % Formazan										Mean ± S.E.	Range
	no.1	no.2	no.3	no.4	no.5	no.6	no.7	no.8	no.9	no.10		
1.หนูท้องปกติ L_1 - L_6	0.1888	0.4602	0.4547	0.4311	0.5283	0.4992	0.4302	0.4284	0.5264	0.1588	0.4106 ± 0.0412	0.3695
2.หนูท้องตัดรังไข่ L_3	0.2905	0.1534	0.1715	0.3150	0.2496	0.2106	0.2587	0.1316	0.1570	0.1189	0.2057 ± 0.0219**	0.1961
3.หนูท้องฉีด Stelazine L_1 - L_5	0.1897	0.1725	0.1634	0.1924	0.3222	0.3077	0.3222	0.2578	0.3004	0.2587	0.2487 ± 0.0202**	0.1588
4.หนูท้องตัดรังไข่L_3ฉีด Progesterone L_3 - L_5	0.2405	0.2024	0.2632	0.3177	0.2814	0.3268	0.2042	0.2696	0.2242	0.3032	0.2633 ± 0.0141**	0.1244
5.หนูท้องตัดรังไข่L_3ฉีดProgesterone+Oestrogen L_3-L_5	0.3676	0.3631	0.5310	0.5219	0.4202	0.4084	0.3948	0.5310	0.3631	0.4702	0.4371 ± 0.0221	0.1679

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

กราฟที่ 2 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซักซินิคดีไฮโดรจีเนส ในผนังบดลูกหนู ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



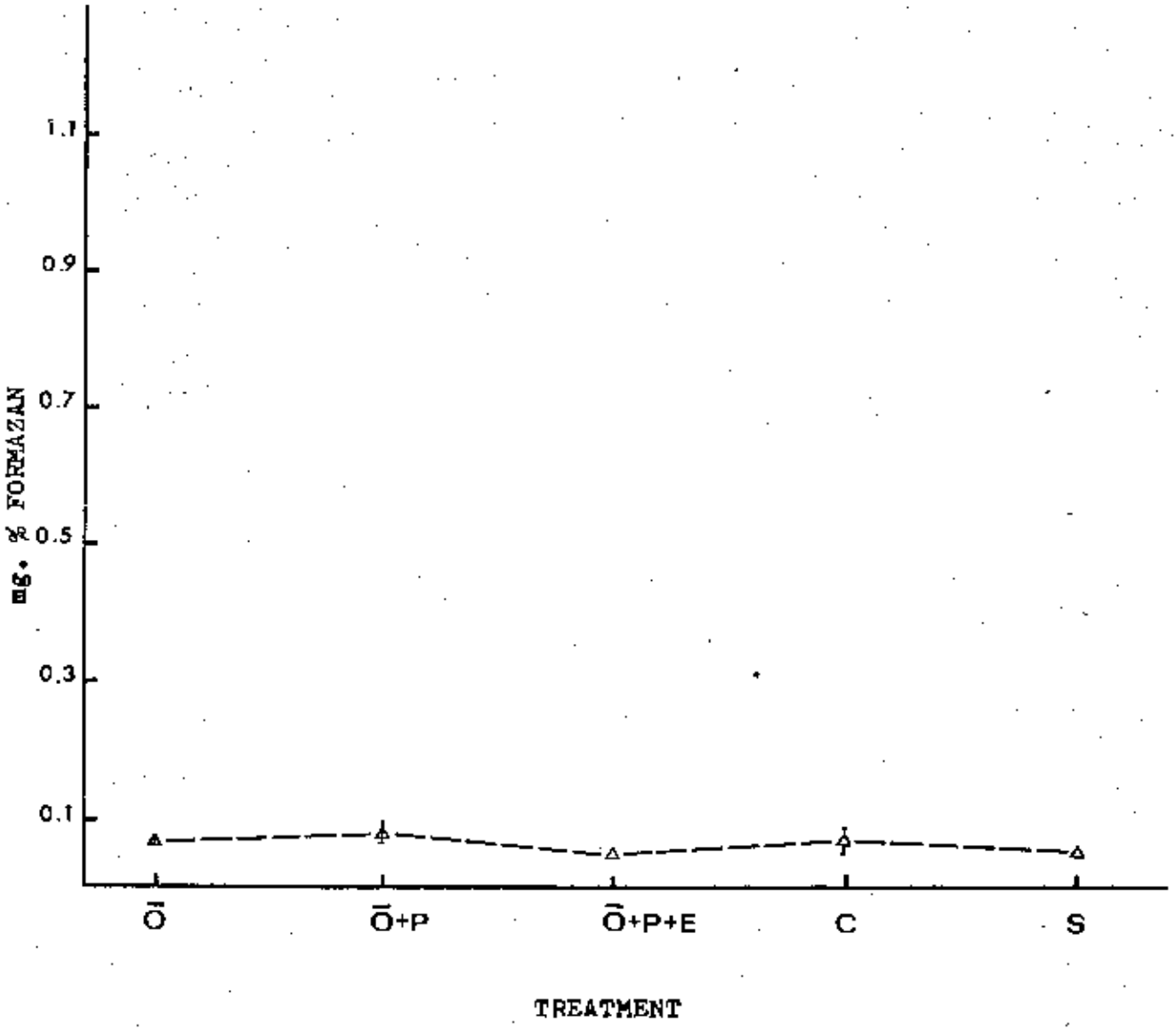
กราฟที่ 3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนส ในผนังมดลูกหนู ระหว่างระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อนกับระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



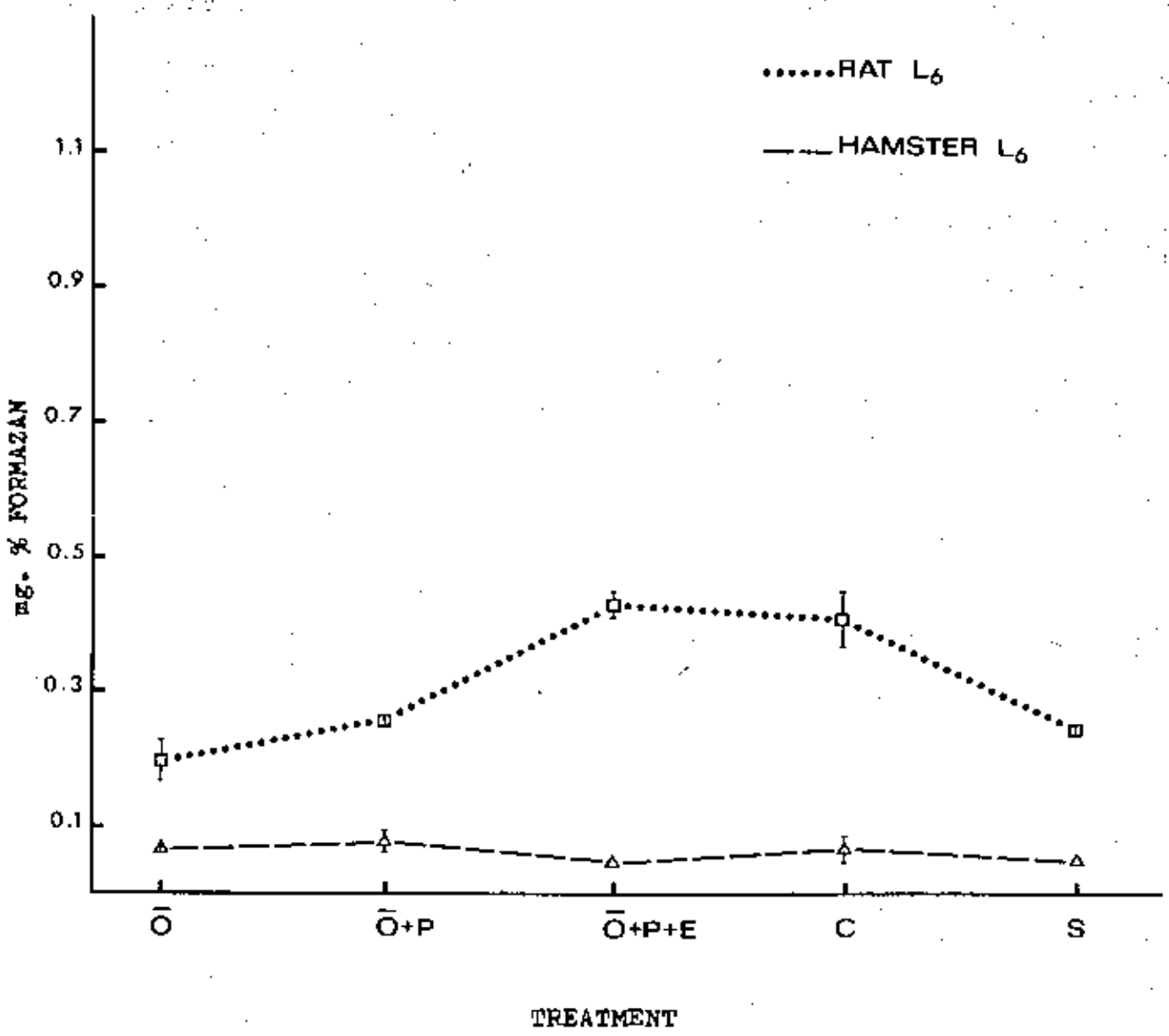
ตารางที่ 5 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจิเนส ในผนังมดลูกแฮมสเตอร์ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6) โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	mg % Formazan					Mean ± S.E.	Range
	no.1	no.2	no.3	no.4	no.5		
1.แฮมสเตอร์ ท้องปกติ $L_1 - L_6$	0.1316	0.0472	0.0744	0.0535	0.0535	0.0720 ± 0.0155	0.0844
2.แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3	0.0526	0.1452	0.0345	0.0454	—	0.0694 ± 0.0241	0.1107
3.แฮมสเตอร์ ฉีด Stelazine $L_1 - L_5$	0.0345	0.0345	0.0345	0.0345	0.0345	0.0345 ± 0.0000	-
4.แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone $L_3 - L_5$	0.0726	0.0980	0.0744	0.1026	0.0681	0.0831 ± 0.0063	0.0345
5.แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone+Oestrogen L_3-L_5	0.0508	0.0508	0.0499	0.0463	0.0490	0.0494 ± 0.0000	-

กราฟที่ 4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ ซักซินิคดีไฮโดรจีเนส ในผนังมดลูกแยมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



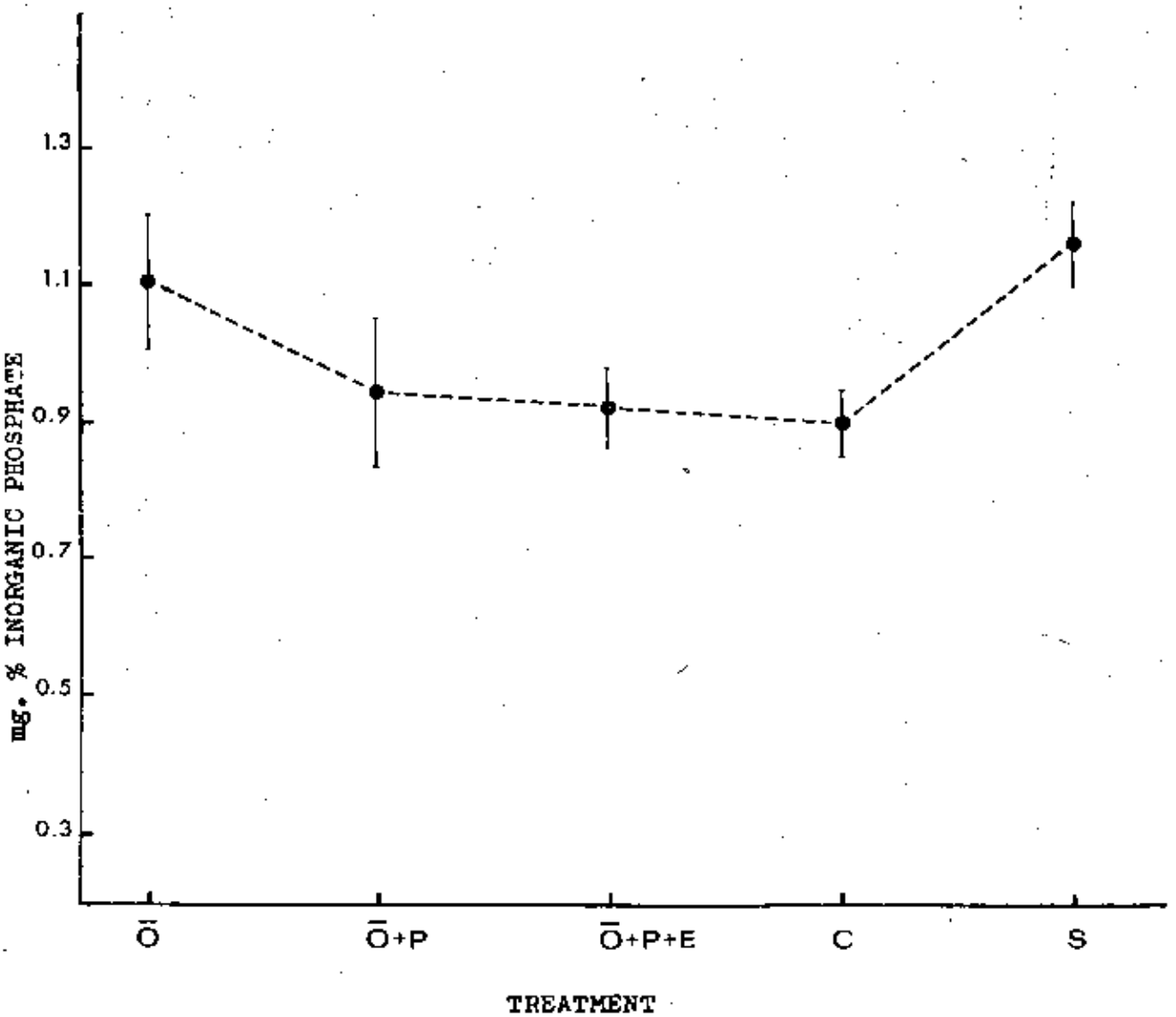
กราฟที่ 5 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนส ในผนังมดลูกหนู กับแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



ตารางที่ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีไบซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนูระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน(L_4)โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_4)	mg % Inorganic Phosphate										Mean ± S.E.	Range
	no.1	no.2	no.3	no.4	no.5	no.6	no.7	no.8	no.9	no.10		
1. หนู ท้องปกติ L_1 - L_4	0.8503	0.7885	0.7954	0.9257	1.2000	0.6857	1.1451	0.8845	0.8160	0.9188	0.9010 ± 0.0505	0.4115
2. หนู ตัดรังไข่ L_3	0.8091	1.1657	1.2000	1.2000	1.0285	0.6034	1.8091	0.8845	0.9600	1.4400	1.1100 ± 0.1077	0.8365
3. หนู ฉีด Stelazine L_1 - L_3	1.2343	1.1588	1.0628	1.2343	0.7885	1.5771	1.1657	1.2343	1.1657	1.0217	1.1643 ± 0.0630	0.7886
4. หนู ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone	1.7622	0.9463	0.4457	0.8228	0.6925	0.9600	0.9874	1.2343	0.8297	0.8434	0.9524 ± 0.1108	1.3165
5. หนู ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone + Oestrogen	1.1931	0.8640	0.8434	1.1588	0.8845	1.0217	0.6171	0.9874	0.6171	1.0971	0.9284 ± 0.0642	0.5760

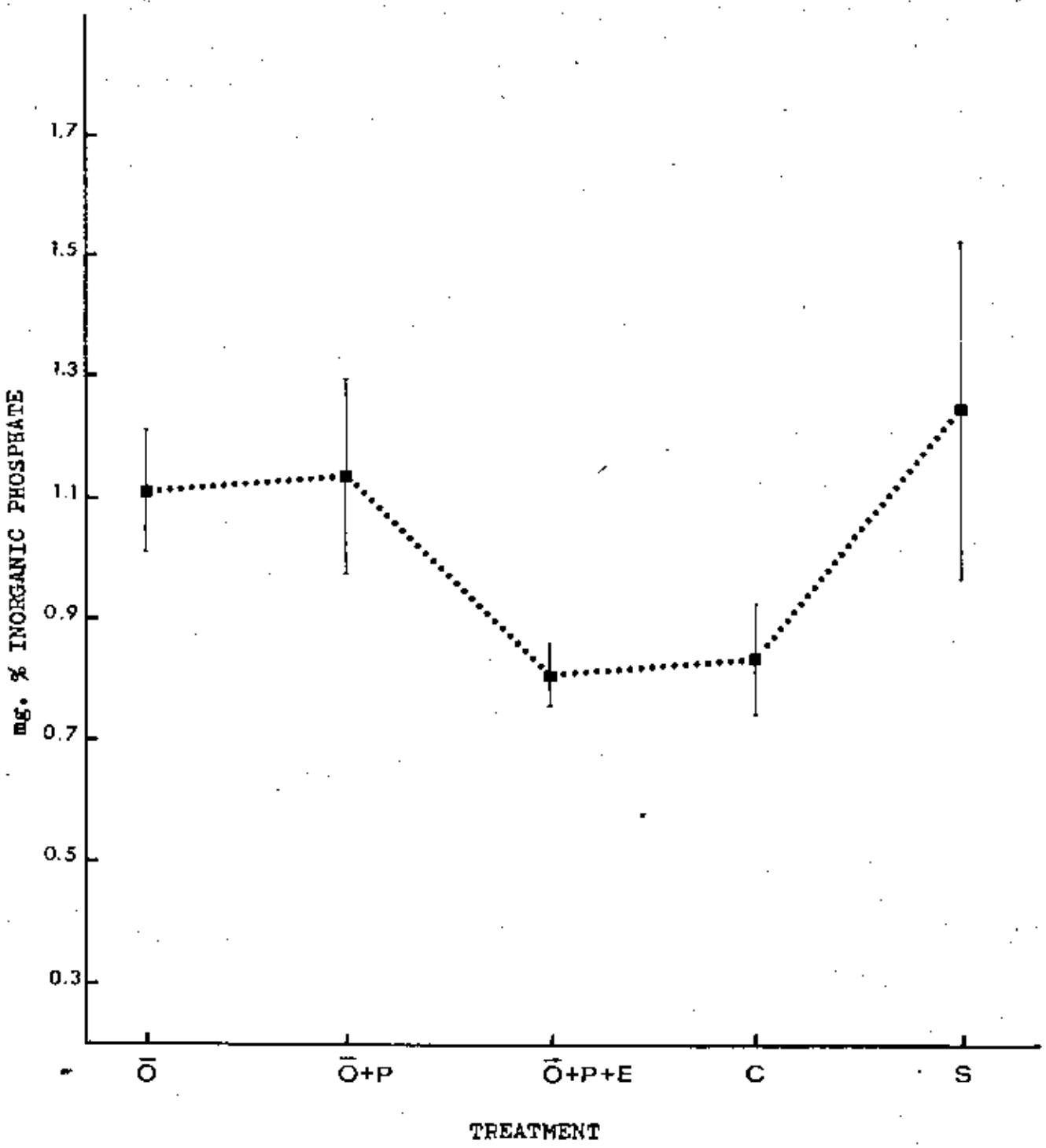
กราฟที่ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนู ระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



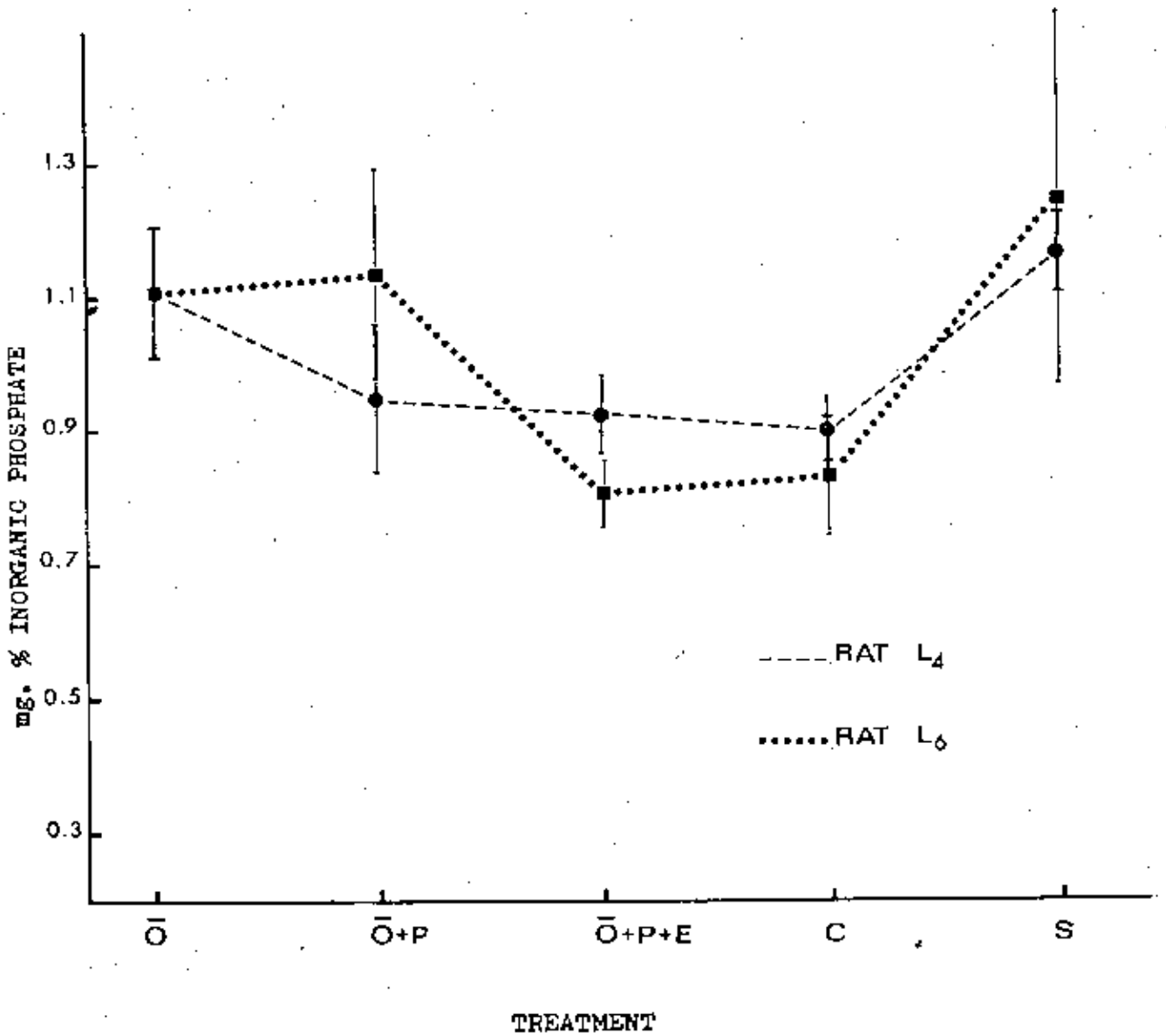
ตารางที่ 7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนูระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน(L_6)โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

หมู่หนูที่ใช้ทดลอง (L_6)	mg % Inorganic Phosphate										Mean ± S.E.	Range
	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	0.5828	1.0217	0.8228	1.0011	1.0628	0.8777	0.7817	0.7200	1.2685	0.2194	0.8358 ± 0.0920	1.0491
2. หนูตัดรังไข่ L_3	1.7074	1.0285	1.0697	0.9943	1.0971	1.0903	0.8297	0.8160	1.2274	1.3371	1.1197 ± 0.0822	0.8914
3. หนูฉีด Stelazine L_1 - L_5	0.9737	1.1931	0.7748	1.3782	0.5074	3.6342	0.9943	0.7200	0.7474	1.5222	1.2445 ± 0.2834	3.1268
4. หนูตัดรังไข่L_3ฉีด Progesterone L_3 - L_5	1.4057	1.8514	1.9542	0.7200	0.5622	1.0903	0.6651	1.3097	0.9600	0.8708	1.1389 ± 0.1532	1.4920
5. หนูตัดรังไข่L_3ฉีด Progesterone+Oestrogen L_3 - L_5	0.6994	0.7063	0.7611	0.9463	1.1520	0.7817	0.8023	0.7543	0.4800	1.0011	0.8084 ± 0.0587	0.6720

กราฟที่ 7 แสดงการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในยุงมดลูกหนู ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



กราฟที่ 8 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส ในผนังมดลูกหนู ระหว่างระยะก่อนที่จะมีการฝังตัวของตัวอ่อน กับระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี

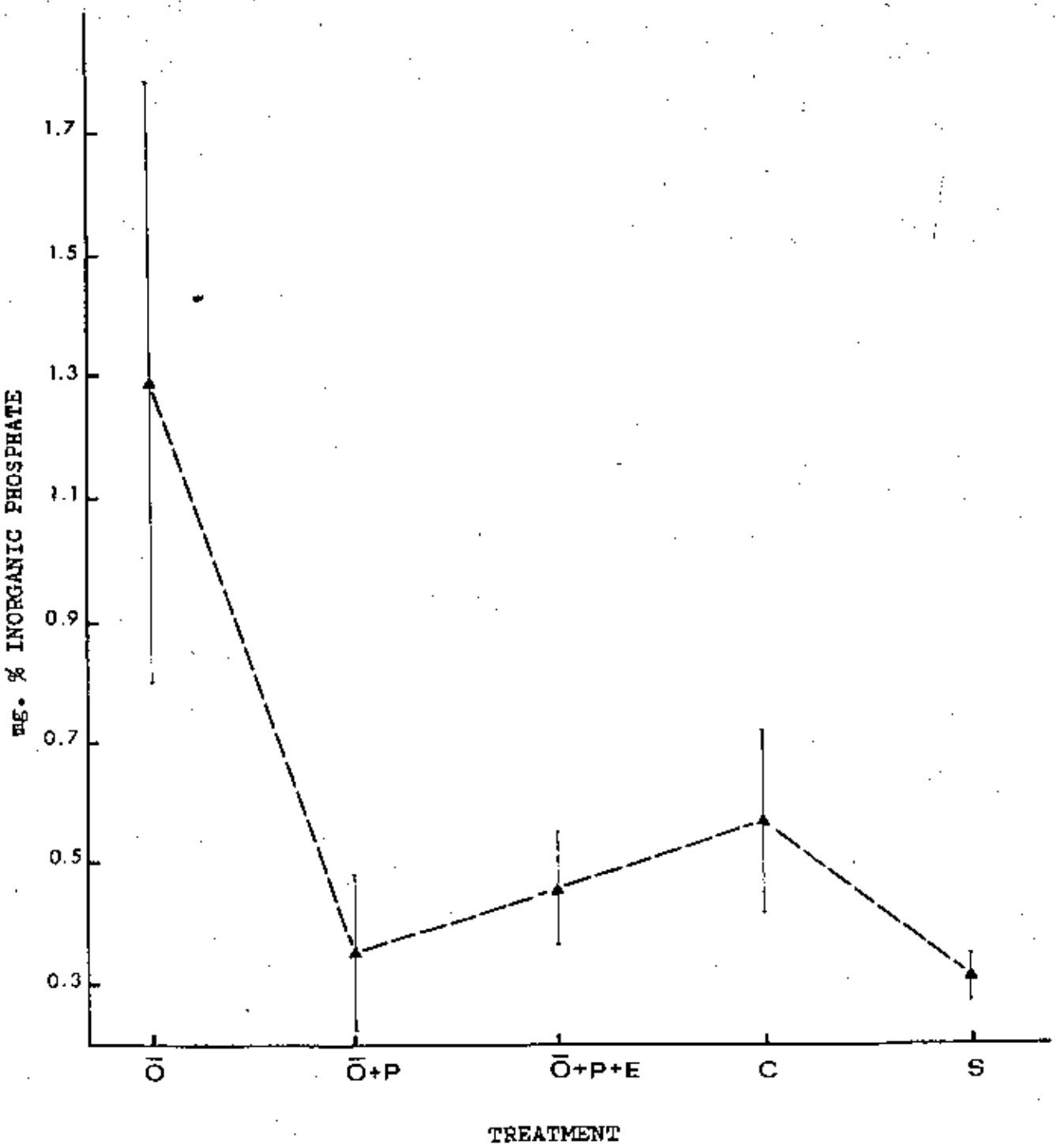


ตารางที่ 8 แสดงการทำงานของ เอ่นไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเตส ในเม็ดบังคลูกแฮมสเตอร์ระยะต่างๆการฝังตัวของตัวอ่อน (L_6) โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี.

หมู่แฮมสเตอร์ที่ใช้ทดลอง (L_6)	mg % Inorganic Phosphate					Mean ± S.E.	Range
	no.1	no.2	no.3	no.4	no.5		
1. แฮมสเตอร์ ท้องปกติ L_1 - L_6	0.8777	0.8914	0.6446	0.1783	0.2400	0.5664 ± 0.1525	0.7131
2. แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3	0.6514	1.0628	2.8456	0.6171	-	1.2942 ± 0.5277*	2.2885
3. แฮมสเตอร์ ฉีด Stelazine L_1 - L_5	0.2263	0.3497	0.3497	0.3497	0.2743	0.3099 ± 0.0253	0.1234
4. แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone L_3 - L_5	0.4594	0.0891	0.4114	0.3908	0.4251	0.3552 ± 0.1349	0.3703
5. แฮมสเตอร์ ตัดรังไข่ L_3 ฉีด Progesterone+Oestrogen L_3-L_5	0.2057	0.4114	0.6514	0.3428	0.6857	0.4594 ± 0.0917	0.4800

* เปรียบเทียบกับ Control เมื่อ ($P < 0.05$)

<u>กราฟที่ 9</u> แสดงการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส ในยุงมดลูกแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี



กราฟที่ 10 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ อดีโนซีนไทรฟอสฟาเทส ในระหว่างยนังมหลูกหนูกับแฮมสเตอร์ ระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน โดยวิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี