# บทนำและสอบสวนเอกสาร

## 1. ความหมายของ luteolysis

Everett (1961) ; Rothchild (1964) และ Malven & Sawyer (1966) ได้อธิบายไว้ว่า เป็นปรากฏการณ์ที่ corpus luteum (พหูพจน์ corpora lutea ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหมดความสามารถในการผลิตและหลั่งฮอร์โมน progesterone (functional luteolysis) ซึ่งผลที่ติดตามมาก็คือเกิดการเสื่อมสลายของ corpus luteum โดย lutein cells ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ corpus luteum เกิดมี connective tissues ขึ้นมาแทนที่ ทำให้ corpus luteum มีขนาดเล็กลงและสลายตัวไปในที่สุด (structural luteolysis)

## 2. กลไกของ luteolysis

กลไกที่ควบคุมการเกิด luteolysis นอกจากจะซับซ้อนมากแล้ว ยังปรากฏว่าไม่เหมือนกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งต่างชนิดกันด้วย สาเหตุที่ทำให้เกิด luteolysis อาจเนื่องมาจากฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองและ/หรือ secretion ของมดลูกส่วน endometrium โดยในทั้งสองกรณีอาจขึ้นอยู่กับระบบของ check balance ของฮอร์โมนที่สร้างจากรังไข่เอง (Rothchild, 1965b)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น หมู, วัว, แกะ, หนูตะเภา, hamsters มดลูกมีส่วนร่วมที่สำคัญอย่างยิ่งในการทำให้เกิด luteolysis โดย secretion จาก endometrium ของสัตว์ที่ไม่ได้ตั้งครรภ์สามารถฉีดโดยตรงต่อ corpus luteum ได้ (Amoroso & Finn, 1962 ; Rothchild, 1965b) กระนั้นก็ตาม เราก็ไม่สามารถที่จะยืนยันได้ว่า ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองและจากรังไข่จะไม่มีส่วนเข้ามาเกี่ยวข้องในการทำให้เกิด luteolysis

ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมในสัตว์พวกนี้ด้วย เพราะ secretion ของมดลูกจะต้องถูกควบคุมโดย hypothalamic-anterior-pituitary-ovarian axis (Rothchild, 1965b) ตัวอย่างเช่นในหนู และแกะ luteolytic factor (s) จากมดลูกมีส่วนเกี่ยวข้องกับต่อมใต้สมองด้วย เพราะว่าถ้าตัดต่อมใต้สมองพร้อมกันที่ตัดมดลูก จะทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ corpora lutea ได้ แต่ถ้าตัดต่อมใต้สมองอย่างเดียว corpora lutea ยังคงสามารถทำหน้าที่สร้างฮอร์โมน progesterone ได้เช่นเดียวกับสัตว์ที่ไม่ได้ถูกตัดต่อมใต้สมอง ( Du Mesnil, du Buisson & Leglise, 1963 ; Denamur & Mauleon, 1963 )

มีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกบางชนิด เช่น rats, mice และกระต่าย ซึ่งพบว่า มดลูกมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด luteolysis ด้วย แต่ไม่มีผลโดยตรงเหมือนพวกแรก ทั้งนี้เพราะว่า การตัดเอามดลูกของสัตว์พวกนี้ออกในระหว่างวง estrus ไม่สามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ได้ จะมีผลก็ต่อเมื่อได้ถูกกระตุ้นให้เกิดท้องเทียม[1] ก่อนเท่านั้น สำหรับในrats การตัดมดลูกจะสามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea จาก 12-14 วัน พบในสัตว์ที่เกิดท้องเทียมธรรมดาเป็น 18-21 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบระหว่างตั้งครรภ์จริงๆ มาก (Long & Evans, 1922 ; Bradbury, 1937;

---

[1] ท้องเทียม (pseudopregnancy) คือการที่ corpora lutea ยืดเวลาทำงานออกไปจากระยะปกติของวงสืบพันธุ์ ในหนูที่ศึกษาท้องเทียมกินเวลาประมาณ 13 ± 1 วัน (Long & Evans, 1922) แต่อาจยืดเวลาออกไปได้นานใกล้เคียงกับ pregnancy โดยการตัดมดลูก (hysterectomy) หรือปล่อยให้ลูกหลายๆตัวดูดนมดิดต่อกันไปนานๆ (lactating pseudopregnancy)

Hechter, Fraenkel, Lev & Soskin, 1940 ; Alloiteau & Vignal, 1958; Butcher, 1969) เชื่อกันว่า secretion จาก endometrium ของสัตว์พวกนี้ไม่ได้มีผลทำให้เกิด luteolysis ได้โดยตรง แต่การขาดมดลูกอาจไปทำให้เสียสภาพสมดุลย์ของฮอร์โมนของ hypothalamic - anterior puititary-ovarian axis ทำให้ functional luteolysis เกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (de Jongh & Wolthius, 1964 ; Rothchild, 1965b) กระนั้นก็ตามเรายังขาดรายละเอียดเกี่ยวกับกลไกที่ควบคุม luteolysis ในสัตว์พวกนี้มาก ทราบแต่เพียงว่า LH เป็น functional luteolytic factor ที่สำคัญที่สุด (Greep, 1938 ; Rothchild, 1965a; Rothchild & Schwartz, 1965) โดย FSH อาจมีส่วนร่วมด้วย (Greep, 1938 ; Alloiteau, Acker & Courrier, 1969) สิ่งที่น่าสนใจในพวก rats ก็คือ การตัดต่อมใต้สมองซึ่งเป็นการกำจัด lutcotrophic และ luteolytic factors ทุกชนิดที่สร้างจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าออกโดยหมดสิ้นมีผลเพียงทำให้เกิด functional luteolysis เท่านั้น เพราะโครงร่างของ corpora lutea ยังคงปรากฏอยู่ที่รังไข่ได้นานกว่า 1 ปี หลังจากผ่าตัด (Smith, 1930)ในสภาวะดังกล่าว Halven and Sawyer (1966) พบว่า prolactin เองมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิด Structural luteolysis

ยังมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกพวกหนึ่ง คือพวก จิงโจ้, ferrets, ลิงและคน ที่มีรายงานว่า มดลูกหรือ secretion ของมันไม่ได้มีผลต่อ luteolytic mechanism ทั้งในทางตรงและทางอ้อมแต่อย่างไรเลย ดังนั้นในสัตว์พวกนี้ luteolysis จะต้องเป็นผลของการทำงานร่วมกันระหว่างฮอร์โมนของ hypothalamus, anterior pituitary และ ovaries เท่านั้น (Amoroso & Finn, 1962 ; Rothchild, 1965 b)

3. วัตถุประสงค์

เนื่องจากเรายังขาดความรู้เกี่ยวกับ lutcolytic mechanism ใน rats อยู่มาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงได้มุ่งทำการทดลองใน rats โดยเฉพาะ โดยมีจุดมุ่งหมายใหญ่ๆ ดังนี้คือ 1) เพื่อจะพิสูจน์ให้แน่ชัดว่า uterine factor (s) ไม่ได้มีผลต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมแต่อย่างไร, 2) เพื่อหาระยะวิกฤตที่การตัดมดลูกจะสามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ของหนูท้องเทียมได้, 3) เพื่อที่จะตรวจดูว่า มี pituitary hormones อะไรบ้างที่มีส่วนในการทำให้เกิด functional luteolysis 4) เพื่อที่จะตรวจสอบและเปรียบเทียบความสำคัญของฮอร์โมน progesterone และ secretion จาก endometrium ของมดลูก ในการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ไม่ได้ตัดมดลูก, 5) เพื่อที่จะตรวจหาว่า การเปลี่ยนแปลงของ photoperiods ซึ่งเป็น environmental factors ที่สำคัญยิ่งอันหนึ่งต่อวงสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Everett, 1961 ; Hurtman, 1968) จะมีผลช่วยส่งเสริมหรือยับยั้งผลของการตัดมดลูกที่มีต่อ luteolysis มากน้อยเพียงไร และ 6) เพื่อที่จะตรวจหาว่า การตัดมดลูกสามารถยืดเวลาของ luteolysis ในแม่หนูท้องเทียมที่เลี้ยงลูกอ่อน (lactating pseudopregnancy) ซึ่งถือว่าเป็นการเกิดท้องเทียมที่มีระยะยาวนานที่สุดตามธรรมชาติ ถ้าแม่หนูยังคงถูกกระตุ้นโดย suckling จากลูก (Selye and McKeown, 1934 a,b) ออกไปได้เกินกว่ากำหนดหรือไม่

## วัสดุและอุปกรณ์

### 1. วัสดุ

#### 1.1 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar ที่เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อยู่ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซนติเกรด และในแต่ละวันปรับให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 06.00 น. – 20.00 น.) โดยสวิทช์อัตโนมัติ (ยกเว้นในกรณีที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ photoperiods ) หนูที่ใช้เลือกเฉพาะตัวเมียซึ่งไม่เคยผ่านการผสมมาก่อน (ยกเว้นในกรณีที่ศึกษา lactating pseudopregnancy ) หนูเหล่านี้กินอาหารมาตรฐานซึ่งสั่งจากบริษัท F.J. Zuellig ( Gold Coil Mills ) และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา หนูทดลองทุกตัวจะต้องผ่านการตรวจว่ามีวง estrus เป็นปกติ ( 4 วัน ) ไม่น้อยกว่า 3 วงติดต่อกันก่อนที่จะเริ่มการทดลอง และจะต้องมีอายุอยู่ในระหว่าง 55 – 70 วัน ยกเว้นในกรณีของ lactating pseudopregnancy ซึ่งอาจจะใช้หนูทดลองที่มีลูกมาแล้วไม่เกิน 2 กรอก และมีอายุประมาณ 70 – 100 วัน

#### 1.2 ฮอร์โมนและสารเคมี

##### 1.2.1 ฮอร์โมน

Follicle Stimulating Hormone (Porcine) ของ Hann, U.S.A.

Lutectrophic Hormone (Ovine) ของ NIH-P-S-2

Lutinizing Hormone (Equine) ของ Hann, U.S.A.

Progesterone (Hann, U.S.A.)

1.2.2 สารเคมี

1.2.2.1 สารเคมีที่ใช้ฉีดทดลอง

Trichloroacetic acid (Kay & Baker, England)

Olive oil (สามัคคีเภสัช, กรุงเทพฯ)

1.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการผ่าศัพ

Dettol (2.5 %)

Ether

1.2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสไลด์

Acetic acid (glacial)

Butyl alcohol

Eosin

Ethyl alcohol

Formaldehyde

Gelatin

Glycerol

Haematoxylin

Paraplast (Arthur, H. Thomas)

Phenol

Propylene glycol

Sudan Black B. (Gurr's, London)

Xylol

2. อุปกรณ์

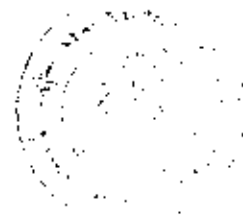
เครื่องมือผ่าตัด

หลอดและเข็มฉีดยา

Microtome (Model 815)

Cryostat (IEC, Model CTD)

สไลด์ และอุปกรณ์ในการย้อมสี



วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมฮอร์โมนและน้ำยาเคมีที่ใช้สำหรับฉีดทดลอง

1.1 การเตรียมฮอร์โมน

1.1.1 Follicle Stimulating Hormone (FSH) ชั่ง Follicle Stimulating Hormone ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ซึ่งผ่านการกลั่นมาแล้ว 3 ครั้ง ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้

1.1.2 Lutootrophic Hormone (Prolactin) ชั่ง prolactin ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้

1.1.3 Lutinizing Hormone (LH) ชั่ง Lutinizing Hormone ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้

1.1.4 Progesterone ชั่งผง progesterone มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งชั่งได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม นำมาใส่โกร่งบดจนละเอียดดีแล้ว จึงละลายในน้ำมันมะกอก (olive oil) บริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ 0.1 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนอุ่นช่วยเล็กน้อย จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

สำหรับ FSH, LH และ prolactin ซึ่งเป็น protein hormones หลังจากที่ละลายเป็นสารละลายแล้ว จะต้องใช้ภายในระยะเวลาอันจำกัด คือไม่เกิน 3 สัปดาห์ ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสีย activity

## 1.2 การเตรียมน้ำยาเคมี

1.2.1 10 % Trichloroacetic acid (TCA) ผสม tricholoroacetic acid กับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 10 %

## การตรวจวงสืบพันธุ์ของหนูทดลอง

หนูที่ใช้ในการทดลอง ได้รับการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวันนับจากวันที่ช่องคลอดเปิด เลือกเอาเฉพาะหนูที่มีวงสืบพันธุ์ 4 วันเท่านั้น ระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ กำหนดจากลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏใน vaginal smear ( Long & Evans, 1922)

วงสืบพันธุ์ของหนูขาว แบ่งออกได้ 4 ระยะ

1. Diestrus เป็นระยะนานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณครึ่งหนึ่งของวง ระยะนี้รังไข่ไม่มีการสร้างฮอร์โมน estrogen และประกอบไปด้วย non - functional corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุด มดลูกมีขนาดเล็ก มี vaginal epithelium บางกว่าระยะอื่น การทำ vaginal smear จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจพบมี

epithelial cells ปนอยู่เป็นส่วนน้อย

2. Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ระยะนี้จะมี follicles เติบโตจนถึงคั่น preovulatory swelling มีการสร้างฮอร์โมน estrogen สูง เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงสูง (hyperhemia) ที่ vagina ก็จะเกิดมี stratification ของ epithelial cells ทำให้มีความหนาเพิ่มขึ้น การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบเซลล์ก้อนข้างกลม มีนิวเคลียสเห็นชัดเจน เรียกว่า nucleated cells ไม่พบมีเซลล์เม็ดเลือดขาวปนอยู่เลย ในตอนท้ายของระยะนี้หมูจะมี heat[1] พร้อมที่จะยอมกับตัวผู้ได้

3. Estrus เป็นระยะต่อจาก proestrus ตอนต้นของระยะนี้ ฮอร์โมน estrogen ที่สร้างจะอยู่ในระดับสูงสุด จากนี้จะมีการตกไข่เกิดขึ้น ส่วน heat จะหมดไปในเวลาหลังจากที่ได้มีการตกไข่เกิดขึ้น หลังตกไข่ระดับของฮอร์โมน estrogen ที่สร้างจะลดต่ำลง มดลูกจะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากสูญเสียน้ำ ที่ vaginal epithelium ยังคงหนา แต่เกิด cornification มี mass ของเซลล์หลุดออกมาสู่ lumen เป็นจำนวนมากมาย เรียก cornified cells มีลักษณะ irregular และมักจะไม่พบมีนิวเคลียสเหลืออยู่ภายในเซลล์ ในการทำ vaginal smear ตอนต้นๆ จะพบมีแก

---

[1]heat เป็นคำที่ใช้เรียกกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมียที่มีวงสืบพันธุ์แบบ estrus หมายถึงระยะที่ตัวเมียยินยอมให้ตัวผู้ผสมพันธุ์ โดยส่วนมากแล้วระยะที่มี heat เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ ที่เกิดขึ้นในตอนที่ใกล้เคียงกับที่มีการตกไข่

cornified cells แต่ก่อนที่จะสิ้นสุดระยะนี้ จะเริ่มมีเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาปะปนด้วยเล็กน้อย ระยะนี้กินเวลาทั้งสิ้นประมาณ 30 ชั่วโมง

ข้อที่น่าสังเกตในระยะนี้ก็คือ ในตอนก่อนการตกไข่นั้น นอกจากจะมีฮอร์โมน estrogen อยู่ในระดับสูงแล้ว รังไข่ยังสามารถสร้างฮอร์โมน progesterone ได้สูงด้วย (Dto, Hasuda, Suzuki & Hosi, 1962) ซึ่ง progesterone ในตอนนี้ มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น ovulatory surge ของ LH (Everett, 1948 ; Everett, 1964 ; Zeilmaker, [illegible])

4. Metaestrus เป็นระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นภายหลังจากการตกไข่ กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เป็นระยะที่ระดับ estrogen ในเลือดลดต่ำลงมาก ในการทำ vaginal smear พบว่าเริ่มมีเซลล์เม็ดเลือดขาวปนอยู่กับ cornified cells เพิ่มมากขึ้น

3. <u>การชักนำให้เกิดท้องเทียม</u> (Pseudopregnancy)

ทำหนูให้เกิดท้องเทียม โดยกระตุ้นปากมดลูก (cervix) ด้วยกระแสไฟฟ้าในตอนเช้าของระยะ proestrus (เวลา 10.00 น.- 12.00 น.) และ estrus (เวลา 10.00 น.- 12.00 น.) ตามวิธีของ Sholeanyak (1931) โดยใช้ไฟฟ้าที่มีความต่างศักดา 100 โวลต์ ความถี่ 32 ครั้งต่อวินาที กระตุ้น 2 ครั้ง ๆ ละ 5 วินาที เว้นช่วงระหว่างการกระตุ้น 5 วินาที วันแรกที่พบเซลล์ของเม็ดเลือดขาวอยู่ในช่องคลอด นับเป็นวันที่ 1 ($L_1$) ของท้องเทียม และวันต่อ ๆ ไปเป็น $L_2$ , $L_3$ .... ตามลำดับ

4. <u>การชักนำให้เกิดท้องเทียมระหว่างเลี้ยงลูกอ่อน</u> (Lactating Pseudopregnancy )

ใช้หนูแม่ลูกอ่อนที่เคยคลอดลูกมาแล้วไม่เกิน 2 ครั้ง และมีช่วงของ

pregnancy ปกติ (21 - 22 วัน) หลังจากคลอดลูกครั้งใหม่ ทำให้เกิด lactating pseudopregnancy โดยจัดให้ลูกอ่อนดูดนมจำนวน 6 - 8 ตัว ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง นับวันที่คลอดลูกเป็นวันที่ 0 ($L_0$) ของการเลี้ยงลูกอ่อน และวันต่อ ๆ ไปเป็น $L_1$ , $L_2$ ... ตามลำดับ

5. การผ่าตัด

การผ่าตัดทุกครั้งกระทำในรายที่หนูถูกทำให้สลบโดยคลอโรฟอร์ม เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (2.5 % dettol)

5.1 การตัดมดลูก (Hysterectomy)

นำหนูมาทำให้สลบ แล้วทาน้ำยาฆ่าเชื้อที่บริเวณท้องด้านล่างเหนือช่องคลอดเล็กน้อย ใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อตอนกึ่งกลางลำตัว (mid - ventral line) ให้เป็นรอยเป็นช่องยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เอาปากคีบดึงไขมันที่อยู่รอบ ๆ มดลูกขึ้นมา มดลูกจะติดขึ้นมาด้วย ดึงมดลูกจนเห็นส่วนต่อของมดลูกกับท่อไข่ ใช้กรรไกรตัดตรงส่วนต่อนั้นให้ขาดออกจากกัน แล้วทำเช่นเดียวกันกับอีกด้านหนึ่งของมดลูก สุดท้ายตัดส่วนของมดลูกที่ติดกับปากมดลูก (cervix) ให้ขาดออกจากกัน แล้วใช้กรรไกรตัดส่วนของเปลวมันที่ติดอยู่กับมดลูกทางด้าน mesometrium ออกจากมดลูกทั้งหมด แล้วจึงค่อย ๆ ใช้ปากคีบดึงเอามดลูกออก โดยพยายามให้ส่วนนี้ได้รับอันตรายน้อยที่สุด เสร็จแล้วค่อย ๆ ใส่ส่วนของไขมันที่ไม่ได้ถูกตัดออกกลับเข้าไปในช่องท้อง โดยใช้ปากคีบจับชิ้นของกล้ามเนื้อด้านปากแผลเป็นช่องว่าง พร้อมกับยกขึ้นเล็กน้อย ไขมันส่วนที่เหลือจะเลื่อนลงสู่ช่องท้องตามเดิม ใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้งหนึ่ง

5.2 การฉีดน้ำยาเคมีเข้า uterine horn

นำหนูมาทำให้สลบ แล้วทาน้ำยาฆ่าเชื้อบริเวณด้านข้างลำตัว เยื้องไปทางด้านบน (dorso - lateral) ต่ำกว่าชายโครงเล็กน้อย ใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อให้เปิดเป็นช่องเล็ก ๆ เอาปากคีบดึงไขมันที่ติดอยู่กับรังไข่ขึ้นมา รังไข่จะติดขึ้นมาด้วยพร้อมกับมดลูกบริเวณ utero-tubal junction ก่อย ๆ จับส่วนมดลูกไว้ แล้วฉีดน้ำยาเคมีเข้าภายใน lumen ของมดลูก ตามจำนวนที่ต้องการ แล้วค่อย ๆ ใส่กลับเข้าที่เดิม เย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้งหนึ่ง ทำเช่นเดียวกันกับอีกด้านหนึ่งของลำตัว

6. การ Autopsy

ใช้วิธีดึงคอต่อหนูให้หลุดออกจากกัน (cervical dislocation) เพื่อให้หนูตายทันที แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตรวจดูลักษณะ และขนาดของรังไข่, มดลูก ตัดเอารังไข่, มดลูกไว้ศึกษาโครงสร้างภายใน (Histology) นอกจากนี้รังไข่ของหนูทุก ๆ กลุ่ม ยังถูกนำมาตรวจสอบหน้าที่ของ corpora lutea โดยทำ cryostat section และย้อมด้วยสี Sudan Black B. เพื่อเปรียบเทียบแบบของการกระจายของ lipid materials ภายใน corpora lutea

7. การตรวจสอบหน้าที่ของ corpora lutea โดยตรวจดูแบบของการกระจายของ lipid materials

7.1 การเตรียมสีและ mounting media (Lillie, 1965)

7.1.1 Sudan Black B. ชั่ง Sudan Black B. จำนวน 500 มิลลิกรัม ละลายใน propylene glycol 30 ml. + ethyl alcohol 30 ml. และน้ำกลั่น 40 ml. ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 -

110 องศาเซนติเกรด และไม่เกิน 110 องศาเซนติเกรด กรองในระหว่างที่ร้อนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งสีที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีภายใน 1 - 3 วัน

7.1.2 Kaiser's glycerol gelatin ซึ่ง Modified โดย Mallory เขย่า gelatin จำนวน 60 กรัม ในน้ำกลั่น 210 ml. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติม glycerol จำนวน 250 ml. และ phenol ที่หลอมเหลว 5 ml. ตั้งไฟอ่อน ๆ พร้อมกับคนตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 10 - 15 นาที จนกระทั่งสารหลอมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 - 5 องศาเซนติเกรด และนำมาทำให้ละลายโดยใช้ความร้อนช่วยเล็กน้อยเมื่อต้องการจะใช้เป็น mounting media

7.2 การทำ cryostat section เพื่อตรวจดูแบบของการกระจายของ lipid materials ที่ corpora lutea

นำรังไข่ที่ต้องการจะตัด section มาทำให้เย็นจัดโดยใส่เครื่อง IEC Cryostat ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซนติเกรด เมื่อเย็นทั่วกันดีแล้ว ใช้เครื่อง cryostat ตัด section หนา 12 ไมครอน แล้วติดที่ cover slip นำไป fix ใน 10 % formaldehyde ประมาณ 10 - 20 นาที แล้วล้างน้ำจนหมด formaldehyde ประมาณ 2 - 5 นาที นำ section ไป dehydrate ใน propylene glycol บริสุทธิ์ ประมาณ 3 - 5 นาที โดยแกว่ง section ไปมาเป็นครั้งคราว แล้วนำลงสู่สีที่จะย้อม (Sudan Black B.) เป็นเวลา 5 - 7 นาที แล้ว differentiate สีให้พอเหมาะใน 85 % propylene glycol เป็นเวลา 2 - 3 นาที ล้างในน้ำกลั่น 3 - 5 นาที เสร็จแล้วนำไป mount ใน glycerol gelatin จากนี้ก็นำมาตรวจ และทำ photomicrograph เพื่อศึกษาการกระจายของ

sudanophilic (lipid) materials ที่ corpora lutea ของรังไข่ เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพในการผลิตฮอร์โมนของ corpora lutea และใช้เป็นหลักฐานในการเปรียบเทียบการเกิด functional luteolysis ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง

8. การทำ Serial section ของรังไข่และมดลูก

นำรังไข่, มดลูกที่ต้องการศึกษา fix ในน้ำยา Lillie's AFA ( ethyl alcohol 85 ml. + formaldehyde 10 ml. + glacial acetic acid 5 ml.) เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน 70% alcohol อีกประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อจากนั้นนำไป dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 80% alcohol, 95% alcohol,95% alcohol + butyl alcohol, butyl alcohol, butyl alcohol + xylol, xylol1, xylol2 ตามลำดับ ขั้นละ 1 ชั่วโมง แล้วนำรังไข่ใส่ในส่วนผสมของ xylol กับ paraplast ที่หลอมเหลวเป็นเวลาประมาณ 1/2 ชั่วโมง ในตู้อบสูญญากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซนติเกรด แล้วเปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เก็บในตู้อบเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นนำรังไข่มา embed ใน paraplast แล้วตัด serial section หนา 6 ไมครอน ย้อมด้วยสี Harris Haematoxylin และ Eosin นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ เพื่อศึกษาลักษณะของ follicle และ corpora lutea ของรังไข่ และ endometrium ของมดลูก แล้วทำ photomicrograph

9. การตรวจหาไข่ที่ท่อนำไข่

เมื่อหนูกลับมามี estrus ครั้งแรก autopsy ระหว่างเวลา 10.00 - 12.00 น. ตัดเอารังไข่ที่มีท่อนำไข่ติดอยู่ออก แล้วแยกท่อนำไข่

ออกจากรังไข่ มาไปวางบน slide ที่สะอาด ใช้ปากคีบและกรรไกรค่อย ๆ ยีดท่อนำไข่ให้เหยียดตรง จะเห็นว่า ส่วนล้อมรองท่อนำไข่ มีลักษณะพองใส กว่าบริเวณอื่น ซึ่ง บริเวณนี้เป็นที่ที่ไข่ หยด 0.85% NaCl ลงไปเล็กน้อย แล้วค่อย ๆ กดให้ไข่หลุดออกมา ตามวิธีของบัวสี่มวง (2510) โดยใช้ปากคีบ และเข็มหมุดช่วย เมื่อแน่ใจว่าไข่ออกหมดแล้ว จึงเอา cover slip ปิดทับ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูไข่ที่ตก ในกรณีที่ไม่พบไข่ นำรังไข่ไป fix ใน AFA เพื่อตรวจดูลักษณะภายในรังไข่อีกครั้งหนึ่ง เพื่อที่จะตัดสินแน่นอนว่า มีการตกไข่หรือไม่

## การทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูเพศเมียรวมทั้งสิ้น 179 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

1. <u>ศึกษาผลของการตัดลูก[1] ในระยะต่าง ๆ ของวง estrus ที่ต่อการชักนำให้ non - functional corpora lutea เปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea</u> ใช้หนูทั้งสิ้น 21 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

1.1 ตัดมดลูกในระยะ proestrus ใช้หนูจำนวน 5 ตัว

1.2 ตัดมดลูกในระยะ estrus ใช้หนูจำนวน 5 ตัว

1.3 ตัดมดลูกในระยะ diestrus วันที่ 1 ใช้หนูจำนวน 6 ตัว

---

[1] การนำตัดกระทำในตอนเช้าระหว่าง 9.00 น. - 10.00 น.

001433

1.4 ตัดมดลูกในระยะ diestrus วันที่ 2 ใช้หนูจำนวน 5 ตัว ทำ vaginal smear ในทุก ๆ กลุ่มหลังจากการผ่าตัดเพื่อตรวจดูว่า การผ่าตัดมดลูกแต่เพียงอย่างเดียว จะสามารถชักนำให้เกิดการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ได้หรือไม่

2. การศึกษาผลของการตัดมดลูกที่มีต่อชีวิตการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียม แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

2.1 Unoperated Controls ใช้หนูที่ถูกชักนำให้เกิดท้องเทียม 9 ตัว

2.2 ตัดมดลูกทันทีหลังจากการกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมครั้งสุดท้าย[1] (วันที่มี cornified cells ใน vaginal smear เรียก $L_0$) ใช้หนูทั้งสิ้นจำนวน 7 ตัว

2.3 ตัดมดลูกในวัน $L_4$ ของการเกิดท้องเทียม[1] ใช้หนูจำนวน 7 ตัว

2.4 ตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ ของการเกิดท้องเทียม ในกลุ่มนี้ยังแบ่งออกเป็น

ก. ผ่าตัดในตอนเช้า ( 9.00 น. - 12.00 น.) จำนวน 8 ตัว

ข. ผ่าตัดในตอนเย็น (18.00 น. - 20.00 น.) จำนวน 6 ตัว

---

[1]การผ่าตัดกระทำในตอนเช้าระหว่าง 9.00 น. - 12.00 น.

2.5 ตัดมดลูกในวัน $L_{12}$ ของการเกิดท้องเทียม[1] ใช้หนู จำนวน 5 ตัว

บันทึกจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมโดยการทำ vaginal smear ในทุก ๆ กลุ่มที่ศึกษา

3. ศึกษาผลของการฉีด FSH, LH และ Prolactin[2] ที่มีต่อ luteolytic mechanism ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูกในช่วงเวลาที่ยังสามารถมีผลต่อการยืดอายุการทำงานของ corpora lutea ได้ ใช้หนูจำนวน 54 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

3.1 ตัดมดลูกในวัน $L_0$ (ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 2.2) ใช้หนู จำนวน 25 ตัว

3.1.1 เริ่มจากวัน $L_{11}$ หนูกลุ่มนี้ถูกฉีด FSH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง โดยแบ่งฉีด 2 ครั้ง ๆ ละ 10 ไมโครกรัม (เช้าฉีดเวลา 8.00 น., บ่ายฉีดเวลา 16.00 น.) จนกระทั่งการทำ vaginal smear พบกลับมามี nucleated และ/หรือ cornified cells ใช้หนูทดลองจำนวน 8 ตัว

3.1.2 เริ่มจากวัน $L_{11}$ ได้รับการฉีด LH เข้าช่องท้อง วันละ 10 ไมโครกรัม โดยแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 ไมโครกรัม

---

[1] การผ่าตัดกระทำในตอนเช้าระหว่าง 9.00 น. - 12.00 น.

[2] ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 27

เช่นเดียวกับ 3.1.1 จนกระทั่งการทำ vaginal smear กลับมามี nucleated และ/หรือ cornified cells กลุ่มนี้ใช้หนูทดลองจำนวน 9 ตัว

3.1.3 ทำเช่นเดียวกับ 3.1.1 และ 3.1.2 แต่แทนที่จะฉีด FSH หรือ LH แต่เพียงอย่างเดียว กลุ่มนี้ฉีด FSH 20 ไมโครกรัม และ LH 10 ไมโครกรัมเข้าช่องท้องพร้อม ๆ กัน นับตั้งแต่วัน $L_{11}$ เป็นต้นไป ใช้หนูทดลองในกลุ่มนี้ 8 ตัว

3.2 ตัดมดลูกในเช้าวัน $L_{11}$ (8.00 น. - 10.00 น.) ของ ท้องเทียม (ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 2.4 ก.) ใช้หนูจำนวน 29 ตัว

3.2.1 เริ่มฉีด FSH 20 ไมโครกรัมต่อวัน ในวัน $L_{11}$ ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 3.1.1 ใช้หนู 9 ตัว

3.2.2 เริ่มฉีด LH 10 ไมโครกรัมต่อวัน ในวัน $L_{11}$ ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 3.1.2 ใช้หนู 6 ตัว

3.2.3 ทำเช่นเดียวกับ 3.2.2 ทุกประการ แต่เพิ่ม dose ของ LH จาก 10 ไมโครกรัมต่อวัน เป็น 20 ไมโครกรัมต่อวัน ใช้หนู 8 ตัว

3.2.4 เริ่มฉีด prolactin 250 ไมโครกรัมต่อวัน เข้าช่องท้องตั้งแต่วัน $L_{11}$ โดยแบ่งฉีดวันละ 2 เวลา เช่นเดียวกับกลุ่มอื่น ๆ ใช้หนู 6 ตัว

4. การศึกษาผลของ progesterone[1] และ/หรือ การทำลาย endometrium ของมดลูกด้วย 10 % TCA[2] ต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ไม่ได้ตัดมดลูก ใช้หนูจำนวน 18 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

4.1 ศึกษาผลของ progesterone ที่มีต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในตอนปลายระยะของท้องเทียม ($L_{11}$) ฉีด progesterone 15 มิลลิกรัม เข้าใต้ผิวหนัง ( subcutaneous ) ในเช้าวัน $L_{11}$ ( 10.00 น.) ของหนูท้องเทียม และทำ vaginal smear ทุกวัน จนกว่าจะกลับมาอีกวง estrus อีก ใช้หนู 6 ตัว

4.2 ศึกษาผลของการทำลาย endometrium ของมดลูกโดย 10 % trichloroacetic acid (TCA) ที่มีต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในตอนปลายระยะของท้องเทียม ($L_{11}$) หนูกลุ่มนี้ฉีด 10 % TCA เข้าสู่ uterine horn แต่ละข้างตรงบริเวณ utero - tubal junction ข้างละ 0.2 มิลลิลิตรในวัน $L_{11}$ ของหนูท้องเทียม (เวลา 8.00 น. - 10.00 น.) ทำ vaginal smear ทุกวัน จนกระทั่งกลับมามีวง estrus ใหม่ autopsy หนูตอนกลับมามี estrus ครั้งแรก นำมดลูกไปศึกษาลักษณะของ endometrium โดย fix ใน AFA แล้วทำ serial section ใช้หนู 6 ตัว

---

[1] ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 23

[2] ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 27

4.3 ศึกษาผลของการทำลาย endometrium ของมดลูกโดย TCA และ progesterone ที่มีต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในตอนปลายระยะของท้องเทียม ($L_{11}$) หนูกลุ่มนี้ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 4.2 ทุกประการ แตกต่างกันที่ฉีด 10% TCA เข้าสู่ uterine horn ทั้งสองข้าง ฉีด progesterone จำนวน 15 มิลลิกรัมเข้าใต้ผิวหนังด้วย ทำ vaginal smear ทุกวัน และนำมดลูกไปศึกษาลักษณะของ endometrium เมื่อหนูกลับมี estrus ครั้งแรกเช่นเดียวกัน ใช้หนู 6 ตัว

5. ศึกษาผลของ progesterone[1] ที่มีต่อการชักนำให้ non - functional corpora lutea ระยะ late estrus ของหนูที่ถูกตัดมดลูกเปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea ใช้หนูจากกลุ่ม 2.2, 2.3 และ 2.4 ที่กลับมามี estrus ครั้งแรก โดยฉีด progesterone เข้าใต้ผิวหนังในตอนเย็นของวันที่เป็น estrus (16.00 น.) ซึ่งพบว่าเป็นระยะที่มี sensitivity ต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมโดยฉีดฮอร์โมนได้ดีที่สุด (Rothchi[illegible] & Schubert, 1963 ; สิทธิเลิศ, 2509) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

ก. untreated controls ใช้หนู 7 ตัว

ข. 5 มิลลิกรัม ใช้หนู 5 ตัว

ค. 10 มิลลิกรัม ใช้หนู 5 ตัว

ง. 20 มิลลิกรัม ใช้หนู 11 ตัว

ทำ vaginal smear ทุกวัน จนกระทั่งกลับมามีวง estrus ใหม่อีก

---

[1] ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 23

6. ศึกษาผลของ photoperiods ที่มีต่ออายุการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูก หนูกลุ่มนี้ถูกตัดมดลูกออกในวัน $L_0$ เช่นเดียวกับกลุ่ม 2.2 ทันทีที่หนูเหล่านี้ถูกตัดมดลูกออก จัดให้หนูแต่ละกลุ่มได้รับสัดส่วนของแสงสว่างและความมืดในแต่ละวันดังนี้

ก. 1 : 23 (ได้รับแสงสว่าง 9.00 น. – 10.00 น.) ใช้หนู 7 ตัว

ข. 6 : 18 (ได้รับแสงสว่าง 9.00 น. – 15.00 น.) ใช้หนู 7 ตัว

ค. 10 : 14 ใช้หนู 7 ตัว (เป็นหนูกลุ่มเดียวกับกลุ่ม 2.2)

และ ง. 24 : 0 ( constant light) ใช้หนู 6 ตัว

ทำ vaginal smear ทุกวัน จนกว่าจะกลับมาอยู่ในวง estrous

7. ศึกษาผลของการตัดมดลูกระหว่างที่เกิดท้องเทียมโดยให้ลูกอ่อน 6 – 8 ตัวดูดนมตลอดเวลาการทดลอง[1] ที่มีต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ใช้หนูจำนวน 24 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

7.1 Unoperated controls ใช้แม่หนู 10 ตัว บันทึกจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมโดยการทำ vaginal smear

7.2 ตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ (เวลา 9.00 น. – 12.00 น.) ใช้แม่หนู 7 ตัว บันทึกจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมเช่นเดียวกับ 7.1

7.3 ตัดมดลูกในวัน $L_{15}$ (เวลา 9.00 น. – 12.00 น.) ใช้แม่หนู 7 ตัว บันทึกจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมเช่นเดียวกับ 7.1 และ 7.2

---

[1] ยกเว้นหนูทดลองบางตัวได้ถูกแยกลูกอ่อนออกในวัน $L_{22}$ – $L_{23}$

หมายเหตุ

Typical results ของ representative ของแต่ละกลุ่มถูกนำมาตรวจดูการกระจายของ lipid ที่ corpora lutea โดยย้อมสี Sudan Black B. ในวันแรกที่พบ proestrus และ estrus ในกรณีของหนูที่ autopsy ในวัน estrus ได้ถูกนำมาตรวจหาไข่ในท่อนำไข่ด้วย เพื่อตรวจหาว่าในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา จะมีการตกไข่ในวันแรกที่กลับมามี estrus หรือไม่

ผลการทดลอง

1. ผลของการตัดมดลูกในระยะต่าง ๆ ของวง estrus ต่อการรักษาให้ non-functional corpora lutea เปลี่ยนแปลงเป็น functional corpora lutea

จากตารางที่ 1 ก. จะเห็นว่า การตัดมดลูกของหนู ไม่ว่าจะตัดออกในระยะใด ๆ ของวง estrus จะไม่สามารถทำให้ corpora lutea เปลี่ยนสภาพจาก non-function ของวง estrus ไปเป็น functional corpora lutea ของท้องเทียมได้เลย เพราะหลังจากตัดมดลูกออก หนูทดลองทุกตัวจะยังคงมีวง estrus เป็นปกติ ค่าเฉลี่ยของวันที่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ vagina หลังจากผ่าตัดในทุกกลุ่มจะไม่แตกต่างไปจากกลุ่ม control ที่ไม่ได้ตัดมดลูก และจากการติดตามตรวจดู vaginal smear ต่อไปอีกก็ไม่ปรากฏว่าหนูเหล่านี้มีวง estrus ที่ผิดปกติเกิดขึ้นเลย ถึงแม้ทุก ๆ ตัวที่ได้ติดตามจะยังคงมีวง estrus 4 - 5 วันตลอดเวลา

2. ผลของการตัดมดลูกที่มีต่อชีวิตการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียม

จากตารางที่ 1 ง. จะเห็นว่า การตัดมดลูกออกในทันทีทันใดหลังจากการกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมครั้งสุดท้าย ($L_0$) สามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea จากท้องเทียมปกติ 13.2 ± 0.5 วัน ได้เป็น 16.6 ± 0.8 วัน ($P < .01$) ทำนองเดียวกัน การตัดมดลูกในวัน $L_4$ และ $L_{11}$ (เวลา 9.00 น. – 12.00 น.) ของท้องเทียมก็มีผลไม่แตกต่างไปจากตัดมดลูกในวัน $L_0$ เพราะสามารถยืดเวลาของท้องเทียมออกไปเป็น 17.7 ± 0.6 วัน และ 19.4 ± 0.6 วัน ตามลำดับ โดยมีค่าต่างกับท้องเทียมปกตินี้น้อยกว่า .01 ในทั้งสองกรณี แต่การตัดมดลูกในตอนเย็นของ $L_{11}$ (18.00 น. – 20.00 น.) และตอนเช้าของวัน $L_{12}$ (9.00 น. – 12.00 น.) ซึ่งมีจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 15.3 ± 1.6 วัน และ 13.3 ± 0.6 วัน ไม่แตกต่างไปจากหนูท้องเทียมปกติที่ไม่ได้ตัดมดลูกในทางสถิติ ($P > .05$)

ผลของการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ระยะวิกฤตที่การตัดมดลูกจะมีผลยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ได้อยู่ในระหว่าง 12.00 น.–18.00 น. ของวัน $L_{11}$

3. ผลของการฉีด FSH, LH และ prolactin ที่มีต่อ Luteolytic Mechanism ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูกในช่วงเวลาที่ยังสามารถมีผลยืดอายุการทำงานของ corpora lutea ได้

ก. กลุ่มตัดมดลูกในวัน $L_0$

จากตารางที่ 2 ก. จะเห็นว่า การฉีด FSH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง มีค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 18.0 ± 0.5 วัน ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างในทางสถิติกับหนูกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดยาร์โมน

ตารางที่ 1 แสดงผลของการตัดมดลูกในระยะต่าง ๆ ของวง estrus และระยะต่าง ๆ ระหว่างที่เกิดท้องเทียมที่มีต่อการทำงานของ corpora lutea

| กลุ่มของหนูทดลอง | วันที่ตัดมดลูก | จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง | จำนวนวันที่พบเยื่อบุช่องเลือดขาวที่ vagina | |
|---|---|---|---|---|
| | | | พิสัย | ค่าเฉลี่ย ±S.E.[1] |
| ก. ผ่าตัดในระยะต่าง ๆ ของวง estrus | | | | |
| 1 ( Unoperated Controls) | - | 12 | 2-3 | 2.5 ± 0.2 |
| 2 | proestrus | 5 | 2-3 | 2.6 ± 0.1 |
| 3 | estrus | 5 | 2-3 | 2.4 ± 0.2 |
| 4 | diestrus วันที่1 | 6 | 3-3 | 3.0 ± 0 |
| 5 | diestrus วันที่2 | 5 | 2-3 | 2.2 ± 0.3 |
| ข. ผ่าตัดในระหว่างท้องเทียม | | | | |
| 1 ( Unoperated Controls) | - | 9 | 12-15 | 13.2 ± 0.3 |
| 2 | $L_0$(9.00-12.00) | 7 | 17-22 | 18.6 ± 0.8 |
| 3 | $L_4$(9.00-12.00) | 7 | 17-21 | 17.7 ± 0.6 |
| 4 | $L_{11}$(9.00-12.00) | 8 | 17-22 | 19.4 ± 0.9 |
| 5 | $L_{11}$(18.00-20.00) | 6 | 12-20 | 15.3 ± 1.6 |
| 6 | $L_{12}$(9.00-12.00) | 5 | 12-15 | 13.8 ± 0.6 |

หมายเหตุ

[1] เป็น Standard Error ของค่าเฉลี่ย

** แตกต่างกับ control อย่าง significant ที่ $P < .01$

(18.6 ± 0.5 วัน) แตกต่างกัน ( P> 0.05)

สำหรับการฉีด LH วันละ 10 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง ได้ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 15.2 ± 0.7 วัน เร็วกว่าหนูในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 3 วัน (ตารางที่ 2 ก.) ซึ่งถ้าที่แตกต่างกันนี้อยู่ในระดับ significant (.05 > P > .01) จาก การตรวจดูลักษณะภายในรังไข่โดยการย้อมด้วย Sudan Black B. ในวันแรกที่กลับมามี proestrus พบว่า corpora lutea ได้เริ่มเสื่อมสภาพ (รูปที่ 1,2) โดยพบมีการกระจายของ sudanophilic materials ไม่สม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับหนู กลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนในวันเดียวกัน ซึ่งยังคงพบมีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ vagina ในทุก ๆ ตัวในกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน นอกจากนี้ยังพบว่า รังไข่ของหนูกลุ่มที่ฉีด LH 10 ไมโครกรัม ในวัน proestrus มี preovulatory follicles อยู่เป็นจำนวนมากด้วย

การฉีด LH วันละ 10 ไมโครกรัม และ FSH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้องพร้อม ๆ กัน พบว่าจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมลดน้อยลงเหลือเพียง 14.6 ± 0.5 วัน ซึ่งเร็วกว่าหนูในกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 4 วัน (ตารางที่ 2 ก.) และถ้าที่แตกต่างกันอยู่ในระดับ significant (.05> P >.01) เมื่อหนูกลับมามี proestrus ครั้งแรก ภายในรังไข่จะพบ preovulatory follicles และพบมีการเสื่อมของ luteal cells เช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วย LH แต่เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3)

ข. <u>กลุ่มฉีดมดลูกในวัน $L_{11}$</u>

จากตารางที่ 2 ข จะเห็นว่า การฉีด FSH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง มีผลทำให้จำนวนวันที่เกิดท้องเทียมลดลงเหลือ 14.8 ± 1.3 วัน เร็วกว่าหนูในกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 4 วัน

(19.4 ± 0.6 วัน) และค่าแตกต่างนี้อยู่ในระดับ significent (.05> P > .01 ) จากการตรวจดูรังไข่เมื่อหนูกลับมามี proestrus และ estrus ครั้งแรก พบว่าระยะ proestrus ภายในรังไข่จะมี preovulatory follicles (รูปที่ 4) lutein cells เริ่มเสื่อม โดย sudanophilic granules จะกระจายอย่างไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 5,6) เมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนในระยะเดียวกัน ($L_{15}$) ซึ่งยังคงพบมีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ vagina อยู่ ที่น่าสังเกตุก็คือ รังไข่ของกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนก็พบมี follicles ขนาดใหญ่เป็นจำนวนมากด้วย (รูปที่ 7,8,9) เมื่อตรวจดูในระยะ estrus พบมีการตกไข่ ภายในรังไข่มี corpora lutea 2 ชุด คือชุดเก่าของท้องเทียมที่มีขนาดเล็กลงมาก แสดงว่าได้เกิดมี structural luteolysis ขึ้นแล้ว และชุดใหม่ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุดซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ามาก (รูปที่ 10) ภายใน corpora lutea ชุดใหม่ จะพบมี sudanophilic granules อยู่อย่างหนาแน่นมาก (รูปที่ 11, 12) แสดงว่ายังไม่ได้รับการกระตุ้นให้เปลี่ยนสภาพไปเป็น corpora lutea ของท้องเทียม ส่วน corpora lutea ชุดเก่านั้น ขนาดของ corpora lutea เล็กลงมาก แสดงว่าได้เกิด structural luteolysis ขึ้น พบมี sudanophilic granules เหลืออยู่น้อย และรวมกันอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ใกล้ ๆ กับบริเวณของ structure (รูปที่ 13, 14)

สำหรับการฉีด LH วันละ 10 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง พบว่าจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 14.2 ± 1.0 วัน เร็วกว่ากลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 5 วัน (ตารางที่ 2 ข) ค่านี้แตกต่างอยู่ในระดับsignificant (.05 > P > .01) เมื่อนำรังไข่ตอนที่กลับมามี proestrus และ estrus ครั้งแรกมาตรวจดู พบว่า ระยะ estrus จะมีการตกไข่เป็นปกติเช่นเดียวกับ

ในกลุ่มที่ฉีด LH วันละ 20 ไมโครกรัม เข้าช่องท้อง พบว่า จำนวนวันที่เกิดหัวเหลือง 13.6 ± 1.0 วัน เร็วกว่าหนูในกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 6 วัน (ตารางที่ 2 ข) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ significant (P < .01) จากการตรวจดูรังไข่ของหนูที่ถูกสังเวยในวัน proestrus และ estrus ครั้งแรก พบว่าในระยะ proestrus จะมี preovulatory follicles (รูปที่ 15) การกระจายของ sudanophilic granules ภายใน corpora lutea ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัด (รูปที่ 16, 17) ในระยะ estrus จะมีการตกไข่ ลักษณะภายในรังไข่จะมี corpora lutea 8 ถึง ที่ถูกเกาะสีเหลืองเห็นได้ชัด และรูที่เกิดจากการตกไข่รังไข่ทุก (รูปที่ 18) corpora lutea ถูกใหม่ เมื่อเทียบกับครั้งก่อน มีการกระจายของ sudanophilic granules อยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 19) ส่วน corpora lutea ถูกเก่าจะมีสีเหลืองจาง และ sudanophilic granules จะมีอยู่เฉพาะบริเวณขอบของ structure (รูปที่ 20)

ในกลุ่มที่ฉีด prolactin วันละ 250 ไมโครกรัม เข้าช่องท้อง พบว่า จำนวนวันที่เกิดหัวเหลือง 16.3 ± 0.8 วัน ซึ่งจะช้ากว่าหนูในกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 3 วัน (ตารางที่ 2ข) ความแตกต่างนี้อยู่ในระดับ significant (.05 > P > .01) เช่นเดียวกับหนูที่ถูกสังเวยในวัน estrus ครั้งแรก autopsy ดู พบว่า มีการตกไข่ในทุก ๆ ตัวที่ตรวจ

ตารางที่ 2 แสดงผลของ FSH, LH และ prolactin ที่มีต่อ luteolytic mechamism ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูกในช่วงเวลาที่ยังสามารถมีผลยืดกายุการทำงานของ corpora lutea ได้

| กลุ่มหนูทดลอง | treatment[1]/วัน | จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง | จำนวนวันที่พบเซลล์เยื่อในช่องคลอด ในช่วง vagina | |
|---|---|---|---|---|
| | | | พิสัย | ค่าเฉลี่ย ± S.E.[2] |
| ก. ตัดมดลูกในวัน $L_0$ | | | | |
| 1 (Unoperated Controls[3]) | - | 7 | 17-22 | 18.6 ± 0.6 |
| 2 | 20 µg FSH | 8 | 12-19 | 18.0 ± 0.9 |
| 3 | 10 µg LH | 9 | 15-20 | 15.2 ± 0.7* |
| 4 | 20 µg FSH+ 10 µg LH | 8 | 12-16 | 14.6 ± 0.5** |
| ข. ตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ | | | | |
| 1 (Unoperated Controls[3]) | - | 8 | 17-22 | 19.4 ± 0.6 |
| 2 | 20 µg FSH | 9 | 11-18 | 14.8 ± 1.0 |
| 3 | 10 µg LH | 6 | 11-19 | 14.2 ± 1.9 |
| 4 | 20 µg LH | 8 | 11-19 | 13.6 ± 1.0 |
| 5 | 250 µg prolactin | 6 | 15-18 | 16.3 ± 0.6 |

หมายเหตุ

[1] ฉีดฮอร์โมนวันละสองครั้งเริ่มจากเช้า $L_{11}$ จนถึงวันสุดท้ายที่พบเซลล์เยื่อเลือกขาวที่ vagina

[2] เป็น Standard Error ของค่าเฉลี่ย

[3] เป็นค่าอันเดียวกับกลุ่ม 2 และ 4 ของตารางที่ 1 ข. ตามลำดับ

* แตกต่างกับ controls อย่าง significant ที่ $.05 > P > .01$

** แตกต่างกับ controls อย่าง significant ที่ $P < .01$

4. ผลของ Progesterone และ/หรือการทำลาย Endometrium ของมดลูกด้วย 10% TCA ต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ไม่ได้ตัดมดลูก

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า การฉีด progesterone เข้าใต้ผิวหนังในหนูท้องเทียมที่ไม่ได้ตัดมดลูกจำนวน 15 มิลลิกรัมในวัน $L_{11}$ ของท้องเทียมมีจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 14.8 ± 0.05 วัน ซึ่งนานกว่าหนูที่ทำให้เกิดท้องเทียมธรรมดา ( 13.2 ± 0.5 วัน) เพียงประมาณ 1 วัน และไม่แตกต่างกันในระดับ significant ($P < 0.05$) ส่วนการทำลาย endometrium ของมดลูกโดยฉีด 10% TCA เข้า uterine horn ข้างละ 0.2 มิลลิลิตรในเช้าวัน $L_{11}$ มีจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 14.5 ± 0.6 วัน ซึ่งค่าที่ได้นี้ไม่แตกต่างกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดทั้ง progesterone และ TCA ในระดับ significant เช่นเดียวกัน จากการนำมดลูกไปศึกษาทาง histology ในวันที่กลับมามี estrus ครั้งแรก พบว่าสภาพของมดลูกเป็นปกติ คือมีชั้น epithelium และ endometrium อยู่เรียบร้อย (รูปที่ 21H,I) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพของมดลูกที่ถูกทำลายโดย 10% TCA ซึ่งทำ section ของมดลูกหลังฉีด TCA 24 ชั่วโมง พบว่าชั้นของ epithelium ถูกทำลายโดยสิ้นเชิงรวมทั้ง stroma ของชั้น endometrium บางส่วน ส่วน endometrial gland มีลักษณะไม่ healthy ประกอบด้วย low cuboidal cells (รูปที่ 21C,D )

สำหรับการทำลาย endometrium โดย 10% TCA และฉีด progesterone พร้อม ๆ กันในวัน $L_{11}$ พบว่า มีจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 17.3 ± 0.06 วัน ซึ่งค่าที่ได้มากกว่ากลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนประมาณ 4 วัน ( $0.05 > P > 0.01$ ) ดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลของ progesterone และ/หรือการทำลาย endometrium ด้วยน้ำยาหลุกหวย 10 % TCA ต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ไม่ได้ผสมพันธุ์

| กลุ่มหนูทดลอง | treatment ในวัน $L_{11}$ ของท้องเทียม | จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง | จำนวนวันที่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวในช่อง vagina | |
|---|---|---|---|---|
| | | | พิสัย | ค่าเฉลี่ย ± S.E.[1] |
| 1 (Untreated Controls) | - | 8 | 12 - 15 | 13.2 ± 0.5 |
| 2 | 15 mg. progesterone | 6 | 14 - 15 | 14.8 ± .05 |
| 3 | 0.4 ml. 10% TCA | 6 | 13 - 16 | 14.5 ± 0.6 |
| 4 | 15 mg. progesterone + 0.4 ml. 10% TCA | 6 | 17 - 18 | 17.3 ± .06* |

หมายเหตุ

[1] เป็น Standard Error ของค่าเฉลี่ย

* แตกต่างกับกลุ่ม control อย่าง significant ที่ $0.05 > P > 0.01$

5. ผลของ progesterone ที่มีต่อการชักนำให้เกิด non-functional corpora lutea ระยะ late estrus ของหนูที่ถูกตัดมดลูก เปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่า การฉีด progesterone 5 – 10 มิลลิกรัมเข้าใต้ผิวหนัง เวลา 16.00 น. ของวัน estrus ในหนูที่ถูกตัดมดลูก ไม่สามารถยืดเวลาทำงานของ corpora lutea ออกไปได้เกินกว่า 2 – 3 วันของวง estrus ปกติเลย ซึ่งผลนี้เหมือนกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 20 มิลลิกรัม progesterone อาจมีผลยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ออกไปได้นานกว่า 2 – 3 วัน ของวง estrus ปกติได้บ้าง จากหนูทดลอง 11 ตัว โดยจะเพิ่มเป็น 4 – 7 วัน จำนวน 5 ตัว, 8 – 14 วัน จำนวน 1 ตัว และมากกว่า 14 วัน จำนวน 1 ตัว (ตารางที่ 4) ผลของการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า หนูที่ถูกตัดมดลูกไม่ได้ sensitive ต่อ progesterone ในการชักนำให้ non – functional corpora lutea เปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea

ตารางที่ 4 แสดงผลของ progesterone ที่มีต่อการชักนำให้ non-functional corpora lutea ระยะ late estrus ของหนูที่ถูกตัดบกลูกเปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea[1]

| กลุ่มหนูทดลอง | จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง | Progesterone Treatment (mg.) | จำนวนวันที่พบเซลล์เยื่อเคลือบช่อง vagina | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2-3วัน | 4-7วัน | 8-13วัน | > 14วัน |
| 1. (Unoperated Controls) | 7 | - | 7 | - | - | - |
| 2. | 5 | 5.0 | 5 | - | - | - |
| 3. | 5 | 10.0 | 5 | - | - | - |
| 4. | 11 | 20.0 | 4 | 5 | 1 | 1 |

หมายเหตุ

[1] หนูทุกตัวได้รับการฉีด progesterone เข้าใต้ผิวหนังตอนเย็น (16.00 น.) ของวัน estrus

6. ผลของ photoperiods ที่มีต่อการทำงานของ corpora lutea ในระหว่างเทียมที่ถูกตัดมดลูกในวัน D$_0$

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า หนูกลุ่มที่ได้รับแสงสว่าง 1 ชั่วโมงต่อความมืด 23 ชั่วโมง มีจำนวนวันของท้องเทียม 15.3 ± 0.6 วัน เร็วกว่าเวลาที่เกิดท้องเทียมในหนูที่ตัดมดลูก และได้รับแสงสว่างปกติ คือ 14 ชั่วโมงต่อ 1 วัน (16.6 ± 0.8 วัน) เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ซึ่งแตกต่างกันในทางสถิติ (.05 > P > .01) ผลนี้จะได้เช่นเดียวกันกับหนูกลุ่มที่ได้รับแสงสว่าง 6 ชั่วโมงต่อความมืด 18 ชั่วโมง หลังจากผ่าตัด ซึ่งพบจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม

15.3 ± 0.7 วัน สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับแสงสว่างตลอดเวลาหลังจากย้ายคัด พบมีจำนวนวันที่เกิดท้องเฉลี่ยม 17.5 ± 0.6 วัน (ตารางที่ 5) ซึ่งไม่แตกต่าง ในทางสถิติกับกลุ่มของหนูที่อยู่ในแสงสว่างปกติ (P > .05)

เมื่อหนูกลับมามี estrus ครั้งแรก ตรวจดูการตกไข่ที่ต่อมน้ำไข่ พบว่าหนูทุกตัวที่อยู่ในระยะ estrus มีการตกไข่เป็นปกติ

ตารางที่ 5 แสดงผลของ photoperiods ที่มีต่อวายุการสร้างจำ ของ corpora lutea ในหนูท้องเฉลี่ยมที่คัดมาลูกในวัน $L_0$

| กลุ่มหนูทดลอง | photoperiods (แสงสว่าง : มืด) | จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง | จำนวนวันที่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ vagina | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ที่สัย | ค่าเฉลี่ย ± S.E.[1] |
| 1 | 14 : 10 | 8 | 17 - 22 | 18.6 ± 0.8 |
| 2 | 1 : 23 | 7 | 14 - 17 | 15.3 ± 0.6* |
| 3 | 6 : 18 | 7 | 13 - 17 | 15.3 ± 0.7* |
| 4 | 24 : 0 (แสงสว่างตลอดเวลา) | 6 | 16 - 19 | 17.5 ± 0.6 |

หมายเหตุ

[1] เป็นค่า Standard Error ของค่าเฉลี่ย

* แตกต่างกับปกติอย่าง significant ที่ (.05> P >.01

7. ผลของการตัดมดลูกระหว่างที่เกิดท้องเทียมโดยให้ลูกอ่อน 6 – 8 ตัว ดูดนม ที่มีต่อการยืดเวลาทำงานของ corpora lutea

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า การตัดมดลูกของแม่หนูในวัน $L_{11}$ และ $L_{15}$ มีจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 23.8 ± 0.8 วัน และ 22.4 ± 0.9 วัน ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีผลไม่แตกต่างกับจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมในหนูแม่ลูกอ่อนที่ไม่ได้ตัดมดลูก (21.9 ± 0.9 วัน) ($P > .05$)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการตัดมดลูกระหว่างที่เกิดท้องเทียม โดยให้ลูกอ่อน 6 – 8 ตัวดูดนม ที่มีต่อการยืดเวลาทำงานของ corpora lutea

| กลุ่มหนูทดลอง | วันที่ตัดมดลูก | จำนวนหนูใช้ทดลอง | จำนวนวันที่แสดงเซลล์เยื่อเมือกจากช่อง vagina | |
|---|---|---|---|---|
| | | | พิสัย | ค่าเฉลี่ย ± S.E.[1] |
| 1 (Unoperated controls) | -- | 10 | 19 -- 24 | 21.9 ± 0.9 |
| 2 | $L_{11}$ | 7 | 21 - 26 | 23.8 ± 0.8 |
| 3 | $L_{15}$ | 7 | 21 - 23 | 22.4 ± 0.5 |

หมายเหตุ

[1] เป็นค่า Standard Error ของค่าเฉลี่ย

รูปที่ 1,2 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black B. ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมดลูกในวัน $D_1$ วางท้องเทียม $D_{4-5}$ เริ่มฉีด LH วันละ 10 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง section ในระยะที่กลับมามีการตกไข่ครั้งแรก ($L_{1C}$) โปรดสังเกตุการกระจายของ endometrial glands ในเนื้อเยื่อแสดงถึงการเสื่อมของ luteal cells

กำลังขยาย : รูปที่ 1 x 140; รูปที่ 2 x 1400

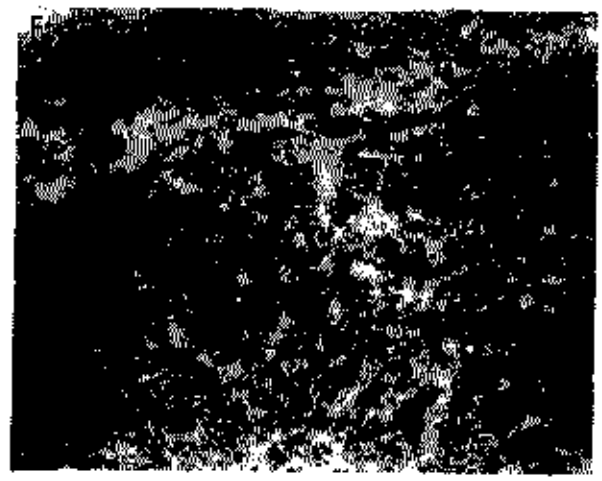
รูปที่ 3 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black B. ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมดลูกในวัน $D_3$ วางท้องเทียม $D_{11}$ เริ่มฉีด PMSI วันละ 20 ไมโครกรัม และ LH วันละ 10 ไมโครกรัมพร้อม ๆ กันเข้าช่องท้อง section ในระยะที่กลับมามี proestrus ครั้งแรก ($D_{14}$) โปรดสังเกตุการเสื่อมของ corpora lutea จะเกิดขึ้นเช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วย $L_{11}$ เพียงอย่างเดียว

กำลังขยาย = 1400

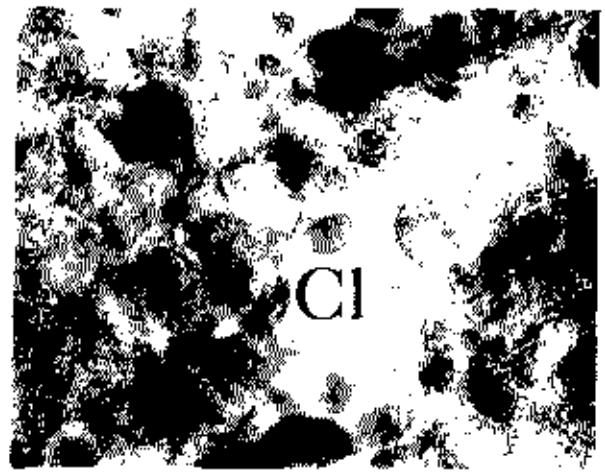
รูปที่ 21 แสดง paraffin section ของมดลูกหนูตัดตาม ขวาง ที่ได้รับการฉีด 10 % TCA เข้า uterine horn ข้างละ 0.2 ml. ในเช้าวัน $L_{11}$ ของท้องเทียม ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin.

รูปที่ 21 A,B แสดงมดลูกหลังจากฉีด TCA 12 ชั่วโมง แสดงส่วน epithelium ทั้งหมด และบางส่วนของ stroma ของ endometrium ทางด้านที่ใกล้กับ utero-tubal junction ที่ถูกทำลาย (รูปที่ 21 A) ส่วนมดลูกบริเวณที่ติดกับ cervix จะพบบางบริเวณของ epithelium ของ endometrium เท่านั้นที่ถูกทำลาย

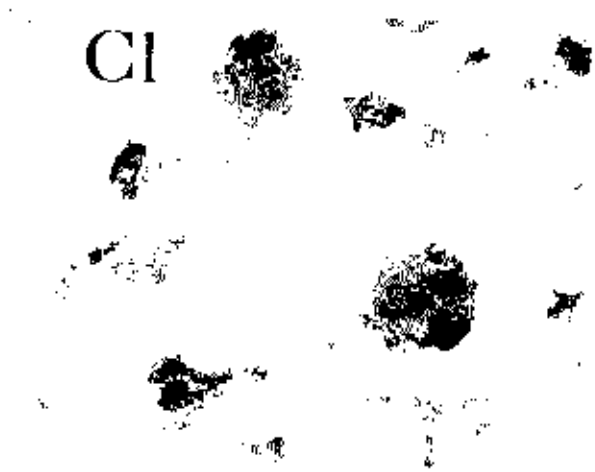
รูปที่ 21 C,D แสดงมดลูกหนูหลังจากฉีด TCA 24 ชั่วโมง แสดงส่วน epithelium ทั้งหมด และบางส่วนของendometrium ถูกทำลาย (รูปที่ 21 C) endometrial gland มีลักษณะไม่สมบูรณ์ ประกอบด้วย low cuboidal cells (รูปที่ 21 D)



1




2




3

I1b088256

รูปที่ 4 – 6 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black ... ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมาดูในวัน $L_{14}$ ของช่วงเลี้ยม $L_{17}$ เริ่มฉีด ... วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง section ในระยะนี้จะมี ... กรั้งแรก ($L_{15}$) โปรดสังเกตภายในรังไข่จะมี preovulatory follicle (รูปที่ 4) sudano philic granules ... ละกระจายไม่สม่ำเสมอ แสดงถึงการเสื่อมของ Lutein cells (รูปที่ 5 และ 6) โปรดสังเกตด้วยว่า ขนาดของ sudanophilic granules ใน Lutein cells มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่เกิดด้วย $L_{12}$ และ $L_{13}$ (รูปที่ 2 และ 3) มาก ทั้ง ๆ ที่เป็นวันแรกที่พบ nucleated cells ที่ ... ด้วยกัน

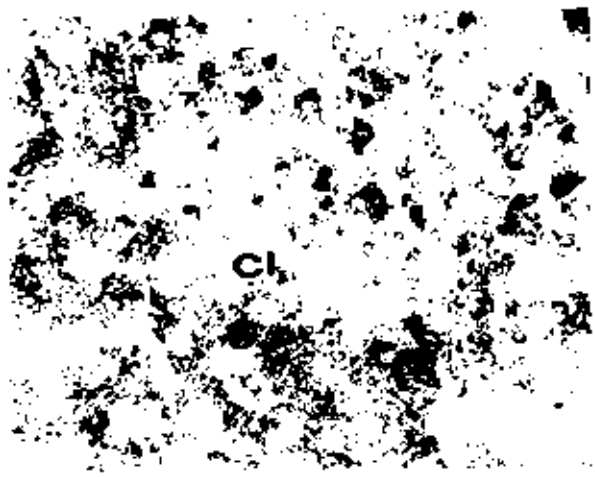
กำลังขยาย : รูปที่ 4 x 140, รูปที่ 5 x 560, รูปที่ 6 x 1400

รูปที่ 7 – 9 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black ... ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมาดูในวัน $L_{17}$ ของช่วงเลี้ยม section ในวัน $L_{15}$ ซึ่งยังคงพบมีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ vagina อยู่ โปรดสังเกตจะพบมี follicle ขนาดใหญ่ (รูปที่ 7) sudanophilic granules ภายใน corpus luteum มีขนาดเล็ก และมีการกระจายสม่ำเสมอ แสดงว่า ยังไม่ได้เริ่มเสื่อม functional lutecytes (รูปที่ 8,9) โปรดเปรียบเทียบกับรูปที่ 2, 3, 5 และ 6

กำลังขยาย : รูปที่ 7 x 140, รูปที่ 8 x 560, รูปที่ 9 x 1400

4

7




5

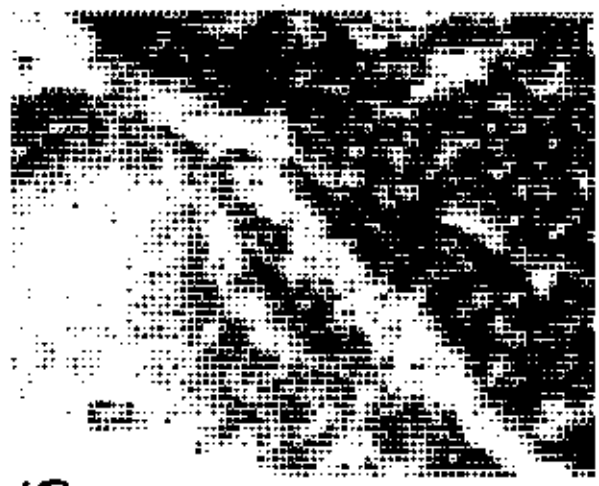
8

6

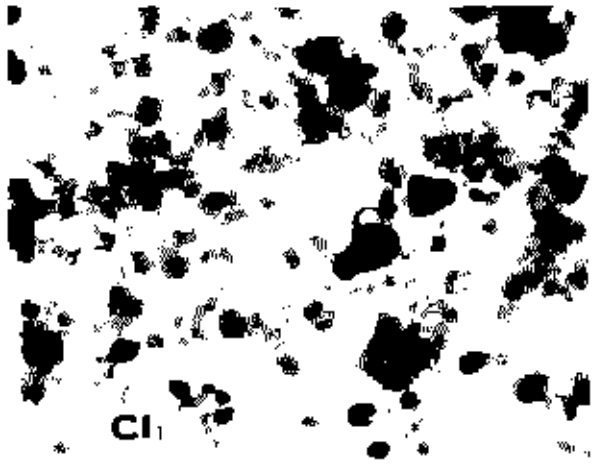
9

รูปที่ 10 - 14 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black B. ของรังไข่หนูที่ถูกตัดตลูกในวัน $L_{11}$ ของห้องเทียม เริ่ม $L_{11}$ ฉีด FSH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง section ในระยะที่กลับมามี estrus ครั้งแรก ($L_{16}$) โปรดสังเกตภายในรังไข่มี corpora lutea 2 ชุด (รูปที่ 10) คือชุดเก่าของห้องเทียม และชุดใหม่ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุด ภายใน corpora lutea ชุดใหม่ จะพบมี sudanophilic granules อยู่อย่างหนาแน่นมาก ส่วน corpora lutea ชุดเก่ามีขนาดลดลงมาก ซึ่งแสดงว่าได้เกิดมี structural luteolysis ขึ้น ลักษณะของการกระจายของ sudanophilic granules ใน corpora lutea ชุดเก่า พบเป็นกลุ่ม ๆ เฉพาะบริเวณขอบนอกของ structure รูปที่ 11 และ 12 ขยายให้เห็นเฉพาะส่วนหนึ่งของ corpora lutea ชุดใหม่ เพื่อแสดงความหนาแน่น และกระจายกันอยู่อย่างไม่เสมอของ sudanophilic materials ส่วนรูปที่ 13 และ 14 แสดงบริเวณขอบนอกของ corpora lutea ชุดเก่า แสดงการรวมกลุ่มของ sudanophilic granules

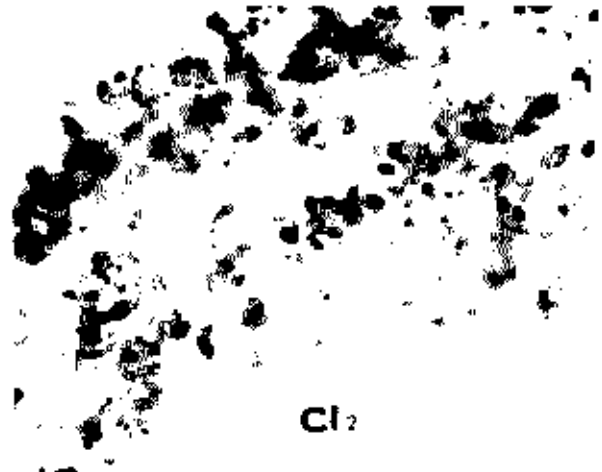
กำลังขยาย : รูปที่ 10 x 140 , รูปที่ 11 x 560,
รูปที่ 12 x 1400
รูปที่ 13 x 560 , รูปที่ 14 x 1400



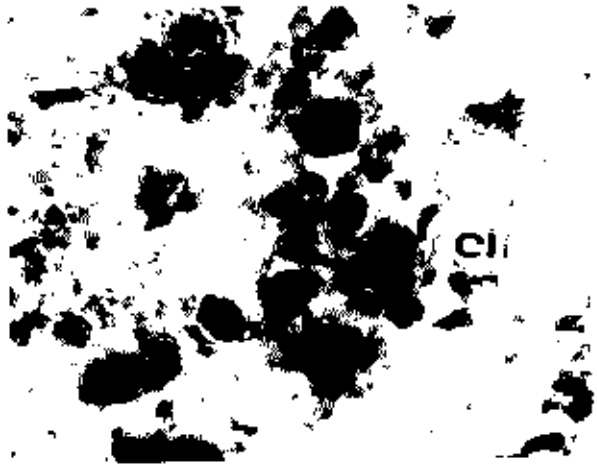
10



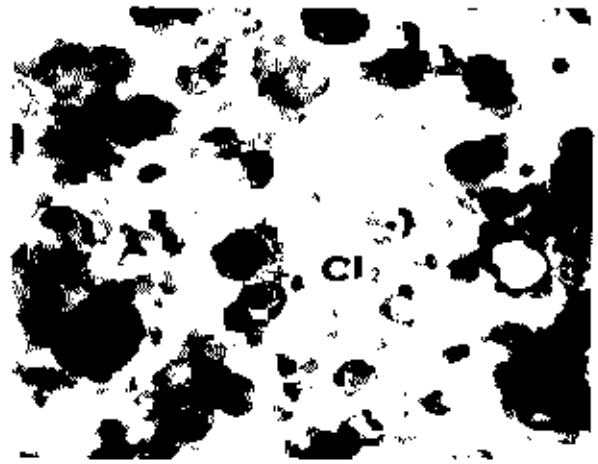

11




13




12




14

รูปที่ 15 - 17 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black B. ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ ของท้องเทียม $L_{11}$ เริ่มฉีด LH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง section ในระยะที่กลับมามี proestrus ครั้งแรก ($L_{15}$) โปรดสังเกตภายในรังไข่จะมี preovulatory follicles จำนวนมาก (รูปที่ 15) การกระจายของ sudanophilic granules ภายใน corpora lutea ไม่สม่ำเสมออย่างเห็นได้ชัด แสดงถึงการเริ่มมี functional luteolysis (รูปที่16,17)

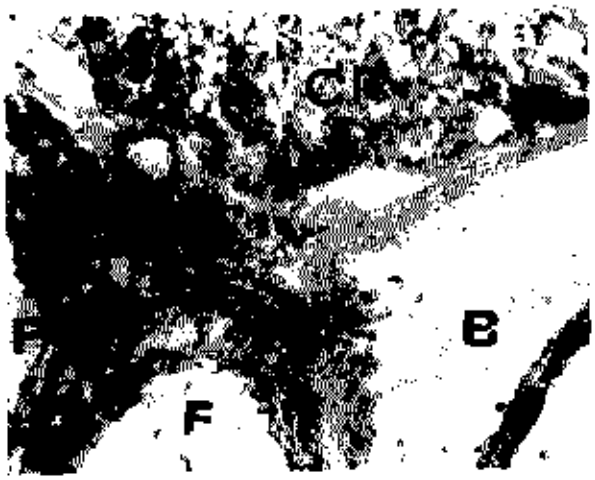
กำลังขยาย : รูปที่ 15 x 140, รูปที่ 16 x 560
รูปที่ 17 x 1400

รูปที่ 18 - 20 cryostat section ย้อมด้วยสี Sudan Black B. ของรังไข่หนูที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ ของท้องเทียม $L_{11}$ เริ่มฉีด LH วันละ 20 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง section ในระยะที่กลับมีestrus ครั้งแรก ($L_{16}$) โปรดสังเกต ภายในรังไข่มี corpora lutea 2 ชุด คือชุดเก่าของท้องเทียม และชุดใหม่ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุด (รูปที่ 18 ) corpora lutea ชุดใหม่มีขนาดใหญ่ การกระจายของ sudanophilic granules มีอยู่อย่างหนาแน่นมาก (รูปที่ 19 ) ส่วน corpora lutea ชุดเก่ามีขนาดลดลงมาก และ sudanophilic granules จะพบอยู่เฉพาะบริเวณรอบของ corpora lutea (รูปที่ 20 )

กำลังขยาย : รูปที่18 x 140 , รูปที่19 x 1400, รูปที่20x1400

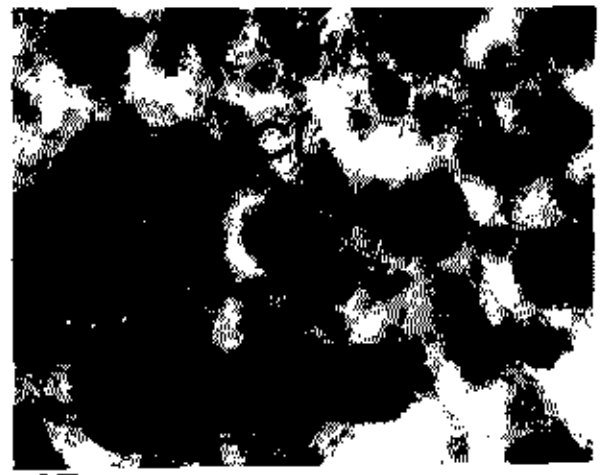
อักษรย่ออธิบายรูป :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| A | = | Antrum | F | = | Follicle |
| B | = | Blood Vessel | G | = | Granulosa Cells |
| Cl | = | Corpus luteum | I | = | Interstitial Tissue |
| $Cl_1$ | = | Corpora lutea ชุดเก่า | S | = | Sudanophilic Granules |
| $Cl_2$ | = | Corpora lutea ชุดใหม่ | T | = | Thecal Tissue |

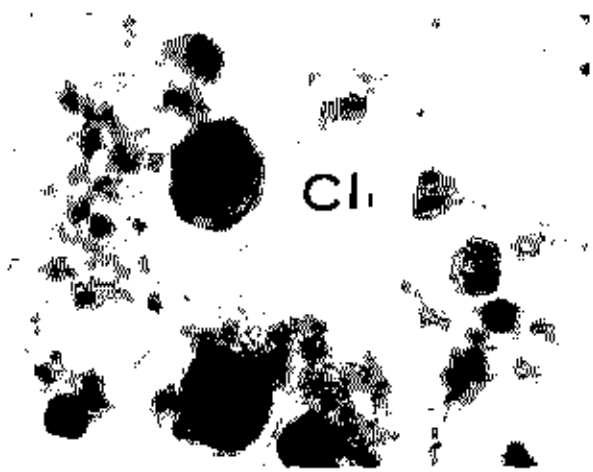



16

18



19




17

20

21A

21C

21B

21D

รูปที่ 21 E-G แสดงมดลูกหลังฉีด TCA 48 ชั่วโมง แสดงส่วนที่มีการซ่อมแซมของ epithelium โปรดสังเกตด้าน antimesometrium (ant.) มีการซ่อมแซมเร็วกว่าด้าน mesometrium (me) (รูปที่ 21 E) มีการแบ่งเซลแบบ mitosis ที่บริเวณที่มีการซ่อมแซม (รูปที่ 21 F,G)

รูปที่ 21 H,I แสดงมดลูกหนูหลังฉีด TCA 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นคอนกลับมี estrus ครั้งแรก แสดง epithelium ของมดลูกกลับอยู่ในสภาพ hypertrophy (รูปที่ 21 H) แต่เซลล์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ endometrial gland ยังมีลักษณะไม่สมบูรณ์และไม่แตกต่างไปจากระยะหลังฉีด TCA 24 ชั่วโมง ซึ่งมีการทำลาย epithelium ของendometrium ในรูปที่ 21 D

โปรดสังเกตด้วยว่า มดลูกระยะที่กลับมามี estrus ครั้งแรก ไม่มี mitosis ปรากฏให้เห็นอยู่เลย

กำลังขยาย : รูปที่ 21 C, E x 140

รูปที่ 21 A,B,D,F,G,H,I x 560

อักษรย่ออธิบายรูป :

ant. = antimesometrial portion of the uterus

de = damaged epithelium

e = epithelium

g = endometrial gland

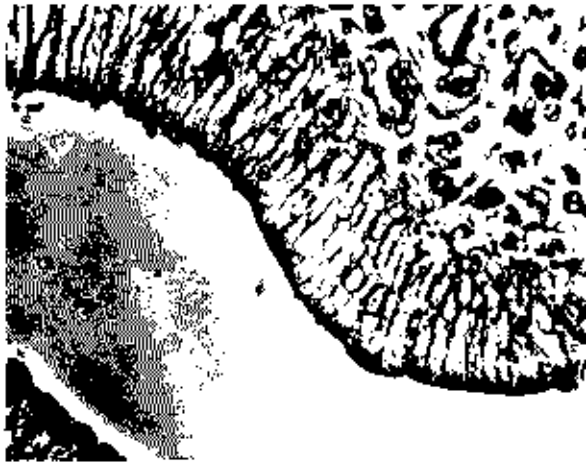
m = mitosis

me = mesometrial portion of the uterus

s = uterine stroma

21E

21F



21H

21G

21I

## วิจารณ์ผล

### ก. การตัดมดลูกระหว่างวง estrus

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 1 ก) จะเห็นว่าการตัดมดลูกในระยะต่างๆ ของวง estrus ไม่สามารถที่จะเปลี่ยน corpora lutea ที่อยู่ในสภาพ non-functional ให้เป็น functional corpora lutea ของท้องเทียมได้เลยไม่ว่าจะผ่าตัดในระยะใดก็ตาม ผลที่ได้เป็นการยืนยันรายงานของ Long & Evans, 1922; Bradbury, 1937; Hechter, Graenkel, Lev,& Soskin, 1940; Alloiteau & Vignal, 1958 ซึ่งพบว่าการตัดมดลูกไม่สามารถชักนำให้เกิดท้องเทียมได้เลยในสัตว์ประเภทนี้ ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามดลูกไม่ได้สร้างสารที่มีผลทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมต่อการรักษาให้เกิดท้องเทียมแต่อย่างไร

### ข. การตัดมดลูกระหว่างท้องเทียม

การตัดมดลูกในหนูท้องเทียมในเช้าวัน $L_0$, $L_4$ และ $L_{11}$ (9.00 น. - 12.00 น.) สามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ของท้องเทียมปกติไปประมาณ 6 วัน ซึ่งผลการทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับ Bradbury, Brown & Gray (1950) ซึ่งตัดมดลูกในวันที่ 4 และ 6 ของท้องเทียม ทำให้ corpora lutea สามารถยืดเวลาทำงานออกไปได้นาน 18 วัน เทียบกับ 12 วันของท้องเทียมธรรมดา และผลของ McIlmoyl, Anderson & Kragt (1964) ที่พบว่าเมื่อตัดมดลูกของหนูท้องเทียมในวัน $L_5$ $L_9$ และ $L_{11}$ ทำให้ corpora lutea ยืดเวลาทำงานออกไปประมาณ 6 - 7 วัน อย่างไรก็ตามเวลาท้องเทียมที่พบหลังจากตัดมดลูกระหว่าง $L_0$ กับเช้าวัน $L_{11}$ น้อยกว่าผลของ Butcher,(1969) ซึ่งได้ทำการตัดมดลูก

ในวัน $L_7$ ของท้องเทียม และพบว่า corpora lutea ยืดอายุการทำงานได้นานถึง 23.6 วัน ซึ่งนับได้ว่าเป็นระยะท้องเทียมที่นานที่สุดที่เคยมีรายงานใน rats ที่ถูกตัดมดลูกในระหว่างท้องเทียม สิ่งที่น่าสังเกตก็คือ Butcher ผู้นำให้เกิดท้องเทียมโดยให้ตัวเมียผสมกับตัวผู้ที่ถูกตัด vas deferens ออก ( vasectomized male) หนูที่ใช้เป็นพันธุ์ Holtzman ซึ่งมีน้ำหนักตัวมากถึง 250 -300 กรัม และเขาพบว่าเมื่อหนูนั้นถูกทำให้เป็นแผล ( trauma) ตรงบริเวณสีข้างของตัวจะทำให้ช่วงของท้องเทียมลดต่ำลงมาเหลือเพียง 19.0 วัน ซึ่งมีค่าคัดเทียมกับช่วงของท้องเทียมกับที่ได้จากการตัดมดลูกระหว่างเช้าวัน $L_0$ ถึง $L_{11}$ ของการทดลองนี้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า strain และอายุของหนู, วิธีชักนำให้เกิดท้องเทียม และแม้แต่การผ่าตัดที่ไม่เหมือนกัน อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ระยะของท้องเทียมแตกต่างกันได้ สำหรับผลการตัดมดลูกในตอนเช้าวัน $L_{12}$ ( 9.00 น. - 12.00 น.) พบว่าจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมจะไม่แตกต่างกับหนูท้องเทียมปกติในทางสถิติ คือ 13.8 วัน เมื่อเทียบกับ 13.2 วันของ control ที่ไม่ได้ตัดมดลูก ส่วนการตัดมดลูกในตอนเย็นวัน $L_{11}$ ( 18.00 น. - 20.00 น.) จำนวนวันที่เกิดท้องเทียม 15.3 วัน อยู่ในระหว่างการตัดมดลูกในเช้าวัน $L_{11}$ ( 19.4 วัน) และในตอนเช้าวัน $L_{12}$ ( 13.8 วัน) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า ระยะวิกฤตที่การตัดมดลูกมีผลต่อการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea อยู่ในระหว่างเวลา 12.00 น. - 18.00 น. ของวัน $L_{11}$ ของท้องเทียม

เนื่องจากการตัดมดลูกในหนูไม่ได้มีผลโดยตรงต่อ corpora lutea ที่ไม่ถูกกระตุ้น ( non-functional corpora lutea) จะมีผลก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมน progesterone ก่อนเท่านั้นจึงจะสามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ได้นานกว่าหนูท้องเทียมธรรมดา ข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับผลของการตัดมดลูกที่มีต่อ corpora lutea

ในหนูอาจเป็นได้ดังนี้คือ. 1) การตัดมดลูกไปลด metatolism ของฮอร์โมน progesterone ที่ corpora lutea สร้าง ทำให้ระดับ progesterone ที่ไป feedback ที่ hypothalamus และ anterior pituitary เริ่มสูงขึ้น เป็นผลให้ยืดเวลาการปล่อย prolactin จากต่อมใต้สมองออกมาในระดับสูงต่อไปอีก ( Rothchild, 1962b; Rothchild & Schubert, 1963; de Jongh & Walthius, 1964 และ 2) การตัดมดลูกนอกจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ progesterone แล้วยังเป็นการกำจัด uterine secretion ซึ่งเชื่อว่ามาจาก endometrium ( Nelampy , Anderson & Kragt , 1964 ) ที่อาจมีบทบาทในการควบคุมการปล่อย luteolytic agent (s) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าได้ ( Eechter, Fraenkel, Lev & Soskin, 1940; Rothchild, 1965b)

สำหรับสัตว์ห้องเที่ยมโดยปล่อยให้ลูก 6 - 8 ตัวดูดนมตลอดเวลานั้น ระยะของห้องเที่ยมก็นเวลานานมากถึง 19 - 24 วัน การตัดมดลูกไม่ว่าจะตัดในวัน $L_{11}$ หรือ $L_{15}$ ของห้องเที่ยมไม่อาจที่จะยืดเวลาของห้องเที่ยมให้นานไปกว่านี้ได้อีกเลย แสดงว่า suckling เป็น stimulus ที่แรงที่สุดในการยับยั้งไม่ให้ต่อมใต้สมองหลั่ง luteolytic factor (s) ออกมาเป็นปริมาณเพียงพอที่จะป้องกันไม่ให้เกิด luteolysis เร็วเกินไปได้ แต่ทราบใดที่ hypothalamus และต่อมใต้สมองส่วนหน้ายังติดต่อถึงกันได้โดยทาง hypophyseal portal blood vessel เป็นปกติแล้ว สำสังการตัดมดลูกและ suckling ยังไม่เพียงพอที่จะไปยืดเวลาการหลั่ง luteolytic agent (s) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าได้เกิน 19 - 24 วัน หลักฐานที่ได้ครั้งนี้ สนับสนุน statement ของ Rothchild (1962a) และ Sheleanyak (1962) ที่กล่าวว่า corpora lutea มีชีวิตการทำงานอันจำกัด เราไม่สามารถยืดเวลาการทำงานของมันให้นานออกไปกว่ากำหนดที่ควรจะเป็นได้

## ก. การตัดมดลูกและฮอร์โมนที่มีผลต่อ Luteolysis

ในกรณีผลของการฉีดฮอร์โมน LH, FSH และ prolactin ในระยะใกล้วิกฤตก่อนที่ corpora lutea ของท้องเทียมจะเกิด functional luteolysis ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูก (ตารางที่ 2 ) จะเห็นว่า FSH แต่เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถทำให้เกิด luteolysis ได้เร็วกว่าสัตว์กลุ่ม control เมื่อเริ่มฉีดฮอร์โมนในวัน $L_{11}$ ถ้าหนูนั้นถูกตัดมดลูกในวัน $L_0$ ทั้ง ๆ ที่ LH และ LH + FSH ในหนูที่ถูกตัดมดลูกในวันเดียวกันจะสามารถทำให้เกิด luteolysis ได้ ส่วนในกลุ่มของหนูทดลองที่ท้องเทียมและถูกตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ และเริ่มฉีดฮอร์โมนในวัน $L_{11}$ ด้วย พบว่าทั้ง FSH (20 µg ) และ LH (10-20µg) จะมีผลทำให้เกิด luteolysis ได้ สามารถพิสูจน์ได้ทั้งจากการทำ vaginal smear และเปรียบเทียบแบบของการกระจายของ sudanophilic granules (รูปที่ 1 - 9) โดยที่ sudanophilic granules จะกระจายอย่างไม่สม่ำเสมอ และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เมื่อเทียบกับ corpora lutea ในหนูที่ถูกตัดมดลูกออกในเวลาเดียวกัน แต่มีการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ออกไปให้นานกว่ากลุ่มที่ถูกฉีดด้วย FSH & LH ซึ่งพบว่า ขณะที่ corpora lutea กำลัง function จะพบมี sudanophilic granules ขนาดเล็กและมีการกระจายของ granules สม่ำเสมอกว่ากลุ่มที่เกิด functional luteolysis ( Deane, 1952; Zeilmaker & Carlaem, 1962; Lobel, Shelesnyak & Tic, 1966) และจากการตรวจ พบว่าหนูทดลองทุกตัวที่กลับมามี estrus ครั้งแรกมีการตกไข่ แสดงให้เห็นว่า เกิด luteolysis ขึ้นอย่างแน่นอน ผลการทดลองนี้จึงอธิบายได้ว่า luteolytic agents ใน rats ไม่ได้มาจาก secretion ของมดลูกโดยตรงแต่มาจากต่อมใต้สมอง (Rothchild, 1965b; Butcher, 1969) การที่ LH มีผลทำให้เกิด

luteolysis ได้ดีที่สุดเป็นการยืนยันผลงานของ Greep (1938),,Rothchild, (1965a) และ Rothchild,& Schwartz (1965) ซึ่งพบว่า LH ของ rats เป็น luteolytic agent จากต่อมใต้สมองที่สำคัญที่สุด นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า FSH อาจมีส่วนร่วมในการทำให้เกิด luteolysis ด้วยเช่นกัน โดยจะทำหน้าที่ได้ดีที่สุดเมื่อมี LH อยู่ด้วย ( Greep, 1938; Alloitcau, Acker & Courrier, 1969) การที่ FSH ปริมาณเท่ากัน (20 µg) ไม่อาจมีผลต่อสัตว์ทดลองที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_0$ ทั้ง ๆ ที่เริ่มฉีด FSH ในวันเดียวกัน ($L_{11}$) กับสัตว์ที่ถูกตัดมดลูกในเช้าวัน $L_{11}$ อาจเป็นไปได้ว่า เช้าวัน $L_{11}$ ของหนูทดลองเป็นระยะวิกฤต ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีการตกไข่ ( Iobel, Tic & Shelesnyak,1965) อาจเริ่มมีการหลั่ง LH ออกมาจากต่อมใต้สมอง (Schwartz & Rothchild, 1964) และ LH ที่หลั่งออกมานี้อาจไปมีผลกระตุ้นให้รังไข่ปล่อย progesterone ไป maintain การเสื่อมสลายของ decidualization[1] ในสัตว์ทดลองที่ถูกรังต่อมใต้สมองออกในวัน $L_{11}$ ได้นานกว่าปกติ

---

[1]decidualization เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ขณะที่อยู่ในระยะ progestation โดยเกิดมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ชั้น mucosa ของมดลูก โดยเซลล์ที่บริเวณนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและรูปร่าง มักจะเกิดมี mitosis ที่ไม่สมบูรณ์ทำให้เซลล์เหล่านี้มี nuclei มากกว่า 1 อัน และมีขนาดใหญ่มากกว่าเซลล์ปกติ ตัวกระตุ้นการเกิด decidualization ในสัตว์ตั้งครรภ์ก็คือไข่ที่ถูกผสมแล้ว ส่วนในสัตว์ทดลองจะเกิดจากการกระตุ้นอื่น ๆ เช่น การทำให้ endometrium เกิดแผล ( trauma) หรือฉีด oil เข้าไปใน lumen ของมดลูก

ส่วนการที่ FSH ไม่มีผลในสัตว์ที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_0$ นั้นน่าจะเป็นด้วยการตัดมดลูกตั้งแต่เริ่มต้นของท้องเทียมสามารถมีผลไปยับยั้ง luteolytic agent จากต่อมใต้สมอง (LH) ไม่ให้หลั่งออกมาได้เร็วเหมือนสัตว์ท้องเทียมปกติ ( Rothchild, 1965b ) ยิ่งไปกว่านั้น การที่พบว่า ถ้าฉีดทั้ง FSH และ LH เข้าไปพร้อม ๆ กัน สามารถช่วยเร่งการเกิด luteolysis ได้ในสัตว์ที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_0$ เป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่า ถ้าฟัง FSH อย่างเดียวไม่สามารถทำให้เกิด luteolysis ในสัตว์ชนิดนี้ได้

นับเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่พบว่า prolactin สามารถทำให้เกิด luteolysis ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_{11}$ ฮอร์โมนนี้ใน rats มีรายงานว่า นอกจากจะเป็น luteotrophic hormone ( Astwood & Fevold, 1939; Astwood, 1941; Evans & Lyons, 1941) แล้วยังสามารถมีผลทำให้เกิด structural luteolysis ในสัตว์ที่ถูกตัดต่อมใต้สมองไปด้วย ( Malven & Sawyer, 1966) เข้าใจว่าภายหลังจาก corpora lutea เกิด functional luteolysisโดยฮอร์โมนอื่น ๆ แล้ว prolactin จะมีบทบาทสำคัญในการที่จะทำให้เกิด structural luteolysis ( Malven, Cousar & Row, 1968; Malven, 1969; Malven & Francis, 1969) ดังนั้นจึงน่าที่จะเป็นไปได้ว่าการตัดมดลูกในเช้าวัน $L_{11}$ ไม่ได้ห้ามการเกิด functional luteolysis โดยสิ้นเชิง เนื่องจากได้เริ่มเกิดมี endogenous release ของ LH จากต่อมใต้สมอง และการที่สัตว์ที่อยู่ในสภาพเช่นนี้ได้รับ prolactin(Schwartz&Rothchild,1964)ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงมาก ( 250 ug / วัน) จึงมีผลช่วยเร่งให้มี luteolysis ได้เร็วกว่าสัตว์ที่ถูกตัดมดลูกแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งจะได้รับเฉพาะ endogenous prolactin เท่านั้น สำหรับสาเหตุที่ prolactin ทำให้เกิด luteolysis ช้ากว่าสัตว์ท้องเทียมปกติเล็กน้อย ( $0.05 > P > 0.01$) อาจเนื่องมาจาก

1) การตัดมดลูกในเช้าวัน $L_{11}$ มีผลไปห้ามการหลั่ง LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่จำเป็นที่จะทำให้เกิด functional luteolysis โดยสมบูรณ์ 2) คุณสมบัติของ prolactin เองที่เป็นทั้ง luteotrophic ( Astwood & Fevold, 1939; Astwood, 1941, Evans & Lyons, 1941) และ luteolytic ( Malven & Sawyer, 1966)

ง. Photoperiods กับการเกิด luteolysis ในสัตว์ที่ตัดมดลูก

จากผลของ photoperiods ที่มีต่ออายุการทำงานของ corpora lutea ในหนูท้องเทียมที่ถูกตัดมดลูกในวัน $L_9$ พบว่า กลุ่มที่อยู่ในแสงปกติ (14 ชั่วโมงต่อวัน) มีระยะการเกิดท้องเทียม ( 18.6 วัน) ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ให้แสงตลอดเวลา ( 17.5 วัน) ส่วนกลุ่มที่ได้รับแสงสว่างวันละ 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง การเกิด luteolysis จะเร็วขึ้น มีผลทำให้ระยะของการเกิดท้องเทียมสั้นขึ้นประมาณ 2 - 3 วัน (15.3 วัน) ระยะท้องเทียมของสัตว์ที่ได้รับแสงสว่างวันละ 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง สั้นกว่ากลุ่มที่ได้รับแสงสว่างวันละ 14 และ 24 ชั่วโมง โดยมีค่าแตกต่างกันในทางสถิติ ( $0.05 > P > 0.01$) แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของแสงสว่างในแต่ละวันมีผลอย่างสำคัญในการเกิด Luteolysis ผลอันนี้นับว่าสำคัญยิ่ง เพราะบอกให้เราทราบได้ว่า การตัดมดลูกจะมีผลยืดเวลาของ luteolysis ได้ดีที่สุดก็ต่อเมื่อมีชั่วโมงของแสงสว่างต่อ 1 วัน สูงเท่านั้น คืออย่างน้อยที่สุดจะต้องได้รับแสงสว่างสูงกว่าวันละ 6 ชั่วโมง จึงจะมีผลยืดเวลาทำงานของ corpora lutea ได้

Everett (1942, 1964) พบว่าหนูที่ถูกปล่อยให้ได้รับแสงสว่างตลอดเวลาจะ response ต่อการเกิด persistent vaginal cornification[1] syndrome ไม่เหมือนกัน คือหนูอายุประมาณ 2 เดือน จะกินเวลาที่จะ response นานถึง 20 - 40 วัน ส่วนหนูอายุ 6 - 8 เดือนจะกินเวลาเพียง 10 วันเท่านั้น ในการทดลองครั้งนี้ หนูที่ใช้มีอายุอยู่ในระหว่าง 2 - 3 เดือน และเวลาที่ปล่อยให้ได้รับแสงสว่างน้อยเพียง 15 - 20วันเท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า แสงสว่างที่ได้รับในช่วงระยะเวลาดังกล่าวไม่เพียงพอที่จะทำให้หนูที่ถูกตัดมดลูกเกิด persistent vaginal cornification syndrome ได้

---

[1] persistent vaginal cornification คือปรากฏการณ์ที่สัตว์เพศเมียพวก rats, mice, ferrets มี cornified cells หลุดออกมาจาก vaginal epithelium ตลอดเวลา เนื่องมาจากมีการสร้าง estrogen ออกมาจากรังไข่ในปริมาณสูงมาก ปรากฏการณ์เช่นนี้สัตว์จะไม่มี heat และไม่สามารถตกไข่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการผิดปกติขึ้นที่สมองบริเวณ hypothalamus เป็นผลให้ไม่สามารถหลั่ง neurohormone ชนิด Lutinizing Hormone Releasing Factor ได้มากเพียงพอที่จะไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่ง LH เพียงพอที่จะทำให้เกิดการตกไข่ได้ แต่จะมีการหลั่ง Follicle Stimulating Hormone Releasing Factor ออกมามากกว่าปกติทำให้ต่อมใต้สมองหลั่ง FSH ออกมาสูงกว่า LH เกิดมีการสร้าง cystic follicles ที่รังไข่และมีการสร้าง estrogen ในปริมาณสูงมาก syndrome เช่นนี้อาจกระตุ้นให้เกิดได้โดยปล่อยให้สัตว์ทดลองได้รับแสงสว่างติดต่อกันนาน ๆ หรือฉีด Testosterone เข้าไปป้องกันไม่ให้มี differentiation ของ preoptic & suprachiasmatic complex ในตอนแรกเกิด หรือปล่อยกระแสไฟฟ้าทำลายที่บริเวณ preoptic & suprachiasmatic complex

เป็นที่ทราบกันดีว่า การเกิด persistent vaginal cornification syndrome เป็นผลเนื่องจากการไม่สมดุลย์ของการหลั่งฮอร์โมน FSH และ LH จากต่อมใต้สมองโดยจะมีการหลั่ง FSH ออกมาในอัตราส่วนที่สูงกว่า LH มาก ( Flerko, 1962, 1963) ทำให้ไม่สามารถมีการตกไข่ และ follicles ภายในรังไข่จะถูกเปลี่ยนสภาพจากขนาดปกติเป็น cystic follicles[1] เป็นจำนวนมาก ถ้ายอมรับว่า LH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญที่สุดในการที่ทำให้เกิด lutcolysis อาจจะสันนิษฐานได้ว่า สัตว์ทดลองกลุ่มนี้ได้รับแสงสว่างในแต่ละวันสูงมาก แสงสว่างมีผลต่อ neuroendocrine mechanism โดยเริ่มจาก impulse ผ่าน optic nerve เข้าสู่ศูนย์ภายใน hypothalamus บริเวณ supraoptic nucleus และ preoptic area ( Fiske & Greep, 1959) ไป postpone การปลอย neurohormone ที่จำเป็นสำหรับกระตุ้นการหลั่งของ LH ในบริเวณมากพอที่จะทำให้เกิดการตกไข่ และเกิด functional luteolysis แต่ถ้าสัตว์นั้นได้รับแสงสว่างแต่ละวันเพียง 6 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า ผลดังกล่าวจะมีน้อยมาก ดังนั้นจึงทำให้สัตว์ที่มีฝูงลูกที่ได้รับแสงสว่างน้อยไปอาจที่จะยืดเวลาของการทำงานของ corpora lutea ได้นานเท่ากับสัตว์ที่ถูกจัดมีฝูงลูกที่ได้รับแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมงขึ้นไป

---

[1]cystic follicles คือ follicles ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมียทุกชนิดรวมทั้งคน ซึ่งมี reproductive cycle ไม่ปกติ และ sterile มีขนาดโตกว่า follicles ที่ตกไข่ปกติ ภายในไม่มีไข่ มี antrum กว้าง มี granulosa cells น้อยหรือไม่มีเลย

จ. การทำลาย Endometrium และ/หรือการฉีด Progesterone ในระยะใกล้จะสิ้นสุดท้องเทียม

การทดลองนี้ก็เพื่อที่จะตอบปัญหาที่ว่า การทำลาย endometrium ด้วย TCA ในระยะก่อนสิ้นสุดท้องเทียม จะมีผลต่อการยืดเวลาท้องเทียมให้ยาวนานเกินกว่าหนูที่ไม่ได้ผสมพันธุ์หรือไม่เพียงไร นอกจากนี้ยังต้องการจะศึกษาว่า progesterone มีบทบาทยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ไว้ในสภาวะที่ endometrium ถูกทำลาย และไม่ถูกทำลายโดย TCA จะแตกต่างกันอย่างไร ผลการทดลอง (ตารางที่ 3 ) แสดงให้เห็นว่า สำหรับการทำลาย endometrium โดยฉีด 10% TCA หรือฉีด 15 mg progesterone แต่เพียงอย่างเดียวทั้งสองกรณีไม่สามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea แตกต่างไปจากท้องเทียมปกติถึงระดับสำคัญในทางสถิติ ( 14.5 วัน และ 14.8 วัน เทียบกับ 13.2 วัน) อย่างไรก็ตามการฉีด progesterone พร้อมกับการทำลาย endometrium โดย TCA จะทำให้ corpora lutea สามารถยืดเวลาการทำงานออกไปได้ดีเทียบกับการผสมพันธุ์ในวัน $L_{11}$ ( 17.3 วัน) และมีความแตกต่างกันในทางสถิติกับหนูกลุ่มท้องเทียม control ( 13.2 วัน) ผลอันนี้แสดงให้เห็นว่า secretion จาก endometrium และ progesterone มีส่วนในการควบคุมอายุการทำงานของ corpora lutea ไว้ก็ต่อเมื่อได้รับจาก secretion จาก endometrium สิ่งที่น่าสนใจก็คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของจำนวนวันที่เกิดท้องเทียมของกลุ่มที่ treat ด้วย progesterone และ TCA ค่อนข้างจะคงที่มากที่สุด ( 17 - 18 วัน) อาจเป็นไปได้ว่า TCA มีผลไปทำลาย endometrium เพียงชั่วคราว เพราะเพียง 48 ชั่วโมงหลังจากที่ฉีดสารนี้เข้าไปในหนูถูกก็สังเกตเห็นมีการ regair ของเนื้อเยื่อทั้งชั้น epithelium และ stroma ของ endometrium (รูปที่ 21 E-G) ดังนั้นการที่ฉีด

progesterone เลี้ยงครั้งเดียวตอน $L_{11}$ อาจทำให้มีระดับของฮอร์โมนนี้ในกระแสโลหิตลดต่ำลงมากในตอนที่เกิดมีการ repair และกลับมามี active secretion ของ endometrium ขึ้นใหม่ ทำให้ไม่อาจยืดอายุของ corpora lutea ต่อไปได้นานกว่า 18 วัน ผิดกับการถูกคัดมดลูกออกไปทั้งหมด ซึ่งเป็นการขจัดเอา secretion จาก endometrium ออกไปโดยสิ้นเชิง

หลักฐานนี้ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่า secretion จาก endometrium ระยะต้น ๆ ของท้องเทียมน่าจะมีส่วนในการกระตุ้นการหลั่ง luteolytic agent (s) จากต่อมใต้สมองซึ่งอาจเป็น LH หรือ LH กับ FSH ส่วน progesterone ในปริมาณที่สูงพออาจมีบทบาทในการเป็นตัว positive feedback ต้านไม่ให้มีการหลั่ง luteolytic agent(s) จากต่อมใต้สมองต่อไปได้ อีกชั่วระยะเวลาหนึ่งไข่ก็ต่อเมื่อไม่ได้ถูกรบกวนโดย secretion จาก endometrium เท่านั้น สำหรับเหตุผลที่ว่าการคัดมดลูกไม่สามารถต้านการเกิด luteolysis ได้ตลอดไป อาจอธิบายได้ว่า เนื่องมาจาก progesterone (สร้างจาก corpora lutea ในกรณีของหนูที่ถูกคัดมดลูก) ไม่สามารถที่จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง luteolytic agents (LH & FSH)) จากต่อมใต้สมองได้ ( Rothchild, 1960, 1962b )

ข. <u>การทดสอบ Sensitivity ของหนูที่ถูกคัดมดลูกที่มีต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมโดย Progesterone</u>

จากการฉีด progesterone ในปริมาณต่าง ๆ กันเข้าในหนูที่ถูกคัดมดลูกตอนระยะ late estrus ซึ่งเป็นระยะที่พบว่าหนูสามารถ response ต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมได้ดีที่สุด ( Rothchild & Schubert, 1963; ไพบูลย์ , 2509 ) พบว่าช่วงการปริมาณของ

progesterone สูงถึง 20 mg จึงจะสามารถยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea ออกไปได้ (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลที่ สิทธิเดช (2509) ศึกษาในหนูบ่กติที่ไม่ได้ตัดมดลูก และปริมาณของ progesterone ที่ใช้ในการยืดเวลาการทำงานของ corpora lutea สูงกว่าที่ Rothchild & Schubert (1963) ประสบความสำเร็จในการทดลองกับหนูบ่กติที่ไม่ได้ตัดมดลูกถึง 2 เท่า แสดงว่าการตัดมดลูกไม่ได้มีส่วนในการทำให้หนูมี sensitivity ต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมโดย progesterone แต่อย่างไร

## สรุปผล

ผลสำคัญที่ได้จากการทดลองต่าง ๆ อาจสรุปได้ดังนี้คือ

1. การตัดมดลูกไม่ได้มีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการเปลี่ยน non-functional corpora lutea ของวง estrus ให้เป็น functional corpora lutea ของท้องเทียมได้เลย

2. การตัดมดลูกมีผลยืดเวลาการทำงานของท้องเทียมบ่กติเป็นประมาณ 5 - 7 วัน ถ้าการฉีดได้เริ่มกระทำก่อนที่จะเกิด functional luteolysis และได้รับยาสม่ำเสมอในแต่ละวันไม่ต่ำกว่า 6 ชั่วโมง

3. ระยะวิกฤตที่การตัดมดลูกยืดอายุการทำงานของ corpora lutea ออกไปได้คือเช้าวัน $L_{11}$

4. การตัดมดลูกไม่ได้มีส่วนทำให้หนูมี sensitivity ต่อการชักนำให้เกิดท้องเทียมโดย progesterone แต่อย่างไร

5. endometrium ของมดลูกและ progesterone มีส่วนในการควบคุมอายุการทำงานของ corpora lutea ของท้องเทียม โดย

progesterone จะห้ามการหลั่ง luteolytic factor (s) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าได้ก็ต่อเมื่อไม่มี secretion ของ endometrium เท่านั้น

6. suckling เป็น stimulus ที่แรงที่สุด สามารถยับยั้งไม่ให้ต่อมใต้สมองหลั่ง luteolytic factor (s) ออกมาเป็นปริมาณเพียงพอที่จะทำให้เกิด luteolysis ได้นานที่สุด

7. การตัดมดลูกไม่สามารถมีผลช่วยเสริมกับผลของ suckling ในการยืดอายุการทำงานของ corpora lutea

8. LH เป็น luteolytic factor จากต่อมใต้สมองที่สำคัญที่สุดในหนูถีบจักรที่ศึกษา

9. FSH อาจเป็น luteolytic factor ได้ในสัตว์บางชนิดที่ต่อมเพศมี LH อยู่ในกระแสโลหิต

10. Prolactin ในปริมาณที่สูงมาก อาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิด luteolysis ใน corpora lutea ที่มีอายุมาก ๆ ได้