

ผลของการใส่ห่วงคุมกำเนิดชนิดใหม่ต่อฮอร์โมนเพศในมดลูกหนู



นางสาวดวงสุดา สิริยานนท์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2527

ISBN 974-563-673-8

010260

I 16590963

EFFECT OF SILK SUTURE INTRAUTERINE DEVICE ON
PROSTAGLANDIN SYNTHETASE IN RAT UTERUS



Miss Duangsuda Siriyanonda

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1984

ISBN 974-563-673-8

Thesis Title Effect of Silk Suture Intrauterine Device on
Prostaglandin Synthetase in Rat Uterus
By Miss Duangsuda Siriyononda
Department Biochemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Peerada Sirijintakarn, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

S. Bunnag
.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Sansern Subptosok
.....Chairman
(Assistant Professor Sansern Subptosok)

Peerada Sirijintakarn
.....Member
(Assistant Professor Peerada Sirijintakarn, Ph.D.)

Prakong Tangprutikul
.....Member
(Associate Professor Prakong Tangpraprutikul, Ph.D.)

Preeda Chaisiri
.....Member
(Preeda Chaisiri, Ph.D.)

Suganya Soontaros
.....Member
(Suganya Soontaros, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใส่ห่วงคุมกำเนิดชนิดใหม่ต่อพรอสตาแกลนดินซินทีเทสในมดลูกหนู
ชื่อผู้ผลิต	นางสาวดวงสุตา สิริยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2526



บทคัดย่อ

การศึกษาผลของห่วงคุมกำเนิดชนิดใหม่ (silk-suture IUD) ต่อการทำงานของเอ็นไซม์พรอสตาแกลนดินซินทีเทสในมดลูกหนู (rat) ในงานวิจัยนี้ พบว่าเมื่อวัดแอกติวิตีของเอ็นไซม์ในส่วนไมโครโซม (microsome) ของมดลูกหนูด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลง-เอพิเนฟริน (L-epinephrine) ไปเป็นอะเดเรโนโครม (adrenochrome) พบว่าห่วงคุมกำเนิดชนิดใหม่ผลทำให้พรอสตาแกลนดินซินทีเทสมีแอกติวิตีสูงขึ้นในทุกระยะของวงจรสืบพันธุ์ (estrous cycle) จากการศึกษาเดียวกันนี้ยังพบว่าเอ็นไซม์นี้มีแอกติวิตีแตกต่างกันที่ระยะต่าง ๆ ของวงจรสืบพันธุ์ด้วย เอ็นไซม์มีแอกติวิตีต่ำสุดในระยะอีสตรัส (estrus) ส่วนระยะโปรอีสตรัส (proestrus) ไดอีสตรัส 1 (diestrus 1) และ 2 (diestrus 2) จะมีแอกติวิตีใกล้เคียงกัน อาจเป็นได้ว่าการทำงานของเอ็นไซม์นี้อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอรโมนเพศด้วย

ในงานวิจัยนี้ พบว่าไม่สามารถศึกษาผลของห่วงคุมกำเนิดด้วยการวัดพรอสตาแกลนดินในมดลูกหนูด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (thin-layer chromatography) หรือจากการวัดแอกติวิตีของเอ็นไซม์ในส่วนไมโครโซมของมดลูกหนู ด้วยวิธีเรดิโอโครมาโตกราฟี (radiochromatography) โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของกรดอะแรคิโคนิกที่ติดฉลากด้วยรังสีไอโซโครเจน-3 (^3H -arachidonic acid) ทั้งนี้เนื่องจากมดลูกหนูอาจผลิตพรอสตาแกลนดินในปริมาณที่ต่ำมาก หรือเกิดการสูญเสียไปมากในระหว่างขบวนการสกัดก่อนการนำไปแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง ทำให้มีสารปริมาณน้อยเกินกว่าขีดความไวของวิธีการทั้งสอง

ในการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ในไมโครโซมที่ระยะอีสตรัส พบว่ามีค่า K_m สำหรับกรดอะแรคิโคนิก เท่ากับ 1.50 ไมโครโมล/ลิตร และค่า V_{max} เท่ากับ 0.94 มิลลิโมลของอะเดเรโนโครมที่เกิดขึ้นในเวลา 1 นาที อินโดเมธาซิน (indomethacin)

สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์นี้ได้ โดยวัดค่า I_{50} เท่ากับ 11.3 มิลลิโมลาร์

รายงานนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของพอสตาแกลนดินซินทิเทสด้วย ไมโครโชมปริมาณสูงหรือซีรัมแอลบูมินของวัว (BSA) สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้ การยับยั้งนี้น่าจะเป็นแบบไม่จำเพาะ สารละลายในไซโตพลาสซึม (CF) ของมดลูกก็มีตัวที่สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของพอสตาแกลนดินซินทิเทสด้วย ตัวกระตุ้นที่พบในสารละลายของไซโตพลาสซึม เป็นสารที่มีขนาดเล็กและทนต่อความร้อน ส่วนตัวยับยั้งเป็นสารมหโมเลกุลและคุณสมบัติในการยับยั้งจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส — อาจเป็นสารประเภทโปรตีน นอกจากนี้ ยังพบว่า สารละลายของไซโตพลาสซึมเอง ก็สามารถเปลี่ยนแอล-เอพิเนพรีนไปเป็นอะเดรีโนโครมได้เล็กน้อยและความร้อนสามารถทำลายคุณสมบัตินี้ได้

ผลจากการศึกษาในรายงานนี้ชี้แนะว่า การที่การปลดปล่อยพอสตาแกลนดินเพิ่มขึ้นในมดลูกหนูโดยเอ็นไซม์พอสตาแกลนดินซินทิเทส อาจมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของห้วงคุมกำเนิดชนิดใหม่ในมดลูกหนู โดยพอสตาแกลนดินอาจจะไปลดการหลั่งฮอโมนโปรเจสเตอโรนจากรังไข่ในระยะที่จำเป็นสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน ทำให้การฝังตัวล้มเหลว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Effect of Silk Suture Intrauterine Device on
Prostaglandin Synthetase in Rat Uterus

Name Miss Duangsuda Siriyanonda

Thesis Advisor Assistant Professor Peerada Sirijintakarn, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1983



ABSTRACT

The study on the effect of silk-suture intrauterine device (silk-suture IUD) on the action of prostaglandin synthetase in rat uterus by measuring spectrophotometrically the activity of microsomal enzyme was measured by following the conversion of L-epinephrine into adrenochrome, the result showed that IUD enhanced the prostaglandin synthetase activity at all stages of the estrous cycle. The same experiment also showed that the enzyme had least activity during estrus, and comparatively the same activity at proestrus, diestrus 1 and 2. This may suggest that the action of this enzyme is regulated by sex steroid hormones.

The effect of silk-suture IUD on prostaglandin synthetase in rat uterus could not be done by measurement of endogenous prostaglandins in rat uterus by thin-layer chromatography. Observation of the products from incubation of microsomal enzyme in rat uterus with ³H-arachidonic acid by radiochromatographic technique also failed to show any detectable effect of the IUD. Such result might be due to the very low production of prostaglandins by rat uterus, or loss during the extraction process prior to application on thin-layer plate, so that the amount was too low beyond the detection limit of these two methods.

Studies in the kinetic property of the microsomal enzyme at estrus showed the K_m for arachidonic acid = 1.50 $\mu\text{mol}/1$ and V_{max} = 0.94 mmole adrenochrome found per min. Indomethacin could inhibit the enzyme activity with I_{50} = 11.3 mM.

The present study also reported on some factors which affected prostaglandin synthetase activity. High amount of microsome or BSA could inhibit the enzyme activity, probably by non-specific mechanism. The soluble components within the cytoplasm (CF) also contained activator(s) or inhibitor(s) to the enzyme. The activator appeared to be small molecule and heat-resistant. The inhibitor was large molecule and heat-labile—possibly a protein. The cytosol fraction (CF) alone could slowly convert L-epinephrine into adrenochrome. This property was lost by heating.

The result from this study suggested that the increased prostaglandin release in rat uterus mediated by prostaglandin synthetase may play an important role in the mechanism of action of silk-suture IUD in the rat uterus, such as prostaglandin may block implantation by its luteolytic effect in the ovary which results in decreased progesterone level at the time of blastocyst implantation.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her deepest appreciation to Dr. Peerada Sirijintakarn for her keen supervision and heartily guidance during the course of this investigation and particularly in the preparation of this thesis. Without her encouragement, understanding and especially her inexhaustible patience, this work would not have been possible.

Her deep appreciation is also expressed to Assistant Professor Sansern Subptosok, Dr. Prakong Tangpraprutigul, Dr. Preeda Chaisiri and Dr. Suganya Soontaros for their criticism and valuable suggestions and also for their serving as thesis committee.

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

Finally, she would like to thank Miss Monchand Vanichapuntu, Miss Sukanya Chotichanapibal and Mr. Songsak Petchmitr for their help in preparing this manuscript and thank to other members of the Department of Biochemistry for assistance at various times in the course of this research.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
CONTENTS	ix
LIST OF TABLE	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II MATERIALS AND METHODS	
A. MATERIALS	19
B. METHODS	21
III RESULTS	
1. Measurement of prostaglandin synthetase by radiochromatographic assay	28
1.1 Solvent system for the separation of prostaglandins from arachidonic acid metabolites by TLC	28
1.2 Prostaglandins levels in the control and IUD uterine horns	30
1.3 Comparison of prostaglandins synthesis between control and IUD uterine horns ...	30
2. Measurement of prostaglandin synthetase by spectrophotometric assay	32
2.1 Optimization of spectrophotometric assay conditions for prostaglandin synthetase	

	Page
from rat uterus	32
2.1.1 The effect of preincubation time	36
2.1.2 The effect of incubation time ...	36
2.1.3 The effect of preincubation temperature	40
2.1.4 The effect of protein concentra- tion	40
2.1.5 The effect of detergent	40
2.1.6 The effect of L-epinephrine concentration	43
2.1.7 The effect of arachidonic acid concentration	43
2.2 Effect of IUD on prostaglandin synthetase	47
2.3 Factors influencing prostaglandin synthetase	56
2.3.1 The effect of BSA	56
2.3.2 The effect of cytosolic factors .	56
2.3.3 The effect of indomethacin	64
IV DISCUSSION	67
REFERENCES	74
APPENDIX	97
BIOGRAPHY	100

LIST OF TABLE

Table		Page
1	Thin-layer chromatography of prostaglandins, arachidonic acid and phospholipids by various solvent systems	29



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Prostanoic acid numbering scheme	1
2	Prostaglandins of the 2-series : chemical structures ..	2
3	The primary prostaglandins and the 3 primary precursors..	4
4	Enzymatic conversion of arachidonic acid	6
5	Enzymes and cofactors of prostaglandin and thromboxane	7
6	The autooxidation of L-epinephrine to adrenochrome	18
7	Diagrammatic representation of the rat uteri with a silk- suture intrauterine device	22
8	Thin-layer chromatography of tissue extracts from control and IUD horns of the estrus rat	31
9	Thin-layer radiochromatogram of labeled prostaglandins E and F formed by crude prostaglandin synthetase	33
10	Absorption spectra of adrenochrome from L-epinephrine by uterine microsomal enzyme	34
11	Formation of adrenochrome from L-epinephrine	35
12	The effect of preincubation time on adrenochrome formation	37
13	The absorbancy at 480 nm of the assay mixture before and after the addition of exogenous arachidonic acid	38
14	The effect of incubation time on the rate of adreno- chrome formation	39
15	Effect of preincubation temperature on the rate of adrenochrome formation	41
16	Crude prostaglandin synthetase activity as a function of enzyme concentration	42

Figure	Page
17 Effect of Tween 40 on adrenochrome formation	44
18 The activity of crude prostaglandin synthetase as a function of L-epinephrine concentration	45
19 The effect of arachidonic acid concentration on the rate of prostaglandin synthetase	46
20 The activity of crude prostaglandin synthetase in the control and IUD horns at each stage of the estrous cycle	48
21 The specific activity of crude prostaglandin synthetase in the control and IUD horns at each stage of the estrous cycle	52
22 Histograms of the specific activity of crude prosta- glandin synthetase in the control and IUD horns of the rats during the estrous cycle	57
23 Effect of BSA on adrenochrome formation	58
24 Effect of the cytosolic fraction on adrenochrome formation in rat uterus	60
25 Effect of the cytosolic fraction (undialysed and dialysed) on adrenochrome formation in rat uterus	65
26 The inhibitory effect of indomethacin on crude prosta- glandin synthetase	66
27 The standard curve of BSA	98
28 The standard curve of adrenochrome	99

ABBREVIATIONS

A	Absorbance
AA	Arachidonic acid
BSA	Bovine serum albumin
C	The crude microsomal enzyme
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
CF	The cytosol fraction
CF _x	The cytosol fraction containing x µg protein
CF _{x,b}	Supernatant from the boiled cytosol fraction which contained x µg protein
CF _{x,d}	The dialysed cytosol fraction containing x µg protein
FSH	Follicle-stimulating hormone
HHT	12L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid
I ₅₀	Concentration required for 50% inhibition
IUD	Intrauterine device
K _m	Michaelis-Menten constant
L-EPN	L-epinephrine
LH	Luteinizing hormone
MW	Molecular weight
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PS	Phosphatidylserine
PG	Prostaglandin
PGDH	Prostaglandin dehydrogenase
SEM	Standard error of mean
V	Initial velocity
V _{max}	Maximum velocity
Tw	Tween 40

