บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. pH, ปริมาตรและความหนืดของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

ของเหลวที่เก็บจากโพรงมดลูกหนูตามวิธีทดลองข้อ 1 นำมารวมกันในแต่ละชุดของหนูทดลอง หาค่า pH, ปริมาตรและความหนืดตามวิธีทดลองที่กล่าวแล้วข้อ 2.1 ปรากฏว่า pH ของ control fluid คือ 8.47 ± 0.53 และของ IUD fluid คือ 7.90 ± 0.29 (ตารางที่ 1) แสดงว่าห่วงคุมกำเนิดไม่ทำให้ pH ของ IUD fluid แตกต่างจาก control fluid อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่ทำให้ปริมาตรของของเหลวในโพรงมดลูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control fluid คือเพิ่มจาก 0.26 ± 0.09 มล. เป็น 0.92 ± 0.36 มล.ต่อมดลูกหนึ่งข้าง สรุปว่าค่า pH เฉลี่ยของ IUD fluid คือ 7.90 ± 0.29 และปริมาตรของของเหลวในโพรงมดลูกข้างหนึ่งโดยเฉลี่ย คือ 0.26 ± 0.09 มล. ดังนั้นในการทดลองทดสอบการคุมกำเนิดต่อๆไป จึงใช้ปริมาตรที่จะทดสอบเป็น 0.2 มล. และปรับค่า pH เป็น 8.0

ความหนืดของ control fluid เป็น 2.63 centipoiselle และของ IUD fluid เป็น 2.72 centipoiselle ซึ่งใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าปริมาตรของ IUD fluid ที่เพิ่มขึ้นนี้เนื่องมาจากมีปริมาณของสารต่างๆที่ความหนาแน่นใกล้เคียงกับใน control fluid เพิ่มจำนวนขึ้น

2. โปรตีน, ฟอสเฟตอินทรีย์และแคลเซียมในของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

ของเหลวที่เก็บจากโพรงมดลูกของหนูที่รวมกันในแต่ละชุดของหนูทดลอง เมื่อหาค่าโปรตีน, ฟอสเฟตอินทรีย์และแคลเซียม ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้อ 2.2, 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของโปรตีนใน control fluid คือ 3.1 ± 2.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และใน IUD fluid คือ 21.90 ± 9.76 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 1 pH, ปริมาตร และความหนืดของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

ชนิดของเหลว	ชุดที่	จำนวนหนู/ชุด	pH	ปริมาตร (มล./มดลูก)	ความหนืด (centipoiselle)
control fluid	1	62	7.95	0.31	2.62
	2	60	8.90	0.20	2.65
	3	17	8.85	0.37	-
		139	8.47±0.53*	0.26±0.09*	2.63**
IUD fluid	1	62	7.70	1.26	2.75
	2	60	8.20	0.65	2.68
	3	17	7.70	0.61	-
		139	7.90±0.29*	0.92±0.36*	2.72**
P from t-test			P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05

* MEAN±S.D.

** MEAN

ของฟอสเฟตอนินทรีย์ใน control fluid คือ 5.0 ± 12 ไมโครกรัม/มล. และใน IUD fluid คือ 117 ± 84 ไมโครกรัม/มล. ส่วนค่าเฉลี่ยของแคลเซียมใน control fluid คือ 0.13 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และใน IUD fluid คือ 0.9 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (ตารางที่ 2) สรุปว่าใน IUD fluid มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นประมาณ 7 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์เพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ control fluid

3. ความสามารถในการคุมกำเนิดของของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วง (IUD fluid)

Batta และ Chaudhury (1968 a) ได้ทดลองเก็บ control fluid และ IUD fluid ปริมาตร 0.05 มล. และฉีดทันทีเข้าในมดลูกของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 2, 4, และ 6 พบว่า control fluid ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด แต่ IUD fluid สามารถยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ที่ผนังมดลูกและลดจำนวนตัวอ่อนเมื่อฉีดให้แม่หนูที่ตั้งครรภ์วันที่ 2 และ 4 แต่ไม่มีผลกับแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 6 สำหรับการทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเปรียบเทียบกับ control fluid และ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ทำโดยฉีด 0.2 มล. ของ IUD fluid หรือ control fluid ที่เก็บจาก donor rats ทันทีหลังจากเก็บของเหลว หรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่อินคิวเบทให้เป็น 37 องศาเซลเซียส เข้าในมดลูกของ recipient rats ที่ตั้งครรภ์วันที่ 4 ตามวิธีทดลองที่กล่าวแล้วข้อ 3 เมื่อดูผลการคุมกำเนิดในแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 15 ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่า IUD fluid ที่เก็บจาก donor rats มาฉีดให้กับ recipient rats ทันที สามารถคุมกำเนิดได้โดยยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ที่ผนังมดลูก (รูปที่ 1)

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีน, ฟอสเฟตอนินทรีย์, และแคลเซียมในของเหลวจากโพรงมดลูกหนู ที่ใส่ห่วงและไม่ใส่

ชนิดของเหลว	ชุดที่	จำนวนหนูต่อชุด	ปริมาณโปรตีน (µg/µl)	ฟอสเฟตอนินทรีย์ (µg/ml)	แคลเซียม (µg/µl)
control fluid	1	62	1.5	2.0	0.15
	2	60	3.8	3.0	0.15
	3	17	6.5	23.0	-
		139	3.1 ± 2.5*	5.0 ± 12*	0.13**
IUD fluid	1	62	15.0	142.0	1.23
	2	60	25.5	56.0	0.65
	3	17	34.5	224.0	-
		139	21.9 ± 9.8*	117.0 ± 84.0*	0.90**
P from t-test			P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05

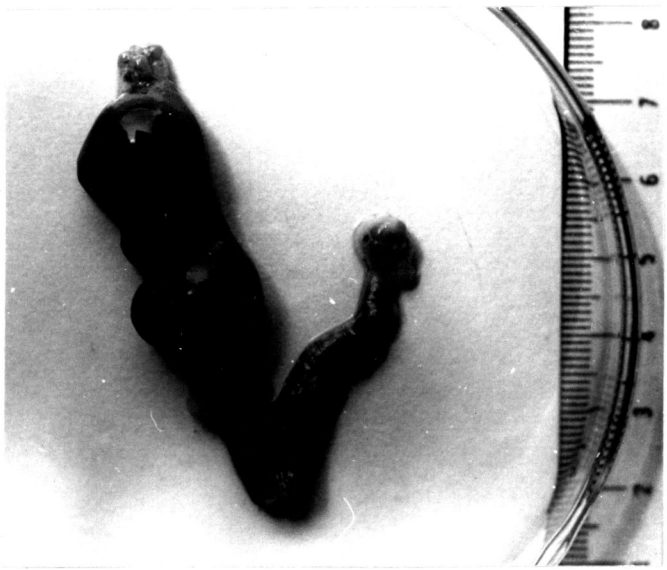
* MEAN ± S.D.

** MEAN

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เปรียบเทียบกับ control fluid และ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เมื่อฉีกเข้ามดลูกของแม่หนูตั้งกรรภ์วันที่ 4 ทันทีหลังจากเก็บของเหลว (0.2 มล. ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งกรรภ์ถึงวันที่ 15

ชนิดของเหลวที่ฉีด		หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เกิบโตเป็นปกติ	
มดลูกซ้าย	มดลูกขวา		มดลูกซ้าย	มดลูกขวา
control fluid	control fluid	1	1	3
		2	1	3
		3	3	5
		4	6	5
		5	8	5
		MEAN±S.D.	3.80±3.11	4.20±1.09
control fluid	0.85% NaCl	1	1	3
control fluid	IUD fluid	1	3	0
		2	5	0
		3	0	1
		4	6	1
		5	8	1
		6	3	0
		MEAN±S.D.	4.16±2.79	0.50±0.54



รูปที่ 1 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid

ฉีด 0.2 มล. ของ IUD fluid ทันทีหลังจากเก็บของเหลวเข้าในมดลูกข้างขวาของแม่หนูถั้งกรรภ์วันที่ 4 เปรียบเทียบกับการฉีด control fluid ปริมาตรเท่ากันเข้ามดลูกข้างซ้าย ดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งกรรภ์ถึงวันที่ 15 ผลคือมดลูกข้างขวามีการยับยั้งการฝังตัวของบลาสโตซิสต์ที่ยังมดลูก ส่วนมดลูกข้างซ้ายมีตัวอ่อนเจริญเติบโตเป็นปกติ

4. เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid

4.1 เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

การเก็บ control fluid และ IUD fluid ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 ตามวิธีทดลองที่กล่าวแล้วข้างต้น โดยฉีด control fluid เข้ามดลูกข้างซ้าย และฉีด IUD fluid เข้ามดลูกข้างขวาของหนูตัวเดียวกัน ผลการทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่า IUD fluid เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 1 วัน ยังคงมีความสามารถในการคุมกำเนิดกล่าวคือไม่พบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตอย่างปกติในมดลูกข้างขวาเลย (รูปที่ 2) แต่มีปุ่มเล็กๆลักษณะคล้ายตัวอ่อนที่สลายไปแล้ว(**re**sidual masses) ติดอยู่ที่ผนังมดลูก โดยจำนวนเฉลี่ยใกล้เคียงกับจำนวนของตัวอ่อนปกติที่พบในมดลูกข้างซ้าย

4.2 เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆกัน

เมื่อแยกเก็บ control fluid และ IUD fluid (0.2 มล./หลอด) ที่ -70 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่างๆกันตั้งแต่ 1-11 สัปดาห์ แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 ปรากฏว่า IUD fluid เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-8 สัปดาห์ ยังคงมีความสามารถในการคุมกำเนิดเช่นเดียวกับ IUD fluid เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส คือไม่พบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติเลย (ตารางที่ 5) พบแต่ปุ่มเล็กๆติดอยู่บนผนังมดลูกเหมือนที่แสดงในรูปที่ 2 แต่ IUD fluid เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสนานกว่า 8 สัปดาห์ (9-11 สัปดาห์) จะสูญเสียความสามารถในการคุมกำเนิดโดยสิ้นเชิง ตัวอ่อนสามารถฝังตัวและเจริญเติบโตเป็นปกติ เช่นเดียวกับในมดลูกข้างซ้ายซึ่งฉีด control fluid (รูปที่ 3) จากผลการทดลองนี้และเพื่อความสะดวกผู้ทดลองจึงใช้ของเหลวจากโพรงมดลูกเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสภายในเวลา 8 สัปดาห์มาใช้ในการทดลองต่อๆไป

ตารางที่ 4 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid หลังจากเก็บที่4 องศาเซลเซียส 24 ชม. แล้วฉีดเข้ามดลูกของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล. ท่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + IUD fluid
1	3	0 (2 residual masses)
2	2	0 (5 " ")
3	3	0 (2 " ")
MEAN ± S.D.	2.66 ± 0.58	0 (3.0 ± 1.7 " ")

<u>รูปที่ 2</u> เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เก็บ control และ IUD fluid ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1วัน แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 โดยฉีด control fluid เข้ามดลูกข้างซ้าย และฉีด IUD fluid เข้ามดลูกข้างขวาของแม่หนูตัวเดียวกัน ดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15 ปรากฏว่าไม่พบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตอย่างปกติในมดลูกข้างขวาเลย แต่พบปุ่มเล็กๆ (residual masses) อยู่ที่ผนังมดลูกข้างขวา

ก รูปมดลูกสด

ข รูปมดลูกข้างขวาผ่าออกแสดง residual masses ที่ผนังมดลูก

ค รูปมดลูกที่ทำให้ใสแล้วด้วย benzol

ก

ข

ค

ตารางที่ 5 เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของของเหลวในโพรงมดลูกหนูหลังจากเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-11 สัปดาห์ แล้วฉีดเข้ามดลูกของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล. ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

ระยะเวลาการเก็บที่ -70° ซ (สัปดาห์)	หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
		มดลูกซ้าย +control fluid	มดลูกขวา+IUD fluid
1	1	6	0 (1 residual masses)
	2	6	0 (5 " ")
	3	4	0 (4 " ")
	MEAN±S.D.	5.33±1.15	0 (3.33±2.08 " ")
4	1	1	0 (3 " ")
	2	2	0 (2 " ")
	3	6	0 (1 " ")
	MEAN±S.D.	3.00±2.60	0 (2.00±1.00 " ")
8	1	1	0 (3 " ")
	2	3	0 (2 " ")
	3	3	0 (2 " ")
	MEAN±S.D.	3.33±1.15	0 (2.30±0.57 " ")
>8	1	5	3
	2	4	4
	3	5	6
	MEAN±S.D.	4.67 ± 0.58	4.33±1.53

รูปที่ 3 การสูญเสียความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 8 สัปดาห์

เมื่อเก็บ control และ IUD fluid ที่ -70 องศาเซลเซียส นานกว่า 8 สัปดาห์ แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 โดยฉีด control fluid เข้ามดลูกข้างซ้ายและฉีด IUD fluid เข้ามดลูกข้างขวาของแม่หนูตัวเดียวกัน ดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 15 พบว่ามีตัวอ่อนเจริญเติบโตเป็นปกติทั้งมดลูกข้างขวาและซ้าย

4.3 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid ใน glycerol

โดยปกติ glycerol เป็นสารที่ใช้ป้องกันการแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์องศาเซลเซียสและใช้เป็นตัวทำละลายได้ การเก็บ IUD fluid ที่ -70 องศาเซลเซียสนั้นของเหลวจะแข็งตัว เมื่อนำ IUD fluid มาใช้ ต้องทิ้งให้อุ่นขึ้นและละลายก่อน การเก็บ IUD fluid ใน glycerol จะช่วยป้องกันการแข็งตัวดังกล่าวนี้ ทำให้ของเหลวคงสภาวะเดิมตลอดระยะการแข็งตัว ดังนั้นจึงได้ทดลองฉีด glycerol อย่างเดียว 0.2 มล. เข้าในมดลูกข้างขวาของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 เทียบกับ control fluid ในมดลูกข้างซ้าย ผลการทดลอง (ตารางที่ 6) แสดงว่าตัว glycerol เอง มีความสามารถในการคุมกำเนิด คือทำให้ตัวอ่อนไม่สามารถเติบโตอย่างปกติในมดลูกข้างขวาได้ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ glycerol ในการเก็บ IUD fluid ที่ -70 องศาเซลเซียส

4.4 อิทธิพลของความร้อนต่อความสามารถในการคุมกำเนิด

เมื่อนำ control fluid และ IUD fluid มาทำให้ร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสในน้ำเดือดเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที แล้วฉีดเข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 เพื่อทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิด ตารางที่ 7 แสดงว่า IUD fluid ที่ทำให้ร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ยังคงมีอิทธิพลในการคุมกำเนิด เนื่องจากในมดลูกข้างขวาของหนูทดลองทั้ง 3 ตัว ไม่มีตัวอ่อนที่สมบูรณ์เลย มีแต่ปุ่มก้อนเนื้อเล็กๆติดอยู่บนผนังมดลูก (residual masses) แต่การต้ม IUD fluid ที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาทีหรือนานกว่า จะทำลายความสามารถในการคุมกำเนิดโดยสิ้นเชิง เนื่องจากพบตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติในมดลูกข้างขวาของหนูทดลองทั้ง 4 ตัว สรุปว่า สารที่เป็นตัวการในการคุมกำเนิดใน IUD fluid จะสูญเสียความสามารถนี้เมื่อถูกความร้อน 100 องศาเซลเซียส 10 นาทีหรือนานกว่า

ตารางที่6 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ glycerol เมื่อฉีดเข้าในถุงแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล. ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เคลื่อนเป็นปกติ	
	มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + glycerol
1	2	0 (2 residual masses)
2	4	0 (1 " ")
3	6	0 (2 " ")
MEAN ± S.D.	4.0 ± 2.0	0 (1.67 ± 0.58 " ")

ตารางที่7 อิทธิพลของความร้อนต่อความสามารถในการคุมกำเนิด

นำของเหลวจากโพรงมดลูกหนูมาทำให้ร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5, 10และ 15 นาที ทำให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้องแล้วฉีดเข้ามดลูกของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล.ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

ที่ 100 °ซ (นาที)	หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
		มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + IUD fluid
5	1	7	0 (3 residual masses)
	2	2	0 (6 " ")
	3	5	0 (3 " ")
	MEAN ± S.D.	4.67 ± 2.52	0 (4.00 ± 1.70 " ")
10	1	4	3
	2	2	5
	3	2	7
	MEAN ± S.D.	2.67 ± 1.15	5.00 ± 2.00
15	1	3	4

5. ความสามารถในการคุมกำเนิดของฟอสเฟตอินทรีย์

เนื่องจากผลการทดลองข้อ 2 (ตารางที่ 2) ที่กล่าวแล้ว แสดงว่าใน IUD fluid มีฟอสเฟตอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นกว่าใน control fluid 20 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของฟอสเฟตอินทรีย์ โดยเตรียมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8 แล้วเติมลงใน control fluid ปรับให้มีความเข้มข้นของฟอสเฟตอินทรีย์เป็น 117 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งเท่ากับค่าเฉลี่ยของฟอสเฟตอินทรีย์ใน IUD fluid เมื่อฉีด 0.2 มล.ของ control fluid ที่เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์นี้ เข้ามดลูกของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) แสดงว่าการเติมฟอสเฟตอินทรีย์ในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูปกติมีผลในการคุมกำเนิด คือไม่พบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติในมดลูกข้างขวาของหนูทดลองเลย

6. ปริมาณน้อยที่สุดของ IUD fluid (เทียบจากปริมาณโปรตีนทั้งหมด) ที่มีความสามารถในการคุมกำเนิด

ผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า total IUD fluid มีความสามารถในการคุมกำเนิดเมื่อฉีดด้วยปริมาตร 0.2 มล.ต่อมดลูกหนึ่งข้าง ในการทดสอบหาปริมาณน้อยที่สุดของ IUD fluid ที่มีผลในการคุมกำเนิดนั้นเนื่องจากยังไม่ทราบชนิดของสารที่แสดงฤทธิ์ในการคุมกำเนิด จึงทดลองใช้ปริมาณโปรตีนเป็นหลัก และเนื่องจาก IUD fluid มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นกว่าใน control fluid ประมาณ 7 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่2) ดังนั้นสามารถใช้ control fluid ไปเจือจางให้ IUD fluid มีปริมาณโปรตีนลดลงระหว่าง 10-50 ไมโครกรัม/0.2 มล.เก็บที่ -70 องศาเซลเซียสไม่เกิน 8 สัปดาห์ แล้วนำมาฉีดเข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 ผลการทดลอง (ตารางที่ 9)แสดงว่า IUD fluid ที่ถูกเจือจางด้วย control fluid จนมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 30 ไมโครกรัม/ 0.2 มล. ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิดเพราะตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติได้ในมดลูกข้างขวา ส่วน IUD fluid ที่ถูกเจือจางด้วย control fluid ให้มีปริมาณโปรตีนมากกว่า 30 ไมโครกรัมต่อ 0.2 มล.ขึ้นไป จะมีความสามารถในการคุมกำเนิด คือไม่พบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติในมดลูกข้างขวาเลย ผลจากการทดลองนี้นำไปใช้เป็นค่าทดสอบสำหรับแฟรคชั่นของ

ตารางที่ 8 ความสามารถในการคุมกำเนิดของฟอสเฟตอนินทรีย์

ฉีด 0.2 มล. ของ control fluid ที่เติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8 จนมีปริมาณฟอสเฟต 117 ไมโครกรัม/มล. เข้าในมดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 และดูผลเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + ฟอสเฟตอนินทรีย์
1	1	0 (2 residual masses)
2	2	0 (4 " ")
3	1	0 (3 " ")
MEAN ± S.D.	1.33 ± 0.58	0 (3.0 ± 1.0 " ")

ตารางที่ 9 ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดใน IUD fluid ที่มีความสามารถในการคุมกำเนิด

หาปริมาณโปรตีนของ IUD fluid แล้วใช้ control fluid เจือจางให้ IUD fluid มีปริมาณโปรตีนต่างๆกันคือ 10-50 ไมโครกรัม/0.2 มล. แล้วเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดภายใน 8 สัปดาห์ โดยฉีดเข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

ปริมาณโปรตีน µg/0.2 ml	หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เกิบโตเป็นปกติ	
		มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + IUD fluid
10	1	2	6
	2	5	5
	3	3	2
	MEAN ± S.D.	3.33 ± 1.53	4.33 ± 2.08
20	1	4	2
	2	6	3
	3	1	6
	MEAN ± S.D.	3.67 ± 2.52	3.67 ± 2.08
30	1	3	0 (4 residual masses)
	2	4	0 (5 " ")
	3	3	0 (6 " ")
	MEAN ± S.D.	3.33 ± 0.58	0 (5.0±1.0 " ")
40	1	2	0 (4 " ")
50	1	6	0 (1 " ")

ในการทดลองต่อๆไปเนื่องจากของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่เก็บได้มีปริมาณจำกัด เมื่อแยกแฟรคชั่นแล้วยิ่งน้อยลงมาก จึงจำเป็นต้องทดสอบด้วยปริมาณต่ำสุดที่น่าจะมีความสามารถในการคุมกำเนิดของ total IUD fluid

7. <u>การแยกแฟรคชั่นของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู</u>

ผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวแล้วแสดงว่า total IUD fluid ปริมาณน้อยที่สุดที่มีความสามารถในการคุมกำเนิดเทียบจากปริมาณโปรตีนเป็นหลักคือ 30 ไมโครกรัม/0.2 มล. ในการทดลองต่อไปเป็นการแยก IUD fluid เป็นแฟรคชั่นต่างๆตามขนาดโมเลกุล โดยอาศัยวิธีการต่างๆกัน และทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแฟรคชั่นเหล่านี้ โดยอาศัยปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม/0.2 มล. เป็นปริมาณน้อยที่สุดสำหรับทดสอบ

7.1 <u>การแยก IUD fluid โดยวิธี Dialysis</u>

การแยกแฟรคชั่นของ IUD fluid โดยวิธี dialysis จนถึงสภาวะสมดุลย์ตามวิธีทดลองข้อ 4.1 ได้ dialysable fraction คือสารประเภทที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 12,000 ดาลตัน และ non-dialysable fraction คือสารที่ไม่สามารถผ่านถุง dialysis มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 12,000 ดาลตันขึ้นไป นำแต่ละแฟรคชั่นที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่อง Freeze-drier (Edward) แล้วใช้น้ำกลั่นละลายให้มีปริมาตรเท่าเดิมก่อนที่จะนำมา dialysis ทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแฟรคชั่นเหล่านี้โดยฉีด 0.2 มล. เข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 ผลการทดลอง (ตารางที่ 10) แสดงว่า dialysable fraction ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด เพราะตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติได้ในมดลูกข้างขวาที่ฉีด 0.2 มล. ของ dialysable fraction ส่วน non-dialysable fraction (ตารางที่ 11) มีผลทำให้ตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติลดลงเมื่อเทียบกับการฉีด control fluid และ dialysable fraction (ตารางที่ 10) นอกจากนั้นพบ residual masses ในมดลูกข้างที่ฉีด non-dialysable fraction ด้วย เมื่อรวม dialysable กับ non-dialysable fraction ที่ทำให้แห้งเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรเดิมของ total IUD fluid แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิด ตัวอ่อนที่เติบโต

ตารางที่ 10 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ dialysable fraction ของ IUD fluid เมื่อฉีดเข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล. ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
	มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + dialysable fraction
1	5	5
2	2	2
3	3	1
4	5	4
MEAN ± S.D.	3.75 ± 1.49	3.00 ± 1.98

ตารางที่ 11 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ non-dialysable fraction ของ IUD fluid อย่างเดียว และ non-dialysable fraction ที่รวมกับ dialysable fraction เมื่อฉีดเข้ามดลูกแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 (0.2 มล. ต่อมดลูกหนึ่งข้าง) และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

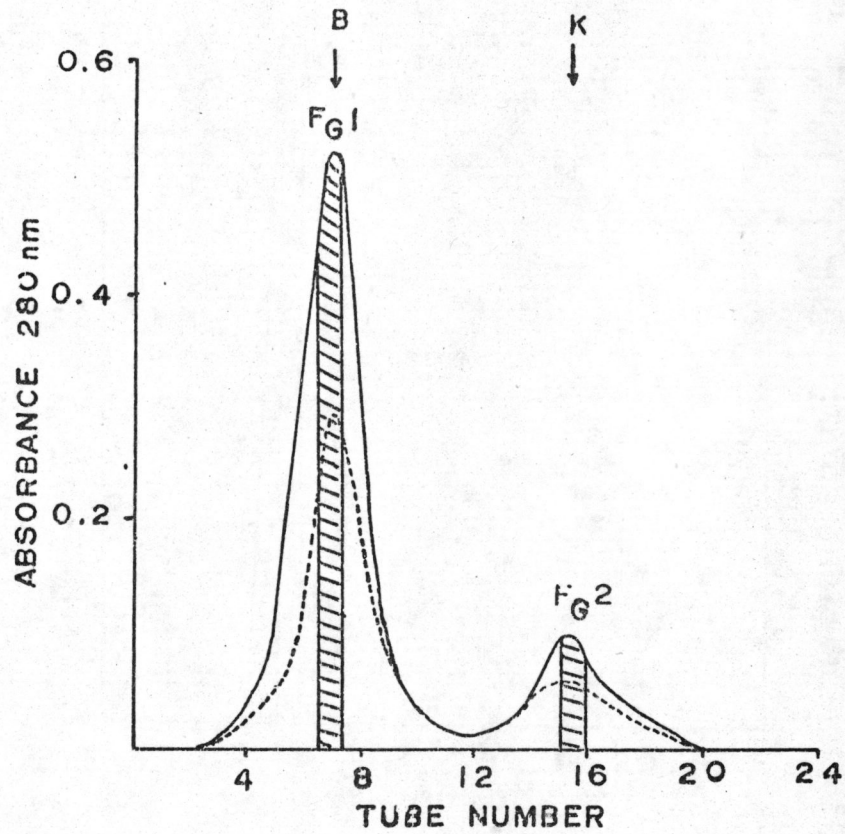
หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เคลิบโตเป็นปกติ	
	มดลูกขวา + non-dialysable fraction	มดลูกซ้ายฉีด non-dialysable + dialysable fraction
1	1 ตัวและ 5 residual masses	1 ตัวและ 3 residual masses
2	3 " 1 "	5 " 2 "
3	1 " 2 "	2 " 1 "
MEAN±S.D.	1.67±1.15 " 2.67±1.79 "	2.67±1.79 " 2.0±1.0 "

ปกติลดลงและพบ residual masses เช่นเดียวกับเมื่อฉีด non-dialysable fraction อย่างเดียว แสดงว่า non-dialysable fraction น่าจะมีสารซึ่งเกี่ยวข้องกับการคุมกำเนิดในด้านเกี่ยวกับการเจริญเติบโตเป็นปกติของตัวอ่อน แต่ผลในการคุมกำเนิดที่สมบูรณ์นั้นอาจจะสูญเสียไประหว่างวิธีทดลอง

7.2 การแยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูโดยคอลัมน์ Sephadex G-25

เมื่อแยก control และ IUD fluid ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอย่างละ 2.5 มก./มล. บนคอลัมน์ Sephadex G-25 ขนาด 1.3 X 26 ซม. ชะด้วยน้ำกลั่น (0.02% โซเดียมเอไซด์) ใช้ Blue dextran 2000 (B) เป็นดัชนีแสดง void volume ของคอลัมน์(21 มล.) และโปตัสเซียมโครเมต (K) เป็นดัชนีแสดง elution volume ของคอลัมน์(45 มล.) เก็บสารละลายจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล.แล้ววัดการดูดแสงที่ 280 nm รูปที่ 4 แสดงการดูดแสงที่ 280 nm ของหลอด ต่างๆ ปรากฏว่ามี 2 พีคทั้ง control และ IUD fluid คือ F_G1 ออกมาพร้อมกับ Blue dextran และ F_G2 ออกมาพร้อมกับโปตัสเซียมโครเมต แสดงว่า F_G1 เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาด 5000 ดาลตันหรือใหญ่กว่า และ F_G2 เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาด 1000 ดาลตันหรือเล็กกว่า นำ F_G1 ที่หลอด 6,7 และ F_G2 ที่หลอด 15,16 ซึ่งมีการดูดแสงที่ 280 nm สูงสุด มาทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 30 ไมโครกรัม/ 0.2 มล.โดยใช้ aquacide แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิด ผลการทดลอง (ตารางที่ 12) แสดงว่า F_G1 หรือ F_G2 แฟรคชั่นเดียวไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด เพราะตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติในมดลูกข้างขวาที่ทดสอบ และเมื่อรวม F_G1 และ F_G2 เข้าด้วยกันในปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม/ 0.2 มล.หรือ 1000 ไมโครกรัม/ 0.2 มล.ก็ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิดเช่นกัน แต่ทั้งนี้ F_G1 และ F_G2 ที่นำมาทดสอบเป็นเพียง 2 แฟรคชั่นที่มีค่าการดูดแสงสูงที่สุดและเป็นเพียงส่วนหนึ่งของพีคเท่านั้นเพื่อความสะดวกในการทดลอง ส่วนของ F_G1 กับ F_G2 ที่นำมาทดสอบนี้ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณโปรตีนถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมดลูกหนึ่งข้าง

เนื่องจากในผลการทดลองข้อ 5 การเติมฟอสเฟตอินทรีย์ลงใน control fluid ทำให้ของเหลวนั้นมีฤทธิ์ในการคุมกำเนิด แต่จากการทดลองนี้พบว่า F_G2 ซึ่งออกมา



รูปที่ 4 การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25

แยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูปริมาณโปรตีน 2.5 มก./มล. บนคอลัมน์ Sephadex G-25 ขนาด 1.3 X 26 ซม. ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น (0.02% NaN_3) เก็บสารละลายจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. และใช้ Blue dextran 2000 (B), K_2CrO_4 (K) เป็นดัชนีแสดง void volume (21มล.) และ elution volume (45 มล.) ของคอลัมน์ตามลำดับ ทั้ง control และ IUD fluid ถูกแยกออกเป็น 2 พีค คือ F_G1 ออกมาพร้อมกับ Blue dextran และ F_G2 ออกมาพร้อมกับ K_2CrO_4

F_G1 (หลอดที่ 6,7) และ F_G2 (หลอดที่ 15,16) ที่อยู่ในกรอบเส้นเฉียง คือส่วนที่นำไปดูดน้ำออกด้วย aquacide แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูทดลอง

IUD fluid ————————

control fluid ----------

<u>ตารางที่ 12</u> ความสามารถในการคุมกำเนิดของ F_G1 และ F_G2 ที่ได้จากการแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25

นำ F_G1 (แฟรคชั่นที่ 6,7) และ F_G2 (แฟรคชั่นที่ 15,16) มาทำให้เข้มข้นด้วย aquacide จนมีปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม/0.2 มล. หรือมากกว่า แล้วฉีดเข้ามดลูกขวาของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 โดยฉีด control fluid ปริมาตรเท่ากันในมดลูกซ้าย และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

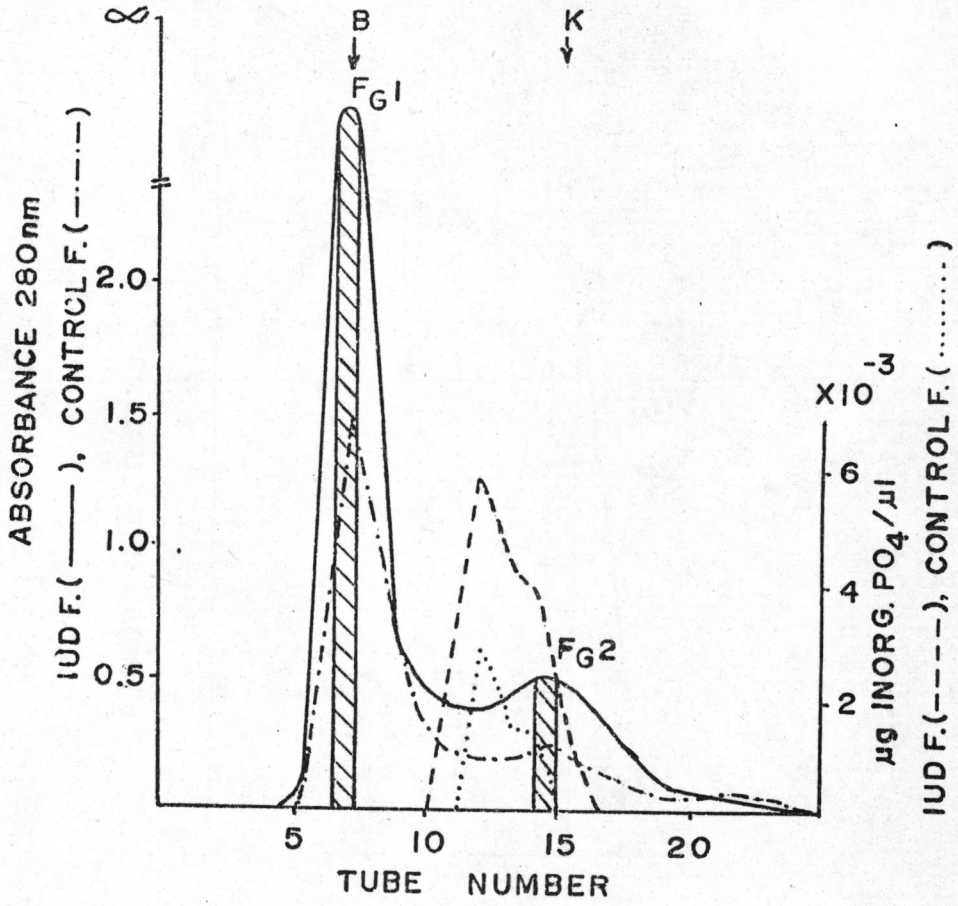
แฟรคชั่นของ IUD fluid	ปริมาณโปรตีน (µg/0.2ml)	หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
			มดลูกซ้าย + control fluid	มดลูกขวา + แฟรคชั่นของ IUD fluid
F_G1	30	1	7	2
		2	1	2
		3	2	2
		MEAN ± S.D.	3.3 ± 2.3	2.0 ± 1.0
F_G2	30	1	1	8
		2	3	2
		3	2	4
		MEAN ± S.D.	2.0 ± 1.0	4.7 ± 3.1
$F_G1 + F_G2$	30	1	2	2
		2	2	4
$F_G1 + F_G2$	1000	1	4	3

พร้อมกับโปตัสเซียมโครเมต และน่าจะมีฟอสเฟตอนินทรีย์อยู่ในแฟรกชั่นนี้ด้วย ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด ทำให้เกิดความสงสัยและจำเป็นต้องทดสอบการกระจายของฟอสเฟตอนินทรีย์ในแฟรกชั่นต่างๆที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-25 ปริมาณของ control และ IUD fluid ที่ต้องใช้แยกบนคอลัมน์ให้มีปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์มากพอที่จะตรวจพบได้ในแต่ละหลอดคือ 17.25 มก./4 มล.ของ control fluid และ 17.25 มก./1มล. ของ IUD fluid เมื่อหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์ของแต่ละหลอดตามวิธีทดลองข้อ 2.3 ปรากฏว่าฟอสเฟตอนินทรีย์ส่วนใหญ่ออกมาระหว่าง F_G1 กับ F_G2 และมีไหล่พีคส่วนหนึ่งออกมาพร้อม F_G2 (รูปที่ 5) ส่วนของ F_G2 ที่นำไปทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดนั้นจึงมีฟอสเฟตอนินทรีย์อยู่บ้างแต่ไม่มากเป็น 20 เท่าของ control fluid เหมือนในการทดลองข้อ 5 ตารางที่ 2 นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่า ฟอสเฟตอนินทรีย์ส่วนใหญ่ใน IUD fluid นั้นไม่ได้อยู่ในฟอร์มอิสระ แต่น่าจะจับตัวอยู่กับสารที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1000-5000 ดาลตัน

7.3 การแยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูโดยคอลัมน์ Sepharose 4B

จากการแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25 สารที่มีขนาดประมาณ 5000 ดาลตันหรือใหญ่กว่า ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด แต่จากวิธี dialysis พบสารที่เกี่ยวข้องกับการคุมกำเนิดมีขนาดใหญ่กว่า 12,000 ดาลตัน (non-dialysable fraction) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sepharose 4B ซึ่งมีช่วงการแยกตั้งแต่ $3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ ดาลตัน เพื่อทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแฟรกชั่นส่วนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่มากๆต่อไป

ใช้ control และ IUD fluid ที่มีปริมาณโปรตีน 2.5 มก./มล. บนคอลัมน์ Sepharose 4B ขนาด 1.5 X 5 ซม. ชะด้วยบัฟเฟอร์ A, pH 8 ใช้ calf thymus DNA (CT-DNA) เป็นดัชนีแสดง void volume ของคอลัมน์ (5มล.) และBovine serum albumin (BSA) เป็นดัชนีแสดง elution volume ของคอลัมน์ (9 มล.) เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มล. และวัดการดูดแสงที่ 280 nm รูปที่ 6 แสดงการ



รูปที่ 5 การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25 เพื่อหาการกระจายของฟอสเฟตอนินทรีย์

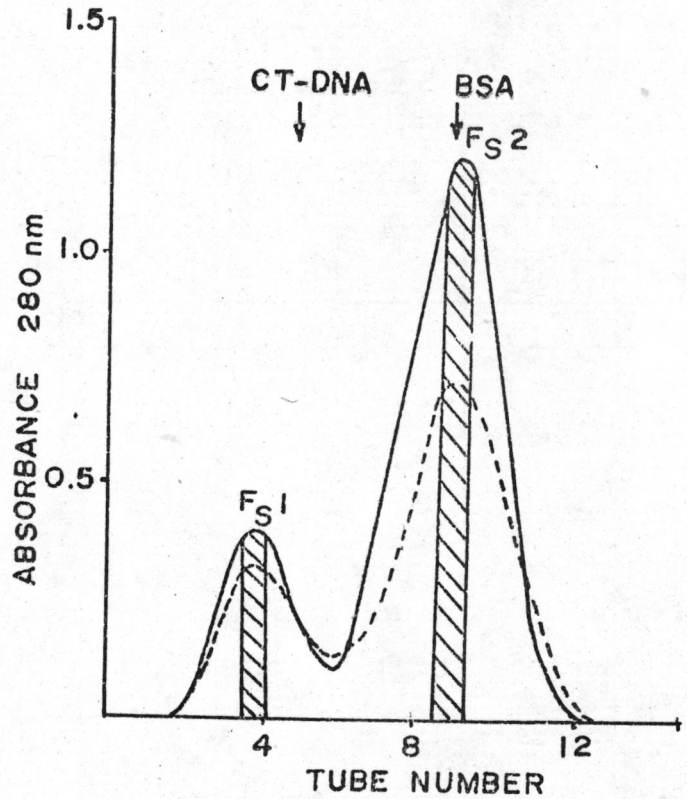
แยก control fluid ปริมาณโปรตีน 17.25 มก./ 4 มล.และ IUD fluid ปริมาณโปรตีน 17.25 มก./ 1 มล. บนคอลัมน์ Sephadex G-25(เช่นเดียวกับรูปที่ 4) นำแต่ละหลอดหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์ ปรากฏว่าได้พีคของฟอสเฟตอนินทรีย์สูงสุดอยู่ที่หลอด 12 ซึ่งอยู่ระหว่าง F_G1 และ F_G2

IUD fluid ————————

control fluid -·-·-·-·-·-

ฟอสเฟตอนินทรีย์ของ IUD fluid ----------

ฟอสเฟตอนินทรีย์ของ control fluid ....



รูปที่ 6 การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sepharose 4B

แยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูปริมาณ 2.5 มก./ 1 มล. บนคอลัมน์ Sepharose 4B ขนาด 1.5 X 5 ซม. ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A, pH 8 เก็บสารละลายจากคอลัมน์หลอดละ 1 มล. และใช้ Calf thymus DNA (CT-DNA) และ BSA เป็นตัวชี้แสดง void volume (5 มล.) และ elution volume (9 มล.) ของคอลัมน์ตามลำดับ ทั้ง control และ IUD fluid ถูกแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ F_S1 ออกมาก่อน CT-DNA เล็กน้อย และ F_S2 ออกมาพร้อมกับ BSA

F_S1 (หลอดที่ 3,4) และ F_S2 (หลอดที่ 9,10) ที่อยู่ในกรอบเส้นเฉียงคือส่วนที่นำไปทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดในแม่หนูทดลอง

IUD fluid ————————

control fluid ----------

ดูดแสงที่ 280 nm ของหลอดต่างๆ ปรากฏว่ามี พีคทั้ง control และ IUD fluid คือ F_S1 ออกมาก่อน CT-DNA เล็กน้อย และ F_S2 ออกมาพร้อมกับ BSA แสดงว่า F_S1 เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาด 3×10^6 ดาลตันหรือใหญ่กว่า และ F_S2 เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาด 3×10^5 ดาลตันหรือเล็กกว่า นำ F_S1 (หลอดที่ 3,4) และ F_S2 (หลอดที่ 9, 10) ซึ่งมีการดูดแสงที่ 280 nm สูงสุด ปรับให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 30 ไมโครกรัม/0.2มล. หรือมากกว่า และทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแต่ละแฟรคชั่น ผลการทดลอง (ตารางที่ 13) แสดงว่า F_S1 และ F_S2 ที่มีปริมาณโปรตีนอย่างละ 30 ไมโครกรัม/0.2 มล. ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิด เพราะพบตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติในมดลูกข้างขวาที่ทดสอบ และเมื่อเพิ่ม F_S2 จนมีปริมาณโปรตีน 394 ไมโครกรัม/0.2 มล.ก็ไม่มีความสามารถในการคุมกำเนิดเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนใน F_S1 เป็น 138 ไมโครกรัม/0.2 มล. ปรากฏว่า F_S1 ทำให้จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับมดลูกข้างที่ฉีด control fluid และพบ residual masses แสดงว่า F_S1 น่าจะมีสารซึ่งเกี่ยวข้องกับการคุมกำเนิด แต่ต้องใช้ปริมาณโปรตีนมากถึง 138 ไมโครกรัม/0.2 มล. และประสิทธิภาพในการคุมกำเนิดของ F_S1 ใกล้เคียงกับของ non-dialysable fraction คือสามารถลดจำนวนตัวอ่อนที่เจริญเติบโตเป็นปกติ และทำให้เกิด residual masses

จากการแยก IUD fluid เป็นแฟรคชั่นต่างๆตามขนาดโมเลกุล โดยอาศัยวิธี dialysis และคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแฟรคชั่นเหล่านี้ สรุปได้ว่า สารที่เกี่ยวข้องในการคุมกำเนิดส่วนหนึ่งน่าจะเป็นประเภทโมเลกุลใหญ่กว่า 3×10^6 ดาลตัน (F_S1 ซึ่งโดยวิธี dialysis อยู่ใน non-dialysable fraction) แต่ส่วนนี้ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการคุมกำเนิดที่สมบูรณ์ ภาวะการทดลองน่าจะมีส่วนในการทำลายคุณภาพในการคุมกำเนิดด้วย

8. <u>การทดสอบคุณสมบัติของ IUD fluid ด้วยวิธีชีวเคมี</u>

เนื่องจากผลการทดลองที่แล้วมาแสดงว่าแฟรคชั่น F_S1 ซึ่งเป็นพวกมหโมเลกุลที่มีขนาด 3×10^6 ดาลตันหรือใหญ่กว่า น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการคุมกำเนิด ดังนั้นใน

ตารางที่ 13 ความสามารถในการคุมกำเนิดของ F_S1 และ F_S2 ที่ได้จากการแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sepharose 4B

นำ F_S1 (แฟรคชั่นที่ 3,4) และ F_S2 (แฟรคชั่นที่ 9,10) มาปรับให้มีปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม/0.2 มล. หรือมากกว่า แล้วฉีดเข้ามดลูกขวาของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 โดยฉีดบัฟเฟอร์ A (pH 8) ปริมาตรเท่ากันในมดลูกข้างซ้าย และดูผลการคุมกำเนิดเมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15

แฟรคชั่นของ IUD fluid	ปริมาณโปรตีน (µg/0.2ml)	หนูตัวที่	จำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ	
			มดลูกซ้าย + บัฟเฟอร์ A (pH 8)	มดลูกขวา + แฟรคชั่นของ IUD fluid
F_S1	30	1	3	3
		2	3	4
F_S1	138	1	3	0 และ 1 residual mass
		2	5	2 ไม่มี " "
		3	3	1 ไม่มี " "
		MEAN ± S.D.	3.16 ± 1.15	1.0±1.0 และ 0.3±0.5 "
F_S2	30	1	3	6
		2	2	3
F_S2	394	1	1	4

ลำดับต่อไปจึงได้ทดสอบคุณสมบัติของแฟรคชั่นดังกล่าว โดยใช้เอ็นไซม์ที่มีความเฉพาะต่อชีวโมเลกุลแต่ละชนิด ได้แก่ Deoxyribonuclease และ Ribonuclease ซึ่งย่อย DNA และ RNA โดยเฉพาะ, Trypsin ซึ่งย่อยโปรตีนที่ peptide bond ทางด้าน C-terminal ของ arginine และ lysine residue, Chymotrypsin จะย่อย peptide bond ที่ติดกับ aromatic amino acids และ Papain ย่อย peptide bond ทางด้าน N-terminal ของกรดอะมิโนที่มี amide group, α-Amylase ย่อย$\alpha(1\rightarrow4)$glucosidic linkages ของ polysaccharides, Lipase จากรำข้าวซึ่งย่อยพวกไขมันโมเลกุลใหญ่ เช่น triglycerides ที่ ester bond และกรดอะซีติก 0.25 N ซึ่งจะย่อย peptide bond ที่ติดกับ aspartic acid residue

การทดลองนี้ทำโดยอินคิวเบท 1 มล.ของ IUD fluid ที่มีปริมาณโปรตีน 2.5 มก.กับเอ็นไซม์ต่างๆ (100 ไมโครกรัม/0.1 มล.) หรือ 0.1 มล.ของกรดอะซีติก 0.25 N ที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B ตามการทดลองที่ 7 เปรียบเทียบกับ profile ของ IUD fluid ปริมาณเท่ากันที่ไม่ผ่านการอินคิวเบท ในการทดลองนี้ใช้บัฟเฟอร์ที่ชะคอลัมน์ 2 ชนิด คือ บัฟเฟอร์ A, pH 8 หรือบัฟเฟอร์ B, pH 5

ผลการทดลองปรากฏว่า IUD fluid ที่ไม่ผ่านการอินคิวเบท เมื่อใช้บัฟเฟอร์ A pH 8 เป็นตัวชะคอลัมน์ มีพื้นที่ใต้พีค F_S1 มากกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ B, pH 5 เป็นตัวชะคอลัมน์อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 7 ก และ ข) แสดงว่าที่ pH เป็นกรด ส่วนหนึ่งของ F_S1 น่าจะมีการแตกตัวเป็นโมเลกุลที่เล็กลงกว่าเดิมและถูกชะออกมาในพีค F_S2

เมื่ออินคิวเบท IUD fluid กับเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ และ 0.1 มล.ของกรดอะซีติก 0.25 N ก่อนแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B ในบัฟเฟอร์ pH 8 พีค F_S1 ไม่ถูกทำลายโดยเอ็นไซม์ใดๆที่ใช้ทดสอบอย่างเห็นได้ชัด นอกจากเมื่ออินคิวเบทในกรดอะซีติก 0.025 N ปรากฏว่าพีค F_S1 หายไป, F_S2 เลื่อนไปทางขวาและมีความสูงของพีคเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่า F_S1 และ F_S2 บางส่วนถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กลงกว่าเดิมและออกมาพร้อมกันเป็นพีคเดียว

รูปที่ 7 การทดสอบคุณสมบัติของ IUD fluid ด้วยวิธีชีวเคมี

อินคิวเบท IUD fluid 1 มล. ปริมาณโปรตีน 2.5 มก. กับเอ็นไซม์ต่างๆ (100 ไมโครกรัม/ 0.1 มล.) หรือ 0.1 มล. ของกรดอะซีติก 0.25 N ที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B (เช่นเดียวกับรูปที่ 6) เปรียบเทียบกับ IUD fluid ปริมาณเท่ากันที่ไม่ผ่านการอินคิวเบท ระคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A, pH 8 หรือบัฟเฟอร์ B, pH 5

ก, ข IUD fluid ที่ไม่ผ่านการอินคิวเบท

ค, ฆ IUD fluid ที่อินคิวเบทกับ Deoxyribonuclease

ง, จ " " Ribonuclease

ฉ, ช " " Trypsin

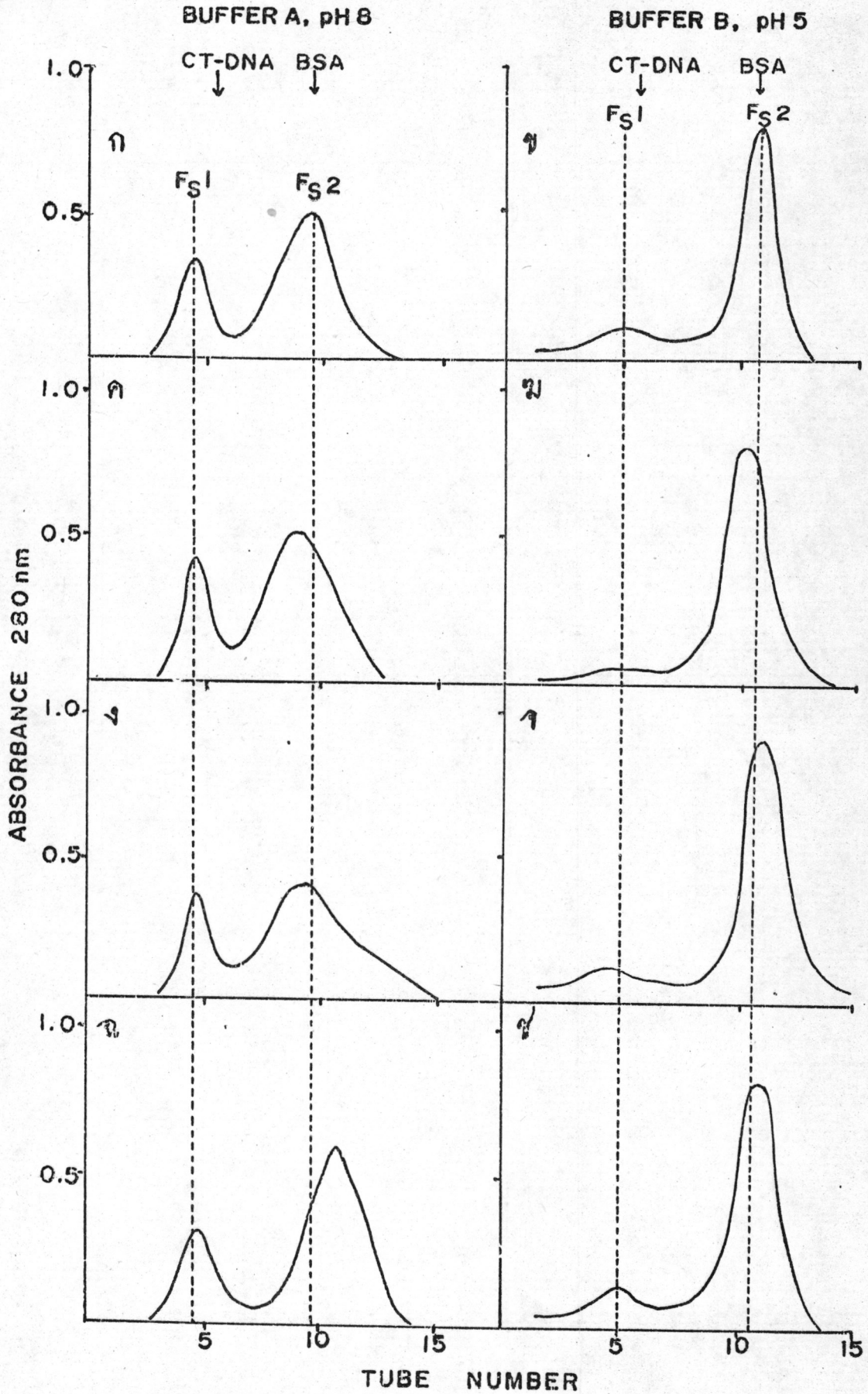
ซ, ฌ " " Chymotrypsin

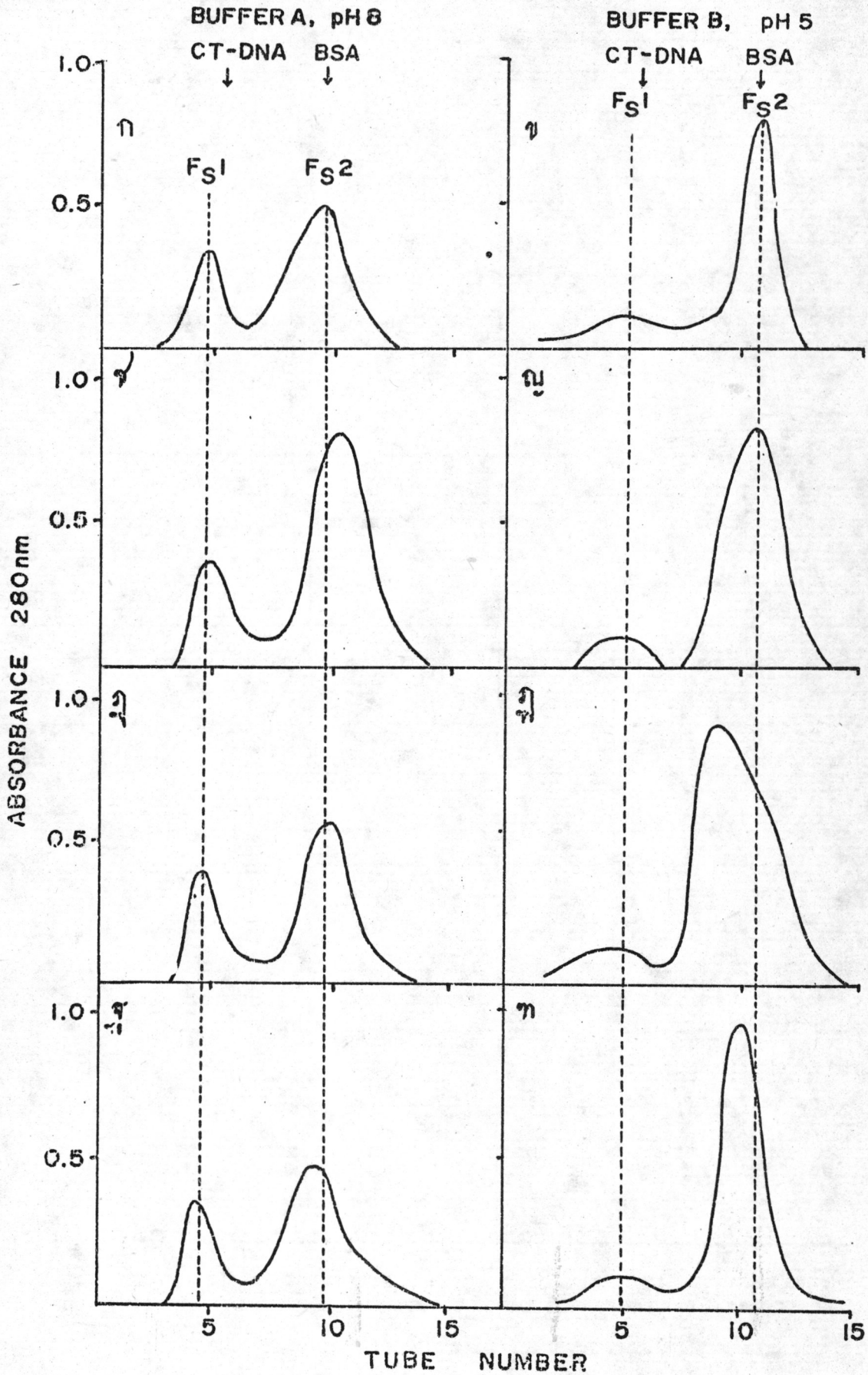
ญ, ฏ " " Papain

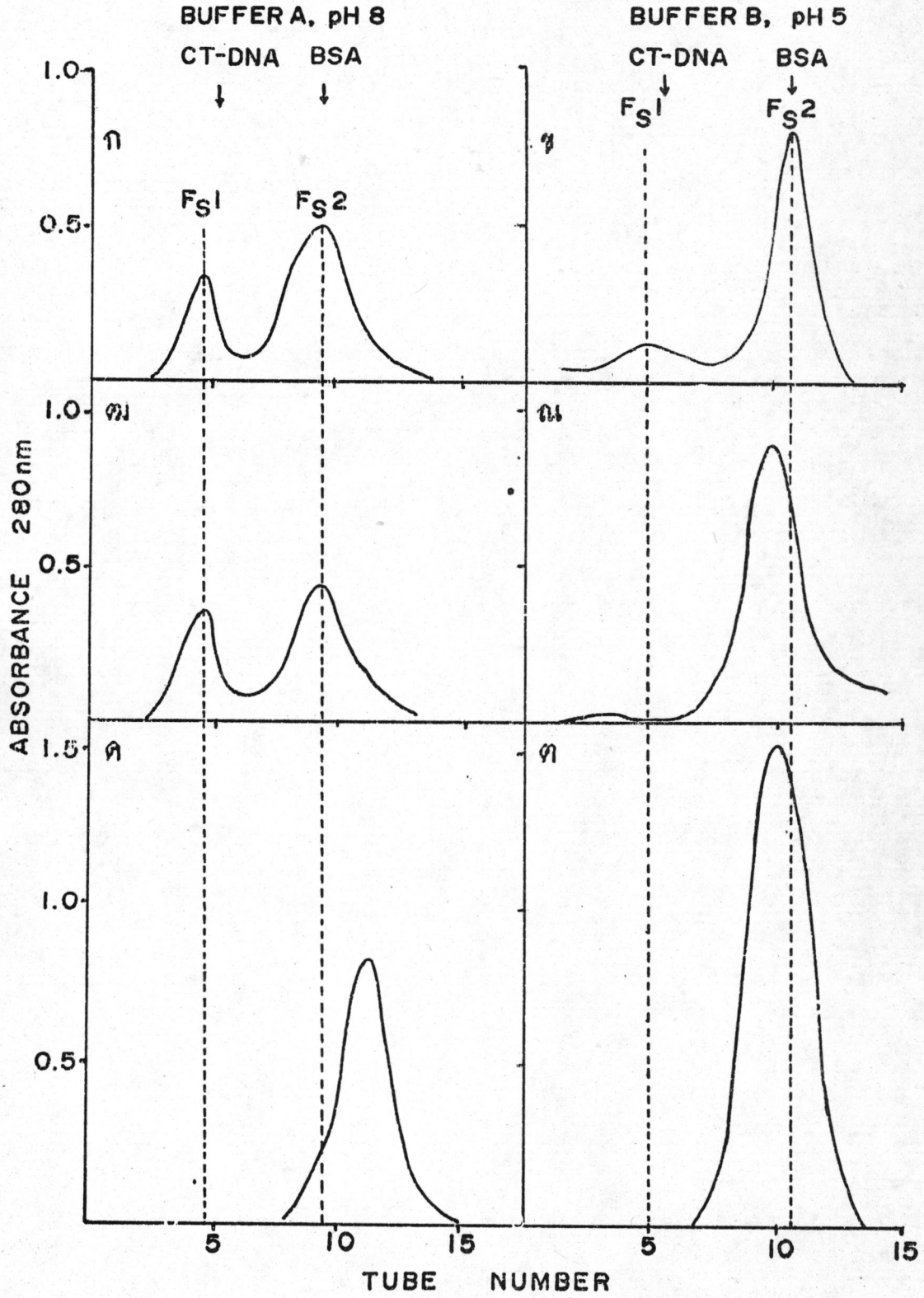
ฐ, ฑ " " α-Amylase

ฒ, ณ " " Lipase

ด, ต " " Acetic acid


BUFFER A, pH 8
BUFFER B, pH 5
CT-DNA
BSA
CT-DNA
BSA
Fs1
Fs2
Fs1
Fs2
ก
ข
ค
ฆ
ง
จ
ฉ
ช
1.0
0.5
ABSORBANCE 280 nm
5
10
15
TUBE NUMBER


BUFFER A, pH 8
CT-DNA
BSA
BUFFER B, pH 5
CT-DNA
BSA
Fs1
Fs2
Fs1
Fs2
ก
ข
ค
ง
จ
ฉ
ช
ซ
ฌ
ญ
1.0
0.5
ABSORBANCE 280nm
5
10
15
TUBE NUMBER


BUFFER A, pH 8
CT-DNA
BSA
BUFFER B, pH 5
CT-DNA
BSA
Fs1
Fs2
Fs1
Fs2
1.0
0.5
1.0
0.5
1.5
1.0
0.5
ABSORBANCE 280nm
5
10
15
5
10
15
TUBE NUMBER

การอินคิวเบท IUD fluid กับ Deoxyribonuclease หรือ Lipase จากรำข้าว ก่อนแยกบนคอลัมน์ ในบัฟเฟอร์ B, pH 5 มีผลทำให้ F_S1 ถูกทำลายมากกว่า IUD fluid ที่ไม่ผ่านการอินคิวเบท (รูปที่ 7 ฆ,ง) ในขณะที่การอินคิวเบท IUD fluid กับ Ribonuclease, protease และ α-Amylase ไม่มีผลในการทำลาย F_S1 เพิ่มเติมจากคอนโทรล (รูปที่ 7 จ,ช,ญ,ฏ,ท และ ข) การอินคิวเบทกับ 0.1 มล. ของกรดอะซีติก 0.25 N ทำให้ F_S1 ถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กลงและออกมาพร้อมกับ F_S2 แต่ไม่มีการเลื่อนตำแหน่งของพีค F_S2

สรุปผลจากการทดลองนี้แสดงว่า F_S1 ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการคุมกำเนิด ที่ pH 8 อยู่ในรูป complex ที่ทนทานต่อการย่อยด้วยเอ็นไซม์นานาชนิดที่กล่าวแล้ว แต่ในภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย คือในบัฟเฟอร์B, pH 5 บางส่วนของ F_S1 จะแตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงออกมาพร้อมกับ F_S2 ส่วนของ F_S1 ที่เหลือนี้ถูกทำลายได้ด้วยเอ็นไซม์ Deoxyribonuclease และ Lipase จากรำข้าว แต่ F_S1 ทั้งหมดจะถูกทำลายเมื่ออินคิวเบทในกรดอะซีติก 0.025 N แสดงว่า F_S1 นี้น่าจะประกอบด้วย DNA, triglycerides และโปรตีน จับกันอยู่ในรูปของ complex โดยมีส่วนของโปรตีนที่มี aspartic acid residue อยู่ส่วนนอก