บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. การผ่าตัดเพื่อใส่ห่วงคุมกำเนิดและเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

ใช้หนูทดลองกลุ่มที่ 1.1 (donor rats) ตรวจวงสืบพันธุ์ (oestrus cycle) ในตอน 8.00-9.00 น. ของทุกวันโดยใช้พาสเจอร์ไปเปตเล็กๆดูด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปล่อยเข้าช่องคลอดของหนูทดลอง และดูดกลับออกมา หยดบนแผ่นสไลด์ (Vagina smear) ตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หนูทุกตัวที่ทดลองจะต้องผ่านการตรวจสอบดูว่ามีวงสืบพันธุ์เป็นปกติแล้ว 2 รอบ ลักษณะเซลล์ที่ปรากฏใช้กำหนดแบ่งระยะต่างๆของวงสืบพันธุ์ของหนูขาว คือ

1. อิสตรัส (Oestrus) เป็นระยะที่หนูจะผสมพันธุ์ ระยะนี้นาน 9-15 ชม. จะมีการหลั่งอิสโตรเจนสูง มี follicle เกิดโตรวดเร็วเนื่องจากอิทธิพลของ Follicle stimulating hormone มดลูกจะขยายใหญ่โดยมีปริมาตรของเหลวในมดลูกสะสมมาก เยื่อบุมดลูกจะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส มีเซลล์ใหม่เกิดขึ้น เซลล์ชั้นบนจะมีรูปร่างเหลี่ยมและแบน เซลล์เหล่านี้จะหลุดเข้าสู่โพรงมดลูก และจะตรวจพบได้ในช่องคลอดในระยะปลายของอิสตรัส จะพบเซลล์ลักษณะเหลี่ยมและปนิวเคลียสที่สลายตัวจำนวนมากในช่องคลอด มีการตกไข่ มีการเปลี่ยนแปลงของ follicles ของเหลวในโพรงมดลูกหนูจะหมดไปก่อนที่มีการตกไข่ หนูที่มีระยะวงจรสืบพันธุ์ 5 วันจะมีระยะอิสตรัสประมาณ 2 วัน คือ ระยะแรกจะมี follicle ขนาดใหญ่ ไข่เกิดโตเต็มที่ นาน 12 ชม. ระยะที่สองมีการตกไข่ นาน 15-18 ชม.

2. เมทตาอิสตรัส (Metaoestrus) เกิดขึ้นหลังจากไข่ตก ระยะนี้นาน 10-14 ชม. หนูไม่ผสมพันธุ์ที่ระยะนี้ รังไข่ประกอบด้วย Corpora lutea และ follicles เล็กๆ มดลูกมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก พบเม็ดเลือดขาวชนิดลิวโคไซท์จำนวนมาก และเซลล์ชนิดเหลี่ยมเล็กน้อยที่ช่องคลอด

3. ไดอิสตรัส (Dioestrus) ระยะนี้นาน 60-70 ชม. Corpora lutea จะไม่ทำงาน มดลูกเล็ก ซีด และมีการหดตัวเพียงเล็กน้อย เยื่อบุมดลูกบาง ขนแต่ไม่โกโรมัสที่ช่องคลอด

4. โพรอิสตรัส (Proestrus) ระยะนี้นาน 12 ชม. มีการเติบโตของรังไข่ Corpora lutea จะทำงาน follicles ขยายใหญ่ มดลูกมีของเหลวและมีการหดตัวมาก ในช่องคลอดพบเยื่อบุผิวลักษณะคอลัมนีเวเคลียส

หนูทดลองที่จะใส่ห่วงอยู่ในระยะอิสตรัส วางยาสลบหนูด้วยอีเธอร์ ทำความสะอากบริเวณหน้าท้องด้วย 50% เมทธีลแอลกอฮอล เครื่องมือผ่าตัดทุกชิ้นฆ่าเชื้อในตู้อบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ผ่าหน้าท้องหนู ใส่ห่วงคุมกำเนิด (silk thread) ขนาด 5-0 ซึ่งฆ่าเชื้อโดยแช่ใน 70% เอทธีลแอลกอฮอล ตามวิธีของ Doyle และ Margolis (1963) โดยแทงเข็มที่มีห่วงคุมกำเนิดสอดอยู่ที่กึ่งกลางของโพรงมดลูกทางขวามือของผู้ทำการทดลอง ให้ห่วงคุมกำเนิดสอดอยู่ภายในโพรงมดลูกยาวประมาณ 1 ซม. แล้วเอาห่วงทั้งสองด้านมาผูกเข้าด้วยกันให้เป็นห่วงส่วนมดลูกทางซ้ายมือของผู้ทำการทดลองใช้เป็นคอนโทรล เพื่อเปรียบเทียบกับข้างขวาที่ใส่ห่วงคุมกำเนิดโดยสอดห่วงคุมกำเนิดผ่านทะลุเช่นเดียวกับมดลูกข้างขวา แล้วดึงห่วงคุมกำเนิดออก (sham operation) เพื่อให้มดลูกทั้งสองข้างอยู่ในสภาวะเดียวกัน เย็บปิดหน้าท้องแล้วทิ้งระยะให้หนูพักประมาณ 2 สัปดาห์ จึงเริ่มกรวจวงสืบพันธุ์ เพื่อเก็บของเหลวจากโพรงมดลูกข้างซ้ายเป็นคอนโทรลเรียก control fluid ของเหลวจากโพรงมดลูกข้างขวา ซึ่งใส่ห่วงเรียก IUD fluid

2. <u>การตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีในของเหลวจากโพรงมดลูกหนู</u>

2.1 <u>การหาความหนืด</u>

ใช้ Ostwald viscometer ใส่สารละลายตัวอย่างที่รู้ปริมาตรและน้ำหนัก จับเวลาที่สารละลายไหลจากขีดบนเหนือกระเปาะมาสู่ขีดล่างใต้กระเปาะเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

ที่ใช้เป็นมาตรฐาน

การคำนวณ

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{\rho_1 t_1}{\rho_2 t_2}$$

โดย n_1 = ความหนืดของน้ำกลั่น หน่วยคือ centipoiselle

n_2 = ความหนืดของสารละลายตัวอย่าง หน่วยคือ centipoiselle

ρ_1 = ความหนาแน่นของน้ำกลั่น หน่วยคือ กรัม/มล.

ρ_2 = ความหนาแน่นของสารละลายตัวอย่าง หน่วยคือ กรัม/มล.

t_1 = เวลาที่น้ำกลั่นไหลจากขีดบนมาสู่ขีดล่าง หน่วยคือ วินาที

t_2 = เวลาที่สารละลายตัวอย่างไหลจากขีดบนมาสู่ขีดล่าง หน่วยคือวินาที

2.2 <u>การหาปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ ,1951)

สารละลายที่ใช้มีดังนี้

2.2.1 sodium carbonate 2% ใน sodium hydroxide 0.1 N

2.2.2 potassium sodium tartrate 2%

2.2.3 copper sulfate 1%

2.2.4 phenol reagent 1 N

2.2.5 stock standard solution ของ Bovine serum albumin (BSA) 1 มก./มล.

ในการวัดปริมาณโปรตีนแต่ละครั้ง เตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัม/0.1 มล. สำหรับกราฟมาตรฐาน และเตรียม working solution โดยใช้ 1 มล.ของ 2% potassium sodium tartrate และ 1 มล. ของ 1% copper sulfate เติมใน 100 มล.ของ 2% sodium carbonate ผสมให้เข้ากันเป็น alkali copper solution ใช้สารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1มล. เติม

alkali copper solution 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาทีเติม phenol reagent จำนวน 0.3 มล. แล้วเขย่าให้ผสมกันทันทีเพื่อป้องกันการสลายตัวของ phenol reagent ในด่าง ทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที วัดการดูดแสงของสารละลายที่ 650 nm เทียบกับ blank ซึ่งทำแบบเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน และอ่านปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

2.3 <u>การหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์</u> (Morin และ Prox, 1973)

สารละลายที่ใช้มีดังนี้

2.3.1 catalyst reagent ประกอบด้วย polyvinylpyrrolidone 60 กรัม, dimethylformamide 9.6 มล., Triton X-100 1 มล.และ sodium azide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.3.2 acid molybdate reagent ประกอบด้วย ammonium molybdate 2.4 กรัม และ concentrated sulfuric acid 48 มล. ในน้ำกลั่น 200 มล.

2.3.3 reducing reagent ประกอบด้วย o-phenylenediamine hydrochloride 4.5 กรัม และ thiourea 15 กรัม ใน dimethylformamide 50 มล.

2.3.4 stock standard solution 1 มก./มล.ประกอบด้วย potassium dihydrogen phosphate 439 มก. ในน้ำกลั่น 100 มล.

ในการวัดปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์แต่ละครั้ง เตรียมสารละลายมาตรฐานของ potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 2-10 ไมโครกรัม/ 0.1 มล.สำหรับกราฟมาตรฐาน และเตรียม working reagent โดยใช้ acid molybdate reagent 200 มล., reducing reagent 40 มล.และ catalyst reagent 1 ลิตรผสมให้เข้ากัน

ใช้สารละลายที่ต้องการหาปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์ 0.1 มล. เติม working reagent 3 มล.เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดการดูดแสงของสารละลายที่ 725 nm เทียบกับ blank ซึ่งทำแบบเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายฟอสเฟต

และอ่านปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน potassium dihydrogen phosphate

2.4 <u>การหาปริมาณแคลเซียม</u> (Clark และ Collip, 1925 ซึ่ง modified โดย วีกูล วีรานุวัตติ์ และ กนกนาถ ชูปัญญา, 2520)

สารละลายที่ใช้มีดังนี้

2.4.1 ammonium oxalate 4 %

2.4.2 sodium oxalate 0.01 N ใน sulfuric acid 1 N

2.4.3 ammonium hydroxide 2 %

2.4.4 potassium permanganate 0.01 N เตรียมก่อนใช้

ใช้สารละลายที่ต้องการหาปริมาณแคลเซียม 2 มล. เติมน้ำกลั่น 2 มล. และ ammonium oxalate 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชม. แล้วไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ซับตะกอนที่ได้ให้แห้งบนกระดาษกรอง โดยคว่ำปากหลอดทดลองที่กระดาษกรอง 1-2 นาที เติม 2 % ammonium hydroxide 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ซับตะกอนให้แห้ง เติม 2 % ammonium hydroxide 2 มล. ล้างตะกอนซ้ำอีกครั้ง แล้วเติม sulfuric acid 1 N 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำร้อน (80-90 องศาเซลเซียส) ประมาณ 2 นาทีแล้วนำมาไตเตรทขณะที่กำลังร้อนกับ potassium permanganate 0.01 N เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน คือ sodium oxalate 0.01 N 2 มล. จนกระทั่งได้จุดสะเทินเป็นสีชมพูอ่อน จดปริมาตรของ potassium permanganate ที่ใช้ในการไตเตรท (ในกรณีที่กำลังไตเตรทก่อนที่จะถึงจุดสะเทิน สารละลายกลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน แสดงว่าเย็นเกินไป ต้องนำสารละลายนั้นไปทำให้ร้อนใหม่)

การคำนวณ

$$\text{จำนวน มก.ของแคลเซียม/ 100 มล.} = 20 \times \frac{x}{y}$$

$$\text{จำนวนไมโครกรัมของแคลเซียม/ไมโครลิตร} = \frac{20}{100} \times \frac{x}{y}$$

โดย x = จำนวนมล.ของ potassium permanganate ที่ใช้ไตเตรทสารละลายตัวอย่าง

y = จำนวนมล.ของ potassium permanganate ที่ใช้ไตเตรทสารละลายมาตรฐาน

3. วิธีทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิด (Bioassay)

004811

ใช้หนูทดลองกลุ่มที่ 1.2 (recipient rats) ผสมพันธุ์กับหนูตัวผู้กลุ่มที่ 1.3 ในตอนเช้าของวันที่ตรวจพบระยะโพรอีสตรัส โดยใช้หนูตัวผู้ 2 ตัวต่อหนูตัวเมีย 1ตัว ในวันรุ่งขึ้นถ้าพบสเปอร์มในช่องคลอดของหนูตัวเมีย เริ่มนับเป็นตั้งครรภ์วันที่ 1 นำมาใช้ทดลองเมื่อตั้งครรภ์วันที่ 4 เวลาเช้าประมาณ 8.30-10.00 น. โดยวางยาสลบแม่หนูด้วยอีเธอร์และผ่าหน้าท้อง ฉีด control fluid ปริมาตร 0.2 มล.เข้าโพรงมดลูกทางซ้ายมือของผู้ทำการทดลอง และฉีด 0.2 มล.ของสารต่างๆที่ต้องการจะทดสอบเข้าโพรงมดลูกทางขวามือของผู้ทำการทดลอง เย็บปิดหน้าท้อง

เมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ได้ 15 วัน ฆ่าแม่หนู เปิดหน้าท้องตรวจดูลักษณะการฝังตัวของตัวอ่อนและจำนวนของตัวอ่อนในมดลูกทั้งสองข้าง ถ่ายรูป แล้วนำมดลูกไป fix และทำให้ใสตามวิธีของ Orsini (1962) คือ fix ใน AFA (95% เอทธิลแอลกอฮอล 30 มล., ฟอร์มาลิน 10 มล., กรดอะซิติก 10 มล., และน้ำกลั่น 50 มล.) ทิ้งไว้ 18-24 ชม.แล้วขจัดน้ำโดยแช่ในเอทธิลแอลกอฮอล 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% และ 100% ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นแช่ 2 ครั้งๆละ 2 ชม. (ในเอทธิลแอลกอฮอล 70% และ 80% ใส่ hydrogen peroxide 2-3 หยด) จากนั้นทำให้เนื้อเยื่อใสโดยแช่ในเอทธิลแอลกอฮอล 100% + benzol (1:1) 2 ชม., ใน benzol 2 ครั้งๆละ 18-24 ชม. และเก็บมดลูกไว้ใน benzyl benzoate

4. การแยกแฟรกชั่นของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู

4.1 การแยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูโดยวิธี Dialysis

นำ IUD fluid ใส่ในถุง dialysis ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 นิ้ว (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, PA., USA.) แช่ในน้ำกลั่นซึ่งมีปริมาตร 1000 เท่าของปริมาตร IUD fluid คนด้วยเครื่องกวนสาร ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชม. จนถึงสภาวะสมดุลย์ ซึ่งทดสอบโดยการวัดปริมาณอนุมูลฟอสเฟต

4.2 การแยกของเหลวจากโพรงมดลูกหนูโดยวิธีโครมาโตกราฟี

คอลัมน์ Sephadex G-25

การเตรียมคอลัมน์ ใช้ Sephadex G-25 (Medium 50-150 ไมครอน) ซึ่งมีช่วงการแยกตั้งแต่ 1000-5000 ดาลตัน แช่ในน้ำกลั่นที่มี 0.02% โซเดียมเอไซด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม. (หรือที่ 100 องศาเซลเซียส 1 ชม.) เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่ แล้วนำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.3 X 26 ซม. total bed volume ของคอลัมน์คือ 35 มล. ผ่านคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น (0.02% โซเดียมเอไซด์) อย่างน้อย 24 ชม. ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้สมดุลย์ อัตราการไหลของสารละลายจากคอลัมน์ 2.5 มล.ต่อนาที operating pressure 84 ซม.

เติมสารตัวอย่างที่ต้องการแยก 1 มล. มีปริมาณโปรตีนประมาณ 2.5 มก. ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น (0.02% โซเดียมเอไซด์) เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. ติดต่อกัน 20 หลอดในเวลาประมาณครึ่งชม. ด้วยเครื่อง Fraction collector แต่ละหลอดหาปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดแสงอุลตราไวโอเลตที่ 280 nm

i 17380893

คอลัมน์ Sepharose 4B

ในการทดลองใช้บัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ

บัฟเฟอร์ A Tris-chloride pH 8 (0.1 M Tris hydrochloride, 0.1 M potassium chloride, 0.001 M ethylene diamine tetra acetic acid) เตรียมโดยละลาย Tris 3.025 กรัม, concentrated hydrochloric acid 1.15 มล., ethylene diamine tetra acetic acid 0.2926 กรัม และ potassium chloride 7.455 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่โซเดียมเอไซด์ 0.02% ในบัฟเฟอร์เพื่อป้องกันแบคทีเรีย

บัฟเฟอร์ B Sodium acetate pH 5 (0.1 M sodium acetate, 0.001 M disodium ethylene diamine tetra acetate) เตรียมโดยละลาย sodium acetate 8.204 กรัม, sodium chloride 0.5844 กรัม, disodium ethylene diamine tetra acetate 0.3722 กรัม และ concentrated acetic acid 0.66 มล. ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่โซเดียมเอไซด์ 0.02% ในบัฟเฟอร์เพื่อป้องกันแบคทีเรีย

การเตรียมคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาด 1.5 X 5 ซม. total bed volume 8 มล. บรรจุด้วย Sepharose 4B ซึ่งมีช่วงการแยกตั้งแต่ $3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ กาลตันที่ ล้างด้วยบัฟเฟอร์แล้วหลายๆครั้ง ปรับอัตราการไหลรองสารละลายจากคอลัมน์ 0.5 มล.ต่อนาที ที่ operating pressure 45 ซม. เติมสารตัวอย่าง 1 มล.ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 2.5 มก. ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A หรือ B เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์โดยเก็บหลอดละ 1 มล.ติดต่อกัน 20 หลอดในเวลาประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดแสงอุลตราไวโอเลตที่ 280 nm

5.การทดสอบคุณสมบัติของ IUD fluid ด้วยวิธีชีวเคมี

นำ IUD fluid ปริมาณโปรตีน 2.5 มก./มล. อินคิวเบทกับเอ็นไซม์ต่างๆ ปริมาณ 100 ไมโครกรัม/0.1 มล. หรือกรดอะซีติก 0.25 M จำนวน 0.1 มล.ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ใช้ optimum pH ของเอ็นไซม์เป็น 7-9 แล้วนำสารละลายนั้นมาแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น