การศึกษาคุณลักษณะของซีวโมเลกุลในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด

นางสาววิไล เยาวพลกุล

004811

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรของปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๒๑

i 17380893

CHARACTERIZATION OF BIOMOLECULES IN RAT INTRA-UTERINE FLUID WITH INTRA-UTERINE DEVICE

Miss Wilai Yaovapolkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Education

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณลักษณะของซีวโมเลกุลในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด
โดย	นางสาววิไล เยาวพลกุล
แผนกวิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. วิทิษฐ์ ประจวบเหมาะ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ชอบเสียง)

.....กรรมการ
(ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณลักษณะของชีวโมเลกุลในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด
ชื่อนิสิต	นางสาววิไล เยาวพลกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญยวัฒน์
แผนกวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2520

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้ เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณลักษณะของชีวโมเลกุลในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูทดลองที่ใส่ห่วงคุมกำเนิด (IUD) ชนิด silk thread การศึกษาเปรียบเทียบของเหลวในโพรงมดลูกที่ใส่ห่วงและไม่ใส่ พบว่าความหนืดและ pH ของของเหลวจากโพรงมดลูกที่ใส่ห่วง (IUD fluid) ไม่แตกต่างจาก control fluid อย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าปริมาตรของ IUD fluid เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า ความเข้มข้นของโปรตีน, ฟอสเฟตอนินทรีย์ และแคลเซียมใน IUD fluid ก็เพิ่มขึ้นประมาณ 7, 20 และ 7 เท่าตามลำดับ

การทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid ทำโดยฉีดของเหลวที่จะทดสอบ 0.2 มล. เข้ามดลูกข้างขวาของแม่หนูตั้งครรภ์วันที่ 4 และฉีด control fluid ที่เหมาะสมจำนวนเท่ากันเข้ามดลูกข้างซ้ายและเปรียบเทียบจำนวนและการเติบโตของตัวอ่อนในมดลูกทั้ง 2 ข้าง เมื่อแม่หนูตั้งครรภ์ถึงวันที่ 15 การทดลองนี้ยืนยันว่าการฉีด IUD fluid ที่เก็บทันทีมีผลในการคุมกำเนิดโดยเกี่ยวข้องกับการฝังตัวของบลาสโตซิสต์และลดจำนวนตัวอ่อนที่เติบโตเป็นปกติ การเก็บ IUD fluid ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 วัน หรือ -70 องศาเซลเซียส 1-8 สัปดาห์ แม้จะทำให้มีการฝังตัวของตัวอ่อนได้ แต่ก็นับว่ามีผลในการคุมกำเนิด เนื่องจากสามารถยับยั้งการเติบโตอย่างปกติของตัวอ่อน ทำให้พบแต่ residual masses หรือ resorption sites ความสามารถในการคุมกำเนิดที่กล่าวนี้สูญเสียไปโดยสิ้นเชิงเมื่อเก็บ IUD fluid ที่ -70 องศาเซลเซียส นานกว่า 8 สัปดาห์ หรือทำให้ร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นานเกิน 10 นาที แม้ว่าจะทนทานต่อการทำให้ร้อนในระยะเวลาสั้น

การเติมฟอสเฟตอนินทรีย์ใน control fluid ให้มีความเข้มข้นของฟอสเฟตอนินทรีย์เท่ากับระดับที่พบใน IUD fluid ทำให้ของเหลวนั้นมีผลในการคุมกำเนิดเช่นเดียวกับ IUD fluid ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดีเมื่อลือเอาความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดเป็นหลัก, ปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดในการที่ IUD fluid สามารถยับยั้งการเติบโตของตัวอ่อนเป็น 30 ไมโครกรัม/0.2 มล.

ผลการแยก IUD fluid โดยวิธี dialysis และกอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วทดสอบความสามารถในการคุมกำเนิดของแต่ละแฟรกชั่น แสดงว่า F_S1 ซึ่งเป็นแฟรกชั่นของมหโมเลกุลขนาดประมาณ 3×10^6 กาลตันหรือใหญ่กว่าเมื่อแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการคุมกำเนิด การย่อย F_S1 ด้วยเอ็นโซม์ที่มีความจำเพาะหลายชนิดและกรดอะซีติก 0.25 N ก่อนแยกบนคอลัมน์ Sepharose 4B ที่ pH 8 และ 5 แสดงว่าที่ pH 5, F_S1 บางส่วนแตกตัวออกเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลง ส่วนที่เหลือถูกทำลายโดยง่ายด้วย deoxyribonuclease และ lipase ส่วนกรดอะซีติก 0.25 N ทำลาย F_S1 ได้หมดที่ pH ทั้งสอง

จากผลทั้งหมดนี้สรุปได้ว่า ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid ไม่ควรจะเกิดเนื่องมาจากสาร simple หรือโมเลกุลขนาดเล็กชนิดเดียว แต่ควรจะเป็นสารเชิงซ้อน (complex form) การรวมตัวของสารเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพนี้น่าจะต้องการฟอสเฟตอนินทรีย์ความเข้มข้นสูงกว่าปกติและประกอบด้วยโปรตีนปริมาณที่พอเหมาะอันหนึ่งส่วนของ complex ที่มีความสามารถในการคุมกำเนิดโดยไปยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนนั้นสลายตัวได้ง่าย และไม่สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำเท่าที่ได้ทดลองมาแล้วเลย อย่างไรก็ตามส่วนของ complex ที่ร่วมในการคุมกำเนิดโดยยับยั้งการเติบโตของตัวอ่อนนั้นน่าจะประกอบด้วยมหโมเลกุลหลายชนิดคือ DNA, triglycerides และโปรตีนซึ่งมี aspartic acid residue อยู่รอบนอก

Thesis Title	Characterization of Biomolecules in Rat Intra-uterine Fluid with Intra-uterine Device
Name	Miss Wilai Yaovapolkul
Thesis Advisor	Dr. Jariya Boonjawat
Department	Biochemistry
Academic Year	1977

ABSTRACT

This thesis concerns the characterization of biomolecules in rat intra-uterine fluid with silk thread intra-uterine device (IUD). Comparative study of pooled uterine fluid showed that, viscosity and pH of IUD-bearing uterine fluid (IUD fluid) were not significantly different from control fluid, although the fluid-volume increased about 4-fold. Concentrations of total protein, inorganic phosphate and calcium were also increased to 7, 20 and 7-fold of those in control fluid.

Bioassay for contraceptive activity of uterine fluid was performed by injecting 0.2 ml of testing fluid into the right uterine of a Day 4 pregnant, recipient rat, and the same amount of proper control fluid was injected into the left uterine, and compared the number and growth of embryos in both uteri on Day 15 of pregnancy. By using this method it was confirmed that freshly-transferred IUD fluid exerted contraceptive activity by concerning about implantation of blastocyst and decreasing the number of conceptus. Storage of IUD fluid at 4°C for 1 day or at -70°C for 1-8 weeks allowed implantation to occur but still resulted in contraceptive action by inhibiting normal growth of embryos as evidenced

by the observation of the residual masses or resorption sites. This contraceptive activity was absolutely destroyed when IUD fluid was stored at -70°C longer than 8 weeks or heated at 100°C longer than 10 minutes although it can stand short heat treatment.

Addition of inorganic phosphate into control fluid until phosphate concentration reached that found in IUD fluid resulted in contraceptive activity as possessed by 4°C-stored IUD fluid. However with respect to total protein concentration, the minimum effective dose of contraceptive activity required at least 30 µg protein in 0.2 ml uterine fluid to fluid to inhibit growth of embryos.

Separation of IUD fluid by dialysis and column chromatography, and assay for biological activity of each fraction showed that F_S1, a macromolecular fraction approximately 3×10^6 dalton or larger on Sepharose 4 B column, should be involved in contraceptive action. Treatment by several specific enzymes and 0.25 N acetic acid befored elution on Sepharose 4B column at pH 8 and 5 demonstrated that, at pH 5, most of F_S1 dissociated and the rest was likely destroyed by deoxyribonuclease and lipase. Whereby 0.25 N acetic acid readily destroyed F_S1 completely at both pH.

It is concluded from all these results that contraceptive effect of IUD fluid should not reside in a simple or small molecule, but rather in a complex form. Formation of this biological active complex should require high concentration of inorganic phosphate, and to be functioning, required a certain amount of protein. Part of the complex, which enables contraceptive action via anti-implantation, is very labile and cannot be

stored even at low temperature tested so far. However, the other moiety, which exerts its contraceptive action on growth of foetus might be composed of several types of macromolecules, namely DNA, triglycerides and protein, which is likely containing aspartic acid residue on the outer part.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

รองศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ชอบเสียง

อาจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

อาจารย์ ดร. พีรดา สิริจินตกานต์

Dr. M. Roy Chaudhury และ Dr. R.R. Chaudhury

ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง มณฑิรา คัณฑ์เกยูร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ประมวล วีรุฒมเสน

นายแพทย์ บุญธรรม ศุนทรเกียรติ

อาจารย์ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์

อาจารย์ยุทธนา สมิตะสิริ

คุณเพ็ญนิภา บุญวิสุทธิ์

คุณนภาศรี ตลับเพชร

คุณจรัล เอกวิภาต

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณองค์การอนามัยโลก ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

กิตติกรรมประกาศ..... ช

รายการตารางประกอบ..... ฌ

รายการรูปประกอบ..... ญ

คำย่อ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 6

3. วิธีการวิจัย..... 10

4. ผลการวิจัย..... 18

1. pH, ปริมาตรและความหนืดของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู..... 18

2. โปรตีน, ฟอสเฟตอนินทรีย์และแคลเซียมในของเหลวจากโพรงมดลูกหนู 18

3. ความสามารถในการคุมกำเนิดของของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วง (IUD fluid) 20

4. เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid 24

5. ความสามารถในการคุมกำเนิดของฟอสเฟตอนินทรีย์..... 33

6. ปริมาณน้อยที่สุดของ IUD fluid (เทียบจากปริมาณโปรตีนทั้งหมด) ที่มีความสามารถในการคุมกำเนิด..... 33

7. การแยกแฟรกชั่นของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู..... 36

8. การทดสอบคุณสมบัติของ IUD fluid ด้วยวิธีชีวเคมี..... 45

5. วิจารณ์ผลการวิจัย..... 53

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 58

เอกสารอ้างอิง..... 60

ประวัติผู้เขียน..... 64

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	pH, ปริมาตร, และความหนืดของของเหลวจากโพรงมดลูกหนู.....	19
2	ปริมาณโปรตีน, ฟอสเฟตอนินทรีย์, และแคลเซียมในของเหลวจากโพรงมดลูกหนูที่ใส่ห่วงและไม่ใส่.....	21
3	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เปรียบเทียบกับ control fluid และ 0.85% โซเดียมคลอไรด์.....	22
4	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid หลังจากเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชม.	25
5	เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของของเหลวในโพรงมดลูกหนูหลังจากเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-11 สัปดาห์.....	28
6	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ glycerol	31
7	อิทธิพลของความร้อนต่อความสามารถในการคุมกำเนิด.....	32
8	ความสามารถในการคุมกำเนิดของฟอสเฟตอนินทรีย์.....	34
9	ปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดใน IUD fluid ที่มีความสามารถในการคุมกำเนิด	35
10	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ dialysable fraction ของ IUD fluid	37
11	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ non-dialysable fraction ของ IUD fluid อย่างเดียว และ non-dialysable fraction ที่รวมกับ dialysable fraction	38
12	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ F_G1 และ F_G2 ที่ได้จากการแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25	41
13	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ F_S1 และ F_S2 ที่ได้จากการแยก IUD fluid บนคอลัมน์ Sepharose 4B	46

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid	23
2	เสถียรภาพของความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส.....	26
3	การสูญเสียความสามารถในการคุมกำเนิดของ IUD fluid เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 8 สัปดาห์.....	29
4	การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25	40
5	การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sephadex G-25 เพื่อหาการกระจายของฟอสเฟตอนินทรีย์.....	43
6	การแยก control และ IUD fluid บนคอลัมน์ Sepharose 4B	44
7	การทดสอบคุณสมบัติของ IUD fluid ด้วยวิธีชีวเคมี.....	48

คำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
B	Blue dextran
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Adenosine 3′, 5′-cyclic phosphate
CT-DNA	Calf thymus deoxyribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
IUD	Intra-uterine device
K	Potassium chromate
RNA	Ribonucleic acid