วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อยู่ในห้องที่อากาศมีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซนติเกรด ได้รับแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 06.00-20.00 น.) และความมืด 10 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 20.00-06.00 น.) โดยใช้สวิทช์อัตโนมัติ ให้กินอาหารมาตรฐานซึ่งสั่งจากบริษัท F.E. Zuelling (Gold Coil Mills) และมีน้ำประปาให้กินตลอดเวลา ใช้หนูทั้งเพศผู้และเพศเมีย อายุ 30 วัน โดยให้หย่านมตอนอายุได้ 22 วัน หนูที่ใช้ถ้าเป็นเพศผู้ต้องมีน้ำหนัก 60 ± 5 กรัม หนูเพศเมียมีน้ำหนัก 55 ± 3 กรัม

2. การเตรียมฮอร์โมนสำหรับใส่หลอดแก้วฝังสมองหนู

ฮอร์โมนที่ใช้มี 4 ชนิดคือ FSH, LH, GH และ PMSG ชั่งฮอร์โมนแต่ละชนิดด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม นำมาผสมกับ cholesterol ซึ่งมีน้ำหนักเท่ากันในโกร่ง ด้วยการบดให้เข้ากัน แต่ละฮอร์โมนแยกไว้แต่ละโกร่ง เก็บไว้ใน desiccator ในตู้เย็น

3. การเตรียมหลอดแก้ว capillary สำหรับบรรจุสารที่ใช้ฝังสมองส่วนไฮโปทาลามัส

ใช้หลอดแก้วกลวงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร นำส่วนกลางไปลนไฟจากเตาแก๊สขนาดเล็ก (camping gas) โดยใช้มือจับปลาย 2 ข้างของหลอด เมื่อเนื้อแก้วอ่อนตัวลงค่อย ๆ ดึงให้ยืดออกตรง ๆ จนได้ขนาดที่ต้องการ ทิ้งให้เย็น ใช้ตะไบ 3 เหลี่ยมถักเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร โดยให้ปลายหลอดมีลักษณะกลมเรียบ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.35 ± 0.05 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อโรคก่อนใช้ โดยใส่ในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซนติเกรด

4. การบรรจุสารทดลองเข้าหลอดแก้ว

นำหลอดแก้วที่เตรียมจากข้อ 3 จิ้มปลายข้างหนึ่งลงในสารผสมของฮอร์โมนแต่ละชนิด กับ cholesterol กดหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งสารผสมบรรจุอยู่แน่นที่ปลายหลอด และสูงขึ้นมาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งจะหนักประมาณ 0.1-0.2 มิลลิกรัม แล้วค่อย ๆ เช็ดสารที่อาจติดอยู่ข้าง ๆ หลอดให้หมดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ที่สะอาด

5. การฝังหลอดแก้ว capillary บรรจุฮอร์โมนในสมองส่วนไฮโปทาลามัส บริเวณ median eminence (De Groot, 1959)

นำหนูมาทำให้สลบโดยให้ดม ether แล้วใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็ก ตัดหูชั้นนอกตรงส่วนที่ติดกับลำตัว ให้ขาดออกจากกันเล็กน้อยเพื่อเห็น external auditory meatus ได้ชัด ใช้ ear clip สอดเข้าไปในช่อง external meatus ทั้งสองข้าง แล้วนำเข้าเครื่อง stereotaxic โดยให้หนอนคว่ำ ช่องของ ear clip ยึดติดกับ ear bar ทั้งสองข้าง ส่วนฟันหน้าซี่บนพาดอยู่บน palate bar ซึ่งจะอยู่เหนือระดับ internal line 5 มิลลิเมตร ใส่ nose clamp บนจมูกของหนูเพื่อกันไม่ให้ส่วนหัวเคลื่อนที่ เวลาหนูดิ้น ใช้สำลีชุบ ether ให้ดมตลอดเวลาที่ทำการฝังสมอง ใช้สำลีชุบ 70% ethyl alcohol เช็ดฆ่าเชื้อโรคบริเวณหัวส่วนบน แล้วใช้กรรไกรตัดหนังตรงกลางหัวยาวประมาณ 1 1/2 เซนติเมตร ใช้คลิปเล็ก ๆ หนีบหนังดึงให้ออกมาทั้งสองข้าง ใช้เข็มปลายโค้งเขี่ยพังผืดบนกระโหลกออกให้หมด จะเห็น bregma (รอยต่อของกระดูก frontal และ parietal ซึ่งยังต่อกันไม่สนิทดี) ใช้ดินสอดำจุดไว้ให้เห็นชัด แล้วขันสกรูปลายแหลมลงบนกระโหลก 2 แห่ง ด้วยไขควงเพื่อยึดหลอดแก้ว ต่อไปเจาะกระโหลกตรง bregma ด้วยสว่านเจาะกระโหลกขนาดเล็ก แล้วฝังหลอดแก้วที่บรรจุฮอร์โมนลงไปจนปลายหลอดอยู่เหนือ interaural line 1.3 มิลลิเมตร หลังจากนี้ใช้สำลีแตะผง tetracyclin ทาบริเวณที่เผาตัดบนกระโหลกเพื่อกันการติดเชื้อ หลังจากนั้นละลาย dental cement ให้เหลวกำลังดี แล้วยาลงบนกระโหลกโดยพยายามปิดแผลให้หมด เมื่อ dental cement แข็งตัวดีแล้วก็จะยึดหลอดแก้วให้ติดกับสกรู ซึ่งจะยึดติดกับกระดูก

กระโหลกอีกทีหนึ่ง แล้วใช้กีมตัดหลอดแก้วส่วนที่พ้นจาก dental cement ออก (พัชนี, 2516)

6. การตรวจการเปิดของช่องคลอด (vaginal canalization)

หลังจากการฝังสมอง ตรวจการเปิดของช่องคลอดของหนูเพศเมียทุกวัน โดยจับหนูหงายท้องดูบริเวณระหว่าง clitoris และช่องทวารหนัก ถ้าช่องคลอดเริ่มเปิดจะพบช่องระหว่างนี้ แล้วสามารถสอด spatula ลงไปได้ลึกอย่างต่ำครึ่งเซนติเมตร

7. การชั่งน้ำหนักหนู

ชั่งน้ำหนักหนูทุก ๆ วัน หลังจากการฝังสมอง โดยทำการชั่งในเวลา 10.00 น. ± 1/2 ชั่วโมง

006369

8. การตรวจวงสืบพันธุ์ (vaginal smear)

หลังจากการเปิดช่องคลอด หนูตัวเมียต้องได้รับการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวัน ซึ่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์ กำหนดจากลักษณะของเซลที่ปรากฏใน vaginal smear (Long & Evans, 1922) ทำโดยใช้แท่งแก้วปลายมนแบน จุ่มน้ำเกลือ (0.85% NaCl) แตะที่ผนังด้านในของช่องคลอดแล้วป้ายบนสไลด์ที่สะอาด นำมาส่องด้วยกล้องจุลทัศน์ จะเห็นเซลรูปต่าง ๆ กันอันจะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะของวงสืบพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะคือ

8.1 Proestrus เป็นระยะก่อนการตกไข่ ระยะนี้ภายในรังไข่จะมี follicles เติบโตจนถึงขั้น preovulatory swelling มีการสร้างฮอร์โมน estrogen สูง เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงสูง ที่ผนังของช่องคลอดจะเกิดมีการแบ่งตัวของ epithelial cells ทำให้มีความหนาเพิ่มขึ้น การทำ vaginal smear จะพบเซลกลมค่อนข้างกลม มีนิวเคลียสเห็นชัดเจน เรียกว่า nucleated cells และไม่พบเซลเม็ดเลือดขาวเลย ในตอนท้ายของระยะนี้หนูจะมี heat พร้อมที่จะผสมกับหนูตัวผู้ได้ ระยะนี้กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง

8.2 Estrus เป็นระยะต่อจาก proestrus ระยะนี้กินเวลาประมาณ 9-15

ชั่วโมง ตอนต้นของระยะนี้ estrogen ถูกสร้างในระดับสูงสุด จากนี้จะมีการตกไข่ หลังจากการตกไข่ระดับฮอร์โมน estrogen จะลดลง มดลูกมีขนาดเล็กลงเนื่องจากสูญเสียน้ำ ผนังช่องคลอดยังคงหนาและเกิด cornifacation เซลที่หลุดออกมาอยู่ใน lumen มีลักษณะเป็นเซลขนาดใหญ่ ไม่มีนิวเคลียส มีรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า cornified cell ตอนใกล้จะสิ้นสุดของระยะนี้จะเริ่มมีเซลเม็กเลือดขาวเข้ามาปะปนเล็กน้อย

8.3 Metestrus เป็นระยะสั้น ๆ เกิดขึ้นหลังจากตกไข่แล้ว กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ระยะนี้ฮอร์โมน estrogen ในเลือดต่ำมาก ในรังไข่จะพบ corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุด และ follicle เล็ก ๆ จำนวนมาก มดลูกยังมีขนาดเล็ก ใน vaginal smear จะเริ่มมีเม็กเลือดขาวปะปนมากขึ้น

8.4 Diestrus เป็นระยะที่นานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณ 60-70 ชั่วโมง ระยะนี้รังไข่ไม่สร้าง estrogen เลย corpora lutea เริ่มสลายตัว มดลูกมีขนาดเล็ก epithelial cells ของช่องคลอดบางกว่าระยะอื่นใน vaginal smear จะพบเซลเม็กเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่

9. <u>การ autopsy</u>

การฆ่าหนูใช้วิธีให้ดม ether แล้วเปิดหน้าท้องหนูตัดเป็นช่องกว้าง ถ้าเป็นหนูเพศเมีย ตัดส่วนของมดลูกและรังไข่ออกมาชั่ง จดน้ำหนักไว้ แล้วนำรังไข่ไป fix ใน Kahle's AFA ถ้าเป็นเพศผู้ ตัดส่วนของลูกอัณฑะและ ventral prostate gland นำมาชั่งจดน้ำหนักไว้ แล้วนำลูกอัณฑะและส่วนของ epididymis ทั้ง 2 ข้างไป fix ใน Kahle's AFA แล้วใช้กรรไกรตัดคอและกรามล่างออก เหลือแต่หัวส่วนบน แกะเอาต่อมใต้สมองออกมา แยกเอาส่วน posterior lobe ออก เหลือส่วนของ anterior lobe นำมาชั่ง จดน้ำหนักไว้ ก่อนนำไป fix ใน Helly's fluid หัวส่วนบนนำมาแช่ในน้ำยา formalin 10 % เป็นเวลา 10 วัน เมื่อส่วนของสมองแข็งดีแล้ว ตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอด ถ้าเห็นปลายหลอดอยู่ตรงตำแหน่งที่ต้องการฝัง จึงจะรวมไว้ในการทดลอง

10. การทำ paraffin section ของรังไข่ ลูกอัณฑะ และ epididymis

10.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

10.1.1 Kahle's AFA

ประกอบด้วย 70 % ethyl alcohol 90 มิลลิลิตร glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร และ formaldehyde 5 มิลลิลิตร น้ำยานี้เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

10.1.2 Ehrlich's acid haematoxylin

ชั่ง haematoxylin 8 กรัม ใส่ใน 95 % ethyl alcohol (หรือ absolute alcohol) 400 มิลลิลิตร อุ่นบน water bath จนละลายเข้าด้วยกัน แล้วชั่ง potash alum 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 นี้มาผสมกัน เติม glycerine 400 มิลลิลิตร glacial acetic acid 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่ขวดอุดด้วยสำลีอย่างหลวม ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้ถูกแสงแดดประมาณ 6 อาทิตย์ (ถ้าต้องการให้สุกรวดเร็วใช้ได้ทันที ก็เติม potassium permanganate 0.4 กรัม ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร)

10.2 การทำสไลด์

นำรังไข่ ลูกอัณฑะ และ epididymis ซึ่ง fix ไว้ใน Kahle's AFA ในตู้เย็นประมาณ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ใน 70 % ethyl alcohol ประมาณ 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำมา dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 80 % ethyl alcohol, 90 % alcohol, 95 % alcohol, 95 % alcohol + n-butyl alcohol และ n-butyle alcohol ตามลำดับขั้นละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน xylol อีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้ tissue ใส ต่อมาจากนั้นนำไปแช่ในส่วนผสมของ xylol และ paraplast อย่างละเท่า ๆ กัน เก็บไว้ในตู้อบซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนไปแช่ใน paraplast อีก 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ในตู้อบเดียวกัน แล้วนำ tissue มา embed ใน paraplast หลังจากทิ้งให้แข็งดีแล้วนำไปตัด section หนา 8 ไมครอน แล้วนำมาติดบนสไลด์ที่ทาด้วย egg albumin แล้วนำไปย้อมสี

Ehrlich's acid haematoxylinและ eosin ตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์

11. การทำ frozen section ของสมองเพื่อดูลักษณะของ เซลและบริเวณที่ฝังหลอดทดลอง

11.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

11.1.1 Albrecht's alcoholic gelatine (Albrecht,1954)

ชั่งผง gelatin 1.5 กรัม ละลายในน้ำอุ่น (50-55°c) 120 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ โรยผง gelatin ลงไปคนให้เข้ากันประมาณ 10 นาที จนละลายดีแล้ว จึงเติม absolute alcohol 80 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

11.1.2 0.5 % cresyl violet

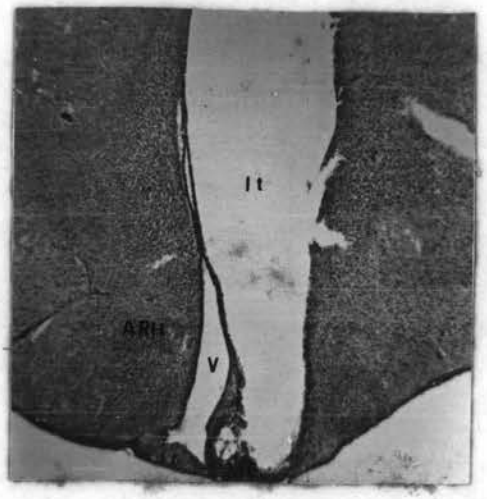
ชั่ง cresyl violet 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution เมื่อจะใช้จึงกรองและเติม glacial acetic acid (dilute 1 : 10) 4 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร

11.2 การตัดและติด section บนสไลด์

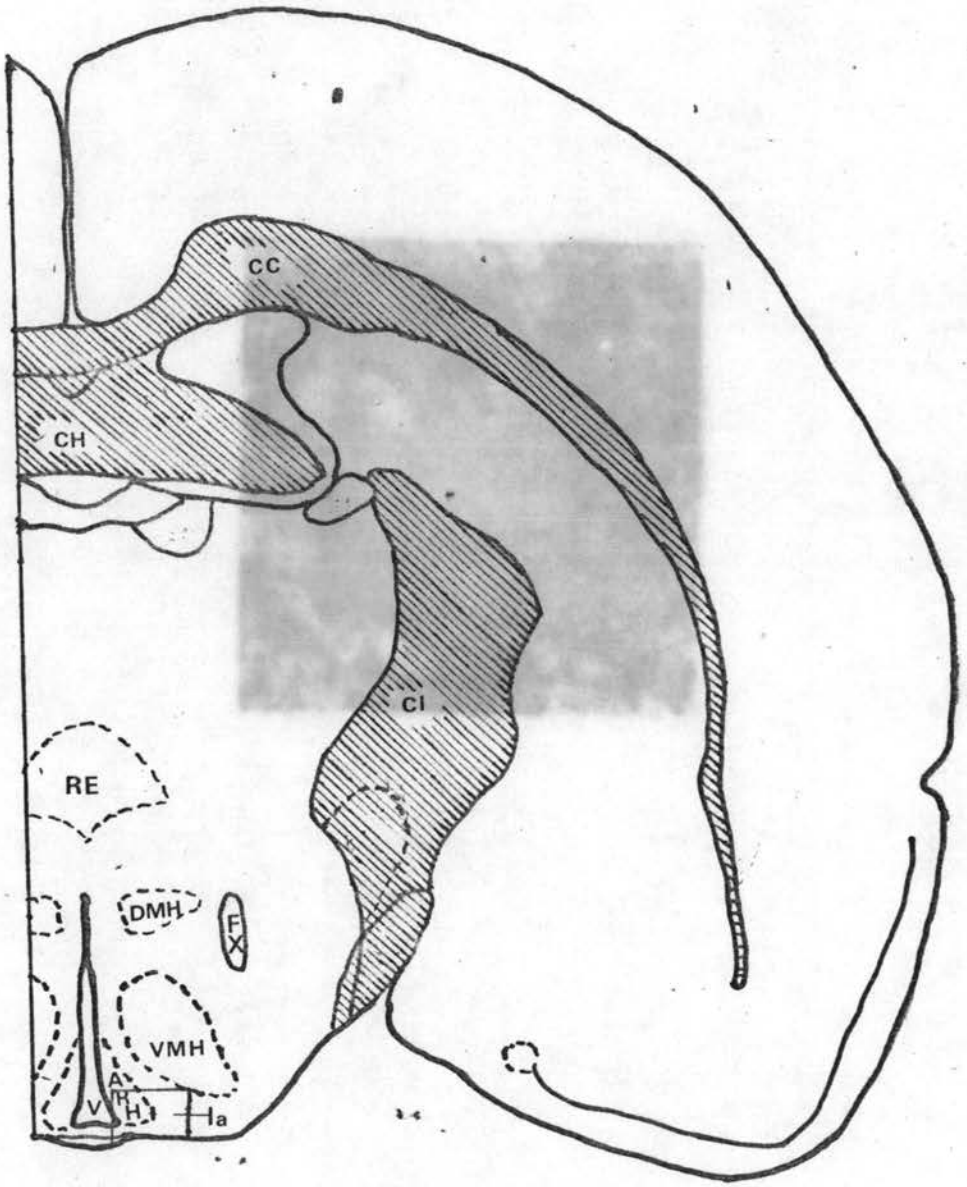
นำส่วนสมองที่ต้องการตัด section ที่ได้ fix ใน 10% formalin 10 วัน แล้วมาติดบนแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง cryostat IEC โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยา cryoform แล้วทำให้เย็นจัดโดยใส่ในเครื่อง cryostat ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -20°c ทันที ทิ้งไว้ในเครื่อง 1 คืน เพื่อให้ tissue เย็นจัดทั่วกันหมด แล้วทำการตัด section หนา 24 ไมครอน นำแต่ละ section ไปใส่ใน Albrecht's alcoholic gelatineอย่างน้อย 5 นาที แล้วใช้ภู่กันขนอ่อน ช้อนมาวางบนสไลด์ ให้กระดาษซับรอบ ๆ tissue แล้วปล่อยให้ระเหยจนแห้ง เมื่อแห้งดีแล้วนำทั้งสไลด์แช่ใน 95 % ethyl alcohol, section จะติดสไลด์แน่นด้วย gelatin ที่เหลืออยู่ หลังจากนั้นนำมา hydrate ต่อจนถึงขั้นน้ำ แล้วนำไปย้อมสี cresyl violet ต่อไป

11.3 การย้อมสี cresyl violet เพื่อดูลักษณะของ เซลและบริเวณที่ฝังหลอดทดลอง (Fernstrom, 1958)

นำสไลด์จาก 11.2 แช่ใน 0.5 % cresyl violet (3-10 นาที)



2a



2b

แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นใส่ใน 70 % ethyl alcohol เพื่อให้สีหลุดจากเนื้อเยื่อไปบ้าง แล้วผ่าน 95 % ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว จากนั้นแช่ใน chloroform อย่างน้อย 20 นาที differentiate ใน 95 % ethyl alcohol จนได้สีที่ต้องการ dehydrate ใน n-butyl alcohol 2 ครั้ง clear ใน xylol และ mount ด้วย permount

12. การทำ paraffin section ของต่อมใต้สมอง

12.1 การเตรียมน้ำยาเฟ

12.1.1 Helly's Fluid (Zenker-Formal)

ชั่ง potassium dichromate 2.5 กรัม, mercuric chloride 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้จึงเติม formalin 100 % 5 - 10 มิลลิลิตร

12.1.2 Aldehyde Fuchsin

ชั่ง basic fuchsin 5 กรัม ละลายใน 70 % ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร, paradehyde 0.75 มิลลิลิตร และ hydrochloric acid เข้มข้น 1.25 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

12.1.3 Schiff's reagents

ชั่ง basic fuchsin 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้ม 1600 มิลลิลิตร แล้วเติม potassium metabisulphite 16 กรัม และ 1N hydrochloric acid 80 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วเติม activated charcoal 4 กรัม เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2-3 นาที กรองด้วยกระดาษกรองอย่างหยาบ สารละลายที่ได้ใสไม่มีสี เก็บไว้ในที่มืดและเย็น

12.1.4 Orange G

ชั่ง Orange G 3.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นซึ่งมี pH 2.0 โดยการเติม glacial acetic acid หรือ hydrochloric acid 2-3 หยด

12.1.5 1 % Periodic acid

ชั่ง periodic acid 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

12.2 การทำสไลด์ต่อมใต้สมอง

นำต่อมใต้สมอง เฉพาะ anterior lobe ซึ่งได้ fix ใน Helly's fluid (เตรียมจาก 12.1.1) 12-24 ชั่วโมง ในที่มืดมาแล้ว นำมาแช่ในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ต่อใน 70 % ethyl alcohol จากนั้น dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นมา แล้ว clear ใน Xylol, embed ใน paraplast วิธีการทำเช่นเดียวกับการทำในรังไข่ ตัด section หนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ที่ทา egg albumin แห้งแล้ว หลังจากนั้นนำไปย้อมสี โดยเริ่มจาก Xylol เพื่อล้าง paraplast ออก แล้วผ่านขั้นต่าง ๆ ของการ hydrate จาก ethyl alcohol ที่มีเปอร์เซ็นต์สูงไปจนถึง 70 % ethyl alcohol เอา mercuric chloride ออกโดยแช่ใน Lygol iodine และ sodium thiosulfate แล้วย้อมใน aldehyde fuchsin 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 95 % ethyl alcohol, oxidise ใน 1 % periodic acid 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วย้อมใน Schiff's reagent 20 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ย้อม acidophil ด้วย Orange G. 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้ว dehydrate ใน ethyl alcohol, clear ใน Xylol, mount ด้วย permount

12.3 การนับเซลล์ต่อมใต้สมอง

นับเซลชนิด gonadotroph และ acidophil จาก section ที่ทำไว้ โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ทั้งนี้พยายามเลือกในบริเวณเดียวกันของทุก ๆ section เท่าที่จะเป็นไปได้

13. การคำนวณ

significant ของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย 2 ค่า ทดสอบโดย Student's t-test.

การทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูเพศเมียรวมทั้งสิ้น 175 ตัว เพศผู้ 80 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังต่อไปนี้คือ

1. กลุ่ม control ใช้หนูปกติ

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 37 ตัว

a) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 30 วัน ใช้หนู 6 ตัว
b) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 34 วัน ใช้หนู 6 ตัว
c) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 36 วัน ใช้หนู 6 ตัว
d) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 42 วัน ใช้หนู 6 ตัว
e) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 48 วัน ใช้หนู 7 ตัว
f) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 55 วัน ใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูเพศผู้ 19 ตัว

a) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 30 วัน ใช้หนู 6 ตัว
b) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 42 วัน ใช้หนู 7 ตัว
c) Autopsy เมื่อหนูอายุได้ 55 วัน ใช้หนู 6 ตัว

2. ศึกษาผลการฝัง cholesterol

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 30 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 4 วัน ใช้หนู 6 ตัว
b) Autopsy หลัง implantation 6 วัน ใช้หนู 6 ตัว
c) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว
d) Autopsy หลัง implantation 18 วัน ใช้หนู 6 ตัว
e) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูเพศเมีย 12 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว
b) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

3. ศึกษาผลของการฝัง LH

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 31 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 4 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 6 วัน ใช้หนู 7 ตัว

c) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

d) Autopsy หลัง implantation 18 วัน ใช้หนู 6 ตัว

e) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูเพศผู้ 12 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

4. ศึกษาผลของการฝัง FSH

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 31 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 4 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 6 วัน ใช้หนู 6 ตัว

c) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

d) Autopsy หลัง implantatiom 18 วัน ใช้หนู 6 ตัว

e) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 7 ตัว

5. การศึกษาผลของการฝัง PMSG

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 33 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 4 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 6 วัน ใช้หนู 7 ตัว

c) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 7 ตัว

d) Autopsy หลัง implantation 18 วัน ใช้หนู 7 ตัว

e) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูเพศผู้ 12 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว

6. ศึกษาผลการฝัง GH

กลุ่มที่ 1 ใช้หนูเพศเมีย 13 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 7 ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนูเพศผู้ 12 ตัว

a) Autopsy หลัง implantation 12 วัน ใช้หนู 6 ตัว

b) Autopsy หลัง implantation 25 วัน ใช้หนู 6 ตัว