วิธีดำเนินการทดลอง

(Methods)

1. การตรวจวงอีสตรัสของแฮมสเตอร์

ใช้วิธี macroscopic ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณปากช่องคลอด โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Ward (1946) Orsini (1961) และภิญญาวัฒน์ (2513) การตรวจระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธุ์แบ่งออกได้ดังนี้ คือ

Day 1 (Proestrus) เป็นระยะก่อนตกไข่ ระยะนี้เมื่อใช้แท่งแก้วแตะบริเวณ Vagina จะพบเมือกใส ๆ ค่อนข้างเหนียวติดแท่งแก้วยืดออกมาได้ในช่วงสั้น ๆ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะประกอบด้วย epithelial cells เป็นจำนวนมาก มีทั้ง nucleated cells และ nonnucleated cell ที่มีรูปร่างเป็นเหลี่ยม

Day 2 (Estrus) เมื่อทำ vaginal smear จะมีเมือกเหนียว ๆ สีขาวขุ่นข้นติดแท่งแก้วยืดออกมาเป็นสายยาว ซึ่ง Orsini (1961) เรียกว่า Post estrus discharge เป็นสิ่งที่แฮมสเตอร์ตัวเมียขับออกมาหลังจากที่มี heat แล้ว ระยะนี้เป็นระยะที่เห็นได้ชัดที่สุดในวงอีสตรัสของแฮมสเตอร์ เพราะเพียงมีอะไรไปสัมผัสที่บริเวณ vagina จะมี post estrus discharge พุ่งออกมา เมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ พบว่าประกอบด้วย epithelial cell ชนิด nucleated cells มีรูปร่างกลมรูปไข่หรือเป็นแท่งกลม ๆ เป็นจำนวนมากมีเซลล์เม็ดเลือดขาวปะปนอยู่น้อยมาก ระยะนี้ Greenwald (1971) เรียกระยะ Day 1

Day 3 (Metestrus A) ระยะนี้เมื่อทำ vaginal smear จะพบน้ำใส ๆ บางครั้งอาจพบ waxy plug ลักษณะเป็นก้อนค่อนข้างแข็งสีขาวอมเหลืองคล้ายขี้ผึ้งอยู่ในช่องคลอด เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมากมี epithelial cells ปะปนอยู่น้อยมาก

Day 4 (Metestrus B) ระยะนี้เมื่อตรวจ vaginal smear จะพบน้ำใส ๆ คล้าย day 3 มาก เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะพบทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาว epithelial cellsรูปหลายเหลี่ยม กลม และรูปไข่ ปะปนกันอยู่

2. การเตรียมฮอร์โมนและยาสำหรับฉีดทดลอง

2.1 การเตรียมฮอร์โมน

2.1.1 Progesterone ชั่งผง progesterone มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม มาใส่โกร่งบดจนละเอียดแล้วนำไป suspend ในน้ำมันมะกอก (olive oil) ให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ก่อนใช้ต้องอุ่นไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 60°C และเขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2.1.2 Estradiol benzoate จาก stock solution ของ estradiol benzoateที่มีความเข้มข้น 1 µg/0.1 ml ดูดมา 1 ml เติมน้ำมันมะกอกจนกระทั่งมีปริมาตร 10 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 µg/0.1 ml

2.1.3 Deoxycorticosterone และ Cortisol ชั่งผง deoxycorticosteroneและ cortisol มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม นำมาบดจนละเอียดดีแล้วจึงละลายในน้ำมันมะกอกให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 0.1 ml

2.2 การเตรียมฟีนอบาร์บิทอล

ฟีนอบาร์บิทอลไม่ละลายในน้ำแต่จะละลายในน้ำมัน (Sharpless, 1971) นำฟีนอบาร์บิทอลชนิดเม็ดมาบดให้ละเอียด แล้วละลายในน้ำมันมะกอกให้มีความเข้มข้น 30 mg/ml ฟีนอบาร์บิทอลที่ใช้ฉีดทดลองจะเตรียมใหม่ทุก ๆ ครั้ง

3. การตรวจหาระยะวิกฤตของการหลั่งฮอร์โมน LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยการฉีดยากดประสาทชนิดฟีนอบาร์บิทอลในระยะเวลาต่าง ๆ ของวัน proestrus

ใช้แฮมสเตอร์ตัวเมียระยะ proestrus (day 1) อายุประมาณ 45 – 55 วัน ที่ตรวจพบอีสตรัสแล้ว 3 ครั้ง ติดต่อกัน นำมาชั่งน้ำหนักแล้วฉีดด้วยฟีนอบาร์บิทอลเข้าใต้ผิวหนัง โดยให้ dose และเวลาแตกต่างกันในการทดลองแบ่งแฮมสเตอร์ออกเป็นกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ Ia ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว ฉีด Olive oil 0.33 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 14.00 น.

กลุ่มที่ IIa ใช้แฮมสเตอร์ 9 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 6.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 12.00 น.

กลุ่มที่ IIb ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 6.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 13.00 น.

กลุ่มที่ IIc ใช้แฮมสเตอร์ 10 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 6.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 14.00 น.

กลุ่มที่ IId ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 13.00 น.

กลุ่มที่ IIe ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 14.00 น.

กลุ่มที่ IIf ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 15.00 น.

กลุ่มที่ IIg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว ฉีดฟีนอบาร์บิทอล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เวลา 16.00 น.

ฆ่าแฮมสเตอร์ที่ทดลองทุก ๆ ตัวในวันรุ่งขึ้น โดยให้ดม ether เวลาที่ฆ่าประมาณ 9.00 – 10.00 น. ตัดท่อนำไข่ออกมาทั้ง 2 ข้าง เพื่อนำไปตรวจนับไข่

4. การตรวจนับไข่จากท่อนำไข่

ก่อนจะฆ่าแฮมสเตอร์ที่ทดลอง ตรวจดูว่ามี Post estrus discharge หรือไม่ถ้าไม่พบ post estrus dicharge ก็คาดคะเนไว้ก่อนว่าไม่มีการตกไข่ ถ้าพบ Post estrus discharge ก็ควรจะมีการตกไข่ หลังจากนั้นนำแฮมสเตอร์ไปฆ่าโดยให้ดม ether แล้วเปิดหน้าท้องออกให้เป็นช่องกว้าง ตัดรังไข่พร้อมทั้งท่อนำไข่ทั้งสองข้าง ตัดไขมันที่หุ้มรังไข่อยู่ออกให้หมด ตรวจดูรังไข่ด้วยตาเปล่า ถ้าหากว่ารังไข่มีสีแดงมีเลือดมาเลี้ยงมาก (hyperemia) ก็คาดคะเนได้ว่าต้องมีการตกไข่ หลังจากนั้นตัดท่อนำไข่มาวางบน slide ที่เช็ดสะอาดแล้ว หยด physiological saline ลงไป 1 หยด ใช้ปากคีบปลายโค้ง 2 อัน ค่อย ๆยืดท่อนำไข่ให้เหยียดออก ถ้ามีการตกไข่ส่วนต้นของท่อนำไข่จะมีลักษณะพองใสกว่าบริเวณอื่นใช้ใบมีดโกนตัดท่อนำไข่ที่ยืดแล้วออกเป็นส่วน ๆ แล้วปิดด้วย cover glass โดยพยายามไล่ฟองอากาศออกให้หมดก่อนปิด หลังจากปิดแล้วใช้ด้ามปากคีบกด cover glass เบา ๆ เพื่อดันให้ไข่หลุดออกมาจากชิ้นส่วนของท่อนำไข่เสร็จแล้วนำไปตรวจนับไข่โดยใช้กล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast ที่มีกำลังขยาย 200 เท่า การวินิจฉัยว่าสัตว์นั้นจะตกไข่ปกติ (normal ovulation) หรือตกไข่ไม่สมบูรณ์ (partial ovulation)ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Everett (1956) ซึ่งจัดให้ rats ที่นับจำนวนไข่ได้มากกว่า 7 ฟองขึ้นไปเป็น normal ovulation ต่ำกว่า 7 ฟองเป็น partial ovulation แต่เนื่องจากการทดลองนี้พบมีสัตว์ที่ตกไข่ 6 ฟองหลายตัว ที่มี 5 ฟองมีน้อยมาก และจากการนำรังไข่ของสัตว์ที่ตกไข่ 6 ฟอง ไปศึกษาทาง histology ไม่พบว่ามี healthy preovular follicles ปรากฏให้เห็นภายในรังไข่เลย มีแต่ atretic follicles ด้วยเหตุนี้จึงจัดพวกที่นับไข่ได้ 6 ฟอง เป็น normal ovulation ที่นับไข่ได้น้อยกว่า 6 ฟองเป็น partial ovulation แม้ว่าแฮมสเตอร์ที่นับไข่ได้น้อยกว่า 6 ฟอง อาจเป็น

002134

แผ่นภาพที่ 1

รูปที่ 1a ตัวอย่างของรังไข่พร้อมทั้งท่อนำไข่ของแฮมสเตอร์ที่มีการตกไข่ 8 ฟอง ในตอนเช้าของวันที่พบมี post estrus discharge รังไข่จะมีสีแดงมีเลือดมาเลี้ยงมาก oviduct ส่วนต้นที่ติดกับรังไข่ (ampulla) จะพองโตและใสกว่าส่วนอื่น ๆ ไข่จะพบที่บริเวณนี้

รูปที่ 1b ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ แสดงไข่ที่ตกใหม่ ๆ ที่ตรวจพบที่อยู่ใน ampulla ของท่อนำไข่ในตอนเช้า ของวัน post estrus discharge

กำลังขยาย

รูป 1a x 9

รูป 1b x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

Am = Ampulla

E = egg

Od = Oviduct

Ov = Ovary

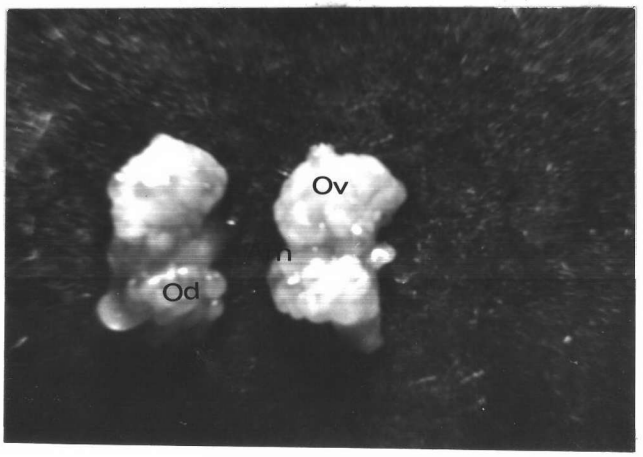
Vm = Vitelline membrane

Ps = Perivilelline space

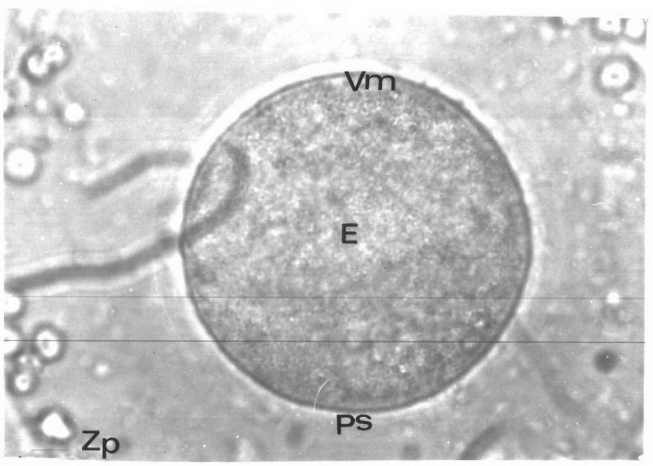
Zp = Zona pallucida

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1



รูปที่ 1a



รูปที่ 1 b

normal ovulation ก็ได้ เนื่องจากมีรายงานว่าในสภาพปกติแฮมสเตอร์อาจมีการตกไข่อยู่ระหว่าง 3 – 17 ฟอง (Kent, 1968) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเลยว่ากลุ่มของแฮมสเตอร์ปกติที่ได้รับฉีดน้ำมันมะกอกแต่เพียงอย่างเดียวหรือฉีดน้ำมันมะกอกและตัดต่อมหมวกไตมีไข่ตกน้อยกว่า 6 ฟอง จากเหตุผลที่กล่าวมานี้จึงน่าเชื่อได้ว่าการนับสัตว์ที่มีไข่ตกตั้งแต่ 6 ฟอง ขึ้นไปว่ามีการตกไข่เป็นปกติ มีการผิดพลาดไปจากความจริงได้น้อยที่สุด ในกรณีที่นับจำนวนไข่ได้น้อยมากหรือตรวจไม่พบไข่ในท่อนำไข่ แต่มีลักษณะบางอย่างที่ทำให้ไม่มั่นใจว่ามีไข่ตกหรือไม่จะต้องนำรังไข่ไป fix ไว้ในน้ำยา Kahle's AFA (70% Ethyl Alcohol 90 ml + 40% formaldehyde 5 ml+glacial acetic acid 5 ml) เพื่อนำไปตรวจทาง histology ว่าภายในรังไข่มี corpora lutea ชุดใหม่เกิดขึ้นหรือไม่และยังมี Graafian follicles เหลืออยู่มากน้อยเท่าไร โดยการทำ serial paraffin section เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้รับจากการตรวจ

5. <u>การทำ Serial paraffin section ของรังไข่</u>

นำรังไข่ที่ fix ไว้ใน Kahle's AFA แล้วประมาณ 48 ชั่วโมง มาแช่ใน 70% alcohol ประมาณ 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไป dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ในน้ำยา 80% alcohol, 95% alcohol, 95% alcohol+n-butyl alcohol, n-butyl alcohol, n-butyl+xylol, xylol 1, Xylol 2 ตามลำดับขั้นละ 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำรังไข่ไปแช่ในส่วนผสมของ xylol กับ paraplast ที่หลอมเหลวเป็นเวลาประมาณ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซ็นติเกรด เปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้อบเช่นกัน นำรังไข่มา embeded ใน paraplast แล้วตัด serial section หนา 7 ไมครอม ย้อมด้วยสี Ehrlich's Acid Haematoxylin และ Eosin นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ ตรวจหา corpora lutea ชุดใหม่และนับจำนวน Graafian follicles ว่ายังคงเหลืออยู่มากน้อยเท่าไร

6. การตัดต่อมหมวกไต (Adrenalectomy)

นำแฮมสเตอร์ระยะ proestrus มาทำให้สลบด้วย ether แล้วนำมาวางบนกระดาษที่จะใช้รองเวลาผ่าตัดโดยให้นอนคว่ำหน้า ทาน้ำยาฆ่าเชื้อ (Dettol 2.5%) ที่บริเวณด้านข้างของลำตัวค่อนมาทางกระดูกสันหลัง ใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อตั้งแต่กระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายลงมาทางด้านท้องให้เปิดออกเป็นช่องยาวประมาณ 1 – 2 เซ็นติเมตร โดยเปิดทางด้านขวาให้ต่ำกว่าทางด้านซ้ายเล็กน้อย เมื่อเห็นไตใช้ปากคีบดึงไขมันที่ติดขั้วไตออกมา ไตจะติดออกมาด้วยจะเห็นต่อมหมวกไตอยู่ทางด้านบนของไต ใช้กรรไกรตัดต่อมหมวกไตออกให้หมด พยายามไม่ให้ไตได้รับอันตรายขณะที่ทำการผ่าตัดถ้าดึงไตออกมาไว้ข้างนอกนานเกินไปควรจะหยด physiological saline ที่ไตเพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อไตแห้งและถูกทำลาย เสร็จแล้วใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนของกล้ามเนื้อถ่างปากแผลออกให้เป็นช่องกว้าง ยกขึ้นเล็กน้อยไตจะเลื่อนกลับเข้าสู่ช่องท้องตามเดิมใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้ง เสร็จแล้วตัดอีกข้างโดยวิธีเดียวกัน หลังจากฟื้นนำไปทดลองต่อไป และหลังจากฆ่าสัตว์ทดลองแล้วจะต้องตรวจดูว่ามีต่อมหมวกไตเหลืออยู่หรือไม่ทุกครั้ง ถ้ามีต่อมหมวกไตเหลืออยู่จะไม่รวมเข้าไว้ในผลของการทดลอง

7. การตัดต่อมใต้สมอง (Hypophysectomy)

นำแฮมสเตอร์มาทำให้สลบโดยให้ดม ether ต่อมานำไปตรึงบนแผ่นกระดานที่จะทำการผ่าตัด โดยให้แฮมสเตอร์นอนหงายใช้หมุดยึดขาหน้า ขาหลัง เพื่อป้องกันไม่ให้แฮมสเตอร์ดิ้นและใช้ยางหนังสติ๊กยึดฟันหน้า (incisor) ของขากรรไกรบนเอาไว้ เพื่อให้ส่วนหัวยืดออกพอเหมาะที่จะทำการผ่าตัด ทา Dettol 2.5% บริเวณคอและคาง (รูปที่ 2) แล้วใช้กรรไกรตัดหนังจากคางให้เป็นเส้นตรงไปจนถึงกระดูก sternum ใช้กรรไกรเล็กค่อย ๆ ตัดตอนกลางของ platysma muscle ออกแล้วใช้คลิปเล็ก ๆ หนีบกล้ามเนื้อดึงมาไว้ด้านข้างใช้เข็มปลายโค้งเขี่ยแยกกล้ามเนื้อ sternohyoid และ digastric ทางด้านซ้ายของหลอดลมออกจากกันในขณะผ่าตัด

แผ่นภาพที่ 1

รูปที่ 1a ตัวอย่างของรังไข่พร้อมทั้งท่อนำไข่ของแฮมสเตอร์ที่มีการตกไข่ 8 ฟอง ในตอนเช้าของวันที่พบมี post estrus discharge รังไข่จะมีสีแดงมีเลือดมาเลี้ยงมาก oviduct ส่วนต้นที่ติดกับรังไข่ (ampulla) จะพองโตและใสกว่าส่วนอื่น ๆ ไข่จะพบที่บริเวณนี้

รูปที่ 1b ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ แสดงไข่ที่ตกใหม่ ๆ ที่ตรวจพบที่อยู่ใน ampulla ของท่อนำไข่ในตอนเช้า ของวัน post estrus discharge

กำลังขยาย รูป 1a x 9

รูป 1b x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

Am = Ampulla

E = egg

Od = Oviduct

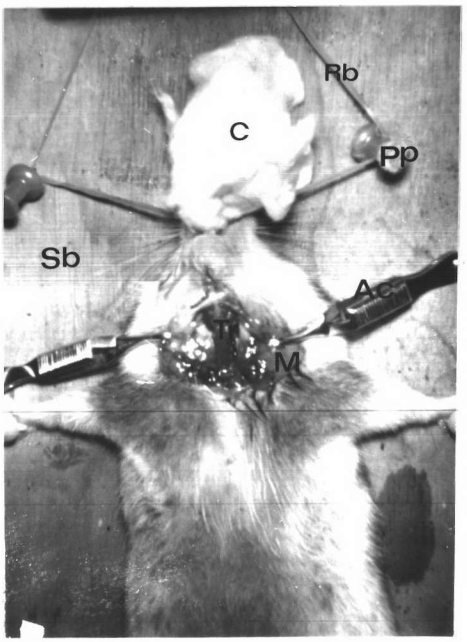
Ov = Ovary

Vm = Vitelline membrane

Ps = Perivilelline space

Zp = Zona pallucida

แผ่นภาพที่ 2



รูปที่ 2

จะต้องมองดูด้วยกล้อง stereomicroscope ที่มีกำลังขยาย 20 เท่า ตลอดเวลา ค่อย ๆ ใช้หลอดดูดที่ต่อกับ suction flask และ suction pump ตามลำดับ ดูด pharyngeal mucous membrane ออก จนกระทั่งมองเห็น synchondrosis ของกระดูก basisphenoid และ occipital ต่อมาใช้สว่านเจาะฟันปลายแหลมเจาะกระดูกตรงกึ่งกลางเหนือ synchondrosis ขึ้นมาเล็กน้อย เจาะให้เป็นรูเล็ก ๆ ด้วยมือแล้วใช้สว่านขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.7 มิลลิเมตร เจาะให้รูกว้างขึ้นทีละน้อยโดยใช้มือหมุนไปมาเบา ๆ จนกระทั่งกระดูกบริเวณนี้ทะลุมองเห็นต่อมใต้สมองเกือบทั้งหมดอยู่ในกล้องจุลทัศน์ ใช้หลอดแก้วที่ปลายอีกข้างหนึ่งติดต่อกับ vacuum pump ค่อย ๆ ดูดต่อมใต้สมองออกให้หมด ขณะที่ดูดจะต้องหลีกเลี่ยงไม่ให้ส่วนของสมองบริเวณใกล้เคียงถูกทำลาย เสร็จแล้วเย็บหนังให้ติดกันนำไปไว้ในกรงที่มีกระดาษปูทับขี้เลื่อยเพื่อป้องกันไม่ให้ขี้เลื่อยเข้าปากและจมูก เปิดไฟเพื่อให้อบอุ่น หลังจากฟื้นนำไปทดลองต่อไป หลังจากฆ่าสัตว์ทดลองแล้วจะต้องตรวจดูบริเวณ sella turcica ด้วย stereomicroscope กำลังขยาย 20 เท่า ทุกครั้ง เพื่อหาว่ามีส่วนของต่อมใต้สมองตกค้างอยู่หรือไม่ สัตว์ที่ไม่มีต่อมใต้สมองเหลืออยู่เท่านั้นจึงจะรวมเข้าไว้ในผลของการทดลอง

8. <u>การศึกษาผลของ Ovarian และ Adrenal Steroids ที่มีต่อการชักนำให้ตกไข่ในสัตว์ที่ถูกห้าม Endogenous Release ของ Ovulating Hormone โดยการฉีดฟีนอบาร์บิทอล 10 mg/100 gm B.W. ระหว่างเวลา 13.30 – 14.00 น. ของวัน proestrus และในสัตว์ที่ตัดต่อมใต้สมองในตอนเช้าของวัน proestrus</u>

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่มย่อยต่าง ๆ ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1 Vehicle (Olive Oil) Controls</u> เป็นกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดฟีนอบาร์บิทอลหรือฮอร์โมนใด ๆ แต่ฉีด vehicle ของยาคือน้ำมันมะกอกแทน ประกอบด้วยกลุ่มย่อยดังนี้ คือ

a. ฉีด 0.1 ml Olive oil ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว

b. Adrenalectomy + 0.1 ml Olive oil ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

c. Hypophysectomy + 0.1 ml Olive oil ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว

กลุ่ม b + c ผ่าตัดในเวลาระหว่าง 11.00 – 12.00 น. ของวัน proestrus

กลุ่มที่ 2 Progesterone treatment โดย progesterone เข้าช่องท้องประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะฉีดยาฟีนอบาร์บิทอลเข้าไปประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย คือ

a. ฉีด 10 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
b. ฉีด 25 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว
c. ฉีด 50 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว
d. ฉีด 100 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
e. ฉีด 500 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
f. ฉีด 1,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

กลุ่มที่ 3 Adrenalectomy+Progesterone Treatment เป็นกลุ่มที่เหมือนกลุ่ม 2 ทุกประการ แต่สัตว์ทดลองถูกตัดต่อมหมวกไตในเวลาที่ฉีดฮอร์โมน progesterone ด้วย ประกอบด้วยกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด 50 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
b. ฉีด 1,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

กลุ่มที่ 4 Estradiol Benzoate Treatment เป็นกลุ่มที่เหมือนกลุ่ม 2 แต่ฉีด estradiol benzoate แทน progesterone แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด 0.25 µg ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว
b. ฉีด 1.0 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
c. ฉีด 2.5 µg ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว

กลุ่มที่ 5 Deoxycorticosterone Treatment เหมือนกับกลุ่ม 2 และ 4 แต่ฉีดด้วย deoxycorticosterone แทน progesterone และ estradiol benzoate

แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด 100 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว
b. ฉีด 1,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 8 ตัว

กลุ่มที่ 6 Adrenalectomy + Deoxycorticosterone treatment เหมือนกลุ่ม 5 แต่ถูกตัดต่อมหมวกไตในเวลาเดียวกันหรือประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะฉีดฮอร์โมน แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด 50 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว
b. ฉีด 100 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว
c. ฉีด 500 µg ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว
d. ฉีด 1,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว

กลุ่มที่ 7 Cortisol Treatment ทำเช่นเดียวกับกลุ่ม 5 แต่ฉีด cortisol แทน deoxycorticosterone แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด 500 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว
b. ฉีด 1,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว
c. ฉีด 2,000 µg ใช้แฮมสเตอร์ 7 ตัว

กลุ่มที่ 8 Progesterone + Deoxycorticosterone treatment เหมือนกับกลุ่ม 2 และกลุ่ม 5 แต่ฉีด progesterone + Deoxycorticosterone ประกอบด้วยกลุ่มย่อยดังนี้

a. ฉีด Progesterone 10 µg + Deoxycorticosterone 50 µg ใช้แฮมสเตอร์ 6 ตัว

b. ฉีด Progesterone 50 µg + Deoxycorticosterone 100 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

c. ฉีด Progesterone 100 µg + Deoxycorticosterone 500 µg ใช้แฮมสเตอร์ 5 ตัว

กลุ่มที่ 9 Hypophysectomy+ Progesterone และ Deoxycorticosterone เหมือนกลุ่ม 8 แต่สัตว์ทดลองถูกตัดต่อมใต้สมองระหว่างเวลา 11.00 – 12.00 น. ของวัน proestrus แทนที่จะฉีดฟีนอบาร์บิทอล ประกอบด้วย

a. ฉีด progesterone 100 µg + Deoxycorticosterone 500 µg ใช้แฮมสเตอร์ 4 ตัว