บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง
(Methods)

1. การตรวจวงสืบพันธ์

นำหนูที่ใช้ในการทดลอง มาทำการตรวจวงจรสืบพันธ์ทุกวัน ตรวจโดยใช้แท่งแก้วปลายมนแบนจุ่มน้ำเกลือ (0.85% NaCl) สอดเข้าไปที่เยื่อบุภายในของคลอด นามาป้ายบนสไลด์ ตรวจดูเซลด้วยกล้องจุลทัศน์ลักษณะเซลล์ที่ปรากฏจะใช้กำหนดแบ่งระยะต่าง ๆ ของวงสืบพันธ์ หนูที่มีวงสืบพันธ์ปกติจะมีวงนาน 4 – 5 วัน (Long and Evans, 1922) วงอีสตรัสของหนูขาวแบ่งออกเป็นระยะดังนี้

1. Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ follicles บางอันในรังไข่เจริญเติบโตเต็มที่เตรียมพร้อมที่จะตกไข่ การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบเซลขนาดเล็กค่อนข้างกลม และมี nucleus เหมือนกันโดยตลอด (nucleated cells) ช่วงเวลาของระยะนี้ประมาณ 12 ชั่วโมง ระหว่างนี้ไม่มีการผสมพันธ์

2. Oestrus เป็นระยะต่อเนื่องจาก proestrus ระยะนี้หนูขาวมี heat จะยอมรับการผสมพันธ์จากตัวผู้ ในการทำ vaginal smear จะพบ nucleated cells หายไป มีเซลขนาดใหญ่โปร่งแสง ไม่มี nucleus ซึ่งเรียกว่า cornified cells แทน ตอนปลายของระยะนี้จะมีการตกไข่ (ovulation) หลังจากนั้น follicles ที่ตกไข่แล้วจะเปลี่ยนไปเป็น corpora lutea ช่วงเวลาของระยะนี้ประมาณ 30 ชั่วโมง

3. Metaoestrus เป็นระยะสั้น ๆ ระหว่าง oestrus กับ dioestrus การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบเซลขนาดเล็กที่

เป็น leucocyte cells จำนวนมาก และมี cornified cells ปะปนอยู่ด้วยเล็กน้อย ช่วงเวลาของระยะนี้ประมาณ 6 ชั่วโมง

4. Dioestrus เป็นระยะต่อจาก metaoestrus ช่วงระยะของเวลานี้ประมาณ 48 ชั่วโมง การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบ leucocyte cells เป็นส่วนมาก บางครั้งอาจพบมี nucleated cells หรือ cornified cells หรือทั้งสองอย่างปะปนอยู่ด้วยส่วนน้อย

2. การตรวจการเปิดของช่องคลอด (Vaginal canalization)

การตรวจการเปิดของช่องคลอด เริ่มต้นตั้งแต่อายุประมาณ 30 วัน ทำการตรวจทุกวัน โดยใช้มือจับหนูตะเภาบริเวณระหว่าง clitoris และ anus ถ้าช่องคลอดเริ่มเปิดจะพบมีช่องอยู่บริเวณระหว่างนี้ ถ้าเปิด spatula จะถูกดูดลงไปได้ลึกอย่างต่ำครึ่งเซนติเมตร เมื่อครูดที่ผนังของช่องคลอดจะมี epithelium cells ของช่องคลอดติดออกมา สำหรับหนูบางตัวที่ได้รับการฉีดยาทดลอง ช่องคลอดจะเปิดเป็นรูเล็ก ใช้ spatula ปลายเล็กแหย่ลงไปในช่องคลอด และเมื่อครูดที่ผนังช่องคลอดจะมี epithelium cells ของช่องคลอดติดกับ spatula ออกมาเช่นกัน

006609

3. การเตรียมฮอร์โมนและสารที่ใช้สำหรับฉีดทดลอง

3.1 การเตรียมฮอร์โมน

3.1.1 Testosterone Propionate

ชั่งผง testosterone propionate มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าซึ่งอ่านได้อย่างละเอียด นำมาใส่โกร่งบดให้ละเอียด แล้วนำไปละลายด้วยน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (olive oil) จนมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนอุ่นเล็กน้อยจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารละลาย

testosterone propionate ที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร บางส่วนมาทำให้เจือจางด้วยน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 500, 400, 50, 20, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.1.2 Dehydroepiandrosterone

วิธีการเตรียมก็เช่นเดียวกับการเตรียม testosterone propionate ละลายให้มีความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย dehydroepiandrosterone ซึ่งมีความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร บางส่วนมาทำให้เจือจางด้วยน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 2,000, 1,500, 1,000, และ 50 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.1.3 Androstenedione

วิธีการเตรียมก็เช่นเดียวกับการเตรียม testosterone propionate ละลายให้มีความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย androstenedione ซึ่งมีความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร บางส่วนมาทำให้เจือจางด้วยน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 2,000, 1,500, และ 500 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.1.4 5α -androstan-3α ol-17 one

วิธีการเตรียมก็เช่นเดียวกับการเตรียม testosterone propionate ละลายให้มีความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย 5α-androstan-3αol-17 one ซึ่งมีความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร บางส่วนมาทำให้เจือจางด้วยน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 1,500, 1,000 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.1.5 Progesterone

วิธีการเตรียมก็เช่นเดียวกับกับการเตรียม testosterone

propionate ละลายให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมยากดประสาท Reserpine

ชั่งผง reserpine มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด นำมาใส่โกร่งบดจนละเอียด แล้วจึงละลายด้วย propylene glycol บริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลาย reserpine ที่ได้จะละลายแบบ homogenous suspension แล้วนำสารละลาย reserpine ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร มาบางส่วนทำให้เจือจางด้วย propylene glycol บริสุทธิ์จนมีความเข้มข้น 7.5, 5.0 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.3 การเตรียม MAOI

3.3.1 Marsilid

ชั่งผง mar silid มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดแล้วละลายด้วย physiological saline (0.85% Nacl) จนมีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.3.2 Marplan

ชั่งผง marplan มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด นำมาใส่โกร่งบดจนละเอียดดี แล้วละลายด้วย ethyl alcohol 95% 1 ส่วนจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมด้วย physiological saline (0.85% Nacl) 9 ส่วนจนมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

3.4 การเตรียม Fixative

Kahle's AFA

70% ethyl alcohol 90 มิลลิลิตร

glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร

formaldehyde 5 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เย็นจนถึงเวลาใช้

Helley's Fluid (Zenker-Formal)

potassium dichromate 2.5 กรัม

mercuric chloride 6.0 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

formalin 40% 5 — 10 มิลลิลิตร เติมก่อนจะใช้

3.5 การเตรียมสี

3.5.1 Ehrlich's Acid Haematoxylin

ชั่ง haematoxylin มา 8 กรัม ละลายด้วย 95% ethyl alcohol 400 มิลลิลิตร อุ่นบน water bath แล้วชั่ง potash alum 8 กรัม เติมด้วยน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร อุ่นให้ละลาย นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน เติม glycerine 400 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่ขวดแล้วอุดด้วยสำลีอย่างหลวม ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้ถูกแสงแดดประมาณ 6 สัปดาห์ (ถ้าต้องการให้สุกเร็วใช้ได้ทันทีก็เติม 0.4 กรัม otassium permaganate ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร)

3.5.2 0.5% Eosin in alcohol

ชั่ง eosin 0.5 กรัม ละลายด้วย 95% ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

3.5.3 Aldehyde Fuchsin

ชั่ง basic fuchsin, C.I 42500 ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 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

3.5.4 Schiff's reagents (Lillie, 1951 B)

ชั่ง basic fuchsin, C.I. 42500 ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 0.5 – 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร, Sodium metabisulfite, $Na_2S_2O_5$ 1.9 กรัม และ $\underline{N}$ HCl 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ขวดขนาด 200 มิลลิลิตร เขย่าอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือค้างคืน เติม activated charcoal 200 มิลลิกรัม แล้วเขย่า กรอง 2 ครั้ง สารละลายที่ได้จะใส เก็บ Schiff's reagent ไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ ใช้ charcoal 50 มิลลิกรัมต่อ solution 100 มิลลิลิตร ถ้าใส่ charcoal มากไป ปฏิกริยาของสีจะลดลง และอย่าปล่อยทิ้ง charcoal ไว้ใน solution นานเกินไป ประมาณ 45 นาทีก็เพียงพอแล้ว

3.5.5 Orange G.

ชั่ง orange G. C.I. 16230 ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 3.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นซึ่งมี pH 2.0 โดยการเติม glacial acetic acid หรือ hydrochloric acid 2 – 3 หยด

3.5.6 1% periodic acid

ชั่ง periodic acid ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. วิธีการผ่า (Autopsy)

ใช้วิธีดึงคอต่อหนูให้หนูให้หลุดออกจากกัน เพื่อให้ตายทันทีแล้วเปิดหน้าท้องเป็นช่องกว้าง ตรวจดูลักษณะและขนาดรังไข่ ตัดเอารังไข่ไว้ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายใน (histology) โดย fix ใน Kahle's AFA

5. การทำ serial section ของรังไข่

ตัดรังไข่ fix ใน Kahle's AFA ประมาณ 48 ชั่วโมงในตู้เย็น หลังจากนั้นเอารังไข่ไปแช่ใน 70% ethyl alcohol อีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมา dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70% ethyl alcohol, 80% ethyl alcohol, 90% ethyl alcohol, 95% ethyl alcohol, 95% ethyl alcohol + n-butyl alcohol, n-butyl alcohol, n-butyl alcohol + xylene, xylene ขั้นละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำรังไข่ไปแช่ในส่วนผสมของ xylene กับ paraplast ที่หลอมเหลว ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซนติเกรด เปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้อบเช่นเดียวกัน แล้วนารังไข่มา embed ใน paraplast แล้วตัด serial section หนา 8 ไมครอน ด้วย microtome model No. 815 ย้อมสีด้วย Ehrlich's acid haematoxylin และ และ eosin mount ด้วย permount ตรวจและศึกษาลักษณะของรังไข่ภายใต้กล้องจุลทัศน์

6. การทำ serial section ของต่อมใต้สมอง

ตัดต่อมใต้สมอง fix ใน Helly's Fluid 12 – 24 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำประปาซึ่งไหลตลอดเวลา 24 ชั่วโมง แช่ใน 70% ethyl alcohol 24 ชั่วโมง แล้ว dehydrate เหมือน dehydrate รังไข่ ต่อจากนั้นนำต่อมใต้สมองมา embed ใน paraplast ตัด serial section หนา 8 ไมครอน ด้วย microtome model No.315 ย้อมสีโดย aldehyde fuchsin-PAS method, clear ใน xylene , mount ใน permount ตรวจและศึกษาลักษณะเซล acidophiles, basophiles และ chromophobes ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า

7. การย้อมสีต่อมไต้สมองโดยวิธี Aldehyde Fuchsin-PAS Method

a. เอา paraplast ออกจาก tissue โดยแช่ใน xylene แล้ว dehydrate จนถึง 70% ethyl alcohol

b. เอา mercuric chloride ออกโดยแช่ใน Lugol iodine และ sodium thiosulphate

c. ย้อมสีใน aldehyde fuchsin 30 นาที

d. ล้างด้วย 95% ethyl alcohol

e. oxidize ใน 1% periodic acid 15 นาที

f. ล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

g. ย้อมใน Schiff's reagent 20 นาที

h. ล้างในน้ำประปา

i. ย้อม acidophile ด้วย orange G. 10 นาที

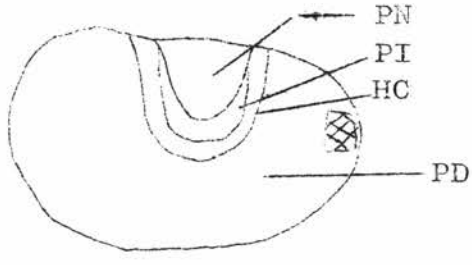
j. ล้างในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

k. dehydrate แล้ว clear ใน xylene mount ใน permount

แล้วศึกษาลักษณะของ acidophiles, basophiles และ chromophobes ในต่อมไต้สมอง acidophiles จะติดสีส้ม, basophiles ชนิด beta-cell ติดสีม่วงเข้ม basophiles ชนิด delta-cell ติดสีแดง

8. วิธีการนับเซลของต่อมใต้สมอง

นำต่อมใต้สมองซึ่งตัด paraffin section หนา 8 ไมครอน ย้อมสีโดย aldehyde fuchsin-PAS method มาดังภาพ



HC = Hypophyseal cleft
PD = Par distalis
PI = Par intermedia
PN = Par nervosa

นับเซลชนิด acidophiles, gonadotrophs thyrotrophs และ chromophobes จากปีกขวาของ Par distalis ต่อตาราง มิลลิเมตร ภายใต้กล้องจุลทัศน์และคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ต่อจำนวนเซลทั้งหมด ในการนับเซลนี้เราพยายามเลือกบริเวณที่เกี่ยวกันตลอดทุก section ทุกตัวเท่าที่จะเป็นได้

การทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar ตัวเมียจำนวน 256 ตัว โดยแบ่งเป็นการทดลองย่อย ๆ ดังนี้

1. การหา critical peroid ของการ differentiation ของสมองส่วนที่ควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและรังไข่โดยการฉีดน้ำของฮอร์โมน testosterone propionate

ฉีดฮอร์โมน testosterone propionate ซึ่งมีความเข้มข้น 1000 µg/0.1 ml. ปริมาณ 0.1 ml/day เข้าทางใต้ผิวหนังแก่ลูกหนูตัวเมียที่มีอายุต่าง ๆ ดังนี้

แผ่นภาพที่ 1

แผ่นภาพที่ 1 แสดงการฉีดฮอร์โมนให้แก่ลูกหนูโดยวิธีเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณใกล้ ๆ กับด้านบนของคอ

a. ฉีด olive oil แก่ลูกหนูอายุ 3 – 12 วัน 0.1 มิลลิลิตร/ตัว จำนวน 27 ตัว

b. TP 1000 µg, อายุ 3 วัน จำนวน 5 ตัว

c. TP 1000 µg, อายุ 5 วัน จำนวน 5 ตัว

d. TP 1000 µg, อายุ 6 วัน จำนวน 6 ตัว

e. TP 1000 µg, อายุ 7 วัน จำนวน 6 ตัว

f. TP 1000 µg, อายุ 8 วัน จำนวน 10 ตัว

g. TP 1000 µg, อายุ 10 วัน จำนวน 6 ตัว

h. TP 1000 µg, อายุ 12 วัน จำนวน 10 ตัว

นำลูกหนูทุกตัวกลับไปให้แม่หนูเลี้ยงตามปกติจนหย่านม แยกเลี้ยงต่างหาก ติดตามดูการเปิดของ vagina เมื่อ vagina เปิด ทำ vaginal smear ทุกวัน (เพื่อติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์ที่ปากช่องคลอด) เพื่อหา incidence of sterility ขณะอายุ 50, 70 และ 90 วัน จนอายุครบ 90 วัน จึงฆ่าโดยวิธีดึงคอตอ (cervical dislocation) ตัดรังไข่ fix ใน Kahle's AFA ทำ serial section เพื่อศึกษาชนิดของ follicles และลักษณะของรังไข่

2. <u>การศึกษาผลเปรียบเทียบของ androgens ชนิดต่าง ๆ ต่อ differentiation ของสมองส่วนที่ควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและรังไข่ในลูกหนูตัวเมียอายุ 3 วัน</u>

การทดลองนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1 Testosterone propionate treatment

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 3 วัน มาฉีดด้วย testosterone propionate เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

a. 5 µg/0.1 ml/body จำนวน 6 ตัว

b. 10 µg/0.1 ml/body จำนวน 10 ตัว

c. 20 µg/0.1 ml/body จำนวน 11 ตัว

d. 50 µg/0.1 ml/body จำนวน 11 ตัว

e. 400 µg/0.1 ml/body จำนวน 7 ตัว

f. 500 µg/0.1 ml/body จำนวน 6 ตัว

g. 1000 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 2 Dehydroepiandrosterone treatment

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 3 วัน ฉีดฮอร์โมน dehydroepiandrosterone เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

a. 50 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

b. 1000 µg/0.1 ml/body จำนวน 12 ตัว

c. 1500 µg/0.1 ml/body จำนวน 6 ตัว

d. 2000 µg/0.1 ml/body จำนวน 6 ตัว

e. 2500 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 3 Androstenedione treatment

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 3 วัน ฉีดด้วยฮอร์โมน androstendedione เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

a. 500 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

b. 1500 µg/0.1 ml/body จำนวน 8 ตัว

c. 2000 µg/0.1 ml/body จำนวน 8 ตัว

d. 2500 µg/0.1 ml/body จำนวน 4 ตัว

กลุ่มที่ 4 5 α -androstan-3 α ol-17 one treatment

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 3 วัน ฉีดด้วยฮอร์โมน 5 α -androstan-3 α ol-17 one เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

a. 1000 µg/0.1 ml/body จำนวน 4 ตัว

b. 1500 µg/0.1 ml/body จำนวน 9 ตัว

c. 2000 µg/0.1 ml/body จำนวน 9 ตัว

ลูกหนูที่ใช้ในการทดลองกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 เมื่อฉีดฮอร์โมนเรียบร้อยแล้ว ทุกกลุ่มนำกลับไปให้แม่หนูเลี้ยงตามปกติ จนกว่าลูกหนูจะหย่านม จึงแยกลูกหนูเลี้ยงไว้ต่างหาก ติดตามการเปิดของ vagina ทุกกลุ่มทุกตัว เมื่อ vagina เปิดทำ vaginal smear ทุกวัน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลที่ปากช่องคลอด (เพื่อหา incidence of sterility ขณะอายุ 50, 70 และ 90 วัน) จนอายุครบ 90 วัน จึงฆ่าโดยวิธีดังกอหอ (cervical distocation) ตัดรังไข่

ทั้งหมด fix ด้วย Kahle's AFA ทำ serial section ย้อมสี haematoxylin และ eosin เพื่อศึกษาชนิดของ follicles และลักษณะของรังไข่เปรียบเทียบในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม

ในกรณีที่ treat ด้วย testosterone propionate dose สูง ๆ มีบางตัว ช่องคลอดไม่เปิด เมื่ออายุครบ 90 วัน แล้ว ให้ฉีด progesterone 4 mg/0.1 ml. เข้าทางกล้ามเนื้อ (intramuscular) ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน แล้วดูตามลักษณะการเปิดของ vagina ไม่ว่า vagina จะเปิดหรือไม่ ให้ผ่าโดยวิธีดึงกรอด คัดรังไข่ fix ใน Kahle's AFA และต่อมใต้สมอง fix ใน Helly's fluid ทำ paraffin serial section รังไข่ย้อมสีด้วย haematoxylin และ eosin ดูลักษณะ follicles ในรังไข่ ต่อมใต้สมองย้อมด้วย aldehyde-fuchsin-PAS-method ดูลักษณะของเซล acidophiles, basophiles, chromophobes และ gonadotrophs นับจำนวน cell แต่ละชนิดต่อตารางมิลลิเมตร และคิดเป็นเปอร์เซนต์ต่อจำนวนเซลทั้งหมด

3. <u>การศึกษาผลของยากดประสาทชนิด reserpine และ ยาห้ามการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน (MAOI) มีที่ผลห้ามฤทธิ์ TP ที่ชักนำให้เกิด differentiation ของสมองส่วนที่ควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและรังไข่ในลูกหนูถัวเมียแรกเกิด</u>

การทดลองนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> เป็นกลุ่มที่ทำ control ไว้เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 และ 3

นำหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 5 วัน ฉีดด้วย propylene glycal บริสุทธิ์จำนวน 0.1 ml/body เข้าทางใต้ผิวหนังจำนวน 5 ตัว อีก 6 ชั่วโมงต่อมาฉีดด้วยฮอร์โมน testosterone propionate ซึ่งมีความเข้มข้น 50 µg/0.1 ml/body ทุกตัว

กลุ่มที่ 2 การศึกษาผลของยากดประสาทเช่น reserpine ที่มีผลต่อการห้ามฤทธิ์ของฮอร์โมน testosterone propionate ในการกระตุ้น differentiation ของสมองส่วนที่ควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและรังไข่ในลูกหนูตัวเมียอายุ 5 วัน

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 5 วัน ฉีดด้วยยากดประสาท reserpine เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่าง ๆ ดังนี้

a. 1.0 µg/0.1 ml/body จำนวน 6 ตัว

b. 5.0 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

c, 7.5 µg/0.1 ml/body จำนวน 12 ตัว

d. 10 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

ลูกหนูที่ได้รับการฉีดด้วยยากดประสาทชนิด reserpine จะอยู่ในสภาพหมดความรู้สึก 6 ชั่วโมงต่อมาฉีดด้วยฮอร์โมน testosterone propionate ซึ่งมีความเข้มข้น 50 µg/0.1 ml/body ทุกตัวเข้าทางใต้ผิวหนังเช่นกัน ใช้ไฟฟ้าส่องให้ความอบอุ่นแก่ลูกหนูจนกระทั่งลูกหนูกลับมามีสภาพปกติ

กลุ่มที่ 3 การศึกษาผลของยาห้ามการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนชนิด marplan และ marsilid ในระดับ hypothalamus เป็นผลให้ไม่มีการใช้ monoamine โดย reserpine ทำให้ reserpine ไม่มีผลต่อการห้ามฤทธิ์ของฮอร์โมน testosterone propionate ในการกระตุ้น differentiation ของสมองส่วนที่ควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและรังไข่ในลูกหนูตัวเมียอายุ 5 วัน

นำลูกหนูตัวเมียแรกเกิดอายุ 5 วัน ฉีดด้วยยาห้ามการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) โดยใช้ dose ต่างกันดังนี้

a. Marplan 100 µg/0.1 ml/body จำนวน 5 ตัว

b. Marsilid 200 µg/0.1 ml/bodyจำนวน 8 ตัว

ใช้ไฟฟ้าสงให้ความอบอุ่นแก่ลูกหนูตลอดเวลา หนึ่งชั่วโมงต่อมาฉีดด้วยยากดประสาท reserpine ซึ่งมีความเข้มข้น 7.5 µg/0.1 ml/body เข้าทางใต้ผิวหนังทุกตัว และอีก 6 ชั่วโมงต่อมาฉีดด้วยฮอร์โมน testosterone propionate ซึ่งมีความเข้มข้น 50 µg/0.1 ml/body ทุกตัว โดยฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังเช่นเดียวกัน แต่คนละตำแหน่ง

ลูกหนูที่ใช้ในการทดลองกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เมื่อได้รับการฉีดฮอร์โมนและยาเป็นที่เรียบร้อยแล้วนำกลับไปให้แม่หนูเลี้ยงตามปกติจนลูกหนูหย่านมแยกเลี้ยงต่างหาก ตัดตามดูการเปิดของ vagina เมื่อ vagina เปิดทำ vaginal smear ทุกวัน เพื่อติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลที่ปากช่องคลอด (เพื่อหา incidence of steriility ขณะอายุ 50, 70 และ 90 วัน) เมื่ออายุครบ 90 วัน ฆ่าโดยวิธีดึงกอต่อ (cervical dislocation)ตัดรังไข่ทั้งหมด fix ด้วย Kahle's AFA ทำ serial section ย้อมสี haematoxylin และ eosin เพื่อศึกษาชนิดของ follicles และลักษณะรังไข่ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตัดต่อมใต้สมองกลุ่มที่ 2 fix ใน Helly's fluid ตัด paraffin section หนา 8 ไมครอน ย้อมโดย aldehyde fuchsin-PAS method ศึกษาดูเซลชนิด acidophiles, gonadotrophs thyrotrophs และ chromophobes ต่อ 1 ตารางมิลลิเมตร และคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ต่อจำนวนเซลทั้งหมดในพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร