วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเตรียมฮอร์โมนและสารที่ใช้สำหรับฉีดทดลอง

1.1 Normal saline solution (0.85 % NaCl)

ชั่งผง NaCl ที่บริสุทธิ์มาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด นำมาละลายในน้ำกลั่น ซึ่งกลั่น 3 ครั้ง ให้มีความเข้มข้น 0.85 %

วิธีเตรียมฮอร์โมนนั้นเหมือนวิธีเตรียม saline solution ทุกประการ เพียงแต่นำมาละลายใน normal saline solution แทนน้ำกลั่นเท่านั้น และทำให้มีความเข้มข้นตามต้องการ

1.2 Follicle stimulating hormone

ละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 25 µg, 50 µg, 75 µg และ 100 µg ใน normal saline 1 ml

1.3 Luteinizing hormone

ละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 15 µg, 70 µg และ 280 µg ใน normal saline 0.1 ml

1.4 Prolactin

ละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 20 µg, 50 µg และ 75 µg ใน normal saline 0.4 ml

1.5 Human chorionic gonadotrophin

ละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 50 I.U./1 ml saline solution

1.6 Pregnant mare serum gonadotrophin

ละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 50 I.U./0.5 ml normal saline

1.7 Anterior pituitary extract

ชั่งต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่แห้งสนิทดีแล้วมาจำนวนหนึ่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด นำมาใส่โกร่งบดนายดจนละเอียดดีแล้ว จึงละลายใน

normal saline solution ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ

ฮอร์โมนทั้งหมดที่เตรียมไว้รวมทั้ง Anterior pituitary extract ยกเว้น normal saline solution เก็บไว้ในตู้เย็นตลอดเวลาที่ใช้ในการทดลอง

2. วิธีเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

2.1 สารละลาย metaphosphoric acid

ชั่ง metaphosphoric acid ซึ่งเป็นแท่งของแข็งมาจำนวนหนึ่ง ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 2.5 % เก็บในขวดสีน้ำตาลที่มีฝาปิดสนิท

2.2 สารละลาย Sodium acetate

ชั่งผง sodium acetate 9.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 ml แบ่งสารละลาย sodium acetate นั้นมา 140 ml นำไป adjust ให้ pH เป็น 7 ด้วย glacial acetic acid

2.3 สารละลาย dye

ชั่งผง dye (2, 6 - dichlorophenol - indophenol - Natrium) 12 mg ละลายในน้ำกลั่น 20 ml

นำสารละลาย sodium acetate pH 7, 140 ml นั้นมาผสมกับ 20 ml dye เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีน้ำตาลที่มีฝาปิดสนิท

สารละลาย metaphosphoric acid และสารละลาย dye เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลองและเก็บไว้ในตู้เย็นตลอดเวลาของการทดลอง

3. การเลี้ยงและระวังรักษาสัตว์ทดลอง

3.1 การเลี้ยงและระวังรักษานกพิลาปที่ใช้ในการทดลอง

นกพิลาปที่ใช้ในการ assay prolactin เป็นนกพิลาปลูกผสมเบลเยี่ยม เลี้ยงไว้ในกรงลวดตาข่าย ขนาด 1 x 2½ x 2½ เมตร กรงนี้ได้รับแสงแดดเกือบตลอดวัน ให้ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว ผักกาดขาว เป็นอาหาร ดื่มน้ำประปาธรรมดา นกทั้งตัวผู้และตัวเมียเลี้ยงไว้ในกรงเดียวกันนี้ ปล่อยให้ผสมพันธุ์กันเองตามธรรมชาติ ลูกนกที่มีอายุ

30 - 50 วัน น้ำหนักตั้งแต่ 275 กรัมขึ้นไป และมีสุภาพแข็งแรงจึงจะใช้ในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้นกพิลาปเป็นจำนวนมาก นกที่เลี้ยงไว้มีจำนวนไม่เพียงพอ จึงต้องใช้นกพิลาปจาก คุณพีร์ รจนานนท์ และจาก นายบุ้นลุย แซ่เฮียว ร่วมด้วย

3.2 การเลี้ยงและระวังรักษาหนูขาวที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar strain ที่ยังไม่เคยผ[redacted]มาก่อน เลี้ยงในกรง stainless steel ขนาด 1 ½ 1 ½ 2 ฟุต ในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 ± 1°c ควบคุมให้มีความสว่าง 14 ชั่วโมง (ระหว่าง 06.00 - 20.00 น.) มืด 10 ชั่วโมง (ระหว่าง 20.00 - 06.00 น.) กินอาหารมาตรฐาน (จากบริษัท F.E. Zuellig) และดื่มน้ำประปาธรรมดา

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็นพวกใหญ่ ๆ ได้ 2 พวก คือ พวกที่โตเต็มที่ (อายุมากกว่าสองเดือนขึ้นไป) สำหรับใช้ในการเก็บรวบรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้า ส่วนอีกพวกหนึ่งเป็นพวกที่มีอายุน้อย (immature) 24 - 25 วัน ใช้สำหรับ assay FSH และ[illegible]

4. การตรวจหา Reproductive cycle ของหนูทดลอง

หนูขาวที่ใช้ในการทดลองเพื่อเก็บรวบรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้า ได้รับการตรวจ reproductive cycle ทุกวัน เลือกเอาเฉพาะพวกที่มี cycle เป็นปกติ (4 - 5 วัน) เท่านั้นที่ใช้ในการทดลอง ระยะต่าง ๆ ของ cycle กำหนดจากลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏใน vaginal smear (Long และ Evans, 1922)

Reproductive cycle ของหนูขาว แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ

ก. Dioestrus ระยะนี้กินเวลาประมาณครึ่งหนึ่งของ reproductive cycle ระยะนี้รังไข่ไม่มีการสร้างฮอร์โมน estrogen และประกอบไปด้วย non - functional corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุด มดลูกมีขนาดเล็ก vaginal epithelium บางมาก การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบ leucocyte cell เป็นส่วนใหญ่ บางครั้งอาจพบมี nucleated cells หรือ cornified cells หรือทั้งสองอย่างปนอยู่ด้วยเป็นส่วนน้อย

ข. Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ follicles บางอันในรังไข่เจริญเต็มโตเต็มที่เตรียมพร้อมที่จะตกไข่ มีการสร้างฮอร์โมน estrogen สูง เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงสูง (Hyperrhemia) vaginal epithelium มีความหนาเพิ่มขึ้น การทำ vaginal smear ในระยะนี้จะพบ nucleated cell ซึ่งเป็นเซลขนาดเล็กค่อนข้างกลม และมี nucleus เหมือนกันทุกเซล ในตัวเจ ช่วงเวลาของระยะนี้ประมาณ 12 ชั่วโมง ระหว่างนี้ยังไม่มีการผสม แต่ในตอนท้ายของระยะนี้ หนูจะมี heat พร้อมที่จะผสมกับตัวผู้ได้

ค. Oestrus เป็นระยะต่อจาก proestrus กินเวลาทั้งสิ้นประมาณ 30 ชั่วโมง ตอนต้นของระยะนี้ฮอร์โมน estrogen ที่สร้างจะอยู่ในระดับสูง มีการตกไข่เกิดขึ้น ส่วน heat จะหมดไปในเวลาใกล้เคียงกับที่มีการตกไข่ หลังการตกไข่ระดับของฮอร์โมน estrogen จะลดต่ำลง มดลูกมีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ เนื่องจากสูญเสียน้ำ ในการทำ vaginal smear จะพบเซลขนาดใหญ่รูปหลายเหลี่ยมโปร่งแสง ไม่มี nucleus ซึ่งเรียกว่า cornified cell แต่ก่อนที่จะสิ้นสุดระยะนี้จะเริ่มมี leucocyte เข้ามาปะปนอยู่ด้วยเป็นส่วนน้อย

ง. Metaoestrus ระยะนี้สั้นมาก ประมาณ 6 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง oestrus กับ Dioestrus เป็นระยะที่หนูหมด heat ระดับ estrogen ในเลือดลดต่ำลงมาก การทำ vaginal smear จะพบเซลขนาดเล็กที่เป็น leucocyte cells จำนวนมาก มี cornified cell ปะปนอยู่บางเล็กน้อย

5. <u>การตั้งครรภ์</u> (Pregnancy)

หนูขาวเพศเมียที่มี reproductive cycle เป็นปรกติและอยู่ในระยะ proestrus ถูกขังไว้ตลอดคืนกับหนูเพศผู้ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าไม่เป็นหมัน แล้วตรวจดูในเช้าวันต่อมาถ้าพบ sperm plug หรือ spermatozoa ในการทำ vaginal smear นับเป็นวันที่ 0 (L_0) ของการตั้งครรภ์ วันต่อมาเป็น L_1, L_2,..... ตามลำดับ หนูที่พบ sperm plug หรือ spermatozoa เท่านั้นที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการตั้งครรภ์

6. การเลี้ยงลูกอ่อน (Lactation)

ปกติหนูขาวจะคลอดลูก (parturition) ประมาณ L_{21} หรือ L_{22} นับวันที่คลอดลูกเป็นวันที่ 0 (L_0) ของการเลี้ยงลูกอ่อน วันต่อมาเป็นวันที่ 1, 2, ... ตามลำดับ จำนวนลูกอ่อนที่เลี้ยงอยู่ระหว่าง 7 - 10 ตัว ตลอดเวลาของการทดลอง

7. การตั้งครรภ์ในระหว่างให้นม (Lactating pregnancy)

แม่หนูที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 83 - 95 วัน และเป็นหนูที่เลี้ยงลูกครอกแรกเท่านั้น ตามปกติ หนูขาวจะมี post partum oestrus อีกครั้งหนึ่ง ภายในเวลาประมาณ 20 ชั่วโมงหลังคลอด ดังนั้นเมื่อหนูขาวคลอดลูกแล้วจึ ปล่อยให้เลี้ยงลูกอยู่นาน 12 - 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกแม่หนูไปผสมพันธุ์กับหนูตัวผู้ที่ไม่เป็นหมัน หลังการผสมนำแม่หนูกลับไปเลี้ยงลูกตามเดิม แม่หนูที่พบ sperm plug หรือ spermatozoa ใน vaginal smear เท่านั้นที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ นับวันที่พบ sperm plug หรือ spermatozoa ใน vaginal smear เป็นวันที่ 0 (L_0) ของการตั้งครรภ์ในระหว่างให้นม

8. การเก็บรวบรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้า

ใช้หนูขาวเพศเมียอายุ 60 - 95 วัน จำนวน 220 ตัว มาแบ่งออกเป็น 9 หมู่ เพื่อรวบรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูทั้ง 9 หมู่ที่อยู่ในระยะต่าง ๆ กันดังนี้

8.1 ระยะเริ่มแรกของการตั้งครรภ์ (Early pregnancy) แบ่งเป็น 3 หมู่ คือ

a. ระยะที่ตั้งครรภ์แล้ว 1 วัน (L_1)

b. ระยะที่ตั้งครรภ์แล้ว 3 วัน (L_3)

c. ระยะที่ตั้งครรภ์แล้ว 5 วัน (L_5)

.2 ระยะเริ่มแรกของการเลี้ยงลูกอ่อน (Early lactation) แบ่งเป็น 3 หมู่ คือ

a. ระยะที่เลี้ยงลูกอ่อน 1 วัน (L_1)

b. ระยะที่เลี้ยงลูกอ่อน 3 วัน (L_3)

c. ระยะที่เลี้ยงลูกอ่อน 5 วัน (L_5)

จำนวนลูกอ่อนที่เลี้ยงอยู่ระหว่าง 7 - 10 ตัว ตลอดเวลาของการทดลอง

8.3 ระยะเริ่มแรกของการตั้งครรภ์ในระหว่างให้นม (Early lactating pregnancy) แบ่งเป็น 3 หมู่ คือ

a. ระยะที่ตั้งครรภ์ในระหว่างให้นมแล้ว 1 วัน (L_1)

b. ระยะที่ตั้งครรภ์ในระหว่างให้นมแล้ว 3 วัน (L_3)

c. ระยะที่ตั้งครรภ์ในระหว่างให้นมแล้ว 5 วัน (L_5)

จำนวนลูกอ่อนที่เลี้ยงอยู่ระหว่าง 7 - 10 ตัว ตลอดเวลาของการทดลอง

นำหนูขาวที่อยู่ในระยะที่ต้องการมาฆ่า ด้วยวิธีดึงคอต่อให้หลุดออกจากกัน เพื่อให้หนูตายทันที ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดกระโหลกศีรษะออก เอาปากคีบปลายงอเปิดเนื้อสมองพลิกขึ้นไปทางด้านหน้าก็จะมองเห็นต่อมใต้สมองวางตัวอยู่ในแอ่ง sella turcica ค่อย ๆ ใช้ปลายปากคีบเขี่ยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบ ๆ ต่อมใต้สมองออก แล้วยกต่อมใต้สมองขึ้นมาจากกระโหลกศีรษะ วางลงบนกระดาษสำหรับชั่งน้ำหนัก ใช้ปากคีบเขี่ยแยก neurohypohysis ออกไป หลังจากนั้นใช้กระดาษกรองซับเลือดออกให้หมด นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

ต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่เก็บรวบรวมได้แยกออกเป็นหวก ๆ ทำให้แห้งด้วยสารละลาย acetone ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 0°c) แล้วนำออกจาก acetone เก็บรวบรวมไว้ในขวดแก้วเล็กมีฝาปิดสนิท นำทั้งหมดไปเก็บไว้ใน desicator ที่มี calcium chloride แห้งอยู่ด้วยเพื่อดูดความชื้น

10. การผ่าตัด

การผ่าตัดทุกครั้งกระทำในขณะที่หนูถูกดมยาสลบ (ether) เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าตัดทุกชิ้นแช่ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 2.5 % Dettol solution ก่อนใช้

10.1 การตัดรังไข่

ให้หนูดมยาสลบแล้วหา น้ำยา ฆ่าเชื้อบริเวณด้านข้างลำตัวด้านซ้ายเยื้อง

การเก็บรวมรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้า กระทำในระหว่างเวลา 10.00 - 12.00 น.

ไปทางด้านบน (dorso - lateral) ต่ำจากขายโครงเล็กน้อย ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อให้เปิดเป็นช่องเล็ก ๆ เอาปากคีบดึงไขมันที่ติดอยู่กับรังไข่ขึ้นมา รังไข่จะติดขึ้นมาด้วย ขอดปลายข้างหนึ่งของกรรไกรปลายโค้งสะอุไขมันเข้าไปใต้หอนำไข่ ตัดเอารังไข่ออกตรงส่วนคอระหว่างรังไข่กับหอนำไข่ส่วนต้นให้ได้เนื้อเยื่อรังไข่ ในสภาพที่ดี เสร็จแล้วใส่ส่วนอื่น ๆ กลับเข้าไปในช่องท้องโดยใช้ปากคีบจับขอบของกล้ามเนื้อให้ปากแผลเปิดเป็นช่องกว้างพร้อมทั้งยกขึ้นเล็กน้อย ไขมันรวบทั้งหอนำไข่จะเลื่อนลงสู่ช่องดังเดิม ใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วเย็บหนังชั้นนอกอีกทีหนึ่ง

10.2 <u>การฉีดฮอร์โมนเข้าเส้นเลือดดำ</u> (intravenous injection)

หานำยา ฆ่าเชื้อบริเวณลำคอใต้คางเยื้องไปด้านข้าง ๆ ใกล้ ๆ กับด้านบนของ pectoral girdle ใช้กรรไกรปลายตรงตัดหนังและกล้ามเนื้อให้เปิดเป็นช่องจนมองเห็นเส้นเลือด external jugular vein ได้ชัดเจน ใช้ปากคีบค่อย ๆ เขี่ยเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มบริเวณเส้นเลือดออกให้มากที่สุด เพื่อสะดวกแก่การแทงเข็มฉีดยา เบอร์ 27 หลังจากนั้นก็ฉีด ฮอร์โมนหรือสารละลายตามที่ต้องการเข้าไปในเส้นเลือดนั้น แต่ก่อนจะถอนเข็มฉีดยาออกต้องกดปากแผลที่ฉีดไว้ให้แน่นสักครู่ มิฉะนั้นเลือดจะพลักตามเข็มฉีดยาออกมา หลังจากนั้นใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้งหนึ่ง

11. <u>การทำ Autopsy</u>

11.1 <u>หนูขาว</u>

ใช้วิธีดึงคอต่อหนูให้หลุดออกจากกัน เพื่อให้หนูตายทันที แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตัดเอารังไข่ออกมาโดยมีไขมันติดอยู่เลย ใช้กระดาษกรองซับเลือดให้แห้ง นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า สำหรับการ assay FSH นั้นเก็บรังไข่ไว้ศึกษาโครงสร้างภายใน (Histology) ด้วย

11.2 <u>นกพิราบ</u>

ฆ่านกพิราบด้วยการตัดหลอดลมที่คอ แล้วเปิดหนังบริเวณถุงพักอาหาร ใช้ปากคีบค่อย ๆ เลาะไขมันรอบ ๆ ถุงพักอาหารออกให้หมด ตัดเอาถุงพักอาหารซึ่งมี

2 ฟู มาตัดแบ่งครึ่งข้างละฟู ล้างให้สะอาดนำไปวางซึ่งให้ตึงบน crop sac holding apparatus (รูปที่ .1.) โดยกลับเอาด้านในออกให้ตำแหน่งที่ฉีดเป็นศูนย์กลาง ที่เครื่องมือมีท่อต่อไปยังเครื่องดูดสูญญากาศ เดินเครื่องอยู่ 10 - 15 นาที แล้วใช้ปากคีบปลายโค้งค่อย ๆ ขูดเอาเนื้อเยื่อชั้น mucosal epithelium ออกจนถึงเนื้อเยื่อชั้น submucosa ภายในพื้นที่วงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร (เท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของ porous plate บน holding apparatus) นำ mucosal epithelium ที่ได้มาห่อด้วยกระดาษตะกั่ว นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100° c เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง เมื่อแห้งสนิทดีแล้วนำ mucosal epithelium นั้นมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

12. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณกรด ascorbic โดยวิธีของ Mindlin และ Butler (1938)</u>

12.1 <u>การทำ standard curve ของกรด ascorbic</u>

ชั่งผง ascorbic acid ที่บริสุทธิ์มา 0.1 mg ละลายในสารละลาย metaphosphoric acid 2.5 % 10 ml

ใช้ pipette ดูดสารละลาย ascorbic acid ที่เตรียมได้มาใส่ใน test tube หลอดต่าง ๆ ในปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้

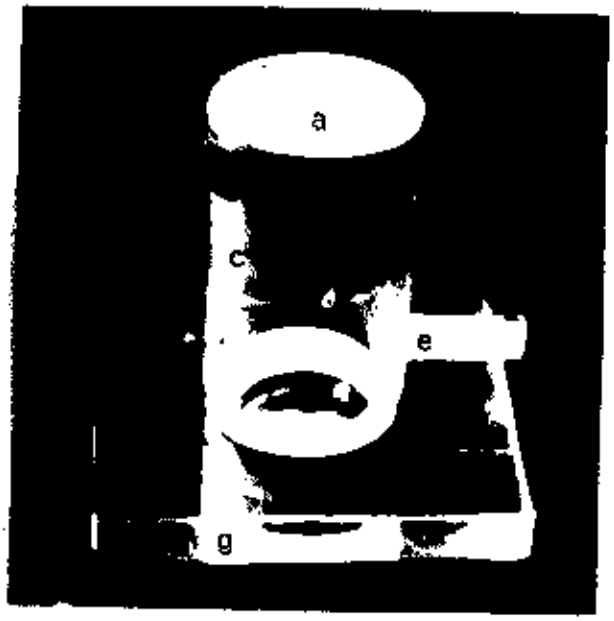
หลอดที่ 1. สารละลาย ascorbic acid 2 ml มี ascorbic acid 20 µg

หลอดที่ 2. สารละลาย ascorbic acid 1.6 ml ผสมกับสารละลาย metaphosphoric acid อีก 0.4 ml รวมเป็นปริมาณสารละลายทั้งหมด 2 ml มี ascorbic acid อยู่ 16 µg

หลอดที่ 3. สารละลาย ascorbic acid 1.2 ml ผสม กับสารละลาย metaphosphoric acid 0.8 ml รวมเป็นสารละลายทั้งหมด 2 ml มี ascorbic acid อยู่ 12 µg

หลอดที่ 4. สารละลาย ascorbic acid 0.8 ml ผสม กับสารละลาย metaphosphoric acid 1.2 ml รวมเป็นสารละลายทั้งหมด 2 ml มี ascorbic acid อยู่ 8 µg

หลอดที่ 5. สารละลาย ascorbic acid 0.4 ml ผสม กับสารละลาย


a
c
e
g

metaphosphoric acid 1.6 ml รวมเป็นสารละลายทั้งหมด 2 ml มี ascorbic acid อยู่ 4 µg

หลอดที่ 6. เป็น control มีเฉพาะสารละลาย metaphosphoric acid 2 ml

ในแต่ละหลอด เติมสารละลายของ dye ที่เตรียมไว้ลงไป 2 ml นำไปวัดเปอร์เซนต์ transmittance โดยใช้แสงที่มีความยาวของช่วงคลื่น (wave length) 520 mµ ใน micro spectro - colorimeter ทั้งนี้โดยใช้สารละลาย metaphosphoric acid 2.5 % เป็น blank คือจัดให้เปอร์เซนต์ transmittance เป็น 100 % เมื่อวัด metaphosphoric acid 2.5 % นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟ เป็น standard curve ของ ascorbic acid

12.2 <u>การหาปริมาณกรด ascorbic ในรังไข่ของหนูขาว</u>

นำรังไข่ที่ต้องการหาปริมาณ ascorbic acid มาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยาขนาดเล็ก ซึ่งมีสารละลาย metaphosphoric acid 2.5 % อยู่ในปริมาณ 5 ml และมีทรายละเอียดปนอยู่ด้วยเล็กน้อย นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ใช้ pipette ดูดสารละลายที่กรองได้มา 2 ml ผสมกับสารละลาย dye ที่เตรียมไว้อีก 2 ml นำไปวัดเปอร์เซนต์ transmittance เช่นเดียวกับการทำ standard curve ของ ascorbic acid

ผลของเปอร์เซนต์ transmittance ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ของ ascorbic acid ทำให้ทราบปริมาณของ ascorbic acid ในรังไข่ได้

13. <u>การศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในของรังไข่และลักษณะของ epithelium ของถุงที่อาหาร (Histology)</u>

ตัดรังไข่ของหนูขาวและถุงที่อาหารของนกที่อาปส่วนที่เกินจาก crop sac holding apparatus มา fix ไว้ในน้ำยา Lillie's AAF (85 ml ethyl alcohol, 5 ml glacial acetic acid, 10 ml formaldehyde) ประมาณ 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้นเปลี่ยนเอารังไข่ไปแช่ใน 70 % ethyl alcohol อีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมา dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 70 % alcohol, 80 % alcohol, 95 % alcohol, 95 % alcohol + Butyl-Butyl, Butyl + Xylol, Xylol -1, Xylol -2 ตามลำดับ ใช้เวลาขั้นละ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ tissue ไปใส่ใน paraplast (Arthus H. thomas) หลอมเหลวนำเข้าตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิประมาณ 65c เพื่อให้ paraplast เข้าสู่เนื้อเยื่อของรังไข่และ epithelium ของถุงพักอาหารดีขึ้น เปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ tissue มา embed ใน paraplast แล้วตัด section หนา 6 u ย้อมด้วยสี Harris Haematoxylin และ Eosin นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์ ศึกษาลักษณะทั่วๆ ไปของรังไข่และ epitheliumของถุงพักอาหารในภาวะต่าง ๆ

14. การทดลอง

การทดลองนี้ใช้หนูเพศเมียอายุระหว่าง 60 - 95 วัน จำนวน 220 ตัว สำหรับเก็บรวบรวมต่อมใต้สมองส่วนหน้า ลูกหนูเพศเมียอายุระหว่าง 24 - 25 วัน น้ำหนักตัวระหว่าง 33 - 50 กรัม (41.61 ± 0.87) จำนวน 201 ตัว สำหรับการ assay FSH และ LH และนกพิราบอายุระหว่าง 30 - 50 วัน จำนวน 60 ตัวสำหรับการ assay prolactin โดยแบ่งการทดลองออกเป็นหมู่ ๆ ดังต่อไปนี้

14.1 การวัดปริมาณ FSH

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Steelman และ Pohley (1953)

14.1.1 การสร้าง standard curve ของ FSH

ใช้ลูกหนู 57 ตัว แบ่งเป็น 6 หมู่

หมู่ที่ 1. ใช้ลูกหนู 16 ตัว ฉีดสารละลาย standard FSH และ HCG เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ทั้งหมด 5 ครั้ง โดย 2 วันแรกฉีด FSH และ HCG เช้าเย็นวันละ 2 ครั้ง และเช้าวันที่ 3 อีก 1 ครั้ง ให้ปริมาณของ FSH ทั้งหมดเป็น 100 µg/ml และ HCG 50 I.U./ml 24 ชั่วโมงหลังการฉีดครั้งสุดท้าย ก็ฆ่าหนูตัดเอารังไข่ทั้งสองข้างมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

001064

หมู่ที่ 2 - 4. ใช้ลูกหนู 10 ตัว, 11 ตัว, 10 ตัว ฉีดสารละลาย standard FSH และ HCG เข้าไปใต้ผิวหนังเช่นเดียวกับในหมู่ที่ 1 ให้ปริมาณ FSH ทั้งหมดเป็น 75 µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml พร้อมทั้ง HCG 50 IU/ml ในแต่ละตัวตามลำดับ 24 ชั่วโมงหลังการฉีดครั้งสุดท้ายก็ฆ่าหนู ตัดเอารังไข่ทั้งสองข้างมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

หมู่ที่ 5. เป็น control group ใช้ลูกหนู 10 ตัว ทำการทดลองอย่างเดียวกับ 4 หมู่แรก แต่ฉีด HCG อย่างเดียวให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 50 I.U./ml

หมู่ที่ 6. ใช้ลูกหนู 11 ตัว ทำการทดลองอย่างเดียวกับ 5 หมู่แรก แต่ฉีด normal saline solution อย่างเดียวให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 1 ml

นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟ เป็น standard curve ของ FSH

14.1.2 <u>Unknown</u>

ใช้ลูกหนู 54 ตัว แบ่งเป็นหมู่ ๆ ละ 6 ตัว นำมาทดลองแบบเดียวกับการทำ standard curve ของ FSH แต่ใช้ crude anterior pituitary extract จากกลุ่มต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้แทนสารละลาย standard FSH โดยให้ปริมาณของ crude anterior pituitary extract ทั้งหมดเป็น 0.4 mg dry weight ของ anterior pituitary/1 ml normal saline solution การฉีดฮอร์โมนใช้เข็มฉีดยา No. 23

นำผลที่ได้จาก unknown ไปเปรียบเทียบผลจาก standard curve ของ FSH หาปริมาณของ FSH ในต่อมใต้สมองส่วนหน้าออกมาเป็น µg/mg wet weight ของ anterior pituitary และ µg/gland

14.2 <u>การวัดปริมาณ LH</u>

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Parlow (1958)

14.2.1 <u>การทำ standard curve ของ LH</u>

ใช้ลูกหนู 32 ตัว แบ่งเป็น 4 หมู่

หมู่ที่ 1. ใช้ลูกหนู 9 ตัว นำมาทำการทดลองเป็นขั้น ๆ ดังนี้

ก. วันแรกฉีดสารละลาย PMS ใน normal saline solution

เข้าใต้ผิวหนัง 50 I.U./½ ml

ข. 56 ชั่วโมงต่อมาฉีดสารละลาย HCG ใน normal saline solution เข้าไปใต้ผิวหนัง 25 I.U./½ ml

ค. 5 - 7 วันต่อมา นำหนูทดลองนั้นมาตัดรังไข่ข้างซ้ายออก แล้วฉีดสารละลาย standard LH เข้า intravenous หนึ่งให้ปริมาณของ LH ทั้งหมดเป็น 280 µg ใน 0.1 ml นำรังไข่ข้างซ้ายที่ตัดออกไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า แล้วนำไปหาปริมาณ ascorbic acid ในรังไข่นั้น อีก 4 ชั่วโมงต่อมาฆ่าหนูตัดเอารังไข่ข้างขวาออกมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า แล้วนำไปหาปริมาณ ascorbic acid ในรังไข่เช่นเดียวกับครั้งแรก โดยใช้วิธีของ Mindlin และ Butler (1938)

เมื่อนำปริมาณ ascorbic acid ที่มีอยู่ในรังไข่ข้างขวาไปหักออกจากปริมาณ ascorbic acid ที่มีอยู่ในรังไข่ข้างซ้ายก็จะได้ปริมาณของ ascorbic acid ในที่ทดลองหลังการฉีด LH เข้าไป

หมู่ที่ 2. ใช้ลูกหนู 8 ตัว ทำการทดลองเช่นเดียวกับหมู่ที่ 1 แต่ฉีด LH ให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 70 µg/0.1 ml

หมู่ที่ 3. ใช้ลูกหนู 7 ตัว ทำการทดลองแบบเดียวกับหมู่ที่ 1 แต่ฉีด LH ให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 15 µg/0.1 ml

หมู่ที่ 4. เป็น control group ใช้ลูกหนู 8 ตัว ทำการทดลองแบบเดียวกับหมู่ที่ 1 แต่ไม่ต้องฉีด LH ตัดรังไข่ข้างซ้ายออกนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าและหาปริมาณ ascorbic acid อีก 4 ชั่วโมงต่อมาตัดรังไข่ข้างขวาที่เหลือมาชั่งน้ำหนัก และหาปริมาณ ascorbic acid ปริมาณ ascorbic acid ที่ลดลงเป็นของ control group

นำผลที่ได้ทั้งหมดไปเขียนกราฟ เป็น standard curve ของ LH

14.2.2 <u>Unknown</u>

ใช้ลูกหนู 57 ตัว แบ่งเป็นหมู่ ๆ ละ 6 ตัว ยกเว้นหมู่ของ Pregnancy -L_1 ใช้ลูกหนู 8 ตัว และ Lactation -L_3 ใช้ลูกหนู 7 ตัว นำมาทดลองแบบเดียวกับการหา standard curve ของ LH แต่ใช้ crude anterior

pituitary extract จากกลุ่มต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้แทนสารละลาย standard LH โดยให้ปริมาณของ crude anterior pituitary extract ทั้งหมดเป็น 1 mg dry weight ของ anterior pituitary/0.1 ml normal saline solution.

นำผลที่ได้จาก unknown ไปเปรียบเทียบกับผลจาก standard curve ของ LH หาปริมาณของ LH ในต่อมใต้สมองส่วนหน้าออกมาเป็น µg/mg wet weight ของ anterior pituitary และ µg/gland

14.3 <u>การวัดปริมาณ Prolactin</u>

โดยใช้วิธีการของ Nicoll (1967)

ใช้นกพิราบทั้งหมด 60 ตัวนำมาทดลองดังนี้ ถอนขนบริเวณถุงพักอาหารออก แล้วใช้สีน้ำหรือหมึกทำเครื่องหมายไว้ตรงกึ่งกลางถุงพักอาหารแต่ละข้างเพื่อแสดงตำแหน่งที่ฉีดฮอร์โมน ในนกพิราบตัวเดียวกัน ถุงพักอาหารข้างหนึ่งฉีด standard prolactin ส่วนอีกด้านหนึ่งฉีด crude anterior pituitary extract จากกลุ่มต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้ (unknown) หรือ normal saline solution เข้าไปใต้ผิวหนัง (intradermal) สำหรับ standard prolactin ที่ฉีดมีปริมาณทั้งหมดเป็น 20 µg, 50 µg และ 75 µg/normal saline solution 0.4 ml ตามลำดับ ส่วน crude anterior pituitary extractให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 2 mg dry weight ของ anterior pituitary/0.4 ml normal saline solution control group นั้นฉีด normal saline solution ให้ปริมาณทั้งหมดเป็น 0.4 ml เช่นเดียวกันโดยฉีดตรงบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ ฉีดทั้งหมด 4 ครั้ง แบ่งเป็นวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น 20 ชั่วโมงหลังการฉีดครั้งสุดท้ายก็ฆ่านกพิราบ นำส่วน mucosal epithelium มาทำให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

ผลที่ได้นำมาทำ standard curve ของ prolactin เสียก่อน หลังจากนั้นจึงนำผลที่ได้จาก unknown ไปเปรียบเทียบกับผลจาก standard curve หาปริมาณของ prolactin ในต่อมใต้สมองส่วนหน้าออกมาเป็น µg/mg wet weight ของ anterior pituitary และ µg/gland.