อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์การศึกษา

1. Swiss albino mice จากภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์-ศิริราชพยาบาล และจากสถานเพาะพันธุ์สัตว์ปากช่อง กรมปศุสัตว์
2. เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด
3. เข็มฉีดยา No. 23 และหลอดฉีดยาขนาด 1 ml.

004979

4. pH meter
5. เครื่องกวนไฟฟ้า (electric stirror)
6. เครื่องกรองแบบใช้ความดัน (Spincraft's Unicell speed-filter ซื้อจาก Spincraft, Inc. Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.) รูปที่ 4
7. เครื่อง centrifuge (International centrifuge IEC)
8. กระดาษกรอง Cenco No. 13255 เส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซ็นติเมตร (Central Scientific Company, Chicago 13, U.S.A.)
9. desiccator (glass)
10. Torsion balance
11. สารประกอบเคมี
    - 11.1 Glacial acetic acid
    - 11.2 Octyl alcohol
    - 11.3 1 N. sodium hydroxide
    - 11.4 Kaolin (Society of Leathers Chemists'specification, BDH Laboratory, Chemical division, Poole, England) หรือ (Oxford-English, Tamms Industries, Chicago, U.S.A.)
    - 11.5 2 N. ammonium hydroxide
    - 11.6 Acetone (Laboratory grade) BDH

i 17434737

11.7 Absolute alcohol จากองค์การเภสัชกรรม และ
70 % Ethyl alcohol

11.8 Solvent ether

11.9 Ammonium acetate

12. ฮอร์โมนที่ใช้ในการตรวจหา Follicle Stimulating Hormone

12.1 Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) (Pregnyl, N.V. Organon - oss, Holland)

12.2 2nd. International Reference Preparation(2nd IRP) เป็น Standard preparation) โดย nature เป็น kaolin acetone extract ของ Urinary Human Menopausal Gonadotrophin (HMG) เตรียมและแจกจ่าย โดย The National Institute for Medical Research Mill Hill, London, N.W. 7.

each ampule contain 40 I.U.FSH activity
40 I.U.ICSH activity

13. ยาคุมกำเนิดที่ใช้ทดลอง

Megestrol acetate เป็น daily oral progestogen แต่ละเม็ดมีปริมาณ 0.5 milligram ขอจากหน่วยวางแผนครอบครัว ร.พ.ศิริราช ซึ่งได้รับมาจาก Population council แห่ง New York

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. <u>การเก็บปัสสาวะเพื่อทำการทดลอง (Collection of urine)</u>

การเก็บปัสสาวะเพื่อมาทำการทดลอง เก็บจากผู้ถูกทดลองอาสาสมัครเพศหญิง 3 คน มีสุขภาพสมบูรณ์ อายุ 18 – 32 ปี ประวัติรอบประจำเดือนปกติ มีประจำเดือนประมาณ 3 – 5 วัน ไม่เคยใช้ยาคุมกำเนิดมาก่อน

ผู้ถูกทดลอง 2 คนแรกยังไม่มีบุตร คนที่ 3 มีบุตร 3 คน ทั้งสามเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงติดต่อกันทุกวันเป็นระยะเวลา 4 เดือน ตั้งต้นในวันแรกของการมีระดู (ถือเป็นวันที่หนึ่งของรอบประจำเดือนด้วย) จนจบหนึ่งรอบเดือนเมื่อเริ่มต้นวันแรกของระดูเดือนต่อไป โดยเริ่มเก็บเวลา 7.00 น. ของวันเริ่มแรกไปจนถึง 7.00 น.ของวันถัดไป (การเก็บปัสสาวะจะเริ่มเก็บเวลาใดก็ได้แล้วแต่ความสดวกของผู้เก็บ เริ่มเวลาใดก็สิ้นสุดการเก็บของแต่ละ sample ในเวลาเดียวกัน ในกรณีนี้เวลา 7.00 น. ของวันตั้งต้นเก็บปัสสาวะให้ผู้ทดลองถ่ายทิ้งเสียให้หมด เพื่อไม่ต้องการให้ปัสสาวะที่ตกค้างมาจากวันก่อนเหลืออยู่ และเก็บเรื่อยไปจนถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นจึงถ่ายเก็บเป็นครั้งสุดท้าย ปัสสาวะที่ได้มาเพื่อรอการสกัดถูกเก็บไว้ในห้องเย็นหรือในตู้เย็นอุณหภูมิไม่เกิน 4°C. และไม่ได้เติมสารกันบูดใด ๆ ไว้ทั้งสิ้น ผู้ถูกทดลองหนึ่งคนเก็บ 48 ชั่วโมง sample แต่เวลาคำนวณผลคำนวณออกมาเป็นค่า 24 ชั่วโมง ส่วนอีกสองคนเก็บเป็น 24 ชั่วโมง sample

เดือนแรกของการทดลอง ผู้ถูกทดลองไม่ได้ทานยาคุมกำเนิดแต่เก็บปัสสาวะมาตรวจหาระดับฮอร์โมน เพื่อแสดงค่าของฮอร์โมนใน Control cycle รอบเดือนต่อมาให้ผู้ถูกทดลองทานยาตั้งแต่วันแรกของระดู ทานติดต่อกันทุกวัน ๆ ละเม็ด แต่ละเม็ดประกอบด้วย Megestrol acetate 0.5 mg. เมื่อหมดยาชุดแรก (28 เม็ด) ให้เริ่มชุดที่สองต่อไปโดยไม่ต้องหยุดพักหรือคอยให้มีรอบเดือนก่อน จนหมดยาชุดที่สองรวมทานยา 28 x 2 เม็ด (เป็น treatment cycles) และเก็บปัสสาวะหลังจากหยุดยาอีก 1 เดือน (After treatment cycle) เพื่อดูผลที่ตามมาหลังจากหยุดทานยา

2. <u>การวัด Basal Body Temperature (BBT)</u>

พร้อมกับขณะที่เก็บปัสสาวะให้ผู้ถูกทดลองวัดอุณหภูมิ โดยใช้ปรอททางปากใต้ลิ้นประมาณ 3 – 5 นาที ในตอนเช้าก่อนลุกจากที่นอน เพื่อจะใช้เป็น index อันหนึ่งของการตกไข่ (ovulation)

3. Detection of human pituitary gonadotrophins excretion in urine.

ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงหรือ 48 ชั่วโมงที่เก็บรวบรวมได้จากข้อ 1. นำมาสกัด gonadotrophins ออกโดยวิธี Kaolin-acetone method และ gonadotrophin extract ที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ethanol และ ammonium acetate.

3.1 Kaolin-acetone method (วิธีของ Albert, 1956) มีวิธีดำเนินการเป็นขั้น ๆ ดังนี้

ก. วัดจำนวนปัสสาวะ 48 ชั่วโมง เติมน้ำให้เป็นจำนวนเต็มเช่น 960 เป็น 1,000 มล. เพื่อความสดวกในการคิดคำนวณ ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.5 ด้วย glacial acetic acid วัดด้วย pH meter.

ข. เติม kaolin 20 กรัม ลงในปัสสาวะ กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนไฟฟ้า 5 นาที

ค. รินสารผสมปัสสาวะและ kaolin ลงในเครื่องกรองที่ใช้ความดันและผ่านกระดาษกรอง กรองเอาปัสสาวะทิ้งไป.

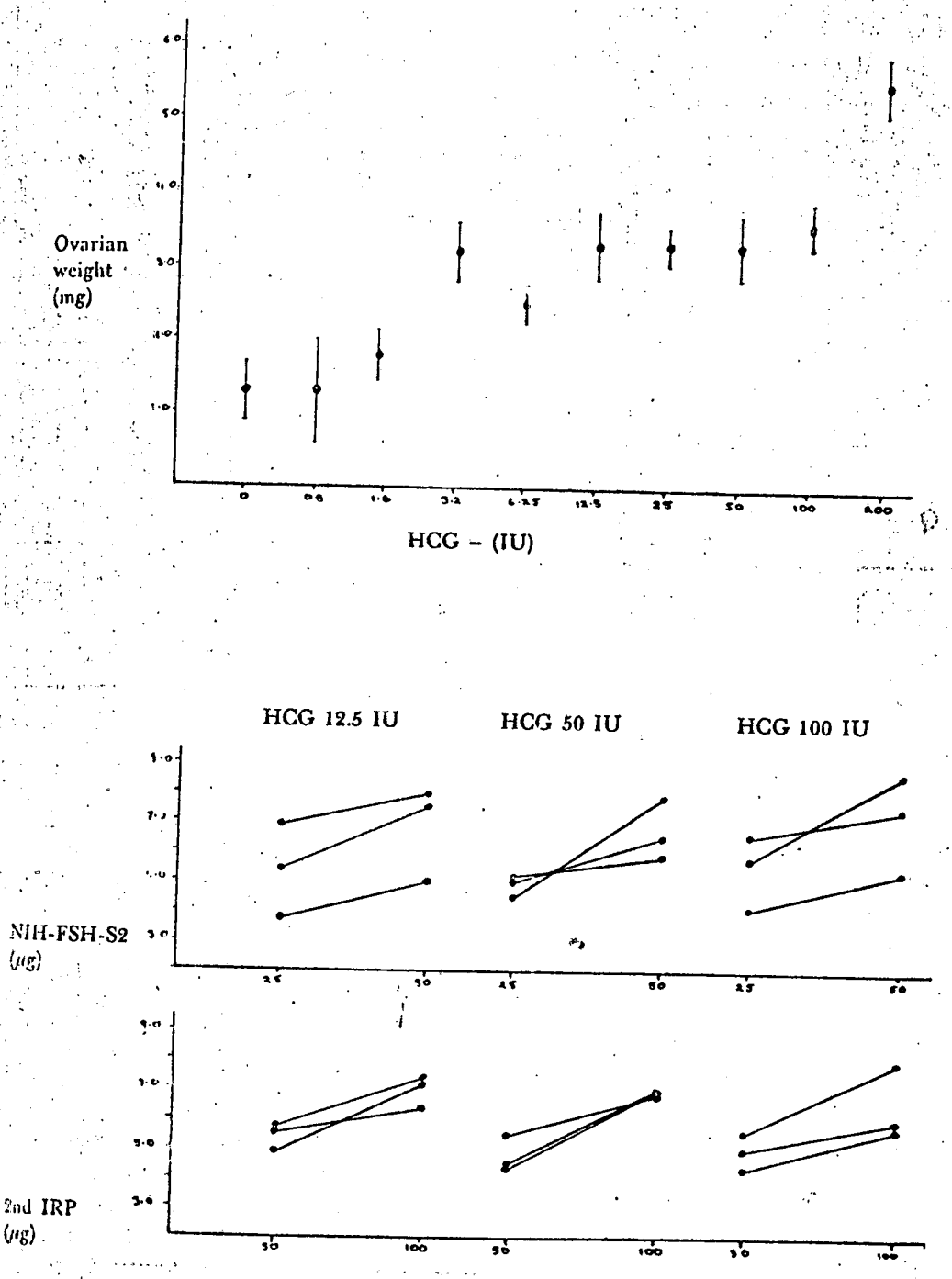
ง. ล้าง kaolin cake ด้วยน้ำ 2,000 มล. เอาน้ำทิ้งไป

จ. สกัดเอา gonadotrophins ออกจาก kaolin cake ด้วย 2 N. ammonium hydroxide 100 มล. และตามด้วยน้ำกลั่น 50 มล. เก็บเอา ammonium hydroxide และน้ำที่ผ่านออกมารวมกัน.

ฉ. ปรับสารละลายที่ได้ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 5.5

ช. ตกตะกอน gonadotrophins ด้วย acetone 2 ปริมาตร โดยเติม acetone ลงในสารละลาย pH 5.5 เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน.

ซ. centrifuge เอาส่วนที่เป็นน้ำทิ้งไป เก็บตะกอนไว้ ล้างตะกอนด้วย absolute alcohol 40 มล. ทิ้งไป เก็บตะกอนไว้.



รูปที่ 5 The dose response curve of thre assays of two standard preparations (NIH-FHS-S_2 and 2nd IRP) at different augmenting doses of HCG. (Martin & Peyton, 1967)

7.2 Purification of gonadotrophins extract with ethanol & ammonium acetate (วิธีของ Albert, et al.1961)

เอาตะกอนหรือ extract ที่ได้จาก 3.1 มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อลดการเป็นพิษเมื่อฉีดเข้าในหนูทดลอง ทำเป็นขั้น ๆ ดังนี้

ก. เติม 10% ammonium acetate ใน 70% alcohol 7 มล. 2 ครั้ง ลงในตะกอนที่สกัดได้ กวนให้ทั่วและผสมกันดี centrifuge เอา alcohol ทั้งสองครั้งมารวมกันเป็น 14 มล. ตะกอนทิ้งไป.

ข. เอา alcohol ซึ่งมี gonadotrophin ละลายอยู่มาตกตะกอนด้วย saturated ammonium acetate ใน absoluted alcohol 2 ปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกเก็บค้างคืนในตู้เย็น.

ค. centrifuge เอา alcohol ทิ้งไป เอาตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ normal เมื่อจะใช้ assay ทันที.

ง. ถ้ายังไม่ทำ assay เอาตะกอนที่ได้ทำให้แห้งด้วย solvent ether แล้วเก็บใน desiccator ในตู้เย็น.

4. การทดลองตรวจหาระดับของ Follicle Stimulating Hormone(Bioassay)

ใช้ augmentation method (วิธีของ Brown,1955) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Steelman & Pohly(1953) (วิธีนี้เป็นวิธี bioassay วิธีเดียวที่ใช้ในการตรวจหา FSH กันอย่างแพร่หลาย และเป็นวิธีที่พิสูจน์และยอมรับแล้วว่า specific ต่อ FSH) เพื่อความสะดวกในการทดลอง เนื่องจาก mice เพาะพันธุ์ได้ง่ายกว่า rat และการทดลองต้องใช้จำนวนสัตว์มาก Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) ถูกใช้เป็นตัว augment หรือไปเสริมให้ผลของ FSH เด่นชัดขึ้น โดยดูน้ำหนักของรังไข่ที่เพิ่มขึ้นเป็นดรรชนี และ HCG ในจำนวนที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ได้ไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของ follicle และรังไข่ (Bate & Schooley, 1942, Martin & Peyton,1967)(รูปที่ 5)

Immature mice เพศเมีย พันธุ์ Swiss albino ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจากกองวัคซีนและซีรั่ม กรมปศุสัตว์นำมาเพาะพันธุ์และเลี้ยงใช้ในการทดลองเองในภาควิชาสรีรวิทยา โรงพยาบาลศิริราช อายุ 21 – 22 วัน น้ำหนัก 9 – 11 กรัม เป็นสัตว์ทดลอง mice ที่จะใช้ทดลองต้องเลือกเพราะบางพันธุ์ (strain) ให้ผลไม่ดีหรือไม่ให้ผลเลย.

4.1 Standard curve of FSH

แบ่งลูกหนูออกเป็น 6 หมู่ หมู่ละ 4 – 5 ตัว ใช้ 2nd International Reference Preparation (Human Urinary Menopausal gonadotrophin) เป็น Standard.

หมู่ที่ 1 เป็น control group ฉีดสารละลาย HCG 25 I.U. ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. ให้หนูทดลองแต่ละตัว โดยแบ่งเป็น 3 doses ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 3 วัน ๆ ละ 1 ครั้ง วันแรก 0.4 มล. และวันต่อมา 0.3 มล. และ 0.3 มล. ตามลำดับ ควรฉีดในเวลาเดียวกันทุกวัน เพราะฉะนั้นหนูแต่ละตัวจะได้รับ HCG ทั้งหมดเท่ากับ 25 I.U. วันที่ 4 ทำ autopsy โดยดึงคอต่อหนูให้หลุดออกจากกันเวลาเดียวกับที่ฉีดยา ตัดเอารังไข่ที่เขี่ยเอาไขมันและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ออกหมดแล้วทั้งสองข้างมาชั่งด้วยเครื่องชั่ง Torsion balance.

หมู่ที่ 2 – 6 ละลายสารผสมของ Standard 2nd IRP - HMG dose ต่าง ๆกัน คือ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 I.U. และ 25 I.U. HCG ในน้ำกลั่น 1 มล. ฉีดในหนูทดลองโดยแบ่งเป็น 3 dose วันละครั้งเหมือนหมู่ที่ 1 เพราะฉะนั้น
ในหมู่ที่ 2 หนูแต่ละตัวจะได้รับ 2nd IRP-HMG 0.5 I.U. + HCG 25 I.U.
ในหมู่ที่ 3 หนูแต่ละตัวจะได้รับ 2nd IRP-HMG 1.0 I.U. + HCG 25 I.U.
ในหมู่ที่ 4 หนูแต่ละตัวจะได้รับ 2nd IRP-HMG 2.0 I.U. + HCG 25 I.U.
ในหมู่ที่ 5 หนูแต่ละตัวจะได้รับ 2nd IRP-HMG 4.0 I.U. + HCG 25 I.U.
ในหมู่ที่ 6 หนูแต่ละตัวจะได้รับ 2nd IRP-HMG 8.0 I.U. + HCG 25 I.U.
วันที่ 4 autopsy เอารังไข่มาชั่งดูน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

นำผลที่ได้ทั้ง 6 หมู่ ไปเขียนกราฟเป็น Standard curve

4.2 Unknown

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับหา Standard แต่ใช้สารผสมของ gonadotrophin extract ที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ถูกทดลอง (ปัสสาวะ 48 ชั่วโมงต่อ 1 extract) กับ 25 I.U. HCG ในน้ำกลั่น 1 มล. ฉีดเข้าในหนู ใช้ลูกหนูหมู่ละ 6 ตัว 3 ตัวได้รับ unknown low dose อีก 3 ตัวได้รับ unknown high dose ละลาย extract ด้วย น้ำกลั่น 3 มล. แบ่งเป็น 2 ส่วน.

low dose :- สารละลาย unknown 1 มล. น้ำกลั่น 1 มล.+50I.UHCG 2 มล.

high dose :- สารละลาย unknown 2 มล.+ 50 I.U. HCG 2 มล.

เพราะฉะนั้น สารผสม 1 มล. มี unknown gonadotrophin + 25 I.U.HCG และปริมาณของ unknown ใน low dose ที่ฉีดเข้าลูกหนูแต่ละตัวจึงเป็นครึ่งหนึ่งของ unknown ใน high dose และปริมาณทั้งหมดของ HCG ที่ลูกหนูแต่ละตัวจะได้รับเท่ากับ 25 I.U. ทุกตัว.

5. Statistical method

นำผลที่ได้จากการทดลองฉีด urinary extract กับ 25 HCG มาเปรียบเทียบกับ Standard curve และคำนวณหาปริมาณของ FSH ใน 24 ช.ม. ออกมาในเทอมของ International Reference Preparation โดยใช้วิธี 3 point assay คือ assay standard 2 dose เป็น low dose และ high dose ส่วน unknown เพียง dose เดียว อาจเป็น low dose หรือ high dose ก็ได้.

ความแม่นยำของแต่ละ assay หาโดยการคำนวณ index of precision(λ) ซึ่งการหาค่านี้ใช้ค่า Standard Diviation หารด้วย Slope

ค่าของ index of precision(λ) ที่ใช้เป็นดังนี้ (ตาม Gaddum,1953a)

ก. ถ้าค่า เท่ากับ 0.2 หรือน้อยกว่า แสดงว่าการทำ assay ได้ผลดี

ข. ถ้าค่า อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.3 แสดงว่าพอใช้ได้.

และค. ถ้าค่า เท่ากับ 0.3 หรือมากกว่า แสดงว่าการทดลองได้ผลไม่ดี.

6. Determination of Thyroid function

การหา Thyroid function ทำได้หลายวิธี เช่น

- 24 ชั่วโมง ^{131}I Iodine uptake
- Triiodothyroxine (T_3) suppression test
- T_3 uptake of resin in serum
- serum Thyroxine (T_4)
- serum PBI (protein-bound iodine)
- % TBG (Thyroxine binding globulin) capacity

ในการศึกษานี้ใช้วิธีวัด Thyroid function เพียง 2 วิธี คือ

6.1 24 ชั่วโมง ^{131}I uptake (วิธีซึ่งเสนอแนะโดย International Atomic Energy Agency (IAEA), 1962)

วันกึ่งกลางของรอบเดือน (ประมาณวันที่ 14 นับจากวันแรกของประจำเดือน) ให้ผู้ถูกทดลองดื่ม ^{131}I จำนวน 50 μc (microcuries) และหลังจากดื่มแล้ว 24 ชั่วโมง ตรวจดูประสิทธิภาพในการดักจับ Iodine ของต่อมธัยรอยด์ โดยการวัด ^{131}I ที่ต่อมธัยรอยด์โดยตรงด้วยเครื่องมือ Scintillation counter เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดักจับ Iodine ของต่อมธัยรอยด์ ระหว่าง control cycle, treatment cycle และ after treatment cycle ซึ่งค่าปกติของ 24 ชั่วโมง Thyroid uptake เท่ากับ 15.45 % ของ dose ที่ให้ ถ้ามากหรือน้อยกว่านี้แสดงว่าการทำงานของต่อมธัยรอยด์ผิดปกติ ถ้ามากแสดงว่าต่อธัยรอยด์มี activity มาก ถ้าน้อยแสดงว่าต่อมธัยรอยด์มี activity น้อย.

6.2 % Thyroxine-binding globulin capacity (TBG) วิธีที่ใช้เป็นวิธีของ Burger, 1962

เจาะเอาซีรั่มของผู้ถูกทดลองในวันเดียวกับข้อ 6.1 เพื่อตรวจหาค่า % TBG capacity โดยมีหลักการในการตรวจหาดังนี้

ดูดซีรั่มของผู้ถูกทดลองผสมกับ T_4 - ^{125}I จนได้ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อบริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป incubate ที่ 37 c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปขีดให้เป็นเส้นยาวบน Sepraphore III ที่แช่จนพองตัวเต็มที่ใน veronal buffer pH 8.6 รีบนำไปวางใน Gelman electrophoresis chamber เปิดกระแสไฟ 20 Volt ต่อ 1 แผ่นของ Sepraphore ขนาด 2 X 17 เซ็นติเมตร เป็นเวลาอย่างน้อย ชั่วโมง นำออกไปย้อมสีและทำ autoradiography

6.2.1 <u>การย้อมสี</u> TBG electrophoresis แช่ Sepraphore ที่ต้องการย้อมลงใน Ponceau S. solution (Ponceau S. 0.5 % ใน 5 % trichloroacetic acid) เป็นเวลาอย่างน้อยที่สุด 5 นาที ล้างใน acetic acid 5 % 1 นาที จะเห็นแถบต่าง ๆ ของโปรตีน ใช้กรรไกรตัดตรงช่องระหว่าง globulins ใส่ลงในขวดวัด ขนาด 3 X 10 เซ็นติเมตร และกาเครื่องหมาย "TBG" ส่วนแถบของ albumin, beta- และ gamma-globulins รวมอยู่ในขวดเดียวกันและกาเครื่องหมาย "other-fractions" ตัดส่วนที่ไม่ปรากฏว่ามีแถบใด ๆ อยู่ลงในขวดที่กาเครื่องหมาย background (bkg) เติมกรด glacial acid ลงไปขวดละ 2 มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งละลายหมดนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีด้วย Well-scintillation detector คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ TBG capacity จากสูตร (Balfour & Tunnicliffe,1960)

$$\% \text{ TBG capacity} = \frac{(\text{TBG} - \text{bkg}) \times 100}{(\text{TBG} - \text{bkg}) + (\text{other fractions} - \text{bkg})}$$

6.2.2 <u>การทำ autoradiography ของ TBG eletrophoresis</u>

expose Sepraphore บน Fuji Medical X-ray film ใน cassette เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ นำ film ไปล้างในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Metol กับ Hydroquinone และสารละลาย sodium thiosulfate เป็น fixing agent ส่วน Sepraphore นั้นนำไปย้อมสี Ponceau S. solution และล้างส่วนพื้นด้วย acetic acid 5 % สามครั้ง ต่อไปทำให้ใสและติดสีเข้มโดยแช่ใน methanol 1 นาที แล้วจุ่มลงใน acetic acid 10 % methanol

วางพาดบนกระจกที่สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 c ประมาณ 15 นาที เปรียบเทียบกับ film ที่ล้างแล้ว จะเห็นรอยแถบดำเข้มอยู่ระหว่างแถบของ และ globulins แถบเข้มที่สองอยู่ตรงกับ albumin อาจเห็นแถบเข้มที่สามอยู่เหนือ albumin เล็กน้อยคือ pre-albumin ซึ่งเรียกว่า Thyroxine-binding-pre-albumin (TBPA)

เปรียบเทียบ % TBG capacity ระหว่าง control, treatment และ after treatment cycle ค่าของ % TBG capacity ในคนปกติเท่ากับ 70 – 79

ตารางที่ 1

แสดงผลของ Standard 2nd IRP-HMG ที่มีต่อรังไข่ของ immature female mice

ฮอร์โมนที่ใช้ + HCG 25 I.U.			จำนวนหนูที่ทดลอง	น้ำหนักรังไข่ทั้งสองข้าง มิลลิกรัม ± S.D
HMG	0	I.U.	5	4.8 ± 1.34
HMG	0.25	I.U.	5	10.1 ± 2.08
HMG	0.5	I.U.	5	12.6 ± 3.06
HMG	1.0	I.U.	4	13.3 ± 3.00
HMG	2.0	I.U.	4	12.1 ± 0.57
HMG	4.0	I.U.	5	16.5 ± 7.76
HMG	6.0	I.U.	5	19.7 ± 4.48
HMG	8.0	I.U.	4	11.4 ± 1.70

ตารางที่ 2

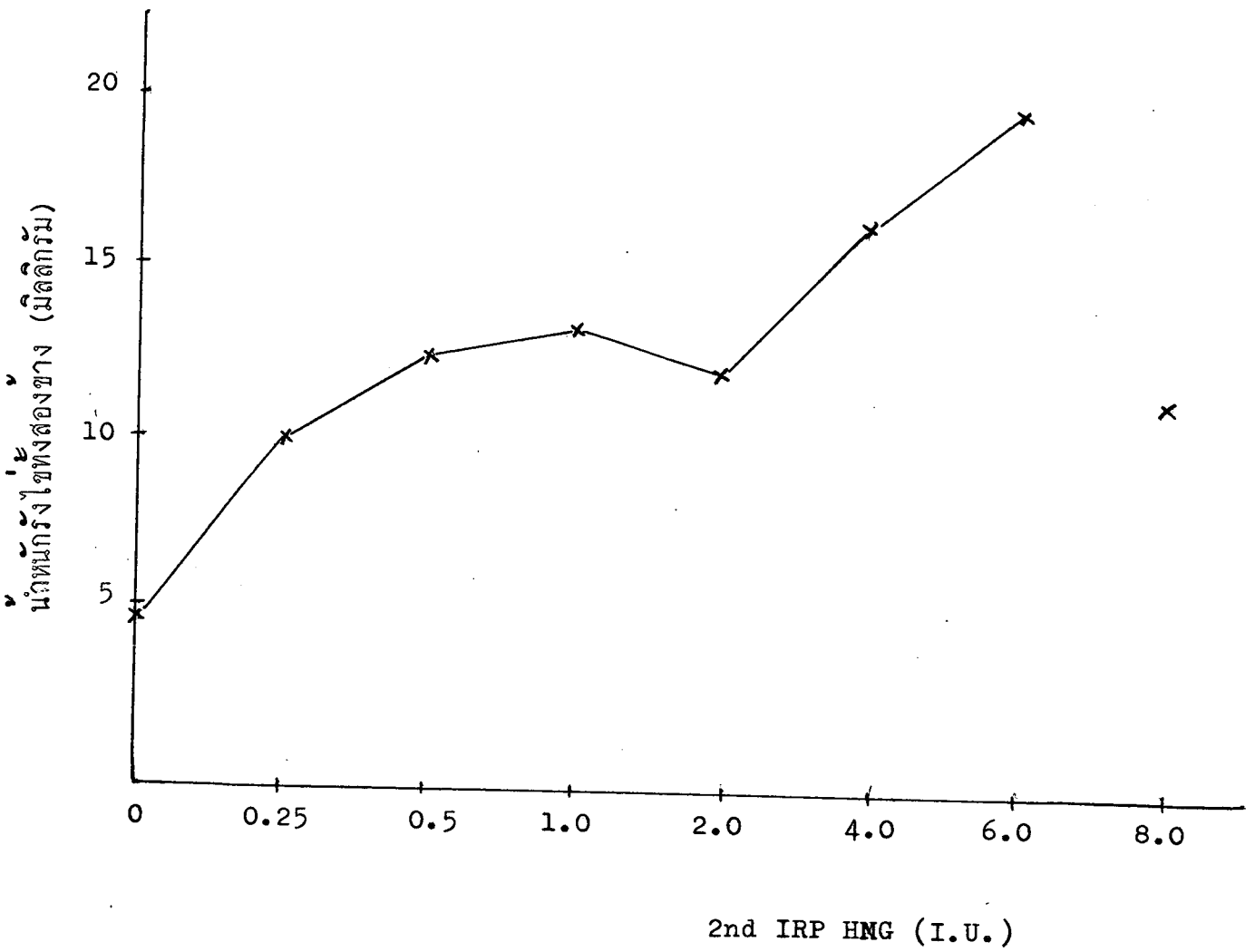
แสดงผลของ Standard 2nd IRP-HMG ที่มีต่อรังไข่ของ immature female mice (จากภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์และศิริราชพยาบาล)

	ฮอร์โมนที่ใช้	จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง	น้ำหนักของรังไข่ทั้งสองข้าง มิลลิกรัม ± S.D
control	HCG 25 I.U.	3	9.0 ± 1.95
low dose	HMG 2.5 I.U. + HCG 25 I.U.	4	13.5 ± 4.19
high dose	HMG 5.0 I.U. + HCG 25 I.U.	4	18.7 ± 2.72

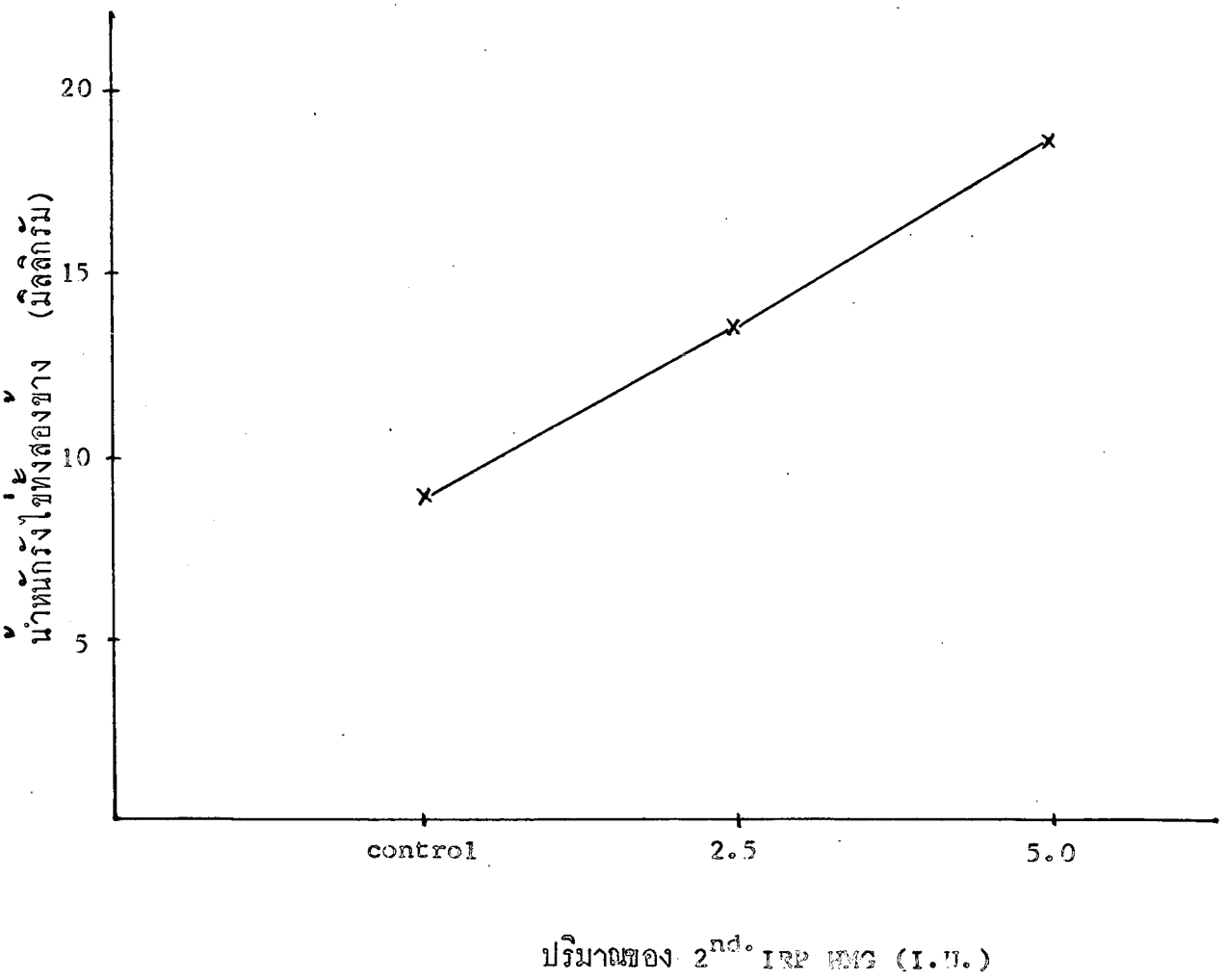
ตารางที่ 3

แสดงผลของ Standard 2nd IRP-HMG ที่มีต่อรังไข่ของ immature female mice (จากสถานเพาะพันธุ์สัตว์ปากช่อง)

	ฮอร์โมนที่ใช้	จำนวนหนูที่ใช้ทดลอง	น้ำหนักของรังไข่ทั้งสองข้าง มิลลิกรัม ± S.D
control	HCG 25 I.U.	4	7.5 ± 2.34
low dose	HMG 2.5 I.U. + HCG 25 I.U.	3	17.9 ± 2.92
high dose	HMG 5.0 I.U. + HCG 25 I.U.	4	15.5 ± 6.11



รูปที่ 6 The ovarian augmentation test in mice



รูปที่ 7 The Ovarian Augmentation Test in Mice.