วิธีดำเนินการทดลอง

(Methods)

1. การเลี้ยง golden hamster

hamster ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้มาจาก Seato Lab นำมาเลี้ยงในกรงเหล็กที่ไม่เป็นสนิม ขนาด 1 x 1 x $\frac{2}{3}$ ฟุต^3 รองด้วยขี้เลื่อยที่ได้ผ่านการอบด้วยความร้อน เพื่อฆ่าเชื้อโรค เลี้ยงในห้องปรับอากาศ และมีสวิชควบคุมแสงให้แต่ละวันมีแสง 14 ชั่วโมง (6.00 - 20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (20.00 - 6.00 น.) มีอาหารมาตรฐานของบริษัท F.E. Zeullic และน้ำประปาคื่มตลอดเวลา ในสัปดาห์หนึ่งจะให้ผัก เช่น แตงกวา 2 ครั้ง ทุกครั้งที่ให้จะต้องตรวจดูเศษผักที่เหลือในวันรุ่งขึ้น และเก็บเอาออก เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการบูดเน่าขึ้นในกรงที่เลี้ยง ในพวกที่เป็นแม่ลูกอ่อนให้กินนม (ใช้นมผงมอลลี่ชงน้ำร้อน) แทนน้ำเป็นบางวันตามแต่สะดวก เมื่อลูก hamster อายุ 30 วัน ก็แยกจากกรงแม่และแยกตัวผู้ตัวเมียไม่ให้ปนกัน hamster ที่เกิดคลอกเดียวกันเลี้ยงในกรงเดียวกันได้ แต่ถ้าแยกตัวหนึ่งตัวใดออกไปแล้วจะใส่เข้ากรงเดิมไม่ได้ ต้องเลี้ยงต่างหาก เมื่อตัวเมียอายุได้ประมาณ 35 วัน เริ่มตรวจดู oestrous cycle สักประมาณ 2-3 cycles แล้วให้ผสมกับตัวผู้ที่มีขนาดโตกว่าตัวเมียเล็กน้อย ตรวจดู sperms หรือ sperm plug ในวันรุ่งขึ้น เมื่อพบ sperms หรือ sperm plug แล้วแยกตัวเมียไว้กรงละ 1 ตัว hamster มีระยะการตั้งครรภ์นานประมาณ 16 วัน ในราววันที่ 12 หลังจากพบ sperms ใส่สำลีลงไปในกรง เพื่อที่จะได้ทำรังสำหรับลูกอ่อน ในระหว่างที่มีลูกอ่อนไม่ควรจะเปลี่ยนกรง และควรจะหลีกเลี่ยงการแตะต้องลูกอ่อน เพราะจะทำให้แม่ hamster กินลูกของมันถ้ามันถูกรบกวน hamster ตัวเมียจะให้ลูกคลอกแรกประมาณ 10 ตัว ถ้าเป็นคลอกที่ 2 จำนวนจะลดลงเหลือประมาณ 4 - 5 ตัว โดยมาก hamster ตัวเมียตัวหนึ่งๆ จะให้ลูกได้ประมาณ 2 คลอกเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากว่า ในระยะตั้งครรภ์นั้น มี atresia ของ follicle ขนาดใหญ่เป็นจำนวนมาก (Greenwald, 1964) ทำให้ population ของ follicle ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จึงเป็นสาเหตุให้ hamster ตัวเมียตัวหนึ่งๆ ให้ลูกได้น้อย ส่วนช่วงอายุที่จะให้ลูกได้มากที่สุด คือ

6 - 8 อาทิตย์

2. การตรวจ oestrous cycle ของ hamster

2.1 อุปกรณ์

2.11 แท่งแก้วขนาดเล็กๆ ยาวประมาณ 4" ปลายข้างหนึ่งแบน

2.12 physiological saline (0.85 % NaCl solution)

2.13 70 % alcohol

2.2 วิธีทำ

ใช้มือซ้ายจับตัว hamster โดยจับหนังบริเวณหลังไว้ตั้งแต่คอจนถึงลำตัว หงายท้องขึ้น ใช้แท่งแก้วปลายข้างที่แบน ซึ่งล้างด้วย 70% alc เช็ดให้แห้ง จุ่มใน physiological saline แตะที่บริเวณ vagina และตรวจดูสิ่งที่ติดออกมากับแท่งแก้วด้วยตาเปล่า และด้วยกล้องจุลทัศน์ ซึ่งจะพบลักษณะต่างๆ แตกต่างกันตามระยะของวง oestrus และพบซ้ำกันทุกๆ 4 วัน ซึ่งแสดงว่า hamster มีวง oestrus ชนิด 4 วัน เพียงชนิดเดียว โดยแบ่งเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ (Ward, 1946; Orsini,1961)

Day 1. (Proestrus) vaginal smear จะพบน้ำเมือกใสๆ ค่อนข้างเหนียว ดูด้วยกล้องจุลทัศน์จะพบเซลล์รูปร่างเหลี่ยมๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีทั้ง nucleated epithelial cells และ nonnuoleated epithelial cells และยังมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) จำนวนเล็กน้อยปะปนอยู่ (แสดงในแผ่นภาพที่ 1)

Day 2. (Oestrus) vaginal smear พบเมือกสีขาวขุ่นข้นๆ เหนียวๆ ติดแท่งแก้วออกมาเป็นสาย ซึ่ง Orsini (1961) เรียก post oestrous discharge (แสดงในแผ่นภาพที่ 2, รูป 2a) ลักษณะของ post oestrous discharge นี้เป็นลักษณะที่เห็นชัดที่สุดในวง oestrus ของ hamster เป็นสิ่งที่ขับออกมาหลังจากที่ hamster ตัวเมียมี heat แล้ว และอยู่ในระหว่างที่กำลังจะมีการตกไข่ ถ้าตรวจ

post oestrous discharge ด้วยกล้องจุลทัศน์ จะพบ epithelial cells ชนิด nucleated epithelial cells รูปร่างกลม รูปไข่ หรือเป็นแท่งกลมๆ เป็นจำนวนมาก มีเซลล์เม็ดเลือดขาวปนอยู่นอยมากในระยะนี้ (แสดงในแผ่นภาพที่ 2)

Day 3 (Metestrus A) vaginal smear พบน้ำใสๆ ในบางครั้งอาจจะพบ waxy plug ด้วย (แสดงในแผ่นภาพที่ 3, รูป 3 a) ตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์จะเห็นเซลล์ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวมี epithelical cells ปะปนอยู่นอยมาก (แสดงในแผ่นภาพที่ 3)

Day 4 (Metestrus B) vaginal smear พบน้ำใสๆ คล้าย Day 3 ตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์จะพบเซลล์ทั้งสามชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดขาว, epithelial cells ชนิดเหลี่ยมๆ และ epithelial cells ชนิดกลม, รูปไขอยู่ปะปนกัน (แสดงในแผ่นภาพที่ 4)

การผสม hamster นั้น อาศัยดูจาก post oestrous discharge เป็นหลักเพราะสามารถเห็นได้ง่าย และมีลักษณะแตกต่างจากวันอื่นๆ ได้ชัดเจน จากการที่รู้ว่า post oestrous discharge นั้น ขับออกมาหลังจากที่ hamster ตัวเมียมี heat แล้ว เพราะฉะนั้นการผสม hamster จึงต้องใส่ตัวผู้และตัวเมียไว้ด้วยกันก่อนที่จะมี post oestrous discharge 1 วัน คือใส่ตอน Day 1 และข้อสำคัญอีกอย่างหนึ่งคือควรจะใส่ตัวผู้และตัวเมียรวมกันภายหลังจาก 10.00 น. ของ Day 1 จึงจะได้ผลดี เนื่องจาก hamster สามารถผสมกันได้แม้ว่าตัวเมียยังไม่ถึงระยะมี heat และตามรายงานของ Greenwald (1963) พบว่า ถ้าใส่ตัวผู้และตัวเมียไว้รวมกันตั้งแต่ Day 3 หรือ Day 4 แล้ว ถ้ามี coitus เกิดขึ้นในระยะนี้จะทำให้ corpora lutea ซึ่ง inactive เปลี่ยนเป็น functional corpora lutea ของท้องเทียม ทำให้ไม่มีการตกไข่ในวง oestrus นั้น เวลาที่ดีที่สุดที่จะเกิด fertile mating นั้นอยู่ระหว่าง 18.00 น. ของ Day 1 จนถึง 9.30 น. ของ Day 2 (Ward, 1946)

แผนภาพที่ 1.

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast แสดง vaginal smear ในระยะ Day 1 (Proestrus) ซึ่งพบ nucleated epithelial cells (e_1), nonnucleated epithelial cells (e_2) และมี cell เม็ดเลือดขาว (l) ปนอยู่เล็กน้อย (รูป a & b)

กำลังขยาย รูปที่ 1 a x 140

รูปที่ 1 b x 280

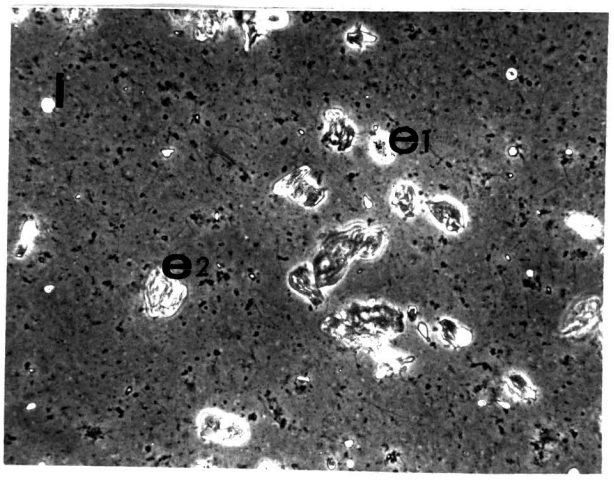
รูปที่ 1 c x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

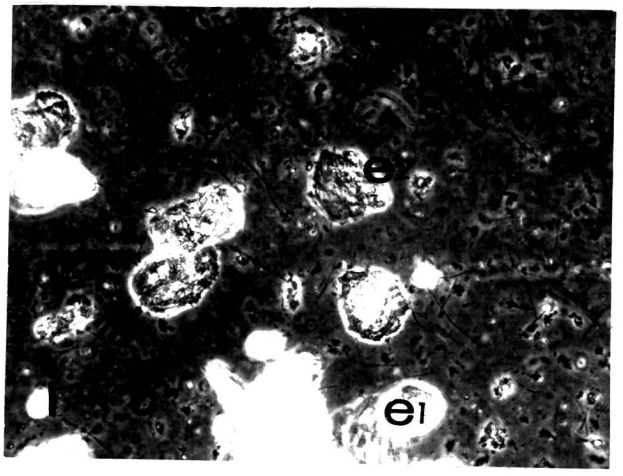
e_1 = nucleated epithelial cells

e_2 = non-nucleated epithelial cells

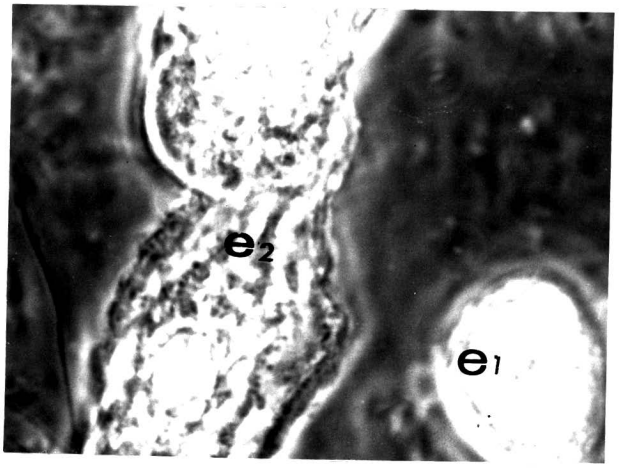
l = leucocytes



1a



1b



1c

แผ่นภาพที่ 2.

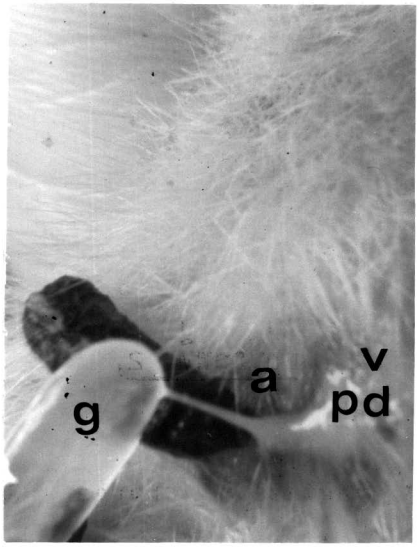
รูปที่ 2 a แสดงลักษณะ vaginal discharge ในระยะ Day 2 ซึ่งจะเห็น post oestrous discharge ยืดออกเป็นสาย

รูปที่ a b, 2 c, 2 d, 2 e ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast แสดง vaginal smear ในระยะ Day 2 (Oestrus) epithelial cell ที่พบมีลักษณะเป็น nucleated cells รูปร่างกลม, รูปไข่ หรือเป็นแท่งกลมๆ (e_1) มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (l) ปะปนอยู่นอยมากในระยะนี้

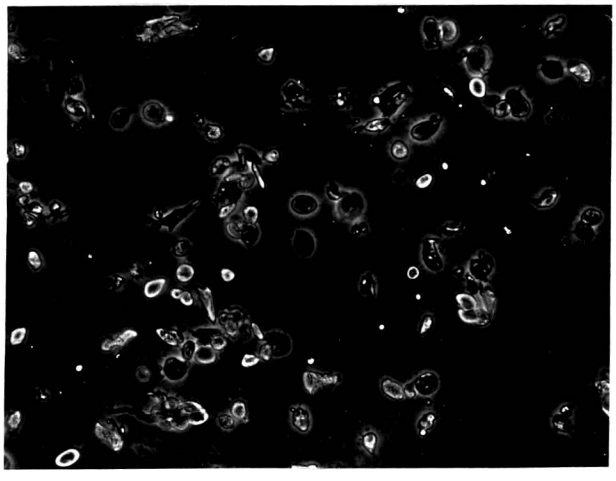
กำลังขยาย : รูปที่ 2 a x 4 , รูปที่ 2 b x 140
รูปที่ 2 c x 280 , รูปที่ 2 d x 560
รูปที่ 2 e x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

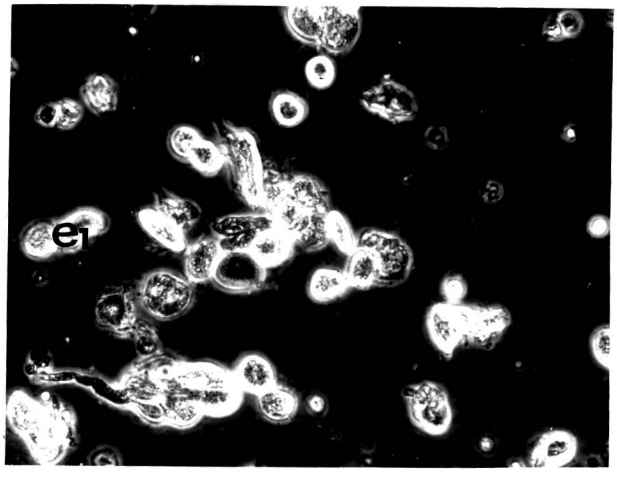
a	=	anus
e_1	=	nucleated epithelial cells
g	=	glass rod
l	=	leucocytes
pd	=	post estrous dicharge
v	=	vagina



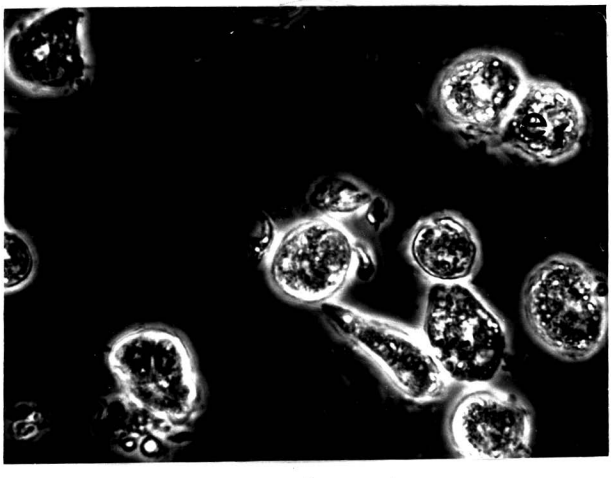
2 a



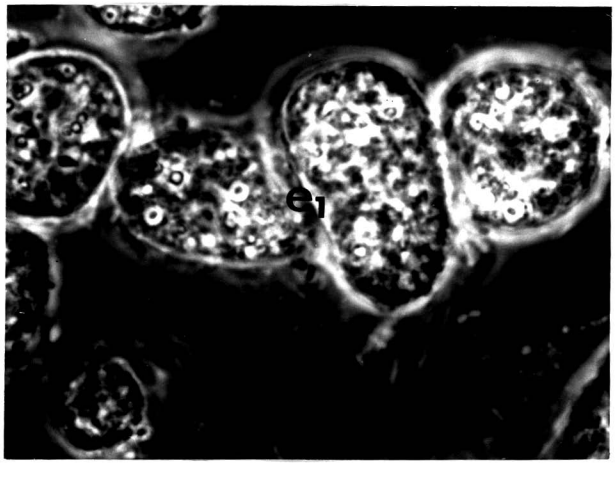
2 b



2 c



2 d



2 e

แผนภาพที่ 3.

รูปที่ 3 a แสดง vaginal discharge ในตอนต้นของระยะ Metestrus A (Day 3) ก้อนขาวๆ ที่เห็นคือ waxy plug รูป 3 b, 3 c. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast แสดง vaginal smear ในระยะ Day 3 เซลล์ที่เห็นเกือบทั้งหมดคือเม็ดเลือดขาว (l) มี epithelial cells (e_1 & e_2) ปะปนอยู่ด้วยกันน้อยมาก

กำลังขยาย : รูปที่ 3 a x 4 , รูปที่ 3 b x 140
รูปที่ 3 c x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

a = anus

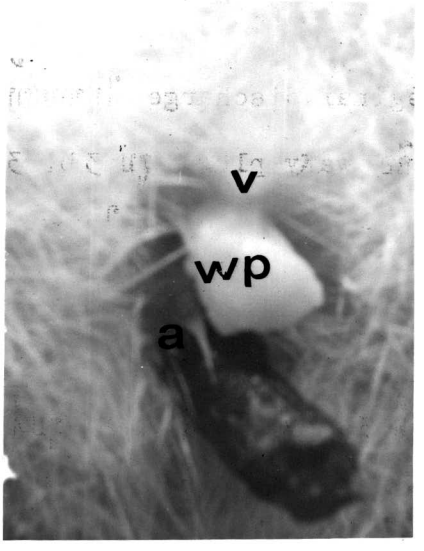
e_1 = nucleated epithelial cells

e_2 = non - nucleated epithelial cells

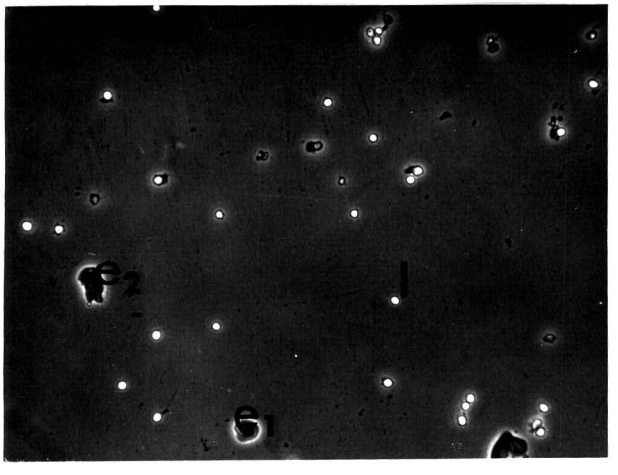
l = leucocytes

v = vagina

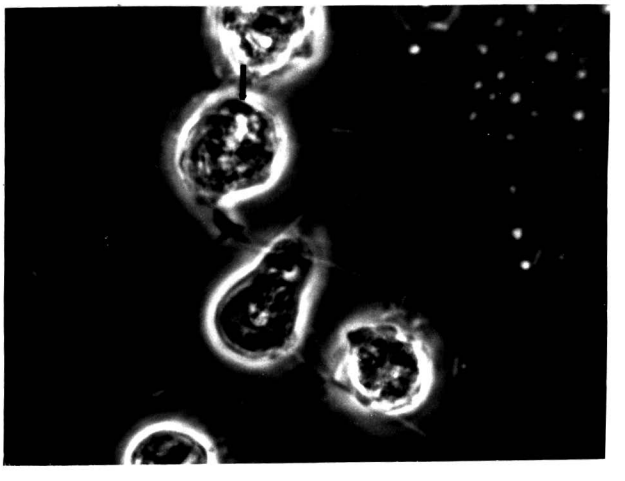
wp = waxy plug



3a



3b



3c

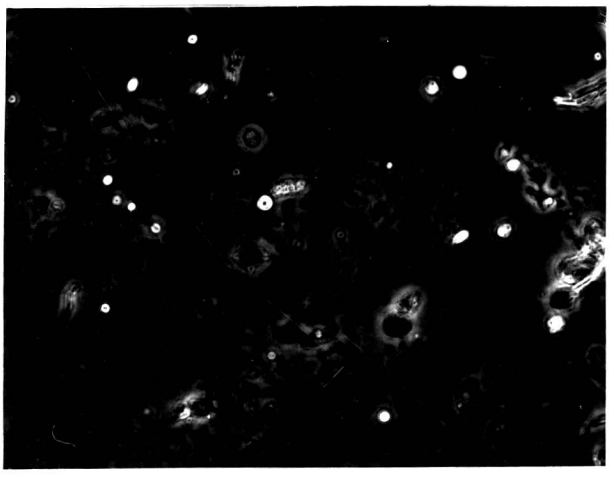
แผนภาพที่ 4.

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast แสดง vaginal smear ในระยะ Day 4 (Metestrus B) ซึ่งพบเซลล์เม็ดเลือดขาว (l), nucleated epithelial cells (e_1) และ non-nucleated epithelial cells (e_2) ปะปนกันอยู่ในจำนวนเท่าๆกัน

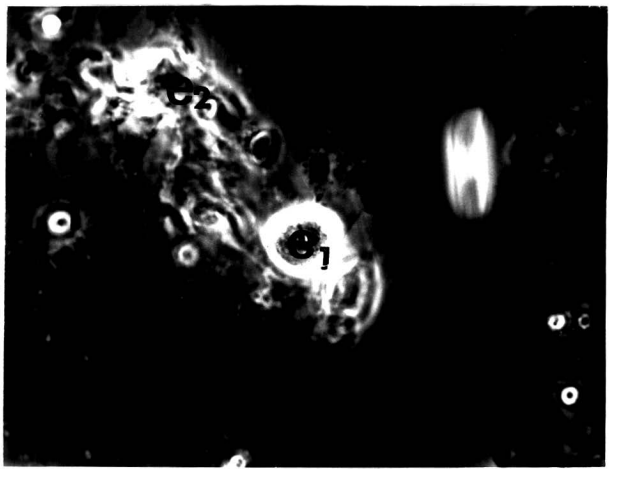
กำลังขยาย รูปที่ 4 a x 140 , รูปที่ 4 b x 280
รูปที่ 4 c x 560 , รูปที่ 4 d x 1400

อักษรย่ออธิบายภาพ

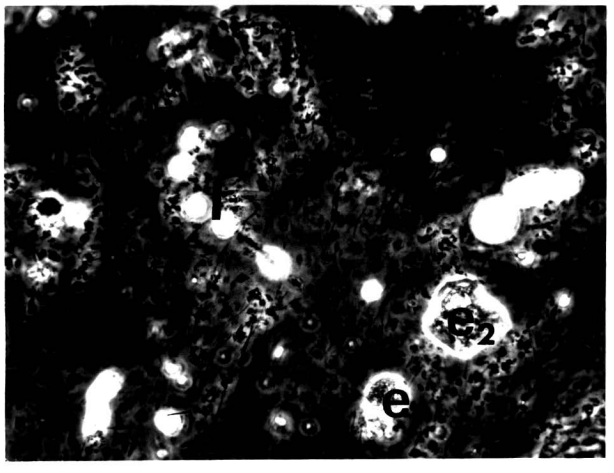
e_1 = nucleated epithelial cells
e_2 = non-nucleated epithelial cells
l = leucocytes



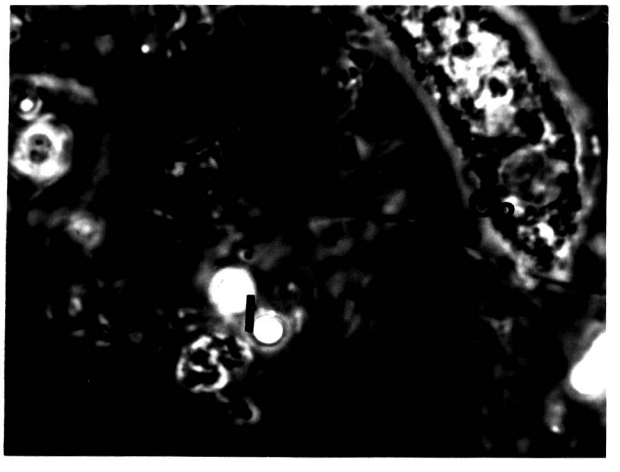
4 a



4 b



4 c



4 d

3. การศึกษาผลของยากดประสาทที่มีต่อ hamster

ใช้ hamster ตัวเมียอายุ 50 ± 10 วัน ตรวจดูวง oestrous แล้วให้ผสมกับตัวผู้ใน Day 1 (หนึ่งวันก่อนจะมี post oestrous discharge) ตรวจดู sperms หรือ sperm plug ในเช้าวันรุ่งขึ้น เฉพาะ hamster ตัวเมียที่พบ sperms หรือ sperm plug เท่านั้นที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยกำหนดวันที่พบ sperms หรือ sperm plug เป็นวัน L_0 และนับ L_1, L_2 ..... ในวันต่อๆ ไป แบ่ง hamster ตัวเมียที่ผสมแล้วออกเป็น 2 พวก แล้วดำเนินการทดลองต่อไปดังนี้

พวกที่ 1 เป็น control ไม่ treat ด้วยสารใดเลย hamster ตัวเมียทุกตัวที่ผสมแล้วจะเลี้ยงแบบปกติ และฆ่าตามวันต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยๆ

กลุ่มที่ 1 Control L_1 ใช้จำนวน 6 ตัว ทุกตัวฆ่าในวัน L_1

กลุ่มที่ 2 Control L_3 " 7 ตัว " L_3

กลุ่มที่ 3 Control L_6 " 8 ตัว " L_6

พวกที่ 2 เป็นพวกที่ฉีดด้วย tranquillizer คือ trifluoperazine hydrochloride (Stelazine) หรือ perphenazine hydrochloride ซึ่งละลาย 1 mg ใน 0.1 ml น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นมา 3 ครั้ง ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในขนาดต่างๆ กัน และฆ่าในวันต่างๆ แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย

กลุ่มที่ 1 ใช้จำนวน 6 ตัว ฉีดด้วย stelazine ขนาด 3 mg ต่อ 100 gm น้ำหนักตัวทุกวันตั้งแต่ L_0 - L_2 และฆ่าในวัน L_3

กลุ่มที่ 2 ใช้จำนวน 8 ตัว ฉีดด้วย stelazine ขนาด 3 mg ต่อ 100 mg น้ำหนักตัวทุกวัน ตั้งแต่ L_0 - L_5 และฆ่าในวัน L_6

กลุ่มที่ 3 ใช้จำนวน 8 ตัว ฉีดด้วย stelazine ขนาด 2 mg ต่อ 100 mg น้ำหนักตัวในวัน L_0 และขนาด 1.5 mg ต่อ 100 gm น้ำหนักตัวในวัน L_1 - L_5 และฆ่าในวัน L_6

กลุ่มที่ 4 ใช้จำนวน 4 ตัว เริ่มฉีดด้วย perfenazine ขนาด ๆ mg ต่อ 100 gm

004578

น้ำหนักตัวตั้งแต่ L_2 - L_6 และฆ่าในวัน L_7 ภายหลังที่ฆ่า hamster ทุกตัวแล้ว ตรวจดูสิ่งต่างๆ ต่อไปนี้

ก. ตรวจดู implantation sites นับจำนวน และวัดขนาดโดยใช้เวอร์เนียคาลิบเปอร์

ข. ตัดเอาเฉพาะรังไข่ทั้งสอง ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่อ่านค่าได้ละเอียด 1/10 มิลลิกรัม

ค. นำเอารังไข่ไปตัด section ด้วยเครื่อง cryostat (IEC) fix ด้วย 10 % formaldehyde และย้อมด้วย Sudan Black B. เพื่อเปรียบเทียบการกระจายของ lipid material ใน corpora lutea ของรังไข่ ภายหลังที่ฉีดด้วย stelazine กับกลุ่ม control

ง. แกะเอาต่อมใต้สมอง (เอาเฉพาะ anterior lobe) ทำให้แห้งโดยเก็บต่อมใต้สมองไว้ระหว่างสไลด์ที่สะอาด 2 แผ่น ใช้กระดาษกาวติดสไลด์ทั้ง 2 แผ่นไม่ให้เลื่อนไปมาได้ แล้วนำไปเก็บไว้ใน desicator เพื่อจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ FSH ของ hamster กลุ่มต่างๆ

4. การตรวจดูการกระจายของ lipid materials ใน corpora lutea ของรังไข่

4.1 <u>อุปกรณ์</u>

4.1.1 Sudan Black B.

4.1.2 Pure propylene glycol

4.1.3 Formaldehyde 10 %

4.1.4 95 % alcohol

4.1.5 glyceral gelatin

4.1.6 slides & cover glasses

4.2 <u>การเตรียมน้ำยาต่างๆ</u>

4.2.1 การเตรียมสี Sudan Black B. (ตามวิธีของ Gutierrez & Lillie) ละลายผง Sudan Black B. 250 mg. ใน pure propylene glycol 15 ml เติม 95 %

17280990

ethyl alcohol 15 ml และน้ำกลั่น 20 ml คนให้เข้ากัน นำไปอุ่นจนเกือบเดือด กรองด้วยกระดาษ สีที่เตรียมนี้ใช้ได้ภายในระยะ 1 - 2 วันเท่านั้น

4.2.2 การเตรียม 85 % propylene glycol solution ใช้ pure propylene glycol 85 ml เติมน้ำกลั่น 15 ml เขย่าให้เข้ากัน

4.2.3 การเตรียม glycerol gelatin (Kaiser's glycerol gelatin ดัดแปลงโดย Mallory) ใส่ gelatin 40 gm ลงในน้ำกลั่น 210 ml ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เติม glycerol 250 ml และ phenol ที่ละลายแล้ว 5 ml นำไปอุ่น และคนตลอดเวลาประมาณ 10 - 15 นาที จนกว่าจะเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อจะใช้นำไปอุ่นในตู้อบให้ละลาย

4.3 การตัด section ของรังไข่ด้วยเครื่อง IEC เอารังไข่ที่ตัดออกจากตัว hamster ติดกับแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง IEC โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยา Cryoform แช่ในตู้ cryostat (IEC) ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -20°C. ทันที ตัด section ให้หนาประมาณ 12 micron วาง section บน cover glass ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปย้อมสี

4.4. การย้อม section ของรังไข่ด้วยสี Sudan Black B. นำเอา section ที่ติดอยู่บน cover glass แช่ในน้ำยาต่างๆ ตามลำดับต่อไปนี้

4.4.1 แช่ formaldehyde 10 % 5 นาที

4.4.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นให้หมด formaldehyde ใช้เวลาประมาณ 5 นาที

4.4.3 แช่ใน pure propylene glycol 5 นาที

4.4.4 ย้อม Sudan Black B. ประมาณ 5 นาที

4.4.5 differentiate ด้วย 85 % propylene glycol โดยวิธีการจุ่มยกๆ หลายๆ ครั้ง

4.4.6 แช่ในน้ำกลั่นจนหมด 85 % propylene glycol

4.4.7 mount ด้วย glycerol gelatin บน slide ที่สะอาด ใช้ยาทาเล็บทาขอบ cover glass เพื่อกันไม่ให้ section แห้ง

section ของรังไข่ที่ย้อมสีเสร็จแล้ว นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์ ส่วนที่มี lipid material จะติดสีน้ำเงินเข้มคอนข้างดำ

5. การวิเคราะห์ปริมาณ FSH ในต่อมใต้สมอง hamster

ดัดแปลงจากวิธีของ Steelman & Pohley (1953) อาศัยหลักว่าเมื่อฉีด HCG ร่วมกับ FSH เข้าในหนูที่อายุยี่สิบกว่าวัน HCG จะเสริมฤทธิ์ของ FSH ทำให้รังไข่หนูมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และการเพิ่มน้ำหนักรังไข่จะเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับปริมาณ FSH ที่ฉีดเข้าไปด้วย เพราะฉะนั้นจึงใช้การเพิ่มน้ำหนักของรังไข่ของหนูในการวิเคราะห์หาปริมาณ FSH ในต่อมใต้สมอง

5.1 <u>อุปกรณ์</u>

5.1.1 หนูตัวเมียอายุ 24 - 25 วัน จำนวน 92 ตัว น้ำหนักในวันแรกที่ทำการทดลองประมาณ 30 - 50 gm

5.1.2 normal saline (0.85% NaCl ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว)

5.1.3 FSH (Mann Research Lab Inc., activity 50 Armour unit/vial) ละลาย 1 mg ใน normal saline 10 ml

5.1.4 HCG (Ayerst Lab Inc., New York, 1000 IU/ml) ละลาย 1 ml ใน normal saline 19 ml เพราะฉะนั้นใน 1 ml จะมี HCG 50 IU

5.2. การหา Standard curve*

ฉีด FSH ขนาดต่างๆ พร้อมกับ HCG (ซึ่งใช้ขนาดคงที่ในทุกกลุ่ม) เข้าใต้ผิวหนังของหนู โดยแบ่งฉีดเป็น 5 ครั้ง ภายในเวลา 3 วัน วันที่ 1 และ 2 ฉีดเช้าเย็น (เช้าฉีดระหว่าง 10.00 - 12.00 น. เย็นฉีดระหว่าง 15.30 - 17.30 น.) ส่วนวันที่ 3 ฉีดแต่เฉพาะตอนเช้า 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดครั้งสุดท้าย ฆ่าหนูตัดเอารังไข่ออกมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า การทดลองนี้ใช้หนูทั้งหมด 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้หนู 16 ตัว ฉีด FSH 100 µg HCG 50 IU
กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 10 ตัว ฉีด FSH 75 µg HCG 50 IU
กลุ่มที่ 3 ใช้หนู 11 ตัว ฉีด FSH 50 µg HCG 50 IU
กลุ่มที่ 4 ใช้หนู 10 ตัว ฉีด FSH 25 µg HCG 50 IU
กลุ่มที่ 5 ใช้หนู 10 ตัว ฉีด HCH 50 IU อย่างเดียว

นำเอาผลที่ได้มาเขียน Standard curve โดย plot graph ระหว่างน้ำหนักของรังไข่กับขนาดของ FSH ที่ฉีดเข้าไป

5.3 การหาปริมาณ FSH ในต่อมใต้สมอง

5.3.1 วิธีเตรียมต่อมใต้สมองสำหรับฉีดในสัตว์ทดลอง เอาต่อมใต้สมองที่เก็บอยู่ระหว่าง slide 2 แผ่น และทำให้แห้งใน desicator แล้วมาขูดเอาต่อมใต้สมองออก โดยใช้มีดโกนที่สะอาด รวบรวมผงต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ทำการทดลองชนิดเดียวกันไว้ด้วยกัน เอาใส่บน weighing paper ชั่งให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน (น้ำหนักที่ได้นี้เป็น dry weight) บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา ละลายผงต่อมใต้สมองนี้ในน้ำเกลือ 0.85 % ที่ใช้สำหรับฉีดในอัตราส่วน 1 mg (dry weight) ต่อ 2 ml. เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีขาวขุ่นๆ เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นตลอดเวลา นอกจากเวลานำออกมาใช้

---

* ทำร่วมกับ เจตะสานนท์, ธีรวรรณ (2513) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท แผนกชีววิทยา

5.3.2 วิธีหา FSH ในต่อมใต้สมอง ทำวิธีเดียวกับการหา Standard curve แต่ใช้สารละลายต่อมใต้สมองจากหนูกลุ่มต่างๆ แทน FSH ส่วน HCG คงใช้ 50 IU เท่าเดิม การทดลองนี้ใช้หนูทั้งหมด 6 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้หนู 6 ตัว ฉีดสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ทำ Control L_1 ทั้งหมด 1 ml กับ HCG 50 IU

กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 5 ตัว ฉีดสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ทำ Control L_3 ทั้งหมด 1 ml กับ HCG 50 IU

กลุ่มที่ 3 ใช้หนู 6 ตัว ฉีดด้วยสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ทำ Control L_6 ทั้งหมด 1 ml กับ HCG 50 IU

กลุ่มที่ 4 ใช้หนู 6 ตัว ฉีดด้วยสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ฉีดด้วย stelazine 3 mg L_0- L_2 และฆ่าในวัน L_3 จำนวน 1 ml กับ HCG 50 IU

กลุ่มที่ 5 ใช้หนู 6 ตัว ฉีดด้วยสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ฉีดด้วย stelazine 3 mg L_0-L_5 และฆ่าในวัน L_6 จำนวน 1 ml กับ HCG 50 IU

กลุ่มที่ 6 ใช้หนู 6 ตัว ฉีดด้วยสารละลายต่อมใต้สมองจาก hamster ที่ฉีดด้วย stelazine 2 และ 1.5 mg ตั้งแต่ L_0 - L_5 และฆ่าในวัน L_6 จำนวน 1 ml กับ HCG 50 IU

จากน้ำหนักรังไข่ของหนูแต่ละกลุ่ม นำไปเทียบหาระดับ FSH ในต่อมใต้สมองจาก standard curve