บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การฆ่ากระแต

นำกระแตมาทำให้สลบโดยฉีดยาสลบ (sodium barbiturate) หรือรมด้วย ether เพื่อสะดวกในการจับชั่งน้ำหนักตัว ผ่าบริเวณคอ ตัดต่อมไทรอยด์ออกมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดเสียก่อน จึงนำไปตัดคอ แล้วเอาส่วนหัวมาเจาะกระโหลก แกะเอาต่อมใต้สมองออกมาชั่งน้ำหนักไว้และ fix ในสารละลาย sublimate-formol เพื่อศึกษาทาง histochemistry ส่วนลำตัวนำมาผ่าผนังหน้าท้อง เจาะเอาต่อมน้ำนมออกมาศึกษาทาง histology

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 Fixative

2.1.1 Bouin's fluid

สารละลาย picric acid	อิ่มตัว	75 มิลลิลิตร
formaldehyde (40 %)		25 มิลลิลิตร
glacial acetic acid		5 มิลลิลิตร

2.1.2 Sublimate formol

สารละลาย mercuric chloride	อิ่มตัว	90 มิลลิลิตร
formaldehyde (40 %)		10 มิลลิลิตร

2.1.3 Kahle's AFA

70 % ethyl alcohol	90 มิลลิลิตร
formaldehyde (40 %)	5 มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เย็น 0–4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ใช้

2.2 การเตรียมสี

2.2.1 Harris Hematoxylin

hematoxylin	5 กรัม
ethyl alcohol (95 %)	50 มิลลิลิตร
potassium aluminium sulphate	100 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
mercuric oxide (yellow)	2.5 กรัม
glacial acetic acid	50 มิลลิลิตร

ละลาย hematoxylin ใน 95 % ethyl alcohol โดยใช้ magnetic stirror ให้ละลายจนหมด

ละลาย potassium aluminium sulphate ในน้ำกลั่น ยกขึ้นตั้งไฟต้มให้เดือด แล้วปล่อยให้เย็นลงช้าๆ จึงเติมสารละลาย hematoxylinซึ่งเตรียมไว้ลงไป ยกของผสมนี้ขึ้นตั้งไฟอีกครั้งให้เดือดอย่างรวดเร็ว แล้วยกลงค่อยๆ เติมผง mercuric oxide ลงไป นำกลับไปต้มอีก 2-3 นาที จนกระทั่งสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม glacial acetic acid ลงในสารละลายที่เย็น และต้องกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

2.2.2 0.5 % Eosin

ชั่ง eosin ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 0.5 กรัม ละลายด้วย 95 % ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ magnetic stirror กรองตะกอนทิ้ง

2.2.3 1 % Carmoisine L ในสารละลาย 1 % acetic acid

นำ glacial acetic acid 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 1 % acetic acid

ชั่ง carmoisine L ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 1 กรัม นำไปละลายในสารละลาย 1 % acetic acid ที่เตรียมไว้ให้เข้ากันดี แล้วกรองก่อนใช้

2.2.4 0.5 % Orange G ในสารละลาย 2 % phosphotungstic acid (ใน 95 % ethyl alcohol)

ชั่ง phosphotungstic acid ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 2 กรัม ละลายใน 95 % ethyl alcohol จำนวน 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 2 % phosphotungstic acid ใน 95 % ethyl alcohol

ชั่ง orange G ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 0.5 กรัม ละลายในสารละลาย 2 % phosphotungstic acid ใน 95 % ethyl alcohol โดยใช้ magnetic stirror ช่วย ให้เข้ากันดี นำไปกรองก่อนใช้

2.2.5 0.5 % Wool green S ในสารละลาย 0.5 % acetic acid

นำ glacial acetic acid มา 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.5 % acetic acid

ชั่ง Wool green S ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียดมา 0.5 กรัม นำมาละลายในสารละลาย 0.5 % acetic acid ที่เตรียมไว้ให้เข้ากันดี กรองก่อนใช้

3. การทำ section ของตอมน้ำนม

นำเนื้อเยื่อตอมน้ำนมที่เจาะออกจากตัวกระแต fix ใน Bouin's fluid ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาเปลี่ยนแช่ใน 70 % ethyl alcohol อีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมา dehydrate ใน 70 % ethyl alcohol, 80 % ethyl alcohol 90 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol+ n-butanol, n-butanol, n-butanol+xylene ขั้นละ 1 ชั่วโมง และแช่ใน xylene อีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อใส ต่อจากนี้นำเนื้อเยื่อตอมน้ำนมไปแช่ในส่วนผสมของ xylene กับ paraplast อย่างละเท่าๆ กัน ที่หลอมเหลวในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

เปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เก็บไว้ในตอบเช่นเดียวกันแล้วนำเนื้อเยื่อตอมน้ำนมนี้มา embed ใน paraplast หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นดีแล้ว ตัด section ตามแนวนอนหนา 6 μ ด้วย microtome มาติดบนสไลด์ ย้อมสีด้วย Harris' hematoxylin และ eosin สุดท้าย mount ด้วย harleco synthetic resin ตรวจและศึกษาว่ามีการสร้างน้ำนมใน alveoli ของตอมน้ำนมหรือไม่โดยกล้องจุลทรรศน์

4. การทำ Whole mount ของตอมน้ำนม

ตัดตอมน้ำนมทางด้านซ้ายออกจากตัวกระต่ายโดยให้มีหนังติดมาด้วย นำมายืดและยึดไว้บนแผ่นไม้คอร์กด้วยเข็มหมุด ผึ่งแดดนานประมาณ 4 ชั่วโมง ให้แห้งพอหมาดๆ นำมาเฉาะเอาแต่ตอมน้ำนมไป fix ใน Kahle's AFA fixative 48 ชั่วโมงในตู้เย็น นำมาล้าง fixative ออกด้วย 70 % ethyl alcohol โดยแช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 วัน จึงนำไปสกัดไขมันออกด้วย chloroform-methanol 2:1 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และ ether 6 ชั่วโมง ย้อมด้วย Harris hematoxylin แล้ว differentiate ในสารละลายกรดเกลือ 0.5 % ให้ติดสีอ่อนจางๆ นำไป dehydrate โดยแช่ใน 70 % ethyl alcohol, 80 % ethyl alcohol, 90 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol + n-butanol, n-butanol, n-butanol + xylene ขั้นละ 15 นาที นำไปผ่านใน xylene 10–20 นาที ทำให้ใสโดยแช่ใน cedar wood oil เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาติดบนสไลด์ mount ด้วย harleco synthetic resin ศึกษาลักษณะของตอมน้ำนมด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

5. การทำ section ของตอมไทรอยด์

นำเนื้อเยื่อตอมไทรอยด์ที่ได้จากตัวกระต่ายมา fix ใน Bouin's fluid ประมาณ 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนแช่ใน 70 % ethyl alcohol อีก 24 ชั่วโมง แล้ว dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 80 % ethyl alcohol, 90 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol, 95 % ethyl alcohol + n-butanol, n-butanol, n-butanol + xylene ขั้นละ 1 ชั่วโมง และแช่

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน xylene อีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อใส ต่อจากนั้นนำเนื้อเยื่อต่อมไทรอยด์ไปแช่ในส่วนผสมของ xylene กับ paraplast อย่างละเท่าๆ กันที่หลอมเหลวในตู้บอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เปลี่ยน paraplast 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เก็บในตู้บอุณหภูมิเช่นเดียวกัน แล้วนำเนื้อเยื่อต่อมไทรอยด์นี้มาembed ใน paraplast หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นดีแล้ว ตัด section หนา 6 μ ด้วย microtome มาติดบนสไลด์ ย้อมสีด้วย Harris hematoxylin และ eosin สุดท้าย mount ด้วย harleco synthetic resin ตรวจและศึกษา activity ของต่อมไทรอยด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. <u>การทำ serial section ของต่อมใต้สมอง</u>

นำต่อมใต้สมองที่แกะออกมา fix ใน sublimate formol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำมาแช่ในน้ำประปาซึ่งไหลตลอดเวลา 2 ชั่วโมง แช่ใน 70 % ethyl alcohol แล้ว dehydrate, embed ใน paraplast เช่นเดียวกับต่อมน้ำนมและต่อมไทรอยด์ หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นดีแล้ว ตัด serial section หนา 4 μ ด้วย microtome นำมาติดบนสไลด์ ย้อมด้วย carmoisine L., orange G และ wool green S. (Brookes, 1968) สุดท้าย mount ด้วย harleco synthetic resin ตรวจและศึกษาชนิดของ เซลในต่อมใต้สมองส่วนหน้า

7. <u>การย้อม section ของต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยใช้ Carmoisine L, Orange G และ Wool green S (Brookes, 1968)</u>

a. เอา paraplast ออกจาก section โดยแช่ใน xylene แล้ว hydrate ด้วย ethyl alcohol เปอร์เซนต์ต่างๆ จนถึง 70 % ethyl alcohol ขั้นละ 3 นาที

b. เอา mercuric chloride ออก โดยแช่ใน

0.5 % Lugol iodine	5 นาที
น้ำกลั่น	3 นาที
สารละลาย 5 % sodium thiosulphate	5 นาที
น้ำประปาซึ่งไหลตลอดเวลา	10 นาที

c. นำไปแช่ใน 10 % aqueous $CuSO_4$ (mordant) 1 ชั่วโมง

d. ล้างในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 20 นาที
และล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

e. ย้อมใน 1 % carmoisine L. ในสารละลาย 1 % acetic acid
เป็นเวลา 30 นาที

f. ผ่านลงในน้ำกลั่น, 95 % ethyl alcohol และสารละลาย 2 % phosphotungstic acid (ใน 95 % ethyl alcohol) ตามลำดับ

g. ย้อมใน saturated (0.5 %) orange G ในสารละลาย 2 % phosphotungstic acid (ใน 95 % ethyl alcohol) เป็นเวลา 30 นาที

h. ล้างในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

i. นำกลับไปย้อมใน 1 % carmoisine L. ในสารละลาย 1 % acetic acid อีกครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

j. ล้างในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

k. ย้อมใน 0.5 % Wool green S ในสารละลาย 0.5 % acetic acid
เป็นเวลา 5 นาที

l. ผ่านลงใน absolute alcohol 3 ครั้ง แล้ว clear ใน xylene และ mount ด้วย harleco synthetic resin

นำสไลด์ไปตรวจทูนิกของ เซลจะได้ดังนี้

Somatotropes (Growth hormone secreting cell) ติดสีส้ม

Lactotropes (Prolactin secreting cell) ติดสีแดง

Gonadotropes ติดสีฟ้าจาง รูปร่าง เซลกลมหรือรี

Thyrotropes ติดสีฟ้าจาง รูปร่าง เซล เป็น angular

นิวเคลียสของ เซลทุกชนิดและ เซล เม็ดเลือดแดงติดสีแดง

8. การตรวจ Mammary alveoli ของต่อมน้ำนม

นำ section ของต่อมน้ำนมกระแต้ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกต่อมน้ำนมเป็นแบบต่างๆ ตามปริมาณน้ำเมใน alveoli ลักษณะของ alveoli และรูปร่างของ alveolar cell ดังนี้

8.1 มีการสร้างน้ำนมระดับสูงมาก alveolar cells ไม่เห็น cytoplasm ด้าน apical part alveoli ของต่อมน้ำนมทั้งหมดทุกอันเต่งออกและมีน้ำนมบรรจุเต็มช่องว่างของ alveoli หรือมากกว่า 3/4 ของ alveoli

8.2 มีการสร้างน้ำนมระดับปานกลาง alveolar cells ไม่เห็น cytoplasm ด้าน apical part alveoli ของต่อมน้ำนมมีน้ำนมบรรจุอยู่ไม่เต็มช่องว่างของ alveoli หรือน้อยกว่า 3/4 ของ alveoli

8.3 หยุดสร้างน้ำนม alveoli เริ่ม regress พบว่าเซล epithelium ของ alveoli ของต่อมน้ำนมจะเริ่มแฟบ หรือแฟบเข้าหากัน และเห็น cytoplasm ด้าน apical part ของ alveolar cells ชัดเจน แต่ยังมีร่องรอยของน้ำนมเหลือค้างอยู่ในช่องว่างของ alveoli บ้าง

8.4 ไม่มีการสร้างน้ำนม พบว่าผนัง alveoli จะแฟบและหดเข้ามาหากันจนติดกัน เห็นแต่ alveolar epithelium ที่มี cytoplasm ด้าน apical part ชัดเจนเท่านั้น ไม่มีน้ำนมหลงเหลืออยู่เลย และช่องว่างของ alveoli ก็หายไปด้วย

9. วิธีการนับเซลของต่อมใต้สมอง

นำต่อมใต้สมองซึ่งทำ paraplast serial sections หนา 4 u ย้อมสีด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นมา 3 sections โดยเลือกจากระดับต่างๆ ดังนี้ คือ ที่ตำแหน่ง $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ และ $\frac{3}{4}$ ของต่อมตามลำดับ มานับเซลด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,500 เท่า นับแยกเซลออกตามลักษณะที่ติดสีและรูปร่างของเซลให้เป็น somatotropes, lactotropes, gonadotropes, thyrotropes และ

chromophobes ทั้งหมดรวมกันประมาณ 2,000 เซล จาก section ในแต่ละระดับ ซึ่งในการนับเซลนี้ได้นับแบบสุ่มตัวอย่างในบริเวณที่เดียวกันทุก sections

จำนวนเซลแต่ละชนิดที่นับได้ใน sections 3 ระดับที่เลือกมานั้น นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วหาจำนวนเซลแต่ละชนิดให้เป็นร้อยละของจำนวนเซลทุกชนิดรวมกัน จะเป็นตัวแทนของเซลชนิดต่างๆ ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า

10. วิธีการวัดขนาดเซลของต่อมใต้สมองส่วนหน้า

เลือก paraplast serial sections ของต่อมใต้สมองส่วนหน้าของสัตว์แต่ละตัวมาทุก 10 sections วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลชนิดที่ต้องการด้วย occular micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer โดยวัดเป็นแนวตั้งฉากกันจากขอบด้านหนึ่งของเซลไปยังอีกด้านหนึ่ง ค่าที่ได้เฉลี่ยกันเป็นขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลต่อมใต้สมองส่วนหน้าของสัตว์แต่ละตัว แล้วนำค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลต่อมใต้สมองส่วนหน้าของสัตว์ทุกตัวมาเฉลี่ยกันอีกครั้งหนึ่ง จะเป็นขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลต่อมใต้สมองที่ต้องการ เซลในต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่ได้ทำการวัดขนาดคือ somatotropes, lactotropes และ gonadotropes สำหรับ thyrotropes และ chromophobes นั้นไม่สามารถวัดได้ เนื่องจากไม่ทราบขอบเขตที่แน่นอนของเซล

11. วิธีวัดความสูงของ Thyroid epithelial cells ในต่อมไทรอยด์

เลือก paraplast sections ของต่อมไทรอยด์ของสัตว์แต่ละตัวมา 10 sections วัดขนาดความสูงของเซล thyroid epithelium โดยการสุ่มตัวอย่างด้วย occular micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer นำค่าที่ได้เฉลี่ยกันเป็นขนาดความสูงของ thyroid epithelial cells ของแต่ละตัว แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวนี้มาเฉลี่ยกันอีกครั้ง เป็นค่าเฉลี่ยของกระแตแต่ละกลุ่ม

12. การจัดกลุ่มกระแตที่ใช้ในการศึกษา

กระแตที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นกระแตเพศเมีย ตัวโตเต็มวัยและช่องคลอดเปิดแล้ว

จำนวน 63 ตัว ถูกแบ่งออกตามสภาวะทางสรีรวิทยาของการสืบพันธุ์ เป็นกลุ่มต่างๆ เพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ ดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่ตั้งครรภ์และไม่ได้อยู่ในภาวะให้นมเลี้ยงลูกอ่อน จำนวน 26 ตัว
2. กลุ่มที่กำลังตั้งครรภ์ จำนวน 23 ตัว
3. กลุ่มที่กำลังอยู่ในภาวะให้นมเลี้ยงลูกอ่อน จำนวน 12 ตัว
4. กระแตที่ตัดรังไข่เป็นเวลา 1–2 สัปดาห์

0005372

โดยตรวจดูจาก histology ของมดลูก (มณี, 2519) และ histology ของต่อมน้ำนม

1. <u>กลุ่มที่ไม่ตั้งครรภ์และไม่อยู่ในภาวะให้นมเลี้ยงลูกอ่อน</u> เนื่องจากว่าในสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่มีวงสืบพันธุ์แน่นอน สามารถแบ่งระยะต่างๆ ของวงสืบพันธุ์ได้ แต่ในกระแตยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับวงสืบพันธุ์ที่แน่นัด จึงยึดถือขนาดของ เวสิคิวลาร์ ฟอลลิเคิล ภายในรังไข่เป็นหลักในการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ อีก 4 กลุ่ม คือ

1.1 พวกที่ไม่พบมี vesicular follicle จำนวน 5 ตัว

1.2 พวกที่มี vesicular follicle ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ตัว

1.3 พวกที่มี vesicular follicle ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.5 มิลลิเมตร ถึง 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 10 ตัว

1.4 พวกที่ vesicular follicle ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.7 มิลลิเมตร จำนวน 8 ตัว

ทั้งนี้โดยตรวจดูจาก histology ของรังไข่ (มณี, 2519)

2. <u>กลุ่มที่กำลังตั้งครรภ์</u> แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่ม โดยตรวจดูจาก histology ของมดลูก (มณี, 2519) และในแต่ละกลุ่มย่อยยังแบ่งออกเป็นพวก active lactation กับ inactive lactation โดยตรวจดูจาก histology ของต่อมน้ำนม เป็นดังนี้

I 17858719

2.1 กระแตที่ตั้งครรภ์เป็นช่วงเวลาประมาณ 6–15 วัน

2.1.1 มี active lactation จำนวน 3 ตัว

2.1.2 inactive lactation จำนวน 4 ตัว

2.2 กระแตที่ตั้งภรรภ์เป็นช่วงเวลาประมาณ 22–29 วัน

2.2.1 มี active lactation จำนวน 6 ตัว

2.2.2 in active lactation มีเพียง 1 ตัว

2.3 กระแตที่ตั้งครรภ์เป็นช่วงเวลามากกว่า 30 วัน มี active lactation จำนวน 3 ตัว

2.4 กระแตที่เพิ่งคลอดลูกใหม่ๆ ไม่เกิน 72 ชั่วโมง เป็น active lactation จำนวน 6 ตัว

3. กลุ่มที่กำลังอยู่ในภาวะให้นมเลี้ยงลูกอ่อน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยตรวจดูจาก histology ของต่อมน้ำนม

3.1 กระแตที่อยู่ในช่วงต้นของภาวะให้นม มี active lactation

3.1.1 ไม่มีคอร์ปัสลูเตียมในรังไข่ จำนวน 8 ตัว

3.1.2 มีคอร์ปัสลูเตียมในรังไข่ มีเพียง 1 ตัว

3.2 กระแตที่อยู่ในช่วงหลังของภาวะให้นม มีการสร้างน้ำนมระดับปานกลาง จำนวน 3 ตัว

4. กระแตที่ตัดรังไข่ออกเป็นเวลา 1–2 สัปดาห์ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับกระแตปกติที่อยู่ในสภาวะทางสรีรวิทยาของการสืบพันธุ์ต่างๆ กัน จำนวน 2 ตัว

13. การทดสอบทางสถิติ

1. น้ำหนักตัว น้ำหนักต่อมใต้สมอง น้ำหนักต่อมไทรอยด์ และจำนวนเซลชนิดเดียวกันในต่อมใต้สมองส่วนหน้า ถูกนำมาทดสอบโดยวิธี t-test แบบ two tail ระหว่างกระแตต่างกลุ่มกัน โดยใช้สูตร

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - (\mu_1 - \mu_2)}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 1)\, s_1^2 + (n_2 - 1)\, s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$\bar{x}_1$ = mean ของกลุ่มที่ 1

$\bar{x}_2$ = mean ของกลุ่มที่ 2

μ_1 μ_2 = mean ของ population ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

s_p^2 = variance pool

s_1^2 = variance ของกลุ่มที่ 1

s_2^2 = variance ของกลุ่มที่ 2

n_1 n_2 = จำนวน sample ของกลุ่มที่ 1 และ 2

2. เซลแต่ละชนิดในตอมไตสมองส่วนหน้า ถูกนำมาหาสหสัมพันธ์ (correlations) ซึ่งกันและกัน

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}\right]\left[\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}\right]}}$$

r = coefficience of correlation

x = จำนวนของเซลชนิดที่ 1

y = จำนวนของเซลชนิดที่ 2

n = จำนวนของสัตว์ที่ศึกษาทั้งหมด