# วิทยานิพนธ์

## ชีววิทยาการสืบพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง

## REPRODUCTIVE BIOLOGY FOR THAI MONOCLED COBRA *Naja kaouthia* LESSON, 1831 PROPAGATION IN CAPTIVITY

นางสาววรวิทู  มีสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

# ใบรับรองวิทยานิพนธ์

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

**ปริญญา**

| สัตววิทยา | สัตววิทยา |
|---|---|
| **สาขา** | **ภาควิชา** |

**เรื่อง** ชีววิทยาการสืบพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง

Reproductive Biology for Thai Monocled Cobra *Naja kaouthia* Lesson, 1831 Propagation in Captivity

**นามผู้วิจัย** นางสาววรวิฑู มีสุข

**ได้พิจารณาเห็นชอบโดย**

**ประธานกรรมการ** ..........

( รองศาสตราจารย์พนัส ธรรมกีรติวงศ์, ปร.ด. )

**กรรมการ** ..........

( รองศาสตราจารย์วิยะดา สีหบุตร, ปร.ด. )

**กรรมการ** ..........

( สัตวแพทย์หญิงลาวัณย์ จันทร์โฮม, สพ.บ. )

**หัวหน้าภาควิชา** ..........

( รองศาสตราจารย์สมภพ นวีภาพ, วท.ม. )

## บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

..........

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr. )

**คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย**

**วันที่**.......... **เดือน**.......... **พ.ศ.**..........

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

# ชีววิทยาการสืบพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง

# Reproductive Biology for Thai Monocled Cobra *Naja kaouthia* Lesson, 1831 Propagation in Captivity

โดย

นางสาววรวิทู มีสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. 2551

วรวิทู มีสุข 2551: ชีววิทยาการสืบพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์พนัส ธรรมกีรติวงศ์, ปร.ด. 54 หน้า

ประชากรงูเห่าไทยลดลงในถิ่นที่อยู่อาศัยธรรมชาติกระทบต่อระบบนิเวศ กอปรการแพทย์ต้องการงูเห่าไทยเพื่อรีดพิษทำเซรุ่ม นำไปสู่การการเพาะขยายพันธุ์งูเห่าไทยในกรงเลี้ยงในอนาคต ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยด้านชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของงูเห่าไทย ซึ่งมีการศึกษาวิจัยน้อยมากในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในนิเวศกรงเลี้ยง การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษามหกายวิภาค ระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ จุลกายวิภาคระบบสืบพันธุ์ และฮอร์โมนเพศของงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) เพศเมียและเพศผู้ในกรงเลี้ยงของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าสัณฐานวิทยาของรังไข่ของงูเห่าไทยเป็นรูปยาวรี ข้างขวาใหญ่กว่าและอยู่หน้ากว่าข้างซ้าย ภายในรังไข่มีฟอลลิเคิลเรียงเป็นแถวยาวและท่อนำไข่ทอดตัวยาวเป็นแนวเดียวกับรังไข่ไปเปิดที่ทวารร่วม มีไต 2 ข้าง ขนาดเท่ากันโดยข้างขวาอยู่หน้ากว่าข้างซ้าย และท่อไตเป็นท่อใสยาวทอดออกจากไตไปเปิดที่ทวารร่วม ภายในรังไข่ของงูเห่าไทยพบฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดง (previtellogenic follicle) และระยะสะสมไข่แดง (vitellogenic follicle) และคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) เฉพาะในรังไข่ที่เก็บศึกษาในเดือนพฤศจิกายน ไม่พบในเดือนพฤษภาคม ส่วนอัณฑะของงูเห่าไทยเป็นรูปยาวรี ข้างขวาใหญ่กว่าและอยู่หน้ากว่าข้างซ้ายเช่นกัน มีหลอดนำอสุจิต่อจากอัณฑะไปเปิดที่เฮมิเพนิส ไตและท่อไตของงูเห่าไทยเพศผู้เหมือนกันกับของเพศเมีย ภายในอัณฑะของงูเห่าไทยประกอบด้วยท่อเซมินิเฟอรัสมากมายซึ่งภายในท่อมีอสุจิระยะต่างๆ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์และเอพิดิไดมิสในงูเห่าไทยที่เก็บศึกษาในเดือนพฤษภาคมและเดือนพฤศจิกายน ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดออลของงูเห่าไทยเพศเมียสูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ส่วนระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนของงูเห่าไทยเพศผู้สูงในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน อย่างไรก็ตามงูเห่าไทยไม่แสดงพฤติกรรมการสืบพันธุ์ในกรงเลี้ยงจากการเฝ้าสังเกต

________________ ________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต | ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Worawitoo Meesook 2008: Reproductive Biology for Thai Monocled Cobra *Naja kaouthia* Lesson, 1831 Propagation in Captivity. Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Associate Professor Panas Tumkiratiwong, Ph.D. 54 pages.

As Thai monocled cobra is at high risk of various causes, especially human hunting and become threatened with extinction. Therefore, the Queen Saovabha Memorial Institute (QSMI), Thailand, initiated a captive breeding program to supply healthy snakes for venom and antivenom production. However, to be successful in their propagation, the reproductive biology of Thai monocled cobra maintained in captivity is basically required, namely gross anatomy of female and male urogenital systems, histology of ovaries and testes and monthly sex hormonal profiles of male total testosterone and female estradiol and also their reproductive behavior. All of the samples were collected at the Queen Saovabha Memorial Institute. It was found that ovaries were elongated with the right ovary larger and more anterior to the left one. A single array of follicles inside ovaries was demonstrated. Oviducts and ureters were open to a common cloaca. Testes were also elongated with the right testis larger and more anterior to the left one. The vas deferens was open to the hemipenis. Two stages of follicle development, previtellogenic follicles and vitellogenic follicles were recognized within their ovaries. Additionally, corpus luteums were found in ovaries collected in November but not in May. The atretic follicles were commonly appeared. Their testes were composed of seminiferous tubules. Various stages of spermatogenic development were processed seminiferous tubule. However, no difference in the process of spermatogenic development between May and November was found. Female Thai monocled cobra had two kidneys with the right kidney more anterior to the left one, the same as that of the male. Female estradiol concentration was surged in between October-November while as male total testosterone level was peaked in between August-September, one to two months prior to male maximal levels. However, no data on their reproductive behaviors observed in captivity was available and also no natural Thai monocled cobra was available to be compared to captive Thai monocled cobra.

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรศ.ดร.พนัส ธรรมกีรติวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือและแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ พร้อมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระหว่างทำการศึกษาวิจัยและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรศ.ดร.วิยะดา สีหบุตร กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก สพ.ญ.ลาวัณย์ จันทร์โฮม กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง และ ศ.ดร.ชาญวิทย์ วัชรพุกก์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างงูเห่าไทย และสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบพระคุณน.สพ.มนตรี เชี่ยวบำรุงเกียรติ น.สพ.ทักษะ เวสารัชชพงศ์ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ นายสันต์คร พุ่มสิริ และนายวินิจ เพียรอุสาหะ เจ้าหน้าที่สวนงูที่ช่วยให้การทดลองเป็นไปได้อย่างราบรื่น และผศ.ดร.สพ.ญ.อุไร พงศ์ชัยฤกษ์ อาจารย์ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ ที่ช่วยให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับเนื้อเยื่อวิทยาของงูเห่าไทย

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบเป็นกตเวทิตาแด่บิดา มารดา และคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

วรวิทู มีสุข

กันยายน 2551

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 12 |
| อุปกรณ์ | 12 |
| วิธีการ | 13 |
| ผลและวิจารณ์ | 15 |
| ผล | 15 |
| วิจารณ์ | 28 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 31 |
| สรุป | 31 |
| ข้อเสนอแนะ | 31 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 32 |
| ภาคผนวก | 37 |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน | 54 |

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

1 ช่วงเวลาในการผสมพันธุ์ วางไข่ และไข่ฟักของงูพิษชนิดต่างๆ 11

# สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศเมีย | 15 |
| 2 | แสดงระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศผู้ | 16 |
| 3 | เฮมิเพนิสของงูเห่าไทย | 17 |
| 4 | แสดงท่อเลือด ท่อน้ำเหลืองบริเวณรังไข่ | 18 |
| 5 | ฟอลลิเคิลของงูเห่าไทย 2 ชนิด | 18 |
| 6 | เปรียบเทียบขนาดของฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดงและระยะสะสมไข่แดง | 19 |
| 7 | แสดงส่วนประกอบของฟอลลิเคิล | 19 |
| 8 | แสดงเซลล์แกรนูโลซา 3 ชนิด | 20 |
| 9 | คอร์ปัสลูเตียม | 20 |
| 10 | แสดงภาพตัดขวางอัณฑะ | 21 |
| 11 | แสดงการเจริญของเซลล์อสุจิ ภายในท่อเซมินิเฟอรัส | 22 |
| 12 | แสดงกลุ่มท่อดัคตัสเอฟเฟอเรน | 23 |
| 13 | แสดงเอพิดิไดมิส | 24 |
| 14 | ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดออล ($\bar{x} \pm$ S.E.) ของงูเห่าเพศเมียในกรงเลี้ยงรอบปี | 26 |
| 15 | ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ($\bar{x} \pm$ S.E.) ของงูเห่าเพศผู้ในกรงเลี้ยงรอบปี | 27 |

**ภาพผนวกที่**

| ภาพผนวกที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ข1 | แสดงวิธีการเจาะเลือดงู | 44 |
| ข2 | แสดงเลือดงูที่แยกชั้นจากการปั่นเหวี่ยง | 45 |
| ข3 | พลาสมางูเห่าไทย | 45 |
| ค1 | การดูดพลาสมาด้วยไมโครปิเป็ต | 47 |
| ค2 | การเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน | 47 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพผนวกที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ง1 | ใช้ไมโครปิเป็ตดูดพลาสมาใส่หลอดทดลอง | 49 |
| ง2 | เป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน | 49 |
| จ1 | เครื่องวัดรังสีแกมมา | 51 |
| ฉ1 | ชุดทดสอบฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน | 53 |

# ชีววิทยาการสืบพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง

## Reproductive Biology for Thai Monocled Cobra *Naja kaouthia* Lesson, 1831 Propagation in Captivity

## คำนำ

งูเป็นกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่มีทั้งคุณค่า และมีโทษต่อมนุษย์โดยเฉพาะงูพิษจำพวกพิษอันตรายและพิษอ่อน อย่างไรก็ตามประชากรของงูพิษน้อยกว่าประชากรของงูไม่มีพิษ (วิโรจน์และบุญเยือน, 2525) มนุษย์ใช้ประโยชน์ทางตรงจากงูได้แก่ เนื้อ หนัง กระดูกและเครื่องใน เป็นต้น ส่วนประโยชน์ทางอ้อมเป็นการควบคุมประชากรของหนูศัตรูพืช และหนูพาหะนำโรค (สุขใจ, 2534) ในทางการแพทย์ งูเห่าซึ่งเป็นงูพิษชนิดหนึ่งที่นำมารีดพิษงูเพื่อการผลิตเซรุ่ม นอกจากนั้นมีรายงานว่าพิษงูเห่าสามารถลดความเจ็บปวดเรื้อรังจากโรคไขข้ออักเสบ (Deoras, 1965) ปัจจุบันมนุษย์นิยมจับงูเห่าขายและส่งออกต่างประเทศ ส่งผลให้จำนวนประชากรงูเห่าลดลงจากถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและใกล้สูญพันธุ์จากธรรมชาติของประเทศไทย สถานเสาวภา สภากาชาดไทยจึงริเริ่มโครงการนำงูเห่าไทยมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงเพื่อทำการรีดพิษสำหรับใช้ในการผลิตเซรุ่ม กระตุ้นให้กลุ่มนักวิจัยทำการศึกษาวิจัยมากมายเกี่ยวกับชีววิทยาของงูเห่า เป็นต้นว่า Salakij *et al.* (2002) ศึกษาเปรียบเทียบโลหิตวิทยาในงูเห่า 3 ชนิด คือ งูเห่าไทย งูเห่าพ่นพิษสยาม และงูเห่าทองพ่นพิษ Chanhome *et al.* (2001) ศึกษาการเพาะเลี้ยงงูพิษในประเทศไทย ได้แก่งูเห่าไทย งูเห่าพ่นพิษสยาม งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูทับสมิงคลา งูกะปะ และงูแมวเซา ณัฏฐิณี (2544) ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของอะโปไลโปรตีนชนิดอีของสัตว์เลื้อยคลาน 4 ชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ จระเข้น้ำจืด จระเข้น้ำเค็ม งูเห่าไทย และแย้ ประทานพร (2538) ศึกษาผลของพิษงูเห่าและส่วนสกัดที่เป็นพิษต่อการทำงานหัวใจและไตในสุนัขที่สลบ และวรรณา (2534) ศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการวิจัยด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยในกรงเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์มีการศึกษากันน้อยมาก ซึ่งเป็นศาสตร์ที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเพาะเลี้ยงงูเห่าไทยในอนาคต เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์งูเห่าที่กำลังถูกคุกคามจนใกล้สูญพันธุ์จากธรรมชาติ การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษา กายวิภาคศาสตร์ระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศเมียและเพศผู้ จุลกายวิภาคของรังไข่และอัณฑะของงูเห่าไทย นอกจากนั้นการประสบความสำเร็จส่วนหนึ่งควรใช้วิทยาต่อมไร้ท่อตรวจสอบความแปรปรวนของฮอร์โมนควบคุมพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของงูเห่าไทย แม้ไม่มีงูเห่าไทยจากแหล่งธรรมชาติไว้ศึกษา

เปรียบเทียบก็ตาม นิเวศกรงเลี้ยงจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาวิจัยวงรอบการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนการสืบพันธุ์ในรอบปีของงูเห่าไทย

# วัตถุประสงค์

1. ศึกษากายวิภาคศาสตร์ระบบขับถ่ายสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศเมียและเพศผู้
2. ศึกษาเปรียบเทียบจุลกายวิภาคศาสตร์รังไข่และอัณฑะของงูเห่าไทย
3. ศึกษารอบปีของฮอร์โมนเอสตราไดออลในงูเห่าไทยเพศเมีย
4. ศึกษารอบปีของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในงูเห่าไทยเพศผู้

# การตรวจเอกสาร

## 1. ชีววิทยาของงูเห่าไทย

### 1.1 อนุกรมวิธาน

งูเห่าไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Naja kaouthia* Lesson, 1831 มีชื่อสามัญว่า Monocled cobra งูเห่าหม้อ Lesson (1831) ได้จัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Chordata

Class Reptilia

Order Squamata

Suborder Serpentes

Family Elapidae

Genus *Naja* Laurenti, 1768

Species *Naja kaouthia* Lesson, 1831

### 1.2 ลักษณะทั่วไปของงูเห่าไทย

#### 1.2.1 รูปร่าง

งูมีลำตัวยาว โค้งงอได้ ส่วนหัว อก ท้อง และหางไม่แตกต่างกัน แบ่งแยกโดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ลำตัวเป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุด ลักษณะเป็นทรงกระบอกตัน มีสันเล็กน้อยด้านข้างลำตัว เป็นรอยต่อระหว่างลำตัวด้านบนและด้านล่าง ส่วนหางเริ่มจากรูเปิดทวารร่วม (cloacal opening) ไปจนสุด งูเห่าไทยเป็นงูพิษขนาดกลาง ค่อนข้างใหญ่ ตัวโตเต็มที่ยาวประมาณ 1-1.8 เมตร (ไพบูลย์, 2547) งูเห่าไทยเพศผู้มักมีขนาดหัวใหญ่กว่า และมีหางยาวกว่าเพศเมีย (Shine *et al*., 2007)

1.2.2 สีผิวหนัง ลักษณะผิวหนัง

งูมีเกล็ดปกคลุมตัวเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ และอันตรายจากการเสียดสี เมื่อเคลื่อนที่โดยการเลื้อย งูมีการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต เกล็ดด้านท้องของลำตัวมีขนาดใหญ่เรียงตัวแถวเดียวตั้งแต่ลำคอถึงรูเปิดทวารร่วม เกล็ดด้านท้องของหางเรียงตัวเป็นสองแถว งูเห่าไทยมีความแปรผันของสีตัวค่อนข้างสูง แต่ส่วนใหญ่มักมีสีน้ำตาล น้ำตาลอ่อน น้ำตาลดำ สีออกเหลือง หรือสีนวล (ไพบูลย์, 2547) เมื่อแผ่แม่เบี้ย จะเห็นลายดอกจัน (hood mark) เป็น รูปวงแหวนเดี่ยว (monocellate) ด้านหลังของส่วนคอ (Slowinski and Wüster, 2000)

1.2.3 อวัยวะรับสัมผัส

ตาของงูไม่มีรอยบุ๋ม (fovea) จึงมองเห็นภาพไม่ชัดเจนโดยเฉพาะวัตถุที่ไม่เคลื่อนไหว งูในธรรมชาติจึงกินเฉพาะเหยื่อที่มีชีวิตเท่านั้น งูไม่มีหูชั้นนอก และหูชั้นกลาง แต่มีหูชั้นใน งูรับเสียงจากแรงสั่นสะเทือนจากพื้นผ่านทางกระดูกขากรรไกรล่างและกระดูกต่างๆ ส่งไปยังหูชั้นในแล้วส่งต่อไปยังสมอง อวัยวะจาคอบสันส์ (Jacobson’s organ) เป็นอวัยวะที่ใช้ในการรับกลิ่น โดยงูแลบลิ้นรับสัมผัสอากาศที่มีกลิ่นกระจายอยู่แล้วหดลิ้นกลับมาแตะกับอวัยวะจาคอบสันส์ที่บริเวณเพดานปากซึ่งเชื่อมต่อกับประสาทรับกลิ่น (olfactory nerve) และส่งกระแสประสาทต่อไปยังสมองเพื่อแปลความหมายของกลิ่น งูเห่าไม่มีพิท (pit organ) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้สำหรับตรวจสอบรังสีอินฟราเรด (infrared) ทำให้งูสามารถหากินในเวลากลางคืนและล่าสัตว์เลือดอุ่นได้ดี เพราะเวลากลางคืนอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมลดต่ำลงในขณะที่อุณหภูมิร่างกายของสัตว์เลือดอุ่นยังคงที่อยู่ งูจึงค้นหาตำแหน่งเหยื่อได้

1.2.4 ระบบพิษงู

ส่วนประกอบของระบบพิษงู (ไพบูลย์, 2547) ที่สำคัญมีดังนี้

1. ต่อมพิษ (venom gland) เป็นต่อมสร้างน้ำพิษพบในงูพิษวงศ์อีลาพิดี (Elapidae) และไวเพอริดี (Viperidae) ต่อมพิษจะพัฒนาจนมีขนาดใหญ่ ตำแหน่งของต่อมพิษอยู่

หลังลูกตาทั้งสองข้างในตำแหน่งที่เทียบได้กับกระพุ้งแก้ม บนต่อมพิษมีกล้ามเนื้อที่ใช้ควบคุมการหลั่งน้ำพิษ โดยการหดตัวของกล้ามเนื้อให้ต่อมพิษบีบตัวและหลั่งน้ำพิษออกมา

2. ท่อนำน้ำพิษ (venom duct) เป็นท่อเชื่อมระหว่างต่อมพิษและโคนของเขี้ยวพิษ เพื่อลำเลียงน้ำพิษจากต่อมพิษไปสู่เขี้ยวพิษ

3. เขี้ยวพิษ (venom fangs) ใช้ฉีดพิษเข้าสู่ตัวเหยื่อ เขี้ยวพิษที่แหลมคมใช้เจาะเข้าไปในตัวเหยื่อ เขี้ยวพิษอยู่ที่ขากรรไกรบนข้างละ 1 ซี่ แต่มีเขี้ยวพิษสำรองหลายชุดอยู่ในเหงือก เมื่อเขี้ยวพิษจริงหักไปเขี้ยวพิษสำรองจะทำหน้าที่แทน งูเห่าจัดเป็นงูเขี้ยวพิษสั้น (proteroglyph) งูที่มีเขี้ยวพิษประเภทนี้มีพิษรุนแรง เขี้ยวพิษยึดติดกับขากรรไกรบนและมีร่องตามยาวอยู่ด้านหน้าของเขี้ยวสำหรับให้น้ำพิษไหลผ่าน งูที่มีเขี้ยวพิษสั้นในประเทศไทย ได้แก่งูในวงศ์อีลาพิดี เช่น งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูทับสมิงคลา และงูทะเลชนิดต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้งูยังมีการจัดเรียงตัวของฟันและเขี้ยวพิษแบบอื่นๆ ได้แก่

งูเขี้ยวพิษยาว (solenoglyph) งูเขี้ยวพิษประเภทนี้มีพิษรุนแรง เขี้ยวพิษอยู่ด้านหน้าของขากรรไกรบน พับเก็บหรือกางออกได้และมีเยื่อหุ้มเขี้ยว เขี้ยวมีช่องกลวงภายในให้น้ำพิษไหลผ่าน เขี้ยวพิษประเภทนี้เป็นเขี้ยวพิษที่มีการพัฒนามากที่สุด ในประเทศไทยงูที่มีเขี้ยวพิษประเภทนี้พบในงูวงศ์ไวเพอริดี เช่น งูแมวเซา งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้ชนิดต่างๆ เป็นต้น

งูเขี้ยวพิษหลัง (opistoglyph) งูเขี้ยวพิษหลังบางชนิดมีร่องบนเขี้ยวเพื่อให้น้ำพิษไหลผ่าน แต่บางชนิดเขี้ยวไม่มีร่อง มนุษย์ที่ถูกงูเขี้ยวพิษประเภทนี้กัดโดยเฉพาะงูที่พบในประเทศไทยมักไม่เป็นอันตรายถึงชีวิต แต่ทำให้เกิดอาการบวม แดง ปวดบาดแผล ยกเว้นในบางชนิดที่อาจมีอาการรุนแรง เช่น งูลายสาบคอแดง งูต้องไฟ งูม่านทอง เป็นต้น

งูไม่มีเขี้ยวพิษ (aglyph) เป็นงูที่มีฟันซี่เล็กขนาดใกล้เคียงกัน เรียงต่อกันเป็นจำนวนมาก ใช้ยึดและช่วยกลืนเหยื่อ เช่น งูเหลือม งูหลาม เป็นต้น

4. น้ำพิษ (venom) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนและไม่ใช่โปรตีน ส่วนที่เป็นโปรตีนมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำพิษ ส่วนโปรตีนแบ่งย่อยเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นพิษ (toxin) และส่วนที่เป็นเอนไซม์ (enzyme) ในประเทศไทยมีรายงานการพบงูจำนวน 163 ชนิด

ในจำนวนนี้มีงูพิษอันตรายอยู่ 48 ชนิด จาก 2 วงศ์ คือ วงศ์อีลาพีดี และวงศ์ไวเพอริดี (ไพบูลย์, 2547)

## 2. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของงูเห่า

อัณฑะ (testes) อยู่ภายในช่องท้องบริเวณเหนือไต และติดกับต่อมหมวกไต อัณฑะข้างขวายาวกว่าและอยู่ในระดับสูง (anterior) กว่าข้างซ้าย ขนาดอัณฑะของงูขึ้นอยู่กับกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) อัณฑะงูที่จำศีลมีขนาดใหญ่ที่สุดช่วงออกจำศีล (ฤดูใบไม้ผลิ) (Jacobson, 2007) ตัวอสุจิเคลื่อนที่จากเซมินิเฟอรัสไปยังดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ เอพิดิไดมิส และหลอดนำอสุจิ เซลล์ที่บุเอพิดิไดมิสเป็นเซลล์ที่มีขน (ciliated cells) (Jacobson, 2007) ตัวอสุจิ (spermatozoa) ของงูประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง รูปร่างและขนาดของตัวอสุจิของงูแต่ละชนิดแตกต่างกัน แต่รูปร่างเป็นรูปทวนเหมือนกัน ส่วนหัวมีนิวเคลียส (nucleus) ส่วนปลายหัวมีอโครโซม (acrosome) หุ้มทำให้ตัวอสุจิสามารถผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ ส่วนกลางมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ การโบกหางทำให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ (Zug, 1993) กระบวนการสร้างอสุจิเป็นผลมาจากฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน (Withers, 1992) เริ่มโดยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอสุจิ (spermatogonium) เจริญเป็นเซลล์อสุจิปฐมภูมิ (primary spermatocyte) ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ต่อจากนั้นมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I (meiosis I) ได้เซลล์อสุจิทุติยภูมิ (secondary spermatocyte) และแบ่งไมโอซิส II (meiosis II) ได้สเปอร์มาติด (spermatid) แล้วมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) เป็นตัวอสุจิ (sperm) ระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในเลือดงูกาเตอร์เพิ่มขึ้นในช่วงที่มีกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Edwards and Jones, 2001) คือเดือนกันยายน ส่วนฤดูสืบพันธุ์ของงูการ์เตอร์อยู่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม (Moore *et al.*, 2000)

การสร้างไข่เกิดขึ้นโดยเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ไข่ (oogonium) เจริญเป็นเซลล์ไข่ปฐมภูมิ (primary oocyte) เซลล์ไข่ปฐมภูมิแต่ละเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิล (follicular cell) ได้เป็นฟอลลิเคิลปฐมภูมิ (primary follicle) เซลล์ฟอลลิเคิลสร้างหลายชั้นกลายเป็นฟอลลิเคิลทุติยภูมิ (secondary follicle) ต่อมาเซลล์ไข่ปฐมภูมิภายในฟอลลิเคิล แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 ได้เซลล์ไข่ทุติยภูมิ (secondary oocyte) ที่มีสารอาหารในเซลล์และมีเซลล์ขั้ว (polar body) เกิดขึ้นเซลล์ไข่ปฐมภูมิเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส II และหยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส II (metaphase II)

จากนั้นเกิดการตกไข่ (ovulation) เข้าไปในท่อนำไข่ เมื่อเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส II ต่อจนสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ (Zug, 1993)

การปฏิสนธิเกิดขึ้นที่อินฟันดิบูลัม (infundibulum) เมื่อไข่ เคลื่อนเข้ามาในท่อนำไข่ ก่อนที่จะมีการสร้างเปลือกไข่ (egg shell) (Pough *et al*., 2004) และงูไม่มีมดลูก (Mader, 1996)

ในงูเพศผู้ ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน (Follicle-stimulating hormone; FSH) กระตุ้นให้หลอดสร้างอสุจิเจริญและสร้างอสุจิ ส่วนลูทิไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone; LH) กระตุ้นเซลล์ลัยดิก (Leydig cell) ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) ให้เจริญและสร้างฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน (testosterone) (อาจ, 2521) Shine (1977) ทำการศึกษาระบบสืบพันธุ์ของงูเพศผู้ในวงศ์อีลาพิดีในประเทศออสเตรเลีย พบว่าน้ำหนักของอัณฑะมีความสัมพันธ์กับปริมาณอสุจิในงูที่ออกลูกเป็นตัว 6 ชนิด คือ *Austrelaps superbus, Hemiaspis daemelii, H. signata, Notechis scutatus, Pseudechis porphyriacus* และ *Unechis gouldii* และงูที่ออกไข่ 2 ชนิด คือ *Pseudonaja nuchalis* และ *P. textilis* ซึ่งงูทั้ง 8 ชนิดที่ทำการศึกษาอยู่ในวงศ์อีลาพิดี ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับงูเห่า และงูจงอางที่พบในประเทศไทย

ไข่ถูกจัดเป็น 2 ระยะ คือระยะก่อนสะสมไข่แดง ไข่ขนาดเล็กมีสีขาว และระยะสะสมไข่แดง ไข่ขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเหลือง (Jocobson, 2007) ฟอลลิเคิลติมูเลทิงฮอร์โมน จากฮัยโปธาลามัส (hypothalamus) กระตุ้นให้ฟอลลิเคิลเจริญและสร้างเอสตราไดออล เอสตราไดออลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte) และทำให้มีการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) (Withers, 1992) เมื่อไข่สุก ลูทีไนซิงฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (นทีทิพย์, 2538) ฟอลลิเคิลซึ่งเปลี่ยนแปลงเป็นคอร์ปัสลูเตียม (corpus luteum) (Edwards and Jones, 2001) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (progesterone) (Ragsdale *et al*., 1993) โพรเจสเทอโรนมีหน้าที่ทำให้ผนังท่อนำไข่หนาตัวพร้อมสำหรับการตั้งท้อง (อาจ, 2521) ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในพลาสมาจะอยู่ในระดับปรกติจนกระทั่งเริ่มมีการตั้งครรภ์ (Edwards and Jones, 2001)

ก่อนเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ งูเพศเมียสะสมไขมันจำนวนมากสำหรับสร้างพลังงานที่จะใช้ในการสืบพันธุ์ ต่างจากงูเพศผู้ที่ใช้พลังงานเพื่อสร้างตัวอสุจิ (Aubret *et al*., 2002) เมื่อถึง ฤดูผสมพันธุ์แล้ว งูเพศเมียปล่อยฟีโรโมน (pheromone) ตามทางที่เลื้อยผ่านไป งูเพศผู้รับรู้ถึงฟีโรโมนที่งูเพศเมียปล่อยไว้ จะเลื้อยตามหางูเพศเมีย เมื่อพบกัน งูจะแสดงพฤติกรรมเกี้ยวพาราสี โดยงูเพศผู้

เลื้อยไปอยู่บนลำตัวของงูเพศเมีย (Parker, 1977) ใช้คางถูด้านหลังคองูเพศเมีย เพื่อกระตุ้นให้งูเพศเมียยอมรับการผสมพันธุ์ ในงูบางชนิดพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีช่วยกระตุ้นการตกไข่ ระดับเทสทอสเทอโรนมีผลต่อการเกิดพฤติกรรมเกี้ยวพาราสี (Aubret *et al.*, 2002) Parker (1977) กล่าวว่าการเกี้ยวพาราสีในงูสกุลบอ (*Boa*) และไพธอน (*Python*) จะแสดงพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นงูเพศผู้ใช้ติ่งขาหลังถูงูเพศเมียเป็นการกระตุ้นการตอบสนองของงูเพศเมีย เมื่องูเพศเมียยอมรับการผสมพันธุ์จะยกหางขึ้น งูเพศผู้ใช้หางพันหางงูเพศเมียแล้วใช้ช่องเปิดทวารร่วมแตะกัน โดยงูเพศผู้ใช้อวัยวะที่เรียกว่าเฮมิเพนิสข้างหนึ่งสอดเข้าในทวารร่วมของงูเพศเมีย Pope (1956) กล่าวว่าการเลือกสอดเฮมิเพนิสข้างใดนั้นขึ้นกับว่าข้างใดอยู่ใกล้เพศเมียมากกว่า และเฮมิเพนิสของงูแต่ละชนิดมีรูปร่างแตกต่างกัน (ไพบูลย์, 2547)

งูส่วนใหญ่ผสมพันธุ์ปีละครั้ง บางชนิดผสมพันธุ์ในฤดูใบไม้ผลิ บางชนิดผสมพันธุ์ปลายฤดูร้อนหรือฤดูใบไม้ร่วง งูเพศเมียอาจผสมพันธุ์หลายครั้งกับงูเพศผู้ตัวเดิมหรือหลายตัว พฤติกรรมเช่นนี้ทำให้งูเพศเมียสามารถเก็บตัวอสุจิได้เพียงพอสำหรับปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ และทำให้ลูกงูมีความหลากหลายของยีนสูง งูบางชนิดไม่สามารถผลิตลูกได้ทุกปีเพราะมีพลังงานที่ใช้ในการสืบพันธุ์จำกัด งูเพศเมียที่ออกลูกเป็นตัว (viviparous snake) ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีตัวอ่อนเจริญอยู่ในท่อนำไข่ไม่กินอาหารแต่ใช้พลังงานจากไขมันและแหล่งพลังงานอื่นๆ ที่สะสมไว้ก่อนหน้าจนกระทั่งตกลูกออกมาจึงจะกินอาหารอีกครั้ง หากลูกงูเกิดในช่วงปลายฤดูร้อนหรือฤดูใบไม้ร่วงงูเพศเมียซึ่งซูบผอมจะมีเวลาเพียงเล็กน้อยเพื่อสะสมอาหารก่อนการจำศีล (hibernation) และอาจต้องใช้เวลา 1 ปีหรือมากกว่าเพื่อสะสมพลังงานให้เพียงพอก่อนเข้าสู่วงรอบการสืบพันธุ์ครั้งต่อไป งูเพศเมียบางชนิดไม่เข้าสู่ฤดูสืบพันธุ์ในปีที่ให้กำเนิดลูก ปกติงูเพศเมียสามารถเก็บอสุจิที่ได้รับจากการผสมพันธุ์กับงูเพศผู้โดยเก็บไว้ในเซมินัลรีเซพตาเคิล(seminal receptacle) ซึ่งอยู่ในผนังของท่อนำไข่ได้เป็นเวลาหลายปี เช่น งูอินดิโก (Indigo snake; *Drymarchon corais*) งูเพศเมียในกรงเลี้ยงวางไข่หลังการผสมพันธุ์ผ่านไป 4 ปี และไข่ยังได้รับการปฏิสนธิด้วย นอกจากนี้ งูดินธรรมดา (brahminy blind snake; *Ramphotyphlops braminus*) สามารถสืบพันธุ์โดยไม่ต้องได้รับการผสมพันธุ์จากงูเพศผู้ ซึ่งให้ลูกเพศเมียที่มีสารพันธุกรรมเหมือนแม่ทุกประการ กระบวนการนี้เกิดจากการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) (Ernst and Zug, 1996)

ไข่งูมีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของตัวอ่อน โดยได้รับความชื้นและออกซิเจนโดยการแพร่ผ่านทางเปลือกไข่ ในงูที่วางไข่ ไข่ใช้เวลาฟักอยู่ภายนอกตัวแม่นาน โดยได้รับการปกป้องจากเปลือกไข่ งูวางไข่ในโพรงตื้นๆ และคลุมด้วยดินบางๆ นอกจากนี้ดินยังช่วย

ป้องกันความร้อนจากแสงอาทิตย์โดยตรงและช่วยควบคุมอุณหภูมิภายในรังจากอุณหภูมิที่ลดต่ำลงในเวลากลางคืน การเลือกสถานที่ทำรังเป็นสิ่งสำคัญมากเพราะมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนโดยขึ้นกับอุณหภูมิภายในรัง งูหลายตัวอาจเลือกสถานที่เดียวกันเพื่อวางไข่ อาจพบไข่งูหลายร้อยฟองในสถานที่เดียวกัน ไข่งูในเขตหนาวมีอัตราการฟักต่ำจึงพบการแพร่กระจายของการวางไข่น้อย (Mader, 1996)

ไข่แดง (yolk) เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ขณะที่ตัวอ่อนพัฒนาใกล้สมบูรณ์ถุงไข่แดงจะถูกดึงเข้าไปในช่องตัว ตัวอ่อนของงูกลุ่มที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous) มีฟันเจาะเปลือกไข่ (egg teeth) ฟันงอกมาจากเหงือกที่กระดูกขากรรไกรบน (premaxilla) ซึ่งอยู่ที่ปลายปากบนมีลักษณะคล้ายมีดโกน ส่วนงูกลุ่มที่ออกลูกเป็นตัว ฟันเจาะเปลือกไข่ไม่มีความจำเป็นและเป็นอันตรายต่อตัวแม่ แต่จะปรับตัวให้โค้งลงไปข้างหลัง และไม่ได้ทำหน้าที่ใดเลย (Parker, 1977) เอสโทรเจน ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของลูกงูเพศเมีย การที่ลูกงูเพศผู้มีเอสโทรเจนและเทสทอสเทอโรนอยู่ในระดับปกติทำให้ลูกงูเจริญเติบโตมากที่สุด (Lerner and Mason, 2001) งูเพศเมียที่วางไข่ ไข่ที่ออกมาเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 4-6 สัปดาห์ หลังวางไข่แม่งูสามารถกินอาหารได้อีกครั้ง และในทางกลับกันงูที่ออกลูกเป็นตัวต้องแบกน้ำหนักของลูก ทำให้งูไม่สามารถกินอาหารได้มากเป็นเวลา 2-3 เดือนก่อนตกลูก แม่งูสูญเสียพลังงานที่สะสมไว้ การเข้าสู่การสืบพันธุ์ครั้งต่อไปอาจใช้เวลา 1 ปี หรือมากกว่า (Ernst and Zug, 1996) งูแต่ละชนิดมีช่วงเวลาในการผสมพันธุ์ วางไข่ และไข่ฟักแตกต่างกันไป (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ช่วงเวลาในการผสมพันธุ์ วางไข่ และไข่ฟักของงูพิษชนิดต่างๆ

| **ชนิด** \ **เดือน** | **ม.ค.** | **ก.พ.** | **มี.ค.** | **เม.ย.** | **พ.ค.** | **มิ.ย.** | **ก.ค.** | **ส.ค.** | **ก.ย.** | **ต.ค.** | **พ.ย.** | **ธ.ค.** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| งูจงอาง | ≡ | ≡ | ≡ | | | | | | | | | |
| (*Ophiophagus hannah*) | | | ▓ | ▓ | ▓ | | | | | | | |
| | | | | | | | ░ | | | | | |
| งูเห่าไทย | ≡ | | | | | | | | | | ≡ | ≡ |
| (*Naja kaouthia*) | ▓ | ▓ | ▓ | | | | | | | | | ▓ |
| | | ░ | ░ | ░ | ░ | | | | | | | |
| งูเห่าพ่นพิษสยาม | | | | ≡ | ≡ | | | | | | | |
| (*Naja siamensis*) | | | | | | ▓ | ▓ | | | | | |
| | | | | | | | | ░ | ░ | ░ | | |
| งูสามเหลี่ยม | ≡ | | | | | | | | | | | |
| (*Bungarus fasciatus*) | | | ▓ | | | | | | | | | |
| | | | | | ░ | | | | | | | |
| งูกะปะ | | | | ≡ | ≡ | | | | | | | |
| (*Calloselasma rhodostoma*) | | | | | | ▓ | ▓ | | | | | |
| | | | | | | | | ░ | | | | |

| | |
|---|---|
| ≡ | ช่วงผสมพันธุ์ |
| ▓ | ช่วงวางไข่ |
| ░ | ช่วงฟักออกจากไข่ |

**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Chanhome *et al*., (2001)

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาขนาด 21 ยาว 1 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 3 มิลลิลิตร
3. เอพเพนดรอฟ (eppendorf)
4. เฮปพาริน (heparin)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
6. ไมโครปิเปต (micropipet)
7. หลอดโพลิโพรไพลีนขนาด 12x75 มิลลิลิตร
8. ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
9. ไดเอธิลอีเธอร์ (diethyl ether)
10. กาซไนโตรเจน
11. ชุดทดสอบฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน
12. ชุดทดสอบฮอร์โมนเอสตราไดออล
13. เวอร์เทคมิกซ์
14. เครื่องมือผ่าตัด
15. ถาดพาราฟิน
16. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
17. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome)
18. อ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath)
19. ภาชนะสำหรับย้อมสี (jar)
20. สีฮีมาทอกซิลิน (haematoxilin)
21. สีอีโอซิน (eosin)

# วิธีการ

## 1. การศึกษาระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ (urogenital system)

การศึกษาระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ ใช้งูเห่าไทยจากสถานเสาวภาผ่าตลอดความยาวลำตัวด้านท้อง กำจัดไขมันที่ปกคลุมอยู่ออก ศึกษาระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ของงูเห่าไทย บันทึกภาพเพื่อวาดภาพลายเส้นแสดงรายละเอียดระบบขับถ่ายสืบพันธุ์

## 2. การตัดเนื้อเยื่อ (histological study)

ศึกษาเปรียบเทียบต่อมบ่งเพศ (gonads) ของงูเห่าไทยเพศผู้และเพศเมีย ตัวอย่างงูเห่าไทยจากสถานเสาวภา ใช้ต่อมบ่งเพศของงูเห่าไทยในเดือนพฤศจิกายน (เป็นตัวแทนต่อมบ่งเพศช่วงฤดูสืบพันธุ์) และใช้ต่อมบ่งเพศของงูเห่าไทยในเดือนพฤษภาคม (เป็นตัวแทนต่อมบ่งเพศนอกช่วงฤดูสืบพันธุ์) (Chanhome *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ก)

## 3. การวิเคราะห์ฮอร์โมนในเลือด (radio immunoassay)

1. เก็บเลือดงูเห่าไทยของสถานเสาวภาโดยเจาะหลอดเลือดดำบริเวณหาง (ventral caudal vein) จำนวน 16 ตัว (ตัวผู้ 8 ตัว และตัวเมีย 8 ตัว) เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนธันวาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน สารป้องกันเลือดแข็งตัวคือเฮปพาริน (ภาคผนวก ข)
2. ปั่นเหวี่ยงเลือดด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกส่วนพลาสมา (plasma) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ฮอร์โมน
3. นำพลาสมาของงูเห่าไทยเพศเมียสกัดฮอร์โมนเอสตราไดออล (ภาคผนวก ค)
4. นำพลาสมางูเห่าไทยเพศผู้สกัดฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน (ภาคผนวก ง)
5. วิเคราะห์ฮอร์โมนเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (radioimmunoassay) (ภาคผนวก จ)
6. วิเคราะห์ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (radioimmunoassay) (ภาคผนวก ฉ)

**4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analyses)**

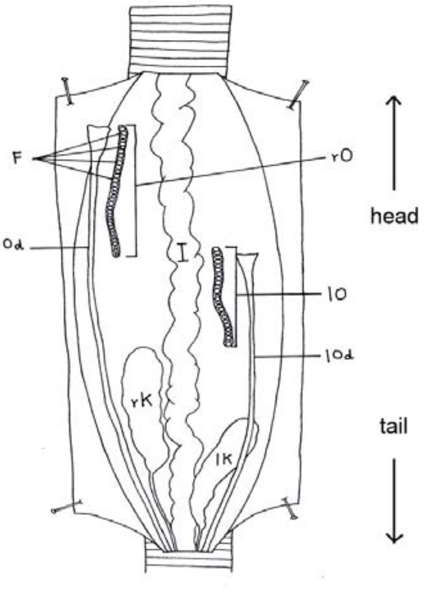
ข้อมูลทั้งหมดแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $\overline{X} \pm$ S.E.) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA; analysis of Variance) ของข้อมูลด้วยวิธี Kruskal-Wallis H test ที่ $P < 0.05$ และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่ากลาง (median) ของแต่ละคู่กลุ่มข้อมูลด้วยวิธี Mann-Whitney U test ที่ $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 16

# ผลและวิจารณ์

## ผล

### 1. มหกายวิภาคระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ (urogenital system) ของงูเห่าไทยเพศเมีย

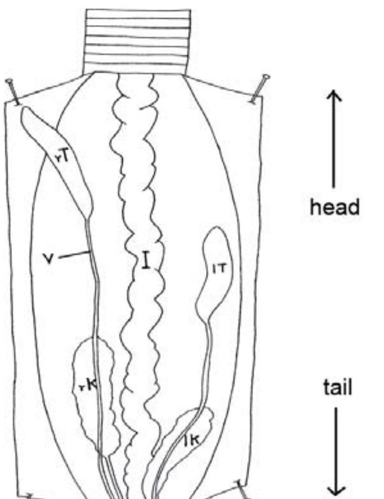
ระบบสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศเมียประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ท่อนำไข่ (oviduct) และทวารร่วม (cloaca) รังไข่สองข้างมีลักษณะเป็นถุงยาวรีสีขาวอยู่เหนือไตโดยรังไข่ข้างขวาอยู่หน้า (anterior) กว่าและยาวมากกว่าข้างซ้าย และฟอลลิเคิล (follicles) มองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วนท่อนำไข่เป็นท่อยาวไปเปิดออกที่รูสืบพันธุ์ (genital pore) อยู่ตรงปลายของปุ่มสืบพันธุ์ (genital papilla) ตรงบริเวณทวารร่วม ส่วนระบบขับถ่ายของงูเห่าไทยเพศเมียประกอบด้วยไต 2 ข้าง ท่อไต และทวารร่วม ไตงูเห่าไทยสีน้ำตาลคล้ำโดยไตข้างขวาวางตัวอยู่ในแนวด้านหน้ากว่าไตข้างซ้ายและไปเปิดออกที่ทวารร่วมตรงปุ่มขับถ่าย (urinary papilla) บริเวณยูโรโพเดียม (uropodeum) ของทวารร่วม(ภาพที่ 1)



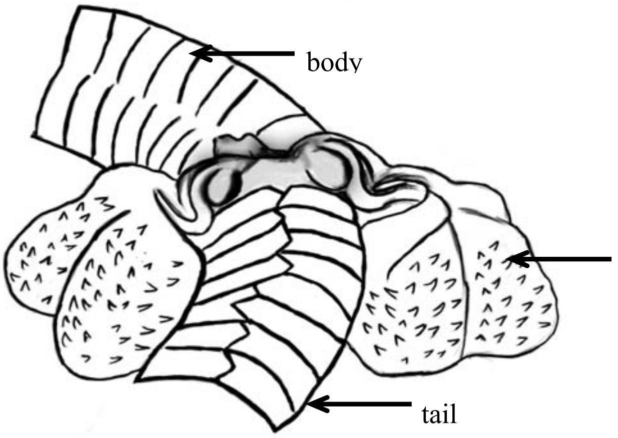

**ภาพที่ 1** ระบบขับถ่ายสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศเมีย: รังไข่ข้างขวา (rO, right ovary); รังไข่ข้างซ้าย (lO, left ovary); ท่อนำไข่ข้างขวา (rOd, right oviduct); ท่อนำไข่ข้างซ้าย (lOd, left oviduct); ไตข้างขวา (rK, right kidney); ไตข้างซ้าย (lK, left kidney) และฟอลลิเคิล (F, follicles)

## 2. มหกายวิภาค (gross anatomy) ระบบขับถ่ายสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศผู้

ระบบสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศผู้ ประกอบด้วยอัณฑะ (testis) 1 คู่ หลอดนำอสุจิ (vas deferens) และเฮมิเพนิส (hemipenes) 2 อัน อัณฑะรูปยาวรีสีขาว ข้างขวาอยู่หน้ากว่าและยาวมากกว่าข้างซ้าย หลอดนำอสุจิออกจากอัณฑะ ทอดตัวติดกับไต และไปเปิดที่เฮมิเพนิสซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ในการฉีดน้ำเชื้อ เปลี่ยนแปลงมาจากส่วนพรอคโตเดียม (proctodaeum) ของทวารร่วม พบเฉพาะในงูและกิ้งก่าที่โคนหาง เก็บเข้าร่างกายได้โดยการม้วนเข้า (invaginate) เวลาผสมพันธุ์ ใช้เฮมิเพนิสเพียงข้างเดียว ส่วนระบบขับถ่ายของงูเห่าไทยเพศผู้ประกอบด้วยไต 2 ข้าง ท่อไต และทวารร่วม ไตงูเห่ามีสีน้ำตาลคล้ำ ข้างขวาวางตัวหน้ากว่าข้างซ้าย เปิดออกที่ทวารร่วมตรงบริเวณปุ่มขับถ่าย (urinary papilla) (ภาพที่ 2) เมื่อฉีดน้ำเข้าโคนหาง พบว่าเฮมิเพนิสรูปร่างค่อนข้างกลม มีร่อง (falk) ปกคลุมด้วยหนาม (spine) จำนวนมาก (ภาพที่ 3) การที่ผู้ศึกษาทำการฉีดน้ำเข้าไปในเฮมิเพนิส เพราะเราสามารถใช้ลักษณะของเฮมิเพนิสในการจำแนกชนิดของงูได้ เฮมิเพนิสในกลุ่มงูเห่าจะแตกต่างกับงูกลุ่มอื่นๆ รูปร่างของเฮมิเพนิสแตกต่างกันในงูแต่ละชนิด



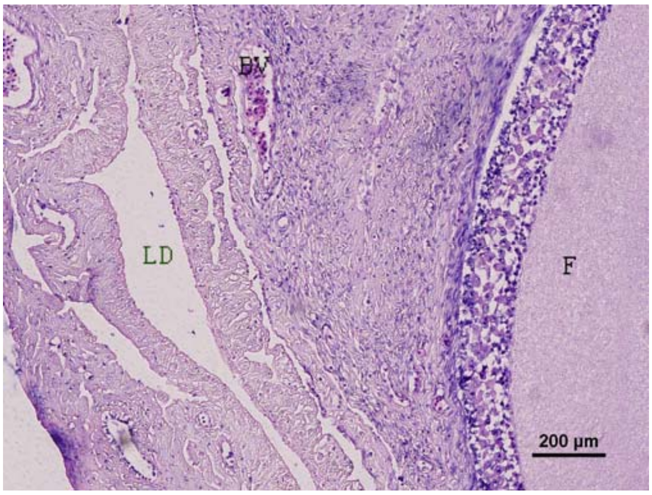

**ภาพที่ 2** ระบบขับถ่ายและสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยเพศผู้: อัณฑะข้างขวา (rT, right testis) อัณฑะข้างซ้าย (lT, left testis) หลอดนำอสุจิ (v, vas deferens) ไตข้างขวา (rK, right kidney) และ ไตข้างซ้าย (lK, left kidney)



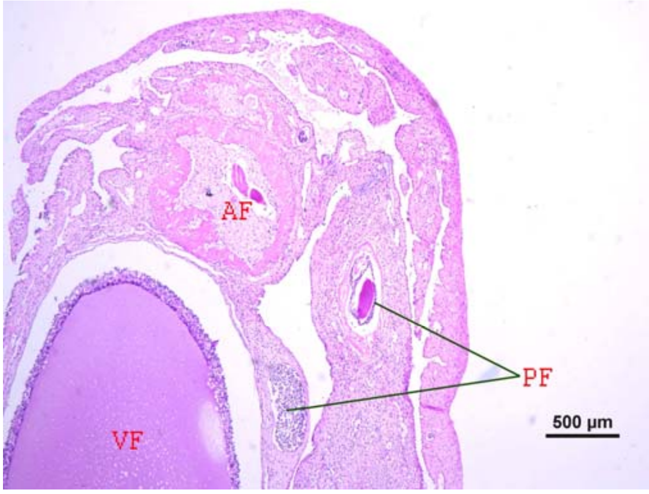

**ภาพที่ 3** เฮมิเพนิสของงูเห่าไทย เมื่อฉีดน้ำเข้าโคนหาง

## 3. จุลกายวิภาคศาสตร์ (microanatomy) ระบบสืบพันธุ์ของงูเห่าเพศเมีย

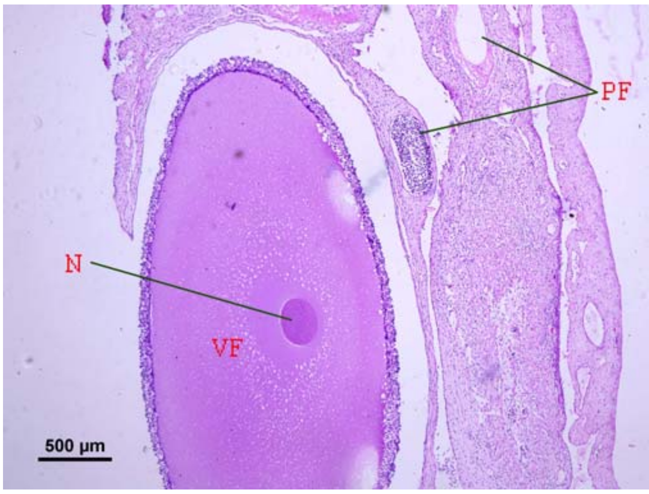
จากการศึกษาทางจุลกายวิภาครังไข่งูเห่าไทย พบฟอลลิเคิลเจริญอยู่ภายในรังไข่ มีท่อเลือดและท่อน้ำเหลืองมาเลี้ยง (ภาพที่ 4) ฟอลลิเคิลแบ่งตามระยะการเจริญออกเป็น 2 ชนิดคือ ฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดงและฟอลลิเคิลระยะสะสมไข่แดง ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน ฟอลลิเคิลฝ่อเรียกว่าอะทรีติคฟอลลิเคิล (atretic follicle) (ภาพที่ 5 และ 6) ฟอลลิเคิลประกอบด้วยโอโอไซต์ (oocyte) และ เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเซลล์ขนาดเล็ก (small cell) ขนาดกลาง (intermediate cell) และขนาดใหญ่ (pyriform cell) ต่อมาถูกล้อมด้วยเซลล์ทีกา (Theca cell) จากนั้นมีการสะสมไข่แดง (yolk) เป็นเกล็ดกระจายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) (ภาพที่ 7 และ 8) ลักษณะของคอร์ปัสลูเตียม (corpus luteum) ไซโทพลาซึมเป็นฟอง นิวเคลียส (nucleus) ย้อมติดสีน้ำเงินอยู่ริมเซลล์ (ภาพที่ 9)



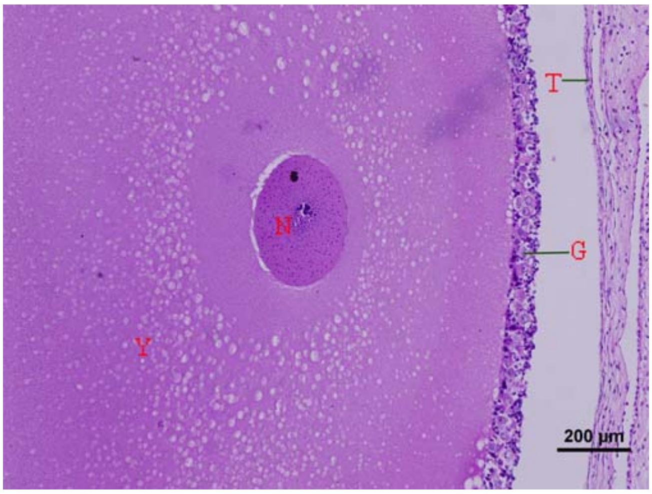

**ภาพที่ 4** แสดงท่อเลือด ท่อน้ำเหลืองบริเวณรังไข่: ฟอลลิเคิล (F; follicle); ท่อเลือด (BV, blood vessel); ท่อน้ำเหลือง (LD, lymphatic duct) (H&E x100)



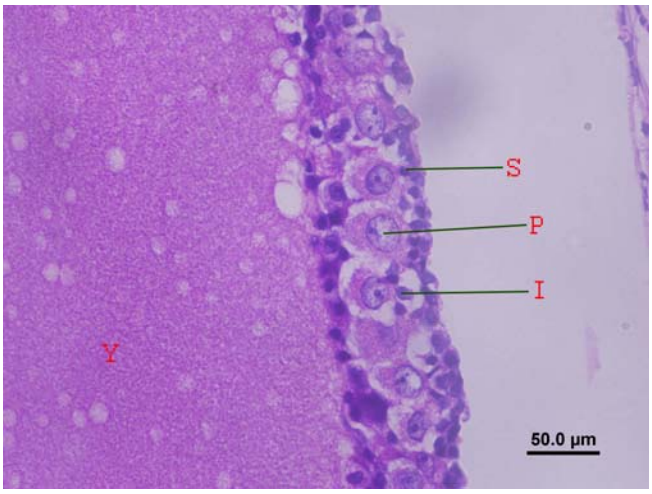

**ภาพที่ 5** ฟอลลิเคิลของงูเห่าไทย 2 ชนิด: ฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดง (PF, previtellogenic follicle); ฟอลลิเคิลระยะสะสมไข่แดง (VF, vitellogenic follicle); ฟอลลิเคิลฝ่อ (AF, atretic follicle) (H&E x40)



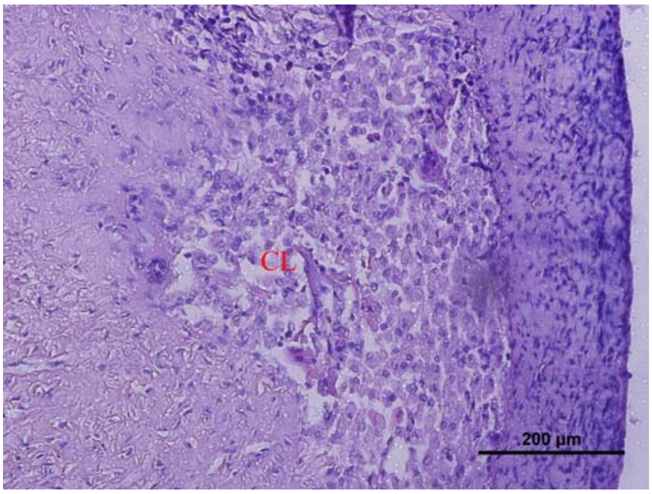

**ภาพที่ 6** เปรียบเทียบขนาดของฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดง (PF, previtellogenic follicle) และระยะสะสมไข่แดง (VF, vitellogenic follicle) นิวเคลียสของโอโอไซต์ (N, nucleus) (H&E x 40)




**ภาพที่ 7** แสดงส่วนประกอบของฟอลลิเคิล: นิวเคลียสของโอโอไซต์ (N, nucleus) และเซลล์แกรนูโลซา (G, granulosa cell) ซึ่งล้อมรอบด้วยเซลล์ทีกา (T, Theca cell) และมีการสะสมไข่แดง (Y, yolk) (H&E x 100)



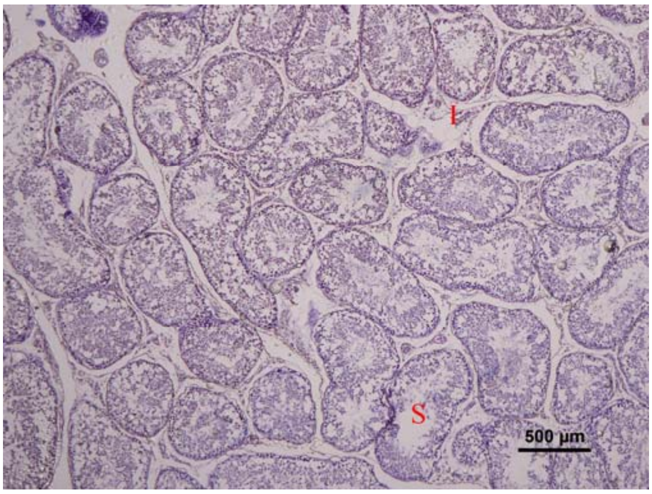

**ภาพที่ 8** แสดงเซลล์แกรนูโลซา 3 ชนิด: ขนาดเล็ก (S, small cell); ขนาดกลาง (I, intermediate cell); และขนาดใหญ่ (P, pyriform cell) (H&E x 400)



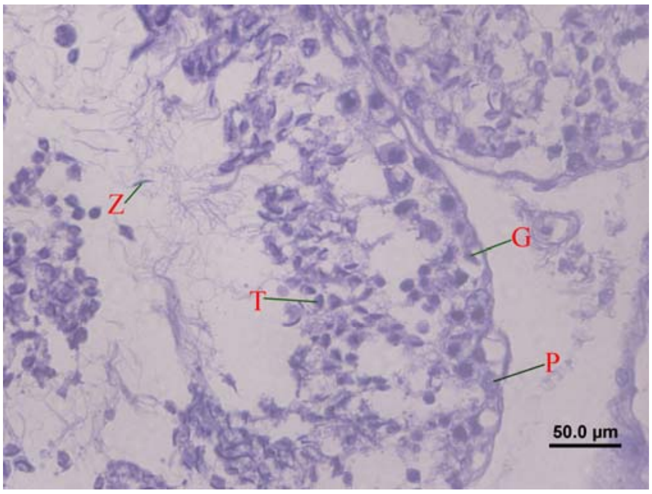

**ภาพที่ 9** คอร์ปัสลูเตียม (CL; corpus luteum) พบในตัวอย่างที่เก็บในเดือนพฤศจิกายน(H&E x 200)

## 4. จุลกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ของงูเห่าเพศผู้

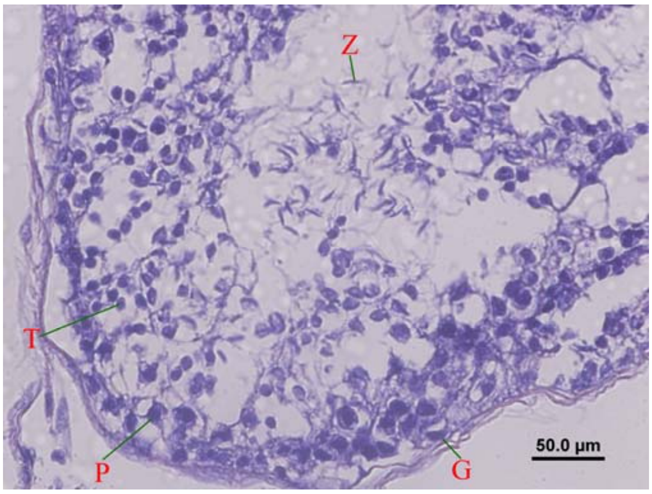
ระบบสืบพันธุ์ของงูเห่าประกอบด้วย อัณฑะและท่อสืบพันธุ์ ได้แก่ ดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ (ductus efferens) เอพิดิไดมิส และหลอดนำอสุจิ ภายในอัณฑะประกอบด้วยท่อเซมินิเฟอรัสที่ขดอยู่แน่น ภายนอกท่อ มีเซลล์ลัยดิก หรือเซลล์อินเตอร์สติเชียล (interstitial cell) (ภาพที่ 10) การเจริญของเซลล์อสุจิภายในท่อเซมินิเฟอรัสระยะต่างๆ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอสุจิ เซลล์อสุจิปฐมภูมิ สเปอร์มาติด และตัวอสุจิ จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคเอพิดิไดมิส(epididymis) และท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ของงูเห่าไทยที่เลี้ยงในกรงเลี้ยงในเดือนพฤษภาคม และเดือนพฤศจิกายน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางจุลกายวิภาคของเอพิดิไดมิส และกลุ่มท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ (ภาพที่ 12 และ 13)




**ภาพที่ 10** แสดงภาพตัดขวางอัณฑะ: เซลล์อินเตอร์สติเชียล (I, interstitial cell); เซมินิเฟอรัส (S, seminiferous tubule) (H& E x40)

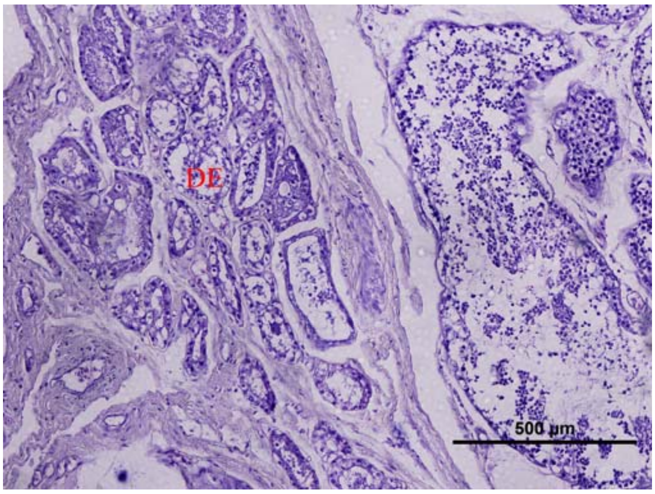



A

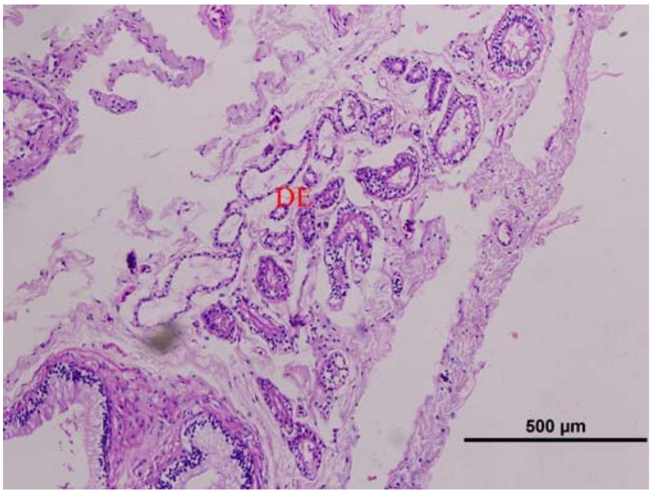



B

**ภาพที่ 11** แสดงการเจริญของเซลล์อสุจิภายในท่อเซมินิเฟอรัส A คือท่อเซมินิเฟอรัสจากอัณฑะที่เก็บในเดือนพฤษภาคม B คือท่อเซมินิเฟอรัสจากอัณฑะที่เก็บในเดือนพฤศจิกายน กระบวนการสร้างอสุจิภายในท่อเซมินิเฟอรัส: เซลล์ต้นกำเนิดตัวอสุจิ (G, spermatogonium); เซลล์อสุจิปฐมภูมิ (P, primary spermatocyte); สเปอร์มาติด (T, spermatid) และตัวอสุจิ (Z, sperm): (H & E, x400)

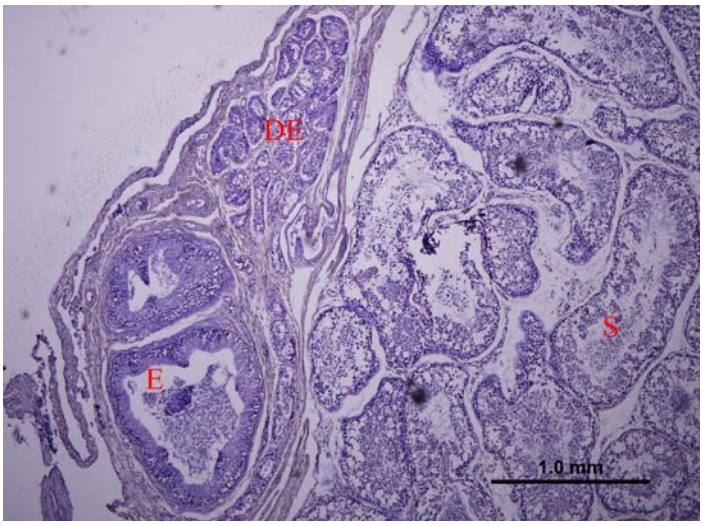



A

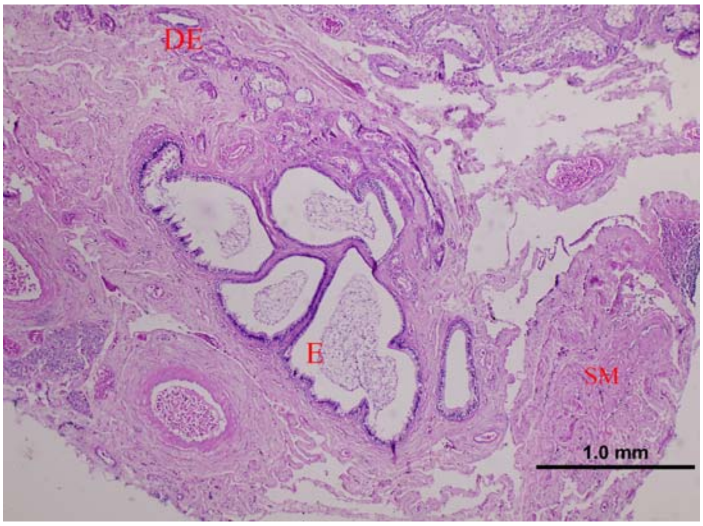



B

**ภาพที่ 12** แสดงกลุ่มท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ A คือท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ (DE; ductus efferens) จากอัณฑะที่เก็บในเดือนพฤษภาคม B คือท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์จากอัณฑะที่เก็บในเดือนพฤศจิกายน (H&E; x 100)




A



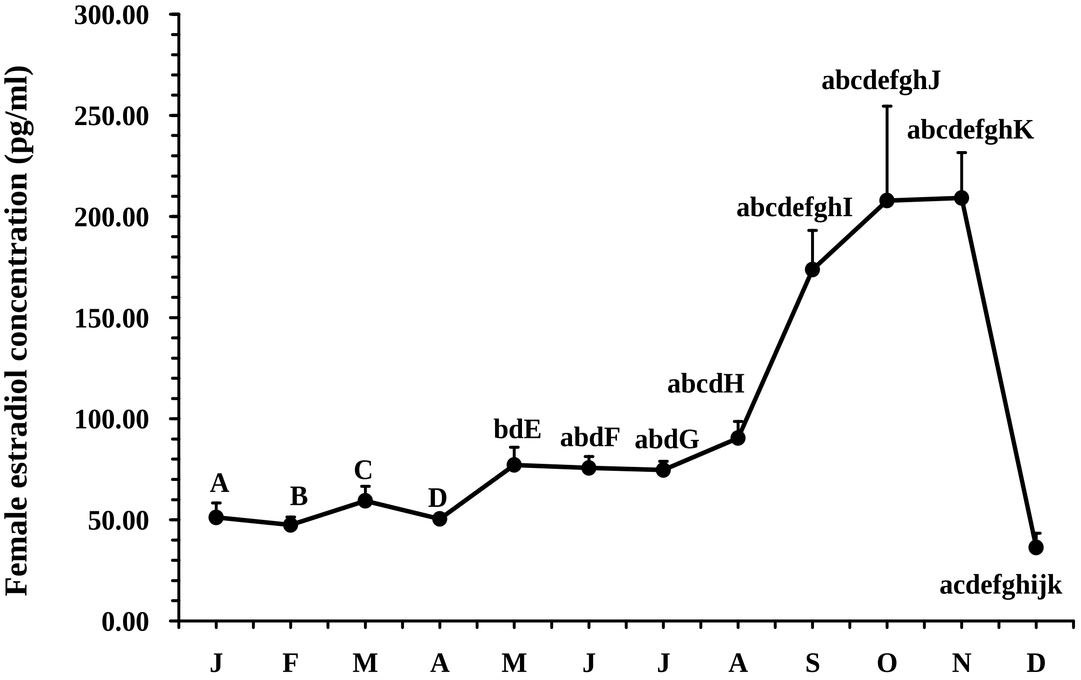

B

**ภาพที่ 13** แสดงเอพิดิไดมิส A คือเอพิดิไดมิส (E; epididymis) ที่เก็บในเดือนพฤษภาคม B คือเอพิดิไดมิสที่เก็บในเดือนพฤศจิกายน เอพิดิไดมิสอยู่ใกล้กับกลุ่มท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ (DE; ductus efferens) อัณฑะของเดือนกันยายนพบกล้ามเนื้อเรียบ (SM; smooth muscle) ใกล้กับ เอพิดิไดมิส (H& E; x 40)

## 5. รูปแบบการคัดหลั่งเอสตราไดออลงูเห่าเพศเมียในรอบปี

การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลของงูเห่าเพศเมียในรอบปี (Fig. 14) ค่าเฉลี่ยฮอร์โมนเอสตราไดออลของงูเห่าเพศเมียมีความแตกต่างกันในแต่ละเดือน (Kruskal Wallis H test; $P \leq 0.05$, $\chi^2 = 74.23$): เดือนมกราคมแตกต่างกับเดือนพฤษภาคม, มิถุนายน, กรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม พฤศจิกายนและธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.028, 0.015, 0.021, 0.005, 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.038 ตามลำดับ) เดือนกุมภาพันธ์แตกต่างกับเดือนพฤษภาคม, มิถุนายน, กรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม และพฤศจิกายน (Mann-Whitney U test; P = 0.002, 0.003, 0.0001, 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.0001 ตามลำดับ) เดือนมีนาคมแตกต่างกับเดือนสิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.015, 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.038 ตามลำดับ) เดือนเมษายนแตกต่างกับเดือนพฤษภาคม, มิถุนายน, กรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.001, 0.001, 0.001, 0.0001, 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.01 ตามลำดับ) เดือนพฤษภาคมแตกต่างกับเดือนกันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.001, 0.0001, 0.0001 และ 0.003 ตามลำดับ) เดือนมิถุนายนแตกต่างกับเดือนกันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.003 ตามลำดับ) เดือนกรกฎาคมแตกต่างกับเดือนกันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.0001, 0.0001, 0.0001 และ 0.003 ตามลำดับ) เดือนสิงหาคมแตกต่างกับเดือนกันยายน, ตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.002, 0.0001, 0.0001 และ 0.001 ตามลำดับ) เดือนกันยายนแตกต่างกับเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.0001) เดือนตุลาคมแตกต่างกับเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.0001) เดือนพฤศจิกายนแตกต่างกับเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.0001)

ความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดออลเฉลี่ยในแต่ละเดือนค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากเดือนมกราคม เพิ่มขึ้นอย่างเฉียบพลันในเดือนกันยายน มีค่ามากที่สุดในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน และลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับต่ำสุดในเดือนธันวาคม




A,a; B,b; C,c; D,d; E,e; F,f; G,g; H,h; I,i; J,j and K,k; อักษรพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กของพยัญชนะเดียวกันแสดงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.05$.

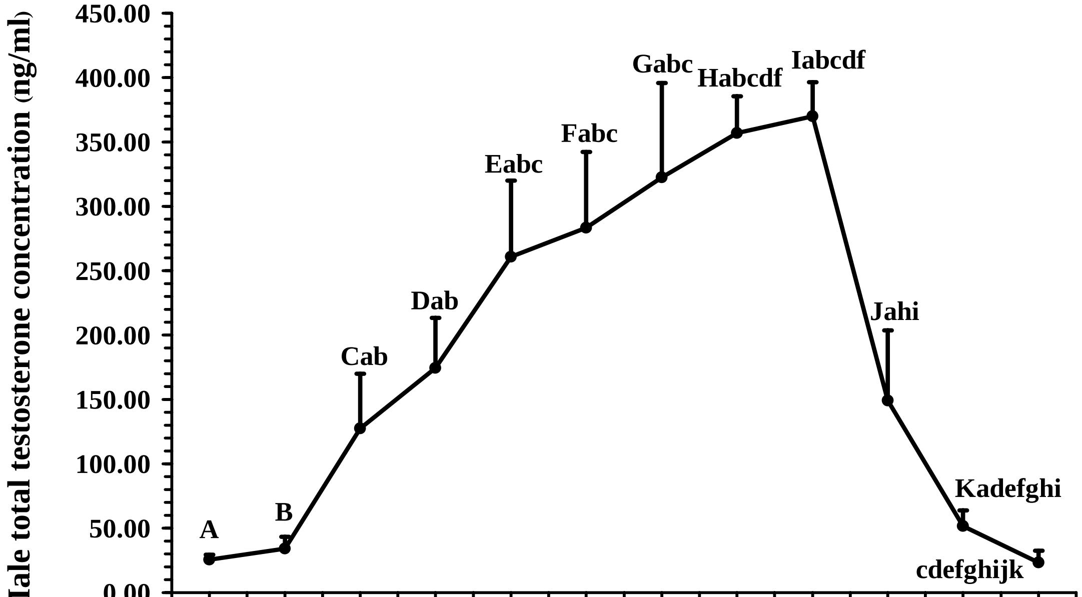
**ภาพที่ 14** ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดออล ($\bar{x} \pm$ S.E.) ของงูเห่าเพศเมียในกรงเลี้ยงรอบปี: J-D แสดงถึง เดือนมกราคม-ธันวาคม

## 6. รูปแบบการคัดหลั่งเทสทอสเทอโรนงูเห่าเพศผู้ในรอบปี

การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนของงูเห่าเพศผู้ในรอบปี (Fig. 15) ค่าเฉลี่ยฮอร์โมนเทสทอสเตอโรนของงูเห่าเพศผู้มีความแตกต่างกันในแต่ละเดือน (Kruskal Wallis H test; $P \leq 0.05$, $\chi^2 = 59.53$): เดือนมกราคมแตกต่างกับเดือนมีนาคม เมษายน พฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน (Mann-Whitney U test; P = 0.002, 0.001, 0.001, 0.001, 0.001, 0.002, 0.002, 0.029 และ 0.045 ตามลำดับ) เดือนกุมภาพันธ์แตกต่างกับเดือนมีนาคม เมษายน พฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน (Mann-Whitney U test; P = 0.021, 0.001, 0.001, 0.001, 0.001, 0.002 และ 0.002 ตามลำดับ) เดือนมีนาคมแตกต่างกับเดือนพฤษภาคม, กรกฎาคม, สิงหาคม, กันยายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P =0.038, 0.038, 0.021, 0.019, 0.011 และ 0.005 ตามลำดับ) เดือนเมษายนแตกต่างกับเดือนสิงหาคม, กันยายน,

พฤศจิกายน และ ธันวาคม (Mann-Whitney U test; P =0.019, 0.011, 0.019 และ 0.001 ตามลำดับ) เดือนพฤษภาคมแตกต่างกับเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P =0.003 และ 0.001 ตามลำดับ) เดือนมิถุนายนแตกต่างกับเดือนสิงหาคม, กันยายน, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.045, 0.03, 0.002 และ 0.001 ตามลำดับ) เดือนกรกฎาคมแตกต่างกับเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.002 และ 0.001 ตามลำดับ) เดือนสิงหาคมแตกต่างกับเดือนตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.018, 0.008 และ 0.002 ตามลำดับ) เดือนกันยายนแตกต่างกับเดือนตุลาคม, พฤศจิกายน และธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.005, 0.008 และ 0.002 ตามลำดับ) เดือนตุลาคมแตกต่างกับเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.009) เดือนพฤศจิกายนแตกต่างกับเดือนธันวาคม (Mann-Whitney U test; P = 0.03)

ความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนเฉลี่ยในแต่ละเดือนค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากเดือนมกราคม และมีค่ามากที่สุดในเดือนกันยายน แล้วลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับต่ำสุดในเดือนธันวาคม




A,a; B,b; C,c; D,d; E,e; F,f; G,g; H,h; I,i; J,j and K,k; อักษรพิมพ์ใหญ่และเล็กพิมพ์ของพยัญชนะเดียวกันแสดงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P< 0.05.

**ภาพที่ 15** ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ($\bar{x}\pm$ S.E.) ของงูเห่าเพศผู้ในกรงเลี้ยงรอบปี: J-D แสดงถึง เดือนมกราคม-ธันวาคม

# วิจารณ์

## 1. ชีววิทยาระบบขับถ่ายสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศเมีย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารังไข่ของงูเห่าไทยเป็นรูปยาวรี ข้างขวาใหญ่กว่า และอยู่หน้ากว่าข้างซ้าย สันนิษฐานว่าเป็นไปได้ว่าเป็นการปรับตัวอย่างหนึ่งของงูให้เหมาะสมกับรูปร่างที่เพรียวยาว สอดคล้องกันกับที่รายงานไว้มากมายในงูชนิดต่างๆ เช่น งู *Thamnophis radix* (Cieslak , 1945) งู *Xenochrophis vittata* (Bergman, 1951) งู *Natrix sipedon* (Bragdon, 1953) งู *N. rhombifera* (Betz, 1963) และงู *Ptyas mucosus* (Das, 1960) ส่วนสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ มีรายงานไว้แตกต่างกันออกไป โดย Parker (1931) รายงานไว้ว่ารังไข่ 2 ข้างของเต่าอยู่ในระดับตำแหน่งเท่ากัน และในกิ้งก่าบางชนิดเช่น *Crotaphylus collaris*, *Eumeces obsoletus*, *Gerrhonotus liocephalus infernalis* และ *Cnemidophorus sackii gularis* รังไข่ซ้ายและขวาก็อยู่ในตำแหน่งเท่ากันเช่นกัน (Brooks, 1906) ส่วนในนก วีรยุทธ์ (2528) รายงานไว้ว่ารังไข่และท่อนำไข่ของนกส่วนมากเหลือแค่ข้างซ้ายข้างเดียวที่พัฒนาขึ้นมาส่วนข้างขวาลดรูปไป ในทำนองเดียวกันกับไตข้างขวาวางตัวอยู่ด้านหน้า (anterior) กว่าด้านซ้าย เพื่อให้เหมาะสมกับรูปร่างเพรียวยาว ไตงูเป็นแบบมีโซเนฟรอส (mesonephros) (Porter, 1972) ความยาวไตกินพื้นที่ประมาณ 10-15% ของความยาวลำตัว (Mader, 2006)

## 2. ชีววิทยาระบบขับถ่ายสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศผู้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัณฑะของงูเห่าไทยเป็นรูปยาวรี ข้างขวาใหญ่กว่าและอยู่หน้ากว่าข้างซ้ายเช่นเดียวกันกับของเพศเมีย Huang (1983) กล่าวไว้ว่ากิ้งก่าและงูทั่วไปมีอัณฑะข้างขวายาวกว่า และอยู่หน้า (anterior) กว่าข้างซ้าย แต่มีบางชนิดที่อัณฑะข้างซ้ายอยู่หน้ากว่าข้างขวา เช่น *Eumaces obsoletus* และ *Crotaphytus collaris* (Brooks, 1906) เช่นเดียวกับในกิ้งก่าด้วงทุกชนิดอัณฑะข้างขวาวางตัวอยู่หน้ากว่าข้างซ้าย (Gans, 1977) อย่างไรก็ตามอัณฑะของกิ้งก่า *Agama tuberculata* วางตัวอยู่ในระดับเดียวกัน (Duda, 1972) การที่อัณฑะสองข้างอยู่เยื้องกันอาจเป็นการปรับตัวให้เหมาะสมกับรูปร่างที่เพรียวยาว และขนาดอัณฑะของงูขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่มีกระบวนการสร้างตัวอสุจิ โดยอัณฑะงูชนิดที่มีการจำศีลมีขนาดใหญ่ที่สุดในช่วงออกจำศีลตรงกับฤดูใบไม้ผลิ (Jacobson, 2007)

## 3. จุลกายวิภาคระบบสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศเมีย

จากการศึกษาครั้งนี้จำแนกฟอลลิเคิลได้ 2 กลุ่ม คือฟอลลิเคิลกลุ่มระยะก่อนสะสมไข่แดง และกลุ่มระยะสะสมไข่แดงในงูเห่าไทยที่เก็บตัวอย่างศึกษาทั้งในเดือนพฤษภาคมและเดือนพฤศจิกายน การเจริญของฟอลลิเคิลแปรผันตามฤดูกาล กลุ่มฟอลลิเคิลสามารถจำแนกได้โดยการสังเกตสีและขนาดของฟอลลิเคิล และพบคอร์ปัสลูเตียมในรังไข่งูเห่าเพศเมียที่เก็บในเดือนพฤศจิกายน แต่ไม่พบในเดือนพฤษภาคม ซึ่งตรงกับแนวคิดของ Jacobson (2007) กล่าวไว้ว่าคอร์ปัสลูเตียมซึ่งเกิดจากการตกไข่จะเกิดขึ้นเฉพาะช่วงเดือนที่คาดว่าเป็นฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น

## 4. จุลกายวิภาคระบบสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศผู้

อัณฑะของงูเห่าไทยประกอบด้วยท่อเซมินิเฟอรัสมากมาย ภายในท่อมีตัวอสุจิระยะต่างๆ ลักษณะของเซลล์สเปอร์มาโทเจนิคระยะต่างๆ ที่พบในงูเห่าไทยไม่ต่างจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Junqueira *et al*., 1986) การวิจัยครั้งนี้ พบลักษณะท่อบุด้วยเซลล์ที่มีขน ซึ่งเป็นลักษณะใกล้เคียงกับเอพิดิไดมิส (Jacobson, 2007) รอบท่อเอพิดิไดมิสของงูเห่าไทยที่เก็บในเดือนพฤศจิกายนมีกล้ามเนื้อเรียบเรียงล้อมอยู่ สันนิษฐานว่าใช้ในการบีบไล่เชื้ออสุจิให้ผ่านหลอดนำอสุจิไปที่เฮมิเพนิส ในขณะที่ Mader (1996) รายงานว่างูไม่มีเอพิดิไดมิส แต่มีหลอดนำอสุจินำอสุจิเข้าสู่เฮมิเพนิสซึ่งอยู่ในโคนหาง

## 5. รูปแบบการคัดหลั่งฮอร์โมนเอสตราไดออลในรอบปี

ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของเอสตราไดออลในพลาสมางูเห่าไทยเพศเมียสูงสุดในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน เป็นไปได้ว่าฤดูสืบพันธุ์น่าจะอยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน แม้ไม่สามารถศึกษาพฤติกรรมสืบพันธุ์ในกรงเลี้ยงอันเนื่องมาจากอุณหภูมิในกรงเลี้ยงต่ำ กระทบต่อเมแทบอลิซึมของงูเห่าในกรงเลี้ยง สอดคล้องกับที่ Chanhome และคณะ (2001) รายงานไว้ว่างูเห่าไทยมีฤดูสืบพันธุ์ประมาณเดือนพฤศจิกายน-มกราคม

## 6. รูปแบบการคัดหลั่งฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในรอบปี

ความเข้มข้นเฉลี่ยของเทสทอสเทอโรนในพลาสมางูเห่าไทยเพศผู้สูงสุดในเดือนสิงหาคมและกันยายน สอดคล้องกับที่ Chanhome และคณะ (2001) รายงานไว้ว่างูเห่าไทยมีฤดูสืบพันธุ์ประมาณเดือนพฤศจิกายน-มกราคม Moore และคณะ (2000) รายงานไว้ว่าเทสทอสเทอโรนในพลาสมาของงูการ์เตอร์สูงสุดเดือนกันยายนเช่นกัน ระดับเฉลี่ยของเทสทอสเทอโรนของงูเห่าเพศผู้มีแนวโน้มสูงสุดก่อนระดับสูงสุดเฉลี่ยของเอสตราไดออลของงูเห่าเพศเมีย อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถศึกษาพฤติกรรมการสืบพันธุ์รอบปีของงูเห่าไทยในกรงเลี้ยงควบคู่กับการศึกษาระดับการเปลี่ยนของฮอร์โมนรอบปี

# สรุปและข้อเสนอแนะ

## สรุป

1. ระบบสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศเมียประกอบด้วยรังไข่ 2 ข้าง ท่อนำไข่ 2 ข้างที่ทอดตัวตามยาว และทวารร่วมโดยรังไข่ข้างขวายาวกว่าและอยู่หน้ากว่ารังไข่ข้างซ้าย ฟอลลิเคิลค่อนข้างรีเรียงเป็นแนวอยู่ในรังไข่รูปยาวรี ส่วนระบบขับถ่ายของงูเห่าไทยเพศเมียประกอบด้วยไต 2 ข้าง ท่อไตทั้ง 2 และทวารร่วม ไตข้างขวาวางตัวหน้ากว่าไตข้างซ้าย

2. ระบบสืบพันธุ์งูเห่าไทยเพศผู้ประกอบด้วยอัณฑะ 2 ข้าง หลอดนำอสุจิต่อจากอัณฑะทั้งสองไปยังเฮมิเพนิส ส่วนระบบขับถ่ายของงูเห่าไทยเพศผู้เหมือนกับของเพศเมีย

3. รังไข่งูเห่าไทยมีฟอลลิเคิล 2 ระยะ ได้แก่ ฟอลลิเคิลระยะก่อนสะสมไข่แดงและฟอลลิเคิลระยะสะสมไข่แดง ฟอลลิเคิลประกอบด้วยโอโอไซต์ และเซลล์แกรนูโลซา ซึ่งถูกล้อมด้วยเซลล์ทีกา และพบคอร์ปัสลูเทียมในรังไข่งูเห่าที่เก็บในเดือนพฤศจิกายนเท่านั้น

4. ไม่พบความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของอัณฑะของงูเห่าไทย อัณฑะประกอบด้วยท่อเซมินิเฟอรัสที่ภายในมีอสุจิระยะต่างๆ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอสุจิ อสุจิขั้นปฐมภูมิ สเปอร์มาติดและตัวอสุจิ นอกจากนี้พบตัวอสุจิในท่อดัคตัสเอฟเฟอเรนส์ และเอพิดิไดมิส

5. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดออลสูงสุดในเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน

6. ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสูงสุดในเดือนสิงหาคม-กันยายน

## ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการทำงานของต่อมไร้ท่อและการสืบพันธุ์ควรศึกษาพฤติกรรมการสืบพันธุ์ในรอบปีควบคู่กับการศึกษาฮอร์โมนจากต่อมบ่งเพศเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากจากการงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถสังเกตพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของงูเห่าไทยในกรงเลี้ยง เสนอแนะให้ศึกษาขีดจำกัดและกระบวนการศึกษาพฤติกรรมโดยการเฝ้าสังเกตต่อไป

# เอกสารและสิ่งอ้างอิง


ณัฏฐิณี ใจจิตร. 2544. **การวิเคราะห์ลำดับอะมิโนแอซิด ของอะโปไลโปรตีนชนิดอีของสัตว์เลื้อยคลาน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

นทีทิพย์ กฤษณามระ. 2538. **ฮอร์โมน กลไกและการออกฤทธิ์ร่วม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

ประทานพร ฉั่วอนุสรณ์. 2538. **ผลของพิษงูเห่าและส่วนสกัดที่เป็นพิษต่อหัวใจต่อการทำงานของไตในสุนัขที่สลบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพบูลย์ จินตกุล. 2547. **งูพิษในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.

วรรณา ธรรมพาเลิศ. 2534. **การศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

วิโรจน์ นุตพันธุ์ และ บุญเยือน ทุมวิภาค. 2525. **การรักษาผู้ป่วยถูกงูพิษกัดและงูพิษในประเทศไทย**. โรงพิมพ์พิฆเณศ, กรุงเทพฯ.

วีรยุทธ์ เลาหะจินดา. 2528. **ปักษีวิทยา**. บูรพาสาส์น, กรุงเทพฯ.

เวคิน นพนิตย์. 2524. **เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา.** สำนักพิมพ์ห้างขายยาตรางู, กรุงเทพฯ.

สุขใจ มหรรทัศนพงศ์. 2534. **ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะย่อยอาหารและอวัยวะสืบพันธุ์ในงูเห่าไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. **เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาจ แจ่มเมฆ. 2521. **กายวิภาคศาสตร์เปรียบเทียบของคอร์เดต**. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชจำกัด, กรุงเทพฯ.

Aubret, F., X. Bonnet, R. Shine and O. Lourdais. 2002. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Horm. Behav** 42: 135 - 147.

Bergman, R.A.M. 1951. The anatomy of *Natrix vittata*. **Zool. Meded** 31: 13-24.

Betz, T.W. 1963. The gross ovarian morphology of the Diamond-backed Water Snake *Natrix rhombifera*, during the reproductive cycle. **Copeia** 4: 692-697.

Betz, T.W. 1963. The ovariance histology of the Diamond-backed Water Snake*, Natrix rhombifera*, during the reproductive cycle. **J. Morphol** 113: 245-260.

Bragdon, D.E. 1953. A contribution to the surgical anatomy of the Water Snake *Natrix sipedon sipedon*; the location of the visceral endocrine organs with references to ventral scutellation. **Anat. Rec** 117: 145-161.

Brooks, B. 1906. The anatomy and internal urogenital organs of certain North American lizards. **Trans. Tex. Acad. Sci** 8: 23-38.

Chanhome, L., P. Jintakune., H. Wilde and M.J. Cox. 2001. Venomous snake husbandry in Thailand. **Wild. Environ. Med** 12: 17-23.

Cieslak, E.S. 1945. Relations between the reproductive cycle and the pituitary gland in the snake *Thamnophis radix*. **Physiol. Zool** 18: 299-329.

Das, S.M. 1960. A competitive functional study of the urino-genital system in *Uromastyx hardwickii* Gray (Sand Lizard), *Ptyas mucosus* (Rat Snake) and *Eryx conicus* (Sand Boa). **Proc. nat. Acad. Sci** 30: 59-78.

Deoras, P.J. 1965. **Snake of India**. National Book Trust, New delhi.

Drury, R.A.B. and E.A. Wallington. 1967. **Carletons Histological Technique**. 4th ed. Oxford University press, New York.

Duda P.C. 1972. The venous system of *Agama tuberculata* gray. **Brit. J. Herpetol** 4: 297-306.

Edwards A. and S.M. Jones. 2001. Changes in plasma progesterone, estrogen, and testosterone concentrations throughout the reproductive cycle in female viviparous Blue-tongued Skinks, *Tiliqua nigrolutea* (cincidae), in Tasmania. **Gen. Comp. Endocr** 122: 260-269.

Edwards A. and S.M. Jones. 2001. Changes in plasma testosterone, estrogen, and progesterone concentrations throughout the annual reproductive cycle in male viviparous Blue-tongued Skinks, *Tiliqua nigrolatea*, in Tasmania. **J. Herpetol** 35: 293-29.

Ernst C.H. and G.R. Zug. 1996. **Sakes in Question**. Csiro publishin, Melbourne.

Gans, C. 1977. **Biology of the Reptilia**. Academic Press, London.

Huang, M.H. 1983. **Hundred pacer, *Agkistrodon acutus***. Science Publication, Beijing.

Humason G.L. 1979. **Animal Tissue Technique.** 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Jacobson E.R., 2007. **Infectious Diseases and Pahology of Reptiles**. CRC Press, Florida.

Slowinski, J.B.S. and W. Wüster. 2000. A new cobra (Elapidae: *Naja*) from Myanmar (Burma). **Herpetologica** 56 (2): 257-270.

Junqueira, L.C., G. Malnic and J.A. Long. 1986. **Basic Histology**. 5th ed. Prentice-Hall Int., Connecticut.

Kiernan, J.A. 1999. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. 3rd ed. Heinemann, Oxford.

Lerner, D.T. and R.T. Mason. 2001 The influence of sex steroids on the sexual size dimorphism in the Red–spotted Garter Snake, *Thamnophis sirtalis concinnus.* **Gen. Comp. Endocr** 124: 218 – 225.

Luna, L.G. 1968. **Manual of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd ed. Mc Graw-Hill Book Company, New York.

Mader, D.R. 1996. **Reptile Medicine and Surgery**. W.B. Saunders company, London.

Moore, I.T., J.P. Lerner, D.T. Lerner and R.T. Mason. 2000. Relationships between annual cycle of testosterone, corticosterone, and body condition in male Red-spotted Garter Snakes, *Thamnophis sirtalis concinnus*. **Physiol. Biochem. Zool** 73 (3): 307-312.

Parker, G.H. 1931. The passage of sperms and of eggs through the oviducts in terrestrial vertebrate. **Phil. Trans** 219: 381-419.

Parker, H.W. 1977. **Snakes: A natural history**. 2nd ed. British Museum, London.

Pope, C.H. 1956. **The Reptile World**. Routledge & Kegan Paul Ltd, London.

Porter, K.R. 1972. **Herpetology**. W.B. Saunders Company, London.

Pough, F.H., R.M. Andrews, J.E. Cadle, M.L. Crump, A.H. Savitzky and K.D. Wells. 2004. **Herpetology**. 3rd ed. Pearson, New Jersey.

Ragsdale, F.R., K.M. Imel, E.E. Nilsson and R.L. Ingermann. 1993. Pregnancy-associated factors affecting organic phosphate levels and oxygen affinity of Garter Snake red cells. **Gen. Comp. endocr** 91: 181-188.

Salakij, C., J. Salakij. and L. Chanhome. 2002. Comparative hematology, morphology and ultrastructure of blood cells in Monocellate Cobra (*Naja kaouthia*), Siamese Spitting Cobra (*Naja siamensis*) and Golden Spitting Cobra (*Naja sumatrana*). **Nat. Sci** 36: 291-300.

Shine, R. 1977. Reproduction in Australian elapid sakes I. Testicular cycles and mating season. **Aust. J. Zool** 25: 647-653.

Shine, R., W.R. Branch, J.K. Webb, P.S. Harlow, T. Shine and J.S. Keogh. 2007. Ecology of cobras from Southern Africa. **J. Zool** 272: 183-193.

Withers, P.C. 1992. **Comparative Animal Physiology**. Saunders College Publishing, Sydney.

Zug, G.R. 1993. **Herpetology**. Academic Press Inc, New York.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

# การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต่อมบ่งเพศ และล้างตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยนอร์มอลซาไลน์ (normal saline) 0.7 เปอร์เซ็นต์ ตัดเป็นชิ้นใหญ่ๆ ก่อนนำไปใส่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative) จนภายนอกของเนื้อเยื่อแข็งพอ จึงนำออกมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีดผ่าตัดบนถาดเทียน ให้ชิ้นเนื้อหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร และพื้นที่หน้าตัดไม่เกิน 1-2 ตารางเซนติเมตร นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative) นิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (neutral buffer formalin) (เวคิน, 2524) (ภาคผนวก 5.1.2)

1. การล้าง

หลังจากเก็บตัวอย่างในสารละลายนิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินได้ 24 ชั่วโมง ให้นำเนื้อเยื่อออกมาห่อด้วยผ้าขาวบาง ใส่ภาชนะ ไปรองใต้ก๊อกน้ำ เปิดน้ำให้ไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างเนื้อเยื่อแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

2. การขจัดน้ำด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้เนื้อเยื่อใสและการแทรกซึมพาราฟิน

เนื่องจากสารที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อไม่ละลายในน้ำ จึงต้องกำจัดน้ำออกจากเซลล์อย่างสมบูรณ์ (Kiernan, 1999) ส่วนสารที่ใช้ขจัดแอลกอฮอล์ นิยมใช้ไซลีน (zylene) (Humason, 1979)

ใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ตั้งโปรแกรมเครื่อง 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างเนื้อเยื่อออกจากแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ ใส่ในตลับพลาสติก นำตลับใส่ตะกร้าที่มีรูพรุน แขวนตะกร้ากับตะขอของเครื่องอัตโนมัติ ตะกร้าจะหมุนไปยังสารเคมีที่เตรียมไว้

3. การฝังเนื้อเยื่อ

ใช้เครื่องหยอดพาราฟิน (dispenser) โดยนำกระทงโลหะทาด้วยกลีเซอรอล เปิดพาราฟินให้ไหลลงในกระทงโลหะ (mold) นำเนื้อเยื่อมาวางในกระทง ใช้กรอบพลาสติก (embedding ring) ครอบด้านบนกระทง กดกรอบพลาสติกให้แน่นแล้วปล่อยพาราฟินให้ไหลจนเต็ม นำไปวางไว้ที่แผ่นเย็นให้พาราฟินแข็งตัว (ศุภลักษณ์, 2545)

4. การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง

ตัดแต่งหน้าบล็อก (trimming) ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู นำมีดมาใส่ในตัวจับมีด ปรับมีดให้เอียง 5 องศา นำบล็อกมาใส่ตัวจับบล็อก (block holder) ปรับหน้าบล็อกให้ตรง ขนานกับหน้าใบมีด ลงมือตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นขนาด 5 ไมครอนด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จนได้แถบเนื้อเยื่อเป็นแผ่นยาว (ribbon) วางไว้บนกระดาษสีเข้ม ตัดเป็นแผ่นขนาดพอดี

5. ติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์

นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath) ในอ่างใส่น้ำกลั่นที่มีเจลาตินอยู่ ใช้สไลด์ช้อนเนื้อเยื่อขึ้นมา นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)

6. การย้อมสี

ล้างพาราฟินโดยจุ่มในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ที่มีระดับความเข้มข้นสูงมาต่ำ แอลกอฮอล์ 100เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แล้วล้างน้ำประปา เปิดน้ำไหลผ่าน 1-2 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสีแฮริสฮีมาท็อกซิลิน (Harris' hematoxylin) ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ แอซิดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ล้างสีส่วนเกินออก ทำให้สไลด์เป็นกลางโดยจุ่มในสารละลายลิเทียมคาร์บอร์เนตแล้วล้างในน้ำไหลนำสไลด์ที่ได้ไปเช็คสี ถ้าติดสีจางไปให้ย้อนกลับไปขั้นแฮริสฮีมาท็อกซิลิน ถ้าสีเข้มไป ย้อนกลับไปขั้น 1เปอร์เซ็นต์ แอซิดแอลกอฮอล์ เมื่อได้สีที่พอใจแล้วจึงนำสไลด์ไปย้อมสีอีโอซิน (eosin) 2 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปขจัดน้ำออกโดยให้ผ่านแอลกอฮอล์ที่มีระดับความเข้มข้นจากต่ำไปสูง แอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาทีแล้วตรวจสอบสีอีโอซิน ถ้าจางไปให้กลับไปย้อมใหม่ ถ้าเข้มไปให้กลับไปที่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้สีพอดีแล้ว นำสไลด์จุ่มใน แอลกอฮอล์ 100เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดยจุ่มในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยหยดเปอร์เมาท์ (permount) เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร

## การเตรียมสารเคมีและสีย้อม

<u>น้ำยาคงสภาพ</u>

1. น้ำยาล้างเนื้อเยื่อก่อนคงสภาพ

Normal saline (NaCl) 0.9 %

2. น้ำยารักษาสภาพ Neutral Buffer Formalin Solution (Drury *et al.*, 1967)

| | |
|---|---|
| Formalin (30 – 40% formaldehyde) | 100 มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 900 มิลลิลิตร |
| Sodium phosphate monobasic (Na $H_2$ $PO_4$) | 4 กรัม |
| Sodium phosphate dibasic ($Na_2$ H $PO_4$) | 6.5 กรัม |

ผสมเข้าด้วยกัน

เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปตามห้องปฏิบัติการต่างๆ เหมาะสำหรับรักษาสภาพเนื้อเยื่อทั่วไปทั้งที่ต้องการย้อมสีธรรมดาและสีพิเศษ Formalin จะเป็นตัวคงสภาพโปรตีนในไซโตพลาสซึม ระยะเวลาในการรักษาสภาพประมาณ 24 ชั่วโมง หรือถ้าจำเป็นต้องรักษาสภาพนานกว่านี้ก็ยังใช้ได้ ล้างออกด้วยน้ำไหลประมาณ 6 ชั่วโมง (Humason, 1979)

<u>สีและวิธีการย้อม</u>

Harris hematoxylin and Eosin stainning method (Luna, 1968)

1. Harris hematoxylin

| | |
|---|---|
| Hematoxylin crystal | 5 กรัม |
| Absolute ethyl alcohol | 50 มิลลิลิตร |
| Ammonium alum or potassium alum | 100 กรัม |
| Mercuric oxide (red) | 2.5 กรัม |

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid

นำผลึกสี hematoxylin ละลายใน absolute alcohol แล้วนำไปต้มแยกไว้ และละลาย ammonium alum ในน้ำกลั่น แล้วนำไปต้ม เมื่อทั้งสองส่วนละลายดีแล้ว ผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำกลับไปต้มใหม่ให้เร็วที่สุด (จำกัดเวลาในการต้มประมาณ 1 นาที) ระหว่างนี้ต้องใช้แท่งแก้วคนอยู่ตลอดเวลา แล้วยกลง ค่อยๆ เติม mercuric oxide (red) ลงช้าๆ คนให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปต้มใหม่จนกระทั่งเดือด สีจะกลายเป็นสีม่วงเข้ม ยกลงจากเตา แล้วแช่ลงในภาชนะที่มีน้ำหล่อเย็นจนเย็นพร้อมนำไปใช้ได้ทันที ก่อนใช้เติม glacial acetic acid 2 – 4 มิลลิลิตรต่อสี 100 มิลลิลิตร เพื่อช่วยเพิ่มให้การติดสีนิวเคลียสดีขึ้น ก่อนใช้ต้องกรองสีก่อน และควรเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

2. Eosin solution

2.1 1 % Stock Alcoholic Eosin

| | |
|---|---|
| Eosin Y (water solution) | 1 กรัม |
| น้ำกลั่น 20 | มิลลิลิตร |
| ละลายเข้าด้วยกันแล้วเติม | |
| 95 % Ethyl alcohol | 80 มิลลิลิตร |

2.2 Working solution

| | |
|---|---|
| Stock eosin solution | |
| Ethyl alcohol 80 % | 1 ส่วน |
| Glacial acetic acid | 0.5/100มิลลิลิตร |

3. 1 % Acid alcohol

| | |
|---|---|
| Ethyl alcohol 70 % | 1000มิลลิลิตร |

Hydrochloric 10 มิลลิลิตร

4. Saturate lithium carbonate ($Li_2 CO_3$)

น้ำกลั่น 1000มิลลิลิตร

Lithium carbonate ($Li_2 CO_3$)

ผสม 2 ส่วนเข้าด้วยกันจนกระทั่ง Lithium carbonate ไม่ละลายในน้ำกลั่น

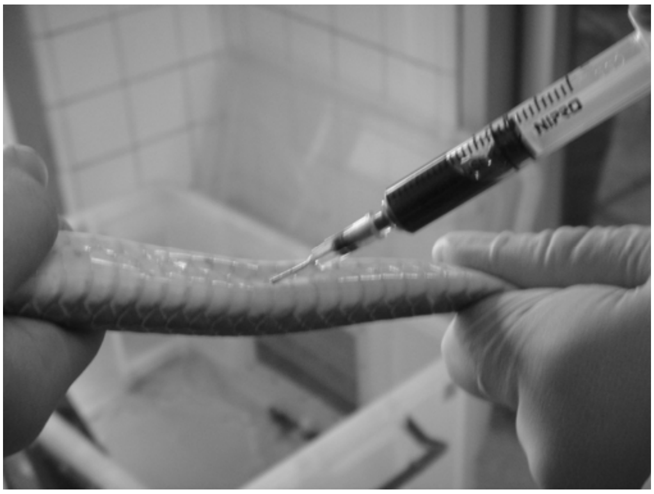
การย้อมสี Harris hematoxylin และ Eosin (Luna, 1968)

1. นำแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อติดอยู่ไป deparaffinized โดยจุ่มใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
2. hydration ใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (100 %, 95 % และ 70 %) ความเข้มข้นละ 2 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น
3. ย้อมสี Harris hematoxylin 5 – 8 นาที
4. ล้างในน้ำประปาที่ไหลจนสี Harris hematoxylin ละลายไปหมด
5. differentiate ใน 1 % acid alcohol โดยจุ่มแล้วยกขึ้นอย่างเร็ว แล้วนำไปล้าง ในน้ำประปาที่ไหล 1 นาที
6. จุ่มใน saturated litium carbonate ($Li_2 CO_3$) 1 นาที
7. นำไปล้างในน้ำประปา (tap water) ที่ไหล 1 นาที
8. ย้อมสี eosin solution นาน 2 นาที
9. จุ่ม ใน 70 % ethyl alcohol แล้วยกขึ้นอย่างเร็ว
10. dehydrate ใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (95 % และ 100 %) ความเข้มข้นละ 2ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. clearing ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
12. mount slide โดยใช้ permount ปิดทับด้วย cover glass

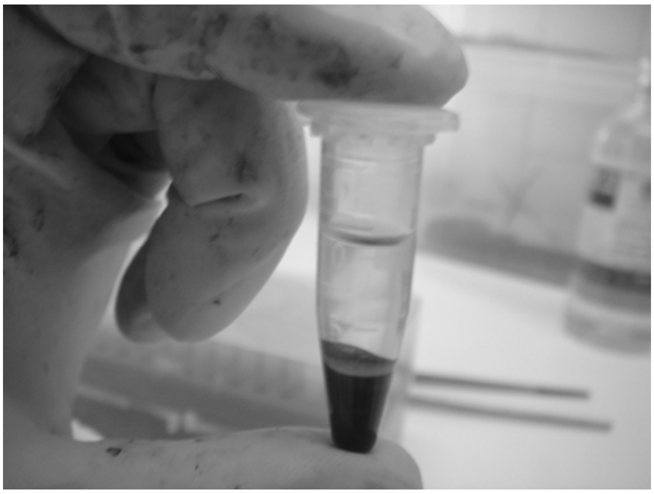
# ภาคผนวก ข

# การเก็บเลือดงู

1. เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำจากด้านท้องของหาง (ภาพที่16)
2. นำเลือดที่ได้เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงจนได้พลาสมา (ภาพที่ 17)
3. ดูดพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C (ภาพที่ 18)




**ภาพผนวกที่ ข1** แสดงวิธีการเจาะเลือดงู; จับงูเห่าสอดท่อ (บน) เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่หาง (ล่าง)



**ภาพผนวกที่ ข2** แสดงเลือดงูที่แยกชั้นจากการปั่นเหวี่ยง; พลาสมาอยู่ส่วนบนหลังจากนำเลือดเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง

**ภาพผนวกที่ ข3** พลาสมางูเห่าไทย

# ภาคผนวก ค

## การสกัดฮอร์โมนเอสตราไดออลจากพลาสมา

1 ดูดตัวอย่างพลาสมา 100 ไมโครลิตร และไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ภาพที่ 19)

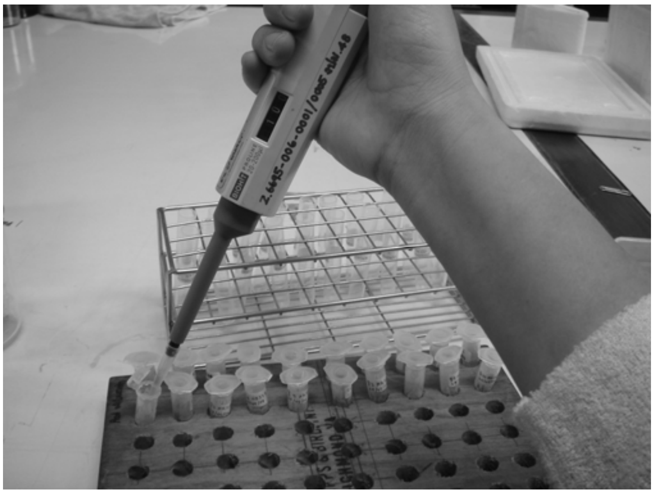
2 เวอร์เทคมิกซ์ นาน 1 นาที

3 นำไปปั่นแยกชั้น 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

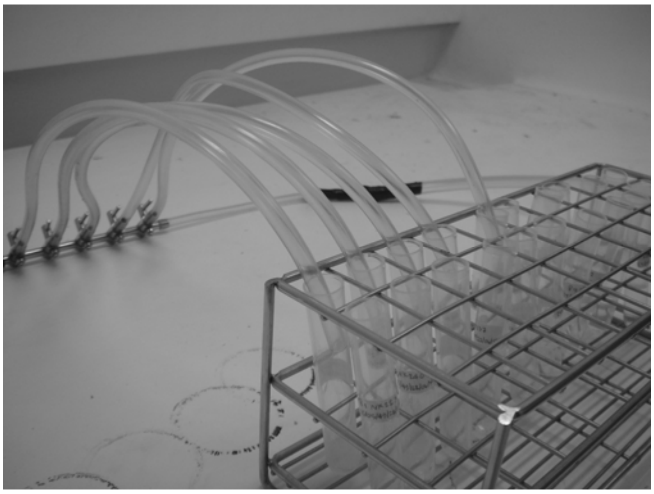
4 นำหลอดทดลองไปแช่น้ำแข็งแห้งเพื่อแยกชั้น

5 ดูดของเหลวชั้นบนใส่ในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด

6 นำไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน (ภาพที่ 20)



**ภาพผนวกที่ ค1** การดูดพลาสมาด้วยไมโครปิเป็ต



**ภาพผนวกที่ ค2** การเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

# ภาคผนวก ง

## การสกัดฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนจากพลาสมา

1 ดูดตัวอย่างพลาสมา 100 ไมโครลิตร และไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ภาพที่ 21)

2 เวอร์เทคมิกซ์ นาน 1 นาที

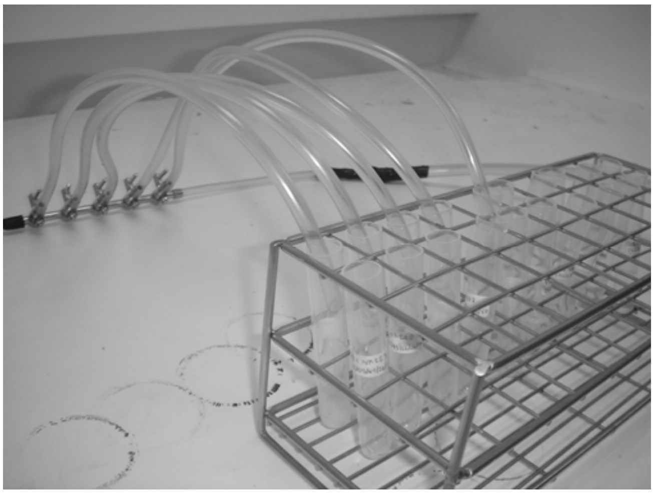
3 นำไปปั่นแยกชั้น 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4 เมื่อแยกชั้นแล้ว ดูดของเหลวชั้นบนออกทิ้ง

5 ดูดของเหลวชั้นล่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด

6 นำไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน (ภาพที่ 22)

**ภาพผนวกที่ ง1** ใช้ไมโครปิเป็ตดูดพลาสมาใส่หลอดทดลอง



**ภาพผนวกที่ ง2** เป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

# ภาคผนวก จ

# การวิเคราะห์ฮอร์โมนเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

1. เตรียมหลอด 2 ชนิด

1.1 หลอดธรรมดาใช้หลอดโพลิโพรไพลีนขนาด 12x75 มิลลิเมตร ติดฉลากหลอดที และหลอดเอ็นเอสบี

1.2 หลอดที่เคลือบแอนติบอดี เตรียมค่ามาตรฐาน 6 ระดับ โดยใช้หลอดที่เคลือบด้วยแอนติบอดีเอสตราไดออล ติดฉลากบนหลอดเป็น เอ (maximum binding, MB) บี ซี ดี อี เอฟ และตัวควบคุม

2. ติดฉลากตัวอย่าง

2.1 ปิเปตคาลิเบรเตอร์เอ (zero calibrator A) 100 มิลลิลิตร ใส่ในเอ็นเอสบี และหลอดเอ

2.2 ปิเปตคาลิเบรเตอร์บี ซี จนถึงจี และตัวควบคุม ใส่ในหลอดที่ทำฉลากไว้

2.3 ปิเปตคาลิเบรเตอร์เอ 120 มิลลิลิตร ใสในตัวอย่างพลาสมาที่สกัดฮอร์โมน เอสตราไดออลแล้ว นำไปเวอร์เท็กซ์มิกซ์ แล้วปิเปตมา 100 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่โค้ดไว้

2.4 ปิเปตไอโอดีน-125 ($^{125}$I Estradiol) ในทุกหลอด แล้วเวอร์เท็กซ์มิกซ์

2.5 บ่ม3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2.6 เทของเหลวในหลอดทิ้ง ยกเว้นหลอดที ทำให้แห้งโดยใช้โฟมดีแคนติงแรค (foam decanting rack) คว่ำหลอดแล้วเคาะแรงๆ บนกระดาษทิชชู รอให้แห้ง

2.7 นับด้วยเครื่องนับรังสีแกมมาเป็นเวลา 1 นาที

2.8 บันทึกค่าซีพีเอ็ม (cpm) แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนเอสตราไดออลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GMS Version 3.05: Gamma – 12 (ภาพที่ 23)

**ภาพผนวกที่ จ1** เครื่องวัดรังสีแกมมา

# ภาคผนวก ฉ

# การวิเคราะห์ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

1 เตรียมหลอด 2 ชนิด

1.1 หลอดธรรมดา (plain tube) ใช้หลอดโพลิโพรไพลิน (polypropylin) ขนาด 13x75 มิลลิเมตร เป็นหลอดหลอดที (total counts)

1.2 หลอดเอ็นเอสบี (nonspecific binding, NSB) เพื่อเตรียมค่าฮอร์โมนมาตรฐาน 4 ระดับ โดยใช้หลอดที่เคลือบด้วยแอนติบอดีเทสทอสเทอโรน ติดฉลากบนหลอดเป็น เอ (maximum binding, MB) บี ซี ดี และ ตัวควบคุม (control)

2 ติดฉลากตัวอย่าง

2.1 ปิเปตคาลิเบรเตอร์เอ (zero calibrator A) 80 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่างพลาสมาที่ทำการสกัดแล้ว นำไปเวอร์เทคมิกซ์ แล้วปิเปตมา 50 ไมโครลิต ใส่ในหลอดที่โค้ดไว้

2.2 ปิเปตคาลิเบรเตอร์เอ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอ็นเอสบี และหลอดเอ

2.3 ปิเปตคาลิเบรเตอร์บี ซี ดี อี เอฟ และตัวควบคุมลงในหลอดที่ทำการติดฉลากไว้แล้ว

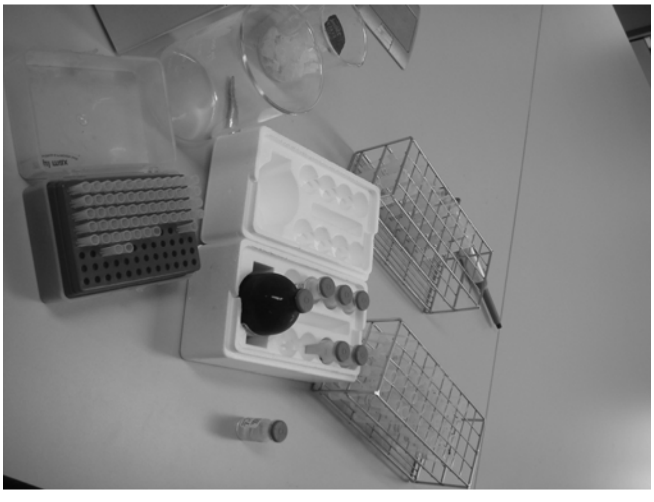
2.4 ปิเปตไอโอดีน-125 ($^{125}$I Total Testosterone) ในทุกหลอด แล้วเวอร์เท็กซ์ (ภาพที่ 25)

2.5 บ่ม (incubate) 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.6 เทของเหลวในหลอดทิ้ง ยกเว้นหลอดที ทำให้แห้งโดใช้โฟมดีแคนติงแรค คว่ำหลอด แล้วเคาะแรงๆ บนกระดาษทิชชู รอให้แห้ง

2.7 นับด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา (gamma counter) เป็นเวลา 1 นาที

2.8 บันทึกค่าซีพีเอม (cpm) แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GMS Version 3.05: GAMMA – C12



**ภาพผนวกที่ ฉ1** ชุดทดสอบฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

| | |
|---|---|
| ชื่อ –นามสกุล | นางสาววรวิทู มีสุข |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด | วันที่ 16 ตุลาคม 2525 |
| สถานที่เกิด | สงขลา |
| ประวัติการศึกษา | วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) |
| | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (หาดใหญ่) |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน | |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน | |
| ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ | |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ |