

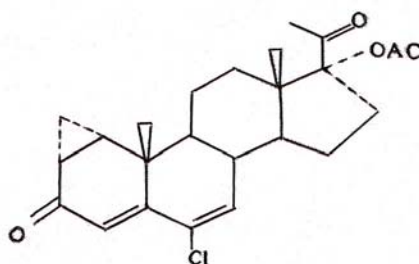
อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

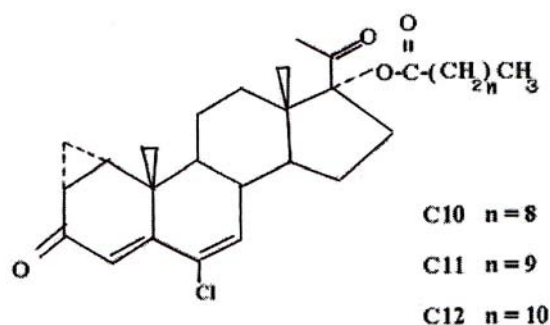
หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์วิสตา อายุ 3 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จำนวนทั้งหมด 105 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงกบลง 8 ตัว โดยกรงทำจากเหล็กไร้สนิม ขนาดของตาข่ายที่ปิดฝากรงมีขนาดของตาข่ายประมาณ 0.85×0.85 เซนติเมตร ภายในห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อุณหภูมิ 24 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้ชื่อกบหยาบเป็นวัสดุรองนอน เนื่องจากมีคุณสมบัติดูดซับสิ่งปฏิกูลได้เป็นอย่างดี ไม่เป็นฝุ่นฟุ้ง และไม่เป็นที่อาศัยของสัตว์ทดลอง เปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 2 วัน ให้น้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูปอย่างไม่จำกัดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง พักหนูก่อนการทดลอง 7 วัน เพื่อให้หนูทดลองปรับตัว

2. สารเคมี

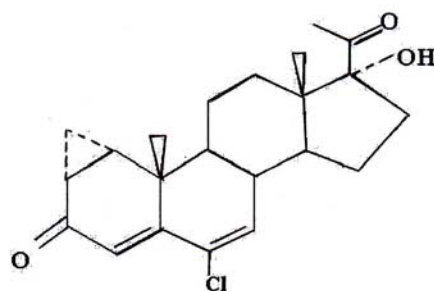
สารเคมีที่นำมาใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด คือ ไสโพรเทอโรนอะซิเตต (CPA) ไสโพรเทอโรนเอสเทอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์เป็นจำนวน 10 คาร์บอนอะตอม (CPC10) ไสโพรเทอโรนเอสเทอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์เป็นจำนวน 11 คาร์บอนอะตอม (CPC11) ไสโพรเทอโรนเอสเทอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์เป็นจำนวน 12 คาร์บอนอะตอม (CPC12) และไสโพรเทอโรน (CPOH) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 10, 11 และ 12 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.บุญส่ง คงคาทิพย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยคุณนราธิป ประดิษฐ์ผล ให้ความอนุเคราะห์เปลี่ยน CPA เป็นไสโพรเทอโรนเอสเทอร์



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ CPA



ภาพที่ 11 โครงสร้างของ CPC10, CPC11 และ CPC12



ภาพที่ 12 โครงสร้างของ CPOH

นำสารเคมีแต่ละชนิดมาละลายในน้ำมันงา โดยใช้ sonicator ช่วยเพิ่มการละลายจนสารละลายได้หมดเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูนขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

3. วิธีการทดลอง

แบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสมบัติเป็นสารละลายไอโซโทนิกต่อเซลล์ (isotonic solution) เพื่อควบคุมปัจจัยความเครียด เนื่องจากการฉีดสาร

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดสารเข้าใต้ผิวหนัง วันเว้นวัน แบ่งเป็น 6 กลุ่มย่อย ดังนี้
 กลุ่มทดลองที่ 1 ฉีดน้ำมันงาขนาด 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว วันเว้นวัน เพื่อตรวจสอบ
 ฤทธิ์ของน้ำมันงา เนื่องจากใช้เป็นตัวทำลาย

กลุ่มทดลองที่ 2 ฉีด CPA ขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
 กลุ่มทดลองที่ 3 ฉีด CPC10 ขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
 กลุ่มทดลองที่ 4 ฉีด CPC11 ขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
 กลุ่มทดลองที่ 5 ฉีด CPC12 ขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
 กลุ่มทดลองที่ 6 ฉีด CPOH ขนาด 0.45 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระยะเวลาในการทดลอง 30 วัน โดยนับวันที่ฉีดสารสังเคราะห์วัน
 แรกเป็นวันที่ 1 ของการทดลองและฉีดสารสังเคราะห์วันเว้นวันเป็นเวลา 30 วัน เมื่อทดลองครบ
 30 วันแล้ว ในวันที่ 31 สลบหนูด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ เพื่อ
 ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

4.1 เก็บตัวอย่างหนูในวันที่ 31 โดยเก็บตัวอย่างอวัยวะ ท่อพักเชื้ออสุจิ ตับและไต ล้าง
 ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วคงสภาพใน neutral buffered formalin
 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีความหนา
 ประมาณ 5 มิลลิเมตร ล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำประปาไหลผ่านตลอดเวลาใช้เวลาอย่าง
 น้อย 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำยาคงสภาพหมดไป

4.2 นำเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการพาราฟินเทคนิค ตามวิธีของ Humason (1972)
 (ภาคผนวก) ตั้งแต่กระบวนการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อจนถึงการแทรกซึมด้วยพาราฟลาสทำใน
 เครื่อง automatic tissue processor จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปฝังในพาราฟลาสตัดเป็นแผ่นบาง ๆ
 (section) ด้วย rotary microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ลอยในอ่างอุณหภูมิ 45 องศา
 เซลเซียส นำเนื้อเยื่อที่ตัดด้วย rotary microtome ไปติดบนสไลด์แล้วย้อมสี H&E (ภาคผนวก)
 เพื่อนำไปตรวจการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. วิเคราะห์ผล

5.1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอัตรา ตามวิธีการของ Kaufman *et al.* (1956) และ Riengrojpitak (1977) แบ่งตามระดับการเปลี่ยนแปลงที่พบในท่อสร้างอสุจิ ได้เป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 เซลล์อสุจิมียังมีจำนวนมากบรรจุอยู่กลางท่อ เซลล์สร้างอสุจิระยะต่าง ๆ เป็นปกติ (ภาพที่ 13)

ระดับ 1 จำนวนเซลล์อสุจิลดลง และสเปิร์มาติดบางเซลล์เสื่อม (ภาพที่ 14)

ระดับ 2 จำนวนเซลล์อสุจิลดลงอย่างเด่นชัด และสเปิร์มาติดส่วนใหญ่เสื่อม มีท่อสร้างอสุจิจำนวนน้อยที่ปกติ (ภาพที่ 15)

ระดับ 3 ท่อสร้างอสุจิทุกท่อแสดงลักษณะเหมือนกันคือ ไม่พบเซลล์อสุจิ สเปิร์มาไทต์ลดลง และอาจพบสเปิร์มาโทโกเนียเสื่อม (ภาพที่ 16 และ 17)

ระดับ 4 ในท่อสร้างอสุจิเหลือเพียงสเปิร์มาโทโกเนีย บางท่ออาจยังคงพบสเปิร์มาติด และสเปิร์มาโทไซด์ที่เสื่อม (ภาพที่ 19 และ 20)

ระดับ 5 ในท่อสร้างอสุจิเหลือเพียงเซลล์เซอร์โทลี อาจพบสเปิร์มาโทโกเนียได้ในบางท่อ

5.2 วิเคราะห์ทางสถิติ ตามวิธีของ บุญชม (2547) และ จรัญ (2549)

6. สถานที่ดำเนินการทดลอง

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

7. ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2546 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2548