



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิชั่วคราวและลดระดับเทสโทสเตอโรน
ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกในหนูวistarแรท

Temporal Antispermatogetic and Lowered Total Testosterone Effect
of *Momordica charantia* Seed Extracts in Wistar Rats

นามผู้วิจัย นายวิชา พลอยภัทรภิญโญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พนัส ธรรมกิตติวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์บุญเกื้อ วัชรเสถียร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิชั่วคราวและลดระดับเทสโทสเตอโรนของสารสกัดเมล็ดมะระ
จีนกในหนูวิสตาแรท

Temporal Antispermato-genic and Lowered Total Testosterone Effect of *Momordica charantia*
Seed Extracts in Wistar Rats

โดย

นายวิชา พลอยภักทรภิญโญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

พ.ศ. 2554

รวิชา พลอยภัทรภิญโญ 2554: ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิชั่วคราวและลดระดับ
เทสโทสเทอโรนของสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกในหนูวิสตาร์แรท ปรินญาวิทยาสาสตร
มหบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์พนัส ธรรมกิตติวงศ์, Ph.D. 129 หน้า

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกซึ่งสกัดโดยเอทิลแอลกอฮอล์โดยวิธีการชอกซ์
เลตต่อการลดความสมบูรณ์พันธุ์ชั่วคราวหนูแรทเพศผู้ โดยกลุ่มควบคุมป้อนไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 1
มิลลิลิตรต่อวัน กลุ่มทดลองป้อนสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 และ 800 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อ 1
กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันซึ่งละลายในไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ป้อนต่อเนื่องกัน 42 วัน
จากนั้นหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 14 วัน ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์วันที่ 42
และ 56 ของการทดลอง พบว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน ลดขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิ ความหนาแน่นสเปิร์มาติด ความสมบูรณ์พันธุ์ การ
ผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว
เฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของ
อโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ระดับเทสโทสเทอโรนในของเหลวอันทะและพลาสมาเลือดอย่าง
มีนัยสำคัญ จากการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่ออันทะพบหลอดสร้างอสุจิฝ่อ เซลล์ใน
กระบวนการสร้างอสุจิต่อตัวออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิ ปรากฏภาวะพิคโนซิสของนิวเคลียส
และพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส ส่วนเนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิปรากฏพลาสมาเซลล์และ
เซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และอสุจิระยะเต็มวัยลดลง หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะ
ระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าความผิดปกติเหล่านี้กลับคืนสู่สภาพปกติ กล่าวสรุปว่าฤทธิ์ยับยั้งความ
สมบูรณ์พันธุ์ชั่วคราวสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกลดระดับเทสโทสเทอโรนในของเหลวอันทะและ
พลาสมาเลือด ส่งผลให้การทำงานของอันทะและหลอดเก็บอสุจิบกพร่องจนทำให้ปริมาณและ
คุณภาพอสุจิลดลง

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Ravicha Ploypattarapinyo 2011: Temporal Antispermatic and Lowered Total Testosterone Effect of *Momordica charantia* Seed Extracts in Wistar Rats. Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Associate Professor Panus Tumkiratiwong, Ph.D. 129 pages.

The objectives of this study were to investigate the reversible antifertility effect of *M. charantia* ethanolic seed extract. The controlled group was provided 1 ml DMSO/d and the experimental group II and III were given 400 and 800 mg/kgbw/d of *M. charantia* seed extract dissolved in 1 ml DMSO via esophageal route. They were orally administered for 42 consecutive days and withdrawn the extract for 14 days. Antifertility effect of *M. charantia* seed extracts was observed at day 42 and 56. At day 42, *M. charantia* seed extract demonstrated a significant reduction in the diameters of the seminiferous tubules and epididymis, spermatid density, fertility, daily sperm production, numbers of spermatozoa in caudal epididymis, sperm motility, viable spermatozoa, normal morphology of spermatozoa, integrity of acrosome and membrane and testicular and blood plasma total testosterone. Pathology changes of the testis in some of the seminiferous tubules revealed tubular atrophy, desquamation, pyknosis nucleus and multinucleated giant cells. Plasma cells, multinucleated giant cells and loss of spermatozoa were evident in the epididymis. After treatment withdrawal for 14 days, all altered parameters, in group II and III, restored to normal. It suggests that the reduced fertility was attributed to the reduced testicular and blood plasma total testosterone, which disturbed functional of testis and epididymis causing reduced sperm parameters.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____/____/____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณรศ. ดร. พันธุ์ ธรรมกิริตวงศ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและชี้แนะ
แนวทางในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และ
ขอกราบขอบพระคุณผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัยที่ช่วยให้คำแนะนำเพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์
ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชาสัตววิทยา ที่ให้ความกรุณาสับสนุนทุนวิจัยและเครื่องมือ
ในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ซึ่งคอยเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมาและขอบคุณ
เพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

รวิชา พลอยภัทรภิญโญ

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	46
ผล	46
วิจารณ์	79
สรุป	87
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ภาคผนวก	104
ภาคผนวก ก รูปภาพประกอบ	105
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	119
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีและสีข้อมทาง Paraffin Technique	124
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	129

สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่

หน้า

- ข1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายโมดิไฟด์ไทโรด
 (Modified Tyrode's medium) (Sperm TALP; TA=modified
 Tyrode with albumin, L=lactate, P=pyruvate)
 ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

120

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 มะเร็งขึ้นก	7
2 กระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศจากสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล	12
3 กลไกการออกฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรน	14
4 โปรตีนตัวพาผลิตขึ้นในไฮโปทาลามัสของเซลล์เซอร์โทลิภายใต้อิทธิพลของ ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน	15
5 โครงสร้างของแอนโดรสเตอโรน อีพีแอนโดรสเตอโรน และอีทีโอโคลาโนโลน	17
6 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในกระบวนการสร้างอสุจิหนูแรท	19
7 เยื่อบุผิวหลอดสร้างอสุจิ	20
8 เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดบี 2 (B 2)	21
9 รูปร่างที่แตกต่างกันของอสุจิส่วนหัวของหนูแรท หนูเมาส์และมนุษย์	24
10 วัฏจักร (cycle) ของเยื่อบุผิวหลอดสร้างอสุจิแสดงตามเวลา (วัน)	26
11 วัฏจักรการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์หนูแรท	27
12 คลื่นของกระบวนการสร้างอสุจิ	28
13 การนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่อง (R) ของเครื่องนับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า	40
14 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง ตลอดการทดลอง 56 วัน	46
15 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะ (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	47
16 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) ของหลอดเก็บอสุจิ หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
17	การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัว) ของต่อมลูกหมาก หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	49
18	การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัว) ของต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	50
19	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดสร้างอสุจิ (ไมโครเมตร) แต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	51
20	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเก็บอสุจิส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย (ไมโครเมตร) แต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	53
21	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	54
22	ค่าเฉลี่ยจำนวนสเปิร์มาโทไซด์เฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	55
23	ค่าเฉลี่ยจำนวนสเปิร์มาทิดเฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	56
24	เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบก่อนเริ่มการทดลอง (ช่วงก่อนทดสอบสารสกัด) วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	57
25	การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน (10^6 ตัวต่อ 1 กรัมเนื้อเยื่ออัณฑะต่อวัน) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย (10^6 ตัวต่อ 1 กรัมเนื้อเยื่อ) ของ หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	60
27 เปอร์เซ็นต์อสุจิก่อนไหลเฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	61
28 เปอร์เซ็นต์อสุจิมิชีวิตเฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	62
29 เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	64
30 เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติแบบต่าง ๆ ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	65
31 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	66
32 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิของหนูวิสตาร์แรท แต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)	67
33 ระดับทดสอบเทอโรโนในของเหลวอันทะเจเลีย (นาโนกรัม/ 1 มิลลิตร) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด)	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
34	ระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดเฉลี่ย (นาโนกรัม/ 1 มิลลิลิตร) ของหนูวิสตาร์แรพแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด)	69
35	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางอัมตะของหนูเมื่อทดสอบผลของสารสกัดเป็นเวลา 42 วัน	71
36	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางอัมตะของหนูภายหลังหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา 14 วัน	72
37	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางของหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของหนู	74
38	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางของหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของหนู	76
39	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางของหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของหนู	78
ภาพผนวกที่		
ก1	การเตรียมสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก	106
ก2	การป้อนสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก	107
ก3	การเกลี่ยป้ายช่องคลอด (vaginal smear)	108
ก4	ระยะโปรเอสตรัส (Proestrous)	109
ก5	ระยะเอสตรัส (Estrous)	109
ก6	ระยะเมทเอสตรัส (Metestrous)	110
ก7	ระยะไดเอสตรัส (Diestrous)	110
ก8	อสุจิที่ค้างอยู่ในช่องคลอดหนู	111
ก9	มดลูกของหนูทดลอง	112
ก10	คอร์ปัสลูเตียมบนรังไข่	113
ก11	อสุจิหนูที่ย้อมสีอีโอซิน-นิโกรซิน	114
ก12	อสุจิที่ย้อมสีดิฟเฟอริก	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก13 อสุจิที่ย้อมด้วยสีคูแมสซึบดู	116
ก14 การย้อมสี แอกกูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซโทโอโซยานะต ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์และโพธิ์เทียมไอโอไดค์	117
ก15 ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา	118

ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิชั่วคราวและลดระดับเทสโทสเตอโรนของ สารสกัดเมล็ดมะระจีนกในหนูวistarแรท

Temporal Antispermatogetic and Lowered Total Testosterone Effect of *Momordica charantia* Seed Extracts in Wistar Rats

คำนำ

การคุมกำเนิดในเพศชายปัจจุบันยังมีข้อจำกัด วิธีที่ใช้ประกอบด้วยการทำหมันชั่วคราว ใช้ฮอร์โมน ใชยาเม็ดบางชนิด เช่น ไนเฟดิพีน (nifedipine) และการใช้ถุงยางอนามัยซึ่งแม้จะป้องกันโรคได้แต่ยังมีข้อผิดพลาดและไม่นิยมใช้ในคู่สามีภรรยา บวกกับแนวคิดที่ว่า การคุมกำเนิดในเพศชายซับซ้อนกว่าเพศหญิงด้วยสาเหตุที่ผู้หญิงผลิตไข่เพียงเดือนละฟองแต่ผู้ชายผลิตอสุจิหลายล้านตัวต่อวัน (NICHD, 2000) งานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งค้นคว้าและวิจัยยาคุมกำเนิดในเพศชายเพื่อทดแทนข้อผิดพลาดและข้อจำกัดจากวิธีคุมกำเนิดเดิมที่มีอยู่ โดยพบว่ายาหรือสารต่าง ๆ มีผลกับอสุจิต่างกันไป บางชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิหรือลดคุณภาพอสุจิ (Mosher and Pratt, 1991) สารสกัดจากพืชบางชนิดในตลาดยาได้รับการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูง เช่น กอสซิปอล (gossypol) ว่านเจ้าพ่อฟ้าผ่า (*Tripterygium wilfordii*) นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดมะละกอและน้ำมันสะเดามีคุณสมบัติลดความสมบูรณ์พันธุ์เช่นเดียวกัน การวิจัยลดความสมบูรณ์พันธุ์เพศชายโดยใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับประเทศไทย โดยพืชในอุดมคติชนิดนี้คือ ‘มะระจีนก’ (*Momordica charantia*) ใ้รับประทานเป็นผักพื้นบ้านและเป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Naseem *et al.*, 1998) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิในสัตว์ทดลอง มีรายงานว่าความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลงมีสาเหตุสำคัญจากกระบวนการสร้างอสุจิที่เสียหาย (Mali *et al.*, 2002) แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ประจักษ์ พืชสมุนไพรบางชนิดออกฤทธิ์ทางอ้อมผ่านการยับยั้งแกนไฮโปธาลามัส-ต่อมใต้สมองส่วนหน้า-อันทะ (hypothalamic-pituitary-gonadal axis) บางชนิดอาจออกฤทธิ์โดยตรงที่ต่อมเพศ (gonad) โดยลดปริมาณและคุณภาพของอสุจิ (sperm) ในน้ำเชื้อ เนื่องจากผลอ่อนมะระจีนกเป็นที่นิยมรับประทาน แต่ส่วนเมล็ดยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์ ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของเมล็ดมะระจีนกมาสำรวจฤทธิ์คุมกำเนิดเพศชายชั่วคราว ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอสุจิซึ่งประกอบด้วยการผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ความ

สมบูรณ์ของโครโซม และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิ สํารวจฤทธิ์ลดระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอํันตะและพลาสมาเลือด และศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออํันตะและหลอดเก็บอสุจิ ผู้วิจัยคาดหวังว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก็มีแนวโน้มประยุกต์ใช้เป็นยาคุมกำเนิดเพศชายชั่วคราวที่ปราศจากฮอร์โมน มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในอนาคตต่อไป



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศผู้ชั่วคราว (temporal fertility) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก
2. ศึกษาฤทธิ์ลดปริมาณอสุจิซึ่งประกอบด้วย การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน (daily sperm production) และจำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย (spermatic count of caudal epididymis) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก
3. ศึกษาฤทธิ์ลดคุณภาพอสุจิซึ่งประกอบด้วย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย (percent sperm motility) เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย (percent live spermatozoa) เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย (percent normal sperm morphology) เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซม (percent acrosomal intactness) เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (percent acrosomal and membrane intactness) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก
4. ศึกษาฤทธิ์ลดระดับเทสโทสเตอโรน (testosterone) ในของเหลวอันทะ (seminal plasma) และพลาสมาเลือด (blood plasma) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก
5. ศึกษาฤทธิ์ทางพยาธิวิทยา (pathology) ของอันทะ หลอดเก็บอสุจิ (epididymis) ส่วนต้น (caput) ส่วนกลาง (corpus) และส่วนปลาย (cauda) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก

การตรวจเอกสาร

มะระจีน

1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

มะระจีนมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่าโมมอร์ดิกาคาแรนเทีย (*Momordica charantia* L.) จัดอยู่ในตระกูลแตง (Cucurbitaceae) สกุลโมมอร์ดิกา (*Momordica*) เป็นพืชที่พบอยู่ทั่วไปในเขตร้อน (Choomsai, 1982)

1.1 ชื่อสามัญ

มะระจีน (ชื่อเรียกทั่วไป) ผักห้า (ภาคอีสาน) มาสา (ภาคเหนือ) (Choomsai, 1982)

1.2 ชื่อพื้นเมือง

บิทเทอร์เกร์ท (bitter gourd), บอลเซิมแอปเปิ้ล (balsam apple) (อังกฤษ/อเมริกา), ปาโรกา (paroka) (ฝรั่งเศส), คาเรลลี (caraille), บอลซามินา (balsamina) (อินเดีย), คาราวีลา (karawila) (ศรีลังกา), ฟุคัว (fu kwa) (จีน), นิกายูริ (nigai uri), ฟุโตเรชิ (futoreishi) (จีน), แอมพาลายา (ampalaya) (ฟิลิปปินส์), เพอริยาลาท (periya laut) (มาเลเซีย), ซีราซี (cerasee) (จาไมกา, ทรินิแดด, บาฮามัส), คุนเดียมอร์ (cundeamor) (เม็กซิโก, คิวบา, เปอร์โตริโก), เซตานโน (caetano), มีเลาเดอซา (melao-de-sao) (บราซิล) และคาเคิล (kakle) (แอฟริกาตะวันออก) (Choomsai, 1982)

1.3 การเพาะปลูก

มะระจีนเป็นพืชหาง่าย ราคาถูก หาซื้อได้ตลอดทั้งปี นิยมนำผลอ่อนมาปรุงเป็นอาหารหลายชนิด ส่วนผลสุกไม่นิยมรับประทาน มีการเพาะปลูกในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชีย อเมริกา (Amazon) และแคริบเบียน (caribbean) ใช้เป็น

ผักรับประทานรวมทั้งใช้เป็นยาพื้นบ้าน (Grover and Yadav, 2004) โดยเฉพาะประเทศอินเดีย เพาะปลูกที่ระดับความสูง (altitude) 1,500 ม. มะระขึ้นกรเริ่มออกดอกหลังเพาะประมาณ 30-35 วัน ระยะเวลาเก็บเกี่ยวประมาณ 15-20 วันหลังออกดอก โดยเก็บเกี่ยวในฤดูร้อนระหว่างเดือนเมษายน-กรกฎาคม (Kumar *et al.*, 2010)

1.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะระขึ้นกรเป็นพืชล้มลุก ไร้ขนยาว ลำต้นเป็นเถาเลื้อย ดอกเจริญมาจากข้อ ต้นโตเต็มที่อาจสูงถึง 6 เมตรหรือมากกว่า (Scartezzini and Speroni, 2000; Grover and Yadav, 2004)

ผล

ผลรูปเหลี่ยม ผิวเปลือกขรุขระ มีปุ่มยื่นออกมา โดยทั่วไปผลมีขนาดยาวประมาณ 5-15 ซม. คล้ายผลแตงกวา รูปร่างคล้ายกระสวย เส้นผ่านศูนย์กลางของผลประมาณ 2.5-3 ซม. ผลอ่อนมีสีเขียว (ภาพที่ 1-ก) กลายเป็นสีส้มเหลือง (ภาพที่ 1-ข) เมื่อสุกงอม (Sathishsekar and Subramanian, 2005)

เมล็ด

เมล็ดมีลักษณะแบน คอคบรีเวณปลาย เปลือกหุ้มเมล็ดของผลอ่อนมีสีขาวและกลายเป็นสีแดง (ภาพที่ 1-ค) เมื่อผลสุก (Scartezzini and Speroni, 2000; Grover and Yadav, 2004)

ดอก

ดอกเป็นดอกเดี่ยว มีสีเหลือง (ภาพที่ 1-ง) ขนาด 1-1.5 ซม. เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่คนละดอก มีก้านดอกยาว 5-6 ซม. และมีกลีบใบหุ้มดอกขนาด 7-10 มม. (Scartezzini and Speroni, 2000; Grover and Yadav, 2004)

ใบ

ใบ (ภาพที่ 1-จ) เป็นใบเดี่ยวขอบใบหยักและเว้าลึก ยาวประมาณ 5-12 ซม. และเรียงสลับกันบนก้านใบ (Scartezzini and Speroni, 2000; Grover and Yadav, 2004)





ก



ข



ค



ง



จ

ภาพที่ 1 มะระจีนก

- ก. ผลอ่อนมะระจีนก
- ข. ผลสุกมะระจีนก
- ค. เมล็ดมะระจีนก
- ง. ดอกมะระจีนก
- จ. ใบมะระจีนก

2. องค์ประกอบทางเคมีของมะระจีน

สารออกฤทธิ์ทางเคมีของมะระจีนได้แก่โมมอร์คาร์นิน (momorcharins) โมมอร์ดีนอล (momordenols) โมมอร์ดิซิลิน (momordicilins) โมมอร์ดิซิน (momordicins) โมมอร์ดิซินิน (momordicinin) โมมอร์ดิน (momordin) โมมอร์โดลอล (momordolol) คาแรนทิน (charantin) คารีน (charine) คริปโทแซนทิน (cryptoxanthin) คูเคอร์บีทิน (cucurbitins) คูเคอร์บีทาซิน (cucurbitacins) คูเคอร์บีเทน (cucurbitanes) ไซโคลอาร์ทีนอล (cycloartenols) ไดออกซีจีนิน (diosgenin) กรดอีเลโอสเตียริก (elaeostearic acids) อิริโทรไดออล (erythrodol) กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acids) กรดเจนทิซิก (gentisic acid) โกยาไกลโคไซด์ (goyaglycosides) โกยาซาโปนิน (goyasaponins) มัลติฟลอเรนอล (multiflorenol) (Husain *et al.*, 1994; Scartezzini and Speroni, 2000; Parkash *et al.*, 2002) ไกลโคไซด์ (glycosides) ซาโปนิน (saponins) อัลคาลอยด์ (alkaloids) ไตรเทอร์ปีน (triterpenes) โปรตีน (proteins) และสเตอรอยด์ (steroids) (Grover and Yadav, 2004) อย่างไรก็ตามส่วนยอด ผลอ่อน ผลสุก เมล็ด และใบของมะระจีนมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน

2.1 องค์ประกอบที่พบในยอด

พบองค์ประกอบหลายชนิดในยอดมะระจีน เช่น เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) ไมร์ทีนอล (myrtenol) ซิส-3-เฮกซานอล (*cis*-3-hexenol) ทรานส์-2-เฮกซานอล (*trans*-2-hexenal) 1-เพนเทน-3-ออล (1-penten-3-ol) ซิส-2-เพนเทน-1-ออล (*cis*-2-penten-1-ol) (Scartezzini and Speroni, 2000)

2.2 องค์ประกอบที่พบในผลอ่อน

ผลอ่อนมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นโมมอร์ดิโคไซด์ชนิดจี (momordicosides G) ชนิดเอฟ-1 (momordicosides F1) ชนิดเอฟ-2 (momordicosides F2) และโมมอร์ดิโคไซด์ชนิดไอ (momordicosides I)

2.3 องค์ประกอบที่พบในผลสุก

ผลสุกมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นโมมอร์ดิกโคไซด์ชนิดเค (momordicosides K) และชนิดแอล (momordicosides L) เอซิลไกลโคซิลสเตอรอล (acylglycosylsterols) เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) ไมร์ทีนอล (myrtenol) ซิส-3-เฮกซานอล (*cis*-3-hexenol) ทรานส์-2-เฮกซานอล (*trans*-2-hexenal) 1-เพนเทน-3-ออล (1-penten-3-ol) ซิส-2-เพนเทน-1-ออล (*cis*-2-penten-1-ol) คาแรนทีน (charantins) สติกแมส-5,25-ไดอิน-3เบตา-โอ-กลูโคไซด์ (stigmast-5,25-diene-3 β -o-glucoside) ทรานส์-2-เฮกซานาล (*trans*-2-hexenal) (Scartezzini and Speroni, 2000)

2.4 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในเมล็ด

เมล็ดมีองค์ประกอบด้วยสารเบตา-ไซโตสเตอรอล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ (β -sitosterol- β -D-glucoside) กรดสเตียริก (stearic acid) เลกติน (lectins) ไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycosides) สองชนิดได้แก่โมมอร์ดิกโคไซด์ชนิดเอและบี (momordicosides A และ B) ไซโทไคนิน (cytokinins) สองชนิดได้แก่เซียติน (zeatin) และเซียตินไรโบไซด์ (zeatin riboside) โปรตีนสองชนิดได้แก่โมมอร์ดิการินชนิดแอลฟา (α) และชนิดเบตา (β) พินิมิน (p-cymene) เฮกซะเดคานอล (hexadecanol) เมนทอล (menthol) เนโรไลดอล (nerolidol) เพนตะเดคานอล (pentadecanol) สควอลีน (squalene) 10-แอลฟา-คิวเคอร์บิท 5,24-ไดอิน-3เบตา-ออล (10 α -cucurbit-5,24-dien-3 β -ol) 24-เมทิลเอนไซโคลอาร์ทานอล (24-methylencycloartanol) ทาราเซอรอล (taraxerol) อะไมรินชนิดเบตา (β -amyrin) แคมเพสเตอร์ (campesterol) ไซโคลยูคาลีนอล (cycloeucalenol) 24-เบตา-เอทิล-5แอลฟา-คอเลสเตรา-7-ทรานส์-22-ไดอิน-3เบตา-ออล (24 β -ethyl-5 α -cholesta-7-trans-22-dien-3 β -ol) 24-เบตา-เอทิล-5แอลฟา-คอเลสเตรา-7-ทรานส์-22,25(27)-ไดอิน-3เบตา-ออล (24 β -ethyl-5 α -cholesta-7-trans-22,25(27)-trien-3 β -ol) โลเฟโนล (lophenol) 4-แอลฟา-เมทิลไซโมสเตอร์ (4 α -methylzymosterol) ออบทูซิโฟลิโอล (obtusifoliol) สไปนาสเตอร์ (spinasterol) สติกมาสเตอร์ (stigmasterol) สติกมาสเตรา-7,25-ไดอินอล (stigmasta-7,25-dienol) และสติกมาสเตรา-7,22,25-ไดอินอล (stigmasta-7,22,25-trienol) โมมอร์ดิกาแอนติโปรตีน (momordica anti-protein; MAP 30) ไรโบโซมอินแอคทีเวติงโปรตีน (ribosome-inactivating-proteins; RIPs) (Scartezzini and Speroni, 2000)

2.5 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในใบ

ใบมะระจีนประกอบไปด้วยสารออกทาคาเซน (octacosane) 1-ไตรอะคอนทานอล (1-triacontanol) 7-สติกมาสเทน-3เบตา-อล (7-stigmasten-3 β -ol) 7,25-สติกมาสตาไดอิน-3เบตา-อล (7,25-stigmastadien-3 β -ol) 5,25-สติกมาสตาไดอิน-3เบตา-อล (5,25-stigmastadien-3 β -ol) กลูโคไซด์ (glucosides) ฟิโตสฟิงโกซีน (phytosphingosine) โมมอร์ดิซิน-1, -2 และ -3 (momordicine-I, -II and -III) (Scartezzini and Speroni, 2000)

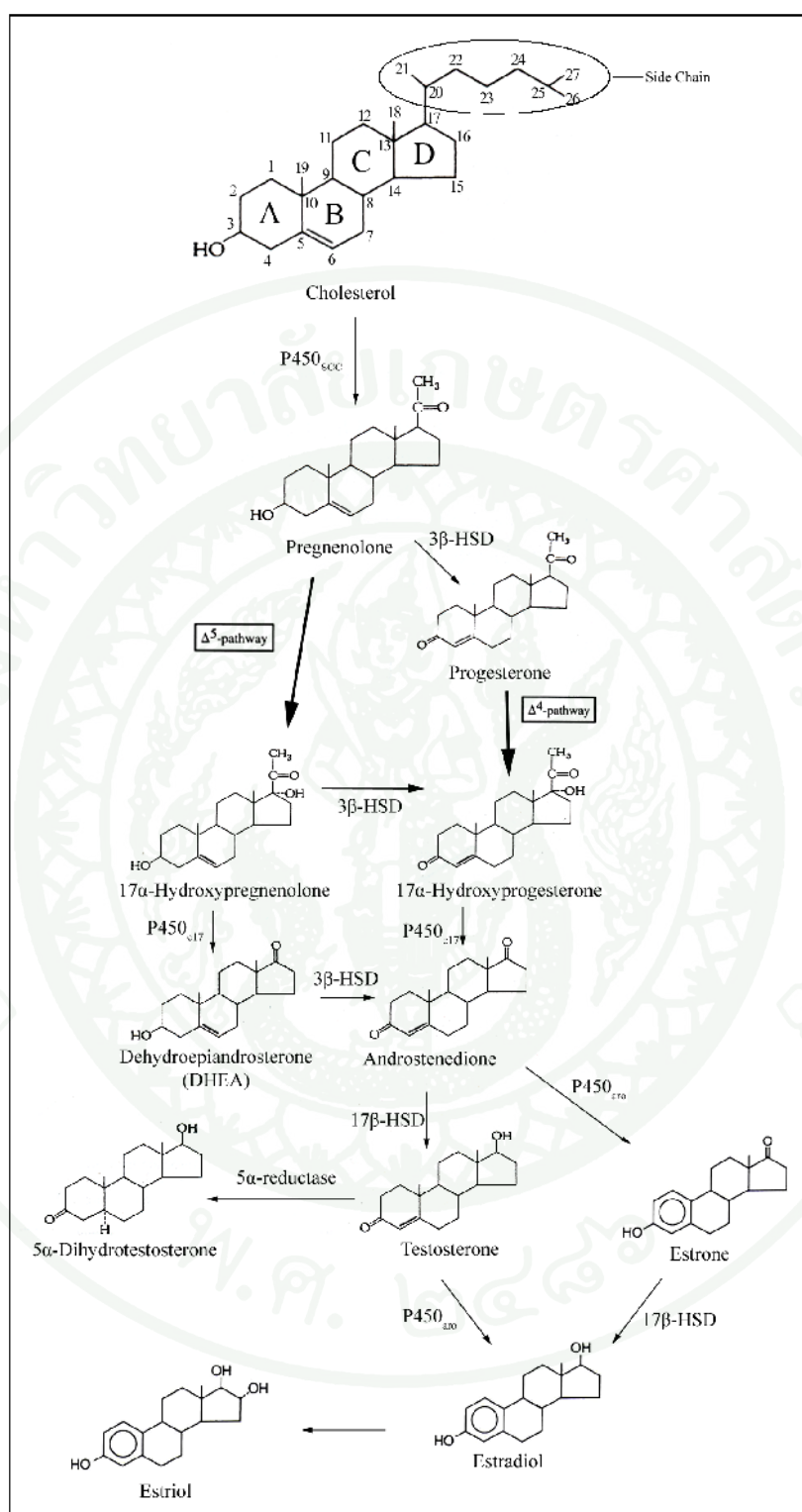
เทสโทสเตอโรน (testosterone)

1. การควบคุม (regulation) การสังเคราะห์เทสโทสเตอโรน

ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) หลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) ซึ่งกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary) ให้สร้างฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมน (follicle-stimulating hormone; FSH) และลูทีไนซิงฮอร์โมน (lutening hormone; LH) โดยลูทีไนซิงฮอร์โมนกระตุ้นเซลล์ลีดิก (Leydig's cell) ในอัณฑะให้ผลิตเทสโทสเตอโรน โดยเทสโทสเตอโรนจะไปยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนและลูทีไนซิงฮอร์โมนแบบย้อนกลับ (negative feedback) ส่งผลให้เซลล์ลีดิกหลังเทสโทสเตอโรนลดลง แต่หากเทสโทสเตอโรนน้อยเกินไปจะมีผลกระตุ้นการหลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนและลูทีไนซิงฮอร์โมนจากไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองส่วนหน้าตามลำดับ ส่งผลให้เซลล์ลีดิกหลังเทสโทสเตอโรนเพิ่มขึ้น เมื่อลูทีไนซิงฮอร์โมนจับกับตัวรับจำเพาะ (LH receptor) เกิดการกระตุ้นโปรตีนจี (G protein) เร่งปฏิกิริยาอะดีโนซิลิไซเคเลส (adenylyl cyclase) เปลี่ยนอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate) เป็นไซคลิกอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (cyclic adenosine monophosphate; cAMP) ซึ่งกระตุ้นโปรตีนไคเนสชนิดเอ (protein kinase A) รูปอัมมัต (inactive forms) เป็นรูปกัมมัต (active forms) โปรตีนไคเนสเอรูปกัมมัตออกฤทธิ์เปลี่ยนโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol esters) เป็นโคเลสเตอรอลและเปลี่ยนโคเลสเตอรอลเป็นเพอร์กินีโนโลนในเวลาต่อมา (Ganong, 1995) เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์เทสโทสเตอโรน

2. การสังเคราะห์ (synthesis)

โคเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้นการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ (ภาพที่ 2) การสังเคราะห์สเตอรอยด์ที่เซลล์ลึดยกของอวัยวะเหมือนกันกับการสังเคราะห์สเตอรอยด์ที่ต่อมหมวกไตส่วนนอกชั้นเรติคูลาริส (zona reticularis) กล่าวคือเอนไซม์ 20-22 เดสโมเลส (20-22 desmolase; P450_{sc}) ตัดพันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 20-22 ของโซ่ข้าง (side chain) ของโคเลสเตอรอล ได้สารเพรกนีโนโลน (pregnenolone) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโปรเจสเตอโรน (progesterone) เพื่อเข้าสู่ปฏิกิริยา (pathway) ของเดลตา 4 (Δ^4) ต่อไปโดยเอนไซม์ 3-เบตาไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 3 β -HSD) ตัดไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีโครงสร้างเบตาตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวงเอ (A ring) เกิดเป็นหมู่คีโตน (ketone) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ของวงเอ ซึ่งหมู่คีโตนเดิมอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 ของวงบี ส่วนสารเพรกนีโนโลนที่ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นโปรเจสเตอโรนจะเข้าสู่ปฏิกิริยาเดลตา 5 โดยเพรกนีโนโลนถูกเปลี่ยนเป็นสารมัธยันต์ 17-แอลฟาไฮดรอกซีเพรกนีโนโลน (17 α -hydroxypregnenolone) ซึ่งต่อมาถูกเปลี่ยนเป็นสารมัธยันต์ดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเทอโรน (dehydroepiandrosterone; DHEA) โดยเอนไซม์ ซี17-ไฮดรอกซีเลส (C₁₇-hydroxylase; P450_{c17} enzyme) ซึ่งสารมัธยันต์ 17-แอลฟาไฮดรอกซีเพรกนีโนโลนและดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเทอโรนถูกเปลี่ยนเป็น 17-แอลฟาไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17 α -hydroxyprogesterone) และแอนโดรสทีนไดโอน (androstenedione) ตามลำดับโดยเอนไซม์ 3-เบตาไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนสตัวเดียวกัน และเอนไซม์ ซี17-ไฮดรอกซีเลส (C₁₇-hydroxylase; P450_{c17} enzyme) เปลี่ยน 17-แอลฟาไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรนเป็นแอนโดรสทีนไดโอนซึ่งถูกเอนไซม์ 17-เบตาไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 17 β -HSD) และอโรมาเทส (aromatase; P450_{aro} enzyme) เปลี่ยนเป็นเทสโทสเตอโรน (testosterone) และเอสโตรน (estrone) ตามลำดับ โดยต่อมาเทสโทสเตอโรนและเอสโตรนถูกเปลี่ยนเป็นเอสตราไดออล (estradiol) โดยเอนไซม์ อโรมาเทส และ 17-เบตาไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนสตามลำดับ และเทสโทสเตอโรนจะถูกเปลี่ยนเป็น 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (5 α -dihydrotestosterone) โดยเอนไซม์ 5-แอลฟารีดักเตส (5 α -reductase) ที่เซลล์เป้าหมายต่อไป และเอสตราไดออลสามารถเปลี่ยนเป็นรูบเอสโตรอล (estriol)



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศจากสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Norris (2007)

3. การคัดหลั่ง (secretion)

อัตราการคัดหลั่งเทสโทสเตอโรนในเพศชายคือ 4-9 มิลลิกรัมต่อวัน (13.9-31.2 นาโนโมล/วัน) ส่วนในเพศหญิงมีการคัดหลั่งเทสโทสเตอโรนในปริมาณน้อยกว่าครึ่งและต่อมหมวกไต

4. การขนส่ง (transportation)

เทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือด (blood plasma) อยู่ในรูปอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์ จับกับอัลบูมิน (albumin) 40 เปอร์เซ็นต์ จับกับโกลบูลิน (globulin) 40 เปอร์เซ็นต์ และจับกับโปรตีนชนิดอื่นอีก 17 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไม่ถูกทำลายหรือถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ ระดับปกติของเทสโทสเตอโรนทั้งหมดของเพศชายและเพศหญิงคือ 0.65 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร (22.5 นาโนโมลต่อลิตร) และ 0.03 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร (1.0 นาโนโมลต่อลิตร) (Hadley, 2000)

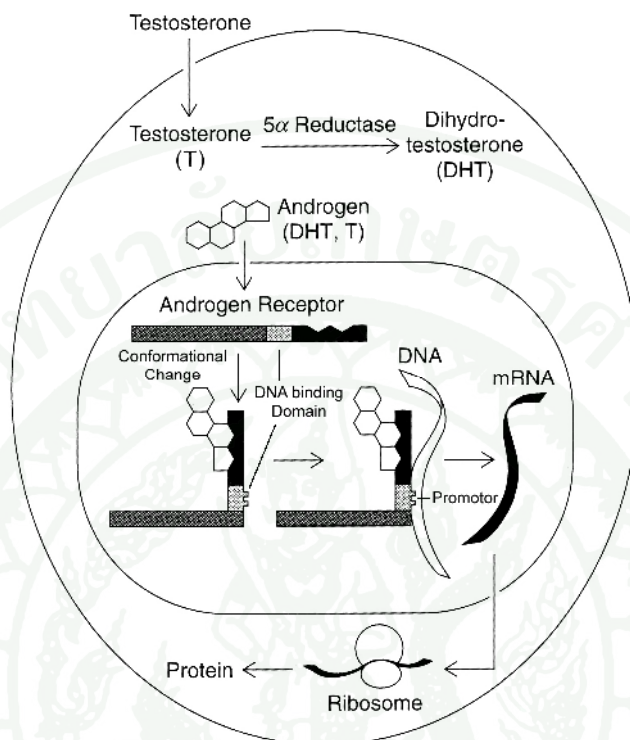
5. เซลล์เป้าหมายของเทสโทสเตอโรน

ที่เซลล์เป้าหมายของเทสโทสเตอโรนและ 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (5 α -dihydrotestosterone; DHT) จะมีตัวรับจำเพาะของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ในนิวเคลียส พบตัวรับจำเพาะนี้มากในนิวเคลียสของเซลล์เซอร์โทไลต์แต่ไม่พบในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ (Griffin and Ojeda, 2000) นอกจากนั้นยังพบตัวรับในหลอดเก็บอสุจิ ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicle) หนังของถุงอัณฑะ (scrotal skin) หลอดนำอสุจิ (vas deferens) และต่อมลูกหมาก (prostate gland) (Demura *et al.*, 1992; Griffin and Ojeda, 2000)

6. การออกฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรน

เทสโทสเตอโรน (T) จะถูกเปลี่ยนเป็น 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (5 α -dihydrotestosterone; 5-DHT) โดยเอนไซม์ 5-แอลฟารีดักเตสในเซลล์เป้าหมาย จากนั้นเทสโทสเตอโรนหรือ 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนจับกับตัวรับจำเพาะของฮอร์โมนเพศชาย (androgen receptor) ในนิวเคลียส จะฟอร์มเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของตัวรับและฮอร์โมน (hormone-receptor complex) ทำให้โดเมนของตัวรับ (DNA binding domain) เปิดออกให้โปรโมเตอร์ (promotor) ของดีเอ็นเอเข้ามาจับ ส่งผลให้อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส (RNA polymerase)

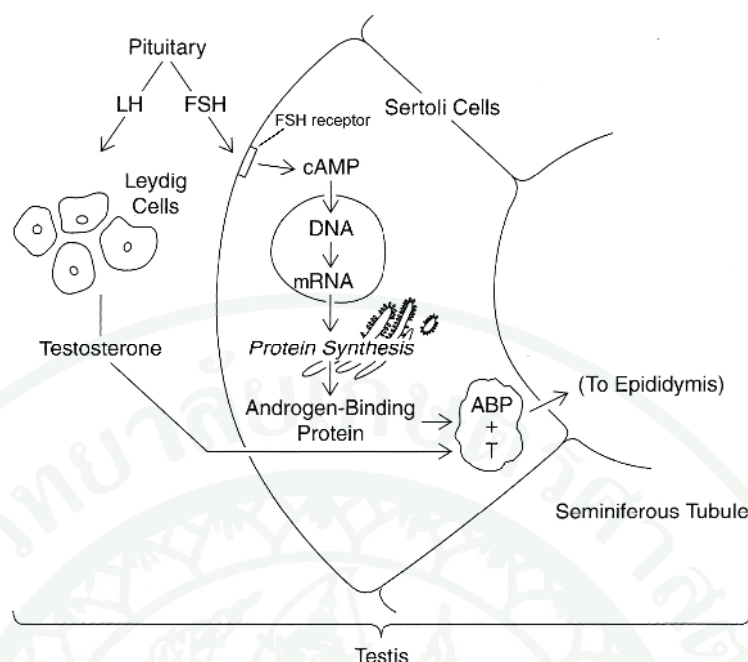
เข้าสู่กระบวนการถอดรหัส (transcription) เพื่อสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger ribonucleic acid; mRNA) สำหรับสังเคราะห์โปรตีนต่อไป (Griffin and Ojeda, 2000; Hadley, 2000) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กลไกการออกฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hadley (2000)

เทสโทสเตอโรนเข้าสู่เซลล์เซอร์โทลิโดยการขนส่งแบบกัมมันต์ (active transport) หรือการแพร่โดยอาศัยตัวพา (facilitated diffusion) จากนั้นเข้าจับกับโปรตีนตัวพา (androgen-binding protein; ABP) ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์เซอร์โทลิ ซึ่งโปรตีนตัวพานี้ผลิตขึ้นจากกระบวนการที่ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมนเข้าจับกับตัวรับจำเพาะ (follicle stimulating hormone receptor; FSH receptor) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เซอร์โทลิ ส่งผลให้เกิดการผลิตไซคลิกอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (cAMP) กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอที่จะแปลรหัส (translation) ได้โปรตีนตัวพา (Hadley, 2000) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โปรตีนตัวพาผลิตขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์เซอร์โทลีภายใต้อิทธิพลของ
ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hadley (2000)

การจับกันระหว่างโปรตีนตัวพากับเทสโทสเตอโรน (ABP+T) ในเซลล์เซอร์โทลีช่วยกักเก็บเทสโทสเตอโรนไว้ในเซลล์เซอร์โทลีก่อนถูกปลดปล่อยออกไปในรูปถุงโดยวิธีเอ็กโซไซโทซิส (vesicular exocytosis) เพื่อขนส่งเทสโทสเตอโรนเข้าสู่หลอดสร้างอสุจิ ช่วยให้เคลื่อนที่เข้าไกลีสเปอร์มาโทไซต์ (spermatocytes) และออกฤทธิ์ทำให้สเปอร์มาโทไซต์เจริญเต็มที่ (maturation) นอกจากนี้โปรตีนตัวพายังช่วยขนส่งเทสโทสเตอโรนจากหลอดสร้างอสุจิเข้าสู่หลอดเก็บอสุจิอีกด้วย (Hadley, 2000) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองทำให้ทราบแน่ชัดว่าการทำงานของหลอดเก็บอสุจิขึ้นกับเทสโทสเตอโรนและ 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (Vreeburg, 1975) สรุปว่าทั้งเทสโทสเตอโรนและ 5-แอลฟาไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิดในหลอดเก็บอสุจิ หากฮอร์โมนทั้งสองชนิดลดปริมาณลงจะส่งผลให้หลอดเก็บอสุจิสูญเสียคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพของอสุจิในการปฏิสนธิ (capacitation) เช่น การพัฒนาความสามารถในการเคลื่อนไหวหรือการเข้าผสมกับเซลล์ไข่ (Dohle *et al.*, 2003)

เทสโทสเทอโรนช่วยรักษากระบวนการสร้างอสุจิให้เป็นไปอย่างสมบูรณ์ ช่วยลดการตายแบบอพอพโตซิส (apoptosis) ของเซลล์สืบพันธุ์และมีผลโดยตรงต่อสภาพในหลอดสร้างอสุจิ สารพาราไครน์ (paracrine) ที่พบภายในหลอดสร้างอสุจิมียหลายชนิด ได้แก่ โกรทแฟกเตอร์ (growth factors) ไซโทไคน์ (cytokines) แอกทีวีน (activins) ซึ่งมีหน้าที่ลดการหลั่งเทสโทสเทอโรน แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน (Dohle *et al.*, 2003) การลดการทำงานของโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมนส่งผลให้อสุจิในน้ำเชื้อลดจำนวนลงและส่งผลให้การสร้างอสุจิต่ำกว่าปกติ (hypospermatogenesis) ถ้าหากไม่มีการผลิตเทสโทสเทอโรนในอวัยวะกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) จะหยุดชะงักลงเกือบทั้งหมดจนถึงขั้นการสร้างสเปิร์มมาติดระดับของเทสโทสเทอโรนที่ต่ำหรือสูงเกินไปทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการสร้างอสุจิซึ่งอาจส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์ได้ มีรายงานว่าการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ของเทสโทสเทอโรนเพื่อช่วยสร้างกล้ามเนื้อในนักกีฬาส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์โดยตรวจพบภาวะน้ำเชื้อมีอสุจิน้อย (oligozoospermia) หรือไร้อสุจิ (azoospermia) และยังพบความผิดปกติในการเคลื่อนไหวของอสุจิและรูปร่างของอสุจิ แต่เมื่อหยุดยาเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าคุณภาพของอสุจิอยู่ในสภาพปกติ อย่างไรก็ตามผลเสียต่อกระบวนการสร้างอสุจียังคงเกิดขึ้นจนกระทั่ง 3 ปีให้หลังหลังจากหยุดยา นอกจากนี้ยังพบว่าเทสโทสเทอโรน ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมนและลูทีไนซิงฮอร์โมนในกระแสเลือดยังคงมีระดับต่ำอีกด้วย ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของผู้ที่เป็นหมันมีระดับเทสโทสเทอโรนในกระแสเลือดต่ำ ซึ่งการรักษาโดยการให้เทสโทสเทอโรนไม่สามารถช่วยให้ร่างกายสร้างอสุจิเพิ่มขึ้น แต่กลับส่งผลยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิแทนเนื่องจากเกิดการควบคุมย้อนกลับแบบยับยั้ง ทำให้ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมนและลูทีไนซิงฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลังลดลง แม้การให้เทสโทสเทอโรนจะทำให้ร่างกายมีเทสโทสเทอโรนในกระแสเลือดสูง อย่างไรก็ตามยังไม่เพียงพอต่อกระบวนการสร้างอสุจิจนอาจทำให้เนื้อเยื่ออวัยวะเกิดความเสียหายและเกิดภาวะไม่มีอสุจิในน้ำเชื้อ (Dohle *et al.*, 2003)

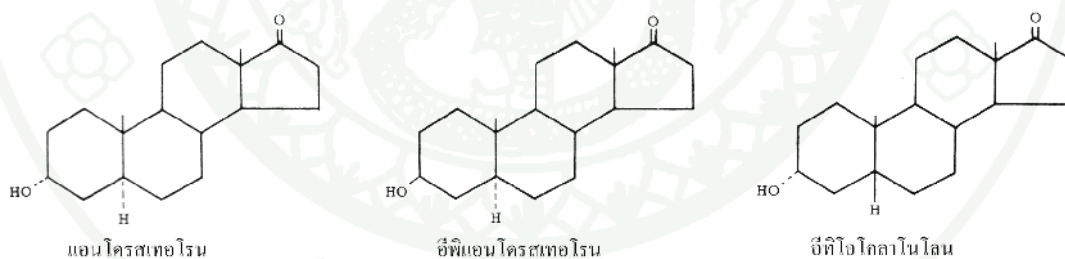
7. การออกฤทธิ์อื่นๆ ของเทสโทสเทอโรน

เทสโทสเทอโรนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาลักษณะเพศชาย มีหน้าที่ในร่างกายตลอดชีวิต ขณะที่ตัวอ่อนอยู่ในครรภ์มารดา เทสโทสเทอโรนจากอวัยวะของตัวอ่อนจะควบคุมการพัฒนาของท่อวูล์ฟเฟียน (Wölfian duct) ซึ่งจะพัฒนาเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ภายในของเพศชาย ได้แก่ หลอดเก็บอสุจิ หลอดนำอสุจิ ต่อมน้ำเลี้ยงอสุจิและท่อฉีดอสุจิ (ejaculatory duct) และควบคุมการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกของเพศชาย ซึ่งได้แก่ การเจริญและการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของถุงอัณฑะและองคชาติ (Hadley, 2000) ช่วงวัยรุ่น (pubertal) จะมีการหลั่ง

เทสโทสเตอโรนในปริมาณสูง ทำให้ร่างกายเปลี่ยนแปลงลักษณะจากวัยเด็กเป็นวัยหนุ่ม กระตุ้นลักษณะเพศชายลำดับที่ 2 (male secondary sexual characteristics) ยกตัวอย่างเช่น กระตุ้นให้องคชาติและถุงอัณฑะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีคล้ำ เกี่ยวข้องกับการเจริญของต่อมลูกหมาก ต่อมน้ำเลี้ยงอสุจิและหลอดเก็บอสุจิ ช่วยให้เกิดเสียง (larynx) และเส้นเสียง (vocal cords) ขยายขนาด น้ำเสียงทุ้ม ไหล่กว้างขึ้น มีขนบริเวณรักแร้ หัวหน้และแขนขา มีหุนวดเครา ก้าวร้าว (aggressive) สนใจเพศตรงข้าม เป็นต้น (Ganong, 1995) ช่วงวัยผู้ใหญ่เทสโทสเตอโรนช่วยกระตุ้นกำหนัด ผสมอสุจิ การมีขน ช่วยพัฒนากระดูกและกล้ามเนื้อให้มีขนาดใหญ่และแข็งแรง

8. เมแทบอลิซึมของเทสโทสเตอโรน

ส่วนใหญ่เทสโทสเตอโรนถูกเมแทบอลิซึมในเซลล์ตับเป็น 17-คีโทสเตอรอยด์ (17-ketosteroids) ได้แก่ แอนโดรสเทอโรน (androsterone) อีพิแอนโดรสเทอโรน (epiandrosterone) และอีทีโอโคลานโณน (etiocholanolone) เป็นต้น (ภาพที่ 5) โดย 67 เปอร์เซ็นต์มาจากเทสโทสเตอโรนที่สังเคราะห์ที่ต่อมหมวกไต และอีก 33 เปอร์เซ็นต์มาจากเทสโทสเตอโรนที่สังเคราะห์ที่อัณฑะ (Ganong, 1995) และถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปควบคู่ (conjugation) กับกลูคูโรไนด์ (glucuronide) และซัลเฟต (sulfate) (Hadley, 2000)

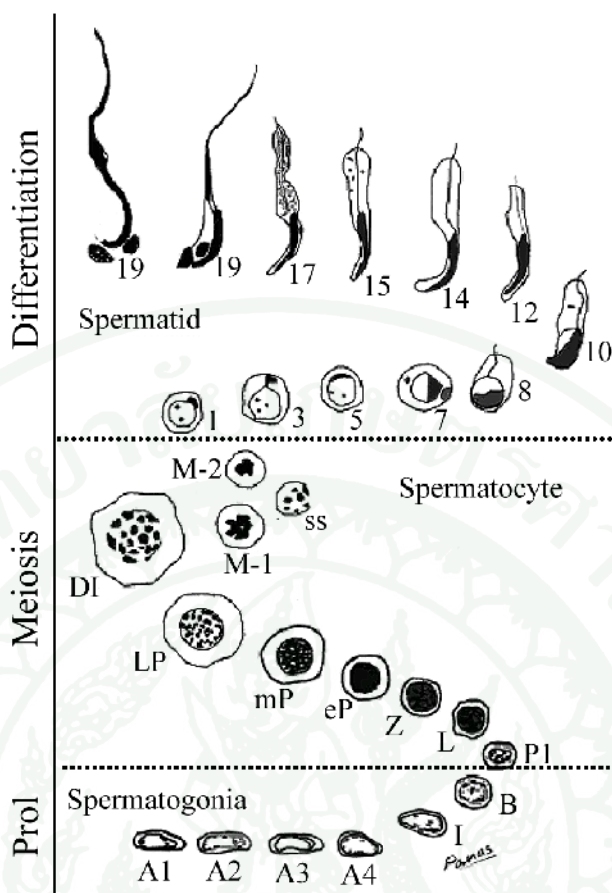


ภาพที่ 5 โครงสร้างของแอนโดรสเทอโรน อีพิแอนโดรสเทอโรน และอีทีโอโคลานโณน

ที่มา: Ganong (1995)

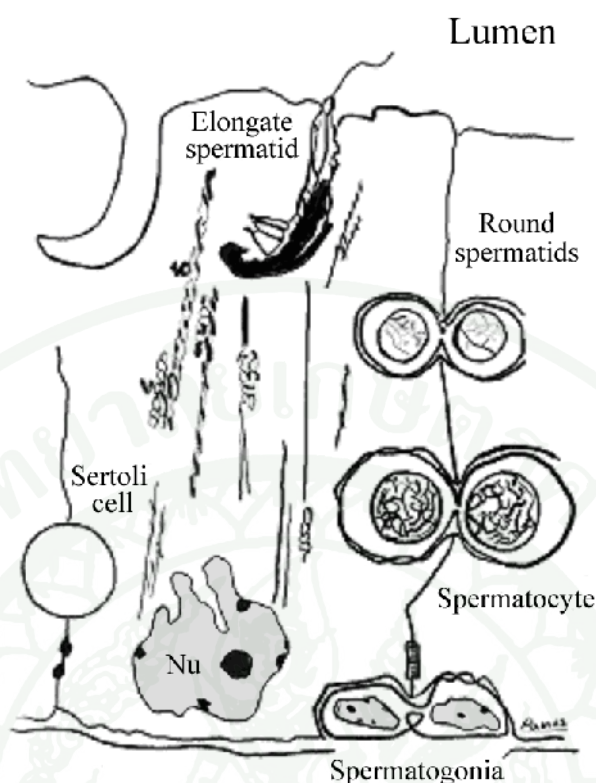
กระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis)

กระบวนการสร้างอสุจิเริ่มจากเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ (spermatogonia) พัฒนาเป็นสเปิร์มาโทไซต์ (spermatocyte) สเปิร์มาทิด (spermatid) จนกระทั่งเป็นอสุจิระยะเต็มวัย (spermatozoa) ตามลำดับ (ภาพที่ 6) เกิดขึ้นภายในหลอดสร้างอสุจิซึ่งเป็นหลอดขนาดเล็กขดไปมาในอัณฑะ หลอดสร้างอสุจิประกอบด้วยเยื่อบุผิวหลอดสร้างอสุจิ (seminiferous epithelium) และช่องภายในหลอด (lumen) ซึ่งเป็นบริเวณที่อสุจิระยะเต็มวัยถูกปลดปล่อยออกมา ส่วนของเยื่อบุผิวหลอดสร้างอสุจิประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือ เซลล์ร่างกายที่เรียกว่าเซลล์เซอร์โทลีและเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งมีหลายระยะจัดเรียงตัวตั้งแต่บริเวณฐาน (basal) จนถึงส่วนกลางของช่องภายในหลอดซึ่งเต็มไปด้วยไซโทพลาสซึมที่หลังจากเซลล์เซอร์โทลี ทำหน้าที่ช่วยหล่อเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนา จึงพบไซโทพลาสซึมตลอดแนวความสูงของเยื่อบุผิวหลอดสร้างอสุจิ



ภาพที่ 6 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในกระบวนการสร้างอสุจิหนูแรท ระยะเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation phase; Prol) ประกอบด้วยการแบ่งตัวซ้ำ ๆ กันของเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอ (A; A1-A4) ชนิดอินเตอร์มีเดียท (intermediate; I) และชนิดบี (B) เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเหล่านี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไปเป็นสเปออร์มาโทไซต์ขั้นพรีเลปโตทีน (preleptotene spermatocyte; PI) และเริ่มเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเมื่อกลายเป็นสเปออร์มาโทไซต์ขนาดเล็กขั้นเลปโตทีน (leptotene spermatocyte; L) หลังจากนั้นเข้าสู่ขั้นไซโกทีน (zygotene; Z) แพคทีนช่วงต้น กลาง และท้าย (early-, mid-, and late pachytene; eP, mP, LP) มีขนาดใหญ่มากขึ้นเรื่อย ๆ ตามลำดับจนกระทั่งขั้นดิพลทีน (diplotene; DI) ซึ่งเป็นขั้นสุดท้ายของกระบวนการไมโอซิส 1 (M-1) จะได้สเปออร์มาโทไซด์ทุติยภูมิ (ss) และจะดำเนินเข้าสู่กระบวนการไมโอซิส 2 (M-2) เกิดเป็นสเปออร์มาติโดรูปร่างกลม (ขั้นที่ 1-7) หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ให้มีรูปร่างยาวขึ้น (ขั้นที่ 8-19) จนได้อสุจิระยะเต็มวัย

ที่มา: Hess (1999)

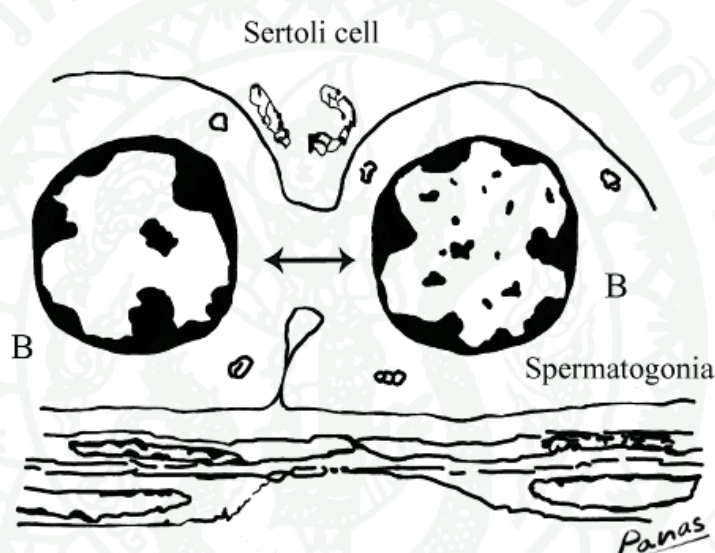


ภาพที่ 7 เชื้ออสุจิหลอดสร้างอสุจิประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือเซลล์เซอร์โทลีและเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งล้อมรอบด้วยไซโทพลาสซึมที่หลังจากเซลล์เซอร์โทลี (Nu; นิวเคลียสของเซลล์เซอร์โทลี)

ที่มา: Hess (1999)

เซลล์เซอร์โทลีมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นรอบวงของหลอดสร้างอสุจิ บริเวณของเซลล์เซอร์โทลีที่อยู่ติดกันเกิดเป็นโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่าไทต์จังก์ชัน (tight junction) เป็นตัวแบ่งแยกระหว่างส่วนฐานกับส่วนกลางช่องภายในหลอด มีหน้าที่ช่วยกันเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิและสเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิ (primary spermatocyte) ให้เจริญอยู่ที่ส่วนฐาน ขณะที่สเปิร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ (secondary spermatocyte) สเปิร์มาทิดและอสุจิระยะเต็มวัยจะเจริญอยู่ที่ส่วนกลางของช่องภายในหลอด นอกจากนั้นยังช่วยกันสารเคมีที่เป็นอันตรายจากกระแสเลือดและน้ำเหลืองไม่ให้ผ่านเข้ามาทำลายเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนาอยู่จึงเปรียบโครงสร้างนี้เป็นบริเวณขวางกั้นระหว่างกระแสเลือดกับอวัยวะ (blood-testis barrier) ระหว่างกระบวนการสร้างอสุจินั้นเซลล์สืบพันธุ์จะเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์หลายชนิด โดยจะเริ่มพัฒนาจากส่วนฐานแล้วจึงเคลื่อนผ่านไทต์

จึงชันจนกระทั่งไปถึงส่วนกลางช่องภายในหลอด เซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นนี้จะมีการพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน ได้เซลล์ในระยะเดียวกัน เนื่องจากการแบ่งไซโทพลาสซึม (cytokinesis) ของเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเกิดขึ้นแบบไม่สมมาตรคือไม่ขาดจากกันเป็นสองเซลล์ แต่กลับได้เซลล์สองเซลล์ที่ยังติดกันอยู่ เสมือนมีสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์สองเซลล์ที่ยังติดกันนี้พัฒนาไปพร้อม ๆ กันและสื่อสารกันอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 8) การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในลักษณะนี้ทำให้พบเซลล์ระยะเดียวกันเป็นบริเวณกว้างในหลอดสร้างอสุจิ ช่วยบ่งชี้ได้ว่ากระบวนการสร้างอสุจินั้นอยู่ในระยะใด



ภาพที่ 8 เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดบี 2 (B 2) เซลล์ที่เชื่อมติดกัน (แสดงด้วยลูกศรสองทิศ) โดยมีไซโทพลาสซึมที่หลังจากเซลล์เซอร์โทลีช่วยคงรูปร่างไว้

ที่มา: Hess (1999)

กระบวนการสร้างอสุจิทั้งหมดประกอบด้วย的增加จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) หลังจากนั้นแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อลดจำนวนชุดโครโมโซมให้เหลือเพียงชุดเดียวเพื่อสร้างสเปิร์มาทิด ชุดท้ายเกิดการเปลี่ยนสภาพจากสเปิร์มาทิดจนกลายเป็นอสุจิระยะเต็มวัย กระบวนการสร้างอสุจิสามารถแบ่งออกได้เป็นสามระยะ (phase) คือ 1. ระยะเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation phase) 2. ระยะไมโอซิส (meiotic phase) ซึ่งมีการลดจำนวนชุดโครโมโซมและมีการแบ่งเซลล์ (reduction-division) และ 3. ระยะการเปลี่ยนสภาพ

(differentiation phase) โดยแต่ละระยะมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ที่จำเพาะแตกต่างกันไป คือ เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ สเปอร์มาโทไซต์และสเปอร์มาทิดตามลำดับ รายละเอียดของแต่ละระยะเป็นดังนี้คือ

1. ระยะเพิ่มจำนวนเซลล์

เซลล์ที่พบในระยะนี้คือเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิซึ่งเป็นเซลล์ดั้งเดิมที่ยังไม่พัฒนาของกระบวนการสร้างอสุจิ โดยพบได้ที่บริเวณฐานหลอดสร้างอสุจิ เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสซ้ำ ๆ กันได้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอจนกระทั่งถึงชนิดบีซึ่งเป็นเซลล์ขั้นสุดท้ายก่อนเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของระยะไมโอซิสคืออสุจิขั้นพรีเลปโตทีน โดยจะเริ่มเคลื่อนตัวจากส่วนฐานของหลอดสร้างอสุจิผ่านไทด์จังก์ชันขึ้นไปด้านบน อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิที่ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งคือ เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอมีคุณสมบัติเพิ่มจำนวนตนเอง (self-renewal) ได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุดเพื่อทดแทนเยื่อบุผิวต้นกำเนิด (germinal epithelium) ที่ขาดหายไป ผลักดันให้กระบวนการสร้างอสุจิเกิดขึ้นตลอดเวลา ด้วยคุณสมบัติทั้งสองประการนี้จึงจัดได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells)

2. ระยะไมโอซิส

อสุจิที่พบในระยะนี้คือสเปอร์มาโทไซต์ซึ่งมีหลายชั้น แต่ละชั้นมีขนาดแตกต่างกัน เช่น สเปอร์มาโทไซต์ขั้นพรีเลปโตทีนมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดง ส่วนสเปอร์มาโทไซต์ขั้นแพคทีนมีขนาดใหญ่ หากดูจากภาพตัดเนื้อเยื่อหลอดสร้างอสุจิตามภาคตัดขวางจะพบสเปอร์มาโทไซต์กินพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง ระยะไมโอซิสนี้ใช้เวลาก่อนข้างนานจึงทำให้พบสเปอร์มาโทไซต์ในทุกระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ (stage) แต่ละระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์แสดงโดยใช้เลขโรมันเป็นสัญลักษณ์แทน โดยแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์เป็นตัวแทนของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ สเปอร์มาโทไซต์และสเปอร์มาทิดที่ได้จากการตัดเนื้อเยื่อหลอดสร้างอสุจิตามภาคตัดขวางร่วมกันภายในระยะเวลาเฉพาะ

กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเกิดขึ้นเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ให้มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเรียกไมโอซิส 1 ในขั้นนี้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุดหรือดิพลอยด์ (diploid) แล้วแบ่งนิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์ให้เป็นเซลล์ 2 เซลล์ที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียวหรือแฮพลอยด์ (haploid) เรียกการแบ่งขั้นตอนแรกนี้ว่า การแบ่งเพื่อลด

จำนวนชุดโครโมโซม (reduction division) ส่วนขั้นตอนที่สองเรียกไมโอซิส 2 เป็นการแยกซิสเตอร์โครมาติด (sister chromatid) ของนิวเคลียสแฮพลอยด์ออกจากกัน

คุณค่าความสำคัญของไมโอซิสที่มีนอกเหนือผลที่ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่ลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งก็มีการเข้าคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome) ทำให้เกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ระหว่างโครโมโซมคู่ดังกล่าว เกิดการจัดเรียงยีนแบบใหม่ (recombination) ในแต่ละเซลล์สืบพันธุ์ เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) สำหรับการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของอสุจิหนูแรทในแต่ละขั้นตอนระยะโพรเฟส (prophase) ของไมโอซิส 1 ใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ ระยะโพรเฟสเริ่มต้นจากสเปอิร์มาโทไซด์ชั้นพรีเลปโตทีนมีการจำลองดีเอ็นเออีก 1 ชุด ชั้นเลปโตทีนจะเริ่มเห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นเส้นบาง ชั้นไซโกทีนมีการเข้าคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซม ในขั้นนี้อาจสังเกตเห็นการจับคู่ของโครโมโซม (synapsis) ชั้นแพคทีนมีการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอ (RNA) และสังเคราะห์โปรตีนเพื่อเตรียมความพร้อมเข้าสู่ระยะต่อไป ชั้นดิพลทีนคู่โฮโมโลกัสโครโมโซมของไบวาเลนต์ (bivalent) แต่ละคู่เริ่มมีการแยกผลออกจากกันและชั้นไดอะไคเนซิส (diakinesis) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) สลายไปและโครโมโซมหดตัวมากขึ้น กระบวนการไมโอซิส 1 และ 2 ดำเนินไปอย่างรวดเร็วจึงรวมทั้งสองขั้นตอนนี้ไว้ในระยะเดียวกัน เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการไมโอซิส 1 จะได้สเปอิร์มาโทไซด์ทุติยภูมิซึ่งมีขนาดเล็กและมีโครโมโซม 2 ชุด (2N) และจะดำเนินเข้าสู่ไมโอซิส 2 อย่างรวดเร็วเกิดเป็นสเปอิร์มาติดรูปร่างกลม (round spermatids) มีขนาดเล็กมากและมีโครโมโซมชุดเดียว (N) หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะการเปลี่ยนสภาพให้มีรูปร่างที่เหมาะสมต่อไป

3. ระยะการเปลี่ยนสภาพ

การเปลี่ยนสภาพของเซลล์สืบพันธุ์เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าสเปอิร์มิโอเจเนซิส (spermiogenesis) ในระยะนี้เซลล์สืบพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ทำให้ได้สัณฐานรูปร่างแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ยกตัวอย่างเช่น อสุจิส่วนหัวของหนูแรทมีรูปร่างเรียวยาวและปลายหัวโค้งงอ อสุจิส่วนหัวของหนูเม้าส์มีขนาดกว้างและสั้นกว่าหนูแรท แต่มีลักษณะปลายหัวโค้งงอเช่นเดียวกันและอสุจิส่วนหัวของมนุษย์มีปลายเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดยาว เป็นต้น (ภาพที่ 9) สเปอิร์มิโอเจเนซิสแบ่งเป็นสามขั้นตอนดังนี้คือ 1. นิวเคลียสมีลักษณะยาวขึ้น โครมาทินหดตัว เมื่อย้อมสีจะเห็นโครมาทินเป็นโครงสร้างสีดำเข็มมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งมีชีวิต

2. เกิดแกรนูลคล้ายไลโซโซม (lysosomal-like granule) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดจาก

กอลจิแอปพาราตัส (Golgi apparatus) ชั้น 1 แกรนูล มีตำแหน่งอยู่เหนือนิวเคลียสโดยภายหลังพัฒนาไปเป็นอโครโซม (acrosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่บรรจุเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติก (hydrolytic enzymes) มีบทบาทเกี่ยวกับอันตรกิริยา (interaction) และการปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับไข่ 3. ชุดท้ายเซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างให้มีหางยาวขึ้นโดยมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) พันเป็นเกลียวทอดยาวตั้งแต่ส่วนต้น (proximal region) และมีการกำจัดทังไซโทพลาสซึมบางส่วนโดยเซลล์เซอร์โทลี สำหรับการเปลี่ยนสภาพของสเปิร์มาทิดหนูสามารถแบ่งออกได้เป็นลำดับต่าง ๆ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มาทิดที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งประกอบด้วยการสร้างอโครโซม รูปร่างของหัวอสุจิ และการอัดแน่นของนิวเคลียส ลำดับของการเปลี่ยนแปลงนี้แสดงโดยใช้เลขอารบิก เช่น สเปิร์มาทิดลำดับที่ 1 เป็นลำดับแรกที่เกิดขึ้นในหนูแรท ได้จากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 จนถึงสเปิร์มาทิดลำดับ 19 อย่างไรก็ตามในสิ่งมีชีวิตทั่วไปรวมทั้งในหนูแรท สเปิร์มาทิดลำดับ ที่ 15-19 จะมีลักษณะเซลล์ที่ยาวขึ้นและมีลักษณะใกล้เคียงกันจนไม่สามารถระบุลำดับที่แน่นอนได้

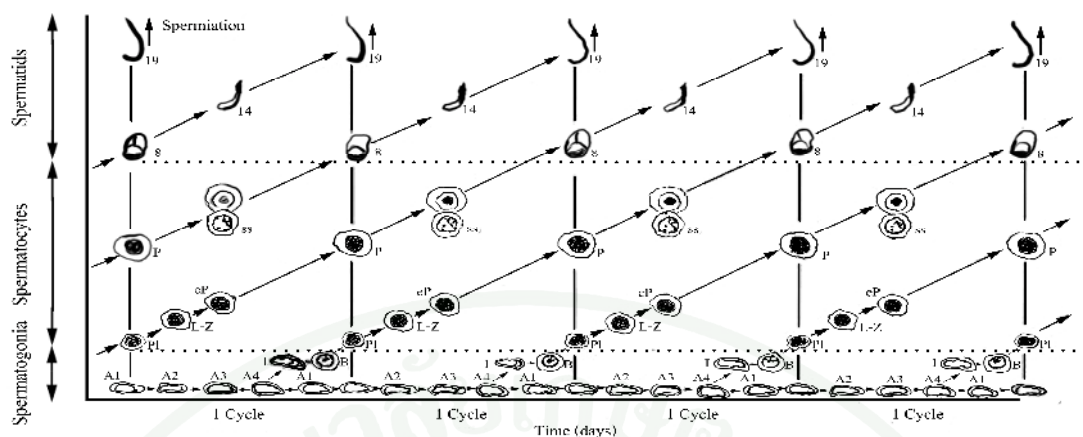


ภาพที่ 9 รูปร่างที่แตกต่างกันของอสุจิส่วนหัวของหนูแรท หนูเม้าส์และมนุษย์ (พื้นที่แรเงาแสดงถึงบริเวณอโครโซม)

ที่มา: Hess (1999)

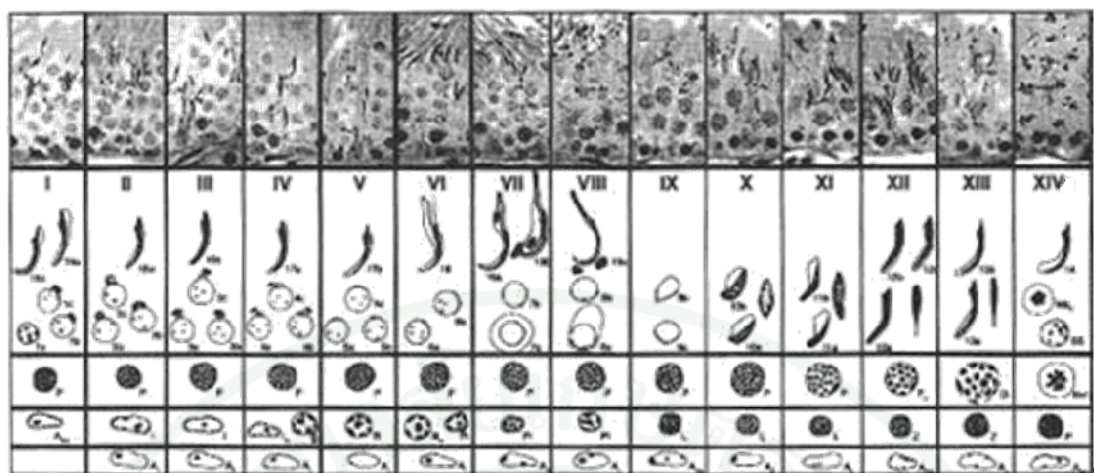
กระบวนการสร้างอสุจิเกิดจากการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ไปพร้อมๆ กัน มีทิศทางการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิออกจากฐานหลอดสร้างอสุจิภายในระยะเวลาที่เป็นวัฏจักร (cycle) (ภาพที่ 10) ของเชื่องพิวหลอดสร้างอสุจิที่ดำเนินอยู่ตลอดเวลา เป็นผลให้ลักษณะรูปร่างและตำแหน่งของเซลล์สืบพันธุ์เปลี่ยนแปลงไป วัฏจักรจำแนกได้เป็นหลายระยะ (stages) บนพื้นฐานของการ

เปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ในหลอดสร้างอสุจิ ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์สามารถจำแนกได้ด้วยการตรวจลักษณะเฉพาะของโครโมโซมจากเทคนิคปฏิกิริยาเพอร์ไอไดคเอซิดชิฟ (periodic acid Schiff's reaction; PAS) โดยกอลไจแอปพาราตัสและโครโมติดสีชมพู หรืออาจเปรียบเทียบลักษณะเซลล์สืบพันธุ์กับแผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์แต่ละระยะ (stage map) (ภาพที่ 11, อักษรโรมัน) ซึ่งแสดงการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ในทิศทางจากซ้ายไปขวา ขยับขึ้นทีละแถวตามลำดับ ช่วงเวลาที่เซลล์สืบพันธุ์อยู่ในแต่ละระยะแตกต่างกัน ตั้งแต่ 7 ชั่วโมงถึง 2 วัน 17 ชั่วโมง (Hess, 1999) ดังนั้นช่วงเวลาของแต่ละระยะจึงเป็นตัวกำหนดว่าแต่ละระยะจะถูกพบมากน้อยเพียงใดภายในเนื้อเยื่อหลอดสร้างอสุจิ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 10 วัฏจักร (cycle) ของเชื้อบุฟิวหลอดสร้างอสุจิแสดงตามเวลา (วัน) แต่ละวัฏจักรประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์ตั้งต้น (progeny) ซึ่งพบได้แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ระยะ (phase) ของกระบวนการสร้างอสุจิสามารถแบ่งได้ตามลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ 3 ชนิด คือ เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ สเปอร์มาโทไซต์และสเปอร์มาทิด เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอ จัดเรียงตัวอยู่ในแถวแรก มีคุณสมบัติเพิ่มจำนวนตนเอง และถูกกำหนด (committed) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอ1-เอ4 (A1-A4) ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดอินเตอร์มีเดียท (I) และบี มีลักษณะแตกต่างกันและมีปริมาณมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิชนิดเอ ระยะการแบ่งตัวแบบไมโอซิสเริ่มตั้งแต่ได้สเปอร์มาโทไซต์ขนาดเล็กขึ้นพรีเลปโตทีน (PI) เลปโตทีน (L) ซิโกทีน (Z) แพคทีนขั้นต้น (O) และแพคทีน (P) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการไมโอซิส 1 จะได้สเปอร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ (ss) และจะดำเนินเข้าสู่ไมโอซิส 2 เกิดเป็นสเปอร์มาทิดที่เหลือจำนวนชุดโครโมโซมเพียงชุดเดียว (N) พัฒนาจนเป็นสเปอร์มาทิดลำดับที่ 8, 14 และ 19 ซึ่งเป็นขั้นท้ายสุดที่อสุจิระยะเต็มวัยจะถูกปลดปล่อยออกมา

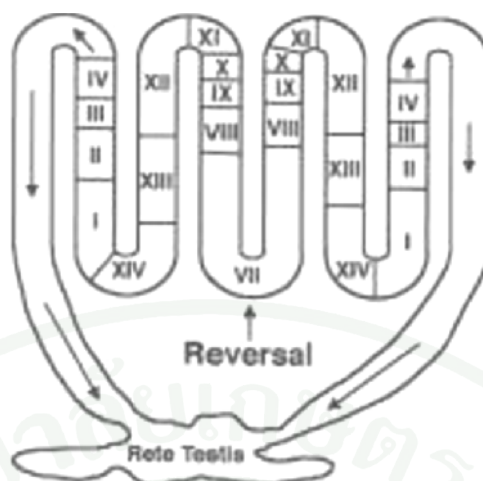
ที่มา: ดัดแปลงจาก Hess (1999)



ภาพที่ 11 ภาพถ่ายแฉกบนสุด: วัฏจักรการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์หนูแรทซึ่งประกอบด้วย 14 ระยะ
ภาพวาด 4 แถวล่าง: รายละเอียดของรูปร่างนิวเคลียสและเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละระยะ
หมายเหตุ: เลขโรมันแสดงลำดับของระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์

ที่มา: Hess (1999)

แต่ละระยะ (stages) จะไม่เรียงตามลำดับกันไปตลอดความยาวหลอดสร้างอสุจิ แต่จะมีการเรียงลำดับของแต่ละระยะเป็นช่วงๆ ภายในแต่ละเซกเมนต์ (segments) ของหลอดสร้างอสุจิเท่านั้น อย่างไรก็ตามแต่ละระยะตลอดแนวความยาวหลอดสร้างอสุจิมีการเรียงของแต่ละระยะซ้ำๆ กัน เรียกว่าคลื่นของกระบวนการสร้างอสุจิ (wave of spermatogenesis) ระยะที่ 1 (I) จะตามด้วยระยะที่ 2 (II) และ 3 (III) ตามลำดับไปจนถึงระยะที่ 14 (XIV) หลังจากนั้นจะวนกลับมาที่ระยะที่ 1 (I) ใหม่ พบระยะต่างๆ เรียงลำดับจากบริเวณเรตของอัณฑะ (rete testis) ผู้ศูนย์กลางของหลอดสร้างอสุจิซึ่งเป็นตำแหน่งวกกลับ (reversal) (ภาพที่ 12) คลื่นของกระบวนการสร้างอสุจินี้สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์มีการพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน แต่กลไกกระบวนการรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด (Hess, 1999)



ภาพที่ 12 คลื่นของกระบวนการสร้างอสุจิ

หมายเหตุ: ระยะ (stages) แสดงด้วยเลขโรมัน

ที่มา: Hess (1999)

ความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility)

ความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศชายเป็นกรณีตรวจวัดศักยภาพการตั้งครรภ์ที่สำคัญในกลุ่มมีภรรยา ประกอบด้วย การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อหาค่าตัวแปรที่สำคัญของอสุจิ เช่น จำนวนอสุจิที่นับได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเคลื่อนไหว และระดับความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อ (Liu *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991; Enginsu *et al.*, 1992) ตัวแปรแต่ละชนิดมีความสำคัญแตกต่างกัน โดยการตรวจนับจำนวนอสุจิเป็นการนับจำนวนอสุจิจากน้ำเชื้อที่หลังออกมาแต่ละครั้ง หากตรวจพบจำนวนอสุจิมาก โอกาสที่อสุจิจะเข้าปฏิสนธิกับไข่จะมากตามไปด้วย (Radtke and Rutowski, 2002) การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็นตัวบ่งชี้ภาวะความสมบูรณ์พันธุ์ (Kawaguchi *et al.*, 2007) โดยตรวจนับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวไปด้านหน้า (progressive motility) ในมนุษย์พบว่าลักษณะการเคลื่อนไหวของอสุจิเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัด (Waeleghem *et al.*, 1996; Zorn *et al.*, 1999) เช่น ผู้ที่มีภาวะโกลโบซอสเปิร์เมีย (globozoospermia) จะพบว่ามีจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวน้อยมาก ความสามารถเคลื่อนไหวยังประเมินได้จากความเร็วในการเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนไหวย่างรวดเร็วของอสุจิ (Jouannet *et al.*, 1988) โดยอสุจิที่เคลื่อนไหวยาวเร็วกว่ามีโอกาสปฏิสนธิกับไข่ได้มากกว่า (Snook, 2005) ส่วนการตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

ของอสุจิเป็นวิธีบ่งบอกศักยภาพในการผสมพันธุ์นอกร่างกาย (*in vitro*) และในร่างกาย (*in vivo*) (Kruger *et al.*, 1986; Enginsu *et al.*, 1991; Ombelet *et al.*, 1994; Eggert-Kruse *et al.*, 1995) โดยงานวิจัยด้านความสมบูรณ์พันธุ์นิยมตรวจนับเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีรูปร่างปกติ อสุจิที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของส่วนหางผิดปกติสัมพันธ์กับการลดความสมบูรณ์พันธุ์จากการให้ยา (Ellis *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999) และอายุ โดยพบความผิดปกตินี้ในเพศชายที่มีอายุมากกว่าอายุน้อย (Ng *et al.*, 2004) อสุจิที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของส่วนหัวและส่วนกลางผิดปกติพบในการให้สารบางชนิด เช่น สารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย (Iranian neem seed, *Azadirachta Indica*) (Dehghan *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าวนี้จัดเป็นการตรวจความไม่สมบูรณ์พันธุ์ในเพศชายแบบดั้งเดิมซึ่งเป็นวิธีการตรวจน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยองค์การอนามัยโลก (WHO, 1999) ได้กำหนดค่าสูงสุดสำหรับแต่ละค่าที่วัดได้จากน้ำเชื้อของชายที่มีร่างกายสมบูรณ์เพื่อเป็นมาตรฐาน อย่างไรก็ตามการตรวจแบบดั้งเดิมนี้มีข้อจำกัดบางประการคือ ไม่สามารถบอกได้ว่าอสุจิสูญเสียหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ไปหรือไม่ (Aitken *et al.*, 1984) และยังมีค่าความแปรปรวนสูงแม้จะใช้วิธีตรวจที่เป็นมาตรฐานแล้วก็ตาม โดยพบว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ได้จากการนับจำนวนอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาปกติและเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวคิดเป็น 44.7 เปอร์เซ็นต์ 17.8 เปอร์เซ็นต์ และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นค่าที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีนี้จึงเป็นเพียงสมมติฐานเท่านั้น

ภายหลังจึงมีการคิดค้นวิธีการวิเคราะห์หน้าที่ (functional assays) แบบใหม่ขึ้นมาเพื่อทดสอบหน้าที่ของอสุจิซึ่งให้ข้อมูลด้านศักยภาพการปฏิสนธิกับไข่มากกว่าการตรวจสอบเพียงจำนวนอสุจิหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เช่น การตรวจสอบการเจาะผ่านเข้าไปของอสุจิ (sperm penetration assay; SPA) (Coetzee *et al.*, 1989) การตรวจสอบการจับตัวของอสุจิกับเฮมิโซน (hemizona assay; HZA) (Franken *et al.*, 1989) การตรวจสอบการบวมตัวของหางอสุจิ (hypoosmotic swelling test) เพื่อตรวจวัดความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Chan *et al.*, 1990) และการตรวจสอบปฏิกิริยาโครโซม (acrosome reaction test; AR) (Henkel *et al.*, 1993) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการทำนายความสำเร็จในการปฏิสนธิและศึกษาด้านความสมบูรณ์พันธุ์ เช่น การคุมกำเนิดเพศชาย คิดค้นวัคซีนคุมกำเนิดโดยสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับอสุจิเพื่อรบกวนปฏิกิริยาโครโซม (acrosome reaction) และศึกษาพิษจากอาหารและยาต่ออวัยวะ นอกจากนั้นยังง่ายต่อการทดลองและราคาไม่แพงอย่างวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ โดยมีมุ่งศึกษาสรีรวิทยาของอสุจิ การเพิ่มประสิทธิภาพของอสุจิในการปฏิสนธิ (capacitation) และปฏิกิริยาโครโซม การเพิ่มประสิทธิภาพของอสุจิในการปฏิสนธินั้นเกิดขึ้นเพื่อเตรียมความพร้อมก่อนเกิดปฏิกิริยาโครโซมซึ่งมีการปลดปล่อยเอนไซม์ช่วยย่อย (lytic enzymes) เช่น แอริลซัลฟาเทส (arylsulfatase) เบตาไกลูโคโรนิเดส

(β -glucuronidase) เอ็นอะซีติล-กลูโคซามินิเดส (N-acetylglucosaminidase) ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และโปรตีเอส (proteases) (Tulsiani *et al.*, 1998) นอกจากนั้นยังมีการแสดงออกตัวรับ (receptor expression) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ตัวรับเหล่านี้มีความสำคัญในกระบวนการเจาะผ่านเข้าไปในโซนาเพลลูซิดา (zona pellucida) เพื่อรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่

ความสมบูรณ์ของโครโมโซมจำเป็นต่อกระบวนการปฏิสนธิเนื่องจากอสุจิที่ปราศจากโครโมโซมจะไม่สามารถผสมกับไข่ได้ อสุจิที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครโมโซมผิดปกติทำให้เกิดความล้มเหลวในการผสมเด็กหลอดแก้วอีกด้วย การเกิดปฏิกริยาโครโมโซมจึงเป็นกรณีบ่งชี้การเพิ่มประสิทธิภาพของอสุจิในการปฏิสนธิและการทำงานของอสุจิ (Esteves *et al.*, 2007) ลักษณะของโครโมโซมที่เห็นมีประโยชน์ต่อการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่าน้ำเชื้อของชายที่เป็นหมันจะปราศจากอสุจิที่โครโมโซมสมบูรณ์ (Blach *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1990) ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคหลายชนิดเพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างอสุจิที่โครโมโซมสมบูรณ์กับเสียหาย เช่น การย้อมอสุจิด้วยสารเคมี การย้อมอสุจิด้วยเลกตินติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ (fluoresceinated lectins) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์วัญภาค (phase-contrast microscope) เพื่อดูการคลายเกลียวโครมาติน (decondensation) ที่ส่วนหัวอสุจิ (Esteves *et al.*, 2007) ย้อมอสุจิด้วยแอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซยานตติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated *Pisum sativum* agglutinin; FITC-PSA) (Casey *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1995) และย้อมอสุจิด้วยแอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซยานตติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ (FITC-conjugated *Arachis hypogea* agglutinin; FITC-PNA) ซึ่งนิยมใช้ตรวจความสมบูรณ์ของโครโมโซมในอสุจิของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสุนัข (สิริวดี, 2548) ม้า (Cheng *et al.*, 1996) วัว (Kline and Rath, 2007, Esteves *et al.*, 2007) แพะ (Yamashiro *et al.*, 2006) เม่น (Funahashi, 2005) ลิงชิมแปนซี (rhesus) (Cai *et al.*, 2005) และหนูแรท (Yamashiro *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามการใช้วิธีตรวจสอบเหล่านี้เพียงวิธีเดียวเป็นวิธีการตรวจสอบที่ไม่ถูกต้องเนื่องจากกระบวนการพัฒนาของอสุจินั้นกระทบกับไข่เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นตามลำดับจึงไม่ควรใช้ลักษณะหรือหน้าที่ของอสุจิเพียงอย่างเดียวมาตัดสินความสมบูรณ์พันธุ์ของมนุษย์หรือสัตว์ทดลอง การทดสอบพิษของยาหรือสารต่าง ๆ ต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ทดลองส่วนใหญ่จึงมีการตรวจสอบเนื้อเยื่อของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ร่วมด้วย ซึ่งประกอบด้วยต่อมต่าง ๆ หลอดเก็บอสุจิ ต่อมลูกหมาก ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่ออัณฑะซึ่งคาดว่าเป็นบริเวณที่ไวต่อสารมากที่สุด นอกจากนั้นควรตรวจสอบผลต่อจำนวนอสุจิ การเคลื่อนไหวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิร่วมด้วยเพื่อช่วยเสริมผลที่ได้จากการ

ตรวจสอบเนื้อเยื่ออีกทั้งยังช่วยแสดงให้เห็นผลของสารต่อระบบสืบพันธุ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากบางรายที่สารส่งผลต่อกระบวนการสร้างอสุจิจะส่งผลไปยังหน้าที่ของอสุจิด้วย แต่บางรายที่พบว่าสารมีผลต่อหน้าที่ของอสุจิกลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออัณฑะ นอกจากนั้นความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของอสุจิและลักษณะเนื้อเยื่ออัณฑะยังแตกต่างกันไปตามระยะเวลาการให้สารอีกด้วย (Kaneto *et al.*, 1999; Golalipour, 2007)

มะเร็งขึ้นกับความสมบูรณ์พันธุ์

มะเร็งก็มีฤทธิ์ในการลดความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูทดลองทั้งเพศเมียและเพศผู้ ใบและผลมีฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูทดลองเพศเมีย ส่วนในหนูทดลองเพศผู้ออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างอสุจิ (Subratty *et al.*, 2005) ในประเทศจีนมีการสำรวจว่าเมล็ดมะระจีนกใช้เป็นยาคุมกำเนิดในเพศหญิงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมล็ดมะระจีนกประกอบด้วยน้ำมัน 32 เปอร์เซ็นต์รวมทั้งกรดสเตียริก กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) กรดโอเลอิก (oleic acids) ไพริมิดีน (pyrimidines) นิวคลีโอไซด์ไพริมิดีน (pyrimidine nucleoside vicine) โมมอร์คาร์นิซินชนิดแอลฟา ชนิดเบตา เลกตินและโมเลกุลคล้ายอินซูลิน (insulin-like molecules) (Scartezzini and Speroni, 2000) จากการศึกษาพบว่าในเมล็ดมะระจีนกมีสารออกฤทธิ์ทำให้แท้งเป็นสารในกลุ่มโปรตีนที่มีชื่อว่าโมมอร์คาร์นิ ฤทธิ์นี้เกิดขึ้นกับตัวทดลองทั้งในช่วงแรกและช่วงกลางการตั้งท้อง โดยพบว่าส่งผลยับยั้งการเจริญของเยื่อบุมดลูก (endometrium) จากการให้มะระจีนกต่อหนูเมาส์ในวันที่ 4 และ 6 ของการตั้งท้อง พบว่าโปรตีนที่พบในเมล็ดมะระจีนกส่งผลยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนที่เยื่อบุมดลูก โดยพบว่าโมมอร์คาร์นิซินชนิดเบตาลดการยึดเกาะของบลาสโทซิสต์ โดยยับยั้งการเจริญของโทรโฟบลาสต์ (trophoblast) และขัดขวางการพัฒนาของอินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass) อย่างไรก็ตามการให้โมมอร์คาร์นิซินชนิดแอลฟาและเบตาก่อนการตั้งท้องไม่มีผลต่อการเจริญของฟอลลิเคิล (follicular maturation) การตกไข่และจำนวนตัวอ่อนที่ฝังตัว

สำหรับฤทธิ์ลดความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศชายนั้นพบว่าโมมอร์คาร์นิซินชนิดแอลฟาและเบตาไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการคัดหลั่งลูทีไนซิงฮอโมนของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและเทสโทสเตอโรนของเซลล์เลย์ดิก มีรายงานการศึกษาในหนูแรทเพศผู้ว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกด้วยแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างอสุจิ (anti-spermatogenic activity) โดยลดจำนวนสเปิร์มาโทไซด์สเปิร์มาทิดและอสุจิระยะเต็มวัย และลดฤทธิ์ของฮอโมนเพศผู้หนูแรท (androgenic activities) (Naseem *et al.*, 1998) การป้อนสารสกัดจากผลมะระจีนกให้หนูแรทปริมาณ 1.75 กรัมต่อวันเป็นเวลา 60 วันติดต่อกัน ทำให้เนื้อเยื่ออัณฑะเกิดความเสียหายเป็นบริเวณกว้างโดยไม่ส่งผล

เปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) และแอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) ในซีรัมและไม่เปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน คอเลสเตอรอล บิลิรูบิน (bilirubin) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) และครีเอทีนฟอสเฟต (creatin phosphate) ในซีรัม นอกจากนี้ยังพบว่าระดับน้ำตาลและยูเรีย (urea) ในกระแสเลือดมีค่าเป็นปกติ (Dixit *et al.*, 1978) พบว่าโมมอร์ดิกาแอนติโปรตีน (momordica- antiprotein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในมะระขึ้นกที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอดส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน (kDa) ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะและไม่ทำให้อุจจาระเมื่อให้โมมอร์ดิกาแอนติโปรตีนในปริมาณเดียวกับที่ใช้กำจัดไวรัสเอดส์ (Schreiber *et al.*, 1999)

มะระขึ้นกและการออกฤทธิ์อื่นๆทางเภสัชวิทยา

ในอดีตหลายประเทศมีการใช้มะระขึ้นกเป็นยารักษาโรคมานานโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่กำลังพัฒนาเช่น ประเทศบราซิล จีน คิวบา กานา เฮติ อินเดีย เม็กซิโก มาเลเซีย นิวซีแลนด์ นิการากัว ปานามา และเปรู เป็นต้น ส่วนใหญ่ใช้เป็นยาต้านเบาหวาน (antidiabetes) บรรเทาอาการเสียดท้อง (carminative for colic) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการรักษาบาดแผล ขับพยาธิ (anthelmintic) ขับระดู (emmenagogue) ต้านไวรัสหัด (antimeasles) และไวรัสตับอักเสบ (antihepatitis) ในประเทศตุรกีมีการใช้ผลสุกรักษาบาดแผลและแผลในกระเพาะอาหาร (treatment of peptic ulcer) ได้เป็นอย่างดี ในประเทศอินเดียและบราซิลมีรายงานการใช้มะระขึ้นกรักษาเบาหวาน ทำแท้ง (abortifacient) ต้านมาลาเรีย (antimalaria) ขาระบาย (laxative) บรรเทาอาการปวดประจำเดือน (dysmenorrheal treatment) ขับน้ำนม (galactagogue) รักษาโรคเกาต์ (gout) ดีซ่าน (jaundice) ระดูขาว (leucorrhea) ริดสีดวงทวาร (piles) ปอดบวม (pneumonia) สะเก็ดเงิน (psoriasis) ไขข้ออักเสบ (rheumatism) หิด (scabies) และโรคเรื้อน (leprosy) (Grover and Yadav, 2004) ในประเทศตุรกีแถบตะวันตกและตะวันออกเฉียงใต้พบการใช้น้ำมันที่ได้จากผลสุกมะระขึ้นกเป็นยารักษาบาดแผลและโรคกระเพาะ (Dengiz and Gursan, 2005) ในประเทศแถบกลุ่มแม่น้ำอะเมซอนใช้ผลหรือใบมะระขึ้นกรักษาเบาหวาน อาการเสียดท้อง รักษาแผลและอาการติดเชื้อ รักษาโรคหนองพยาธิหรือเชื้อปรสิต และใช้รักษาโรคจากไวรัสทั้งไวรัสหัด ตับอักเสบและอาการไข้

งานวิจัยในปัจจุบันศึกษาสรรพคุณของมะระขึ้นกในการรักษาโรคต่างๆ มากมาย เป็นต้นว่า มะระขึ้นกช่วยรักษาเบาหวาน (Grover *et al.*, 2001; Vikrant *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2006) ขับยูเรีย (Lee-Huang *et al.*, 1990; Lee-Huang *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1999; Au *et al.*, 2000) เริ่ม

(herpes) (Bourinbaiar and Lee-Huang, 1996; Schreiber *et al.*, 1999) โปลิโอ (polio) ด้านเนื้องอก (antitumor) (Clafin *et al.*, 1978; Jilka *et al.*, 1983; Lee-Huang *et al.*, 1995; Kusamran *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Tazzari *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001) ด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Sathishsekar and Subramanian, 2005; Wu and Ng, 2007) รักษาโรคกระเพาะ (Yesilada *et al.*, 1999; Gürbüz *et al.*, 2000) ด้านการอักเสบ (anti-inflammation) รักษาภาวะเลือดมีคอเลสเตอรอลต่ำ (hypcholesterolemic treatment) (Jayasooriya *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2001) รักษาภาวะเลือดมีไตรกลีเซอไรด์ต่ำ (hypotriglyceridemic treatment) ภาวะความดันโลหิตต่ำ (hypotensive treatment) (Wang and Ng, 2001) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) (Telang *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006)

รายงานด้านความเป็นพิษของมะระจีนกอนปัจจุบันนี้มีจำนวนน้อย การป้อนสารสกัดจากผลอ่อนมะระจีนกอนปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวให้หนูแรทเป็นเวลา 1 เดือนพบว่าไม่มีพิษต่อไต (nephrotoxicity) ตับ (hepatotoxicity) หลังจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าทางชีวเคมีในกระแสเลือด (biochemical parameters) ของเอนไซม์ซีรัมกลูตามิกออกซาโลอะซีติกทรานส์อะมิเนส (serum glutamic oxaloacetic transaminase; SGOT) ซีรัมกลูตามิกไพรูวิกทรานส์อะมิเนส (serum glutamic pyruvic transaminase; SGPT) และไขมันร่วมกับการตรวจสอบทางมิวชีววิทยา (Platel *et al.*, 1993; Viridi *et al.*, 2003) แต่เมื่อให้ทางหลอดเลือด (vein) หรือทางเยื่อช่องท้อง (peritoneum) กลับก่อให้เกิดโทษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากเมล็ดและผลมีความเป็นพิษมากกว่าสารสกัดจากใบถึงขั้นทำให้หนูแรทเสียชีวิต (Rathi *et al.*, 2001; Panda and Kar, 2000) เช่นเดียวกับเมื่อให้สารสกัดจากทุกส่วนของมะระจีนกอนแก่สัตว์ทดลองทางหลอดเลือดหรือทางเยื่อช่องท้องในปริมาณสูง (Kusamran *et al.*, 1998) นอกจากนั้นอาจทำให้เกิดภาวะเลือดมีน้ำตาลต่ำขั้นโคม่า (hypoglycemic coma) การชักในเด็ก (children convulsion) กลุ่มอาการพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; G6PD deficiency) ปวดหัว และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แกมมากลูตามิลทรานสเฟอเรส (gamma-glutamyltransferase) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ในหนูแรท (Basch *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หนูพันธุ์วิสตาเรท (Wistar rat)
2. กรงเลี้ยงและอาหารหนู (cage and feed)
3. จีเลื่อย (bedding)
4. เข็มป้อนอาหาร (feeding needle)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 3 และ 4 ตำแหน่ง (weighing apparatus)
6. เครื่องนับเม็ดเลือด (hematocytometer)
7. กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่าน (light microscope)
8. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope)
9. เครื่องมือผ่าตัดและถาดผ่าตัด (vet surgical instrument)
10. ขวดน้ำหนูและฝาปิด (water bottle with cap and filter cap)
11. ปิเปต (pipette) ปีกเกอร์ (beaker) กระบอกตวง (cylinder) หลอดทดลอง (test tube) ปากคีบ (forceps) และขวดรูปชมพู่ (volumetric flask)
12. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (tissue grinder)
13. สไลด์แก้ว (glass slide)
14. กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
15. ไมโครปิเปต (micropipette)
16. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
19. เครื่องฝังเนื้อเยื่อ (tissue embedding processor)
20. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
21. ชุดอุปกรณ์ซอกซ์เลท (soxhlet apparatus)
22. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
23. แร็ค (rack)
24. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
25. ถุงมือยาง (latex glove)
26. เครื่องนับเวลา (timer)

27. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
28. น้ำยาเช็ดเลนส์ (lens cleaning fluid)
29. กระดาษเช็ดเลนส์ (lens tissue wiper)
30. กระดาษกรอง (filter paper)
31. วอร์เทกซ์ (vortex)
32. เครื่องนับรังสีแกมมา (gamma counter)
33. เอปเพนดอร์ฟ (eppendorf)
34. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)
35. เครื่องระเหยแห้ง (freeze dryer)

สารเคมี

1. สีอีโอซิน-นีโกรซิน (eosin-nigrosin)
2. ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether)
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.9% NaCl)
4. สารละลายฮันกส์ (normal Hank's solution)
5. สารละลายซาไลน์ไทรตอนเมอร์ไธไอโอเลต (saline triton merthiolate)
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
7. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)
8. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)
9. แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate)
10. กรดกลacial อะซิติก (glacial acetic acid)
11. ไซลีน (xylene)
12. เอทานอล (ethanol)
13. เมทานอล (methanol)
14. พาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde)
15. สีฮีมาทอกซาลีน (hematoxylin)
16. ชุดย้อมสีดิฟฟควิก (Diff-Quick stain set, Baxter Heal Thcare, Miami, FL)
17. ทริส (tris-hydroxymethyl-aminomethane)
18. ฟรุคโตส (fructose)
19. กลีเซอรอล (glycerol)

20. โพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide)
21. เพนนิซิลินจี (penicilin G)
22. แอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซโอไซยานเนตติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์
(fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin)
23. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
24. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
25. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin)
26. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
27. โซเดียมไพรูเวท (sodium pyruvate)
28. กรดแลกติก (lactic acid; 60% syrup)
29. คูแมสซีปบลู (coomassie blue G-250, Fisher Biotech, Springfield, NJ, USA)
30. เมธิลีนบลู (methylene blue)
31. พาราฟิน (parafin)
32. ซูโครส (sucrose)
33. เอธิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylene diaminetetra acetic acid; EDTA)
34. โคทเอเคาท์โททอลเทสทอสเทอโรน (Coat-A-Count® Total Testosterone (TKTT)
kit, Diagnostic Products, Los Angeles, CA)
35. อีเทอร์ (ether)
36. ฟอर्मาลิน (formaline)
37. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide; DMSO)
38. อีโอซิน (eosin)
39. เฮพาริน (heparin)
40. พาราพลาสติก (paraplast)

วิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

หนูเพศผู้พันธุ์วิสตาร์แรท น้ำหนักตั้งแต่ 250-300 กรัม อายุประมาณ 9 สัปดาห์ ขังหนูไว้ในกรงเดี่ยวในห้องที่ระบายอากาศดี อุณหภูมิประมาณ 24-25 องศาเซลเซียส ช่วงสว่าง (photophase) 12 ชั่วโมง ระหว่าง 6.00-18.00 น. โดยให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูป และเจดน้ำดื่มให้กินได้ตลอดเวลา (*ad libitum*) หนูทั้งหมดจะได้รับการปรับตัวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง โดยสัตว์ทดลองได้รับการรับรองว่าเป็นตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสภาวิจัยแห่งชาติ

2. การทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility test)

ทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูเพศผู้โดยใช้วิธีผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยใช้หนูเพศเมียที่อยู่ในระยะโพรเอสโตรัส (proestrous) (ภาพผนวกที่ ก4) 2 ตัว ขังร่วมกับหนูเพศผู้ 1 ตัว ในกรงเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเกลี่ยป้ายช่องคลอด (vaginal smear) (ภาพผนวกที่ ก3) ทุกวันในช่วงเช้าเวลาระหว่าง 7.00-8.00 น. โดยใช้สำลีพันก้านจุ่มในโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์สอดเข้าไปในช่องคลอดเบาๆ ลึกประมาณ 5-8 มิลลิเมตร จากนั้นชุดเบาๆ และเกลี่ยป้าย (smear) ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตหาระยะการเป็นสัตรวมทั้งสังเกตร่องรอยของการผสมพันธุ์คือ ตัวอสุจิที่คงค้างอยู่ในช่องคลอด (ภาพผนวกที่ ก8) ซึ่งถ้าหากพบเช่นนั้นแล้วให้แยกหนูเพศเมียออกจากกรงเพื่อแยกเลี้ยงดูต่างหากในกรงเดี่ยวเป็นเวลา 8-10 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดหนูเพศเมียจะถูกทำให้สลบและผ่าตัดแบกรังไข่และมดลูกออกมา เพื่อนับจำนวนตัวอ่อน (foetus) ที่ฝังตัวบนปีกมดลูก (ภาพผนวกที่ ก9) จดบันทึกจำนวนตัวอ่อนบนปีกมดลูก จากนั้นนำรังไข่มาตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียมจากเนื้อเยื่อรังไข่ (ภาพผนวกที่ ก10) จดบันทึกจำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่สังเกตได้จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์โดยคำนวณจากสูตรข้างล่างนี้ หนูเพศผู้ตัวใดที่มีความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ฝังตัว}}{\text{จำนวนคอร์ปัสลูเทียม}} \times 100$$

3. การสกัดสารจากมะระขี้นก

นำเมล็ดมะระขี้นกจากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี มาตากให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ปั่นเมล็ดให้เป็นผง และสกัดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล (v/v) โดยชุดอุปกรณ์ซอกซ์เลท หลังจากนั้นระเหยเอทานอลออก ทำให้แห้งโดยกลั่นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และเครื่องระเหยแห้ง (freeze dryer) โดยจะเหลือปริมาณสาร 15 – 17 % (w/w) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพผนวกที่ ก1)

4. แผนการทดลอง

หลังจากประเมินความสมบูรณ์พันธุ์หนูเพศผู้แล้ว แบ่งหนูเพศผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์จำนวน 54 ตัวออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 18 ตัว

กลุ่มที่ 1: ป้อนไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2: ป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 400 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง/ 1 กิโลกรัม น้ำหนักตัว /วัน ละลายในไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน

กลุ่มที่ 3: ป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 800 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง/ 1 กิโลกรัม น้ำหนักตัว /วัน ละลายในไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน

สุ่มหนูจากทุกกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 9 ตัว สลบหนูด้วยอีเทอร์ หลังการให้สารครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเลือด แยกชิ้นส่วนอวัยวะ หลอดเก็บอสุจิ ต่อมลูกหมากและต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิออกมา จากนั้นลอกชิ้นส่วนไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก ชั่งน้ำหนัก วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิ ตรวจความสมบูรณ์พันธุ์ ปริมาณและคุณภาพอสุจิ ระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะ (seminal plasma) และในพลาสมาเลือดและศึกษาทางพยาธิวิทยา (pathology) ของอวัยวะและหลอดเก็บอสุจิ ส่วนหนูที่เหลือในแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 9 ตัว จะนำไปทดสอบคุณสมบัติในการกลับคืนสู่สภาพเดิม (recovery) โดยหยุคให้สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกและไคเมธิลซัลฟอกไซด์ในหนูทดลองทุกกลุ่มเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นใช้วิธีเก็บตัวอย่างและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น

5. การบันทึกการเจริญเติบโต

ก่อนเริ่มการทดลองจะต้องชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวเพื่อนำไปคำนวณปริมาณสารสกัดจากเมสส์มะระจิ้งก่าให้ตรงตามปริมาณที่กำหนดไว้ในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวทุกตัวที่จับจนสิ้นสุดการทดลองเพื่อเปลี่ยนขนาดยาตามปริมาณที่กำหนดและศึกษาการเจริญเติบโต

6. ปริมาณอสุจิ

6.1 การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน (daily sperm production)

หลังจากสลบหนู ผ่าตัดแยกอวัยวะออกจากถุงหุ้มอวัยวะ แล้วนำอวัยวะมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นดึงเนื้อเยื่อชั้นทูนิกาอัลบูจินี (tunica albuginea) ออกจากอวัยวะข้างหนึ่ง แล้วนำอวัยวะทั้งหมดนั้นไปบดด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อในสารละลายชาโลนไตร์ตรอนเมอร์โซโอเลดเป็นเวลา 2 นาที จึงนำมาตรวจนับหัวอสุจิโดยสุ่มนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่องของเครื่องนับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 13) ค่าที่บันทึกได้นำมาคำนวณจำนวนอสุจิต่อน้ำหนักอวัยวะดังสูตรข้างล่างนี้ (Amann and Howards, 1980)

จำนวนอสุจิที่นับได้ทั้งหมด N ตัว

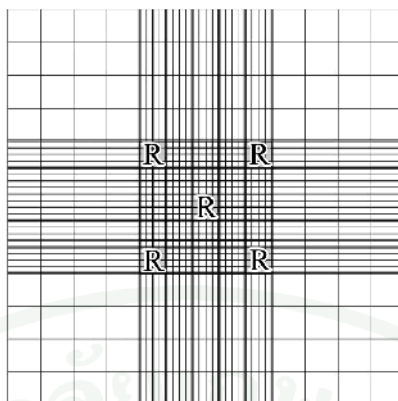
แฟกเตอร์เครื่องนับเม็ดเลือด (hematocytometer factor) 10^4 มิลลิลิตร

ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร

น้ำหนักอวัยวะ X กรัม

ตัวหารเวลา (time divisor) หนูแรท 6.3 วัน

$$\text{การผลิตอสุจิแต่ละวัน} = \frac{N \times 10^4 \times 10}{X \times 6.3} \text{ ตัวต่อกรัมต่อวัน}$$



ภาพที่ 13 การนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่อง (R) ของเครื่องนับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

6.2 จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย (spermatic count of caudal epididymis)

ตัดหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมาซึ่งน้ำหนัก นำไปบดด้วยเครื่องบดเนื้อแช่ในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดจนละเอียด เทกลับใส่หลอดทดลอง เขย่าจนเข้ากัน จากนั้นใช้ ไมโครปิเปตดูดของเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนเครื่องนับเม็ดเลือดแล้วสุ่มนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่องของเครื่องนับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 13) จากนั้นคำนวณดังสูตรข้างล่างนี้

ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ N ตัว

แฟกเตอร์สแควร์ (square factor) 5 ช่อง

แฟกเตอร์เครื่องนับเม็ดเลือด 10^4 มิลลิลิตร

ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร

น้ำหนักหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย X กรัม

$$\text{จำนวนอสุจิในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย} = \frac{N \times 5 \times 10^4 \times 10}{X} \text{ ตัวต่อกรัม}$$

7. คุณภาพอสุจิ

7.1 เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย (percent sperm motility)

เก็บน้ำเชื้อจากหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำการเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลแซงก์ที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิตร ที่บ่มอยู่ในน้ำอุ่น 30 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน หยดลงบนเครื่องนับเม็ดเลือดเพื่อนำไปตรวจนับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวและไม่เคลื่อนไหวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวในเครื่องนับเม็ดเลือดตัวอย่างละ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหวและไม่เคลื่อนไหว โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว} = \frac{\text{จำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหว}}{\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด} = \text{จำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหว} + \text{จำนวนอสุจิที่ไม่เคลื่อนไหว}$$

7.2 เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย (percent live spermatozoa)

หยดสีอีโอซิน-นิโกรซินลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด นำน้ำเชื้อจากหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมาผสมกับสีที่หยดบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที นำแผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาเกลี่ยป้ายผ่านหยดสีจนสุดแผ่นสไลด์ นำไปลงไฟจนแห้ง ตรวจนับจำนวนอสุจิที่เป็นและตาย จำนวน 100 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอสุจิที่เป็นจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายแล้วจะติดสีม่วงแดง (ภาพผนวกที่ ก11) จากนั้นนำมาคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนอสุจิที่เป็น}}{\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด}} \times 100$$

7.3 เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย (percent normal sperm morphology)

เกลี่ยปายน้ำเชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปย้อมสีในชุดสตีฟฟัลวิกซึ่งมีสารละลายอยู่ 3 ชนิด ประกอบด้วย เมธานอล อีโอซิน และเมธิลีนบลู โดยแช่ในสารละลาย เมธานอล 1 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่ในสารละลายเมธิลีนบลู 2 นาที ล้างในน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มลงในสารละลายอีโอซิน 3 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วจึงทิ้งไว้ให้แห้ง นับอสุจิจำนวน 200 ตัว โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติและผิดปกติชนิดต่าง ๆ เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิผิดปกติที่พบประกอบด้วยอสุจิไม่มีหาง (tailless) อสุจิไม่มีหัว (no hook head) อสุจิหัวผิดปกติ (amorphous head) อสุจิกอผิดปกติ (neck abnormal) อสุจิหางผิดปกติ (tail abnormal) (ภาพผนวกที่ ก12)

7.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซม (percent acrosomal intactness)

นำอสุจิจากหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย 1 ไมโครลิตร มารักษาสภาพในพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นดูดเอาน้ำส่วนบนออก ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยแอมโมเนียมอะซิเตท 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ดูดเอาส่วนใสออก จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยปายบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปย้อมด้วยสีกูแมสซิบิลู 20-40 ไมโครลิตร ใช้ปลายทิป (tip) คนเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วินาที (Larson and Miller, 1999) แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า นับอสุจิจำนวน 200 ตัว เพื่อตรวจสอบคุณภาพของอโครโซม ซึ่งจะพิจารณา 3 เกณฑ์ ดังนี้ อสุจิที่อโครโซมสมบูรณ์ (acrosome intact) หลังย้อมอโครโซมจะติดสีฟ้าสม่ำเสมอทั้งหมด อสุจิที่ไม่มีอโครโซม (no acrosome) หลังย้อมอโครโซมจะไม่ติดสี อสุจิที่อโครโซมถูกทำลาย (acrosome damage) หลังย้อมอโครโซมจะติดสีฟ้าแบบไม่สม่ำเสมอ (ภาพผนวกที่ ก13)

7.5 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (percent acrosomal and membrane intactness)

ตรวจหาเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิโดยการย้อมสี แอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซโอไซยานเนตติดฉลากฟลูออเรสเซนต์และโพรพิเดียม ไอโอไดด์ โดยนำน้ำเชื้อประมาณ 1 ไมโครลิตรมาเจือจางกับสารละลายโมดิไฟด์ไทโรด (modified Tyrode's medium; sperm TALP) ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 (ตารางผนวกที่ ข1) (Parrish *et al.*, 1988) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมโพรพิเดียมไอโอไดด์ (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และแอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซโอไซยานเนตติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโพรพิเดียมไอโอไดด์และแอ็กกลูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซโอไซยานเนตติดฉลากฟลูออเรสเซนต์เป็น 0.025 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ 0.01 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Thongtip *et al.*, 2004) กระบวนการย้อมสีทั้งหมดกระทำในที่มืดจากนั้นนำตัวอย่างมาหยดบนสไลด์ 10 ไมโครลิตร ตามด้วยกลีเซอรอลในปริมาณเล็กน้อยเพื่อลดการเคลื่อนไหวของอสุจิที่ยังมีชีวิต ทำให้สะดวกต่อการนับ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 1,000 เท่า และการนับจำนวนอสุจิ 100 ตัว อสุจิที่ประเมินคุณภาพมีรูปแบบดังนี้ อสุจิปกติที่มีโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (acrosome-membrane intact) หลังย้อมอสุจิจะไม่ติดสี อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์แต่โครโซมถูกทำลาย (membrane intact-acrosome damage) หลังย้อมโครโซมจะติดสีเขียว อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (membrane damage) หลังย้อมอสุจิจะติดสีแดง อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์และโครโซมถูกทำลาย (membrane-acrosome damage) หลังย้อมอสุจิจะติดทั้งสีเขียวและสีแดง (ภาพผนวกที่ ก14)

8. การเตรียมตัวอย่างของเหลวอณูและ การเก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์ทดสอบเทอโรน

หลังจากเก็บตัวอย่างอณู นำอณูมาทำให้เป็นชิ้นเนื้อเล็ก ๆ แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในเอสทีอีบัฟเฟอร์ (STE buffer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งประกอบด้วยซูโครส 0.25 โมลาร์ ทริส 10 มิลลิโมลาร์และเอชอีดีไอเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด 1 มิลลิโมลาร์ (Abul *et al.*, 2002) นำเนื้อเยื่อที่ถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized tissue) ไปหมุนเหวี่ยงที่ 15000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายชั้นบน (supernatant) ซึ่งมีลักษณะขุ่นข้นมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดตะกอนเนื้อเยื่อออกไป เก็บ

สารละลายชั้นบนที่ได้ซึ่งมีลักษณะขุ่นเช่นเดียวกันแบ่งใส่เอปเพนคอร์ฟ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ทดสอบเทอโรนในของเหลวอัมตะ (Abul *et al.*, 2002)

เก็บเลือดจากหลอดเลือดดำช่องท้อง (abdominal vein) หลังจากสลบหนูทันที ถ่ายเลือดลงในเอปเพนคอร์ฟที่มีเฮพาริน นำเอปเพนคอร์ฟไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนซึ่งเป็นพลาสมาเลือดแบ่งใส่เอปเพนคอร์ฟ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ทดสอบเทอโรนในพลาสมาเลือด

9. การวิเคราะห์ทดสอบเทอโรนโดยการหาปริมาณอิมมูโนทางรังสี (radioimmunoassay)

ก่อนการวิเคราะห์ฮอร์โมนให้นำของเหลวอัมตะและพลาสมาเลือดที่เก็บไว้มาละลายที่อุณหภูมิห้อง เจือจางของเหลวอัมตะที่ได้โดยนำของเหลวอัมตะปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางกับเอสทีอีบัฟเฟอร์ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้วอร์เทกซ์ ส่วนพลาสมาเลือดสามารถนำไปวิเคราะห์ทดสอบเทอโรนได้โดยตรง วิเคราะห์ทดสอบเทอโรนโดยการหาปริมาณอิมมูโนทางรังสีโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปโคเทเคาท์โททอลทดสอบเทอโรน โดยเปิดสารละลายมาตรฐานทดสอบเทอโรนความเข้มข้นตั้งแต่ 0-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและสารตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ภายในเคลือบด้วยแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อทดสอบเทอโรน จากนั้นเติมทดสอบเทอโรนติดฉลากไอโซโทปรังสีไอโอดีน-125 (เลขมวล) (^{125}I -testosterone) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด รวมทั้งหลอดเปล่า (uncoated tube) 1 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดโททอลเคาท์ (total count; T) ผสมสารในหลอดให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเทสารละลายภายในหลอดออกจนหมด ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2 ถึง 3 นาที วัดปริมาณรังสีแกมมาด้วยเครื่องนับรังสีแกมมาเป็นเวลา 1 นาที ทำ 2 ซ้ำสำหรับแต่ละตัวอย่างทดลองแล้วนำข้อมูลที่ได้นำไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูปจีเอ็มเอส (GMS Version 3.05: GAMMA-C12) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและหาความเข้มข้นของทดสอบเทอโรนในตัวอย่าง

10. การศึกษาทางพยาธิวิทยา (pathology)

หลังจากสลบหนูด้วยอีเทอร์ ผ่าตัดแยกอัมตะและหลอดเก็บอสุจิทั้ง 3 ส่วน แล้วทำการคงสภาพเนื้อเยื่อโดยเร็วที่สุดโดยใช้ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 1 คืน ล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วยน้ำ ขึ้นตอนต่อไปจะจัดน้ำออกด้วยเอทานอล 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำขึ้น

เนื้อไปแช่โซลิน ฟังตัวอย่างด้วยพาราฟินปล่อยทิ้งไว้ให้แข็งตัว นำพาราฟินบล็อกไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ นำชิ้นเนื้อมาติดบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกโซลินและอีโอซิน จากนั้นนำไปตรวจสภาพทางพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

11. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\bar{x}$ S.E.) ของเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์ การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซม เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซมและเยื่อหุ้มอสุจิ เทสทอสเทรอนในของเหลวอันทะและพลาสมาเลือด ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ตรวจสอบการแจกแจงปกติและความเป็นเอกพันธ์ของค่าความแปรปรวนของกลุ่มข้อมูลโดยวิธีทดสอบโคลโมโกรอฟ-สมิธอร์นอฟ (Kolmogorov-Smirnov test) และลีวี (Levene test) ตามลำดับ จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variance; One-Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่โดยวิธีของคันแคน (Duncan's multiple range test; DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 16

12. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลาง ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการทางสรีรวิทยา ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. ระยะเวลาทำการวิจัย

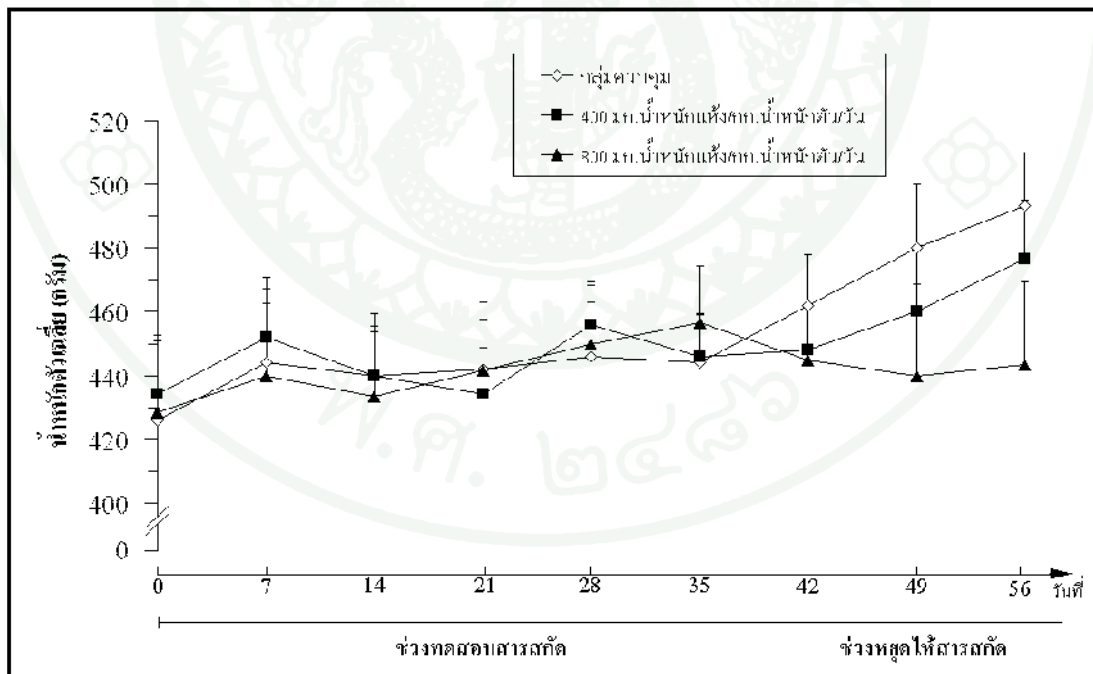
การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 และสิ้นสุดการทดลองเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว

น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ก่อนการทดลอง (วันที่ 0) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 461.67 ± 9.1 , 457.14 ± 9.44 และ 464 ± 13.63 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 14) น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 42) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 460 ± 11.95 , 453.75 ± 12.67 และ 455.71 ± 11.92 กรัม ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอด 42 วันของการทดลอง ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน (วันที่ 56) น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 493.33 ± 16.67 , 476.67 ± 18.56 และ 443.33 ± 26.03 กรัม ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันตลอด 56 วัน ของการทดลอง

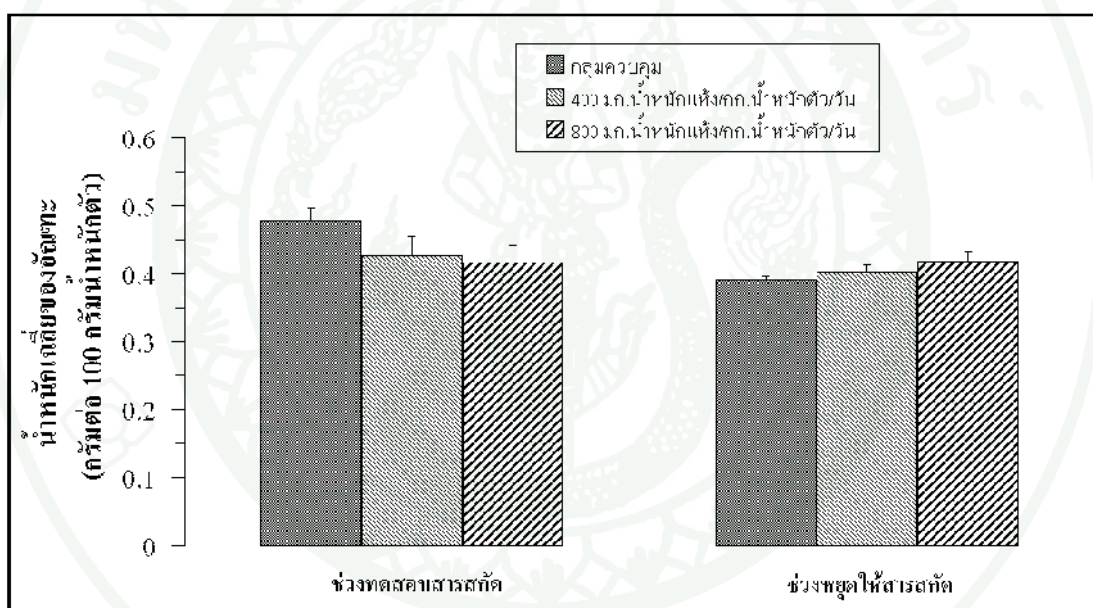


ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของหนูวิสตาแรทแต่ละกลุ่มการทดลอง ตลอดการทดลอง 56 วัน

2. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะในระบบสืบพันธุ์

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะ

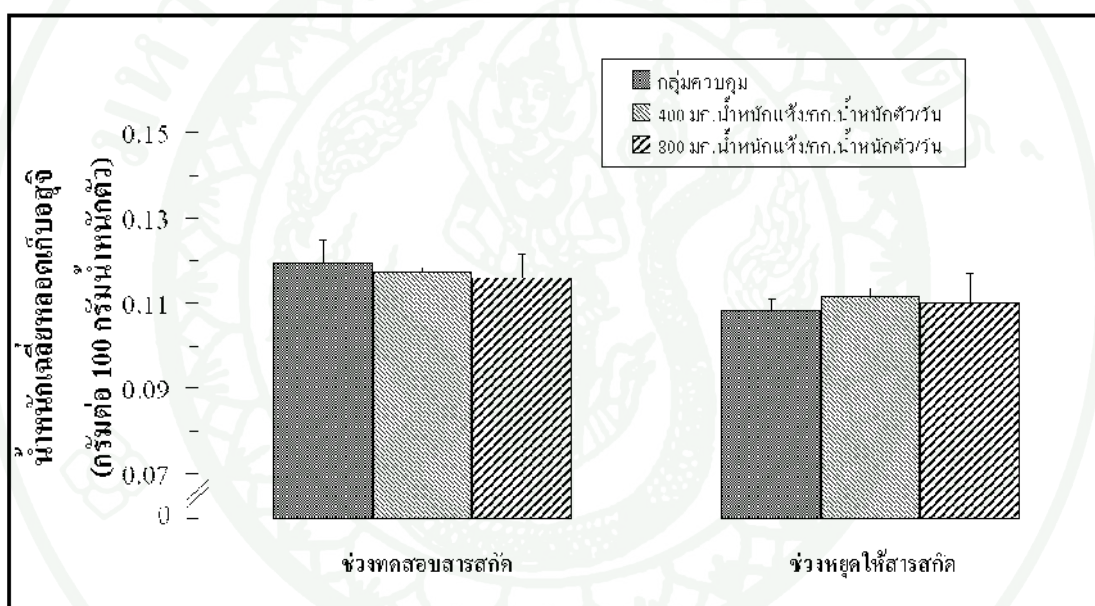
หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน น้ำหนักเฉลี่ยอวัยวะของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 ± 0.03 , 0.43 ± 0.04 และ 0.42 ± 0.04 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 15) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน น้ำหนักเฉลี่ยอวัยวะของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.39 ± 0.01 , 0.40 ± 0.01 และ 0.418 ± 0.01 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะ (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

2.2 น้ำหนักเฉลี่ยของหลอดเก็บอสุจิ

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกินเป็นเวลา 42 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของหลอดเก็บอสุจิหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.119 ± 0.01 , 0.117 ± 0.00 และ 0.116 ± 0.01 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ (ภาพที่ 16) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกินเป็นเวลา 14 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของหลอดเก็บอสุจิของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.108 ± 0.00 , 0.112 ± 0.00 และ 0.110 ± 0.01 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

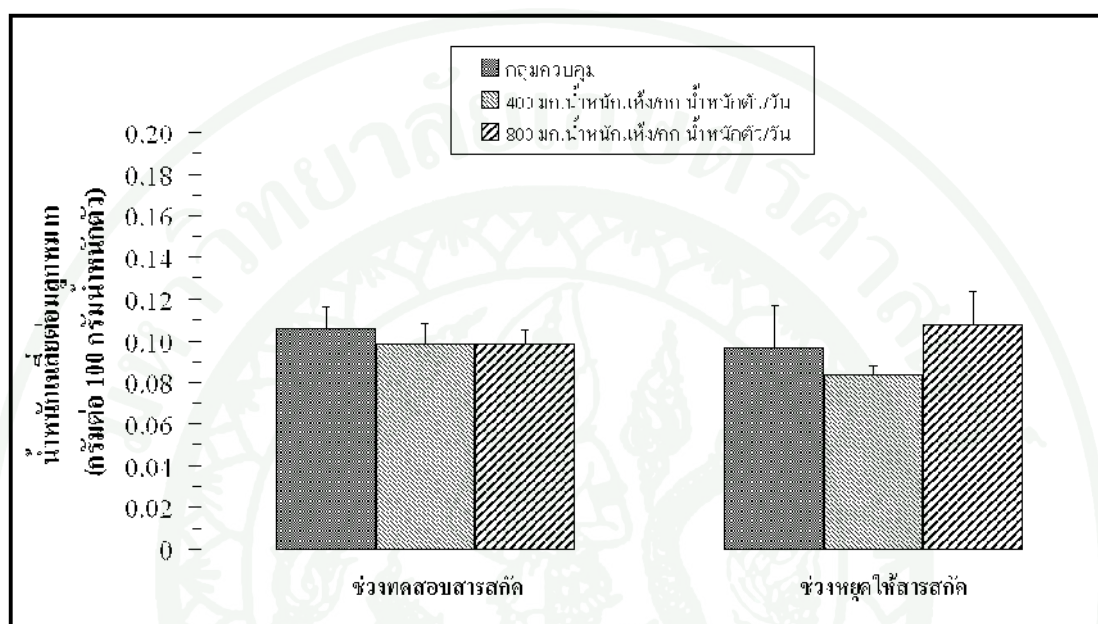


ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) ของหลอดเก็บอสุจิหนูตัวผู้แต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

2.3 น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมลูกหมาก

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกินเป็นเวลา 42 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมลูกหมากหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.106 ± 0.01 , 0.098 ± 0.01 และ 0.098 ± 0.01 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ (ภาพที่ 17) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P >$

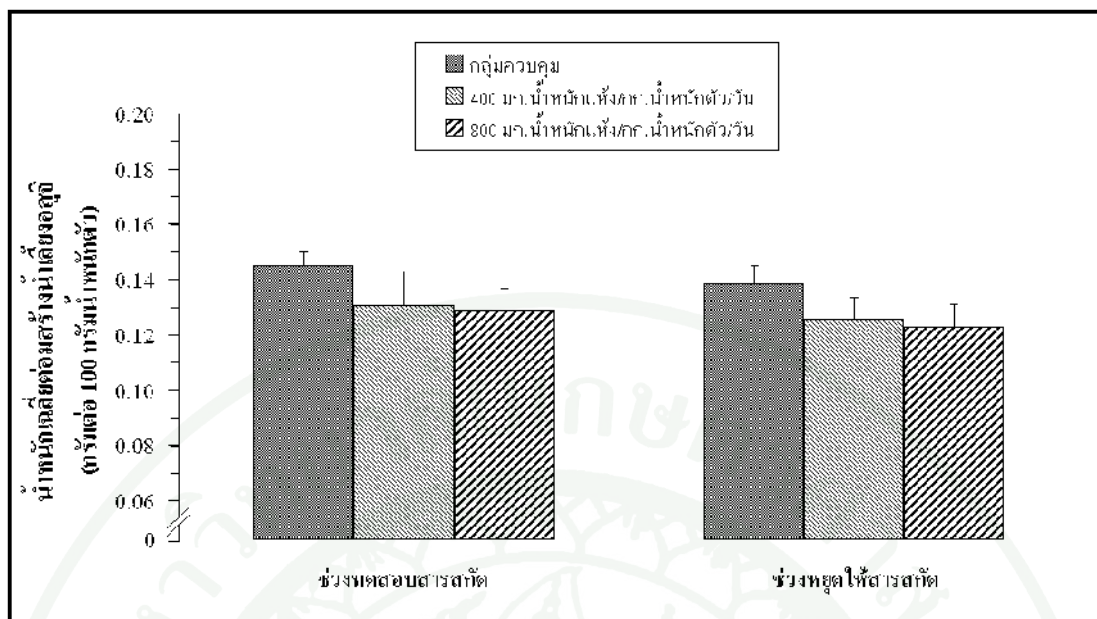
0.05) หลังหยุคให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมลูกหมากของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.097 ± 0.02 , 0.083 ± 0.00 และ 0.108 ± 0.02 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) ของต่อมลูกหมาก หนูวิสตาร์แรตแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และ วันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุคให้สารสกัด)

2.4 น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ

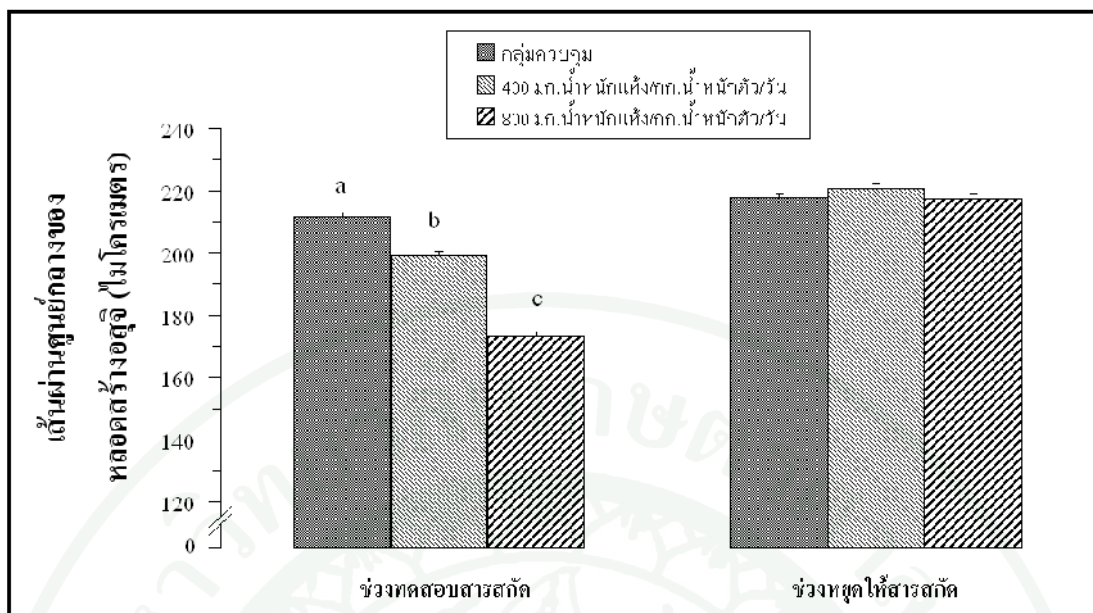
หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 42 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.145 ± 0.00 , 0.131 ± 0.01 และ 0.129 ± 0.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ (ภาพที่ 18) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุคให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.138 ± 0.01 , 0.126 ± 0.01 และ 0.123 ± 0.01 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) ของต่อมสร้างน้ำเลี้ยง อสุจิหนูวิสตาร์แรพแต่ละกลุ่มการทดลองวันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

3. เส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิ

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 42 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิของหนูแรพเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 211.50 ± 1.63 , 199.11 ± 1.44 และ 173.13 ± 1.59 ไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 19) จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 199.11 และ 173.13 ไมโครเมตรตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิ 211.50 ไมโครเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นยังส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกด้วย หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 14 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 217.65 ± 1.29 , 220.57 ± 1.39 และ 217.38 ± 1.36 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 19 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของผลสดสร้างอสุจิ (ไมโครเมตร) แต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

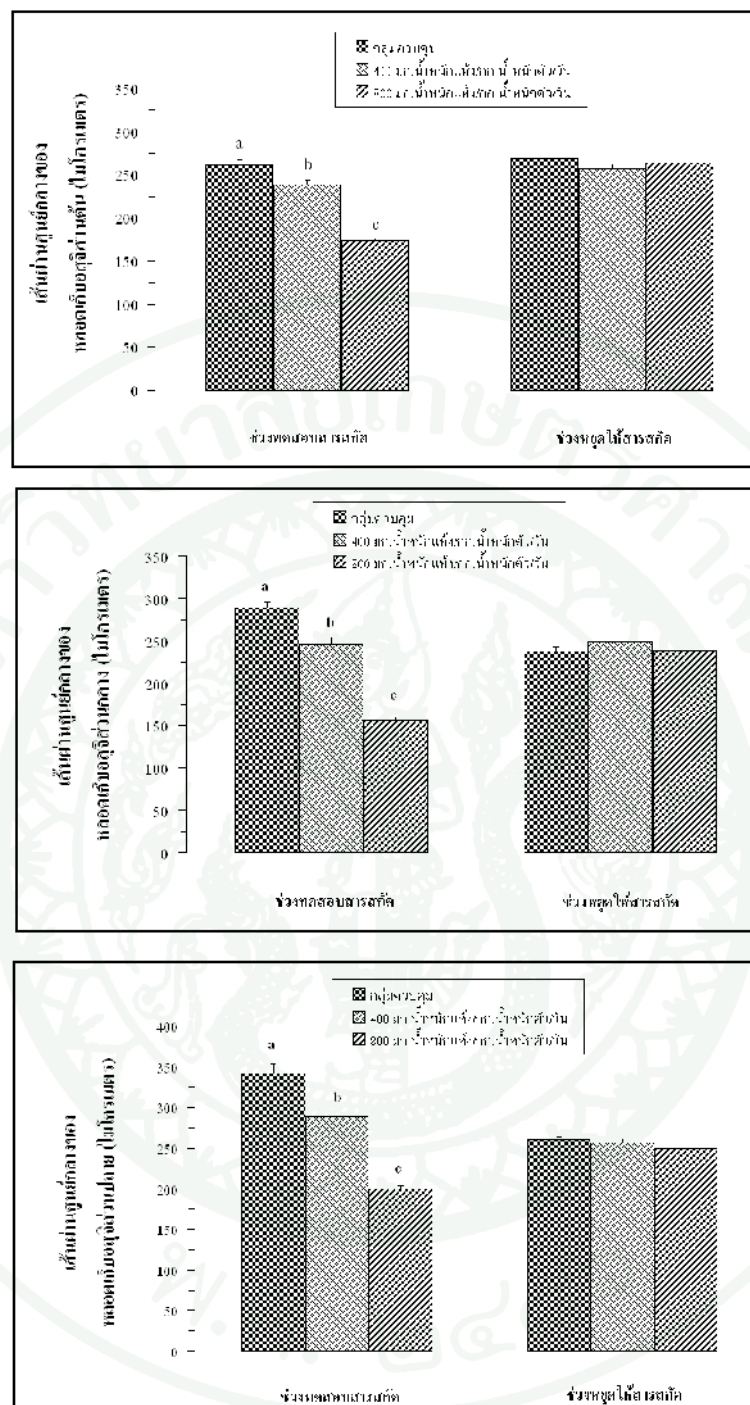
หมายเหตุ: ^{a,b,c}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

4. เส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิ

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 42 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิ ส่วนต้นของหนูแรพเทสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 261.72 ± 5.76 , 238.21 ± 5.65 และ 173.84 ± 2.95 ไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 20-บน) กลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 238.21 และ 173.84 ไมโครเมตรตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนต้น 261.72 ไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นยังส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกด้วย หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 14 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิ ส่วนต้นของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 269.82 ± 4.00 , 257.87 ± 4.34 และ 263.93 ± 4.84 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของหนูแรพเพสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 288.75 ± 6.39 , 246.42 ± 8.29 และ 155.71 ± 3.68 ไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 20-กลาง) จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 246.42 และ 155.71 ไมโครเมตรตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนกลาง 288.75 ไมโครเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นยังส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกด้วย หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 238.00 ± 5.16 , 249.00 ± 8.35 และ 238.66 ± 1.65 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของหนูแรพเพสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 342.22 ± 10.89 , 288.40 ± 5.55 และ 199.59 ± 3.54 ไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 20-ล่าง) จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 288.40 และ 199.59 ไมโครเมตรตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย 342.22 ไมโครเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นยังส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกด้วย หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 260.67 ± 2.90 , 256.76 ± 4.79 และ 249.45 ± 5.53 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

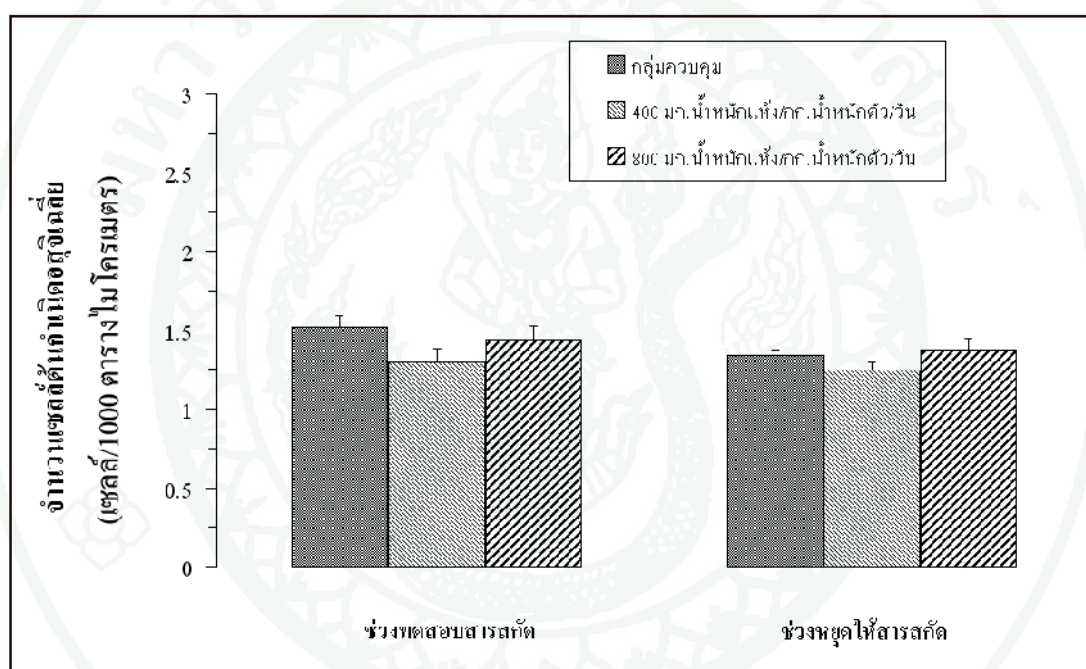


ภาพที่ 20 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเก็บอสุจิส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย (ไมโครเมตร) แต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b,c}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

4. จำนวนเซลล์สืบพันธุ์

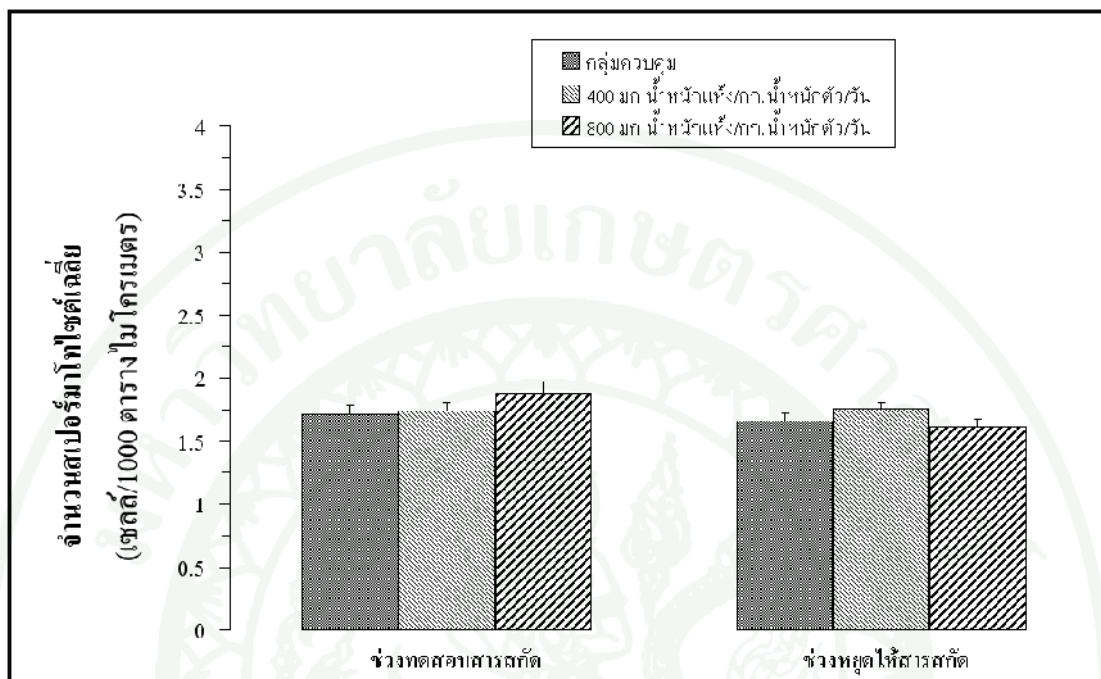
หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.51 ± 0.07 , 1.29 ± 0.09 และ 1.44 ± 0.09 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 21) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.34 ± 0.04 , 1.24 ± 0.05 และ 1.38 ± 0.07 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 21 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

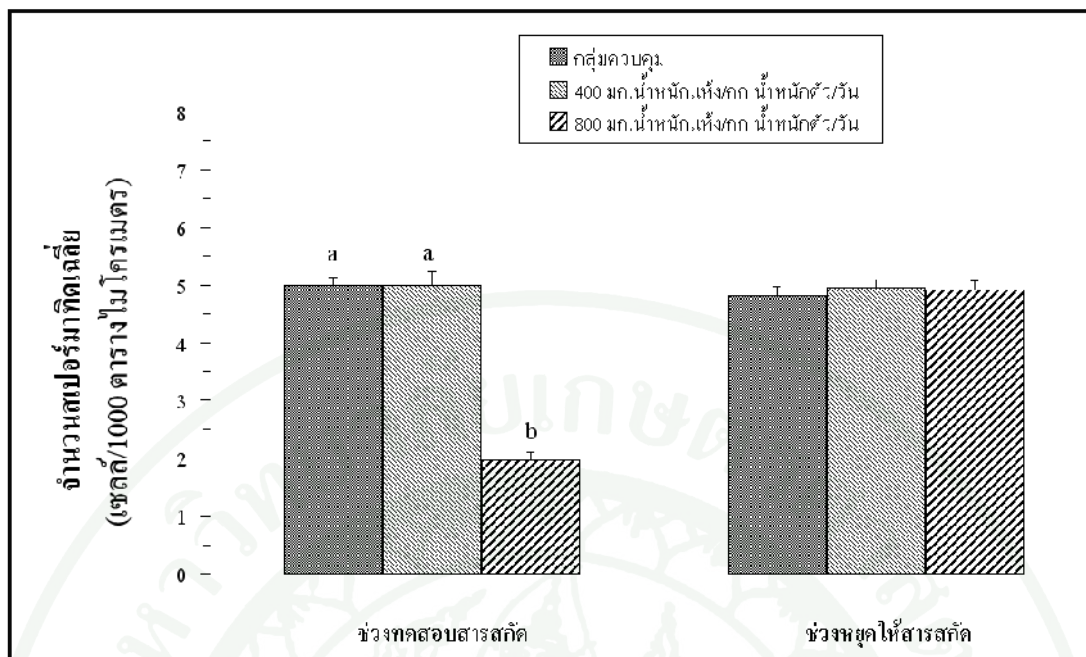
หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน จำนวนสเปิร์มาโทไซด์เฉลี่ยในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.71 ± 0.07 , 1.74 ± 0.07 และ 1.88 ± 0.1 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 22) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน จำนวนสเปิร์มาโทไซด์เฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มี

ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.66 ± 0.06 , 1.76 ± 0.04 และ 1.61 ± 0.06 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



ภาพที่ 22 ค่าเฉลี่ยจำนวนสเปิร์มาโทไซด์เฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 42 วัน จำนวนสเปิร์มาทิดเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.99 ± 0.15 , 4.99 ± 0.24 และ 1.97 ± 0.13 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 23) จากการทดลองพบว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนปริมาณ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน ลดจำนวนสเปิร์มาทิดเฉลี่ยลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และหลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน จำนวนสเปิร์มาทิดเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 ± 0.15 , 4.94 ± 0.14 และ 4.91 ± 0.15 เซลล์ต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



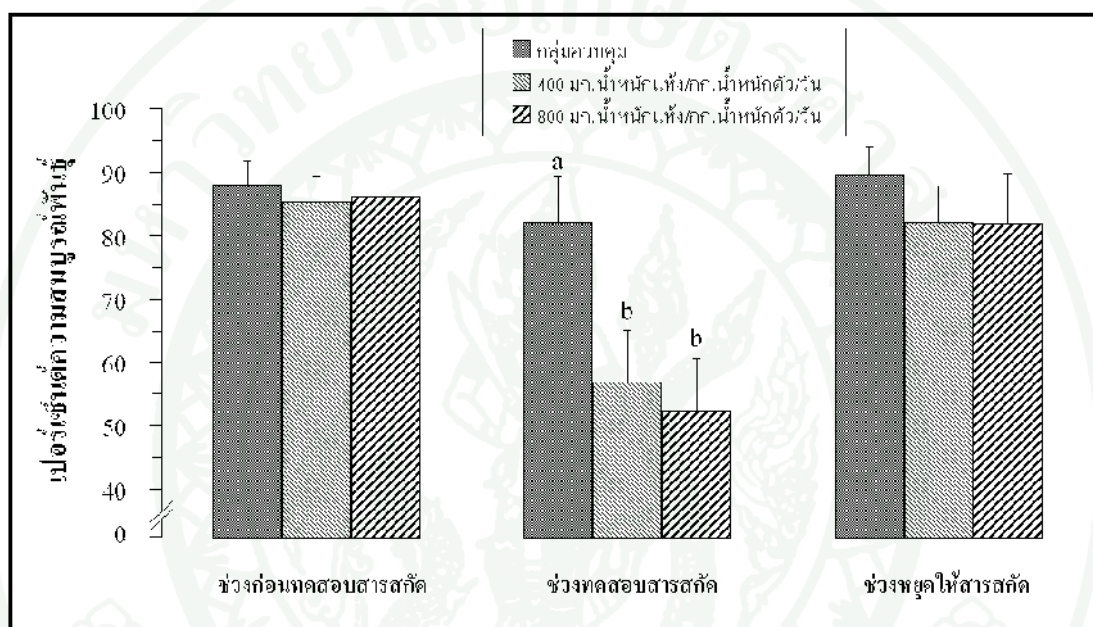
ภาพที่ 23 ค่าเฉลี่ยจำนวนสเปิร์มมาทิดเฉลี่ยต่อ 1000 ตารางไมโครเมตรแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

5. ความสมบูรณ์พันธุ์

เมื่อเริ่มการทดลองเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูแรพเพสคูในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.09 ± 3.65 , 85.34 ± 3.88 และ 85.98 ± 3.51 ตามลำดับ (ภาพที่ 24) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเริ่มการทดลอง ($P > 0.05$) หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูแรพเพสคูในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82.05 ± 7.18 , 56.93 ± 8.13 และ 52.42 ± 8.12 ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 57 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ย 82 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม

ตามการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์มากกว่าที่ระดับสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 89.66 ± 4.23 , 82.05 ± 5.75 และ 81.91 ± 7.86 ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



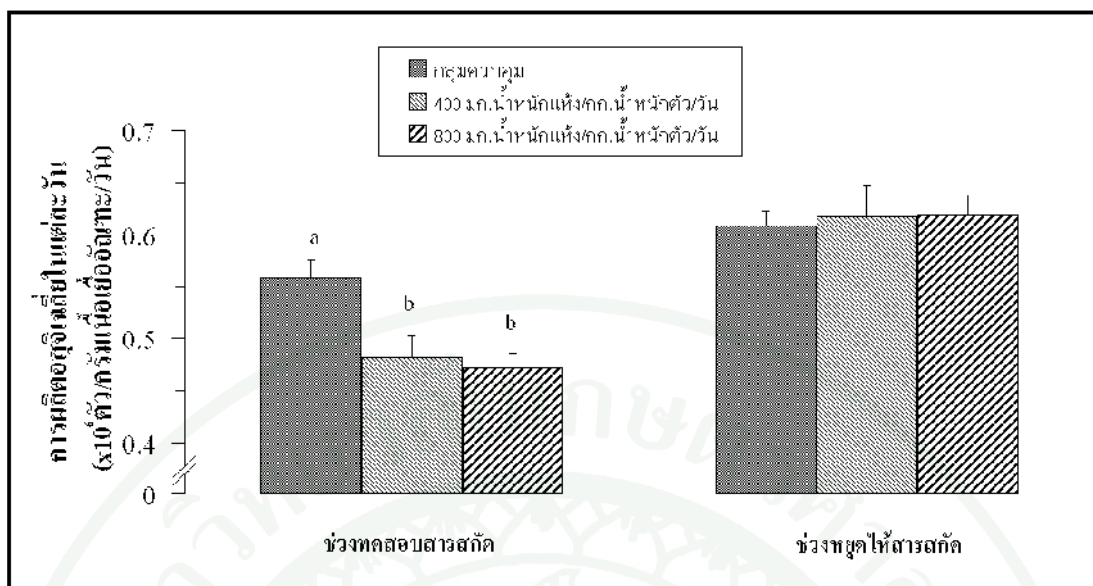
ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบก่อนเริ่มการทดลอง (ช่วงก่อนทดสอบสารสกัด) วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

6. ปริมาณอสุจิ

6.1 การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวันของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.56 ± 0.02 , 0.48 ± 0.02 และ 0.47 ± 0.01 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่ออัณฑะต่อวันตามลำดับ (ภาพที่ 25) จากการทดลองพบว่าการผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวันของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวันของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดการผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวันมากกว่าที่ระดับสารสกัดจากเมล็ดมะระขึ้นก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวันของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.61 ± 0.01 , 0.62 ± 0.03 และ 0.62 ± 0.02 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่ออัณฑะต่อวันตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



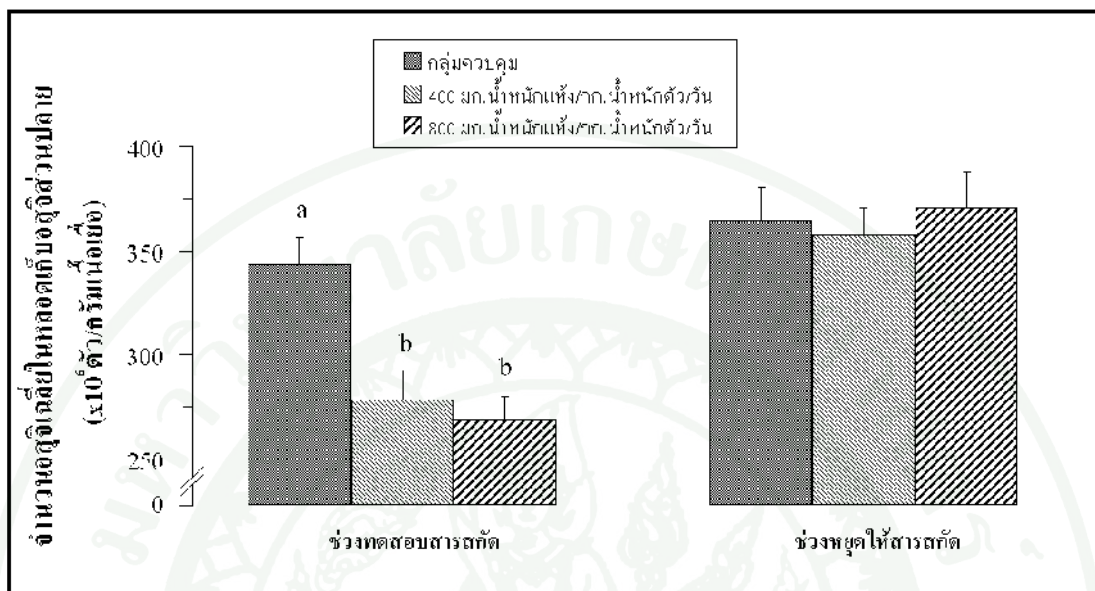
ภาพที่ 25 การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน (10^6 ตัวต่อ 1 กรัมเนื้อเยื่ออวัยวะต่อวัน) ของ หนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

6.2 จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 42 วัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิ ส่วนปลายของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 343.39 ± 12.70 , 278.19 ± 13.98 และ 268.60 ± 11.24 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่อตามลำดับ (ภาพที่ 26) จากการทดลองพบว่าจำนวนอสุจิ เฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก. น้ำหนัก แห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การเพิ่มความ เข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของกลุ่ม ที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดเมล็ด มะระขึ้น 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดจำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอด เก็บอสุจิส่วนปลายมากกว่าที่ระดับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/ วัน หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 14 วัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วน ปลายของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 364.23 ± 16.31 , 357.39 ± 13.29 และ

370.62 ± 17.31 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่อตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง



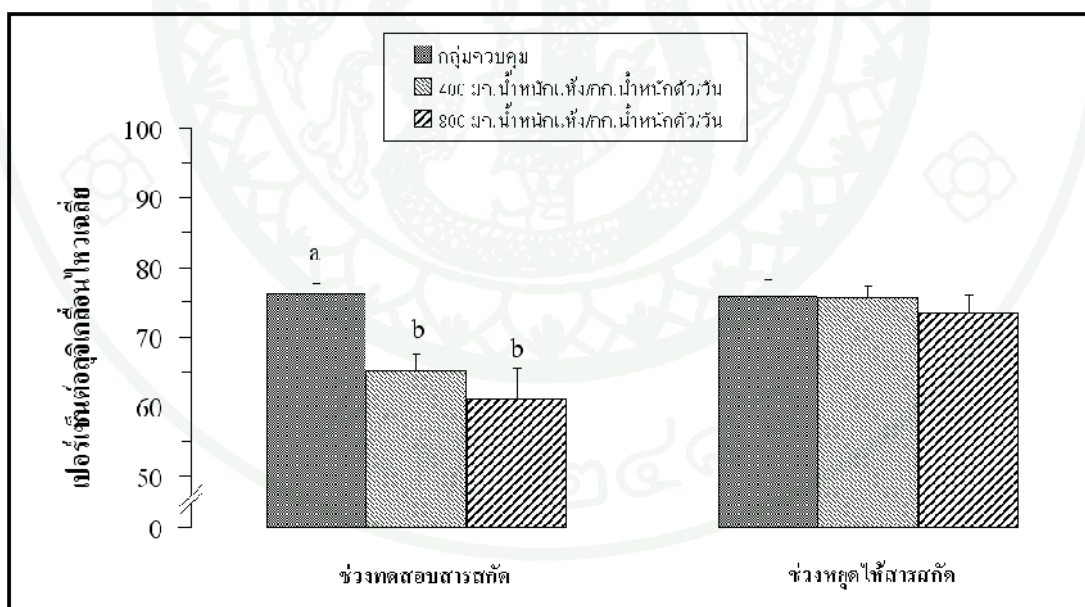
ภาพที่ 26 จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย (10^6 ตัวต่อ 1 กรัมเนื้อเยื่อ) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

7. คุณภาพอสุจิ

7.1 เปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยของหนูแรพเพสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 76.21 ± 1.46 , 65.15 ± 2.43 และ 61.01 ± 4.35 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ภาพที่ 27) การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ส่งผลต่อเปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการลดลงของเปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยเมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.81 ± 2.47 , 75.72 ± 1.59 และ 73.38 ± 2.72 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

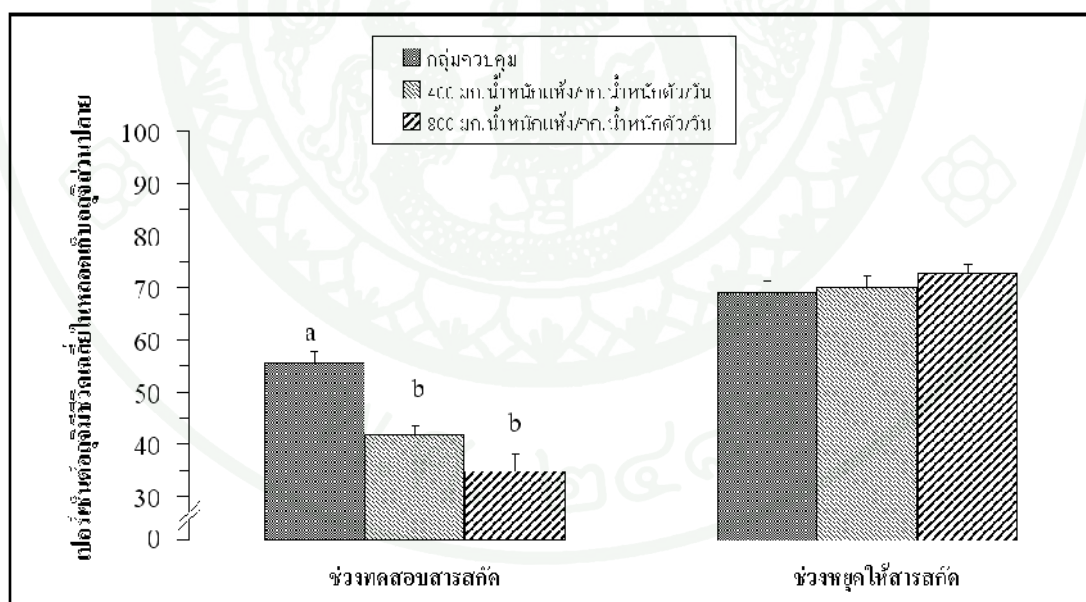


ภาพที่ 27 เปอร์เซนต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรพแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

7.2 เปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ย

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกินเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55.65 ± 2.27 , 41.84 ± 1.72 และ 34.76 ± 3.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 28) จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 41.84 และ 34.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ย 55.65 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดเปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยมากกว่าที่ระดับสารสกัดเมล็ดมะระจีน 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกินเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.05 ± 2.36 , 69.94 ± 2.31 และ 72.83 ± 1.63 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

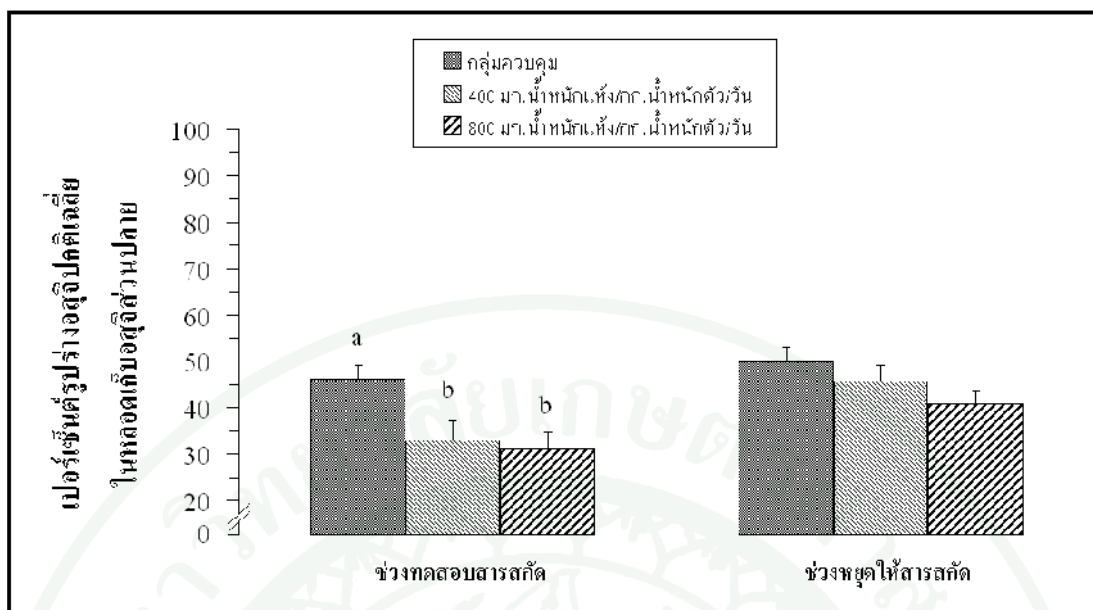


ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์ต่อสุกมีชีวิตเฉลี่ยของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

7.3 เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยของหนูแรพเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.14 ± 3.08 , 32.92 ± 4.34 และ 31.29 ± 3.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 29) จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระขึ้นก 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดลงเป็น 32.92 และ 31.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย 46.14 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยมากกว่าที่ระดับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.79 ± 3.28 , 45.68 ± 3.49 และ 40.76 ± 2.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

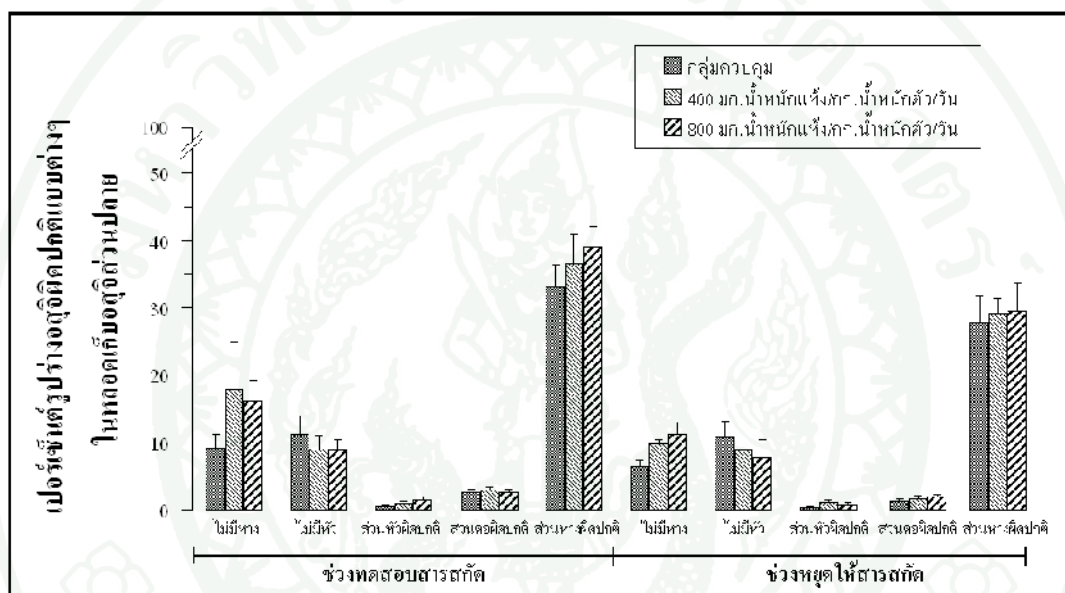


ภาพที่ 29 เปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิผิดปกติของหนูวิสตาร์แรตแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

ความผิดปกติของรูปร่างอสุจิที่พบประกอบด้วย อสุจิไม่มีหาง (tailless), อสุจิไม่มีหัว (no hook head), อสุจิหัวผิดปกติ (amorphous head), อสุจิกอผิดปกติ (neck abnormal) และอสุจิหางผิดปกติ (tail abnormal) (ภาพที่ 30) หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิไม่มีหางเฉลี่ยของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.12 ± 2.06 , 17.74 ± 7.07 และ 16.18 ± 3.10 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิไม่มีหัวเฉลี่ยของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.19 ± 2.79 , 9.05 ± 1.99 และ 8.85 ± 1.64 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิหัวผิดปกติเฉลี่ยของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 ± 0.14 , 1.01 ± 0.28 และ 1.42 ± 0.56 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิกอผิดปกติเฉลี่ยของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.62 ± 0.42 , 2.83 ± 0.54 และ 2.51 ± 0.54 เปอร์เซนต์ตามลำดับและเปอร์เซนต์รูปร่างอสุจิหางผิดปกติของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 33.07 ± 3.01 , 36.51 ± 4.36 และ 38.92 ± 3.15 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของความผิดปกติของรูปร่างอสุจิแบบต่าง ๆ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซนต์อสุจิไม่มีหางเฉลี่ยของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.44 ± 0.88 , 9.79 ± 0.69 และ 11.27 ± 1.68 เปอร์เซนต์

ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์อสุจิไม่มีหัวเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.73 ± 2.40 , 8.79 ± 1.10 และ 7.74 ± 2.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์อสุจิหัวผิดปกติเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.24 ± 0.24 , 1.14 ± 0.32 และ 0.68 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์อสุจิคอผิดปกติเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.33 ± 0.31 , 1.59 ± 0.54 และ 1.97 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและเปอร์เซ็นต์อสุจิหางผิดปกติเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 27.81 ± 3.90 , 29.15 ± 2.30 และ 29.51 ± 4.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

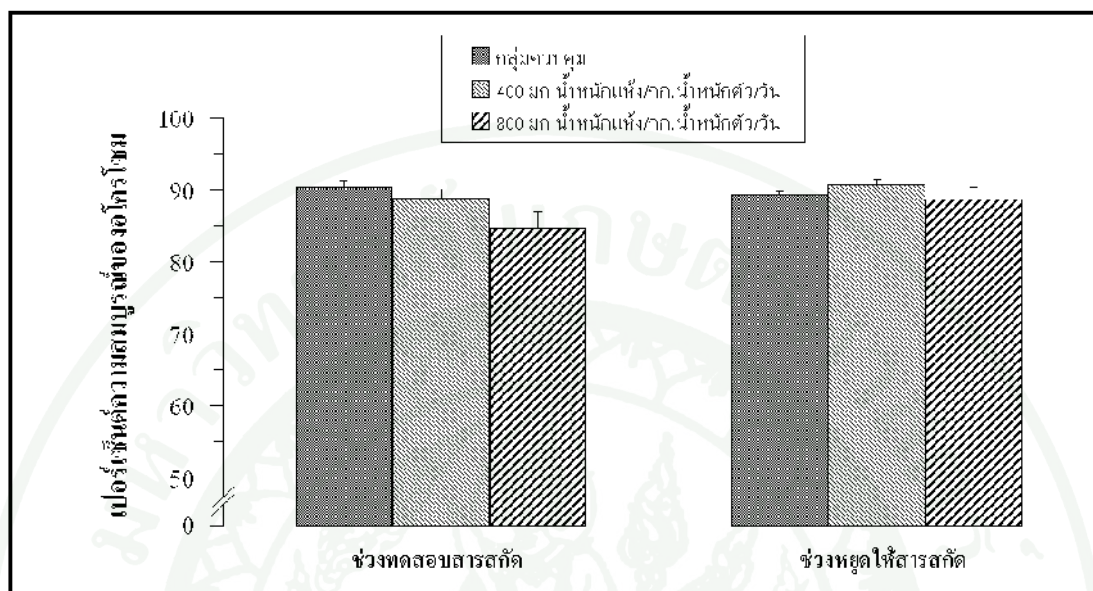


ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิผิดปกติแบบต่าง ๆ ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

7.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซม

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซมของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 90.43 ± 0.77 , 88.88 ± 1.15 และ 84.5 ± 2.39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 31) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซม

ของหนูกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 89.27 ± 0.55 , 90.73 ± 0.77 และ 88.69 ± 1.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

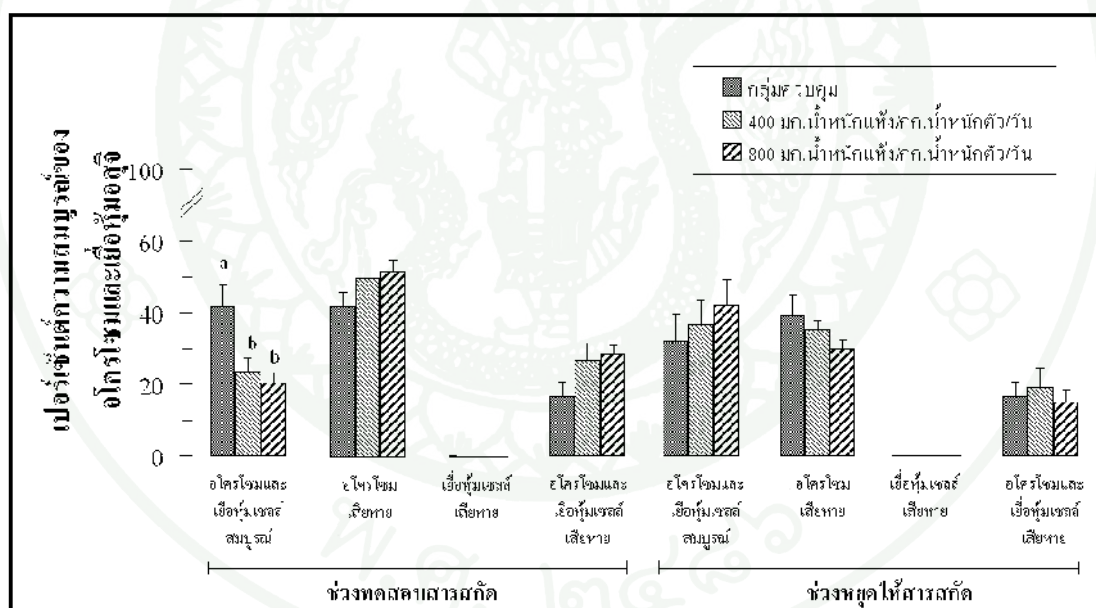


ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโซมของหนูวิสตาร์แรตแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยุดให้สารสกัด)

7.5 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิ

หลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกินเป็นเวลา 42 วัน เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิสมบูรณ์ของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.47 ± 6.01 , 23.42 ± 3.87 และ 20.18 ± 3.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 32) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีโครโซมเสียหายแต่เชื้อหุ้มเซลล์อสุจิสมบูรณ์ของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.76 ± 4.23 , 49.88 ± 3.73 และ 51.65 ± 3.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีโครโซมสมบูรณ์แต่เชื้อหุ้มเซลล์อสุจิเสียหายของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.15 ± 0.10 , 0.00 ± 0.00 และ 0.06 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิเสียหายของหนูแรตเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.62 ± 3.93 , 26.70 ± 4.59 และ 28.11 ± 2.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

หลังหยดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน ค่าเฉลี่ยของสุจิตที่มีอโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์ของสุจิตสมบูรณ์ของหนูกุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 31.94 ± 7.43 , 36.55 ± 7.08 และ 41.94 ± 7.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของสุจิตที่มีอโครโซมเสียหายแต่เชื้อหุ้มเซลล์ของสุจิตสมบูรณ์ของหนูกุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.20 ± 5.72 , 35.28 ± 2.55 และ 29.73 ± 2.59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของสุจิตที่มีอโครโซมสมบูรณ์แต่เชื้อหุ้มเซลล์เสียหายของหนูแรพเพสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ทุกกลุ่มการทดลองและค่าเฉลี่ยของสุจิตที่มีอโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์เสียหายของหนูแรพเพสผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.37 ± 4.26 , 19.05 ± 5.36 และ 14.88 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของสุจิตที่มีอโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์ของสุจิตสมบูรณ์ อสุจิตที่มีอโครโซมสมบูรณ์แต่เชื้อหุ้มเซลล์เสียหาย อสุจิตที่มีอโครโซมเสียหายแต่เชื้อหุ้มเซลล์ของสุจิตสมบูรณ์และอสุจิตที่มีอโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์เสียหายของหนูแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในวันที่ 56 ของการทดลอง

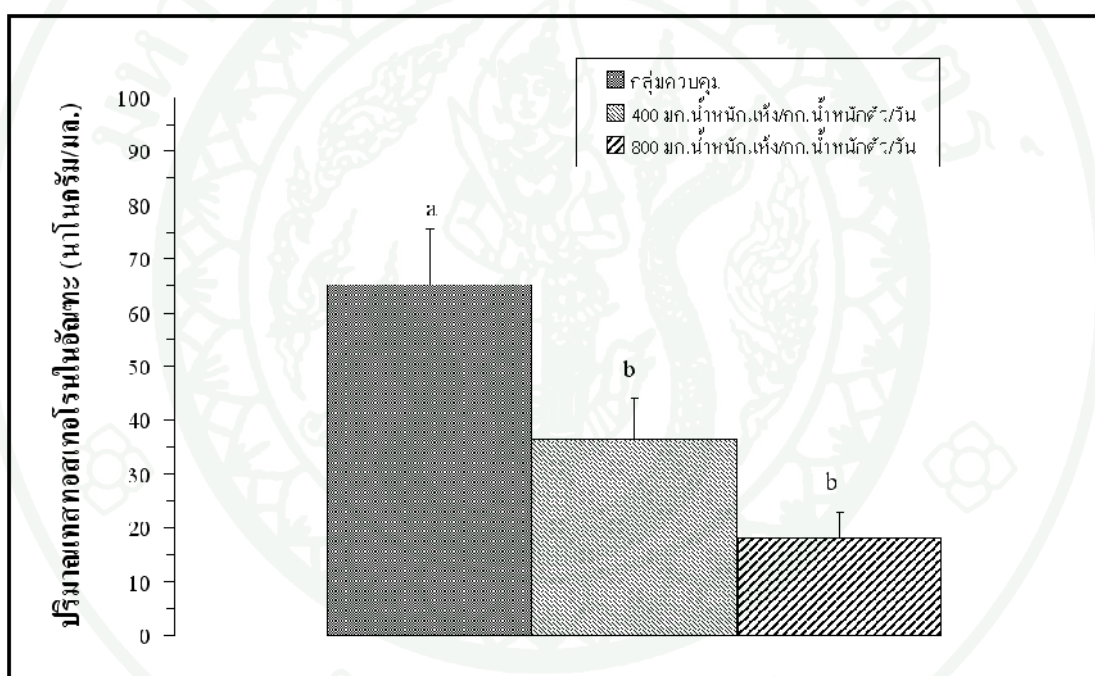


ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซมและเชื้อหุ้มเซลล์ของหนูวิสตาร์แรพแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ช่วงหยดให้สารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

8. การเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอสุจิ

ระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอสุจิเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65.20 ± 10.37 , 36.45 ± 7.61 และ 18.17 ± 4.67 นาโนกรัมต่อมล.ตามลำดับ (ภาพที่ 33) การให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ส่งผลลดระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับเทสโทสเตอโรนเมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ($P > 0.05$)

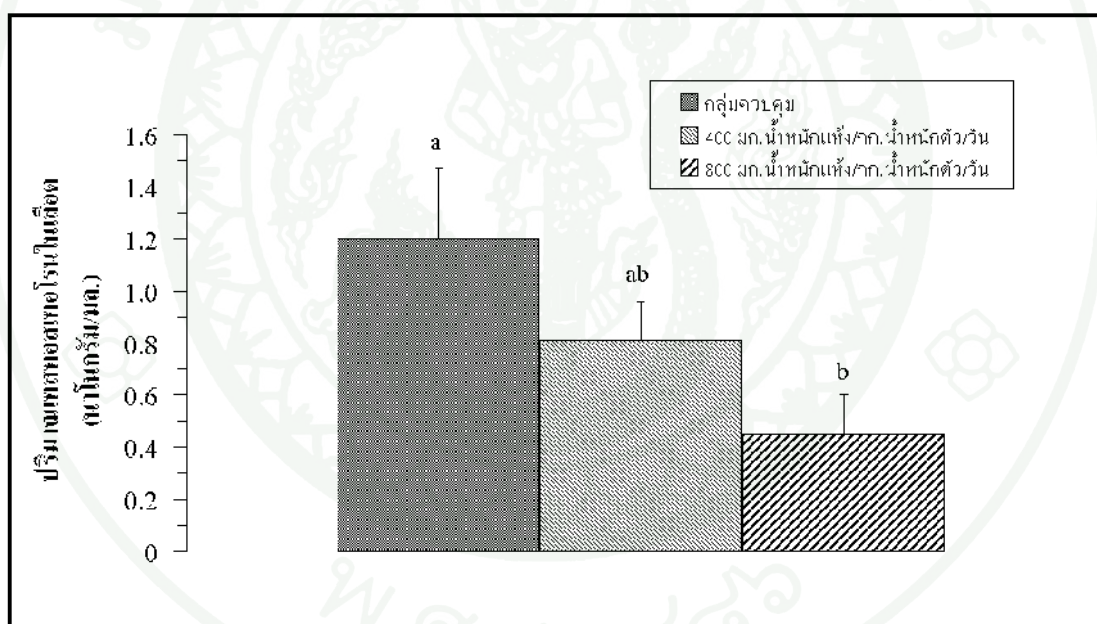


ภาพที่ 33 ระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอสุจิเฉลี่ย (นาโนกรัม/ 1 มิลลิลิตร) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

9. การเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือด

ระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.20 ± 0.27 , 0.81 ± 0.15 และ 0.45 ± 0.15 นาโนกรัมต่อมล.ตามลำดับ (ภาพที่ 34) ระดับความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดในกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นน 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) แต่เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดมะระขึ้นน 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน พบว่าระดับความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดในกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นน 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นน 800 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ($P > 0.05$)



ภาพที่ 34 ระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดเฉลี่ย (นาโนกรัม/ 1 มิลลิลิตร) ของหนูวิสตาร์แรทแต่ละกลุ่มการทดลอง วันที่ 42 ของการทดลอง (ช่วงทดสอบสารสกัด)

หมายเหตุ: ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P=0.05$

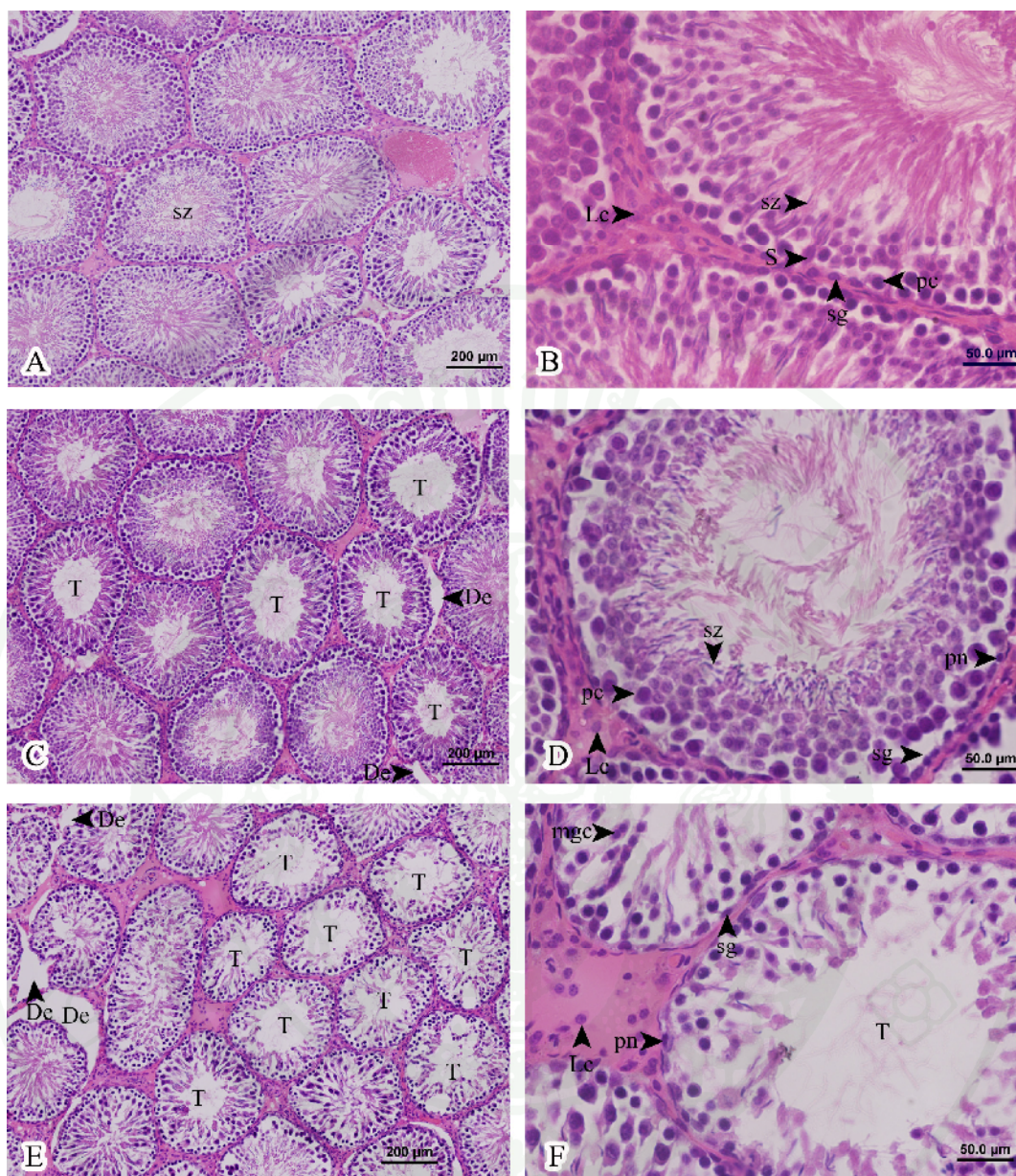
10. การศึกษาทางพยาธิวิทยา

10.1 อัมตะ

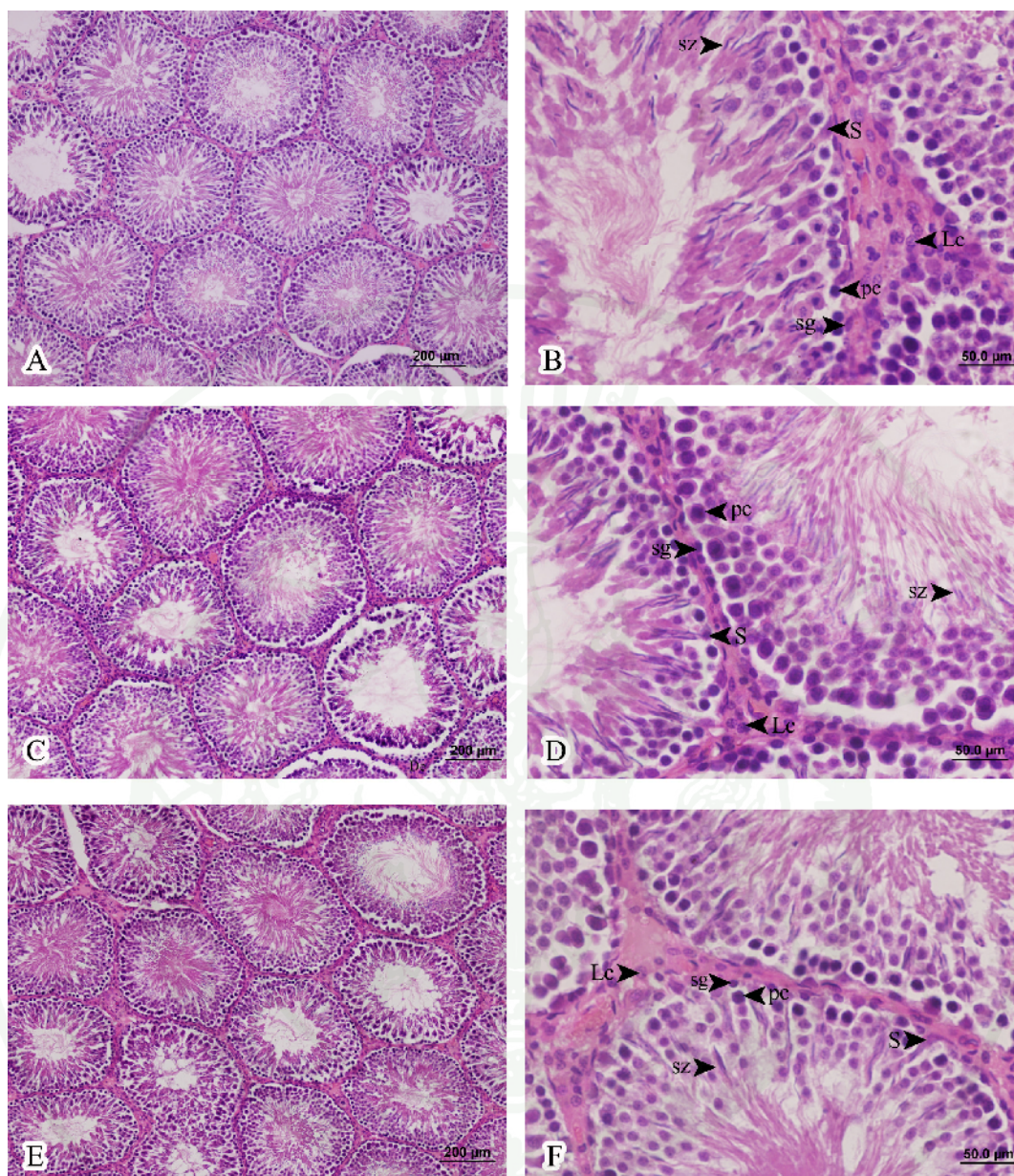
จากการตรวจสอบเนื้อเยื่ออัมตะหนูกลุ่มควบคุมพบกลุ่มเซลล์ต่าง ๆ ในช่องภายในหลอดสร้างอสุจิ (seminiferous lumen) ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ (spermatogonia; sg) สเปออร์มาโทไซต์ (spermatocytes; pc) สเปออร์มาทิด (spermatids; st) และอสุจิระยะเต็มวัย (spermatozoa; sz) เป็นปกติในวันที่ 42 (ภาพที่ 35-A, 35-B) และวันที่ 56 ของการทดลอง (ภาพที่ 36-A, 36-B)

การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 400 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน (กลุ่มที่ 2) พบบางส่วนของหลอดสร้างอสุจิฝ่อ (tubular atrophy; T) เกิดพิกโนซิสนิวเคลียส (pyknosis nucleus; pn) และเซลล์ในกระบวนการสร้างอสุจิมีการลอกตัวออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิ (desquamation) (ภาพที่ 35-D) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบหลอดสร้างอสุจิฝ่อ พิกโนซิสนิวเคลียสและการลอกตัวของเซลล์ในกระบวนการสร้างอสุจิออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิ (ภาพที่ 36-D)

เนื้อเยื่ออัมตะของหนูกลุ่มที่ 3 ได้รับความเสียหายในบางส่วนมากกว่ากลุ่มที่ 2 จากการตรวจสอบพบว่า การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีน 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน พบบางส่วนของหลอดสร้างอสุจิฝ่อ เกิดพิกโนซิสนิวเคลียสและเซลล์ในกระบวนการสร้างอสุจิมีการลอกตัวออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิมากกว่ากลุ่ม 2 และมีสเปออร์มาทิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น นอกจากนั้นยังตรวจพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cells; MGCs) (ภาพที่ 35-F) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบหลอดสร้างอสุจิฝ่อ ภาวะพิกโนซิสนิวเคลียส การลอกตัวของเซลล์ในกระบวนการสร้างอสุจิออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิ และเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส อีกทั้งสเปออร์มาทิดมีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 36-F)



ภาพที่ 35 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางอวัยวะของหนูเมื่อทดสอบผลของสารสกัดเป็นเวลา 42 วัน กลุ่มควบคุม (รูป A และ B) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขี้นก 400 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน (รูป C และ D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขี้นก 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน (รูป E และ F) sz=Spermatozoa; sg=Spermatogonia, p=Primary spermatocyte; S=Sertoli cell; Lc=Leydig's cell; T=Tubular atrophy; De=Desquamation; pn=Pyknosis nucleus; mgc=Multinucleated giant cells



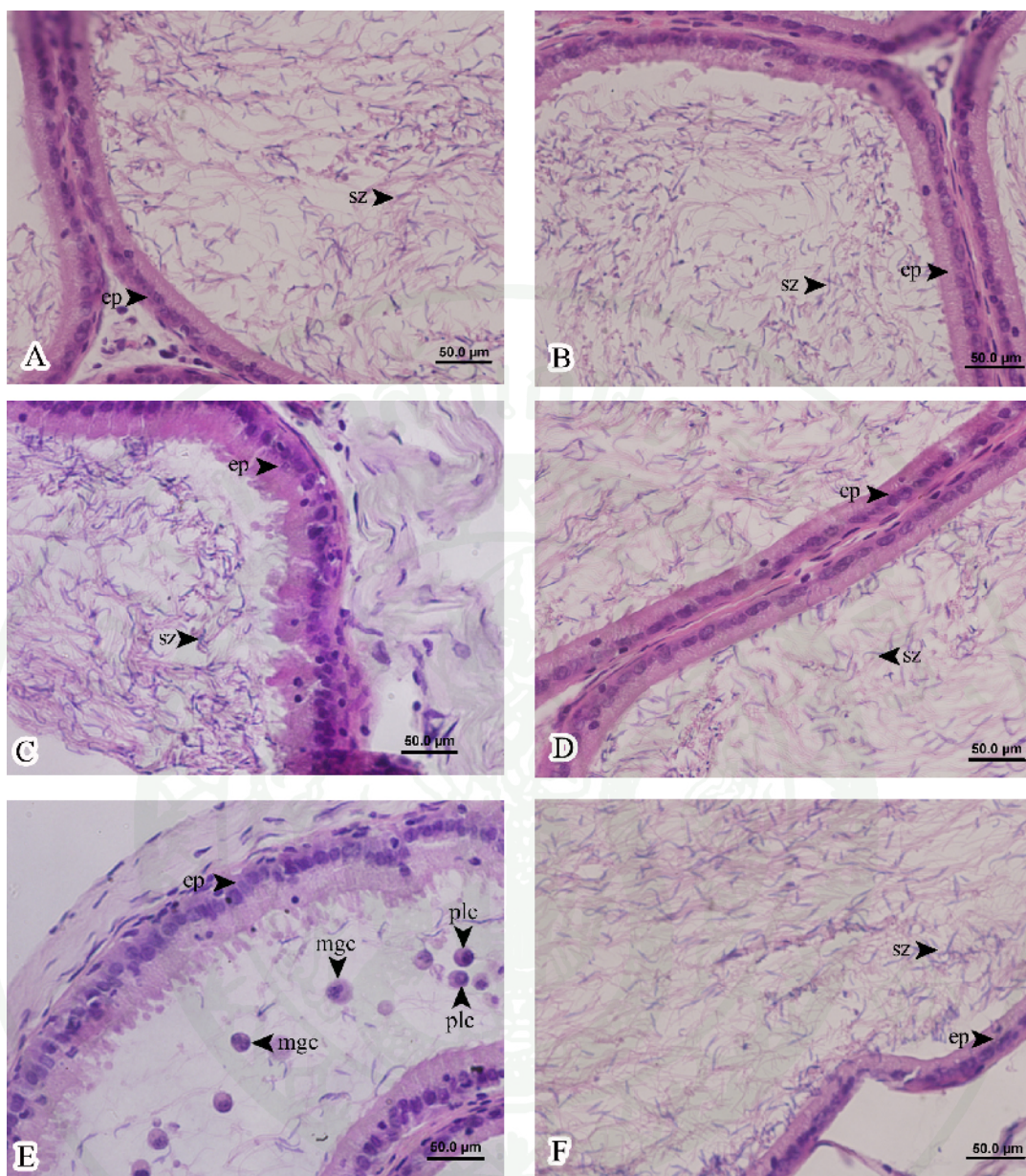
ภาพที่ 36 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางอวัยวะของหนูภายหลังหยดให้สารสกัดเป็นเวลา 14 วัน กลุ่มควบคุม (รูป A และ B) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขี้นก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป C และ D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขี้นก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป E และ F); sg=Spermatogonia; pc=Primary spermatocyte; sz=Spermatozoa; S=Sertoli cell; Lc=Leydig's cell

10.2 หลอดเก็บอสุจิส่วนต้น

จากการตรวจสอบไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของหนูกลุ่มควบคุม ในวันที่ 42 (ภาพที่ 37-A) และ 56 ของการทดลอง (ภาพที่ 37-B) โดยภายในหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นมีอสุจินานแน่น

เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของหนูกลุ่มที่ 2 มีจำนวนอสุจิลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 37-C) หลังหยุคให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นมีจำนวนอสุจิภายในหลอดเก็บอสุจิเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 37-D)

เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของหนูกลุ่มที่ 3 มีจำนวนอสุจิลดลงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และพบพลาสมาเซลล์ (plasma cell; plc) (ภาพที่ 37-E) หลังหยุคให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นมีอสุจินานแน่น และไม่พบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสและพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 37-F)



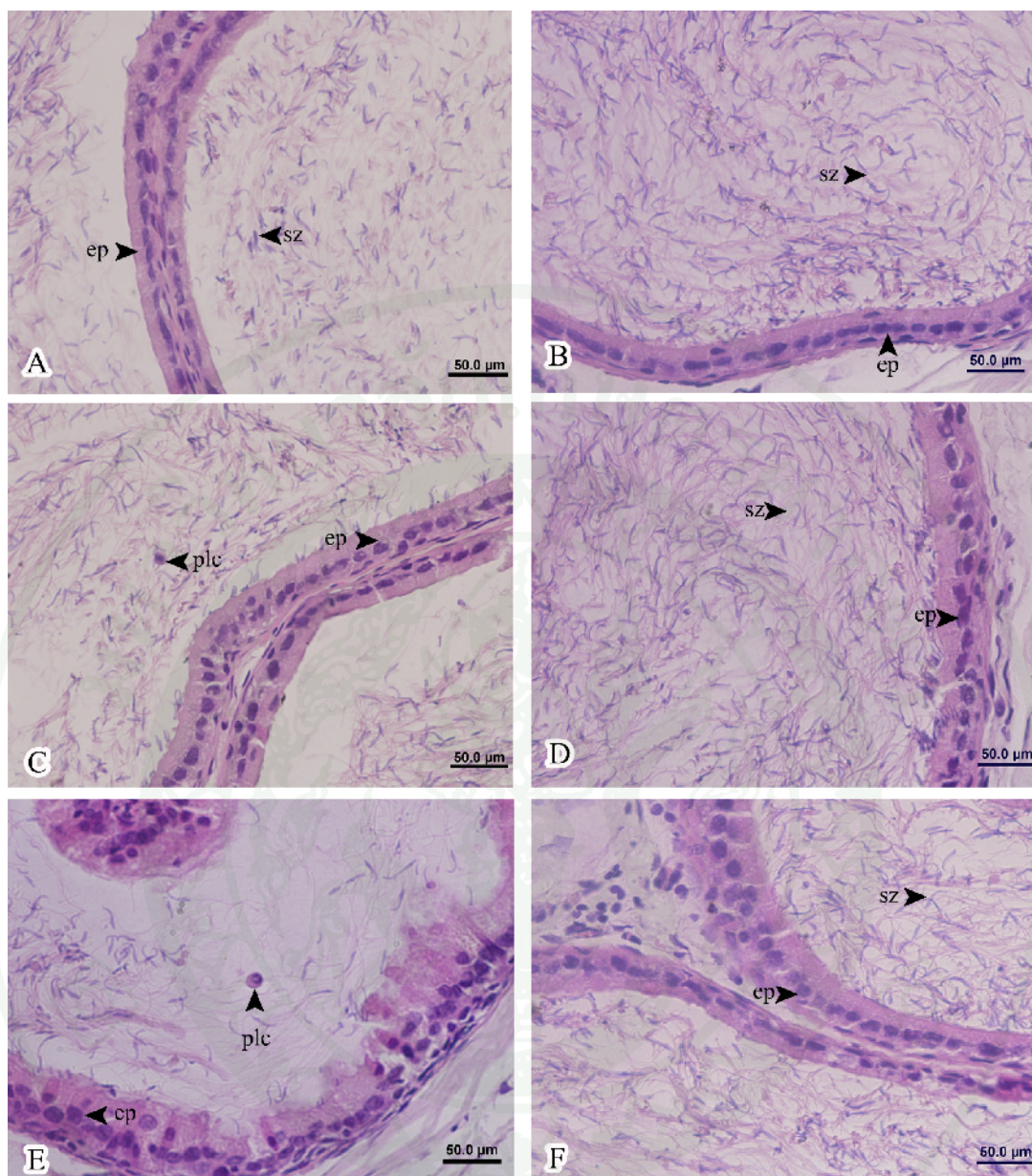
ภาพที่ 37 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางของหลอดเก็บอสุจิส่วนต้นของหนู
 คอถัมน์ด้านซ้ายแสดงผลของสารสกัดที่เวลา 42 วัน และคอถัมน์ด้านขวาแสดงผลหลัง
 หยุดให้สารสกัด 14 วัน กลุ่มควบคุม (รูป A, B) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก
 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป C, D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระ
 ขึ้นก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป E, F); ep=Epithelium cell;
 mgc=Multinucleated giant cells; plc=Plasma cell; sz=Spermatozoa

10.3 หลอดเก็บอสุจิส่วนกลาง

จากการตรวจสอบเนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางของหนูกลุ่มควบคุมไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อในวันที่ 42 (ภาพที่ 38-A) และ 56 ของการทดลอง (ภาพที่ 38-B) โดยภายในหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางมีอสุจินานแน่น

การให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ส่งผลให้เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางมีอสุจิน้อยลงกว่ากลุ่มควบคุม และพบพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 38-C) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางมีจำนวนอสุจิภายในหลอดเก็บอสุจิมากขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและไม่พบพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 38-D)

การให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ส่งผลให้เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางมีอสุจิลดลงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบพลาสมาเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ 2 (ภาพที่ 38-E) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนกลางมีจำนวนอสุจิมากขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและไม่พบพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 38-F)



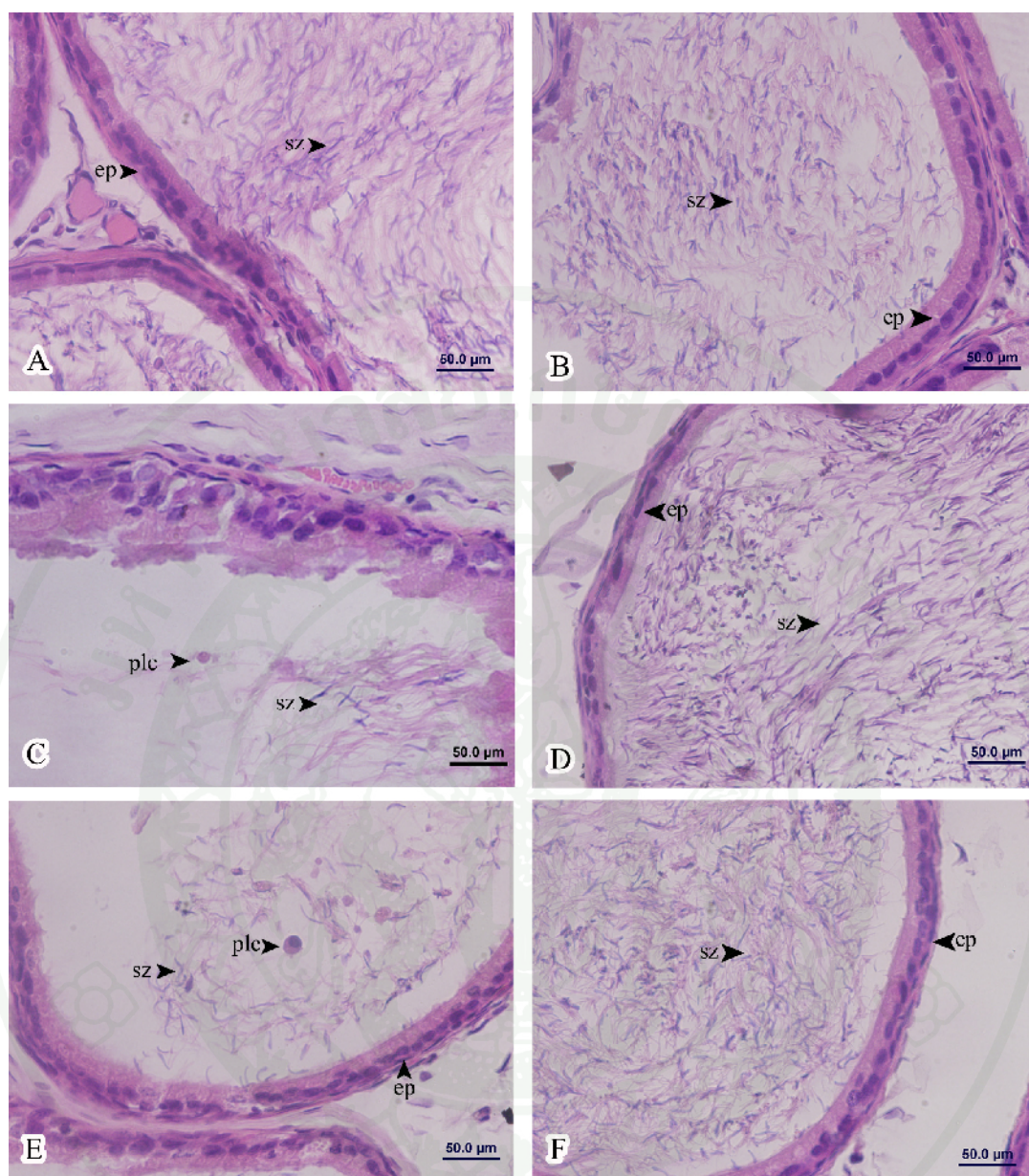
ภาพที่ 38 คอลัมน์ด้านซ้ายแสดงผลของสารสกัดที่เวลา 42 วัน และคอลัมน์ด้านขวาแสดงผลหลังหยุดให้สารสกัด 14 วัน กลุ่มควบคุม (รูป A, B) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นนก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป C, D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นนก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป E, F) ep=Epithelium cell; sz=Spermatozoa; plc=Plasma cell

10.4 หลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย

เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายหนูกลุ่มควบคุมไม่เกิดความผิดปกติ พบอสุจิในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายหนาแน่นในวันที่ 42 ของการทดลอง (ภาพที่ 39-A) เมื่อหยุดป้อนสารเป็นเวลา 14 วันพบว่าเนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายหนูกลุ่มควบคุม ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ พบอสุจิในช่องภายในหลอดหนาแน่น (ภาพที่ 39-B)

การให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ส่งผลให้เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมีความหนาแน่นของอสุจิตดลงกว่ากลุ่มควบคุมและพบพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 39-C) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมีจำนวนอสุจิภายในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและไม่ปรากฏพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 39-D)

การให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ส่งผลให้เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมีอสุจิตดลงและพบพลาสมาเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 มก./น้ำหนักแห้ง/กก./น้ำหนักตัว/วัน (ภาพที่ 39-E) หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายมีจำนวนอสุจิภายในหลอดเก็บอสุจิใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและไม่ปรากฏพลาสมาเซลล์ (ภาพที่ 39-F)



ภาพที่ 39 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงภาคตัดขวางของหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายของหนู คอไลน์น้ด้นซ้ายแสดงผลของสารสกัดที่เวลา 42 วัน และคอไลน์น้ด้นขวาแสดงผลหลัง หยดให้สารสกัด 14 วัน กลุ่มควบคุม (รูป A, B) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระจีนก 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป C, D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระจีนก 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (รูป E, F) ep=Epithelium cell; sz=Spermatozoa; plc=Plasma cell

วิจารณ์

น้ำหนักตัวหนูวิสตาร์แรทเพศผู้เมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการให้สารสกัดจากผลมะระขึ้นกปริมาณ 500 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 14 วัน (Abalaka *et al.*, 2009) สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกจึงไม่ส่งผลข้างเคียงในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกสูงถึง 800 น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน และพบน้ำหนักอัมชะ น้ำหนักหลอดเก็บอสุจิ น้ำหนักต่อมลูกหมากและน้ำหนักต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ขณะที่ Naseem และคณะ (1998) รายงานว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกด้วยแอลกอฮอล์แก่หนูอัลบิโนแรท (albino rat) เพศผู้ทางปากและทางเชื่อมช่องท้องประมาณ 25 มก./100 ก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 35 วัน ลดน้ำหนักอัมชะ น้ำหนักต่อมลูกหมากและน้ำหนักต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นการให้สารสกัดจากพืชยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์บางชนิด เช่น การให้สารสกัดจากฝักระรุมป่า (*Albizia lebbek*) ปริมาณ 50, 100 และ 200 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน (Gupta *et al.*, 2004) และการให้สารสกัดจากผล *Amalakyadi churna* ปริมาณ 400 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 30 วัน (Seetharam *et al.*, 2003) ไม่เปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว แต่น้ำหนักอัมชะ น้ำหนักหลอดเก็บอสุจิ น้ำหนักต่อมลูกหมากและน้ำหนักต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) กล่าวได้ว่าการให้สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชที่มีคุณสมบัติยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ต่อน้ำหนักอวัยวะเสริมของระบบสืบพันธุ์ (accessory sex organs) มักให้ผลไม่สอดคล้องกันบ่อยครั้ง

จากการตรวจสภาพเนื้อเยื่อหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิพบว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกด้วยแอลกอฮอล์ปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิทั้ง 3 ส่วนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.01$) แต่ Naseem และคณะ (1998) รายงานว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกด้วยแอลกอฮอล์ปริมาณ 25 มก./100 ก. น้ำหนักตัว/วันแก่หนูอัลบิโนแรท (albino rat) เพศผู้ทางปากและทางเชื่อมช่องท้องเป็นเวลา 35 วัน ลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ส่วนผลกระทบต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเก็บอสุจิไม่มีรายงานไว้ ฤทธิ์ลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิยังพบเช่นเดียวกันในสารสกัดจากฝักระรุมป่า (Gupta *et al.*, 2004) และสารสกัดจากผล *Amalakyadi churna* (Seetharam *et al.*, 2003) และเมื่อหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก.

น้ำหนักตัว/วัน พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$)

การศึกษานี้แสดงฤทธิ์ลดความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกในหนูแรพเพสผู้เป็นครั้งแรก รายงานก่อนหน้านี้โดย Naseem และคณะ (1998) ระบุเพียงฤทธิ์ด้านกระบวนการสร้างอสุจิ (antispermatogenesis) ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกในหนูแรพ แต่มีการกล่าวอ้างว่าสารสกัดจากลำต้นมะระจีนกลดความสมบูรณ์พันธุ์ในสุนัข (Bhargava, 1988) เมื่อหยดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าความสมบูรณ์พันธุ์มีค่าความสมบูรณ์พันธุ์ใกล้เคียงกับช่วงก่อนให้สารสกัด กล่าวได้ว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกออกฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์แบบชั่วคราว เช่นเดียวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดมะละกอ (*Carica papaya*) (Lohiya *et al.*, 2002) และสารสกัดจากเมล็ด Beikh Bakain (*Melia azadrach* L.) (Parandin *et al.*, 2008)

การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกด้วยแอลกอฮอล์ปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 42 วัน ลดการผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน สะท้อนการลดจำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย จากการทดลองของ Naseem และคณะ (1998) พบการลดลงของจำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 25 มก./100 ก. น้ำหนักตัว/วัน แก่หนูอัลบิโนแรพ (albino rat) เพศผู้ทางปากและทางเยื่อช่องท้องเป็นเวลา 35 วัน นอกจากนั้นการลดลงของจำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายอาจเกิดจากภาวะการอุดตันของหลอดขนส่งอสุจิบริเวณเรเตของอันทะ (rete testis) และ/หรือหลอดนำอสุจิ (vas efferens) (Goyal *et al.*, 2001)

จากการทดลองพบว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเคลื่อนไหวของอสุจิเกิดขึ้นสมบูรณ์ขณะที่อสุจิอยู่ในหลอดเก็บอสุจิ ดังนั้นหากหลอดเก็บอสุจิเกิดความผิดปกติขึ้นจะส่งผลให้การเคลื่อนไหวของอสุจิผิดปกติตามมา ซึ่งสอดคล้องกับความเสียหายที่พบตรงบริเวณหลอดเก็บอสุจิทั้งส่วนต้น กลางและปลาย

สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ลดเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญและออกฤทธิ์ลดเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ยชั่วคราว Lohiya และคณะ (2002) รายงานว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดมะละกอแก่ค้างปริมาณ 50 มก./กก.

น้ำหนักแห้ง/วันเป็นเวลา 360 วัน โดยตรวจสอบจำนวนอสุจิทุก ๆ 30 วัน พบว่าในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง จำนวนอสุจิตดลงอย่างมีนัยสำคัญและในวันที่ 90 120 150 180 210 240 270 300 330 และ 360 วัน อสุจิตายทั้งหมด หลังหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา 150 วันพบจำนวนอสุจิมีชีวิตเฉลี่ย ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม Parandin และคณะ (2008) รายงานว่าการให้สารสกัดจากเมล็ด Beikh Bakain ปริมาณ 50 และ 100 มก./กก.น้ำหนักแห้ง/วัน เป็นเวลา 60 วัน ลดเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญและเมื่อหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา 90 วัน เปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ยที่ลดลงมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

รูปร่างอสุจิปกติสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการตั้งครรภ์ทั้งในกาย (*in vivo*) และนอกกาย (*in vitro*) (Garrett *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003) Auger (2010) รายงานว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิเกิดขึ้นทั้งในอันทะและหลอดเก็บอสุจิโดยการขึ้นแรกเกิดขึ้นในอันทะจากกระบวนการสเปอร์มิโอเจเนซิส (spermiogenesis) แม้ว่าอสุจิจากหลอดสร้างอสุจิในอันทะจะมีรูปร่างเช่นเดียวกับในน้ำเชื้อ แต่ในแง่การทำงาน อสุจิจากอันทะต้องได้รับการเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิ (capacitation) ระหว่างที่ผ่านเข้าสู่หลอดเก็บอสุจิเสียก่อน จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก แสดงให้เห็นว่าอันทะและหลอดเก็บอสุจิเกิดความผิดปกติขึ้น ซึ่งยืนยันได้จากการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาที่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่ออันทะและหลอดเก็บอสุจิ Shetty และ Narayana (2007) รายงานว่าอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติไม่สามารถเดินทางผ่านท่อนำไข่และ/หรือเข้าปฏิสนธิกับไข่ สำหรับการทดลองนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยที่ลดลงเกิดจากความผิดปกติของรูปร่างอสุจิจากหลายบริเวณร่วมกัน

สารสกัดจากเมล็ดมะระขึ้นกส่งผลลดเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากโครโมโซมเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาโครโมโซม (acrosome reaction) ซึ่งมีการปลดปล่อยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และโปรตีโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzymes) ออกมาเพื่อย่อยสลายโซนาเพลลูซิดา (zona pellucida) ของเซลล์ไข่ ช่วยให้อสุจิเข้าปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ได้ จึงจัดได้ว่าความสมบูรณ์ของโครโมโซมมีผลโดยตรงต่อความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ รายงานศึกษาโดยใช้วิธีทดสอบปฏิกิริยาโครโมโซมระบุว่า กอสซิพอลซึ่งสามารถทำให้ไข่เป็นหมันได้เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์มีการทำลายส่วนของโครโมโซมเช่นเดียวกัน (Mohan *et al.*, 1989) ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่พบร่วมกับความเสียหายของโครโมโซมในอสุจิตัวเดียวกันจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์หนูแรทในการศึกษา

สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นปริมาณ 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ทำให้เนื้อเยื่ออันตรายเสียหายซึ่งประกอบด้วยหลอดสร้างอสุจิฝ่อ จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่าพบการลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นปริมาณ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วันเท่านั้นลดความหนาแน่นของสเปิร์มาทิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิและสเปิร์มาโทไซต์มีความหนาแน่นเป็นปกติดังเดิม การลดความหนาแน่นของสเปิร์มาทิดนี้สนับสนุนฤทธิ์ด้านกระบวนการสร้างอสุจิ Naseem และคณะ (1998) รายงานว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นปริมาณ 25 มก./100 ก. น้ำหนักตัว/วันแก่หนูอัลบิโนแรทเป็นเวลา 35 วัน พบสเปิร์มาโทไซต์ สเปิร์มาทิดและอสุจิระยะเต็มวัยลดลงแต่ไม่พบว่าจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิลดลง จากการศึกษาพบว่าความหนาแน่นของสเปิร์มาทิดมีค่าเพิ่มขึ้นหลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นเป็นเวลา 14 วัน คาดว่าเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิสามารถแบ่งเซลล์ทดแทนเซลล์สืบพันธุ์สเปิร์มาทิดที่ถูกทำลายได้ซึ่ง Meistrich (1986) กล่าวว่าเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในแง่การแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและทดแทนเซลล์สืบพันธุ์ที่ขาดหายไป การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิจึงสำคัญอย่างยิ่งต่อการฟื้นฟูสภาพหลังเซลล์สืบพันธุ์ถูกทำลายความสามารถในการฟื้นฟูสภาพกระบวนการสร้างอสุจินี้กระทั่งทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์กลับมาเป็นปกติขึ้นกับสัดส่วนเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้รับความเสียหายและระยะเวลาของวัฏจักรกระบวนการสร้างอสุจิซึ่งแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นอกจากนั้นหากเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิได้รับความเสียหายด้วยจะใช้เวลาในการฟื้นฟูสภาพนานขึ้น สำหรับในหนูแรทที่เซลล์ต้นกำเนิดอสุจิถูกทำลายต้องใช้เวลาในการฟื้นฟูสภาพกระบวนการสร้างอสุจิเป็นเวลา 7-8 สัปดาห์ และ Creasy (2001) รายงานว่าการลดลงของสเปิร์มาทิดสัมพันธ์กับการลดระดับเทสโทสเตอโรนโดยสเปิร์มาทิดสามารถฟื้นฟูเป็นปกติได้ภายในเวลา 14 วัน และ 9 วันในหนูเมาส์และหนูแรทตามลำดับและ Lohiya และคณะ (2002) พบว่าสารสกัดเมล็ดมะระสกัดที่ให้กับค้างไม่มีผลต่อการลดลงของของเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ

จากการทดลองครั้งนี้พบภาวะพิกโนซิสของนิวเคลียส (pyknosis nucleus) ในเซลล์ของหลอดสร้างอสุจิเมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ซึ่ง Damjanov (2005) อธิบายไว้ว่าภาวะพิกโนซิสของนิวเคลียสเกิดเนื่องจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บอย่างถาวร (irreversible injury) โดยโครมาตินในนิวเคลียสเกิดการหดตัวอย่างถาวรทำให้เซลล์ขนาดเล็กลงและเกิดการตายของเซลล์ และยังพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cells, MGCs) ของหลอดสร้างอสุจิเมื่อให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้น 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ซึ่ง Damjanov (2005) อธิบายไว้ว่าเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสเป็นลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบเรื้อรัง (chronic

inflammation) เกิดเนื่องจากการรวมตัวกันของแมโครฟาจในสภาวะที่แมโครฟาจกินสิ่งแปลกปลอมไม่หมด ทำให้เห็นลักษณะของเซลล์มีหลายนิวเคลียส

จากการศึกษาพบว่าการสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกับปริมาณ 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน ออกฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อหลอดเลือดบอสสุจินเกิดความเสียหายโดยความผิดปกติทางพยาธิวิทยาประกอบด้วยหลอดเลือดบอสสุจิฝ่อ ลดจำนวนอสุจิระยะเต็มวัย เกิดเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเกิดพลาสมาเซลล์ซึ่ง Damjanov (2005) อธิบายไว้ว่าพลาสมาเซลล์เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวและมีนิวเคลียสค่อนข้างกลม และมีรายงานว่า สารเมทิลคลอไรด์ (methyl chloride) (Chapin *et al.*, 1983) และแอลฟาคลอโรไฮดริน (α -chlorohydrin) (Creasy, 2001) ทำให้เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดบอสสุจิส่วนต้นอักเสบ ซึ่งจากการทดลองพบเซลล์จำพวกพลาสมาเซลล์และเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสในลูเมนของหลอดเลือดบอสสุจิเช่นกัน

คาดว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่หลายนิวเคลียสเกิดจากการอักเสบของเนื้อเยื่ออันทะก่อนแล้วหลุดเข้ามาสู่หลอดเลือดบอสสุจิ หรือเกิดการอักเสบขึ้นทั้งในเนื้อเยื่ออันทะและหลอดเลือดบอสสุจิ มีรายงานว่าพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสในลูเมน (lumen) ของหลอดเลือดบอสสุจิในผู้ที่เป็หมันชนิดไม่พบอสุจิในน้ำเชื้อ (azoospermia) อันเป็นกลไกหนึ่งในการกำจัดอสุจิที่ตายแล้วโดยการกลืนกิน (phagocytosis) ส่วนอีกกลไกหนึ่งคือเกิดการย่อยสลายตัวเองของอสุจิ (autolysis) (Phadke and Phadke, 1961)

การเปลี่ยนแปลงที่เนื้อเยื่ออันทะและหลอดสร้างอสุจิที่พบในการศึกษาครั้งนี้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของอันทะและหลอดเลือดบอสสุจิ จนกระทั่งทำให้ปริมาณและคุณภาพอสุจิลดลง ซึ่งประกอบด้วยการผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเลือดบอสสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ยและ เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง มีรายงานพืชและสารเคมีบางชนิดออกฤทธิ์ลดความสมบูรณ์พันธุ์โดยลดปริมาณหรือคุณภาพอสุจิร่วมกับทำลายเนื้อเยื่ออันทะหรือหลอดเลือดบอสสุจิ ยกตัวอย่างเช่น การให้สารสกัดจากใบเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea spectabilis*) แก่หนูเมาส์ 800 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ส่งผลให้จำนวนอสุจิและขนาดหลอดสร้างอสุจิลดลง (Parandin and Ghorbani, 2010) สารออกฤทธิ์ทริปโทไลด์ (triptolide) จากสารสกัดจากต้นว่านเจ้าฟ้าผ่าผ่า (*Tripterygium wilfordii*) ลดจำนวนอสุจิในน้ำเชื้อและลด เปอร์เซ็นต์เคลื่อนไหวของอสุจิ (Hikim *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการให้สารสกัดจาก *Citrullus colocynthis* (Chaturvedi *et al.*, 2003) การให้สารสกัดจากใบกรงขมา (*Cissampelos pareira*)

ปริมาณ 1.0 มล./ 100 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน ส่งผลต่อจำนวนอสุจิในน้ำเชื้อและเพิ่มเปอร์เซ็นต์อสุจิรูปร่างอสุจิผิดปกติ (Luangpirom, 2010) กอสมิซปอลออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิในอัณฑะและลดความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิในหลอดเก็บอสุจิ (Frayne and Hall, 1999) ส่วนสารเคมีคลอโรไฮดริน (chlorohydrin) ซึ่งเป็นน้ำตาลชนิด 6-คลอโร-6-ดีออกซี (6-chloro-6-deoxy sugar) และเมทิลมีเทนซัลโฟเนต (methyl methanesulphonate) มีผลต่อความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ กล่าวคืออสุจิไม่มีหางและไม่มีหัว มีจำนวนเพิ่มขึ้น ทำลายหลอดสร้างอสุจิและจำนวนสเปิร์มมาติดลดลง (Kuriyama *et al.*, 2005) และพบว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของผู้ที่เป็นหมันชนิดอสุจิในน้ำเชื้อตายหรือไม่เคลื่อนที่ (necrozoospermia) เกิดความผิดปกติของหลอดเก็บอสุจิ ส่วนอีก 80 เปอร์เซ็นต์เกิดจากความผิดปกติของหลอดเก็บอสุจิและอัณฑะร่วมกัน (de Kretser *et al.*, 1998)

สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างอสุจิในอัณฑะและลดปริมาณและคุณภาพอสุจิทั้งในอัณฑะและหลอดเก็บอสุจิจึงทำให้ออกฤทธิ์ลดความสมบูรณ์พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและหลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกเป็นเวลา 14 วัน ความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลงกลับมาเป็นปกติ สอดคล้องกับการกลับมาเป็นปกติของเนื้อเยื่ออัณฑะและหลอดเก็บอสุจิ ส่งผลให้การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

จากการทดลองพบว่าปริมาณเทสโทสเตอโรนในอัณฑะมีสัดส่วนสูงกว่าในพลาสมาเลือดประมาณ 50 เท่า สอดคล้องกับ Turner และคณะ (1984) ซึ่งรายงานว่ายเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะมีปริมาณสูงกว่าเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดประมาณ 50 เท่า โดยระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะ 50-70 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างอสุจิใน หนูแรท แสดงให้เห็นว่ายเทสโทสเตอโรนระดับสูงในของเหลวอัณฑะไม่ออกฤทธิ์ต่อบทบาทการควบคุมการผลิตอสุจิ กล่าวคือรูปที่ออกฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรนคือเมแทบอลิต์ 5-ไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (5-dihydrotestosterone) ซึ่งมีปริมาณเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ในของเหลวอัณฑะหนูแรท (Turner *et al.*, 1984) ซึ่งส่วนมากเทสโทสเตอโรนจับอยู่กับโปรตีนในของเหลวในหลอดสร้างอสุจิ (Jarow *et al.*, 2005) การลดลงของเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะประมาณสองในสามส่วนไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการสร้างอสุจิ อย่างไรก็ตามหากระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะมีค่าต่ำกว่านี้จะมีผลโดยตรงต่อจำนวนอสุจิ (Zirkin *et al.*, 1989) สำหรับการทดลองนี้พบว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนัก

แห่ง/กก.น้ำหนักตัว/วัน ลดระดับเทสโทสเทอโรนในของเหลวอัมตะในระดับที่ต่ำกว่ากำหนด โดย Zirkin และคณะ (1989) รายงานว่าระดับเทสโทสเทอโรนในของเหลวอัมตะที่ต่ำกว่า 2 ใน 3 ของค่าปกติ (50-70 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จะรบกวนกระบวนการสร้างอสุจิ จากการทดลองพบว่าการให้สารสกัดจากมะระขึ้นกับปริมาณ 400 และ 800 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ส่งผลลดเทสโทสเทอโรนในของเหลวอัมตะต่ำกว่าระดับ 2 ใน 3 ของกลุ่มควบคุม (55.57-75.57 นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) โดย Naseem และคณะ (1998) พบว่าสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก็มีผลยับยั้งการสร้างสเปิร์มเนื่องจากพบสารตั้งต้นคลอเรสเตอรอลเพิ่มขึ้นและไม่ถูกนำไปใช้เปลี่ยนเป็นสเปิร์มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าสารสกัดมะระขึ้นก็มีผลโดยตรงต่อการลดการคัดหลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน โดยกลุ่มเซลล์ประสาทในไฮโปทาลามัส หรือมีผลการสังเคราะห์โกนาโดโทรปิน (gonadotropins) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า จากผลการทดลองคาดว่าสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก็มีผลกระทบโดยตรงต่อการลดการสังเคราะห์เทสโทสเทอโรนโดยเซลล์ลีดิกซึ่งส่งผลต่อการทำงานของเซลล์เซอร์โทลีและการผลิตอสุจิตามลำดับ

ในการศึกษานี้พบว่ากลไกการลดปริมาณและคุณภาพอสุจิส่วนหนึ่งเกิดจากระดับเทสโทสเทอโรนในของเหลวอัมตะและในพลาสมาเลือดที่ลดลง Mohri และคณะ (1975) รายงานว่าเทสโทสเทอโรนจำเป็นต่อกระบวนการสร้างอสุจิ Dohle และคณะ (2003) อธิบายว่าเทสโทสเทอโรนในของเหลวอัมตะออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์เซอร์โทลี ปริมาณเทสโทสเทอโรนที่ลดลง ลดการแสดงออกของยีนสังเคราะห์ตัวรับฮอร์โมนเพศผู้ (androgen receptor) ในเซลล์เซอร์โทลี หากขาดเทสโทสเทอโรนกระบวนการสร้างอสุจิและการทำงานของอัมตะจะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์และทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอพอพโทซิส (apoptosis) เทสโทสเทอโรนที่ลดลงจึงเป็นสาเหตุการผลิตอสุจิน้อยในแต่ละวันและลดจำนวนอสุจิน้อยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลายอย่างมีนัยสำคัญโดย Creasy (2001) รายงานไว้ว่าหลังสัปดาห์แรกของการให้สารยับยั้งเอนไซม์ 17, 20 ไลเอสซึ่งเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนเพรกนีโนโลนไปเป็นดีไฮโดรอีพิแอนโดรสเทอโรน พบว่าหลอดสร้างอสุจียังคงเป็นปกติแต่เริ่มพบการตายแบบอพอพโทซิสของเซลล์สืบพันธุ์ ในเวลาต่อมาพบการตายแบบอพอพโทซิสของเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้นร่วมกับจำนวนสเปิร์มที่ลดลงเนื่องจากเทสโทสเทอโรนมีบทบาทในการพัฒนาสเปิร์มมาโทไซท์และพัฒนาสเปิร์มมาทิดขั้นที่ 7-8 และขั้นที่ 9-14 และท้ายสุดพบการฝ่อของหลอดสร้างอสุจิ และ Creasy (2001) กล่าวว่าสาเหตุที่ทำให้หลอดสร้างอสุจิฝ่อ นั้นได้แก่จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ลดลงและการหลั่งของเหลวจากหลอดสร้างอสุจิลดลงซึ่งการหลั่งของเหลวที่ลดลงสัมพันธ์กับระดับเทสโทสเทอโรนที่ลดลง นอกจากนั้นเทสโทสเทอโรนยังสำคัญต่อการเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิในหลอดเก็บอสุจิเนื่องจากเทสโทสเทอโรนออกฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิดที่จำเป็นต่อ

การเจริญวัยของอสุจิในหลอดเก็บอสุจิ (Cooper, 1992; Dohle *et al.*, 2003) จากการทดลองนี้ เทสทอสเทอโรนที่ลดลงจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่อสุจิเคลื่อนไหว อสุจิมีชีวิต รูปร่างอสุจิ ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญในการทดลองครั้งนี้

กล่าวสรุปได้ว่าความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลงจากการให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนปริมาณ 400 และ 800 มก. น้ำหนักแห้ง/กก. น้ำหนักตัว/วัน มีสาเหตุมาจากความเสียหายโดยตรงที่เกิดกับเนื้อเยื่ออัณฑะและหลอดเก็บอสุจิ และจากการลดลงของเทสทอสเทอโรนในพลาสมาเลือดและของเหลวอัณฑะ ส่งผลเสียต่อกระบวนการสร้างอสุจิและการพัฒนาการเจริญวัยของอสุจิในเวลาต่อมาซึ่งคาดว่าจะปกไหนี่ที่ส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์ชั่วคราวของสารสกัดเมล็ดมะระจีนก

สรุป

1. การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก.น้ำหนักตัว/วัน ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์หนูวิสตาร์แรพเพสผู้ลดลงจาก 82 เปอร์เซ็นต์เป็น 57 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังหยุดให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน ความสมบูรณ์พันธุ์หนูแรพเพสทุกกลุ่มกลับคืนสู่สภาพปกติ

2. การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก.น้ำหนักตัว/วัน ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ส่งผลลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิ การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ หลังหยุดให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดสร้างอสุจิและหลอดเก็บอสุจิ การผลิตอสุจิเฉลี่ยในแต่ละวัน จำนวนอสุจิเฉลี่ยในหลอดเก็บอสุจิส่วนปลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์รูปร่างอสุจิปกติเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิกลับสู่สภาพปกติ

3. การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก./น้ำหนักแห้ง/กก.น้ำหนักตัว/วัน ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ส่งผลลดทดสอบทดสอบโรนินในของเหลวอัณฑะและพลาสมาเลือดของหนูวิสตาร์เพศผู้

4. การให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 400 และ 800 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ทางปาก ส่งผลให้เนื้อเยื่ออัณฑะเสียหาย ซึ่งประกอบด้วยหลอดสร้างอสุจิฝ่อ เซลล์ในกระบวนการสร้างอสุจิหลุดตัวออกจากเยื่อหลอดสร้างอสุจิ ปรากฏภาวะพิษโนซิสของนิวเคลียสและพบเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส ส่วนเนื้อเยื่อหลอดเก็บอสุจิปรากฏพลาสมาเซลล์ เซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียสและอสุจิระยะเต็มวัยลดลง หลังหยุดให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกเป็นเวลา 14 วัน เนื้อเยื่ออัณฑะและหลอดเก็บอสุจิมีสภาพกลับคืนสู่ปกติ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- สิริวดี พรหมน้อย. 2548. การเปรียบเทียบผลของการแยกไขมันออกจากน้ำเชื้อสด การเติมสารโซเดียมโตะเคซิลซัลเฟตในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่เตรียมเองเปรียบเทียบกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสำเร็จรูปต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุนัขหลังการแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abalaka, M.E, O.S. Olonitola, J.A. Onaolapo and H.I. Inabo. 2009. Evaluation of acute toxicity of *Momordica charantia* extrat using Wistar Rats to determine safety levels and usefulness of the plant in ethnochemotherapy. **Int. Jor. P. App. Scs.** 3: 1-6.
- Abul, H., T.C. Mathew, F. Abul, H. Al-Sayer and H.M. Dashti. 2002. Antioxidant enzyme level in the testes of cirrhotic rats. **Nutrition** 18: 56-59.
- Ahmed, I., M.S. Lakhani, M. Gillett, A. John and H. Raza. 2001. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 51: 155-161.
- Aitken, R. J., F. S. Best, P. Warner and A. Templeton. 1984. A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. **J. Androl.** 5 (4): 297-303.
- Amann, R.P. and S.S. Howard. 1980. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. **J. Uro.** 124: 211-215.
- Amann, R.P., L. Johnson, D.L. Thompson and B.W. Pickett. 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biol. Reprod.** 15: 586-592.

- Au, T.K., R.A. Collins, T.L. Lam, T.B. Ng, W.P. Fong, D.C. Wan. 2000. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. **FEBS. Lett.** 471: 169-72.
- Auger, J. 2010. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics?. **Asian J. Androl.** 12: 36-46.
- Basch, E., S. Gabardi and C. Ulbricht. 2003. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review and safety. **Am. J. Health Syst. Pharm.** 60 (4): 356-9.
- Bhargava, S.K. 1988. Antifertility agents from plants. **Fitoterapia.** 59: 163-177.
- Blach, E.L., R.P. Amann, R.A. Bowen, H.R. Sawyer and J.M. Hermenet. 1988. Use of a monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm. **Gamete Res.** 21 : 233-241.
- Bourinbaiar, A.S. and S. Lee-Huang. 1996. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus *in vitro*. **Biochem Biophys. Res. Commun.** 219: 923-9.
- Cai, K, J. Yang, M. Guan, W . Ji, Y. Li and W. Rens. 2005. Single UV excitation of Hoechst 33342 and propidium iodide for viability assessment of rhesus monkey spermatozoa using flow cytometry. **Arch. Androl.** 51 (5): 371-83.
- Casey, P.J., R.B. Hillman, K.R. Robertson, A.L. Thdin, K.M. Liu and E.Z. Drobnis. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **J. Androl.** 14: 289-297.
- Chan, S.Y., C. Wang, S.T. Chan and P.C. Ho. 1990. Differential evaluation of human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with the outcome of in-vitro fertilization of human oocytes. **Hum. Reprod.** 5: 84-88.

- Chapin, R.E., K.T. Morgan and J.S. Bus. 1983. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione. **Exp. Mol. Pathol.** 38: 149-169.
- Chaturvedi, M., P.C. Mali and A.S. Ansari. 2003. Induction of reversible antifertility with a crude ethanol extract of *Citrullus colocynthis* Schrad fruit in male rats. **Pharmacology** 68 (1): 38-48.
- Cheng, F.P., A. Fazeli, W.F. Voorhout, A. Marks, M.M. Bevers and B. Colenbrander. 1996. Use of Peanut Agglutinin to Assess the Acrosomal Status and the Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa. **J. Androl.** 17 (6): 674-82.
- Choomsai, A. 1982. Bitter Gourd: *Momordica charantia* Linn. in Thailand. **IBPGR Newsletter**. 6:4.
- Claflin, A.J., D.L. Vesely, J.L. Hudson, C.B. Bagwell, D.C. Lehotay, T.M. Lo, M.A. Fletcher, N.L. Block and G.S. Levey. 1978. Inhibition of growth and guanylate cyclase activity of an undifferentiated prostate adenocarcinoma by an extract of the balsam pear (*Momordica charantia* abbreviata). **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 75: 989-93.
- Coetzee K., T.F. Kruger, R. Menkveld, R.J. Swanson, C.J. Lombard and A.A. Acosta. 1989. Usefulness of sperm penetration assay in fertility predictions. **Arch. Androl.** 23: 207–212.
- Cooper, T.G. 1992. The epididymis as a site of contraceptive attack, pp. 419-460. In E. Nieschlag and U.F. Habenicht, eds. **Spermatogenesis, Fertilization and Contraception**. Springer, Berlin.
- Creasy, D.M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. **Toxicol. Pathol.** 29: 64-76.
- Damjanov, I. 2005. **High-Yield Pathology**. 2nd ed. Lippincot Williams&Wilkins, Baltimore.

- de Kretser, D.M., C. Huidobro, G.J. Southwick and P.D. Temple-Smith. 1998. The role of the epididymis in human infertility. **J. Reprod. Fertil.** 53: 271-275.
- Dehghan, M.H., T. Martin and R. Dehghanan. 2005. Antifertility effect of Iranian neem seed alcoholic extract on epididymal sperm of mice. **IJRM.** 3 (2): 83-89.
- Demura, T., N. Ohashi, K. Nonomura, T. Mori, M. Mamiya, H. Seki, N. Enami and T. Koyanagi. 1992. Localization of androgen receptor in male sex organ, accessory sex organs and external genital skin. **JPN J UROL.** 83: 2078-84.
- Dengiz, G.O. and N. Gursan. 2005. Effects of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on indomethacin-induced ulcer model in rats. **Turk. J. Gastroenterol.** 16: 85-88.
- Dixit, V.P., P. Khanna and S.K. Bhargava. 1978. Effects of *Momordica charantia* L. fruit extract on the testicular function of dog. **Planta. Med.** 34: 280-286.
- Dohle, G.R., M. Smit and R.F.A. Weber. 2003. Androgen and male fertility. **World J. Urol.** 21: 341-345.
- Drury, R.A.B., E.A. Wallington and R. Cameron. 1967. **Careton's Histological Technique 4th**. Oxford University Press, Ely House, London.
- Eggert-Kruse, W., J. Reimann-Anderson, G. Rohr, S. Pohl, W. Tilgen and B. Runnenbaum. 1995. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm–mucus interaction *in vivo* and *in vitro*. **Fertil. Steril.** 63: 612–624.

- Ellis, M.K., A.G. Richardson, J.R. Foster, F.M. Smith, P.S. Widdowson, M.J. Farnworth, R.B. Moore, M.R. Pitts and G.A.S. Wickramaratne. 1998. The reproductive toxicity of molinate and metabolites to the male rat: effects on testosterone and sperm morphology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 151: 22–32.
- Enginsu, M.E., J.C. Dumoulin, M.H. Pieters, M. Bras, J.L. Evers and J.P. Geraedts. 1991. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization *in vitro*. **Hum. Reprod.** 6: 854–858.
- Enginsu, M.E., M.H. Pieters, J.C. Dumoulin, J.L. Evers and J.P. Geraedts. 1992. Male factor as determinant of *in vitro* fertilization outcome. **Hum. Reprod.** 7: 1136–1140.
- Esteves, S.C., R.K. Sharma, A.J. Thomas, A. Agarwal. 2007. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. **Int. Braz. J. Urol.** 33 (3): 364-74.
- Franken, D.R., T.F. Kruger, S. Oehninger, C.C. Coddington, C. Lombard, K. Smith and G.D. Hodgen. 1989. The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in *in vitro* fertilization (IVF) treatment. **J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.** 6: 44–49.
- Frayne, J. and L. Hall. 1999. The potential use of sperm antigen as targets for immunocontraception: past, present and future. **J. Reprod. Immunol.** 43:1-33.
- Funahashi, H. 2005. Effect of beta-mercaptoethanol during *in vitro* fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development *in vitro*. **Reproduction** 130 (6): 889-98.

- Ganong, W.F. 1995. **Review of Medical Physiology**. 17th ed. Lange Medical Publication, Los Altos, California.
- Garrett, C., D.Y. Liu, G.N. Clarke, D.D. Rushford and H.W. Baker. 2003. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. **Hum. Reprod.** 18:1643-1649.
- Golalipour, M.J., R. Azarhoush, S. Ghafari, A.M. Gharravi, S.A. Fazeli and A. Davarian. 2007. Formaldehyde exposure induces histopathological and morphometric changes in the rat testis. **Folia. Morphol. (Warsz)**. 66 (3): 167-71.
- Goyal, H.O., T.D. Braden, M. Mansour, C.S. Williams, A. Kamaleldin and K.K. Srivastava. 2001. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. **Biol. Reprod.** 64: 927-934.
- Griffin, J.E. and S.R. Ojeda. 2000. **Textbook of Endocrine Physiology**. 4th ed. Oxford University Press, New York.
- Grover, J.K. and S.P. Yadav. 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J. Ethnopharmacol.** 93: 123-132.
- Grover, J.K., V. Vats, S.S. Rathi and R. Dawar. 2001. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J. Ethnopharmacol.** 76: 233-8.
- Gupta, R.S., J.B. Kachhawa and R. Chaudhary. 2004. Antifertility effects of methanolic pod extract of *Albizzia lebbeck* (L.) Benth in male rats. **Asian J. Androl.** 6 (2): 155-9.
- Gürbüz, I., C. Akyüz, E. Yesilada, B and Sener. 2000. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.** 71: 77-82.

- Hadley, M.E. 2000. **Endocrinology**. 5th edition. Prentice-Hall, Inc Upper Saddle River, NJ United States of America.
- Henkel, R. C. Müller, W. Miska, H. Gips and W.B. Schill. 1993. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization *in vitro*. **Hum. Reprod.** 8: 2128–2132.
- Hess, R.A. 1999. Spermatogenesis, overview. **Encyclopedia of reproduction**. 4: 539-545.
- Hikim, A.P., Y.H. Lue, C. Wang, V. Reutrakul, R. Sangsuwan and R.S. Swerdloff. 2000. Posttesticular antifertility action of triptolide in the male rat: evidence for severe impairment of cauda epididymal sperm ultrastructure. **J Androl.** 21: 431-437.
- Huang, P.L., Y. Sun, H.C. Chen, H.F. Kung and S. Lee-Huang. 1999. Proteolytic fragments of anti-HIV and anti-tumor proteins MAP30 and GAP31 are biologically active. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 262: 615-23.
- Humason, G.L. 1972. **Animal Tissue Technique**. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Husain, J., I.J. Tickle and S.P. Wood. 1994. Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. **FEBS. Letters** 342: 154-158.
- Jarow, J.P., W.W. Wright, T.R. Brown, X. Yan and B.R. Zirkin. 2005. Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men. **J. Androl.** 26: 343-348.
- Jayasooriya, A.P., M. Sakono, C. Yukizaki, M. Kawano, K. Yamamoto and N. Fukuda. 2000. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. **J. Ethnopharmacol.** 72 : 331–336.

- Jilka, C., B. Strifler, G.W. Fortner, E.F. Hays and D.J. Takemoto. 1983. *In vivo* antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). **Cancer Res.** 43: 5151-5.
- Jouannet, P., B. Ducot, D. Feneux and A. Spira. 1988. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. **Int. J. Androl.** 11 (5): 379-94.
- Kaneto, M., S. Kanamori, H. Atsuko and K. Kurajiro. 1999. Epididymal sperm motion as a parameter of male reproductive toxicity: sperm motion, fertility, and histopathology in ethinylestradiol-treated rats. **Reprod. Toxicol.** 13 (4):279-89.
- Kawaguchi, T., M. Kawachi, M. Morikawa, H. Kazuta, K. Shibata, M. Ishida, N. Kitagawa, A. Matsuo and T. Kadota. 2007. Key parameters of sperm motion in relation to male fertility in rats given alpha-chlorohydrin or nitrobenzene. **J. Toxicol Sci.** 29 (3): 217-31.
- Klinc, P. and D. Rath. 2007. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reprod. Domest. Anim.** 42 (1): 63-7.
- Kruger T.F., R. Menkveld, F.S. Stander, C.J. Lombard, J.P. van der Merwe, J.A. Van Zyl and K. Smith. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 46: 1118-1123.
- Kumar D.S., K.V. Sharathnath, P. Yogeswaran, A. Harani, K. Sudhakar, P. Sudha and D. Banji. 2010. A medicinal potency of *Momordica charantia*. **IJPSRR.** 1: 95-100.
- Kuriyama, K., T. Kitamura, R. Yokoi, M. Hayashi, K. Kobayashi, J. Kuroda and H. Tsujii. 2005. Evaluation of testicular toxicity and sperm morphology in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS). **J. Reprod. Dev.** 51: 657-67.

- Kusamran, W.R., A. Ratanavila and A. Tepsuwan. 1998. Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter gourd fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenases and glutathione S-transferase activities, and *in vitro* metabolic activation of chemical carcinogens in rats. **Food Chem. Toxicol.** 36: 475-84.
- Larson, J.L. and D.J. Miller. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. **Mol. Reprod. Dev.** 52 (4): 445-9.
- Lee-Huang, S., P.L. Huang, P.L. Huang, A.S. Bourinbaiar, H.C. Chen and H.F. Kung. 1995. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92: 8818-22.
- Lee-Huang, S., P.L. Huang, P.L. Nara, H.C. Chen, H.F. Kung, P. Huang, H.I. Huang and P.L. Huang. 1990. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. **FEBS. Lett.** 272: 12-8.
- Lim, C.C., S.E. Lewis, M. Kennedy and W. Thompson. 1998. Humansperm morphology and *in vitro* fertilization: sperm tail defects are prognostic for fertilization failure. **Andrologia.** 30 (1): 43-47.
- Liu, D.Y., C. Garrett and H.W. Baker. 2003. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. **Hum. Reprod.** 18:2382-2389.
- Liu, D.Y. and H.W. Baker. 1990. Relationship between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization *in vitro*. **Hum. Reprod.** 5: 298-303.
- Lohiya, N.K., B. Manivannan, P.K. Mishra, N. Pathak, S. Sriram, S.S. Bhande and S. Panneerdoss. 2002. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. **Asian J. Androl.** 4: 17-26.

- Luangpirom, A., W. Sirisarn, and J. Pontaisog. 2010. Antifertility activity of the aqueous leaf extract of *Cissampelos pareira* in male albino mice. **ABAH Bioflux**. 2: 59-64.
- Luna, L.G. 1960. **Manual of Histological Staining Methods of the Armed Force Institute of Pathology**. McGraw – Hill Book Company, New York.
- Mali, P.C., A.S. Ansari and M. Chaturvedi. 2002. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **J. Ethnopharmacol**. 82: 61-67.
- Meistrich, M.M. 1986. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption.. **Biol. Reprod**. 34: 17-28.
- Meyers, S.A., J.W. Overstreet, I.K. Liu and E.Z. Drobnis. 1995. Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. **J. Androl**. 16: 47-54.
- Mohan, J., J.N. Panda, U.S. Singh and R.P. Moudgal. 1989. Studies on antifertility effects of gossypol acetic acid in domestic cocks. **J. Reprod. Fert**. 85: 73-78.
- Mohri, H., D.A.I. Suter, P.D.C. Brown-Woodman, I.G. White and D.D. Ridley. 1975. Identification of the biochemical lesion produced by α -chlorohydrin in spermatozoa. **Nature** 255: 75-77.
- Mosher, W.D. and W.F. Pratt. 1991. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. **J. Fertil. Steril**. 56: 192-193.
- Naseem, M.Z., S.R. Patil, S.R. Patil, Ravindra, R.S. Patil. 1998. Antispermato-genic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. **J. Ethnopharmacol**. 61: 9-16.

National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD). 2000. **From cells to selves: reproductive health for the 21st century**. n.p.

Ng, K.K., R. Donat, L. Chan, A. Lalak, I. Di Pierro and D.J. Handelsman. 2004. Sperm output of older men. **Hum. Reprod.** 19: 1811–1815.

Noguchi, R., Y. Yasui, R. Suzuki, M. Hosokawa, K. Fukunaga and K. Miyashita. 2001. Dietary effects of bitter gourd oil on blood and liver lipids of rats. **Arch. Biochem. Biophys.** 396: 207-12.

Norris, D.O. 2007. **Vertebrate Endocrinology**. 4th ed. Elsevier Academic Press, San Diego.

Ombelet, W., F.R. Fourie, H. Vandeput, E. Bosmans, A. Cox, A. Janssen and T.F. Kruger. 1994. Teratozoospermia and *in-vitro* fertilization: a randomized prospective study. **Hum. Reprod.** 9: 1479–1484.

Panda, S. and A. Kar. 2000. Excess use of *Momordica charantia* extract may not be safe with respect to thyroid function and lipid peroxidation. **Curr. Sci. India.** 79: 222-224.

Parandin, R., H.R. Sadeghipour and S.A. Haeri Rohani. 2008. Evaluation of antifertility effect and recovery of the seed oil constituents of Iranian species of *Melia azadrach* L. in male rats. **ISPBU.** 19: 161-166.

Parandin, R and R. Ghorbani. 2010. Effects of alcoholic extract of *Achilea millefolium* flowers on fertility parameters of male rats. **Int.J. PharmTech Res.** 2: 2492-2496.

Parkash, A., T.B. Ng and W.W. Tso. 2002. Purification and characterization of charantin, a anapin-like ribosome-inactivating peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*) seed. **J. Pept. Res.** 59: 197-202.

- Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** 38 (5): 1171-80.
- Phadke, A.M. and G.M. Phadke. 1961. Occurrence of macrophage cells in the semen and in the epididymis in case of male infertility. **J. Reprod. Fertil.** 2: 400-403.
- Platel, K., K.S. Shurpalekar and K. Srinivasan. 1993. Influence of bitter gourd (*Momordica charantia*) on growth and blood constituents in albino rats. **Nahrung.** 37 (2): 156-60.
- Radtke, M.G. and R.L. Rutowski. 2002. Variation in the number of sperm transferred during mating among males of the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). **J. Insect. Physiol.** 48 (12): 1087-1092.
- Rathi, S.S., J.K. Grover. V. Vikrant and N.R. Biswas. 2001. Prevention of experimental diabetic cataract by Indian Ayurvedic plant extracts. **Phytother. Res.** 16 (8): 774-7.
- Reyes, B.A., N.D. Bautista, N.C. Tanquilut, R.V. Anunciado, A.B. Leung, G.C. Sanchez, R.L. Magtoto, P. Castronuevo, H. Tsukamura and K.I. Maeda. 2006. Anti-diabetic potentials of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and their effects on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** 105: 196-200.
- Sathishsekar, D. and S. Subramanian. 2005. Antioxidant properties of *Momordica charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.** 14: 153-8.
- Scartezzini, P. and E. Speroni. 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **J. Ethnopharmacol.** 71: 23-43.

- Schreiber, C.A., L. Wan, Y. Sun, L. Lu, L.C. Krey and S. Lee-Huang. 1999. The antiviral agents, MAP30 and GAP31, are not toxic to human spermatozoa and may be useful in preventing the sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Fertil. Steril.** 72: 686-90.
- Seetharam, Y.N., H. Sujeeth, G. Jyothishwaran, A. Barad, G. Sharanabasappa, B. Umareddy, M.B. Vijaykumar and S.B. Patil. 2003. Antifertility effect of ethanolic extract of *Amalakyadi churna* in male albino mice. **Asian J. Androl.** 5: 247-250.
- Shetty, A.J. and K. Narayana. 2007. The effects of carbamazepine on sperm morphology in Wistar rats. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 51: 255-260.
- Singh, A., S.P. Singh and R. Bamezai. 1998. *Momordica charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. **Toxicol. Lett.** 94: 37-46.
- Singh, R.K., R.C. Dhiman and P.K. Mittal. 2006. Mosquito larvicidal properties of *Momordica charantia* Linn (family: Cucurbitaceae). **J. Vector Borne Dis.** 43: 88-91.
- Snook, R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. **Tree** 20 (1): 46-53.
- Subratty, A.H., A. Gurib-Fakim and F. Mahomoodally. 2005. Bitter melon: an exotic vegetable with medicinal values. **Nutrition & Food Science** 35 (3): 143-147.
- Sun, Y., P.L. Huang, J.J. Li, Y.Q. Huang, L. Zhang, P.L. Huang and S. Lee-Huang. 2001. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma-associated virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 287: 983-94.

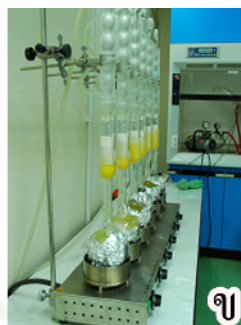
- Tazzari, P.L., D. de Toter, A. Bolognesi, N. Testoni, S. Pileri, S. Roncella, G. Reato, H. Stein, M. Gobbi and F. Stirpe. 1999. An Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell line (D430B) that grows in SCID-mice with the morphologic features of a CD30+ anaplastic large cell lymphoma, and is sensitive to anti-CD30 immunotoxins. **Haematologica** 84: 988-95.
- Telang, M., A. Srinivasan, A. Patankar, A. Harsulkar, V. Joshi, A. Damle, V. Deshpande, M. Sainani, P. Ranjekar, G. Gupta, A. Birah, S. Rani, M. Kachole, A. Giri and V. Gupta. 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry** 63: 643-52.
- Thongtip, N, J. Saikhun, M. Damyang, S. Mahasawangkul, P. Suthunmapinata, M. Yindee, A. Kongsila, T. Angkawanish, S. Jansittiwate, W. Wongkalasin, W. Wajjwalkul, Y. Kitiyanant, K. Pavasuthipaisit and A. Pinyopummin. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometry: the effects of extender and cryoprotectant. **Theriogenology** 62 (3-4): 748-60.
- Tulsiani, D.R.P., A. Abou-Haila, C. R. Loeser and B.M. J. Pereira. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. **Exp. Cell. Res.** 240: 151-164.
- Turner, T.T., C.E. Jones, S.S. Howards, L.L. Ewing, B. Zegeye and G.L. Gunsalus. 1984. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. **Endocrinology** 115: 1925-1932.
- Vikrant, V., J.K. Grover, N. Tandon, S.S. Rathi and N. Gupta. 2001. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **J. Ethnopharmacol.** 76: 139-43.
- Virdi, J., S. Sivakami, S. Shahani, A.C. Suthar, M.M. Banavalikar and M.K. Biyani. 2003. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **J. Ethnopharmacol.** 88: 107-111.

- Vogel, T., R.M. Speed, P. Teague and H.J. Cooke. 1999. Mice with Y chromosome deletion and reduced *Rbm* genes on a heterozygous *Dazl* 1 null background mimic a human azoospermic factor phenotype. **Hum. Reprod.** 14 (12): 3023–3029.
- Vreeburg, J.M. 1975. Distribution of testosterone and 5 α -dihydro-testosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid. **J. Endocr.** 67: 203-210.
- Waeleghe K.V., Clercq N.D, L. Vermeulen, F. Schoonjans and F. Comhaire. 1996. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. **Hum. Reprod.** 11 (2): 325-9.
- Wang, C., A. Leung, W.L. Tsoi., J. Leung, V. Ng, K.F. Lee and S.Y. Chan. 1991. Computer-assisted assessment of human sperm morphology: usefulness in predicting fertilizing capacity of human spermatozoa. **Fertil. Steril.** 55 (5): 989-93.
- Wang, HX. and TB. Ng. 2001. Studies on the anti-mitogenic, anti-phage and hypotensive effects of several ribosome inactivating proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 128: 359-66.
- World Health Organization. 1999. **WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.** 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wu, S.-J. and L.T. Ng. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. **LWT - Food Science and Technology.** 41: 323-330
- Yamashiro, H., K. Kumamoto, H. Wang, Y. Yamashita and T. Terada. 2006. Effect of semen collection in extender solution on the characteristics of goat spermatozoa. **J. Reprod. Dev.** 52 (3): 397-406.

- Yamashiro, H., Y.J. Han, A. Sugawara, I. Tomioka, Y. Hoshino and E. Sato. 2007. Freezability of rat epididymal sperm induced by raffinose in modified Krebs-Ringer bicarbonate (mKRB) based extender solution. **Cryobiology**. 55 (3): 285-94.
- Yesilada, E., I. Gürbüz and H. Shibata. 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. **J. Ethnopharmacol.** 66: 289-93.
- Zhang, J., M.S. Boyle, C.A. Smith and H.D. Moore. 1990. Acrosome reaction of stallion spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona-free hamster eggs. **Mol. Reprod. Dev.** 27 (2): 152-8.
- Zirkin, B.R., R. Santulli, C.A. Awoniyi and L.L. Ewing. 1989. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology** 124: 3043-3049.
- Zorn , B., I.K. Virant, I. Verdenik and H.M. Vrtovec. 1999. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. **Int. J. Androl.** 22 (3): 178-83.





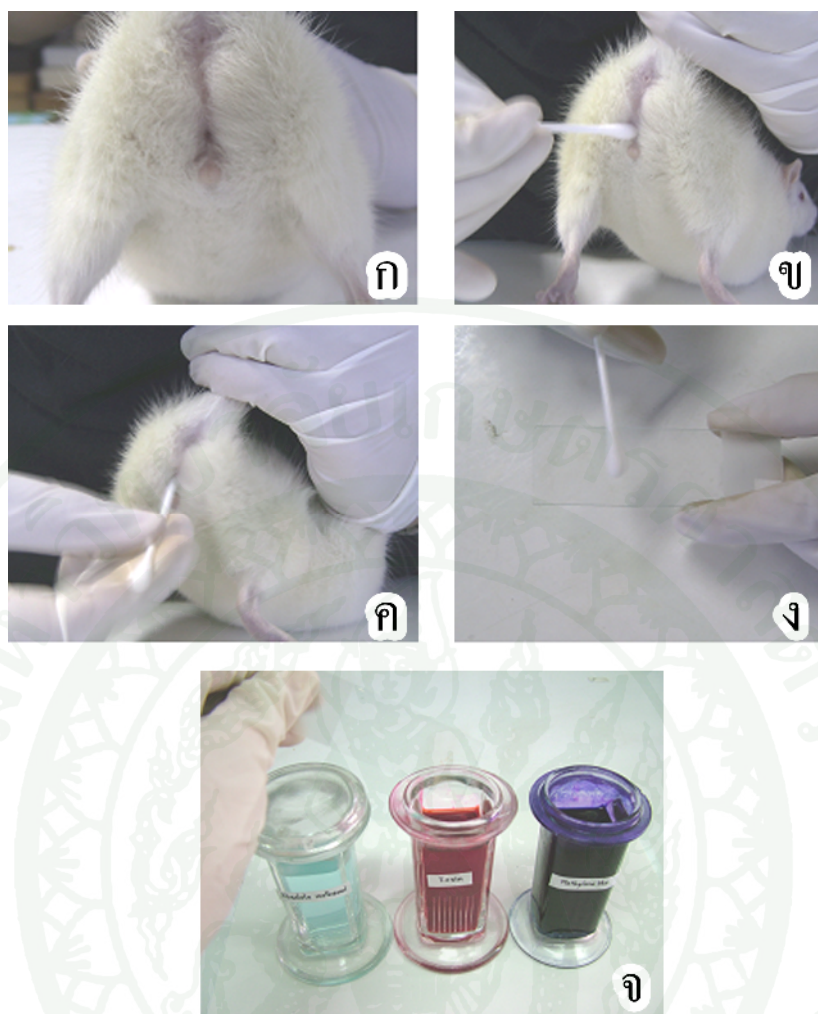


ภาพผนวกที่ 1 การเตรียมสารสกัดเมล็ดมะระจีน

- ก. เมล็ดมะระจีนที่บดเป็นผง
- ข. สกัดด้วยชุดอุปกรณ์ซอกซ์เลท (soxhlet apparatus)
- ค. กลั่นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)
- ง. ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (freeze dryer)
- จ. สารสกัดแห้ง

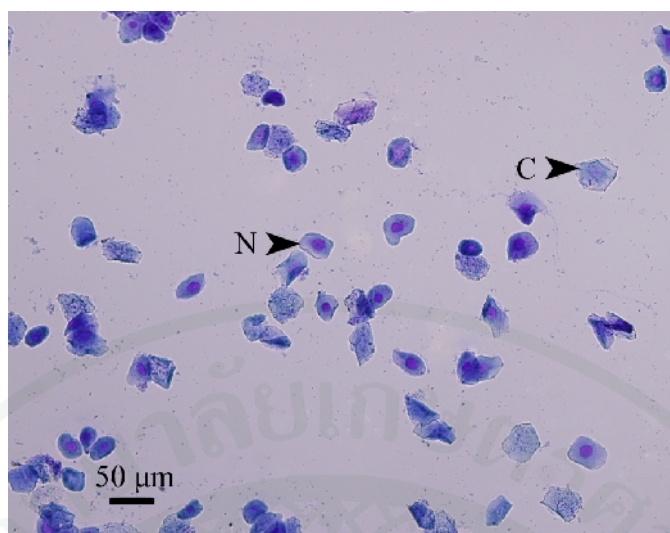


ภาพผนวกที่ ก2 การป้อนสารสกัดเมล็ดมะระจีน



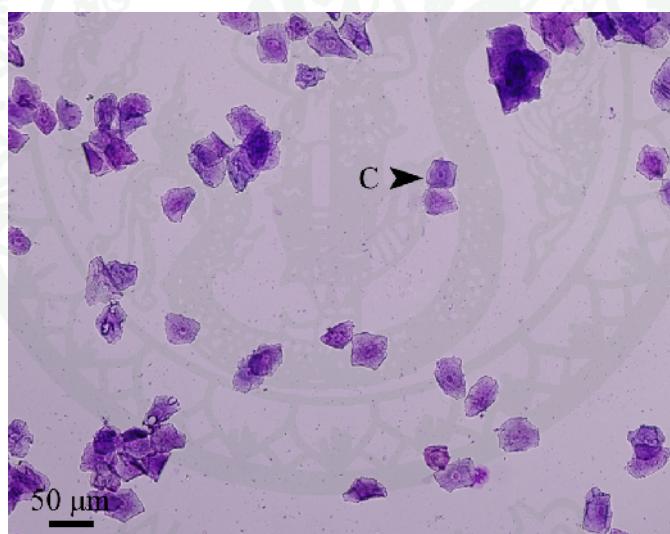
ภาพผนวกที่ 3 การเก็บป้ายช่องคลอด (vaginal smear)

- ก. ช่องคลอดหนูทดลอง
- ข. ใช้สำลีพันก้านจุ่มในโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์
- ค. สอดเข้าไปในช่องคลอดเบาๆ ลึกประมาณ 5-8 มิลลิเมตร จากนั้นขูดเบาๆ
- ง. เก็บป้าย (smear) ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด
- จ. ย้อมด้วยสีดิฟฟ์ควิก



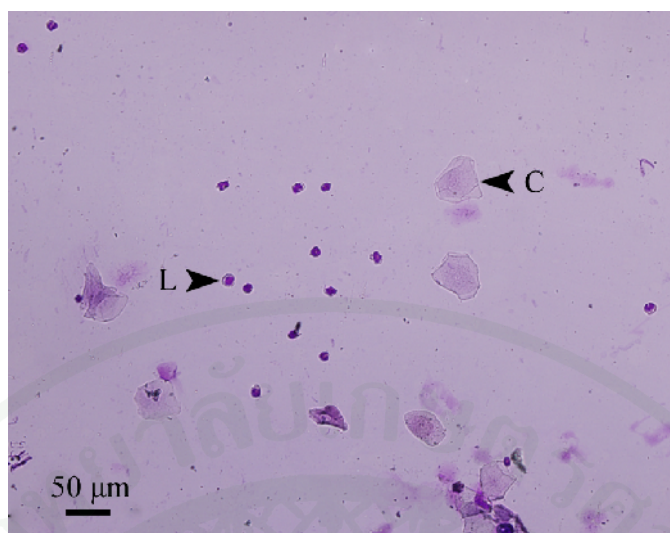
ภาพผนวกที่ ก4 ระยะโปรเอสตรัส (Proestrous)

N= nucleated epithelial cells; C= cornified cell



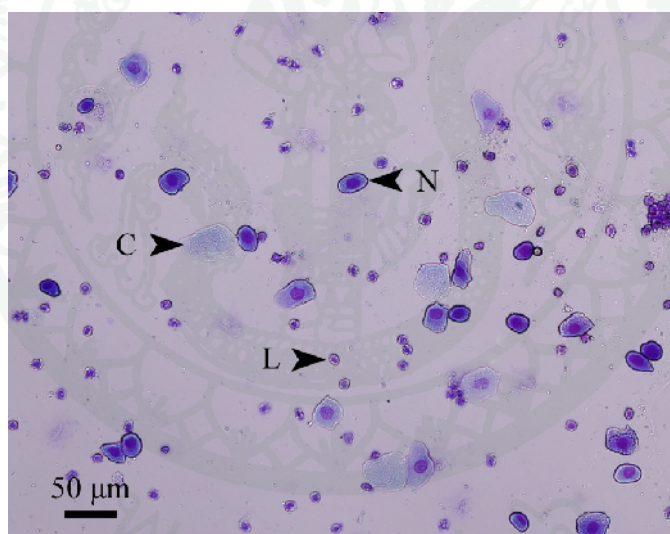
ภาพผนวกที่ ก5 ระยะเอสตรัส (Estrous)

C= cornified cell



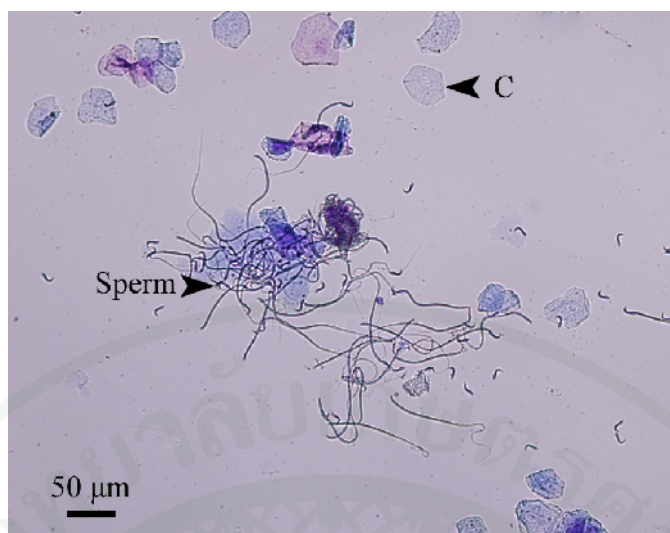
ภาพผนวกที่ ก6 ระยะเมทเอสตรัส (Metestrus)

L= leukocyte; C= cornified cell



ภาพผนวกที่ ก7 ระยะไดเอสตรัส (Diestrus)

L= leukocyte; C= cornified cell; N= nucleated epithelial cells

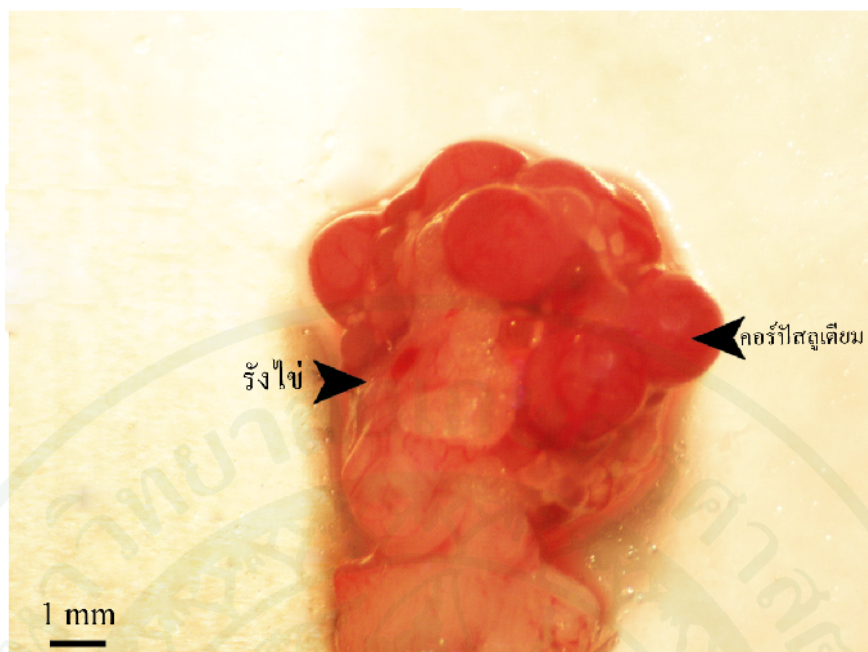


ภาพผนวกที่ ก8 อสุจิที่ค้างค้ำอยู่ในช่องคลอดหนู

C= cornified cell



ภาพผนวกที่ ๑ มดลูกของหนูทดลอง
 ก. ตัวอ่อนบนปีกมดลูก
 ข. ปีกมดลูกที่ไม่มีตัวอ่อน



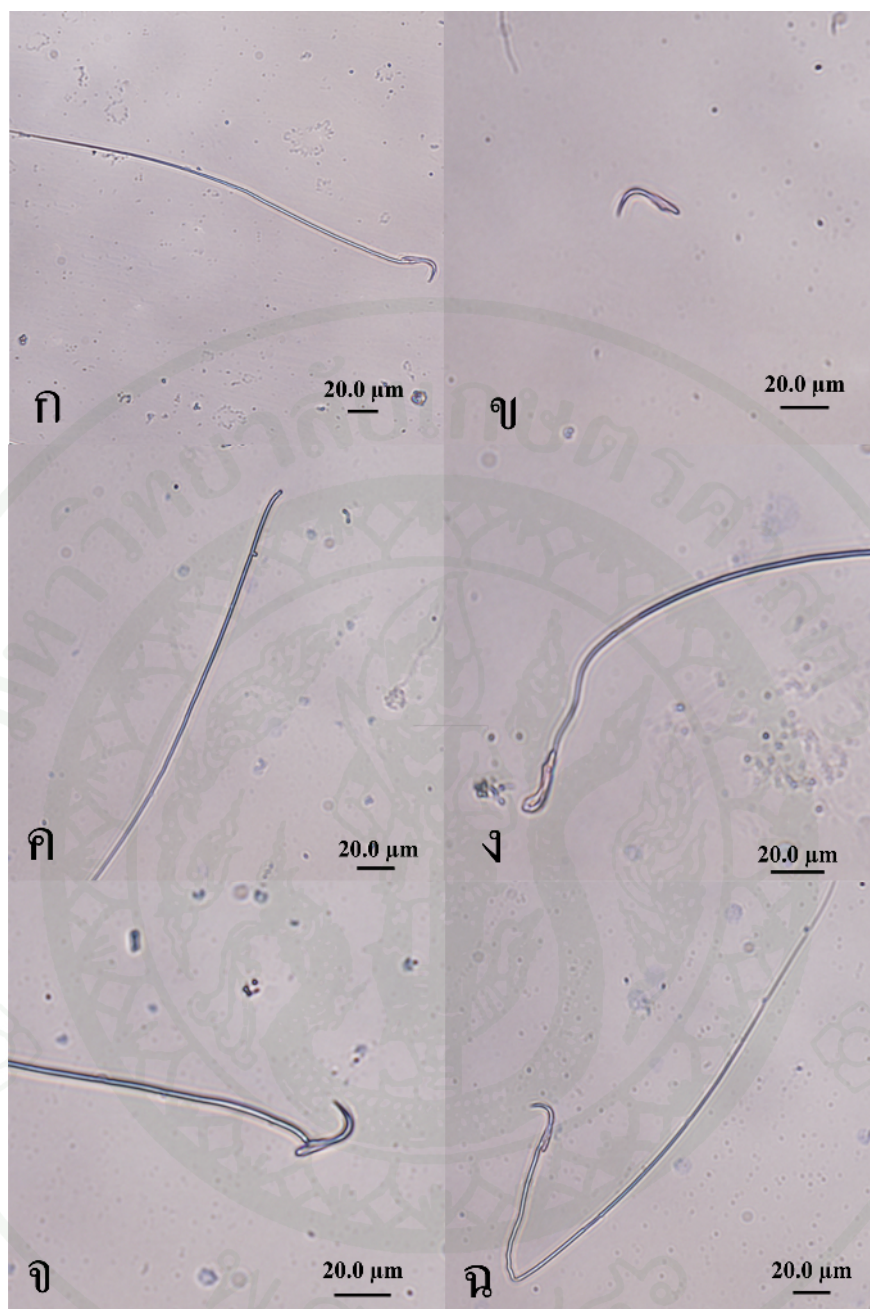
ภาพผนวกที่ ก10 คอร์ปัสลูเทียมบนรังไข่



ภาพผนวกที่ 11 อสุจิหนูที่เชื่อมสปีไอซิน-นิโกรซิน

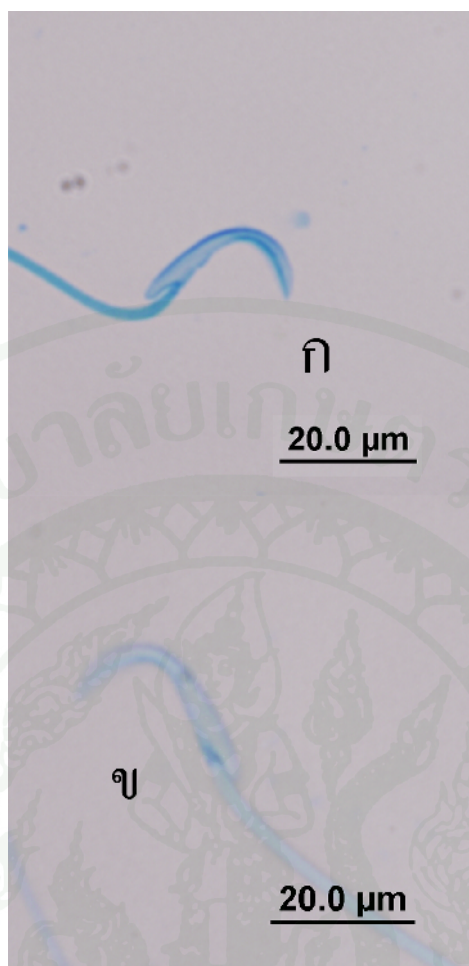
ก. อสุจิที่เป็นจะไม่ติดสี

ข. อสุจิที่ตายจะติดสีม่วงแดง



ภาพผนวกที่ 12 อสุจิที่เชื่อมสัติฟที่ควิก เพื่อดูรูปร่างของอสุจิ

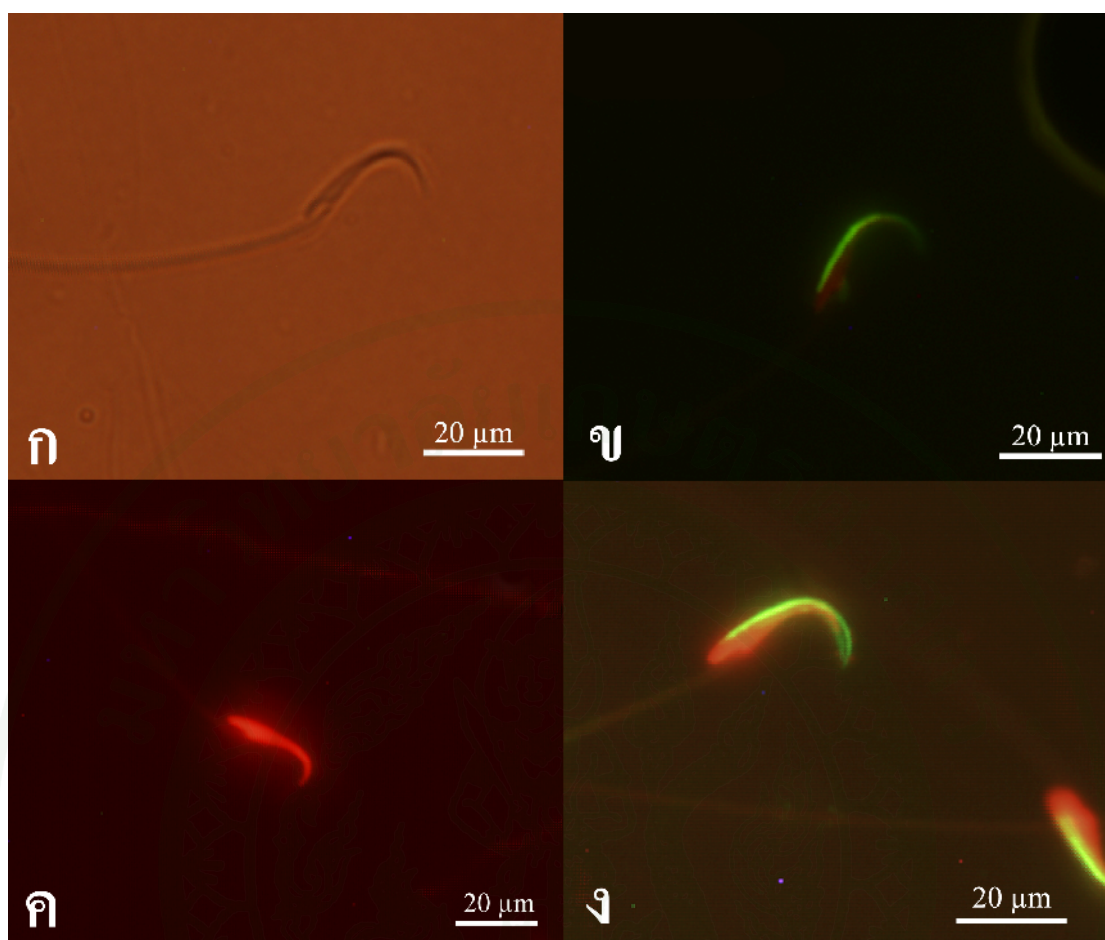
- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ก. อสุจิที่มีรูปร่างปกติ | ข. อสุจิไม่มีหาง (tailless) |
| ค. อสุจิไม่มีหัว (no hook head) | ง. อสุจิหัวผิดปกติ (amorphous head) |
| จ. อสุจิคอผิดปกติ (neck abnormal) | ฉ. อสุจิหางผิดปกติ (tail abnormal) |



ภาพผนวกที่ ก13 อสุจิที่เชื่อมด้วยสีกูแมสซิปดู

ก. อสุจิที่อโครโซมสมบูรณ์ (acrosome intact) หลังเชื่อมอโครโซมจะติดสีฟ้า
สม่ำเสมอทั้งหมด

ข. อสุจิที่ไม่มีอโครโซม (no acrosome) หลังเชื่อมอโครโซมจะไม่ติดสี



ภาพผนวกที่ 14 การย้อมสี แอ็กกูตินินจากถั่วลิสงควบคู่ไอโซไซโอไซยานตติดฉลาก ฟลูออเรสเซนต์และโพรฟิเคียมไอโอไดค์

ก. อสุจิปกติที่มีโครโมโซมและเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์

(acrosome-membrane intact) หลังย้อมอสุจิจะไม่ติดสี

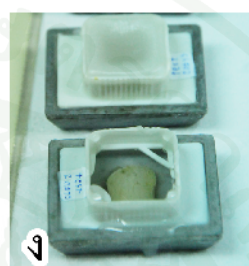
ข. อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์แต่โครโมโซมถูกทำลาย

(membrane intact-acrosome damage) หลังย้อมโครโมโซมจะติดสีเขียว

ค. อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย(membrane damage) หลังย้อมอสุจิจะติดสีแดง

ง. อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์และโครโมโซมถูกทำลาย

(membrane-acrosome damage) หลังย้อมอสุจิจะติดทั้งสีเขียวและสีแดง



ภาพผนวกที่ ก15 ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา

- ก. การขจัดน้ำออกด้วยเอทานอล 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- ข. - ง. นำชิ้นเนื้อไปแช่ไซลิน ผังตัวอย่างด้วยพาราฟินปล่อยทิ้งไว้ให้แข็งตัว
- จ. ตัดพาราฟินบล็อกด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ
- ฉ. - ช. นำชิ้นเนื้อมาติดบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน



ตารางผนวกที่ ข1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายโมดิไฟด์ไทโรด (Modified Tyrode's medium) (Sperm TALP; TA=modified Tyrode with albumin, L=lactate, P=pyruvate) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารเคมี	กรัม/100 มล.
NaCl	0.59
KCl	0.0231
NaHPO ₄	0.004
NaHCO ₃	0.209
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.081
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0294
Na Pyruvate	0.0022
D-glucose	0.0900
Lactic acid (60% Syrup)	0.368
HEPES (Na salt) MW. 260.3	0.238
Bovine Serum Albumin	0.6
Penicilin G	0.0012

ที่มา : Parrish *et al.* (1988)

1. การเตรียมสารละลายโมดิไฟด์ไทโรด ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.1 ทำการชั่งสารตามตารางผนวก ข1 ทุกสาร แล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่ 1 ยกเว้น แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂.6H₂O) และแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂.2H₂O) ให้ชั่งแยกไว้ในขวดรูปชมพู่ที่ 2 และ 3 และยังไม่ต้องใส่โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin)

1.2 ทำละลายสารในขวดรูปชมพู่ที่ 1 ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.3 ทำละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในขวดรูปชมพู่ที่ 2 ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเทรวมในขวดรูปชมพู่ที่ 1

1.4 ทำละลายแคลเซียมคลอไรด์ ในขวดรูปชมพู่ที่ 3 ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเทรวมในขวดรูปชมพู่ที่ 1

1.5 เทสารละลายจากขวดรูปชมพู่ที่ 1 ทั้งหมดลงในกระบอกตวง (cylinder) 100 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เทใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ 1 จากนั้นใส่โบวไนซ์ซีรัมอัลบูมินลงไปโดยไม่ต้องคนสาร รอจนกระทั่งโบวไนซ์ซีรัมอัลบูมินละลายหมดเอง

1.6 นำไปกรองผ่านไนลอนแมสท์ (nylon mesh) ขนาด 22 ไมครอน แล้วบรรจุลงในขวดไร้เชื้อ

1.7 นำไปวัดค่าออสโมลาริตี โดยค่าจะอยู่ที่ 280-290 มิลลิออสโมล

1.8 ปรับค่าความเป็นกรดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 7.4

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีอีโอซิน-นิโกรซิน (Eosin-Nigrosin stains)

2.1 ใส่ น้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมนิโคติอามีนไฮดรอกไซด์ 1.45 กรัม ละลายจนหมด

2.2 ชั่งอีโอซิน 0.835 กรัมและนิโกรซิน 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ คนให้ละลายเข้ากัน

2.3 นำสารละลายที่ได้ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที

2.4 กรองด้วยกระดาษกรอง และบันทึกวันที่ข้างขวด รอให้เย็น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 30 วัน

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี

3.1 Sperm Fixative 4% Paraformaldehyde (pH 7.4) ประกอบด้วย

Paraformaldehyde	2	กรัม
NaHPO ₄	7.81	กรัม
NaH ₂ PO ₄	0.172	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับ pH โดยใช้ HCl นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 3-4 เดือน ก่อนนำมาใช้ให้เอาออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง

3.2 Sperm washing medium 0.1 M Ammonium acetate (pH 9.0) ประกอบด้วย

Ammonium acetate	3.85	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับ pH โดยใช้ NaOH นำไปเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 6 เดือน ก่อนนำมาใช้ให้เอาออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง

3.3 Coomassie blue stain solution

Methanol	50	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10	มิลลิลิตร
Coomassie blue G-250	0.22	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายนอร์มัลแฮงค์ (normal Hank's solution)

NaCl	130.9	มิลลิโมลาร์
KCl	5.4	มิลลิโมลาร์
CaCl ₂	1.3	มิลลิโมลาร์
KH ₂ PO ₄	1.0	มิลลิโมลาร์
Na ₂ HPO ₄	1.9	มิลลิโมลาร์
MgSO ₄	1.4	มิลลิโมลาร์
NaHCO ₃	4.2	มิลลิโมลาร์
Glucose	5.8	มิลลิโมลาร์
Bovine serum albumin	4	เปอร์เซ็นต์
IM-Tris buffer	20	มิลลิโมลาร์
pH	7.05	

5. สารละลาย Saline-Triton-Merthiolate (Amann *et al.*, 1976)

NaCl	150	มิลลิโมลาร์
NaN ₃	3.8	มิลลิโมลาร์
Triton X-100	0.05	% (v/v)

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์

NaCl	0.9	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนกระทั่งได้สารละลายปริมาตร	100	มิลลิลิตร



1. น้ำยาคงสภาพ

1.1 น้ำยาล้างเนื้อเยื่อก่อนคงสภาพ

Normal saline (NaCl)	0.9	%
----------------------	-----	---

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

Formaline (30-40 formaldehyde)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4)	4	กรัม
Sodium phosphate dibasic (NaHPO_4)	6.5	กรัม

คุณสมบัติ

เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปตามห้องปฏิบัติการต่างๆ เหมาะสำหรับรักษาสภาพเนื้อเยื่อทั่วไป ทั้งที่ต้องการย้อมสีธรรมดาและสีพิเศษ Formalin จะเป็นตัวคงสภาพโปรตีนในไซโทพลาสซึม ระยะเวลาในการรักษาสภาพประมาณ 24 ชั่วโมง หรือถ้าจำเป็นต้องรักษาสภาพนานกว่านี้ก็ยังใช้ได้ ล้างออกด้วยการนำไปผ่านน้ำไหลประมาณ 6 ชั่วโมง (Humason, 1972)

2. สารเกาะยึด

Mayer's egg albumin		
ไข่ขาว	50	มิลลิลิตร
Glycerin	50	มิลลิลิตร
Thymol	2-3	เกร็ด

ผสมไข่ขาวและ Glycerin เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วคนจนไข่ขาวขึ้น นำไปกรองด้วยกระดาษชนิดหยาบ หรือใช้ผ้าขาวบางซ้อนกันหลายๆ ชั้น ใส่ Thymol 2-3 เกร็ด เพื่อกันเชื้อรา เมื่อเตรียมเสร็จแล้วใช้ได้เลย และควรเก็บไว้ในตู้เย็น

3. สีและวิธีการย้อม

3.1 Harris hematoxylin and Eosin stain method (Luna, 1960)

3.1.1 Harris hematoxylin crystal

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		

นำฟลิกสี 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 ยกออกจากเตา แล้วแช่ลงในภาชนะที่มีน้ำหล่อเย็นจนเย็นพร้อมนำไปใช้ได้ทันที ก่อนใช้เติม Glacial acetic acid 2-4 มิลลิลิตรต่อสี 100 มิลลิลิตร เพื่อช่วยเพิ่มให้การติดสีนิวเคลียสดีขึ้น ก่อนใช้กรองสีก่อน และควรเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

3.1.2 Eosin solution

ก. 1% Stock Alcoholic Eosin

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

ข. Working solution

Stock eosin solution

Ethyl alcohol 80%	1	ส่วน
Glacial acetic acid	0.5/100	มิลลิลิตร

3.1.3 1% Acid alcohol

Ethyl alcohol 70%	1000	มิลลิลิตร
Hydrochloric	10	มิลลิลิตร

3.1.4 Saturate lithium carbonate (Li_2CO_3)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

Lithium carbonate (Li_2CO_3)

ผสมทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันจนกระทั่ง Lithium carbonate ไม่ละลายในน้ำกลั่น

4. การย้อมสี Harris hematoxylin และ Eosin (Luna, 1960)

1. นำแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อติดอยู่ไป deparaffinized โดยจุ่มใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 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 hematoxyline ละลายไปหมด
5. Differentiate ใน 1% acid alcohol โดยจุ่มแล้วยกขึ้นอย่างรวดเร็ว
6. นำไปล้างในน้ำประปาที่ไหล 1 นาที
7. จุ่มใน Saturate lithium carbonate (Li_2CO_3) 1 นาที
8. นำไปล้างในน้ำประปาที่ไหล 1 นาที
9. ย้อมสี Eosin solution นาน 2 นาที
10. Differentiate ใน 70% ethyl alcohol โดยจุ่มแล้วยกขึ้นอย่างรวดเร็ว
11. Dehydrate ใน 70% ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (95% และ 100%) ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
12. Clearing ใน xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. Mount slide โดยใช้ permount ปิดทับด้วย cover glass

โดยนิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินม่วง และส่วนไซโทพลาสซึมจะติดสีชมพูม่วง



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นายวิชา พลอยภัทรภิญโญ
 เกิดวันที่ 2 ตุลาคม 2525
 สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วท.ม. (สัตววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -
 ทักษะการศึกษาที่ได้รับ -