เอกสารอ้างอิง

กนก อุไรสกุล. 2546. สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่าและสมุนไพรบางชนิดต่อผลผลิตของพริกและป้องกันกำจัดไรขาวและศัตรูที่สำคัญในพริก. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร.

กนกอร แสงอรุณ. 2543. ผลของสารสกัดจากรากหนอนตายหยากต่อน้ำหนักอัณฑะและตับในหนูขาว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรีสาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กฤษณา ภูตะคาม. 2525. รวบรวมรายงานการศึกษารากหนอนตายหยาก. *เชียงใหม่เภสัชสาร.*

ชุลีพร วณิชกุลชัยพร ธวัชชัย ศุภดิษฐ์ แตงอ่อน มั่นใจตน และ บุญจง ขาวสิทธิวงษ์. 2551. การใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากควบคุมลูกน้ำยุงลาย. *วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม.* 4(1) : 107-121.

ณรงค์ โฉมเฉลา. 2536. การใช้พืชสมุนไพรและพืชหอมในการป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร. รายงานการสัมมนาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ณัฐกานต์ ธิคำ บงกชรัตน์ ปีติยนต์ และสุรพล วิเศษสรรค์. 2551. การแยกสารสกัดบางส่วนจากหนอนตายหยากและผลของสารสกัดต่อหนอนกระทู้หอม. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

ณัฐวดี สมบัติเทพสุทธิ์ ฤดีกร วิวัฒนปฐพี สนั่น ศุภธีรสกุล และ สุนทร พิพิธแสงจันทร์. 2551. ผลของสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก โล่ติ๊น และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้างต่อการวางไข่ของผีเสื้อหนอนใยผัก. *Thai Journal of Agricultural Science.* 39(3) : 476-479.

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

ทะเบียนพันธุ์พืชในประเทศไทย. 2548. ระบบออนไลน์. แหล่งที่มา: http:// www.doa. go. th/ prakaddoa/ regis-agri. pdf. (5 กันยายน 2550).

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543. สมุนไพรพื้นบ้าน เล่ม 5. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บริษัทประชาชน จำกัด.

นิตยา ขันธบุตร. 2554. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบทองพันชั่งและรากหนอนตายหยากที่มีฤทธิ์ในการกำจัดเห็บสุนัข. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.

ประคอง พันธุ์อุไร. 2520. รายงานการศึกษาชีววิเคราะห์ของรากหนอนตายหยาก. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.*

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

มณิสร เตือนธรรมรักษ์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ฮอร์โมนเพศผู้ในกวาวเครือแดงจากจังหวัดลำปาง. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เมธี รุ่งโรจน์สกุล. 2544. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซม และการขยายพันธุ์ของต้นหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัตนาภรณ์ พรหมศรัทรา. 2543. การสกัดสารออกฤทธิ์จากโลติ๊น หนอนตายหยากและสะเดา. ในเอกสารการฝึกอบรมการสกัดสารออกฤทธิ์จากโลติ๊น หนอนตายหยาก และสะเดาในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช. สถาบันวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ กรมวิชาการเกษตร.

เลาจนา ธีรภัทรสกุล และ ประคอง พันธุ์อุไร. 2520. การศึกษาพิษของหนอนตายหยากที่มีกับหนอนแมลงวันบ้าน. *วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.* 19(4) : 217-227.

วิชิต พิพิธกุล และ สุชาติ ปริยานนท์. 2526. คู่มือประกอบการเรียนกีฏวิทยาทางการแพทย์. ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศูนย์ข้อมูลคณะกรรมการประสานงานองค์กรเอกชนเพื่อการสาธารณสุขมูลฐาน (คปอส.). 2534. สารเคมีอันตรายต่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม. 1(4) : 1-83.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 2554. "ผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชจากสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยาก". องค์ความรู้และนวัตกรรมด้านเกษตรอินทรีย์ ปี พ.ศ. 2552-2553. ระบบออนไลน์. แหล่งที่มา: http://www.nia.or.th/organic/books/14_1.pdf. (21 มีนาคม 2554).

สมจิตร พงษ์พงัน และสุภาพ ภู่ประเสริฐ. 2515. พืชที่กินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

อภิฤทธิ์ จิตใจงาม. 2551. ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook. F.) ต่อการสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อัญชลี วัฒนโสภณ. 2531. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันสะเดาที่มีต่อเพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียวข้าวตัวเต็มวัย.บทคัดย่อการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 26, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารมณ์ แสงวนิชย์. 2536. การใช้สารธรรมชาติในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช. รายงานการสัมมนาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ และอารมย์ แสงวนิชย์. 2548. หางไหลสมุนไพรพื้นบ้านในการกำจัดแมลงที่น่าสนใจ (1). *เคหการเกษตร*. 23(8) : 184-188.

โอภา วัชระคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พริ้นท์. กรุงเทพฯ.

อำนวย อิศรางกูร ณ อยุธยา. 2535. การใช้สารสกัดจากพืชควบคุมแมลงศัตรูพืช. วารสารเกษตรก้าวหน้า ปีที่ 7 ฉบับที่ 4.

Adamkovicova, M., Toman, M. and Cabaj, M. 2010. Diazinon and cadmium acute testicular toxicity in rats examined by histological and morphometricel methods. *Slovak Journal of Animal Science*. 43(3) : 134 – 140.

Adhikary, P., Banerji, J., Choudhary, D., Das, A. K., Deb, C. C., Mukherjee, S. R. and Chatterjee, A. 1990. Effect of *Piper betle* Linn. (stalk) extract on male rat fertility. *Indian pharmacy*. 22 : 145-149.

Afifi, N. A., Ramadan, A., Abd-El-Aziz, M. I. and Saki, E. E. 1991. Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 98 : 419–423.

Aitken, R. J. and Roman, S. D. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1 : 15-24.

Akinloye, O. O. and Morayo, O. M. 2010. Evaluation of andrological indices and testicular histology following chronic administration of aqueous extract of *Carica papaya* leaf in Wistar rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(5) : 252-255.

Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipid of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development.* 42 : 334-346.

Armagan, A., Yilmaz, H. R., Soyupek, S., Oksay, T. and Ozcelik, N. 2006. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian Journal of Andrology.* 8 : 595-600.

Barles, N., Selmanoglu, G., Songru, S., Kockaya, A. E. and Erdemil, E. 2002. Biochemical and histological effects of carbendazim to rat male reproduction. *Pesticides.* 17 : 59-71.

Blackburn, D. M., Gray, A. J., Lloyd, S. C., Sheard, C. M. and Foster, P. M. D. 1988. Comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testes in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 92 : 54 –64.

BOSTID. 1992. Neem A Tree for Solving Global Problems. Board on Science and Technology for International Development, National Academy Press. Washington, D.C.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hart, H., Hadcek, F., Hofer, O., Vajrodaa, S. and Greger, H. 2004. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of *Stemona* species. *Phytochemistry.* 65 : 2719-2729.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger, H. J. 2002. Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids-a source of potent natural insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50 : 6383–6388.

Buege, J. A. and Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 52 : 302-310.

Ceribasi, O. A., Turk, G., Sonmez, M., Sakin, F. and Atessahin, A. 2010. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 107(3) : 730–736.

Chandra, A. K., Ghosh, R., Chatterjee A. and Sarkar, M. 2007. Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 101 : 944-956.

Chapin, R. E., Morgan, K. T. and Bus, J. S. 1983. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5- hexanedione. *Experimental and Molecular Pathology*. 38: 149 – 169.

Chitra, K. C., Latchoumycandane, C. and Mathur, P. P. 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Archives of Toxicology*. 76 : 545-551.

Choudhary, N., Goyal, R. and Joshi, S. C. 2008. Effect of malathion on reproductive system of male rats. *Journal of Environmental Biology*. 29(2) : 259-262.

Connell, G. M. and Eikness, K. B. 1968. Testosterone production by rabbit testis slices. *Steroids*. 12 : 507-516.

Creasy, D. M. 2003. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the society of toxicologic pathology. *Reproductive Toxicology*. 68 : 408–415.

Creasy, D. M., Beech, L. M., Gray, T. J. B. and Butler, W. H. 1987. The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testes of the mature rat. *Experimental and Molecular Pathology* . 46 : 357 –371.

Creasy, D. M., Ford, G. R. and Gray, T. J. B. 1990. The morphogenesis of cyclohexylamine induced testicular atrophy in the rat: *In vivo* and *in vitro* studies. *Experimental and Molecular Pathology*. 52 : 155–169.

Critian, S. and Eduardo, B. O. 2000. Sperm quality in mice acutely treated with parathion. *Asian Journal of Andrology*. 2 : 147-150.

Dadoune, J. P. 1985. Functional morphology of the seminal vesicle epithelium. *Reproductive Biology Training Programs*. 12 : 18-25.

Dandekar, S. P., Nadkarni, G. P., Kulkarni, V. S. and Punekar, S. 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine*. 48 : 186-189.

Debnath, D. and Mandal, T. K. 2000. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague-Dawley albino rats. *Journal of Applied Toxicology*. 20 : 197-204.

Debnath, S., Kannadasan, M., Acharjee, A., Bhattacharjee, C., Kumar, S. and Kumar, G. 2010. Antioxidant activity of the hydro-alcoholic extract of *Erythrina fusca* Lour. bark against the animal models of epilepsy. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2(5) : 379-383.

Dianne, C. M. 2001. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicologic pathology.* 29(1) : 64 –76.

Dixit, V. P., Gupta, R. S. and Gupta, S. 1989. Antifertility plant Products: testicular cell population dynamics following solasodine ($C_{27}H_{43}O_2N$) administration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia.* 21 : 542-546.

Dua, A. A. and Vaidya, S. R. 1996. Sperm motility and morphology as changing parameters linked to sperm count variations. *Journal of Postgraduate Medicine.* 42 : 93-96.

Duyfies, B. E. E. 1993. Stemonaceae. *Flora Malesiana Ser.* I. 11 : 399-409.

El-Missiry, M. A. 1999. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 124 : 233-237.

Evans, H. J., Fletcher, J., Torrance, M. and Hargreave, T. B. 1981. Sperm abnormalities and cigarette smoking. *Lancet.* 1 : 627.

Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek, A. J., Rempeld, D. M. and Ames, B. N. 1996. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research.* 351 : 199-203.

Free, M. J., Schluntz, G. A. and Jaffe, R. A. 1976. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biology of Reproduction.* 14 : 481-488.

Friedmann, A. S. 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reproductive Toxicology.* 16 : 275–279.

Gagnepain, F. 1934. Stemonacees (Roxburghiacees). *Flore Cenerale de L Indo-Chine.* 6 : 745-753.

Ghosh, D., Das, S., Maiti, R., Jana, D. and Das, U.B. 2002. Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: Association with oxidative stress. *Reproductive Toxicology.* 16 : 385-390.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Ghosh, D., Das, U. B. and Misro, M. 2002. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: A correlative approach to oxidative stress. *Free Radical Research*. 36 : 1209-1218.

Ghosh, D., Das, U. B., Ghosh, S., Das, U. B., Ghosh, S., Mallick, M. and Debnath, J. 2002. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: A correlative study with testicular oxidative stress. *Drug and Chemical Toxicology*. 5 : 281-292.

Gonzales, G. F., Miranda, S., Nieto, J., Fernández, G., Yucra, S., Rubio, J., Yi, P. and Manuel, G. 2005. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3 : 5.

Gore, A. C. 2001. Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine*. 14 : 235-246.

Griffin, D. K. and Finch, K. A. 2005. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Human Fertility*. 8(1) : 19-26.

Halliwell, B. and Chirica, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and signifi cance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57 : 715-725.

Handelsman, D. J., Conway, A. J., Boylan, L. M. and Turtle, J. R. 1984. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *International Journal of Andrology*. 7 : 369.

Hansson, V. E., Reusech, O., Trygstad, O., Torgerson, O. Ritzen, E. M. and French, F. S. 1973. FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nature New Biology*. 246 : 56-59.

Hess, R. A. and Nakai, M. 2000. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histology and Histopathology*.15 : 207-224.

Hiremath, S. P., Badamia, S., Swamya, H. K. S., Patilb, S. B. and Londonkarb, R. L. 1997. Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*. 56(1) : 55-60.

Hjollund, N. H., Bonde, J. P., Henriksen, T. B., Giwercman, A. and Olsen, J. 2004. The Danish first pregmancy planner study team. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology*. 15 : 21.

Homma, T. S., Hiraku. Y., Ohkuma, Y., Oikawa, S. M. M. and Ogawa, K. 2002. 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radical Research*. 36 : 555-566.

Inya-Agna, S. L, Oguntirnen, B., Sofowora, A. and Benjamin, T.V. 1987. Phytochemical and antibacterial studies on the essential of *Eupatorium odorata* (L.). *International Journal of Crude Drug Research*. 25 : 49-52.

Irshad, M. and Chaudhuri, P.S. 2002. Oxidant antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*. 40 : 1233-1239.

Jedlinska, K. M., Bomba, G., Jakubowski, K., Rotkiewicz, T. and Jana, B. 2006. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *Journal of Reproduction and Development*. 52 : 203-209.

Johnson, B. H. and Ewing, L. L. 1971. Follicle stimulating hormone and the regulation of testosterone secretion in rabbit testes. *Science*. 173 : 635-637.

Jones, R., Mann, T. and Sherins, R. J. 1978. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London*. 201 : 413-417.

Kacker, R., Srivastara, M. K. and Raizada, R. B. 1997. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozob. *Industrial Health*. 35 : 104-111.

Kaltenegger, E., Brem, B., Mereifer, K., Kalchhauer, H., Kahlig, H., Varojdaya, S. and Greger, H. 2003. Insecticidal pyrido [1,2-a] azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry*. 63 : 803-816.

Karagounis, C. S., Papanikolaou, N. A. and Zavos, P. M. 1985. Semen parameters compared between smoking and nonsmoking men: smoking intensity and semen parameters. *Infertility*. 8 : 373.

Kasahara, E., Sato, E. F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K. and Sasaki, J. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochemical Journal*. 365 : 849-856.

Kashoury, A. A. E. and Din, H. A. T. E. 2010. Chlorpyrifos (from different sources): Effect on testicular biochemistry of male albino rats. *Journal of American Science*. 6(7) : 252-261.

Kaur, P., Kalia, S. and Bansal, M. P. 2006. Effect of diethyl maleate induced oxidative stress on male reproductive activity in mice: Redox active enzymes and transcription factors expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 291 : 55-61.

Kisiler, A. R., Aydemir, B., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Gulyasar, T. and Akyolcu, M. C. 2007. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress in infertile men. A prospective study. *Fertility and Sterility*. 78 : 491.

Klaus, W. 1995. Biologically Active Ingredents. *In* ;The Neem Tree Sourceof Unique Natural Productsfor Integrated Pest Management, Medicine, industry and Other Purposes: Schmutterer, H. (Ed.). VCH Verlaggesellschaft mbH, Weinheim, Germany. pp. 372-373.

Koizumi, T. and Li, Z. G. 1992. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium induced testicular cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 37 : 25–36.

Konoshima, M. 1973. Medicinal plants in Thailand. Kyoto Univerisity Scientific surveys of crude drugs and medicinal plants in Thailand. Kyoto.

Krishnamoorthy, P., Vaithinathan, S., Vimal, R., A. and Bhuvaneswari, A. 2007. Effect of *Terminalia chebula* fruit extract on lipid peroxidation and antioxidative system of testis of albino rats. *African Journal of Biotechnology*. 6 (16) : 1888-1891.

Kumar, S., Kumari, A. and Murarka, S. 2009. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47: 615-624.

Kumar, B. S., Rao, K. M., Madhusudhan, K., Reddy, M. K. and Prasad, M. S. K. 2011. Isolation and evaluation of antifertility activity of total alkaloids from leaves of *Aegle marmelos* in male albino rats (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2(3) : 178-183.

Latchoumycandane, C. and Mathur, P. P. 2002. Effect of methoxychlor on the antioxidant system in mitochondrial and microsome-rich fractions of rat testis. *Toxicology*. 176 : 67-75.

Latchoumycandane, C., Chitra, K. C. and Mathur, P. P. 2002. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis. *Toxicology*. 171 : 127-135.

Lee, E., Ahn, M. Y., Kim, H. J., Kim, I. Y., Han, S. Y. and Kang, T. S. 2007. Effect of di(n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats. *Environmental Toxicology*. 22 : 24-55.

Londonkar, R.L., Sonar, A., Patil, S. and Patil, S.B. 2000. Nicotine delays puberty in male rat. *Pharmaceutical Biology*. 38(4) : 291-297.

Mahgoub, A. A. and Medany, H. A. 2000. Evalution of subchronic exposure of the male rat's reproductive system to the insecticide methomyl. *International Journal of Biological Sciences*. 7(2) : 138-145.

Martinez, M., Reis, G. S., Pinheiro, P. F., Almeida, C. C., Cagnon, V. H., Mello-Júnior, W., Pereira, S., Padovani, C. R. and Martinez, F. E. 2008. Evaluation of the ethanol intake on the *Calomys callosus* seminal vesicle structure. *Micron*. 39(5) : 587-592.

Matsumura, F. 1975. Botanical insecticides; Toxicology of Insecticides. Plenum, New York. 94-98.

Mazaro, R., Di, S., Kempinas, L. and Grava, D. W. 2002. Effects of the hydromethanolic extract of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on reproductive parameters of male rats. *Contraception*. 66(3) : 205-209.

Meng, Z. and Bai, W. 2004. Oxidation damage of sulfur dioxide on testicles of mice. *Environmental Research*. 96 : 298-304.

Meymand, M. M., Mohsen, M., Mahmoud, G. K., Batool, N. and Bagher, M. 2002. Sterility effects of Neem (*Azadirachta indica*) extract on male rat. *Journal of Reproductive and Infertility*. 3(2) : 77.

Moore, K. L. and Dalley, A. F.1999. Clinical Oriented Anatomy (4th Edition). Lippincot Williams and Williams; a Woller Klumner Corporation, Philadelphia. pp. 263-271.

Mukerjee, B. and Rajan, T. 2004. Morphometric study of rat prostate in normal and under stressed condition. *Journal of the Anatomical Society of India*. 53 : 29–34.

Narayanan, C. R., Singh, R. P. and Sawaikar, D. D. 1970. Phagodeterrency of various fractions of neem oil against *Schistocerca gregaria* (Forsk). Pesticides. 12. 31-32.

Negro, V. A. 1993. Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women: Overview. *Environmental Health Perspectives*. 101 : 59.

Ngoula, F., Watcho, P., Dongmo, C. M., Kenfack, A., Kamtchouing, P. and Tchoumboue, J. 2007. Effects of pirimiphos-merthyl (an organophosphate insecticide) on the fertility of adult male rat. *African Health Science.* 7(1) : 3-9.

Niels, E., Skakkebæk, N. J., Katharina, M., Main, E. R. and Leffers, H. 2006. Is human fecundity declining? *International journal of andrology.* 29 : 2–11.

Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. 1990. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol.* 25 : 231-237.

Oguz, A. O. and Kus, A. M. 2008. Protective Effects of Melatonin Against Formaldehyde-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in Rat Testes: An Immunohistochemical and Biochemical Study. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 54 : 169–176.

Ojeda, S. R. and Urbanski, H. F. 1994. Puberty in the rat: The Physiology of Reproduction. Knobil, E. and Neill, J.D. (eds). New York : Raven Press. Pp. 363-409.

Omura, M., Hirata, M. and Ahao, M. 1995. Pesticide cause testicle damage reduces sperm count. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology.* 55 :1-7.

Ozyurt, H., Pekmez, H., Parlaktas, B. S., Kus, I., Ozyurt, B. and Sarsılmaz, M. 2006. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian Journal of Andrology.* 8 :189-193.

Pandee, S., Sangjun, N. and Jatisatienr, A. 2003. An acute toxicity testing of *Stemona curtisii* Hk. F. Proceeding on The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. 3-7 Feb, 2003. Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Parandin, R., Sadeghipour, H. R. and Haeri, R. S. A. 2008. Evaluation of antifertility effect and recovery of the seed oil constituents of Iranian species of *Melia azadrach* L. in male rats. *Journal of Reproduction & Contraception.* 19(3) :161-166.

Pasqualotto, F. F., Umezu, F. M., Nelson, D. R. and Thomas, A. J. 2002. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men. A prospective study, *Fertility and Sterility.* 90 : 278.

Pasqualotto, F. F., Lucon, A. M., Sobreiro, B. P., Pasqualotto, E. B. and Arap, S. 2004. Effects of medical therapy, alcohol, smoking and endrocrine disruptors on male dertility. *Revista do Hospital das Clínicas Sao Paulo.* 59 : 375.

Patil, R. B., Vora, S. R. and Pillai, M. M. 2009. Antioxidant effect of plant extracts on phospholipids levels in oxidatively stressed male reproductive organs in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 7(1) : 35-39.

Peltola, V., Mantyla, E., Huhtaniemi, I. and Ahotupa, M. 1994. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *Journal of Andrology*. 15(4) : 353-361.

Prahalathan, C., Selvakumar, E. and Varalakshmi, P. 2005. Lipoic acid ameliorates Adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reproductive Toxicology*. 20 : 111-116.

Qian, S. Z., Zhong, C. Q. and Xu, Y. 1986. Effect of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. on the fertility of rats. *Contraception*. 33 :105–110.

Qureshi, S., Tariq, M., Parmar, N. S. and Meshal, A.1988. Cytological effects of Khat (*Catha edulis*) in somatic and male germ cells of mice. *Drug and Chemical Toxicology*. 11(2) : 151-165.

Rajasekaran, M., Bapna, J. S., Lakshmanan, S., Nair, R. A. G., Veliath, A. J. and Panchanadam, M. 1998. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. *Journal of Ethnopharmacol*. 24(1) :115-121.

Rao, M., Narayana, K., Benjamin, S. and Bairy, K. L. 2005. L-ascorbic acid ameliorates postnatal endosulfan induced testicular damage in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 49 : 331-336.

Ratnasooriya, W. D., Ratnayake, S. S. K. and Jayatunga, Y. N. A. 2002. Effects of pyrethroid insecticide ICON (lambda cyhalothrin) on reproductive competence of male rats. *Asian Journal of Andrology*. 4(1) : 35-41.

Rosenblum, E. R., Gavaler, J. S. and Thiel, D. H. 1989. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 7 : 569-577.

Samanta, L., Sahoo, A. and Chainy, G. B. 1999. Age-related changes in rat testicular oxidative stress parameters by hexachlorocyclohexane. *Archives of Toxicology*. 73 : 96-107.

Sarkar, R., Mohanakumar, K. P. and Chowdhury, M. 2000. Effects of an organophosphate pesticide, qiunalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *Journal of Reproduction & Fertility*. 118: 29-38.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Sathiyaraj, K., Sivaraj, A., Vinoth, K. P., Devi, K. and Kumar, K. B. 2010. Spermicidal activity of *Azdirachta indica* (Neem) aqueous leaf extract on male albino rats. *International Journal of PharmTech Research*. 2(1) : 588-591.

Saxena, R. C. and Khan, Z. R. 1985. Electronically recorded disturbances in feeding behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera : Cicadellidae) on neem oil treated rice plants. *Journal of Economic Entomology*. 78 : 222-226.

Schlorffa, E. C, Husaina, K. and Somani, S.M. 1999. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*. 18(2-3) : 203-214.

Schmutterer, H. and Freres, T. 1990. Influence of neem seed oil on the metamorphosis, color and behavior of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk), and of the african migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *Zeitschhrift fuer Pflanzen krankheiten und Pflanzenschutz*. 97(4) : 431-438.

Shahat, R. A., Gabr, A., Meki, A. R. and Mehama, E. S. 2009. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by carmium in experimental rats and protective effect of simultaneous greentea extract. *International Journal of Morphology*. 27(3) : 757-764.

Sharpe, R. M. and Skakkebaek, N. E. 2003. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (11–12) : 2023–2038.

Shen, H. M., Chia, S.E., Ni, Z. Y., Lee, B. L. and Ong, C. N. 1997. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigrarette smoking. *Reproductive Toxicology*. 11 : 675.

Sikiru, L., Shmaila, H. and Yusuf, G. S. 2009. Erectile dysfunction in older male stroke patients: correlation between side of hemiplegia and erectile function. *African Journal of Reproductive Health*. 13(2) : 49-54.

Singh, M., Kalla, N. R. and Sanyal, S. N. 2006. Effect of monensin on the enzymes of oxidative stress, thiamine pyrophosphatase and DNA integrity in rat testicular cells *in vitro*. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 58 : 203-208.

Sombatsiri, K., Kongkatip, K., Visetson, S., Sankwarapong, A. and Anukoonwata, K. 1995. Neem: Pesticides. *Journal of Navakaset*. 11(11) : 103-104.

Somkuti, S. G., Lapadula, D. M., Chapin, R. E. and Abou-Donia, M. B. 1991. Light and electron microscopic evidence of tri-o-cresyl phosphate (TOCP)-mediated testicular toxicity in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 107: 35– 46.

Srinivasa, J., Maxim, P., Urban, J. and Souza, A. D. 2005. Effects of pesticides on male reproductive functions. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 30(4) : 153-159.

Sujatha, R., Chitra, K. C., Latchoumycandane, C. and Mathur, P. P. 2001. Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats. *Asian Journal of Andrology*. 3 : 135-138.

Thania, R. K. A., Thania, A. S. A, Elbetiehab, A. and Darmani, H. 2003. Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. *Toxicology Letters*. 138(3) : 253-260.

Verma, R. J. and Nair, A. 2001. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian Journal of Andrology*. 3 : 217-221.

Visscher, T. L. and Seidell, J. C. 2001. The public health impact of obesity. *Annual Review of Public Health*. 22 : 355.

Voga, H. J., Heller, W. D. and Borelli, S. 1986. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertility and Sterility*. 45 : 106.

Wah, S., Zhang, J. and Wang, J. 2006. Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats. *Research report Fluoride*. 39(1) : 17-21.

Wanichacheewa, S., Singtripop, T., Sassa, S., Sakamoto, S. and Mori, T. 2001. Decrease in the number of sperm associated with decreased blood testosterone levels in male rats treated with extracts from seven plants consumed by natives of northern Thailand. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10(1-2) : 1-4.

Weber, R. F. A., Pierik, H. F., Dohle, G. R. and Burdorf, A. 2002. Environmental influences on male reproduction. *British Journal of Urology International*. 89 : 143-148.

Yadav, N. and Khandelwal, S. 2008. Effect of picrolivon cadmium induced testicular damage in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 46 : 494-501.

Yakubu, M. T. and Afolayan, A. J. 2009. Reproductive toxicologic evaluations of *Bulbine natalensis* Baker stem extract in albino rats. *Theriogenology*. 72 : 322-332.

Yakubu, M. T., Oladiji, A. T. and Akanji, M. A. 2007. Evaluation of biochemical indices of male rat reproductive function and testicular histology in wistar rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Heirn) stem. *African Journal of Biochemistry Research*. 1(7) : 156-163.

Ye, Y. and Velten, R. F. 2003. Semi-syntheses of new stemofoline derivertives. *Trtrahedron Letters*. 44 : 7171-7173.

Ye, Y., Qin, G. W. and Xu, R. S. 1994. Alkaloids of *Stemona japonica*. *Phytochemistry*. 37(4): 1205-1208.

Yousef, M. I. and El-Demerdash, F. M. 2006. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*. 219 : 133-141.

Zavos, M. P. and Zavos, P. N. 1999. Impact of cigarette smoking on human reproduction: Its effects on male and female fecundity. *Technology*. 6 : 9-16.

Zenick, H., Clegg, E. D., Perreault, S. D., Klinefelter, G. R. and Earl, G. L. 1994. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach: *In*: Hayes, A.W. (Ed.). Principles and Methods of Toxicology. New York: Raven Press, p. 937-988.

Zhou, D. X., Qiu, S. D., Zhang, J., Tian, H and Wang, H. X. 2006. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian Journal of Andrology*. 8 : 584-548.

Zidan, N.A. 2009. Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticide in male rats. *International Journal of Phamacology*. 5(1) : 51-57.

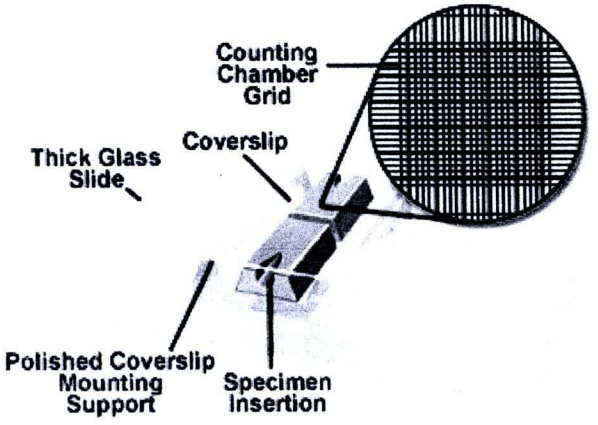
ภาคผนวก

1. วิธีการนับความหนาแน่นของอสุจิ (sperm density)

1.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างอสุจิและอุปกรณ์ในการตรวจนับ

1.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการนับอสุจินั้น จะใช้ hemocytometer ที่ประกอบด้วย counting chamber กระจกปิด และ micropipette โดยบริเวณสไลด์ที่เป็นกระจกหนานั้น (thick glass slide) ที่มีร่องลึกประมาณ 0.1 mm ที่สามารถวางกระจกปิดไว้ด้านบน ซึ่งบริเวณกลาง counting chamber จะมี counting chamber grid ที่มีการนับอสุจิบริเวณนี้

1.1.2 เตรียมตัวอย่างอสุจิที่ทำการตรวจสอบ โดยตัดส่วนของ cauda epididymis มาบดขยี้ใน 10 มล 0.85% ของสารละลาย normal saline หลังจากนั้นดูดสารตัวอย่างที่เตรียมด้วย micropipette ประมาณ 15 µl ใส่บริเวณ specimen insertion (ร่องรูปตัว V) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้ตัวอสุจิหยุดลอยจะทำให้นับได้ง่ายขึ้น แล้วทำการตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

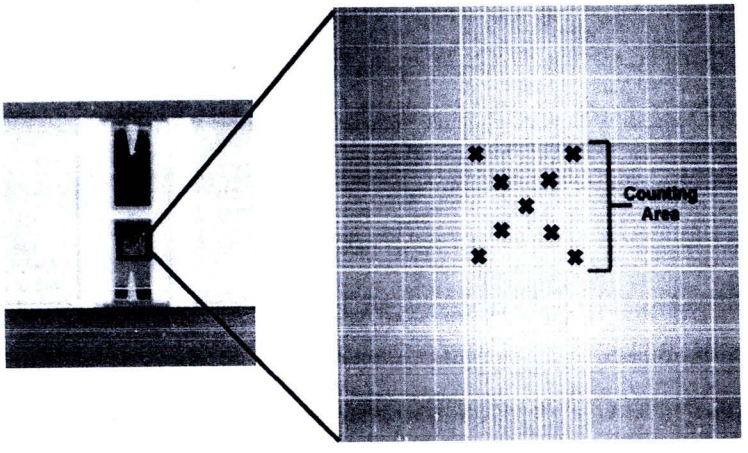


ภาพผนวก 1 แสดงลักษณะของ heamocytometer ที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนอสุจิ (ที่มา: http://www.microscopyu.com/articles/formulas/measurements.jpg, 2010)

1.2 การนับความหนาแน่นของอสุจิ

ในแต่ละด้านของ Neubauer Hemocytometer เมื่อสังเกตดู counting chamber grid ที่กำลังขยายต่ำ จะเห็นว่าประกอบด้วย 25 ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ซึ่งในแต่ละช่องใหญ่นั้นจะประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจำนวน 16 ช่องเล็ก ซึ่งในการนับจำนวนอสุจิใน counting chamber grid จะนับทั้งหมดจำนวน 9 ช่องใหญ่ (ดังภาพภาคผนวก 2) ที่กำลังขยาย 40X โดยนับช่องที่มุมทั้ง 4 ช่อง และนับช่องที่อยู่บริเวณมุมทั้ง 4 ของช่องกลาง และนับช่องกลาง 1 ช่อง รวมทั้งหมด 9 ช่องใหญ่ การนับตัวอสุจิที่อยู่คาบเส้นคู่ จะกำหนดว่าจะนับตัวอสุจิที่อยู่ด้านบนและด้านซ้ายของเส้นคู่ หรือนับตัวอสุจิที่อยู่

ด้านขวาและด้านล่างของเส้นคู่อย่างใดอย่างหนึ่ง เพื่อมิให้นับซ้ำ เมื่อนับจำนวนตัวอสุจิใน 9 ช่อง รวมกันแล้ว นำค่าของจำนวนอสุจิที่นับได้ไปหาค่าเฉลี่ยต่อไป



ภาพผนวก 2 แสดงตำแหน่งที่มีการนับจำนวนอสุจิ (กากบาท) ในบริเวณ counting chamber grid (ที่มา: http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html, 2002)

1.3 วิธีการคำนวณความหนาแน่นของอสุจิ

ปริมาตรของสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก 1 ช่อง = กว้างxยาวxสูง (มีจำนวน 16 ช่อง)

= 1/20 mm.x1/20 mm.x1/10 mm.x16 ช่อง

= 1/250 mm^3

ปริมาตรของสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ทั้งหมด 9 ช่อง เท่ากับ

= 1/250 x 9 ช่อง = 0.036 mm^3

สมมุติจำนวนตัวอสุจินับที่ในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 9 ช่อง คือ N

จำนวนตัวอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง $= \frac{\text{N ตัว/ } mm^3}{0.036}$

ดังนั้น จำนวนตัวอสุจิใน 1 มล. $= \frac{\text{N x 1,000 ตัว/ml}}{0.036}$

ในกรณีที่เจือจางน้ำเชื้อ 1:10

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $= \frac{\text{N x 1,000 x 10 ตัว/ml}}{0.036}$

$= 5N \times 10^6$ ตัว/ml

สมมติจำนวนตัวอสุจินับที่ในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 9 ช่อง คือ 150 ตัว

จำนวนตัวอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 9 ช่อง $= \frac{150 \text{ ตัว/ mm}^3}{0.036}$

ดังนั้น จำนวนตัวอสุจิใน 1 มล. $= \frac{150 \times 1{,}000 \text{ ตัว/ml}}{0.036}$

$= 4.16 \times 10^6$ ตัว/ml

2. การเตรียมสีย้อมและสารแช่ตัวอย่าง

2.1 Eosin (1% Stock Alcoholic Eosin)

- อีโอซินวาย ละลายน้ำได้ (Eosin Y, water soluble) 1 g
- น้ำกลั่น 20 ml

  ละลายสีและน้ำกลั่นให้เข้ากัน แล้วจึงเติม
- Ethanol 95% 80 ml

2.2 สารละลายเวิคกิง (Working Solution)

- สารละลายอีโอซินสต็อก 1 ส่วน
- Ethanol 80% 3 ส่วน

*ก่อนใช้ให้เติม 1-1.5 มล. ของกรดแอซิติกเข้มข้นต่อ 100 มล. ของสีแล้วคนให้เข้ากัน

2.3 Harris's Hematoxylin

- ฮีมาท็อกซิลิน (hematoxylin crystals) 5 g
- Absolute alcohol 50 ml
- แอมโมเนียมหรือโปรแตสเซียมอาลัม 100 g
- น้ำกลั่น 1,000 ml
- เมอคูลิกออนไซด์เรด (Mercuric oxide, red) 2.5 g

2.4 Bouin's Fixative

- Formalin 4% 25 ml

- Bouin's solution 75 ml
- Acetic acid 5 ml

3. ขั้นตอนการทำสไลด์เนื้อเยื่ออัณฑะและต่อมช่วยสืบพันธุ์

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่ออัณฑะและต่อมช่วยสืบพันธุ์

1. ผ่าตัดเก็บเนื้อเยื่ออัณฑะและต่อมช่วยสืบพันธุ์ นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปล้างในน้ำเกลือ (normal saline) ก่อนนำไปแช่ในสารละลาย Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดเปลี่ยนมาแช่ใน 70 % ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากสีของ ethanol 70 % มีสีเหลืองเข้มคล้ายคลึงกับสีของ Bouin's fixative ในขั้นแรก ควรมีการเปลี่ยนสารละลายเพื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย Bouin's fixative ในเนื้อเยื่อ
3. แช่ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดใน ethanol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ในสารละลาย ethanol 80%, ethanol 90% และ absolute alcohol ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
4. ต่อจากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดไปแช่ในสารละลาย absolute alcohol:xylene ที่อัตราส่วน 2:1, 1:1, 1:2 และ xylene บริสุทธิ์ ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
5. นำชิ้นเนื้อมาแช่ในสารละลาย xylene ผสมกับ paraffin ในอัตราส่วน 2:1, 1:1, 1:2 ตามลำดับและ paraffin บริสุทธิ์ จำนวน 3 ซ้ำ โดยแช่ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมงเช่นดียวกัน
6. ฝังชิ้นเนื้อเยื่อใน Paraffin แข็ง รอจนกว่าจะแห้ง และเหลา paraffin แข็งที่ติดกับฐานพลาสติก สำหรับยึดติดกับเครื่อง microtome
7. นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนข้างต้นที่ฝัง paraffin แข็งกับฐานพลาสติกแล้ว มาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร
8. นำตัวอย่างของชิ้นเนื้อเยื่อมาติดบนสไลด์ และนำไปวางบน hot plate เพื่อให้สไลด์เนื้อเยื่อแห้ง และเก็บเพื่อนำไปย้อมสีต่อไป

3.2 การย้อมสีของสไลด์เนื้อเยื่ออัณฑะและต่อมช่วยสืบพันธุ์

1. นำสไลด์ของเนื้อเยื่อมาแช่ใน xylene จำนวน 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที ต่อจากนั้นนำไปแช่ใน Butyl alcohol จำนวน 2 ครั้งครั้งละ 5 นาที

2. ต่อมาแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน 95% ethanol, 85% ethanol และ 70% ethanol ตามลำดับ นาน 5 นาที และนำไปผ่านน้ำประปาแบบไหลผ่านเป็นเวลา 5-10 นาที
3. ย้อมสี hematoxylin ประมาณ 5-6 นาที
4. นำสไลด์เนื้อเยื่อไปจุ่มเร็วใน 1% acid alcohol และนำไปผ่านน้ำประปาแบบไหลผ่าน ประมาณ 5-10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน ethanol 70% นาน 5 นาทีและย้อมด้วยสี eosin 3-5 นาที
5. นำสไลด์เนื้อเยื่อไปผ่านอย่างรวดเร็วใน ethanol 70%, 80%, 90% และ Butyl alcohol (2 ซ้ำ) ตามลำดับ เพื่อดึงน้ำออก
6. แช่สไลด์ใน xylene จำนวน 2 ซ้ำซ้ำละ 5 นาทีและ mount ด้วย permount
7. นำสไลด์ที่ผ่านการ mount เรียบร้อยแล้วมาวางบน hot plate และรอจนกระทั่งสไลด์แห้งสนิท
8. นำไปตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อต่อไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4. วิธีการคำนวนความเข้มข้นของสารสกัดจากหนอนตายหยาก

ตัวอย่าง การเตรียมสารสกัดจากหนอนตายหยากขนาด 300 และ 500 mg/kg BW

หนูทดลองน้ำหนักตัว 1,000 กรัม ต้องได้รับสารสกัด 300 mg/kg BW

หนูทดลองน้ำหนักตัว 150 กรัม ต้องได้รับสารสกัด $\frac{300 \times 150}{1,000} = 45$ mg

และในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 mg/kg BW ใช้วิธีในการคำนวณเดียวกัน เมื่อชั่งสารสกัดได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้ว เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml เพื่อใช้ป้อนหนู 1 ตัว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาว จิตติกานต์ อินต๊ะโมงค์

วัน เดือน ปีเกิด 13 เมษายน 2530

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน ปีการศึกษา 2547

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2551

Supported paper

คุณภาพอสุจิหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดด้วยเอทธานอลจากหนอนตายหยาก *Stemona aphylla* Craib.

Sperm Quality of Male Rats Treated with Ethanolic Extract of *Stemona aphylla* Craib.

จิตติกานต์ อินต๊ะโมงค์, กนกพร แสนเพชร, สุภาพ แสนเพชร

Jittikan Intamong, Kanokporn Seanphet, Supap Seanphet

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอ เมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail address: kangaro_o@hotmail.com

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทคัดย่อ

จากการตรวจสอบผลของสารสกัดด้วยเอทธานอลจากรากของ *Stemona aphylla* ต่อคุณภาพของอสุจิในหนูขาวเพศผู้ โดยแบ่งกลุ่มหนูทดลองแบบสุ่มออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้รับสารสกัดด้วยเอทธานอลจากรากของ *S. aphylla* ที่ขนาด 300 และ 500 mg/kg BW ตามลำดับเป็นระยะเวลา 45 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หลังจากฆ่าสัตว์ทดลองทำการผ่าตัดแยกส่วนของ cauda epididymis เพื่อเก็บตัวอย่างอสุจิเพื่อนำไปทดสอบคุณภาพของอสุจิ พบว่าสารสกัดที่ขนาด 500 mg/kg BW มีผลต่อการเคลื่อนที่และความผิดปกติของรูปร่างอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ในขณะที่ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของอสุจิ จากการตรวจพบครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้สารสกัดด้วยเอทธานอลจากรากของ *S. aphylla* ที่ความเข้มข้นสูงมีผลไปเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของอสุจิ

คำสำคัญ คุณภาพของอสุจิ, หนูขาวเพศผู้, สารสกัดด้วยเอทธานอล, *Stemona aphylla*

Abstract

The effects of the ethanolic root extract of *Stemona aphylla* Craib. on sperm quality of male albino rats were investigated. The rats were randomly divided into 3 groups of eight rats each. Group I served as control, while rats in groups II and III were administered 300 and 500 mg/kg BW of the ethanolic extract of *S. aphylla*, respectively, for 45 days. At the end of the treatment periods, the rats were sacrificed and the cauda epididymis was dissected and sperm were collected for sperm quality assay. The motility and abnormalities of the sperm in the 500 mg/kg BW-treated rats were significant differences ($p<0.05$) from the controls, whereas the extracts had no effect on sperm concentration. These findings indicate that the use of the ethanolic extract of *S. aphylla* at the higher dose can significantly alter the motility and abnormalities of the sperm but not the sperm concentration.

Keywords Sperm Quality, Male Rats, Ethanolic Extract, *Stemona aphylla*

1. Introduction

At the present time, one of the social problems regarding world health is the environmental pollution especially agriculture problems. People have become concerned about pesticide residuals on food crops due to the usage of synthetic pesticides[1]. Recently, herbal extracts that are not harmful to the environment, have been shown to be effective insecticidal properties and natural preservatives[2-4]. Several plant species that have been used as herbicide such as *Azadirachta indica*[5], *Nicotiana tabacum*[6], *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae)[7] including *Stemona spp.*[8]. About 8 *Stemona* species have been reported in Thailand, including *Stemona burkillii* Prain., *S. collinsae* Craib., *S. curtisii* Hook. F., *S. tuberosa* Lour., *S. hutunguriana* Nov., *S. phyllantha* Gangeb., *S. beerii* Craib. and *S. aphylla* Craib[9]. *S. aphylla* Craib. belongs to Family *Stemonaceae*, is known locally as "Non tay yak" in Thailand[10]. It is distributed mainly in tropical

Asia[11]. The major bioactive phytochemicals found in roots extracts are *Stemona* alkaloids and isoflavonoid active ingredient substances[12]. Some of alkaloids have been shown to have significant antitussives activity in guinea pig after cough induction as well as insect toxicity, antifeedant and repellent activities[13-15]. Moreover, *Stemona* sp. have been used in traditional medicine in China, Japan and Southeast Asia to treat the symptoms of bronchitis, pertussis and tuberculosis. In addition, the anti-parasitics on humans and animals[16] and also insecticide[17] have been documented. Furthermore, Janyapeth (1995)[18] reported that *Stemona* sp. extracts at concentration of up to 17 ppm can be killed small golden apple snails. According to the above properties, the roots of several *Stemona* species are widely used as insecticides and for medicinal purposes. However, the effects of ethanolic extract of *S. aphylla* in traditional medicine are not scientifically supported and have little reports on its effects on sperm quality. Therefore, the focus of the present investigation was to determine the effects of ethanolic extract of *S. aphylla* on male Wistar rat through analysis of the sperm concentration, sperm motility and morphology.

2. Objective

To evaluate the effects of the ethanolic extract of *S. aphylla* Craib. on sperm quality of male rats.

3. Materials and methods

3.1 Preparation of the *S. aphylla* extract

The sample of *S. aphylla* root were purchased from Lumpang province, Thailand and authenticated by Mr. James F. Maxwell, a botanist of Department of Biology, Chiang Mai University (CMU). A voucher specimen was deposited at CMU herbarium under a voucher number 09-111. The root was chopped and dried in an oven at 50°C for constantly dried weight. The ground roots were extracted with 95% ethanol in the ratio of 1:1 (w/v) for 3 days and then filtered through the filter paper (Whatman No. 1). The filtrate obtained was then evaporated with vacuum rotary evaporator at 50°C. The solid extract (7.92 % yield) was dissolved in distilled water to make up to 36 and 60 mg/ml for further study.

3.2 Experimental animals

Adult male Wistar rats were purchased from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya campus, Thailand. The rats were 6 weeks old, weighing 140±10 g. They were acclimated for one week prior to the start of the experiments. The rats were housed in metal cages in a room with controlled temperature of 24±1°C with 12 hours dark/light cycle at the Animal Facility Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University. They had access to food and water ad libitum. The study was conducted in accordance with the recommendations from the declaration of the Institutional Animal Care and Use Committee of Biology Department, Faculty of Sciences, Chiang Mai University.

The rats were randomly divided into 3 groups (n=8). The control group was force fed with distilled water. The treatment groups were administered with 300 mg/kg BW and 500 mg/kg BW of *S. aphylla* root extracts, respectively (equivalent to 36 and 60 mg/ml). The selected doses in this study were based on the doses used in chronic toxicity test of this plant which have been reported in previous study[19]. The volume of each gavage was 1 ml and the procedure was repeated daily between 7.00-8.00 am for 45 consecutive days. Body weight was recorded before the beginning of treatment, at weekly intervals and at the end of treatment. At the completion of treatment, the rats were sacrificed using ether after the overnight fasting and collection of the sperm samples were then aseptically conducted.

3.3 Sample collection

Right epididymis was exposed by scrotal incision and sperm were released out by cutting the distal end of the cauda epididymidal tubule. The cauda epididymis was, then, minced in 10 ml of normal saline to determine sperm parameters.

3.4 Sperm motility and concentration

One drop of a suspending sample was placed on a glass slide and the motility of 200 spermatozoa per rat

was observed under a light microscope. The percentage of sperm motility was reported as percentage of progressively motile, non-progressively motile and immotile sperm as previously described[20]. For sperm concentration assay, the sperm mixtures were transferred into hemocytometer chamber and sperm heads was manually counted under a light microscope. The data were expressed as the $x10^6$ spematozoa per ml[21].

3.5 Sperm morphology

To determine the sperm morphology, sperm suspension was smeared on a glass slide and dried overnight at room temperature. The slide was fixed in 4% formalin, stained with Aniline Blue (pH 3.5) and Eosin[22], and then examined under the light microscope at 40X magnification. A total of 200 spermatozoa from each rat were morphologically examined. The number of sperm abnormalities including sperm with head defect alone, sperm with tail defect only and sperm with both head and tail defects were individually recorded under a blind method.

3.6 Statistical analysis

All parameters were expressed as means±S.D. The data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the level of significance between control and treatment. Further comparison between groups was performed using Least Significant Difference (LSD) and Turkey HSD test. All differences were considered significant at 5% level, which is $p<0.05$.

4. Results

4.1 Sperm Concentration

The obtained results in this study are illustrated in tables 1. There was no significant difference in sperm concentration between the groups.

Table 1 Effects ethanolic root extracts of *S. aphylla* on sperm concentration.

Group	sperm concentration ($x10^6$ cell/ml)
control	91.17±17.4
300 mg/kg BW of *S. aphylla* extract	71.75±22.4
500 mg/kg BW of *S. aphylla* extract	66.5±29.2

4.2 Sperm motility

The numbers of progressive motile spermatozoa in rats treated with ethanolic extract of *S. aphylla* were gradually decreased in treated groups. Particularly, it was found that the numbers of progressive motile spermatozoa in 500 mg/kg BW-treated rats was significantly lowered ($p<0.05$) as compared to the control and the 300 mg/kg BW-treated rats. On the contrary, a number of immotile sperm were significantly higher ($p<0.05$) in rats exposed to the ethanolic extrats of *S. aphylla* than that of the controls. Whereas a number of non progressive motile spermatozoa were somewhat higher in the controls than those of the treated groups, however, there were not significantly different (Fig. 1).

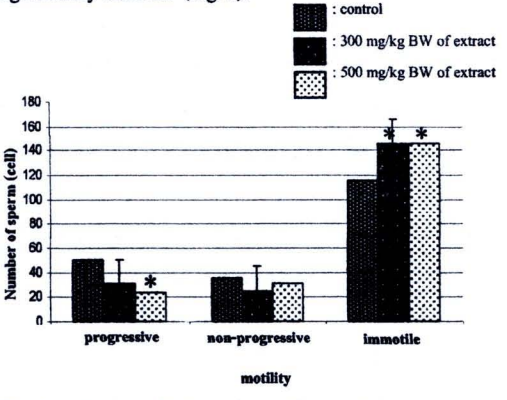


Fig. 1 Number of progressive motile sperm, non progressive motile sperm and immotile sperm of control and treatment groups.

There was no significant difference in the number of progressive motile sperm between the control and the 300 mg/kg BW-treated rats. However, the number of progressive motile sperm in 500 mg/kg BW-treated rats was significantly less ($p<0.05$) compared to the control and the lower dose groups. On the other hand, the percentage of non-progressive motility was gradually increased in the experiment groups in which that of 500 mg/kg BW-treated rats was significantly higher ($p<0.05$) compared to the control and the 300 mg/kg BW-treated rats (Fig. 2).

4.3 Sperm morphology

The extracts of *S. aphylla* detrimentally affected the sperm morphology in all treated groups. The total sperm abnormality counts showed that there was a high level of abnormality in the sperm of rats exposed to the extracts as compared to the controls. The numbers of spermatozoa with tail defects were significant higher ($p<0.05$) in rats exposed to the extracts than those of the controls. But the sperms with both of head and tail defects in rats exposed to the extracts had significantly lower ($p<0.05$) than that of the controls. Additionally, although the sperm with head defects were higher observed in the treated groups than that of the controls, there was not significant difference (Fig 3).

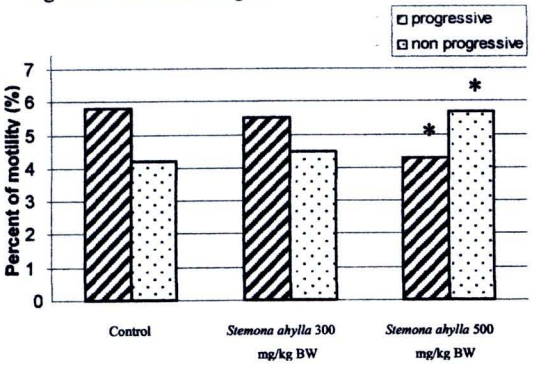


Fig. 2 Percentage of progressive motile sperm and non progressive motile sperm observed in the control and tested groups.

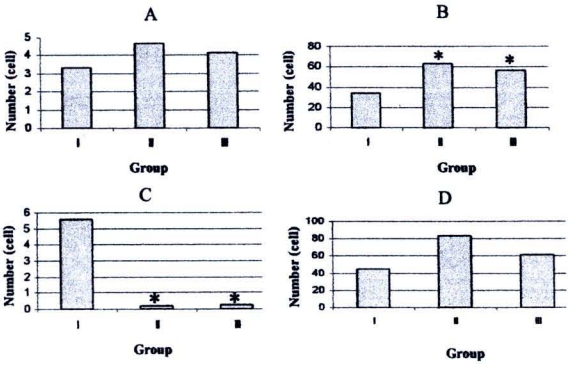


Fig. 3 The number of morphological change of sperm of rats after administered with aqueous extract of *S. aphylla*: (A) Abnormal sperms heads; (B) Abnormal sperms tails; (C) Abnormal sperms both of tails and heads; (D) Total number of sperm morphology. (Group I: control groups; Group II: 300 mg/kg BW; Group III: 500 mg/kg BW)

The normal rat sperm has long and hook-like head. The tail contains a long axial filament and without cytoplasm (Fig. 4A). The abnormality of sperm heads observed was a pin-head (Fig. 4B). Abnormal sperm tails were dag-like defect (broken mid-piece) (Fig. 4C), bent tail (Fig. 4D), fold mid-piece (Fig. 4E). Abnormal sperms both of tails and heads were observed such as reduced hook, club-shaped head and broken mid-piece (Fig. 4F).

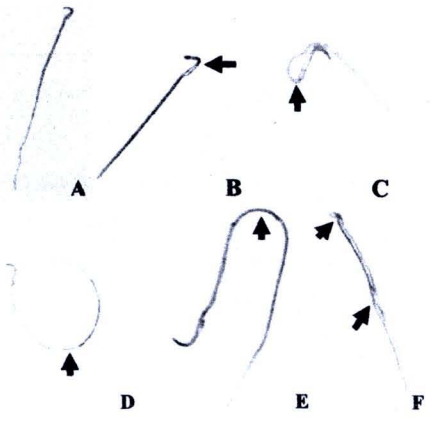


Fig. 4 The morphology of normal and abnormal sperm. (A) Normal sperm morphology. Head abnormalities: (B), pin-head. Tail abnormalities: (C), dag-like defect (broken mid-piece); (D), bent tail; (E), fold mid-piece; (F), club-shaped head, reduce hook and broken mid-piece. (Arrows indicate location of abnormalities sperm.)

5. Discussion

The concentration, motility and morphology were used to assess the effect of oral administration of ethanolic root extract of *S. ahylla* on male reproductive system by using the Wistar rats as animal model. These spermatogenic parameters have been reported as the indices of male fertility [23-25]. In this study, the sperm concentration in the treated groups was not significantly difference as compared to the control groups. It was suggested that *S. aphylla* extract may not reduce or inhibit the processes of spermatogenesis.

It has been well known that decrease blood testosterone level reflected the abnormal spermatogenesis [26-27]. Even though the blood serum testosterones were not determined in this study, it is rationale to assume that no change in sperm concentration may also no effect to the altered testosterone production in testes.

One of the most important predictors of fertility is sperm motility. The progressive sperm motility was decreased in the treated rats when compared with the controls. This may be due to lack or reduce in Adenosine triphosphate (ATP), the major energy source for motile spermatozoa. It is released by the breakdown of fructose secreted by the seminal vesicle. Reduced ATP levels or/and ATP production through ATPase hydrolysis results in inadequate energy and subsequently poor sperm motility [28]. In addition, Sperm motility depends on the synchronized propagation of flagella wave under acetylcholinesterase control [29]. Sperm acetylcholinesterase activity was negatively related to the development of sperm motility during sperm maturation and with sperm abnormality [30]. Thus, it is possible that the reduction in sperm motility in this study may be due to the alteration of the seminal vesicle functions, epididymal sperm maturation [31], and sperm acetylcholinesterase activity by the extract.

Alteration of sperm morphology caused by *S. aphylla* in this study was observed in treated rats. Tail abnormality of sperm was the highest defects when compared with the other defect criteria. Such these sperm with tail abnormalities are usually immotile and consequently unable to fertilize mature ovum [32]. Head abnormality could be due to the aberration in the process of spermatogenesis from damaged seminiferous tubules [33-35]. Previous studies explained that abnormal sperm morphology combined with elevated Reactive Oxygen Species (ROS) production may serve as a useful indicator of potential damage to sperm DNA [36]. The sperm abnormalities and the low sperm concentration observed in rats administered with *S. aphylla* extract may lead to oxidative damage due to Free-Radical (FR) and ROS generation [37]. The pro-oxidants like alkaloids contained in this extract [11] may be responsible for its reprotoxic effect. This substance may also have direct effect on sexual gland and sperm beside its pro-oxidant effects. It is presumed that alkaloids could be bioactive to release metabolites that can bind to cell molecules and cross-link DNA, eventually cause cytotoxicity [38-39].

In conclusion, the overall result shows that the exposure of the rats to the ethanolic extracts of *S. ahylla* at the dose of 300 mg/kg BW affect only sperm morphology while exposure of rat to this extract at the dose of 500 mg/kg BW for 45 days is toxic to rat's reproduction, resulting in decrease sperm motility and increase sperm abnormality. However, to clarify the precise mechanisms of this plant on male reproductive system, the histological examination and biochemical action of ethanolic extracts of *S. aphylla* should be further investigated.

6. Acknowledgments

The authors are grateful to all laboratory staff of the Medicinal plant and reproductive research unit, Chiang Mai University especially Mr. Suluck Wutteerapol for technical assistance.

7. References

[1] Addor, R.W. 1995. *Insecticides*. In: C.R.A. Godfrey (ed.), Agrochemicals from Natural Products. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

[2] Grafius, E., and Hayden, J. 1988. Insecticide and *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae), in celery and observations on parasitism. *Great Lakes Entomol.* 21: 49-54.

[3] Hafzolu, H. 1984. *Orman Yan rnleri Kimyas*. Ve Teknolojisi Ders Notlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi, Trabzon.

[4] Sen, S. 2001. *Determination of Effetcs of Some Plant Phenols on Wood Protection*. PhD thesis, Universitiy of Karaelmas, Institute of Science, Zonguldak, Turkey.

[5] Boeke, J.S., Boersma, M.G., Gerrit, M.A., Joop, J.A., Arnold, V.H., Marcel, D., and Ivonne, M.C.M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*. 94 : 25–41.

[6] Idoko, J.E., and Adebayo, R.A. 2011. Efficacy of Single and Combined Leaf Powder of *Nicotiana Tabacum* L. [Solanales: Solanaceae] with Reduced Rates of Pirimiphos-Methyl in Management of *Sitophilus Zeamais* Motschulsky [Coleoptera: Curculionidae]. *Journal of Agricultural Science*. 3 (1) : 276-280.

[7] Murray, B.I. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents Inmodern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*. 51: 45–66.

[8] Chun, P.T., Chen, T., Velten, R., Jeschke, P., Kintscher, U.E., Geibel, S., and Ye, Y. 2008. Alkaloids from Stems and Leaves of *Stemona japonica* and Their Insecticidal Activities. *Journal of Natural Products*. 71 : 112–116.

[9] Mungkornasawakul, P., Chaiyong, S., Sastraruji T., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C., Pyne, G. S., Ung, A.T., Korth, J., and Lie, W. 2009. Alkaloids from the Roots of *Stemona aphylla*. *Journal of Natural Products*. 72 : 848–851.

[10] Mungkornasawakul, P., Pyne, S.G., Ung, A., Jatisatienr, A., and Willis, A. 2009. Stemofoline ethyl acetate solvate. *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports*. 65 : O1878-U3157.

[11] Mungkornasawakul, P., Chaiyong, S., Sastraruji T., Jatisatienr, A., Jatisatienr, C., Pyne, G.S., Ung, A.T., Korth, J., and Lie, W. 2009. Alkaloids from the Roots of *Stemona aphylla*. *Journal of Natural Products*. 72 : 848–851.

[12] Sompeng, W., Pimsamarn, S., and Aromdee, C. 2009. Insecticidal Activity of *Stemona tuberose* Lour Extract. *Khon Kaen University Research Journal*. 14 (2) : 112-122.

[13] Zenick, H., Clegg, E.D., Perreault, S.D., Klinefelter, G.R., and Gray, L.E. 1994. *Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach*. In: HAYES AW (Ed), Principles and Methods of Toxicology, New York, Raven Press.

[14] Chinoy, N.J., and Padman, P. 1996. Anti-fertility investigation on the benzene extract of *Carica papaya* seeds in male albino rats. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 19 (2): 422-426.

[15] Arash, K., Fatemeh, F., Mohammad, N., Amir, A.K., Chelar, C.O., Marefat, G., and Mohammad, H. 2009. The effects of Ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 7 (1) : 7-12.

[16] Pilli, R.A., Rosso, G.B., and Oliveira, M.C.F. 2005. The Stemona alkaloids, The Alkaloids, (Editor G. A. Cordell). *Elsevier, Amsterdam*. 62 (2): 77-173.

[17] Akanitapichat, P., Tongngok, P., Wangmaneerat, A., and Sripanidkulchai, B. 2005. Antiviral and Anticancer Activities of *Stemona collinsae*. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 29 (3-4) : 125-136.

[18] Janyapeth, C., and Archawakom, T. 1995. *Biology of the alien apple snails*. In Thai Ministry of Agriculture and Cooperatives,ed. Conference Report on the Alien Apple Snail. Pailin Hotel, Phitsanulok. 1 : 11-15.

[19] Sang-arun K. 2000. Effects of the root of *Stemono kerrii* Craib. Extract on weight of testes and liver in *Rattus norvegicus*.

[20] World Health Organization (WHO). 1999. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge university press.

[21] Momeni, R.H., Mehranjani, M.S., Mohammad, A.H., and Mahmoodi, M. 2009. Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylphenol. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 7 (3) : 111-116.

[22] Wong, A., Chuan, S.S., Patton, C.W., Jacobson D.J., Corselli, J., and Chan, J.P. 2008. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. *Fertility and Sterility*. 90 (5) : 1999-2002.

[23] Garner, D.L., and Hafez, E.S.E. 1993. *Spermatozoa and seminal plasma*. In Hafez ESE (eds.) \Reproduction in Farm animals (6th ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

[24] Small, D.R., Collins, J.A., Wilson, E.H., and Wrixon, W. 1987. Interpretation of semen analysis among infertile couples. *Canadian Medical Association Journal*. 136 (8) : 829-833.

[25] Smith, K.D., Rodriguez-Rigau, L.J., and Steinberger, E. 1977. Relationship between Indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertility and Sterility*. 28 (12) :1314-1319.

[26] Orth, J.M. 1993. *Cell and Molecular biology of the testis* (eds. Desjardins,C, Ewing). University Press, New York.

[27] Lee, P.A., Coughlin, M.T., and Bellinger, M.F. 2001. Inhibin B: Comparison with Indexes of Fertility among Formerly Cryptorchid and control men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 86 (6) : 2576-2584.

[28] Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S., and Greger, H. 2002. Feeding deterrence and contact toxicity of Stemona alkaloid-source of potent natural insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 : 6383-6388.

[29] Nelson, L. 1972. Quantitative evaluation of sperm motility control mechanisms. *Biology of Reproduction*. 6 : 319–324.

[30] Egbunike, G.N. 1980. Changes in acetylcholinesterase activity of mammalian spermatozoa during maturation. *International Journal of Andrology*. 3 (4) : 459-468.