

วิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับสัตว์ทดลอง

- 1.1. Animal food (C.P. Mice Food)
- 1.2. เครื่องมือผ่าตัดที่ประกอบด้วย กรรไกรปลายมน 1 อัน
กรรไกรปลายโค้ง 1 อัน
Tooth forceps 2 อัน
non- Tooth forceps 1 อัน
- 1.3. เครื่องชั่งน้ำหนักหนู
- 1.4. กล้องจุลทรรศน์ (Model CHS Olympus optical Co.,LTD. Japan)
- 1.5. เครื่อง water bath (HAAKE , W.GERMANY)
- 1.6. watch glass
- 1.7. Haemocytometer (Reichert-Jung ,Hausser Scientific,USA)
- 1.8. Denominator (Denominator Company, INC USA)

2. สารเคมี

- 2.1. Baker 's solution (ประกอบด้วย Glucose, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl)
- 2.2. 1 % formalin
- 2.3. 50% เมทิลพาราไรออน (เจียไต๋สังเสริมเกษตรกรรม)

3. วิธีการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

1. นำหนูขาวเล็กเพศผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ น้ำหนัก30-40 กรัม อายุ 8-10 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มโดยก่อนทำการทดลองให้หนูอดอาหารก่อนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 1. เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน (กลุ่มควบคุม) โดยให้น้ำปริมาณ 0.5ml. ทางปากเป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน
กลุ่มที่2. เป็นกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนทางปาก ในขนาด 1 mg./kg. ของน้ำหนักหนูเป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน

กลุ่มที่3. เป็นกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนทางปาก ในขนาด 2 mg./kg. ของน้ำหนักหนูเป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน

กลุ่มที่4. เป็นกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนทางปาก ในขนาด 4 mg./kg. ของน้ำหนักหนูเป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน

การทดลองนี้จะทำการตรวจดูผลหลังให้เมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 1,3,5,7,9 สัปดาห์เพื่อศึกษาผลของเมทิลพาราไรออนต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ของหนูถีบจักรในระยะต่างๆต่อไปนี้

ถ้าหนูได้รับเมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากหนูที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน แสดงว่าเมทิลพาราไรออนมีผลต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ(spermatogenesis)ในระยะที่เป็น spermatozoa

ถ้าหนูได้รับเมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 3 สัปดาห์ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากหนูที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน แสดงว่าเมทิลพาราไรออนมีผลต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ในระยะที่เป็น spermatid

ถ้าหนูได้รับเมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 5 สัปดาห์ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากหนูที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน แสดงว่าเมทิลพาราไรออนมีผลต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ในระยะที่เป็น spermatocyte

ถ้าหนูได้รับเมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 7 สัปดาห์ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากหนูที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน แสดงว่าเมทิลพาราไรออนมีผลต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ในระยะที่เป็น spermatogonium

ถ้าหนูได้รับเมทิลพาราไรออนไปแล้วเป็นเวลา 9 สัปดาห์ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากหนูที่ไม่ได้รับเมทิลพาราไรออน แสดงว่าเมทิลพาราไรออนมีผลต่อกระบวนการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis)ในระยะที่เป็น spermatogonium

วิธีตรวจคุณภาพของเชื้ออสุจิ

หลังให้เมทิลพาราไรออนและนำหนูมาเลี้ยงต่ออีก 1,3,5,7,9 สัปดาห์ตามลำดับ นำหนูที่ได้รับเมทิลพาราไรออนและกลุ่มควบคุมมากลุ่มละ 5 ตัวทำการ sacrifice จากนั้นทำการผ่าตัดเปิดช่องเชิงกรานเอาส่วน caudal epididymisมา 1 ข้าง ใส่ใน water glassซึ่งมี baker's solution 1 ml นำไปอุ่นบนเครื่อง water bath ให้มีอุณหภูมิ 37 ° c ตัด epididymisให้เป็นชิ้นเล็กๆเพื่อให้เชื้ออสุจิสามารถว่ายออกมาสู่ภายนอกได้ทั้งหมดตั้งทิ้งไว้ใน water bath 15 นาที จากนั้นทำการทดลอง 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 สำหรับหาค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิ

หยดสารละลาย baker's solution ที่มีเชื้ออสุจิผสมอยู่ 2 หยด ลงบน Hemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนเชื้ออสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าและจำนวนเชื้ออสุจิทั้งหมดจากตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิ

$$\% \text{ motility} = (P \times 100) / T$$

P = จำนวนเชื้ออสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยจากสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง

T = จำนวนเชื้ออสุจิทั้งหมดที่นับได้เฉลี่ยจากสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง

ส่วนที่ 2. สำหรับหาจำนวนเชื้ออสุจิต่อมิลลิลิตรต่อ cauda epididymis 1 ข้าง

หยด 1% formalin ลงในสารละลาย baker's solution วางทิ้งไว้ 15 นาที หยดสารละลาย baker's solution ที่มีเชื้ออสุจิผสมอยู่ 2 หยด ลงบน Hemocytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนเชื้ออสุจิทั้งหมดจากตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนเชื้ออสุจิต่อมิลลิลิตรต่อ cauda epididymis 1 ข้าง

$$\text{จำนวนอสุจิ} = N \times (1 / 0.02) \times 1000$$

N = จำนวนเชื้ออสุจิที่นับได้รวมทั้งหมดจากตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง

สถิติที่ใช้

1. ทดสอบความแตกต่างของจำนวนเชื้ออสุจิและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเชื้ออสุจิระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ CLA ANOVA Analysis of Variance Program for The Apple^R MacintoshTM โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E.

2. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักของ vas deferens, testes โดยใช้ ANOVA Analysis of Variance โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E.