


ผลของเมทิลพาราไทออกนต่อระบบสืบพันธุ์กบนาเพศผู้ *Rana rugulosa*



นางสาวอัจฉริยา ไชยรัตน์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1044-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF METHYLPARATHION ON REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE FROGS

Rana rugulosa



Miss. ARTCHARIYA CHAIYARAT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-1044-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของเมทิลพาราไทออนต่อระบบสืบพันธุ์กบนาเพศผู้
 Rana rugulosa
โดย นางสาวอัจฉริยา ไชยรัตน์
สาขาวิชา สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตั้งประพจน์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตั้งประพจน์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวรรณ นุตประพันธ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทธี สิงห์อาษา)

อัจฉริยา ไชยรัตน์ : ผลของเมทิลพาราไทออนต่อระบบสืบพันธุ์กบนาเพศผู้ *Rana rugulosa* (EFFECTS OF METHYLPARATHION ON REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE FROGS *Rana rugulosa*), อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ประคอง ตั้งประพุกฤทธิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ผุสดี ปริยานนท์, หน้า, ISBN

การศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาและต่อเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์กบนาเพศผู้ *Rana rugulosa* อายุ 2,4,6,8,10 และ 12 เดือน โดยใช้เมทิลพาราไทออนที่ความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน แล้วเก็บตัวอย่างเลือดของกบนาเพื่อนำไปปั่นเพื่อเอาพลาสมาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะของกบนาโดยตัดออกมาทั้งสองข้าง แล้วแช่ลงใน Bouin's solution ทันที เพื่อนำไปศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อต่อไป ผลการศึกษาพบว่าเมทิลพาราไทออนมีผลทำให้ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมยกเว้นในกบนาเพศผู้อายุ 2 เดือน โดยพบว่าในกบนาอายุ 4, 6, 8, 10, และ 12 เดือนมีปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลง 15.94%, 17.68%, 29.05%, 19.18% และ 27.12% ตามลำดับ จากการศึกษาเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์พบว่า เมทิลพาราไทออนมีผลทำลายเซลล์ลัยดิกโดยตรง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่มี การรวมกลุ่มของโครมาตินรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส นิวเคลียสอัดกันแน่นเป็นก้อนติดสีที่บอญู่กลางเซลล์ มีการบวมของเซลล์ มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสฉีกขาดและเกิดการสลายตัวของนิวเคลียสและมีการทำลายของเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัส ผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าผลของเมทิลพาราไทออนนี้ทำให้ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้ลดลง เกิดจากการที่เมทิลพาราไทออนทำลายลัยดิกส์เซลล์โดยตรง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชาสัตววิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2543.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072463923 MAJOR : ZOOLOGY

KEY WORD: METHYLPARATHION / TESTOSTERONE / *Rana rugulosa*

ARTCHARIYA CHAIYARAT: EFFECTS OF METHYLPARATHION OF REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE

FROGS *Rana rugulosa*. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. PRAKONG TANGPRAPRUTGUL, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR: ASSIS.PROF. PUTSATEE PARIYANONTH, PP. ISBN

The effects of methylparathion (MPT) on reproductive system of the male frog *Rana rugulosa* were investigated. Male frog ages of 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months old were exposed to 20 ppm of MPT for 60 days. At the end of the experiment, animals were autopsied. Plasma samples were collected and kept at -20°C until testosterone (T) radioimmunoassay. Testes were fixed in Bouin's solution for histological study. MPT significantly lowered plasma T levels of the frog at all ages examined except of the frog at the age of 2 months. Plasma T levels decreased 15.94% in 4 month old, 17.68% in 6 month old, 29.05% in 8 month olds, 19.18 % in 10 month old and 27.12% in 12 month old frogs. Microscopic studied showed that MPT directly injured leydig cell and effected on cell structure. The histological alliation of Leydig cell composed of hydropic swelling, pyknotic nucleus, perinuclear chromatin clumping nucleus, karyolysis, nuclear membrane disruption and vacuolated of interstitial tissue and it is concluded that the effect of MPT on lowering of T levels may exert directly on the Leydig cells.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DepartmentBiology..... Student's signature.....

Field of study.... Zoology..... Advisor's signature.....

Academic year.....2000..... Co - Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้สำเร็จลงโดยความกรุณาของรองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตั้งประพทสิทธิ์ กุล อาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษา การทดลอง จัดหาสัตว์ทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเรียบร้อย จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และขอบพระคุณที่อาจารย์ได้กรุณาให้คำแนะนำและปรึกษาในการศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนกรุณาตรวจแก้ไขในรายละเอียดจนสำเร็จเรียบร้อย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทนี สิงห์อาษา และคณาจารย์ประจำภาควิชาทุกท่าน ที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนในการลาศึกษาต่อในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความเอื้อเฟื้อเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ตลอดจนให้กำลังใจในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทนี สิงห์อาษาและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรวรรณ นุตประพันธ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณโครงการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงกบ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทรายอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา ที่กรุณาให้ใช้สถานที่ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่บริเวณอ่างเลี้ยงกบของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกคนของภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความร่วมมือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณบิดา มารดาเป็นอย่างสูงที่ได้สนับสนุนและให้กำลังใจตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1-4
2 สืบสวนเอกสาร.....	5-25
3 วัสดุ อุปกรณ์และการทดลอง.....	26-37
4 ผลการทดลอง.....	38-67
5 อภิปรายผลการทดลอง.....	68-73
6 สรุปผล.....	74
รายการอ้างอิง.....	75-81
ประวัติผู้เขียน.....	82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงค่าความคงตัวครึ่งชีวิต (half life) ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในน้ำกร่อย..... 12
2	แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานเทสโทสเดอโรน..... 31
3	แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่างๆเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเดอโรน.....32
4	แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเดอโรนและสารอื่นๆที่นำมาตรวจสอบ.....34
5	แสดงปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเดอโรนเฉลี่ย ($\bar{X} \pm SEM$) ของกบนาเพศผู้ <i>R. rugulosa</i> ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน..... 41
6	แสดงค่าน้ำหนักอวัยวะเฉลี่ย ($\bar{X} \pm SEM$) และค่า GSI% ของกบนา <i>R. rugulosa</i> เพศผู้ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน 41
9	ตารางเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ ลัยดิกส์เซลล์และขนาดของท่อเซมินิเฟอร์รัสในกบนาเพศผู้ <i>R. rugulosa</i> อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนานเป็นเวลา 60 วัน 48
10	ตารางเปรียบเทียบลักษณะต่างๆการเปลี่ยนแปลงลัยดิกส์เซลล์ในกบนาเพศผู้ <i>R. rugulosa</i> อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือนที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนานเป็นเวลา 60 วัน 49

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แผนผังแสดงการกระตุ้นฤทธิ์ (activation) ของเมทิลพาราไทออนให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ Acetylcholinesterase ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.....	10
2	แผนภูมิแสดงผลของเมทิลพาราไทออนต่อไลปิดเมตาบอลิซึม.....	15
3	แสดงวงจรชีวิตของกบนา.....	21
4	ก. แสดงระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ของกบเพศผู้.....	22
4	ข. ตัวอสุจิของกบนา.....	22
5	กราฟแสดงปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยของกบนาเพศผู้อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน.....	42
6	กราฟแสดงค่า GSI% ของกบนาเพศผู้อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน	43
7	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	50
8	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน.....	51
9	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	52
10	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	53
11	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน.....	54

12	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	55
13	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	56
14	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน.....	57
15	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	58
16	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	59
17	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน.....	60
18	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	61
19	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	62
20	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน.....	63
21	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	64
22	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules ของกบนาเพศผู้อายุ 14 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน.....	65

23	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 14 เดือน.....	66
24	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 14 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน.....	67



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ถูกนำมาใช้ในการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมในประเทศนับเป็นปัญหาใหญ่ของสิ่งแวดล้อมที่นับวันจะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้นหากมิได้มีการแก้ไข ปัญหาที่กล่าวถึงนี้ครอบคลุมถึงปัญหาอันอาจเกิดขึ้นมาจากพิษเฉียบพลัน และพิษเรื้อรัง ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากได้รับสารเป็นระยะเวลายาวนาน นอกจากนี้ปัญหาของสารตกค้างในผลิตภัณฑ์เกษตรกรรมและอุตสาหกรรมซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคยังเป็นอุปสรรคในการส่งผลผลิตเป็นสินค้าออกรวมถึงปัญหาการเกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อมคือดิน น้ำ อากาศ และวัฏจักรของระบบนิเวศน์ด้วยและการที่ทรัพยากรมนุษย์ และธรรมชาติถูกทำลายเช่นนี้เป็นผลพลอยให้เกิดปัญหาต่อเนื่องทางเศรษฐกิจและความมั่นคงของประเทศอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาพิษวิทยาของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้เข้าใจเรื่องราวของสารเคมีเหล่านี้ จึงน่าจะเกิดประโยชน์ตลอดจนการป้องกันอันตรายและเสริมแนวทางการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัญหาดังกล่าวได้บ้าง (พิษวิทยา 1, 2530) สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นการใช้โดยตรง ที่อาจเป็นการฉีดพ่นด้วยยานิคมหรือชนิดที่เป็นน้ำหรือโดยการหว่านสารชนิดเม็ด มีผลให้เกิดการสะสมอยู่ในดินและอาจถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ในบริเวณใกล้เคียง ทำให้เกิดความเป็นพิษแก่สัตว์น้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอลง ติดโรคง่าย และมีพฤติกรรมต่างๆ ผิดปกติ (Couch, 1975) นอกจากนี้การปนเปื้อนของสารเคมีเหล่านี้ ยังมีผลกระทบต่อคุณภาพของแหล่งน้ำอันเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศน์ (ecosystem)

เมทิลพาราไทออน (methyl parathion) เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟตที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช เมทิลพาราไทออนสามารถละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นจึงซึมผ่านไขมันที่เคลือบผิวใบไม้และแมลงได้ดี นอกจากนั้นยังซึมผ่านผิวหนังของคนและสัตว์ได้แม้จะในอัตราที่ช้ากว่า สารเคมีในกลุ่มนี้ในรูปของเหลวจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ทุกทางรวมทั้งทางเดินอาหาร ผิวหนัง เยื่อบุต่างๆ เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะแพร่กระจายอยู่ในสมอง ตับ และ ในกล้ามเนื้อของตัวอ่อนในครรภ์ของหนูทดลอง (ฝ่ายจัดการสารพิษ, 2533) เนื่องจากเกษตรกรนิยมใช้เมทิลพาราไทออนกันอย่างแพร่หลายในนาข้าวและแหล่งที่มีการทำการเกษตรกรรมต่างๆ ทำให้มีการกระจายตัวลงไปในดินและในน้ำ โดยการชะล้างของฝนและน้ำที่ไหลผ่านและกลายเป็นสารพิษตกค้าง เมทิลพาราไทออนเมื่อเข้าสู่ร่างกายของคน แมลงและสัตว์ชนิดอื่นๆ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเมทิลพาราออกซอน (methyl paraoxon) ซึ่งเป็น active metabolite ที่

ออกฤทธิ์จับกับเอ็นไซม์โคลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) และไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลสสารอะเซทิลโคลีน(acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อในระบบประสาทอัตโนมัติ (สินธุ์ชัย และคณะปีพ.ศ. 2530)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) นับเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่ได้รับผลกระทบอย่างมากจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Fulton and Chambers, 1985) เนื่องจากอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการสะสมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และช่วงระยะที่มีการสืบพันธุ์ของสัตว์กลุ่มนี้จะเป็นช่วงที่ตรงกับฤดูกาลที่มีการใช้สารเคมีเหล่านี้ ดังนั้นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้จึงมีความสำคัญเนื่องจากมีผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการสืบพันธุ์และการอยู่รอดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งจะทำให้หน้าที่เป็นตัวควบคุมศัตรูพืชตามธรรมชาติ จากการศึกษาในยุโรปพบว่ากบมีจำนวนลดลงเป็นอย่างมากด้วยสาเหตุเหล่านี้ (Honegger, 1973, Phillips, 1990) นอกจากผลกระทบที่เกิดขึ้นโดยตรงกับตัวมันเองแล้ว ยังพบว่าส่งผลกระทบต่อผู้ล่าในขั้นสูงด้วย เช่น นกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hall and Kolbe, 1980) ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทำหน้าที่อยู่ในตำแหน่งของห่วงโซ่อาหาร (food chain) และสายใยอาหาร (food chain) และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สามารถเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อได้ จากการศึกษาในลูกอ๊อด (tadpole) พบว่าสามารถเป็นตัวบ่งชี้ (indicators) การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในน้ำดีกว่าในตัวเต็มวัย (adult) เพราะว่าลูกอ๊อดสะสมพิษได้มากกว่าเนื่องจากนิสัยการกินอาหารของลูกอ๊อด (Powell et al, 1982) โดยปกติจะหาอาหารโดยใช้ปากดูดตามพื้นโคลนหรือสาหร่ายที่อาจจะมีสารพิษต่างๆ เช่น เมทิลพาราไทออน ปนเปื้อนอยู่ ทำให้ลูกอ๊อดรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงที่การเจริญเติบโตของลูกอ๊อดจะตรงกับฤดูกาลที่มีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชด้วย การที่ลูกอ๊อดอาศัยอยู่ในบริเวณ สระน้ำ คลอง หนอง บึงต่างๆที่มีน้ำขัง ที่มีการสะสมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ทำให้สารเคมีสามารถเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทาง เหงือก ผิวหนัง และเข้าไปพร้อมกับอาหารที่กิน (Honrubia et al, 1993) มีการศึกษาพบว่าประชากรของกบหลายชนิดในปัจจุบันในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและมีหลายชนิดที่สูญพันธุ์ไปเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การปนเปื้อนของมลพิษหรือสารเคมี ที่อยู่อาศัยถูกทำลาย หรือระบบนิเวศมีการเปลี่ยนแปลง (TED Case Studies, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าความผิดปกติเกิดขึ้นกับกบในธรรมชาติมากขึ้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจกับกบมากขึ้นเนื่องจากกบมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสิ่งแวดล้อมและผิวหนังมีความไวต่อมลภาวะมาก

กบนา(*Rana rugulosa*) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดที่สามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย เป็นกบพื้นเมืองที่หาได้ง่าย ปกติจะพบอาศัยอยู่ตามบริเวณที่มีแหล่งน้ำ ได้แก่ นาข้าว

ลำคลอง หรือหนองบึงต่างๆ โดยเฉพาะในแหล่งที่มีการทำการเกษตรกรรม ซึ่งในบริเวณเหล่านั้น พบว่ามีการนำสารเคมีเหล่านี้มาใช้ในการทำการเกษตรกรรมเพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตเป็นจำนวนมากตัวอย่างเช่น สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดศัตรูพืช หรือปุ๋ยเคมี เป็นต้น เนื้อของกบนายังเป็นที่ยิมนำมาปรุงเป็นอาหารกันอย่างแพร่หลาย

กบนาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาลและมีการสืบพันธุ์ในช่วงฤดูฝน จากการศึกษาพบว่าช่วงฤดูสืบพันธุ์ของกบนาจะมีขนาด น้ำหนักตัว น้ำหนักของอวัยวะเพิ่มขึ้น พบเซลล์สุจิที่สมบูรณ์และเซลล์สเปิร์มาทิตระยะกลางเป็นจำนวนมาก ส่วนนอกฤดูสืบพันธุ์นั้นจะพบเซลล์เหล่านี้น้อยลงรวมทั้งน้ำหนักตัวและอวัยวะก็ลดลงด้วย ระหว่างการพัฒนาของอวัยวะกบนาพบว่าเริ่มมีหลอดสร้างตัวสุจิ (seminiferous tubules) เมื่อกบอายุสามเดือน และมีเซลล์สเปิร์มาโทโกเนียมภายในหลอดนี้เมื่ออายุได้สี่เดือน และเริ่มขบวนการสร้างตัวสุจิเมื่ออายุได้ห้าเดือน เมื่ออายุได้หกเดือนเป็นต้นไปภายในหลอดสร้างตัวสุจิเต็มไปด้วยเซลล์สเปิร์มาโทซัว (Sretarugsa *et al*, 1997) จากการศึกษาพบว่ากบนาเพศผู้และเพศเมียจะเจริญเต็มที่พร้อมที่จะสืบพันธุ์เมื่ออายุ 1 ปีขึ้นไป (ธีรวรรณ และคณะ 2531) การศึกษาแบบแผนการหลังฮอร์โมนเพศในกบนาเพศผู้และเพศเมียที่โตเต็มที่ในรอบหนึ่งปี พบว่าปริมาณเทสโทสเตอโรนในกบนาเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มสูงขึ้นในเดือนมีนาคมไปถึงเดือนตุลาคมและปริมาณของฮอร์โมนชนิดนี้จะมีต่ำในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ เช่นเดียวกับการหลังฮอร์โมนอีสตราไดออล 17 บีต้า ในกบนาเพศเมีย จะมีแบบแผนการหลังของฮอร์โมนเช่นเดียวกับการหลังเทสโทสเตอโรน (Tangpraprutgul *et al*, 1996) กบนาเพศผู้เริ่มพร้อมที่จะสืบพันธุ์ในเดือนพฤษภาคมและต่อไปเรื่อยๆถึงเดือนตุลาคม แต่พอเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งเป็นฤดูหนาวและฤดูแล้ง ปริมาณเทสโทสเตอโรนมีน้อยมากและมีกลุ่มเซลล์ Leydig cell ที่สร้างฮอร์โมนอยู่ไม่หนาแน่นนัก ถึงแม้จะยังได้รับอาหารและน้ำอย่างสม่ำเสมอก็ตาม

จากการศึกษาในอดีตที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพิษของสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งมีการศึกษาในกบบางชนิด พบว่าสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีผลต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อของกบ นอกจากนี้ยังพบว่า พาราไทออนสามารถทำให้ลูกอ๊อดของกบมีความผิดปกติของกระดูกที่ขาและที่หาง ถ้าได้รับในความเข้มข้นที่สูง (5 ppm) จะทำให้ถึงตายได้

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของของเมทิลพาราไทออนที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ของกบนา โดยปกติกลไกการสืบพันธุ์ของกบนาถูกควบคุมโดยระบบประสาทส่วนกลาง ฮอริโมนจากต่อมใต้สมองและอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งถ้าเมทิลพาราไทออนมีผลต่อระบบประสาทที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของไฮโปทาลามัส และอาจจะมีผลต่อเนื่องไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่มีผลต่ออวัยวะสืบพันธุ์ ทำให้มีผลต่อปริมาณการหลั่งของฮอริโมนเพศผิดปกติไป และอาจจะมีผลต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของกบนาได้ ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาผลกระทบของเมทิลพาราไทออนต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของกบ โดยเฉพาะในกบเพศผู้ ได้แก่การหลั่งของฮอริโมนเทสโทสเทอโรนจากอัณฑะและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออัณฑะของกบนาเพศผู้ *Rana rugulosa* ในกบนาที่มีอายุแตกต่างกัน เพื่อให้ทราบว่าเมทิลพาราไทออนจะมีผลมากน้อยแตกต่างกันหรือไม่และอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อระดับฮอริโมนเทสโทสเทอโรนและต่อเนื้อเยื่อของอัณฑะกบนาเพศผู้ *Rana rugulosa*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงผลของเมทิลพาราไทออนที่มีต่ออวัยวะสืบพันธุ์และระดับฮอริโมนเทสโทสเทอโรนของกบนาในช่วงอายุต่างๆกัน
2. ทำให้ทราบถึงผลของเมทิลพาราไทออนที่อาจจะมีต่อความพร้อมและความสามารถในการสืบพันธุ์ของกบนา
3. ทำให้ทราบถึงอันตรายของเมทิลพาราไทออนในสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อกบนา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สืบสวนเอกสาร

เนื่องจากความต้องการกำจัดวัชพืชและแมลงที่เป็นศัตรูพืช ซึ่งอาจทำให้มีการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำจากการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในการเกษตรและป่าไม้ ทำให้มีสารเคมีกำจัดศัตรูพืชบางส่วนระเหยไปในอากาศและตกลงสู่พื้นดิน เมื่อฝนตกลงมาก็ชะล้างสู่แหล่งน้ำจากการระบายน้ำทิ้งที่มีสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่ในแหล่งน้ำหรือจากการทิ้งเศษเหลือจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชหรือภาชนะที่บรรจุสารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้มีการปนเปื้อนอยู่ในส่วนประกอบต่าง ๆ ของแหล่งน้ำ สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในน้ำส่วนใหญ่มักดูดซึม หรือเกาะจับกับสารอนินทรีย์ที่แขวนลอยในน้ำและจมลงสู่พื้นท้องน้ำ ดังนั้นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำส่วนใหญ่มักตกค้างในดินตะกอนหรือโคลนเลนในบริเวณพื้นท้องน้ำบางส่วนของสารตกค้างในดินจะสะสมอยู่ในสัตว์ที่อาศัยตามพื้นท้องน้ำ พืชและสัตว์น้ำ การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมของแหล่งน้ำหลายด้าน ซึ่งรายงานโดย ฝ่ายจัดการสารพิษ, 2533 ดังต่อไปนี้

ผลกระทบในทางชีววิทยา โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นๆ โดยเฉพาะสัตว์น้ำ ระดับความรุนแรงของอันตรายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ตลอดจนความต้านทานของสิ่งมีชีวิตต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ผลกระทบต่อชีวิตของสัตว์น้ำ (lethal effect) คือการที่สัตว์น้ำได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจนถึงระดับที่ทำให้สัตว์น้ำตาย ผลกระทบประเภทนี้จะเกิดขึ้นรุนแรงและในเวลารวดเร็วปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำซึ่งอยู่ในระดับที่เรียกว่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์น้ำตาย (lethal concentration) และผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของสัตว์น้ำ (sublethal effect) คือการที่สัตว์น้ำได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชถึงระดับที่ไม่ทำให้สัตว์น้ำตาย แต่เป็นอันตรายต่ออวัยวะและระบบต่างๆ ของร่างกาย การเจริญเติบโต ซึ่งก็ใช้เวลานานพอสมควรจึงจะแสดงอาการเป็นพิษออกมา ความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในน้ำก่อให้เกิดผลกระทบประเภทนี้จะต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์น้ำตาย เรียกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์น้ำตาย (sublethal concentration)

ผลกระทบในทางนิเวศวิทยา คือการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำมีผลกระทบที่เป็นอันตรายโดยตรงต่อกล้ำมเนื้อของสิ่งมีชีวิตทุกกลุ่ม ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีชีวิต (biological component) ของระบบนิเวศน์แหล่งน้ำ นั่นคือสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำมีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เว้นแต่จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเป็นแหล่งพลังงานได้

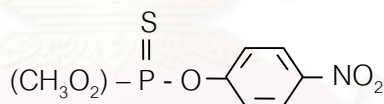
ผลกระทบด้านกิจการประมง โดยส่งผลกระทบทำให้ขนาดของทรัพยากรประมงในแหล่งน้ำลดลง มีผลกระทบต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์และการวางไข่ของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยทำให้แหล่งน้ำนั้นไม่เหมาะที่จะใช้เป็แหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกต่อไป

Edward, 1977 ได้เปรียบเทียบผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแหล่งน้ำของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มสำคัญ 4 กลุ่ม คือ ออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมตและสารกำจัดวัชพืช โดยพิจารณาเปรียบเทียบตามคุณสมบัติของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เป็นสาเหตุของผลกระทบอันเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ พบว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีความเป็นพิษรุนแรงมากที่สุดคือ สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน รองลงมาคือกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมตและสารกำจัดวัชพืชตามลำดับ สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมีศักยภาพของการรับเข้าและสะสมในร่างกายและความคงสภาพในแหล่งน้ำนั้นดีที่สุด สารเคมีทั้ง 4 กลุ่มนี้มีปริมาณการใช้ใกล้เคียงกันในหรือใกล้แหล่งน้ำ

เมทิลพาราไทออน (methyl parathion) เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ที่ใช้ในการกำจัดแมลงในการเกษตรได้อย่างกว้างขวาง เช่นเดียวกับเอทิลพาราไทออนและมีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เพื่อจุดประสงค์หลายประการมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ทั้งที่เป็นประเภทใช้ปากดูดหรือปากกัด (sucking and biting) สำหรับประเทศไทยจากการสำรวจของกองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตรพบว่าเมทิลพาราไทออนที่ใช้ในประเทศทั้งหมดนำเข้าจากต่างประเทศ

การบ่งลักษณะ (identification)

ชื่อทางเคมี	(chemical abstracts name) : 0, 0 – dimethyl 0 – (4 – nitrophenyl)ester หรือ 0, 0 – dimethyl 0 – p – nitrophenyl phosphorothiate หรือ phosphorothioic acid (IUPAC Systematic name) : 0, 0 dimethyl 0 – 4 – nitrophenyl phosphorothioate
ชื่อสามัญ	methyl parathion
ชื่ออื่น ๆ	alenthione, Bayer E - 601, carbathion M, demethylfenitrothion, dimethyl parathion, folidiol-M, malatyr, metacid, methaphos, methylfolidol, nitrox, vofatox
ชื่อการค้า	A-Gro, Folidol M, Metacide, Methyl – E 605, Metron, M – Parathion, Nitrox, Paratox, Paridol, vofatox, Wapatox
สูตรโมเลกุล	$C_8H_{10}O_5NSP$
สูตรโครงสร้าง	



คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

สถานะทางกายภาพ สีและกลิ่น	- สารบริสุทธิ์ (Pure substance) เป็นผลึกไม่มีสี - ผลิตภัณฑ์และสารเจือปน (technical products and impurities) เป็นของเหลวสีนํ้ามัน สีน้ำตาลแดงมี กลิ่นเหม็นเล็กน้อยคล้ายกระเทียม
น้ำหนักโมเลกุล	263.22
จุดหลอมเหลว	35 – 36° ซ
จุดเดือด	109° C ที่ความดัน 0.04 มม. ของปรอทหรือ 160° ซ ที่ความดัน 1 มม. ของปรอท
ความดันไอ	0.57 X 10 ⁻⁵ มม. ปรอทที่ 20° ซ.
ความหนาแน่น	1.358 ที่ 4° ซ. ความดัน 20 มม.

ความถ่วงจำเพาะ	1.2655
การละลาย	- ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ (55-60 มิลลิกรัม/ลิตร) - ละลายในสารละลายอินทรีย์ทุกชนิดเช่น acetone, alcohol, ketones, ether, benzene, xylene, light petroleum และ mineral oils ยกเว้น alkanes
เสถียรภาพ	- เสถียรในสภาพสารละลายที่เป็นกลางและกรดที่อุณหภูมิปกติ - ไฮโดรไลส์โดยต่าง - ไอโซเมอร์ไรซ์กับไอโซเมอร์ของ O, S-dimethyl ในขณะร้อน
ความคงสภาพ	- ไม่สลายตัวในสภาพที่เป็นกรดหรือมี pH ต่ำกว่า 7 หรือ 7 - สลายตัวง่ายในสภาพที่เป็นด่างหรือมี pH ที่อุณหภูมิของห้องเท่ากับ 8-9 หรือมากกว่า - สลายตัวได้เล็กน้อยที่ 100 ° ซ.

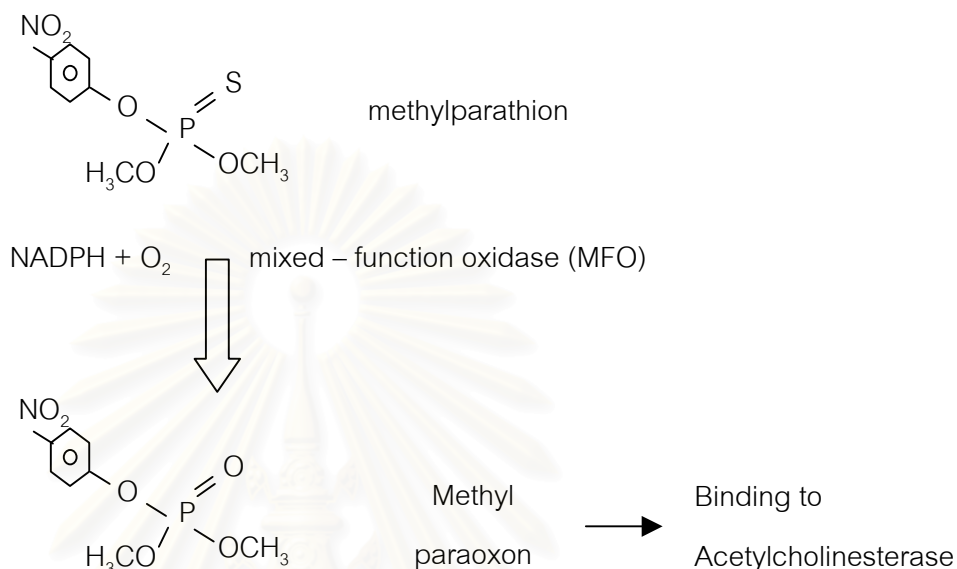
กลไกการออกฤทธิ์ ยาฆ่าแมลงสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบันเกือบทั้งหมด ออกฤทธิ์โดยมีจุดเป้าหมาย (Target) คือ ระบบประสาท (nervous system) เมทิลพาราไทออนและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase) และเอ็นไซม์สิวโดโคลีนเอสเตอเรส (Pseudocholinesterase) ซึ่งเป็น carboxylic acid ester hydrolase และสร้างขึ้นที่ตับ (Parteghini *et al*, 1986) มีผลทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholinesterase (ACh) บริเวณ cholinceptive site และก่อให้เกิดผลจากการทำงานของอะซิติลโคลีน (Acetylcholine) คือกระตุ้นการทำงานของโกลิเนอจิกไฟเบอร์อย่างต่อเนื่อง

ในสภาวะปกติเอ็นไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะทำหน้าที่ไฮโดรไลส์โคลีนเอสเตอเรส โดยเฉพาะอะซิติลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทพาราซิมพาทีติก (parasympathetic) อากาศได้รับพิษอย่างเฉียบพลันจากเมทิลพาราไทออน คือ มีผลมาจากการกระตุ้น M-cholinergic

receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเทติก มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบ เกิดการหดตัวที่ระบบทางเดินอาหาร มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งในท้องและท้องเดิน น้ำลายออกมากผิดปกติ เหงื่อออก สำหรับระบบการหายใจมีอาการแน่นในอก หายใจมีเสียงหวีด มีผลทำให้หัวใจเต้นช้าลง ความดันโลหิตต่ำ สารหลังเพิ่มมากขึ้น และรูม่านตาหด นอกจากนี้แล้วยังมีผลกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติกและกล้ามเนื้อลาย ทำให้มีฤทธิ์ตรงกันข้ามกับการกระตุ้นระบบพาราซิมพาเทติก ซึ่งผู้รับพิษจะแสดงอาการหัวใจเต้นเร็ว รูม่านตาขยายได้ ความดันโลหิตสูง มีการกระตุกของกล้ามเนื้อบริเวณเปลือกตา ใบหน้าและคอ กล้ามเนื้ออ่อนแอ โดยที่ในระยะแรกจะแสดงอาการเด่นทางซิมพาเทติก แต่ต่อมาจะแสดงอาการเด่นทางพาราซิมพาเทติก ส่วนการกระตุ้นกล้ามเนื้อลายที่ motor end plate ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนกำลังลง ในที่สุดจะเกิดอัมพาตโดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจ ส่วนฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางนั้น อาจมีผลมาจากการกระตุ้นระบบ central M – cholinergic ทำให้มีอาการวิงเวียน ความคิดฟุ้งซ่าน การเคลื่อนไหวปะทะ พูดไม่ชัด การหายใจผิดปกติ ไม่มีปฏิกิริยาโต้ตอบสิ่งกระตุ้น มีการกระตุกของกล้ามเนื้อ การชักเกร็งของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง มีการสับสนทางจิต ชัก อาการโคม่า และหมดสติ (ฝ่ายจัดการสารพิษ, 2533)

การเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ เป็นการลดกำมะถันที่รวมตัวอยู่ในเมทิลพาราไทออน โดยลำพังแล้วเมทิลพาราไทออนไม่สามารถกระตุ้นฤทธิ์ (active) ได้ต้องอาศัยการกระตุ้นฤทธิ์จากระบบเอ็นไซม์ที่ทำให้เกิดขบวนการเปลี่ยนเป็นออกซิไดส์ (mixed-function oxidases : MFO) ซึ่งมีปรากฏในร่างกายของแมลง สัตว์ทดลองและคน ระบบเอ็นไซม์ดังกล่าวอยู่ใน microsome และต้องอาศัย NADPH และ O_2 ในการทำงานด้วย ดังรูปที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แผนผังแสดงการกระตุ้นฤทธิ์ (activation) ของเมทิลพาราไทออนให้เปลี่ยนเป็น active metabolite ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับเอ็นไซม์ Acetylcholinesterase และยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์

คุณสมบัติของการเกิดความเป็นพิษ แหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายมลพิษเข้าสู่สภาพแวดล้อมคือ การฉีดยุติ และการฟุ้งกระจายของผงฝุ่น หลังจากมีการให้เมทิลพาราไทออนกับพืชปลูก ทำให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อมทั้งในลักษณะที่เป็นไอระเหย หรือผงฝุ่น การสูญเสียที่ pH ในน้ำเท่ากับ 8 เมทิลพาราไทออนสามารถสลายตัวได้หมดในเวลาอันน้อยกว่า 7 เดือน โดยการเกิดการแตกตัวทำปฏิกิริยากับน้ำในที่มีดและอุณหภูมิห้อง แบคทีเรีย (*Bacillus subtilis*) จะสลายเมทิลพาราไทออนอย่างรวดเร็วโดยปฏิกิริยา reduction ของ p- nitro group ในดินสลายตัวได้ 90% ในเวลา 1 เดือน สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตละลายน้ำได้น้อยจึงต้องใช้ในรูปผงฝุ่น ผงเปียกได้หรือในรูปอิมัลชัน หากการผสมในสูตรเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ อาจทำให้สัตว์ได้รับสารมากหรือน้อยเกินไป ฉะนั้นจึงต้องผสมให้ดีก่อนใช้ สารกลุ่มนี้ละลายได้ดีในน้ำมันหรือสารละลายอินทรีย์ (organic solvents) ดังนั้นจึงมีความสามารถที่จะซึมผ่านไขมันที่เคลือบผิว (waxy coating) ของใบไม้ ผลไม้ และของตัวแมลงได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังอาจซึมผ่านผิวหนังของคนและสัตว์ได้แม้จะในอัตราที่ช้ากว่า

ความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ขึ้นกับตัวแปรหรือปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปัจจัยทางเคมี ฟิสิกส์ เช่นความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้จะลดลงเมื่อถูกแสง ความร้อน ความเป็นด่าง (pH 7-8) ตลอดจนอุณหภูมิของโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง Virgil *et al*, 1979 พบว่า อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อค่าครึ่งชีวิตของพาราไทออนคือ ที่ 20 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต 130 วันและจะลดลงเหลือแค่ 27 วัน เมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้น 37.5 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ มะลิวรรณ แสงจันทร์, ม.ป.ป. ได้ศึกษาค่าครึ่งชีวิตของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในน้ำกร่อย ได้ผลดังตารางที่ 1 ความเป็นกรดต่างในน้ำมีผลต่อการสลายตัวของมาลาไทออนในแหล่งน้ำ โดย Konrad *et al*, 1969 ได้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของมาลาไทออนใน 7 วัน พบว่า ที่ pH 2.0 มาลาไทออนจะไม่สลายตัวเลย (0 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ pH 11.0 จะสลายตัวได้หมด (100 เปอร์เซ็นต์) ปัจจัยทางชีวภาพ ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดสัตว์ (species) เช่น วัชพืชต่อฤทธิ์ของพอเททมากกว่าสุกร แต่วัชพืชน้ำข้างทนต่อฤทธิ์ของพาราไทออนมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ ความแตกต่างในการตอบสนองของสัตว์เหล่านี้ เนื่องมาจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชแต่ละชนิดจะกระตุ้นหรือทำลายเอ็นไซม์ในสัตว์แต่ละชนิดอายุ สารที่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยไม่ต้องถูกกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ ค่อนข้างจะมีพิษสูงต่อสัตว์อายุน้อย เพราะสัตว์เหล่านี้มีเอ็นไซม์ที่ใช้ในการทำลายพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชน้อย แต่สารที่ต้องถูกกระตุ้นโดยเอ็นไซม์ก่อนที่จะออกฤทธิ์จะมีพิษต่อสัตว์ที่มีอายุน้อยไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์โตที่มีปริมาณเอ็นไซม์สูงกว่า เพศ ซึ่งแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสัตว์และชนิดของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช การได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นร่วมด้วย รวมทั้งยาที่มีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว ยากดประสาท ยาที่เพิ่มระดับเอ็นไซม์ในตับ และภาวะของการเป็นโรคในขณะที่ได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

เมทิลพาราไทออนสามารถสลายตัวได้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินและพืช สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ถูกย่อยสลายในดินทั่วไปได้ภายในเวลา 7 วัน กรณีที่มีการใช้ในปริมาณมาก เมทิลพาราไทออนย่อยสลายตัวได้โดยจุลินทรีย์ภายในระยะเวลา 2-3 เดือน (Quoted in ฝ่ายจัดการสารพิษ, 2533) เมทิลพาราไทออนสามารถคงทนในน้ำที่เป็นโคลนได้นาน 2 สัปดาห์ และคงทนในน้ำที่มีลักษณะใสได้นานถึง 3 เดือน

ตารางที่ 1 แสดงค่าความคงตัวครึ่งชีวิต (half life) ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในน้ำกร่อย
(มะลิวรรณ แสงจันทร์, ม.ป.ป.)

สารเคมีกำจัดศัตรูพืช		ค่าครึ่งชีวิต			หมายเหตุ
กลุ่ม	ชนิด	น้ำ		ตะกอนและดิน	
		นอกห้อง	ในห้อง		
ออร์กาโนคลอรีน	Heptachlor	28 วัน	-	2 ปี	
	Aldrin	>28 วัน	-	2 ปี	
	Chlordane	>28 วัน	-	5 ปี	
	DDT	>28 วัน	-	4 ปี	
	Dieldrin	>28 วัน	-	3 ปี	
ออร์กาโนฟอสเฟต	Malathion	11 วัน	-	7 วัน	20° c, pH 7.4
		-	2.6 วัน***	2 วัน***	20° c, pH 8.0
	Monocrotophos	>28 วัน	-	-	75 – 100%
	Dimethoate	>28 วัน	-	-	
	Diazinon	-	-	12 สัปดาห์	
Methyl parathion	6.3 วัน*	>28 วัน**	1.2 วัน***		
สารกำจัดวัชพืช	Glyphosate	-	-	24 วัน	
คาร์บาเมท	Carbaryl	28 วัน	-	1.7 วัน***	

หมายเหตุ * ได้รับแสงแดดและอุณหภูมิ 22-45° C

** ได้รับแสงสีขาจจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25° C

*** ได้รับ organic matter 46%

ผลของเมทิลพาราไทออนต่อระบบประสาท ขบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายอาศัย NADPH, O₂ เกิดเป็นเมทิลพาราออกซอน (methyl paraoxon) โดยอาศัยเอนไซม์ oxidase ในไมโทคอนเดรียของตับซึ่งเป็นสารที่มีผลยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ในขณะที่เดียวกันร่างกายจะหลั่งเอนไซม์ glutathione-s-alkyl transferase และ ary transferase ออกจากตับ เพื่อทำลายเมทิลพาราไทออนให้กลายเป็นสารที่ไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase แล้วจะทำให้เมทิลพาราไทออนไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว

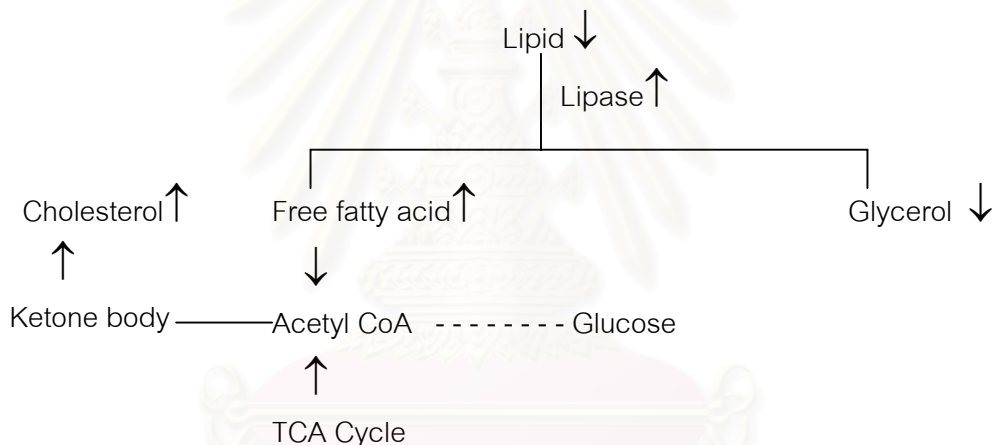
พิษต่อระบบประสาทของออร์กาโนฟอสเฟตเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถทำลาย acetylcholine ได้ ทำให้การส่งกระแสความรู้สึกของระบบประสาท ดำเนินต่อกันโดยไม่มีหยุด เกิดอาการกล้ามเนื้อชักกระตุก และตายในที่สุด จากรายงานของ Schoor and Brausch, 1980 ได้ศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อระดับเอนไซม์ AChE ของกุ้ง *Penacus duorarum* โดยใช้ความเข้มข้น 1.3 ไมโครกรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ที่ใช้เลี้ยงกุ้ง หลังจากการทดลองในเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าระดับเอนไซม์ AChE ในบริเวณ nerve cord ลดลง จากการศึกษารายงานของ Reddy and Rao, 1988 ถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อเนื้อเยื่อประสาท (nervous tissue) ของกุ้ง *Penaeid Prawn (Metapenaeus monoceros)* โดยใช้ความเข้มข้นของเมทิลพาราไทออน ทำให้กุ้งตาย 50% (LC₅₀) คือ 0.12 ppm ในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อประสาทลดลง 63.60% จากระดับปกติ ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นของเมทิลพาราไทออนที่ไม่ทำให้กุ้งตาย (sublethal concentration) คือ 0.04 ppm ในเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าระดับของเอนไซม์ AChE เนื้อเยื่อประสาทลดลง 34.88% จากระดับปกติ ปลาที่ได้รับออร์กาโนฟอสเฟตจะพบว่าปริมาณ AChE ในเนื้อเยื่อสมองลดลง โดยพบว่าปลาตายมี AChE ลดลงเหลือน้อยกว่า 20% ของค่าปกติ ในขณะที่ปลาที่รอดชีวิตจะมีค่าอยู่ระหว่าง 22 – 61% (Hosbeng and Hoy, 1989) ดังนั้นการวัดปริมาณของ AChE จึงใช้เป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ยังบอกถึงความเป็นพิษของออร์กาโนฟอสเฟตของปลาในสภาวะแวดล้อม (Coppage, 1972) นอกจากนี้ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ เมื่อได้รับเมทิลพาราไทออน ก็พบการลดลงของเอนไซม์ AChE เช่นเดียวกัน ดังรายงานของ Palmer, 1978 พบว่าเมทิลพาราไทออนสามารถลดระดับของเอนไซม์ AChE ในลูกวัวแรกเกิดและวัวอายุ 2-3 ปี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงพิษของสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มีต่อระบบประสาทของกบ มีการศึกษาพบว่า Methamidophos (o,s-dimethyl phosphoroamidothiolate) ยับยั้งการทำงานของ cholinesterase ในกล้ามเนื้อของหนูและกบ (Camara et al, 1997) มีการศึกษาถึงพิษเฉียบพลันของ Phosalone โดยฉีดเข้าทางหน้าท้องของ

กับ *Rana tigrina* ทำให้ยับยั้ง inorganic ion linked ATPase ในระบบประสาทส่วนกลาง ที่ประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ 6 ส่วนคือ terencephalon, mid-brain, rhombencephalon, cervical spinal cord, thoracic spinal cord และ lumbar spinal cord และมีผลทำให้กล้ามเนื้อที่รับประทานมีอาการเมื่อยหรือสลับไป (Balasundaram *et al*, 1995)

ผลของเมทิลพาราไทออนต่อเมตาบอลิซึม เมื่อเมทิลพาราไทออนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตและจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติที่เซลล์ตับ จากการศึกษาของ Reddy *et al*, 1986 ในปูน้ำจืด *Oziotelphusa senex_senex* โดยใช้ความเข้มข้นของเมทิลพาราไทออนที่ไม่ทำให้ปูตาย (sublethal concentration) 0.2 ppm ในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าคาร์โบไฮเดรตเมตาบอลิซึมของปูน้ำจืดเปลี่ยนแปลงไปโดยที่เมทิลพาราไทออนมีผลทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและปริมาณไกลโคเจนใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อลดลง ส่วนแลคเตท (lactate) ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อกลับเพิ่มขึ้น ระดับเอ็นไซม์ phosphorylase a เพิ่มขึ้นแต่ phosphorylase b ลดลง ทั้งใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อ เอ็นไซม์ aldolase เพิ่มขึ้น เอ็นไซม์ lactate dehydrogenase และ succinate dehydrogenase ลดลงทั้งใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเมทิลพาราไทออนมีผลยังยั้งการลอกคราบของปูน้ำจืด *Oziotelphusa senex senex* คือทำให้เปอร์เซ็นต์การลอกคราบของปูลดลงตามระดับความเข้มข้นของเมทิลพาราไทออนที่ให้เริ่มจาก 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 ppm ตามลำดับ (Reddy *et al*, 1985) และยังมีการศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อปูน้ำจืดชนิดนี้อีกครั้ง โดย Reddy *et al*. ในปี ค.ศ.1986 โดยใช้เมทิลพาราไทออนเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 ppm ทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ acid phosphatase ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อ ปริมาณของเอ็นไซม์ acid phosphatase จะกลับคืนสู่ระดับปกติเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ของความเข้มข้น 0.1 ppm และ 30 วันของความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1 ppm การเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ acid phosphatase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ในไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์นั้น แสดงว่าเนื้อเยื่อบริเวณนั้นถูกทำลายไป

Reddy *et al*, 1989 ศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อกุ้ง penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* พบว่าปริมาณลิปิดทั้งหมดและกลีเซอรอลลดลง ส่วนเอ็นไซม์ lipase เพิ่มขึ้น กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และปริมาณคลอเรสเตอรอลทั้งหมดเพิ่มขึ้น

ซึ่งพวกเขาได้ให้ข้อสังเกตว่าการที่ปริมาณลิปิดลดลง เพราะร่างกายมีการสลายลิปิดเพื่อนำไปสร้างเป็นพลังงานในภาวะที่ได้รับความเครียดจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ภาวะการลดลงของลิปิดสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ lipase ดังแผนภูมิที่แสดงไว้ในรูปที่ 2 จากรายงานของ Reddy and Rao, 1990 ที่ศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อกุ้ง penaeid prawn (*Metapenaeus monoceros*) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่ทำให้กุ้งตาย คือ 0.04 ppm ในเวลา 96 ชั่วโมง มีการสังเคราะห์ urea, glutamine และ ammonia เพิ่มขึ้นและยังไปเพิ่มขบวนการ gluconeogenesis ลดการสะสมไขมันและโคเลสเตอรอล



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงผลของเมทิลพาราไทออนต่อลิปิด เมตาบอลิซึม (Reddy et al, 1989)

หมายเหตุ ↓ หมายถึง ลดลง
 ↑ หมายถึง เพิ่มขึ้น

มีการศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อปลาหลายชนิดเช่น ภัทรา, 2535 ศึกษาถึงความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายของเมทิลพาราไทออนต่อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) พบว่าค่า LC₅₀ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 1.48 ppm และอัตราการตายของปลาที่ได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชขึ้นกับความเข้มข้นที่ให้ เช่นเดียวกับที่สมรรถนะของเอ็นไซม์ โคลีนเอสเทอเรสในกล้ามเนื้อและสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) ส่วนพิษของเมทิลพาราไทออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.2 ppm ในเวลา 7 วัน พบว่า

ปลาจะแสดงอาการเป็นพิษออกมาเช่นกันและระดับเอ็นไซม์โกลด์ในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ในขณะที่ในกล้ามเนื้อลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ วุฒิติวาลัย, 2539 ศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไทออนต่อระดับไฮโดรเจนพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม (*Clarias macrocephalus* vs. *clarias gariepinus*) พบว่าระดับไฮโดรเจนพี 450 ในตับปลาดุกลดลงเมื่อปลาสัมผัสกับเมทิลพาราไทออนนาน 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1–5ppm มีการศึกษาถึงพิษของเมทิลพาราไทออนในปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาตาย คือ 0.09 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตใน กล้ามเนื้อ เหงือก ตับ และสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$ (Rao and Rao, 1983) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) โดย Rao et al, 1985 พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของเนื้อเยื่อปลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการเพิ่มออกซิเดทีฟเมตาบอลิซึม (oxidative metabolism) ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อเมทิลพาราไทออนในทันที เมื่อให้ปลาได้รับสารเคมีจนครบ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง อัตราการใช้ออกซิเจนก็ลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากร่างกายขาดออกซิเจนและมีการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ปลาตายและกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจเป็นอัมพาต จากการศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนในปลาดุกด้านพบว่าความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาตายสามารถลดการทำงานของเอ็นไซม์ในตับและกล้ามเนื้อของปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) เอ็นไซม์ดังกล่าวเช่น Cytoplasmic malate dehydrogenase, mitochondria malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase จะลดลงประมาณ 30 - 39 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษา ระดับ Ultrastructure ไม่พบ glycogen granules แต่มี smooth endoplasmic reticulum จำนวนมาก (Tripathi and Shukla, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Prasada and Ramma, 1984 ที่พบว่าปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) ที่ให้เมทิลพาราไทออนในความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาตาย มีการลดลงของเอ็นไซม์ succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, cytochrome C oxidase

ผลของเมทิลพาราไทออนต่อระบบสืบพันธุ์ จากการศึกษาของ Gupta et al, 1984 ได้ศึกษาในหนูแรทที่ตั้งท้อง โดยให้รับเมทิลพาราไทออนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตั้งแต่วันที่ 6-15 หรือ 19 ของการตั้งท้อง พบว่ามีการลดลงของโปรตีนและกรดอะมิโนในสมองส่วนต่าง ๆ หลายบริเวณ รวมทั้งเนื้อเยื่อของรกด้วย ซึ่งเมทิลพาราไทออนจะมีผลต่อหนูแรทที่ตั้งท้องได้ 19 วันมากกว่า 15 วัน และมีผลต่อเนื้อเยื่อของตัวอ่อนมากกว่าตัวแม่ นอกจากนี้ยังพบ

ว่าเมทิลพาราไทออนมีผลต่อตัวอสุจิของสัตว์เพศผู้ จากรายงานของ Mathew *et al*, 1992 ได้ศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวอสุจิหนูไมส์ (mice) โดยใช้ความเข้มข้นของเมทิลพาราไทออนเท่ากับ 75, 37.5, 18.75 และ 9.37 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยให้ครั้งเดียวหลังจากนั้นดูความผิดปกติของตัวอสุจิในสัปดาห์ที่ 1 และ 5 พบว่าตัวอสุจิมีความผิดปกติในทุกขนาดความเข้มข้นที่ให้ และจะพบมากขึ้นตามขนาดที่ให้มากขึ้น Tanimura *et al*, 1967 ได้มีการทดลองฉีดเมทิลพาราไทออนเข้าทางช่องท้องของหนูไมส์ขณะตั้งท้องได้ 10 วัน ทำให้หนูแสดงอาการชัก น้ำลายไหลออกมาก กล้ามเนื้อไม่ประสานงานกันและสิ้นกระดูก ถ้าให้เมทิลพาราไทออนในปริมาณสูงจะทำให้หนูตายได้ มงคล, 2539 ศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อการหลังฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในหนูแรทเพศผู้ พบว่าเมื่อฉีดเมทิลพาราไทออนขนาด 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในซีรัมได้และเมทิลพาราไทออนที่มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ppm ก็สามารถยับยั้งการหลังฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจากเซลล์ลีดิก (Leydig cell) ของหนูแรทตามขนาดความเข้มข้น จากการศึกษาดูเนื้อเยื่ออัณฑะพบว่า เมทิลพาราไทออนมีผลทำลายเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส (Seminiferous tubule) และทำลายเซลล์ลีดิกโดยตรง มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ เช่น เกิดการรวมกลุ่มของโครมาตินรอบ ๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส นิวเคลียสเกิดการสลายตัว มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของเซลล์ลีดิก รวมทั้งมีการตายของเซลล์ลีดิก

ผลของเมทิลพาราไทออนต่อการเจริญเติบโต มีการศึกษาของ เมทิลพาราไทออนที่มีผลต่อกบ เช่น Hall, 1990 ได้ศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนในลูกอ๊อดของกบ bullfrog (*Rana catesbeiana*) และลูกอ๊อดของกบ green frog (*Rana clamitans*) พบว่าเมื่อให้เมทิลพาราไทออนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 96 ชั่วโมง ไม่สามารถทำให้ลูกอ๊อดตายได้ แต่เมทิลพาราไทออนมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นในอ่างทดลองที่ให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา (flow-through systems) ส่วนปริมาณของเมทิลพาราไทออนที่สะสมอยู่ในตัวลูกอ๊อด หลังจากหยุดให้เมทิลพาราไทออนจะเริ่มมีปริมาณลดลงในวันที่ 4 ของการทดลอง ลูกอ๊อดจะเริ่มตายเมื่อให้เมทิลพาราไทออนเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง Alvarez *et al*, 1995 ได้ศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนในลูกอ๊อดของกบ *Rana perezi* โดยใช้เมทิลพาราไทออนความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำที่ใช้เลี้ยงกบ เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 7 วันเป็นเวลา 95 วัน พบว่ามีอัตราการตายของกบกลุ่มที่สัมผัสกับเมทิลพาราไทออนทั้งสองความเข้มข้น สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และมีความผิดปกติของกระดูกที่ขาและหาง ซึ่งจะทำให้ขาสั้นหนาและไม่ยืดหยุ่นด้วย

ในประเทศไทยมีกบหลายชนิดที่น่าสนใจ เช่น กบหูต (*Rana blythii*) กบแรด (*R. fasciculispina*) ทั้งนี้เพราะกบเป็นอาหารของมนุษย์มาแต่โบราณกาล โดยเฉพาะกบนา (*R. rugulosa*) ชาวบ้านจะจับกบจากธรรมชาติมารับประทานอย่างเดียว โดยขาดความคิดให้สอดคล้องกับหลักการอนุรักษ์ที่ถูกต้อง คือเมื่อประสงค์จะใช้ประโยชน์ก็ต้องมีการป้องกันการสูญพันธุ์และเพิ่มปริมาณ กบนาเป็นกบพื้นเมืองที่หาได้ง่าย และสามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย (Taylor, 1962 ; สุทธิลักษณ์ อำไพวงศ์, 2523) จึงเป็นที่นิยมนำมาเลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร โดยปกติมักเข้าใจกันว่า กบนาจะอยู่แต่ในนาข้าว ล้ำคลองหรือหนองบึงต่างๆ โดยเฉพาะแหล่งที่มีการทำการเกษตรกรรม ซึ่งในบริเวณเหล่านั้นพบว่ามีกรนำเอาสารเคมีมาใช้ในการทำการเกษตรกรรมเพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิต เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น สารกำจัดแมลง สารกำจัดศัตรูพืช หรือปุ๋ยเคมี เป็นต้น แต่ในความเป็นจริงแล้ว กบนาสามารถอาศัยอยู่ได้ในหลายสภาวะ แม้แต่ในสภาพที่เป็นดินทราย แต่เนื่องจากกบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงจำเป็นต้องอาศัยความชื้นตลอดวงจรชีวิต เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังช่วยในการระบายความร้อนและแลกเปลี่ยนก๊าซ ในฤดูแล้ง(เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์) ความชื้นจะลดลงทำให้การระบายความร้อนและการแลกเปลี่ยนก๊าซเสียไป กบจะกินอาหารน้อยลงทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ในช่วงนี้ กบจะอาศัยอยู่ในโพรงหรือซุกตัวอยู่ใต้ดิน ใช้ไขมันที่สะสมไว้แทนอาหาร เรียกว่า กบจำศีล (Hibernation) ช่วงนี้จะตรงกับเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน เมื่อความชื้นมากขึ้นกบจะกลับมากินอาหารตามเดิมและเริ่มต้นสืบพันธุ์ ซึ่งตรงกับเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม (มุสตี ปริยานนท์, 2535) การนำกบจากธรรมชาติมาขายจะทำได้เฉพาะในช่วงฤดูฝนซึ่งสามารถหาพบได้ง่าย จึงได้มีการนำกบมาเลี้ยงในฟาร์มเพื่อจะได้มีกบมาขายตลอดปีและสามารถปรับปรุงพันธุ์กบได้

กบนา *Rana rugulosa* จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่อยู่ใน ไฟลัม Chordata ชั้น Amphibia อันดับ Anura วงศ์ Ranidae มีลักษณะที่สำคัญคือ ด้านหลังส่วนใหญ่มีสีเขียวและมีจุดสีดำทั่วไป ผิวหนังด้านท้องมีสีขาวและขาวอมเหลือง ใต้คางมีจุดสีดำและเส้นดำตรงกึ่งกลางซึ่งในบางตัวอาจไม่มี ลักษณะภายนอกที่สามารถแยกออกจากกบชนิดที่คล้ายคลึงกันอย่างเห็นได้ชัดคือ ส่วนหัวจะสั้นเป็นรูปทางสามเหลี่ยม ที่มีส่วนสูงเกือบเท่าส่วนฐาน ช่วงขาหลังยาวเป็น 1.5 เท่า

ของช่วงลำตัว และยาวเป็น 2 เท่าของขาหน้า ความกว้างของหนังตาบนเท่ากับระยะระหว่างรูจมูก และเท่ากับระยะระหว่างรูจมูกถึงริมปาก สำหรับการวินิจฉัยเพศพบว่าในกบนาที่โตเต็มวัย เพศเมียจะมีขนาดและน้ำหนักมากกว่าเพศผู้และในเพศผู้จะพบว่ามีถุงลม (vocal sac) สีคล้ำอยู่ใต้คางทั้งสองข้างซึ่งจะไม่พบลักษณะที่กล่าวถึงนี้ในเพศเมีย นอกจากนี้ยังพบว่าความกว้างของหัวและระยะระหว่างตากับวงหูของในเพศเมียจะกว้างกว่าในเพศผู้ (กัมพล อิศรางกูร ณ อยุธยา และคณะ, 2532)

วงจรชีวิตของกบนา ลูกกบจะเริ่มเกิดในช่วงฤดูสืบพันธุ์ ไข่กบที่ผสมกับอสุจิแล้วจะฟักเป็นตัวภายใน 18-28 ชั่วโมง ไข่ที่ได้รับการผสมใหม่จะมีรูปร่างกลม หลังจากนั้นจะเป็นเป็นรูปรี่ แล้วค่อย ๆ เพิ่มความยาวขึ้นเรื่อยๆ จนมองเป็นส่วนหัว ลำตัวและหางดูคล้ายลูกปลา เมื่ออายุ 20 วัน ขาหลังก็จะงอก ส่วนขาหน้าจะงอกหลังจากนั้น 3 วัน ต่อมาอีก 7- 13 วันหางจะหดหายไปจนหมด กลายเป็นลูกกบตัวเล็ก ๆ ใช้เวลาของการเจริญจากไข่ที่ถูกผสมแล้วจนเป็นลูกกบตัวเล็ก ๆ ทั้งสิ้นประมาณ 28-36 วัน (ธีรวรรณ นุตประพันธ์และคณะ, 2531) (รูปที่ 3)

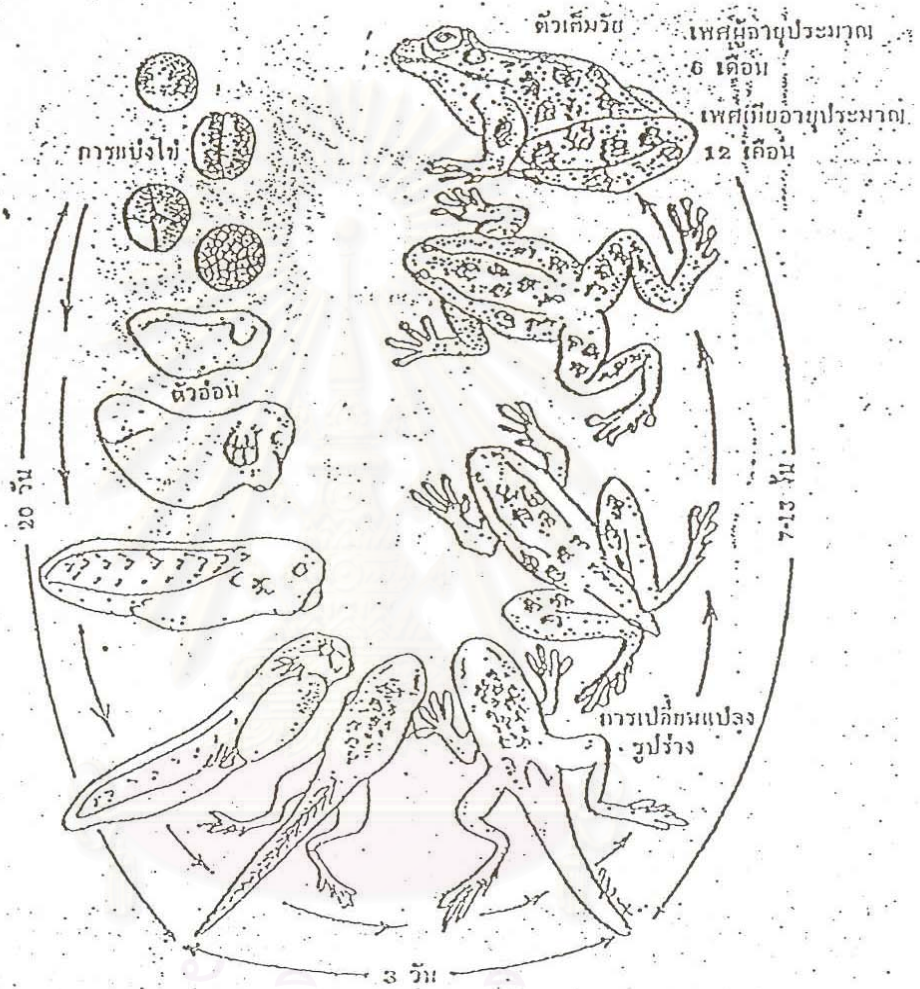
ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของกบนา ในเพศผู้ที่โตเต็มวัย จะพบว่าภายในช่องท้องมีอัณฑะ 1 คู่ มีสีเหลืองเป็นท่อนกลมยาว จะพบอยู่สองข้างของแนวกลางหลัง และยึดติดอยู่กับไตทางด้านหน้าด้วยเยื่อบาง ๆ (mesorchium) โดยจะมีการสร้างอสุจิ (spermatozoa) จากท่อภายในอัณฑะ (seminiferous tubule) แล้วส่งออกไปตามท่อเล็กๆ (vasa efferentia) ปลายท่อไตก่อนเปิดออกสู่ภายนอกทางช่องทวาร หรือช่องก้น (cloaca) จะพองออกเป็นถุงพักอสุจิ (seminal vesicle) ลักษณะของตัวอสุจิจะมีความยาวประมาณ 0.32 – 0.65 มิลลิเมตรประกอบด้วยส่วนบน (acrosome) ส่วนหัว (nucleus) ส่วนคอ (neck or middle piece) ที่สั้นมากและส่วนหาง (tail) ซึ่งยาวมากประมาณ 4 เท่าของส่วนหัว (ธีรวรรณ นุตประพันธ์, 2535) (รูปที่ 4)

กบนาเพศผู้ที่โตเต็มวัยและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ (mature) นั้นควรมีอายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไป และจากการศึกษาทางวิทยาฮิสโตของอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ที่มีอายุ 6 เดือนขึ้นไป ภายในอัณฑะมีการสร้างอสุจิแล้ว ส่วนในกบตัวเมียที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผสมพันธุ์ควรมีอายุมากกว่า 12 เดือน ลักษณะของรังไข่จะมี Follicle จำนวนมาก กบนาตัวผู้ที่มีอายุครบ 6 เดือน ซึ่งจะอยู่ในช่วงเวลาของฤดูการจำศีล (เดือนพฤศจิกายน) อัณฑะจะมี

ขนาดเล็กและน้ำหนักน้อย เนื่องจากกบมี metabolism ลดลงและมีการนำอาหารที่สะสมไว้มาใช้ ส่วนกบอายุ 12 เดือน จะตรงกับช่วงฤดูการผสมพันธุ์ (เดือนพฤษภาคม) มีการกินอาหาร น้ำหนัก และขนาดของอวัยวะจะเพิ่มขึ้น น้ำหนักรังไข่ของกบเพศเมีย จะพบว่ารังไข่มีน้ำหนักเพิ่มมากเมื่อ อายุ 12 เดือน ซึ่งควรเป็นช่วงที่โตเต็มวัย และพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ (ธีรวรรณ นุตประพันธ์ และ คณะ, 2531) โดยทั่วไปในธรรมชาติกบจะสืบพันธุ์ในฤดูฝน แต่เนื่องจากกบเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ (lower vertebrate) การสืบพันธุ์จึงต้องอาศัยความสัมพันธ์ของสองสภาวะทำงานร่วมกันคือความพร้อมของการเจริญพันธุ์ของร่างกาย และสภาพแวดล้อมภายนอกที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น ถ้าขาดปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง ทำให้มีผลต่อการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติ (สุสดี ปริยานนท์ , 2535)

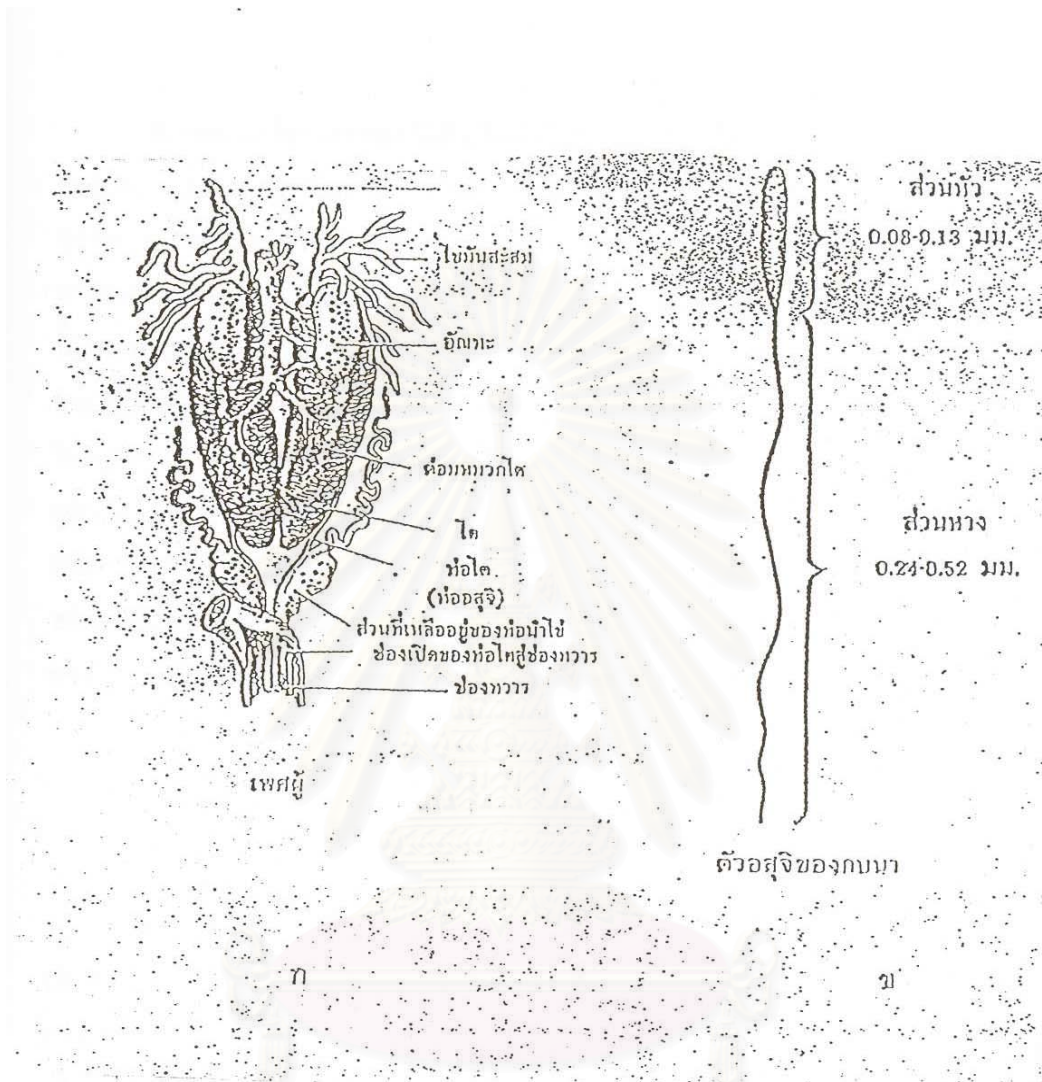


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของกบนา (กิริวรรณ นุตประพันธ์, 2535)



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ก แสดงระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ของกบนาเพศผู้

ข ตัวอสุจิของกบนา

(ธีรวรรณ นุตประพันธ์, 2535)

สภาพแวดล้อมภายนอกที่เป็นปัจจัยสำคัญในการสืบพันธุ์ของกบคือ อุณหภูมิ ความชื้น ช่วงแสง และอาหาร (Herman, 1992) กบนาที่มีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาลและมีการสืบพันธุ์ในช่วงฤดูฝน จากการศึกษาพบว่าช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ กบนา มีขนาด น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะเพิ่มขึ้น พบเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์และเซลล์สเปิร์มาที่ระยะกลางเป็นจำนวนมาก ส่วนนอกฤดูกาลสืบพันธุ์นั้นจะพบเซลล์เหล่านี้น้อยลงรวมทั้งน้ำหนักตัวและอวัยวะก็ลดลงด้วย จากการศึกษาถึงน้ำหนักตัวและอวัยวะของกบนา *R. tigerina* ในฤดูกาลที่แตกต่างกันโดย Sretarugsa *et al*, 1997 พบว่าในฤดูกาลที่ไม่มีการสืบพันธุ์ (เดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม) น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะจะต่ำกว่าในฤดูกาลสืบพันธุ์ (เดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม) อย่างชัดเจน ขนาดและน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์จะบ่งบอกถึงความพร้อมในการสืบพันธุ์ของกบทั้งเพศผู้และเพศเมีย เนื่องจากน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ที่อวัยวะและรังไข่จะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวอย่างมาก จึงใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ของ gonado somatic index (GSI %) แทนน้ำหนักอวัยวะ ซึ่งในเพศผู้จะหาค่า GSI % ได้จาก

$$GSI \% = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะ}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$$

ค่า GSI % นี้เป็นที่ยอมรับมากกว่าค่าน้ำหนักอวัยวะโดยตรง เนื่องจากสามารถลดค่าที่เกิดจากการผันแปรของน้ำหนักตัวในกบแต่ละตัวและความพร้อมในการสืบพันธุ์จะสูงตามค่า GSI % (Licht *et al*, 1983)

ในการศึกษาการพัฒนาของอวัยวะของกบนา ในระหว่างการพัฒนาของอวัยวะกบนา พบว่าเริ่มมีหลอดสร้างตัวอสุจิ (seminiferous tubules) เมื่อกบอายุสามเดือนและมีเซลล์สเปิร์มาโทโกเนียมภายในหลอดนี้เมื่ออายุได้สี่เดือนพร้อมกับปรากฏมีตัวอสุจิบ้างเล็กน้อย จากเดือนที่ห้าถึงเดือนที่หกอวัยวะจะขยายขนาดอย่างรวดเร็วและมีตัวอสุจิเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็ว พอกบอายุได้หกเดือนเป็นต้นไปจะพบเซลล์อสุจิจำนวนมากค้างอยู่ในหลอดสร้างตัวอสุจิ (Sretarugsa *et al*, 1997)

การทำงานของระบบสืบพันธุ์ในกบทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยเฉพาะกลไกการสร้างและการหลั่งฮอร์โมนจากอวัยวะสืบพันธุ์จะคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง คือถูกควบคุมโดย hypothalamo - pituitary gonadal axis (McCreery and Licht, 1984) กลไกการสืบพันธุ์ของกบถูกควบคุมโดยระบบประสาท ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองและอวัยวะสืบพันธุ์ ในกบเพศผู้ฮอร์โมนเพศจากอวัยวะทั้งเพศโทสต่อโรนที่มีบทบาทในการควบคุมการหลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน (gonadotropin releasing hormone ; GnRH) จากสมองส่วนไฮโปทาลามัส และฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง กบเพศเมียก็พบว่าฮอร์โมนอีสโตรเจนจากรังไข่ก็มีบทบาทในตนเองเดียวกัน (McCreery and Licht, 1984) GnRH มีผลต่อการหลั่งโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง ซึ่งโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองของกบมี 2 ชนิดเหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ ฮอร์โมนลูทีไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone; LH) และฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้งฮอร์โมน (follicle stimulating hormone; FSH) ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์และโครงสร้างสัมพันธ์กับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย (Licht *et al*, 1997) ซึ่ง LH ในเพศผู้มีเป้าหมายอยู่ที่เลย์ดีกเซลล์ (leydig cell) ของอวัยวะสืบพันธุ์ ทำให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเพศโทสต่อโรน ที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการสร้างตัวอสุจิ ส่วน FSH พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างสเตรอยด์ฮอร์โมน จากเซอโทไลเซลล์ (sertoli cell) ของอวัยวะสืบพันธุ์ได้ ระดับของ GnRH นี้จะขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลด้วย (Jokura and Urara, 1985) ได้มีการทดลองพบว่า GnRH เพิ่มขึ้นในช่วงที่เกิดการเจริญของอวัยวะและจะมีระดับต่ำเมื่อสิ้นสุดฤดูกาลสืบพันธุ์ ซึ่งจะลดระดับลงก่อนที่ระดับของแอนโดรเจนในพลาสมาจะต่ำลงทำให้ความสามารถในการสืบพันธุ์ลดลง (Zoeller and Moore, 1985) แสดงว่าการเข้าสู่หรือการสิ้นสุดฤดูสืบพันธุ์จะขึ้นอยู่กับการหลั่งหรือหยุดหลั่ง GnRH จากไฮโปทาลามัส การฉีด GnRH สังเคราะห์จะสามารถเพิ่มระดับฮอร์โมนเพศโทสต่อโรนในพลาสมาและเพิ่มการเคลื่อนที่ (mobilization) ของตัวอสุจิ (Andreoletti *et al*, 1980) นอกจากนี้การฉีดสารที่มีฤทธิ์เหมือนกับ GnRH (buserelin) ยังสามารถเพิ่มปริมาณของแอนโดรเจนในอวัยวะได้ด้วย (Pierantoni *et al*, 1984)

จากการศึกษาแบบแผนการหลั่งของฮอร์โมนเพศในกบนาเพศผู้และเพศเมียที่โตเต็มที่ในรอบหนึ่งปีพบว่า ปริมาณเพศโทสต่อโรนในกบนาเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มสูงขึ้นในเดือนมีนาคม ไปจนถึงเดือนตุลาคมและฮอร์โมนนี้จะมีปริมาณต่ำในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ การหลั่งของฮอร์โมนอีสตราไดออล 17 ปีตัวในกบเพศเมียมีแบบแผนการหลั่งเช่นเดียวกับการหลั่ง

ของฮอริโมนเทสโทสเตอโรน (Tangpraprutgul *et al*, 1996) กบนาเพศผู้เริ่มพร้อมที่จะสืบพันธุ์ในฤดูฝน คือในเดือนพฤษภาคมและต่อไปเรื่อย ๆ ถึงเดือนตุลาคมแต่พอเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นฤดูแล้งกบนาจะไม่มี การสืบพันธุ์ (Pariyanonth *et al*, 1985) นอกจากนี้การขนย้ายและการกักขังสัตว์ทดลองมีผลต่อระดับความเข้มข้นของฮอริโมนในพลาสมาได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Tangpraprutgul and Pariyanonth, 1999 พบว่ากบนา *Rana tigerina rugulosa* และกบบูลฟรอก *R. catesbeiana* ที่ทำการเคลื่อนย้ายจากบ่อเลี้ยงมาที่ห้องทดลองและเก็บไว้เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงก่อนทำเก็บตัวอย่างเลือดโดยวิธี Trunk blood นั้นพบว่าในกบนาเพศผู้ทั้ง 2 สปีชีส์จะมีระดับฮอริโมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาลดลงต่ำกว่ากบในกลุ่มควบคุมที่ทำการเก็บเลือดจากบ่อเลี้ยงทันทีโดยในกบนาเพศผู้ลดลง 60 - 70% ในขณะที่กบบูลฟรอกเพศผู้ลดลง 50 - 60 % ส่วนในกบนาเพศเมียพบว่าฮอริโมนอีสโตรเจนลดลง 70-75 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ในกบบูลฟรอกเพศเมียการขนย้ายจะไม่มีผลต่อระดับฮอริโมนอีสโตรเจน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

กบนาเพศผู้ *Rana rugulosa* อายุ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน อย่างละ 40 ตัว จากโครงการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงกบ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทรายอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรีนำมาเลี้ยงในอ่างเลี้ยงกบของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ มีโปรตีนระหว่าง 28-35 เปอร์เซ็นต์ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ทุก 2 วัน

สารเคมี

Charcoal reagent	: WHO RIA reagent programme, Switzerland
Dextran reagent	: WHO RIA reagent programme, Switzerland
Diethyl ether	: E. Merk, Germany
Dioxane	: E. Merk, Germany
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	: E. Merk, Germany
Ethanol (95%)	: องค์การสุราสรรพสามิต โรงงานสุราอยุธยา
Gelatin	: Difco laboratories, USA
Heparin	: Leo, USA
Methylparathion	: Bayer (ไบเออร์ไทย) จำกัด
POPOP (1,4-bis [5 – phenyl – 2 oxazolyl] benzene; 2, 2 –P-phenylene-bis [5-phenyloxazole])	: Sigma chemical company, USA
POP (2,5 – dipheny loxazole)	: Sigma chemical company, USA
Sodium chloride	: E Merk, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	: E. Merk, Germany
Thiomersal	: Sigma chemical company, USA

Toluene : E. Merk, Germany

ฮอร์โมนและแอนติบอดี

Testosterone antisera : WHO RIA reagent programme, Switzerland

Testosterone standard : WHO RIA reagent programme, Switzerland

(1, 2, 6, 7, ³H) testosterone : WHO RIA reagent programme, Switzerland

อุปกรณ์

Beta liquid scintillation counter : Wallac, Finland

(model 1218-811)

Dri-block heater (model DB-3) : Tecam laboratory and industrial equipment, USA

Dubnoff incubator shaker (model 3575 -1) : Labline instrument Inc. , USA

Dynac centrifuge : Clay-Adam, Bectom-Dickenson company, USA

Magnetic stirror (model s-18520) : Thermoline corporation, USA

pH meter (model EP 500/11345) : Eutech Cybernetics, Singapore

Refrigerated centrifuge (model PR-J) : International equipment company, USA

Vortex mixer (model M – 16715) : Thermolyne corporation, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้กบนาเพศผู้ *Rana rugulosa* 6 กลุ่ม อายุ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน กลุ่มละ 40 ตัว

ทั้งหมด 240 ตัวโดยนำกบมาจากบ่อเลี้ยงที่จังหวัดเพชรบุรี มาเลี้ยงไว้ในอ่างเลี้ยงกบบริเวณภาค วิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 7 วันก่อนทำการทดลอง

การแบ่งสัตว์ทดลองตามกลุ่มอายุ

มี 6 กลุ่มทดลอง ใช้กบนาอายุ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน กลุ่มละ 20 ตัว ซึ่งนำหนักแต่ละตัวแล้ว นำแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำและเปลี่ยนน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน ทุก 2 วัน เมื่อครบ 60 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะของสัตว์ทดลอง โดยในแต่ละกลุ่มเก็บตัวอย่างในฤดูสืบพันธุ์ของกบคือตั้งแต่เดือนเมษายน – กันยายน (Tangpraprutgul *et al*, 1996) รวมทั้งกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะเดียวกัน กลุ่มอายุละ 20 ตัว

การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากชั่งน้ำหนักตัวแล้ว เก็บเลือดจาก trunk blood ด้วยวิธี decapitation ในช่วงเวลา 8.00 – 12.00 น. โดยใช้ heparinized tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นพลาสมาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ด้วยวิธี RIA ต่อไป

การเก็บอวัยวะ

หลังจากเก็บเลือดจาก trunk blood แล้วแยกอวัยวะออกมาทั้งสองข้าง ซึ่งนำหนักแล้วแช่ใน Bouin 's solution ทันททีเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเนื้อเยื่อลงใน 70% alcohol และเปลี่ยนใหม่ทุก 1 สัปดาห์ จนกว่าจะหมดสีเหลืองของ Bouin 's solution

การวิเคราะห์หาปริมาณออร์โมนเทสโทสเดอโรนด้วยวิธี RIA

การเตรียมสารละลายสำหรับ RIA

1. Buffer solution จำนวน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.6	กรัม
Gelatin	1.0	กรัม
Sodium chloride	8.8	กรัม
Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35	กรัม
Thiomersal	0.1	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer และอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมดทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติมสารเคมีที่เหลือลงไปทีละอย่าง แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1000 มิลลิลิตร นำไปวัด pH ด้วย pH meter ให้ได้อยู่ระหว่าง 7.2 – 7.4 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension ประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

Buffer solution	100	มิลลิลิตร
Charcoal reagent	0.625	กรัม
Dextran reagent	0.625	กรัม

ละลาย dextran ลงใน buffer solution หลังจากนั้นเติม charcoal ลงไปกวนด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุการใช้งาน 1 เดือน (ขณะที่ใช้ต้องกวนตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส)

3. Scintillation fluid ประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

Dioxane	200	มิลลิลิตร
POPOP	0.35	กรัม
PPO	5.5	กรัม
Toluene	1000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมให้เข้ากันในขวดแก้วสีน้ำตาล กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เตรียมก่อนใช้อย่างน้อย 1 สัปดาห์

4. Testosterone antisera

นำ testosterone antisera จาก WHO ซึ่งอยู่ในสภาพที่ถูกทำให้แห้ง (lyophilized) มาเติม buffer solution 10 มิลลิลิตรต่อขวด เขย่าให้ละลายจนหมด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมแล้วใช้ทันที และเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5. Testosterone working tracer

จาก (1, 2, 6, 7, ^3H) testosterone ซึ่งละลายอยู่ใน toluene : ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น testosterone stock tracer มีความแรง 250 ไมโครคูรีต่อลิตร นำมาเจือจางให้ได้ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร โดยการนำ testosterone stock tracer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเป่าให้แห้งด้วย air compressor หลังจากนั้นเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ testosterone stock tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. Testosterone standard

เตรียมจากสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรน ของ WHO ที่มีความเข้มข้น 220 นาโนโมลต่อลิตร โดยนำสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนมา 100 ไมโครลิตร เติม buffer solution 10 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วนำไป heat ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะได้สารละลายเทสโทสเตอโรนที่มีความเข้มข้น 2.2 นาโนโมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 1,100 เฟมโตโมล ต่อ 500 ไมโครลิตร จนถึง 17 เฟมโตโมล ต่อ 500 ไมโครลิตร เพื่อใช้ทำกราฟของฮอริโมนมาตรฐาน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรน

ลำดับที่	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	Buffer solution (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมโตโมลต่อ 500 ไมโครลิตร)
1	Stock solution	0.5	-	1100
2	1	2.0	2.0	550
3	2	2.0	2.0	275
4	3	2.0	2.0	138
5	4	2.0	2.0	69
6	5	2.0	2.0	34
7	6	2.0	2.0	17

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

มีวิธีการดังนี้

1. เปิดพลาสติกประมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (conical tube) ตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate)
2. เติมอีเทอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย direct mix นานหลอดละ 1 นาที
3. ทำการแยกชั้นอีเทอร์ออกจากชั้นพลาสติกโดยนำหลอดทดลองที่อยู่ใน test tube rack วางบนภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้ง ผสมกับ 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol แล้วจะทำให้ชั้นล่างของหลอดทดลองซึ่งเป็นพลาสติกจะแข็งตัว ส่วนชั้นบนจะเป็นฮอร์โมนที่ถูกสกัดออกมาด้วยอีเทอร์ เทส่วนบนลงในหลอดทดลอง (assay tube) อีกชุดหนึ่ง
4. นำหลอดทดลองชุดใหม่ไปทำการระเหยอีเทอร์ ด้วยการทำให้แห้งโดยนำหลอดไปใส่ไว้ใน dri block heater ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกว่าอีเทอร์จะระเหยไปหมด
5. นำหลอดทดลองมาเติม buffer solution หลอดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง direct mix เพื่อให้ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดลงมาละลายอยู่ใน buffer solution ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง
6. เปิด testosterone working tracer 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ดังตารางที่ 3

7. ปิเปต testosterone antisera 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันนำไปตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง

8. ปิเปต charcoal suspension 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในถาดน้ำแข็งนาน 15 นาที

9. นำไปปั่นเพื่อแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal suspension ออกด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

10. เทส่วนที่เป็น bound form ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณฮอริโมนด้วยเครื่อง Beta – liquid scintillation counter นานหลอดละ 5 นาที

ในการทำ RIA ทุกครั้งจะทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยการนำสารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรนที่เตรียมไว้แล้ว (ตารางที่ 2) มาใส่ในหลอดทดลอง (assay tube) แต่ละความเข้มข้นใช้ 500 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลอด และความเข้มข้นละ 3 หลอด (triplicate) หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกับหลอดทดลองตัวอย่าง จากข้อ 6 เป็นต้นไป

ตารางที่ 3 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอริโมนเทสโทสเตอโรน

หลอดทดลอง	Assay buffer (ไมโครลิตร)	Tracer (ไมโครลิตร)	Antibody (ไมโครลิตร)		Charcoal Suspension
TC	600	100	-	ทิ้งไว้ที่	-
NSB	600	100	-	4 องศา	200
MB	500	100	100	เซลเซียส	200
สารละลายมาตรฐาน	500	100	100	นาน	200
เทสโทสเตอโรน				18-24	
สารตัวอย่าง	500	100	100	ชั่วโมง	200

หมายเหตุ : TC = total count

NSB = non specific binding

MB = maximum binding

การหาความสามารถในการสกัดฮอร์โมนตัวอย่าง (% Recovery)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทุกครั้ง จะหา % recovery ได้ดังนี้

ปิเปต tracer 50 ไมโครลิตรแล้วเติม pool serum 150 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอด นำไปเติมอีเทอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer หลังจากนั้นทำการแยกชั้น โดยวางบนถาดน้ำแข็งแห้ง เพื่อให้ส่วนของฮอร์โมนถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของอีเทอร์แล้วนำไป heat จนแห้ง แล้วล้างฮอร์โมนจากหลอดด้วย buffer solution 500 ไมโครลิตร ปิเปตไปใส่หลอดทดลองอีกชุด 250 ไมโครลิตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ recovery

ปิเปต tracer 50 ไมโครลิตร ใส่ใน counting vial นำมาเติม buffer solution 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 vial เพื่อหา total count recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ Rec}) \times 2}{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR})} \times 100$$

การคำนวณผล RIA

โดยนำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute, cpm) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกัน 2 vial ในแต่ละตัวอย่าง และ 3 vial สำหรับ TC, NSB และสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐานนำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วหักออกด้วยค่า cpm เฉลี่ยของ NSB ทุกตัวอย่างยกเว้น TC หลังจากนั้นนำค่าของสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐานไปเขียนกราฟบน semi – logarithm ระบุว่า cpm เฉลี่ยของมาตรฐาน กับ log ความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งกราฟดังกล่าวสามารถอ่านค่าปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจากค่า cpm ของสารตัวอย่างได้

การประเมินความเชื่อถือได้ของ RIA

ความเชื่อถือได้ของวิธีการที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ประเมินได้จากความจำเพาะ (specificity), ความแม่นยำ (precision), ความถูกต้อง (accuracy) และความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ซึ่งอาศัยตามวิธีการของ Ekins, 1970 และ Abraham, 1974 มีรายละเอียดดังนี้

ความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดี กับ แอนติเจนหรือฮอร์โมน และสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมน ที่ต้องการวิเคราะห์ได้มากน้อยเพียงใดถ้าแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูงก็จะทำปฏิกิริยากับ ฮอร์โมนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และจะไม่ทำปฏิกิริยากับ สารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ ต้องการวิเคราะห์ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์หรือสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งเราเรียกปฏิกิริยาการทดสอบนี้ว่า cross reaction คำนวณได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ cross reaction} = \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ 50\%}}{\text{ปริมาณสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ 50\%}} \times 100$$

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน และสารอื่น ๆ ที่นำมาตรวจสอบ จาก Sufi, Donaldson and Jeffcoate, 1986

ฮอร์โมน	% Cross reaction
Testosterone	100
5 α dihydroxytestosterone	77.02
5 α dihydrotestosterone	14.0
4 – androstenedione	1.62
5 α androstenediol	6.0
Cortisol	0.0001

ความแม่นยำ (precision)

คือความสามารถในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างชนิดหนึ่ง ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง แล้วค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันหรือใกล้เคียงกันมาก ซึ่งทดสอบความแม่นยำโดยทำการวิเคราะห์ สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสามระดับคือ ระดับสูง ระดับปกติ และระดับต่ำ มาวัดหาปริมาณ

ฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำซ้ำกันอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง เพื่อหาความแม่นยำในภาวิเคราะห์ แต่ละระดับความเข้มข้น ซึ่งจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% co-efficient variance หรือ % CV) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% CV = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต (\bar{x})}} \times 100$$

ความถูกต้อง (accuracy)

คือการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแล้วเติมลงไปนสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแน่นอน ไปผ่านการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้ กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่าความถูกต้องจากสูตรดังนี้

$$\% \text{ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

ความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity)

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของสารที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ซึ่งเป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารมาตรฐานทำให้ได้ค่าน้อยที่สุด ซึ่งสามารถแยกออกจากศูนย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทำได้โดยตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (blank) และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นที่นำมาทำกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน x เป็นเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว (% bound) และ y คือ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวหาได้จาก

$$\% bound = \frac{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของสารมาตรฐาน} - \text{NSB}}{\text{ค่า cpm เฉลี่ยของ MB} - \text{NSB}} \times 100$$

การทำ Paraffin section ของอวัยวะกะบนา

เมื่อทำการทดลองครบ 60 วัน นำกบมา Autopsy โดยเปิดดูอวัยวะออกแล้วตัดอวัยวะออกมาทั้ง 2 ข้าง ในทุกกลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 ตัว จากนั้นก็ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอน Fixation

นำเนื้อเยื่ออวัยวะทั้ง 2 ข้างที่ตัดออกมาใส่ลงใน Bouin's fluid ทันที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเนื้อเยื่อลงใน 70% ethyl alcohol เปลี่ยนใหม่จนกว่าจะหมดสีเหลืองของ picric acid เนื้อเยื่อสามารถเก็บได้ใน 70% ethyl alcohol โดยเปลี่ยนใหม่ทุกสัปดาห์

2. ขั้นตอน Dehydration

มีขั้นตอนการทำได้ดังนี้

2.1 ถ่ายเนื้อเยื่อจาก 70% ethyl alcohol ลงใน 90% ethyl alcohol ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2.2 ถ่ายเนื้อเยื่อลงใน 95% ethyl alcohol ซ้ำมึนโดยเปลี่ยน 95% ethyl alcohol 2 ครั้ง ใช้เวลาทั้งหมด 18-22 ชั่วโมง

2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงใน n-butyl alcohol ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

3. ขั้นตอน Clearing

นำเนื้อเยื่อในข้อ 2.3 ไปใส่ไว้ใน xylene เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. ขั้นตอน Impregnation

ขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้อบ โดยปรับให้มีอุณหภูมิที่ 58 องศาเซลเซียสตลอดเวลา

4.1 ถ่ายเนื้อเยื่อที่อยู่ใน xylene ลงในขวดที่มี xylene + moltenwax อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที

4.2 เท xylene + wax ออกจากเนื้อเยื่อแล้วใส่ wax1 ที่หลอมเหลวแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

4.3 เทเอา wax 1 ออก แล้วใส่ wax 2 ที่หลอมเหลวแล้วลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ขั้นตอน Embedding

ขั้นตอนนี้ทำนอกตู้อบโดยเท wax₃ ที่หลอมเหลวแล้วใส่ลงใน block ที่เตรียมไว้แล้ว นำเนื้อเยื่อออกจาก wax₂ วางลงใน block ที่มี wax₃ อยู่ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วค่อยเอาออกจาก block ได้

6. ขั้นตอนการตัด Section

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอน Embedding แล้วไปตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 6 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปติดบนสไลด์ โดยใช้ egg albumin

7. ขั้นตอน Hydration

นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์มาล้าง paraffin ออกโดยใช้ xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนลงใน 95 % n-butyl alcohol, 70 % ethyl alcohol, น้ำประปา ขั้นตอนละ 3 นาที

8. ขั้นตอน staining

เป็นขั้นตอนการย้อมสีด้วย Haematoxylin และ Eosin มีวิธีการทำดังนี้

8.1 นำสไลด์ที่ผ่านขั้นตอน hydration มาย้อมสี Haematoxylin เป็นเวลา 10 – 12 นาที นำไป differentiate ด้วย acid alcohol 5 – 10 วินาที แล้วนำไปล้างในน้ำประปาที่เปิดเบา ๆ ตลอดเวลานาน 10 นาที

8.2 เปลี่ยนถ่ายลงใน 70 % ethyl alcohol และ 90 % ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาที

8.3 นำสไลด์ไปย้อมด้วยสี Eosin นาน 3 – 5 นาที

8.4 ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95 % ethyl alcohol นาน 15 – 30 วินาที

8.5 เปลี่ยนถ่ายลงใน n-butyl alcohol , xylene ครั้งที่ 1 และ xylene ครั้งที่ 2 นานขั้นตอนละ 5 นาที

8.6 นำสไลด์มา mount ด้วย canada balsam ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บใส่ในกล่องเก็บสไลด์ให้เรียบร้อย

บันทึกผลการทดลองโดยนำสไลด์มาถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

การแปลผลทางสถิติ

ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่วัดได้ ในแต่ละกลุ่มนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ T-test two way analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสม

1. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 2 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 477 ± 69.42 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (533 ± 46.13 พิโกโมลต่อลิตร) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการชั่งน้ำหนักอวัยวะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (19.2 ± 2.2 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม (8.7 ± 0.1 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

2. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 4 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 174 ± 15.09 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (207 ± 23.95 พิโกโมลต่อลิตร) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการชั่งน้ำหนักอวัยวะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (74.6 ± 49.8 เปอร์เซ็นต์) จะมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม ($39.5 \pm$ เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

3. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 6 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 1704 ± 70.59 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (2070 ± 71.65 พิโกโมลต่อลิตร) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการซึ่งนำหนักอวัยวะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (220 ± 10 เปอร์เซ็นต์) จะมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม (210 ± 10 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

4. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 8 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 16682 ± 146.06 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (2371 ± 163.05 พิโกโมลต่อลิตร) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการซึ่งนำหนักอวัยวะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (150 ± 8 เปอร์เซ็นต์) จะมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (180 ± 6 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

5. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 10 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 1352 ± 110.51 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (1675 ± 107.70 พิโกโมลต่อลิตร)

และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการชั่งน้ำหนักอัตรหะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (200 ± 10 เปอร์เซ็นต์) จะมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (230 ± 20 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

6. ผลของเมทิลพาราไทออนต่อค่า GSI% และระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน

ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมของกบนาเพศผู้ที่ถูกเลี้ยงในน้ำที่มีพาราไทออนละลายอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาที่มีอายุได้ 12 เดือน พบว่าในกลุ่มทดลองมีปริมาณฮอร์โมนเฉลี่ย \pm SEM คือ 3248 ± 323.45 พิโกโมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณฮอร์โมนจะมีปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (4457.89 ± 423.93 พิโกโมลต่อลิตร) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5) จากการชั่งน้ำหนักอัตรหะและน้ำหนักตัวแล้วนำมาหาค่า GSI % ในกลุ่มทดลอง (170 ± 20 เปอร์เซ็นต์) จะมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (200 ± 20 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ย ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) ของกบนาเพศผู้ *R.rugulosa* ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน

อายุ (เดือน)	ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (T) (pmol/l)		%การลดลง ของปริมาณ (T)
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลอง	
4 เดือน	533 \pm 46.13 (n=13)	477 \pm 69.42 (n=13)	10.50
6 เดือน	207 \pm 23.95 (n=15)	174 \pm 15.09 * (n=16)	15.94
8 เดือน	2070 \pm 71.65 (n=15)	1704 \pm 70.59 * (n=17)	17.68
10 เดือน	2371 \pm 163.05 (n=20)	1682 \pm 146.06 * (n=20)	29.05
12 เดือน	1675 \pm 107.70 (n=20)	1352 \pm 110.51 * (n=20)	19.18
14 เดือน	4457.89 \pm 423.93 (n=19)	3248 \pm 323.45 * (n=19)	27.12

* แสดงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนระหว่างกลุ่มหลังการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ $p < 0.05$

n หมายถึงจำนวนของสัตว์ทดลอง

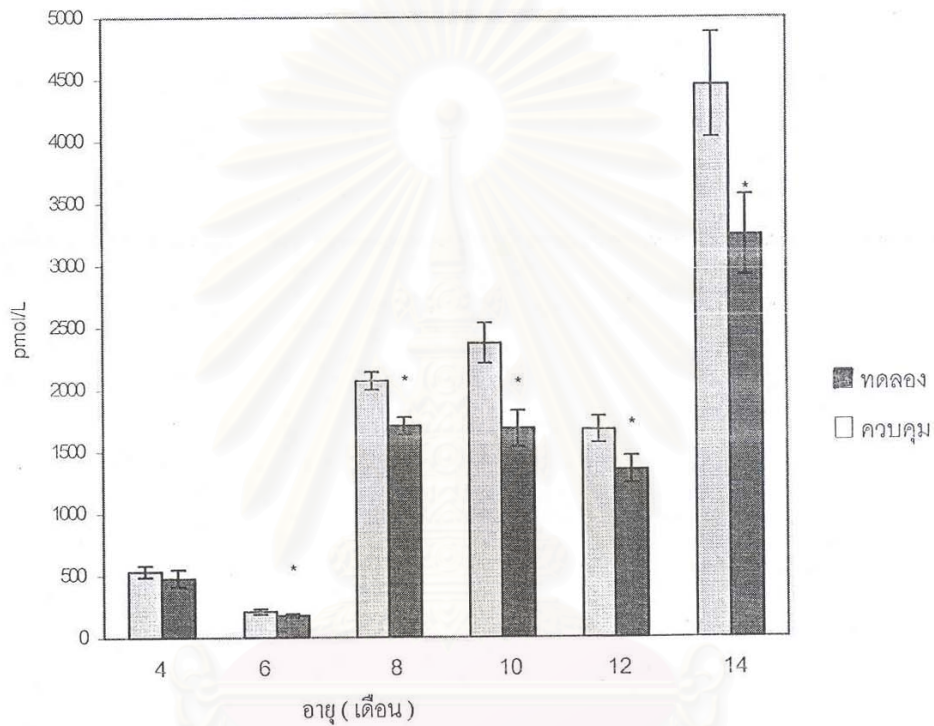
ตารางที่ 6 แสดงค่าค่า GSI% ของกบนาเพศผู้ *R. rugulosa* อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน
ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน

อายุหลังการทดลอง (เดือน)	กลุ่มควบคุม GSI%	กลุ่มทดลอง GSI%
4 เดือน	8.7 \pm 0.1 (n=13)	19.2 \pm 2.2 (n=13)
6 เดือน	39.5 \pm 5 (n=15)	74.6 \pm 49.8 (n=16)
8 เดือน	210 \pm 10 (n=15)	220 \pm 10 (n=17)
10 เดือน	180 \pm 6 (n=20)	150 \pm 8 (n=20)
12 เดือน	230 \pm 20 (n=20)	200 \pm 10 (n=20)
14 เดือน	200 \pm 20 (n=19)	170 \pm 20 (n=19)

n หมายถึงจำนวนของสัตว์ทดลอง

รูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยของกบนาหว้าอายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 12 เดือน กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน

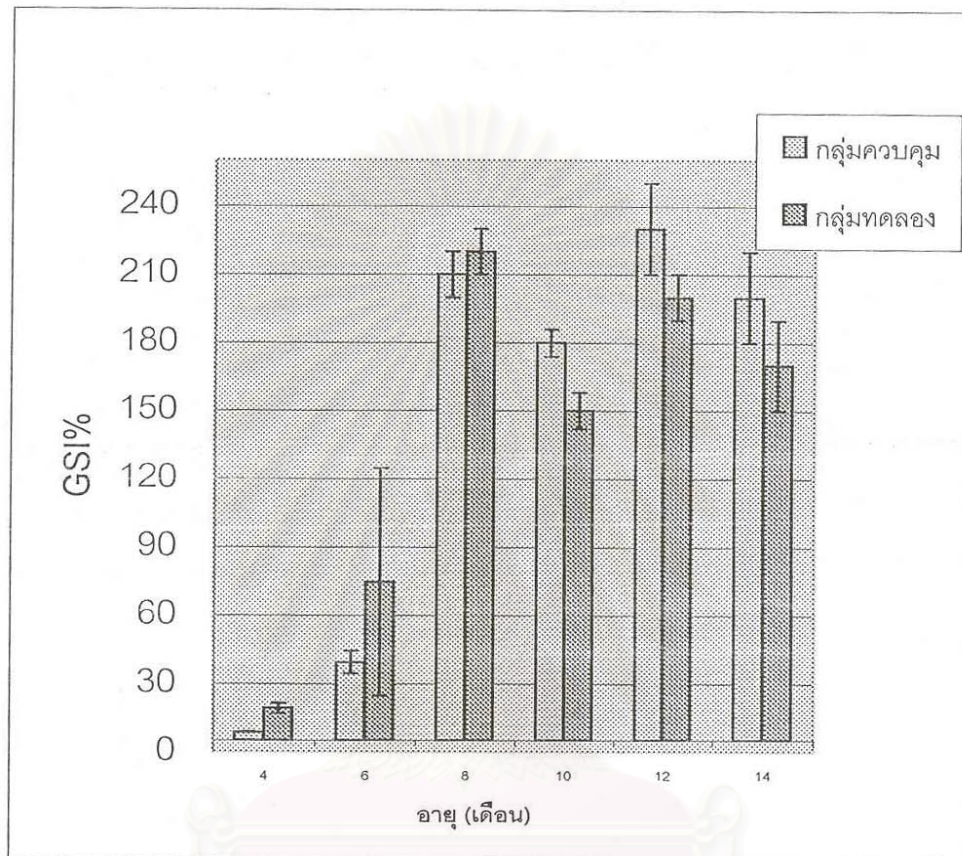
ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน



* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 กราฟแสดงค่า GSI% ของกบนาเพศผู้อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน และกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน.



ผลการศึกษาเนื้อเยื่ออัณฑะ

1. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออัณฑะของกบนาอายุ 4 เดือน ที่ได้รับเมทิลพาราไทออน ในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนาอายุ 4 เดือน ที่เริ่มต้นทดลองเมื่อกบนาอายุ 2 เดือน หลังจากได้รับเมทิลพาราไทออน พบว่า Leydig cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลักษณะนิวเคลียสและมีจำนวนเซลล์น้อย (ตารางที่ 9) พบนิวเคลียสหดตัวเป็นก้อนทึบในลักษณะของ pyknotic nucleus และมีการตายของ Leydig cell ในลักษณะที่เกิดการสลายตัวของนิวเคลียส (karyolysis) (รูปที่ 9-A,B) เมื่อเปรียบเทียบ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อของกบนา กลุ่มควบคุม (รูปที่ 8-A) ซึ่งมีสภาพปกติ เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กึ่งกลางนิวเคลียส บริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Leydig cell จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปและพบมากบริเวณใกล้ๆ เส้นเลือด และท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนา กลุ่มทดลองมีช่องว่าง (Lumen) เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 80 μm . (ตารางที่ 9) ภายในท่อประกอบไปด้วยเซลล์ระยะสเปิร์มาโตโกเนียและ 1° สเปิร์มาโตไซด์เป็นส่วนใหญ่ ช่อง Lumen กว้างและไม่พบเซลล์สเปิร์มาโตซัว (รูปที่ 7-B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 7-A) ซึ่งพบว่าท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Lumen ขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 140 μm . (ตารางที่ 9) และบริเวณผนังท่อมีเซลล์สืบพันธุ์เจริญอยู่ในระยะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์สเปิร์มาโตโกเนีย 1° สเปิร์มาโตไซด์ สเปิร์มาทิด และมีเซลล์สเปิร์มาโตซัวในบางท่อ (ตารางที่ 10)

2. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออัณฑะของกบนาอายุ 6 เดือน ที่ได้รับเมทิลพาราไทออนที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนาอายุ 6 เดือนที่เริ่มทดลองเมื่อกบนาอายุ 4 เดือน หลังได้รับเมทิลพาราไทออนพบว่ามีจำนวนของ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสลดลง (ตารางที่ 9)ที่นิวเคลียสพบการเปลี่ยนแปลงได้แก่ มีการรวมกลุ่มของโครมาตินที่บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียสและพบนิวเคลียสหดตัวเล็กลงเป็นก้อนทึบเนื่องจากการรวมกลุ่มกันของโครมาติน (pyknotic nucleus) และเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสถูกทำลายในบางบริเวณ (รูปที่ 12-Aและตารางที่ 10) รวมทั้งมีการตายของเซลล์ในลักษณะที่เกิดการสลายตัวของนิวเคลียส (รูปที่ 12-B) ในขณะที่ Leydig cell ของกบนา กลุ่มควบคุม (รูปที่ 11-A,B) เซลล์มีรูปร่าง

กลม ภายในไฮโดพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันชัดเจนอยู่กึ่งกลางนิวเคลียส บริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Leydig cell เรียงตัวอย่างหนาแน่นและพบมาก บริเวณใกล้ๆเส้นเลือด ลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์รัสบนากลุ่มทดลองเลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm นาน 60 วันพบว่าขนาดของท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Lumen แคบ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 120 μm . ภายในท่อปรากฏเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่ในปริมาณน้อย (รูปที่ 10-B และตารางที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 10- A) ซึ่ง Lumen ของท่อเซมินิเฟอร์รัสกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 220 μm . ภายในท่อมีเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่อย่างหนาแน่นกระจายอยู่ทั่วไป (ตารางที่ 9)

3. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออวัยวะของกบนาอายุ 8 เดือน ที่ได้รับเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนาอายุ 8 เดือน ที่เริ่มทดลองเมื่อกบนาอายุ 6 เดือน พบว่าจำนวนของ Leydig cell ที่พบอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสมีจำนวนลดลง และเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างได้แก่ การรวมของเซลล์และมีการรวมกลุ่มของโครมาตินที่บริเวณรอบๆเยื่อหุ้มนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียสฉีกขาด (รูปที่ 15-A) รวมทั้งพบนิวเคลียสหดตัวเล็กลง เป็นก้อนที่บวมซึ่งเกิดจากการกลุ่มกันของโครมาติน (รูปที่ 15-B และตารางที่ 10) ส่วน Leydig cell ของกบนากลุ่มควบคุม (รูปที่ 14-A,B) มีสภาพปกติ เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไฮโดพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กึ่งกลางนิวเคลียส บริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Leydig cell อยู่จำนวนมาก ลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนากลุ่มทดลองมี Lumen แคบเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 170 μm . (รูปที่ 13-B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 13-A) ซึ่งท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Lumen กว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 280 μm . ภายในท่อมีเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่จำนวนมาก

4. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออวัยวะของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือนที่ได้รับเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน

เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสและ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือนที่เริ่มต้นทดลองเมื่อกบนาอายุ 8 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงและการทำลายเนื้อเยื่อและ Leydig cell

เป็นจำนวนมาก มีเซลล์กระจายห่างๆกัน บางบริเวณถูกทำลายมากจนเกิดเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ และจำนวนของ Leydig cell ที่พบอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสนั้นมีน้อยมาก (ตารางที่ 9) มีการรวมของเซลล์ และการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาตินที่บริเวณรอบๆเยื่อหุ้มนิวเคลียสและนิวเคลียสหดตัวเล็กน้อยเป็นก้อนที่พบ เซลล์ตายในลักษณะที่เกิดการสลายตัวของนิวเคลียส (รูปที่ 18-A) และเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาด (รูปที่ 18-B และตารางที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 17-A,B) พบ Leydig cell สภาพปกติอยู่บริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส เซลล์ลีดี้ดิกมีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กลางนิวเคลียส มีเซลล์หนาแน่น ลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนาากลุ่มทดลองพบว่า Lumen มีขนาดแคบ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ $210 \mu\text{m}$. ผนังท่อมีลักษณะบาง (รูปที่ 16-B) ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาทิดเป็นจำนวนมาก ส่วนเซลล์สเปอร์มาโตซัวพบจำนวนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 16-A) พบว่าท่อเซมินิเฟอร์รัสมี Lumen กว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ $350 \mu\text{m}$. ผนังท่อหนาและเรียบ ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวอย่างหนาแน่น บริเวณกลางท่อ และเซลล์สเปอร์มาทิดอยู่บริเวณเยื่อรองรับพื้นฐาน (Basement membrane) รอบท่อเซมินิเฟอร์รัส

5. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออวัยวะของกบนาอายุ 12 เดือน ที่ได้รับเมทิลพาราไทออนความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสและ Leydig cell ของกบนาอายุ 12 เดือน หลังได้รับเมทิลพาราไทออน โดยเริ่มทดลองเมื่อกบนาอายุ 10 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสถูกทำลายมากและเป็นบริเวณกว้างทำให้บริเวณนี้เห็นเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ (รูปที่ 21-A,B) การเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell ประกอบด้วยการรวมกลุ่มของโครมาตินอยู่ที่บริเวณรอบๆเยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวเคลียสของ Leydig cell หดตัวเป็นก้อนที่พบ ซึ่งเกิดจากการจับตัวกันแน่นของเส้นใยโครมาตินและพบเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาด (รูปที่ 21-A) นอกจากนี้ยังพบว่า Leydig cell มีจำนวนน้อยมาก พบว่ามีเซลล์ตาย (รูปที่ 21- B) ความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell ในลักษณะต่างๆแสดงไว้ในตารางที่ 10 เนื้อเยื่อและ Leydig cell ปกติอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสของกบนาากลุ่มควบคุม (รูปที่ 20-A,B) มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กลางนิวเคลียส เซลล์มีการจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น โดยเฉพาะบริเวณรอบเส้นเลือด ไม่พบการทำลายเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส ลักษณะโครงสร้าง

ของท่อเซมินิเฟอร์สของกบนาากลุ่มทดลองพบว่า Lumen มีขนาดของท่อแคบ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 210 μm . ผนังรอบท่อมีลักษณะบาง (รูปที่ 19-B) ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนน้อย พบเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนมากเป็นส่วนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 19-A) ซึ่งพบว่าท่อเซมินิเฟอร์สมี Lumen ขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 420 μm . ผนังรอบท่อหนา ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนมาก (ตารางที่ 9) บริเวณกลางท่อและมีเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่บริเวณเยื่อรองรับพื้นฐาน รอบๆท่อเซมินิเฟอร์ส

6. ผลของเมทิลพาราไทออนต่ออวัยวะของกบนาอายุ 14 เดือน ที่ได้รับเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน

เนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์สของกบนาอายุ 14 ที่เริ่มทดลองเมื่อกบนาอายุ 12 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์สถูกทำลายเป็นบริเวณกว้างจนเห็นเป็นช่องว่าง ความรุนแรงและการเปลี่ยนแปลงในลักษณะต่างๆ (ตารางที่ 10) ได้แก่ มีการรวมของเซลล์และนิวเคลียสของ Leydig cell หดตัวเล็กลงเป็นก้อนทึบ (รูปที่ 24-A) พบการตายของเซลล์ในลักษณะที่เกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสและเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาด (รูปที่ 24-B) และจำนวนของ Leydig cell มีจำนวนน้อยมาก (ตารางที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบกับกบนาากลุ่มควบคุม (รูปที่ 23-A,B) ซึ่งมี Leydig cell กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นที่บริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ส เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กลางนิวเคลียส ลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์สของกบนาากลุ่มทดลอง มี Lumen ขนาดแคบ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 280 μm . (รูปที่ 22-B) ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนน้อย มีเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนมากเป็นส่วนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 22-A) ซึ่งพบว่าท่อเซมินิเฟอร์สมีขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 420 μm . ผนังรอบท่อหนา ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณกลางท่อ และเซลล์สเปอร์มาโตซัวอยู่บริเวณเยื่อรองรับพื้นฐาน รอบๆท่อเซมินิเฟอร์ส

ตารางที่ 9 ตารางเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ ลัยดิกส์เซลล์และขนาดของท่อเซมินิเฟอร์สใน กบนาเพศผู้ *R. rugulosa* อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิล พาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนานเป็นเวลา 60 วัน

	กลุ่ม	อายุ (เดือน)					
		4	6	8	10	12	14
1. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินิเฟอร์ส (μm)	ควบคุม	140	220	280	350	420	420
	ทดลอง	80	120	170	210	210	280
2. จำนวนลัยดิกส์เซลล์	ควบคุม	++	+++	+++	++++	++++	++++
	ทดลอง	+	++	++	+	++	+
3. จำนวนเซลล์สเปอร์มาโตโกเนีย	ควบคุม	++++	+++	++	+	+	+
	ทดลอง	+++	++	+	+	+	+
4. จำนวนของเซลล์สเปอร์มาโตไซต์ระยะแรก	ควบคุม	++++	+	++	+	+	+
	ทดลอง	++	++	+++	++	+	+
5. จำนวนของเซลล์สเปอร์มาทิด	ควบคุม	+	++	+	++	+	++
	ทดลอง	-	+	++	+++	++++	+++
6. จำนวนของเซลล์สเปอร์มาโตซัว	ควบคุม	+	++	+++	++++	++++	++++
	ทดลอง	-	+	++	+	++	+

++++ หมายถึง มากที่สุด ++ หมายถึง ปานกลาง - หมายถึง ไม่มี

+++ หมายถึง มาก + หมายถึง น้อย

ตารางที่ 10 ตารางเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆของลัษณิกเซลล์ในกบนาเพศผู้ *R. rugulosa* อายุ 4, 6, 8, 10,12 และ 14 เดือนที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนาน 60 วัน

การเปลี่ยนแปลง	อายุ (เดือน)					
	4	6	8	10	12	14
Swelling(การบวม)	+	+	+	+	-	+
Pyknosis (การหดตัวของนิวเคลียส)	++	+++	++	+++	++++	++++
Nuclear membrane disruption(การฉีกขาด)	+	++	+++	++++	++++	++
Karyolysis (การสลายตัวของ นิวเคลียส)	+	+++	++	++++	++++	+++
Necrosis of interstitial tissues (การตายของ เนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิ เฟอร์รัส)	-	+	-	++++	++++	+++

++++ หมายถึง มากที่สุด

+++ หมายถึง มาก

++ หมายถึง ปานกลาง

+ หมายถึง น้อย

- หมายถึง ไม่มี

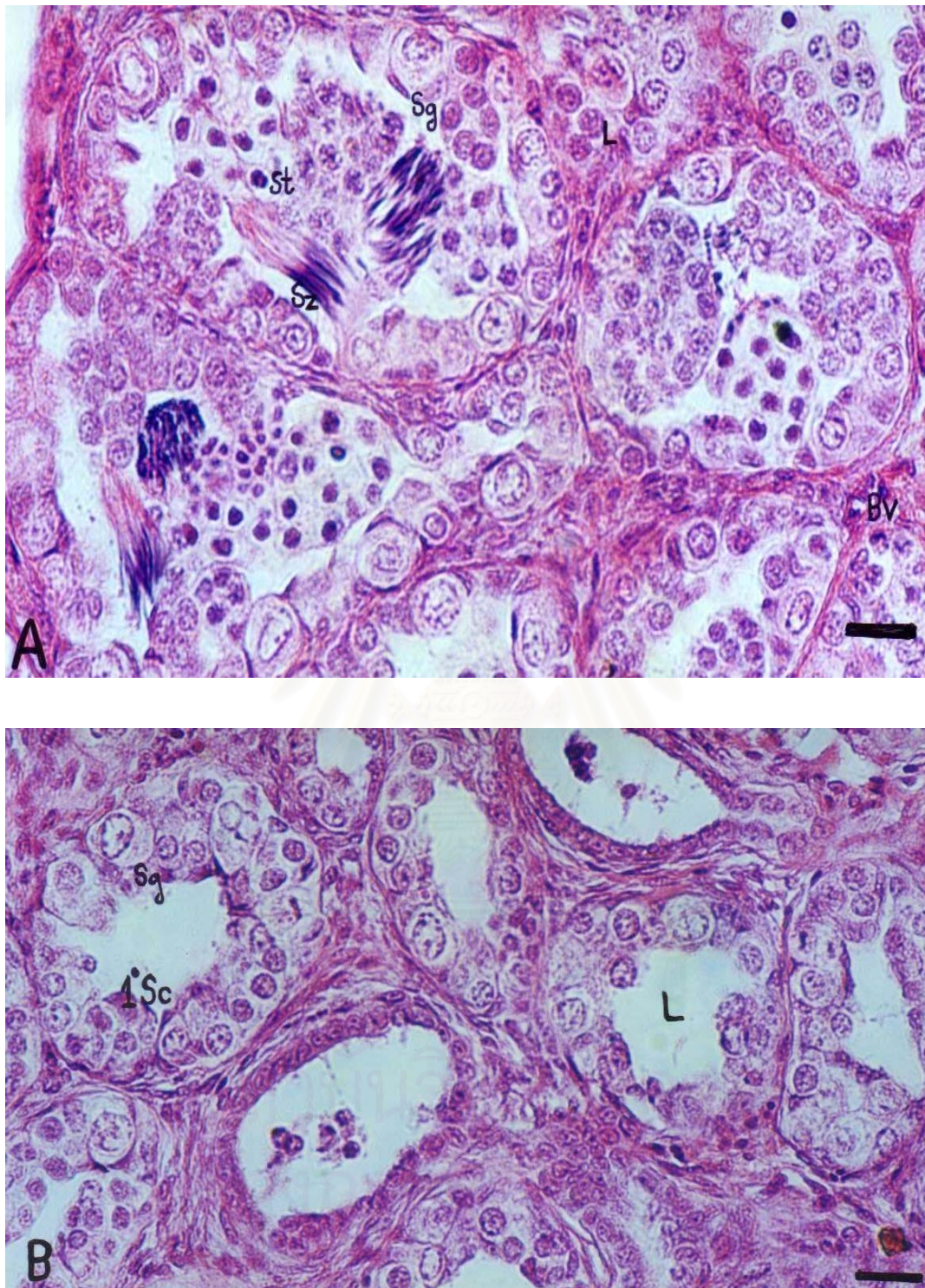
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7-A แสดงลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์สกลุ่มควบคุมประกอบด้วย Leydig cell (L) และเส้นเลือด (BV) ขนาดของท่อเซมินิเฟอร์สมี Lumen กว้างโดยเฉลี่ยประมาณ 140 μm . ภายในท่อเซมินิเฟอร์ส ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ คือ สเปออร์มาโตโกเนีย (Sg) 1^o สเปออร์มาโตไซด์ (1^oSc) สเปออร์มาทิด (St) และในบางท่อพบเซลล์สเปออร์มาโตซัว (Sz) จำนวนน้อย

7-B แสดงลักษณะโครงสร้างท่อเซมินิเฟอร์สของกลุ่มทดลอง ประกอบด้วยเซลล์ระยะ สเปออร์มาโตโกเนีย (Sg) สเปออร์มาโตไซด์ระยะแรก (1^oSc) ช่องตรงกลางท่อ (L) มีขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 80 μm . และไม่มีเซลล์สเปออร์มาโตซัว



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



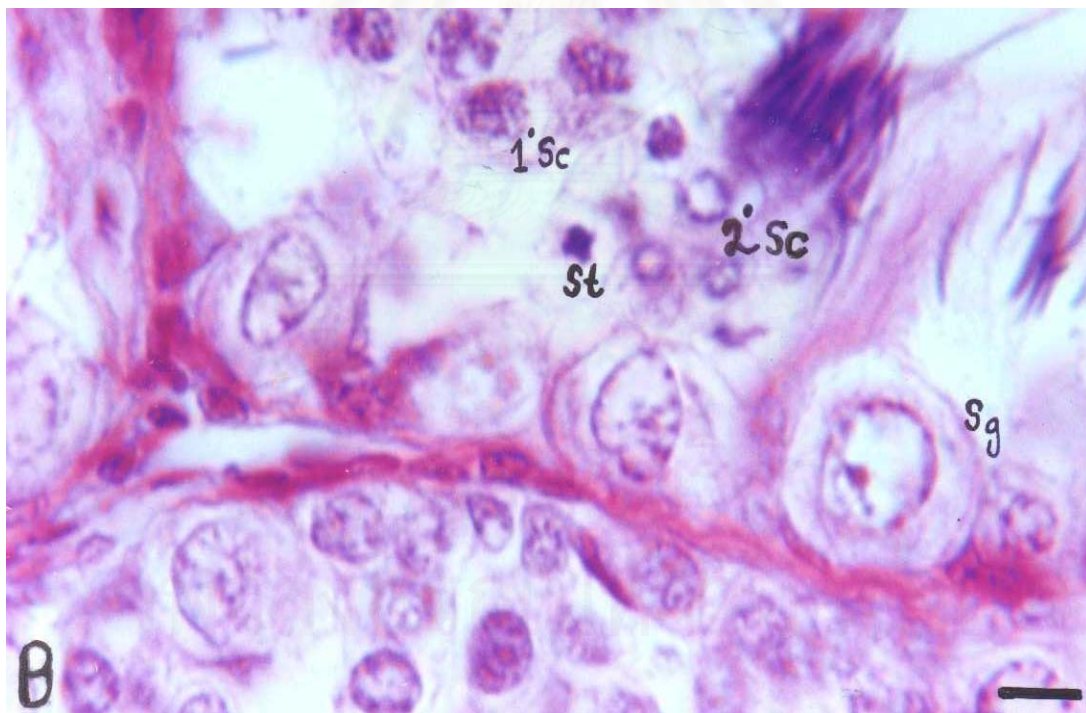
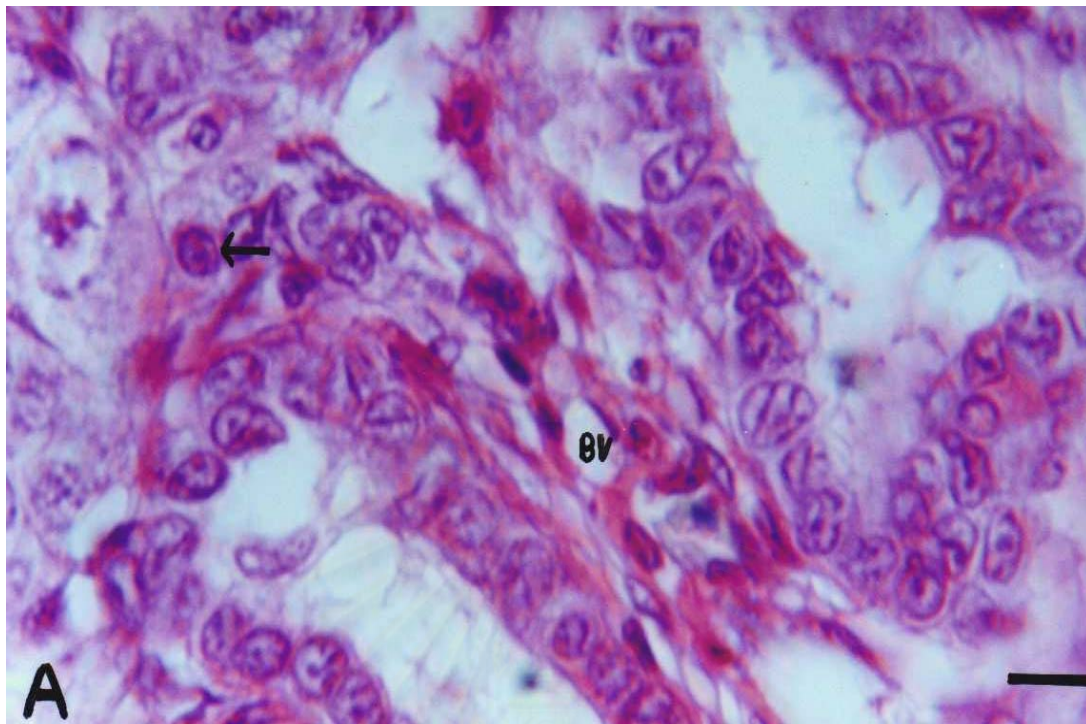
รูปที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules และ Interstitial tissue ของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน เข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

Scale Bar = 20 μ m. ย้อมสี Haematoxyline & Eosin

- 8-A แสดงลักษณะ Leydig cell ของกบนาากลุ่มควบคุมในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส เซลล์รูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมและมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่กลางนิวเคลียส (←) พบเซลล์กลุ่มนี้กระจายตัวอยู่ทั่วไปในบริเวณใกล้เส้นเลือด (BV)
- 8-B แสดงลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ ภายในท่อเซมินิเฟอร์รัส ประกอบด้วยเซลล์สเปิร์มาโตโกเนีย (Sg) สเปิร์มาโตไซต์ระยะแรก (1° Sc) สเปิร์มาโตไซต์ระยะที่สอง (2° Sc) สเปิร์มาทิด (St) และสเปิร์มาโตซัว (Sz)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



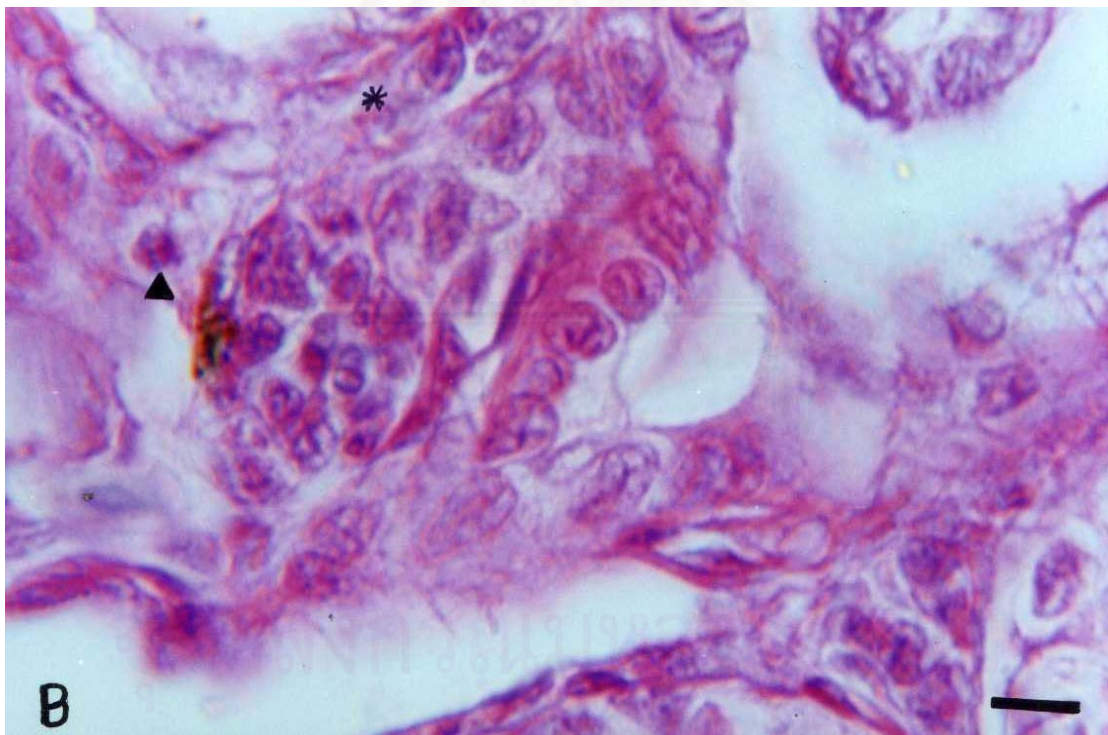
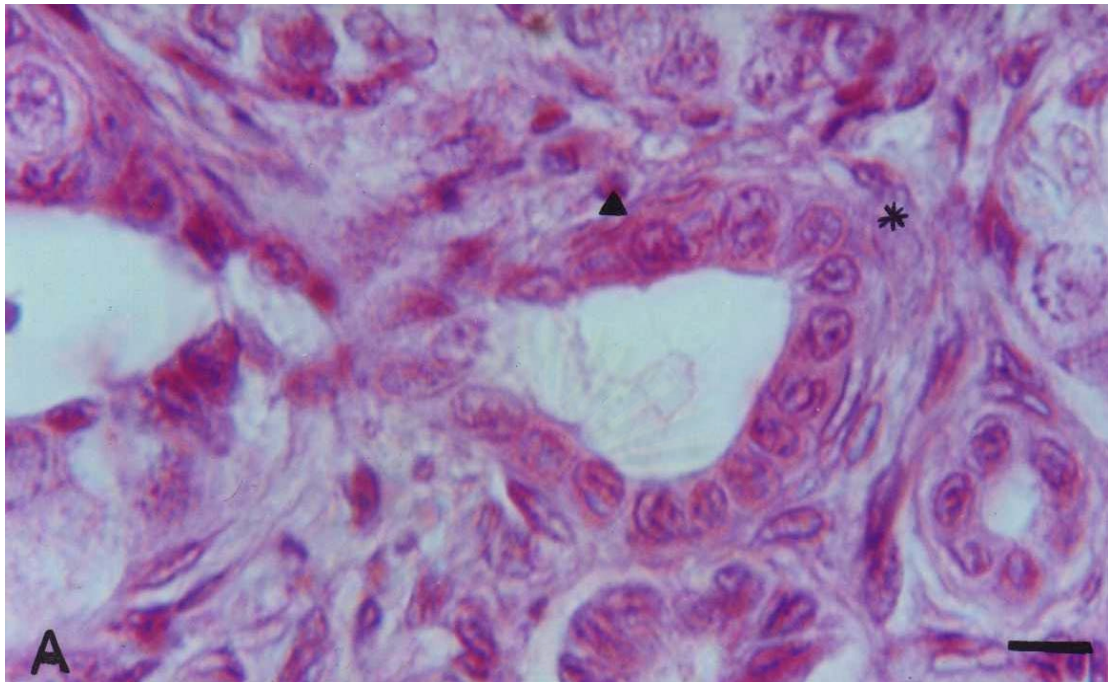
รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุม อายุ 4 เดือน

Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 9-A แสดงลักษณะ Leydig cell ที่เปลี่ยนแปลงไป มีนิวเคลียสหดตัวลงเป็นก้อนทึบ (▲) พบเซลล์ตายในลักษณะที่นิวเคลียสจางมองไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (*)
- 9-B แสดงลักษณะของ Leydig cell ของกลุ่มหลอดที่ตาย ในลักษณะที่เกิด karyolysis (*) และเซลล์ที่มีนิวเคลียสหดตัวเล็กลงเป็นก้อน ดิดสีเข้ม (▲) ในลักษณะที่เรียกว่า pyknotic nucleus



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



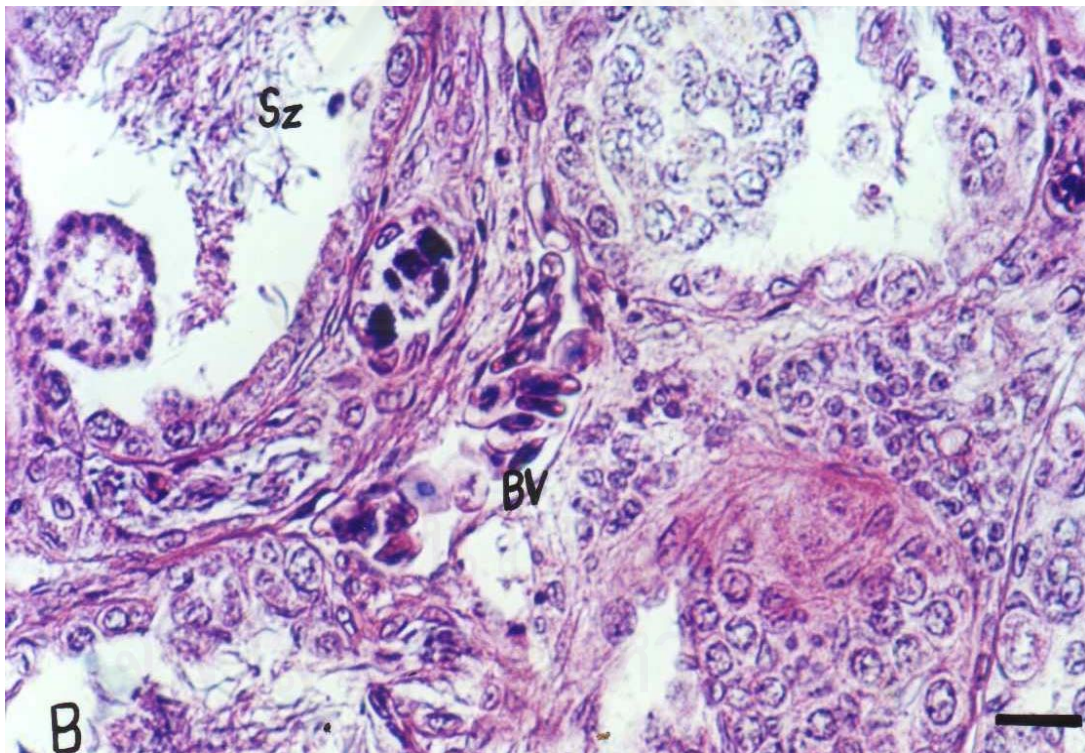
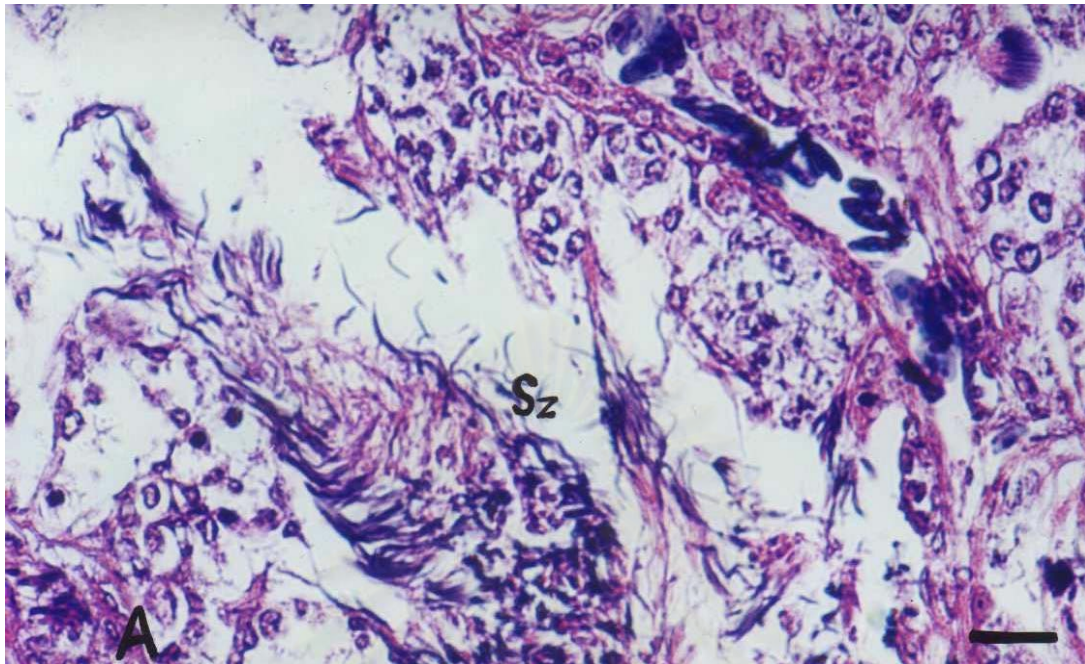
รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 4 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 10-A แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส พบเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) กระจาย
อยู่ทั่วไปภายในท่อที่มี Lumen ขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 220 μm .
- 10-B แสดงลักษณะโครงสร้างของ ท่อเซมินิเฟอร์สกลุ่มทดลอง ที่มี Lumen ขนาดแคบและมี
เส้นผ่าศูนย์กลาง Lumen ท่อเฉลี่ยประมาณ 120 μm . ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโต
ซัว (Sz) ในปริมาณน้อย (BV = เส้นเลือด).



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



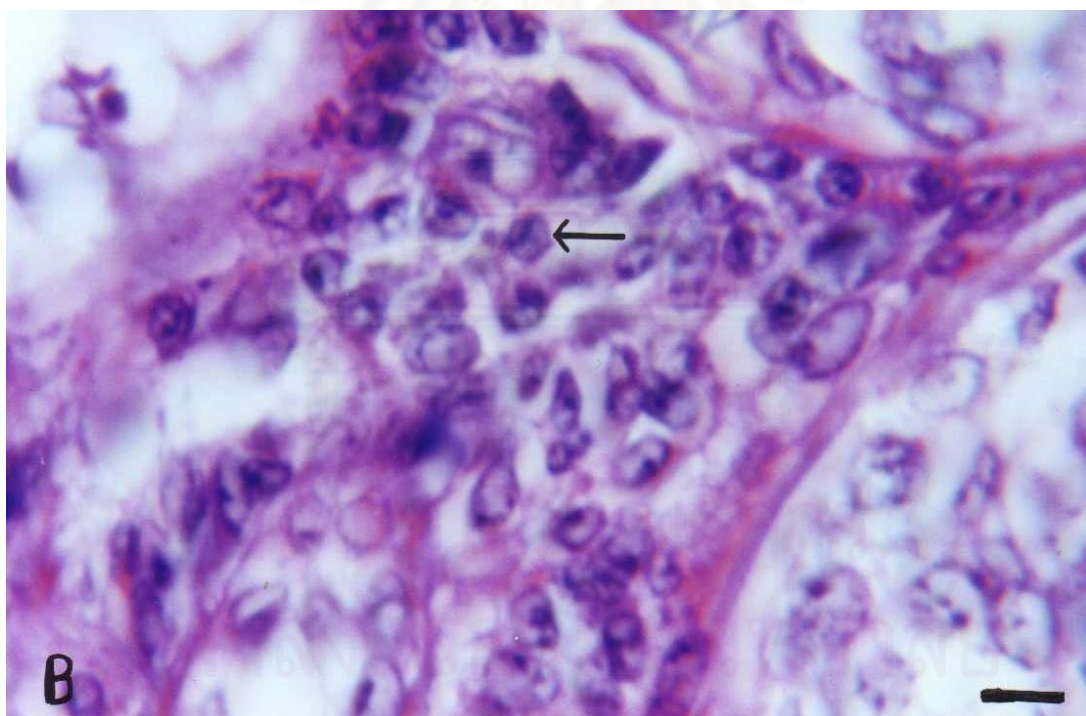
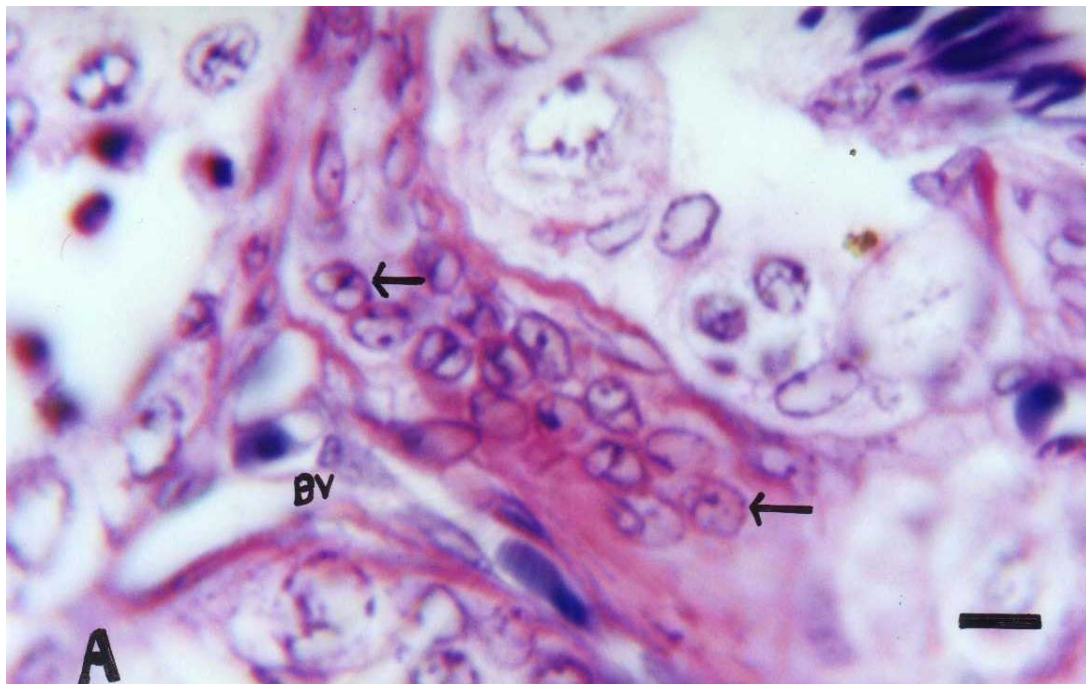
รูปที่ 10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules และ Interstitial tissue ของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน เข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

Scale Bar = 20 μm . ย้อมสี Haematoxyline & Eosin

11-A,B แสดงลักษณะ Leydig cell ของกบนากลุ่มควบคุมในบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่ กลางนิวเคลียส (←) เซลล์พวกนี้กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นในเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส โดยเฉพาะที่บริเวณใกล้กับเส้นเลือด (BV)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



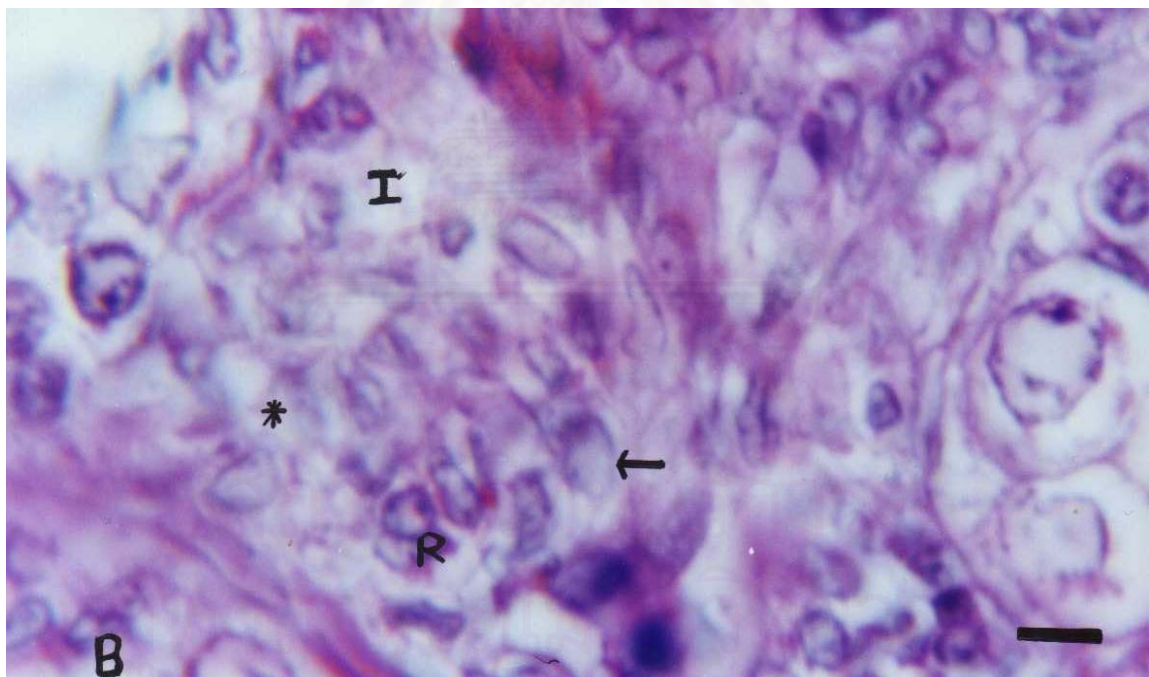
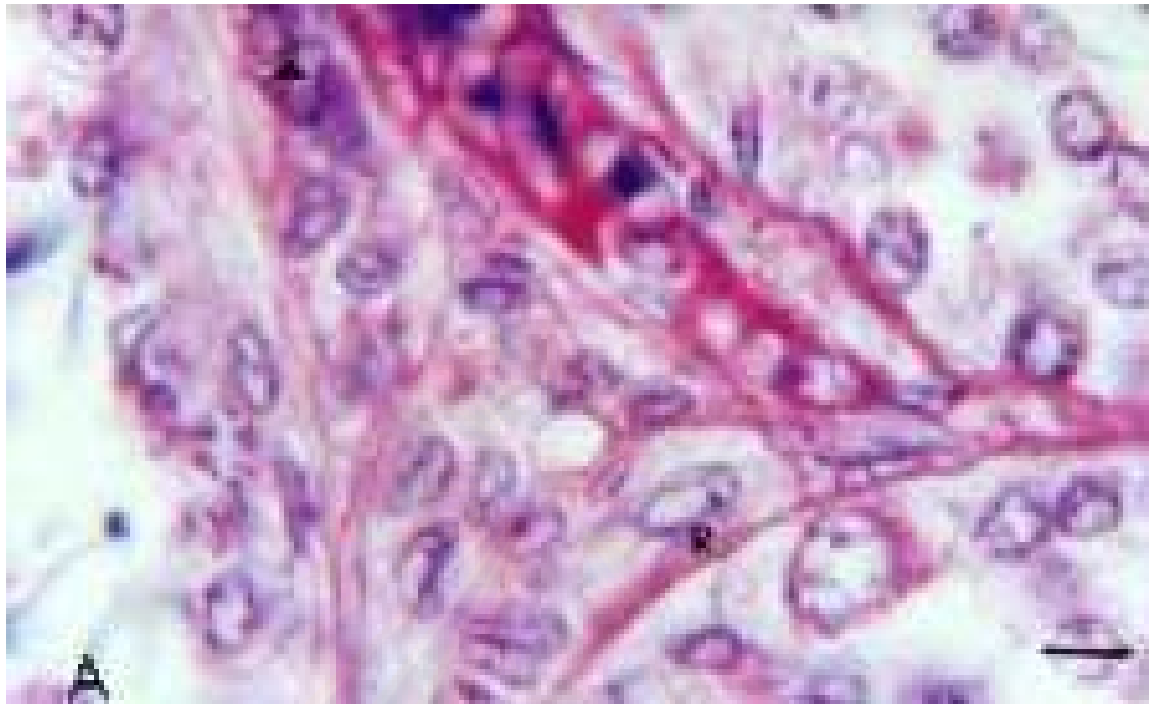
รูปที่ 11 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุม
อายุ 6 เดือน

Scale Bar = 10 μm . ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 12-A แสดงลักษณะผิดปกติของ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส ซึ่งมีการรวมกลุ่มของโครมาตินอยู่ที่บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (R) และนิวเคลียสมีการหดตัว เล็กลงเป็นก้อนทึบ (▲) พบ Leydig cell น้อยในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อ
- 12-B แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสที่ถูกทำลาย (I) พบมีการตายของ เซลล์ในลักษณะที่นิวเคลียสจางมองไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (*) และมีการรวมกลุ่มของโครมาตินอยู่ที่บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (R) เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาด (←)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 6 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

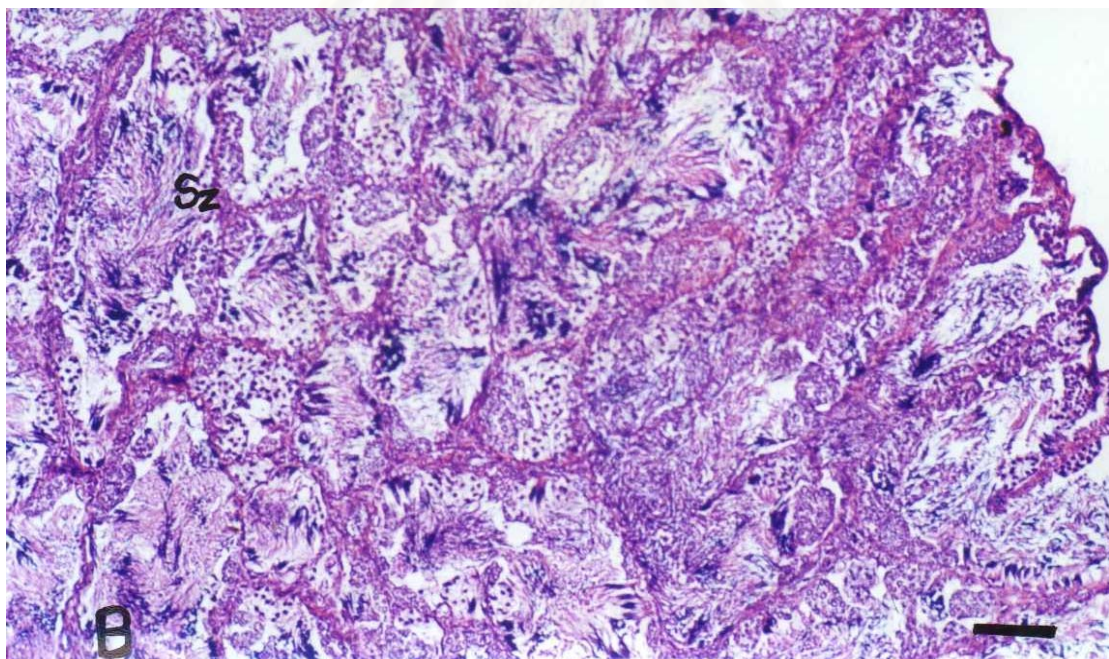
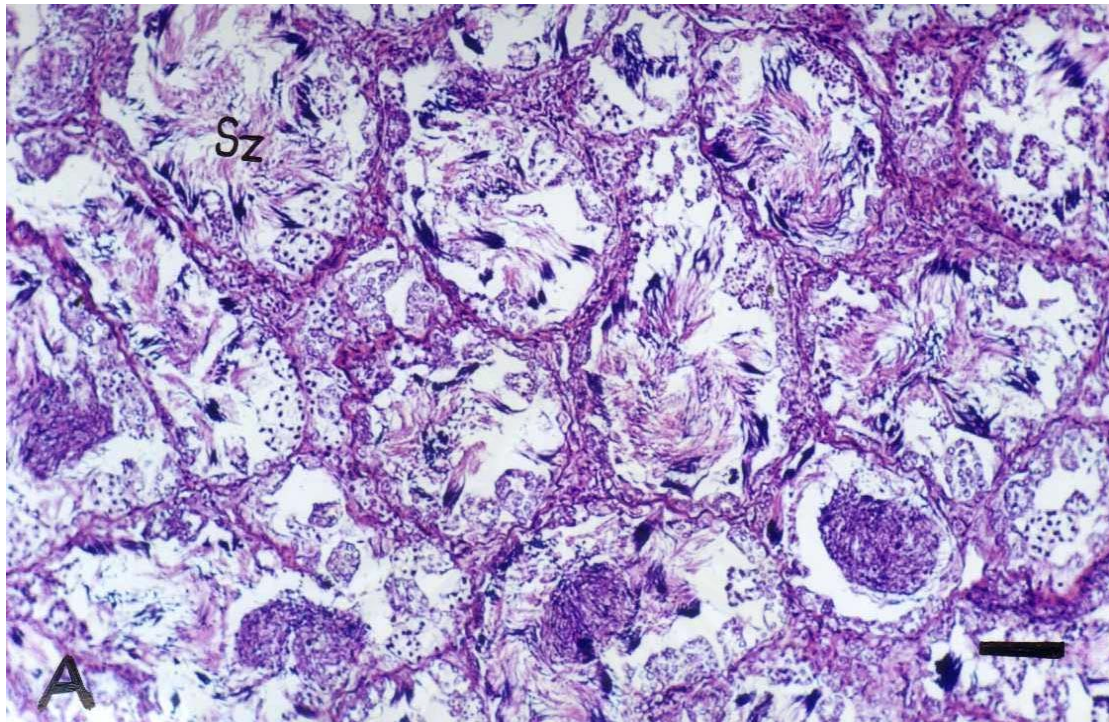
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

13-A แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์สที่มีเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) จำนวนมาก
ท่อเซมินิเฟอร์สมี Lumen ขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 280 μm .

13-B แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส พบเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) กระจายอยู่
ในท่อส่วนใหญ่และท่อเซมินิเฟอร์สที่มี Lumen ขนาดแคบ เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย
ประมาณ 170 μm .



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



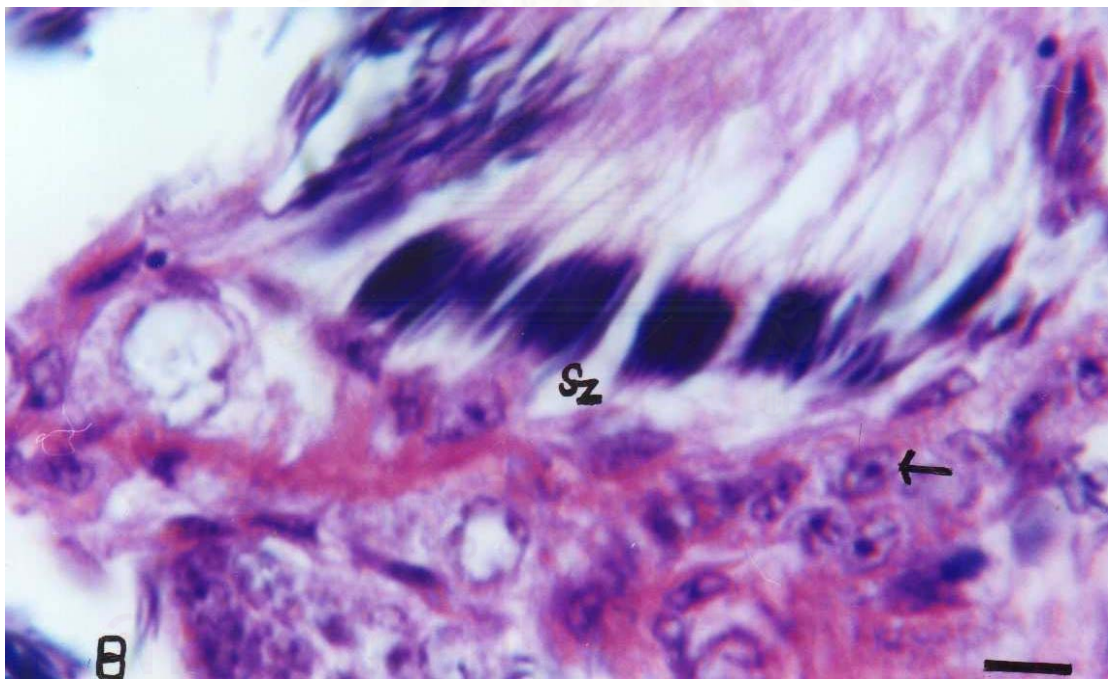
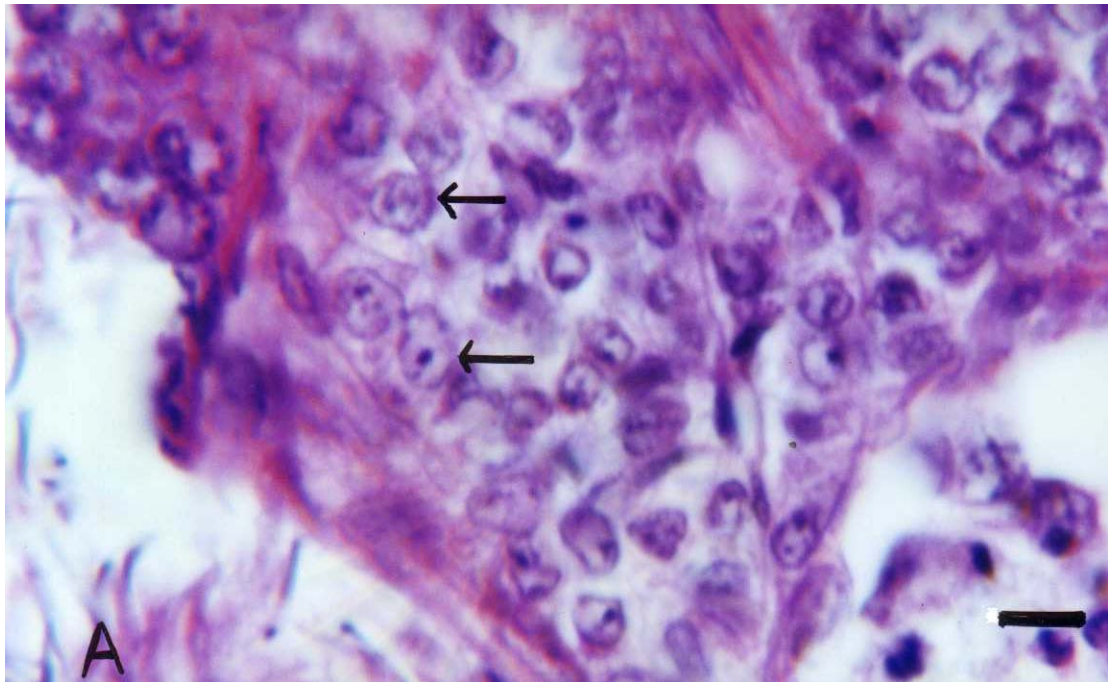
รูปที่ 13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules และ Interstitial tissue ของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่ได้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน เข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

Scale Bar = 70 μ m. ย้อมสี Haematoxyline & Eosin

- 14-A แสดงลักษณะของ Leydig cell ปกติที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อัน อยู่กลางนิวเคลียส (←) เซลล์มีการจัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น
- 14-B แสดงลักษณะปกติของ Leydig cell กลุ่มควบคุม(←) ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส และเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) ที่ส่วนหัวมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีเข้มและส่วนหางมีรูปร่างเรียวยาว อยู่รวมกลุ่มกันเป็นกระจุก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเทศผู้กลุ่มควบคุม
อายุ 8 เดือน

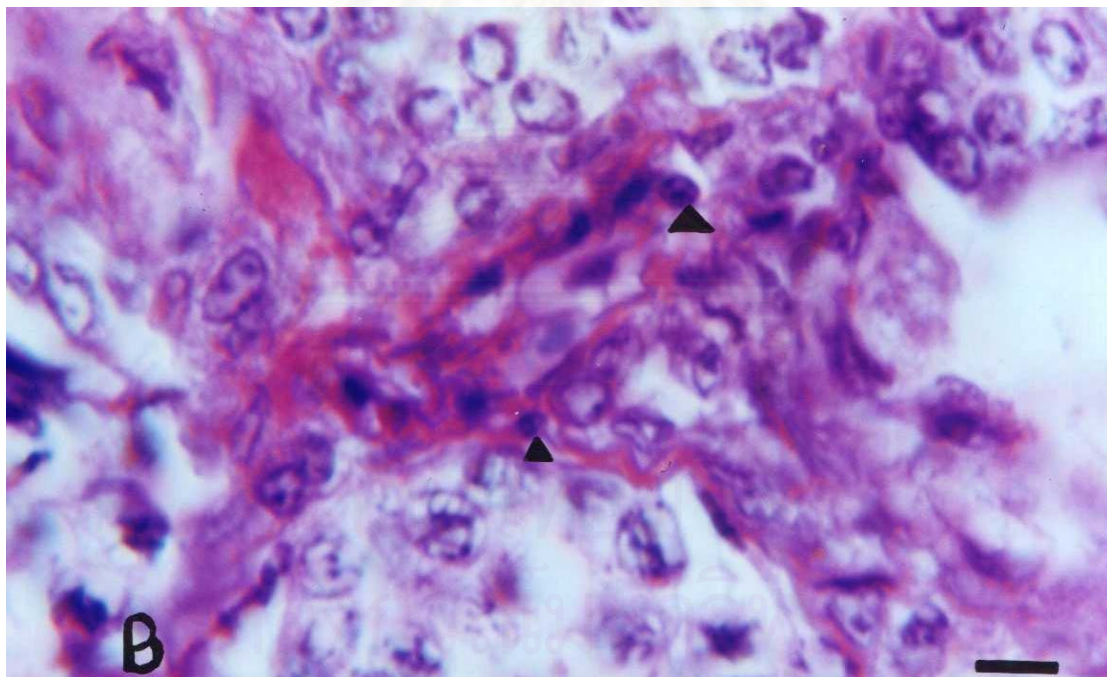
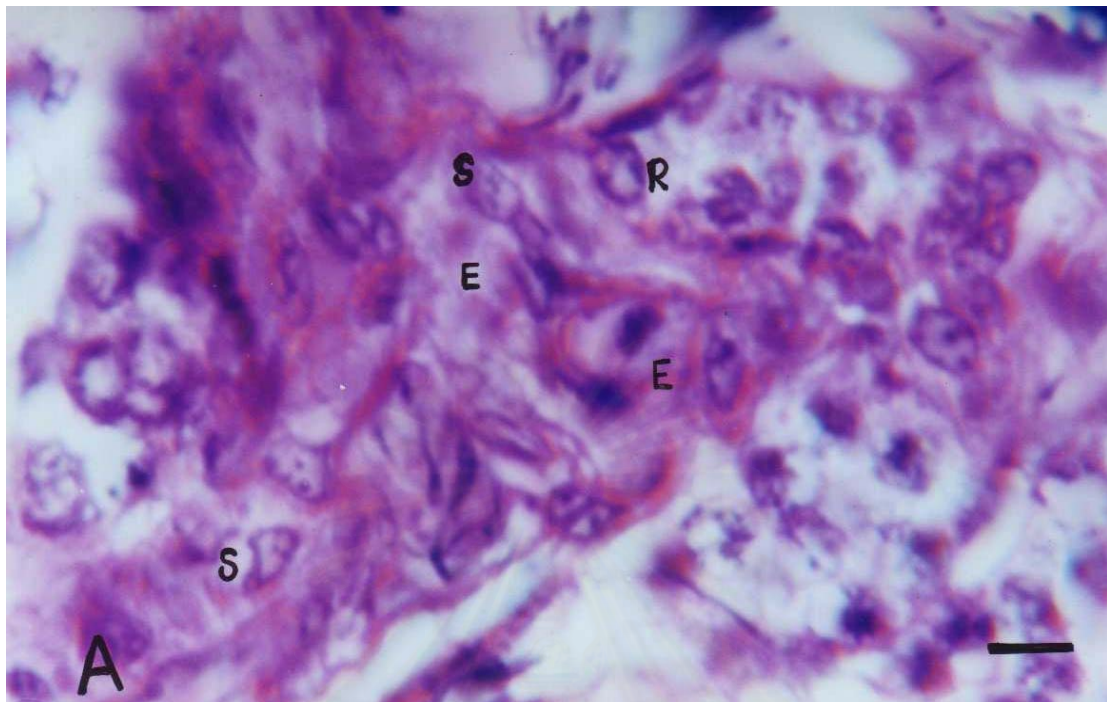
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

15-A แสดงลักษณะของ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส บางเซลล์มีลักษณะบวม (E) เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาด (S) พบการรวมกลุ่มของโครมาตินที่บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (R) นิวเคลียสของเซลล์หดตัวเป็นก้อนทึบ (◆)

15-B แสดงจำนวนของ Leydig cell ที่มีจำนวนน้อย นิวเคลียสของเซลล์หดตัวเป็นก้อนทึบ (◆)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

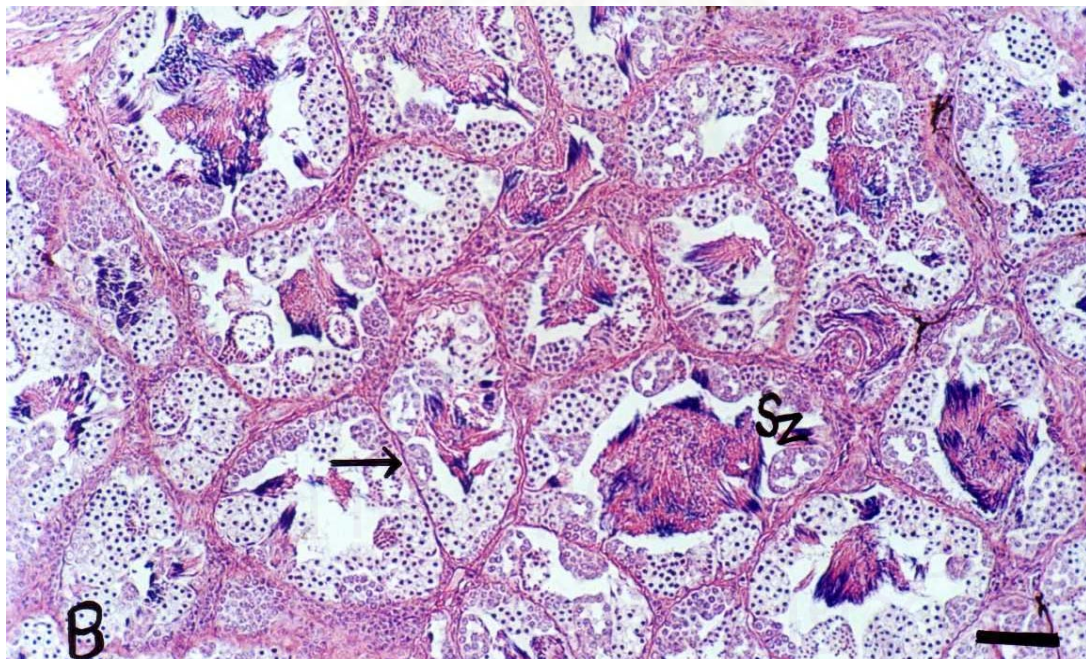
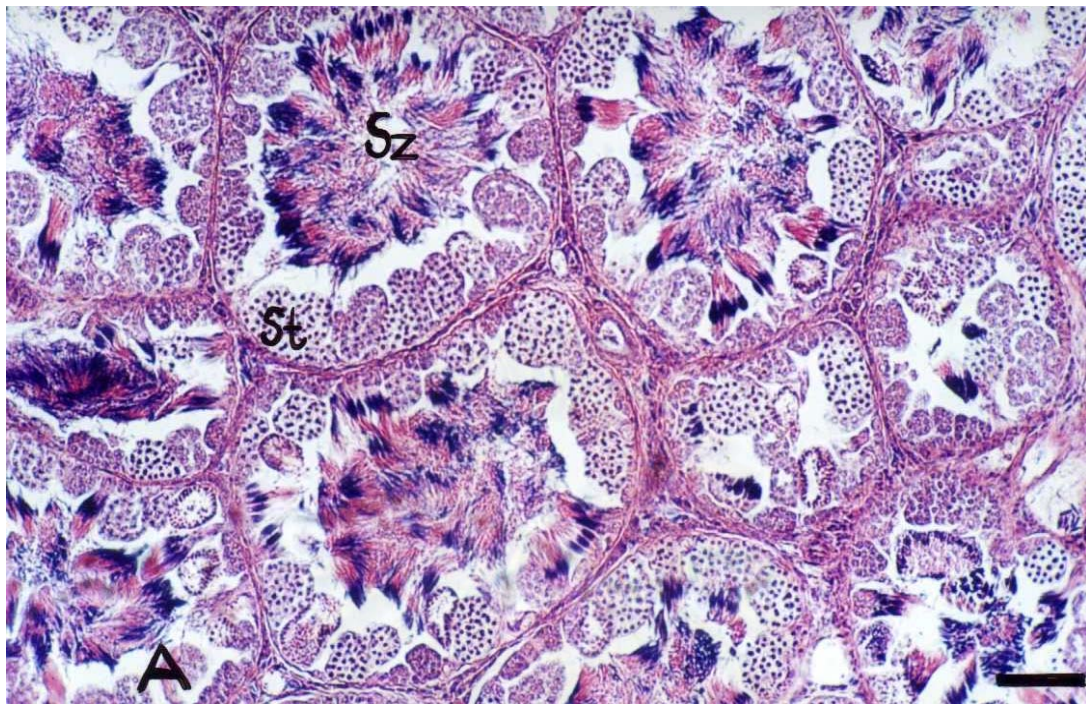
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

16-A แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส พบเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) อยู่จำนวนมากและเซลล์สเปอร์มาติด (St) เรียงตัวอยู่บริเวณเยื่อรองรับพื้นฐาน (Basement membrane) รอบๆท่อเซมินิเฟอร์สที่มี Lumen ขนาดกว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 350 μm . และมีผนังหุ้มรอบท่อ (←)หนา

16-B แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส พบเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) จำนวนน้อย ท่อเซมินิเฟอร์สมี Lumen ขนาดแคบกว่าท่อของกบนาคลุ่มควบคุม มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 210 μm . เยื่อหุ้มรอบท่อ (←)บาง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



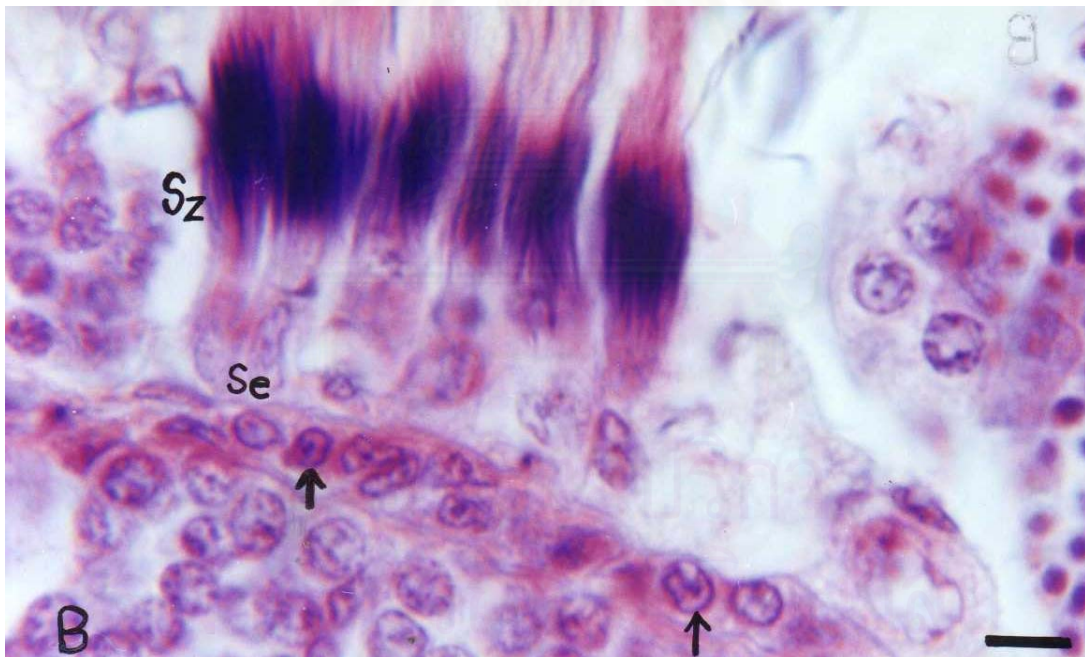
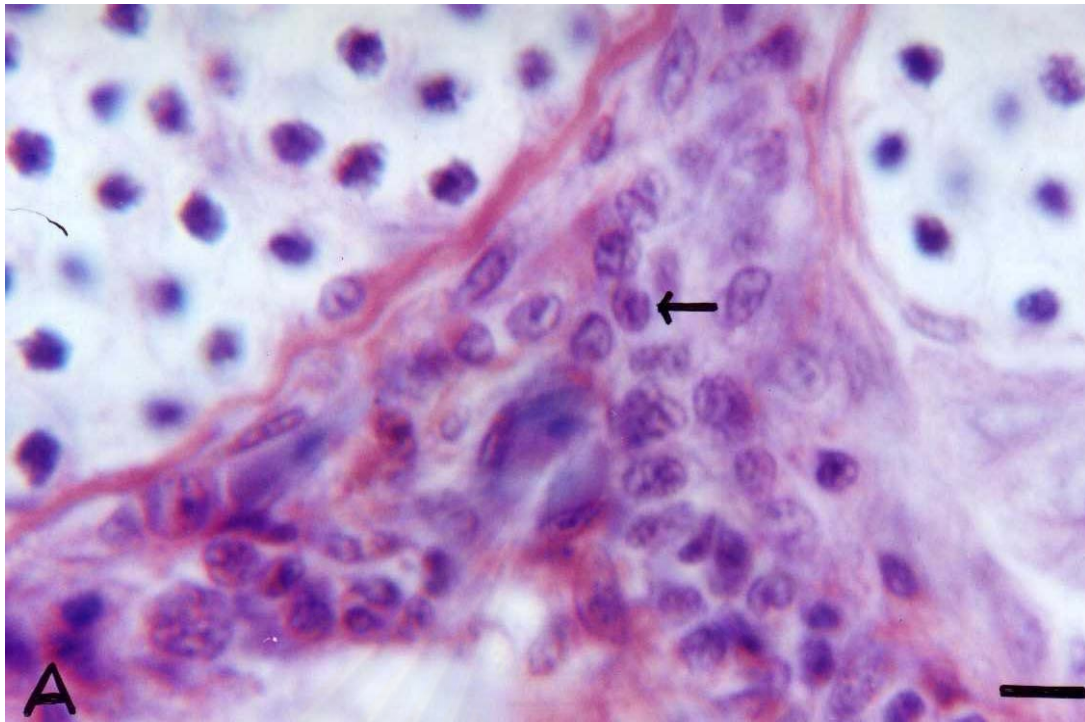
รูปที่ 16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 17-A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อปกติของ interstitial tissue และ Leydig cell บริเวณท่อ เซมินิเฟอร์รัส เซลล์มีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมและมีนิวคลีโอลัส 1 อัน อยู่ตรงกลาง (←) เซลล์พวกนี้กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อเซมินิเฟอร์รัสและ บริเวณใกล้เส้นเลือด (BV)
- 17-B แสดงลักษณะของ Leydig cell และเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) ในกบนาปกติ พบ ส่วนหัวของสเปิร์มฝังลงในไซโตพลาสซึมของเซอร์ทอร์ไลต์เซลล์ (Se) ในระหว่างท่อ เซมินิเฟอร์รัสมิ Leydig cell (←) กระจายตัวอยู่ล้อมรอบท่อ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุม อายุ 10 เดือน

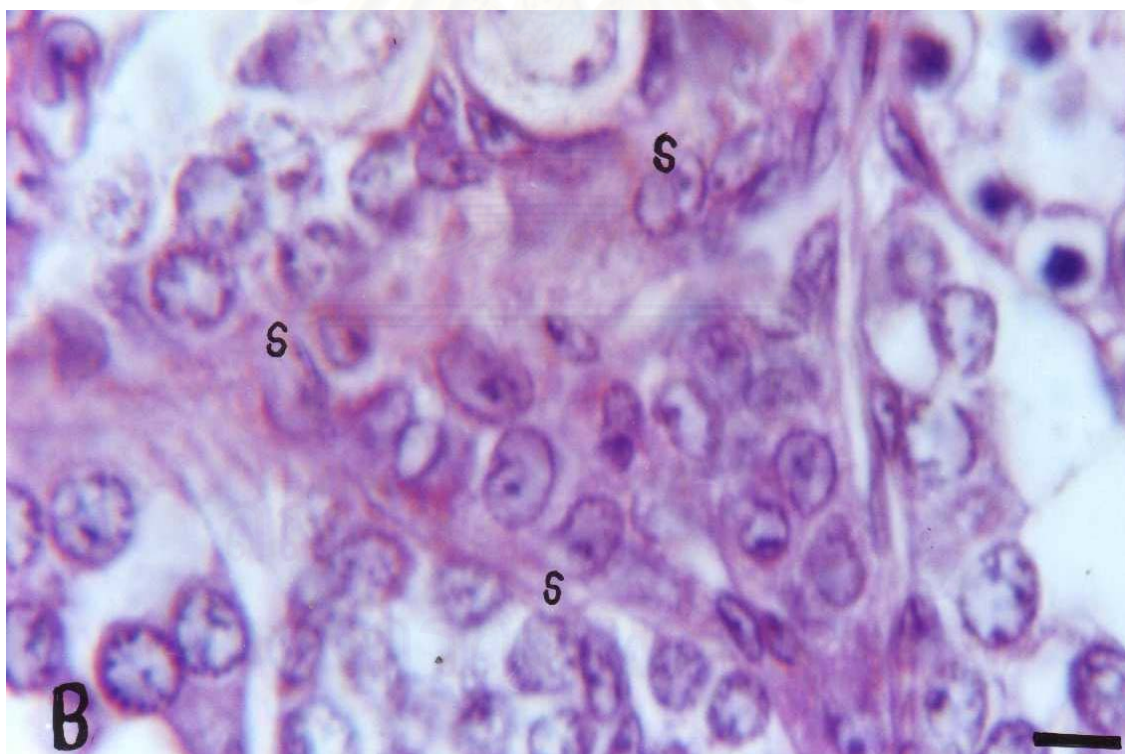
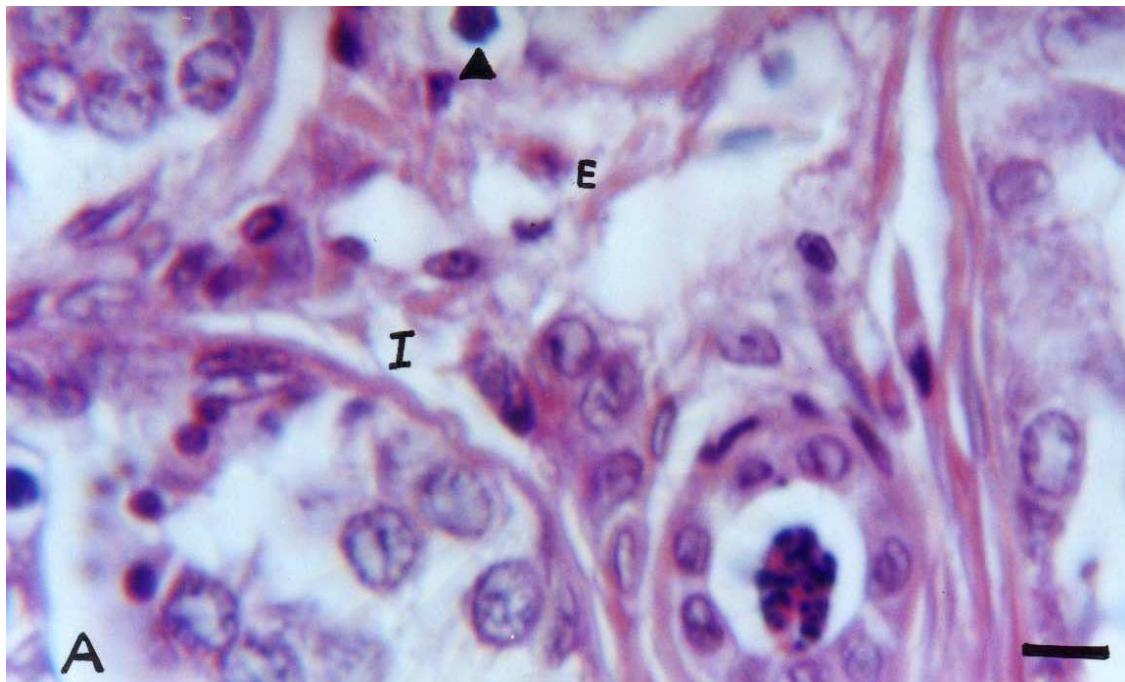
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

18-A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสและ Leydig cell พบว่ามี Leydig cell เรียงตัวรอบๆ เส้นเลือด (BV) จำนวนน้อยมาก เนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสถูกทำลาย (I) และ Leydig cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะของนิวเคลียสในลักษณะที่มีนิวเคลียสหดตัวเล็กลงเป็นก้อนทึบ (▲) มีเซลล์ตายในลักษณะที่มองไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียส (Karyolysis) (*) และเซลล์บวม (E)

18-B แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส พบว่าเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาดเป็นแห่งๆไป (S)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 10 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

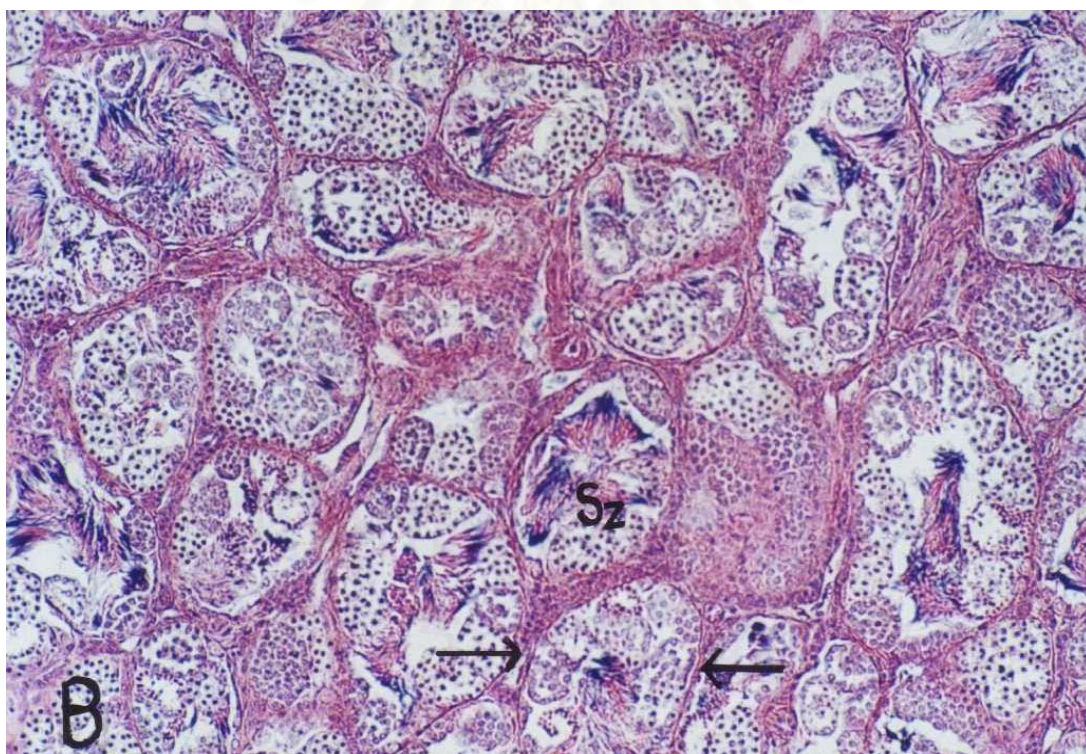
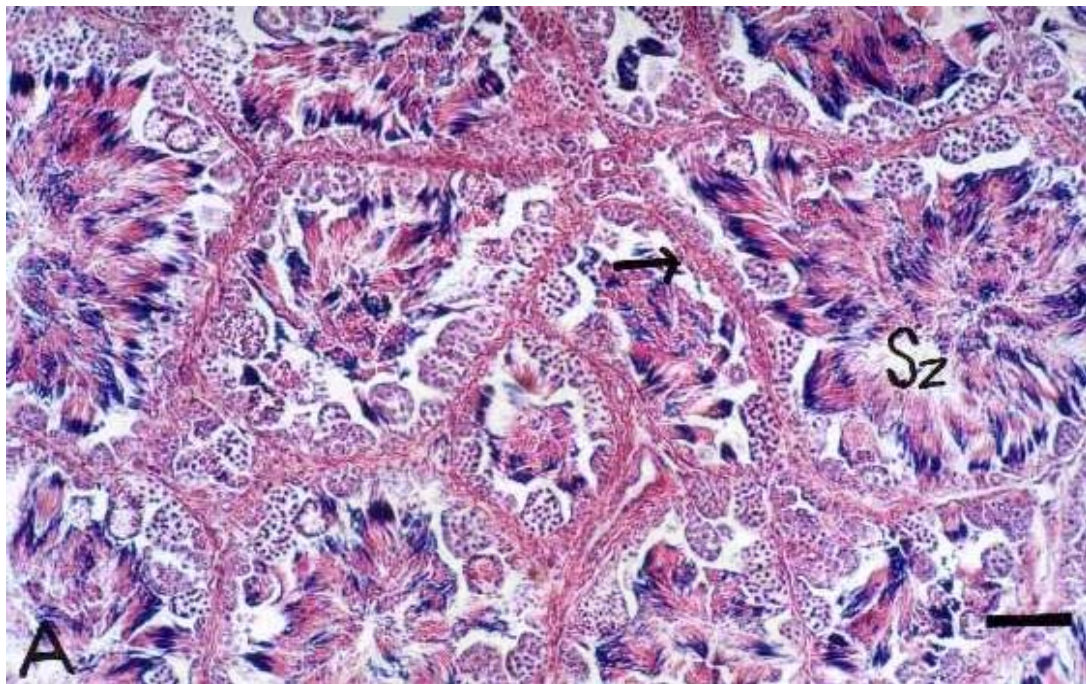
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

19-A แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ัสของกบนา พบเซลล์สเปอร์มาโตไซ์ (Sz) กระจายอย่างหนาแน่นบริเวณ (Lumen) กลางท่อที่มีขนาดกว้างโดยเฉลี่ยประมาณ 350 μm . ผนังหุ้มรอบท่อ (\leftarrow) มีเซลล์ชั้นหลายชั้น

19-B แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ัสของกบกลุ่มทดลอง ภายใน Lumen ของท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตไซ์ (Sz) น้อยและมีเซลล์สเปอร์มาติด (St) อยู่เป็นจำนวนมาก ท่อเซมินิเฟอร์ัสมี Lumen แคบ เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 210 μm . เยื่อหุ้มรอบท่อมีเซลล์เรียงตัวเป็นชั้นบาง (\leftarrow)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



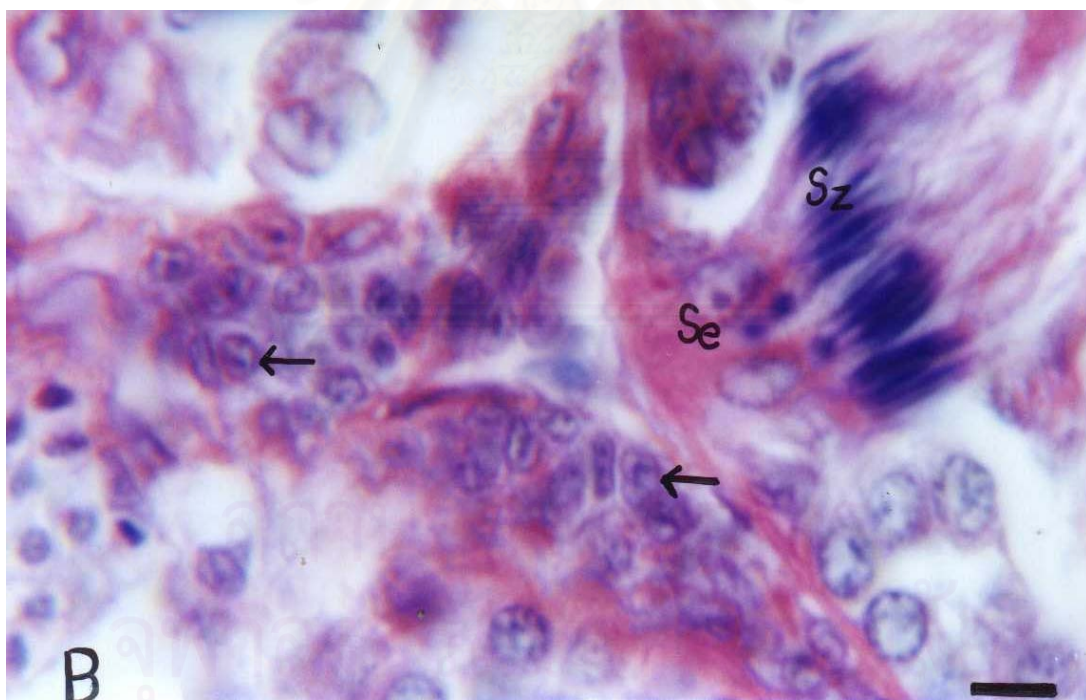
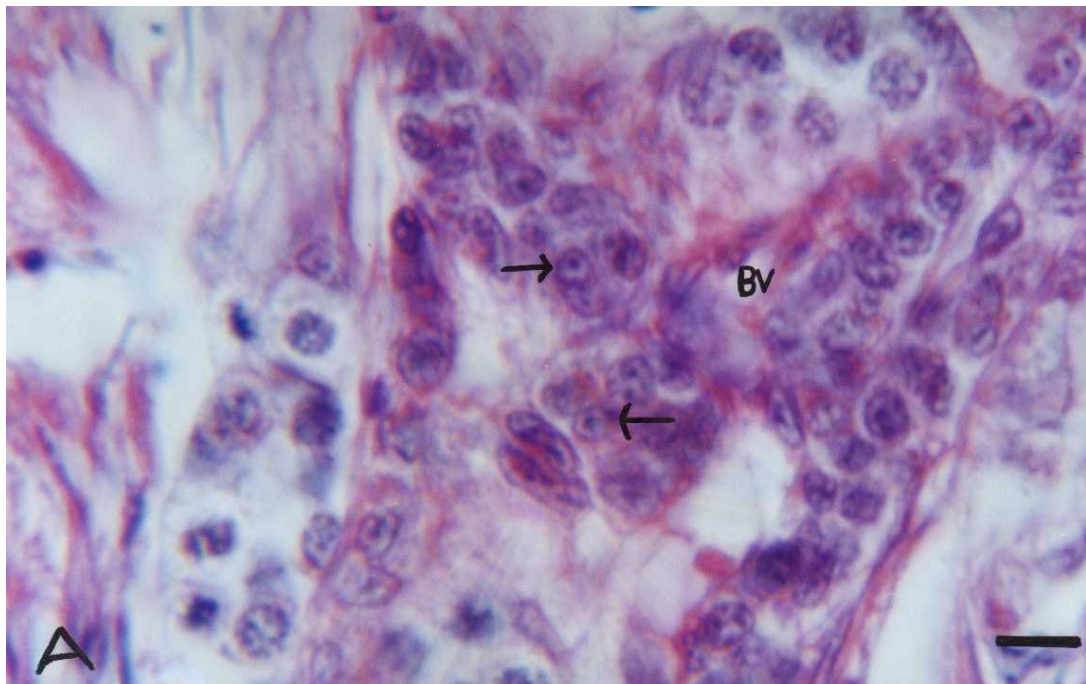
รูปที่ 19 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules และ Interstitial tissue ของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน เข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

Scale Bar = 70 μm . ย้อมสี Haematoxyline & Eosin

- 20-A แสดงลักษณะปกติของ Leydig cell กลุ่มควบคุม เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมมีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่ตรงกลาง (←) เซลล์พวกนี้กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นรอบๆท่อเลือด (BV)
- 20-B แสดงลักษณะของ Leydig cell และเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) ที่ส่วนหัวของเซลล์สเปอร์มาโตซัวมีรูปร่างคล้ายกระสวยและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนหางมีรูปร่างเรียวยาว ส่วนหัวฝังลงไปบนเซอร์ทอไรไลต์เซลล์ (Se) พบ Leydig cell (←) กระจายอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสจำนวนมาก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุม อายุ 12 เดือน

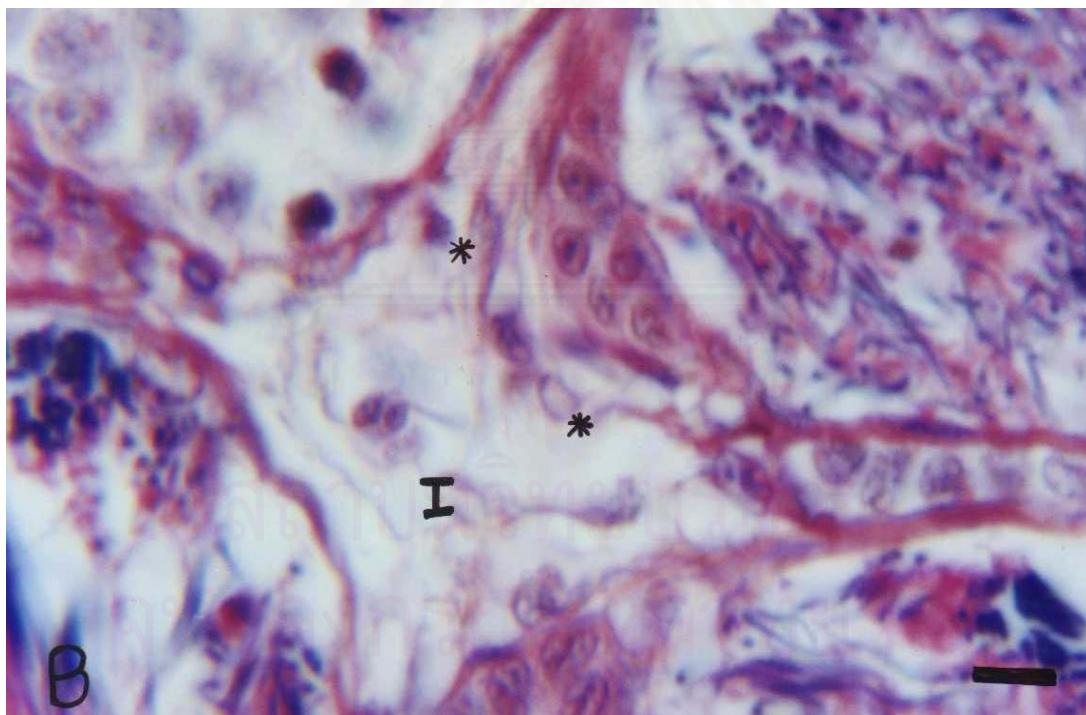
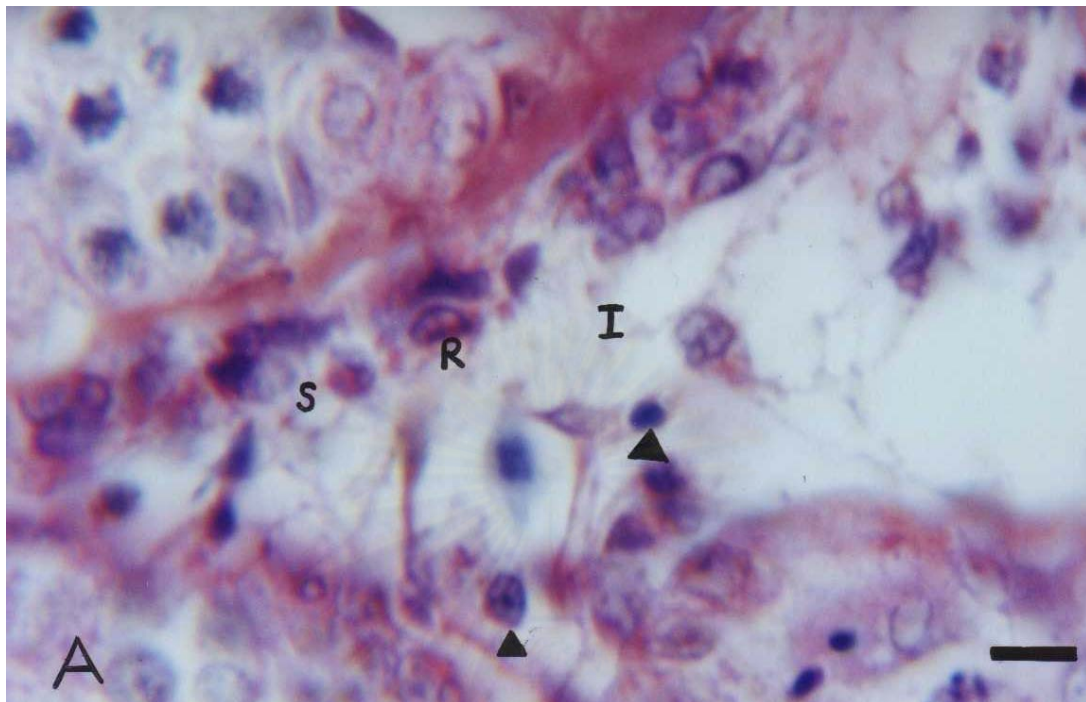
Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

21-A แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อ interstitial tissue และ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสมีการเปลี่ยนแปลงและถูกทำลาย พบว่าเนื้อเยื่อระหว่างท่อถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง (I) จนเกิดเป็นช่องว่าง Leydig cell มีการรวมกลุ่มของโครมาตินที่อยู่บริเวณรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (R) พบนิวเคลียสของเซลล์หดตัวเล็กลงเป็นก้อนทึบ (▲) เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาดเป็น (S)

21-B แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อ interstitial tissue และ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส พบว่า Leydig cell มีอยู่น้อยมาก มีการตายของเซลล์ในลักษณะที่มองไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียสที่ (*) (Karyolysis) เนื้อเยื่อระหว่างท่อถูกทำลาย (I)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



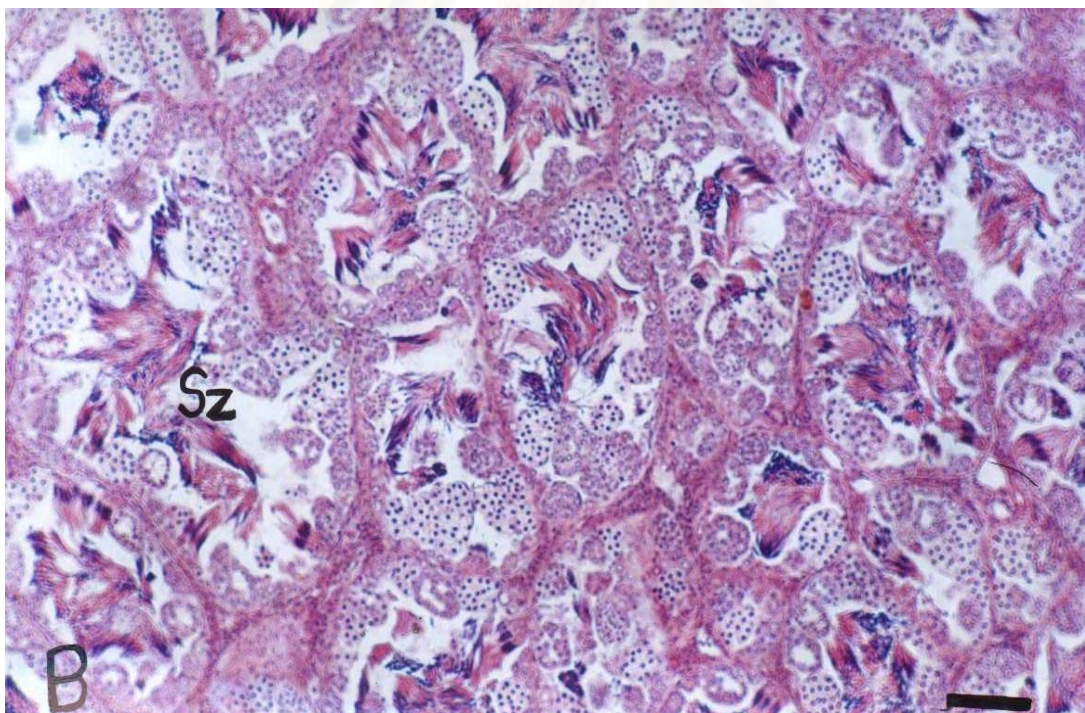
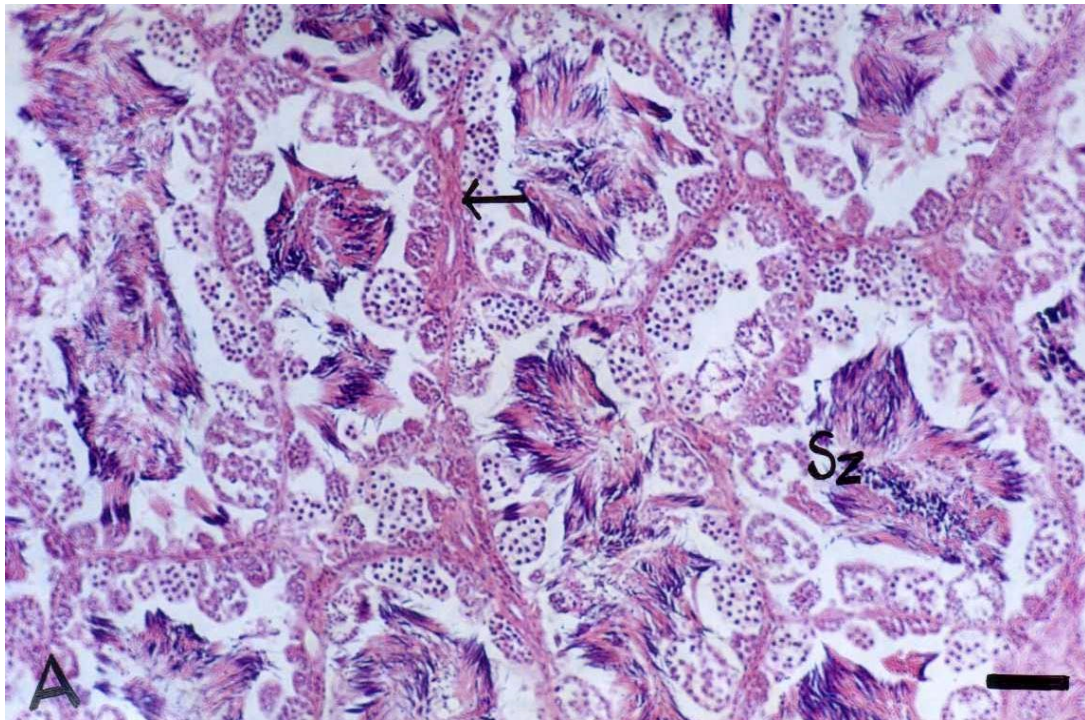
รูปที่ 21 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 12 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

Scale Bar = 10 μm . ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 22-A แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส มีเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) กระจายตัวหนาแน่นบริเวณกลางท่อเซมินิเฟอร์สที่มี Lumen กว้าง เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 420 μm . ผนังหุ้มรอบท่อ (\leftarrow) มีความหนา มีเซลล์เรียงซ้อนหลายชั้น
- 22-B แสดงลักษณะโครงสร้างของท่อเซมินิเฟอร์ส ภายในท่อพบเซลล์สเปอร์มาโตซัวจำนวนน้อย (Sz) ท่อเซมินิเฟอร์สมี Lumen แคบ เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 280 μm .



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงโครงสร้าง Seminiferous tubules และ Interstitial tissue ของกบนาเพศผู้อายุ 14 เดือน กลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มทดลอง (B) ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน เข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน

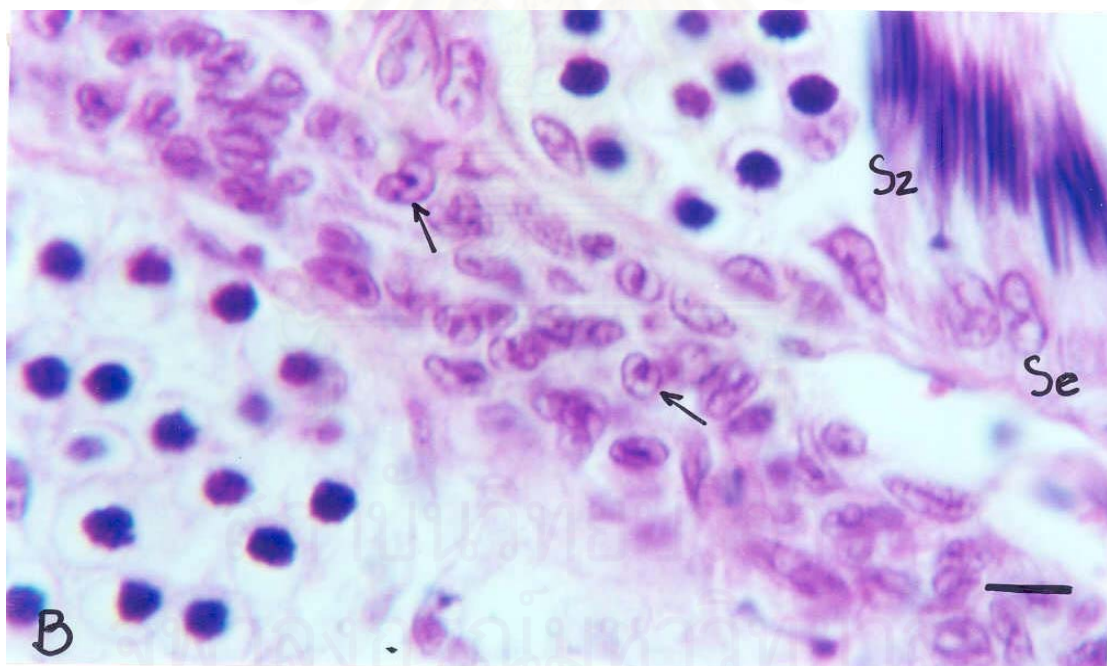
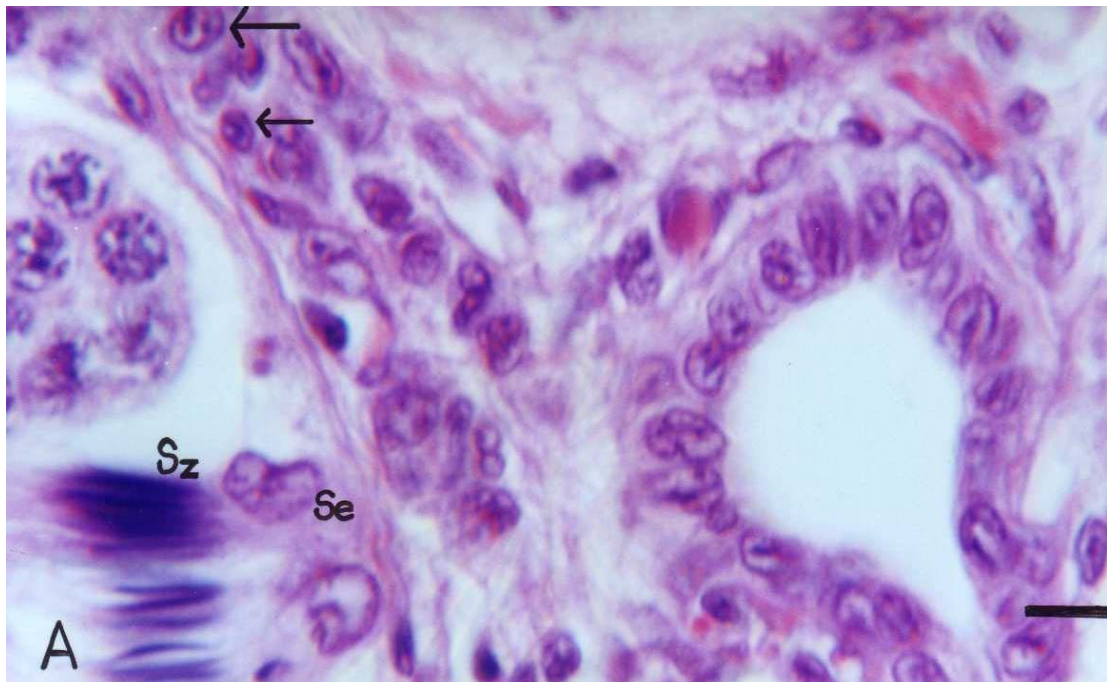
Scale Bar = 70 μm . ย้อมสี Haematoxyline & Eosin

23-A แสดงลักษณะรูปร่างของ Leydig cell ที่ปกติอยู่บริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ส เซลล์มีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อัน อยู่กึ่งกลางนิวเคลียส (←)

23-B แสดงลักษณะของ Leydig cell และเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) ที่กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ส พบเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Sz) ที่ส่วนหัวมีรูปร่างคล้ายกระสวยและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่และ ส่วนหางมีลักษณะเรียวยาว ฝังลงในเซอร์ทอร์ไลต์เซลล์ (Se)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



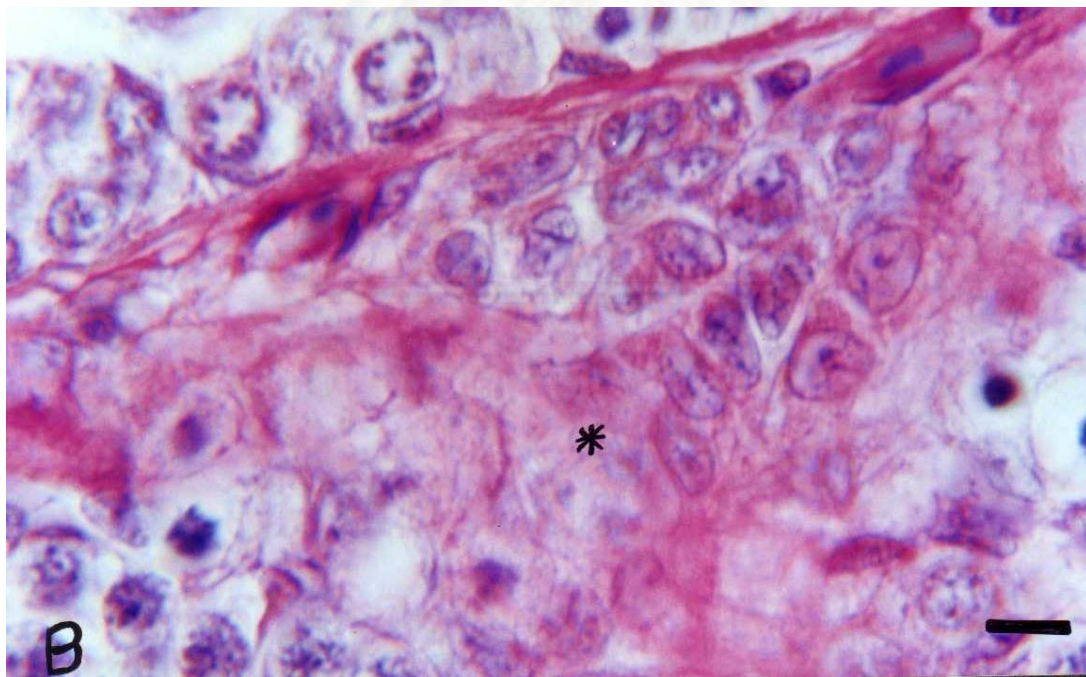
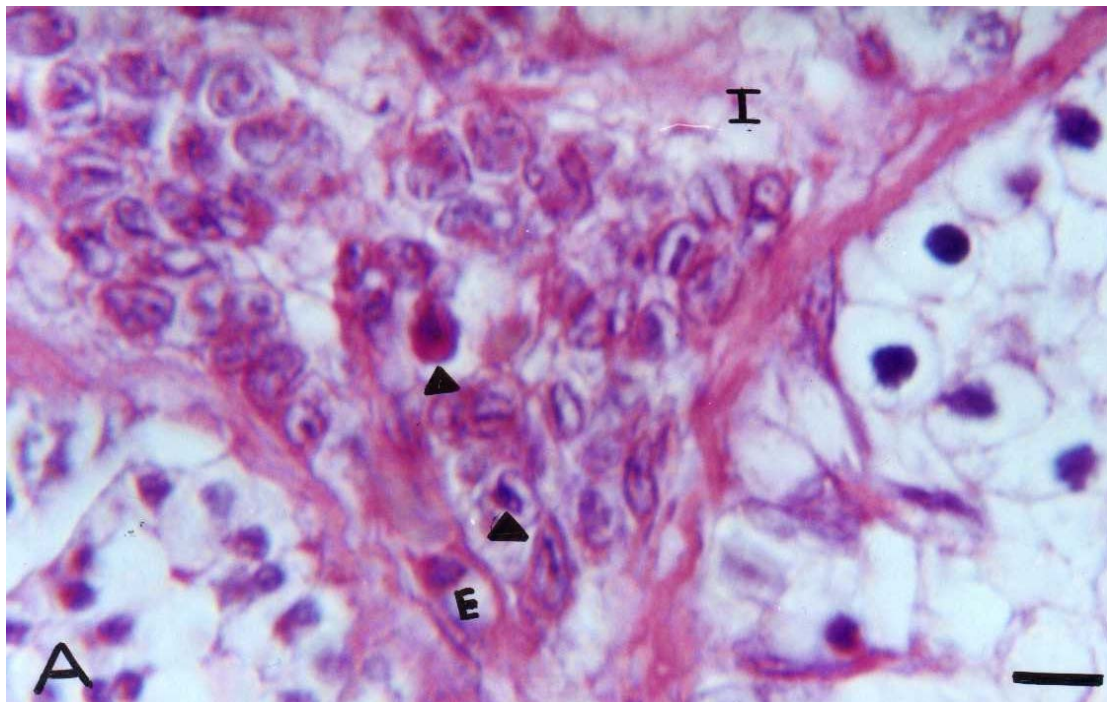
รูปที่ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุม อายุ 14 เดือน

Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

- 24-A แสดงลักษณะของ interstitial tissue และ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ตที่มีการเปลี่ยนแปลงไป พบว่านิวเคลียสหดเล็กลงเป็นก้อนทึบ(▲) และมีการบวมของเซลล์ (E) เนื้อเยื่อระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ตถูกทำลาย (I)
- 24-B แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์ต พบว่ามีการตายของเซลล์ในลักษณะที่เป็นแบบ Karyolysis (*) .



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงรูปร่างของ Leydig cell ของกบนาเพศผู้อายุ 14 เดือน กลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

Scale Bar = 10 μ m. ย้อมสี Haematoxylin & Eosin

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมากของกบนาเพศผู้อายุหลังการทดลอง 4 เดือน พบว่า เมทิลพาราไทออนที่ความเข้มข้น 20 ppm ในเวลา 60 วัน สามารถลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เมื่อทดลองเลี้ยงกบนาเพศผู้อายุหลังการทดลอง 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน ในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออน 20 ppm ในเวลา 60 วัน พบว่าสามารถลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลาสมากของกบนาได้และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าในกบนาอายุหลังการทดลอง 6 เดือน ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับกบนาในกลุ่มอื่นๆ เนื่องจากว่าช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดคือเดือนพฤศจิกายนนั้นตรงกับปลายฤดูการสืบพันธุ์ ทำให้ปริมาณของฮอร์โมนลดลงต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กบนาอายุหลังการทดลอง 4, 8, 10, 12 และ 14 เดือนทำการเก็บตัวอย่างเลือดในเดือน กันยายน พฤษภาคม เมษายน มิถุนายนและสิงหาคม ตามลำดับซึ่งอยู่ในฤดูการสืบพันธุ์ ดังรายงานของ Tangpraprutgul *et al*, 1996 กล่าวว่าแบบแผนการหลังฮอร์โมนเพศในกบนาเพศผู้และเพศเมียที่โตเต็มที่ในรอบหนึ่งปี พบว่าปริมาณเทสโทสเตอโรนในกบนาเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มสูงขึ้นในเดือนมีนาคมไปถึงเดือนตุลาคมและปริมาณของฮอร์โมนชนิดนี้ฮอร์โมนนี้จะมีปริมาณต่ำในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ในกบนาทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไทออนจะแตกต่างกันตามอายุของกบนา โดยพบว่าในกบนาที่มีอายุมากจะมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงกว่าในกบนาที่มีอายุน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ มงคล สมัญญา ในปี พ.ศ. 2539 ที่พบว่า เมทิลพาราไทออนที่ปริมาณความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 30 วัน ในหนูอายุ 24 วัน ไม่สามารถลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในซีรัมของหนูได้ ส่วนหนูอายุ 50 วันนั้น สามารถลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.01$) นอกจากนี้สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิด ethane dimethanesulfonate (Kerr *et al*, 1987 ; Rommerts *et al*, 1985) ก็มีผลทำให้การหลังของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงได้หรือชนิด Tri-o-cresyl phosphate ที่มีผลลดความสมบูรณ์พันธุ์ การสร้างตัวสุจิและการหลังฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในหนูแรทได้ (Somkuti, 1987 ; Chapin *et*

al, 1990) เป็นต้น ทั้งนี้สาเหตุของการลดลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนนั้นน่าจะมีสาเหตุจาก เมทิลพาราไทออนไปมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ acetylcholine esterase (Palmer, 1978 ; Schoor and Brausch, 1980) ในระบบประสาทและส่งผลต่อเนื่องไปยังสมองส่วนไฮโปทาลามัส ต่อมาได้สมองส่วนหน้าและระบบสืบพันธุ์ ทำให้ลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในที่สุด โดยที่ไฮโปทาลามัสจะกระตุ้น gonadotrops ให้หลั่ง GnRH ให้สร้างและหลั่ง LH โดยที่ LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า จะกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจาก Leydig cell จากอวัยวะ โดยพบว่าในกบนาเพศผู้ตัวเต็มวัยจะมีผลกระทบบมากกว่าตัวที่ยังไม่โตเต็มวัย (ดังรูปที่ 5) (มงคล สมัญญา, 2539 ; Johnson and Everitt, 1988 ; Hadley, 1996) เนื่องจากไฮโปทาลามัสจะหลั่ง GnRH ไปกระตุ้นการสร้างหลั่ง gonadotropin จากต่อมใต้สมองคือ LH ไปควบคุมการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในตัวเต็มวัยมากกว่าตัวที่ยังไม่โตเต็มวัย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Rattner and Michael, 1985 ที่พบว่า organophosphate ชนิด acethion สามารถลดการสร้างและหลั่ง LH ได้ ซึ่งได้สอดคล้องกับรายงานของ Smallridge *et al*, 1991 ที่รายงานว่า diisopropyl fluorophosphate สามารถลดการสร้าง LH ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระดับของ LH ลดลง ก็จะมีผลทำให้การสร้างและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดตามไปด้วย

ในเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน พบว่ากบนาจะมีระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาสูงกว่าในฤดูอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งน่าจะเป็นการกระตุ้นให้เกิดลักษณะทางเพศทุติยภูมิ และเพื่อเป็นการเตรียมอวัยวะให้พร้อมก่อนการสืบพันธุ์ซึ่งนอกจากปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาและในอวัยวะจะสามารถบอกถึงฤดูกาลและความพร้อมของการสืบพันธุ์ของกบนาได้แล้วยังมีข้อมูลอื่นอีกได้แก่ gonado - somatic - index(GSI %) (รังสิมา ใช้เทียมวงศ์, 2538) จากตารางที่ 6 ที่แสดงค่า GSI% ในกบนาเพศผู้กลุ่มควบคุมอายุหลังการทดลอง 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน พบว่าค่า GSI% มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามอายุของกบนา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ รังสิมา ใช้เทียมวงศ์ในปี 2538 ที่พบว่ากบนาที่พร้อมจะสืบพันธุ์จะมีการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจากอวัยวะมากขึ้นโดยสัมพันธ์กับการที่อวัยวะมีน้ำหนักมากขึ้น ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในน้ำที่มีเมทิลพาราไทออนอยู่ในความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 60 วัน พบว่าค่า GSI% ของกบนาเพศผู้ที่มีอายุ 10, 12 และ 14 เดือนต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนในกบนาเพศผู้กลุ่มทดลองอายุ 4, 6 และ 8 เดือนพบว่าค่า GSI % สูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นเห็นได้ว่าเมทิลพาราไทออนจะมีผลทำให้น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะลดลงในกบนาที่มีอายุมากเท่านั้น (อายุ 10, 12

และ 14 เดือน) ดังนั้นการที่เมทิลพาราไทออนมีผลต่อค่า GSI% ของกบนาเพศผู้ก็น่าจะส่งผลกระทบต่อความพร้อมที่จะสืบพันธุ์ของกบนาเพศผู้ได้

จากการศึกษาครั้งนี้เมทิลพาราไทออนในความเข้มข้น 20 ppm ในเวลา 60 วัน มีผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและค่า GSI% ของกบนาเพศผู้ในช่วงอายุต่างๆกันและความรุนแรงจะปรากฏชัดเจนในกบนาเพศผู้ที่มีอายุมาก ดังนั้นระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ลดลงอาจไปมีผลต่อการสร้างเซลล์สเปิร์มาโตซัวได้ ดังรายงานของ Pierantoni *et al*, 1984 กล่าวว่า การเพิ่มขึ้นของสเตียรอยด์ฮอร์โมนอาจมีความจำเป็นต่อการสร้างสเปิร์มาทิดใน *Rana esculenta* ซึ่งขบวนการสร้างเซลล์สเปิร์มจะถูกกระตุ้นและควบคุมโดยความสัมพันธ์ระหว่างโกนาโดโทรปิน (gonadotropins) อุณหภูมิและฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ทั้งโกนาโดโทรปินและเทสโทสเตอโรนจะเป็นตัวกำหนดการแบ่งเซลล์แบบไมโทติก (mitotic proliferation) ของเซลล์สเปิร์มาทิดโกเนียและการสร้างเซลล์สเปิร์มาทิดด้วย

เมื่อศึกษาผลของเมทิลพาราไทออนต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะของกบนาเพศผู้ *R. rugulosa* อายุ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เดือน ซึ่งได้รับเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm ติดต่อกันนานเป็นเวลา 60 วัน พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณ Interstitial tissue และ Leydig cell ในลักษณะที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนดังนี้คือ

ในกบนาอายุ 4 เดือน กลุ่มควบคุมพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอร์รัสโดยเฉลี่ยจะแคบที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกบนาในกลุ่มอายุอื่นๆ และจำนวนของ Leydig cell ที่อยู่ในบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัสก็น้อยด้วย พบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะสเปิร์มาโตโกเนียและสเปิร์มาโตไซต์มากที่สุด ขณะที่เซลล์สเปิร์มาทิดและสเปิร์มาโตซัวเล็กน้อย ซึ่งจำนวนของ Leydig cell และจำนวนของสเปิร์มาโตซัวนี้ก็มีความสอดคล้องกับปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาที่พบว่ามีอยู่ในปริมาณต่ำเช่นเดียวกันเพราะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในความควบคุมของฮอร์โมนซึ่งยังคงมีปริมาณต่ำในกบวัยอ่อนอายุ 4 เดือน ในกลุ่มทดลองพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอร์รัสโดยเฉลี่ยมีขนาดแคบกว่าของกบนาในกลุ่มควบคุม จำนวนของ Leydig cell เซลล์ระยะสเปิร์มาโตโกเนียและสเปิร์มาโตไซต์มีจำนวนน้อยกว่าภายในท่อเซมินิเฟอร์รัสมีช่องว่างขนาดใหญ่ที่เรียกว่า Lumen เซลล์สเปิร์มาทิดและสเปิร์มาโต

ตัวไม่พบอยู่ภายในท่อ นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell ในลักษณะที่มีการรวมของ ไฮโดรพลาสซึม มีการหดตัวของนิวเคลียสเป็นก้อนทึบ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีรอยฉีกขาดและพบมีการ สลายตัวของนิวเคลียสบ้างเล็กน้อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นน่าจะเป็นผลมาจากเมทิล พาราไทออนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานและรูปร่างลักษณะ Leydig cell โดยตรงจึงมี ผลทำให้มีปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาคลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไทออน ลดลง 10.50% ฮอร์โมนนี้มีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Jokura and Urara, 1985)

ในกบนาอายุ 6 เดือน พบว่าเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ Interstitial tissue และ Leydig cell สอดคล้องกับการลดลงของ ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ซึ่งพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอรัสมีขนาด แคบ ภายในท่อมีเซลล์สเปอร์มาทิดและสเปอร์มาโตซัวอยู่น้อย และจำนวนของ Leydig cell ที่พบ อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสก็มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและรูปร่างลักษณะของ Leydig cell มีความผิดปกติคือเซลล์บวมและมีรอยฉีกขาดของเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีการหดตัวของ นิวเคลียสเป็นก้อนทึบและมีเซลล์ตายโดยการสลายตัวของนิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อ Interstitial ในบางบริเวณถูกทำลายเล็กน้อย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อบริเวณ ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสมีผลทำให้ระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลง 15.94% เมื่อเปรียบ เทียบกับกลุ่มควบคุม

ในกบนาเพศผู้อายุ 8 เดือน พบว่าเมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm มีผล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและจำนวนของ Leydig cell คล้ายคลึงกันกับกบนาอายุ 6 เดือน จะแตกต่างกันในเรื่องของจำนวนเซลล์สเปอร์มาโตซัวที่มีมากกว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอรัสมากขึ้นและเนื้อเยื่อ Interstitial tissue ไม่มีการถูกทำลาย ปริมาณ ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 16.68 % ทั้งนี้เพราะจำนวนของ Leydig cell ที่ถูกทำลายและลดจำนวนลง ซึ่งเป็นที่ทราบว่าย LH ในเพศผู้มีเป้าหมายอยู่ที่ Leydig cell ของ อวัยวะสืบพันธุ์ทำให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการ สร้างตัวอสุจิ (Licht et al, 1997)

เมทิลพาราไทออนในระดับความเข้มข้น 20 ppm มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากต่อเนื้อเยื่ออัณฑะของกบนาเพศผู้อายุ 10, 12 และ 14 เดือน ในกลุ่มควบคุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอร์รัสมากขึ้นกว่าของกบนาอายุ 8 เดือน แต่ในกบนาอายุ 12 และ 14 ไม่มีความแตกต่างในด้านขนาดของท่อเป็นเพราะในกบตัวเต็มวัยที่พร้อมจะผสมพันธุ์ ภายในท่ออัณฑะจะเต็มไปด้วยเซลล์สเปอร์มาโตซัวที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจากสเปอร์มาทิด ขนาดของเซลล์เล็กลงและไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ไปมากกว่านี้แล้ว ฉะนั้นขนาดของท่ออัณฑะจึงไม่มีการขยายเพิ่มอีก ในกบนากลุ่มทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของท่อเซมินิเฟอร์รัสแคบลงและภายในท่อจะหนาแน่นไปด้วยเซลล์สเปอร์มาทิด ขณะที่เซลล์สเปอร์มาโตซัวน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่พบเซลล์สเปอร์มาทิดได้น้อย ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 29.05% 19.18% และ 27.12% ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมทิลพาราไทออนไปมีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สเปอร์มาทิดไปเป็นเซลล์สเปอร์มาโตซัว (Michael et al, 1992) ทำให้มีเซลล์สเปอร์มาทิดปรากฏอยู่ในท่อเป็นจำนวนมาก เนื้อเยื่อบริเวณระหว่างท่อเซมินิเฟอร์รัส ของกบนาทั้งสามกลุ่มอายุถูกทำลายอย่างมาก ทำให้บริเวณดังกล่าวเกิดช่องว่างขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่า Leydig cell มีการเปลี่ยนแปลงคือมีการตายของเซลล์ในลักษณะที่มีการสลายตัวของนิวเคลียสและมีการหดตัวของนิวเคลียสเป็นจำนวนมากกว่าที่เกิดขึ้นในกบนาที่มีอายุน้อย

เนื้อเยื่อของกบนาอายุ 10, 12 และ 14 เดือนจะถูกทำลายอย่างรุนแรงมากกว่าในกบนาอายุ 4, 6 และ 8 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับระดับของฮอร์โมนที่ลดลงเป็นเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นไปในกลุ่มอายุ 10, 12 และ 14 เดือนหลังจากที่กบนาได้รับเมทิลพาราไทออนตามลำดับ ดังนั้นอายุของกบนาที่น่าที่จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ มะลิวรรณ แสงจันทร์, 2534 กล่าวว่าความเป็นพิษของสารขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายอย่างเช่น อายุ สารที่ออกฤทธิ์ได้โดยไม่ต้องถูกกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ ค่อนข้างที่จะมีพิษสูงต่อสัตว์ที่มีอายุน้อย เพราะสัตว์เหล่านี้มีเอ็นไซม์ที่ใช้ในการทำลายพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชน้อย แต่สารที่ต้องถูกกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ก่อนที่จะออกฤทธิ์เช่น เมทิลพาราไทออนนี้ จะมีพิษต่อสัตว์ที่มีอายุน้อยไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์โตที่มีปริมาณเอ็นไซม์สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของมณฑล สมัญญา, 2539 พบว่าเมื่อเลี้ยง Leydig cell ของหนูอายุ 24 วัน ในที่มี hCG และ cAMP จะกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แต่พบว่าเมทิลพาราไทออนจะลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้ประมาณ 25 และ 70% เมื่อปริมาณเมทิลพาราไทออน 1 และ 10 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ในหนูอายุ 70 - 75 วัน พบว่าเมทิลพาราไทออนสามารถลด

ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้หมด สาเหตุหรือกลไกที่เมทิลพาราไทออนสามารถลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้นั้น มีกลไกมาจากเมทิลพาราไทออนไปมีผลยับยั้งการทำงานของ hCG และ cAMP ซึ่งจะส่งผลไปลดการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้ในที่สุด (Ewing et al, 1983 ; Johnson and Everitt, 1988) นอกจากนี้เมทิลพาราไทออนอาจไปมีผลลด substrate ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน เช่น ลดการสะสมโคเลสเตอรอล (Prasada and Ramana, 1984) หรืออาจมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ในขบวนการสร้างฮอร์โมน เทสโทสเตอโรนทั้งหมด ซึ่งจะทำให้การหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงได้เช่นเดียวกับ organophosphate ชนิด ethandimethanesulfonate (Kerr et al, 1987; Rommerts et al, 1985) กลไกการสร้างและหลั่งของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจาก Leydig cell นั้นพบว่า LH และ hCG ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย LH มี target cell อยู่ที่ Leydig cell โดยไปจับกับ receptor บริเวณผนังเซลล์ ทำให้ adenylyl cyclase มีความสามารถผลิตสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ (second messenger) คือ cAMP ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นจาก adenosine triphosphate (ATP) โดยที่ cAMP จะไปกระตุ้นให้เกิดขบวนการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Ewing et al, 1989; Johnson and Everitt, 1988)

จำนวนของ Leydig cell ที่ลดลงในอวัยวะของกบนาที่ได้รับเมทิลพาราไทออนนั้น ส่งผลทำให้ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังกล่าวแล้วข้างต้น ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้อยู่สอดคล้องกับการศึกษาของ Muller and Licht, 1981 ที่พบว่าจำนวนของ Leydig cell ที่ลดลงมีผลทำให้การหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงด้วย ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยที่เทสโทสเตอโรนซึ่งสร้างจาก Leydig cell เป็นส่วนใหญ่และเป็นที่ยอมรับว่าฮอร์โมนพวกเดียวกันรอยดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเมื่อสร้างแล้วจะหลั่งออกมาโดยตรงไม่ได้เก็บไว้ เนื่องจาก Leydig cell มีความสามารถจำกัดในการสะสม (Smith et al, 1983) การที่ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงนั้นจะส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมสืบพันธุ์ของกบนาได้ ดังรายงานของ Tangpraputgul et al, 1996 ที่พบว่าปริมาณเทสโทสเตอโรนในกบนาเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มสูงขึ้นในเดือนมีนาคมไปถึงเดือนตุลาคมและฮอร์โมนนี้จะมีปริมาณต่ำในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งกบนาเพศผู้พร้อมที่จะสืบพันธุ์ในเดือนพฤษภาคมและต่อไปเรื่อยๆถึงเดือนตุลาคมพอเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมีน้อยมากและมีกลุ่มเซลล์ลัยดิกที่สร้างฮอร์โมนอยู่จำนวนน้อยทำให้กบนาไม่สามารถที่จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากและลดความสามารถในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. เมทิลพาราไทออนมีผลต่อระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้โดยพบว่าปริมาณของฮอร์โมนในพลาสมาลดลง และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงในกบนาที่เป็นตัวเต็มวัยสูงมากกว่าในกบนาที่ยังไม่โตเต็มวัย
2. เมทิลพาราไทออนมีผลทำลายเนื้อเยื่อ Interstitial tissue และ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัส โดยพบว่าในกบนาตัวเต็มวัยเนื้อเยื่อชั้นนี้จะถูกทำลายมากกว่ากบนาที่ยังไม่โตเต็มวัย
3. เมทิลพาราไทออนทำให้ปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาของกบนาเพศผู้ลดลง โดยมีผลโดยตรงที่ระดับ Leydig cell

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กัมพล อิศรางกูล ณ อยุธยา, นางเยาว์ จันทร์ผ่อง และมุสตี ปริญญาพันธ์. 2532. สันฐานวิทยา และกายวิภาคของกบนา *Rana tigerina*. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 14 : 91- 98.
- ฐิติลาวัฒน์ กลิ่นคล้ายกัน. 2539. ระดับไซโตโครพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาตกพันธุ์ผสมภายหลังสัมผัสเมทิลพาราไธออนและไตรบิวทิลดีน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. 85 หน้า.
- ธีรวรรณ นุตประพันธ์. 2535. ระบบสืบพันธุ์ของกบนา. ใน มุสตี ปริญญาพันธ์ (บรรณาธิการ). การเลี้ยงกบ ชีววิทยาการเลี้ยงและวิธีการขยายพันธุ์. หน้า 12-17. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ธีรวรรณ นุตประพันธ์, นางเยาว์ จันทร์ผ่อง, กัมพล อิศรางกูล ณ อยุธยา และมุสตี ปริญญาพันธ์. 2531. การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบนา (1) การศึกษาการเจริญพันธุ์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 13 : 130 – 139.
- มุสตี ปริญญาพันธ์. การเพาะเลี้ยงกบนา. ใน มุสตี ปริญญาพันธ์ (บรรณาธิการ). การเลี้ยงกบ ชีววิทยาการเลี้ยง และวิธีการขยายพันธุ์. หน้า 22-47. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2535.
- ฝ่ายจัดการสารพิษ กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. 2533. เมทิลพาราไธออน (Methyl parathion). เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. 121 หน้า.
- ภัทรา หาญจริยากุล 2535 การศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายของเมทิลพาราไธออนต่อปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 151 หน้า.
- มะลิวรรณ แสงจันทร์. 2534. ผลกระทบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อการเลี้ยงกุ้ง. แผนการใช้สารเคมีและพิษวิทยา ศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง เครือเจริญโภคภัณฑ์ (ม.ป.ป.)
- มงคล สมัญญา. 2539. ผลของเมวินฟอสและเมทิลพาราไธออนต่อการหลังเทสโทสเตรอนในหนูแรทเพศผู้. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 81 หน้า.
- รังสิมา ไข่เทียมวงศ์. 2538. การเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเตรอนในอวัยวะและพลาสมาของกบนา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 75 หน้า.

สุทธิลักษณ์ อัมพันธ์วงศ์. 2523 การเลี้ยงกบ. หน้า 1-18 กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์คุรุสภา
ลาดพร้าว.

ภาษาอังกฤษ

- Abraham, G.E. 1974. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta.Endocrinol. 183 : 7-42.
- Alvarez, R., Honrubia, M.P., and Herraiez, M.P. 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox (R) and Folidol (R) during larval development of Rana perezi. Arch.Environ.Contam. Toxicol. 28(3) : 349-356.
- Andreoletti, G.E., Mazzi, V., Vellano, C., and Sacerdote, M. 1980. Effects of LHRH on spermiation and serum testosterone levels in the winter newt, Triturus cristatus carnifex. Monitore. Zool. Ital. 14 : 255-262.
- Balasundaram, K., Ramalingam, K., and Selvarajan, V.R. 1995. Phossalone poisoning on the cation-linked ATPases of central – nervous – system of Rana Tigrina. (daudin). Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. & Endocrinol. 111(3). 451-455.
- Camara, A.L., Braga, M.F.M., Rocha, E.S., Santos, M.D., Cortes, W.S., Cintra, W.M., Aracava, Y., Maelicke, A., and Albuquerque, E.X. 1997. Methamidophos: An anticholinesterase without significant effects on postsynaptic receptors or transmitter release. Neurotoxicol. 18(2) : 589-602.
- Chapin, R.E., Phelps, J.L., Somkuti, S.G., Heindel, J.J., and Burka, L.T. 1990. The interaction of sertoli and leydig cells in the testicular toxicity of tri-o-cresyl phosphate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 104 : 483-495.
- Coppage, D.L. 1972. Organophosphate pesticides specific brain AchE –inhibition related to death in sheepshead minnows. Trans. Am Fish. Soc. 101 : 534-536.
- Couch, J.A. 1975. Histopathological effects of pesticides and related chemicals on the liver of fishes, In W.E. Ribelin and G. Migaki. (eds) The Pathology of Fishes. The University of Wisconsin Press.
- Edwards, C.A. 1977. Pesticides in aquatic environments. New York : plenum Press.

- Ekins, R.P. 1970. Theoretical aspects of saturation analysis, *in vitro* procedure with radioisotopes in medicine. International. Atomic Energy. Agency. Vienna. pp. 325.
- Ewing, L.L., Wing, T.Y., Cochran, R.C., Kromann, N., and Zirkin, B.R. 1983. Effect of luteinizing hormone on leydig cell structure and testosterone secretion. Endocrinol. 112(5) : 1763-1769.
- Fulton, M.H, and Chambers, J.E. 1985. The toxic and teratogenic effects of selected organophosphorus compounds on the embryos of three species of amphibians. Toxicol. Lett. 26 : 175-180.
- Gupta, R.C., Thornburg, J.E., Stedman, D.B., and Weisch, F. 1984. Effect of Subchronic administration of methyl parathion on *in vivo* protein synthesis in pregnant rat and their conceptuses. Toxicol. Appl. Pharmacol. 73 (3) : 457-468.
- Hadley, M.E. 1996. Endocrinology. 4th edition Prentice - Hall international, Inc. pp. 518.
- Hall, R.J., and Kolbe, E. 1980. Bioconcentration of organophosphorous insecticides to hazardous levels by amphibians. J. Toxicol. Environ. Health. 6 : 853-860.
- Hall, R.J. 1990. Accumulation metabolism and toxicity of parathion in tadpoles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44 : 629-635.
- Herman, C.A. 1992. Endocrinology. In Feder, M.E., and Burgger, W.W. (eds.), Environmental Physiology of amphibian. Chicago, University of Chicago press. 40-54.
- Honrubia, M.P., Herraiez, M.P., and Alvarez, R. 1993. The carbamate insecticide ZZ-Aphox (R) induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25 : 184-191.
- Hosbeng, E., and Hoy, T. 1989. Organophosphate poisoning of Atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. Acta. Vet. Scan. 330 : 385-390.
- Johnson, M., and Everitt, E. 1988. Essential reproduction. 3th ed. London. Blackwall Scientific Publication.
- Licht, P., McGreery, B.R., Barnes, R., and Pang, R. 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroid and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesheianq.* Gen. Comp. Endocrinol. 50 : 124-145.

- Licht, P., Papkof, H., Farmer, S.W., Muller, C.H., Tsi, H.W., and Crew, D. 1977. Evolution of gonadotropin structure and function. Recent Progr. Horm. Res. 33 : 169-248.
- Kerr, J.B., Knell, C.M., Abbott, M., and Donachie, K. 1987. Ultrastructural analysis of the effect of ethane dimethanesulphonate on the testis of the rat guinea pig, hamster and mouse. Cell Tissue Res. 209 : 452-457.
- Mathew, G., Vijayalaxmi, K.K., and Abdul, R.M. 1992. Methyl parathion induced sperm shape abnormalities in mouse. Mut.Res. 280 (3) : 169-173.
- Matthew, P.H., Robert, L.S., and Larry L.E. 1992. Leydig cell renewal in testes of breeding animals. J. Exp. Zool. 261: 161-172.
- McCreery, B.R., and Licht, P. 1984. Effect of gonadectomy and sex steroid on pituitary gonadotropin release and response to gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Gen. comp. Endocrinol. 54 : 184-196.
- Michael, H.R., Lynn, J.R., and Gordon, I.K. 1992. Histology. A Text and Atlas. Pp. 823.
- Mull, C.H., and Licht, P. 1981. Gonadotropin specificity of androgen secretion by amphibian testes. Gen. Comp. Endocrinol. 42 : 365-377.
- Palmer, T.S.1978. Toxicologic evaluation of a microencapsulated formation of methyl parathion applied dermally to cattle. Am.J.Vet. Res. 39 (3) : 429 – 431.
- Phillips, K. 1990. Where have all the frogs and toads gone? BioScience. 40(6). 422-424.
- Prasada, R.K.S., Ahammad sahib, I.K., and Ramana, R.I.K. 1985. Methyl parathion (O-O-dimethyl-O-4-nitrophenyl thiophosphate) effect on whole-body and tissue respiration in the teleost *Tilapia mossambica* (peters). Ecotoxicol. Envir. 9(3): 339-345.
- Prasada, R.K.S., and Ramma, R.K.V. 1984. Change in the lipid tissue lipid profiles of fish (*Oreochromi mossabicus*) during methyl parathion toxicology a time course study. Toxicol. Lett. 21(2) : 147-153.
- Pierantoni, R., Fasono, S., Di matteo, L., Minucci, S., Varriale, B., and Chieffi, G. 1984. Stimulatory effect of a GnRH agonist (Buserelin) *in vitro* and *in viro* Testosterone production by frog (*Rana esculenta*) testis. Mol. Cell. Endocrinol. 35 : 215-219
- Pierantoni, R., Iela, L., d'Istria, M., Fasano, S., Rastogi, R.K., and Derio, G. 1985. Seasonal testosterone profile and testicular responsiveness to pituitary factors

- and gonadotrophin Releasing hormone during two difference phases of the sexual cycle of the the frog (*Rana esculenta*). J. Endocrinol. 102 : 387 – 392.
- Powell, G.V.N., Dee weese, L.R., and Lamont, T.G. 1982. Evaluation of frogs as a potential source of secondary organophosphorous insecticide poisoning. Can. J. Zool. 60 : 2233-2235.
- Rao, K.S.P., Sahib, I.K.A., and Rao, K.V.R. 1985. Methyl parathion (O-O-Dimethyl 0-4 nitrophenyl thiophosphate) effect on whole body and tissue respiration in Teleost, *Tilapia mossambica* (peters). Ecotoxicol. Environ. Safety. 9 : 339-345.
- Rattner, B.A., and Michael, S.D. 1985. Oganophosphorus insecticide induce decrease in plasma luteinizing hormone concentration in white - footed mice. Toxicol. Lett. 24 : 65-69.
- Reddy, M., and Rao, K.V.R. 1990. Methyl parathion-induced alterations in the acethyl cholinesterase and phosphatases in a penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45 : 452 – 458.
- Reddy, M.,and Rao, K.V.R. 1988. Modulation of carbohydrate metabolism in the selected tissue of marine prawn, *Penaeus indicus* under phosphamidon induced stress. Ecotoxicol. Environ. Safety. 15 : 212 – 220.
- Reddy, P.S., Bhagylakshmi, A., and Ramamurthi, R. 1986. Carbohydrate Metabolism in tissue of fresh water crab (*Oziotelphusa senex senex*) exposed to methyl parathion. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 : 204 - 210.
- Reddy, P.S., Bhagylakshmi, A., and Ramamurthi, R. 1985. Molt-inhibition in the crab *Oziotelphusa senex senex*, following exposure to malathion and methyl parathion. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35 : 92-97.
- Reddy, P.S., Rao, K.V.R., and Murphy, B.N. 1989. Changes in nitrogen metabolism in response to phosphamidon, methyl parathion, and lindane exposure in the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 603-610.
- Rommerts, F.F.G., Grootenhuis, J.W., and Vander Molen, H.J. 1985. Ethane dimethanesulphonate (EDS)specifically inhibits LH- stimulated steroidogenesis in

- Leydig cells isolated from mature rats but not in cells from immature rat. Mol. Cell. Endocrinol. 55 : 87-94.
- Schoor, W.P., and Brausch, J. 1980. The inhibition of acetylcholinesterase in pink shrimp, *Penaeus duorarum* by methylparathion and its oxon, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9 : 599-605.
- Smallridge, R.C., Carr, F.E., and Fein, H.G. 1991. Diisopropyl fluorophosphate (DFP) reduced serum prolactin thyrotropin, luteinizing hormone and growth hormone and increases adrenocorticotropin and corticosterone in rats : involvement of dopaminergic and somatostatinergic as well as cholinergic pathway. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108 : 284-295.
- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., and White, A. 1983. General principles concerning the nature and actions of hormone. In principles of biochemistry: mammalian biochemistry. 7th ed. Singapore : McGraw-Hill book company.
- Sofi, S.D., Donalson, A., and Jelfcoate, S.L. 1986. WHO matched reagent programme method manual. 14th ed. London : Who collaborating center for immunoassay.
- Somkuti, S.G. 1987. Reproductive tract lesions resulting from subchronic administration (63days) of tri- o - cresyl-phosphate in male rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 89 : 43-63.
- Sretarugsa, P., Nakiem, V., Sobhon, P., Chavadej, J., kruatrachue, M., and Upatham, E.S. 1997. Structure of the testis of *Rana tigerina* and its changes during development and seasonal variation . J. Sci. Soc. Thailand. 23 : 75-86.
- Tangpraputgul, P., and Pariyanonth, P. 1999. The influence of transportation on plasma gonadal steroid concentrations in adult frogs, *Rana tigerina rugulosa* and *Rana catesbeiana*. Mole. and Comp. Endocrinol. 477-481.
- Tangpraputgul, P., Pariyanonth, P., and Chaitiamwong, R. 1996. Seasonal changes in plasma gonadal steroids in *Rana tigerina rugulosa* and *Rana catesbeiana*. Thai J. Physiological Science. 9(1) : 35-44.
- Taylor, E.H. 1962. The amphibian fauna in Thailand. The university of Kansas bullatin. 8 : 265 – 599.

- TED Case Studies. 2000. Bengali frog legs export and used of pesticides. <http://www.american.edu/projects/mandala/TED/bangfrog.htm>. 22/12/43.
- Tripathi, G., and Shukla, S.P. 1990. Enzymatic and ultrastructural studies in fresh water catfish : impact of methyl parathion. *Biomed. Envir. Sci.* 3(2) : 166-182.
- Virgil, H.F., Chiou, C.T., and Schmedding, D.W. 1979. Degradation of selected organophosphate pesticides in water and soil. *J. Agr. Food Chem.* 27 : 706-708.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอัจฉริยา ไชยรัตน์ เกิดวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2514 ที่อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2540 ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย