

ผลของยาซัลฟานิลาไมด์ ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของ
ท่อพักเชื้อและตัวเชื้ออสุจิ

EFFECTS OF SULFANILAMIDE ON STRUCTURE
AND FUNCTION OF EPIDIDYMIS AND
EPIDIDYMAL SPERMATOZOA

สุภาพ สุจริต
Suparp Sujarit

ชุมพล ผลประมุล
Chumphol Pholpramool

วิภา วีรวัฒน์นภากุล
Vipa Veerawatnapakul

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Department of Physiology, Faculty of Science,
Mahidol University

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาถึงกลไกการทำให้เป็นหมันชั่วคราวของยาซัลฟานิลาไมด์ในหนูเพศผู้ โดยศึกษาผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ท่อพักเชื้ออสุจิ (epididymis) และต่อตัวเชื้ออสุจิในหนูขาวที่เจริญเติบโตเต็มที่ ทำการป้อนยาซัลฟานิลาไมด์ขนาด 450 มก./กก. (น้ำหนักหนู)/วัน ให้หนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วจึงทำการทดสอบความสามารถในการสืบพันธุ์ พบว่าการผสมติด (fertility) ของหนูลดลงจาก 94% เป็น 18% ($P < 0.05$) ความเข้มข้นของตัวอสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลายลดลงจาก $(2.83 \pm 0.21) \times 10^9$ เป็น $(1.80 \pm 0.11) \times 10^9$ เซลล์/มล. ($P < 0.05$) ส่วนในน้ำกาม ลดลงจาก $(2.08 \pm 0.48) \times 10^7$ เป็น $(0.03 \pm 0.02) \times 10^7$ เซลล์ ($P < 0.05$) เมื่อนำเชื้ออสุจิมาละลายใน phosphate buffer saline (PBS) นาน 60 นาที ความสามารถในการเคลื่อนไหว (motility) ของเชื้ออสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ลดลงจาก 90% เป็น 60% ในหนูปกติ และจาก 60% เหลือ 50% ในหนูที่ได้รับการป้อนยา ส่วนเชื้ออสุจิในน้ำกามมีค่า 80% และ 28-38% ในหนูปกติและหนูที่ได้รับการป้อนยา ตามลำดับ การทดสอบน้ำคัดหลังจากต่อมลูกหมาก (prostate gland) พบว่าสามารถยับยั้งความสามารถในการเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลายได้ โดยการเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิของหนูปกติลดลงจาก 90% เป็น 77% ส่วนหนูที่ได้รับการป้อนยาซัลฟานิลาไมด์ การเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิจะลดลงจาก 60% เป็น 48% เมื่อละลายเชื้ออสุจิในสารละลาย PBS และ prostatic fluid ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของ curvilinear velocity ของเชื้ออสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลายและในน้ำกามมีรูปแบบคล้ายคลึง

คำนำ

ปัจจุบันพบว่ายาซัลฟาบางชนิด เช่น ยาซัลฟาซาลาซีน (Sulfasalazine, Salicylazosulfapyridine) ซึ่งใช้ในการรักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง มีฤทธิ์ทำให้ผู้ป่วยชายมีบุตรยากหรือสามารถยับยั้งการเจริญพันธุ์ของหนูเพศผู้ได้ชั่วคราว^{2,3,10,11} จากการทดลองในหนูพบว่าสารซัลฟาพิริดีน (sulfapyridine) ซึ่งได้จากการย่อยสลายยาซัลฟาซาลาซีนโดยเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหาร เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญพันธุ์^{4,5} ยาซัลฟาซาลาซีนและสารซัลฟาพิริดีนไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนเพศ และอัตราการสร้างเชื้ออสุจิ (spermatogenesis) ในลูกอัมชะ แต่อาจจะออกฤทธิ์ที่ท่อพักเชื้อ (epididymis) ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนไหว และการผสมไข่ติดของเชื้ออสุจิลดลง

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่ายาซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ซึ่งเป็นยาตัวหนึ่งในกลุ่มซัลฟามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญพันธุ์ของหนูเพศผู้ได้เช่นกัน^{6,7} ดังนั้นยาทั้งสองชนิดนี้จึงน่าจะเป็นต้นแบบของยากำเนิดในเพศชายที่ดี หากมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อไปเพราะเป็นยาที่ออกฤทธิ์เร็ว และร่างกายสามารถกลับคืนสู่ภาวะเจริญพันธุ์ปกติได้เร็วหลังการหยุดใช้ยาโดยไม่มีผลต่อฮอร์โมนเพศและการสร้างเชื้ออสุจิ จึงทำให้ผลข้างเคียงของยาประเภทนี้ต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย ความรู้สึทางเพศและการผันแปรของฮีนในเชื้ออสุจิไม่มีหรือมีน้อยมาก อย่างไรก็ตาม การพัฒนายากำเนิดในเพศชายจากสารต้นแบบนี้ยังจะเป็นไปได้ยากในขณะนี้ เพราะกลไกการออกฤทธิ์ที่ท่อพักเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เนื่องจากการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิเป็นลักษณะที่แสดงออกที่สำคัญอย่างหนึ่งของการมีพัฒนาการเพื่อการผสมไข่ติด (sperm maturation process) การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาผลของยาซัลฟานิลาไมด์ต่อการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) และเชื้ออสุจิในน้ำกาม (ejaculated spermatozoa) และผลที่มีต่อโครงสร้างของเซลล์นุท่อเชื้ออสุจิและตัวเชื้ออสุจิ ซึ่งความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ยาซัลโฟนาไมด์ที่จะนำมาทดสอบและพัฒนาเป็นยากำเนิดในเพศชายต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Fischer ที่เจริญวัยเต็มที่แล้ว (มีอายุประมาณ 90 วัน หรือน้ำหนักตัวมากกว่า 250 ก.) เป็นสัตว์ทดลอง เหตุที่ใช้หนูขาวเพราะจากการศึกษาของ Srikhao และ Pholpramool⁹ พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อยาซัลฟาตัวอื่นได้ดีกว่าหนูถีบจักร และหนู hamster กล่าวคือความสามารถในการผสมไข่ติดของหนูขาวจะลดลงหลังได้รับยาประมาณ 1 สัปดาห์ และเมื่อหยุดป้อนยาประมาณ 1 สัปดาห์ ความสามารถนี้จะกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ซึ่งเร็วกว่าในหนูถีบจักรและหนู hamster หนูขาวที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ผ่านการตรวจสอบความสามารถในการเจริญพันธุ์ และมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงเกิน 80%

วิธีการ

1. ศึกษาผลของยาซัลฟานิลาไมด์ต่อการเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิจากท่อพักเชื้อส่วนปลายและจากน้ำกาม

แบ่งหนูขาวออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละประมาณ 5-6 ตัว หนูกลุ่มที่ 1 และ 3 ป้อนน้ำมันข้าวโพด ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 และ 4 ป้อนยาซัลฟานิลาไมด์ซึ่งแขวนลอยในน้ำมันข้าวโพดที่ขนาด 450 มก./กก. น้ำหนักหนูทุกวัน เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ และทำการทดสอบความสามารถในการเจริญพันธุ์โดยให้ผสมกับหนูตัวเมียหลังได้รับยา 5 สัปดาห์ตามวิธีของ Pholpramool⁵ เพื่อทดสอบความสามารถในการผสมไข่ติดที่ลดลงนั้นว่าเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของเชื้อสpermหรือไม่ เก็บตัวอย่างเชื้อจากท่อพักเชื้อส่วนปลายจากหนูกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยวิธี retrograde perfusion จากท่อ vas deferens หลังจากทำให้หนูสลบด้วยยาโซเดียมเพนโทบาร์บิทอล และเก็บตัวอย่างเชื้อจาก ejaculated semen ในหนูกลุ่มที่ 3 และ 4 โดยการทำให้ dislocation กระดูกคอ ซึ่งจะ ทำให้หนูมีอาการเกร็งพร้อมหลังน้ำกามก่อนตาย นำน้ำเชื้อที่ได้จากหนูกลุ่มที่ 1,2,3 และ 4 มาตรวจนับจำนวนเชื้อ/มล. (ความเข้มข้น) ด้วย hemocytometer เพื่อดูว่าตัวนี้ลดจำนวนเชื้อหรือไม่ น้ำเชื้ออีกส่วนหนึ่งนำมาวัดการเคลื่อนไหวหลังจากเจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10 เซลล์/มล.

วิธีวัดความสามารถในการเคลื่อนไหว

เจือจาง (dilute) เชื้อสperm ด้วย PBS บ่ม (incubate) เชื้อที่อุณหภูมิ 34°C. เป็นเวลา 10 นาที และที่เวลา 0, 20, 40 และ 60 นาที หลังจากการบ่มเชื้อ นำเชื้อมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast บันทึกการเคลื่อนไหวของเชื้อด้วยวิดีโอเทปประมาณ 2-3 นาที

การวิเคราะห์การเคลื่อนไหว (motility) วัดหลังจากการ playback นับจำนวนเชื้อสperm ประมาณ 100 ตัว/ครั้ง และคำนวณค่าดังต่อไปนี้

1. % motile sperm = (จำนวน motile sperm/จำนวน non-motile+motile sperm) × 100
2. speed (velocity)
 - 2.1 straight forward movement = distance from start to final/time
 - 2.2 curvilinear speed = real path of distance from start to final/time

นำค่าที่ได้ทั้งหมดมาเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากเชื้อหนูปกติและหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์

2. ศึกษาผลของ accessory gland secretion ต่อการเคลื่อนไหวของเชื้อสperm จากท่อพักเชื้อส่วนปลายจากการศึกษาขั้นต้นของ Pholpramool (จากการสังเกต)⁴⁻⁷ และของ Wong และคณะ¹¹ พบว่ายาซัลฟานิลาไมด์ ถูกสะสมอยู่ในท่อพักเชื้อและน้ำคั่งหลังของต่อม seminal vesicles และ/หรือต่อม ventral prostate จึงทำการทดสอบว่ายาที่อยู่ในน้ำคั่งหลังของต่อมดังกล่าวมีผลต่อการเคลื่อนไหวของเชื้อสpermหรือไม่ และพบว่าการเคลื่อนไหวของเชื้อสperm จากท่อพักเชื้อส่วนปลายมีค่าสูงกว่าที่พบจากน้ำกาม ดังนั้น น้ำคั่งหลังจากต่อม seminal vesicles หรือ จากต่อม ventral prostate อาจมีผลต่อการเคลื่อนไหวของเชื้อสperm

เก็บตัวอย่างเชื้อจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองขั้นตอนที่ 1 และเก็บ prostatic fluid (PF) จากหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์และจากหนูปกติ แล้วดำเนินการทดลองดังนี้

- 2.1 เจือจางเชื้อสperm ที่ได้จากหนูที่ได้รับยา (treated rat) ด้วย secretion จากหนูที่ได้รับยา
- 2.2 เจือจางเชื้อสperm ที่ได้จากหนูที่ได้รับยาด้วย secretion จากหนูปกติ (untreated rat)
- 2.3 เจือจางเชื้อสperm ที่ได้จากหนูปกติด้วย secretion จากหนูปกติ

2.4 เจือจางเชื้ออสุจิที่ได้จากหนูปกติด้วย secretion จากหนูที่ได้รับยา

2.5 วัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และหาความเร็ว (velocity) ของการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิในการทดลองดังกล่าวตามวิธีการของการทดลองขั้นตอนที่ 1

3. ศึกษาผลของยาซัลฟานิลาไมด์ต่อโครงสร้างของเซลล์ที่บู่ท่อพักเชื้อส่วนต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ และโครงสร้างของเชื้ออสุจิ

ศึกษาผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้ออสุจิในท่อพักเชื้อและเซลล์ที่บู่ท่อพักเชื้อส่วนต่างๆ โดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อให้ทราบถึงตำแหน่งที่ยานี้ออกฤทธิ์ต่อท่อพักเชื้อ

แบ่งหนูขาวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ สำหรับการทดลองระยะสั้น (6 สัปดาห์) และระยะยาว (12 สัปดาห์) แบ่งหนูแต่ละกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือหนูกลุ่มปกติ และกลุ่มหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ขนาด 450 มก./กก. (น้ำหนักหนู) ทุกวันติดต่อกัน และทำการทดสอบความสามารถในการผสมไข่ติดตามวิธีของ Pholpramool⁵ หลังสัปดาห์ที่ 5 สำหรับหนูกลุ่ม 6 สัปดาห์ และสัปดาห์ที่ 7, 9 และ 11 หลังได้รับยาสำหรับหนูกลุ่ม 12 สัปดาห์ และเก็บเนื้อเยื่อหลังจากให้ยา 6 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์

วิธีการเก็บเนื้อเยื่อ

หลังจากวางยาสลบหนูด้วยยาโซเดียมเพนโทบาร์บิทอล ทำการตรึง (fix) เซลล์ โดยใช้สารละลาย fixative ที่ประกอบด้วย 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer หลังจากตัดลูกอัมชะและท่อพักเชื้อออกมาทั้ง 2 ข้าง แบ่งท่อพักเชื้อออกเป็น 3 ส่วน คือ segment 1A segment 2 และ segment 3 ตามลำดับ ตามลักษณะการแบ่งของ Reid & Cleland⁸ และเตรียมเนื้อเยื่อต่อไปเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การวิเคราะห์ข้อมูล (statistical analysis)

เปรียบเทียบข้อมูลของการผสมติด ความเข้มข้น และความสามารถในการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลายและในน้ำกามของหนูกลุ่มควบคุมและหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ เพื่อหาัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney U test

ผล

1. ผลของยาซัลฟานิลาไมด์ต่อการผสมติดและความเข้มข้นของเชื้ออสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลายและน้ำกาม

หลังจากให้ยาซัลฟานิลาไมด์หนูขาวเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการผสมติดลดลงจาก 94% เป็น 18% (ตารางที่ 1) เมื่อวัดความเข้มข้นของตัวอสุจิในท่อพักเชื้อส่วนปลายและปริมาณของตัวอสุจิในน้ำกามพบว่า หนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์มีความเข้มข้นของตัวอสุจิในท่อพักเชื้อลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง และปริมาณของตัวอสุจิในน้ำกามลดลงอย่างมากคือเกือบ 100 เท่า (ตารางที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาตรของน้ำกามจากหนูกลุ่มที่ได้รับ

ยาซัลฟานิลลาไมด์ไม่ลดลง แสดงว่ายาทำให้มีผลต่อกลไกการจับตัวของสูกิจออกจากท่อพักเชื้อส่วนปลายด้วย

2. ผลของยาซัลฟานิลลาไมด์ต่อการเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจจากท่อพักเชื้อส่วนปลายและจากน้ำกาม

2.1 ผลต่อการเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจ

เมื่อนำเชื้อสูกิจจากท่อพักเชื้อส่วนปลายของหนูมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) พบว่าเชื้อสูกิจที่เคลื่อนไหวได้ในหนูกลุ่มปกติมี 90% แต่เชื้อสูกิจที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลายของหนูกลุ่มที่ได้รับยาซัลฟานิลลาไมด์ จะมีเชื้อสูกิจที่เคลื่อนไหวได้ประมาณ 60% และการเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจทั้ง 2 กลุ่มจะลดลงหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C นาน 60 นาที เชื้อสูกิจที่เคลื่อนไหวได้ในกลุ่มที่ได้รับยาจะมีจำนวนเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าในหนูกลุ่มปกติทุกช่วงเวลา (รูปที่ 1)

การเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจในน้ำกามให้ผลที่คล้ายคลึงกับการเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจจากท่อพักเชื้อส่วนปลายคือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวน้ำในหนูกลุ่มปกติจะสูงกว่าหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลลาไมด์ และการเคลื่อนไหวน้ำของเชื้อสูกิจในหนูกลุ่มปกติจะคงอยู่นานตลอด 60 นาที ในขณะที่ของหนูกลุ่มที่ได้รับยาจะลดลงระหว่างการทดลอง 60 นาที (รูปที่ 2)

2.2 ผลต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ของเชื้อสูกิจจากท่อพักเชื้อส่วนปลายและจากน้ำกาม

2.2.1 ผลของยาซัลฟานิลลาไมด์ต่อการเคลื่อนที่แบบ straight forward movement

เชื้อสูกิจที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลายของหนูกลุ่มปกติ และหนูกลุ่มที่ได้รับยาซัลฟานิลลาไมด์เคลื่อนที่ไปข้างหน้าแบบ straight forward movement ด้วยความเร็วที่ใกล้เคียงกัน และมีลักษณะใกล้เคียงกันตลอดเวลา 60 นาทีของการทดลอง คือมีความเร็วตั้งต้นที่ 0 นาที ประมาณ 55 ไมครอน/วินาที หลังจากนั้นความเร็วค่อย ๆ ลดลงเป็น 40 ไมครอน/วินาที และ 45 ไมครอน/วินาที สำหรับหนูกลุ่มปกติ และหนูกลุ่มที่ได้รับยา ตามลำดับ (รูปที่ 3)

ส่วนการเคลื่อนที่ของเชื้อสูกิจในน้ำกามในหนูกลุ่มปกติจะมีค่าสูงกว่าที่พบในหนูที่ได้รับยาทุก ๆ เวลาที่ศึกษาแต่มีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงความเร็วที่คล้ายคลึงกันคือจะสูงในนาทีที่ 0 และ 20 หลังจากนั้นจะลดลง (รูปที่ 4) จะมีความเร็วประมาณ 65-58 ไมครอน/วินาที ในหนูกลุ่มปกติ และ 57-43 ไมครอน/วินาที ในหนูที่ได้รับยา

2.2.2 ผลของยาซัลฟานิลลาไมด์ต่อการเคลื่อนที่ด้วยความเร็วแบบ curvilinear

การเคลื่อนที่ด้วยความเร็วแบบ curvilinear ของเชื้อสูกิจจากท่อพักเชื้อส่วนปลายในหนูกลุ่มปกติจะมีค่าสูงกว่าค่าของหนูกลุ่มที่ได้รับยาตลอดระยะเวลา 60 นาทีของการศึกษา โดยมีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงความเร็วที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 5) คือในหนูกลุ่มปกติมีค่าประมาณ 148 ไมครอน/วินาที ที่ 0 นาที ต่อมาความเร็วจะลดลงและคงที่ในนาทีที่ 20 และ 40 หลังจากนั้นจะลดลงเป็น 122 ไมครอน/วินาทีเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับยาความเร็วมีค่าประมาณ 123-108 ไมครอน/วินาที

ความเร็วของเชื้อสูกิจจากน้ำกามของหนูกลุ่มที่ได้รับยาได้น้อยกว่าหนูกลุ่มปกติทุก ๆ เวลาของการศึกษา หนูกลุ่มปกติมีค่าเฉลี่ยตลอดการทดลอง 60 นาทีประมาณ 140 ไมครอน/วินาที ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับยามีค่า 105 ไมครอน/วินาที เมื่อเริ่มต้น และความเร็วจะลดลงเหลือประมาณ 87 ไมครอน/วินาที ในนาทีที่ 40 และมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 6)

ส่วนการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิในน้ำกามของหนูกลุ่มปกติจะมีค่าสูงกว่าที่พบในหนูกลุ่มที่ได้รับยาทุก ๆ ช่วงเวลาที่ศึกษา แต่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงความเร็วที่คล้ายคลึงกันคือ จะสูงในนาทีที่ 0 และ 20 หลังจากนั้นจะลดลง (รูปที่ 4) โดยจะมีความเร็วประมาณ 65-58 ไมครอน/วินาที ในหนูกลุ่มปกติ และ 57-43 ไมครอน/วินาที ในหนูที่ได้รับยา

3. ศึกษาผลของ prostatic fluid (PF) ต่อการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย

จากการทดลองที่ 1 (รูปที่ 1 และ 2) พบว่าการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิในน้ำกามที่ละลายใน PBS ของหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์มีค่าน้อยกว่าการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย แสดงให้เห็นว่า น้ำคืดหลังของต่อม prostate หรือ seminal vesicles อาจมีผลยับยั้งหรือลดการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิ แต่เนื่องจาก น้ำคืดหลังจากต่อม seminal vesicles เก็บตัวอย่างได้ยาก ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จะเลือกใช้น้ำคืดหลังจากต่อม prostate

เมื่อนำเชื้ออสุจิจากท่อพักเชื้อส่วนปลายมาละลายใน PF ที่ได้จากหนูตัวเดียวกัน ผลปรากฏว่า เชื้ออสุจิที่เคลื่อนที่ได้ในหนูปกติมีค่า 77% แต่เชื้ออสุจิที่ละลายใน PBS จะเคลื่อนที่ได้ถึง 90% (รูปที่ 7) ในทำนองเดียวกันเมื่อนำเชื้ออสุจิจากตำแหน่งเดียวกันของหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์มาละลายใน PF เชื้ออสุจิที่เคลื่อนที่ได้มีประมาณ 48% แต่ถ้าละลายใน PBS จะมีค่าประมาณ 60% เชื้ออสุจิที่เคลื่อนที่ได้ในหนูกลุ่มปกติ และกลุ่มที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ที่ละลายใน PF จะมีค่าต่ำกว่าหนูปกติและหนูที่ได้รับยาที่ละลายเชื้ออสุจิใน PBS

3.1 ผลต่อ straight forward movement

เมื่อนำเชื้ออสุจิจากท่อพักเชื้อส่วนปลายของหนูกลุ่มปกติมาละลายใน PF ของหนูตัวเดียวกัน พบว่าเชื้ออสุจิเคลื่อนที่ด้วยความเร็วแบบ straight forward movement มีค่าประมาณ 51 ไมครอน/วินาที ตลอดระยะเวลา 60 นาทีของการทดลองซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับที่พบเมื่อนำเชื้ออสุจิของหนูปกติมาละลายใน PF ของหนูที่ได้รับยา ในขณะที่ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างของความเร็วในหนูที่ได้รับยาที่นำเชื้ออสุจิมาละลายใน PF ของหนูปกติ หรือเชื้ออสุจิที่นำมาละลายใน PF ของหนูที่ได้รับยา ซึ่งมีค่าประมาณ 57 ไมครอน/วินาที (รูปที่ 8)

3.2 ผลต่อ curvilinear velocity

รูปที่ 9 แสดงค่าของความเร็วของการเคลื่อนที่ที่เป็นเส้นโค้งของเชื้ออสุจิของหนูกลุ่มปกติที่นำมาละลายใน PF ของหนูตัวเดียวกัน และที่ละลายใน PF ของหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ จะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกัน และมีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของความเร็วที่เหมือนกันตลอดระยะเวลา 60 นาที ของการบ่มเชื้อ คือมีค่าประมาณ 150 ไมครอน/วินาที และเช่นเดียวกันเมื่อนำเชื้ออสุจิของหนูกลุ่มที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์มาละลายใน PF ของหนูตัวเดียวกัน และ PF ของหนูปกติ พบว่ามีการเคลื่อนที่ที่เป็นเส้นโค้งด้วยความเร็วที่ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาของการทดลองคือ 122-129 ไมครอน/วินาที

4. ผลของยาซัลฟานิลาไมด์ต่อโครงสร้างของเซลล์ที่บู่ท่อพักเชื้อส่วนต่าง ๆ และโครงสร้างของตัวอสุจิ

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในความสูงของเซลล์และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อพักเชื้ออสุจิในหนูที่ได้รับยานาน 6 หรือ 12 สัปดาห์ (กลุ่ม 6 สัปดาห์ ประกอบด้วยหนูปกติ 3 ตัว หนูที่ได้รับยา 3 ตัว และ 12 สัปดาห์ประกอบด้วยหนูปกติ 2 ตัว และหนูที่ได้รับยา

2 ตัว) ของทุก ๆ segment ที่ศึกษา ซึ่งค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ของความสูงของเซลล์ และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อพักเชื้อหนูกุ้ง 2 กลุ่ม แสดงไว้ในตารางที่ 3 (ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนครั้งในการวัดท่อ)

จากตารางที่ 3 ค่าความสูงเฉลี่ยของเซลล์ที่ท่อพักเชื้อส่วน segment IA, segment 2 และ 3 ในหนูกุ้งที่ได้รับยา มีค่าประมาณ 63, 38 และ 23 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความสูงของเซลล์ที่ท่อพักเชื้อที่วัดได้จากหนูกุ้งกลุ่มปกติ คือ 63, 37 และ 31 ไมครอน สำหรับเซลล์ที่มาจาก segment IA, 2 และ 3 ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อพักเชื้อทั้ง 3 ส่วนคือ segment IA, 2 และ 3 ซึ่งมีค่าในหนูกุ้งปกติคือ 216, 170 และ 182 ไมครอน และ 219, 168 และ 182 ไมครอน ในหนูกุ้งที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา ultrastructure พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์คือใน segment IA ของหนูกุ้งที่ได้รับยาจะมี large vacuoles ใน apical region เพิ่มขึ้น และจำนวน lipid droplets ในไซโตพลาสซึมเหนือนิวเคลียสมีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งตรงข้ามกับ segment 2 พบว่า vacuoles ที่บริเวณ apical region และ lipid droplets ที่อยู่เหนือบริเวณนิวเคลียสของหนูกุ้งมีจำนวนลดลงหลังจากได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ นอกจากนี้พบว่าขนาดของ Golgi apparatus เล็กลงด้วย สำหรับใน segment 3 lipid droplets ที่พบบริเวณเหนือนิวเคลียส และที่อยู่บน basement membrane มีจำนวนลดลง ทั้งขนาดของ Golgi apparatus ก็ลดลงด้วยหลังจากได้รับยาซัลฟานิลาไมด์

รูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนบ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ส่วนหางของเชื้อสุงิ จาก sperm pellet ที่ได้จากท่อพักเชื้อส่วนปลาย ในส่วน middle piece และ principal piece (ตารางที่ 4) เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่พบในหางทั้ง 2 ส่วนมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 4% ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติในหนูกุ้งที่ได้รับยาพบได้บ่อยกว่าในหนูกุ้งปกติประมาณ 2-3 เท่า เนื่องจากมีการแตกของ coarse filament ทำให้เสีย contractile filament ไปมากกว่าครึ่งจากจำนวนปกติคือ 9+2 fibers

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาซัลฟานิลาไมด์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญพันธุ์ของหนูกุ้งเพศผู้ได้ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับที่ Pholpramool ได้รายงานไว้เมื่อปี ค.ศ.1987 และ 1988^{6,7} ทั้งนี้เพราะยาซัลฟานิลาไมด์ไปลดความเข้มข้นของเชื้อสุงิในท่อพักเชื้อส่วนปลาย โดยเฉพาะในน้ำกาม และลดการเคลื่อนที่ของเชื้อสุงิจากท่อพักเชื้อส่วนปลายและจากน้ำกาม เป็นที่น่าสังเกตว่ายาจะมีผลลดการเคลื่อนที่ของเชื้อสุงิในน้ำกามมากกว่าในท่อพักเชื้อส่วนปลาย

การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของเชื้อสุงิ จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงความเร็วแบบ curvilinear velocity คือระยะทางที่เคลื่อนที่ได้ทั้งหมดต่อระยะเวลา I หน่วยเวลามากกว่าการเคลื่อนที่ด้วยความเร็วแบบ straight forward movement ซึ่งเป็นระยะทางการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายที่เป็นเส้นตรงต่อระยะเวลา I หน่วย

น้ำคืดหลังของต่อม accessory มีผลในการลดการเคลื่อนที่ของเชื้อสุมิจินำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลายและจากน้ำกามโดยจะออกฤทธิ์ต่อเชื้อสุมิจินน้ำกามมากกว่าเชื้อสุมิจินจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนผลงานของ Pholpramool⁴⁻⁷ กับ Wong และคณะ¹¹ ที่ว่ายาซัลฟานิลาไมด์เมื่อถูกย่อยสลายจะสะสมอยู่ในท่อพักเชื้อ และน้ำคืดหลังของต่อม accessory male sex organs

การลดลงของภาวะการเจริญพันธุ์ของหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์นี้อาจเป็นเพราะยาไปมีผลต่อตัวเชื้อสุมิจินโดยตรง คือทำให้ coarse filament ในส่วนทางที่เรียกว่า middle piece และ principal piece แตกทำให้มีการสูญเสีย contractile filament ที่จำเป็นสำหรับการเคลื่อนไหว หรือมีผลทางอ้อมโดยผ่านเยื่อท่อพักเชื้อสุมิจินซึ่งจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของเซลล์ในการหลั่งสารหรือดูดซึมสารกลับ เพื่อรักษาภาวะแวดล้อมของเชื้อสุมิจินให้คงที่พอเหมาะ เพราะพบว่ามีการลดขนาดของ Golgi apparatus และมีการเปลี่ยนแปลงจำนวน lipid droplets ของเซลล์ใน segment IA, 2 และ 3 ซึ่ง Golgi apparatus เป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกลัยโคโปรตีนในเซลล์ ส่วน vacuoles และ lipid droplets มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมหรือขับออกของสาร¹

สรุปและข้อเสนอแนะ

ยาซัลฟานิลาไมด์ลดความสามารถในการเจริญพันธุ์ของหนูขาวได้ โดยไปลดการเคลื่อนที่ของเชื้อสุมิจินซึ่งอาจมีผลโดยตรงต่อตัวสุมิจินคือทำให้ coarse filament ที่อยู่ในส่วน middle piece และ principal piece แตกซึ่ง filament นี้จะเป็นตัวที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของหางตัวสุมิจิน หรืออาจออกฤทธิ์ทางอ้อมโดยทำให้การทำงานของเยื่อท่อพักเชื้อเปลี่ยนแปลงซึ่งจะทำให้สภาวะแวดล้อมของเชื้อสุมิจินผิดไปจากปกติและมีผลถึงตัวเชื้อสุมิจินด้วยยานี้ให้ผลเหมือนกันเมื่อใช้ในระยะสั้น (6 สัปดาห์) หรือระยะยาว (12 สัปดาห์) กล่าวคือจะลดหน้าที่ของเซลล์ท่อพักเชื้อ segment 2 และ 3 เพราะขนาดของ Golgi apparatus เล็กลง และอาจจะมีการเพิ่มหน้าที่ของเซลล์ใน segment IA เพราะมีการเพิ่มจำนวนของ vacuole และ lipid droplets ภายในเซลล์ ซึ่งข้อสรุปนี้ต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติม โดยการตัด section จากจำนวน block อื่นหรืออาจใช้จำนวนสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้น เพื่อพิสูจน์ว่ายานั้นทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับยา และอาจศึกษาใน *in vitro* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture technique) เพื่อพิสูจน์ว่ายาซัลฟานิลาไมด์ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเชื้อสุมิจินหรือออกฤทธิ์ผ่านเซลล์ท่อพักเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าการเคลื่อนที่ของเชื้อสุมิจินเป็นเครื่องหมาย (marker) ที่ดีสำหรับการศึกษา fertility test ซึ่งจะสัมพันธ์กับ curvilinear velocity มากกว่า straight forward velocity

เอกสารอ้างอิง

1. Fawcett, D.W. and Hoffer, A.P. Failure of Exogenous Androgen to Prevent Regression of the Initial Segment of the Rat Epididymis after Efferent Duct Ligation or Orchidectomy. *Biol. Reprod.*, 1979, 20, 162-181.
2. Giwercman, A. and Skakkeback, N.E. The Effect of Salicylazosulphapyridine (sulphasalazine) on Male Fertility. *Rev. Int. J. Androl.*, 1986, 9, 38-52.
3. Levi, A.J., Fischer, A.M., Hughes, L. and Hendry, W.F. Male Infertility due to Sulphasalazine. *Lancet*, 1979 2, 276-278.

4. Pholpramool, C. and Srikhao, A. Antifertility Effect of Sulfasalazine in the Male Rat. *Contraception*, 1983, 28, 273-279.
5. Pholpramool, C. Antifertility Action of Sulfasalazine in the Male Rat. Final Report, Mahidol University Research Grant, 1985.
6. Pholpramool, C. A Study of the Antifertility Effect of Sulfonamide Drugs in the Male Rats. Final Report, Mahidol University Research Grant, 1987.
7. Pholpramool, C. Sulfonamide Drugs as a Male Antifertility Agent. Progress Report No. 3, US-Israel CDR Program, 1988.
8. Reid, B.L. and Cleland, K.W. The Structure and Function of the Epididymis. I. The Histology of the Rat Epididymis. *Aust. J. Zool.*, 1957, 5, 223-246.
9. Srikhao, A. and Pholpramool, C. The Antifertility Effects and Toxicity of Sulfasalazine and Sulfapyridine on Male Rats, Hamsters and Mice. *Thai J. Physiol. Sci.*, 1989, 2, 11-20.
10. Toth, A. Reversible Toxic Effect of Salicylazosulfapyridine on Semen Quality. *Fert. Steril.*, 1979, 31, 538-540.
11. Wong, P.Y.D., Leu, S.K.D. and Fu, W.O. Antifertility Effect of Some Sulphonamides and Related Compound and Their Accumulation in the Epididymides of Male Rats. *J. Reprod. Fert.*, 1987, 81, 259-267.

ตารางที่ 1. ผลของยาซัลฟาไมด์ต่อการผสมติด (fertility) ของหนูขาว

Group	Fertility (%)	
	Before drug	6 weeks after drug
Control	92.6 ± 2.9 (10)	87.7 ± 5.3 (10)
Sulfanilamide	94.3 ± 2.9 (10)	17.8 ± 3.8* (10)

Mean ± SEM (n)

*P<0.01 when compared to the control (Mann-Whitney U test)

ตารางที่ 2. ผลของยาซัลฟาไมด์ต่อความเข้มข้นของเชื้ออสุจิ (mean ± SEM) จากท่อพักเชื้ออสุจิ และจากน้ำกาม

Group	Sperm concentration/sperm number	
	cauda epididymidis (x10 ⁹ cells/ml)	ejaculate (x10 ⁷ cells/ejaculate)
Control	2.88 ± 0.21 (10)	2.08 ± 0.48 (7)
SN-treated	1.82 ± 0.11 (11)*	0.03 ± 0.02 (8)*

Numbers in Parenthesis are number of rats.

*P<0.01 when compared to the control (Mann-Whitney U test)

ตารางที่ 3. ผลของยาซัลฟาไมด์ต่อความสูงของเซลล์ และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อในส่วนต่าง ๆ ของท่อพักเชื้อสุจิ

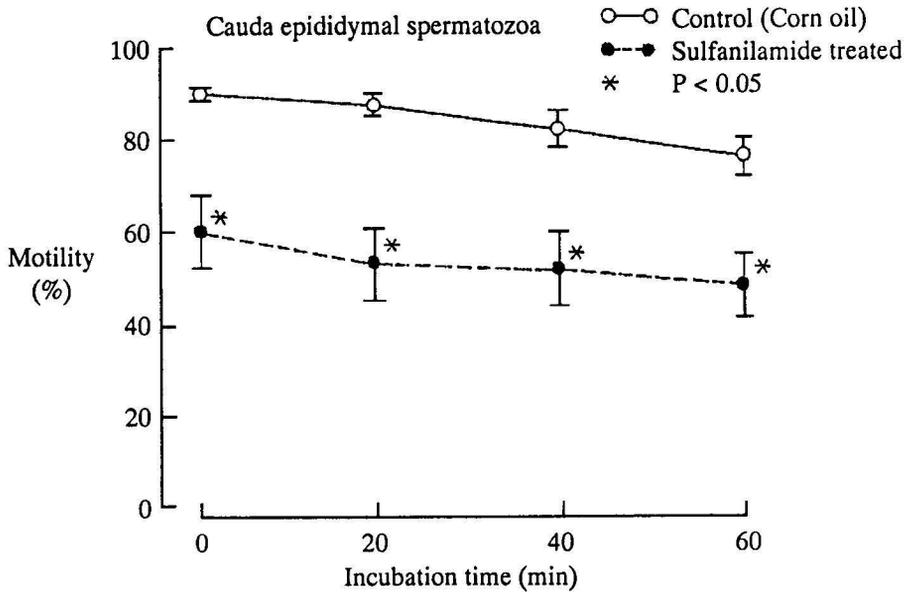
Epididymis	Epithelial height (μm)		Duct diameter (μm)	
	Control	Sulfanilamide	Control	Sulfanilamide
Segment IA	62.7 \pm 0.8 (201)	63.2 \pm 0.8 (239)	215.9 \pm 2.4 (61)	219.1 \pm 1.8 (97)
Segment 2	37.4 \pm 0.7 (456)	37.7 \pm 0.5 (296)	169.7 \pm 3.2 (200)	168.0 \pm 0 (194)
Segment 3	31.3 \pm 0.7 (158)	28.7 \pm 1.2 (155)	182.4 \pm 1.9 (49)	182.0 \pm 0 (50)

Mean \pm SEM (n)

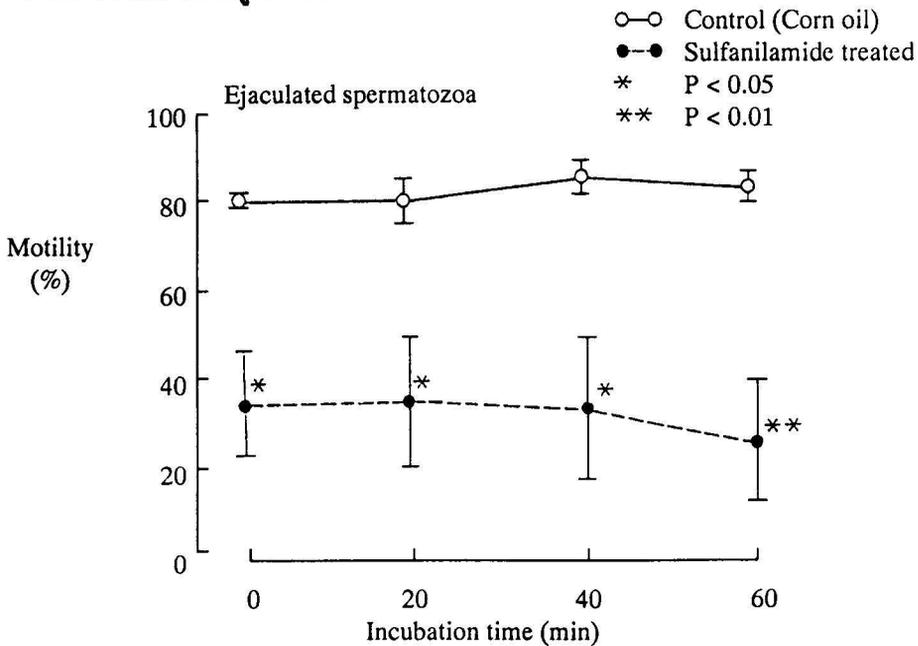
ตารางที่ 4. ผลของยาซัลฟาไมด์ต่อโครงสร้างของตัวสุจิ

Experiment	No. of animals	% Abnormality of spermatozoa			
		Middle piece	Total number sperm's tail measured	Principal piece	Total number sperm's tail measured
Control	2	2.4 \pm 0.8	963	1.2 \pm 0.4	605
Sulfanilamide	3	4.4 \pm 1.4	728	4.2 \pm 0.7	744

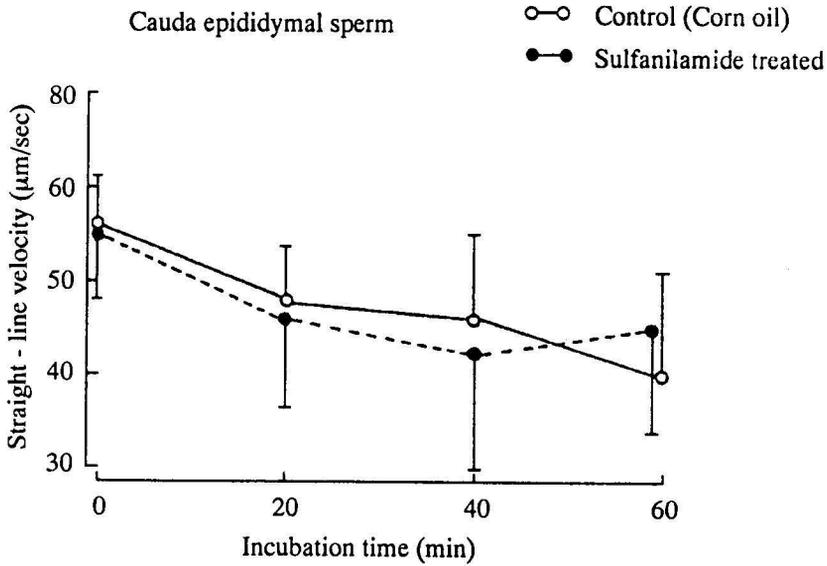
Mean \pm SEM



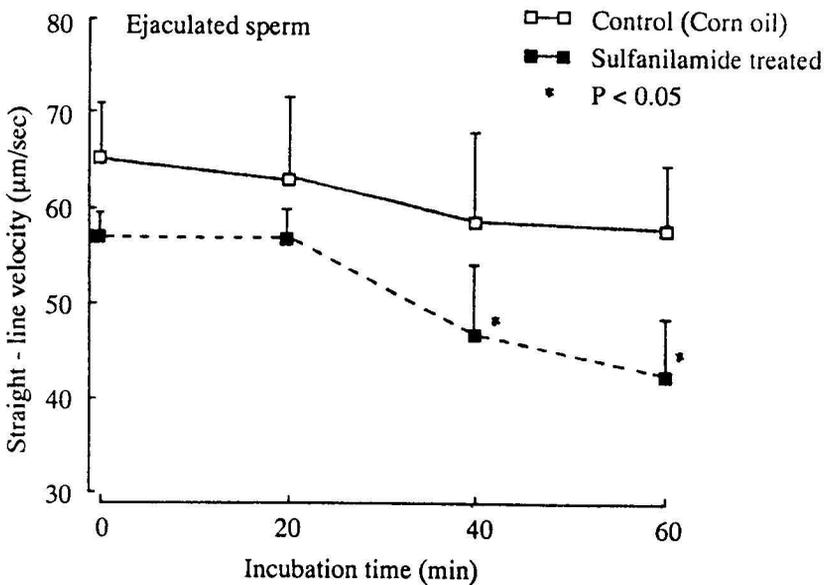
รูปที่ 1. แสดงความสามารถในการเคลื่อนไหว (motility) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean ± SEM จากหนู 6-7 ตัว



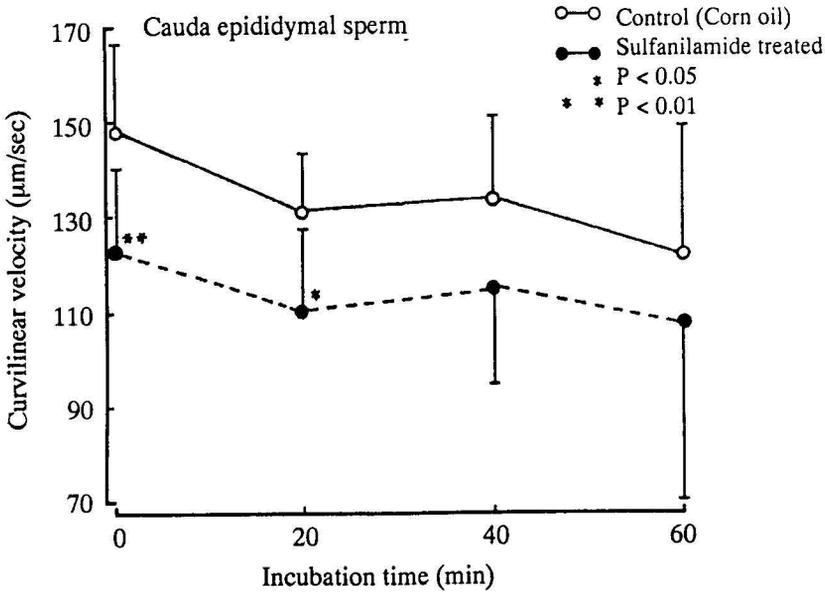
รูปที่ 2. แสดงความสามารถในการเคลื่อนไหว (motility) ของอสุจิน้ำกาม (ejaculated spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean ± SEM จำนวน 3-6 ตัว



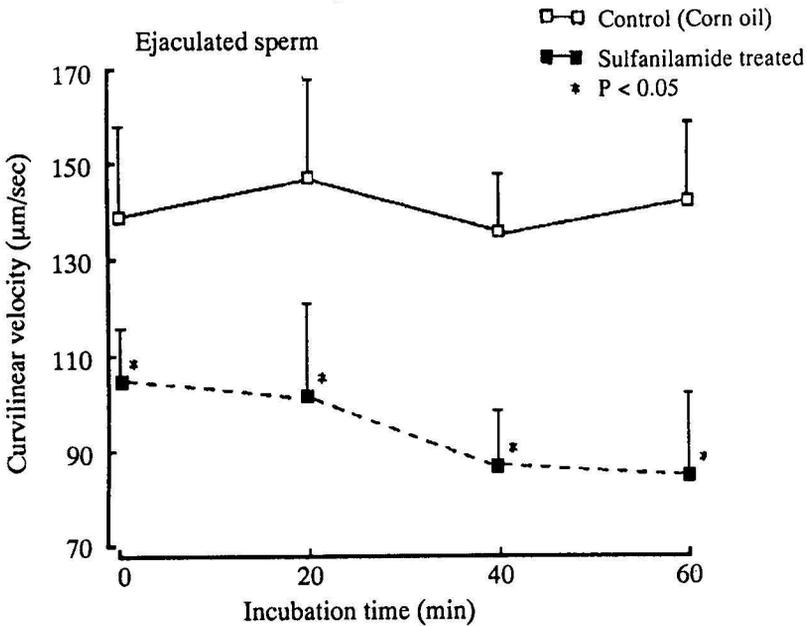
รูปที่ 3. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นตรง (straight-line velocity) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากหนู 6 ตัว



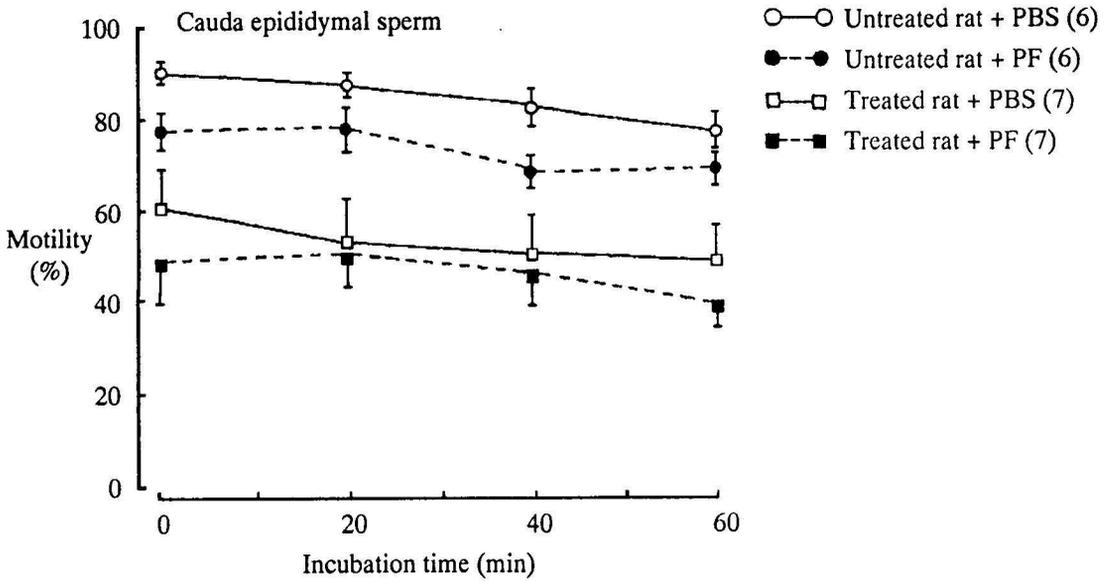
รูปที่ 4. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นตรง (straight-line velocity) ของอสุจิน้ำนม (ejaculated spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากหนู 6 ตัว



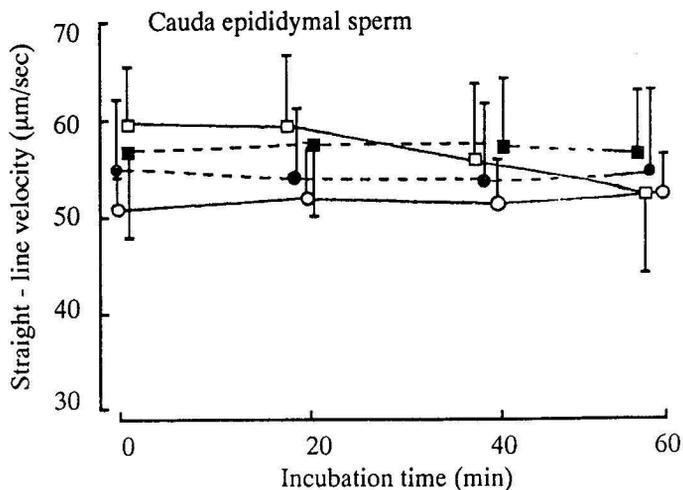
รูปที่ 5. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นโค้ง (curvilinear velocity) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean ± SEM จากหนู 6 ตัว



รูปที่ 6. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curvilinear velocity) ของอสุจิน้ำกาม (ejaculated spermatozoa) ของหนูปกติ (control) และหนูที่ได้รับยาซัลฟาไมด์ (sulfanilamide treated) หลังจากให้น้ำอสุจิมาละลายใน PBS และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. นาน 60 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean ± SEM จากหนู 6 ตัว

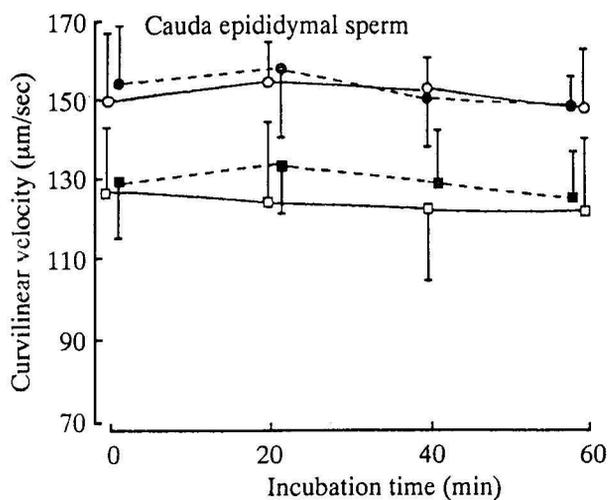


รูปที่ 7. แสดงความสามารถในการเคลื่อนไหว (motility) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (untreated rat) และหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ (treated rat) หลังจากให้นำอสุจิมาละลายใน PBS หรือ prostatic fluid (PF) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากหนู 6-7 ตัว



○—○ Untreated rat + PF from the untreated rat □—□ Treated rat + PF from the untreated rat
●—● Untreated rat + PF from the treated rat ■—■ Treated rat + PF from the treated rat

รูปที่ 8. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นตรง (straight-line velocity) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (untreated rat) และหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ (treated rat) หลังจากให้นำอสุจิมาละลายใน PBS และ prostatic fluid (PF) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากหนู 6 ตัว



○—○ Untreated rat + PF from the untreated rat □—□ Treated rat + PF from the untreated rat
●—● Untreated rat + PF from the treated rat ■—■ Treated rat + PF from the treated rat

รูปที่ 9. แสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นโค้ง (curvilinear velocity) ของอสุจิที่นำมาจากท่อพักเชื้อส่วนปลาย (cauda epididymal spermatozoa) ของหนูปกติ (untreated rat) และหนูที่ได้รับยาซัลฟานิลาไมด์ (treated rat) หลังจากให้นำอสุจิมาละลายใน PBS และ prostatic fluid (PF) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34°C. ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากหนู 6 ตัว