บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1.อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ถุงมือ

1.2 เข็มเขี่ย

1.3 จานแก้ว (petridish)

1.4 ไมโครปีเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครปีเปต

1.5 ขวดแก้ว

1.6 Tissue Culture Flask

1.7 ฟอร์เซ็บ

1.8 กรรไกร

1.9 หลอดหยด

1.10 บีกเกอร์

1.11 หลอดฟาง

1.12 ตะเกียงบุนเซน

1.13 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

1.15 กล่องโฟม

1.16 ถังไนโตรเจนเหลว

1.17 เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Controlled-rate Programmable Freezer (model CL3000)

1.18 Hemacytometer

1.19 Osmometer

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

2.1 Slide และ Cover Slide

2.2 กล้องจุลทรรศน์

2.3 น้ำกลั่น

3. สารเคมี

3.1สารละลายบัฟเฟอร์สูตรมีประจุ และสารละลายบัฟเฟอร์สูตร ไม่มีประจุ

3.1.1 NaCl

3.1.2. KCl

3.1.3 $CaCl_2.2H_2O$

3.1.4 Glucose

3.1.5 Mannital

ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 ,100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM

3.2 บัฟเฟอร์ (extender)

3.2.2 Extender 7

3.2.2 Cacium Free Hank 's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) (ศิริพร คชรัตน์ และคณะ, 2550)

3.3 สารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 6 ชนิด คือ

3.3.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)	5%, 10%, 15% และ 20%
3.3.2 Methanol (MET)	5%, 10%, 15% และ 20%
3.3.3 Glycerol (GLY)	5%, 10%, 15% และ 20%
3.3.4 Ethanol (ETH)	5%, 10%, 15% และ 20%
3.3.5 Propylene Glycol (PG)	5%, 10%, 15% และ 20%
3.3.6 Ethylene Glycol (EG)	5%, 10%, 15% และ 20%

3.4 สีย้อมสเปิร์ม

3.4.1 0.5% Eosin

3.4.2 10% Nigrosin

(การเตรียมสารดูที่ภาคผนวก)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีดำเนินการ

1. การวางแผนการทดลอง

การดำเนินการทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลายกลุ่มมีประจุ และสารละลายกลุ่มไม่มีประจุ ที่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกัน ทำการทดลอง วันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแช่แข็ง

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 โดยศึกษาสารไครโอโพรเทคแทนน์ 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในแบบต่าง ๆ ทำการทดลองวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยศึกษาสารไครโอโพรเทคแทนน์ 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในแบบต่าง ๆ ทำการทดลองวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 2.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน และอัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตรา ทำการทดลองวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 2.4 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน และอัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตรา ทำการทดลองวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวทำการทดลอง วันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2551

การทดลองที่ 4 การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม ทำการทดลองวันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง

ก่อนการทดลองทุกครั้ง นำปลายี่สกเทศที่สมบูรณ์เพศมาฉีดฮอร์โมน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะ บริเวณเหนือเส้นข้างลำตัว โดยใช้ฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Homone analogue (GnRHa) มีชื่อทางการค้าว่า Suprefact ในอัตรา 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม แล้วพักปลาไว้ 6 ชั่วโมง

3.การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลายี่สกเทศเพศผู้

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลายี่สกเทศที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากปลาตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) ก่อนรีดน้ำเชื้อปลาควรเช็ดตัวปลาให้แห้ง โดยเฉพาะบริเวณช่องเปิดของน้ำเชื้อกับปัสสาวะ แล้วจึงนำปลามารีดน้ำเชื้อลงในจานแก้ว และควรระวังน้ำเชื้อไม่ให้มีสิ่งอื่นปะปนออกมาด้วย เช่น น้ำเลือด น้ำปัสสาวะ ประเมินคุณภาพเบื้องต้นได้จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ซึ่งน้ำเชื้อปลาที่ดีจะมีสีขาวขุ่น จากนั้นนำน้ำเชื้อไปประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งน้ำเชื้อปลาที่ใช้ในการทดลองต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพ จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อใส่ tissue culture flask แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็ง จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ เพื่อรักษาคุณภาพของสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แบ่งน้ำเชื้อปลาไว้ 2 ml เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด ได้แก่ การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม และการประเมินค่าออสโมลาริตี

การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม โดยการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เขย่าให้ทั่ว ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมา 10 ไมโครลิตร แล้วใส่ในอุปกรณ์ Hemacytometer แล้วนับจำนวนสเปิร์มใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า หลังจากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม

การประเมินค่าออสโมลาริตี (Osmolality) นำน้ำเชื้อสดเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) 5000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วค่อย ๆ ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (seminal plasma) ออกมา นำไปวัดค่าออสโมลาริตีโดยเข้าเครื่อง Osmometer (Vapor pressure osmometer.) หน่วยเป็น mOsmol/kg

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรมีประจุ และในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรไม่มีประจุ ที่มีระดับออสโมลาริดีแตกต่างกัน

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลาย 2 กลุ่ม คือกลุ่มมีประจุ NaCl, KCl และ $CaCl_2$ และกลุ่มไม่มีประจุ คือ Glucose และ Mannital ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 ,100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM โดยนำเอาสารทั้งหมดที่ต้องการศึกษามาละลายใน deionized water

ศึกษาจุดที่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ (Threshold activation) และมีการเคลื่อนที่สูงสุด (Tomplete activation) ของสารละลายทุกสูตร โดยนำน้ำเชื้อสดจากปลายี่สกเทศมาประเมินการเคลื่อนที่โดยสารละลายทั้งสองกลุ่ม ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ 1 ไมโครลิตร วางบนสไลด์แล้วกระตุ้นด้วยสารละลายเคมี 50 ไมโครลิตร ทั้ง 2 กลุ่มจากความเข้มข้นน้อยไปมาก แล้วนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าทันที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปวัดระดับออสโมลาริตีด้วยเครื่อง Osmometer เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างสารละลายกลุ่มประจุและไม่มีที่ประจุว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศเกิดที่ขึ้นนั้นเกิดจากปัจจัยด้าน อิออนหรือค่าออสโมลาริตี

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ โดยเตรียมบัฟเฟอร์เก็บรักษาน้ำเชื้อปลา 2 สูตร ได้แก่ Ca-F HBSS และ Extender 7 โดยชั่งสารเคมีตามส่วนประกอบของแต่ละสูตร (ส่วนประกอบของสารเคมีแสดงในภาคผนวก ก) วัด pH ของบัฟเฟอร์ด้วยเครื่อง pH meter และปรับ pH ของบัฟเฟอร์ให้เป็น 7.6 นำบัฟเฟอร์ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนน์

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนน์ ที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ การทดลองเริ่มจากดูดน้ำเชื้อผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (เตรียมจากข้อ 2.1)ในอัตราการเจือจางที่ 1:5 ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ใส่ Tissue Culture Flask แล้วจึงประเมินดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สเปิร์ม โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ ในขณะเดียวกันนำสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่จัดเตรียมขึ้นมาผสมกันน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ ในอัตราส่วน 1:1 ไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ทดสอบกับน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ได้แก่ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene Glycol และ Ethylene Glycol สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายที่ 5% 10% 15% และ 20% (การเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS หรือ Extender 7 ในการเจือจาง) สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์เพื่อป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็งจะถูกปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลาย (equilibation) ก่อนที่จะรวบรวมน้ำเชื้อใส่หลอดฟางขนาด 0.25 ml การทดลองแต่ละชุดการทดลองใช้หลอดฟาง 5 หลอด (replication)

2.3 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ controlled-rate programmable freezer (model CL3000) ทำการศึกษา 3 โปรแกรม ได้แก่

โปรแกรมการทดลองที่ 1 ลดอุณหภูมิอัตรา -3°C/min

โปรแกรมการทดลองที่ 2 ลดอุณหภูมิอัตรา -5°C/min

โปรแกรมการทดลองที่ 3 ลดอุณหภูมิอัตรา -10°C/min

ทั้ง 3 โปรแกรมตั้งการทำงานของเครื่องเป็น 4 section ดังนี้

section 1 ใส่หลอดฟางใน freezing unit คอยจนอุณหภูมิของตัวอย่างในหลอดกับช่องใส่หลอดฟาง (freezing chamber) เป็น 25°C

section 2 ลดอุณหภูมิจาก 25°C ถึง 0°C (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม) แล้วพักไว้ (hold) 0.5 นาที

section 3 ลดอุณหภูมิจาก 0°C ถึง -40°C (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม)

section 4 จบการทำงาน

เมื่อโปรแกรมการทำงานของเครื่องเสร็จนำหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งใส่ canister ที่อยู่ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 7 วัน นำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม Ca-F HBSS หรือ Extender 7 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:5 และนำมาเจือจางกับ 15% DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% แล้วดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.2 ml ใส่หลอดฟางขนาด 0.25 ml ปิดปลายหลอดด้วยดีมหนีบลนไฟ และปล่อยให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibration time) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) แล้วนำไปแช่แข็งโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ ในอัตราการลดอุณหภูมิ 10°C/min จาก 25°C ถึง -40°C และเมื่ออุณหภูมิสุดท้ายมาถึง -40°C จึงนำหลอดฟางมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแช่แข็งมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อในทุก ๆ เดือน นาน 9 เดือน โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และตรวจสอบการมีชีวิตของสเปิร์ม โดยการย้อมสีสเปิร์มเพื่อตรวจดูตัวเป็นตัวตาย โดยการนำเอาน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดฟางมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำน้ำเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ มาย้อมด้วยสารละลาย egosin-nigrosin 5 ไมโครลิตร แล้วสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสีย้อม (dead sperm) โดยสุ่มนับ 300 ตัว/สไลด์ และนับ 3 ซ้ำต่อการทดลอง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าแล้วคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

4. พัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม

นำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS หรือ extender 7 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:5 แล้วนำมาเจือจางกับ 15% DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% แล้วดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.5 ml ใส่หลอด cryotube และปล่อยให้อยู่ในภาวะสมดุล นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาด 17 × 32 × 20 เซนติเมตร ที่บรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 3 เซนติเมตร โดยเทไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ 5 นาที พร้อมทั้งปิดฝากล่องโฟมเพื่อปรับอุณหภูมิโฟม เมื่อครบ 5 นาที จึงนำหลอด cryotube ใส่ลงในกล่องโฟมสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาการลดอุณหภูมิในกล่องโฟม 3 ระยะ ได้แก่ 5, 10 และ 15 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 50 วินาที เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์ม (ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศ

นำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ 1 ไมโครลิตรวางบนสไลด์แล้วกระตุ้นด้วยน้ำจืด ใส่ลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าทันที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ

การละลาย

น้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70°C ประมาณ 5 วินาที และน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอด cryotube ละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70°C ประมาณ 50 วินาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±SE ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS 11.0 for windows

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University