



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์และการผลิตสัตว์)

ปริญญา

การปรับปรุงพันธุ์และการผลิตสัตว์

สัตวบาล

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของการปั่นเหวี่ยงและชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพของตัวอสุจิ
ในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

Effect of Centrifugation and Sugar Types in Semen Extender on Sperm Quality
of Goat Frozen Semen

นามผู้วิจัย นายภูเบศร์ เศรษฐสุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุกัญญา รัตนทัตทิมาทอง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ศรีสุวรรณ ชมชัย, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เนรมิตร สุขมณี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของการปั่นเหวี่ยงและชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพของตัวอสุจิ
ในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

Effect of Centrifugation and Sugar Types in Semen Extender on Sperm Quality
of Goat Frozen Semen

โดย

นายภูเบศร์ เศรษฐสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์และการผลิตสัตว์)

พ.ศ. 2556

ภูเบศวร์ เศรษฐสุข 2556: ผลของการปั่นเหวี่ยงและชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อ
คุณภาพของตัวอสุจิในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง ปรินญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์
และการผลิตสัตว์) สาขาการปรับปรุงพันธุ์และการผลิตสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุกัญญา รัตนทัพบิมทอง, Ph.D. 92 หน้า

การศึกษาผลของการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพ
อสุจิในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 ศึกษาคุณภาพของอสุจิหลังการ
ทำละลายที่ผ่านกระบวนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกัน ใช้แผน
การทดลองแบบ 2 x 2 แฟกทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์เพื่อทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ความเร็ว (500 และ
1500 รอบต่อนาที) และ เวลา (3 และ 10 นาที) พบว่า อสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วย
ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด (MOT) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMOT) ความเร็ว
เฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (VSL) ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง
(VCL) และ อสุจิมีชีวิต สูงกว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที
นอกจากนี้ การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้
อสุจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดและอสุจิมีชีวิตสูงสุด ในการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของ
ชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย ใช้แผนการทดลองแบบ 4 x 4
แฟกทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์เพื่อทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อ (กลูโคส
ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโครส) และเวลาหลังการทำละลาย (0, 1, 2, และ 3 ชั่วโมง) พบว่า น้ำตาล
ทรีฮาโลสส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมี MOT PMOT VAP VSL VCL อสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มี
ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น นอกจากนี้ คุณภาพอสุจิหลังการทำละลายทันที
(0 ชั่วโมง หลังการทำละลาย) มีค่า MOT PMOT VAP VSL VCL อสุจิมีชีวิต อสุจิที่มีความสมบูรณ์
ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่าอสุจิที่ผ่านการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมง การศึกษา
ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที
และการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อหลังการทำละลายทันทีช่วยเพิ่มคุณภาพอสุจิแพะ
หลังการทำละลายทั้งลักษณะการเคลื่อนที่และการมีชีวิตหลังการทำละลาย

Phubet Satsook 2013: Effect of Centrifugation and Sugar Types in Semen Extender on Sperm Quality of Goat Frozen Semen. Master of Science (Animal Breeding and Production),
Major Field: Animal Breeding and Production, Department of Animal Science.
Thesis Advisor: Miss Sukanya Rattanatabtimtong, Ph.D. 92 pages.

The effects of centrifugation for seminal plasma separation and sugar types in semen extender on sperm quality of goat frozen semen were studied in two trials. In experiment 1, the effect of different speed and time of centrifugation to separate spermatozoa from the seminal plasma on the post-thawed sperm quality was conducted using 2 x 2 factorial in completely randomized designs. The centrifugation speeds (500 and 1500 rpm) and times (3 and 10 min), were two major factors tested. The results revealed that post-thawed spermatozoa centrifuged with 1500 rpm had higher total motility (MOT), progressive motility (PMOT), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curve-line velocity (VCL) and viability compared to those centrifuged with 500 rpm. In addition, there was interaction between speed (1500 rpm) and time (3 min), which could improve the MOT, viability and membrane integrity. In the experiment 2, the effect of different sugar types in semen extender and time after thawing on post-thaws sperm quality was conducted using 4 x 4 factorial in completely randomized designs. There were two factors of interest, sugar type (glucose, fructose, trehalose, and sucrose) and time after thawing (0, 1, 2, and 3 h.). The results revealed that trehalose could improve MOT, PMOT, VAP, VSL, VCL, viability and membrane integrity of spermatozoa which was higher than other sugar types. In addition, sperms after-thawing at 0 h. have higher MOT, PMOT, VAP, VSL, VCL, viability, membrane integrity and normal characteristic compared to those after thawing. These studies indicate that the seminal plasma removal by centrifugation with 1500 rpm for 3 minutes and use of trehalose in semen extender can improve sperm quality in terms of both sperm motility and survival after cryopreservation.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุกัญญา รัตนทัพบิมทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ศรีสุวรรณ ชมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านการศึกษา ทักษะในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ และรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ ที่ให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคุณพิรุฑธ นิลชื่น ที่เป็นทั้งพี่และเพื่อน คอยให้คำปรึกษาด้านการเรียน การใช้ชีวิต และชักจูงให้เข้ามาสนใจศาสตร์ด้านระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตโค สถาบันสุวรรณวาทกสิกิจฯ ที่ให้คำแนะนำในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง สนับสนุนถึงน้ำเชื้อแช่แข็งและไนโตรเจนเหลว ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ สถาบันสุวรรณวาทกสิกิจฯ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อและสนับสนุนสารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา จ.สงขลา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และสัตว์ทดลองในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาในระบบสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทย์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (CASA) และขอขอบคุณคุณนนทชัย ปานโลก คุณจงกล เพ็งปรีชา คุณเดชณรงค์ สีนพูล ที่สละเวลาอันมีค่ามาช่วยวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสุรศักดิ์ คุณแม่อุมา และคุณอาภิดิตยา ที่อบรมเลี้ยงดู สนับสนุนการศึกษา ให้โอกาสทำในสิ่งที่ข้าพเจ้าชอบ เป็นขวัญและกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดมา ตลอดจนผู้มีอุปการคุณ เพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่มีส่วนช่วยและเป็นกำลังใจ ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ และคุณค่าแห่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แด่ผู้มีอุปการคุณทุกท่าน และคณาจารย์ที่สั่งสอนข้าพเจ้าตั้งแต่อติตจนถึงปัจจุบัน ขอให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้จงเป็นประโยชน์แก่ผู้ศึกษาค้นคว้า เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสืบต่อไป

ภูเบศร์ เศรษฐสุข

มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	
สรุป	74
ข้อเสนอแนะ	75
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	76
ภาคผนวก	86
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอล พลาสมา ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ	24
2	ตัวอย่างส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีการปั่นแยกเซมินอล พลาสมา ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ	25
3	สารเคมีที่ใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งปริมาตร 100 มิลลิลิตร	34
4	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อการเคลื่อนที่ ของอสุจิ	43
5	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะ การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการทำละลาย	44
6	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิมิชีวิต	47
7	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิ ที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์	50
8	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิ ที่มีรูปร่างปกติ	54
9	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิ ที่มีความผิดปกติส่วนหัว	55
10	ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิ ที่มีความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง	56
11	ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อ การเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	61
12	อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการ ทำละลายต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	62
13	ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลาย ต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ	63
14	อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการ ทำละลายต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลาย ต่ออสุจิมีชีวิตและอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์	68
16	อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการ ทำละลายต่ออสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์	69
17	ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่ออสุจิที่มี รูปร่างปกติ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ	72
18	อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการ ทำละลายต่ออสุจิที่มีรูปร่างปกติ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัว และหางของอสุจิ	73
ตารางภาคผนวกที่		
1	คุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ปราศจากไข่แดงและกลีเซอรอล ซึ่งใช้น้ำตาลชนิดแตกต่างกัน	87

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อวัยวะสืบพันธุ์ของแพะเทศผู้	4
2	กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ	7
3	ลักษณะโครงสร้างอสุจิแพะ	9
4	โครงสร้างของน้ำตาตกลูโคส และ ฟรุคโตส	22
5	โครงสร้างของน้ำตาตกลูโคส มอลโทส แลคโทส และทรีฮาโลส	23
ภาพภาคผนวกที่		
1	ลักษณะอสุจิหลังผ่านการตรวจความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์	88
2	ลักษณะอสุจิหลังผ่านการย้อมสีอีโอซิน-นีโกรซิน	89
3	ลักษณะความผิดปกติส่วนหัว และความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ	91

ผลของการปั่นเหวี่ยงและชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพของตัวอสุจิ ในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

Effect of Centrifugation and Sugar Types in Semen Extender on Sperm Quality of Goat Frozen Semen

คำนำ

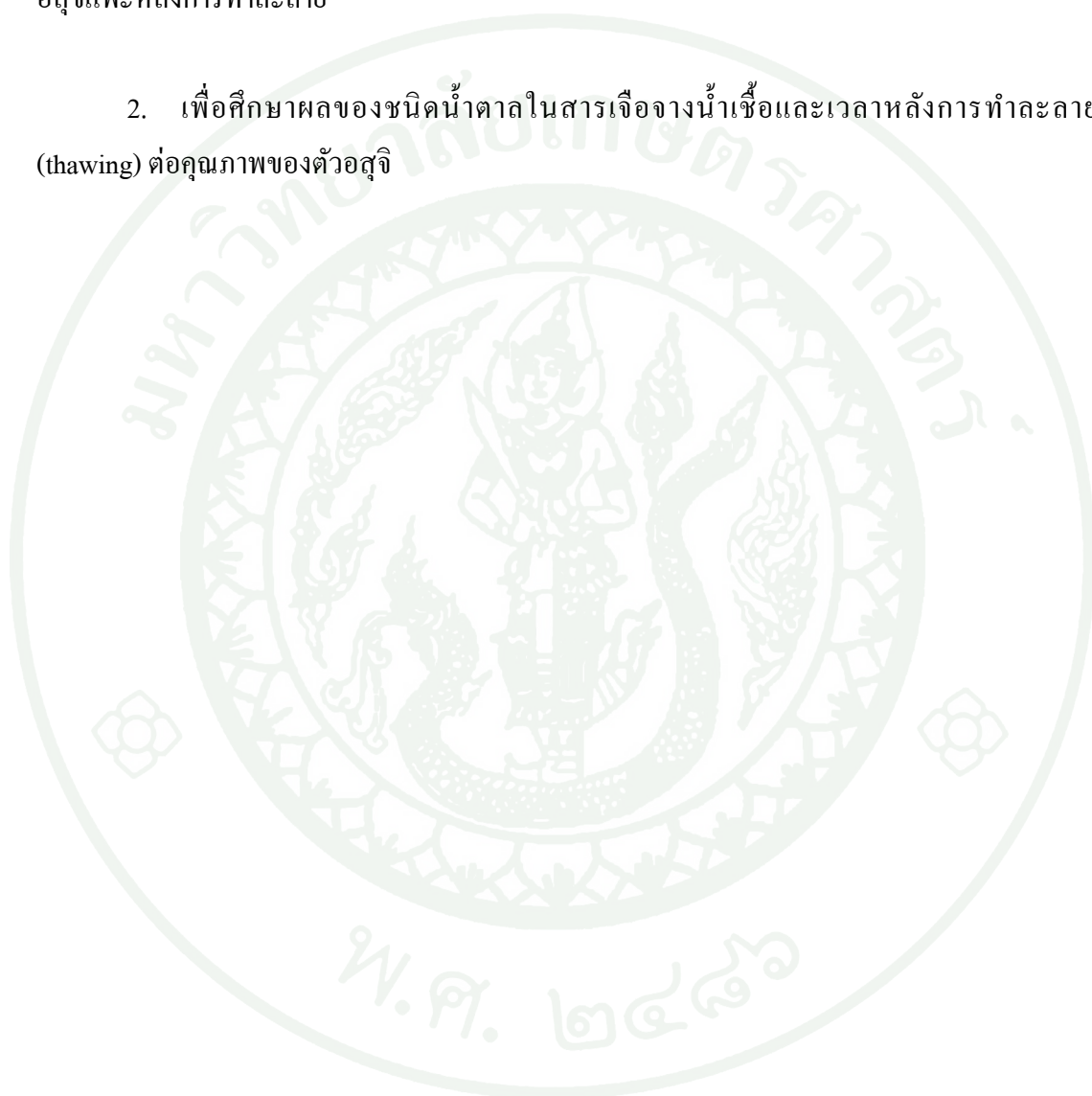
ปัจจุบัน เทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์มีบทบาทต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ เพิ่มความสามารถในการให้ผลผลิตของตัวสัตว์ และกระจายแหล่งพันธุกรรมดีตามความต้องการของผู้ผลิต เทคโนโลยีการผสมเทียม (artificial insemination) เป็นเทคโนโลยีประเภทหนึ่งที่ได้รับการยอมรับและมีการนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการผสมเทียม ได้แก่ คุณภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลาย ดังนั้น กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์เพศผู้เพื่อกระจายแหล่งพันธุกรรมที่ดี จึงเป็นส่วนสำคัญต่อระบบการผสมเทียม ซึ่งวิธีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีอยู่หลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมและมีการปฏิบัติกันโดยทั่วไป คือการเก็บรักษาในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) โดยทำการเก็บน้ำเชื้อไว้ในโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าปฏิบัติถูกต้องตามวิธีการ ก็จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพได้อย่างยาวนาน และให้ผลการผสมเทียมได้อย่างน่าพอใจ

การเก็บรักษาสpermatozoa ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จำเป็นต้องมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อให้สpermatozoa สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะการถูกแช่แข็ง เช่น น้ำ สารรักษาระดับความเป็นกรด-ด่าง แหล่งพลังงาน สารควบคุมแบคทีเรีย สารรักษาระดับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) จากความสำเร็จในการทำน้ำเชื้อโคแช่แข็ง สารที่นิยมใช้ในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง คือ ไข่แดง และนมไขมันต่ำ (skim milk) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ egg yolk coagulating enzyme (EYCE) (Roy, 1957) และ secreted bulbourethral III (SBUIII) (Nunes *et al.*, 1982) ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้งสองชนิดจะมีการหลั่งออกมาจากต่อมบัลโบยูเรทราล (bulbourethral gland) ปะปนมากับเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) ซึ่งผลผลิตจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีผลที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ ทำให้อสุจิไวต่อการเกิดความเสียหายจากการแช่แข็ง ทำให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (Naing *et al.*, 2011)

ในการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการศึกษาเพื่อลดปริมาณการใช้ไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อ (Bispo *et al.*, 2011) อีกทั้งการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่มีส่วนประกอบของไข่แดง (รพีพรรณ และคณะ, 2549) หรือใช้วิธีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ (อนนท์ และคณะ, 2551; เกลิมพล, 2552) อย่างไรก็ตามความแรงและระยะเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ปริมาณและชนิดของสารละลายที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิหลังการทำละลาย (Leboeuf *et al.*, 2000) นอกจากนี้ ชนิดของน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อก็มีผลต่อคุณภาพของตัวอสุจิหลังการทำละลายด้วยเช่นกัน เนื่องจากน้ำตาลสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานให้แก่ตัวอสุจิและเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง น้ำตาลที่นิยมใช้เป็นแหล่งพลังงานเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส หรือ ฟรุคโตส เนื่องจากน้ำตาลเหล่านี้สามารถดูดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปเป็นแหล่งพลังงานแก่อสุจิ (Ponglowhaphan *et al.*, 2004) ขณะที่น้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ทรีฮาโลส หรือ ซูโครส ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ แต่มีบทบาทเป็นตัวป้องกันอันตรายจากการถูกแช่แข็ง เนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลคู่มีผลต่อการสร้างแรงดันออสโมติกช่วยกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ เป็นผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิน้อยลง ช่วยให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และเยื่อหุ้มเซลล์ดีขึ้น (Naing *et al.*, 2010) การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา และชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพตัวอสุจิหลังการทำละลาย (thawing) เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านระบบสืบพันธุ์ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมติด และพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเร็วและระยะเวลาในการปั่นแยกไขมันอลพลาสมาต่อคุณภาพ
อสุจิแพะหลังการทำละลาย
2. เพื่อศึกษาผลของชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลาย
(thawing) ต่อคุณภาพของตัวอสุจิ

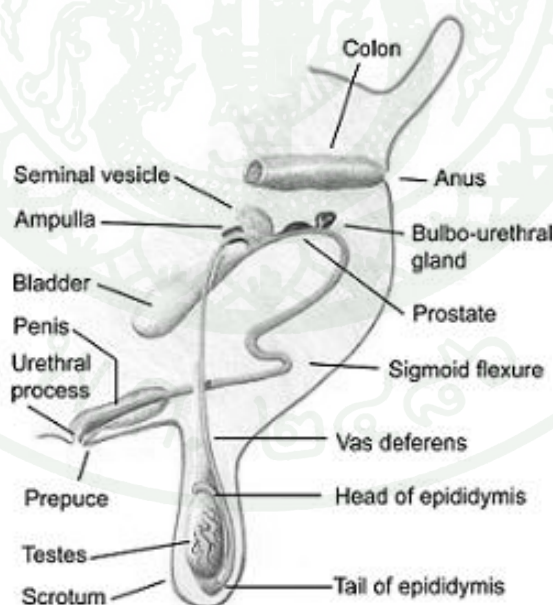


การตรวจเอกสาร

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้มีลักษณะคล้ายกับสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมอื่นๆ ดังภาพที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย ส่วนต่างๆ ดังนี้

1. อัณฑะ (testis) ถือได้ว่าเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่เป็นส่วนสำคัญ มีอยู่ 1 คู่ ติดอยู่ในกึ่งกลางทางด้านท้ายของลำตัว และอยู่ในถุงหุ้มอัณฑะ (scrotum) ที่อยู่นอกตัว ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับอัณฑะโค โดยมีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ovoid shape) แต่มีขนาดเล็กกว่า มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร และน้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเพศ และอสุจิ ขณะที่ถุงหุ้มอัณฑะ ทำหน้าที่เป็นตัวคอยปรับอุณหภูมิที่เหมาะสมให้แก่ลูกอัณฑะ เนื่องจากอัณฑะต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตอสุจิ ซึ่งต้องมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิในร่างกายประมาณ 2-4 องศาเซลเซียส (Hafez, 1993)



ภาพที่ 1 อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้

ที่มา: Girma (2009)

2. ระบบท่อ (duct system) ที่เป็นทางเดินผ่านของตัวอสุจิจากอัณฑะออกมายังภายนอกตัวสัตว์ และ รวมกับระบบท่อภายในอัณฑะ ได้แก่

2.1 อีพิดิไดมิส (epididymis) ติดกับลูกอัณฑะ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ อีพิดิไดมิสส่วนหัว (caput epididymis) อีพิดิไดมิสส่วนกลาง (corput epididymis) และอีพิดิไดมิสส่วนหาง (cauda epididymis) ทำหน้าที่เก็บสะสมและขนส่งตัวอสุจิที่ผลิตได้จากลูกอัณฑะ โดยอสุจิที่เคลื่อนตัวมาถึงอีพิดิไดมิส จะเป็นอสุจิที่มีความสมบูรณ์พร้อมที่จะเกิดการปฏิสนธิ

2.2 คักตัสเดเฟเรน (ductus deferens) หรือวาสเดเฟเรน (vas deferens) มีลักษณะเป็นท่อโดยต่อมาจากอีพิดิไดมิส แล้วมีปลายเปิดสู่หลอดปัสสาวะ (urethra) ตรงบริเวณใกล้กับคอของกระเพาะปัสสาวะ

2.3 หลอดปัสสาวะ (urethra) จะวางตัวผ่านไปทางด้านหลัง และทอดตัวไปบนพื้นของกระดูกเชิงกราน (pelvis) และจะไปสุดที่ปลายองคชาต (penis) โดยเป็นท่ออยู่ภายในองคชาต แต่ในแพะและแกะนั้น ท่อปัสสาวะจะยื่นโผล่พ้นออกจากส่วนหัวขององคชาต

2.4 องคชาต (penis) ทำหน้าที่ขนส่งน้ำเชื้อ ผ่านเข้าไปในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

3. อวัยวะที่ช่วยสร้างอาหารเลี้ยงตัวอสุจิ คือ ต่อมช่วย (accessory sex organs) ประกอบด้วย ต่อมเวสติคูลาร์ (vasicular gland) ต่อมโพรสเทท (prostate gland) และต่อมบัลโบยูเรทรอล (bulbo-urethral gland) หรือต่อมคาวเปอร์ (cowper's gland) จะอยู่บริเวณรอบๆ หลอดปัสสาวะ ต่อมเหล่านี้ จะทำหน้าที่สร้างส่วนที่เป็นของเหลวในน้ำเชื้อหรือเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) เพื่อเป็นอาหาร และสร้างสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมให้แก่ตัวอสุจิ สารที่ขับออกมาประกอบไปด้วย น้ำตาล ชนิดต่างๆ โปรตีน กรดอะมิโน เกลือของกรดซิตริก เอนไซม์ วิตามินและเกลือแร่ โดยพบว่าสำหรับแพะ ต่อมเวสติคูลาร์สามารถผลิตฟรุคโตสออกมามากกว่าสารกลุ่มอื่น (พีระศักดิ์, 2548ก)

กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (spermatogenesis)

การสร้างเซลล์อสุจิ (sperm) ในสัตว์เพศผู้เริ่มต้นเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ตัวอสุจิมีการผลิตออกมาจากเซมินิเฟอร์รัสทิวบูล (seminiferous tubule) ในลูกอัณฑะ ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อขนาดเล็กขดไปมาในลูกอัณฑะ ชั้นของเซมินิเฟอร์รัสอีพิทีเลียม (seminiferous epithelium) ประกอบด้วยเซลล์อสุจิต่างชนิดกัน คือ สเปออร์มาโทโกเนีย (spermatogonia) สเปออร์มาโทไซต์ (spermatocyte) และ สเปออร์มาทิด (spermatid) โดยเซลล์เหล่านี้จะแทรกรวมตัวกับเซลล์เซอร์โทลี (sertoli cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ให้อาหารแก่อสุจิ โดยมีฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ที่สร้างจากเซลล์เลย์ดิก (leydig cell) ควบคุมการสร้างตัวอสุจิ กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิเป็นกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิจากเซลล์สืบพันธุ์เริ่มต้นหรือจิร์มเซลล์ (germ cells) ของสเปออร์มาโทโกเนียชนิด เอ (type A-spermatogonia) ซึ่งมีโครโมโซมคู่ (2n) จนกระทั่งได้เซลล์อสุจิชนิดสเปออร์มาโทซัว (1n) ที่พร้อมปฏิสนธิ (มงคล, 2543) แสดงดังภาพที่ 2 กระบวนการดังกล่าว ประกอบด้วย 2 กระบวนการย่อย คือ

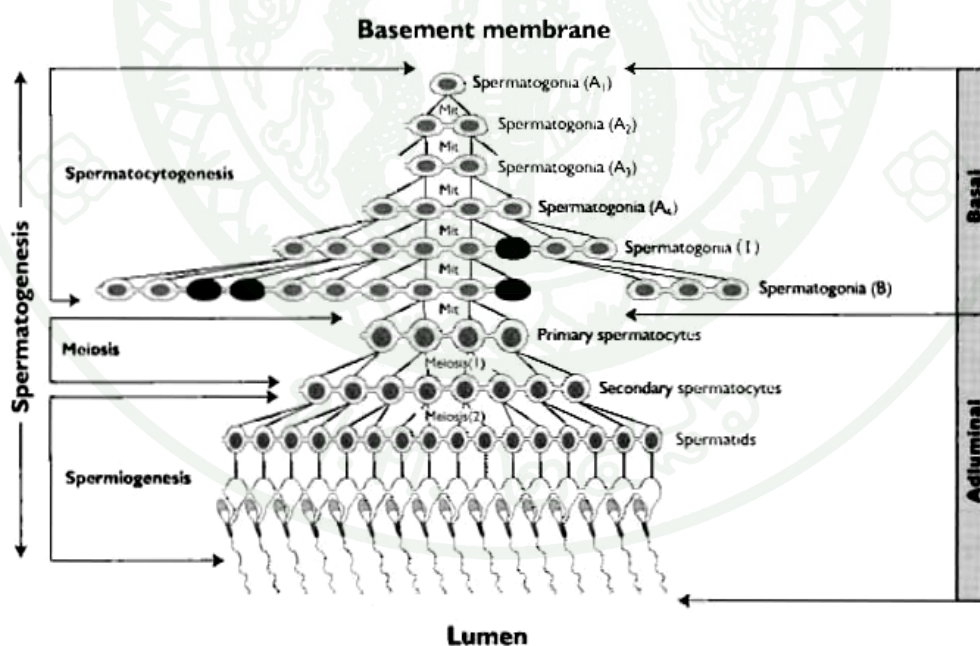
1. สเปออร์มาโทไซโทเจเนซิส (spermatocytogenesis)

กระบวนการนี้เริ่มในระยะที่สัตว์ยังมีอายุน้อย จนกระทั่งเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เป็นช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงจากสเปออร์มาโทโกเนียไปเป็นสเปออร์มาทิด สัตว์เพศผู้จะมีเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่าโกโนไซท์ (gonocyte) อยู่ในอัณฑะตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อน (embryonic testes) (Bearden and Fuquay, 1992) และพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น สเปออร์มาโทโกเนียชนิด A0 ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นของการผลิตอสุจิ โดยแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) และพัฒนาอย่างต่อเนื่องไปเป็นชนิด A1 A2 และ A3 อาศัยอยู่ตามผนังชั้นล่าง (basement membrane) ของเซมินิเฟอร์รัสทิวบูล ต่อมาจึงพัฒนาไปเป็นอินเตอร์มีเดียทสเปออร์มาโทโกเนีย (intermediate spermatogonia) ส่วนที่เหลือเป็นเซลล์สืบพันธุ์ต้นตอที่เก็บไว้ (resting type-A spermatogonia) (มงคล, 2543)

จากนั้น อินเตอร์มีเดียทสเปออร์มาโทโกเนีย จะพัฒนาต่อเนื่องไปเป็น สเปออร์มาโทโกเนีย ชนิด B (type B-spermatogonia) แล้วจึงมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ประกอบด้วยระยะต่างๆ คือ ระยะโปรเฟสวัน (prophase I) มีระยะย่อยๆ คือ 프리เลพโตทีน (preleptotene) เลพโตทีน (leptotene) ไซโกทีน (zygotene) พาคิทีน (pachytene) และดิพโลทีน (diplotene) ต่อมาจึงเข้าสู่ระยะ

เมทาเฟสวัน (metaphase I) แอนาเฟสวัน (anaphase I) และเทโลเฟสวัน (telophase I) กลายเป็น ไพรมารีสเปอร์มาโทไซท์ (primary spermatocyte) (มงคล, 2543)

ไพรมารีสเปอร์มาโทไซท์ ($2n$) จะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (1^{st} meiotic division) ซึ่งจะมีการลดจำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสลงมาครึ่งหนึ่ง ได้เป็นเซกันดารีสเปอร์มาโทไซท์ (secondary spermatocyte) จากนั้น เซกันดารีสเปอร์มาโทไซท์ ($1n$) จะแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 2 (2^{nd} meiotic division) ซึ่งประกอบด้วยระยะ โปรเฟสทู (prophase II) เมทาเฟสทู (metaphase II) แอนาเฟสทู (anaphase II) และเทโลเฟสทู (telophase II) อีกครั้ง โดยไม่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม กลายเป็น สเปิร์มาทิด ($1n$) (มงคล, 2543) แสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เรียกว่า สเปิร์มิโอเจเนซิส (spermiogenesis) เจริญเป็นตัวอสุจิต่อไป (Arthur *et al.*, 2001) กระบวนการสเปอร์มาโทไซโทเจเนซิสอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง (follicle stimulating hormone: FSH) (มงคล, 2543)



ภาพที่ 2 กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ

ที่มา: Senger (1999)

2. สเปิร์มมิโอเจเนซิส (spermiogenesis)

กระบวนการสเปิร์มมิโอเจเนซิส เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสเปิร์มาทิดไปเป็นสเปิร์มาโทซัว (spermatozoa) เป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของตัวอสุจิ จากระยะที่ยังไม่เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ (immature spermatid, $1n$) ไปเป็นตัวอสุจิที่พร้อมปฏิสนธิกับโอโอไซด์ (mature spermatozoa, $1n$) ในระยะนี้ ตัวอสุจิจะมีนิวเคลียสกลม และมีไซโทพลาสซึมล้อมรอบ ภายในไซโทพลาสซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และกอลจิคอมเพล็กซ์ (golgi complex) กระบวนการดังกล่าวอยู่ภายใต้การทำงานของฮอร์โมนลูทีไนซิง (luteinizing hormone, LH) แบ่งกระบวนการนี้ออกเป็น 4 ระยะตามลักษณะการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

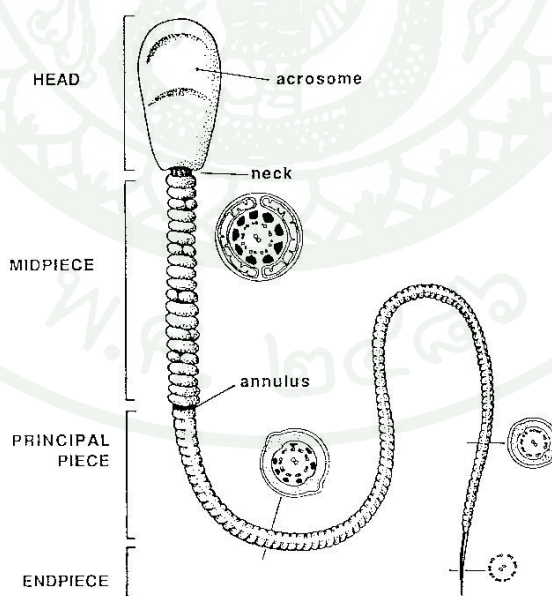
ช่วงการเปลี่ยนแปลงในระดับกอลจิโบดี้ (golgi phase) ในระยะแรก จะมีการสร้างส่วนของกอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) และมีโปรอะโครโซมเวสิเคิล (proacrosome vesicle) ติดอยู่กับนิวเคลียส สามารถพบพโรคซึมอลเซนทริโอล (proximal centriole) ซึ่งเป็นส่วนที่พัฒนาไปเป็นหาง (flagella) ของตัวอสุจิ ไมโทคอนเดรียกระจายอยู่ทั่วไปในไซโทพลาสซึม ในช่วงท้ายโปรอะโครโซมเวสิเคิลพัฒนาเป็นอะโครโซมเวสิเคิล (acrosome vesicle) ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูลเล็กๆ ของอะโครโซม และสามารถพบส่วนของโครมาตอยบอดี (chromatoid body) ที่จะพัฒนาเป็นวงรอบหาง

ช่วงการเปลี่ยนแปลงส่วนหัว (cap phase) แกรนูลเล็กๆ ของอะโครโซมเคลื่อนที่มาอยู่บริเวณตรงกลางนิวเคลียส และเริ่มมีการขยายใหญ่มากขึ้น หางถูกสร้างขึ้นตรงข้ามกับอะโครโซม ซึ่งต่อมาอะโครโซมมีสีเข้มขึ้นและเริ่มปกคลุมนิวเคลียส ส่วนหางจะฝังอยู่ในนิวเคลียส

ช่วงการเปลี่ยนแปลงส่วนอะโครโซม (acrosome phase) ในระยะแรก นิวเคลียสจะฝังอยู่ตรงกลางเซลล์ อะโครโซมยืดยาวติดอยู่กับผนังเซลล์ ต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส โดยขยายขนาดที่ยาวขึ้นและแบนลง โครมาตินมีลักษณะเข้มขึ้น สังเกตเห็นไมโครทิวบูล (microtubules) ที่ด้านหลังและเห็นวงแหวนแอนนูลัส (annulus) ได้ชัดเจน ในช่วงท้าย อะโครโซมจะมีการยืดยาวขยายขึ้นไปพร้อมกับนิวเคลียส

ช่วงการเจริญพร้อมปฏิสนธิ (maturation phase) เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงระยะสุดท้ายของสเปิร์มาทิด มีการสะสมรวมตัวของโครมาตินเสร็จสมบูรณ์ ส่วนหน้าของอะโครโซมดันไปข้างหน้า และ เพอรินิวเคลียสริง (perinuclear ring, PNR) เคลื่อนที่ไปด้านหลัง ส่วนของแผ่นหุ้มอะโครโซม (postacrosomal sheath, PAS) ถูกสร้างขึ้น วงแหวนแอนนูลัสเคลื่อนที่ไปด้านหลัง สร้างเป็นส่วนกลางของตัวอสุจิ เมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของกระบวนการนี้ ไมโทคอนเดรียส่วนมากรวมตัวกับส่วนหางของตัวอสุจิ ส่วนของไซโทพลาสซึมจะหลุดออก เหลือเพียงเป็นหยดเล็กๆ เรียกว่า ไซโทพลาสซึมครอปเล็ต (cytoplasmic droplet) ที่ยังอยู่รอบส่วนบนของมิดพีซ (mid-piece) (มงคล, 2543)

ตัวอสุจิปกติประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง ส่วนหัวจะประกอบด้วยนิวเคลียสและมีอะโครโซม โดยภายในนิวเคลียสจะมีสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid) ส่วนหัวอสุจิจะถูกครอบด้วยอะโครโซมซึ่งภายในมีเอนไซม์ช่วยในการเจาะผ่านเปลือกไข่ (zona pellucida) โดยจะปล่อยออกมาเมื่อเกิดการปฏิสนธิ ส่วนหางแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (mid piece) ส่วนกลาง (main piece) และ ส่วนปลาย (end piece) โดยส่วนหางมีหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของอสุจิ (เฉลิมพล, 2552) แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างอสุจิแพะ

ที่มา: Barth and Oko (1989)

วงรอบของการสร้างอสุจิ

การผลิตอสุจิเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาในส่วนต่างๆ ของท่อผลิตอสุจิและพบตัวอสุจิชนิดต่างๆ กันตลอดเวลา ในขณะที่กลุ่มเซลล์กลุ่มหนึ่งกำลังผ่านกระบวนการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเต็มที่ เพื่อที่จะได้อสุจิที่สมบูรณ์ สเปิร์มาโทโกเนียอีกกลุ่มหนึ่งที่อยู่ ณ บริเวณเดียวกัน กำลังพัฒนาขึ้นมาเรื่อยๆ และในแต่ละรอบการสร้างอสุจิจะประกอบด้วยรอบย่อยๆ ในแพะมีวงรอบการสร้างประมาณ 4.5 วงรอบ แต่ละวงรอบการผลิตอสุจิใช้ระยะเวลา 10.6 วัน ประกอบด้วย 8 ระยะ (Franca *et al.*, 1999) ในแต่ละระยะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลา ดังนั้นจึงพบระยะที่แตกต่างกันหลายระยะของตัวอสุจิในบริเวณต่างๆ ของท่อผลิตอสุจิ หากทำการตัดขวางท่อผลิตอสุจิก็จะพบอสุจิระยะต่างๆ กัน โดยระยะสุดท้ายจะเป็นตัวอสุจิที่ใกล้จะเจริญพร้อมปฏิสนธิชนิดสเปิร์มาโทซัว ในขณะที่สเปิร์มาทิดที่มีระยะใกล้เคียงกัน อาจจะอยู่ชิดๆ กัน หรือติดกับระยะอื่นๆ ก็ได้ (เฉลิมพล, 2552)

การควบคุมการสร้างตัวอสุจิ

ฮอร์โมนเพศชาย หรือ เทสโทสเตอโรน (testosterone) เป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการสร้างตัวอสุจิ โดยสร้างมาจากเซลล์อินเตอร์สเตเชียล (interstitial cell) หรือเซลล์เลย์ดิก (Leydig cell) ซึ่งติดอยู่กับเยื่อรีติคูลูม เซลล์เลย์ดิกถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนลูทิไนซิง ทำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ส่วนฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง จะกระตุ้นให้เซลล์เซอร์โตไล (sertoli cell) สร้างโปรตีนชนิดแอนโดรเจน (androgen binding protein, ABP) โดยแอนโดรเจนทำหน้าที่ควบคุมปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone, T) ในเยื่อรีติคูลูม โดยจับกับแอนโดรเจน กลายเป็น ABP-T กระตุ้นให้มีการสร้างตัวอสุจิ ฮอร์โมนแอนโดรเจนเองก็มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์เซอร์โตไลตอบสนองต่อฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้งมากขึ้นด้วย ดังนั้น หน้าที่ของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินทั้งสองชนิด (ฮอร์โมนลูทิไนซิง และ ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง) คือ รักษาระดับของเทสโทสเตอโรนและไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนในเยื่อรีติคูลูม ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการสร้างตัวอสุจิ และทำให้เกิดตัวอสุจิที่สมบูรณ์ (มงคล, 2543)

ปริมาณการสร้างอสุจิ

การสร้างอสุจิมีค่าผันแปรระหว่าง 2.76-7.23 พันล้านตัวต่อวันซึ่งมีค่าผันแปรได้เล็กน้อยตามฤดูกาลและสายพันธุ์ (Derashri *et al.*, 1992; Walkden-Brown *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Leboeuf *et al.*, (2000) รายงานว่า เส้นรอบวงอวัยวะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักของอวัยวะและปริมาณอสุจิภายในอวัยวะ ($r = 0.88$ และ 0.72 ตามลำดับ) ซึ่งการวัดเส้นรอบวงอวัยวะสามารถทำได้ง่ายและมีความแม่นยำสูง โดยเมื่อทำการประเมินปริมาณอสุจิที่ผลิตได้ต่อวันในแพะพันธุ์แองโกราในช่วงฤดูผสมพันธุ์ พบว่ามีจำนวนอสุจิสำรองในอีพิดิไดมิสประมาณ 4.0-6.4 พันล้านตัว สัมพันธ์กับน้ำหนักของอวัยวะ ($r = 0.50$, $p = 0.01$) และจำนวนอสุจิภายในอวัยวะ ($r = 0.42$, $p < 0.07$) แต่ไม่สัมพันธ์กับน้ำหนักของอีพิดิไดมิส (Ritar *et al.*, 1992)

เมื่อทำการประเมินปริมาณการหลั่งอสุจิต่อวัน พบว่ามีการหลั่งประมาณ 40-80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ผลิตต่ออสุจิได้ต่อวัน ในพ่อพันธุ์อัลไพน์และซานนมีการหลั่งอสุจิประมาณ 2.96 ± 0.36 พันล้านตัวต่อวัน (Degadillo *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่เก็บได้ก็เพียงพอต่อการทำน้ำเชื้อแช่แข็งและการจัดการการผสมเทียม (Leboeuf *et al.*, 2000)

เมตาบอลิซึมของตัวอสุจิ

น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งน้ำตาลที่มีอยู่ในเซมินอลพลาสมาคือ ฟรุคโตส ส่วนน้ำตาลกลูโคสก็เป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งที่อสุจิสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และนิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในสารเจือจางน้ำเชื้อ โดยอสุจิสามารถนำน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และไมโทคอนเดรียออกซิเดทีฟ ฟอสโฟรีเลชัน (mitochondrial oxidative phosphorylation) เพื่อสร้างพลังงาน สนับสนุนการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ (Naing *et al.*, 2010) ผลที่ได้จากการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของอสุจิคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดแลคติก โดยหากมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับสูง จะมีผลไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และหากปล่อยทิ้งไว้นานๆ จะเกิดการสะสมของกรดแลคติก จะทำให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อลดลง และมีผลทำให้การมีชีวิตรอดของตัวอสุจิน้อยลง (ศรีสุวรรณ, 2537)

เซมินอลพลาสมา (seminal plasma)

เซมินอลพลาสมาเป็นส่วนหนึ่งของน้ำเชื้อ ประกอบด้วยสารคัดหลั่ง ที่สร้างขึ้นมาจากต่อมช่วย ซึ่งมีด้วยกัน 3 ต่อม คือ ต่อมเซมินอลเวสิเคิล ต่อมโพรสเทท และ ต่อมบัลโบยูเรทรอล ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เซมินอลพลาสมา มีบทบาทในการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อ และมีส่วนสำคัญในการพาอสุจิจากระบบสืบพันธุ์เพศผู้ไปสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ช่วยปรับสภาพของตัวอสุจิ เป็นแหล่งอาหารของตัวอสุจิ จำเป็นต่อการเคลื่อนไหว ความสมบูรณ์ของอสุจิ และทำหน้าที่ปกป้องอสุจิด้วย (Hafez, 1993) นอกจากนี้ เซมินอลพลาสมายังทำหน้าที่เป็นสารที่ปรับความเป็นกลาง (buffer medium) โดยปกติเซมินอลพลาสมา มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.0 มีแรงดันเท่ากับแรงดันเลือด

Mendoza *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของเซมินอลพลาสมาในน้ำเชื้อแพะพันธุ์แองโกรา พบว่า ปกติแพะจะมีการหลั่งน้ำเชื้อประมาณ 0.8-1.0 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นประมาณ 2.94-3.33 พันล้านตัว และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.01-7.2 อสุจิสามารถใช้ประโยชน์จากน้ำตาลฟรุคโตส (875 ± 97 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และกรดแลคติก (73 ± 17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นแหล่งพลังงาน ช่วยสนับสนุนการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ ส่วนความเข้มข้นของ glycerylphosphorylcholine (GPC) ในปริมาณ 809 ± 154 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่มีตัวอสุจิ ($p < 0.001$) แสดงให้เห็นว่า GPC มีการหลั่งออกมาจากอีพิไดไมส ซึ่งตัวอสุจิไม่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์ได้ แต่สามารถใช้ประโยชน์ได้จากสารที่คล้ายกัน คือ กลีเซอโรฟอสเฟต (glycerophosphate) และ กลีเซอรอล (glycerol) แต่ก็ไม่มากพอที่จะใช้เป็นแหล่งพลังงานที่แท้จริง ส่วนกรดซิตริก ก็มีในปริมาณ 331 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร และสีของน้ำเชื้อเกิดจากปริมาณความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน (riboflavin) ที่สร้างขึ้นจากต่อมเวสิคูลาร์ โดยความเข้มข้นของไรโบฟลาวินในปริมาณ 5.38 ± 2.89 , 3.09 ± 0.85 และ 1.73 ± 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เกิดสีเหลือง เหลืองอ่อน และสีขาวในน้ำเชื้อ ตามลำดับ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อในกระบวนการแช่แข็ง จำเป็นต้องเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง โดยนิยมใช้ไข่แดง (egg yolk) หรือ นมไขมันต่ำ (not-fat dried skim milk) อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำเชื้อลงในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงหรือนม อาจสร้างความเสียหายให้แก่ตัวอสุจิ การรายงานของ Roy (1957) พบว่า การกำจัดเซมินอลพลาสมาออกก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ ทำให้อสุจิมีความสามารถ

ในการเคลื่อนไหวน้ำได้ดี แต่ถ้าหากยังมีการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะทำให้เกิดการจับกันเองของไข่แดง และเกิดการตายของตัวอสุจิ ปัจจัยดังกล่าวเกิดจาก egg yolk-coagulating enzyme (EYCE) ซึ่งหลังจากต่อมบัลโบยูเรทราล เช่นเดียวกันกับการค้นพบของ Nunes *et al.* (1982) สามารถแยกโปรตีน secreted bulbourethral III (SBU III) จากเซมินอลพลาสมาซึ่งพบว่าการสร้างมาจากต่อมบัลโบยูเรทราล (bulbourethral secretion: BSU) โดยสามารถสร้างความเสียหายแก่อสุจิ เมื่อทำการเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีนมเป็นองค์ประกอบ

ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ EYCE คล้ายกับ SBU III (Leboeuf *et al.*, 2000) โดย EYCE ออกฤทธิ์คล้ายฟอสโฟไลเปสเอ (phospholipase A) และ SBU III มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับไกลโคโปรตีนไลเปส (glycoprotein lipase) ซึ่ง EYCE มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55-60 กิโลดาลตัน มีการหลั่งมาจากต่อมบัลโบยูเรทราล (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997) EYCE เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เปลี่ยนเลซิธิน (lecithin) ในไข่แดงให้เป็นกรดไขมัน (fatty acid) และไลโซเลซิธิน (lysolecithin) (Iritani and Nishigawa, 1961) ซึ่งไลโซเลซิธินนี้เองเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ที่ผนังเซลล์อสุจิ (Upreti *et al.*, 1999) ทำให้เกิดการหลุดตัวของโครมาติน (Sawyer and Brown, 1995) ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจินั่นเอง ส่วน SBU III มีโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์พอร์ไน์แพนกรีเอติกไลเปส (porcine pancreatic lipase) (Carriere *et al.*, 1994) สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในน้ำนม ได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น โอเลอิก (oleic acid) เป็นหลัก ซึ่งมีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิเช่นเดียวกัน (Purdy, 2006) โดยพบว่าปริมาณ EYCE มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสดเลือด ซึ่งในช่วงฤดูผสมพันธุ์จะมีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนประมาณ 346.7 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร และในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ 288.57 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในระดับต่ำอาจจะมีผลให้มีการกระตุ้นต่อมบัลโบยูเรทราลที่น้อยลง ส่งผลให้มี EYCE ในเซมินอลพลาสมาลดลง (Cavalcante, 2003)

เพื่อเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีแนวความคิดการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีปริมาณไข่แดงหรือนมในปริมาณต่ำ (Bispo *et al.*, 2011) การหลีกเลี่ยงการใช้เจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ โดยใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีเลซิธินจากพืชเป็นส่วนประกอบ (ระพีพรรณ และคณะ, 2549) หรือการกำจัดเซมินอลพลาสมาโดยการปั่นแยกเอาเซมินอลพลาสมาออกให้เหลือเฉพาะตัวอสุจิ ก่อนทำการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงหรือนมเป็นองค์ประกอบ โดยจุดประสงค์ของ

การศึกษาเพื่อต้องการให้อุสจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่สูงสุด และเกิดความเสียหายต่ออะโครโซมน้อยที่สุด (Ritar and Salamon, 1982)

อนนท์ และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ก่อนการเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ประกอบด้วย ทริส กรดซิตริก น้ำตาลฟรุคโตส ไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อุสจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดและอสุจิมีชีวิตสูงกว่าการไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา แต่มีค่าความผิดปกติของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลของความแรงในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาที่แตกต่างกันในระดับ 300, 900 และ 1500 g เป็นเวลา 10 นาที ต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความแรงที่แตกต่างกันส่งผลให้อุสจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด อสุจิมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทุกค่าชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (เฉลิมพล, 2552) นอกจากนี้ Bispo *et al.* (2011) ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการใช้ไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยมีกลูโคส-อีดีทีเอ (ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA) เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน ผลการทดลอง พบว่า กลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงในปริมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด และค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่มที่ใช้ไข่แดงในปริมาณต่ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีความผิดปกติของตัวอสุจิต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดงในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ขัดแย้งกับการศึกษาของ Tuli and Holtz (1994) ได้ทำการประเมินเอนไซม์ glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) ที่หลั่งออกมาจากตัวอสุจิ ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพบว่ากลุ่มที่ทำกรปั่นแยกเซมินอลพลาสมามีระดับของ GOT สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ในขณะที่กลุ่มที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด และ อสุจิที่มีชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (frozen semen)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ทำให้สามารถเก็บรักษาคุณภาพและพันธุกรรมของสัตว์ได้ยาวนานกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น นอกจากนี้ยังช่วยกระจายพันธุกรรมของสัตว์ที่มีลักษณะดีได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งมีปัจจัยหลายประการที่ต้องนำมาพิจารณาเพื่อให้เหมาะสมกับการผลิต เช่น สารเจือจางน้ำเชื้อ ชนิดของสารป้องกันความเสียหายต่อตัวอสุจิจากการแช่แข็ง วิธีแช่แข็งน้ำเชื้อ และระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (พีระศักดิ์, 2548ข)

Smith and Polge (1950) เริ่มศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะเป็นครั้งแรก โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส วิธีการและสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาประยุกต์ใช้ในการทำน้ำเชื้อแพะแช่แข็งเป็นวิธีปฏิบัติในการทำน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ซึ่งเชมินอลพลาสมาเชื่อว่าทำให้เกิดอันตรายต่ออสุจิหากมีการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงหรือนมไขมันต่ำเป็นส่วนประกอบ จึงนิยมกำจัดเชมินอลพลาสมาก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง Corteel (1974) พบว่า น้ำเชื้อที่รีดได้ควรมีการบ่มเพื่อปรับสภาพประมาณ 1-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงมีการเติมน้ำยาล้างตัวอสุจิลงในน้ำเชื้อสดในอัตราส่วน น้ำเชื้อสดต่อน้ำยาล้างตัวอสุจิ 1:5-1:10 และทำการปั่นแยกเชมินอลพลาสมาที่ความเร็ว 600-1000 g เป็นเวลานาน 10-15 นาที ซึ่งน้ำยาล้างตัวอสุจิที่มีการใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Krebs-Ringer phosphate buffer (มีหรือไม่มีกลูโคส) หรือ สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ปราศจากกลีเซอรอลและไข่แดง (อนนท์ และคณะ, 2551)

ประสิทธิภาพในการกำจัดเชมินอลพลาสมาขึ้นอยู่กับกระบวนการปั่นแยกเชมินอลพลาสมา ยกตัวอย่างเช่น ชนิดและปริมาณของน้ำยาล้างตัวอสุจีก่อนการปั่นเหวี่ยง หรือจำนวนครั้งของการปั่นเหวี่ยง การเพิ่มจำนวนครั้งของการปั่นเหวี่ยงเป็น 2 ครั้ง อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชมินอลพลาสมาได้ หรืออีกวิธีหนึ่งคือการเพิ่มอัตราส่วนของน้ำยาล้างตัวอสุจิเป็น 2 เท่า คือ อัตราส่วนของอสุจิต่อน้ำยาล้างตัวอสุจิ เป็น 1:20 (Ritar and Salamon, 1982) ในกระบวนการของ Corteel (1974) จะมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีกลีเซอรอล และนำไปลดอุณหภูมิโดยการแช่เย็นจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 4 องศาเซลเซียส ใน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอล 14 เปอร์เซ็นต์ และปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 400 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงทำการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสอีก 3 ชั่วโมงก่อนการแช่แข็ง

กระบวนการดังกล่าว เป็นกระบวนการแช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน คือ มีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งแรกคือ เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีกลีเซอรอลในน้ำเชื้อที่กำจัดเซมินอลพลาสมาเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และครั้งที่สอง คือ เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอลและไข่แดงในน้ำเชื้อที่มีการบ่มอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่กระบวนการแช่แข็งแบบ 1 ขั้นตอน จะมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอลและไข่แดงในน้ำเชื้อหลังกำจัดเซมินอลพลาสมาเพียงครั้งเดียว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีแช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน ไม่ได้ทำให้อัตราการมีชีวิตของอสุจิหลังการทำละลายมากกว่าวิธีแช่แข็งแบบ 1 ขั้นตอนแต่อย่างใด (Ritar and Salamon, 1982)

โดยปกติแล้วเมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จะทำให้อสุจิตายอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของอสุจิทั้งหมด (Watson, 1995) ทั้งนี้ เนื่องจากกระบวนการลดความเย็นลงนั้น จะทำให้น้ำที่แทรกอยู่ภายในเซลล์เกิดเป็นผลึกขึ้น อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อตัวอสุจิ นอกจากนั้นของเหลวที่อยู่รอบๆ ตัวอสุจิ เมื่อได้รับความเย็นจะทำให้โมเลกุลของน้ำที่ปะปนอยู่ แยกตัวออกมาจากทั้งในเซลล์อสุจิและรอบๆ เซลล์ กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น และสร้างความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้เช่นกัน อัตราการลดอุณหภูมิที่แนะนำ คือ จากช่วง 5 ถึง 15 องศาเซลเซียส ลดลง 0.8-3 องศาเซลเซียสต่อนาที และช่วงจาก 15 ถึง -79 องศาเซลเซียส ลดลง 3-5 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยหากลดความเย็นลงช้าเกินไป น้ำในสารเจือจางน้ำเชื้อจะถูกดึงออกมาเป็นผลึกน้ำแข็งมากขึ้น ทำให้สารเจือจางน้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากขึ้น อสุจิเกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิ แต่ถ้าลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้ผนังเซลล์อสุจิแตกได้เช่นกัน การลดอุณหภูมิในอัตรานี้จะช่วยให้มีการเกิดผลึกน้ำแข็งนอกเซลล์อสุจิน้อยลง (พีระศักดิ์, 2548ข)

ในทำนองเดียวกัน การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมนั้น การทำละลายที่เร็วโดยใช้อุณหภูมิสูงในระยะเวลาอันสั้น เป็นวิธีป้องกันอสุจิสัมผัสกับสารละลายที่เข้มข้นได้ดีกว่าการทำละลายที่ช้า (พีระศักดิ์, 2548ข) ดังนั้น จึงนิยมละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (อนนท์ และคณะ, 2551)

สารเจือจางน้ำเชื้อ (semen extenders)

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็ง จำเป็นต้องมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อ เป็นแหล่งอาหาร ควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ และเป็นตัวป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง สารเจือจางน้ำเชื้อในสัตว์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบ และอัตราส่วนของสารต่างๆ แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม สารเจือจางน้ำเชื้อจะต้องมีความสามารถในการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 7.2-7.8 และในแพะ มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 6.8-7.0 (Barbas and Mascaraenhas, 2009) สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีจำนวนมากมาย เช่น โซเดียมซิเตรท-กลูโคส-ไข่แดง แลคโตส-ไข่แดง ทริส-กรดซิตริก-กลูโคส-ไข่แดง-กลีเซอรอล หรือ ทริส-ไข่แดง เป็นต้น การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อมักใช้ค่าดัชนีชี้วัด เช่น ค่าอสุจิมีชีวิตหลังการทำละลาย การเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ อสุจิที่มีรูปร่างปกติ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การปลดปล่อยเอนไซม์ glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) และ อัตราการปฏิสนธิ เป็นต้น

คุณลักษณะของสารที่ใช้สำหรับสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง มีดังนี้

1. สารแตกตัวและสารไม่แตกตัวเป็นไอออน

สารชนิดนี้ใช้ผสมลงไปเพื่อรักษาความดันออสโมติก และรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย เช่น โซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต (sodium citrate dehydrate) ทริส (tris) โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และนม ที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการต่างๆ สารเหล่านี้มีคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่แตกต่างกันไป สารที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน คือ ไข่แดง-ซิเตรท รวมถึง ไข่แดง-ทริส ซึ่งให้คุณภาพน้ำเชื้อโคหลังการทำละลายเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากทริสมีความสามารถในการรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ดี จึงมีการใช้ทริสเป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดหรือแบบหลอดฟางทั้งในน้ำเชื้อแพะและน้ำเชื้อแกะ (พีระศักดิ์, 2548ข)

2. สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectants)

ในกระบวนการแช่แข็งอสุจิ จำเป็นต้องมีการเติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง แก่ตัวอสุจิ เพื่อช่วยป้องกันและลดความเสียหายของตัวอสุจิขณะทำการลดอุณหภูมิ การแช่แข็ง รวมถึงการทำละลายน้ำเชื้อ โดยสารป้องกันความเสียหายอันเนื่องมาจากการแช่แข็ง จะช่วยป้องกัน อสุจิในระดับเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) องค์กรประกอบภายในเซลล์ (organelles) และ โครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) (Barbas and Mascarenhas, 2009) นอกจากนี้ สารเหล่านี้ยังช่วยลด ความเสียหายที่เกิดจากความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ (solution effect) และการเกิดการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ (Purdy, 2006) โดยสารที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1 กลุ่มที่ซึมผ่านผนังเซลล์ (penetrating membrane cryoprotectant)

สารกลุ่มนี้ มีความสามารถในการแทรกซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์อสุจิ มีผลทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของไขมันและโปรตีนที่บริเวณ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลให้มีการไหลเวียนของสารที่ผนังเซลล์เพิ่มมากขึ้น มีการขจัดน้ำออกได้ดีขึ้น สร้างความสมดุลของน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และช่วย เพิ่มการมีชีวิตของอสุจิหลังผ่านการแช่แข็ง (Holt, 2000) ซึ่งสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลีเซอริน (glycerine) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) หรือ พรอโพลีนไกลคอล (propylene glycol)

กลีเซอรอลที่ใช้ผสมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง มีผลต่อการกำจัดน้ำออกนอก เซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์เพื่อให้เป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ น้อยลง นอกจากนี้ กลีเซอรอลมีความสามารถในการรวมตัวกับน้ำ ทำให้จุดเยือกแข็งของ สารเจือจางน้ำเชื้อลดลง เป็นผลให้มีการเกิดผลึกน้ำแข็ง (crystallization) ภายในเซลล์น้อยกว่าปกติ ดังนั้น อสุจิจึงมีความไวต่อการเสียหายจากการแช่แข็งน้อยลง นอกจากนี้ เมื่อเติมสารเจือจาง น้ำเชื้อแช่แข็งลงในน้ำเชื้อ กลีเซอรอลจะผ่านเข้าอสุจิได้อย่างรวดเร็ว และไปสะสมอยู่ที่ด้านท้าย ของส่วนหัวอสุจิ อสุจิจะนำกลีเซอรอลไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ทำให้มีชีวิตรอดได้ดีขึ้น (พิระศักดิ์, 2548ข) มีการศึกษาการใช้เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และ โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ใช้เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง แต่ยังไม่ให้ประสิทธิภาพดีพอเท่าการใช้กลีเซอรอล

(Waide *et al.*, 1977) โดยพบว่าปริมาณการใช้กลีเซอรอลที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 4-7 เปอร์เซ็นต์ของสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งหมด (Leboeuf *et al.*, 2000)

2.2 กลุ่มที่ไม่ซึมผ่านผนังเซลล์ (non-penetrating membrane cryoprotectant)

สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในกลุ่มนี้ จะไม่สามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของตัวอสุจิได้ เช่น ไข่แดง (egg yolk) น้ำตาลกลุ่มไดแซคคาไรด์ (disaccharide) หรือ ไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) เป็นต้น สารเหล่านี้จะทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายจากภายนอกเซลล์ ช่วยขัดขวางกระบวนการเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ (Kundu *et al.*, 2002) ซึ่งนิยมใช้ไข่แดงเป็นส่วนผสมในปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งหมด (พีระศักดิ์, 2548ข)

ปัจจุบัน ได้มีการพิจารณาการใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ทรีฮาโลส (trehalose) ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) ราฟิโนส (rafinose) หรือ เด็กซ์แทรน (dextrane) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง การใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อไม่ได้จำกัดการใช้แค่ น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของตัวอสุจิได้อย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส (glucose) หรือ ฟรุคโตส (fructose) เท่านั้น แต่น้ำตาลที่ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ก็ส่งผลดีมากมายเช่นเดียวกัน โดยน้ำตาลเหล่านี้จะสร้างแรงดันออสโมติกต่อเซลล์อสุจิ เหนียวน้ำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ และในที่สุดคือทำให้เกิดการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์อสุจิน้อยลง นอกจากนี้ น้ำตาลทรีฮาโลสยังมีผลต่อชั้นฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดการจัดระบบใหม่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้อสุจิสามารถมีชีวิตที่ดีกว่าหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง (Aisen *et al.*, 2002) มีการศึกษาระดับการใช้ทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อ เช่น การทำน้ำเชื้อแคะแช่แข็งโดยใช้น้ำตาลทรีฮาโลสในระดับ 100.0 มิลลิโมล (Jafaroghli *et al.*, 2011; Tonieto *et al.*, 2010) การทำน้ำเชื้อแพะแช่แข็งโดยใช้น้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลทรีฮาโลส ระดับ 70.0 และ 198.2 มิลลิโมล ตามลำดับ (Naing *et al.*, 2010) และการทำน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งโดยใช้ทรีฮาโลสในระดับ 330.0 มิลลิโมล (Malo *et al.*, 2010) โดยพบว่าอสุจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีน้ำตาลหรือมีน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Aboagla and Terada (2003) ทดสอบการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสในระดับที่แตกต่างกัน (0, 93.75, 187.50, 281.25, และ 375.00 มิลลิโมล) เพื่อใช้เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มี ทริส กรดซิตริก และกลูโคส เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสในระดับ 375 มิลลิโมล ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความเร็วในการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว เมื่อทำการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี flow cytometric พบว่า น้ำตาลทรีฮาโลสสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับขั้ว (polar-head group) ของฟอสโฟลิปิดที่บริเวณผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการเคลื่อนที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ มีจัดระบบใหม่ของโปรตีนและไขมัน จึงช่วยลดความเสียหายทางโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ อีกทั้งน้ำตาลทรีฮาโลสยังมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จึงสามารถสร้างแรงดันออสโมติกได้มากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้มีการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น เป็นผลให้มีผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์น้อยลง อสุจิหลังการทำละลายจึงมีชีวิตได้นานขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และความสมบูรณ์ของอะโครโซม สูงกว่ากลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลแลคโตส และกลูโคส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Malo *et al.*, 2010)

3. สารที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน

สารที่นิยมใช้เป็นแหล่งพลังงานในสารเจือจางน้ำเชื้อ คือ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เช่น กลูโคส หรือ ฟรุคโตส เพราะน้ำตาลเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับตัวอสุจิได้ทันที (พีระศักดิ์, 2548) นอกจากนี้ Corteel (1974) รายงานว่า ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งที่มีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่อสุจิสามารถนำไปใช้ได้ทันที ส่งผลให้อสุจิในกลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสมีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีน้ำตาล (Leboeuf *et al.*, 2000) ซึ่งปกติแล้วในเซมินอลพลาสมาจะมีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งพลังงานแก่ตัวอสุจิ แต่เมื่อมีการกำจัดเซมินอลพลาสมาก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ น้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อจึงมีหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานแก่ตัวอสุจิและป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Fukuhara and Nishigawa, 1973)

4. ยาปฏิชีวนะ

มีการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะในสารเจือจางน้ำเชื้อมากมาย เนื่องจากการพิจารณาใช้ยาปฏิชีวนะในสารเจือจางน้ำเชื้อเป็นมาตรฐานสากล (Certified Semen Services, 2002) โดยยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และ เพนนิซิลิน (penicillin) รวมถึงการผสมรวมกันของเจนตามัยซิน (gentamycin) ทัยโลซิน (tylosin) และ ลินโคสเป็คติน (linco-spectin) ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus* และ *pseudomonas* เป็นต้น ยาปฏิชีวนะจึงช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ และช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดในการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (Akhter *et al.*, 2007)

การใช้น้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง

Purdy (2006) รายงานว่า ในกระบวนการเก็บรักษาตัวอสุจิแพะด้วยกระบวนการแช่แข็ง นิยมใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบหลักในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง เช่น ฟรุคโตส กลูโคส แลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส หรือน้ำตาลชนิดอื่น เนื่องจากอสุจิมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลได้ทันทีในกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจนจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือการสร้างสมดุลของแรงดันออสโมติก และป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเมื่อมีการหลั่งน้ำเชื้อของแพะเพศผู้ ฟรุคโตสเป็นน้ำตาลชนิดเดียวที่สามารถพบได้ในเซมินอลพลาสมา ซึ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Corteel, 1974) โดยสามารถจำแนกชนิดน้ำตาลตามขนาดโมเลกุลหรือจำนวนหน่วยย่อยของโมเลกุลได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ไดแซคคาไรด์ (disaccharide) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งคำว่าแซคคาไรด์มาจากภาษากรีกโบราณแปลว่าน้ำตาล (ฤดี, 2005) การเลือกใช้น้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งมักพิจารณาถึงบทบาทและหน้าที่ของน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้แก่ โมโนแซคคาไรด์ และ ไดแซคคาไรด์ ดังรายละเอียดดังนี้

1. โมโนแซคคาไรด์ หมายถึง น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถแบ่งจำพวกออกตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุล ได้แก่

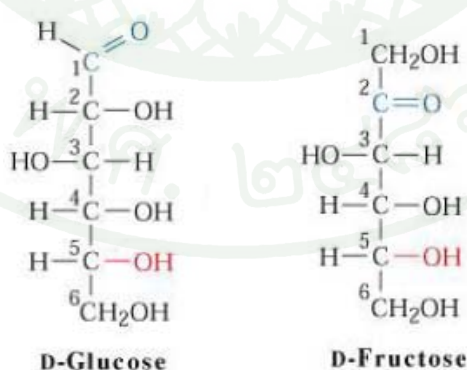
เตโตรส (tetrose) จำนวนอะตอมของคาร์บอน เป็น 4 อะตอม

เพนโตส (pentose) จำนวนอะตอมของคาร์บอน เป็น 5 อะตอม

เฮกโซส (hexose) จำนวนอะตอมของคาร์บอน เป็น 6 อะตอม

เฮปโตส (heptose) จำนวนอะตอมของคาร์บอน เป็น 7 อะตอม

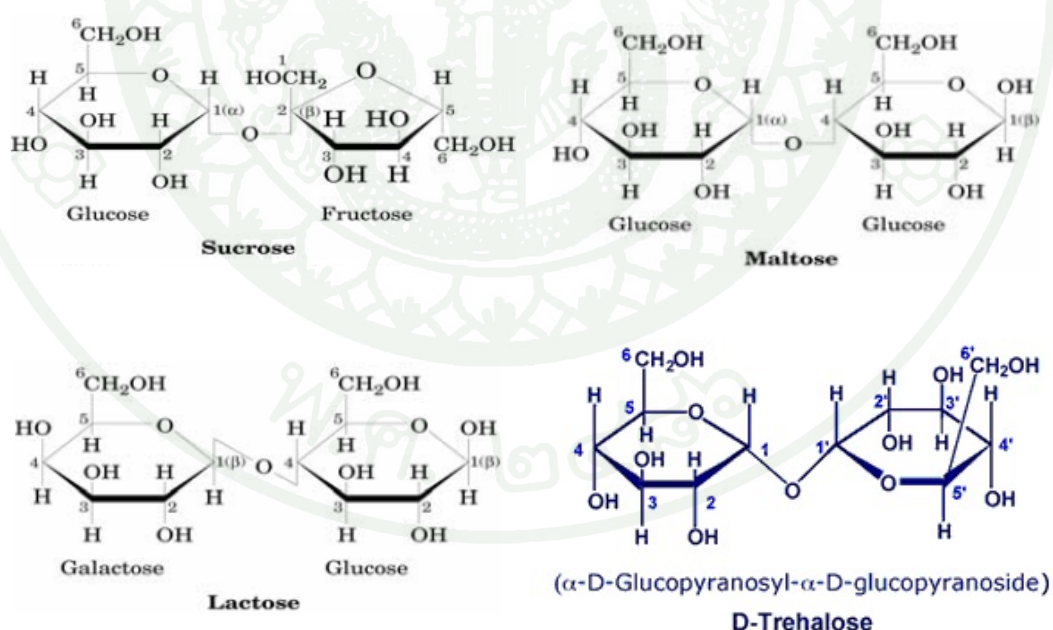
น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง คือ น้ำตาลเฮกโซส ซึ่งได้แก่ กลูโคส หรือ ฟรุคโตส มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 4 โดย Cortee (1974) รายงานว่า ภายหลังจากการทำลายน้ำเชื้อแช่แข็ง อสุจิในกลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีน้ำตาลกลูโคสมีการเคลื่อนที่ทั้งหมดดีกว่ากลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่มีน้ำตาล เนื่องจากอสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีความต้องการน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งสร้างพลังงานในทันที และส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ได้ดีกว่า โดยน้ำตาลกลูโคส หรือ ฟรุคโตส เป็นน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) เพื่อสร้างพลังงาน สนับสนุนการมีชีวิตและการเคลื่อนที่ (Naing *et al.*, 2010) ผลที่ได้จากการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของอสุจิ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดแลคติก โดยหากมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับสูง จะมีผลไปยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ และหากปล่อยทิ้งไว้นานๆ จะเกิดการสะสมของกรดแลคติก จะทำให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อลดลง และมีผลทำให้การมีชีวิตรอดของตัวอสุจิน้อยลง (ศรีสุวรรณ, 2537)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโตส

ที่มา: ฤดี (2005)

2. ไคแซคคาไรด์ หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ คือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ตัวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะทางเคมีที่เรียกว่าพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ชนิดที่รู้จักกันดีได้แก่ ซูโครส มอลโตส แลคโตส และ ทรีฮาโลส เป็นต้น มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 5 โดยน้ำตาลในกลุ่มนี้ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ จึงสามารถสร้างแรงดันออสโมติกต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยให้อสุจิมีการกักน้ำออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (Purdy, 2006) จึงมีการใช้น้ำตาลในกลุ่มนี้เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง นอกจากนี้ น้ำตาลทรีฮาโลสซึ่งมีการใช้ในวิศวกรรมอาหารในกระบวนการการทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) มีคุณสมบัติในการรักษาเสถียรภาพ ปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนและไขมันจากความเสียหายจากการแช่แข็ง เมื่อนำมาใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหัวของฟอสโฟลิปิดที่ผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการจัดระบบใหม่ของโปรตีนและไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีชีวิตรอดจากการแช่แข็งได้ดีขึ้น (Aisen *et al.*, 2002; Aboagla and Terada, 2003)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของน้ำตาลซูโครส มอลโตส แลคโตส และทรีฮาโลส
ที่มา: ฤดี (2005)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่มีการปั่นแยกเซมินอล
พลาสมา ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ

สารเคมี	อัตราส่วนการเจือจาง (น้ำเชื้อสด : สารละลายน้ำเชื้อ)			
	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4
ทริส (กรัม)	6.057	4.543	4.039	3.768
กรดซิตริก (กรัม)	3.475	2.606	2.316	2.172
กลูโคส (กรัม)	1.000	0.750	0.667	0.625
ไข่แดง (มิลลิลิตร)	4.0	3.0	2.6	2.5
กลีเซอรอล (มิลลิลิตร)	8	6	5.3	5
เพนนิซิลิน (ไอ.ยู.)	100,000	100,000	100,000	100,000
สเตรปโตมัยซิน (มิลลิกรัม)	100	100	100	100
เติมน้ำกลั่นให้ครบ (มิลลิลิตร)	100	100	100	100

ที่มา: ศรีสุวรรณ (2537)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อเห็ด ซึ่งใช้ในการปั่นแยกไขมันอลพลามาก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ

สารเคมี	ปริมาณ		
	อนันต์ และคณะ (2551)	Aboagla and Terada (2003)	Choe <i>et al.</i> (2006)
ทริส (มิลลิโมล)	250	375	250
กรดซิตริก (มิลลิโมล)	90	124	90
กลูโคส (มิลลิโมล)	-	-	-
ฟรุคโตส (มิลลิโมล)	70	-	70
ทรีฮาโลส (มิลลิโมล)	-	375	-
กลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์)	7	8	7
ไข่แดง (เปอร์เซ็นต์)	20	20	20
เพนนิซิลิน (ไอ.ยู.)	-	100,000	-
สเตรปโตมัยซิน (มิลลิกรัม)	-	100	-
นีโอมัยซิน (มิลลิกรัม)	-	-	-
			10

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของความเร็วและระยะเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อ คุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย

สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglonubian) ช่วงอายุระหว่าง 2-3 ปี น้ำหนักระหว่าง 60-70 กิโลกรัม จำนวน 1 ตัว มีระบบสืบพันธุ์ปกติ สามารถผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี โดยน้ำเชื้อที่รีดได้ก่อนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ต้องมีอสุจิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์และตัวผิดปกติไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์

อาหารทดลอง

แพะพ่อพันธุ์จะได้รับอาหารชั้นที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 กิโลกรัม รวมถึงได้รับหญ้าแห้ง และน้ำสะอาดอย่างเต็มที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง

โรงเรือนและการจัดการเลี้ยงดู

โรงเรือนที่ใช้เลี้ยงแพะพ่อพันธุ์ เป็นคอกแยกข้างเดี่ยว ขนาด 2 x 2 เมตร มีพื้นคอกเป็นพื้นสแลตคอนกรีต

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดน้ำเชื้อ
 - 1.1 ช่องคลอดเทียม (artificial vagina)
 - 1.2 สารหล่อลื่น (K-Y gelly)

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ

- 2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast
- 2.2 ไมโครไพเปต (micropipette)
- 2.3 สไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glasses)
- 2.4 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.5 สี eosin-nigrosin
- 2.6 สารละลาย hypo-osmotic swelling test (HOS-test)
- 2.7 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- 2.8 กระดาษชำระและผ้าสะอาด
- 2.9 เครื่องอุ่นสไลด์ (warming plate)
- 2.10 เครื่องอุ่นน้ำ (water bath)

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

- 3.1 ถังไนโตรเจนเหลว
- 3.2 ไนโตรเจนเหลว
- 3.3 ถังโฟม ขนาดกว้าง 12 เซนติเมตร ยาว 42 เซนติเมตร สูง 17 เซนติเมตร
- 3.4 เทอร์โมมิเตอร์
- 3.5 อุปกรณ์นับความเข้มข้นอสุจิ (haemocytometer)
- 3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugation)
- 3.7 เครื่องลดอุณหภูมิ Bio cool (FTS system, INC. NY, USA)
- 3.8 กระดาษชำระและผ้าสะอาด
- 3.9 หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร (mini-straw)
- 3.10 ปากคีบ (forceps) และถาดสเตนเลสที่ใช้วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ
- 3.11 สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง

สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง

สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง (ทริส-กรดซิตริก-ฟรุกโตส) ประกอบด้วย ทริส 3.03 กรัม กรดซิตริก 1.89 กรัม น้ำตาลฟรุกโตส 1.26 กรัม ไข่แดง 20 มิลลิลิตร และ กลีเซอรอล 8 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (อนนท์ และคณะ, 2551)

วิธีการทดลอง

การศึกษาผลของความเร็วรอบและระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ต่อคุณภาพของตัวอสุจิ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด โดยใช้ความเร็วรอบ และระยะเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที นาน 3 นาที

กลุ่มที่ 2 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

กลุ่มที่ 3 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 1500 รอบ/นาที นาน 3 นาที

กลุ่มที่ 4 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็ว 1500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

การรีดน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อ และการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

เตรียมแพะพ่อพันธุ์และอุปกรณ์การรีดน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อในช่วงเช้าเวลา 6.00-8.00 น. โดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) โดยการเติมน้ำอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในช่องคลอดเทียม เป่าลมเข้าในช่องคลอดเทียม จนท่อยางอ่อนภายในรู้สึกกระชับ (พืระศักดิ์, 2548ข) และใช้แพะเพศเมียเป็นตัวล่อ นำน้ำเชื้อที่รีดได้ เติมด้วยน้ำเกลือ (normal saline) ในอัตราส่วน 1:19 ทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกัน เมื่ออสุจิมีการตกตะกอน ทำการกำจัดเซมินอลพลาสมาโดยดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง นำน้ำเชื้อที่ได้มาตรวจปริมาณหลังการปั่นเหวี่ยงและนับความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้ Haemocytometer แล้วจึงเติมด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยหลังการเจือจางต้องมีจำนวนตัวอสุจิ 150×10^6 ตัวต่อหลอด ซึ่งปริมาณสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ ได้จากการคำนวณดังนี้

$$\text{จำนวนโคสต์} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำเชื้อก่อนการเจือจาง (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของอสุจิก่อนการเจือจาง (ตัว/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของอสุจิต่อโคสต์ (150 x 10^6 ตัว/โคสต์)}}$$

$$\text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังการเจือจาง (มิลลิลิตร)} = \text{จำนวนโคสต์} \times \text{ปริมาตรน้ำเชื้อต่อโคสต์ (0.25 มิลลิลิตร)}$$

$$\text{ปริมาตรสารเจือจางที่ใช้ (มิลลิลิตร)} = \text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังการเจือจาง (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตรน้ำเชื้อก่อนการเจือจาง (มิลลิลิตร)}$$

หลังเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำเข้าตู้ลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง (equilibration time) จากนั้น จึงทำการบรรจุน้ำเชื้อในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร อุดปลายหลอดน้ำเชื้อด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) ทำการเรียงหลอดน้ำเชื้อบนถาดเรียงน้ำเชื้อ และนำไปลดอุณหภูมิต่อในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว 13 นาที โดยวางถาดเรียงน้ำเชื้อเหนือระดับไนโตรเจนเหลว ประมาณ 5 เซนติเมตร สุดท้ายจึงนำหลอดน้ำเชื้อที่ได้ไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (อนนท์ และคณะ, 2551)

การทำละลายน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพของตัวอสุจิ

ภายหลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (อนนท์ และคณะ, 2551) เพื่อตรวจคุณภาพของตัวอสุจิหลังการทำละลาย ซึ่งการตรวจคุณภาพของตัวอสุจิแต่ละค่าจะใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 10 หลอด โดยตรวจคุณภาพตัวอสุจิตามวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility) ก่อนการแช่แข็ง

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า ประเมิน 5 จุดบนแผ่นสไลด์และหาค่าเฉลี่ย โดยให้คะแนนการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็น 0-100 เปอร์เซนต์ (เฉลิมพล, 2552)

2. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility) หลังการทำละลาย

หยดน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์สำหรับเครื่อง Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) (Hamilton Thorne Biosciences IVOS, Version 12 TOX IVOS, Beverly, USA) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ด้านบน ทำการประเมินด้วยเครื่อง CASA โดยต้องมีจำนวนอสุจิน้อยกว่า 800 ตัว บันทึกค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง

3. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่มีชีวิตทั้งหมด (total viability)

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสี eosin-nigrosin ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ 30 วินาที แล้วจึงสเมียร์ตัวอย่างลงบนสไลด์ ทำการประเมินตัวอสุจิมีชีวิตทั้งหมด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า นับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว แล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีแดงบริเวณส่วนหัว (เฉลิมพล, 2552)

4. การประเมินอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ในสารละลายที่มีความดันต่ำ (HOS-test) 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หยดน้ำเชื้อบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า นับอสุจิจำนวน 200 ตัว แล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยอสุจิที่มีหางงอ คือ อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Naing *et al.*, 2010)

5. การตรวจประเมินรูปร่างของตัวอสุจิ (normal morphology)

จากตัวอย่างสไลด์ที่ใช้ประเมินตัวอสุจิมีชีวิต ทำการประเมินรูปร่างตัวอสุจิ โดยการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยายสูง (1000 เท่า) นับตัวอสุจิทั้งหมดอย่างน้อย 200 ตัว แล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวผิดปกติชนิดต่างๆ ได้แก่ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง และการเกิดหยดน้ำบริเวณลำตัว

การบันทึกข้อมูล

การศึกษาคูณภาพตัวอสุจิก่อนการแช่แข็ง ทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. อสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility)
2. อสุจิมีชีวิตทั้งหมด (total viability)
3. อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)
4. อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (normal morphology)

การศึกษาคูณภาพตัวอสุจิหลังการทำละลาย ทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. อสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility, MOT)
2. อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility, PMOT)
3. ความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ (average path velocity, VAP)
4. ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (straight-line velocity, VSL)
5. ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curve-line velocity, VCL)
6. อสุจิมีชีวิตทั้งหมด (total viability)
7. อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)
8. อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (normal morphology)

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบ 2x2 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ (statistical model) คือ

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

- เมื่อ Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตจากอิทธิพลร่วมของความเร็วที่ i , เวลาในการปั่นที่ j และซ้ำที่ k
- μ คือ ค่าเฉลี่ยรวม
- A_i คือ อิทธิพลของความเร็วในการปั่น คือ 500 และ 1500 รอบต่อนาที
- B_j คือ อิทธิพลของเวลาในการปั่น คือ 3 และ 10 นาที

AB_{ij} คือ อิทธิพลร่วมของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

E_{ijk} คือ ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way anova และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อคุณภาพของตัวสุจิ

สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglonubian) ช่วงอายุระหว่าง 2-3 ปี น้ำหนักระหว่าง 60-70 กิโลกรัม จำนวน 1 ตัว มีระบบสืบพันธุ์ปกติ สามารถผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี โดยน้ำเชื้อที่รีดได้ก่อนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ต้องมีอสุจิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์และตัวผิดปกติไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์

อาหารทดลอง

แพะพ่อพันธุ์จะได้รับอาหารชั้นที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 กิโลกรัม รวมถึงได้รับหญ้าแห้งและน้ำสะอาดอย่างเต็มที่ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง

โรงเรือนและการจัดการเลี้ยงดู

โรงเรือนที่ใช้เลี้ยงแพะพ่อพันธุ์ เป็นคอกแยกข้างเดี่ยว ขนาด 2 x 2 เมตร มีพื้นคอกเป็นพื้นสแลตคอนกรีต

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดน้ำเชื้อ
 - 1.1 ช่องคลอดเทียม (artificial vagina)
 - 1.2 วาสลินสำหรับหล่อลื่น (K-Y jelly)
2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ
 - 2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast
 - 2.2 ไมโครไพเปต (micropipette)
 - 2.3 สไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glasses)
 - 2.4 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - 2.5 สี eosin-nigrosin
 - 2.6 สารละลาย hypo-osmotic swelling test (HOS-test)
 - 2.7 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
 - 2.8 กระดาษชำระและผ้าสะอาด
 - 2.9 เครื่องอุ่นสไลด์ (warming plate)
 - 2.10 เครื่องอุ่นน้ำ (water bath)
3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง
 - 3.1 ถังไนโตรเจนเหลว
 - 3.2 ไนโตรเจนเหลว
 - 3.3 ถังโฟม ขนาดกว้าง 12 เซนติเมตร ยาว 42 เซนติเมตร สูง 17 เซนติเมตร
 - 3.4 เทอร์โมมิเตอร์
 - 3.5 นาฬิกาจับเวลา
 - 3.6 อุปกรณ์นับความเข้มข้นอสุจิ (haemocytometer)
 - 3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugation)
 - 3.8 เครื่องลดอุณหภูมิ Bio cool (FTS system, INC. NY, USA)
 - 3.9 กระดาษชำระและผ้าสะอาด

3.10 หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร (mini-straw)

3.11 ปากคีบ (forceps) และถาดสแตนเลสที่ใช้วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ

3.12 สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง

วิธีการทดลอง

การศึกษารผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพของตัวอสุจิ ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0, 1, 2, และ 3 ชั่วโมง ทำการแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด ดังนี้

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อ (100 มิลลิลิตร)			
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
ทริส (กรัม)	3.03	3.03	3.03	3.03
กรดซิตริก (กรัม)	1.89	1.89	1.89	1.89
ไข่แดง (มิลลิลิตร)	20	20	20	20
กลีเซอรอล (มิลลิลิตร)	8	8	8	8
กลูโคส (กรัม)	1.26	-	-	-
ฟรุกโตส (กรัม)	-	1.26	-	-
ซูโครส (กรัม)	-	-	1.26	-
ทรีฮาโลส (กรัม)	-	-	-	1.26

การรีดน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อ และการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

เตรียมแพะพ่อพันธุ์และอุปกรณ์การรีดน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อในช่วงเช้าเวลา 6.00-8.00 น. โดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) โดยการเติมน้ำอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียสลงในช่องคลอดเทียม เป่าลมเข้าในช่องคลอดเทียม จนท่อยางอ่อนภายในรู้สึกกระชับ (พืระศักดิ์, 2548ข) และใช้แพะเพศเมียเป็นตัวล่อ นำน้ำเชื้อที่รีดได้ เจือจางน้ำเชื้อกับน้ำเกลือ (normal saline)

ในอัตราส่วน 1:19 จากนั้น แล้วจึงนำน้ำเชื่อมมาปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาในการปั่นเหวี่ยงที่ให้ผลคุณภาพอสุจิหลังการทำละลายดีที่สุดจากผลการทดลองที่ 1 หลังการปั่นเหวี่ยงทำการกำจัดเซมินอลพลาสมาโดยดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง นำน้ำเชื้อที่ได้มาตรวจปริมาตรและนับความเข้มข้นของอสุจิโดยใช้เครื่อง haemocytometer แล้วจึงเติมด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยกำหนดให้อสุจิหลังการเจือจางมีความเข้มข้นเท่ากับ 150×10^6 ตัวต่อหลอด ซึ่งปริมาตรสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ ได้จากการคำนวณดังนี้

$$\text{จำนวนโดส} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำเชื้อก่อนการเจือจาง (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของอสุจีก่อนการเจือจาง (ตัว/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของอสุจิต่อโดส (150×10^6 ตัว/โดส)}}$$

$$\text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังการเจือจาง (มิลลิลิตร)} = \text{จำนวนโดส} \times \text{ปริมาตรน้ำเชื้อต่อโดส (0.25 มิลลิลิตร)}$$

$$\text{ปริมาตรสารเจือจางที่ใช้ (มิลลิลิตร)} = \text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังการเจือจาง (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตรน้ำเชื้อก่อนการเจือจาง (มิลลิลิตร)}$$

หลังเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำเข้าตู้ลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง (equilibration time) จากนั้น จึงบรรจุน้ำเชื้อในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร และอุดปลายหลอดน้ำเชื้อด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) ทำการเรียงหลอดน้ำเชื้อบนถาดเรียงน้ำเชื้อ และนำไปลดอุณหภูมิต่อในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว 13 นาทีโดยวางถาดเรียงน้ำเชื้อเหนือระดับไนโตรเจนเหลว ประมาณ 5 เซนติเมตร สุดท้ายจึงนำหลอดน้ำเชื้อที่ได้ไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (อนนท์ และคณะ, 2551)

การทำละลายน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพของตัวอสุจิ

ภายหลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (อนนท์ และคณะ, 2551) เพื่อตรวจคุณภาพของตัวอสุจิหลังการทำละลาย โดยบ่มน้ำเชื้อในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจคุณภาพของตัวอสุจิที่ 0, 1, 2, และ 3 ชั่วโมงหลังการทำละลายซึ่งการตรวจคุณภาพของตัวอสุจิแต่ละค่าจะใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 10 หลอด โดยตรวจคุณภาพตัวอสุจิตามวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility) ก่อนการแช่แข็ง

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า ประเมิน 5 จุดบนแผ่นสไลด์และหาค่าเฉลี่ย โดยให้คะแนนการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเป็น 0-100 เปอร์เซนต์ (เฉลิมพล, 2552)

2. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility) หลังการทำละลาย

หยดน้ำเชื้อในปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์สำหรับเครื่อง Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) (Hamilton Thorne Biosciences IVOS, Version 12 TOX IVOS, Beverly, USA) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ด้านบน ทำการประเมินด้วยเครื่อง CASA โดยต้องมีจำนวนอสุจิไม่น้อยกว่า 800 ตัว บันทึกค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง

3. การตรวจประเมินตัวอสุจิที่มีชีวิตทั้งหมด (total viability)

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสี eosin-nigrosin ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ 30 วินาที แล้วจึงผสมตัวอย่างลงบนสไลด์ ทำการประเมินตัวอสุจิมีชีวิตทั้งหมด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า นับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว แล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซนต์ โดยอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีแดงที่บริเวณส่วนหัว (เฉลิมพล, 2552)

4. การประเมินอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)

หยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ในสารละลายที่มีความดันต่ำ (HOS-test) 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หยดน้ำเชื้อบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า นับอสุจิจำนวน 200 ตัวแล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซนต์ โดยอสุจิที่มีหางงอ คือ อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Naing *et al.*, 2010)

5. การตรวจประเมินรูปร่างของตัวอสุจิ (normal morphology)

จากตัวอย่างสไลด์ที่ใช้ประเมินตัวอสุจิมีชีวิต ทำการประเมินรูปร่างตัวอสุจิ โดยการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยายสูง (1000 เท่า) นับตัวอสุจิทั้งหมดอย่างน้อย 200 ตัว แล้วจึงเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวผิดปกติชนิดต่างๆ ได้แก่ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง และการเกิดหยดน้ำบริเวณลำตัว

การบันทึกข้อมูล

การศึกษาคุนภาพตัวอสุจีก่อนการแช่แข็ง ทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. อสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility)
2. อสุจิที่มีชีวิตทั้งหมด (total viability)
3. อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)
4. อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (normal morphology)

การศึกษาคุนภาพตัวอสุจิหลังการทำละลาย ทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. อสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility, MOT)
2. อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility, PMOT)
3. ความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ (average path velocity, VAP)
4. ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (straight-line velocity, VSL)
5. ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curve-line velocity, VCL)
6. อสุจิที่มีชีวิตทั้งหมด (total viability)
7. อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity)
8. อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (normal morphology)

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบ 4 x 4 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ (statistical model) คือ

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตจากอิทธิพลร่วมของชนิดน้ำตาลที่ i, ระยะเวลาหลังการทำละลาย น้ำเชื้อที่ j และซ้ำที่ k

μ คือ ค่าเฉลี่ยรวม

A_i คือ อิทธิพลของชนิดน้ำตาล คือ กลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และ ซูโครส

B_j คือ อิทธิพลของเวลาหลังการทำละลายน้ำเชื้อ คือ 0, 1, 2, และ 3 ชั่วโมง

AB_{ij} คือ อิทธิพลร่วมของชนิดน้ำตาลและเวลาหลังการทำละลายน้ำเชื้อ

E_{ijk} คือ ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way anova และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

สถานที่ทำการทดลอง

1. ดำเนินการเลี้ยงสัตว์ทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ และ ดำเนินการทำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา กรมปศุสัตว์ อำเภอลาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. วิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อที่ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ สถาบันสุวรรณวากกสิกิจฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
3. วิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ที่ห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เดือน กุมภาพันธ์ – สิงหาคม 2555



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของความเร็วและระยะเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อ คุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย

1.1 การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจีก่อนนำเข้าสู่การทดลอง พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกันที่ระดับ ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที พบว่าอสุจิมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด เท่ากับ 77.0, 78.5, 79.5, และ 78.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีผลทำให้อสุจิมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้หลังการปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าอสุจิมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด เท่ากับ 58.0, 61.0, 62.5, และ 62.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีผลทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงดังตารางที่ 4

ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดเท่ากับ 27.2, 36.0, 40.6, และ 35.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า กลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิหลังการทำละลาย ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 4

ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; PMO) ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอล

พลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 3 นาที และ ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 10 นาที มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ 11.60, 14.00, 16.20, และ 14.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่ ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 5

ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (average path velocity, VAP) ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่ากลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในระดับความเร็ว 500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 10 นาที มีความเร็วเฉลี่ยเท่ากับ 57.32, 54.96, 77.96, และ 76.12 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่ ส่งผลให้อสุจิมีความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่สูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (straight-line velocity, VSL) ของอสุจิหลังการทำละลาย มีค่าเท่ากับ 47.20, 46.92, 55.34, และ 54.72 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่ ส่งผลให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรงสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curve-line velocity, VCL) ของอสุจิหลังการทำละลาย มีค่าเท่ากับ 107.40, 106.94, 150.86, และ 145.36 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที่ ส่งผลให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 500 รอบต่อนาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 5

เมื่อเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจีก่อนการแช่แข็ง พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและระยะเวลาที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนการแช่แข็ง เนื่องจากกระบวนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีจุดประสงค์เพื่อแยกเอาเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อ ดังนั้นการนำน้ำเชื้อเพาะสมาเจี๊องด้วยน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:19 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วและเวลาที่แตกต่างกันเพื่อให้ตัวอสุจิตกตะกอน สามารถแยกส่วนใสด้านบนที่มีส่วนผสมของเซมินอลพลาสมาออกจากอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่างได้ และไม่กระทบต่อ

การเคลื่อนที่ของอสุจิ สอดคล้องกับการทดลองของ เกลิมพล (2552) ที่ไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนการแช่แข็งในน้ำเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วแตกต่างกัน

ผลของความเร็วและเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่า อสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง สูงกว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เนื่องจาก การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ทำให้เกิดแรงเหวี่ยงในระดับสูง ช่วยให้เกิดการแยกชั้นระหว่างเซมินอลพลาสมากับอสุจิที่ตกตะกอนได้อย่างชัดเจน จึงสามารถกำจัดเซมินอลพลาสมาได้อย่างสมบูรณ์ (Len *et al.*, 2010) อีกทั้งช่วยลดการสูญเสียตัวอสุจิในระหว่างกระบวนการกำจัดเซมินอลพลาสมา (Violeta and Pana, 2007) นอกจากนี้ Naing *et al.* (2011) รายงานว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 x g เป็นเวลา 3 นาที สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังการทำละลาย โดยหากมีเซมินอลพลาสมาปะปนอยู่กับอสุจิ จะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง EYCE ในเซมินอลพลาสมากับ egg yolk phosphatidylcholine ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะได้ผลผลิตเป็น lysophosphatidylcholine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารชะล้างต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดความเป็นพิษกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำให้ลดความสามารถในการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของตัวอสุจิหลังการทำละลาย (Ritar and Salamon, 1982)

ตารางที่ 4 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	การเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)		
	ก่อนการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่น x เวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	77.00	58.00	27.20 ^b
500 รอบต่อนาที x 10 นาที	78.50	61.00	36.00 ^a
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	79.50	62.50	40.60 ^a
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	78.00	62.50	35.60 ^a
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	77.75	59.50	31.60 ^b
1500 รอบต่อนาที	78.75	62.50	38.10 ^a
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	78.25	60.25	33.90
10 นาที	78.25	61.75	35.80
P-value			
ความเร็วในการปั่นxเวลา	0.3195	0.3799	0.0129
ความเร็วในการปั่น	0.5053	0.0839	0.0181
เวลาที่ใช้ในการปั่น	1.0000	0.3799	0.4526
Pooled S.E.	3.16	2.50	5.52

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของ
อสุจิหลังการทำละลาย

กลุ่มทดลอง	PMO (เปอร์เซ็นต์)	ความเร็วการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ไมโครเมตร/วินาที)		
		VAP	VSL	VCL
ความเร็วในการปั่นxเวลา				
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	11.60	57.32	47.20	107.40
500 รอบต่อนาที x10 นาที	14.00	54.96	46.92	106.94
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	16.20	77.96	55.34	150.86
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	14.40	76.12	54.72	145.36
ความเร็วในการปั่น				
500 รอบต่อนาที	12.80 ^b	56.14 ^b	47.06 ^b	107.17 ^b
1500 รอบต่อนาที	15.30 ^a	77.04 ^a	55.03 ^a	148.11 ^a
เวลาที่ใช้ในการปั่น				
3 นาที	13.90	67.64	51.27	129.13
10 นาที	14.20	65.54	50.82	126.15
P-value				
ความเร็วในการปั่น x เวลา	0.0535	0.8725	0.9211	0.2625
ความเร็วในการปั่น	0.0246	<0.0001	0.0002	<0.0001
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.7697	0.2063	0.9733	0.1885
Pooled S.E.	2.25	3.56	3.78	4.85

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่าง
ของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.2 อสุจิมิชีวิต

เมื่อทำการประเมินตัวอสุจิมิชีวิต พบว่าหลังผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในระดับความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที มีค่าอสุจิมิชีวิตเท่ากับ 81.60, 85.55, 84.40, และ 82.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาส่งผลให้ค่าอสุจิมิชีวิตแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ หลังผ่านการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง มีค่าอสุจิมิชีวิตเท่ากับ 46.30, 65.00, 62.10, และ 57.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า กลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีส่งผลให้มีค่าอสุจิมิชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลา พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมานาน 10 นาทีส่งผลให้มีอสุจิมิชีวิตสูงกว่าการปั่นด้วยเวลา 3 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลให้ค่าอสุจิมิชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) เมื่อตรวจคุณภาพของอสุจิหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พบว่ามีค่าอสุจิมิชีวิตเท่ากับ 31.80, 46.60, 50.70, และ 43.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีค่าอสุจิมิชีวิตสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลให้ค่าอสุจิมิชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p=0.0002$) แสดงดังตารางที่ 6

ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าอสุจิมิชีวิตภายหลังการทำละลาย พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที มีค่าอสุจิมิชีวิตสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ส่วนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 10 นาที มีอสุจิมิชีวิตสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 3 นาที นอกจากนี้ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าอสุจิมิชีวิต โดยพบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที หรือการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้มีค่าอสุจิมิชีวิตสูงสุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอิทธิพลของเซมินอลพลาสมา นอกจากลดความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแล้ว ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Naing *et al.*, 2011) ส่งผลให้อสุจิในกลุ่มที่ไม่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา หรือมีการกำจัดเซมินอลพลาสมาไม่

สมบูรณ์มีค่าอสุจิมีชีวิตต่ำกว่ากลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (อนนท์ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ Len *et al.* (2010) รายงานว่า ถึงแม้การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วและเวลาในระดับสูง (1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที) สามารถแยกชั้นเซมินอลพลาสมาได้อย่างสมบูรณ์ และลดการสูญเสียตัวอสุจิในระหว่างการจัดเซมินอลพลาสมา (Violeta and Pana, 2007) แต่การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงเป็นเวลานาน (1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที) จะสามารถสร้างความเสียหายทางโครงสร้างต่อเซลล์อสุจิได้ ทำให้พบค่าอสุจิมีชีวิตต่ำกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หรือการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทั้งนี้ การตรวจสอบค่าอสุจิมีชีวิตด้วยการย้อมสีเป็นการตรวจสอบทางโครงสร้างของตัวอสุจิ (Brito *et al.*, 2003) สอดคล้องกับการรายงานในแพะพันธุ์อื่นๆ ที่พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็วสูงและเวลาด้าน (1500 x g นาน 3 นาที) ช่วยเพิ่มความสามารถในการมีชีวิตของอสุจิหลังผ่านการแช่แข็ง (เฉลิมพล, 2552; Naing *et al.*, 2011; Ritar and Salamon, 1982)

ตารางที่ 6 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิมีชีวิต

กลุ่มทดลอง	จำนวนเชื้ออสุจิมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)		
	หลังการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่นเวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	81.60	46.30 ^c	31.80 ^c
500 รอบต่อนาที x 10 นาที	85.55	65.00 ^a	46.60 ^{ab}
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	84.40	62.10 ^a	50.70 ^a
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	82.85	57.90 ^b	43.40 ^b
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	83.58	54.20 ^b	39.20 ^b
1500 รอบต่อนาที	83.63	61.45 ^a	47.05 ^a
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	83.00	55.65 ^b	41.25
10 นาที	84.20	60.00 ^a	45.00
P-value			
ความเร็วในการปั่นเวลา	0.0991	<0.0001	0.0002
ความเร็วในการปั่น	0.9756	<0.0001	0.0037
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.4649	0.0006	0.1239
Pooled S.E.	2.42	2.29	5.16

หมายเหตุ ^{a, b, c} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.3 อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์

เมื่อทำการประเมินตัวอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าหลังผ่านการปั่นแยก เซมินอลพลาสมาในระดับความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที มีค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ เท่ากับ 74.40, 71.00, 72.80, และ 71.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาส่งผลให้ค่าอสุจิมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้หลังผ่านการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง มีค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ เท่ากับ 54.70, 56.30, 60.20, และ 56.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0059$) ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พบค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ เท่ากับ 39.80, 42.60, 45.10, และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0081$) แสดงดังตารางที่ 7

อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นการประเมินตัวอสุจิที่มีความสมบูรณ์และการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Brito *et al.*, 2003) พบว่า หลังการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดง ถึงแม้ว่าปัจจัยด้านเวลาที่ใช้ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาจะมีความสำคัญมากกว่าความเร็วก็ตาม (Violeta and Pana, 2007) การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที สามารถแยกเซมินอลพลาสมา ล้างปดอมปที่ติดมากับน้ำเชื้อ และอสุจิตัวตาย ออกจากอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ซึ่งนอกจากปฏิกิริยาระหว่าง EYCE ในเซมินอลพลาสมากับ egg yolk phosphatidylcholine ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะได้ผลผลิตเป็น lysophosphatidylcholine ซึ่งมีความเป็นพิษกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิแล้ว อสุจิตัวตายสามารถผลิตรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species, ROS) (Upreti *et al.*, 1999) โดยหากพบรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ในระดับสูง จะเกิดกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของฟอสโฟลิปิดที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดความเสียหายและส่งผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (Shekarriz *et al.*, 1995) การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงและเวลาดำเนิน (ความเร็ว 1500

รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที) จึงสามารถกำจัดสิ่งปลอมปน อสุจิตัวตาย และเซมินอลพลาสมาได้อย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้มีจำนวนอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงสุด สอดคล้องกับการทดลองของ Naing *et al.* (2011) ที่พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว $3000 \times g$ เป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงสุด แต่แตกต่างกับการทดลองของ เฉลิมพล (2552) ที่พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว $300 \times g$ นาน 10 นาทีให้ผลดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองอาจแตกต่างกันอันเนื่องมาจากปัจจัยของตัวสัตว์ ความแตกต่างของพ่อพันธุ์ และฤดูกาล

ตารางที่ 7 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์

กลุ่มทดลอง	อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)		
	หลังการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่น x เวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	74.40	54.70 ^b	39.80 ^b
500 รอบต่อนาที x 10 นาที	71.00	56.30 ^b	42.60 ^{ab}
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	72.80	60.20 ^a	45.10 ^a
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	71.90	56.50 ^b	40.00 ^b
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	72.70	55.50 ^b	42.45
1500 รอบต่อนาที	72.35	58.35 ^a	41.30
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	73.60	57.45	41.20
10 นาที	71.45	56.40	42.55
P-value			
ความเร็วในการปั่น x เวลา	0.2862	0.0059	0.0081
ความเร็วในการปั่น	0.7614	0.0036	0.3920
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.0759	0.2271	0.3171
Pooled S.E.	2.53	1.87	2.92

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.4 อสุจิที่มีรูปร่างปกติ

เมื่อทำการประเมินลักษณะตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติ พบว่าหลังผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในระดับความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที และความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที มีอสุจิที่มีรูปร่างปกติ เท่ากับ 93.40, 88.70, 88.70, และ 86.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การปั่นโดยใช้เวลา 3 นาทีส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นโดยใช้เวลา 10 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการประเมินรูปร่างอสุจิหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีอสุจิรูปร่างปกติ เท่ากับ 87.30, 85.20, 84.70, และ 78.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีอสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 3 นาทีส่งผลให้มีอสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 10 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อประเมินรูปร่างอสุจิหลังการทำละลาย มีค่าเท่ากับ 79.10, 80.80, 80.60, และ 77.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีรูปร่างปกติแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0334$) แสดงดังตารางที่ 8

1.4.1 ความผิดปกติส่วนหัวอสุจิ

ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะความผิดปกติส่วนหัวอสุจิ พบว่า หลังการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีความผิดปกติส่วนหัวอสุจิสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 10 นาทีส่งผลให้มีความผิดปกติส่วนหัวอสุจิสูงกว่าการปั่นโดยใช้เวลา 3 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการประเมินความผิดปกติส่วนหัวอสุจิหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าหลังการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้มีความผิดปกติส่วนหัวอสุจิสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 10 นาที

ส่งผลให้มีความผิดปกติส่วนหัวอสุจิสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลา 3 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้เกิดความผิดปกติส่วนหัวอสุจิแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0179$) เมื่อทำการประเมินความผิดปกติส่วนหัวอสุจิภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้เกิดความผิดปกติส่วนหัวอสุจิแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0331$) แสดงดังตารางที่ 9

1.4.2 ความผิดปกติส่วนลำตัวและหางอสุจิ

เมื่อทำการประเมินความผิดปกติส่วนลำตัวและหางอสุจิหลังการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา พบว่าการปั่นโดยใช้เวลา 10 นาทีส่งผลให้อสุจิมีความผิดปกติส่วนลำตัวและหางสูงกว่าการปั่นโดยใช้เวลา 3 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการประเมินความผิดปกติส่วนลำตัวและหางอสุจิหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้อสุจิมีความผิดปกติส่วนลำตัวและหางสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อประเมินความผิดปกติส่วนลำตัวและหางอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมามีผลทำให้อสุจิมีความผิดปกติส่วนลำตัวและหางแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 10

1.4.3 อสุจิมัลักษณะไซโทพลาสซึมครอเบิล (cytoplasmic droplet)

การศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบอสุจิที่มีลักษณะไซโทพลาสซึมครอเบิล ทั้งในลักษณะอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะติดที่หางใต้ฐานของหัว (proximal cytoplasmic droplet) อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะติดที่หางตรงกลางมิดพีช (medial cytoplasmic droplet) และหยดน้ำเกาะติดที่หางตรงส่วนปลายของมิดพีช (distal cytoplasmic droplet) จึงไม่สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบได้

ลักษณะความผิดปกติของอสุจิจากการทดลองในครั้งนี้ สามารถพบความผิดปกติในหลายรูปแบบ เช่น ความผิดปกติส่วนหัว ได้แก่ อสุจิที่มีหัวแคบกว่าปกติ อสุจิที่มีส่วนฐานของหัวแคบกว่าปกติ อสุจิมีหัวขนาดใหญ่กว่าปกติ อสุจิมีหัวรูปร่างกลม อสุจิมีหัวขนาดเล็กกว่าปกติ และอสุจิมีหัวกว้างมากกว่าปกติ ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง ได้แก่ อสุจิที่มีแต่หัวหรือหาง

อสุจิหางขงอ อสุจิมีความผิดปกติส่วนมิดพิช และอสุจิหางม้วน จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า ความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีผลต่อลักษณะรูปร่างอสุจิ โดยหลังกระบวนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา และหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส การปั่นแยกเซมินอลพลาสมา โดยใช้ความเร็วต่ำ (500 รอบต่อนาที) ส่งผลให้มีค่าอสุจิรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็วสูง (1500 รอบต่อนาที) ซึ่งการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้ความเร็วสูง สามารถพบลักษณะความผิดปกติในส่วนหัว และส่วนลำตัวและหางเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลานั้น (3 นาที) ส่งผลให้มีค่าอสุจิรูปร่างปกติสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลานาน (10 นาที) ซึ่งการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้เวลานาน สามารถพบลักษณะความผิดปกติในส่วนหัว และส่วนลำตัวและหางเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีผลโดยตรงต่อความสมบูรณ์ทางโครงสร้างของเซลล์ (Violeta and Pana, 2007) ถึงแม้ว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ด้วยความเร็วสูงเป็นเวลานาน สามารถกำจัดเซมินอลพลาสมา และอสุจิตัวตายออกได้ แต่แรงเหวี่ยงที่สูงและนานขึ้นยังส่งผลต่อความเสียหายทางโครงสร้างของเซลล์ได้มากเช่นกัน (Aurich, 2005) ทำให้หลังผ่านการแช่แข็ง สามารถพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อค่าอสุจิที่มีรูปร่างปกติ โดยการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ส่งผลให้มีค่าอสุจิที่มีรูปร่างปกติต่ำสุด โดยมักพบลักษณะความผิดปกติส่วนหัวมากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองในแพะพันธุ์บอร์ โดยพบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงในเวลานั้น ช่วยลดความผิดปกติของตัวอสุจิ (Naing *et al.*, 2011) เช่นเดียวกับการทดลองในสุกรที่พบว่า อสุจิที่ผ่านการปั่นโดยใช้ความเร็วสูงเป็นเวลานาน จะมีคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลาย และมีความสามารถในการเจาะโอโอไซท์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Carvajal *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Violeta and Pana (2007) รายงานว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในน้ำเชื้อสุนัขโดยใช้ความเร็วสูงหรือใช้เวลานาน สามารถพบลักษณะตัวอสุจิที่มีแต่หัว หางแตก และความเสียหายของอะโครโซมสูงที่สุด ส่วนอสุจิที่มีลักษณะไฮโทพลาสซึมผิดปกติ ถือเป็นอสุจิที่ยังพัฒนารูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ เกิดขึ้นในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิ (spermiogenesis) ทำให้อสุจิเกิดการสูญเสียส่วนของไฮโทพลาสซึม จึงเกิดลักษณะหยดน้ำเกาะบริเวณลำตัวและหางอสุจิ (Bearden and Fuquay, 1992) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติในลักษณะดังกล่าว

ตารางที่ 8 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิที่มีรูปร่างปกติ

กลุ่มทดลอง	อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (เปอร์เซ็นต์)		
	หลังการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่นเวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	93.40	87.30	79.10 ^a
500 รอบต่อนาที x 10 นาที	88.70	85.20	80.80 ^a
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	88.70	84.70	80.60 ^a
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	86.90	78.10	77.20 ^b
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	91.05 ^a	86.25 ^a	79.95
1500 รอบต่อนาที	87.80 ^b	81.40 ^b	78.90
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	91.05 ^a	86.00 ^a	79.85
10 นาที	87.80 ^b	81.65 ^b	79.00
P-value			
ความเร็วในการปั่นเวลา	0.1846	0.0551	0.0334
ความเร็วในการปั่น	0.0068	0.0004	0.3521
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.0068	0.0010	0.4491
Pooled SE	2.34	2.43	2.45

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิที่มีความผิดปกติ
ส่วนหัว

กลุ่มทดลอง	อสุจิที่มีความผิดปกติส่วนหัว (เปอร์เซ็นต์)		
	หลังการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่นxเวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	5.90	11.50 ^b	17.90 ^b
500 รอบต่อนาที x10 นาที	9.20	13.40 ^b	17.20 ^b
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	9.90	13.00 ^b	16.00 ^b
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	10.90	19.90 ^a	20.10 ^a
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	7.55 ^b	12.45 ^b	17.55
1500 รอบต่อนาที	10.40 ^a	16.45 ^a	18.05
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	7.90 ^b	12.25 ^b	16.95
10 นาที	10.05 ^a	16.65 ^a	18.65
P-value			
ความเร็วในการปั่นxเวลา	0.2130	0.0179	0.0331
ความเร็วในการปั่น	0.0054	0.0007	0.6336
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.0275	0.0003	0.1180
Pooled S.E.	1.98	2.12	2.30

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่าง
ของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 10 ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่ออสุจิที่มีความผิดปกติ
ส่วนลำตัวและหาง

กลุ่มทดลอง	อสุจิที่มีความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง (เปอร์เซ็นต์)		
	หลังการปั่นเหวี่ยง	หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส	หลังการทำละลาย
ความเร็วในการปั่นxเวลา			
500 รอบต่อนาที x 3 นาที	0.70	1.20	3.00
500 รอบต่อนาที x10 นาที	2.10	1.40	2.00
1500 รอบต่อนาที x 3 นาที	1.40	2.30	3.40
1500 รอบต่อนาที x 10 นาที	2.20	2.00	2.70
ความเร็วในการปั่น			
500 รอบต่อนาที	1.40	1.30 ^b	2.50
1500 รอบต่อนาที	1.80	2.15 ^a	3.05
เวลาที่ใช้ในการปั่น			
3 นาที	1.05 ^b	1.75	3.20
10 นาที	2.15 ^a	1.70	2.35
P-value			
ความเร็วในการปั่นxเวลา	0.3969	0.4960	0.8111
ความเร็วในการปั่น	0.2628	0.0308	0.3863
เวลาที่ใช้ในการปั่น	0.0057	0.8909	0.1876
Pooled S.E.	0.77	0.80	1.38

หมายเหตุ ^{a, b} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่าง
ของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลาย ต่อคุณภาพของตัวอสุจิ

2.1 การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโครส เท่ากับ 81.00, 79.67, 80.33, และ 81.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่าการเคลื่อนที่เท่ากับ 65.00, 68.33, 61.67, และ 63.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility, MOT) ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อส่งผลให้อสุจิมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 0, และ 1 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ทั้งหมดสูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 11 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลให้อสุจิมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0238$) แสดงดังตารางที่ 12

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility, PMOT) ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 11 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) แสดงดังตารางที่ 12

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (average-path velocity, VAP) ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อส่งผลให้อสุจิมีความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง มีความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่สูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 13 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) แสดงดังตารางที่ 14

ผลของชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (straight-line velocity, VSL) พบว่าน้ำตาทรียาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อ ส่งผลให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรงสูงกว่าน้ำตาชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง มีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรงสูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 13 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) แสดงดังตารางที่ 14

ผลของชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (curve-line velocity, VCL) พบว่าน้ำตาทรียาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อ ส่งผลให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งสูงกว่าน้ำตาชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมงมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งสูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 13 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้อสุจิมีความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) แสดงดังตารางที่ 14

ผลของชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่า น้ำตาทรียาโลสส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งสูงกว่าน้ำตาถลุมโคส ฟรุคโตส และซูโครส ($p<0.05$) เนื่องจาก น้ำตาทรียาโลสเป็นน้ำตาโมเลกุลคู่ ไม่สามารถดูดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เช่นเดียวกับน้ำตาลซูโครส แต่น้ำตาทรียาโลสมิพบปัญหาในการลดความเสียหายจากการแช่แข็งต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยปกติ

ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจะจับกับโมเลกุลของน้ำ แต่หมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลทรีฮาโลส มีความจำเพาะเจาะจงในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับฟอสโฟลิปิด ทดแทนการจับกับน้ำที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงช่วยเพิ่มการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ (Aisen *et al.*, 2002) อีกทั้งยังช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการจัดระบบใหม่ของโปรตีนและไขมัน ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ทนต่อความเสียหายจากการแช่แข็งได้ดีขึ้น (Aboagla and Terada, 2003) ทำให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ได้ดีขึ้น (Giraud *et al.*, 2000) นอกจากนี้ น้ำตาลโมเลกุลคู่ยังมีบทบาทในการสร้างแรงดันออสโมติกต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยให้เกิดการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น ทำให้มีผลึกน้ำแข็งในเซลล์ลดน้อยลง สอดคล้องกับการทดลองในแพะ (Aboagla and Terada, 2003; Khalili *et al.*, 2009) และ (Jafaroghli *et al.*, 2011; Aisen *et al.*, 2002; Bucak *et al.*, 2006) กระบือ (Reddy *et al.*, 2010) โค (Chhillar *et al.*, 2012) สุกร (Malo *et al.*, 2010) และสุนัข (Yildiz *et al.*, 2000; Yamashiro *et al.*, 2007) ที่พบว่าหลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง อสุจิที่เดิมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลมีการเคลื่อนที่ที่ดีกว่าอสุจิที่เดิมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีน้ำตาลหรือมีน้ำตาลชนิดอื่น แต่มีบางการทดลองที่พบว่า อสุจิที่เดิมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส มีการเคลื่อนที่หลังการทำละลายไม่แตกต่างจากอสุจิที่เดิมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดอื่น (สุพาที และคณะ, 2554; Naing *et al.* 2010) ซึ่งอาจแตกต่างกัน เนื่องจากสายพันธุ์ วิธีการแช่แข็ง และลักษณะเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์ ถึงแม้ว่า น้ำตาลโมเลกุลคู่มีความสามารถในการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ได้ดีกว่า (Molinia *et al.*, 1994) แต่จากการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งกลูโคส และฟรุคโตสจะมีบทบาทในการเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งได้น้อยกว่าน้ำตาลทรีฮาโลส แต่ก็มีความสามารถช่วยสนับสนุนการเคลื่อนที่ของอสุจิ ทำให้อสุจิหลังการทำละลายมีความเร็วในการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำตาลซูโครส โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะถูกอสุจิดูดซึมผ่านทางช่องกลูโคสทรานสปอร์เตอร์ (glucose transporters, GLUTs) ซึ่งสามารถดูดซึมเอาเฉพาะน้ำตาล 6 คาร์บอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อเข้าสู่ไกลโคไลซิส (glycolysis) และออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) สร้างเป็นแหล่งพลังงาน และช่วยสนับสนุนการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Bucci *et al.*, 2011)

ผลของเวลาหลังการทำละลายต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการทำละลาย พบว่า อสุจิหลังการทำละลายทันที (ที่ 0 ชั่วโมง หลังการทำละลาย) มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งสูงกว่าอสุจิหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า ยิ่งเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นานขึ้น การเคลื่อนที่ของอสุจิทุกลักษณะมีค่าลดลง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเสื่อมของ

ตัวอสุจิ ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ความแข็งแรงหรือความสมบูรณ์ทางโครงสร้างของอสุจิ หรือมีการผลิตกรดแลคติก จากการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานของอสุจิ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง (ศรีสุวรรณ, 2542) สอดคล้องกับการทดลองในสุกร ที่พบว่าหลังการทำละลาย การเก็บรักษาน้ำเชื้อนานขึ้นเป็นผลให้ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิตลดลง (Malo *et al.*, 2010) นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ เนื่องจาก น้ำตาลทรีฮาโลสช่วยป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Aboagla and Terada, 2003) และเวลาหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมงมีการเสื่อมของอสุจิน้อยที่สุด (Malo *et al.*, 2010) ส่งผลให้อสุจิที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสหลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมงมีลักษณะการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงสุด แต่หากพิจารณาความเร็วในการเคลื่อนที่ พบว่าการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทั้งกลูโคส และฟรุคโตส ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายทันทีที่มีความเร็วในการเคลื่อนที่สูงสุดทั้งความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (VSL) และความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (VCL) เนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถถูกดูดซึมและใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้อสุจิหลังการทำละลายมีความเร็วในการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ แต่เมื่อทำการบ่มอสุจิหลังการทำละลายในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานขึ้น อสุจิจะมีการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลมากขึ้น มีการปลดปล่อยกรดแลคติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ประกอบกับอสุจิมีความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากกระบวนการแช่แข็ง (ศรีสุวรรณ, 2542) ทำให้อสุจิที่ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารเจือจางน้ำเชื้อหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมง มีความเร็วในการเคลื่อนที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำตาลทรีฮาโลส

ตารางที่ 11 ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	การเคลื่อนที่ของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)	
	การเคลื่อนที่ทั้งหมด	การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
ชนิดน้ำตาล		
กลูโคส	20.13 ^b	6.00 ^b
ฟรุคโตส	19.35 ^b	6.35 ^b
ทรีฮาโลส	31.25 ^a	10.80 ^a
ซูโครส	9.45 ^c	2.65 ^c
เวลาหลังการทำละลาย		
0 ชั่วโมง	26.00 ^a	10.90 ^a
1 ชั่วโมง	25.65 ^a	8.70 ^b
2 ชั่วโมง	17.13 ^b	4.05 ^c
3 ชั่วโมง	11.40 ^c	2.15 ^d
P-value		
ชนิดน้ำตาล	<0.0001	<0.0001
เวลาหลังการทำละลาย	<0.0001	<0.0001
Pooled S.E.	6.19	2.21

หมายเหตุ ^{a, b, c, d} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 12 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาดในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	การเคลื่อนที่ของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)	
	การเคลื่อนที่ทั้งหมด	การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
ชนิดน้ำตาด x เวลาหลังการทำละลาย		
กลูโคส x 0 ชั่วโมง	30.90 ^{bc}	10.70 ^{ab}
กลูโคส x 1 ชั่วโมง	25.70 ^{cd}	7.20 ^{cd}
กลูโคส x 2 ชั่วโมง	17.11 ^e	2.77 ^{efg}
กลูโคส x 3 ชั่วโมง	7.30 ^{gh}	0.50 ^h
ฟรุคโตส x 0 ชั่วโมง	24.20 ^d	9.20 ^b
ฟรุคโตส x 1 ชั่วโมง	26.00 ^{cd}	8.20 ^c
ฟรุคโตส x 2 ชั่วโมง	16.62 ^e	2.75 ^{ef}
ฟรุคโตส x 3 ชั่วโมง	9.70 ^{fgh}	1.30 ^{efgh}
ทรีฮาโลส x 0 ชั่วโมง	35.50 ^{ab}	12.50 ^{ab}
ทรีฮาโลส x 1 ชั่วโมง	37.00 ^a	14.50 ^a
ทรีฮาโลส x 2 ชั่วโมง	28.70 ^{cd}	9.70 ^c
ทรีฮาโลส x 3 ชั่วโมง	23.80 ^d	6.50 ^d
ซูโครส x 0 ชั่วโมง	13.40 ^{ef}	5.70 ^d
ซูโครส x 1 ชั่วโมง	12.30 ^{efg}	3.40 ^e
ซูโครส x 2 ชั่วโมง	6.70 ^h	1.20 ^{fgh}
ซูโครส x 3 ชั่วโมง	4.80 ^h	0.30 ^h
P-value	0.0238	<0.0001
Pooled S.E.	6.19	2.21

หมายเหตุ ^{a, b, c, d, e, f, g, h} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ไมโครเมตรต่อวินาที)		
	VAP	VSL	VCL
ชนิดน้ำตาล			
กลูโคส	45.07 ^c	36.80 ^{bc}	79.09 ^c
ฟรุคโตส	47.78 ^b	38.08 ^b	83.13 ^b
ทรีฮาโลส	52.97 ^a	41.47 ^a	91.47 ^a
ซูโครส	44.99 ^c	35.80 ^c	83.76 ^b
เวลาหลังการทำละลาย			
0 ชั่วโมง	57.64 ^a	46.63 ^a	98.86 ^a
1 ชั่วโมง	49.55 ^b	39.80 ^b	86.62 ^b
2 ชั่วโมง	43.68 ^c	34.64 ^c	78.83 ^c
3 ชั่วโมง	39.96 ^d	31.08 ^d	73.15 ^d
P-value			
ชนิดน้ำตาล	<0.0001	<0.0001	<0.0001
เวลาหลังการทำละลาย	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Pooled S.E.	4.15	3.97	6.43

หมายเหตุ VAP (average path velocity) คือ ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่

VSL (straight-line velocity) คือ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง

VCL (curve-line velocity) คือ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง

^{a, b, c, d} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ไมโครเมตรต่อวินาที)		
	VAP	VSL	VCL
ชนิดน้ำตา x เวลาหลังการทำละลาย			
กลูโคส x 0 ชั่วโมง	59.70 ^a	49.88 ^a	102.10 ^a
กลูโคส x 1 ชั่วโมง	46.29 ^d	38.68 ^{ef}	79.07 ^{ef}
กลูโคส x 2 ชั่วโมง	38.66 ^{fg}	31.13 ^{ij}	70.12 ^g
กลูโคส x 3 ชั่วโมง	35.78 ^g	27.69 ^j	65.64 ^g
ฟรุคโตส x 0 ชั่วโมง	60.24 ^a	48.15 ^{ab}	103.24 ^a
ฟรุคโตส x 1 ชั่วโมง	50.69 ^c	40.62 ^{de}	87.41 ^{cd}
ฟรุคโตส x 2 ชั่วโมง	42.50 ^{ef}	33.61 ^{ghi}	76.30 ^f
ฟรุคโตส x 3 ชั่วโมง	38.27 ^{fg}	30.34 ^{ij}	66.29 ^g
ทรีฮาโลส x 0 ชั่วโมง	56.44 ^{ab}	43.51 ^{bcd}	95.27 ^b
ทรีฮาโลส x 1 ชั่วโมง	56.52 ^{ab}	43.72 ^{cd}	95.94 ^b
ทรีฮาโลส x 2 ชั่วโมง	52.13 ^c	41.79 ^{ce}	90.45 ^b
ทรีฮาโลส x 3 ชั่วโมง	46.78 ^d	36.84 ^{fg}	84.23 ^{de}
ซูโครส x 0 ชั่วโมง	54.18 ^{bc}	44.97 ^{cd}	94.84 ^{bc}
ซูโครส x 1 ชั่วโมง	44.69 ^{de}	36.18 ^{fgh}	84.04 ^{de}
ซูโครส x 2 ชั่วโมง	42.13 ^{ef}	32.59 ^{hi}	79.74 ^e
ซูโครส x 3 ชั่วโมง	38.99 ^{fg}	29.46 ^{ij}	76.42 ^f
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Pooled S.E.	4.15	3.97	6.43

หมายเหตุ VAP (average path velocity) คือ ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่

VSL (straight-line velocity) คือ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง

VCL (curve-line velocity) คือ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย

แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.2 อสุจิมีชีวิต

เมื่อทำการประเมินอสุจิมีชีวิตก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโครส เท่ากับ 79.10, 77.05, 78.80, และ 80.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ทำการประเมินอสุจิมีชีวิตหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 62.80, 66.10, 64.00, และ 65.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการประเมินอสุจิมีชีวิตภายหลังการทำละลาย พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาล ทรีฮาโลสส่งผลให้อสุจิมีชีวิตสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนปัจจัย ด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าหลังการทำละลายทันที (หลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง) ส่งผลให้อสุจิมีชีวิตสูงกว่าหลังการทำละลายที่ 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดง ดังตารางที่ 15 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลให้อสุจิมีชีวิตแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.0001$) แสดงดังตารางที่ 16

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่ออสุจิมีชีวิตหลัง การทำละลาย พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสส่งผลให้อสุจิมีชีวิตสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เนื่องจาก น้ำตาลทรีฮาโลสมีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายจากการ แห้งแข็ง (Aboagla and Terada, 2003) นอกจากนี้ Watson *et al.* (1995) รายงานว่า อันตรายจาก กระบวนการแห้งแข็งอสุจิ คือ การเหี่ยวเฉาให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งอาจ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์ (cell organelle) การเกิดผลึกน้ำแข็งจากน้ำ ภายนอกเซลล์ทำให้สารเจือจางน้ำเชื้อมีแรงดันออสโมติกสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงชั้นไขมันของ เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการซ็อกเนื่องจากความเย็น เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ จึงพบว่า อสุจิหลังการทำละลายมีเปอร์เซ็นต์มีชีวิตต่ำลง นอกจากนี้ การซ็อกเนื่องจากการแห้งแข็งยังก่อให้เกิด ความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) และความผิดปกติของโครมาติน (chromatin) ส่งผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (Sariozkan *et al.*, 2012) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำตาล โมเลกุลคู่มีความสามารถในการป้องกันความเสียหายจากการแห้งแข็งมากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ จึงเห็นได้ว่า น้ำตาลทรีฮาโลส (กลูโคส+กลูโคส) มีความสามารถในการป้องกันความเสียหายจากการแห้งแข็งได้มากกว่าน้ำตาล ซูโครส (กลูโคส+ฟรุคโตส) (Fernandez *et al.*, 2012) ส่วนเวลาหลังการทำละลาย พบว่า หลังการ ทำละลายทันที (ที่ 0 ชั่วโมง หลังการทำละลาย) มีค่าอสุจิมีชีวิตสูงสุดและมีค่าลดลงเมื่อเวลา

เก็บรักษานานขึ้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเสื่อมของตัวอสุจิ ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากกระบวนการแช่แข็ง การผลิตกรดแลคติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานของอสุจิ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง (ศรีสุวรรณ, 2542) นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของ ROS จากการปลดปล่อยของอสุจิตัวตายส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ได้เช่นกัน ทำให้อสุจิหลังการทำละลายมีการตายเพิ่มมากขึ้นตามเวลาหลังการทำละลายน้ำเชื้อ (Brinsko *et al.*, 2002) สอดคล้องกับการทดลองในสุกร ที่พบว่าหลังการทำละลาย การเก็บรักษาน้ำเชื้อนานขึ้นเป็นผลให้อสุจิมีชีวิตมีค่าลดลง (Malo *et al.*, 2010) ดังนั้น การนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมเพื่อให้ได้อัตราการผสมติดที่ดี ควรรีบผสมเทียมโดยทันทีหลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

2.3 อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์

เมื่อประเมินค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ก่อนเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโครส มีค่าเท่ากับ 79.20, 79.00, 80.75, และ 79.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อประเมินค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์หลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 56.55, 55.85, 55.40, และ 53.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการประเมินค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์หลังการทำละลาย พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสส่งผลให้มีค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าหลังการทำละลายทันที (หลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง) มีค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าหลังการทำละลาย 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 15 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) แสดงดังตารางที่ 16

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่า อสุจิในกลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส มีค่าอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น เนื่องจาก น้ำตาลทรีฮาโลส มีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Aboagla and Terada, 2003) สอดคล้องกับ

การทดลองในสุกร โดยพบว่ากลูโคสมีความสามารถในการป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งได้ดีที่สุดในกลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่ยังด้อยกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มากกว่ามีผลต่อแรงดันออสโมติก ส่งผลให้มีการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ได้ดีกว่า (Pursel *et al.*, 1972) แต่ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มารวมกันเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ก็มีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง โดยพบว่าการจับกันของกลูโคส 2 โมเลกุลด้วยพันธะอัลฟา 1-1 กลูโคไซด์ (α -1 $\rightarrow$ 1 glucoside linkage) ซึ่งสามารถพบได้ในน้ำตาลทรีฮาโลส มีความสามารถในการจับกับหัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (polar head group) ได้ดีกว่า จึงมีผลในการป้องกันความเสียหายได้มากกว่าน้ำตาลซูโครส ทำให้พบค่าออสโมติกที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ และการเคลื่อนที่ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดอื่น (Fernandez *et al.*, 2012; Aboagla and Terada, 2003) ส่วนเวลาหลังการทำละลาย พบว่า หลังการทำละลายทันที มีค่าออสโมติกที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงที่สุดและมีค่าลดลงเมื่อเวลาเก็บรักษานานขึ้น เนื่องจากการเสื่อมของออสโมติกความเสียหายจากการแช่แข็ง และการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (ศรีสุวรรณ, 2542) นอกจากนี้ ออสโมติกตัวตายมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ยังส่งผลให้ค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ออสโมติกต่ำลง โดยออสโมติกตัวตายจะสามารถปลดปล่อย ROS ออกนอกเซลล์ ซึ่งหากมี ROS ที่มากเกินไปจะสามารถเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ได้เช่นกัน (Brinsko *et al.*, 2002)

ตารางที่ 15 ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่ออสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์

กลุ่มทดลอง	อสุจิมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	อสุจิที่มีความสมบูรณ์ ของเชื้อหุ้มเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)
ชนิดน้ำตาล		
กลูโคส	23.74 ^b	23.60 ^b
ฟรุคโตส	22.25 ^b	18.43 ^c
ทรีฮาโลส	34.80 ^a	30.83 ^a
ซูโครส	14.36 ^c	9.78 ^b
เวลาหลังการทำละลาย		
0 ชั่วโมง	30.05 ^a	28.56 ^a
1 ชั่วโมง	28.68 ^a	22.66 ^b
2 ชั่วโมง	21.30 ^b	17.13 ^c
3 ชั่วโมง	15.13 ^c	14.26 ^d
P-value		
ชนิดน้ำตาล	<0.0001	<0.0001
เวลาหลังการทำละลาย	<0.0001	<0.0001
Pooled S.E.	4.79	5.21

หมายเหตุ ^{a, b, c, d} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลาย
ต่ออสุจิมีชีวิตและอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์

กลุ่มทดลอง	อสุจิมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	อสุจิที่มีความสมบูรณ์ ของเชื้อหุ้มเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)
ชนิดน้ำตาล x เวลาหลังการทำละลาย		
กลูโคส x 0 ชั่วโมง	31.90 ^b	33.45 ^b
กลูโคส x 1 ชั่วโมง	26.90 ^{cd}	25.00 ^{cd}
กลูโคส x 2 ชั่วโมง	22.45 ^{de}	18.95 ^{ef}
กลูโคส x 3 ชั่วโมง	13.70 ^{gh}	17.00 ^{efg}
ฟรุคโตส x 0 ชั่วโมง	29.75 ^{bc}	27.50 ^c
ฟรุคโตส x 1 ชั่วโมง	29.00 ^{bc}	19.90 ^{ef}
ฟรุคโตส x 2 ชั่วโมง	17.50 ^{fg}	15.10 ^{fgh}
ฟรุคโตส x 3 ชั่วโมง	12.75 ^h	11.20 ^{hi}
ทรีฮาโลส x 0 ชั่วโมง	40.80 ^a	39.05 ^a
ทรีฮาโลส x 1 ชั่วโมง	40.70 ^a	36.60 ^{ab}
ทรีฮาโลส x 2 ชั่วโมง	33.60 ^b	25.80 ^{cd}
ทรีฮาโลส x 3 ชั่วโมง	24.10 ^d	21.85 ^{de}
ซูโครส x 0 ชั่วโมง	18.50 ^{ef}	14.25 ^{gh}
ซูโครส x 1 ชั่วโมง	17.35 ^{fg}	9.15 ⁱ
ซูโครส x 2 ชั่วโมง	11.65 ^h	7.80 ⁱ
ซูโครส x 3 ชั่วโมง	9.95 ^h	7.90 ⁱ
P-value	0.0060	0.0044
Pooled S.E.	4.79	5.21

หมายเหตุ ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.4 อสุจิรูปร่างปกติ

เมื่อทำการประเมินรูปร่างอสุจิปกติก่อนการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน คือ กลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโครส เท่ากับ 86.10, 90.80, 89.50, และ 91.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ทำการประเมินรูปร่างอสุจิปกติหลังการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 87.00, 87.00, 85.70, และ 87.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการประเมินรูปร่างปกติอสุจิหลังการทำละลาย พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาล กลูโคส หรือฟรุคโตสส่งผลให้มือสุจิรูปร่างปกติสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าหลังการทำละลายทันที (หลังการทำละลายที่ 0 ชั่วโมง) ส่งผลให้มือสุจิรูปร่างปกติสูงกว่าหลังการทำละลาย 1, 2, และ 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 17 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อรูปร่างอสุจิปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0103$) แสดงดังตารางที่ 18

2.4.1 ความผิดปกติส่วนหัวอสุจิ

เมื่อทำการประเมินลักษณะความผิดปกติส่วนหัวอสุจิภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส และซูโครสส่งผลให้อสุจิมีความผิดปกติส่วนหัว สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปัจจัยด้านเวลาหลังการทำละลาย พบว่าหลังการทำละลาย 3 ชั่วโมง ส่งผลให้อสุจิมีความผิดปกติส่วนหัวสูงกว่าหลังการทำละลายที่ 0, 1, และ 2 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 17 นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อความผิดปกติส่วนหัวอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0013$) แสดงดังตารางที่ 18

2.4.2 ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง

เมื่อทำการประเมินลักษณะผิดปกติส่วนลำตัวและหางภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองส่งผลต่อรูปร่างอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) แสดงดังตารางที่ 18

2.4.3 อสุจิมีลักษณะไซโทพลาสซึมคิรอปเล็ท (cytoplasmic droplet)

การศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบอสุจิมีลักษณะไซโทพลาสซึมคิรอปเล็ท ทั้งในลักษณะอสุจิมียอดน้ำเกาะติดที่หางใต้ฐานของหัว (proximal cytoplasmic droplet) อสุจิมียอดน้ำเกาะติดที่หางตรงกลางมิดพีช (medial cytoplasmic droplet) และยอดน้ำเกาะติดที่หางตรงส่วนปลายของมิดพีช (distal cytoplasmic droplet) จึงไม่สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบได้

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่ออสุจิที่มีรูปร่างปกติ พบว่า กลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือ ฟรุคโตส มีอสุจิรูปร่างปกติสูงกว่ากลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส หรือซูโครส เนื่องจากกลูโคส หรือฟรุคโตส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ จึงนิยมใช้เป็นแหล่งพลังงานแก่อสุจิ (พิรศักดิ์, 2542ข) แต่น้ำตาลทรีฮาโลส และซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ประกอบกับการมีน้ำหนักลโมเลกุลมากกว่า ส่งผลให้มีค่าออสโมลาริตี (osmolality) สูงกว่า จึงก่อกวนน้ำออกนอกเซลล์ได้มากขึ้น (Pursel *et al.*, 1972) อย่างไรก็ตาม การก่อกวนน้ำออกนอกเซลล์ก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์ ทำให้อสุจิที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส หรือซูโครสมีรูปร่างผิดปกติมากกว่าอสุจิที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตส (สุพาที และคณะ, 2554) เมื่อจำแนกความผิดปกติตามโครงสร้างของตัวอสุจิ คือ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง และการเกิดหยดน้ำที่บริเวณส่วนหาง พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส หรือซูโครส มีผลต่อความผิดปกติส่วนหัวมากกว่าอสุจิที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตส เช่น ลักษณะอสุจิที่มีตัวอสุจิที่มีหัวแคบกว่าปกติ อสุจิที่มีส่วนฐานของหัวแคบกว่าปกติ และ อสุจิมีหัวขนาดใหญ่กว่าปกติ อีกทั้งยังพบว่า เวลาหลังการทำละลายเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีความผิดปกติส่วนหัวเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังมีการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาริตีจากการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ศรีสุวรรณ, 2542) นอกจากนี้ การเติมกลีเซอรอลก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์เช่นกัน โดยพบว่าการค่อยๆ เติมทีละหยดโดยใช้เวลามากกว่า 5 นาที ช่วยให้อสุจิสามารถรักษขนาดเซลล์ได้ดีกว่า (Gilmore *et al.*, 1998) แต่การศึกษาในครั้งนี้ พบอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อลักษณะความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง โดยพบว่ากลุ่มที่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตสหลังการทำละลาย 3 ชั่วโมง มีความผิดปกติส่วนหางเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้ประโยชน์จากน้ำตาล เป็นผลให้แรงดันออสโมติคลดลง น้ำจากภายนอกเซลล์จึงมีการไหลเข้าสู่เซลล์ ทำให้พบความผิดปกติ

ในลักษณะหางบวมเพิ่มมากขึ้น และการทดลองในครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติในลักษณะหยดน้ำบริเวณลำตัวและหาง (cytoplasmic droplet)

ตารางที่ 17 ผลของชนิดน้ำตาในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่ออสุจิที่มีรูปร่างปกติ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	ลักษณะรูปร่างอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)		
	อสุจิที่มีรูปร่างปกติ	ความผิดปกติส่วนหัว	ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง
ชนิดน้ำตา			
กลูโคส	81.80 ^a	15.10 ^b	3.10
ฟรุคโตส	81.05 ^a	16.10 ^b	2.85
ทรีฮาโลส	73.95 ^b	23.15 ^a	2.90
ซูโครส	76.20 ^b	20.65 ^a	3.15
เวลาหลังการทำละลาย			
0 ชั่วโมง	85.15 ^a	13.05 ^d	2.80
1 ชั่วโมง	80.60 ^b	16.65 ^c	2.75
2 ชั่วโมง	76.20 ^c	20.70 ^b	3.10
3 ชั่วโมง	72.05 ^d	24.60 ^a	3.35
P-value			
ชนิดน้ำตา	<0.0001	<0.0001	0.8383
เวลาหลังการทำละลาย	<0.0001	<0.0001	0.3902
Pooled S.E.	4.11	4.16	1.34

หมายเหตุ ^{a, b, c, d} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 18 อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อ
อสุจิที่มีรูปร่างปกติ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ

กลุ่มทดลอง	ลักษณะรูปร่างอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)		
	อสุจิที่มีรูปร่างปกติ	ความผิดปกติส่วนหัว	ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง
ชนิดน้ำตาล x เวลาหลังการทำละลาย			
กลูโคส x 0 ชั่วโมง	88.00 ^a	9.60 ⁱ	2.40 ^{bcd}
กลูโคส x 1 ชั่วโมง	84.60 ^b	14.20 ^{fghi}	1.20 ^d
กลูโคส x 2 ชั่วโมง	78.60 ^{cde}	17.00 ^{efg}	4.40 ^a
กลูโคส x 3 ชั่วโมง	76.00 ^{efg}	19.60 ^{def}	4.40 ^a
ฟรุคโตส x 0 ชั่วโมง	85.00 ^{ab}	13.40 ^{hi}	1.60 ^{abcd}
ฟรุคโตส x 1 ชั่วโมง	81.80 ^{abc}	16.40 ^{fgh}	1.80 ^{dc}
ฟรุคโตส x 2 ชั่วโมง	80.60 ^{abc}	15.40 ^{ghi}	4.00 ^{ab}
ฟรุคโตส x 3 ชั่วโมง	76.80 ^{cdf}	19.20 ^{defg}	4.00 ^{ab}
ทรีฮาโลส x 0 ชั่วโมง	81.80 ^{bcd}	15.00 ^{fghi}	3.20 ^{abc}
ทรีฮาโลส x 1 ชั่วโมง	74.60 ^{cdf}	23.20 ^{cde}	2.20 ^d
ทรีฮาโลส x 2 ชั่วโมง	72.20 ^{fgh}	24.20 ^{bcd}	3.60 ^{ab}
ทรีฮาโลส x 3 ชั่วโมง	67.20 ^h	30.20 ^a	2.60 ^{abcd}
ซูโครส x 0 ชั่วโมง	85.00 ^{bcd}	11.20 ^{fg}	3.80 ^{dc}
ซูโครส x 1 ชั่วโมง	80.60 ^{cde}	15.80 ^{efg}	3.60 ^{ab}
ซูโครส x 2 ชั่วโมง	71.00 ^{gh}	26.20 ^{abc}	2.80 ^{abcd}
ซูโครส x 3 ชั่วโมง	68.20 ^h	29.40 ^{ab}	2.40 ^{bcd}
P-value	0.0103	0.0013	<0.0001
Pooled S.E.	4.11	4.16	1.34

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f, g, h, i อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ (column) เดียวกันในแต่ละปัจจัย แสดงความแตกต่าง
ของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลของความเร็ว (500 และ 1500 รอบต่อนาที) และเวลา (3 นาที และ 10 นาที) ในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย สรุปผลได้ดังนี้

การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง และอสุจิมิชีวิต สูงกว่ากลุ่มที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในระดับ 500 รอบต่อนาที นอกจากนี้ การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด อสุจิมิชีวิต อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงสุด

ผลของชนิดน้ำตาลในสารเจือจางน้ำเชื้อและเวลาหลังการทำละลายต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย สรุปผลได้ดังนี้

สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส ส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง อสุจิมิชีวิต และอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ดีที่สุด ส่วนอสุจิหลังการทำละลายทันที (ที่ 0 ชั่วโมงหลังการทำละลาย) มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง อสุจิมิชีวิต อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอสุจิที่มีรูปร่างปกติ สูงสุด นอกจากนั้น อิทธิพลร่วมระหว่างสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสส่งผลให้อสุจิหลังการทำละลายทันทีมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิมิชีวิต และอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. หากมีการศึกษาเรื่องความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในครั้งต่อไป ควรปรับระดับความเร็วในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาให้สูงหรือต่ำกว่า 1500 รอบต่อนาที โดยกำหนดเวลาในการปั่นเหวี่ยงที่ 3 นาทีเท่าเดิม เพื่อสามารถหาระดับความเร็วที่เหมาะสมสำหรับการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในน้ำเชื้อแพะได้ละเอียดยิ่งขึ้น
2. แพะแต่ละสายพันธุ์อาจจะมีลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์อสุจิที่แตกต่างกัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาระดับความเร็วและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาในน้ำเชื้อแพะแต่ละสายพันธุ์ที่ชัดเจนมากขึ้น
3. ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนผลของเวลาในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมื่อมีการเก็บรักษาอสุจิแพะในรูปของน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง
4. เนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลสมีราคาแพง จึงควรพิจารณาถึงต้นทุนและความคุ้มค่าในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง รวมถึงอัตราการผสมติดเมื่อมีการนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง
5. อสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง อาจพบลักษณะที่อ่อนแอ และไวต่อการตาย ดังนั้น ในการนำน้ำเชื้อแพะแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียม จึงควรรีบปฏิบัติทันทีหลังการทำละลายน้ำเชื้อ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เฉลิมพล มหามาตร. 2552. การศึกษาการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและการเสริม Equex STM Paste ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

พีระศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2548ก. สรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์วิทยาลัย.

พีระศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2548ข. การแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ. สงขลา: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มงคล เตชะกำพุ. 2543. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และ อนันต์ เทืองสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus[®] Bioexcel[®] และ Egg Yolk Tris. ประมวลผลงานการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 20. กรมปศุสัตว์

ฤดี สุราฤทธิ. 2005. น้ำตาล. แหล่งที่มา: <http://dental.anamai.moph.go.th/sweet2/StockData/story01.pdf>, 15 กุมภาพันธ์ 2556.

ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2537. การผสมเทียมแพะ แกะ. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542. คู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร. สำนักพิมพ์สัตว์เศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

สุพาที กิจคำ, สุธี รัตนภิรมย์, ปิยวรรณ สุธรรมานันท์, กรไชย แก้วกรรัตน์, ปวีวรรณ พูลเพิ่ม และ อนุชัย ภิญโญภูมิมนตรี. 2554. ผลของการเติมน้ำตาลทรีฮาโลสในสารละลายสำหรับ

แช่แข็ง ระยะเวลาที่เกิดสมมูล และความแตกต่างระหว่างฟอสเฟต ต่อคุณภาพอสุจิหลังการอ่อนละลาย. วารสารสัตวแพทย์. 21(2): 70-83.

อนนท์ เทื่องสันเทียะ, จตุพร พงษ์เพ็ง, บัณฑิต กุล่าพูล และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2551.

คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา.

รายงานประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 9. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Aboagla, E.M.E. and T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biol. Reprod.** 69: 1245-1250.

Aisen, E.G., V.H. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology** 57: 1801-1808.

Akhter, S., M. Sajjad, S. M. H. Andrabi, N. Ulla and M. Qayyum. 2007. Effect of Antibiotics in Extender on Fertility of Liquid Buffalo Bull Semen. **Pakistan Vet. J.** 27: 13-16.

Arthur, H., E. Noakes, J. Parkinson and C.W. England. 2001. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. New York.

Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci.** 89: 65-75.

Barbas, J.P. and D. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cell. **Cell Tissue Bank.** 10: 49-62.

Barth, A.D. and R.J. Oko. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. **Iowa State University Press**, Ames. Iowa. p. 29-88.

Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. **Applied Animal Reproduction**. 3rd ed. Prentice-Hall, New Jersey.

Bispo, C.A.S., G. Pugliesi, P. Galvao, M.T. Rodrigues, P.G. Ker, B. Filgueiras and G.R.

Carvalhob. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Rumin. Res.** 100: 54-58.

Brinsko, S.P. T.L. Blanchard, S.L. Rigby, C.C. Love and D.D. Varner. 2003. Effect of dead sperm on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine sperm. **Theriogenology** 59: 735-742.

Brito, L.F., A.D. Barth, S. Bilodeau-Goeseels, P.L. Panich, and J.P. Kastelic. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology** 60:1539-1551.

Bucci, D., J.E. Rodriguez-Gil, C. Vallorani, M. Spinaci, G. Gakeati and C. Tamanini. 2011. GLUTs and Mammalian Sperm Metabolism. **Journal of Andrology** 32(4): 348-355.

Bucak, M.N., A. Atessahin, O. Varışlı, A. Yuce, N. Tekin and A. Akcay. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology** 67: 1060–1067.

Carriere, F., K. Thirstrip, E. Boel, R. Verger and L. Thim. 1994. Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. **Protein Eng.** 7: 563–569.

Carvajal, G., C. Cuello, M. Ruiz, J. M. Vazquez, E. A. Martinez and J. Roca. 2004. Effect of centrifugation on Boar sperm. **Journal of Andrology.** 25: 389-396.

Cavalcante, T.V. 2003. **Plasma concentrations of testosterone and fertility of bucks of the Alpine and Boer breed during breeding and non breeding season.** Dr. Thesis, UNESP, Brazil.

Certified Semen Services. 2002. **CSS minimum requirements for health of bulls producing semen for AI**, Missouri, USA.

Choe, C.Y., J.G. Kim, S.R. Cho, D.S. Son, Y.K. Kim, S. Balasubramanian, S.Y. Choe and G.J. Rho. 2006. Influence of season, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. **Reprod. Dom. Anim.** 41: 55-60.

Chhillar, S., V.K. Singh, R. Kumar and S.K. Atreja. 2012. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. **Theriogenology** 135: 1-7.

Corteel, J.M. 1974. Viability of buck spermatozoa preserved and frozen with or without their seminal plasma: glucose effect. **Biol. Anim.** 14: 741–745.

Delgadillo, J.A., B. Leboeuf and P. Chemineau. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. **Reprod. Nutr. Dev.** 33: 609–617.

Derashri, H.J., A.K. Pathak, K.K. Bansal, A.K. Sharma and S.K. Verma. 1992. Reproduction in buck: 2. Daily sperm output, extra-gonadal sperm reserve, daily sperm production rate and seminiferous tubule length. **Pre-Conference Proceeding**, New Delhi vol. 1 p.

Fernandez, J.G., E. Gómez-Izquierdo, C.T.E. Moceb and E.D. Mercado. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.** 133: 109– 116.

Franca, L.R., S.C. Becker-Silva and H. Chiarini-Garcia. 1999. The length of the circle of seminiferous epithelium in goat (*Capra hircus*). **Tissue Cell.** 31(3): 274-280.

Fukuhara, R. and Y. Nishikawa. 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa.

Jpn. J. Zootech. Sci. 44: 266–270.

Gilmore, J. A., J. Liu, A.T. Peter, and J.K. Critser. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation.

Biol. Reprod. 58: 28-36.

Giraud, M.N., C. Motte, D. Boucher and G. Grizard. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Hum. Reprod.** 15: 2160–2164

Girma, A. 2009. Reproduction in Sheep and Goat. Available Source:

<http://www.esgpip.org/HandBook/Chapter5.html>, November, 6. 2011.

Hafez, E.S.E. 1993. **Reproduction in Farm Animal**. 6th ed. Lea & Febiger. Philadelphia.

Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**

62: 3–22.

Iritani, A., and Y. Nishikawa. 1961. Studies on the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. **In: Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry**, Kyoto University. pp. 97–104.

Jafaroghli, M., B. Khalili, A. Farshad and M.J. Zamiri. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen.

Small Rumin. Res. 96: 58–63.

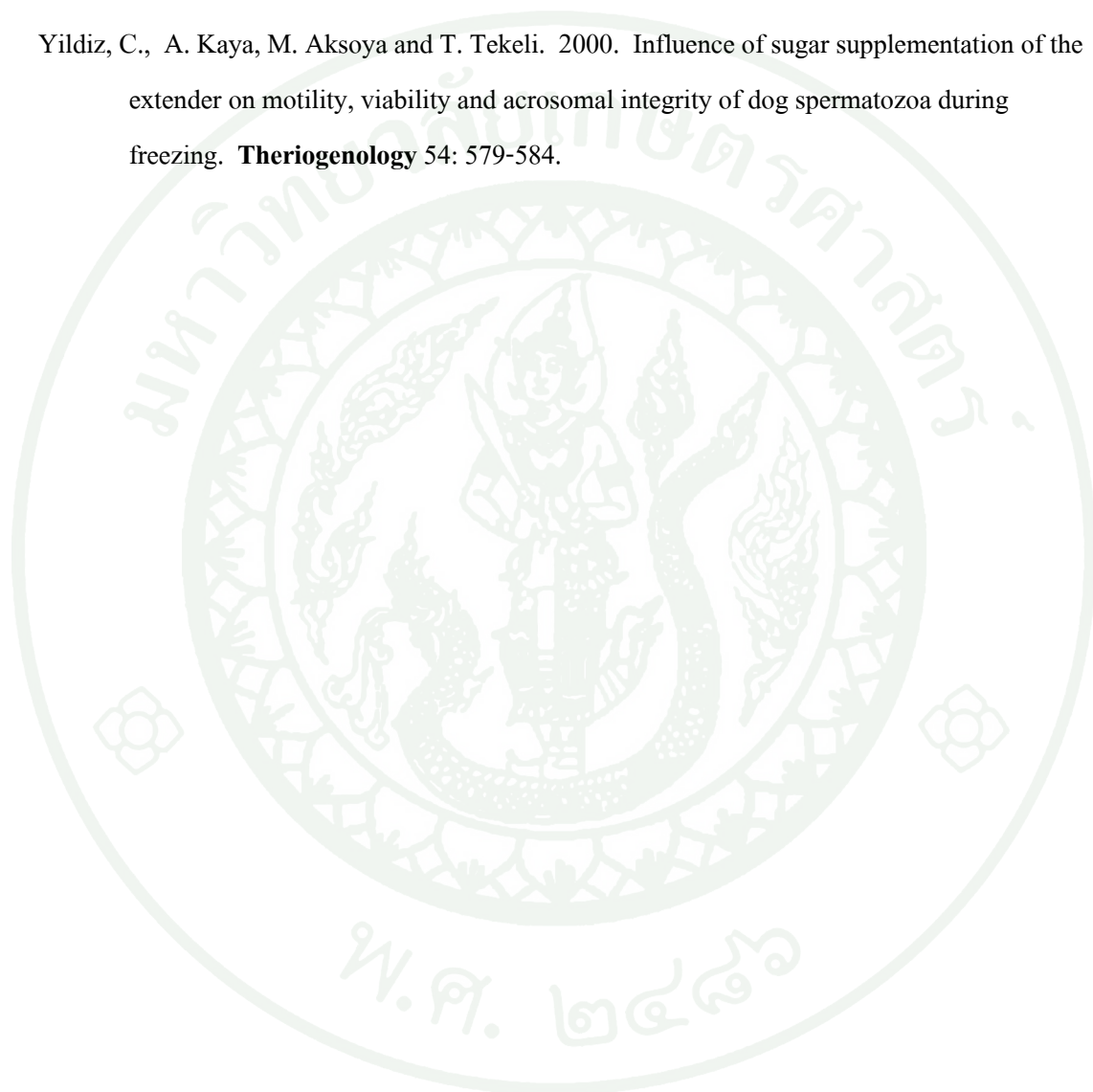
- Khalili, B., A. Farshad, M.J. Zamiri¹, A. Rashidi and P. Fazeli. 2009. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of mazkhoz goat spermatozoa. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 22(12): 1614-1619.
- Kundu, C.N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh and G.C. Majumder. 2002. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction** 123: 907–913.
- Len, J.A., J.A. Jenkins, B.E. Eilts, D.L. Paccamonti, S.K. Lyle and G. Hosgood. 2010. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology** 73: 225–231.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.** 62: 113–141.
- Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, R. Cano, I. de Blas and E. Espinosa. 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiol** 61: 17–21.
- Mendoza, G., I.G. White and P. Chow. 1989. Studies of Chemical Components of Angora Goat Seminal Plasma. **Theriogenology** 32: 455-466.
- Molinia, F.C., G. Evans and W.M. Maxwell. 1994. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reprod. Nutr. Dev.** 34: 491–500.
- Naing, S.W., A.W. Haron, M.A.K. Goriman, R. Yusoff, M.Z.A. Bakar, K. Sarsaifi, M.M. Bakar, M. Thein, T. Kyaw and M.M. San. 2011. Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on Boer goat semen cryopreservation. **J. Trop. Agric. Sci.** 34: 271-279.

- Naing, S.W., H. Wahid, K. Mohd Azam, Y. Rosnina, A.B. Zuki, S. Kazhal, M.M. Bukar, M. Thein, T. Kyaw and M.M. San. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.** 122: 23–28.
- Nunes, J.F., J.M. Corteel, Y. Combarous and G. Baril. 1982. Role of seminal plasma in the in vitro survival of goat sperm. **Reprod. Nutr. Dev.** 22: 611–620.
- Pellicer-Rubio, M.T., T. Magallon and Y. Combarous. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.** 57: 1023–1031.
- Perez, B. and E. Mateos. 1999. Seasonal variations in plasma testosterone levels in Verata and Malagueña bucks. **Small Rumin. Res.** 15: 155–162.
- Perry, E.J. 1968. **The Artificial Insemination of Farm Animal.** Quinn & Borden Company, New York.
- Ponglowhapan, S., B. Esson-Gustavsson and C.L. Forsberg. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology** 62: 1498–1517.
- Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin. Res.** 63: 215–225.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and L.L. Schulman. 1972. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim. Sci.** 35: 580–584.
- Ritar, A.J., G. Mendoza, S. Salamon and I.G. White. 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat *Capra hircus*. **J. Reprod. Fertil.** 95: 97–102.

- Ritar, A.J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.** 35: 305–312.
- Reddy, N.S.S., G. Jagan Mohanarao and S.K. Atreja. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.** 119 : 183–190.
- Roy, A. 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature** 179: 318–319.
- Sariozkan, S., M.N. Bucak, F. Canturk, S. Ozdamar, A. Yay, P.B. Tuncer, S. Ozcan, N. Sorgucu and Y. Caner. 2012. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 °C. **Cryobiology** 65: 93–97.
- Salamon, S. 1976. **Artificial Insemination of Sheep**. Publicity Press, Sydney.
- Sawyer, D.E. and D.B. Brown. 1995. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. **Reprod. Toxicol.** 9: 351–357.
- Senger, P.L. 1999. **Pathway to pregnancy and parturition**. 1th ed. Current Conception, Inc., Washington.
- Shekarriz, M., D.M. Dewire, A.J. Thomas Jr. and A. Agarwal. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **Eur. Urol.** 28 :31-35

- Smith, A.H. and C. Polge. 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature London** 166: 668–671.
- Tonieto, R.A., K.L. Goularte, G.D.A. Gastal, R.S. Schiavon, J.C. Deschamps and T. Lucia Jr. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Rumin. Res.** 93: 206–209.
- Tuli, R.K. and W. Holtz. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology** 42: 547–555.
- Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver and R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. **Anim. Reprod. Sci.** 56: 107–121.
- Violeta, I. and R. Pana. 2007. The influence of different centrifugation regimes on dog spermatozoa. **Bulletin USAMV-CN** 64:1-2.
- Waide, Y., T. Niwa and R. Asanuma. 1977. Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals: III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. **Jpn. J. Anim. Reprod.** 23: 129–137.
- Walkden-Brown, S.W., B.J. Restall and W.A. Taylor. 1994. Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. **Reprod. Fertil. Dev.** 6: 727–736.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.** 7: 871–891.

- Yamashiro, H., K. Narita, S. Sugimura, Y.J. Han, A. Sugawara, K. Morohakua, F. Nakazato, T. Konno, M. Yoshida and E. Sato. 2007. Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). **Anim Reprod. Sci.** 102: 165–171.
- Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoya and T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology** 54: 579-584.





ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 คุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อแซ่แข็งที่ปราศจากไข่แดงและกลีเซอรอลซึ่งใช้น้ำตาลชนิดแตกต่างกัน

สูตรน้ำตาล	ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (โวลต์)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ค่าแรงดันออกสโมติก (มิลลิออสโมล/ น้ำ 1 กิโลกรัม)	ต้นทุนการผลิต (บาท/โด้ส)
กลูโคส	1.7	7.1	271	0.24
ฟรุคโตส	0.1	7.1	267	0.24
ทรีฮาโลส	0.1	7.0	376	0.75
ซูโครส	4.6	7.0	350	0.23

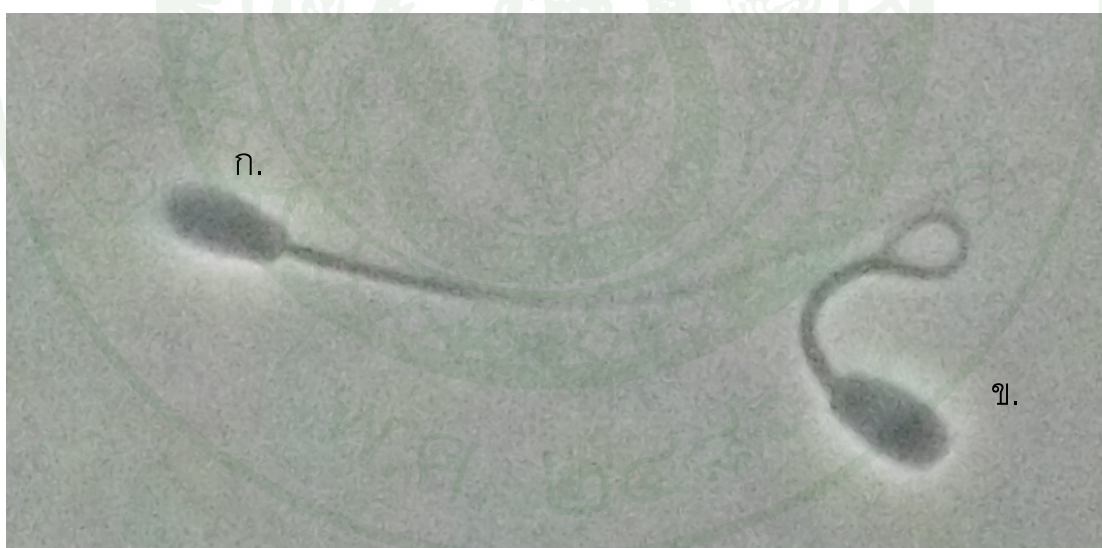
การทดสอบค่าออสโมติกที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายที่มีความดันต่ำ

(Hypo-osmotic swelling test solution: HOS-test) ตามวิธีของ Naing *et al.* (2010)

การทดสอบค่าออสโมติกที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นวิธีที่ใช้ตรวจจำนวนตัวอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถตรวจได้ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง อาศัยหลักการของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) โดยน้ำในสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกต่ำ (ในอสุจิโคให้แรงดัน 100 มิลลิออสโมล/น้ำ 1 กิโลกรัม) จะสามารถแทรกซึมเข้าไปในตัวอสุจิที่มีชีวิตทำให้หางตัวอสุจิบวมและม้วนงอ ส่วนอสุจิตัวตายจะไม่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว

การเตรียมสารละลาย

- Fructose	9	กรัม
- Trisodium citrate	4.9	กรัม
- Deionized water	1000	มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะอสุจิหลังการตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์

ก. อสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย

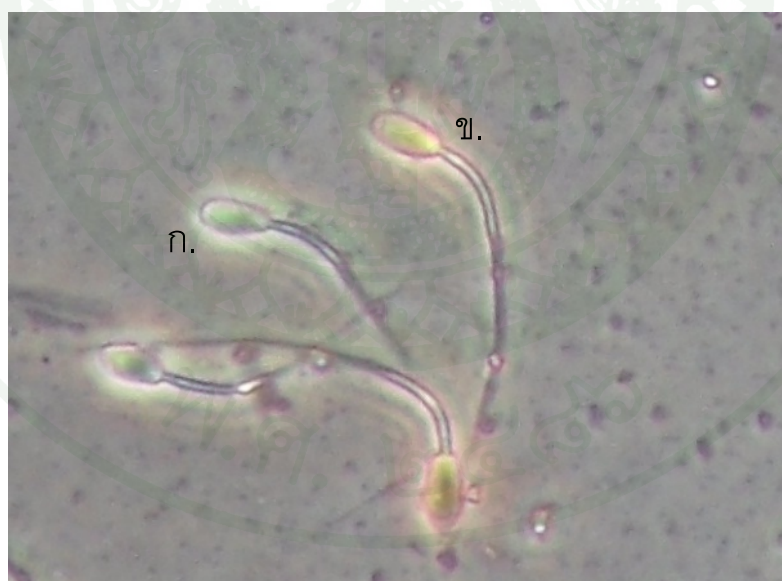
ข. อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์

การทดสอบค่าอสุจิมีชีวิตด้วยสีอีโอซิน-นิโกรซิน (eosin-nigrosin) ตามวิธีของ ศรีสุวรรณ (2542)

สีอีโอซิน (eosin) เป็นสีที่ไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าไปในตัวของอสุจิที่มีชีวิตได้ แต่จะสามารถผ่านเข้าไปในตัวของอสุจิที่ตายแล้ว ดังนั้น สีย้อมเพื่อดูตัวเป็นตัวตายทุกสูตรจึงต้องมีสีอีโอซินเป็นส่วนผสม ส่วนสีอื่นๆ เช่น นิโกรซิน (nigrosin) หรืออะนาไลน์ (aniline) จะใช้เป็นสีพื้น เพื่อให้หัวของตัวอสุจิมองเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ การย้อมสีตัวอสุจิด้วยอีโอซิน-นิโกรซินยังสามารถใช้สำหรับการตรวจความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิได้เช่นกัน

การเตรียมสีอีโอซิน-นิโกรซิน

- สีอีโอซิน	1	กรัม
- สีนิโกรซิน	5	กรัม
- โซเดียมซิเตรท	2.9	กรัม
- น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะอสุจิหลังการย้อมสีอีโอซิน-นิโกรซิน

ก. อสุจิตัวเป็น (live sperm)

ข. อสุจิตัวตาย (dead sperm)

การตรวจอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ

ในการประเมินลักษณะความผิดปกติของอสุจิ สามารถแบ่งความผิดปกติได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติส่วนลำตัวและหาง และการเกิดหยดน้ำเกาะติดที่ตัวอสุจิ ตามวิธีของ Barth and Oko (1989)

ความผิดปกติส่วนหัวของอสุจิ

- narrow head	อสุจิที่มีหัวแคบกว่าปกติ
- narrow at base	อสุจิที่มีหัวฐานแคบกว่าปกติ
- pear shape	อสุจิที่มีหัวรูปร่างคล้ายลูกแพร์
- abaxial	อสุจิที่มีหางไม่อยู่ตรงกลางหัว
- tailless head	อสุจิที่ไม่มีหาง มีแต่หัว
- giant	อสุจิที่มีหัวขนาดใหญ่กว่าปกติ
- round	อสุจิที่มีหัวรูปร่างกลม
- small	อสุจิที่มีหัวขนาดเล็กกว่าปกติ
- broad	อสุจิที่มีหัวกว้างมากกว่าปกติ
- double heads	อสุจิที่มีสองหัว

ความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ

- bent tail	อสุจิที่หางงอ
- pathogenic midpiece	อสุจิที่ส่วนมิดพีซีมีความผิดปกติ
- tail coiled around head	อสุจิที่หางพันรอบส่วนหัว
- tail coiled below head	อสุจิที่หางงอใต้ส่วนหัว
- double tails	อสุจิที่มีสองหาง

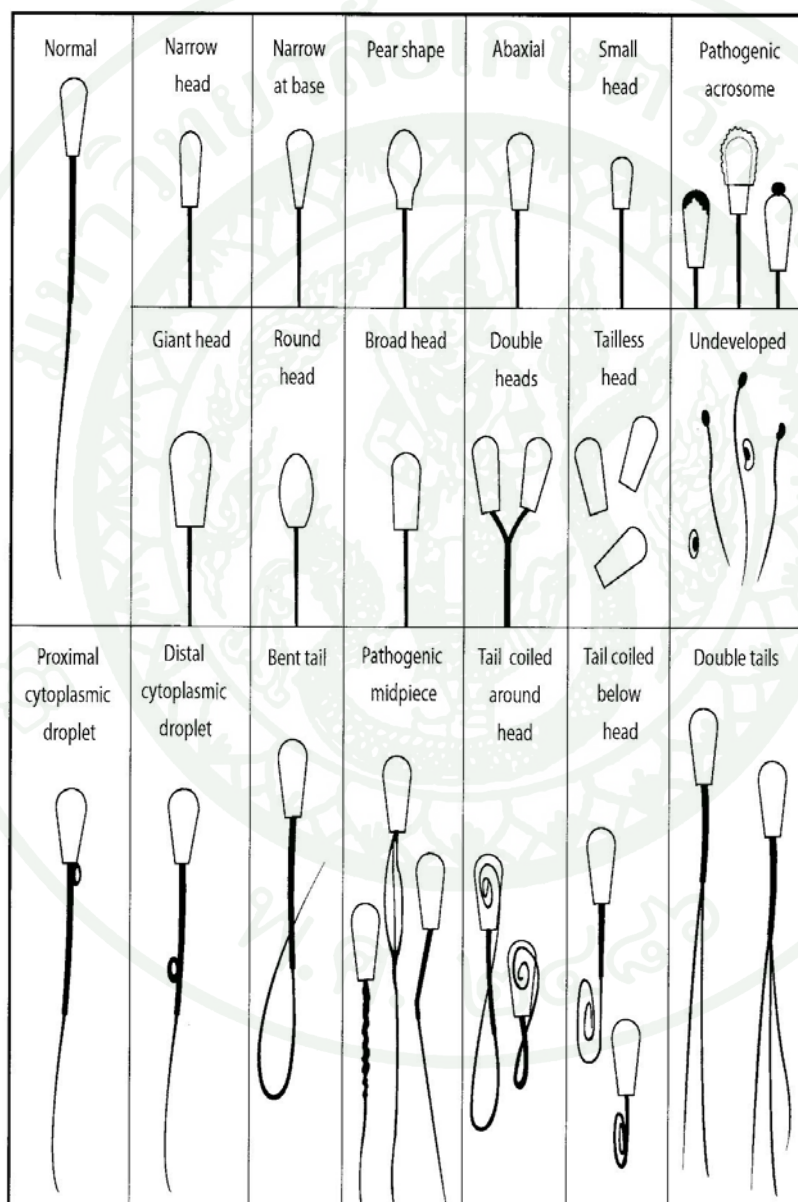
การเกิดหยดน้ำที่ตัวอสุจิ

- proximal cytoplasmic droplet

อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะติดที่หางใต้ฐานของหัว

- distal cytoplasmic droplet

อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะติดที่หางตรงส่วนปลายของมิดพีช



ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะความผิดปกติส่วนหัว และความผิดปกติส่วนลำตัวและหางของอสุจิ
ที่มา: Barth and Oko (1989)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายภูเบศวร์ เศรษฐสุข
เกิดวันที่	9 กันยายน 2531
สถานที่เกิด	อำเภอองครักษ์ จังหวัดพิจิตร
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนพิจิตร จังหวัดพิจิตร วท.บ. (สัตวศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน