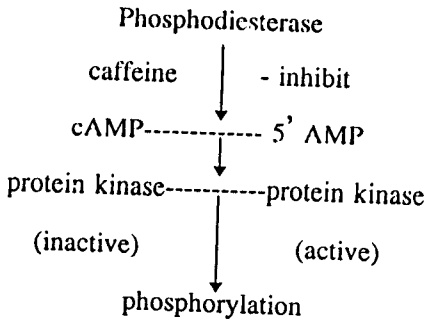
บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ผลของการใช้สารกระตุ้นการเคลื่อนที่ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโค

4.1.1 การเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนการแช่แข็ง

อิทธิพลของ caffeine : จากผลการทดลองพบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นเมื่อเติม caffeine แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ไม่เติมสาร (control) และการเติม caffeine ทำให้อสุจิเคลื่อนที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ ทั้งนี้สอดคล้องกับสุรชัย (2538) ซึ่งรายงานว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นเป็นแนวเส้นตรงตามการเพิ่มขึ้นของระดับความเข้มข้นของ caffeine 0.012 ถึง 2 mM สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่และเมตาบอลิซึมของอสุจิได้ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างในระดับการกระตุ้นการเคลื่อนที่อสุจิอาจขึ้นอยู่กับระดับของ caffeine ที่ใช้ ทั้งนี้เนื่องจาก caffeine จะไปมีผลยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase และไปมีผลต่อการเพิ่มของ cAMP นอกจากนั้นยังไปมีผลทำให้ขบวนการ phosphorylation ในเมตาบอลิซึมของน้ำตาลเกิดขึ้นได้มากและได้ ATP มากขึ้น ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังในภาพที่ 9

ภาพที่ 9 แสดงการทำงานของ caffeine และบทบาทของ CAMP ต่อเอนไซม์ protein kinase และ phosphorylation



ที่มา : Stryer (1988)

อิทธิพลของ glutathione : จากการทดลองพบว่าการเติม glutathione ไม่ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนการแช่แข็งแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เติมสาร ($P<0.05$) ซึ่งอาจเนื่องจากการเก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 5°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ glutathione ลดลง ทั้งนี้ Mann et al. (1980) อธิบายว่า glutathione เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ glutathione preoxidase ซึ่งพบในส่วนหัวของอสุจิ การเกิดกระบวนการ peroxidation ที่ช้าลงจะทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น

(Christopherson, 1968) นอกจากนี้ Slaweta and Leslowsky (1987) อธิบายไว้ว่า glutathione มีบทบาทในกระบวนการ fructolysis ของอสุจิ โดย glutathione จะเป็นcoenzyme ของ 1,3 diphosphoglyceric aldehyde ที่ทำให้เกิด oxidation ของ triose phosphate ให้เปลี่ยนเป็น phosphoglyceric acid ซึ่งจะทำให้ pyruvic acid ลดลงอย่างช้าและทำให้เกิด acetic acid ลดลง ซึ่งบางทีอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้การเกิดเมตาบอลิซึมและการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น

อิทธิพลของ β-glucuronidase จากผลการทดลองพลว่าการเติม β-glucuronidase ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับการไม่เติมสาร (Control) ซึ่งสอดคล้องกับ Hafs etal. (1971) ที่รายงานว่าการเติม β- glucuronidase ระดับ 30 และ 300 unit ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ยังไม่ทราบปฏิกิริยาที่แน่นอนแต่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของสารตั้งต้นอสุจิ (Foote. 1976) โดย β- glucuronidase มีความสำคัญใน pentose phosphate pathways ซึ่งมีความสำคัญในเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้พลังงานของอสุจิ สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ glucose - 6 - phosphate ไปเป็น glyceral dehyde - 6 - phosphate ขบวนการเมตาบอลิซึมดังกล่าวจะมี oxidation เกิดขึ้นและปฏิกิริยานี้จะเกิดเฉพาะอวัยวะพิเศษ เช่น ตับ , เซลล์สืบพันธุ์, ต่อมน้ำนม, adipose tissue โดยจะเกิดขึ้นภายในเซลล์นอก mitochondria ซึ่งจะทำให้เกิดพลังงานสำหรับการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เพิ่มขึ้น

4.1.2 การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลาย 0 ชั่วโมง

อิทธิพลของ caffein : จากการทดลองพบว่าการเติม caffeine 2 mM ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ สุรชัย (2538) ที่รายงานว่าการเติม caffeine 0.4 ถึง 1 mM ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายที่ 0 ชั่วโมง สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมสารอย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ ($P<0.05$) และรายงานของ Fattouh and Abdou (1991) ที่พบว่าหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือที่เติม caffein 2 mM ที่ 0 ชั่วโมงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 57% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอยู่ 14% นอกจากนี้ Fattouh and Abdou (1991) รายงานว่าที่ระดับ caffeine 4 และ 6 mM กระตุ้นการเคลื่อนที่หลังการละลาย 0 ชั่วโมง ได้น้อยกว่าระดับ 2 mM แสดงว่าระดับที่เหมาะสมของ caffine กับการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิมีอยู่ระดับหนึ่งเท่านั้น

อิทธิพลของ glutathione : จากการทดลองพบว่าการเติม glutathione 5 mM. ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่เติมสาร อย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Sinha et al. (1995) ที่รายงานว่าการเติม glutathione 5 mM ในน้ำเชื้อแช่แข็งแกะ ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายน้ำเชื้อเพิ่มมากขึ้น และลดความผิดปกติอะโครโซมด้วย และมีรายงาน

อื่น ๆ ที่สอดคล้องกับรายงานนี้ได้แก่ Slawera and Laskowsky (1973), Shannon et al.(1983), Gupta and Tripathi (1984) และ Slaweta and Laskowsky 1987) ซึ่งพบว่า glutatione ทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ของอสุจิเพิ่มสูงขึ้น

อิทธิพลของ β- glucuronidase : จากการทดลองเติม β- glucuronidase 150 unit ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่เติมสาร อย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งยังไม่มีรายงานอื่น ๆ สนับสนุน แต่อย่างไรก็ตาม Hafs et al. (1971 รายงานว่าการใช้ β- glucuronidase ที่ระดับ 30 และ 300 unit ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นภายหลังเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 7 วัน ลดลงน้อยกว่าการไม่เติมสาร

4.1.3 การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายที่ 5 ชั่วโมง

อิทธิพลของ caffeine : จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม caffeine ทำให้การเคลื่อนของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มไม่เติมสาร (P<0.05) หลังการละลายที่ 5 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับสุรชัย (2538) ที่รายงานว่าการเติม caffeine 0.4 ถึง 1.0 mM. ไม่ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมง และ El- Gaafary et al. (1990) ซึ่งรายงานว่าการเติม 6.7% แต่ขัดแย้งกับ Fattouh and Abdou (1991) ที่รายงานว่าการเติม caffeine ระดับ 2 และ 4 mM. ในน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดของกระบือหลังละลายรายงานนี้ชี้ชัดเป็นไปได้ว่าอสุจิที่เคลื่อนที่มากในช่วงแรกต้องใช้พลังงานมาก ทำให้พลังงานในเซลล์อสุจิถูกใช้จนหมดไป (Bearden and Fuquay, 1984)

อิทธิพลของ glutathione : จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม glutathione ทำให้การเคลื่อนที่หลังการละลาย 5 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมสาร (P< 0.05) ซึ่งในรายงานอื่น ๆ มีการวัดการเคลื่อนไหวของอสุจิหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมงเท่านั้น (Slaweta and Laskowsky (1973), shannon etal.(1983), gupta and tripathi (1984), Gupta and Tripathi (1987), และ Sinha et al. (1996) การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เพิ่มขึ้นในการทดลองนี้ อาจเนื่องมาจากการลดลงของการหลั่งเอนไซม์ Aspartate aminotransferase.(AST), Alanine aminotransferase (ALT) และ Lactate dehydrogenase (LHD) จากเซลล์อสุจิ (Sinha, 1995) ซึ่ง Laskowlka (1987) รายงานว่าการลดการหลั่งเอนไซม์เหล่านี้จะช่วยให้อสุจิมีความคงทนและช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วย

อิทธิพล β- glucuronidase : จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม β- glucuronidase ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลาย 5 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่เติมสาร (P<0.05) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการสะสมกรดแลคติกจากขบวนการเมตาบอลิซึม ที่เพิ่มขึ้นมากในช่วงหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะ

สมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ และการใช้พลังงานสำหรับการเคลื่อนที่มากเกินไปทำให้พลังงานถูกใช้หมดไป (Bearden and Fuqauy, 1984) เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในการเติม caffeine

4.2 การทดลองที่ 2 ผลการใช้สารกระตุ้นการเคลื่อนที่ต่ออัตราการผสมติด

อิทธิพลของ caffeine : จากผลการทดลองจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังทำ capacitation พบว่า caffeine ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่เติมสาร ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับสุรชัย (2538) ซึ่งรายงานว่าคาเฟอีนระดับ 1.0 mM ไม่ทำให้อัตราการผสมติด (37.5%) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (25%) แต่ขัดแย้งกับ Niwa and Ohgada (1988) ซึ่งรายงานว่า caffeine (5 mM) ผสมกับ heparin (10 $\mu g\ ml^{-1}$) เหนี่ยวนำให้เกิด capacitation และทำให้เกิด aerosome reaction ภายหลังละลายน้ำเชื้อโค อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการใช้ cafeine เพียงอย่างเดียว

อิทธิพลของ glutahione : จากการทดลองจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังทำ capacitation พบว่า glutathione ทำให้อสุจิมีชีวิตเพิ่มสูงขึ้นมากว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Sinha et al., (1996) ที่รายงานว่าการเติม glutathione 5 mM ทำให้เปอร์เซ็นต์การตั้งท้องของแม่โคที่ผสมสูงขึ้น และ Slaweta (193)., Slaweta and Laskowska (1984) ซึ่งพบว่าอัตราการตั้งท้องของแม่โคสูงสำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เติม glutathione นอกจากนี้ Sinha et al., (1976) ยังรายงานอีกว่าความผิดปกติของอะโครโซมลดลงเมื่อเติม glutathione ในน้ำเชื้อแช่แข็งแกะ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้จำนวนอสุจิมีชีวิตสูงขึ้นหลังจากทำ capacitation

อิทธิพลของ β- glucuronidase : จากการทดลองพบว่าจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังทำ capacitation เมื่อเติม β- glucuronidase สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Hafs et al., (1971) ที่รายงานว่าการผสมติดของน้ำเชื้อที่ไม่เติมเอนไซม์จะมีอัตราการผสมติด (67.2%) ต่ำกว่าน้ำเชื้อที่เติม β- glucuronidase 30 unit ($P< 0.05$) แต่ขัดแย้งกับ Foote (1976) ซึ่งรายงานว่าการเติมเอนไซม์ β- amylase ผสมกับ β- glucuronidase ไม่ทำให้มีการเพิ่มอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งโคใน whole milk อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการใช้ β- glucuronidase เพียงอย่างเดียวในงานทดลองนี้