



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการ
แช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

The Comparison of the Effects of Extenders and Cryoprotectants on Frozen Semen
Quality of Three-yellow Cocks (*Gallus domesticus*)

นามผู้วิจัย นายวีระศักดิ์ ฟุ่งเฟื่อง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อนุชัย ภิญโญภูมิมนตรี, D.Vet.Med.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วรัญญู สิริพลวัฒน์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ
คุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

The Comparison of the Effects of Extenders and Cryoprotectants on Frozen Semen Quality of
Three-yellow Cocks (*Gallus domesticus*)

โดย

นายวีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2552

วีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง 2552: การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์อนุชัย ภิญญภูมิมนตรี, D.Vet.Med.Sc. 78 หน้า

เก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองจำนวน 10 ตัวด้วยวิธีการนวดบริเวณท้องเพื่อศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (การทดลองที่ 1) และวิธีการการแช่แข็ง (การทดลองที่ 2) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งของไก่สามเหลือง สารเจือจางน้ำเชื้อในการศึกษาคือ Beltsville poultry semen extender (BPSE) และ modified Tyrode's medium (TALP) สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ใช้ได้แก่ 8% dimethyl sulfoxide (DMSO) และ 6% dimethyl acetamide (DMA) ในการทดลองที่ 1 ทำการเจือจางและแบ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็น 4 กลุ่มคือ BPSE + 8% DMSO, BPSE + 6% DMA, TALP + 8% DMSO และ TALP + 6% DMA พบว่า TALP + 8% DMSO ให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งโดยมีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเท่ากับ 57.32 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์อสุจิรูปร่างปกติเท่ากับ 56.67 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเท่ากับ 48.50 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเท่ากับ 10.50 ± 3.40 และมีการเคลื่อนที่ของอสุจิในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ได้นาน 5 ชั่วโมง ในการทดลองที่ 2 ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย TALP และแบ่งการแช่แข็งเป็น 4 กลุ่มคือ one-step + 8% DMSO, one-step + 6% DMA, two-step + 8% DMSO และ two-step + 6% DMA พบว่ากลุ่มของ 8% DMSO ที่มีการแช่แข็งด้วยขั้นตอน one-step ให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งเหมือนกับการแช่แข็งด้วยขั้นตอน two-step แต่กลุ่มของ 6% DMA ที่แช่แข็งด้วยขั้นตอน one-step ให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่ดีกว่าการแช่แข็งด้วยขั้นตอน two-step อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาคุนคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งในห้องปฏิบัติการครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ TALP ร่วมกับ 8% DMSO เป็นทางเลือกสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่สามเหลืองโดยสามารถใช้วิธีการการแช่แข็งแบบ one-step

Wirasak Fungfuang 2009: The Comparison of the Effects of Extenders and Cryoprotectants on Frozen Semen Quality of Three-yellow Cocks (*Gallus domesticus*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Anuchai Pinyopummin, D.Vet.Med.Sc. 78 pages

Semen was collected from 10 three-yellow cocks (*Gallus domesticus*) by a massage technique. Pooled semen was treated to determine the effect of extender and cryoprotectant (experiment 1) and the effect of freezing protocol and cryoprotectant (experiment 2) on frozen/thawed semen quality. The examined extenders were Beltsville poultry semen extender (BPSE) and modified Tyrode's medium (TALP). The cryoprotectants were 8% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 6% dimethyl acetamide (DMA). In experiment 1, semen was diluted and frozen in 4 treatments: BPSE + 8% DMSO, BPSE + 6% DMA, TALP + 8% DMSO and TALP + 6% DMA. The superior result ($p<0.05$) as followed was obtained by using TALP + 8% DMSO: percentages (mean $\pm$ SD) of live (57.32 ± 0.40), morphological normal (56.67 ± 1.10), motile (48.50 ± 3.40), progressive motile (10.50 ± 3.40) sperm, and sustenance of sperm motility at 37 °C in an incubator (5% CO₂ in air) for 5 h. In experiment 2, TALP was used as a basis extender. Semen was diluted and frozen in 4 treatments: one-step + 8% DMSO, one-step + 6% DMA, two-step + 8% DMSO and two-step + 6% DMA. The one-step method gave similar results to the two-step method in the case of using 8% DMSO, but not that of 6% DMA, in which the one-step method was superior ($p<0.05$).

This study indicated that from in vitro analysis, TALP with 8% DMSO was the preferred freezing solution for three-yellow cock sperm and this could be carried out by a one-step freezing protocol.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณา ให้คำแนะนำ คำปรึกษาอบรมสั่งสอนให้ความรู้ในทุกๆ ด้านรวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการ เขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมิทร ยิ้มมงคล ผู้แทนบัณฑิต วิทยาลัยที่ได้กรุณาชี้แนะและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาทกกลกิจเพื่อการค้นคว้าและ พัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนสถานที่ สำหรับการทำงานวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในการดำเนินการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดย งบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรภายใต้โครงการ บัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดม ศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจสำคัญตลอดมา เพื่อนๆ ทุกคน ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอบพระ โยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับ นี้แก่ผู้มีอุปการคุณทุกท่านและคณาจารย์ที่สั่งสอนข้าพเจ้ามาตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน ขอให้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้จงเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสืบต่อไป

วีระศักดิ์ ฟู่งเฟื่อง

กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์ผลการทดลอง	64
สรุปและข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	78

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าการทำงานของเครื่อง HTM-IVOS motility สำหรับวิเคราะห์การเคลื่อนที่	20
2	ส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ของสารเจือจางน้ำเชื้อ	21
3	ค่าเฉลี่ยคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดที่นำมารวมกันหลังรีดเก็บจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลือง	26
4	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ	30
5	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	35
6	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	36
7	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Average path velocity (VAP)	37
8	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Progressive velocity (VSL)	38
9	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Curvilinear velocity (VCL)	39
10	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Amplitude of lateral head displacement (ALH)	40
11	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Beat cross frequency (BCF)	41
12	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Straightness of track (STR)	42
13	ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Linearity of track (LIN)	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของอสุจิในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์	45
15	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ	49
16	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	53
17	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	54
18	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Average path velocity (VAP)	55
19	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Progressive velocity (VSL)	56
20	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Curvilinear velocity (VCL)	57
21	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Amplitude of lateral head displacement (ALH)	58
22	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Beat cross frequency (BCF)	59
23	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Straightness of track (STR)	60
24	ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Linearity of track (LIN)	61
25	ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของอสุจิในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์	63

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงไข่สามเหลือง	4
2 แสดงอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ปีก	6
3 แสดงส่วนของ testis และ epididymis ในสัตว์ปีก	6
4 แสดงส่วนของ cloaca และ ductus deferens ในสัตว์ปีก	7
5 แสดงรูปร่างของอสุจิหนู, วัว และ ไก่	10
6 แสดงโครงสร้างของอสุจิไก่	12
7 แสดงลักษณะรูปร่างของอสุจิ	31
8 แสดงลักษณะความผิดปกติของอสุจิแบบ bent tail	31
9 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	36
10 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	37
11 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Average path velocity (VAP)	38
12 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Progressive velocity (VSL)	39
13 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Curvilinear velocity (VCL)	40
14 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Amplitude of lateral head displacement (ALH)	41
15 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Beat cross frequency (BCF)	42
16 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Straightness of track (STR)	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Linearity of track (LIN)	44
18	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การ เคลื่อนที่ของอสุจิ	53
19	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การ เคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	54
20	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Average path velocity (VAP)	55
21	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Progressive velocity (VSL)	56
22	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Curvilinear velocity (VCL)	57
23	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Amplitude of lateral head displacement (ALH)	58
24	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Beat cross frequency (BCF)	59
25	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Straightness of track (STR)	60
26	แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อ Linearity of track (LIN)	61

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการ แช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

The Comparison of the Effects of Extenders and Cryoprotectants on Frozen Semen Quality of Three-yellow Cocks (*Gallus domesticus*)

คำนำ

ไก่เป็นสัตว์เศรษฐกิจของไทยที่ทำให้ภาคอุตสาหกรรมส่งออกเนื้อสัตว์สร้างรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายล้านบาท โดยพบว่าประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกไก่เนื้อที่สำคัญของโลก เนื่องด้วยไก่ที่เลี้ยงเพื่อการส่งออกล้วนแต่เป็นไก่ที่นำสายพันธุ์มาจากต่างประเทศทำให้มีการสูญเสียเงินไปในแต่ละปีเป็นจำนวนมากเช่นเดียวกัน การพัฒนาสายพันธุ์ไก่ให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ สภาพอากาศ เนื้อมีคุณภาพเป็นความต้องการของตลาด เป็นเรื่องที่หลายๆ หน่วยงานทำการศึกษาเพื่อให้ได้พันธุ์ดีและทนทานต่อโรค ไก่สามเหลืองซึ่งเป็นไก่พันธุ์พื้นเมืองของประเทศจีนและได้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยซึ่งเป็นไก่พันธุ์ที่มีความแข็งแรง ทนทานต่อโรค เลี้ยงง่าย หากินเก่ง มีความสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพดิน ฟ้า อากาศแบบร้อนชื้นได้เป็นอย่างดี เนื้อมีรสชาติหวาน กลิ่นหอมชวนกินและเนื้อนุ่มพอเหมาะจึงได้ถูกนำมาศึกษาในการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ไก่เพื่อให้ได้ไก่ที่มีความทนทานต่อโรค สภาพอากาศ เนื้อรสชาติหวานกลิ่นหอมชวนกิน และเป็นที่ต้องการของท้องตลาด ดังเช่น ไก่ลูกผสมไก่สีทองกำแพงแสน ที่มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์มาจากไก่เบตงและไก่สามเหลือง

เนื่องด้วยในปัจจุบันสัตว์ปีกหลายชนิดมีความเสี่ยงต่อการสูญเสียทางพันธุกรรม เนื่องจากภัยคุกคามของมนุษย์ ภัยธรรมชาติ และโรคระบาด โดยเฉพาะโรคไข้หวัดนกที่มีการระบาดในหลายพื้นที่ของประเทศไทยทำให้ต้องมีการทำลายสัตว์ปีกเป็นจำนวนมากจึงมีโอกาที่จะทำให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ การใช้เทคโนโลยีทางระบบสืบพันธุ์ เช่น การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง การผสมเทียม มีความสำคัญในการที่จะเก็บรักษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อนำไปใช้ในอนาคตเพื่อที่จะดำรงความหลากหลายทางชีวภาพให้คงอยู่และที่สำคัญคือเป็นการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ที่มีคุณลักษณะดีเด่น หายาก มีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่รูปแบบของการแช่แข็งได้เป็นผลสำเร็จแต่ในปัจจุบันนี้การใช้น้ำเชื้อ

แช่แข็งไก่อเพื่อการผลิตเชิงอุตสาหกรรมนั้นยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากมีต้นทุนในการจัดการที่สูง ปัญหาการสูญเสียความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งเพราะลักษณะทางโครงสร้างของอสุจิไก่อที่มีโอกาสเกิดความเสียหายได้ง่ายกว่าปกติ หรือปัญหาเกี่ยวกับการใช้สารเคมีป้องกันการแข็งตัวของอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง ดังนั้นการหาวิธีที่จะช่วยรักษาน้ำเชื้อไว้ให้มีคุณภาพที่ดีจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่อพื้นเมือง

เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ของไก่อสามเหลียงและเก็บรักษาพันธุกรรมเพื่อช่วยคงความหลากหลายทางชีวภาพ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อของไก่อสามเหลียง โดยศึกษาถึงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับไก่อสามเหลียงและเพื่อเป็นการพัฒนาวิธีการสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับสัตว์ปีกที่ใกล้เคียงพันธุ์ชนิดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่สามเหลือง
2. เพื่อศึกษาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่สามเหลือง
3. เพื่อพัฒนาวิธีผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับไก่

การตรวจเอกสาร

ไก่สามเหลือง (Three-yellow chicken) มีถิ่นกำเนิดในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ลักษณะเด่นประจำพันธุ์คือมีขนสีเหลือง แข็งเหลืองและหนังมีสีเหลือง (รูปที่ 1) เนื้อมีรสชาติหวาน กลิ่นหอมชวนกินและเนื้อนุ่มพอเหมาะ เนื่องด้วยไก่สามเหลืองเป็นไก่พื้นเมืองซึ่งการเจริญเติบโตช้าและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ต่ำ จึงได้มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ไก่ลูกผสมที่มีการเจริญเติบโตเร็ว หรือให้ไข่ในปริมาณที่สูง โดยที่ยังคงลักษณะประจำพันธุ์ไว้คือ สีขน สีของหนังและสีของแข้ง รวมไปถึงรูปร่างและขนาด (Yang and Jiang, 2005) สมรรถภาพการให้ผลผลิต น้ำหนักที่อายุ 4 สัปดาห์ 254.34 ± 22.39 กรัม น้ำหนักที่อายุ 8 สัปดาห์ 758.34 ± 67.41 กรัม น้ำหนักที่อายุ 12 สัปดาห์ $1,418.00 \pm 213.55$ กรัม อายุเมื่อให้ไข่ฟองแรก 150 ± 5 วัน น้ำหนักตัวเมื่อให้ไข่ฟองแรก $2,070.33 \pm 184.62$ กรัม น้ำหนักไข่ฟองแรก 41.67 ± 8.34 กรัม ไข่ปีละ 150 ± 4 ฟอง (นิรนาม, 2550) สุชาติ (2547) ได้ทำการศึกษาการใช้แม่พันธุ์ไก่สามเหลืองผสมกับพ่อพันธุ์ไก่เบตงในการผลิตไก่ลูกผสม ไก่สีทองกำแพงแสน พบว่าไก่ลูกผสมดังกล่าวมีความแข็งแรง เลี้ยงง่าย ทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี เนื้อมีรสชาติหวาน กลิ่นหอมชวนกิน เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเลี้ยงไก่สีทองกำแพงแสนเพิ่มมากขึ้น



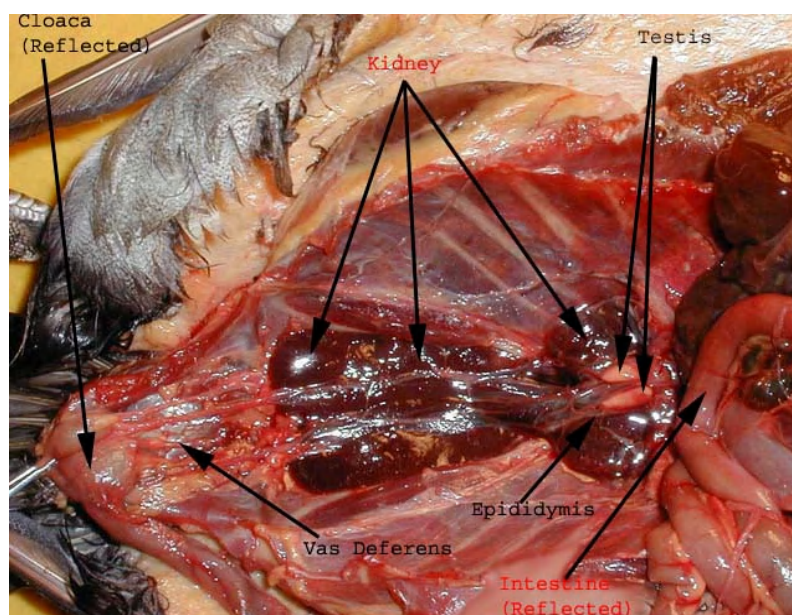
ภาพที่ 1 ไก่สามเหลือง

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์ปีก

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์ปีกประกอบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์ที่ไม่มีความซับซ้อนเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย อัณฑะ (testis), tubuli recti and rete testis, epididymis, ducti deferentes และ อวัยวะสำหรับการปล่อยน้ำเชื้อขนาดเล็ก (erectile tissue and phallus) ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับสัตว์ปีกอัณฑะมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว สีเหลืองอ่อน วางขนานกันอยู่ในตำแหน่งซีโครัสสุดท้ายของลำตัวและอยู่ด้านหน้าไตทั้ง 2 ข้าง อัณฑะของสัตว์ปีกแตกต่างจากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ก็อยู่ในช่องลำตัวและไม่มี accessory organ ภายนอกของอัณฑะถูกคลุมด้วย tunica albuginea ซึ่งจะไม่เชื่อมต่อและแบ่งภายในของอัณฑะเป็นส่วนย่อย ภายในอัณฑะประกอบด้วยท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubule) และ interstitial cell (leydig cell) ส่วนของ tubuli recti ซึ่งเป็นส่วนของปลาย seminiferous tubule มีขนาดสั้นๆ เป็นส่วนเชื่อมต่อมายัง rete testis และเชื่อมต่อไปยังส่วน ducti efferentes ของ epididymis ซึ่งจะมีส่วนเชื่อมต่อกับ epididymal duct และขยายขนาดเป็น ductus deferens โดยจะมีลักษณะเป็นท่อที่ขดตลอดความยาวของท่อและจะขยายใหญ่ขึ้นจนงอมากขึ้นทำหน้าที่เป็นที่เก็บอสุจิในสัตว์ปีกก่อนที่จะเปิดออกที่ urodeum ของ cloaca โดยเป็นตุ่มหรือติ่ง (papillae) (รูปที่ 3 และ 4) ในขณะผสมพันธุ์พ่อพันธุ์จะสอดใส่ papillae เข้าไปในช่องคลอด (vagina) ของแม่พันธุ์และหลั่งน้ำเชื้อโดยผ่านจากปลายของปมยึดตัวตามร่องเกลียวจากโคนถึงปลาย papillae ในไก่เล็กและไก่วง papillae จะเป็นเพียงติ่งเนื้อเล็กๆ ซึ่งติดอยู่กับผนังตอนบนของทวารหนัก ปริมาณของน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาในการผสมพันธุ์แต่ละครั้งอย่างมากประมาณ 1 มิลลิลิตรขึ้นอยู่กับพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อไก่ (สุจินต์, 2532; McIntosh and Porter, 1967; Crawford, 1990)

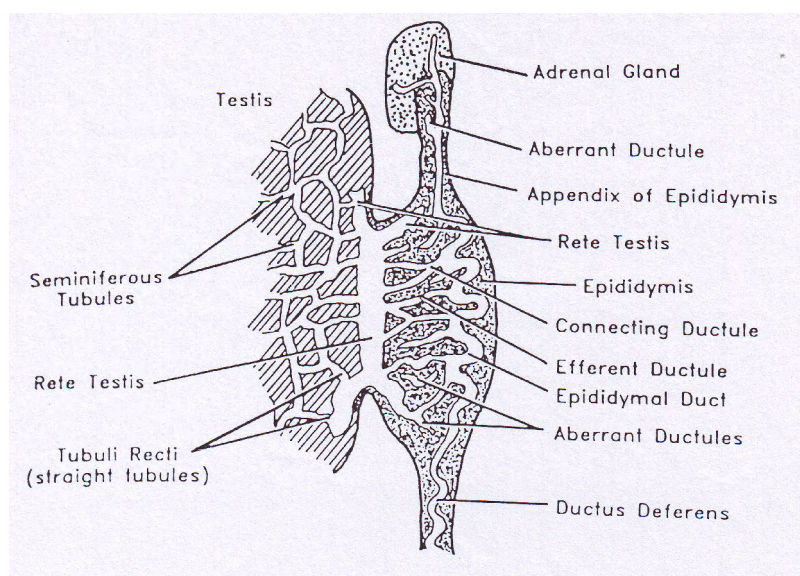
การสร้างอสุจิ (Spermatogenesis)

การพัฒนาของอัณฑะและการสร้างตัวอสุจิของสัตว์ปีกพบว่าอัณฑะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดและส่วนมากคล้ายกันในสัตว์ปีกทุกชนิด การพัฒนาของอัณฑะและการสร้างตัวอสุจิของสัตว์ปีกภายหลังจากที่ฟักออกจากไข่แล้วสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ 1) Prepubertal phase ช่วงอายุประมาณ 10-14 สัปดาห์ 2) Pubertal phase ช่วงอายุ 20-24 สัปดาห์ และ 3) Sexual maturity ไก่ที่มีอายุประมาณ 5 สัปดาห์ท่อสร้างเชื้ออสุจิปรากฏเห็นได้และเมื่ออายุ 20 สัปดาห์มีตัวอสุจิในท่อสร้างเชื้ออสุจิ (McIntosh and Porter, 1967)



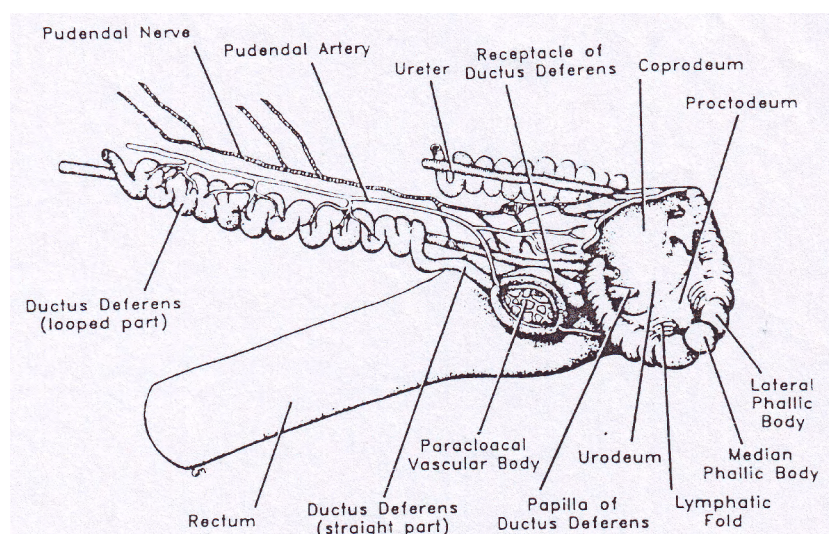
ภาพที่ 2 แสดงอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ปีก

ที่มา: http://campus.murraystate.edu/academic/faculty/terry.derting/cva_atlases/canduck/Image016.jpg
(2008)



ภาพที่ 3 แสดงส่วนของ testis และ epididymis ในสัตว์ปีก

ที่มา: Crawford (1990)



ภาพที่ 4 แสดงส่วนของ cloaca และ ductus deferens ในสัตว์ปีก

ที่มา: Crawford (1990)

ตัวสุกมีการพัฒนาหลายขั้นตอนก่อนที่จะเป็นตัวสุกที่สมบูรณ์และสามารถผสมพันธุ์ได้
ดังนี้

1. Germ cell เจริญเติบโตเป็น spermatogonia
2. Spermatogonia เจริญเติบโตกลายเป็น Primary spermatocyte
3. Primary spermatocyte เจริญต่อไปเป็น Secondary spermatocyte
4. Secondary spermatocyte เจริญต่อไปเป็น Spermatid
5. Spermatid มีการพัฒนาตัวเองต่อไปเป็นอสุจิที่สมบูรณ์

กระบวนการที่เจิมเซลล์ (primitive germ cell) มีการพัฒนาจนกลายเป็นตัวสเปิร์มาโตซัว (spermatozoa, sperm cell) กระบวนการทั้งหมดมีการพัฒนาที่ต่อเนื่องเกิดขึ้นภายในท่อเซมินิเฟอร์รัสของอวัยวะสืบพันธุ์สามารถแบ่งกระบวนการนี้ออกเป็นสองส่วนคือ กระบวนการสเปิร์มาโตไซโตเจเนซิส (spermatocytogenesis) เริ่มตั้งแต่การพัฒนาจากเจิมเซลล์ไปจนถึงเซลล์สเปิร์มาติด (spermatid) และกระบวนการสเปิร์มาโตเจเนซิส (spermiogenesis) เป็นกระบวนการที่เซลล์สเปิร์มาติดมีการพัฒนาต่อไปจนเป็นอสุจิที่สมบูรณ์เกิดขึ้นภายในท่อเซมินิเฟอร์รัส เจิมเซลล์ฝังตัวอยู่ในสุดของท่อจะค่อยๆ

พัฒนาขึ้นเป็นอสุจิซึ่งจะพบเซลล์เหล่านี้บริเวณกลางท่อเซมินิเฟอร์ัสของอัณฑะ กระบวนการสร้างอสุจิสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

1 สเปออร์มาโตโกเนีย (spermatogonia) ซึ่งฝังตัวอยู่บริเวณผนังท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubule) มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้เซลล์ 2 ชนิด คือ ดอร์แมนทสเปออร์มาโตโกเนีย (dormant spermatogonium, $2n$) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เก็บสำรองไว้ และแอคทีฟสเปออร์มาโตโกเนีย (active spermatogonium, $2n$) เซลล์ชนิดนี้จะแบ่งตัวแบบไมโทซิสอีก 4 ครั้ง และได้เซลล์ไพรมารีสเปออร์มาโตไซท์ ($2n$) จำนวน 16 เซลล์

2 ไพรมารีสเปออร์มาโตไซท์แต่ละเซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (meiosis I) การแบ่งลดโครโมโซมลงเหลือครึ่งหนึ่งได้เซลล์ใหม่ คือ เซกคันดารีสเปออร์มาโตไซท์ (secondary spermatocyte, n) จำนวน 2 เซลล์

3 เซกคันดารีสเปออร์มาโตไซท์ แต่ละเซลล์แบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 2 (meiosis II) ได้เซลล์สเปออร์มาติดจำนวน 2 เซลล์ ระยะนี้ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง กล่าวโดยสรุปสเปออร์มาโตโกเนีย 1 เซลล์สามารถแบ่งได้สเปออร์มาติดจำนวน 32 เซลล์

4 เป็นขั้นตอนที่สเปออร์มาติดเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เป็นอสุจิ (spermatozoa) หรือขั้นตอน spermiogenesis โดยไม่มีการแบ่งเซลล์อีกเลย ขั้นตอนนี้สเปออร์มาติดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้กลายเป็นอสุจิในระหว่างขั้นตอนนี้สเปออร์มาติดเกาะตัวอยู่กับเซลล์ฟีเลีย็ง (sertoli cells) Soley and Groenewald (1999) อธิบายขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น 8 ระยะคือ

ระยะที่ 1 สเปออร์มาติดมีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างกลม เริ่มมีการก่อตัวของ acrosomal granule ส่วนของเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีการหนาตัวขึ้นและมีการรวมตัวของโครมาตินภายในนิวเคลียส ในส่วนของไซโตรพลาสซึมมีการเพิ่มจำนวนของ ไมโตรคอนเดรีย, dictyosome, smooth and granular endoplasmic reticulum

ระยะที่ 2 สเปออร์มาติดยังมีลักษณะเหมือนกับในระยะแรก ระยะนี้กลุ่มเม็ดเล็ก ๆ ของอโครโซมจะจับตัวกันเป็นชั้นเห็นเป็นรูปหมวก ปกคลุมส่วนหน้าของนิวเคลียสอย่างชัดเจน

ระยะที่ 3 ส่วนของโครโซมและเซนทริโอ (centriole) จะอยู่ในตำแหน่งตรงกันข้ามกันของนิวเคลียส ส่วนหางของอสุจิเริ่มมีการพัฒนาขึ้นในช่วงปลายของระยะนี้จาก เซนทริโอ โดยพืดอกซิมัลเซนทริโอ (proximal centriole) จะพัฒนาเป็นท่อนหางของอสุจิ ส่วนดิสตัลเซนทริโอ (distal centriole) จะพัฒนาเป็นช่องวงแหวนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไกล์นิวเคลียสทำให้หางของตัวอสุจิตอดยาวผ่านไป

ระยะที่ 4 สเปอร์มาตอิดเริ่มมีรูปร่างที่ยาวขึ้น นิวเคลียสจะมีรูปร่างคล้ายไตหรือลูกแพร์ ส่วนของโครโซมจะมีลักษณะรูปร่างที่แบนและติดกับด้านหนึ่งของนิวเคลียสในขณะที่เซนทริโอจะอยู่ด้านตรงข้ามและมีทิศทางขนานไปตามความยาวของเซลล์ มีการพัฒนาส่วนของ circular manchette

ระยะที่ 5 สเปอร์มาตอิดมีรูปร่างคล้ายระยะที่ 4 แต่ส่วนของนิวเคลียสมีขนาดยาวและแคบกว่าเดิม ส่วนของไซโทพลาสซึมประกอบด้วยแกรนูลที่มีลักษณะละเอียดขึ้น เชื้อหุ้มเซลล์ครอบคลุมส่วนของโครโซม

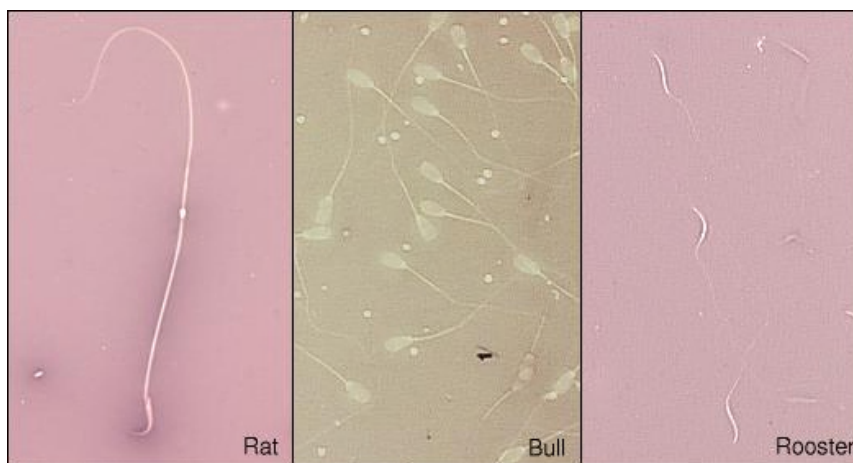
ระยะที่ 6 สเปอร์มาตอิดมีรูปร่างที่ยาวขึ้นรวมทั้งส่วนของนิวเคลียสจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร โครมาตินมีลักษณะละเอียดขึ้น ส่วนท้ายของเซลล์มีการพัฒนาของ flagellum โดยมีการสร้าง flagellar canal มีการพัฒนาในส่วนของ circular manchette เป็นอย่างมาก

ระยะที่ 7 สเปอร์มาตอิดมีความแตกต่างจากระยะก่อนหน้านี้นี้เล็กน้อย นิวเคลียสมีขนาดยาวขึ้นและแคบลงเล็กน้อย ส่วนของโครโซมมีการสร้าง acrosome cap-like ที่บริเวณปลายด้านหน้า นิวเคลียส

ระยะที่ 8 สเปอร์มาตอิดมีการเคลื่อนตัวเข้ามาใกล้ภายในบริเวณท่อ มีการพัฒนาขั้นสุดท้ายในตัวอสุจิ (maturation) เช่น มีการเจริญของไฟบรัสชีท (fibrous sheath) หุ้มพันรอบหางทั้งหมดและไมโทคอนเดรียชีท (mitochondria sheath) หุ้มโดยรอบส่วนกลางของหางที่มีไมโทคอนเดรียอยู่ ระยะนี้ถ้าตัวอสุจิยังเกาะอยู่กับเซลล์เซอร์โทไลจะยังปรากฏไซโตพลาสมิคดรอเพลท (cytoplasmic droplet) อยู่ในตัวอสุจิบริเวณกลางของลำตัวและไซโตพลาสมิคดรอเพลทจะสลายตัวไปเมื่ออสุจิค่อยๆ เคลื่อนตัวหลุดออกจากเซลล์พีเลียงและถูกขับดันโดยเทสติคูล่าฟลูอิด (testicular fluid) ผ่านไปยังท่อกักเก็บอสุจิ (epididymis) แล้วเท่านั้น

ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิของสัตว์ปีก

ขนาดของอสุจิแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสัตว์ปีกแต่ก็มีโครงสร้างทั่วไปคล้ายกัน ตัวอสุจิในสัตว์ปีกมีลักษณะส่วนหัวเรียวแหลมคล้ายกันหมดในไก่ตัวอสุจิส่วนหัวยาวและมี acrosome แหลม ส่วนกลาง (mid piece) สั้น ซึ่งต่อกับส่วนหางที่ยาว เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าตัวอสุจิของสัตว์ปีกมีขนาดเล็กกว่าดังแสดงในรูปที่ 5 และรูปที่ 6 คือ มีปริมาตร 9.2 ลูกบาศก์ ไมโครเมตร มี acrosome ยาว 1.75 ไมโครเมตร ส่วนหัวยาว 12.5 ไมโครเมตร ส่วนกลางยาว 4 ไมโครเมตร และส่วนหางยาว 80 ไมโครเมตร ส่วนกลางคือ distal centriole ที่มีลักษณะกลมและคลุมด้วย mitochondrial sheath ในสัตว์ปีกตัวอสุจิไม่มี cytoplasmic droplet เหมือนเช่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทั้งตัวของอสุจิล้อมรอบด้วย cytoplasmic membrane ส่วนของ acrosome เป็นแบบง่าย ๆ ภายในมี spine ฝังอยู่ ส่วนปลายของหัวนี้อยู่ภายใน cap ที่มีลักษณะเป็นรูปโคน mitochondrial sheath ของส่วนกลางมีลักษณะเป็นแผ่นโค้งและไม่มี outer fiber อยู่รอบนอกของ fiber แก้วที่อยู่ภายในเหมือนตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (สุจินต์, 2532; ปฐม, 2540; Bakst and Howarth, 1975)



ภาพที่ 5 แสดงรูปร่างของอสุจิหนู, วัว และ ไก่

ที่มา: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/sperm3.jpg> (2008)

คุณสมบัติของน้ำเชื้อและส่วนประกอบทางเคมี

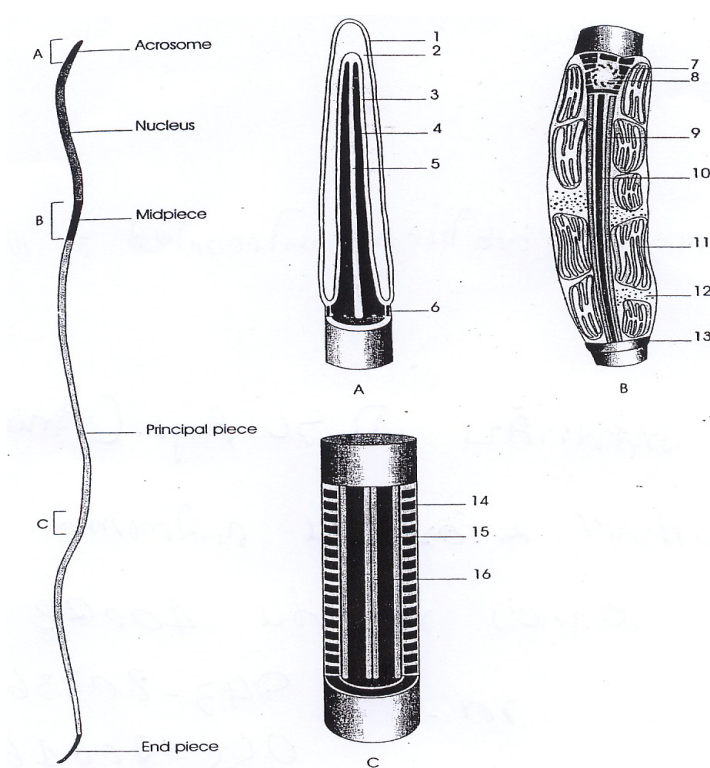
ส่วนหัวของตัวอสุจิประกอบด้วย DNA (deoxyribonucleotide) และสารที่เกี่ยวข้องกับ DNA เป็นส่วนใหญ่ มี cytoplasm น้อย และอยู่ระหว่างนิวเคลียสและ cytoplasmic membrane สารที่อยู่ใน cytoplasm ได้แก่ ไขมัน, ไกลโคโปรตีน, acrosome และส่วนหางมีต้นกำเนิดมาจากบริเวณ Golgi ของอสุจิ ซึ่งมีไขมันและไกลโคโปรตีนเป็นส่วนประกอบเช่นกัน ในส่วนกลางมีแต่ไขมันซึ่งน่าจะมาจาก mitochondria และ cytoplasm ตัวอสุจิของไก่มีเอนไซม์ใน acrosome ที่สามารถทำให้ vitelline membrane ของ ovum สลายตัวได้ ชนิดของเอนไซม์อาจจะเป็น Hyaluronidase หรือสารที่มีคุณสมบัติคล้าย Trypsin ในของเหลวที่ได้จากอสุจิพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น Lactic dehydrogenase, Hydroxybutyric dehydrogenase, Glutamic, Oxaloacetic transaminase, Creatinine kinase, Alolase, Sorbital dehydrogenase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Phosphohexase isomerase, Acetylcholinesterase และ Leucine-amino-peptidase โดยทั่วไปเมตาบอลิซึมของอสุจิใกล้เคียงกับของสัตว์อื่นๆ คือ มีการใช้ anaerobic glycolytic pathway และ aerobic citric acid cycle (สุจินต์, 2532; Yanagimachi and Teichman, 1972)

น้ำเชื้อไก่ต่างจากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากในไก่หรือสัตว์ปีกชนิดอื่นไม่มีต่อม seminal vesicle และต่อม prostate มีเพียง epididymis ซึ่งไม่พัฒนาเหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม น้ำเชื้อไก่จึงไม่มี fructose, citrate, ergothionine, inositol, phosphoryl choline และ glyceryl phosphoryl choline มี chloride ต่ำ แต่มี potassium และ glutamate สูง แหล่งที่มาของ glutamate อาจเป็นท่อสร้างเชื้ออสุจิ น้ำเชื้อของไก่มีสีขาวขุ่น มีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-7.6 (สุจินต์, 2532)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ปีก

การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญในการที่จะเก็บรักษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ไว้สำหรับนำไปใช้ในอนาคตเพื่อที่จะดำรงความหลากหลายทางชีวภาพให้คงอยู่และที่สำคัญคือเป็นการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ที่มีลักษณะดี หายาก มีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์ รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพทางการผสมเทียม (Blesbois, 2007) การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเริ่มมีการศึกษากันเมื่อประมาณ 100 ปีที่ผ่านมาโดยในระยะแรกเป็นการศึกษาวิธีการที่จะเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในสภาวะอุณหภูมิต่ำแต่ก็มีข้อมูลการศึกษาเพียงเล็กน้อย ต่อมา Shaffner *et al.* (1941) ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่เย็นแต่ไม่มีลูกไก่ฟักออกมาได้

จนกระทั่งเมื่อประมาณ 50 ปีที่ผ่านมาได้มีการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์โดยเฉพาะอสุจิในรูปของการแช่แข็ง ซึ่งเป็นการค้นพบโดยความบังเอิญถึงคุณสมบัติของกลีเซอรอลในการป้องกันอันตรายของอสุจิจากการแช่แข็งที่ผสมอยู่ใน Ringer's solution ร่วมกับ กลีเซอรอล 20% แล้วทำการแช่แข็ง เมื่อทำการละลายน้ำเชื้ออย่างรวดเร็วพบว่าอสุจิมีการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างจากอสุจิที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (Polge and Parkes, 1949) และจากการค้นพบนี้ทำให้มีการพัฒนาการเก็บรักษาอสุจิด้วยวิธีการแช่แข็งกับสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น โค สุกร แกะ แพะ กระบือ และสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ เป็นต้น



ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างของอสุจิไก่

A ส่วน Acrosome, B ส่วน Midpiece และ C ส่วน Principle piece

1 plasmalemma, 2 acrosome, 3 sub-acrosomal space, 4 nucleus, 5 endonuclear canal

6 posterior ring, 7 segmented connecting piece, 8 proximal centriole, 9 wall of distal centriole

10 rod of dense material lying within distal centriole, 11 mitochondrion, 12 inter-

mitochondrial cement, 13 annulus, 14 ribs of fibrous sheath, 15 outer double microtubules of

axoneme, 16 inner microtubular pair of axoneme

ที่มา: Soley and Groenewald (1999)

Lake and Stewart (1978) ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อของไก่หลังจากที่มีการค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณ 30 ปีก่อนหน้านี้ วิธีการสำหรับการแช่แข็งแบบปรับลดอุณหภูมิช้าๆ และมีการละลายน้ำเชื้ออย่างช้าๆ โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและเก็บในหลอดแก้ว ในขณะที่การศึกษาของ Sexton (1980) ได้ใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและบรรจุในหลอดเก็บน้ำเชื้อ (straw) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนารูปแบบการแช่แข็งและการใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Seigneurin and Blesbois (1995) และ Van Voorst and Leenstra (1995) ได้พัฒนารูปแบบการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิและการละลายน้ำเชื้ออย่างรวดเร็ว Tselutin *et al.* (1995) ศึกษาการนำ dimethyl acetamide (DMA) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Buss (1993) รายงานว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเมื่อนำไปผสมเทียมโดยใช้อสุจิ 156 ล้านตัว/โดส พบอัตราการผสมติดระหว่าง 7-79 เปอร์เซ็นต์ Calvert (1978) รายงานการใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง พบว่ามีผลเสียต่อการปฏิสนธิของอสุจิและมีผลในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิแต่ถ้ามีการแยกกลีเซอรอลออกจากอสุจีก่อนการผสมเทียมจะทำให้มีอัตราการผสมติดดีขึ้น นอกจากนี้ Donoghue and Wishart (2000) รายงานว่ากลีเซอรอลมีความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียบริเวณช่องคลอด ซึ่งหากใช้สารดังกล่าวเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งจะต้องมีการกำจัดออกจากรูปร่างน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนการผสมเทียม

การผลิตน้ำเชื้อไก่แช่แข็งในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทยน้อย จำกัดอยู่ในหน่วยงานราชการและสถานศึกษา ข้อมูลที่เกี่ยวข้องต่างๆ ยังมีน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สารเคมีป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งของอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง อติศักดิ์และคณะ (2545) ได้ศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแช่แข็งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 4-8 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเคลื่อนที่รายตัวประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อผสมเทียมด้วยความเข้มข้นของอสุจิ 100 ล้านตัว/โดส มีอัตราการผสมติด 16.39 เปอร์เซ็นต์ ภูมิรินทร์และคณะ (2549) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทิลีนไกลคอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็งพบว่าการใช้เอทิลีนไกลคอลที่ระดับความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

สุนทรและคณะ (2547) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทยโดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทย 4 วันติดต่อกันพบว่าน้ำเชื้อที่รีดเก็บวันที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายสูงกว่าที่รีดเก็บในวันที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อัตราการผสมติด

และการฟักออกของไข่มีเชื้อของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษา 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันกับที่เก็บรักษานาน 3 เดือน (37.50 และ 46.66 เปอร์เซ็นต์, 34.37 และ 36.36 เปอร์เซ็นต์)

สุนทรและคณะ(2548) ได้ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางโดยสารเจือจาง BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย BPSE มีการเคลื่อนที่รายตัวดีที่สุดและมีการเคลื่อนที่นาน 6 วัน ในขณะที่ Kiev มีการเคลื่อนที่ต่ำสุดและมีการเคลื่อนที่เพียง 1 วัน เมื่อทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่เจือจางและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่ามีอัตราการผสมติดของสารเจือจาง BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev คือ 44.64, 21.68 และ 4.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 4 และ 10 องศาเซลเซียสและชนิดของสารเจือจาง BPSE และ Egg yolk-Tris พบว่าอัตราการฟักไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ส่งผลให้อัตราการผสมติดและอัตราการฟักสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส

สราวุธและคณะ(2549) ได้ศึกษาผลของระยะเวลาในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อไปที่ 5 องศาเซลเซียสต่อคุณภาพน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทยพบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ผ่านการลดอุณหภูมิแบบทันทีและลดอุณหภูมิอย่างคงที่โดยใช้เวลา 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำเชื้อจากกลุ่มที่ใช้เวลา 4 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการมีชีวิตของอสุจิและการใช้สีเมทิลีนบลูในกลุ่มที่ใช้การลดอุณหภูมิตันทีสูงกว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 4 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมงและพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและการใช้สีเมทิลีนบลูมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในทางลบค่อนข้างสูง ($R^2=0.74$)

เทวินทร์และคณะ (2550ก) ได้ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, คณะสี และพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด โดยเปรียบเทียบสูตรของสารเจือจางน้ำเชื้อ 5 สูตร คือ BPSE, Prefreezing Lake, Tselutin et al. modified, Schramm และ IGGKP พบว่า น้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, คณะสี สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร IGGKP และ BPSE ให้คุณภาพอสุจิภายหลังการเก็บรักษาสูงสุด ส่วนพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร IGGKP ให้ผลดีที่สุด และเมื่อนำน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Prefreezing Lake, Tselutin et al. modified, Schramm, BPSE และ IGGKP ให้อัตราการผสมติด 93.65, 89.39, 96.53, 93.43 และ 94.78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เทวินทร์และคณะ (2550ข) ได้ศึกษาผลของชนิดของสารเจือจางและชนิดของ สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร BPSE, Lake และ Tselutin พบว่ามีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไม่แตกต่างกัน และเมื่อทำการผสมเทียมด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อดังกล่าวให้ผลอัตราการผสมติด 81.97, 77.04 และ 78.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการศึกษาชนิดของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เสริมในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย BPSE โดยใช้ ethylene glycol, glycerol, dimethylacetamide และ dimethylsulfoxide ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์เป็นพิษต่อตัวสุจิยกเว้น glycerol และเมื่อทำการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดพบว่าไม่มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลง

เทวินทร์และคณะ(2550ค) ได้ศึกษาผลของวิธีการผสมพันธุ์ต่ออัตราการผสมติดของไก่พื้นเมืองโดยวิธีการผสมตามธรรมชาติแบบฝูงเล็ก การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อไม่เจือจาง และการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อเจือจางพบว่าวิธีการผสมพันธุ์ดังกล่าวให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อในการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองและไก่ไข่ทางการค้า โดยมีตำแหน่งในการปล่อยน้ำเชื้อที่ความลึก 2 และ 4 เซนติเมตรพบว่าตำแหน่งการปล่อยน้ำเชื้อที่ความลึกทั้งสองตำแหน่งให้ผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันทั้งในไก่พื้นเมืองและไก่ไข่ทางการค้า การศึกษาความยาวนานในการผสมติดด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อเจือจางภายหลังการผสมเทียมครั้งเดียว พบว่าความสามารถในการผสมติดจากการผสมเทียมลดน้อยลงจากสัปดาห์ที่ 1 ถึง 3 และการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อไม่เจือจางให้อัตราการผสมติดสูงกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจางในสัปดาห์ที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สารเคมี

1. เทส (TES, N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid)
2. HEPES (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid))
3. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)
4. กลูโคสโมโนไฮเดรต (Glucose monohydrate)
5. ฟรุคโตส (Fructose)
6. เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)
7. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
8. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
10. โพแทสเซียมซิเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$)
11. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)
12. โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)
13. โซเดียมกลูตาเมต ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$)
14. โซเดียมอะซิเตต (NaCH_3COO)
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
16. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
17. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
18. โซเดียมไพรูเวท ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$)
19. กรดแลกติก (Lactic acid; 60% syrup)
20. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO)
21. ไดเมทิลอะเซตามิด (Dimethylacetamide; DMA)

วัสดุและอุปกรณ์

1. ถังไนโตรเจนเหลวพร้อมไนโตรเจนเหลว
2. ตู้ควบคุมความเย็น (ASECO[®] system, Inc)
3. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
4. สไลด์แก้ว (Glass slide)
5. แผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)
6. หลอดเก็บน้ำเชื้อ (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
7. กล่องโฟม (Styrofoam box)
8. แร็ค (Vaporization rack)
9. พงอุดหลอดน้ำเชื้อ (Sealing power)
10. สีย้อมอีโอซิน-นีโกรซิน (Eosin-Nigrosin stain)
11. หลอดจุลภาค (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 3 มิลลิลิตร
13. เคาท์ติ้งแชมเบอร์ (Counting chamber)
14. เครื่องจับเวลา
15. เครื่องนับด้วยมือ (Hand counter)
16. สไลด์ใช้นับเม็ดเลือด (Hemocytometer)
17. มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
18. มาตรวัดออสโมลาริตี (Osmolarity meter)
19. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
20. ไมโครปิเปต ขนาด 1-20, 10-100, 100-1000 ไมโครลิตร
21. กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่าน (Ligh microscope)
22. ปากคีบ (Forcep)
23. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
24. มาตรวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
25. ปากกาเขียนถาวร
26. น้ำยาเช็ดเลนส์
27. กระดาษเช็ดเลนส์

วิธีการ

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์ไก่สามเหลืงอายุระหว่าง 1-2 ปี จำนวน 10 ตัว โดยการสุ่ม โดยไก่ทุกตัวเลี้ยงในกรงเลี้ยงแบบแยกขังเดี่ยว ได้รับแสงตามธรรมชาติ 14 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารวันละ 2 ครั้งในตอนเช้าและตอนเย็น (อาหารสำเร็จรูปคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 17 ให้กินประมาณ 125 กรัม/ตัว/วัน) มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา ดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาทกกลสิกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การรีดเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากไก่สามเหลืงด้วยวิธีการนวดทวารรวมตามวิธีของ Burrows and Quinn (1937) 2 ครั้ง/สัปดาห์ จำนวน 6 ครั้ง รongรับน้ำเชื้อด้วยหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร โดยรีดน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์ 10 ตัวและนำน้ำเชื้อมารวมกัน (pool semen) นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาตรวจสอบคุณภาพโดย การวัดปริมาณของน้ำเชื้อ(volume), กรด-ด่าง (pH), ความดันสารละลาย (osmolality), ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (sperm concentration), ลักษณะรูปร่างของอสุจิ (abnormal morphology), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (percentage of motile spermatozoa) และเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่ปกติและผิดปกติ (percentage of normal and abnormal spermatozoa)

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

การวัดความเข้มข้นของตัวอสุจิ (sperm concentration) โดยใช้อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamatocytometer) ซึ่งจะปฏิบัติกับน้ำเชื้อสด (pool semen) และน้ำเชื้อที่แช่แข็ง โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย formal saline อัตราส่วน 1:100 เขย่าให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายดังกล่าวใส่ลงในช่องของ heamatocytometer ให้เต็มพอดี ปิดด้วยกระจก (coverglass) ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2-3 นาที เพื่อให้ตัวอสุจิลงสู่พื้นหรือหุคหนึ่ง นำมานับจำนวนด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x โดยนับจำนวนอสุจิในช่องใหญ่ 4 มุมและช่องตรงกลาง (รวม 5 ช่องใหญ่ หรือ 80 ช่องเล็ก) รวมกัน เพื่อนำมาใช้คำนวณหาอสุจิต่อ 1 มิลลิลิตร

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ทำการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 41 องศาเซลเซียส ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ทำการประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำการตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิจาก 5 ตำแหน่งบนสไลด์และประเมินการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าโดยให้คะแนนการเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซนต์ ทำการประเมินการเคลื่อนที่ตัวอย่างละ 3 สไลด์และหาค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของอสุจิ

อัตราการมีชีวิตของอสุจิ

โดยการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 41 องศาเซลเซียสและเติมสี eosin-nigrosin 2 หยดใช้ไม้จิ้มฟันสะอาดผสมน้ำเชื้อและสีให้เข้ากัน เติมน้ำบนสไลด์ เป่าให้แห้งและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า อสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีแดงของสี eosin ทำการตรวจนับอสุจิจำนวน 200 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างแล้วจึงคำนวณเทียบเป็นร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต

Computer-aided sperm motility analysis (CASA)

ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยเจือจางน้ำเชื้อ 1:100 ของสารเจือจางน้ำเชื้อ จากนั้นนำไปหยดลงบนสไลด์ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA (HTM-IVOS, Sperm analysis system version 12; Hamilton Thorne Biosciences, USA) โดยจะแสดงผลค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจินี้ average path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), beat cross frequency (BCF), straightness of track (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH) และ linearity of track (LIN) (Girija and Shivaji, 1994 และ Shivaji *et al.*, 1995)

ตารางที่ 1 ค่าการทำงานของเครื่อง HTM-IVOS motility สำหรับวิเคราะห์การเคลื่อนที่

Parameter setup	
Temperature (°C)	37
Apply sort	None
Frame acquired	30
Frame rate (Hz)	60
Minimum contrast	50
Minimum cell size (pixels)	4
Minimum static contrast	50
Threshold straightness (%)	80
Low VAP cut off (um/s)	5
Medium VAP cut off (um/s)	24.9
Low VSL cut off (um/s)	15
Non-motile head size (pixels)	4
Non-motile head intensity	50
Static head size	0.1-2.92
Static head intensity	0.48-3.0
Static elongation (limits)	50-99
Slow cell motile	Yes
Magnification	2.04
Video source	Camera
Video frequency	60
Bright field	No
Image type	Phase contrast
Brightness for LED	2681
Minimum track point	15

ดัดแปลงจาก: Sontakke *et al.* (2004)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ของสารเจือจางน้ำเชื้อ

ส่วนประกอบ (กรัม)	สารเจือจางน้ำเชื้อ	
	BPSE ¹	SP-TALP ²
Potassium citrate	0.64	-
Dipotassium phosphate 3 H ₂ O	12.70	-
Sodium glutamate	8.67	-
Sodium acetate 3 H ₂ O	4.30	-
Monopotassium phosphate	0.65	-
Magnesium chloride 6 H ₂ O	0.34	0.08
Fructose	5.00	-
Sodium chloride	-	5.69
Potassium chloride	-	0.23
Sodium dihydrogen phosphate	-	0.04
Sodium bicarbonate	-	2.09
Calcium chloride 6 H ₂ O	-	0.29
Sodium pyruvate	-	0.02
Glucose monohydrate	-	0.90
Lactic acid (60% syrup)	-	3.68
HEPES	-	2.38
BSA	-	6.00
TES	1.95	-
Penicillin G	-	0.01
Distilled water	1,000 ml	
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	366	280-290
pH	7.5	7.4

HEPES = N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid)

BSA = Bovine serum albumin

TES = N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid

ที่มา: ¹ Sexton (1977); ² Parrish *et al.* (1988)

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

โดยปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ 1) สารเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิดคือ BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) และ SP-TALP และ 2) สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 2 ชนิดคือ DMSO (dimethylsulfoxide) และ DMA (dimethylacetamide) นำน้ำเชื้อรวม (pool semen) มาแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มผสมกับสารเจือจางน้ำเชื้ออัตราส่วน 1:2 (น้ำเชื้อ:สารเจือจางน้ำเชื้อ) คือ

กลุ่มที่ 1 เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE และใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMSO

กลุ่มที่ 2 เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE และใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMA

กลุ่มที่ 3 เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP และใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMSO

กลุ่มที่ 4 เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP และใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMA

ผสมสารเจือจางน้ำเชื้อครึ่งหนึ่งของปริมาณที่คำนวณได้นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผสมกับสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งผสมอยู่โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMA 6 เปอร์เซ็นต์และ DMSO 8 เปอร์เซ็นต์ นำส่วนผสมที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที บรรจุส่วนผสมที่ได้ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.50 มิลลิลิตร ทดอุณหภูมิโดยนำไปวางไว้เหนือระดับในโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ลงไปในไนโตรเจนเหลว ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการเก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์โดยนำหลอดน้ำเชื้อมาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที

การทดสอบการเคลื่อนของอสุจิภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดทดลองโดยมีกลุ่มควบคุมคือ น้ำเชื้อรวมที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP และ BPSE อัตราส่วน 1:1 โดยไม่แช่แข็ง กลุ่มทดลองคือ น้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาอุ่นละลายแล้วเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อตามชนิดที่แช่แข็งด้วยอัตราส่วน 1:5 (น้ำเชื้อแช่แข็ง:สารเจือจางน้ำเชื้อ) แล้วนำไปเก็บรักษาในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ณ เวลา 0, 30 นาที และทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอน

โดยปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ 1) ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียว (1 step) และแบบสองขั้นตอน (2 step) 2) สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 2 ชนิดคือ DMSO และ DMA นำน้ำเชื้อรวม (pool semen) มาเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 อัตราส่วน 1:2 (น้ำเชื้อ:สารเจือจางน้ำเชื้อ) โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มทดลอง คือ

กลุ่มที่ 1 แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้ DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

กลุ่มที่ 2 แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้ DMA เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

กลุ่มที่ 3 แช่แข็งแบบสองขั้นตอนโดยใช้ DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

กลุ่มที่ 4 แช่แข็งแบบสองขั้นตอนโดยใช้ DMA เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

วิธีการทดลองของกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 นำน้ำเชื้อรวมเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMA ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 6 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 8 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลองของกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 นำน้ำเชื้อรวมเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อครึ่งหนึ่งของปริมาณที่คำนวณได้แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น

นำมาผสมกับสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง DMA ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 6 เปอร์เซนต์ และ DMSO ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 8 เปอร์เซนต์

นำส่วนผสมที่ได้ในแต่ละกลุ่มไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บรรจุส่วนผสมที่ได้ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.50 มิลลิลิตร ลดยุณหภูมิโดยนำไปวางไว้เหนือระดับไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ลงไปไนโตรเจนเหลว ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการเก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์โดยนำหลอดน้ำเชื้อมาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที

การทดสอบการเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดทดลองโดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาอุ่นละลายแล้วเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดเดียวกับที่ใช้ในการแช่แข็งด้วยอัตราส่วน 1:5 (น้ำเชื้อแช่แข็ง: สารเจือจางน้ำเชื้อ) แล้วนำไปเก็บรักษาในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ณ เวลา 0, 30 นาที และทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองจัดพหุคูณแบบแฟกทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial experimental in completely randomized design) โดยศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง และการเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ต่อ การเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม (mean $\pm$ standard deviation) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (2003) ในการวิเคราะห์ พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย การเคลื่อนที่ของอสุจิ อสุจิที่มีชีวิต รูปร่างอสุจิ การศึกษาครั้งนี้มีแบบแผนทางคณิตศาสตร์ของการทดลองแบบ 2x2 factorial ที่ใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design

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

μ = ค่าเฉลี่ยรวม

A_i = อิทธิพลของปัจจัยสารเจือจางน้ำเชื้อ ($i = 1, 2$)

B_j = อิทธิพลของปัจจัยสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ($j = 1, 2$)

AB_{ij} = อิทธิพลร่วมของปัจจัยสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

e_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

ผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

คุณภาพของน้ำเชื้อสด

ผลจากการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่รีดจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองจำนวน 10 ตัวแล้วนำน้ำเชื้อมารวมกันทำการรีดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ลักษณะที่ทำการศึกษาคือปริมาตรของน้ำเชื้อรวม (volume), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ความดันสารละลาย (osmolality), ความเข้มข้นของตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร (sperm concentration) (ตารางที่ 3) การศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจิ (abnormal morphology), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (percentage of motile spermatozoa) และเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติและผิดปกติ (percentage of normal and abnormal spermatozoa) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดที่นำมารวมกันหลังรีดเก็บจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลือง

ลักษณะที่ศึกษา	ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อน	พิสัย
	มาตรฐาน	
1. ปริมาตรของน้ำเชื้อรวม (มิลลิลิตร)	2.22±0.09	(1.70-2.80)
2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.82±0.08	(7.44-8.22)
3. ค่าความดันสารเจือจางน้ำเชื้อ	347.75±6.78	(328.00-402.00)
4. ความเข้มข้นของอสุจิ (ล้านตัว/มิลลิลิตร)	3,463.75±32.68	(3,210.00-3,635.00)
5. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	89.17±1.35	(80.00-95.00)

ลักษณะรูปร่างของอสุจีก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและชนิดของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งไม่มีอิทธิพลร่วมต่อกันต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิ และค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ สำหรับผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างของอสุจีก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง (ตารางที่ 4) พบว่าลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงหลังการแช่แข็งเมื่อเทียบกับก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของอสุจิพบว่าอสุจิภายหลังการแช่แข็งมีลักษณะผิดปกติแบบ macrocephalic, amorphous head, bent tail, bent mid piece และอสุจิที่ตาย มีค่าสูงกว่าอสุจีก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนลักษณะความผิดปกติแบบ cytoplasmic droplet ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

รูปร่างของอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 81.00 ± 0.63 และ 85.33 ± 1.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 80.25 ± 0.62 และ 79.50 ± 0.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับรูปร่างของอสุจิที่ปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่า อสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 56.67 ± 1.10 และ 49.25 ± 1.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 42.33 ± 1.58 และ 40.75 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีอสุจิที่มีรูปร่างปกติหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA มีอสุจิที่มีรูปร่างปกติหลังการแช่แข็งต่ำกว่าอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO แต่สูงกว่าอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลักษณะผิดปกติแบบ macrocephalic ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.33 ± 0.44 และ 2.17 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.33 ± 0.40 และ 2.58 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับภายหลังการแช่แข็งพบในอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO เท่ากับ 2.33 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-

TALP ร่วมกับ 6% DMA สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 4.33 ± 0.42 , 4.33 ± 0.44 และ 4.58 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะผิดปกติแบบ amorphous head ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.00 ± 0.13 และ 1.00 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.17 ± 0.21 และ 1.50 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับภายหลังการแช่แข็งพบว่าในอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO เท่ากับ 1.92 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA โดยกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA, สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 3.25 ± 0.44 , 2.42 ± 0.37 และ 2.42 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ bent tail ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.33 ± 0.17 และ 2.67 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.58 ± 0.33 และ 3.50 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่าน้อยที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 6% DMA สำหรับภายหลังการแช่แข็งพบว่าในอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO เท่ากับ 17.92 ± 0.79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA โดยกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA, สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 18.58 ± 0.81 , 20.92 ± 0.45 และ 20.17 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ bent mid piece ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.00 ± 0.18 และ 1.50 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.08 ± 0.15 และ 1.33 ± 0.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับภายหลังการแช่แข็งพบว่าในอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO เท่ากับ 2.42 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA สารเจือจางน้ำเชื้อ

ชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 4.83 ± 0.33 , 4.08 ± 0.52 และ 4.83 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ cytoplasmic droplet ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.75 ± 0.36 และ 1.25 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.25 ± 0.25 และ 2.17 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับภายหลังการแช่แข็งพบว่าในอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA เท่ากับ 1.25 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.08 ± 0.33 , 2.50 ± 0.32 และ 2.33 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

อสุจิที่ตาย ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 9.58 ± 0.47 และ 6.08 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 10.33 ± 0.44 และ 9.42 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าพบว่าการแช่แข็งอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่า 16.67 ± 0.60 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ซึ่งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 18.50 ± 0.73 , 23.42 ± 0.66 และ 24.92 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

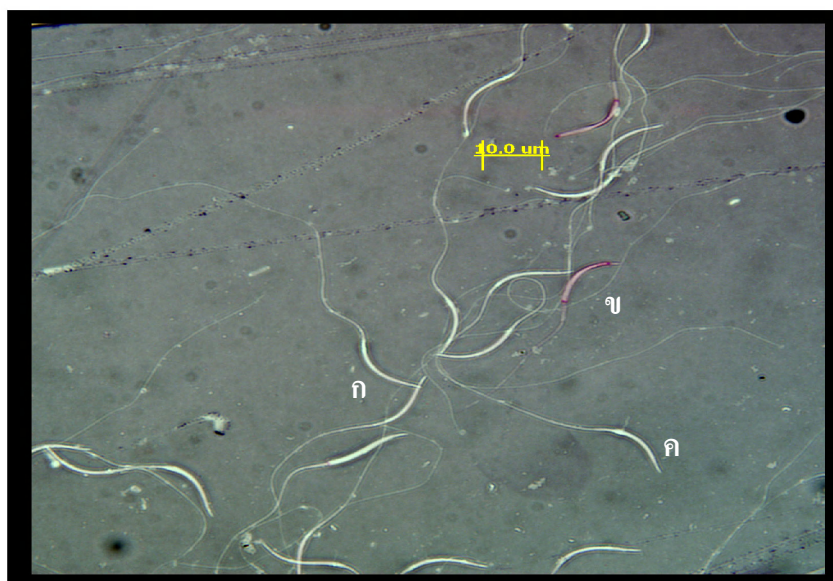
ตารางที่ 4 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ

Parameter	Pre-freezing				Post thawing			
	SP-TALP		BPSE		SP-TALP		BPSE	
	8% DMSO	6% DMA	8% DMSO	6% DMA	8% DMSO	6% DMA	8% DMSO	6% DMA
Morphological normal	81.00±0.63 ^A	85.33±1.37 ^B	80.25±0.62 ^A	79.50±0.75 ^A	56.67±1.10 ^a	49.25±1.48 ^b	42.33±1.58 ^c	40.75±0.69 ^c
Macrocephalic	2.33±0.44	2.17±0.38	2.33±0.40	2.58±0.37	2.33±0.44 ^a	4.33±0.42 ^b	4.33±0.44 ^b	4.58±0.35 ^b
Amorphous head	1.00±0.13	1.00±0.13	1.17±0.21	1.50±0.26	1.92±0.43 ^a	3.25±0.44 ^b	2.42±0.37 ^{ab}	2.42±0.37 ^{ab}
Bent tail	2.33±0.17 ^A	2.67±0.36 ^{AB}	2.58±0.33 ^{AB}	3.50±0.43 ^B	17.92±0.79 ^a	18.58±0.81 ^{ab}	20.92±0.45 ^c	20.17±0.48 ^{bc}
Bent mid piece	1.00±0.18	1.50±0.26	1.08±0.15	1.33±0.21	2.42±0.30 ^a	4.83±0.33 ^b	4.08±0.52 ^b	4.83±0.49 ^b
Cytoplasmic droplet	2.75±0.36 ^A	1.25±0.25 ^B	2.25±0.25 ^A	2.17±0.28 ^A	2.08±0.33 ^a	1.25±0.25 ^b	2.50±0.32 ^a	2.33±0.25 ^a
Death	9.58±0.47 ^A	6.08±0.69 ^B	10.33±0.44 ^A	9.42±0.47 ^A	16.67±0.60 ^a	18.50±0.73 ^a	23.42±0.66 ^b	24.92±0.58 ^b

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะรูปร่างของอสุจิ

ก อสุจิปกติ

ข อสุจิตาย

ค อสุจิผิดปกติแบบ cytoplasmic droplet



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะความผิดปกติของอสุจิแบบ bent tail

ค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ผลจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนและหลังการแช่แข็งพบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าคล้ายกับก่อนการแช่แข็งแต่มีความเร็วต่ำกว่า สำหรับค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับค่า STR และ LIN มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) ก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 90.00 ± 3.49 และ 90.00 ± 3.490 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 85.25 ± 1.38 และ 82.75 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 48.50 ± 3.40 และ 33.50 ± 7.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 17.00 ± 2.80 และ 11.50 ± 3.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 5 และภาพที่ 9

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile) ก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 66.50 ± 9.77 และ 68.50 ± 8.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 57.25 ± 7.34 และ 58.00 ± 8.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 10.50 ± 3.40 และ 6.00 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 4.00 ± 1.08 และ 3.00 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่า

กลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 10

ค่า VAP ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 116.53 ± 11.81 และ 127.43 ± 11.55 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 125.18 ± 12.21 และ 113.28 ± 15.91 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VAP ของอสุจิล้างการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 59.18 ± 3.85 และ 64.28 ± 5.73 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 82.18 ± 4.38 และ 68.40 ± 5.26 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VAP ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 11

ค่า VSL ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 98.58 ± 9.28 และ 111.05 ± 10.15 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 113.10 ± 12.04 และ 102.60 ± 15.82 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VSL ของอสุจิล้างการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 51.70 ± 3.09 และ 56.18 ± 6.64 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 75.80 ± 5.18 และ 63.93 ± 4.66 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VSL ของอสุจิ ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 12

ค่า VCL ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 168.10 ± 13.51 และ 177.70 ± 11.37 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 176.60 ± 8.90 และ 154.23 ± 8.29 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VCL ของอสุจิล้างการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 87.73 ± 3.99 และ 91.70 ± 3.67 ไมโครเมตรต่อวินาที

ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 128.95 ± 2.72 และ 95.70 ± 7.81 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VCL ของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 9 และภาพที่ 13

ค่า ALH ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 6.38 ± 0.38 และ 6.45 ± 0.21 ไมโครเมตรตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 6.00 ± 0.31 และ 5.65 ± 0.18 ไมโครเมตรตามลำดับ ส่วนค่า BCF ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 4.18 ± 0.19 และ 3.78 ± 0.36 ไมโครเมตรตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 5.63 ± 0.79 และ 4.08 ± 0.53 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่าค่า ALH ของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 14

ค่า BCF ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 25.48 ± 1.24 และ 26.43 ± 1.98 เซิร์ทซ์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 28.38 ± 2.28 และ 31.20 ± 1.77 เซิร์ทซ์ตามลำดับ ส่วนค่า BCF ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 24.40 ± 1.48 และ 29.45 ± 1.49 เซิร์ทซ์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 28.15 ± 1.43 และ 24.33 ± 1.99 เซิร์ทซ์ตามลำดับ พบว่าค่า BCF ของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 6% DMA มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 6% DMA ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 15

Straightness of track (STR) ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 83.00 ± 0.91 และ 85.25 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 89.50 ± 1.85 และ 86.50 ± 0.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่า STR ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 87.75 ± 1.25 และ 87.25 ± 2.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้

สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 91.25 ± 1.25 และ 93.25 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าค่า STR ของอสุจิกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 6% DMA มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ดังตารางที่ 12 ภาพที่ 16

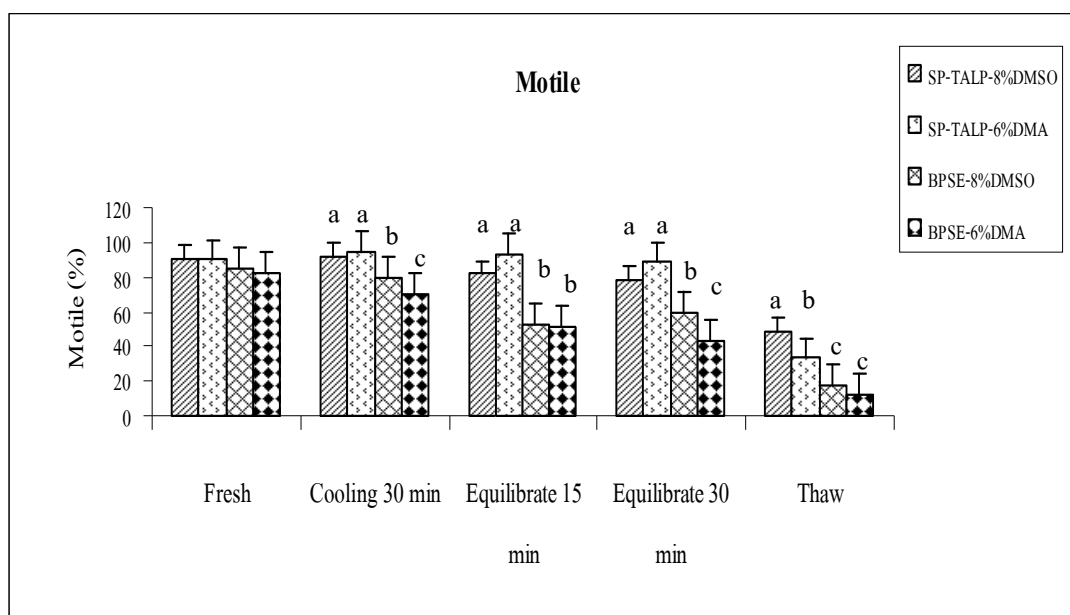
Linearity of track (LIN) ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 57.50 ± 1.19 และ 61.00 ± 2.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 61.75 ± 3.77 และ 54.00 ± 2.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่า LIN ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 62.50 ± 2.25 และ 63.75 ± 6.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 59.00 ± 3.76 และ 68.00 ± 4.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าค่า LIN ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 13 ภาพที่ 17

ตารางที่ 5 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

	Motile				
	Fresh	Cooling	Equilibrate	Equilibrate	Thaw
		30 min	15 min	30 min	
SP-TALP + 8% DMSO	90.00 ± 3.49	91.75 ± 2.06^{ab}	81.75 ± 2.43^a	78.00 ± 5.05^a	48.50 ± 3.40^a
SP-TALP + 6% DMA	90.00 ± 3.49	94.25 ± 1.11^a	93.00 ± 1.08^a	88.75 ± 1.55^a	33.50 ± 7.75^b
BPSE + 8% DMSO	85.25 ± 1.38	79.75 ± 4.33^{bc}	52.75 ± 5.65^b	59.00 ± 5.76^b	17.00 ± 2.80^c
BPSE + 6% DMA	82.75 ± 1.25	70.00 ± 6.36^c	50.75 ± 5.62^b	42.50 ± 4.94^c	11.50 ± 3.30^c

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



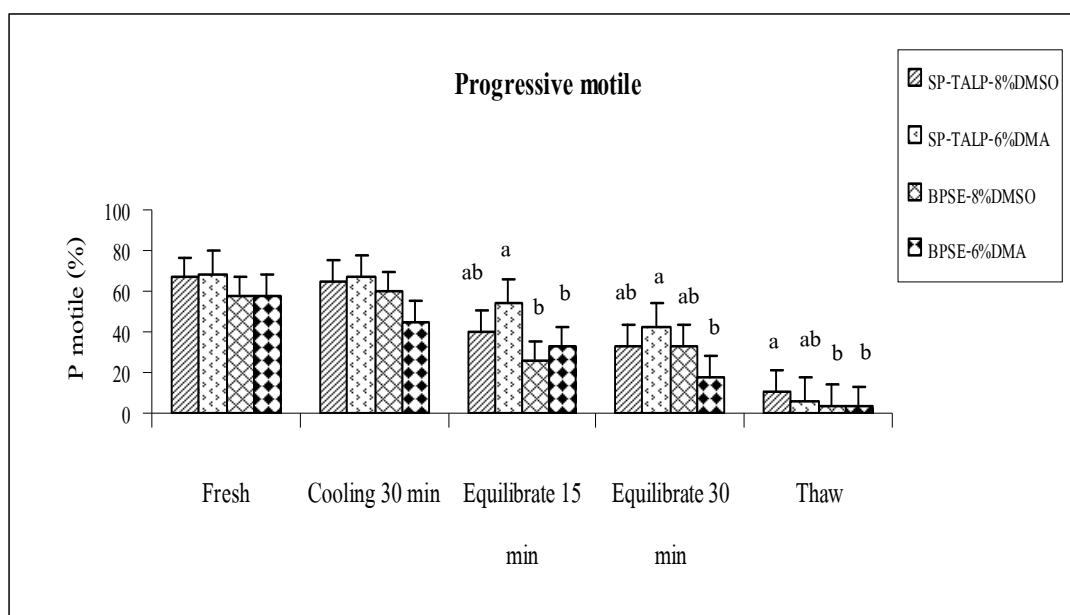
ภาพที่ 9 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

	P Motile				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	66.50±9.77	64.50±3.12	39.75±3.68 ^{ab}	32.50±4.09 ^{ab}	10.50±3.40 ^a
SP-TALP + 6% DMA	68.50±8.53	66.75±4.63	54.25±2.46 ^a	42.50±4.72 ^a	6.00±0.41 ^{ab}
BPSE + 8% DMSO	57.25±7.34	59.50±7.03	25.50±6.60 ^b	32.75±8.22 ^{ab}	4.00±1.08 ^b
BPSE + 6% DMA	58.00±8.29	45.25±15.09	32.50±7.90 ^b	18.00±5.79 ^b	3.00±0.82 ^b

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



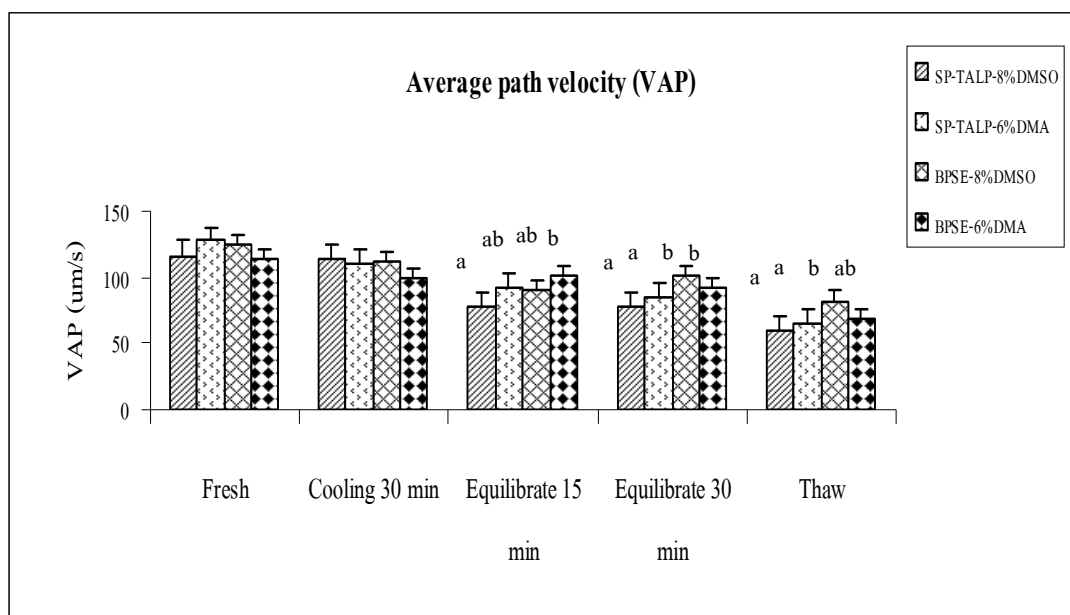
ภาพที่ 10 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 7 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VAP

	Average path velocity (VAP)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	116.53±11.81	112.98±3.76	77.20±3.54 ^a	77.18±2.13 ^a	59.18±3.85 ^a
SP-TALP + 6% DMA	127.43±11.55	110.93±5.08	92.30±4.30 ^{ab}	85.35±4.07 ^a	64.28±5.73 ^a
BPSE + 8% DMSO	125.18±12.21	111.98±17.29	90.23±3.14 ^{ab}	100.83±3.91 ^b	82.18±4.38 ^b
BPSE + 6% DMA	113.28±15.91	99.80±13.92	101.18±11.41 ^b	92.23±6.38 ^b	68.40±5.26 ^{ab}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



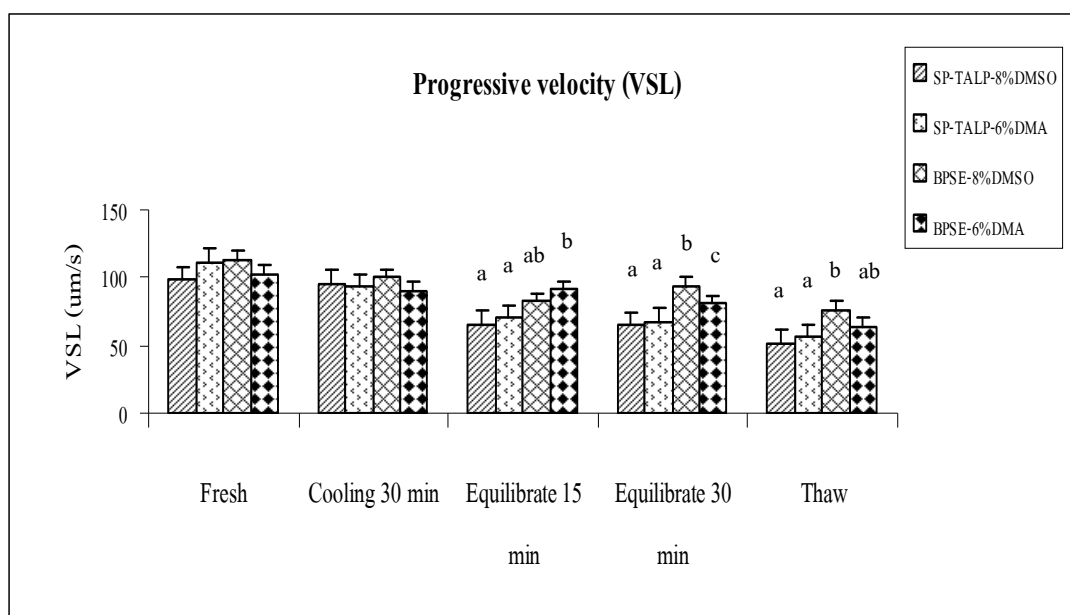
ภาพที่ 11 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VAP อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 8 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VSL

	Progressive velocity (VSL)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	98.58±9.28	95.90±2.51	66.08±3.48 ^a	65.03±2.02 ^a	51.70±3.09 ^a
SP-TALP + 6% DMA	111.05±10.15	92.65±4.45	70.35±3.49 ^a	67.43±2.87 ^a	56.18±6.64 ^a
BPSE + 8% DMSO	113.10±12.04	100.05±15.15	82.50±3.55 ^{ab}	93.28±2.19 ^b	75.80±5.18 ^b
BPSE + 6% DMA	102.60±15.82	89.85±14.08	90.98±10.18 ^b	80.50±6.22 ^c	63.93±4.66 ^{ab}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



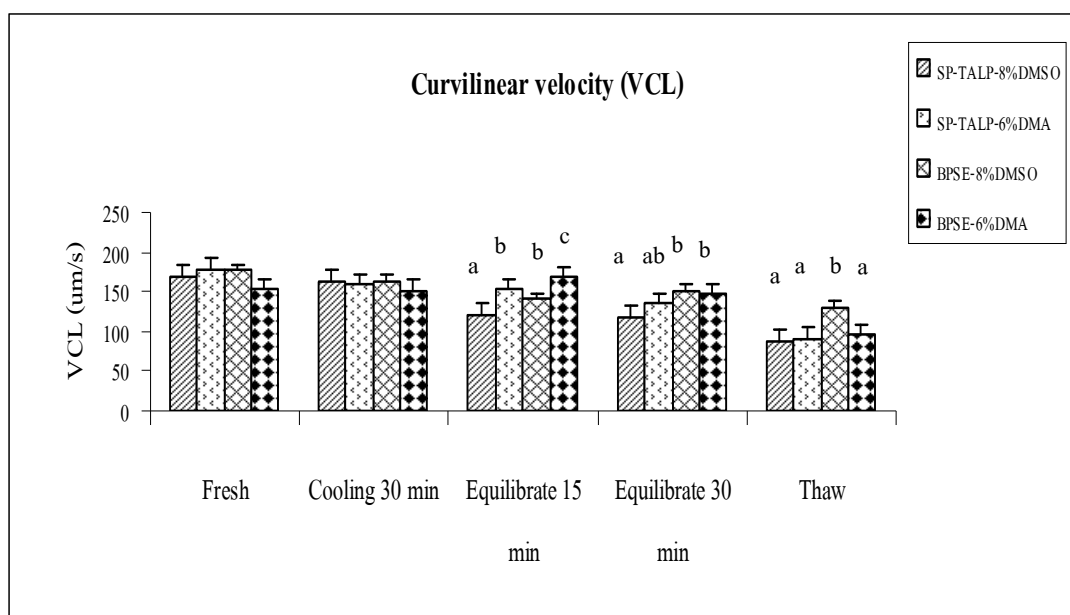
ภาพที่ 12 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VSL อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VCL

	Curvilinear velocity (VCL)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	168.10±13.51	161.60±6.26	120.95±5.92 ^a	116.60±3.20 ^a	87.73±3.99 ^a
SP-TALP + 6% DMA	177.70±11.37	158.50±6.26	152.33±6.16 ^{bc}	134.33±7.37 ^{ab}	91.70±3.67 ^a
BPSE + 8% DMSO	176.60±8.90	162.30±19.44	140.70±4.42 ^b	150.40±7.47 ^b	128.95±2.72 ^b
BPSE + 6% DMA	154.23±8.29	151.90±11.88	169.20±7.37 ^c	146.18±8.30 ^b	95.70±7.81 ^a

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



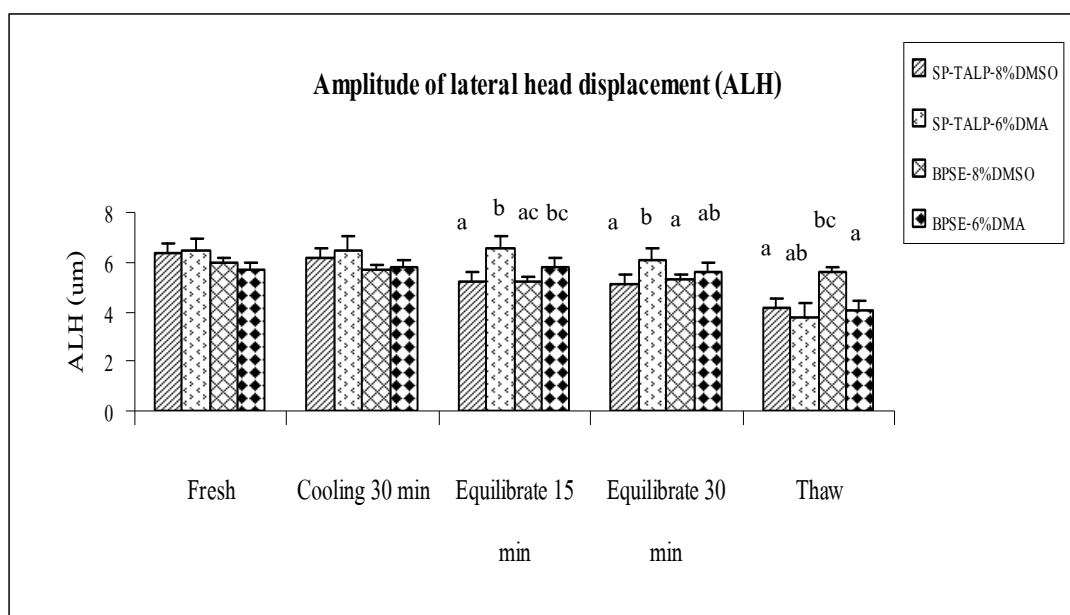
ภาพที่ 13 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า VCL อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 10 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Amplitude of lateral head displacement (ALH)

	Amplitude of lateral head displacement (ALH)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	6.38±0.38	6.20±0.22	5.20±0.21 ^a	5.13±0.13 ^a	4.18±0.19 ^a
SP-TALP + 6% DMA	6.45±0.21	6.48±0.23	6.55±0.12 ^b	6.03±0.25 ^b	3.78±0.36 ^{ab}
BPSE + 8% DMSO	6.00±0.31	5.73±0.43	5.23±0.31 ^{ac}	5.33±0.28 ^a	5.63±0.79 ^{bc}
BPSE + 6% DMA	5.65±0.18	5.75±0.13	5.83±0.30 ^{bc}	5.60±0.18 ^{ab}	4.08±0.53 ^a

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



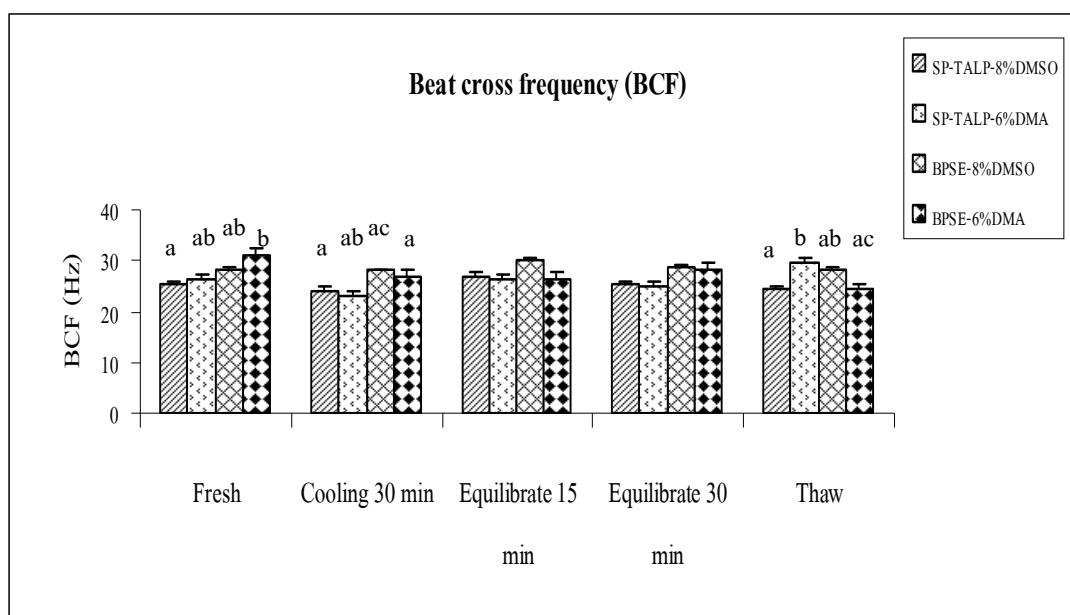
ภาพที่ 14 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า ALH อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 11 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Beat cross frequency (BCF)

	Beat cross frequency (BCF)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	25.48±1.24 ^a	24.20±1.02 ^a	27.05±0.63	25.50±0.78	24.40±1.48 ^a
SP-TALP + 6% DMA	26.43±1.96 ^{ab}	23.18±0.72 ^{ab}	26.30±0.87	26.30±0.87	29.45±1.49 ^b
BPSE + 8% DMSO	28.38±2.28 ^{ab}	28.03±1.43 ^{ac}	30.25±2.97	30.25±2.97	28.15±1.43 ^{ab}
BPSE + 6% DMA	31.20±1.77 ^b	26.98±2.21 ^a	26.40±3.25	26.40±3.25	24.33±1.99 ^{ac}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



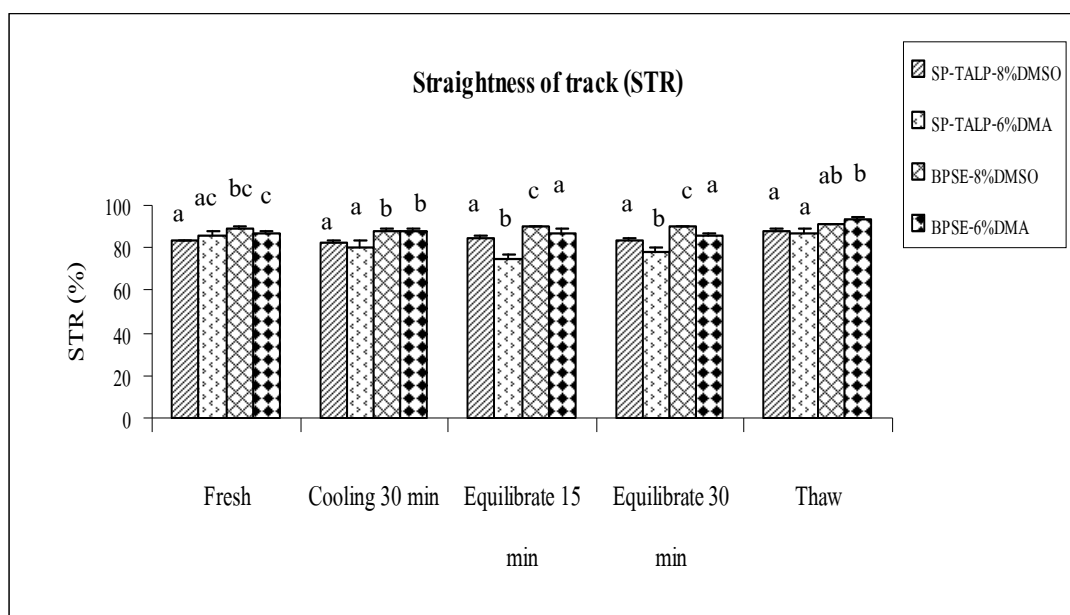
ภาพที่ 15 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า BCF อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 12 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Straightness of track (STR)

	Straightness of track (STR)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	83.00±0.91 ^a	82.00±0.91 ^a	85.00±0.91 ^a	83.75±0.48 ^a	87.75±1.25 ^a
SP-TALP + 6% DMA	85.25±0.25 ^{ac}	80.75±1.11 ^a	75.00±0.82 ^b	78.00±1.08 ^b	87.25±2.10 ^a
BPSE + 8% DMSO	89.50±1.85 ^{bc}	88.25±0.85 ^b	89.75±0.63 ^c	89.75±1.65 ^c	91.25±1.25 ^{ab}
BPSE + 6% DMA	86.50±0.65 ^c	88.00±1.58 ^b	87.25±0.75 ^a	86.00±0.71 ^a	93.25±1.31 ^b

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



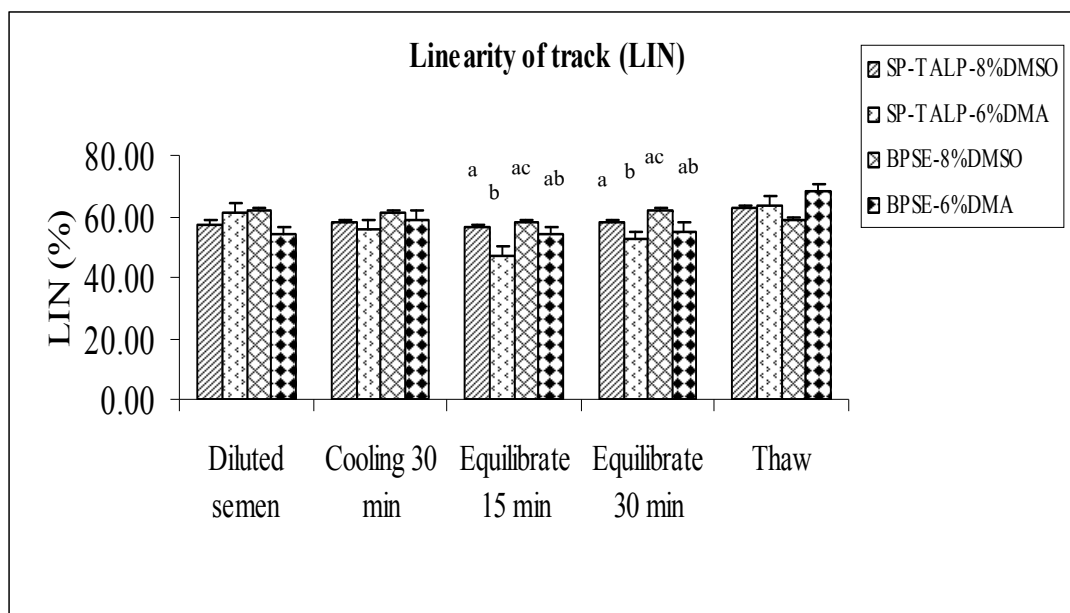
ภาพที่ 16 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า STR อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 ผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อ Linearity of track (LIN)

	Linearity of track (LIN)				
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 15 min	Equilibrate 30 min	Thaw
SP-TALP + 8% DMSO	57.50±1.19	57.75±0.75	56.25±1.38 ^a	57.75±1.49 ^a	62.50±2.25
SP-TALP + 6% DMA	61.00±2.04	56.00±1.08	47.25±0.85 ^b	52.25±1.44 ^b	63.75±6.14
BPSE + 8% DMSO	61.75±3.77	61.25±1.65	58.25±1.80 ^{ac}	61.75±1.93 ^{ac}	59.00±3.76
BPSE + 6% DMA	54.00±2.48	59.00±3.08	54.00±6.10 ^{ab}	55.00±2.04 ^{ab}	68.00±4.02

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 17 แสดงผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่า LIN อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดทดลอง ในตู้ปัมเปียงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์พบว่า ในกลุ่มของน้ำเชื้อรวมที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อโดยไม่ผ่านการแช่แข็ง (SP-TALP และ BPSE) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 58.00 ± 1.16 และ 46.25 ± 1.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 6 ชั่วโมง สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งด้วย SP-TALP + 8% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 10.25 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 5 ชั่วโมงและไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 6 ชั่วโมง ขณะที่ น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย SP-TALP + 6% DMA, BPSE + 8% DMSO และ BPSE + 6% DMA มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 11.75 ± 2.99 , 2.75 ± 1.89 และ 2.00 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเก็บรักษาได้นาน 3 ชั่วโมงโดยไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 4 ชั่วโมงดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 14 ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของอสุจิในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

Group	0 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Pooled semen+SP-TALP	83.00 ±0.82 ^{A,a}	83.25±0.96 ^{A,a}	80.75±0.96 ^{A,b}	79.75±1.26 ^{A,bc}	79.00±0.82 ^{A,c}	78.50±1.29 ^{A,c}	70.75±1.26 ^{A,d}	58.00±1.16 ^{A,e}
Pooled semen+BPSE	83.00±0.82 ^{A,a}	83.00±0.82 ^{A,a}	80.50±0.58 ^{A,b}	79.25±0.96 ^{A,b}	77.75±0.96 ^{A,c}	66.50±1.29 ^{B,d}	56.75±0.96 ^{B,e}	46.25±1.26 ^{B,f}
SP-TALP + 8% DMSO	51.50±5.32 ^{B,a}	47.50±1.91 ^{B,a}	31.50±2.65 ^{B,b}	27.75±1.50 ^{B,b}	22.25±3.59 ^{B,c}	16.50±4.36 ^{C,d}	10.25±2.21 ^{C,e}	0 ^{C,f}
SP-TALP + 6% DMA	34.50±13.89 ^{C,a}	30.25±13.96 ^{C,ab}	22.75±5.62 ^{C,bc}	17.50±5.00 ^{C,c}	11.75±2.99 ^{C,d}	0 ^{D,e}	0 ^{D,e}	0 ^{C,e}
BPSE + 8% DMSO	20.75±2.75 ^{D,a}	18.75±2.75 ^{D,a}	13.50±1.91 ^{D,b}	7.25±0.96 ^{D,c}	2.75±1.89 ^{D,d}	0 ^{D,d}	0 ^{D,d}	0 ^{C,e}
BPSE + 6% DMA	16.00±3.65 ^{D,a}	15.00±3.37 ^{D,a}	10.25±1.71 ^{D,b}	6.25±0.96 ^{D,c}	2.00±2.31 ^{D,d}	0 ^{D,d}	0 ^{D,d}	0 ^{C,d}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ABCD ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

abcdef ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

2. การเปรียบเทียบขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อลักษณะรูปร่างของอสุจีก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของขั้นตอนการแช่แข็งและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าขั้นตอนการแช่แข็งและชนิดของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิและค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจีก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งพบว่า ลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงหลังการแช่แข็งเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของอสุจิพบว่าอสุจิภายหลังการแช่แข็งมีลักษณะผิดปกติแบบ macrocephalic, bent tail, amorphous head, bent mid piece และ อสุจิที่ตาย มีค่าสูงกว่าอสุจีก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนลักษณะความผิดปกติแบบ cytoplasmic droplet ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 15)

รูปร่างของอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 79.83 ± 0.83 และ 81.75 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อสุจิที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 81.25 ± 1.10 และ 80.75 ± 0.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับรูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่า อสุจิที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่า 40.42 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยรูปร่างของอสุจิที่ปกติที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO, 6% DMA และอสุจิที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่า 50.17 ± 0.63 , 48.83 ± 1.27 และ 51.50 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ macrocephalic ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.58 ± 0.30 และ 2.67 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.92 ± 0.24 และ 2.17 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าในอสุจิที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่า 4.58 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ซึ่งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่า 3.33 ± 0.40 , 4.17 ± 0.33 และ 3.58 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ amorphous head ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.42 ± 0.30 และ 1.17 ± 0.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.08 ± 0.37 และ 2.58 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 6% DMA มีค่า 3.33 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO ซึ่งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.92 ± 0.44 , 1.92 ± 0.44 และ 3.00 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ bent tail ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 3.83 ± 0.49 และ 3.00 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 3.42 ± 0.58 และ 3.00 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่า 19.92 ± 0.46 ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO ซึ่งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่า 18.08 ± 0.51 , 18.67 ± 0.78 และ 16.50 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ bent mid piece ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.75 ± 0.28 และ 1.92 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.83 ± 0.25 และ 1.92 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 6% DMA มีค่า 19.92 ± 0.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO ซึ่งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.42 ± 0.30 , 2.42 ± 0.30 และ 4.67 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติแบบ cytoplasmic droplet ก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.83 ± 0.28 และ 1.83 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 1.58 ± 0.27 และ 1.83 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 6% DMA มีค่า 1.25 ± 0.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 2.08 ± 0.33 , 2.25 ± 0.38 และ 2.42 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

อสุจิที่ตายก่อนการแช่แข็งของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 8.75 ± 0.38 และ 7.67 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 6.92 ± 0.38 และ 7.75 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO ส่วนภายหลังการแช่แข็งพบว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 6% DMA มีค่า 18.92 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 22.00 ± 0.88 , 21.83 ± 0.76 และ 25.00 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ

Parameter	Prefreezing				Post thaw			
	1 Step		2 Step		1 Step		2 Step	
	DMSO	DMA	DMSO	DMA	DMSO	DMA	DMSO	DMA
Morphological normal	79.83±0.83	81.75±0.85	81.25±1.10	80.75±0.67	50.17±0.63 ^a	48.83±1.27 ^{ab}	51.50±0.85 ^{ac}	40.42±0.40 ^d
Macrocephalic	2.58±0.30	2.67±0.27	2.92±0.24	2.17±0.31	3.33±0.40 ^a	4.17±0.33 ^{ab}	3.58±0.30 ^a	4.58±0.27 ^b
Amorphous head	1.42±0.30 ^A	1.17±0.21 ^A	2.08±0.37 ^{AB}	2.58±0.44 ^B	1.92±0.44 ^a	3.33±0.40 ^b	1.92±0.44 ^a	3.00±0.32 ^{ab}
Bent tail	3.83±0.49	3.00±0.29	3.42±0.58	3.00±0.29	18.08±0.51 ^a	18.67±0.78 ^{ab}	16.50±0.29 ^a	19.92±0.46 ^b
Bent mid piece	1.75±0.28	1.92±0.30	1.83±0.25	1.92±0.30	2.42±0.30 ^a	4.83±0.33 ^b	2.42±0.30 ^a	4.67±0.33 ^b
Cytoplasmic droplet	1.83±0.28	1.83±0.28	1.58±0.27	1.83±0.28	2.08±0.33 ^a	1.25±0.25 ^b	2.25±0.38 ^a	2.42±0.30 ^a
Death	8.75±0.38 ^A	7.67±0.42 ^{AB}	6.92±0.38 ^B	7.75±0.38 ^{AB}	22.00±0.88 ^a	18.92±0.71 ^b	21.83±0.76 ^a	25.00±0.41 ^c

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ผลจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนและหลังการแช่แข็งด้วยวิธีแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอนพบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าคล้ายกับก่อนการแช่แข็งแต่มีความเร็วต่ำกว่า สำหรับค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL และ ALH มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับค่า STR และ LIN มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) ก่อนการแช่แข็ง กลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 89.33 ± 1.05 และ 92.83 ± 1.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 92.5 ± 1.75 และ 96.00 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 47.00 ± 8.82 และ 34.17 ± 4.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 40.83 ± 3.82 และ 28.00 ± 2.74 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA ดังตารางที่ 16 และภาพที่ 18

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile) ก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 34.17 ± 2.33 และ 46.67 ± 4.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 76.50 ± 2.52 และ 80.17 ± 2.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 10.83 ± 2.93 และ 11.17 ± 2.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 11.33 ± 2.19 และ 8.50 ± 2.19 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 17 และภาพที่ 19

ค่า VAP ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 79.33 ± 1.89 และ 83.78 ± 0.66 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 76.50 ± 2.52 และ 121.65 ± 3.60 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VAP ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 64.77 ± 3.56 และ 64.48 ± 1.98 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 59.38 ± 3.39 และ 65.20 ± 3.76 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VAP ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 18 และภาพที่ 20

ค่า VSL ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 66.58 ± 1.69 และ 63.35 ± 0.86 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 100.87 ± 2.38 และ 101.83 ± 3.38 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VSL ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 56.87 ± 3.00 และ 54.15 ± 1.20 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 52.70 ± 2.27 และ 58.03 ± 3.78 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VSL ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 19 และภาพที่ 21

ค่า VCL ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียว ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 119.62 ± 2.63 และ 137.72 ± 1.54 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 174.30 ± 4.36 และ 174.80 ± 3.42 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ ส่วนค่า VCL ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 76.85 ± 12.90 และ 89.00 ± 4.58 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 84.00 ± 6.93 และ 88.55 ± 4.83 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าค่า VCL ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 20 และภาพที่ 22

ค่า ALH ของอสุจิก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 5.12 ± 0.09 และ 6.10 ± 0.07 ไมโครเมตรตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 6.60 ± 0.17 และ 6.67 ± 0.07 ไมโครเมตรตามลำดับ ส่วนค่า

BCF ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 4.00 ± 0.23 และ 3.97 ± 0.39 ไมโครเมตรตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 3.65 ± 0.30 และ 3.62 ± 0.32 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่าค่า ALH ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 21 และภาพที่ 23

ค่า BCF ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 25.77 ± 0.40 และ 25.45 ± 0.83 เฮิรท์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 25.17 ± 1.08 และ 23.67 ± 0.68 เฮิรท์ตามลำดับ ส่วนค่า BCF ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 24.03 ± 2.06 และ 26.63 ± 1.16 เฮิรท์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 23.62 ± 2.54 และ 23.10 ± 3.06 เฮิรท์ตามลำดับ พบว่าค่า BCF ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 22 ภาพที่ 24

ค่า STR ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 83.33 ± 0.40 และ 75.17 ± 0.54 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 81.83 ± 0.60 และ 81.67 ± 0.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่า STR ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 88.00 ± 2.06 และ 86.00 ± 1.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 89.00 ± 1.84 และ 89.33 ± 1.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าค่า STR ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 23 ภาพที่ 25

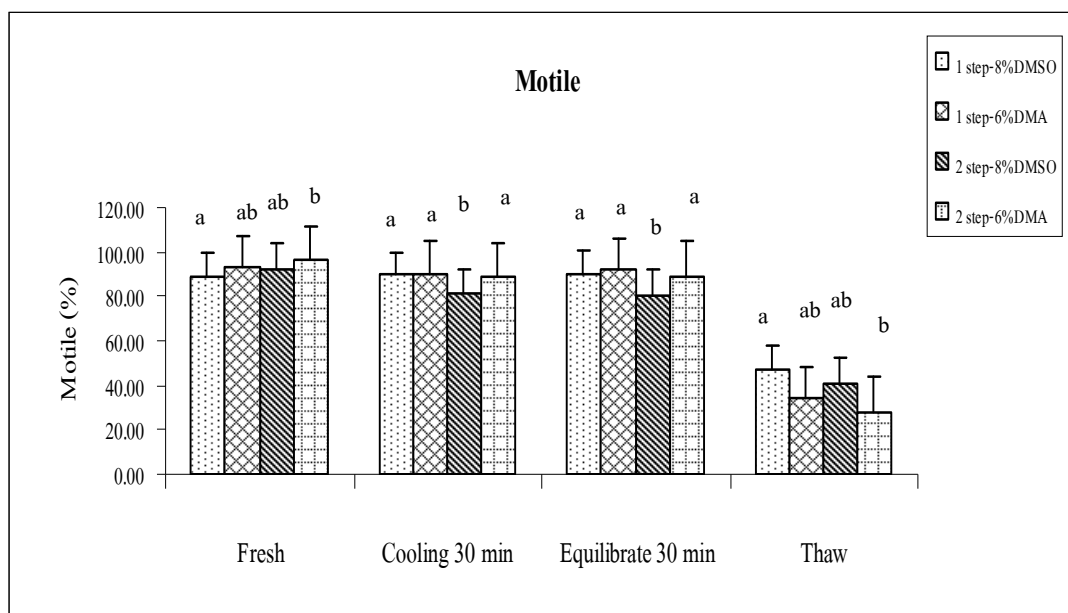
ค่า LIN ของอสุจีก่อนการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 57.17 ± 0.91 และ 47.67 ± 1.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 57.33 ± 0.71 และ 57.67 ± 0.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนค่า LIN ของอสุจิหลังการแช่แข็งกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 64.33 ± 2.01 และ 63.67 ± 2.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 65.33 ± 2.56 และ 68.00 ± 3.51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าค่า LIN ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 24 ภาพที่ 26

ตารางที่ 16 ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

	Motile			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	89.33±1.05 ^a	89.50±1.95 ^a	89.67±1.15 ^a	47.00±8.82 ^a
1 step- 6% DMA	92.83±1.85 ^{ab}	90.33±2.28 ^a	91.83±1.82 ^a	34.17±4.23 ^{ab}
2 step- 8% DMSO	92.5±1.75 ^{ab}	81.17±1.05 ^b	80.67±1.84 ^b	40.83±3.82 ^{ab}
2 step- 6% DMA	96.00±0.82 ^b	88.50±0.85 ^a	89.33±0.99 ^a	28.00±2.74 ^b

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสัณภูมิเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



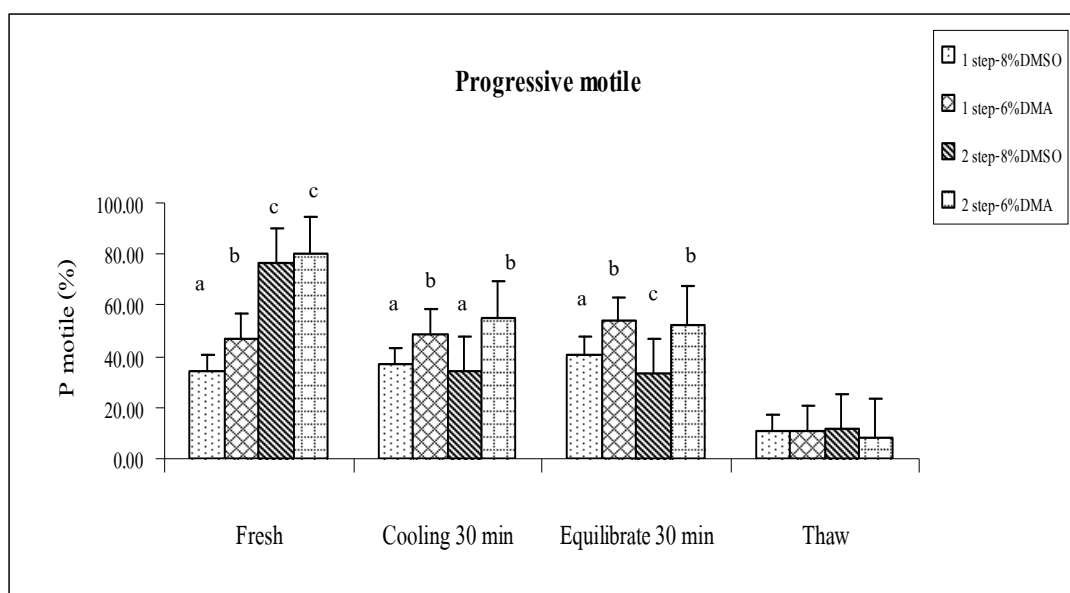
ภาพที่ 18 แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 17 ผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

	P Motile			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	34.17±2.33 ^a	36.83±2.73 ^a	40.67±2.81 ^a	10.83±2.93
1 step- 6% DMA	46.67±4.21 ^b	49.00±2.65 ^b	53.67±1.50 ^b	11.17±2.12
2 step- 8% DMSO	76.50±2.52 ^c	34.17±3.40 ^a	33.33±2.59 ^c	11.33±2.19
2 step- 6% DMA	80.17±2.90 ^c	54.67±2.86 ^b	52.33±1.23 ^b	8.50±2.19

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



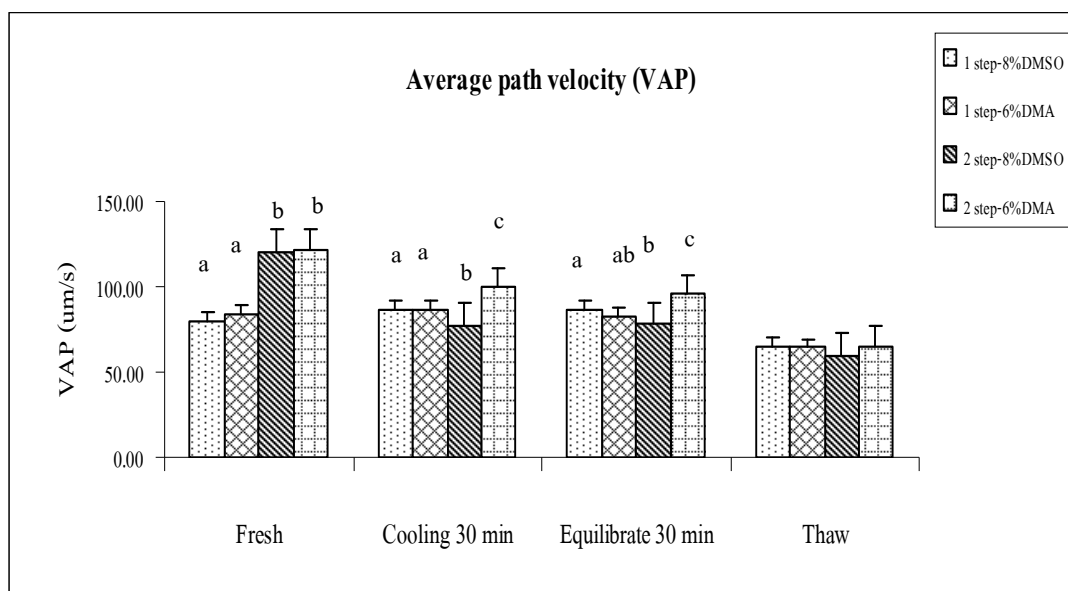
ภาพที่ 19 แสดงผลของการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 18 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อ Average path velocity (VAP)

	Average path velocity (VAP)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	79.33±1.89 ^a	87.12±2.16 ^a	86.53±1.10 ^a	64.77±3.56
1 step- 6% DMA	83.78±0.66 ^a	86.27±0.96 ^a	82.30±0.78 ^{ab}	64.48±1.98
2 step- 8% DMSO	120.72±3.24 ^b	77.28±1.36 ^b	77.72±3.22 ^b	59.38±3.39
2 step- 6% DMA	121.65±3.60 ^b	99.86±1.26 ^c	95.48±1.64 ^c	65.20±3.76

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



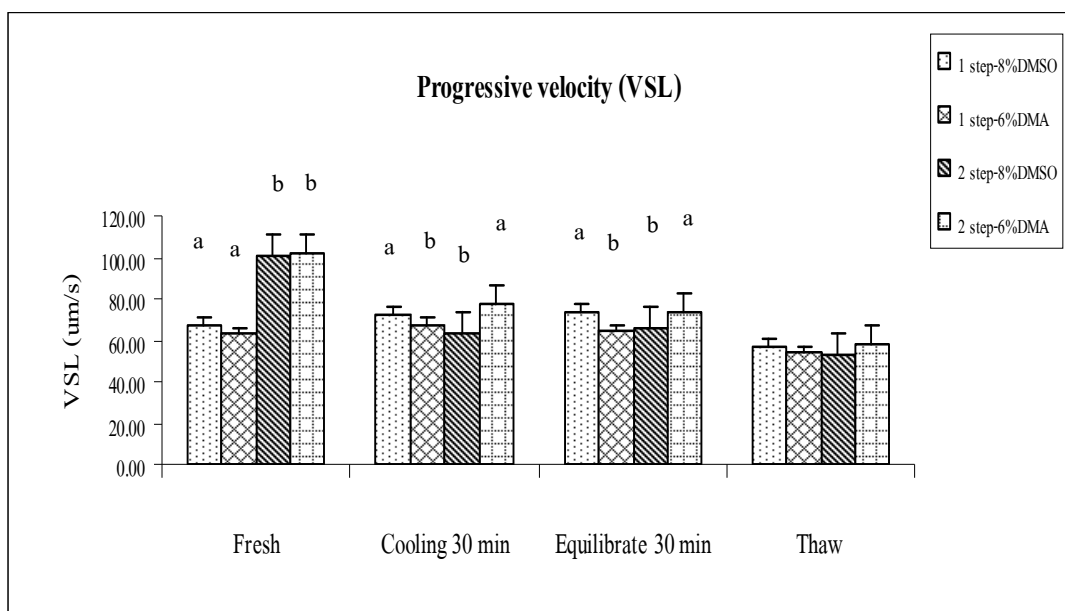
ภาพที่ 20 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อ ค่า VAP อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 19 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า VSL

	Progressive velocity (VSL)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	66.58±1.69 ^a	72.60±1.95 ^a	73.35±0.96 ^a	56.87±3.00
1 step- 6% DMA	63.35±0.86 ^a	67.72±0.99 ^b	64.07±0.34 ^b	54.15±1.20
2 step- 8% DMSO	100.87±2.38 ^b	63.62±1.60 ^b	65.30±2.77 ^b	52.70±2.27
2 step- 6% DMA	101.83±3.38 ^b	77.03±1.70 ^a	73.18±1.62 ^a	58.03±3.78

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



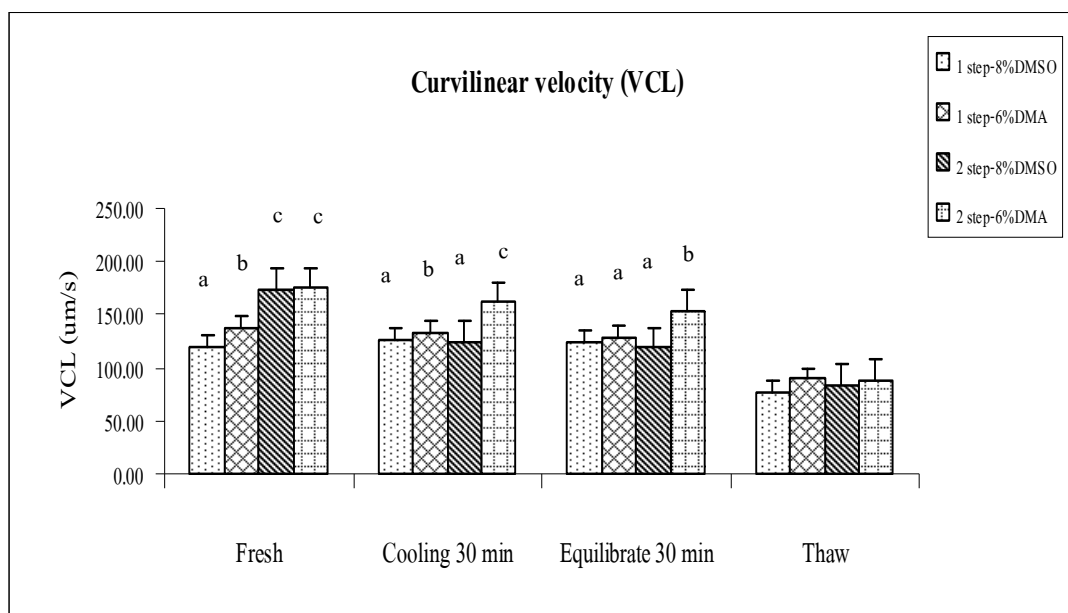
ภาพที่ 21 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า VSL อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 20 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า VCL

	Curvilinear velocity (VCL)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	119.62±2.63 ^a	126.13±1.10 ^a	124.38±1.37 ^a	76.85±12.90
1 step- 6% DMA	137.72±1.54 ^b	132.93±2.11 ^b	127.52±2.26 ^a	89.00±4.58
2 step- 8% DMSO	174.30±4.36 ^c	124.68±3.03 ^a	119.68±4.39 ^a	84.00±6.93
2 step- 6% DMA	174.80±3.42 ^c	161.30±1.30 ^c	153.88±2.43 ^b	88.55±4.83

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสคมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



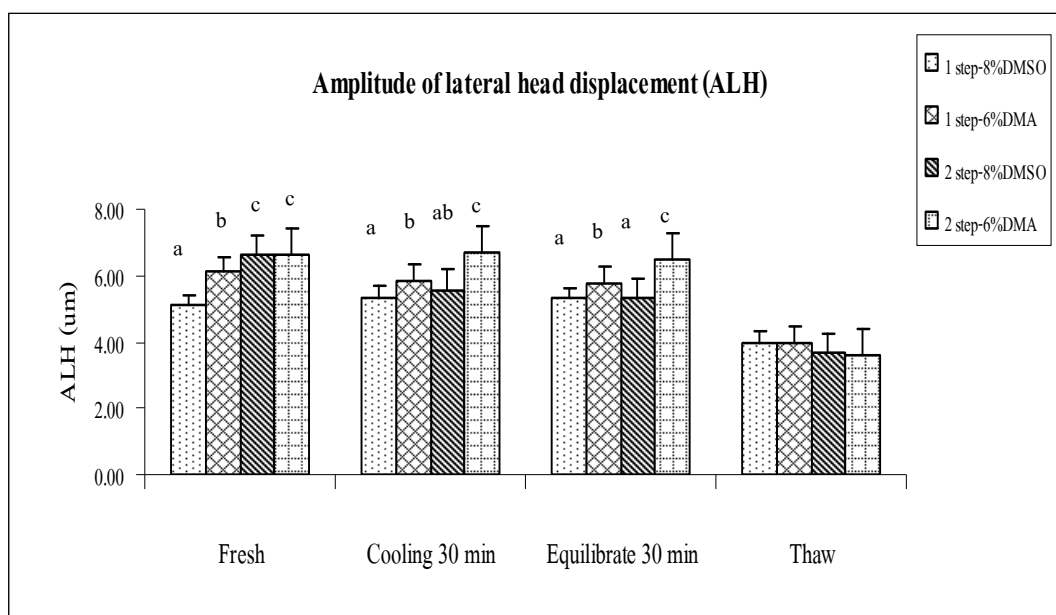
ภาพที่ 22 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า VCL อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 21 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า ALH

	Amplitude of lateral displacement (ALH)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	5.12±0.09 ^a	5.35±0.05 ^a	5.32±0.10 ^a	4.00±0.23
1 step- 6% DMA	6.10±0.07 ^b	5.83±0.10 ^b	5.77±0.09 ^b	3.97±0.39
2 step- 8% DMSO	6.60±0.17 ^c	5.57±0.22 ^{ab}	5.30±0.10 ^a	3.65±0.30
2 step- 6% DMA	6.67±0.07 ^c	6.73±0.08 ^c	6.52±0.10 ^c	3.62±0.32

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสคมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



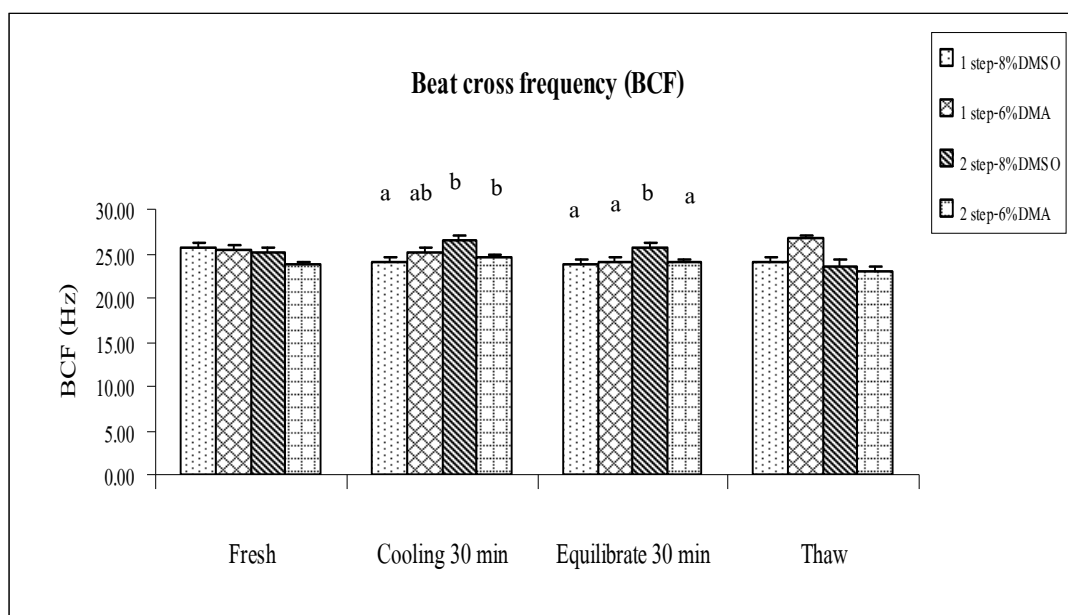
ภาพที่ 23 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า ALH อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 22 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า BCF

	Beat cross frequency (BCF)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	25.77±0.40	24.02±0.26 ^a	23.90±0.52 ^a	24.03±2.06
1 step- 6% DMA	25.45±0.83	25.20±1.04 ^{ab}	24.13±0.40 ^a	26.63±1.16
2 step- 8% DMSO	25.17±1.08	26.52±0.52 ^b	25.58±0.38 ^b	23.62±2.54
2 step- 6% DMA	23.67±0.68	24.55±0.58 ^{ab}	23.93±0.23 ^a	23.10±3.06

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



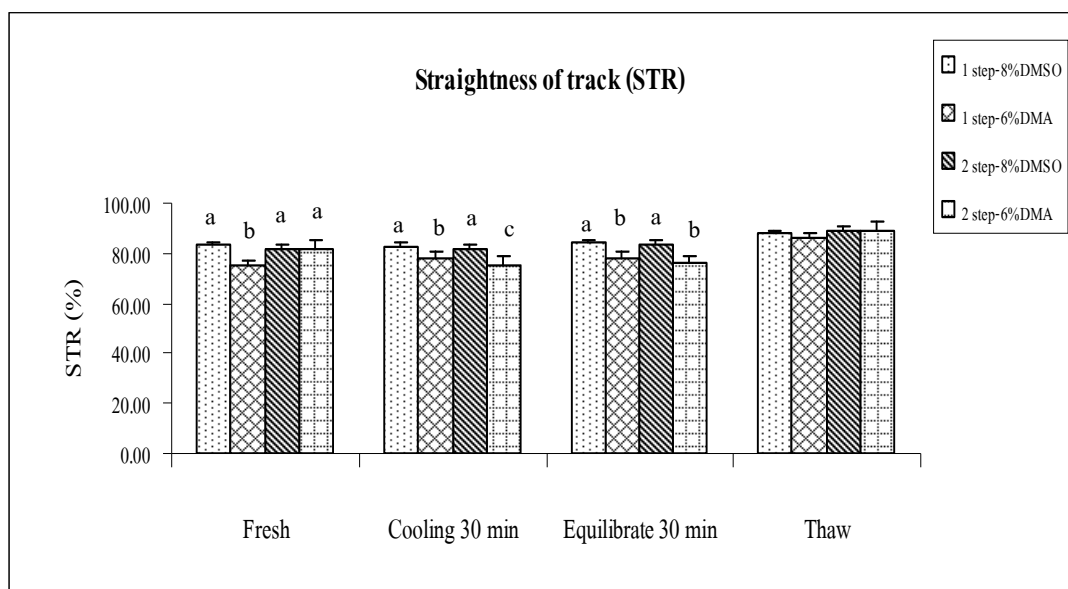
ภาพที่ 24 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า BCF อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 23 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า STR

	Straightness of track (STR)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	83.33±0.61 ^a	83.00±0.37 ^a	84.50±0.67 ^a	88.00±1.13
1 step- 6% DMA	75.17±0.54 ^b	78.17±0.40 ^b	78.00±0.63 ^b	86.00±1.81
2 step- 8% DMSO	81.83±0.60 ^a	81.83±1.49 ^a	83.50±1.23 ^a	89.00±1.84
2 step- 6% DMA	81.67±0.49 ^a	75.33±1.02 ^c	75.83±0.70 ^b	89.33±1.33

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสคัมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



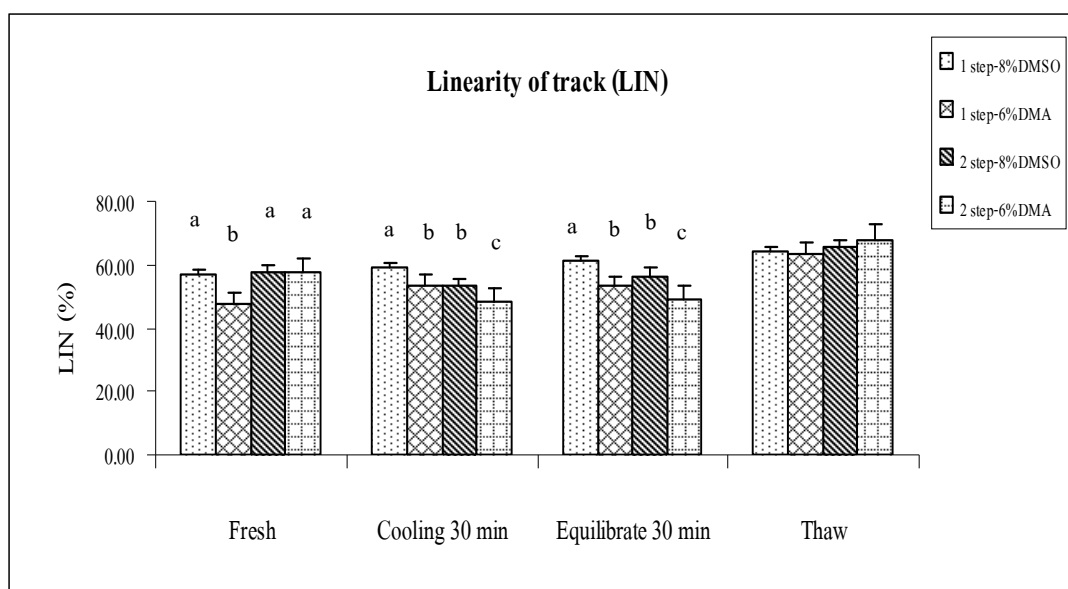
ภาพที่ 25 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า STR อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 24 ผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า LIN

	Linearity of track (LIN)			
	Fresh	Cooling 30 min	Equilibrate 30 min	Thaw
1 step- 8% DMSO	57.17±0.91 ^a	59.17±0.87 ^a	61.17±0.95 ^a	64.33±2.01
1 step- 6% DMA	47.67±1.14 ^b	53.33±0.67 ^b	53.00±0.77 ^b	63.67±2.11
2 step- 8% DMSO	57.33±0.71 ^a	53.00±2.02 ^b	56.33±2.28 ^b	65.33±2.56
2 step- 6% DMA	57.67±0.99 ^a	48.33±1.33 ^c	49.00±0.81 ^c	68.00±3.51

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสคัมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 26 แสดงผลของการแช่แข็งแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอนต่อค่า LIN อักษรเหนือแท่งแผนภูมิที่แตกต่างกันในช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดทดลองในตู้ บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 1 step + 8% DMSO และ 2 step + 8% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 9.25 ± 2.63 และ 7.25 ± 1.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 5 ชั่วโมงและไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 6 ชั่วโมง ขณะที่น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 1 step + 6% DMA และ 2 step + 6% DMA มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 2.50 ± 1.91 และ 1.25 ± 1.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาได้นาน 3 ชั่วโมงโดยไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 4 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของอสุจิในหลอดทดลองในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

Group	0 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
1step + 8% DMSO	46.50±1.92 ^{A,a}	44.00±2.83 ^{A,a}	31.75±0.69 ^{A,b}	26.75±1.50 ^{A,b}	20.25±3.78 ^{A,c}	14.50±4.44 ^{A,d}	9.25±2.63 ^{A,e}	0 ^f
1step + 6% DMA	30.25±8.65 ^{B,a}	16.25±2.63 ^{B,b}	11.00±1.41 ^{B,c}	7.00±1.41 ^{B,cd}	2.50±1.91 ^{B,de}	0 ^{B,e}	0 ^{B,e}	0 ^e
2step + 8% DMSO	46.00±6.48 ^{A,a}	42.00±3.65 ^{A,a}	32.75±3.30 ^{A,b}	28.75±2.99 ^{A,b}	20.25±3.49 ^{A,c}	14.00±2.71 ^{A,d}	7.25±1.89 ^{A,e}	0 ^f
2step + 6% DMA	25.75±2.63 ^{B,a}	16.50±1.73 ^{B,b}	9.25±2.21 ^{B,c}	4.75±1.26 ^{B,d}	1.25±1.50 ^{B,e}	0 ^{B,e}	0 ^{B,e}	0 ^e

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

^{abcdef} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

วิจารณ์

การรีดเก็บน้ำเชื้อในไก่อสามเหลืองเพื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยมีการนำมาตรวจคุณภาพก่อนการแช่แข็งพบว่า ปริมาตรของน้ำเชื้อรวมเฉลี่ยเท่ากับ 2.22 มิลลิลิตรหรือมีปริมาตรของน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.22 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นเฉลี่ย 3,463.75 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.82 และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 89.1 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีความใกล้เคียงกับน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองไทยที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ สุนทรและคณะ (2548) ได้รายงานคุณภาพของน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองไทยโดยการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์จำนวน 20 ตัว พบว่ามีความเข้มข้นเฉลี่ย 2,950 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.5 และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ภูมิรินทร์และคณะ(2549) รายงานการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองไทยก่อนการแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ 20 ตัวมีปริมาตรน้ำเชื้อรวมเฉลี่ย 2.55 มิลลิลิตรหรือมีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.11 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นเฉลี่ย 2.25 พันล้านตัว/มิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 67.78 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าความดันสารละลายมีค่า 328-402 mOsmol/kg พบว่ามีค่ามากกว่าค่าความดันสารละลายของไก่อว, นกกระทาและห่าน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 320-340, 270-345 และ 250-260 mOsmol/kg ตามลำดับ (Chelmonska *et al.*, 2006)

การศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิโดยการย้อมสี eosin-nigrosin พบว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะรูปร่างปกติมีค่าสูงที่สุด คือ 57.32 ± 0.40 และ 56.67 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE ร่วมกับ 6% DMA มีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะรูปร่างปกติต่ำที่สุด 45.08 ± 0.42 และ 40.75 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของอสุจิภายหลังการแช่แข็งพบว่า มีลักษณะผิดปกติแบบ Bent tail มากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ(motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH มีค่าลดลงตามกระบวนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับค่า STR, และ LIN มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการศึกษามีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งอสุจียังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้เหมือนกับก่อนการแช่แข็งแต่

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่จะน้อยกว่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีผลเสียต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อให้เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ปีก และมีประสิทธิภาพในการผสมติดที่สูง (Donoghue and Wishart, 2000) สารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรจะมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันไปซึ่งก็ได้มีรายงานการศึกษาผลของส่วนประกอบแต่ละชนิดต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษา Sexton (1988) ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่วงที่เก็บรักษาไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE มีผลต่อการเสื่อมสภาพของอสุจิน้อยที่สุด รองลงมาคือ BPSE ร่วมกับ Tobramycin, Minnesota Turkey Growers Association (MTGA) ร่วมกับ Gentamicin , Instruments for Veterinary Medicine (IMV) และ MTGA ตามลำดับ Sexton (1977) ศึกษาส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อไก่วงพบว่าเมื่อไม่เติมส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อบางชนิดจะมีผลทำให้อัตราการผสมของน้ำเชื้อลดลง เช่น สารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ (TES, potassium phosphate) และ neutral salt (citrate, acetate, chloride) ในขณะที่การขาด น้ำตาลฟลูคโตสและโซเดียมกลูตาเมต จะไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด

สำหรับรายงานการศึกษานิตของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองไทย และไก่ที่เลี้ยงในประเทศไทยได้มีการศึกษาดังนี้ เทวินทร์และคณะ (2550ก) ได้ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่ 41 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, กล้วย และพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด โดยเปรียบเทียบสูตรของสารเจือจางน้ำเชื้อ 5 สูตร คือ BPSE, Prefreezing Lake, Tselutin et al. modified, Schramm และ IGGKP พบว่า น้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, กล้วย สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร IGGKP และ BPSE ให้คุณภาพอสุจิภายหลังการเก็บรักษาสูงสุด ส่วนพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร IGGKP ให้ผลดีที่สุด สุนทรและคณะ(2548) ได้ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางโดยสารเจือจาง BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย BPSE มีการเคลื่อนที่รายตัวดีที่สุดและมีการเคลื่อนที่นาน 6 วัน ในขณะที่การเจือจางด้วย Kiev มีการเคลื่อนที่ต่ำสุดและมีการเคลื่อนที่เพียง 1 วัน เมื่อทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่เจือจางและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่ามีอัตราการผสมติดของน้ำยาเจือจาง BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev คือ 44.64, 21.68 และ 4.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 4 และ 10 องศาเซลเซียส และชนิดของน้ำยาเจือจาง BPSE และ Egg yolk-Tris พบว่าอัตราการฟักไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเก็บ

รักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ส่งผลให้อัตราการผสมติดและอัตราการฟักสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE ซึ่งเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับสัตว์ปีกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์ปีกหลายชนิดและสารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ซึ่งเป็นสูตรสำหรับการเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ที่ดัดแปลงจาก Tyrod's medium โดยการเพิ่ม albumin, lactate และ pyruvate พบว่าส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองชนิดที่ใช้มีความแตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้วซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาความสอดคล้องกับการศึกษาของ Sontakke *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ Blue rock pigeon (*Columba livia*) ทั้งแบบแช่เย็นและแช่แข็งพบว่า SP-TALP มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Blue rock pigeon ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารเจือจางน้ำเชื้อ turkey sperm extender, chicken sperm extender, mouse sperm extender, Ham's F-10 และ Tyrode's medium โดยส่วนใหญ่เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับสัตว์ปีก แสดงให้เห็นว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับสัตว์แต่ละชนิดจะมีความเหมาะสมไม่เหมือนกันแม้ว่าจะเป็นสัตว์ที่อยู่ในตระกูล(species) เดียวกันและกล่าวว่า albumin, lactate และ pyruvate มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน Bakst and Cecil (1992) ศึกษาผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการ เคลื่อนที่และการผสมติดของอสุจิไก่อวง พบว่า bovine serum albumin ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงขึ้นและอสุจิมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้นแต่ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด นอกจากนี้พบว่า fatty acid-free BSA, globulin-free BSA และ fraction V BSA ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงขึ้นและอสุจิมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้นเช่นกัน รวมทั้งมีรายงานว่า bovine serum albumin มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Klem *et al.*, 1986)

การศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์ปีกจากผลการทดลองพบว่าการใช้ DMSO ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองชนิดพบว่าลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ปกติมีค่าสูงกว่าการใช้ DMA ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง รวมทั้งอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติและอสุจิที่ตายมีค่าน้อยกว่าทั้งก่อนและหลังการแช่แข็งนอกจากนี้ส่วนของพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิก็ให้ผลเช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์ปีกจากการที่พบว่ากลีเซอรอลมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมที่สุดแต่เนื่องจากพบว่ากลีเซอรอลมีผลต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งด้วยกลีเซอรอล (Donoghue and

Wishart, 2000) มีการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กลีเซอรอลพบว่า การกำจัดกลีเซอรอลก่อนนำไปผสมจะช่วยทำให้อัตราการผสมติดสูงขึ้น ขณะที่ Long and Kulkarni (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการกำจัดกลีเซอรอลจากน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่า การใช้วิธี Accudenz centrifugation จะทำให้อัตราการผสมติดเพิ่มขึ้น 17.90-37.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการกำจัดกลีเซอรอลออกก่อนการผสม ขณะที่วิธี Dialyze มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลงจาก 26.4 เปอร์เซ็นต์ถึง 0 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าวิธีการ Dialyze และ Accudenz centrifugation จะช่วยกำจัดกลีเซอรอลก่อนการผสมแต่พบว่ามีข้อเสียคือเสียเวลาและอาจทำให้เกิดอันตรายต่ออสุจิระหว่างปฏิบัติงานได้ Tselutin *et al.* (1999) รายงานการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่ออสุจิไก่ พบว่ากลีเซอรอลมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ DMA และ DMSO ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของการแช่แข็งพบว่า การใช้ DMA ร่วมกับการแช่แข็งแบบเม็ด (pellet) ทำให้อัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้กลีเซอรอล และการใช้ DMA ร่วมกับการแช่แข็งโดยใส่ในหลอดฟาง

Sexton (1975) รายงานการใช้ DMSO สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ว่ามีข้อจำกัดในการใช้คือ DMSO จะมีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อใช้กับสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยอาจมีสาเหตุเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารเจือจางน้ำเชื้อซึ่งมีผลทำให้อสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ BPSE และ SP-TALP โดยทั้งสองชนิดมีส่วนประกอบของฟอสเฟตและปริมาณที่แตกต่างกันดังที่แสดงมาก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้ DMSO ร่วมกับ SP-TALP ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ร่วมกับ BPSE โดย SP-TALP มีส่วนประกอบของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ขณะที่ BPSE มีส่วนประกอบของไดโพแทสเซียมฟอสเฟตและโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต จากผลการทดลองพบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่า DMSO ที่ใช้ร่วมกับสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการแช่แข็งสูงกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต นอกจากนี้ Schramm (1976) รายงานว่าความเป็นพิษของ DMSO ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ SP-TALP จะช่วยลดความเป็นพิษต่ออสุจิ

รายงานการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ Lukaszewicz (2002) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อของ White Italian gander โดยใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ EK diluent ร่วมกับ

6% DMF พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของรูปร่างของอสุจิคือ รูปร่างของอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงภายหลังการแช่แข็งและลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติร่วมกับอสุจิที่ตายมีค่าสูงขึ้นภายหลังการแช่แข็ง นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าจำนวนอสุจิที่อยู่รอดภายหลังการแช่แข็งไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งดังรายงานของ Lukaszewicz (2001) ที่ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อห่านที่มีรูปร่างปกติก่อนการแช่แข็งสูงโดยใช้ DMA เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีอสุจิที่มีลักษณะปกติเพียง 29 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญในการเลือกสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Sontakke *et al.* (2004) รายงานว่า DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อของ Blue rock pigeon มากกว่าการใช้ polyethylene glycol และกลีเซอรอล Han *et al.* (2005) รายงานว่า DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็ดมากกว่าการใช้กลีเซอรอล, dimethyl acetamide และ dimethyl formamide เนื่องจากมีรายงานการศึกษาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสำหรับสัตว์ปีกมากมายหลายชนิดซึ่งให้ผลที่มีความแตกต่างกันไปทั้งนี้ควรจะต้องมีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่ออสุจิ, ความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับสัตว์แต่ละชนิด, อุณหภูมิสำหรับการปรับสภาพ, ระยะเวลาการปรับสภาพ (equilibration time), รูปแบบการแช่แข็ง, อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

การศึกษาผลของขั้นตอนการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิพบว่าลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงภายหลังการแช่แข็งโดยกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติและกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่าต่ำที่สุด ขณะที่ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติและอสุจิที่ตายมีค่าสูงขึ้นภายหลังการแช่แข็งโดยกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่าสูงที่สุดและกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่าต่ำที่สุดแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO มีผลต่อลักษณะรูปร่างของอสุจิใกล้เคียงกับการแช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO สำหรับผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH, มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับค่า STR และ LIN มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งแสดงให้เห็นว่า ภายหลังการแช่แข็งทั้งแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอนอสุจียังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเหมือนก่อนการแช่แข็งแต่มีความเร็วลดลง

สำหรับขั้นตอนการแช่แข็งอสุจิของสัตว์ปีกนั้น จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าเป็นการแช่แข็งแบบสองขั้นตอนเพื่อเป็นการลดอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับอสุจิจากสภาวะแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นมาก เมื่อมีการเติมส่วนประกอบสำหรับการแช่แข็ง โดยเฉพาะในส่วนของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Tselutin *et al.* (1999) ได้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกเมื่อเติม DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 11 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าแรงดันออสโมติก 870 ± 42 , $1,178 \pm 27$, $1,474 \pm 45$ และ $1,902 \pm 118$ mOsm ตามลำดับ ขณะที่แรงดันออสโมติกเมื่อเติม DMA ที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 11 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าแรงดันออสโมติก $1,033 \pm 43$, $1,457 \pm 54$, $1,845 \pm 35$ และ $3,362 \pm 60$ mOsm ตามลำดับ รวมทั้งอธิบายว่าผลเสียที่เกิดขึ้นกับอสุจิอาจขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเพียงอย่างเดียวแม้ว่าความดันออสโมติกจะเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้น จากผลการศึกษาครั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนของอสุจิพบว่าค่า VAP, VSL และ VCL ของกลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวเมื่อมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งแล้วนำไปวัดค่าทันทีพบว่ามีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนและเมื่อผ่านขั้นตอนการปรับสภาพ (equilibrate) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนและสูงกว่าในช่วงแรกระยะหลังจากนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าดังกล่าวมีแนวโน้มคล้ายกันทั้งสองกลุ่มทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากในระยะแรกของขบวนการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวอสุจิต้องอยู่ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งเมื่อมีการเคลื่อนที่ของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเข้าสู่ภายในเซลล์และมีการเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์มีผลทำให้สมดุลของแรงดันออสโมติกเปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิตีขึ้นตามมา

สำหรับการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยวิธี computer-aided sperm motility analysis ได้มีรายงานการศึกษาในอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น หนูแฮมสเตอร์ สิงโต เสือ เสือดำ กระต่าย โค รวมทั้งมนุษย์ สำหรับการศึกษาในอสุจิของสัตว์ปีกพบว่ามีข้อมูลน้อยมากจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีลักษณะสอดคล้องกับรายงานของ Sontakke *et al.* (2004) ที่ศึกษาค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนและหลังการแช่แข็งของ Blue rock pigeon (*Columba livia*) พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีการลดลงของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ คือ VAP, VSL, VCL, BCF, ALH, STR และ LIN นอกจากนี้ Blesbois *et al.* (2007) ได้รายงานการศึกษาค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนและหลังการแช่แข็งของไก่พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีการลดลงของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ คือ VAP, VSL, STR, LIN, percentage of motile sperm, percentage of progressive motile และ percentage of rapid spermatozoa King *et al.* (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิตับลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิในไก่วง พบว่า

VAP, VSL, VCL, BCF และ LIN จะมีค่าสูงในกลุ่มที่มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเคลื่อนที่แบบปานกลางและแบบช้า นอกจากนี้ค่า VSL, BCF และ LIN มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิไถ่วง

การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดทดลอง ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO ทั้งการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอน อสุจิมีการเคลื่อนที่ได้ 5 ชั่วโมงและไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่วนน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย BPSE ร่วมกับ 8% DMSO หรือ 6% DMA ทั้งการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอน อสุจิมีการเคลื่อนที่ได้ 3 ชั่วโมงและไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เวลา 4 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า สารเจือจางน้ำเชื้อ, สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง, ขั้นตอนของการแช่แข็งและระยะเวลาของการเก็บรักษาน้ำเชื้อในหลอดทดลองมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิเมื่อทำการอุ่นละลาย Fujihara และ Koga (1984) รายงานว่าเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายนอกร่างกาย การเคลื่อนที่ของอสุจิตลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเสื่อมสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิที่มากขึ้นจากภาวะ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นตลอดเวลา มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิส่วนที่เป็นฟอสโฟไลปิดจะมีการเสื่อมสลายเปลี่ยนเป็น monoaldehyde เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้นทำให้อสุจิตสูญเสียการเคลื่อนที่หรือตายมากขึ้นตลอดเวลา

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียว สามารถเป็นทางเลือกสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่สามเหลือง

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อ สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง และขั้นตอนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นควรมีการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ไปผสมเทียมให้กับแม่ไก่ เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิต่อไป รวมทั้งควรมีการศึกษา อัตราส่วนสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อ อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ รูปแบบของการแช่แข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการอุณหภูมิต่ำน้ำเชื้อแช่แข็ง ปริมาณความเข้มข้นของอสุจิที่เหมาะสมในการผสมเทียม และระยะเวลาในการผสมเทียม เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่สมบูรณ์และสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, ยุพิน ผาสุก, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, จุฬานิช น่วมสุข และ พรจิตร สอนสีดา. 2550ก. ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่, น. 196-203. ใน รายงาน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

_____, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, สจ๊ กัณหาเรียง, สราวุธ ศรีงาม และ ยุพิน ผาสุก. 2550ข. ผลของชนิดน้ำยาเจือจางและชนิด cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษา, น. 188-195. ใน รายงาน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

_____, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, สจ๊ กัณหา และ ยุพิน ผาสุก. 2550ค. การศึกษาผลการผสมติดจากการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง, น. 180-187. ใน รายงาน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

นิรนาม. 2550. แหล่งที่มา: <http://webhost.tsu.ac.th/491011076/kfc06.htm>, 10 เมษายน 2550.

ปฐุม เลาหะเกษตร. 2540. การเลี้ยงสัตว์ปีก. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, กรุงเทพมหานคร.

ภูมินทร์ สุมาลย์, สุรศักดิ์ จันทิ, อเนก แสนกอง และ นงเยาว์ สุวรรณธาดา. 2549. ระดับความเข้มข้นของเอทิลีนไกลคอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็ง, น. 179-183. ใน ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32, กรุงเทพฯ.

สราวุธ ศรีงาม, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, มนต์ชัย ดวงจินดา และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2549. ผลของระยะเวลาในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อไปที่ 5 °C ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทย. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.16(1): 18-26.

สุจินต์ สิมารักษ์. 2532. **สรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ปีก**. โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุชาติ สงวนพันธุ์. 2547. ลูกผสมไก่เบตงและไก่สามเหลืง. **วารสารสัตวบก**11(130): 88-91.

สุนทร สุนาทย์, เทิดศักดิ์ ชมชื่นจิตร, กุลภัทร โพธิกนิษฐ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2547.
การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทย. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.**14(1): 26-33.

_____, สราวุธ ศรีงาม อติศักดิ์ สังข์แก้ว อภิชัย พูลชัย และกังวาน กาญจนพงศ์กิจ.
2548. การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางและเก็บ
รักษาโดยน้ำยาเจือจาง BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.**
15(1): 18-27

อติศักดิ์ สังข์แก้ว ประยงค์ แสงเรืองศรี กิ่งกาญจน์ สาระชู วีระศักดิ์ วงศ์ศรีแก้ว สุณิรัตน์ เอี่ยม
ละมัย มงคลโปร่งเจริญ ชัยวัฒน์ จรัสแสง และ พงษ์ธร สุวรรณธาดา. 2545. ระดับ
ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็ง. **วารสาร
สัตวแพทยศาสตร์ มข.**12(1): 51-62

Bakst, M.R. and B. JR. Howarth. 1975. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa
examined with the transmission electron microscope. **Biol. Reprod.** 12: 632-640.

_____ and H.C. Cecil. 1992. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of
turkey spermatozoa before and after storage. **J Reprod. Fert.** 94: 287-293.

Blesbois E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poult Sci J.**
63: 213-222.

- Blesbois E. , F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, L. Besnard , D. Gourichon , G. Coquerelle, P. Rault and M. Tixier-Boichard. 2007. Semen cryopreservation for ex-situ management of genetic diversity in chickens ; creation of the French Avian Cryobank. **Poult. Sci.** 8: 550-565.
- Burrows, W.H. and J.P. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poult. Sci.** 16: 19-24.
- Buss, E.G. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. **Poult. Sci.** 72: 944-954.
- Calvert, J.A. 1978. **Artificial insemination in poultry. Bulletin 213.** Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, England.
- Chelmonska, B., E. Lukaszewicz, A. Kowalczyk, and A. Jerysz. 2006. The effect of DMA level on morphology and fertilizing ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) sperm. **Theriogenology**.65:451-458
- Crawford, R.D. 1990. **Poultry breeding and genetics.** Elsevier science publishing company INC, Netherland.
- Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. **Anim.Reprod.Sci.** 62: 213-232.
- Fujihara, N., and O. Koga, 1984. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 7:385–390.
- Girija, D. L. and S. Shivaji. 1994. Computerized analysis of motility parameters of hamster spermatozoa during maturation. **Mol Reprod Dev.** 38: 94-106.

Han, X.F., Z.Y. Niu, F.Z. Liu and C.S. Yang. 2005. Effects of diluents, cryoprotectant, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen.

Int J. Poult. Sci. 4: 197-201.

http://campus.murraystate.edu/academic/faculty/terry.derting/cva_atlases/canduck/Image016.jpg

(2008)

<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/sperm3.jpg> (2008)

King, L.M., D.R. Holsberger and Donoghue A.M. 2000. Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in Turkeys. **J.of Andrology.** 21: 65-71.

Klem, M.E., J.L. Kreider, J.B. Pruitt and G.D. Potter. 1986. Motility and fertility of equine spermatozoa extended in bovine serum albumin and sucrose. **Theriogenology.** 26: 569-576

Lake, P.E. and Stewart J.M. 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen-an improved method. **Br Poult Sci.** 19: 187-194.

Long, J.A. and G. Kulkaarni. 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol exposed poultry semen. **Poult. Sci.** 83: 1594-1601.

Lukaszewicz, E. 2001. Effective of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. **Theriogenology.** 55: 1819-29.

_____. 2002. An effective method for freezing white Italian gander semen. **Theriogenology.** 58: 19-27.

- McIntosh, J.R. and K.R. Porter. 1967. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. **J. Cell Biol.** 35: 153.
- Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 39: 1171-1180.
- Polge, C. 1951. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -70 °C. **Nature.** 167: 949-950.
- Polge, C. and A.S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature.** 164: 666.
- SAS. 2003. **SAS/STAT User's Guide: Statistic.** SAS institute, Inc., Cary, North Carolina.
- Schramm, T.J. 1976. Effect of diluent components on fertilizing capacity of chicken semen. **J. Reprod. Fertil.** 44: 120-126.
- Seigneurin, F. and Blesbois E. 1995. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. **Theriogenology.** 43: 1351-1358.
- Sexton, T.J. 1975. Relationship of the method addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. **Poult Sci.** 54: 845-848.
- _____. 1977. A new poultry semen extender. 5. Relationship of diluent components to cytotoxic effects of dimethylsulfoxide on turkey spermatozoa. **Poult Sci.** 59: 1142-1144.
- _____. 1980. Optimal rate for cooling chicken semen from +5 °C to -196 °C. **Poult Sci.** 59: 2765-2770.

- Shaffner, C.S., E.W. Henderson and C.G. Card. 1941. Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. **Poult Sci.** 20: 259-265.
- Shivaji, S., J. Peedicayil and D. Girija. 1995. Analysis of the motility parameter of in vitro hyperactivated hamster spermatozoa. **Mol Reprod Dev.** 42: 325-33.
- Soley, J.T. and H.B. Groenewald. 1999. Reproduction, pp. 129-158. *In* D.C. Deeming, ed. **The ostrich biology, production and health.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Sontakke, S.D., G. Umapathy, V. Sivaram, S.D. Kholkute and S. Shivaji. 2004. Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). **Theriogenology.** 62: 139-153.
- Tselutin L., L. Narubina, T. Maorodina and B. Tur. 1995. Cryopreservation of poultry semen. **Br Poult Sci.** 36: 805-811.
- _____, F. Seigneurin and E. Blesbois. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poult. Sci.** 78: 586-590.
- Van Voorst, A. and F.R. Leenstra. 1995. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. **Poult. Sci.** 74: 136-140.
- Yanagimachi, R. and R.J. Teichman. 1972. Cytochemical demonstration of acrosome proteinase in mammalian and avian spermatozoa by a silver proteinate method. **Biol. Reprod.** 6: 87.
- Yang, N. and R.-S. Jiang. 2005. Recent advances in breeding for quality chicken. **World's Poult. Sci.J.** 61: 373-381.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายวีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 สิงหาคม 2518
สถานที่เกิด	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
ประวัติการศึกษา	2530-2536 มัธยมศึกษาตอนต้นและมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนประจวบวิทยาลัย 2536-2542 สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นายสัตวแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลสัตว์บ้านหมอรั้งหมา
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	2536-2542 ทุนการศึกษาจากมูลนิธินายห้างโรงปูนผู้หนึ่ง 2549-2550 ทุนการศึกษาจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์