

บทที่ 2

การตรวจเอกซเรย์

2.1 น้ำเชื้อ (semen)

น้ำเชื้อประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ส่วนที่เป็นเซลล์อสุจิ (spermatozoa) และส่วนที่เป็นของเหลว (seminal plasma) เซลล์อสุจิผลิตจาก sertoli cells ใน seminiferous tubule ส่วนที่เป็นของเหลวผลิตจากต่อมร่วม (accessory glands) โดยปกติส่วนที่เป็นของเหลวของน้ำเชื้อโคมาจาก epididymis และ vas deferens 5-10 เปอร์เซ็นต์, ต่อมน้ำกาม (vesicular glands) 60-80 เปอร์เซ็นต์, ต่อมลูกหมาก (prostate gland) 10 เปอร์เซ็นต์ และต่อมข้างท่อปัสสาวะ (bulbourethral glands หรือ Cowper's glands) 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (Bearden and Fuquay, 1984)

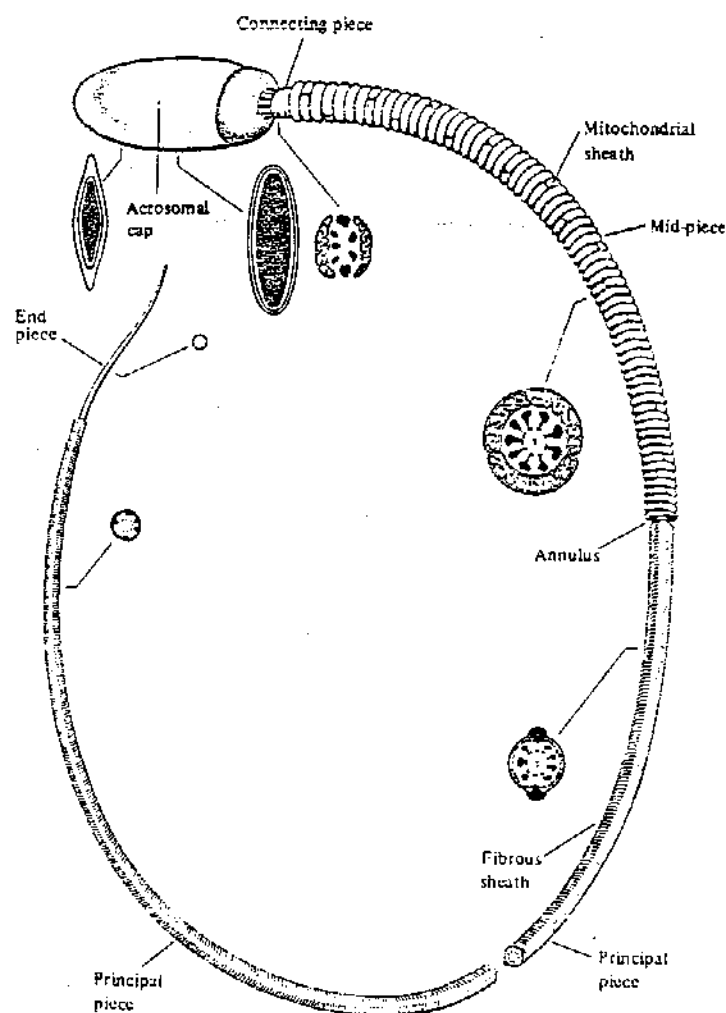
2.1.1 เซลล์อสุจิ (spermatozoa)

2.1.1.1 ส่วนประกอบของเซลล์อสุจิ

เซลล์อสุจิแบ่งเป็น 3 ส่วน คือส่วนหัว (head), ส่วนคอ (neck), ส่วนหาง (tail) ดังแสดงในภาพที่ 1

หัวของเซลล์อสุจิมีส่วนประกอบที่สำคัญคือนิวเคลียส (nucleus) และอะโครโซม (acrosome) ภายในนิวเคลียสบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีนพื้นฐานพวกฮิสโตน (histone) หรือโปรตามีน (protamine) โดยอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั่วไปแต่ละนิวเคลียสจะมีสารพันธุกรรมประมาณ 3×10^{-12} กรัม (Bearden and Fuquay, 1984) ส่วนของอะโครโซมปกคลุมส่วนหัวของเซลล์อสุจิไว้ประมาณสองในสามส่วนและรวมอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) อะโครโซมเปลี่ยนแปลงมาจาก golgi apparatus และมีหน้าที่สำคัญคือช่วยในการเจาะ (penetration) เข้าไปในไข่โดยอาศัยเอนไซม์ hyaluronidase ในการย่อยสลาย cumulus cell (Settchell, 1990) และ acrosin ย่อยสลาย zona pellucida ซึ่งเป็นชั้นที่ประกอบขึ้นด้วยไขมันและโปรตีน (lipoprotein) (Austin, 1990) ดังนั้นอะโครโซม

จึงมีความสำคัญต่อการที่อสุจิจะเข้าปฏิสนธิกับไข่ อย่างไรก็ตามอสุจิจะผ่านเข้าผสมกับไข่ได้ ต้องเกิดขบวนการเปลี่ยนแปลงของอะโครโซมก่อนเรียกว่า capacitation ซึ่งเป็นการกำจัดหรือเปลี่ยนแปลงสารบางอย่างบนเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (Yanagimachi, 1988) และอาจเริ่มเกิดเมื่ออสุจิผ่าน cervix หรือ cervical mucus (Kopecký and Flechon, 1981) หลังจากนั้นจะเกิด acrosome reaction เกิดการแตกของอะโครโซมโดยเริ่มที่เยื่อหุ้มอะโครโซมด้านนอก (outer acrosome membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (plasma membrane) เกิดสลาย (fusion) ในครึ่งหนึ่งของส่วนหัวอสุจิและปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาเพื่อการเจาะไข่ (Bedford, 1990) โดยมี cumulus และหรือ zona pellucida เป็นตัวชักนำให้เกิด acrosome reaction (Yanagimachi, 1988)



ภาพที่ 1 รูปร่างเซลล์อสุจิ

ที่มา: Settonell (1990)

ส่วนหางแบ่งเป็นสามส่วนคือส่วนกลาง (middle piece) ส่วน principal piece และส่วนปลาย (end piece) ส่วนกลางประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และมี filament ที่จัดเป็นรูปแบบ 9+2 และภายในไมโทคอนเดรียบรรจุเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงาน (ATP) เพื่อการดำรงชีวิตและการเคลื่อนที่ของอสุจิ และเมทาโบลิซึมส่วนใหญ่ของเซลล์อสุจิเกิดขึ้นที่ส่วนนี้ ส่วน principal piece เป็นส่วนที่ยาวที่สุดของหาง filament ยังเป็นรูปแบบ 9+2 เช่นเดียวกับส่วนกลางแต่ไม่มีไมโทคอนเดรีย ส่วน end piece ยังมีลักษณะเส้นใย 9+2 เช่นเดียวกับส่วนต้นแต่ขนาดเล็กลง ดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนหางเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหากส่วนหางมีรูปร่างที่ผิดปกติจะทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ตรงไปข้างหน้าทำให้ความสามารถในการเดินทางถึงและเข้าผสมกับไข่เกิดขึ้นได้น้อยลง

2.1.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเมทาโบลิซึมและการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพลังงานสำหรับเคลื่อนที่ของอสุจิได้มาจากขบวนการ glycolysis และขบวนการหายใจ (respiration) ในเซลล์อสุจิกระต่าย (Storey and Kayne, 1975) กระบือ (Sidhu and Guraya, 1979) และโค (Morton, 1968) พบเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ glycolytic pathway และ Kreb's cycle อยู่ที่ไมโทคอนเดรีย ที่อยู่ในส่วนของ middle piece ของเซลล์อสุจิ (Sidhu and Guraya, 1979) และฟรุคโตส (fructose) เป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์อสุจิโค (Flipe and Anderson, 1969) เนื่องจากในส่วนของเหลวในน้ำเชื้อของโคมีฟรุคโตสประมาณ 5.3 mg/ml ของน้ำเชื้อ (Hafez, 1987)

อัตราการเกิดขบวนการเมทาโบลิซึมคืออัตราการใช้สารพลังงานของเซลล์อสุจินั้นการควบคุมให้มีเมทาโบลิซึมน้อยลงเป็นสิ่งจำเป็นในการยืดเวลาการมีชีวิตของเซลล์อสุจิหรือยืดเวลาการเก็บรักษา ในทางตรงกันข้ามการเคลื่อนที่ของอสุจิจำเป็นต้องมีอัตราเมทาโบลิซึมเพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้พลังงานที่จำเป็นต่อการโบกพัดของหางอสุจิ

ก. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Holt and North, 1986 และ Canvin and Buhr, 1989) อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราเมทาโบลิซึมเพิ่มขึ้นและการมีชีวิตของอสุจิสั้นลง เมื่ออุณหภูมิเกิน 50 °C เซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนที่และจะมีชีวิตอยู่ได้อีกไม่นานเนื่องจากสารตั้งต้นที่เป็นพลังงานถูกใช้หมดและ pH ลดลงเนื่องจากกรดแลคติกเพิ่มขึ้น (Boarden and Fuquay, 1984) Hammerstad และ Hay (1980)

พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิที่ป่ม (incubation) เซลล์อสุจิไคจาก 20 เป็น 40 °C ทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 35 ไมโครเมตรต่อวินาที Pace และคณะ (1981) พบว่า อุณหภูมิที่ 30 °C อสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่าที่ 10 °C (44.60 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่อุณหภูมิ 10 °C และ 0 °C ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการลดอุณหภูมิเป็นการลดอัตราเมทาโบลิซึมและยืดเวลาการมีชีวิตของเซลล์อสุจิและลดการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วย

การลดลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์อสุจิของสัตว์เกือบทุกชนิดเกิด cold shock ซึ่งมีผลให้เซลล์อสุจิสูญเสียการเคลื่อนที่ การเกิด cold shock เกิดขึ้นในช่วงของการลดอุณหภูมิจาก 15 ถึง 0 °C เนื่องจากเป็นช่วงที่น้ำในเซลล์จะเปลี่ยนเป็นน้ำแข็ง ซึ่งหากอุณหภูมิช่วงนี้ถูกลดลงในอัตราที่เร็วเกินไปจะเกิดผลึกภายในเซลล์ได้ ดังนั้นจึงต้องป้องกันโดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ การเติมไข่แดงและนมซึ่งมี lecithin และ lipoprotein ในน้ำเชื้อจะป้องกัน cold shock ได้โดยช่วยลดจำนวน ion-specific channels หรือ pore ที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เมื่อน้ำเชื้อโคเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C อัตราเมทาโบลิซึมถูกลดลงเหลือ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ของอัตราเมทาโบลิซึมของอสุจิที่อุณหภูมิร่างกายปกติ (Bearden and Fuquay, 1984)

ข. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเชื้อเมื่อหลังออกข้างนอกเป็นตัวควบคุมการเริ่มต้นเคลื่อนที่ของอสุจิไค Acott และ Carr (1984) พบว่าอสุจิที่โคเต็มวัยแต่ยังมีการเคลื่อนที่ได้น้อยซึ่งอยู่ในของเหลว pH 5.8 ของ cauda epididymis จะมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำให้ของเหลวนั้นมี pH สูงขึ้นถึง 7.0 และช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6.9-7.5 (ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์) เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์อสุจิ จึงเกิดเมทาโบลิซึมได้สูงสุด แต่หากความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่า 7.0 จะทำให้อัตราการเกิดของเมทาโบลิซึมลดลง คาเฟอีนสามารถเพิ่มเมทาโบลิซึมและการเคลื่อนที่ของอสุจิได้และเมื่อเวลาหลังการเติมคาเฟอีนนานขึ้นการลดลงของ pH จะมากกว่าการไม่เติม (El-Gaafary et al., 1990) นอกจากนั้นออกซิโตซิน 10^{-10} โมล ทำให้อสุจิเคลื่อนที่มากขึ้น (Vongpradub and Koyanagi, 1994) จึงเป็นไปได้ว่าออกซิโตซินเพิ่มเมทาโบลิซึมของอสุจิแล้วทำให้ pH ลดลงทำนองเดียวกับคาเฟอีน

ค. แรงดันออสโมติก (osmotic)

การแช่แข็งและการละลายมีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีขนาดช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ phospholipid ใหญ่ขึ้นอันเนื่องจากการไหลรวมกันของอนุภาคโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ (molecule aggregation) และมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานเนื่องจากสูญเสียความสามารถในการเลือกสารที่จะผ่าน (loss of permeability) รวมทั้ง fusion ของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นผลจากเยื่อหุ้มเซลล์แตกร้าวและการปิดตัว (cracking and resealing) (Watson et al., 1992 อ้างโดย Correa and Zavos, 1994) เซลล์อสุจิมีเมทาบอลิซึมสูงสุดเมื่อตัวเจือจาง (extender) มีสภาพเป็น isotonic สภาพ hypotonic และ hypertonic ทำให้อัตราเมทาบอลิซึมลดลงแต่ไม่ได้ยืดอายุของเซลล์อสุจิ เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเป็นแบบ semipermeable membrane ทั้ง hypotonic และ hypertonic เปลี่ยนแปลงการขนส่งน้ำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์อสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลาย isotonic เท่านั้น (Bearden and Fuquay, 1984) เซลล์อสุจิที่อยู่ในสารละลาย hypertonic น้ำจะซึมออกนอกเซลล์ทำให้อสุจิเหี่ยวแฟบลงเสียสมดุลภายในเซลล์และตายในที่สุด ส่วน hypotonic น้ำจะซึมผ่านเข้าเซลล์ทำให้เซลล์แตกได้ Correa และ Zavos (1994) รายงานว่าอสุจิโคหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เกิดการบวมน้ำมากที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีแรงดันออสโมติก 100 mOsm/L คือเกิด 48 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าเซลล์อสุจิที่อยู่ในสารละลายที่มีแรงดันออสโมติก 50, 75, 125, 200 และ 300 mOsm/L แต่เปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของอะโครโซม (intact acrosome) ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม มีการเติมคาเฟอีนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.065 มิลลิโมล (Levin et al., 1981) ถึง 12 มิลลิโมล (Moussa, 1983) ในน้ำเชื้อแต่ไม่พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกที่เกิดจากคาเฟอีน

ง. ก๊าซ (gases)

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นขบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ แต่ถ้ามีคาร์บอนไดออกไซด์เกิน 5-10 เปอร์เซ็นต์ ขบวนการเมทาบอลิซึมถูกยับยั้ง (Bearden and Fuquay, 1984) นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ยังเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมอัตราเมทาบอลิซึมใน epididymis ขณะที่ออกซิเจนจำเป็นสำหรับเมทาบอลิซึมแบบมีออกซิเจน (aerobic) แต่ถ้าออกซิเจนมากเกินไปจะเป็นพิษและยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึม โดยอนุมูลอิสระของออกซิเจน (oxygen free radical) ด้วยการจัดกับ nucleic acid, โปรตีน

และไขมันของเซลล์อสุจิทำให้เบสใน DNA เกิด mutagenesis และที่สำคัญทำให้เกิด lipid peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ หมู่ CH_2 ของไขมันถูก O_2 เข้าจับเปลี่ยนเป็น $\text{HOO}-\text{CH}$ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดคุณสมบัติในการเป็น hydrophobic มีผลต่อความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์และการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Plummer, 1989) ส่วนเมแทบอลิซึมแบบไม่มีออกซิเจน (anaerobic) สามารถเกิดได้ถึงแม้ในสภาพมีไนโตรเจนไฮโดรเจนหรือฮีเลียมโดยไม่มีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึม Boatman และ Robbin (1991) รายงานว่า bicarbonate (HCO_3^-) และ CO_2 ในอัตราส่วน 2.9 มิลลิโมลต่อ 0.6 เปอร์เซ็นต์เพิ่มดัชนีการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ 2.7-3.6 เท่าของกลุ่มควบคุมคาเฟอีนและออกซิโตซินกระตุ้นให้เกิดเมแทบอลิซึมเพิ่มขึ้นและผลผลิตสุดท้ายจากขบวนการเมแทบอลิซึมคือ ATP, น้ำ และ CO_2 จะเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้น CO_2 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อรวมกับน้ำจะได้ carbonic acid ซึ่งทำให้ pH ลดลงจึงมีผลยับยั้งขบวนการเมแทบอลิซึมด้วย

๑. แสง (light)

ปกติแสงจะยับยั้งอัตราการเกิดเมแทบอลิซึม การเคลื่อนที่และการผสมติดของเซลล์อสุจิ (Bearden and Fuquay, 1984) ผลเสียจากแสงเกิดขึ้นเมื่อน้ำเชื้อสัมผัสกับออกซิเจน เนื่องจากแสงเป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาเคมีแบบ photochemical ในน้ำเชื้อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดคุณสมบัติ hydrophobic สูญเสียความสามารถในการคัดเลือกสารที่จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Plummer, 1989) ดังนั้นควรป้องกันไม่ให้น้ำเชื้อถูกแสงโดยตรง

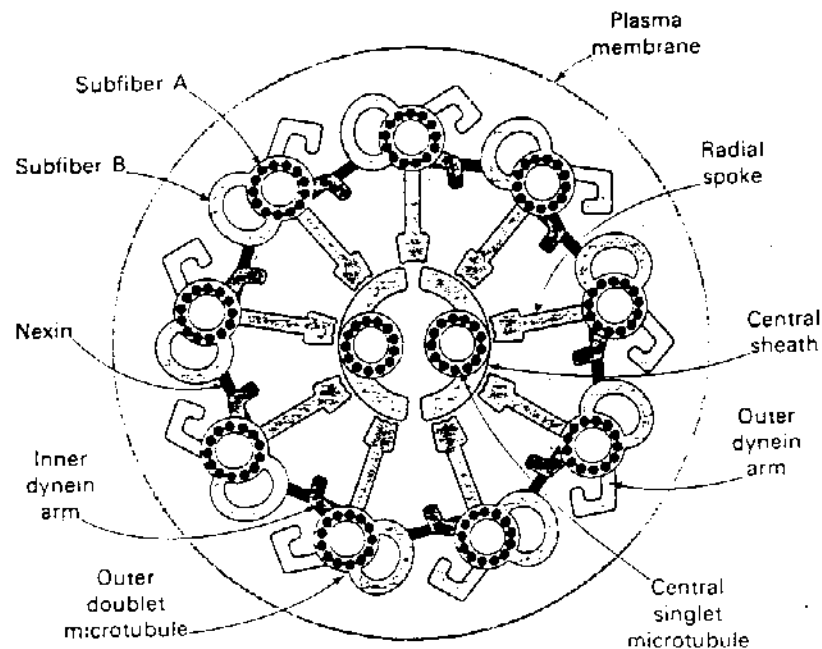
๑. สารป้องกันจุลินทรีย์ (antimicrobial agents)

penicillin, dihydrostreptomycin หรือ neomycin ใช้เติมในตัวเจือจางน้ำเชื้อเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Almquist, 1951 อ้างโดย Ahmad and Foote, 1986) สารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนประกอบหลักอย่างหนึ่งของตัวเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผสมเทียม อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารเหล่านี้มีใช้มาช้านานจึงมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (strain) ที่สามารถต้านทานได้ นอกจากนั้นสารเหล่านี้ยังไม่มีผลหรือมีผลเล็กน้อยในการทำลาย mycoplasma ซึ่งพบในน้ำเชื้อแช่แข็งของโค (Onoviran et al., 1975 อ้างโดย Ahmad and Foote, 1986) และพบว่าการใช้สาร antibiotic บางชนิด เช่น minocin,

tetracycline derivative สามารถทำลาย mycoplasma ได้ (Ahmad and Foote, 1986) และไม่พบผลต่ออัตราเมตาโบลิซึม แต่บางครั้งเพิ่มการสมมติของน้ำเชื้อที่ได้จากโคที่มีน้ำเชื้อคุณภาพต่ำ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า antimicrobial agent เหล่านี้ยืดเวลาการมีชีวิตของน้ำเชื้อได้ โดยควบคุมการเจริญและควบคุมการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ซึ่งมีผลในการรักษาปริมาณสารพลังงานไว้ให้เซลล์อสุจิได้

2.1.1.3 การเคลื่อนไหวของหางอสุจิ

microtubule เป็นส่วนประกอบหลักของหางอสุจิเช่นเดียวกับใน cilia และ flagella ของพวก eucaryotic cell คือมีมัดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เรียกว่า axoneme และภายใน axoneme ประกอบด้วย microtubule เดี่ยวๆอยู่ 1 คู่อยู่ตรงกลางมีกลุ่มของ microtubule อยู่ล้อมรอบ 9 คู่ ล้อมรอบอยู่เป็นวงกลมซึ่งเรียกว่าอยู่เป็นรูปแบบ 9+2 ซึ่งแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อที่หางของเซลล์อสุจิ

ที่มา: Stryer (1988)

แต่ละกลุ่มของ microtubule ที่อยู่รอบนอก (outer doublet) ปรากฏ คล้ายเลข 8 ขนาด $370 \text{ \AA} \times 250 \text{ \AA}$ มีเส้นใย A, B เป็น subfiber ที่อยู่ใน sheath ของบน microtubule เชื่อมกันด้วย nexin ส่วน subfiber A มีแขน 2 อันเรียกว่า dynein ซึ่งเป็นที่ที่ ATPase ทำงานได้ dynein เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (1,500 kd) มีลักษณะ 3 หัวแต่ละหัวทำหน้าที่เป็น ATPase site ซึ่งทำหน้าที่เป็นเสมือน crossbridges เช่นเดียวกับ S_1 ในไมโอซิน (myosin) ของเซลล์กล้ามเนื้อ ATPase cycle ของ dynein คล้ายกับที่เกิดขึ้นในไมโอซินโดย ATP จับกับ dynein ผลที่ได้จากการย่อยสลาย ATP คือ dynein-ADP- P_i แล้วจับกับ subfiber B อีกครั้งหนึ่ง dynein กับ subfiber B เป็นตัวชักนำการปล่อย P_i เหมือนกับที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ เมื่อ S_1 สัมผัสกับแอกติน (actin) กลไกที่ทำให้เกิดการเคลื่อนไหวของหางอสุจิคือการเลื่อนของ microtubule (Gibbons, 1968 อ้างโดย Stryer, 1988) พลังงานสำหรับการเลื่อนของ microtubule มาจากการทำงานของ ATPase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ dynein arm และ outer doublet microtubule (Stryer, 1988) กลไกการเคลื่อนที่โดย axoneme ทำให้การเคลื่อนที่มีหลายรูปแบบทั้งการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าและแบบถอยหลังซึ่งพบในสัตว์พวก Chlamonas (Bessen et al., 1980 อ้างโดย Stryer, 1988) หรือการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและ capacitation ของเซลล์อสุจิ (Katz et al., 1978 และ Katz and Yamagimachi, 1980) กลไกการควบคุมการเลื่อน (sliding) ของ microtubule มีสารประกอบ 2 ชนิดคือ Ca^{2+} และ cAMP ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่ของ axoneme แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า cAMP มีบทบาทหรือทำงานอย่างไรที่ axoneme มีเพียงในพวก eucariotic cell เท่านั้นที่รู้การทำงานของ cAMP ว่ากระตุ้นขบวนการ protein phosphorylation โดยผ่าน cAMP-dependent protein kinase (Tash and Means, 1983) สำหรับในเซลล์กล้ามเนื้อ Ca^{2+} ควบคุมการเคลื่อนที่โดยย่อยสลาย calmodulin-dependent myosin phosphorylation โดยเอ็นไซม์ myosin light chain kinase (Bolton, 1979) และเป็นไปได้ว่าบทบาทของ cAMP และ Ca^{2+} ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของหางอสุจิผ่านขบวนการ protein phosphorylation เช่นกัน และ Stryer (1988) รายงานว่าการโบกพัดของหางอสุจิเกิดได้จาก ATPase cycle ของ dynein โดยที่ outer doublet ของ axoneme เลื่อนผ่านซึ่งกันและกัน แรงระหว่าง doublet ถูกสร้างโดย dynein crossbridge แขนของ dynein บน subfiber A เคลื่อนไปรอบๆบน subfiber B ของ doublet ทำให้เกิดการย่อย ATP เหมือนที่เกิดขึ้นที่ myosin crossbridge บนเส้นใยแอกติน (actin filament) ในกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle)

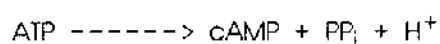
ก. ATP กับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

พลังงานของเซลล์อสุจิได้มาจากทั้งขบวนการ glycolysis และ oxidation phosphorylation ของ mitochondria อสุจิของโคและสุกรเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่ออัตราการเกิด glycolysis และ mitochondrial respiration เพิ่มขึ้นตามด้วยการลดลงของระดับ ATP และเพิ่มระดับ ADP และ AMP (Garbers et al., 1973) ในอสุจิโคการลดลงของอัตราส่วน ATP/ADP เป็นปัจจัยแรกที่ป้องกันการเพิ่มขึ้นของขบวนการ phosphorylation (Halang et al., 1985 และ 1987) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิขึ้นอยู่กับปริมาณ ATP ภายในเซลล์ (Mann, 1964 อ้างโดย Soderquist, 1991) โดยปกติในน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีปริมาณ ATP ประมาณ 18.7 นาโนโมลต่อเซลล์ 10^8 เซลล์ในน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีการเคลื่อนที่ 52.7 เปอร์เซ็นต์ (Soderquist et al., 1991) ขณะที่ระดับ ATP ประมาณ 13.9-16.6 นาโนโมลต่อเซลล์ 10^8 ตัวในน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ 54.5 เปอร์เซ็นต์ (Soderquist and Stalhammar, 1991) แต่ถ้าหากมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเป็น 58.4 เปอร์เซ็นต์ ต้องมีปริมาณ ATP ภายในเซลล์มากขึ้นเป็น 34.8 นาโนโมลต่อเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร (Soderquist, 1991) แสดงให้เห็นว่าปริมาณ ATP มากขึ้นทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่มากขึ้นด้วย

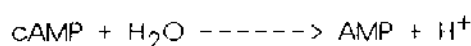
1. Cyclic Adenosine 3', 5' Monophosphate (cAMP)

ใน phosphorylation

cAMP เกิดจากการย่อยสลาย ATP โดยเอนไซม์ adenylate cyclase ดังนี้



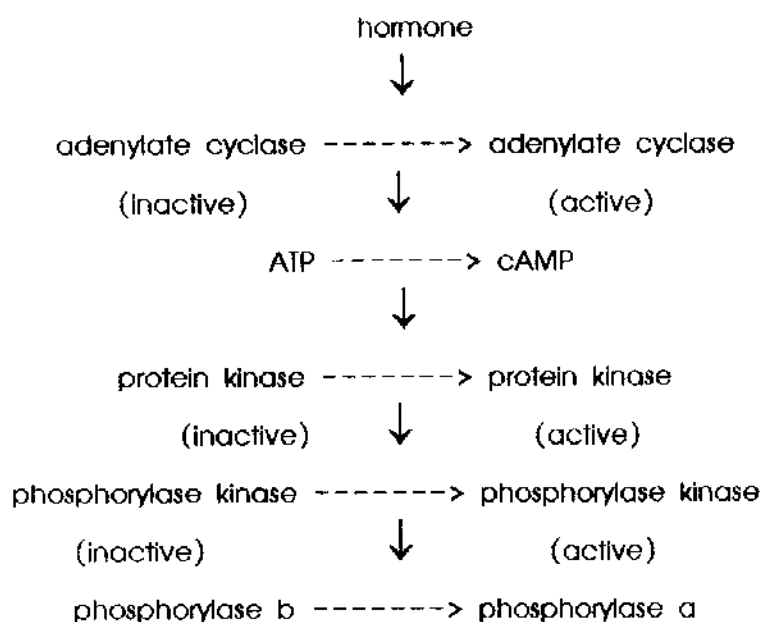
และ cAMP ถูก phosphodiesterase ย่อยเป็น AMP ดังนี้



ในการทำงานของฮอร์โมนหลายชนิดจะใช้ cAMP เป็น second messenger โดยมีขั้นตอนการทำงานดังนี้คือฮอร์โมนจับกับตัวรับ (receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์และกระตุ้นการทำงานของ adenylate cyclase เมื่อ adenylate cyclase ทำงานมากขึ้นทำให้มีระดับ cAMP ใน cytosol มากขึ้นด้วยแล้ว cAMP ไปเปลี่ยนแปลงอัตราการทำงานของขบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Stryer, 1988)

ค. ระดับ cAMP กับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

เนื่องจาก cAMP มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิโดย Morisawa และ Okuno (1982) พบว่าอสุจิที่อยู่ใน epidymis ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้หากไม่มี cAMP อยู่ภายในเซลล์และโดยปกติแล้วปริมาณ cAMP ในเซลล์อสุจิโดยอยู่ระหว่าง 155-183 พิโคโมลต่ออสุจิ 10^9 เซลล์ (Tash and Mann, 1973 อ้างโดย Tash and Means, 1982) ในขณะที่ Garbers และคณะ (1980) พบว่าระดับปกติของ cAMP คือ 1-2 นาโนโมลต่อกรัม ของน้ำหนักเปียกของเซลล์อสุจิ แต่อัตราส่วนการทำงาน (activity ratio) ของ cAMP-dependent protein kinase คือ 0.1-0.2 เท่านั้น (มีเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของเอ็นไซม์ เท่านั้นที่ทำงาน) อย่างไรก็ตามระดับ cAMP ที่มากขึ้นช่วยกระตุ้นขบวนการ phosphorylation และการเคลื่อนที่อสุจิให้มากขึ้นด้วย (Tash and Means, 1982) เนื่องจากขบวนการ phosphorylation ใน glycolysis เพิ่มขึ้นและอสุจิมี ATP ที่จะใช้ในการเคลื่อนไหวของหางอสุจิ มากขึ้น



ภาพที่ 4 แผนภาพการทำงานของ cAMP ในการกระตุ้นขบวนการ phosphorylation
ที่มา: Stryer (1988)

ง. แคลเซียมกับการเคลื่อนที่ของอสุจิ

เป็นที่ทราบค่อนข้างแน่ชัดว่า cAMP กระตุ้นการเคลื่อนไหวของหางอสุจิแต่บทบาทของ Ca^{2+} ซับซ้อนมากกว่าเนื่องจาก Ca^{2+} ไม่แค่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของ cAMP เท่านั้น แต่ยังมีผลบางส่วนกระตุ้นโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของ axoneme (Tash and Means, 1983) ผลที่เกิดจากระดับ Ca^{2+} ที่อยู่นอกเซลล์ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิมิมากกว่าระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ในส่วนที่เป็นของเหลว (seminal plasma) มี Ca^{2+} มากที่สุดเมื่อเทียบกับ Na^+ และ K^+

ผลของ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ (extracellular Ca^{2+}) ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ในอสุจิของ sea urchin ระดับ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ที่กระตุ้นการเคลื่อนที่ได้ดีต้องมากกว่า 9 มิลลิโมล (Young and Nelson, 1974) ในอสุจิหนู hamster ต้องการ 1 มิลลิโมล (Morton et al., 1974 อ้างโดย Tash and Means, 1983) ในหนู rat 1.7 มิลลิโมล แต่ถ้าน้อยหรือมากกว่าจะมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Davis, 1978 อ้างโดย Tash and Means, 1983) และในอสุจิโคการเคลื่อนที่จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} 1 มิลลิโมล หรือมากกว่า (McGrady et al., 1974) อย่างไรก็ตามเนื่องจากภายในส่วนของเหลวมีสารที่เป็น chelating factors เช่น ซีเตรตและฟอสเฟต ดังนั้นต้องพิจารณาระดับ Ca^{2+} อิสระแยกจาก Ca^{2+} รวม เนื่องจากเมื่อน้ำเชื้อผ่านจาก epididymal จนถึงหลังออกมาระดับของ Ca^{2+} อิสระเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Tash and Means, 1983) และการเพิ่มการทำงานของ Ca^{2+} pump และการลดลงของระดับ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์อาจจะมีผลสำคัญต่อการเริ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่ยังไม่มีย่อสรุปที่แน่นอนเกี่ยวกับกลไกที่ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่บางส่วนของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด acrosome reaction (Corbers and Kopf, 1980 อ้างโดย Tash and Means, 1983)

ระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ (internal Ca^{2+}) มีอิทธิพลต่อการเคลื่อนไหวของหางอสุจิของสัตว์ทุกชนิด อสุจิที่ถูกทำลายจาก cold shock มี Ca^{2+} ภายในเซลล์มากขึ้นและหยุดการเคลื่อนที่ (Karagiannidis, 1976) อย่างไรก็ตามการยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เกิด cold shock ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพียงอย่างเดียว ผลของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิแบ่งออกได้เป็น 2 กรณีคือ เปลี่ยนแปลงลักษณะการเคลื่อนที่แบบลูกคลื่น (waveform) และกับังการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์เนื่องจาก Gibbons และ Gibbons (1973) อ้างโดย Tash และ Means (1983)

พบว่าอสุจิของ sea urchin เคลื่อนที่แบบไม่สมมาตร (asymmetric) เมื่อไม่มี Ca^{2+} อยู่ภายในเซลล์และกลับมาเคลื่อนที่แบบสมมาตรเมื่อภายในเซลล์มี Ca^{2+} 1 มิลลิโมล ใน axoneme ของสัตว์ชั้นต่ำพวก Chlamydomonas แสดงการเคลื่อนที่แบบไม่สมมาตรถ้ามี Ca^{2+} ต่ำกว่า 10^{-6} โมล (Bessen et al., 1980 อ้างโดย Tash and Means, 1983) และถ้าภายในเซลล์มี Ca^{2+} มากกว่า 10^{-6} โมล จะกลับมีเคลื่อนที่แบบสมมาตรและตรงไปข้างหน้าเช่นเดียวกับใน Paramecium และ Crithidia (Holwill and McGregor, 1976) Gibbons และ Gibbons (1980) อ้างโดย Tash และ Means (1983) พบว่าอสุจิของ sea urchin เคลื่อนที่แบบไม่สมมาตรเมื่อไม่มี Ca^{2+} แต่ถ้ามี Ca^{2+} 100-200 ไมโครโมล จะหยุดการเคลื่อนที่ ในอสุจิของหนู hamster การเคลื่อนที่ของอสุจิจะหยุดเมื่อมี Ca^{2+} อิสระ 200-600 ไมโครโมล ในอสุจิสุนัข 9 ไมโครโมล (Tash and Means, 1982)

2.1.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งโค

ก. ชนิดของตัวเจือจาง (extender)

ตัวเจือจางน้ำเชื้อมีหน้าที่ป้องกันเซลล์อสุจิและเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อ ตัวเจือจางหลายชนิดประกอบด้วยน้ำนมและไข่แดงเป็นหลักเนื่องจากสามารถป้องกันเซลล์อสุจิไม่ให้ถูกทำลายจาก cold shock ได้ (Garola and Graham, 1989) และผลของตัวเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการผสมติดมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดย Schenk และคณะ (1987) รายงานว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ 0 ชั่วโมงหลังการละลาย ตัวเจือจาง egg yolk-citrate มีการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่าตัวเจือจาง homogenized milk และตัวเจือจาง egg yolk-Tes-Tris แต่ไม่พบความแตกต่างของการผสมติด ขณะที่ Karabinus และคณะ (1991) ไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่หลังการละลายเมื่อใช้ตัวเจือจาง egg yolk-citrate กับตัวเจือจางน้ำนม แต่ตัวเจือจาง egg yolk-citrate เป็นผลดีต่อโครงสร้างของโครมาตินของอสุจิ (sperm chromatin structure) และเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในส่วนประกอบของไข่แดงและน้ำนม ส่วน Senger และคณะ (1983) พบว่าตัวเจือจาง egg yolk-Tris ทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่และการคงอยู่ของอะโครโซม (acrosomal integrity) สูงสุดหลังละลายเมื่อเทียบกับตัวเจือจาง egg yolk-citrate และหางนม (skimi milk)

ข. ระดับกลีเซอรอล (glycerol) ในตัวเจี๊จาง

กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant agent) ภายในเซลล์อสุจิที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Watson, 1990) แต่กลีเซอรอลก็เป็นอันตรายต่อเซลล์อสุจิได้ถ้ามีในปริมาณที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากทำให้แรงดัน osmotic เปลี่ยนแปลงและอาจมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และต่อเมแทบอลิซึมของอสุจิ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีผลร่วมกับอัตราการแช่แข็ง (freezing rate) ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายจากหลอดฟาง (Robbins et al., 1976 และ Rodriguez et al., 1975) Mortimer และคณะ (1976) พบว่า 7 เปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอลในตัวเจี๊จาง egg yolk-citrate ให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายสูงกว่าการใช้กลีเซอรอล 5, 6, 8, 9, 10, 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเฉลี่ยจากหลายๆ อัตราการแช่แข็ง

ค. ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (french straw)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งโคในหลอดพลาสติก (french straw) มีข้อดีกว่าหลอดแก้ว (glass ampules) คือมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากกว่า (Pickett and Berndtson, 1974) และหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 ml มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งโคสูงกว่าหลอดขนาด 0.5 ml และสามารถลดต้นทุนการเก็บน้ำเชื้อได้ด้วย (Senger et al., 1983) และเนื่องจากอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของหลอดขนาด 0.25 ml มากกว่าหลอดขนาด 0.5 ml ดังนั้นอัตราการแช่แข็งและการละลายจึงมีความแตกต่างกัน Senger และคณะ (1983) รายงานว่าหลอดขนาด 0.25 ml ควรทำให้เย็นในอัตราที่ช้ากว่าหลอดขนาด 0.5 ml โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ egg yolk-citrate และ egg yolk-Tris เป็นตัวเจี๊จาง

ง. อัตราการแช่แข็งและการละลาย

การมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิระหว่างการแช่แข็งและการละลายขึ้นอยู่กับอัตราการแช่แข็ง, ชนิดและระดับของ cryopreservative (Mortimer et al., 1976) อัตราการแช่แข็งมีผลร่วมกันกับระดับกลีเซอรอล และจากรายงานของ Rodriguez และคณะ (1975) พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุดเมื่อการลดความเย็นจาก 5 ถึง -130°C ใน 3.5 นาที (กลีเซอรอล 10.22 เปอร์เซ็นต์) และอยู่ที่อุณหภูมินี้นาน 20-40 นาที ขณะที่

Robbins และคณะ (1976) พบว่าอัตราการแช่แข็ง $26.3^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$ จาก -10 ถึง -80°C ได้น้ำเชื้อที่มีการทำลายเซลล์อสุจิน้อยที่สุดเมื่อมีกลีเซอรอล 8.5 % และอุณหภูมิน้ำที่แช่ละลาย 65°C Ennen และคณะ (1976) พบว่าการลดเวลาที่ทำให้น้ำเชื้อเย็นลงจาก 2 ชั่วโมง เป็น 30 นาที ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายลดลง ซึ่งตรงข้ามกับ Weidlier และ Zougg (1975) อ้างโดย Ennen และคณะ (1976) ที่พบว่าอัตราการไม่กลับลัดที่ 66 วันหลังผสมด้วย น้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิจาก 35 เป็น 5°C ในเวลา 1.5 และภายใน 3 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Jondet (1972) อ้างโดย Ennen และคณะ (1976) ที่ไม่พบความแตกต่างของ อัตราการไม่กลับลัดเมื่อผสมด้วยน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิจาก 30 ถึง 5°C ใน 30, 60, และ 120 นาที การละลายที่ $75^{\circ}\text{C}/7$ วินาที ให้ผลการเคลื่อนที่อสุจิสูงสุดเมื่อเทียบกับ $5^{\circ}\text{C}/3$ นาที (Ennen et al., 1976) Senger และคณะ (1983) แนะนำว่าอัตราละลายเร็วเป็นผลดีต่อ คุณภาพน้ำเชื้อ Pace และคณะ (1981) พบว่าการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ 37°C มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและเซลล์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติและการทำงานของ เอ็นไซม์ acrosin มากกว่าการละลายที่ 10°C และละลายด้วยน้ำแข็งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 37°C น่าที่จะเหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

2.1.2 ส่วนที่เป็นของเหลวของน้ำเชื้อ (seminal plasma)

ส่วนของเหลวเป็นแหล่งอาหารและสารรักษาสภาพความเป็นกรดเป็นด่างให้ เซลล์อสุจิ ในน้ำเชื้อโคจะมีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย แรงดันออสโมติกคล้ายเลือด (เท่ากับ 0.9 % Sodium chloride) และส่วนที่เป็นของเหลวในน้ำเชื้อโคประกอบด้วยสารอินทรีย์และสาร อนินทรีย์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ส่วนที่เป็นของเหลวในน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมประกอบด้วย Na, K, Mg, Ca, Cl และ P อีออน แต่มีสัดส่วนที่แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งของการหลังและวิธีการ รีดเก็บน้ำเชื้อ (Garcia and Graham, 1989) อัตราการเกิดขบวนการเมทาโบลิซึมและการ เคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิแตกต่างกัน เนื่องมาจากความแตกต่างของส่วนประกอบในทางเคมีของ ส่วนที่เป็นของเหลว (Mann, 1964) K^+ มีอยู่ในเซลล์อสุจิมากกว่าในส่วนที่เป็นของเหลว ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้นเช่น ใน epididymis อัตราส่วนของ K^+/Na^+ สูงขึ้น อนินทรีย์อีออนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจิโดยมีผลต่อการคงอยู่ (integrity) ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและช่วยรักษาแรงดัน osmotic ให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต

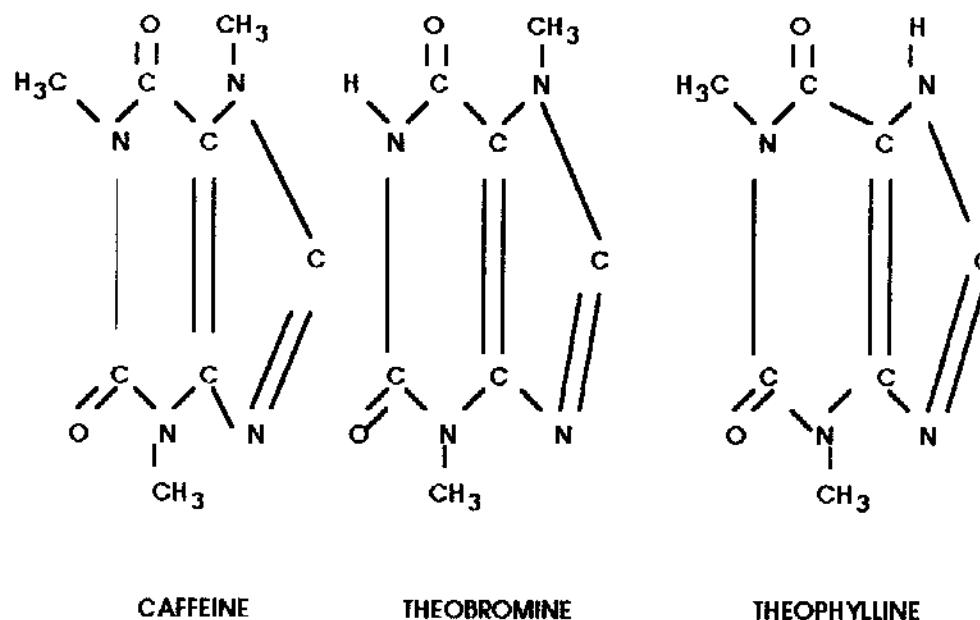
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อโค

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (mg/100 cc.)
Fructose	530
Sorbitol	75
Glycerolphosphorylcholine	350
Inositol	35
Citric acid	720
Plasmalogen	60
Sodium	230
Potassium	140
Chlorine	180
Calcium	44
Magnesium	9

ดัดแปลงจาก: Hafez และคณะ (1974)

ของเซลล์อสุจิ การที่ความเข้มข้น K^+ และ Na^+ สูงจะยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิ ลดขบวนการใช้ออกซิเจนและลดขบวนการ fructolysis (Yassen and Foote, 1967 อ้างโดย Garcia and Graham, 1989) Ca^{2+} อาจเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Simpson and White, 1987) และ Ca^{2+} ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ 2 ทางคือแลกเปลี่ยนกับ Na^+ และผ่านโดย Ca^{2+} pump นอกจากอินทรีย์ออสอนแล้วในส่วนที่เป็นของเหลวยังพบ อินทรีย์ออสอนด้วยได้แก่ bicarbonate ซึ่งผลิตโดย vesicular glands และทำหน้าที่เป็นสาร รักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในน้ำเชื้อ ปกติ buffer มีปริมาณไม่เพียงพอกับการป้องกันการลดลงของ pH เมื่อเก็บน้ำเชื้อได้นาน ๆ ดังนั้นตัวเจือจางน้ำเชื้อที่ดีต้องมีความสามารถในการ รักษาสภาพความเป็นกรดเป็นด่างได้สูง

สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดที่เป็นแหล่งพลังงานของอสุจิในน้ำเชื้อโดยปกติ ได้แก่ fructose, sorbitol และ glycerolphosphorylcholine (GPC) fructose เป็นน้ำตาลโมเลกุล



ภาพที่ 5 โครงสร้างของสารในกลุ่ม methylxanthines

ที่มา: Rall (1985)

2.2.2 กลไกการทำงานของคาเฟอีน

คุณสมบัติที่เด่นชัดที่สุดในระดับเซลล์ของคาเฟอีนคือยับยั้งการทำงานของ cyclic nucleotide phosphodiesterase และทำงานตรงข้ามหรือยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine (antagonism of receptor-mediated actions of adenosine) (Rall, 1985) ในระดับร่างกายคาเฟอีนมีผลต่อหลายส่วนทั้งผลต่อระบบการย่อยอาหาร คือกระตุ้นการหลั่งกรดเกลือ (gastric acid) และเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน (pepsin) ผลกระทบต่อระบบขับถ่ายทำให้เกิดการหลั่งปัสสาวะและ Na^+ มากขึ้น (Rall, 1982) มีผลกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางโดยถ้าได้รับ 150 มิลลิกรัม กระตุ้นโดยตรงต่อ cerebral cortex ถ้าได้รับมากขึ้นถึง 500 มิลลิกรัม จะกระตุ้นสมองส่วน medulla

ผลของคาเฟอีนต่อการเคลื่อนที่และขบวนการหายใจของเซลล์ออร์แกนิโดจะทำงานโดยผ่าน cyclic adenosine 3' 5' monophosphate (Schoenfeld et al., 1975) โดยคาเฟอีนเป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอ็นไซม์ phosphodiesterase และอาจเพิ่มความเข้มข้นของ cAMP (Stryer, 1988; Iash and Means, 1982 และ Schoff and Lardy, 1987) และ

cyclic guanosine 3' 5' monophosphate (Moussa, 1983) ภายในเซลล์อสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของอัตรา glycolysis หรือการเพิ่มขบวนการหายใจของ mitochondria อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่าระดับ cAMP ภายในเซลล์ (intracellular) ชักนำให้เกิดการเพิ่มการเคลื่อนที่ได้อย่างไร และการควบคุมการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของ Ca^{2+} อาจเกี่ยวข้องกับ (Roll, 1985) การเพิ่มขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์มีผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Peterson et al., 1979) ในผนังเซลล์ แคลเซียมปั๊มมีความสัมพันธ์กับ cAMP (cAMP-associated calcium pumps) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์อสุจิ เป็นไปได้ว่าการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายในระหว่างการแช่แข็งเป็นสาเหตุทำให้อสุจิสูญเสียการเคลื่อนที่หลังการแช่แข็งและละลายซึ่งเกี่ยวข้องกับการที่ plasmalemma ที่ถูกทำลายขาดความสามารถในการควบคุมระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์อสุจิ คาเฟอีนอาจช่วยทดแทนที่จุดนี้ได้และเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยกระตุ้นการส่งออก Ca^{2+} ที่มากเกินไปผ่านผนังเซลล์โดยใช้ cAMP ช่วย (Aitken et al., 1983)

คาเฟอีนกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยในอสุจิคน Aitken และคณะ (1983) รายงานว่าการเติมคาเฟอีน 2, 5 และ 10 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังจากละลายแล้วพบว่าการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนเท่ากับ 28.30 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงขึ้นตามระดับการเติมคาเฟอีนในทำนองเดียวกับ Moussa (1983) ที่พบว่าการเติมคาเฟอีน 3, 6 และ 12 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อสดของคนภายหลังการเติม 30 นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิกลุ่มที่เติมในระดับ 3 และ 6 มิลลิโมล มีค่าเท่ากับ 58.75 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมประมาณ 9.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่เติมคาเฟอีน 12 มิลลิโมล มีการเคลื่อนที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติม และเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ผลการเคลื่อนที่ยังเป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่ 30 นาที ตรงกันข้ามกับ Ree และคณะ (1990) ที่พบว่าการเติมคาเฟอีน 0 และ 6 มิลลิโมล ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่วนในอสุจิของโค El-Godfary และคณะ (1990) ได้รายงานว่าการเติมคาเฟอีนในน้ำเชื้อสดที่ระดับ 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 มิลลิโมล ในตัวเจือจาง Tris และวัดการเคลื่อนที่ทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 6 พบว่าโดยเฉลี่ยกลุ่มที่เติมคาเฟอีนระดับ 0.1 และ 0.2 มิลลิโมล อสุจิมีการเคลื่อนที่สูงสุดและเมื่อใช้ตัวเจือจางเป็น citrate ก็ได้ผลในทำนองเดียวกัน ส่วนในอสุจิของกระบือ Singh และ Raina (1994) พบว่าการเติมคาเฟอีนระดับ 2, 4 และ 8 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อที่เก็บ 4-7 °C หลังการเติมก่อนที่ จะถึง 68 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เติมคาเฟอีนโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม แต่หลังจาก 68 ชั่วโมง แล้วกลุ่มที่เติม 2 และ 8 มิลลิโมล มีการเคลื่อนที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมนอกจากนั้น

Fattouh และ Abdou (1991) พบว่าคาเฟอีน 2, 4 และ 6 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเป็นเม็ดหลังการละลายที่ 3 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของอสุจิกลุ่มที่เติมคาเฟอีนโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม (20 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 10.33 เปอร์เซ็นต์ และการเติมคาเฟอีนระดับ 2 มิลลิโมล ให้อสุจิที่มีการเคลื่อนที่สูงสุด

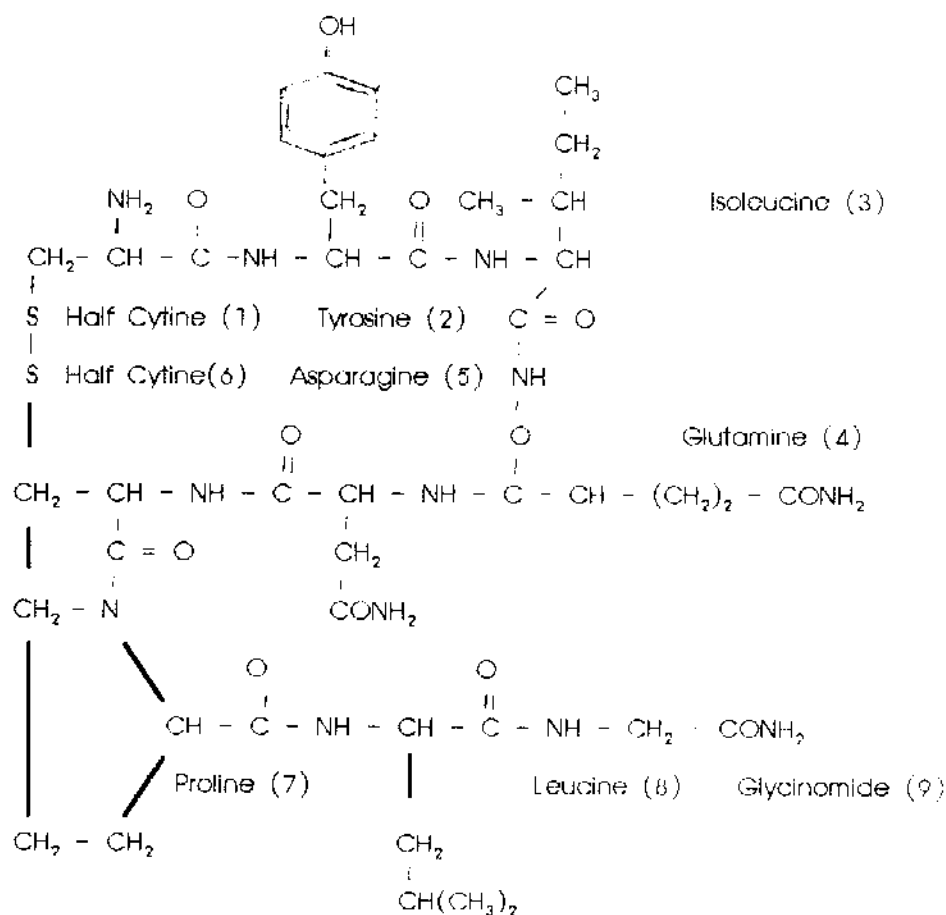
คาเฟอีนเพิ่มการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า (progressive motility) ของอสุจิได้จนถึงระดับ 1.0 มิลลิโมล (Levin et al., 1981) ขณะที่ Moussu (1983) ไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจิเมื่อเติมคาเฟอีนที่ระดับ 3, 6 และ 12 มิลลิโมล ทั้งหลังการเติมคาเฟอีนที่ 30 และ 120 นาที ตรงกันข้ามกับ Ree และคณะ (1990) ที่พบว่าการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าลดลงประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ของกลุ่มที่ไม่เติม (68 เปอร์เซ็นต์) หลังการเติมคาเฟอีน 6 มิลลิโมล ที่ 2 ชั่วโมง

คาเฟอีน 2, 5 และ 10 มิลลิโมล ไม่มีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (velocity) ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง (Aitken et al., 1983 และ Moussu, 1983) ขณะที่ Ree และคณะ (1990) พบว่าคาเฟอีนที่ระดับ 0.75 มิลลิโมล เพิ่มความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิได้สูงสุด และที่ระดับ 3 มิลลิโมล ขึ้นไปลดความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจินี้คือ 54, 54, 59, 69, 49, 45 และ 38 ไมโครเมตรต่อวินาที ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังการเติมคาเฟอีนระดับ 0, 0.15, 0.38, 0.75, 1.5, 3.6 และ 12 มิลลิโมล ตามลำดับ ตรงกันข้ามกับ Cai และ Marik (1989) พบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดเพิ่มขึ้นได้ด้วยคาเฟอีนระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมล

Prins และ Ross (1985) พบว่าความสามารถในการเข้าปฏิสนธิ (fertilizing capacity) ของอสุจิที่มีคุณภาพต่ำเพิ่มขึ้นหากเติมคาเฟอีนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cai และ Marik (1989) ที่พบว่าการใช้คาเฟอีนในน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำโดยเฉพาะน้ำเชื้อแช่แข็งเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิได้ดีกว่าการเติมคาเฟอีนในน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีอยู่แล้ว ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้น Aitken และคณะ (1983) รายงานว่าความเข้มข้นระดับ 2 มิลลิโมล ทำให้อสุจิมียัตราการเจาะไข่ (penetration rate) ได้สูงกว่าการเติมคาเฟอีนที่ระดับ 5 และ 7 มิลลิโมล ขณะที่ Cai และ Marik (1989) พบว่าคาเฟอีน 1 มิลลิโมล เป็นผลดีต่ออัตราการเจาะไข่ อย่างไรก็ตามผลของคาเฟอีนต่อความสามารถในการปฏิสนธิแตกต่างกันในแต่ละการทดลองอาจเกิดจากความแตกต่างที่เวลาในการเติมคาเฟอีนหรือความเข้มข้นสุดท้ายของคาเฟอีนหรือชนิดของน้ำเชื้อที่ทดลอง (น้ำเชื้อสดหรือแช่แข็ง) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สามารถเปลี่ยนผลที่แท้จริงของคาเฟอีนได้ทั้งสิ้น (Levin et al., 1981)

2.3 ออกซิโตซิน (oxytocin)

ออกซิโตซินเป็นฮอร์โมนที่เป็นเปปไทด์หลั่งออกจาก neurohypophysis ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ตัว มีลักษณะโครงสร้างคล้ายฮอร์โมน vasopressin ดังแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนั้นแล้วออกซิโตซินยังสร้างและหลั่งได้จาก granulosa cell (ของ follicle ตลอดจนถึงเซลล์ของ corpus luteum) (Sawyer et al., 1986; Ivell et al., 1990; Rodgers et al., 1983; และ Meidan et al., 1992) และพบว่ามีการหลั่งออกจาก cumulus cell ของหนูดด้วย (Makimura et al., 1992) Ivell และ Richter (1984) อ้างโดย Okuda และคณะ (1992) รายงานว่าจำนวน mRNA ของออกซิโตซินใน corpora lutea ในระหว่าง midluteal phase ของวงรอบการเป็นสัดสูงกว่าที่พบในไฮโปธาลามัส 250 เท่า นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าออกซิโตซินจาก corpora lutea และจาก neurophysis มีผลกระตุ้นการหลั่งของ $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Flint and Sheldrich, 1982 และ 1983)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของฮอร์โมนออกซิโตซิน

ที่มา: Hadley (1988)

กพ
GF
๘๔๔๗



หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

น ๖๕๑๑๑

25

พารენไคมา (parenchyma) ใน corpus luteum ของโคประกอบด้วยเซลล์ที่สร้าง
ฮอร์โมน steroid (steroidogenic luteal cell) 2 ชนิดคือ large luteal cell หรือ granulosa-
lutein cell และ small cell หรือ theca-lutein cell (Fitz et al., 1982 และ Rodgers et al.,
1983) ออกซิโตซินถูกจำกัดปริมาณการผลิตโดยจำนวนของ large luteal cell (Sawyer et al.,
1986) โดยเซลล์นี้เพิ่มจำนวนและขนาดขึ้นในวันที่ 10 และ 16 ของรอบการเป็นสัด (Schams
et al., 1985)

Olins และ Bremel (1984) รายงานว่าออกซิโตซินไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ cGMP
แต่เพิ่มปริมาณ cAMP ใน myoepithelial cell การเพิ่มระดับ cAMP เพื่อตอบสนองต่อ
ออกซิโตซินไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการควบคุม myosin phosphorylation และระดับการตอบ
สนองของเซลล์ต่อออกซิโตซินขึ้นอยู่กับระดับ Ca^{2+} ขณะที่ Olins และ Bremel (1982)
พบว่าการใช้ออกซิโตซิน 10 มิลลิโมล สามารถกระตุ้นขบวนการ phosphorylation ของ
myosine ได้

Milovanov และคณะ (1962) อ้างโดย Wathes (1984) รายงานว่าการฉีดออกซิโตซิน
ให้โคตัวผู้ก่อนผสมทำให้เพิ่มปริมาณน้ำเชื้อและให้ผลในทำนองเดียวกันเมื่อทดลองในกระต่าย
Sharma และ Hays (1976) พบว่าการให้ methallibure ซึ่งไปยับยั้งการหลั่งออกซิโตซินจาก
hypothalamus ให้จำนวนอสุจิลดลง 45 เปอร์เซ็นต์ ต่อกการหลั่งแต่ละครั้ง แต่สามารถแก้ไขได้
โดยฉีดออกซิโตซินแสดงให้เห็นว่าออกซิโตซินเป็นตัวการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อและบางครั้ง
เพิ่มจำนวนเซลล์อสุจิที่หลั่งออกซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มการเคลื่อนไหวของระบบขนส่ง (upper
genital tract) (Wathes, 1984)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่มีความแปรปรวนในการเคลื่อนไหวของมดลูกในช่วงรอบ
การเป็นสัด ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากอิทธิพลของการหลั่งออกซิโตซินและวาโซเพรสซินในโค แพะ
และสุกรมีจังหวะในการเคลื่อนไหวของมดลูกคล้ายคลึงกัน (Wathes, 1984) โดยการเคลื่อนไหว
เกิดสูงสุดระหว่าง proestrus และ estrus ขณะที่ luteal phase มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า
(Crocker and Shelton, 1973; Ruckebusch and Bueno, 1976 และ Nooktegeboren et al.,
1973) สำหรับโคและแกะมีหลักฐานบางอย่างบ่งชี้ว่ามีการเคลื่อนไหวจาก cervix ไปสู่ท่อนำไข่
ในช่วง oestrus แต่จะกลับกันเมื่ออยู่ในช่วงหลังของ oestrus (Hawk, 1975 และ Rexrood,
1980) การเปลี่ยนแปลงของลักษณะการเคลื่อนไหวดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลง
ของ estrogen และ progesterone (Lye and Porter, 1978 และ Porter and Lye, 1983)
การฉีด estrogen และ progesterone ทำให้บทบาทของออกซิโตซินต่อกล้ามเนื้อมดลูกลดลง
(Porter and Lye, 1983) ในช่วง anestrus ขบวนการถ่ายมดลูกสงบไม่เคลื่อนไหวแต่กลับมา

เคลื่อนไหวในช่วง estrus และทันทีหลังการผสมเพิ่มการเคลื่อนไหวอย่างรวดเร็วและลดลงจนสงบ เช่นเดิมในวันที่ 4 ของการตั้งท้อง (Aref and Hafez, 1973) ในกระต่ายที่ไม่ตั้งท้อง ออกซิโตซินและ vasopressin สามารถกระตุ้นมดลูกได้และการตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับ estrogen แต่จะหยุดลงด้วยการให้ progesterone (Nissenson et al., 1978 อ้างโดย Wathes, 1984)

2.4 อัตราการผสมติด

สิ่งที่สำคัญประการหนึ่งของการเลี้ยงโคคือความสามารถในการสืบพันธุ์ของโคและการผสมติดถือว่าเป็นความสำเร็จขั้นต้นของขบวนการสืบพันธุ์ของโค หลังการผสมพันธุ์ 30-60 วัน โคไม่กลับมาเป็นสัดอีกแสดงว่ามีการผสมติด (Hunter, 1980) แต่อัตราการผสมติดของโคแปรปรวนตามปัจจัยหลายอย่างเช่น อาหารการจัดการ สภาพแวดล้อมรอบตัว ปริมาณการให้ผลผลิต รวมทั้งอายุและพันธุ์ของสัตว์

Fonseco และคณะ (1983) รายงานว่าโคที่ให้มน้อยกว่า 1400 กิโลกรัม มีอัตราการผสมติดดีกว่าโคที่ให้ผลผลิตนมมากกว่า 2,600 กิโลกรัม ใน 70 วัน แรกของการให้นม เช่นเดียวกับรายงานของ Badinga และคณะ (1985) ที่พบว่าโคพันธุ์ Holstein ให้นมมากกว่าพันธุ์ Jerseys (6,799 และ 4,504 กิโลกรัม) จะต้องการจำนวนครั้งในการผสมมากกว่า

Ullberg และ Burfenig (1967) พบว่าอัตราการตั้งท้องลดลงจากร้อยละ 61 เป็น 45 เมื่ออุณหภูมิที่ทวารหนักที่ 12 ชั่วโมง หลังผสมพันธุ์เพิ่มขึ้น 1 °C สอดคล้องกับรายงานของ Dunlop และ Vincent (1971) ที่พบว่าถ้าเลี้ยงโคที่ 32.2 °C อุณหภูมิทวารหนัก 40.0 °C เมื่อ 72 ชั่วโมง หลังผสมจะมีอัตราการผสมติดร้อยละ 0 ขณะที่อัตราการผสมติดเปลี่ยนเป็นร้อยละ 48 หากเลี้ยงในอุณหภูมิ 21.1 °C และอุณหภูมิทวารหนัก 38.5 °C การที่อุณหภูมิทวารหนักสูงขึ้นเชื่อว่าทำให้เกิดความไม่สมดุลของฮอโมน นอกจากนั้นการที่มีระดับ estrogen ต่ำทำให้การเจริญของไข่ผิดปกติไปก่อนที่จะเกิดการตกไข่ (Ingraham et al., 1974) นอกจากอุณหภูมิแล้วความยาวสั้นของกลางวันมีผลต่อการผสมติดของโคดังนี้ โดยฤดูหนาวซึ่งมีกลางวัน 5.5 ชั่วโมง มีอัตราการผสมติดร้อยละ 44 เทียบกับฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งมีกลางวันยาวกว่าจะมีอัตราการผสมติดร้อยละ 55 (Badinga et al., 1985)

อัตราการผสมติดของโคแต่ละพันธุ์แตกต่างกันกล่าวคือโคพันธุ์ Jerseys มีอัตราการผสมติดสูงสุดเมื่อเทียบกับพันธุ์ Holstein, Ayrshire และ Brown swiss คือร้อยละ 48.4, 35.5, 33.8 และ 34.6 ตามลำดับ และเนื่องจากอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของการสืบพันธุ์มี

ค่าต่ำคือประมาณ .10 (Boddinga et al., 1985) ทำให้การปรับปรุงด้านการสืบพันธุ์เป็นไปได้
ช้ากว่าการปรับปรุงด้านการให้ผลผลิตนม

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผสมติดของการผสมเทียม

2.4.1.1 จำนวนเซลล์อสุจิที่ใช้ผสม

จำนวนเซลล์อสุจิที่ zona pellucida มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับการ
ผสมติดในโค (Hawk and Tanabe, 1986) ในแกะ (Hawk and Cooper, 1984) ในสุกร
(Pursel, 1982) และในกระต่าย (Overstreet and Adams, 1971) และโดยทั่วไปการผสมเทียม
โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในโคใช้เซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่อย่างน้อยที่สุด 10×10^6 เซลล์ต่อโดสการ
ผสมเทียมแต่ละครั้ง (Pace et al., 1981) Hawk และคณะ (1988) เพิ่มจำนวนไข่ที่มีอสุจิ
จาก 12 เพอร์เซ็นต์ เป็น 32 เพอร์เซ็นต์และเพิ่มอัตราการปฏิสนธิจาก 53 เพอร์เซ็นต์ เป็น
เกือบ 100 เพอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มจำนวนเซลล์อสุจิจาก 70×10^6 เป็น 4.4×10^9 เซลล์ อย่างไรก็ตาม
ก็ตามจำนวนเซลล์อสุจิที่ไวขึ้นอยู่กับขนาดของการทำน้ำเชื้อและคุณภาพพ่อโคด้วย (Salisbury et
al., 1978) Schonk และคณะ (1987) พบว่าอัตราการผสมติดเท่ากับ 64 เพอร์เซ็นต์
เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่มีจำนวน 11×10^6 เซลล์ ซึ่งต่ำกว่าการผสมด้วยโคสที่มีจำนวนเซลล์
อสุจิที่มากกว่า 11×10^6 เซลล์ ขณะที่ Foote (1970) พบว่าการใช้อสุจิจำนวน 16×10^6 และ
 24×10^6 เซลล์ มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน

2.4.1.2 เวลาที่ทำการผสมเทียม

การตรวจพบการเป็นสัดและเวลาการผสมเทียมมีความสำคัญในการเพิ่ม
ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในฝูงโค ความแม่นยำในการตรวจสัดเป็นกุญแจสำคัญที่ทำให้การ
ผสมเทียมได้ถูกเวลา (Bowen et al., 1988) โคแสดงการเป็นสัดด้วยการยืนนิ่งยอมให้โค
ตัวอื่นขึ้นทับ โคส่วนใหญ่เริ่มเป็นสัดในช่วงกลางคืนหรือตอนเช้ามืด (Foote, 1979) และมีความ
ยาวของการเป็นสัดประมาณ 15-20 ชั่วโมง (Salisbury et al., 1978) แต่อาจแปรปรวนขึ้น
อยู่กับสภาพสังคมและสิ่งแวดล้อมของคอกด้วย (De Silva et al., 1981) อย่างไรก็ตามการ
ตกไข่ (ovulation) ของโคเกิดหลังการเป็นสัดสิ้นสุดลง โดยเฉลี่ยการตกไข่เกิดที่ 25-30 ชั่วโมง
หลังเริ่มต้นเป็นสัดและเฉลี่ย 11-13 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดการเป็นสัด (Salisbury et al., 1978)

ความแม่นยำของเวลาในการผสมเทียมเกี่ยวข้องกับเวลาที่ต้องการในการเกิด sperm capacitation ในมดลูกหรือปีกมดลูกและเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Hafez, 1974) อัตราการผสมติดต่ำที่สุดหากผสมช่วงต้นของการเป็นสัดหรือหลังการเป็นสัดมากกว่า 6 ชั่วโมง และอัตราการผสมติดสูงสุดเมื่อผสมเทียมช่วงกลางของการเป็นสัด (midestrus) ถึงช่วงท้ายของการยืนนิ่งยอมรับการผสม (Salisbury et al., 1978) ขณะที่ Rankin และคณะ (1992) พบว่าการผสมเทียมหลังการเป็นสัด 0-6.59 ชั่วโมง มีอัตราการผสมติดมากกว่าการผสมในเวลาหลังการเป็นสัดที่มากกว่า 6.59 ชั่วโมง

2.4.1.3 บริเวณที่ปล่อยน้ำเชื้อ

ผลการทดลองส่วนใหญ่พบว่าอัตราการผสมติดแตกต่างกันเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อปล่อยน้ำเชื้อที่ช่วงต้นของ cervix, ตัวมดลูกและช่วงปลายของปีกมดลูก (Olds, 1978) อย่างไรก็ตาม Zavos และคณะ (1985) พบว่าการปล่อยน้ำเชื้อที่บริเวณปีกมดลูกข้างที่คาดว่า จะตกไข่มีอัตราการผสมติดมากกว่าการปล่อยที่บริเวณตัวมดลูกคือ 57 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับ Graves และคณะ (1991) ที่พบว่าการปล่อยน้ำเชื้อที่ตัวมดลูก ให้อัตราการผสมติด (62.9 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าการปล่อยที่ปีกทั้งสองข้างของมดลูกประมาณ 8.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Hawk และ Tanabe (1986) รายงานว่าการปล่อยน้ำเชื้อที่ตัวมดลูก หรือปีกมดลูกข้างที่ตกไข่และปล่อย น้ำเชื้อข้างที่ไม่มีการตกไข่มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Larsson (1986) ที่พบว่าการปล่อยน้ำเชื้อที่ปีกมดลูกด้านใดด้านหนึ่ง หลังจากนั้น 2 ชั่วโมง พบว่ามีเซลล์อสุจิอยู่ที่ท่อนำไข่ทั้ง 2 ด้าน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การปล่อยน้ำเชื้อที่ปีกทั้ง 2 ข้างเท่าๆกันช่วยเพิ่มอัตราการผสมติด (Senger et al., 1984) และการปล่อยที่ความลึกในปีกมดลูกแต่ละข้าง 2.5 เซนติเมตร ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับ ความลึกระยะอื่น (Williams et al., 1988)