

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การทดลองที่ 1

ผลการทดลองโดยสรุปคือคาเฟอีนเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ในช่วงเวลาก่อนการแช่แข็งและหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง และผลการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนแต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า การมีชีวิต และสภาพอะโครโซมของอสุจิทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการละลาย

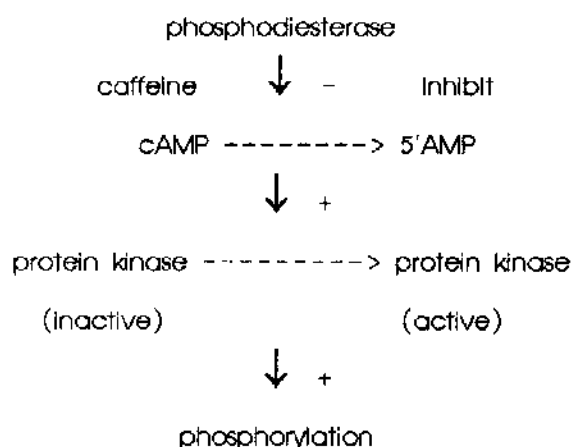
ออกซิโตซินเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ในช่วงเวลาก่อนการแช่แข็ง หลังการละลายที่ 0 และ 2 ชั่วโมง มีผลเพิ่มการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจีก่อนการแช่แข็งแต่ไม่มีผลต่อการมีชีวิตและสภาพอะโครโซมของอสุจิทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการละลาย

5.1.1 การเคลื่อนที่ของอสุจิ

5.1.1.1 ก่อนการแช่แข็ง

อิทธิพลของคาเฟอีน: จากผลการทดลองแสดงว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นเป็นแนวเส้นตรงตามการเพิ่มขึ้นของระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนจาก 0.4 ถึง 1.0 มิลลิโมล สอดคล้องกับรายงานของ Levin และคณะ (1981) ที่พบว่าระดับคาเฟอีนจาก 0.012 ถึง 2.0 มิลลิโมล สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่และเมทาโบลิซึมของอสุจิได้และกระตุ้นได้สูงสุดที่ระดับ 1.0 มิลลิโมล แต่ระดับที่มากกว่า 1.0 มิลลิโมล เพิ่มการเคลื่อนที่ได้น้อยลง ในทำนองเดียวกับรายงานของ Aitken และคณะ (1983); Moussa (1983); El-Goofary และคณะ (1990) และ Sigh และ Raina (1994) ที่พบว่าหลังการเติมคาเฟอีนความเข้มข้นระหว่าง 0.1-12.0 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อสดหรือก่อนการแช่แข็งมีผลเพิ่มการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิระหว่าง 9.15 - 28.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีน อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างในระดับการกระตุ้นการเคลื่อนที่อาจขึ้นอยู่กับระดับคาเฟอีนที่ใช้โดยถ้าหากใช้คาเฟอีนสูงขึ้นการยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase เกิดขึ้นได้มากขึ้นระดับ cAMP เพิ่มขึ้น

และไปเปลี่ยน protein kinase ที่ไม่ทำงาน (inactive) เป็น protein kinase ที่ทำงานได้ (active) จึงทำให้จำนวนการ phosphorylation ในเมทอโบลิซึมของน้ำตาลเกิดได้มากขึ้น ได้ ATP มากขึ้น ส่งผลให้การเคลื่อนที่มากตามไปด้วย ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การทำงานของคาเฟอีนและบทบาทของ cAMP ต่อเอ็นไซม์ protein kinase และ phosphorylation

ที่มา: Stryer (1988)

อิทธิพลของออกซิโคซิน: จากผลการทดลองบ่งว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นเป็นแนวเส้นตรงตามระดับความเข้มข้นของออกซิโคซินที่เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) อาจจะเป็นเนื่องมาจากออกซิโคซินที่มากขึ้นมีผลในการเพิ่มปริมาณ cAMP ในเซลล์อสุจิมากขึ้น (Olins and Bremel, 1984) และมีผลให้เกิดขบวนการ phosphorylation ได้เพิ่มขึ้น (Olins and Bremel, 1982) ซึ่งอาจมีผลเช่นเดียวกันในอสุจิทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม บทบาทของออกซิโคซินที่เซลล์อสุจินอกเหนือจากเพิ่มระดับ cAMP โดยกระตุ้นที่ adenylyate cyclase แล้วอาจเพิ่มระดับการผ่านเข้าสู่เซลล์ของ Ca^{2+} (Vongpralub and Koyanagi, 1994) ด้วยในทำนองเดียวกับที่พบใน prostaglandins (Kirtland and Baum, 1972) ซึ่งพบว่า PGE-1 และ PGE-2 ควบคุมการ กักเก็บ (uptake) หรือการจับเอา Ca^{2+} ของเซลล์อสุจิ (Horrobin, 1977 อ้างโดย Aitken and Kelly, 1985) และระดับที่ PGE-2 กระตุ้นการเจาะไข่ (penetration) ของอสุจิได้สูงสุดที่ระดับ 8.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ PGE-1 มีอัตราการเจาะไข่ได้สูงสุดที่ระดับ 33.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ระดับที่สูงกว่านี้ มีผลในการยับยั้ง และอัตราการเจาะไข่กลับมามีระดับที่ไม่มี PGE-1 ที่ระดับ 270

ไม่มีใครมีต่อมิลลิเมตร ซึ่งบ่งว่าการตอบสนองเป็นรูประฆังคว่ำ (bell-shape) และ Horrobin (1977) อ้างโดย Aitken และ Kelly (1985) ได้รายงานว่าผลของ prostaglandins ขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมการใช้ประโยชน์ได้ (availability) ของบริเวณที่จับของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ซึ่งตามรูปแบบนี้ความสัมพันธ์ระหว่าง prostaglandins กับตัวรับ prostaglandin เป็นตัวชักนำให้เกิดการทำงานของบริเวณที่ Ca^{2+} ใช้จับ (binding sites) และการจับของ Ca^{2+} ทำให้เกิดการทำงานของระบบ การตอบสนองในลักษณะระฆังคว่ำเกิดขึ้นเนื่องจากเมื่อระดับความเข้มข้น prostaglandins สูงกว่าปริมาณที่ Ca^{2+} ใช้จับที่มีอยู่ไม่มีการตอบสนองของระบบ และเนื่องจาก Ca^{2+} จะเกี่ยวข้องกับเมทาโบลิซึมของ cAMP แล้วยังมีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของ axoneme (Tash and Means, 1983) ดังนั้นข้อสันนิษฐานที่ว่าออกซิโตซินเกี่ยวข้องกับการควบคุมการจับของ Ca^{2+} กับส่วนของเซลล์อสุจิและการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิเช่นเดียวกับ prostaglandins จึงน่าจะเป็นไปได้ อย่างไรก็ตามยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโตซินต่อการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนการแช่แข็งพบว่าค่าเฉลี่ยการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (77.57 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างกับกลุ่มที่เติมออกซิโตซิน (79.03 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากค่าเฉลี่ยของความสามารถในการกระตุ้นขบวนการ phosphorylation ของออกซิโตซินระดับความเข้มข้น 10^{-12} - 10^{-4} โมล สูงกว่าคาเฟอีนระดับความเข้มข้น 0.4 ถึง 1.0 มิลลิโมล อย่างไรก็ตามเป็นเพียงข้อสันนิษฐานควรมีการพิสูจน์โดยการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ cAMP ภายในเซลล์อสุจิภายหลังการเติมออกซิโตซินที่ความเข้มข้น 10^{-12} - 10^{-4} โมล หรือหลังเติมคาเฟอีน 0.4-1.0 มิลลิโมล ที่ 1 ชั่วโมง ตามวิธีที่รายงานโดย Steiner และคณะ (1972) หรืออาจตรวจวัดระดับอัตราส่วนของ ATP/ADP ซึ่งบ่งชี้อัตราการเกิด phosphorylation ได้ คือเมื่ออัตราส่วนนี้ลดลงแสดงว่าขบวนการ phosphorylation เพิ่มขึ้น (Halang et al., 1985 และ 1987) วิธีนี้รายงานโดย Ree และคณะ (1990)

5.1.1.2 หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

อิทธิพลของคาเฟอีน: ที่ 0 ชั่วโมงหลังการละลาย (0 h, post-thawing) จากผลการทดลองแสดงว่าระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนในระดับ 0.4 ถึง 1.0 มิลลิโมล ให้การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทุกระดับมีการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานของ Fattouh และ Abdou

(1991) ที่พบว่าหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือที่เติมคาเฟอีนในระดับ 2 มิลลิโมล ที่ 0 ชั่วโมง อสุจิมีการเคลื่อนที่ 57 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มควบคุม 14 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้ พบว่าคาเฟอีน 1.0 มิลลิโมล เพิ่มการเคลื่อนที่จากกลุ่มควบคุม 9.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความแตกต่างของการเพิ่มการกระตุ้นนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของระดับคาเฟอีนที่ใช้ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase แตกต่างกันได้ด้วย Fattouh และ Abdou (1991) พบว่าที่ระดับคาเฟอีน 4 และ 6 มิลลิโมล กระตุ้นการเคลื่อนที่หลังละลายที่ 0 ชั่วโมง ได้น้อยกว่าที่ 2 มิลลิโมล แสดงว่ามีระดับที่เหมาะสมกับการกระตุ้นการเคลื่อนที่อยู่ระดับหนึ่งเท่านั้นและเป็นไปได้ว่าคาเฟอีนมีกลไกอื่นในการควบคุมการเคลื่อนที่นอกเหนือจากการยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase (Levin et al., 1981)

อิทธิพลของออกซิโตซิน: ที่ 0 ชั่วโมงหลังการละลาย จากผลการทดลองที่ว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นตามระดับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของออกซิโตซิน ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าภายหลังจากละลายที่ 0 ชั่วโมง ออกซิโตซินระดับความเข้มข้น 10^{-12} – 10^{-4} โมล สามารถกระตุ้นขบวนการ phosphorylation ของอสุจิหรือกระตุ้นการผ่านเข้าในเซลล์อสุจิของ Ca^{2+} มากขึ้น ในทำนองเดียวกับที่พบใน prostaglandins ดังที่ได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 5.1.1.1

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโตซินต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (44.00 เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่ากลุ่มที่เติมออกซิโตซิน (49.13 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากระดับความเข้มข้นออกซิโตซิน 10^{-12} ถึง 10^{-4} โมล สามารถเพิ่มระดับ cAMP และขบวนการ phosphorylation ได้มากกว่าคาเฟอีนระดับความเข้มข้น 0.4 – 1.0 มิลลิโมล ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมออกซิโตซินสูงกว่ากลุ่มที่เติมคาเฟอีน อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบสมมติฐานนี้โดยการวัดระดับความเข้มข้นของ cAMP หรืออัตราส่วนของ ATP/ADP ด้วย หรือทำการตรวจสอบเพิ่มเติมว่าทั้งออกซิโตซินและคาเฟอีนมีผลทำให้ Ca^{2+} เข้าไปภายในเซลล์มากขึ้นโดยตรงหรือไม่ จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิสูญเสียไปในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลายประมาณ 33.5 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุม และ 33.57 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่เติมคาเฟอีน และ 29.90 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่เติมออกซิโตซินซึ่งทุกกลุ่มทดลองมีค่าการสูญเสียการเคลื่อนที่หลังการละลายใกล้เคียงกับที่รายงานโดย McLoughlin และคณะ (1992) และ Almid และ Johnson (1988) ที่พบว่ามีการสูญเสียเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลายประมาณ 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความสูญเสียเกิด

จากมีการตายของเซลล์อสุจิบางส่วนจากขบวนการแช่แข็งและการละลาย อันเนื่องมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Watson, 1990) หรือโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (Pederson and Lebeck, 1971) หรือความเสียหายที่เกิดจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์อสุจิและการเกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) ในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลาย (Correa and Zavos, 1994)

อิทธิพลของคาเฟอีน: ที่ 2 ชั่วโมงหลังการละลาย จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่เดิมคาเฟอีนยังคงมีการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม 2.47 เปอร์เซ็นต์ หลังการละลาย 2 ชั่วโมง ทำนองเดียวกับ Fattouh และ Abdou (1991) ที่พบว่า การเติมคาเฟอีนระดับ 0 ถึง 6 มิลลิโมลในน้ำเชื้อโค เมื่อหลังละลาย 2 ชั่วโมง ยังคงมีการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยที่ระดับ 2 มิลลิโมล มีอสุจิเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มที่ไม่เติม 23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความแตกต่างในระดับการเพิ่มอาจเกิดจากระดับคาเฟอีนที่ใช้แตกต่างกัน

อิทธิพลของออกซิโตซิน: ที่ 2 ชั่วโมงหลังการละลาย จากผลการทดลองที่ว่าออกซิโตซินที่ระดับ 10^{-4} และ 10^{-8} โมล มีการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าระดับอื่นอาจเกิดจาก 10^{-4} โมล เป็นความเข้มข้นสูงสุดทำให้การกระตุ้น adenylyate cyclase มากที่สุด จึงทำให้เกิด cAMP มากที่สุดด้วย แต่ที่ระดับ 10^{-8} โมล ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากสาเหตุใดจึงทำให้ระดับ 10^{-8} โมล กระตุ้นการเคลื่อนที่ได้มากกว่า 10^{-6} , 10^{-10} และ 10^{-12} โมล อย่างไรก็ตาม หากอธิบายตามข้อสันนิษฐานที่ว่าออกซิโตซินทำงานต่อเซลล์อสุจิ โดยเพิ่มการผ่านเข้าเซลล์ของ Ca^{2+} มากขึ้น ในทำนองเดียวกับที่สันนิษฐานใน prostaglandins อาจกล่าวได้ว่า 10^{-8} โมล เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณ Ca^{2+} ที่เข้าสู่เซลล์พอดีกับ Ca^{2+} binding sites ที่มีอยู่หรือที่ทำงานได้ ส่วนระดับที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่า 10^{-8} โมล เป็นระดับที่ทำให้ Ca^{2+} เข้าในเซลล์น้อยหรือมากเกินไปกว่า Ca^{2+} binding sites ที่มีอยู่ แต่ข้อสันนิษฐานนี้ไม่สามารถอธิบายออกซิโตซินความเข้มข้น 10^{-4} โมล ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโตซินต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ หลังการละลายที่ 2 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เดิมคาเฟอีน (26.22 เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่ากลุ่มที่เดิมออกซิโตซิน (28.63 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาจเกิดจากขบวนการ phosphorylation ในกลุ่มที่เดิมออกซิโตซินโดยเฉลี่ยยังสูงกว่ากลุ่มที่เดิมคาเฟอีนทำให้การเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยจึงยังสูงกว่า

อิทธิพลของคาเฟอีน: ที่ 4 ชั่วโมงหลังการละลาย จากผลการทดลองแสดงว่าการเติมคาเฟอีนไม่ได้เพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับ El-Godfary และคณะ (1990) ที่พบว่าในน้ำเชื้อสดโคที่เดิมคาเฟอีน 0.8

มิลลิโมล ที่ 4 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (57.5 เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติม 6.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ขัดแย้งกับ Fattouh และ Abdou (1991) ที่พบว่าการเติมคาเฟอีนระดับ 2 และ 4 มิลลิโมล ในน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเป็นเม็ด (pellet form) ของกระบือหลังการละลายที่ 3 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีน แต่ที่ระดับ 6 มิลลิโมล การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เติม อย่างไรก็ตามในรายงานไม่มีการวัดการเคลื่อนที่หลังการละลาย 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เติมคาเฟอีน 2 และ 4 มิลลิโมล อาจไม่แตกต่างกันเพราะอัตราการลดลงของการเคลื่อนที่ในกลุ่มที่เติมคาเฟอีนมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากอสุจิที่มีการเคลื่อนที่มากในช่วงแรกต้องใช้พลังงานมากทำให้แหล่งพลังงานภายในเซลล์อสุจิหมดได้ (Bearden and Fuquay, 1984) หรืออาจเกิดจากเซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่มากกว่าเกิดขบวนการเมแทบอลิซึมมากกว่าและผลิตกรดแลคติกมากกว่า ทำให้สภาพ pH ภายในเซลล์อสุจิไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเมแทบอลิซึม (Acott and Carr, 1984) ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงด้วย ดังเช่นที่ El-Gaafary และคณะ (1990) ได้พบว่าภายหลังการเติมคาเฟอีน 0.8 มิลลิโมล แล้ว 2 ชั่วโมง ขึ้นไป pH ต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนและยิ่งเวลาหลังการเติมมากขึ้นความแตกต่างของ pH ก็ยิ่งเพิ่มขึ้นด้วยตามระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนที่มากขึ้น ในทำนองเดียวกับการเคลื่อนที่ของอสุจิก็น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนและการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงตามระดับ pH ที่ลดลง

อิทธิพลของออกซิโดซิน: ที่ 4 ชั่วโมงหลังการละลาย การที่กลุ่มที่เติมออกซิโดซินมีการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เติมออกซิโดซินเมื่อเวลาหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากกรดแลคติกจากขบวนการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นมากในช่วงแรกทำให้สภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในขบวนการเมแทบอลิซึมทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลงเช่นเดียวกับสภาพที่เกิดขึ้นเมื่อเติมคาเฟอีน อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับออกซิโดซินในอสุจิและระดับ pH หลังการใช้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ แต่สันนิษฐานว่าเมื่อเมแทบอลิซึมเพิ่มขึ้น pH น่าจะลดลง

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโดซินต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (13.00 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิโดซิน (12.80 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) แสดงว่าเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นการลดลงของการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมออกซิโดซินจะมากกว่ากลุ่มที่เติมคาเฟอีนซึ่งอาจเกิดจากเมแทบอลิซึมที่มากกว่าในช่วงแรกของกลุ่มที่เติมออกซิโดซินทำให้เกิดหมดพลังงานเร็วขึ้นหรือเกิดการลดลงของ pH เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่มากขึ้นดังที่ได้อธิบายไว้แล้วในช่วงต้น

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงและการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมงที่พบจากการทดลองนี้ต่ำกว่าหลายการทดลองโดย Soderquist และคณะ (1991) ที่พบว่าอสุจิเคลื่อนที่ 33.5 เปอร์เซ็นต์ หลังการละลายที่ 3 ชั่วโมง และ Fattouh และ Abdou (1991) ที่พบว่าอสุจิมีการเคลื่อนที่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการละลายที่ 3 ชั่วโมง แต่ก็ใกล้เคียงกับค่าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมขอนแก่นทำได้ (ติดต่อบุคคล)

5.1.2 การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ

5.1.2.1 ก่อนการแช่แข็ง

เนื่องจากการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้ามีความสัมพันธ์ในทางบวกกับอัตราการผสมติด (Bearden and Fuquay, 1984) ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อจึงจำเป็นต้องศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ

อิทธิพลของคาเฟอีน: จากผลการทดลองก่อนการแช่แข็งแสดงว่าการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่เติมคาเฟอีนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เติม ในทำนองเดียวกับ Moussu (1983) ที่รายงานว่าหลังเติมคาเฟอีน 3 มิลลิโมล 1 ชั่วโมง ในน้ำเชื้อสดของคนไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิซึ่งอาจเนื่องมาจากระดับคาเฟอีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (0.4-1.0 มิลลิโมล) กับที่ Moussu (1983) ใช้ไม่สูงมากนักทำให้เมื่อเติมในน้ำเชื้อแล้ว 1 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าไม่แตกต่างกัน แต่ขัดแย้งกับ Ree และคณะ (1990) ที่พบว่าหลังการเติมคาเฟอีน 6 มิลลิโมล ที่ 0 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าซึ่งอาจเกิดจากที่ 0 ชั่วโมงหลังการเติมคาเฟอีนคาเฟอีนยังไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ เนื่องจาก El-Gaafary (1987) อ้างโดย El-Gaafary และคณะ (1990) กล่าวว่าผลของคาเฟอีนต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิจะเริ่มแสดงเมื่อหลังการเติม 1 ชั่วโมง ขึ้นไป แต่ Ree และคณะ (1990) ยังพบอีกว่า เมื่อถึง 2 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าลดลง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งอาจเกิดจากการที่อสุจิมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคาเฟอีนสูงขึ้นเนื่องจากมีการยับยั้งเอ็นไซม์ phosphodiesterase เกิดขึ้นมากขึ้นจึงทำให้กระบวนการ phosphorylation ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารที่เป็นแหล่งพลังงานเกิดได้มากขึ้นด้วยและส่งผลให้มีพลังงาน (ATP) เพื่อการเคลื่อนที่มากขึ้นและที่ 2 ชั่วโมง เซลล์อสุจิอาจหมดพลังงานหรือเกิดกรดแลคติกจาก

ขบวนการเมทาบอลิซึมมากทำให้ pH ต่ำลง ทำให้สภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเมทาบอลิซึมและที่ลดการเคลื่อนที่ลดลงด้วยหรืออาจเกิดจาก กลไกอื่นของคาเฟอีนที่ไม่ใช่บทบาทการยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase แต่ยังไม่ ทราบแน่ชัดว่ากลไกใด อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่าคาเฟอีนอาจทำงานคล้าย ionophores โดย ทำงานโดยตรงต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ Ca^{2+} (Kirtland and Baum, 1972) ซึ่งเมื่อใช้ ระดับสูงถึง 6 มิลลิโมล ทำให้จำนวนเซลล์ของอสุจิที่เคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าลดลง แต่เคลื่อนที่ แบบส่ายไปมา (yawing) มากขึ้นและยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการใช้คาเฟอีนระดับ 6 มิลลิโมล ทำให้การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าลดลงหรือไม่ เพราะ Moussa (1983) ใช้คาเฟอีน 6 มิลลิโมล 1 ชั่วโมง หลังเติมไม่พบความแตกต่างในการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิเมื่อ เทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เป็นไปได้ว่าคาเฟอีนทำให้ Ca^{2+} เข้าเซลล์มากขึ้นและเมื่อความ เข้มข้นของคาเฟอีนมากขึ้น Ca^{2+} เข้าเซลล์มากขึ้นตามไปด้วยทำให้ยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิ ได้ เนื่องจาก Tash และ Means (1982) รายงานว่า Ca^{2+} ภายในอสุจิสูงมีระดับ 9 มิลลิโมล มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และ Blum และ Hayes (1977) อ้างโดย Tash และ Means (1983) พบว่า cilia ของ *Mytilus* และ *Elliptio* ที่หยุดการเคลื่อนที่เมื่อมี Ca^{2+} ภายในเซลล์เกิน 1 มิลลิโมล อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ที่ทำให้ การเคลื่อนที่ของอสุจิเปลี่ยนแปลงไป

อิทธิพลของออกซิโตซิน: ก่อนการแช่แข็ง จากผลการทดลองที่พบว่า การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมออกซิโตซินสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมออกซิโตซินอย่างมีนัย สำคัญในทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากออกซิโตซินทำให้ Ca^{2+} เข้าเซลล์อสุจิได้ มากขึ้นทำให้การเคลื่อนที่แบบไปข้างหน้ามากขึ้นเพราะ Ca^{2+} ไม่เพียงแต่มีผลต่อเมทาบอลิซึม ของ cAMP เท่านั้น แต่ยังมีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของ axoneme ด้วย (Tash and Means, 1983) และระดับของ Ca^{2+} มีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ (waveform) ของอสุจิด้วย โดย Bessen และคณะ (1980) อ้างโดย Tash และ Means (1983) พบว่าสัตว์ชั้นต้นพวก Chlamydomonas จะเคลื่อนที่แบบไม่ตรงเมื่อมี Ca^{2+} ภายในเซลล์ต่ำกว่า 10^{-6} โมล เช่นเดียวกับที่ Holwill และ McGregor (1976) ที่พบในพวก Crithidia หรือเกิดจากออกซิโตซิน กระตุ้นขบวนการ phosphorylation ให้มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโตซินต่อการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจีก่อนการแช่แข็งพบว่าผลการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนโดย เฉลี่ย (82.41 เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่ากลุ่มที่เติมออกซิโตซิน (84.16 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงความ

สามารถในการเคลื่อนที่เข้าผสมกับไข่ใน ovary ของระบบสืบพันธุ์เพศเมียเซลล์อสุจิที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามีโอกาสเข้าถึงบริเวณที่จะเกิดปฏิสนธิได้เร็วกว่าและมากกว่าพวกที่เคลื่อนที่แบบไม่ตรงไปข้างหน้าเนื่องจากในระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียมีจุดกั้น (barrier) ที่สำคัญอยู่ 2 ที่ คือ cervix และ utero-tubal junction ดังนั้นระหว่างการเคลื่อนที่กับการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าตัวที่ไปถึงซึ่งความสามารถในการเข้าปฏิสนธิได้ดีกว่าน่าจะเป็นการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า แต่เนื่องจากการประเมินหาการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าต้องใช้เวลามากกว่าดังนั้นตามศูนย์ผสมเทียมทั่วไปจึงมักจะวัดเฉพาะการเคลื่อนที่เท่านั้น

5.1.2.2 หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

อิทธิพลของคาเฟอีน: จากผลการทดลองหลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง จะเห็นว่าการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิในกลุ่มที่เติมและไม่เติมคาเฟอีนไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมที่ 0 และ 2 ชั่วโมงหลังการละลาย แสดงให้เห็นว่าคาเฟอีนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าหลังการแช่แข็งได้ แต่ที่ 4 ชั่วโมงหลังละลายค่าเฉลี่ยการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีน อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าจากการทดลองครั้งนี้ต่ำกว่าที่รายงานไว้โดย Moussou (1983) ที่พบว่าหลังการเติมคาเฟอีน 3 มิลลิโมล 2 ชั่วโมงในน้ำเชื้อสดโคอสุจิมีการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า 83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการทดลองดังกล่าวใช้น้ำเชื้อสดและใช้คาเฟอีนสูงกว่าการทดลองครั้งนี้

อิทธิพลของออกซิโดซีน: หลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง จากการทดลอง จะเห็นว่าออกซิโดซีนมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจิอย่างไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม ที่ 0 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีออกซิโดซีนและหลังละลายที่ 2 ชั่วโมง แสดงว่าถึงแม้ว่าการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิจะแตกต่างกันเมื่อได้รับระดับความเข้มข้นของออกซิโดซีนต่างกัน แต่จากภาพที่ 10 จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} โมล มีการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าสูงสุด อาจเป็นไปได้อาจจากความเข้มข้น 10^{-4} โมล เป็นความเข้มข้นสูงสุดของออกซิโดซีนจึงทำให้การกระตุ้นสูงสุดด้วย ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 10^{-4} โมล อาจทำให้การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าสูงขึ้นแต่ระยะเวลาที่เคลื่อนที่ได้ลดลงเนื่องจากเมื่อความเข้มข้นออกซิโดซีนสูงขึ้นอัตราการเกิดเมแทบอลิซึมของเซลล์อสุจิจะมากขึ้นทำให้การลดลงของ pH เร็วขึ้น เอ็นไซม์ใน

ขบวนการเมแทบอลิซึมทำงานได้น้อยลงและการเคลื่อนที่ได้ก็ลดลงด้วย แต่ที่เวลา 4 ชั่วโมง หลังการละลายกลุ่มที่มีออกซิไดซินโดยเฉลี่ยเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีออกซิไดซิน

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิไดซินต่อการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจิหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนโดยเฉลี่ย (82.37 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน (82.45 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) และจะพบว่า การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าลดลงจากค่าก่อนการแช่แข็ง 1.65 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุมและ 0.04 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่เติมคาเฟอีนและลดลง 1.71 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน และที่หลังการละลายที่ 2 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนโดยเฉลี่ย (75.26 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน (77.59 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) และหลังการละลายที่ 4 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (65.22 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน (67.16 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) จากผลการทดลอง แสดงว่าเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์เซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าลดลง สอดคล้องกับงานของ McLoughlin และคณะ (1992) แต่ขัดแย้งกับรายงานของ Moussa (1983) ที่พบว่าหลังการละลายที่ 3 ชั่วโมง (83.20 เปอร์เซ็นต์) ในน้ำเชื้อสดที่เติมคาเฟอีน 3 มิลลิโมล ไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าเมื่อเปรียบเทียบกับหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง (82.00 เปอร์เซ็นต์) การที่การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของกลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนหรือออกซิไดซินเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มที่เติมเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นเป็นไปได้ว่าเมื่อเวลาหลังการละลายมากขึ้น pH ของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนลดลงมากกว่า (El-Gaafary et al., 1990) เช่นเดียวกับกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน ดังนั้นในระยะยาวแล้วการเคลื่อนที่ของกลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนหรือออกซิไดซินน่าจะดีกว่า

5.1.3 เซลล์อสุจิที่มีชีวิต

5.1.3.1 ก่อนการแช่แข็ง

การทดลองครั้งนี้ใช้สีย้อม eosin-nigrosin เพื่อนับตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิ วิธีนี้มีข้อดีคือทำงานง่ายและใช้เวลาน้อยสามารถมองเห็นความแตกต่างของตัวเป็นตัวตายได้ชัดเจนเมื่อยังไม่มีกระบวนการละลายน้ำเชื้อเข้ากับตัวเจือจาง (extender) แต่หลังการเจือจางความชัดเจนจะต่ำลงเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์เนื่องมาจากไขมันจากไข่แดงที่เป็นส่วนผสมในตัวเจือจาง

อิทธิพลของคาเฟอีน: ก่อนการแช่แข็งจากผลการทดลองแสดงว่า คาเฟอีนไม่ได้เพิ่มเปอร์เซ็นต์เซลล์อสุจิที่มีชีวิตให้มากขึ้นซึ่งขัดแย้งกับ Makler และคณะ (1980) และ Moussa (1983) ที่รายงานว่าคาเฟอีนสามารถยืดเวลาการมีชีวิตของเซลล์อสุจิได้ ซึ่งอาจเกิดจากระดับคาเฟอีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ต่ำเกินไปทำให้จำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตไม่เพิ่มขึ้นมากนักเนื่องจากในอสุจิคน (Schoenfeld et al., 1975), โค (Miyamoto and Nishikawa, 1979) และในแกะ (El-Gaafary et al., 1990) จะเพิ่มเวลาของการมีชีวิตได้เมื่อใช้ 10 และ 20 มิลลิโมล อย่างไรก็ตาม ถ้าพิจารณาจากบทบาท (mode of action) ของคาเฟอีนที่กระทำต่อเอ็นไซม์ phosphodiesterase ภายในเซลล์อสุจิไม่น่าที่คาเฟอีนจะมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ แต่ Levin และคณะ (1981) พบว่าคาเฟอีนอาจกระตุ้นการเคลื่อนที่โดยกลไกอื่นด้วย นอกเหนือการยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase เนื่องจากคาเฟอีนกระตุ้นการเคลื่อนที่และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของ cAMP phosphodiesterase ดังนั้น ยังต้องการงานวิจัยสนับสนุนเพิ่มเติมต่อไป

อิทธิพลของออกซิไดซิน: ก่อนการแช่แข็ง ออกซิไดซินไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากออกซิไดซินสามารถเพิ่ม phosphorylation ได้แต่ไม่สามารถยืดเวลาการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิไดซินต่อการมีชีวิตของอสุจิ ก่อนการแช่แข็งพบว่าการมีชีวิตโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (65.05 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิไดซิน (66.74 เปอร์เซ็นต์) ($P > 0.05$) เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีกลไกต่อเซลล์อสุจิบางส่วนเหมือนกันโดยทางอ้อมเช่น เพิ่มระดับ cAMP หรืออาจกระตุ้นให้ Ca^{2+} เข้าเซลล์มากขึ้นเหมือนกัน ดังนั้นผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจิจึงไม่แตกต่างกัน

5.1.3.2 หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

อิทธิพลของคาเฟอีน: หลังการละลาย 0, 2 และ 4 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงว่าในขบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อการเติมคาเฟอีนระดับความเข้มข้น 0.4-1.0 มิลลิโมล ไม่มีผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ ถึงแม้ว่า Levin และคณะ (1981) จะตั้งข้อสันนิษฐานว่า คาเฟอีนอาจมีการสะสมและเพิ่มความเข้มข้นภายในเซลล์อสุจิเนื่องจากผลต่อเมทาบอไลซึมของอสุจิที่อยู่ใน medium ที่มีความเข้มข้นคาเฟอีนต่ำและสูงมีความแตกต่างกัน แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับข้อสันนิษฐานดังกล่าวซึ่งการพิสูจน์ควรทำโดยตรวจหา

ปริมาณคาเฟอีนภายในเซลล์อสุจิหลังการเติมคาเฟอีนที่เวลาต่าง ๆ กันและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์หลังการเติมคาเฟอีน อย่างไรก็ตามคาเฟอีนสามารถเข้าภายในเซลล์อสุจิได้โดยอาศัยตัวพาเช่นเดียวกับกรดอะมิโนจึงไม่น่าจะเป็นอันตรายกับเยื่อหุ้มเซลล์

อิทธิพลของออกซิโดซีน: หลังการละลาย 0, 2 และ 4 ชั่วโมง จากผลการทดลองจะเห็นว่าในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลายออกซิโดซีนระดับความเข้มข้น 10^{-4} - 10^{-12} โมล ไม่มีผลเสียการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโดซีนต่อการมีชีวิตของอสุจิหลังละลายที่ 0 ชั่วโมง พบว่าการมีชีวิตโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (43.22 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิโดซีน (44.94 เปอร์เซ็นต์) ($P > 0.05$) แสดงว่าที่เวลาหลังละลาย 0 ชั่วโมง คาเฟอีนและออกซิโดซีนไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตได้ และพบว่าในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลายมีการตายของอสุจิเพิ่มขึ้นโดยกลุ่มที่ไม่เติมคาเฟอีนหรือออกซิโดซีน, กลุ่มที่เติมคาเฟอีนและกลุ่มที่เติมออกซิโดซีนตาย 22.98, 21.83 และ 21.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากการแช่แข็งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิถูกทำลาย (Watson, 1990) ตามปกติไม่ใช่ว่าผลที่เกิดจากการเติมคาเฟอีนหรือออกซิโดซีนเนื่องจากขบวนการแช่แข็งและการละลายจะทำให้โครงสร้างของรูที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิใหญ่ขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลงการทำงาน การสูญเสียความสามารถในการเลือกสารที่จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งเกิด fusion ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Correa and Zavos, 1994) เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ที่มีแหลมและเกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) โดยผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิเกิดขึ้นในกรณีที่น้ำภายในเซลล์ไม่สามารถออกสู่ภายนอกเซลล์ได้เนื่องจากการแช่แข็งอย่างรวดเร็วจึงเกิดผลึกน้ำแข็งที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ส่วน dehydration เกิดในกรณีที่น้ำภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์เนื่องจากผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์เมื่อการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งอย่างช้าๆ (Bearden and Fuquay, 1984) หรือเมื่ออุณหภูมิลดลง ปริมาณ ATP ลดลง ความสามารถของ Na-K pump ลดลง ดังนั้น K เข้ามาภายในเซลล์น้อยกว่าที่ออกนอกเซลล์ผลตามมาคือระดับ K ภายในเซลล์ลดลงซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับมีการปั๊ม Na ออกนอกเซลล์น้อย (ภายในเซลล์มี Na มากขึ้น) ดังนั้น อัตราส่วนของ Na-K ภายในเซลล์จึงเปลี่ยนแปลงไปจากปกติทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชั่วคราวบางส่วนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เปิดช่องควบคุมความต่างศักย์ของ Ca^{2+} และทำให้ Ca^{2+} เข้ามาในเซลล์มากขึ้นเป็นผลให้เกิดเพิ่มการสลายตัวของ phospholipids ในน้ำ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ phospholipids และการสะสมของ free fatty acids ควรเป็นผลให้มีการเพิ่มการแทรกซึมผ่านใน mitochondrial และเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสาเหตุแรกที่ทำให้เซลล์อสุจิตาย (Courten et al., 1989)

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโดซีนต่อการมีชีวิตของอสุจิหลังละลายที่ 4 ชั่วโมง พบว่าการมีชีวิตโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีน (16.87 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มที่เติมออกซิโดซีน (17.89 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) และจากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตลดลงเช่นเดียวกับการทดลองส่วนใหญ่

5.1.4 สถานภาพของอะโครโซม

5.1.4.1 ก่อนการแช่แข็ง

การทดลองครั้งนี้ใช้สีย้อม eosin-nigrosin เช่นเดียวกับการย้อมดูตัวเป็นตัวตายและดูด้วยกล้อง phase-contrast microscope กำลังขยาย 1000 เท่า การใช้วิธีนี้การมองเห็นจะไม่ชัดเจน เนื่องจากไขมันจากไข่แดงในตัวเจือจาง (extender) แต่อย่างไรก็ตามสามารถมองเห็นลักษณะของอะโครโซมได้

อิทธิพลของคาเฟอีน: ก่อนการแช่แข็ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคาเฟอีนไม่มีผลต่ออะโครโซมหรือผนังเซลล์ของอสุจิเนื่องจากเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) โดยเรียงตามความเข้มข้นของคาเฟอีนดังนี้คือ 80.38, 79.26, 79.32, 79.65 และ 79.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติในการทดลองครั้งนี้ต่ำกว่าที่รายงานไว้โดย Arnold และ Foote (1987) และ Vogler และคณะ (1991) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ (intact acrosome) ก่อนการแช่แข็งเท่ากับ 87.40 และ 86.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ตัวเลขจากการทดลองครั้งนี้ต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากทั้ง 2 การทดลองที่กล่าวถึงรายงานตัวเลขเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่แต่การทดลองครั้งนี้รายงานเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่หรือเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติหลังการเติมคาเฟอีน

อิทธิพลของออกซิโดซีน: ก่อนการแช่แข็ง เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติของกลุ่มที่เติมออกซิโดซีนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เติมออกซิโดซีน ($P>0.05$) ซึ่งเป็นไปได้ว่าออกซิโดซีนไม่มีผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิหลังการเติม 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองแสดงว่ากลุ่มที่เติมออกซิโดซีนโดยเฉลี่ยมีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมออกซิโดซีน ซึ่งอาจเกิดจากกลุ่มที่เติมออกซิโดซีนมีการเกิด

acrosome reaction ของเซลล์อสุจิมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมออกซิไดซิน เนื่องจากออกซิไดซิน กระตุ้นให้ Ca^{2+} เข้าเซลล์มากขึ้น เช่นเดียวกับ prostaglandins (Vongpralub and Kanayagi, 1994) และโดยปกติเมื่อ Ca^{2+} ผ่านเข้าภายในเซลล์อสุจิจะเกิด capacitation ตามด้วยการเกิด acrosome reaction (Yanagimachi, 1981) และ Vongpralub และ Kanayagi (1994) พบว่าหลังปมอสุจิหนูในออกซิไดซิน 10^{-10} โมล ที่ 1 ชั่วโมง กลุ่มที่เติมเกิด acrosome มากกว่ากลุ่มที่ไม่เติมออกซิไดซิน

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิไดซินต่อเซลล์อสุจิที่มีสภาพ อะโครโซมปกติก่อนการแช่แข็ง พบว่าค่าเฉลี่ยเซลล์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติของคาเฟอีน (79.41 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับออกซิไดซิน (79.90 เปอร์เซ็นต์) ($P>0.05$) ซึ่งเป็นไปได้ว่าทั้งคาเฟอีนและออกซิไดซินไม่ทำความเสียหายให้กับผนังเซลล์หรืออะโครโซมอสุจิ หรือสารทั้งสองชนิดนี้กระตุ้นให้เกิด acrosome reaction ไม่แตกต่างกันใน 1 ชั่วโมงหลังการ เติม

5.1.4.2 หลังการละลายน้ำแช่แข็ง

อิทธิพลของคาเฟอีน: ที่ 0 ชั่วโมงหลังการละลายเปอร์เซ็นต์เซลล์อสุจิ ที่มีสภาพอะโครโซมปกติไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพ อะโครโซมปกติเรียงตามระดับความเข้มข้นคาเฟอีนได้ดังนี้คือ 56.07, 55.28, 54.93, 54.50 และ 53.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติในการ ทดลองครั้งนี้ต่ำกว่าที่รายงานไว้โดย Robbins และคณะ (1976); Senger และคณะ (1983); Arriola และ Foote (1987) และ Vogler และคณะ (1991) ที่พบว่าหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง มีอสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ 78, 72.9, 68.4 และ 79.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ Pace และคณะ (1981) พบว่าหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง มีอะโครโซมที่ไม่ถูกทำลาย (uninjured) 56.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองครั้งนี้แต่ยังไม่พบรายงานสภาพอะโครโซมหลัง การเติมคาเฟอีน

ที่ 2 ชั่วโมงหลังการละลาย คาเฟอีนไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพ อะโครโซมปกติโดยเรียงตามระดับความเข้มข้นคาเฟอีนได้ดังนี้คือ 42.18, 41.18, 41.29, 41.14 และ 40.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติต่ำกว่าที่รายงานโดย Schenk และคณะ (1987) ที่พบว่าหลังละลายน้ำแช่แข็งที่ 2 ชั่วโมง มี เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ (intact acrosome) 64 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับ

ที่รายงานโดย Robbins และคณะ (1976); Senger และคณะ (1983) และ Vogler และคณะ (1991) ที่พบว่าหลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 3 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ 67.0, 60.4 และ 73.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ผลการทดลองในครั้งนี้สูงกว่าที่ได้รายงานไว้ โดย Pace และคณะ (1981) ซึ่งพบว่าหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมไม่ถูกทำลาย (uninjured) 39.9 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่ผลการทดลองในครั้งนี้สูงกว่าที่ Pace และคณะ (1981) รายงานไว้ อาจเนื่องมาจากระยะเวลาบ่มน้ำเชื้อหลังละลายต่างกันคือ 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสาเหตุที่การทดลองครั้งนี้มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติต่ำกว่าที่ Robbins และคณะ (1976); Senger และคณะ (1983) และ Vogler และคณะ (1991) รายงานไว้ อาจจะเป็นเนื่องมาจากทั้ง 3 การทดลองรายงานเป็น เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ (intact acrosome)

ที่ 4 ชั่วโมงหลังการละลายคาเฟอีนมีผลต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติอย่างไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยเรียงตามระดับความเข้มข้นคาเฟอีนดังนี้ 30.88, 29.36, 29.01, 28.93 และ 28.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และตัวเลขเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติต่ำกว่าที่รายงานโดย Robbins และคณะ (1976) ที่พบว่าหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมเหลืออยู่ (intact acrosome) 61 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม เมื่อระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากคาเฟอีนช่วยกระตุ้นให้เกิด capacitation ของอสุจิด้วย เนื่องจาก Peterson และคณะ (1979) พบว่าคาเฟอีนอาจจะกระตุ้นการผ่านของ Ca^{2+} เข้าเซลล์เพิ่มขึ้น และ Tash และ Means (1983) และ Wasserman (1987) พบว่า Ca^{2+} ชักนำให้เกิด capacitation และ acrosome reaction ในเซลล์อสุจิ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าสาเหตุที่เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติในกลุ่มที่เติมคาเฟอีนต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมเกิดจากคาเฟอีนทำให้ Ca^{2+} เข้าเซลล์มากขึ้นและเกิด acrosome reaction มากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของคาเฟอีน

อิทธิพลของออกซิโตซิน: ที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการละลาย เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติของกลุ่มที่เติมออกซิโตซินมีการลดลงในอัตราที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นคือหลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง กลุ่มที่เติมออกซิโตซินมีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมออกซิโตซิน 0.64, 1.08 และ 2.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอสุจิเกิด acrosome reaction มากขึ้นเมื่อเวลาหลังการละลายเพิ่มขึ้นทำนองเดียวกับที่ Vongpradub และ Kanayogi (1994) พบว่าอสุจิของหนูที่บ่ม (incubation) ในออกซิโตซินระดับความเข้มข้น 10^{-10} โมล อัตราการเกิด acrosome reaction เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการแช่ในออกซิโตซิน

เมื่อเปรียบเทียบผลของคาเฟอีนและออกซิโตซินต่อเซลล์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติหลังการละลาย พบว่าเซลล์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติโดยเฉลี่ยของกลุ่มที่เติมคาเฟอีนสูงกว่ากลุ่มที่เติมออกซิโตซินแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และอัตราการลดลงของเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติในกลุ่มที่เติมคาเฟอีนสูงกว่ากลุ่มที่เติมออกซิโตซินซึ่งเป็นไปได้ว่าคาเฟอีนระดับความเข้มข้น 0.4-1.0 มิลลิโมล สามารถกระตุ้นให้เกิด acrosome reaction ได้มากกว่าออกซิโตซิน 10^{-12} - 10^{-4} โมล และต้องมีการศึกษาค้นคว้าต่อไป

5.2 การทดลองที่ 2

5.2.1 อัตราการผสมติด

เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้อัด PGF $_{2\alpha}$ เพียงครั้งเดียวเท่านั้น (15 มิลลิกรัมต่อตัว) และมีโคเพียง 43.48 เปอร์เซ็นต์ ที่แสดงอาการเป็นสัดหลังการฉีด 5 วัน (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการแสดงอาการเป็นสัดครั้งที่ 2 ของกลุ่มที่แสดงอาการเป็นสัดภายหลัง 5 วันหลังการฉีดหรือการเป็นสัดครั้งแรกของกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการฉีด PGF $_{2\alpha}$ จึงไม่เป็นผลจาก PGF $_{2\alpha}$

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าอัตราการตั้งท้องในโคพื้นเมืองที่ได้รับการผสมจากน้ำเชื้อที่มีคาเฟอีน 1.0 มิลลิโมล หรือมีออกซิโตซิน 10^{-8} โมล และน้ำเชื้อที่ไม่มีทั้งคาเฟอีนหรือออกซิโตซินไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) คืออัตราการตั้งท้อง 37.5, 37.5 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตั้งท้องของการทดลองนี้ต่ำกว่าที่ วิโรจน์ (2527) ได้รายงานไว้ว่าโคพื้นเมืองมีอัตราการตั้งท้อง 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ผสมธรรมชาติ) เมื่อตรวจที่ 90 วันหลังการผสมพันธุ์ การที่การทดลองครั้งนี้มีอัตราการตั้งท้องต่ำอาจเกิดจากหลายสาเหตุรวมทั้งเทคนิคการผสมของผู้ผสมเทียมหรือสภาพอุณหภูมิแวดล้อมหลังการผสมและความเหมาะสมของเวลาการผสมเทียมรวมทั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์ที่ใช้ด้วย ส่วนสาเหตุที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ไม่มีกับกลุ่มที่มีคาเฟอีนหรือออกซิโตซินอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากการใช้จำนวนโคทดลองน้อยเกินไปที่จะเห็นความแตกต่างของอัตราการตั้งท้อง และถึงแม้อัตราการตั้งท้องจะต่างกัน 12.5 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างกลุ่มที่เติมและไม่เติมคาเฟอีนหรือออกซิโตซินแต่เป็นเปอร์เซ็นต์ที่เกิดจากความแตกต่างของสัตว์เพียงตัวเดียวคือตั้งท้อง 2 ตัวในกลุ่มที่ไม่เติมและ 3 ตัวในกลุ่มที่เติมคาเฟอีนหรือออกซิโตซิน

สรุป

1. คาเฟอีนเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิเมื่อเวลา 1 ชั่วโมง หลังการเติมหรือก่อนการแช่แข็งโดยเฉลี่ย 7 เปอร์เซ็นต์ และการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มมากขึ้นแบบเส้นตรงตามความเข้มข้นคาเฟอีนที่เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) และหลังการละลาย 0 ชั่วโมง คาเฟอีนเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยเฉลี่ย 7.62 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) แต่หลังการละลายที่ 2 และ 4 ชั่วโมง คาเฟอีนไม่สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิได้

2. ก่อนการแช่แข็งออกซิโตซินเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยเฉลี่ย 9 เปอร์เซ็นต์ และการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของออกซิโตซินเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) หลังการละลาย 0 และ 2 ชั่วโมง ออกซิโตซินเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยเฉลี่ย 12.75 และ 4.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเวลาหลังละลายที่ 4 ชั่วโมง ออกซิโตซินไม่สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิได้

3. คาเฟอีนไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ($P > 0.05$)

4. ออกซิโตซินเพิ่มการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของอสุจีก่อนแช่แข็งได้โดยเฉลี่ย 3.22 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) และหลังการละลายที่ 0 และ 4 ชั่วโมง ออกซิโตซินไม่มีผลในการเพิ่มการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ($P > 0.05$) แต่ที่ 2 ชั่วโมงหลังละลายออกซิโตซิน 10^{-4} โมล เพิ่มการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 4.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม ($P < 0.05$)

5. คาเฟอีนและออกซิโตซินไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจิทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง ($P > 0.05$)

6. คาเฟอีนและออกซิโตซินไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีสภาพอะโครโซมปกติทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการละลาย ($P > 0.05$)

7. คาเฟอีนที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลและออกซิโตซินระดับความเข้มข้น 10^{-8} โมล ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องในแมโค ($P > 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรหาวิธีการย้อมสีที่สามารถมองเห็นอะโครโซมของอสุจิได้ชัดเจนหลังการผสมกับตัวเจือจางแล้วเนื่องจากการย้อมด้วย eosin-nigrosin ไม่สามารถมองเห็นได้ชัดเจนนัก อันเนื่องมาจากไขมันในไข่แดงที่เป็นส่วนผสมของตัวเจือจาง
2. เวลาหลังการเติมคาเฟอีนหรือออกซิไดซินก่อนแช่แข็งอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งด้วย ดังนั้นหากลดช่วงเวลาหลังการเติมถึงการแช่แข็งลงอาจมีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในเวลาที่นานขึ้น (การทดลองนี้ใช้เวลาหลังเติมถึงบรรจุหลอด 1 ชั่วโมง)
3. การทดสอบการผสมติดควรใช้ประชากรโคขนาดใหญ่เพื่อลดความแปรปรวนอันเนื่องจากแม่โคและเพื่อให้ทราบผลที่แท้จริงของคาเฟอีนหรือออกซิไดซินหรืออาจทดสอบการผสมติดโดยวิธี *in vitro* เพื่อดูความสามารถในการเข้าทำการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิจากกลุ่มทดลอง
4. อัตราการผสมติดอาจเพิ่มได้ด้วยการใช้คาเฟอีนหรือออกซิไดซินช่วยเนื่องจากสารทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ ซึ่งทำให้จำนวนอสุจิที่เข้าถึงปีกมดลูกส่วน ampulla มากขึ้น โอกาสในการผสมติดมากขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามสารทั้งสองชนิดนี้มีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในช่วงไม่นานหลังการละลาย ดังนั้นควรมีการใช้ทันทีหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อแช่แข็งของโค ยังต้องมีการศึกษาต่อไป