# บทที่ 2
# เอกสารที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 กระบือ

กระบือเลี้ยง (domestic buffalo) แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ กระบือปลัก (swamp bufffalo) และกระบือแม่น้ำ (river buffalo) ซึ่งกระบือทั้งสองชนิดจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันโดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Bubalus Bubalis* (Gordon, 1996) แต่มีความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา ลักษณะรูปร่าง และผลผลิต (กรมปศุสัตว์, 2553ก)

### 2.1.1 กระบือปลัก

มีโครโมโซมจำนวน 2n = 48 เลี้ยงกันในประเทศไทย เวียดนาม พม่า กัมพูชา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และลาว เป็นต้น เลี้ยงเพื่อใช้แรงงานและเพื่อใช้เนื้อเป็นอาหาร กระบือประเภทนี้ชอบนอนแช่ปลัก มีรูปร่างล่ำสัน ผิวหนังมีสีเทาเข้มเกือบดำอาจมีสีขาวเผือก ลำตัวหนาลึก หัวยาวแคบ ท้องใหญ่ เขามีลักษณะโค้งไปข้างหลัง หน้าผากแบนราบ ตานูนเด่นชัด คอยาว บริเวณใต้คอจะมีขนขาวเป็นรูปตัววี (chevlon) หัวไหล่และอกนูนเห็นชัด (กรมปศุสัตว์, 2553ก)

### 2.1.2 กระบือแม่น้ำ

มีโครโมโซมจำนวน 2n = 50 เลี้ยงกันในประเทศอินเดีย ปากีสถาน อียิปต์ ประเทศในยุโรปตอนใต้ และยุโรปตะวันออก เลี้ยงเพื่อรีดนมเพราะให้น้ำนมมาก กระบือประเภทนี้ไม่ชอบลงแช่โคลน แต่ชอบน้ำสะอาด กระบือแม่น้ำมีหลายสายพันธุ์ เช่น มูร่าห์ นิลิราวี เซอติ และเมดิเตอเรเนียน เป็นต้น กระบือประเภทนี้มีขนาดใหญ่ รูปร่างแข็งแรง ลักษณะทั่วไปจะมีผิวหนังสีดำ หน้าผากนูน เขาสั้นและบิดม้วนงอ ส่วนลำตัวจะลึกมาก มีขนาดเต้านมใหญ่กว่ากระบือปลัก (กรมปศุสัตว์, 2553ก)

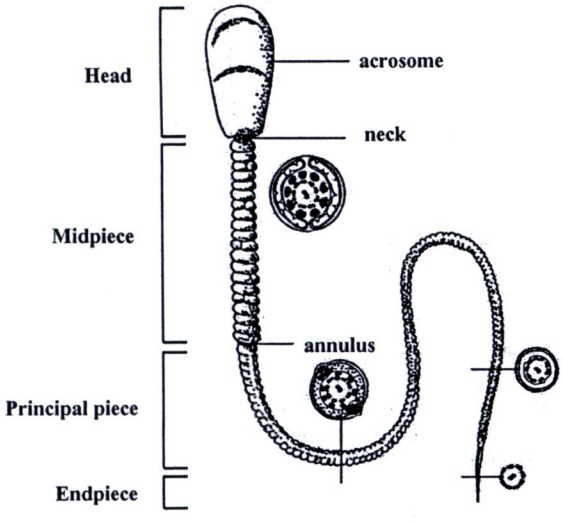
## 2.2 น้ำเชื้อ

น้ำเชื้อ (semen) เป็นของเหลวซึ่งประกอบด้วย เซลล์อสุจิ (sperm cell) และเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) (Bearden et al., 2004)

### 2.2.1 เซลล์อสุจิ

เซลล์อสุจิของกระบือจะมีรูปร่างคล้ายกับโค แต่เซลล์อสุจิกระบือมีความยาวมากกว่าโค โดยมีความยาวประมาณ 75.4 ไมโครเมตร ส่วนโค 69.3 ไมโครเมตร ส่วนหัว (head) มีความยาวประมาณ 8.3 ไมโครเมตร และกว้าง 4.5 ไมโครเมตร ส่วนกลาง (midpiece) ยาวประมาณ 12.2 ไมโครเมตร และส่วนหาง (tail) มีความยาวประมาณ 54.8 ไมโครเมตร (Noakes et al., 2001) ภายในส่วนหัวมี

องค์ประกอบที่สำคัญคือ นิวเคลียส (nucleus) และอะโครโซม (acrosome) ซึ่งภายในนิวเคลียสบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีนพื้นฐานพวกฮีสโตน (histone) หรือโปรตามีน (protamine) อะโครโซมจะเป็นส่วนที่ครอบส่วนหัวของเซลล์อสุจิประมาณ 2 ใน 3 ส่วน มีลักษณะเป็นถุงบางมีผนัง 2 ชั้น ภายในบรรจุเอนไซม์ชนิด hydrolytic หลายชนิด เช่น proacrosin, hyaluronidase esterase และ hydrolase ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการปฏิสนธิ ส่วน equatorial ของอะโครโซม จะเป็นบริเวณที่อสุจิใช้เชื่อมเข้ากับไข่ขณะที่มีการปฏิสนธิ สำหรับเอนไซม์ต่างๆที่พบ เช่น hyaluronidase สลายกลุ่มของ cumulus cell, acrosin ช่วยในการเจาะผ่าน zona pelucida (เทวินทร์, 2542) ซึ่ง Bhosrekar (2005) รายงานว่า glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) เป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์อสุจิและเมื่อหลั่งออกมาอยู่ในเซมินอลพลาสมาแสดงว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิเกิดความเสียหาย ส่วนหางของเซลล์อสุจิประกอบด้วยบริเวณคอ (neck) ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมระหว่างหัวและหาง ส่วนหางแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนกลางมีไมโตครอนเดรียม้วนเป็นเปาะต่อกันหุ้มอยู่ภายนอกสิ้นสุดที่แอนนูลัส โดยเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเคลื่อนที่ บริเวณ principal ต่อจากแอนนูลัสไปจนเกือบตลอดหาง ซึ่งแกนกลางประกอบด้วย axoneme และ coause fiber fibrous sheath ห่อหุ้มส่วนนี้ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของหาง และส่วน end piece ประกอบด้วย axoneme ซึ่งปกคลุมโดยเยื่อหุ้มเซลล์ axoneme มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของอสุจิ microtubules คู่ที่อยู่รอบๆหางจะควบคุมการเคลื่อนที่แบบโค้งงอของหาง (เทวินทร์, 2542)




**ภาพที่ 2-1** โครงสร้างของเซลล์อสุจิ

ที่มา : Bearden et al. (2004)

**2.2.2 เซมินอลพลาสมา**

เซมินอลพลาสมาหรือน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนของๆเหลวที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเชื้อส่วนมากหลั่งจากต่อมผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อ (vesicular gland) โดยเซมินอลพลาสมามีประโยชน์ในการเป็นบัฟเฟอร์ และมีสารอาหารที่ช่วยรักษาความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์อสุจิ ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ได้แก่ (Bearden et al., 2004)

2.2.2.1 โปรตีน โดยทั่วไปแล้วโปรตีนจะมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ซึ่งพบในเซมินอลพลาสมา เช่น glycosaminoglycan (GAG) binding protein ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดกระบวนการ capacitation (Bearden et al., 2004) ซึ่ง Asadpour et al. (2007) ได้ศึกษารูปแบบโปรตีนในเซมินอลพลาสมาของกระบือที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะของคุณภาพน้ำเชื้อพบว่ามีทั้งหมด 25 ขนาด โดยขนาดของโปรตีนที่ต่ำกว่า 35.5 kDa มีประมาณ 72% ของขนาดที่พบ ซึ่งโปรตีนขนาด 24.5 kDa มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสดและการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง โปรตีนขนาด 45 kDa มีความสัมพันธ์กับรูปร่างของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติของน้ำเชื้อแช่แข็ง และโปรตีนขนาด 55 kDa มีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสด

2.2.2.2 สารอนินทรีย์ โซเดียมและคลอไรด์เป็นสารที่พบในเซมินอลพลาสมาเป็นส่วนใหญ่ แคลเซียมและแมกนีเซียมพบในปริมาณน้อย โปแตสเซียมจะพบมากในน้ำเชื้อ ซึ่งในส่วนของเซลล์อสุจิจะมีความเข้มข้นของโปแตสเซียมสูงกว่าส่วนที่เป็นเซมินอลพลาสมา ดังนั้นเมื่ออสุจิเข้มข้นขึ้นเมื่ออยู่ในอิพิดิไดมิสจึงทำให้สัดส่วนของโปแตสเซียมต่อโซเดียมสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้สารอนินทรีย์ยังมีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และยังช่วยรักษาแรงดันออสโมติกให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่เซลล์อสุจิสามารถดำรงชีวิตได้ซึ่งคล้ายกับสารอินทรีย์

2.2.2.3 บัฟเฟอร์ สารอนินทรีย์และสารอินทรีย์เป็นบัฟเฟอร์ที่พบอยู่ในส่วนของเซมินอลพลาสมา ส่วนมากคือไบคาร์บอเนต ซึ่งถูกผลิตจากต่อมผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อและทำหน้าที่ป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามบัฟเฟอร์ที่พบในเซมินอลพลาสมามีปริมาณไม่เพียงพอ ที่จะป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ที่ลดลงเมื่อน้ำเชื้อถูกเก็บรักษาไว้

2.2.2.4 สารที่ให้พลังงาน โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบของสารอินทรีย์นั้นเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์อสุจิซึ่งพบอยู่ในเซมินอลพลาสมา เช่น fructose, sorbital และ glycerylphosphorylcholine (GPC) ซึ่ง fructose และ sorbital นั้นถูกผลิตจากต่อมผลิตน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วน GPC ถูกผลิตขึ้นในส่วนของอิพิดิไดมิส เซลล์อสุจิสามารถใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งพลังงานในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนขณะที่ถูกเก็บรักษาไว้ และในสภาวะที่มีออกซิเจนเมื่ออยู่ใน

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ซอบิทอล และ GPC สามารถใช้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนได้เพียงอย่างเดียว GPC มีบทบาทโดยเอนไซม์ที่พบในระบบสืบพันธุ์เพศเมียก่อนที่จะใช้ประโยชน์ได้ โดยเอนไซม์นี้จะแยกโครลีนจากส่วนที่เหลือของโมเลกุลทำให้อยู่ในรูปของ glycerylphosphate ซึ่งสามารถเผาพลาญเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์อสุจิ กรดแลคติคเป็นผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟรุคโตสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยถูกสร้างเพิ่มขึ้นในน้ำเชื้อจนกระทั่งทำการเก็บรักษา และสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้เมื่ออยู่ใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยในพ่อพันธุ์โคและแกะจะพบฟรุคโตสในความเข้มข้นที่สูง ส่วนพ่อพันธุ์ม้าและสุกรจะพบในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ จึงทำให้เกิดปัญหาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ดังกล่าว

2.2.2.5 สารอินทรีย์อื่นๆ ส่วนประกอบอื่นที่พบในเซมินอลพลาสมาซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นอยู่สูงแต่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงงานได้ คือ inosital และ กรดซิตริค

น้ำเชื้อประกอบด้วยเซลล์อสุจิและเซมินอลพลาสมา ซึ่งเซมินอลพลาสมาประกอบด้วยสารที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์อสุจิ (Brinsko et al., 2000) แต่เซมินอลพลาสมาที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลเสียต่อเซลล์อสุจิ (Pickett et al., 1975) โดยอาจจะเกี่ยวข้องกับเซมินอลพลาสมาโปรตีน บางครั้งส่งผลต่อเซลล์อสุจิที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นหรือแช่แข็งในทางลบ (Martinez-pastor et al., 2006)

ปัจจัยที่ลดการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิที่อยู่ในเซมินอลพลาสมานั้นยังไม่ทราบแน่นอน แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะไปลดการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิของโค (Baas et al., 1983) ซึ่ง Dott et al. (1979) พบว่าเมื่อบ่มเซลล์อสุจิจากอิพิดิไดมิสในเซมินอลพลาสมา ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ และ Douard et al. (2005) พบว่าเซมินอลพลาสมาของไก่งวงนั้นจะส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C โดยทำให้อัตราการผสมติดและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่ำโดยจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟอสโฟลิปิดของเซลล์อสุจิ แต่ Castellini et al. (2000) พบว่าเซมินอลพลาสมาของกระต่ายจะช่วยเพิ่มเซลล์อสุจิที่มีชีวิตและการเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยค่า VAP, VSL, VCL และ LIN ส่วนในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น Martinus et al. (1991) อ้างโดย Ahmad et al. (1996) ศึกษาผลของเซมินอลพลาสมาต่อเซลล์อสุจิของโคเมื่อแช่แข็งด้วยน้ำยาเจือจางสูตร sodium citrate-glucose-glycerol พบว่าเซมินอลพลาสมาเป็นสาเหตุให้เกิดการหลั่งของ amino acid oxidase โดยเพิ่มขึ้นจาก 39.6 เป็น 86.1% และส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิซึ่งลดลงจาก 29.6 เป็น 2.6% และ Martinez-pastor et al. (2006) ได้ศึกษาในกวางพบว่าการแยกเซมินอลพลาสมาส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายลดลง โดยพบว่ากลุ่มที่ทำการแยกเซมินอลพลาสมาและกลุ่มที่ไม่แยกเซมินอลพลาสมาให้ค่า total motility (42.69±1.48 และ 55.06±1.53%) progressively motility (17.87±0.89 และ 23.77±0.92%) และ VAP (46.05±1.21 และ 53.22±1.27 μm/s)

อย่างไรก็ตามผลของเซมินอลพลาสมาก็จะแตกต่างกันไประหว่างสัตว์แต่ละตัว โดย Aurich et al. (1996) รายงานว่าเซมินอลพลาสมาของม้าแต่ละตัวจะมีจำนวนองค์ประกอบที่ต่างกัน และองค์ประกอบดังกล่าวเป็นปัจจัยที่ทำให้เซลล์อสุจิสามารถรอดชีวิตในกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งการศึกษานี้ได้เติมเซมินอลพลาสมาจากม้าตัวอื่น พบว่าเมื่อเติมเซมินอลพลาสมาจากม้าที่มีการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายสูงให้กับน้ำเชื้อจากม้าที่มีการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายต่ำโดยจะช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ และเมื่อเติมเซมินอลพลาสมาของม้าที่มีคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายต่ำให้กับน้ำเชื้อจากม้าที่มีคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายสูงก็จะส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิหลังละลายลดลง

**2.3 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อและคุณลักษณะของน้ำเชื้อกระบือปลัก**

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อใช้วิธีการประเมินแบบเดียวกันในสัตว์พ่อพันธุ์แต่ละชนิด ซึ่งพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำงานของระบบสืบพันธุ์ที่ดีด้วย โดยจะต้องมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่า 60% ความเข้มข้น $600x10^6$ cells/ml เซลล์อสุจิมีชีวิตมากกว่า 70% เซลล์อสุจิที่ผิดปกติต่ำกว่า 20% มีหยดน้ำกลางตัว (proximal droplets) ต่ำกว่า 4% มีหยดน้ำที่ส่วนหาง (distal droplets) ต่ำกว่า 4% หางหลุด (tailless) ต่ำกว่า 10% หางงอ (singly bent tails) ต่ำกว่า 8% หางงอ (double bent tails) ต่ำกว่า 4% หางม้วน (coiled tails) ต่ำกว่า 3% (Vale, 2010) การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ประกอบด้วย

**2.3.1 ปริมาตร (volume)**

ปริมาตรของน้ำเชื้อกระบือสามารถประเมินหลังจากการรีดน้ำเชื้อได้ทันที โดยอ่านปริมาตรน้ำเชื้อได้โดยตรงจากหลอดเก็บน้ำเชื้อที่บอกปริมาตร (สุรชัย, 2545) ปริมาตรของน้ำเชื้อจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และอายุของพ่อพันธุ์ (Sansone et al., 2000) พ่อพันธุ์ที่มีอายุน้อยจะให้ปริมาตรน้ำเชื้อต่ำกว่าพ่อพันธุ์ที่มีอายุมาก (Koonjaenak et al., 2006) ซึ่ง Vale (1994) อ้างโดย Sansone et al. (2000) พบว่าปริมาตรน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่มีอายุน้อยจะอยู่ระหว่าง 1-3 มิลลิลิตร ในขณะที่พ่อพันธุ์อายุมากจะให้น้ำเชื้อประมาณ 6 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำเชื้อกระบือปลักมีปริมาตรอยู่ระหว่าง 1-6 มิลลิลิตร (สุรชัย, 2545; Jainudeen et al., 1982; Noakes et al., 2001; Bhosrekar, 2005; Koonjaenak et al., 2007b)

**2.3.2 สี (color)**

สีของน้ำเชื้อสามารถบอกถึงความผิดปกติ รวมทั้งความหนาแน่นและความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ ซึ่งแบ่งออกเป็น สีครีม (creamy white) สีขาวน้ำนม (milky white) สีขาวใส (opalescent) และสีจางใส (watery) ปกติน้ำเชื้อกระบือจะมีสีขาวน้ำนมถึงสีครีม (สุรชัย, 2545; Noakes et al., 2001; Bhosrekar, 2005; Koonjaenak et al., 2007b) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นมากจะมีสีครีมและมีลักษณะข้น

แสดงถึงความเข้มข้นหรือมีจำนวนเซลล์อสุจิมาก ถ้าพ่อพันธุ์กระบือได้รับการรีดเก็บน้ำเชื้อบ่อยๆ น้ำเชื้อจะใสและจางเหมือนน้ำแสดงว่ามีเซลล์อสุจิน้อย (ปาริฉัตร, 2544)

**2.3.3 ความเป็นกรด ด่างของน้ำเชื้อ (pH)**

สามารถวัดได้โดยใช้ pH meter หรือกระดาษวัดค่า pH ซึ่งน้ำเชื้อกระบือปลักจะมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.4-7.0 (Kumar et al., 1993; Noakes et al., 2001; Bhosrekar, 2005; Koonjaenak et al., 2007b)

**2.3.4 การเคลื่อนที่ (motility)**

การเคลื่อนที่เป็นค่าแรกที่ใช้เป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์อสุจิ โดยการเคลื่อนที่นั้นจะแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์อสุจิ (Pena-martinez, 2004) ซึ่งการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิสามารถประเมินได้ 2 แบบคือ (เทวินทร์, 2542)

2.3.4.1 การเคลื่อนที่แบบคลื่น ซึ่งประเมินโดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์ที่วางบน warm plate ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C โดยไม่ต้องปิดสไลด์ จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยจะประเมินการเคลื่อนที่เป็นค่าคะแนน 0-5 (5: ดีมาก, 4: ดี, 3: ปานกลาง, 2: ต่ำ, 1: ต่ำมาก และ 0: อสุจิตาย)

2.3.4.2 การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า ประเมินหลังการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง สังเกตดูการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเป็นรายตัว โดยหยดน้ำเชื้อบนสไลด์ที่วางบน warm plate ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C ปิดด้วย coverslip จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ ซึ่งน้ำเชื้อกระบือจะมีการเคลื่อนที่อยู่ประมาณ 70.7-75.2% (Jainudeen et al., 1982; Koonjaenak et al., 2007b) หรืออาจประเมินการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง CASA (computer assisted sperm analysis) ซึ่งจะประเมินออกมาเป็นค่าต่างๆ ประกอบด้วย total motility (MOT), progressive motility (PMOT), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), linearity (LIN), straightness (STR) และ velocity distribution (rapid, medium, slow และ static) (Muino et al., 2008; Contri et al, 2010) ซึ่งลักษณะของน้ำเชื้อกระบือที่ทำการประเมินด้วยเครื่อง CASA จะมีค่า MOT ประมาณ 66.85±2.79%, VSL 26.58±0.24 μm/s, VCL 107.07±1.47 μm/s, LIN 26.91±0.01 μm/s, ALH 11.19±0.09 μm/s และ VAP 61.78±2.79 μm/s (Mandal et al., 2003)

**2.3.5 ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (sperm concentration)**

การประเมินความเข้มข้นของเซลล์อสุจิอาจประเมินได้โดยการใช้ spectrophotometer หรือ haemocytometer (Sansone et al., 2000) กระบือที่มีอายุน้อยจะมีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิต่ำกว่ากระบือที่มีอายุมาก (Pant et al., 2003) โดยน้ำเชื้อกระบือปลักมีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิประมาณ 1.1-1.6 x $10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร (สุรชัย, 2545; Jainudeen et al., 1982; Koonjaenak et al., 2007b)

**2.3.6 เซลล์อสุจิที่มีชีวิตและรูปร่างของเซลล์อสุจิ**

วิธีที่สะดวกและนิยมใช้สำหรับการประเมินเซลล์อสุจิที่มีชีวิตคือการย้อมสี อิโอซิน-นิโกรซิน (Mandal et al., 2003) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีควรจะมีเซลล์อสุจิที่มีชีวิตในการหลั่งแต่ละครั้งอย่างน้อย 75-80% ของเซลล์อสุจิที่มีชีวิต ถ้าต่ำกว่า 70% จะไม่นำมาผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง (ปาริฉัตร, 2544) ส่วนการตรวจรูปร่างของเซลล์อสุจินั้นสามารถทำได้โดยการย้อมสี เช่น อิโอซิน-นิโกรซิน (Goyal et al., 1996) หรือย้อมสีโดยวิธีวิลเลี่ยม เพื่อตรวจความผิดปกติบริเวณส่วนหัวของเซลล์อสุจิ หรือการดองเซลล์อสุจิในน้ำยา formal saline เพื่อตรวจความผิดปกติบริเวณส่วนหางด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดาขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า (ปาริฉัตร, 2544) น้ำเชื้อกระบือจะมีเซลล์อสุจิที่ปกติอยู่ประมาณ 86.3-89.3% (Koonjaenak et al., 2007b) เซลล์อสุจิกระบือที่ผิดปกติอยู่ระหว่าง 5-15% (Jainudeen et al., 1982; Koonjaenak et al., 2007b; Vale, 2010) โดยประกอบด้วยความผิดปกติส่วนหัวประมาณ 2.3-2.4% อะโครโซมหลุดออกจากเซลล์อสุจิ 1.1-1.8% หางหลุด 3.2-5.3% และอสุจิที่ยังไม่สมบูรณ์ 2.0-2.2% (Koonjaenak et al., 2007b)

**2.3.7 เยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม**

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิอาจประเมินโดยวิธี hypo-osmotic swelling test (HOST) และใช้สารละลายที่มีคุณสมบัติเป็น hypotonic ซึ่งมีแรงดันออสโมติกประมาณ 100-150 mOsm/kg (Mandal et al., 2003; Shukla and Misra, 2007; Singh et al., 2007) โดยสารละลายมีแรงดันออสโมติกต่ำกว่าน้ำเชื้อ ใช้สารละลายปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30-45 นาที และนำไปตรวจดูด้วยกล้องชนิดตัดแสง (phase contrast) (Rasul et al., 2007) เซลล์อสุจิที่มีชีวิตหรือเยื่อหุ้มเซลล์ไม่เสียหายจะแสดงลักษณะการบวมหรือการม้วนงอของหางเพื่อรักษาความสมดุลของเซลล์ หรือการประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้การย้อมสี SYBR-14/propidium iodide นำไปตรวจด้วยเครื่อง LSR flow cytometer ซึ่งจะแสดงผลออกมา 3 รูปแบบคือ เซลล์อสุจิที่มีชีวิตจะติดเฉพาะสีเขียวของ SYBR-14 (SYBR-14+/PI-) ซึ่งเซลล์อสุจิที่เสียหายบางส่วนจะติดสีเขียวของ SYBR-14 และติดสีแดงของ PI (SYBR-14+/PI+) และเซลล์อสุจิที่ตายนั้นจะติดเฉพาะสีแดง (SYBR-14-/PI+) โดยเซลล์อสุจิกระบือจะพบเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความสมบูรณ์ (intact membrane) ประมาณ 68.7-75.6% (Koonjaenak et al., 2007b)

การตรวจอะโครโซมอาจใช้วิธีการย้อมสีจิมซ่า (giemsa stain) (Mandal et al., 2003) หรืออาจประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยดูจากเปอร์เซ็นต์ขอบหัวของเซลล์อสุจิที่ปกติ (normal apical ridge : NAR) โดยใช้สารละลาย 1% formal citrate ประมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเชื้อ 500 ไมโครลิตร และนำไปตรวจดูด้วยกล้องชนิดตัดแสง (phase contrast) (Rasul et al., 2007) หรืออาจใช้การย้อมสี FICT-PNA (fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin) และนำไป

ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent ซึ่งจะแสดงผลออกมา 3 รูปแบบคือ อะโครโซมที่สมบูรณ์, อะโครโซมเสียหายบางส่วน และอะโครโซมเสียหายทั้งหมด (Herold et al., 2004) โดยเซลล์อสุจิของกระบือมีอะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) ประมาณ 82.4% (Jainudeen et al., 1982) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งอาจส่งผลกระทบต่ออะโครโซม ดังนั้นจึงควรทำการตรวจความผิดปกติของอะโครโซมหลังจากแช่แข็งน้ำเชื้อ (Sukhato et al., 2001)

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

### 2.4.1 การเลี้ยงและการจัดการ

โภชนาการหรือการให้อาหารมีผลต่อการพัฒนาการทางเพศเป็นอย่างมาก การให้อาหารมากเกินไปอาจส่งผลทำให้เกิดการสร้างไขมันที่มากและพ่อพันธุ์เฉื่อยชาได้ (Gordon, 1996) ส่วนการขาดอาหารจะส่งผลทำให้สัตว์เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ช้าลง ผลผลิตลดลง และส่งผลต่อลักษณะของน้ำเชื้อในสัตว์เพศผู้ สัตว์ที่อยู่ในวัยเจริญเติบโตนั้นมีความไวต่อความเครียดหรือความต้องการอาหารมากกว่าสัตว์ที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์แล้ว โดยอาหารจะส่งผลต่อระบบต่อมไร้ท่อซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิในอัณฑะ (Jainudeen and Hafez, 2000) ซึ่งจะไปลดการหลั่งฮอร์โมนเอนโดรเจนและทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง (Gordon, 1996)

### 2.4.2 ฤดูกาล

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางการสืบพันธุ์ เมื่ออุณหภูมิร่างกายเพิ่มขึ้นจะก่อให้เกิดการเสื่อมของอัณฑะและส่งผลให้เซลล์อสุจิที่ปกติ และความสามารถในการผสมกับไข่ลดต่ำลง (Jainudeen and Hafez, 2000) ซึ่งในกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิต้องการอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายประมาณ 4-5°C (Bhosrekar, 2005) โดย วรรณนิษา (2549) ศึกษาผลกระทบของฤดูกาลต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลัก พบว่า ฤดูกาลไม่มีผลต่อปริมาตรน้ำเชื้อ ความหนาแน่น ความเข้มข้น ความเป็นกรดด่าง และความผิดปกติส่วนหาง ส่วนในฤดูร้อนจะพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของน้ำเชื้อสดและความผิดปกติส่วนหัวต่ำสุด ส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวหลังแช่แข็งและความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์อสุจิในฤดูฝนจะสูงสุด และ Koonjaenak et al. (2007b) ศึกษาผลกระทบของฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลักในประเทศไทย พบว่า ฤดูกาลไม่มีผลต่อปริมาตรน้ำเชื้อ ความเข้มข้น และการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ โดยในฤดูร้อนจะพบความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และรูปร่างของเซลล์อสุจิปกติสูงที่สุด ส่วนในฤดูฝนจะพบความผิดปกติของเซลล์อสุจิโดยเฉพาะส่วนหางสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลไม่ได้เป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลัก ซึ่งการเกิดความเครียดจากความร้อน (heat stress) นั้นมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์ (ปาริฉัตร, 2544) โดยความเครียด

เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตฮอร์โมนคอร์ติซอล ซึ่งจะไปลดความอยากอาหารและทำให้เกิดความไม่สมดุลของพลังงาน ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ หากพ่อพันธุ์ได้กินน้ำที่เย็นจะสามารถช่วยลดความเครียดที่เกิดจากความร้อนได้ โดยในช่วงฤดูร้อนจะพบว่ากระบือมักจะเล่นน้ำเพื่อลดความเครียด (Bhosrekar, 2005)

**2.4.3 อายุ**

กระบือที่จะนำมารีดเก็บน้ำเชื้อควรมีอายุไม่น้อยกว่า 2 ปี 6 เดือน (กรมปศุสัตว์, 2553ข) ซึ่ง Nordin et al. (1990) ได้ศึกษาถึงอายุของพ่อพันธ์กระบือต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยแบ่งกระบือเป็น 6 กลุ่ม คืออายุต่ำกว่า 29, 29-32, 33-41, 42-53, 54-65 และมากกว่า 65 เดือน พบว่าพ่อพันธุ์กระบือที่มีอายุต่ำกว่า 29 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 300±20 กิโลกรัม ไม่สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้าได้ ส่วนกระบือที่อายุมากกว่า 29 เดือนนั้นจะตอบสนองได้ดีตามอายุที่เพิ่มขึ้น โดยกระบือกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 65 เดือน จะมีปริมาตรน้ำเชื้อ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิมีชีวิต ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิสูงที่สุดโดยที่พบความผิดปกติของเซลล์อสุจิต่ำสุด และ Saeed et al. (1989) พบว่าอายุของพ่อพันธุ์กระบือมีผลต่อความผิดปกติของเซลล์อสุจิ โดยแบ่งกระบือออกเป็น 4 กลุ่มคือ 2-3, 3-4, 4-5 และ 5 ปีขึ้นไป พบว่าความผิดปกติของเซลล์อสุจิจะสูงในกระบือที่มีอายุต่ำกว่า 3 ปี แล้วจะค่อยๆลดลงและความผิดปกติของเซลล์อสุจิจะเพิ่มขึ้นเมื่อกระบืออายุ 5 ปีขึ้นไป

**2.4.4 การรีดเก็บน้ำเชื้อ**

การรีดเก็บน้ำเชื้อควรทำในช่วงเช้า อากาศเย็น และพ่อพันธุ์ยังไม่ได้กินอาหาร โดยรีดในช่วงเวลาประมาณ 05.00-06.00 น. และควรเสร็จสิ้นภายในเวลา 09.00-10.00 น. เพราะหากรีดน้ำเชื้อหลังจากนี้อุณหภูมิจะสูงขึ้นซึ่งจะทำให้พ่อพันธุ์ไม่นิ่ง การรีดน้ำเชื้อควรดำเนินการสัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง ซึ่งจะทำให้ไม่ส่งผลต่อคุณภาพและการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Bhosrekar, 2005) วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อกระบือมี 3 วิธี คือ การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้โยนีเทียม (artificial vagina : AV) เป็นวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อที่ดีที่สุด ซึ่งเป็นการเลียนแบบพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของพ่อพันธุ์ตามธรรมชาติ (ปาริฉัตร, 2544) ส่วนการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า (electroejaculator) น้ำเชื้อที่ได้มักจะมีคุณภาพลดลง เนื่องจากพ่อพันธุ์จะหลั่งน้ำเชื้อเนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ซึ่งไม่คล้ายการหลั่งเองตามธรรมชาติ การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มักใช้กับพ่อพันธุ์ที่มีปัญหาเกี่ยวกับการขึ้นทับ เช่น พ่อพันธุ์ขาเจ็บหรือดุมากๆ ไม่สามารถปล่อยให้ออกจากคอกได้ (กรมปศุสัตว์, 2553ข) และการเก็บน้ำเชื้อจากส่วนของอิพิดิไดมิส (epididymis) จะใช้สำหรับกระบือพ่อพันธุ์ที่เสียชีวิตแล้ว (Harshan et al., 2006)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 มิ.ย. 2556
เลขทะเบียน 208806
เลขเรียกหนังสือ



**2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจินอกร่างกาย**

**2.5.1 แรงดันออสโมติก**

การเติมน้ำยาเจือจางลงในน้ำเชื้อสดจำนวนมาก มีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ลดลงชั่วขณะและเพิ่มขึ้นในเวลาต่อมา ทั้งนี้เป็นเพราะแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งต้องสมดุลกันระหว่างภายนอกและภายในเซลล์อสุจิ โดยปกติน้ำเชื้อส่วนที่เป็นเซมินอลพลาสมาจะมีแรงดันออสโมติกประมาณ 285 mOsm/kg ซึ่งในน้ำเชื้อกระบือจะอยู่ประมาณ 283.75±2.31 mOsm/kg (Sansone et al., 2000) น้ำยาเจือจางควรมีคุณสมบัติ isotonic ต่อเซลล์อสุจิ (280-300 mOsm/kg) หากมีแรงดันน้อยกว่าหรือมากกว่าเซลล์อสุจิจะทำให้เซลล์อสุจิเสียหายได้ โดยน้ำยาเจือจางที่มีคุณสมบัติ hypotonic และ hypertonic จะทำให้อัตราการเมแทบอลิซึมลดลงแต่ไม่ได้ทำให้เซลล์อสุจิมีชีวิตนานขึ้น ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ดังนั้นน้ำยาเจือจางที่มีคุณสมบัติ hypotonic จะส่งผลให้น้ำในเซลล์อสุจิไหลออกจากเซลล์อสุจิ และ hypertonic จะทำให้น้ำผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมากซึ่งทำให้เซลล์อสุจิเกิดความเสียหาย (ปาริฉัตร, 2544; Bearden et al., 2004) และเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ (Bhosrekar, 2005)

**2.5.2 อุณหภูมิ**

อัตราเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้นนั้นจะส่งผลต่อระยะเวลาในการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลดลง เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำเชื้อที่สูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 50°C ส่งผลให้เซลล์อสุจิเคลื่อนที่ต่ำลง และหากมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่อุณหภูมิของร่างกายเซลล์อสุจิสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง และจะค่อยๆลดลงเนื่องจากพลังงานถูกใช้ไป การลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อส่งผลให้อัตราเมแทบอลิซึมลดลงและยืดการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ แต่ควรมีการป้องกันอันตรายที่เกิดจาก cold shock และการแช่แข็ง (Bearden et al., 2004)

**2.5.3 แหล่งพลังงาน**

แหล่งพลังงานจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับเซลล์อสุจิที่ต้องใช้พลังงานในการเคลื่อนที่ การเพิ่มสารที่ให้พลังงาน เช่น น้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตส ลงไปในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้เซลล์อสุจิมีพลังงานสำรองใช้ได้นานกว่าการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์อสุจิต้องใช้เวลามากขึ้นนอกร่างกายในระหว่างขั้นตอนต่างๆของการปฏิบัติงาน (ปาริฉัตร, 2544)

**2.5.4 ความเป็นกรด ด่าง**

น้ำเชื้อมีสภาพเป็นกลางหรือกรดเล็กน้อยซึ่ง pH อยู่ที่ประมาณ 6.9-7.0 (Koonjaenak et al., 2007b) แต่การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิจะลดลงในสภาพที่เป็นกรดมากขึ้น และเพิ่มขึ้นในสภาพที่เป็นด่างระหว่าง 4-8 ซึ่งไม่เป็นผลดีเพราะทำให้มีอัตราเมแทบอลิซึมเพิ่มขึ้นและผลิตกรดแลคติคมากขึ้น ทำให้เซลล์อสุจิมีชีวิตสั้นลง (ปาริฉัตร, 2544)

**2.5.5 ก๊าซในสภาพแวดล้อมของน้ำเชื้อ**

ออกซิเจนมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์อสุจิให้ทำงานมากขึ้น ทำให้เซลล์อสุจิมีอายุสั้นลง ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ควบคุมให้มีการเคลื่อนที่และเมแทบอลิซึมของเซลล์อสุจิลดลงได้ดีเนื่องจากเป็นปฏิกิริยากลับคืนสภาพได้ (ปาริฉัตร, 2544)

**2.5.6 แสงแดด**

แสงจะส่งผลทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึม การเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์อสุจิลดลง ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อน้ำเชื้อสัมผัสกับออกซิเจนทำให้เกิดสารพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเอนไซม์ catalase สามารถที่จะลดความเสียหายได้ แต่อย่างไรก็ตามควรป้องกันน้ำเชื้อจากแสงแดด (Bearden et al., 2004)

**2.5.7 สารเคมี แร่ธาตุ**

สารบางชนิด เช่น อะดรินาลิน อะซิทิลโคลีน ในความเข้มข้นต่ำๆมีผลกระตุ้นเมแทบอลิซึมของเซลล์อสุจิ วิตามินบางชนิด เช่น วิตามินบี ซี และเค มีผลทำให้ยืดอายุของเซลล์อสุจิ (ปาริฉัตร, 2544) ฮอร์โมน เช่น เทสโทสเตอโรน และฮอร์โมนพวกเอนโดรเจน ทำให้อัตราการเมแทบอลิซึมลดลง (Bearden et al., 2004) ยาปฏิชีวนะบางชนิดในความเข้มข้นสูง เช่น ซัลฟานิลาไมด์ เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน มีผลเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ สารพิษต่างๆที่ปนเปื้อนจากภายนอก เช่น โลหะหนัก หรือไอออนต่างๆ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่หรือทำลายเซลล์อสุจิได้ (ปาริฉัตร, 2544)

**2.5.8 การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์**

การรีดน้ำเชื้อโดยปกติจะมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ซึ่งอาจมาจากในท่อปัสสาวะของพ่อพันธุ์ หรือมาจากอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ สารละลายที่มีส่วนประกอบของไข่แดงหรือน้ำนมก็เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างดี (ปาริฉัตร, 2544) ดังนั้นจึงต้องมีการผสมสารปฏิชีวนะเพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย ทำให้ประหยัดพลังงานสำหรับเซลล์อสุจิ และช่วยยืดอายุของน้ำเชื้อให้ยาวนานขึ้น (Bearden et al., 2004)

**2.6 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น**

น้ำเชื้อกระบือสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 5°C นานมากกว่า 72 ชั่วโมงโดยที่ไม่ทำให้การเคลื่อนที่ลดลง ถ้าละลายในน้ำยาเจือจางที่มีส่วนประกอบเหมือนกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็ง (Dhami et al., 1994 อ้างโดย Sansone et al., 2000) น้ำนมโคนิยมใช้เป็นสารละลายในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือแบบเหลว (Sansone et al., 2000) ซึ่งก่อนนำมาใช้เป็นสารละลายควรนำน้ำนมไปผ่านความร้อนและใส่ไว้ในตู้เย็นทิ้งไว้ข้ามคืนหลังจากนั้นจึงนำไขมันที่เป็นแผ่นซึ่งอยู่ด้านบนออกและนำน้ำนมไปทำให้ร้อนอีกครั้ง โดยใส่ใน water bath ประมาณ 10-12 นาที และทำ

ให้เย็นอีกครั้งจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง (Kumar et al., 1993) ซึ่ง Rahman et al. (1988) พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือที่อุณหภูมิ 5°C ในน้ำยาเจือจางสูตร egg yolk citrate และ egg yolk tris เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะช่วยรักษาการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิได้ แต่อย่างไรก็ตาม น้ำยาเจือจางสูตร egg yolk tris สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ระยะเวลานาน ซึ่งที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเท่ากับ 58.01±0.01 และ 56.50±0.02% และความผิดปกติของอะโครโซมของเซลล์อสุจิ 23.80±0.04 และ 18.10±0.03% ในกระบือพันธุ์มูร่าห์และพันธุ์เซอร์ติ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางสูตร egg yolk citrate พบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ 36.30±0.02 และ 36.50±0.02% และความผิดปกติของอะโครโซมของเซลล์อสุจิคือ 35.300±0.01 และ 35.80±0.02% และ Dhami et al. (1994) อ้างโดย Sansone et al. (2000) ได้ทำการทดสอบถึงความสัมพันธ์ของสารละลาย tris-base, citrate-base และ lactose-base พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิในสารละลาย tris-base ที่ 5°C เวลา 72 ชั่วโมง ดีที่สุด และจากรายงานของ Nair et al. (2006) พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4-8°C ส่งผลให้ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้นจาก 1.99±0.26 (0 ชั่วโมง) เป็น 8.70±0.10 nmol/$10^8$ (72 ชั่วโมง) โดยการทำงานของเอนไซม์ SOD, GPx และ G6PD ในเซลล์อสุจิของกระบือจะลดลงเรื่อยๆ แต่การทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในเซมินอลพลาสมา ปริมาณของ MDA ที่สร้างขึ้นในเซลล์อสุจิของกระบือนั้นมีความสัมพันธ์ทางลบ ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ SOD, GPx และ G6PD ในเซลล์อสุจิของกระบือมีความสัมพันธ์ทางบวกกับการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ

**2.7 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง**

การแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นเป็นที่รู้กันทั่วไปว่าทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของเซลล์อสุจิลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็น (Moore et al., 2005) ซึ่งเกิดจากความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิหลังละลายที่ต่ำลงและอัตราส่วนของการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตรอดหลังละลายเพิ่มสูงขึ้น สาเหตุที่ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลงนั้นแตกต่างกันไป โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตรอดประกอบไปด้วย การเกิด cold shock อัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) องค์ประกอบในน้ำยาเจือจาง และ osmotic stress โดยขั้นตอนต่างๆในกระบวนการแช่แข็งนั้นมีส่วนในการทำให้เกิดความเสียหายจากความเครียด เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การเกิดความ เครียดจากแรงดันออสโมติก และความเป็นพิษจากความเข้มข้นของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง การก่อตัวและการละลายของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (Watson, 2000) และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อหน้าที่การทำงานของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตรอด เช่น ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ความเสียหายจาก oxidative ความสมบูรณ์ของรีเซพเตอร์บริเวณส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และองค์ประกอบของนิวเคลียส (Watson, 2000)

น้ำเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ มีบทบาทในการขนส่งสารเคมีที่สำคัญทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์แต่ละชนิดมีปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาเพื่อกำหนดความเหมาะสมในวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อให้ได้น้ำเชื้อเมื่อทำละลายแล้วมีคุณภาพดีที่สุด คือ ชนิดและระดับของสารที่จะใช้ป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย อัตราการลดอุณหภูมิจนถึงสภาพแข็งเพื่อควบคุมการเกิดผลึกน้ำแข็ง อัตราการทำละลายเพื่อให้เซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติ โดยหาทางป้องกันการกลับคืนมาก่อตัวของผลึกน้ำแข็งอีกครั้งหนึ่งก่อนที่เซลล์จะกลับสู่สภาพปกติ (เทวินทร์, 2542)

**2.7.1 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ**

ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งคือ องค์ประกอบของน้ำยาเจือจางที่ใช้สำหรับเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง (Sansone et al., 2000) สารละลายที่ใช้ประกอบไปด้วยสารที่เป็นบัฟเฟอร์ สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง และสารอื่นๆที่เติมเข้าไป ซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์อสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และมักจะมีการเติมยาปฏิชีวนะในน้ำยาเจือจางด้วย ดังนั้นก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อจึงควรทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญ คือ (Salisbury et al., 1978)

2.7.1.1 สารละลาย (dilution) โดยทั่วไปมักใช้ส่วนผสมของน้ำนมหรือน้ำกลั่น

2.7.1.2 สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectants) นิยมใช้ไข่แดงและ Glycerol ร่วมกันในการเป็นสารป้องกันการแช่แข็ง

2.7.1.3 สารให้พลังงาน (energy source) พลังงานที่เซลล์อสุจิต้องการส่วนใหญ่ใช้เพื่อการเคลื่อนไหว การเติมสารพลังงานลงไปจึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อดำรงสภาวะปกติของเซลล์ให้ปกติ ซึ่งเซลล์อสุจิมีความสามารถที่จะเกิดเมแทบอลิซึมทั้งแบบที่ต้องการออกซิเจนและแบบที่ไม่ต้องการออกซิเจน แหล่งพลังงานที่นิยมเติมลงในน้ำยาเจือจาง เช่น glucose หรือ fructose

2.7.1.4 สารปรับความเป็นกลางของ pH (buffering) จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์อสุจิจะมีการผลิตกรดแลคติค ซึ่งค่า pH ต่ำนั้นอาจทำอันตรายต่อเซลล์อสุจิ ดังนั้นการเติม citrate phosphate และ tris buffers จะช่วยปรับค่า pH ให้เกิดความสมดุล

2.7.1.5 การรักษาแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) เซลล์อสุจิจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจาง ซึ่งส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Songsasen et al., 2002) ซึ่งน้ำตาลที่ผสมในสารละลายจะช่วยลดการเกิด hypoosmotic และช่วยป้องกันเซลล์อสุจิ

2.7.1.6 สารป้องกันเชื้อแบคทีเรีย (inhibition of bacteria) การเติมยาปฏิชีวนะในสารละลายน้ำเชื้อจะช่วยควบคุมจำนวนแบคทีเรียจากการปนเปื้อนและเชื้อที่ติดต่อทางการสืบพันธุ์

เช่น vibriosis นอกจากนี้สารละลายน้ำเชื้อควรเตรียมให้สดและสะอาดเพื่อลดโอกาสปนเปื้อน ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้ penicillin (1,000 U/ml) และ streptomycin (1 mg/ml) ซึ่งอาจจะใช้ชนิดเดียวหรือสองชนิดร่วมกัน (Sansone et al., 2000)

น้ำยาเจือจางที่นิยมใช้สำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งได้แก่ lactose-eggyolk-glycerol, lactose-fructose-eggyolk-glycerol และ tris-eggyolk-glycerol (Sansone et al., 2000; Noakes et al., 2001) ซึ่ง Ahmad et al. (1988) รายงานว่า การใช้น้ำยาเจือจางสูตร lactose-egg yolk-glycerol ในการแช่แข็งน้ำเชื้อกระบือพันธุ์นิลิราวี ส่งผลทำให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด (49.86%) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางสูตร fructose-lactose-egg yolk-glycerol และ milk-egg yolk-glycerol (45.12 และ 39.08%) ตามลำดับ และ Hashemi et al. (2007) พบว่าการใช้น้ำยาเจือจางสูตร egg yolk citric acid fructose glycerol และละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-15 นาทีพบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิสูงที่สุด คือ 62.14±2.01% เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร illinois variable temperature egg yolk glycerol, minnesota egg yolk glycerol และ cornell university extender egg yolk glycerol คือ 42.30±4.17, 44.28±1.1 และ 58.14±2.28% ตามลำดับ และ Kumar et al. (1992) พบว่าเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในสารละลาย milk-base, tris-base และ citrate-base ที่ 5°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลงทั้ง 3 สูตร แต่หลังจาก 48 ชั่วโมง พบว่าในสารละลาย milk-base และ tris-base นั้นจะช่วยรักษา การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิได้ดีที่สุด

**2.7.2 สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง**

ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง อุณหภูมิจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งถึงจุดเยือกแข็ง ซึ่งทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในและภายนอกเซลล์อสุจิ การเกิดผลึกน้ำแข็งนั้นส่งผลต่อความเสียหายของเซลล์อสุจิโดยเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้โครงสร้างภายในและภายนอกของเซลล์อสุจิถูกทำลาย (Bhosrekar, 2005) ดังนั้นจึงมีการเติมสารป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อหลีกเลี่ยงหรือลดผลกระทบที่เกิดจากผลึกน้ำแข็ง แรงดันออสโมติก และความเครียดจากอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Chelmonska et al., 2006) ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (เทวินทร์, 2542)

2.7.2.1 กลุ่มที่มีในผลผลิตจากธรรมชาติ (organic materials) ได้แก่ น้ำนมและไข่แดง ซึ่งนับเป็นองค์ประกอบของที่นิยมใช้ในน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อเกือบทุกสูตร ไข่แดงและ Glycerol นิยมใช้ร่วมกันสำหรับป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง (Sansone et al., 2000) โดยทั่วไปนิยมใช้ไข่แดงประมาณ 20% ของปริมาณสารละลาย เพื่อช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไม่ให้ถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็ง (ice crystals) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (สุณีรัตน์, 2542) ในไข่แดงมีองค์ประกอบของ lecithin และ lipoprotein ซึ่งจะช่วยป้องกัน lipoprotein sheath ของเซลล์อสุจิ (Kumar et al., 1992) และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ในไข่แดงสามารถลดความเสียหายของเซลล์อสุจิ

จากความเย็นได้เช่นกัน ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถเปลี่ยนองค์ประกอบหรือโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Bhosrekar, 2005) ส่วนในน้ำนมจะมี casein ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยป้องกันความเสียหายจากการเกิด cold shock (เทวินทร์, 2542)

2.7.2.2 กลุ่มที่เป็นสารเคมี (cryoprotective agent) แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1) กลุ่มที่ไม่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ hydroxyethyl starch (HES), mannitol, sorbitol, albumin, น้ำตาลกลุ่ม monosaccharide, oligosaccharide, disaccharide, dextran, methyl cellulose, polyvinylpyrrolidone (PVP) และpolyethylene glycol (PEG) (Hubalek, 2003) ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของความดันสารละลายและมีบทบาทแทนพวก electrolyte สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งกลุ่มนี้ไม่สามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ในขณะแช่แข็งและทำละลาย โดยอาจมีบทบาทบรรเทาความรุนแรงของผลที่เกิดจากความเข้มข้นของสารละลาย (เทวินทร์, 2542)

2) กลุ่มที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

2.1) กลุ่มที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิอย่างรวดเร็วภายใน 30 นาที ได้แก่ methanol, ethanol, ethylene glycol (EG), dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO) และ methylacetamide (DMA) (Hubalek, 2003) การเติม methyl ($CH_3$) ที่อยู่ในโมเลกุลของเอไมด์จะช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของสารของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและปรับปรุงประสิทธิภาพในการทำงานของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Bianchi et al., 2008) เอไมด์และ Glycerol มีกลไกที่แตกต่างกัน ซึ่งเอไมด์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (73.09) เมื่อเปรียบเทียบกับ Glycerol (92.05) ส่งผลให้เอไมด์สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้สูงทำให้สามารถลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจาก osmotic stress (Dalimata and Graham, 1997; Ball and Vo, 2001) โดย Chalah et al. (1999) ศึกษาถึงความสามารถในการมีชีวิตรอดของอสุจิสัตว์ปีกของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายพบว่าความสมบูรณ์พันธุ์ของไข่จากแม่ไก่ที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMF พบว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่าไข่จากแม่ไก่ที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งใช้ DMA แต่ Medeiros et al. (2002a) พบว่าเซลล์อสุจิของม้าที่แช่แข็งโดยใช้ DMF นั้นทำให้การเคลื่อนที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งชนิดอื่น อย่างไรก็ตามเซลล์อสุจิที่แช่แข็งและทำการเติมสารกลุ่มเอไมด์ร่วมกันส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ดีกว่ากลุ่มที่เติม Glycerol เพียงอย่างเดียว โดยพบการเคลื่อนที่รวมและการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าคือ 48 และ 19%, 57 และ 19%, 59 และ 18%, 38 และ 16% ตามลำดับสำหรับน้ำเชื้อในน้ำยาเจือจางซึ่งประกอบด้วย DMF 1.5% + GLY 3.5%, DMF 3.5% + GLY 1.5% DMF 5% + GLY 5% และ GLY 5% เพียงอย่างเดียว และ Chelmonska et al. (2006) ศึกษาน้ำเชื้อสดของนกกระทาญี่ปุ่นที่ไม่ได้เจือจางเปรียบเทียบกับการใช้ DMA ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 6% ในน้ำยาเจือจางที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปผสมเทียม พบว่าแรงดันออสโมติก

มีค่าเพิ่มขึ้นคือ 307±28.636, 664±18.130, 929±44.850 และ 1200±77.460 mOsmol/kg ตามลำดับ แต่ pH ไม่เปลี่ยนแปลงโดยมีค่าเท่ากับ 7.25±0.13, 7.31±0.170, 7.30±0.120 และ 7.37±0.220 ส่วนเซลล์อสุจิปกติที่มีชีวิตหลังทำการผสมเทียมมีค่าเท่ากับ 43.8±7.80, 12.8±5.20, 12.43±6.37 และ 6.5±3.47% และอัตราการผสมติดเท่ากับ 71.5±17.90, 2.3±5.47, 3.9±6.90 และ 2.8±5.60% ตามลำดับ

2.2) กลุ่มที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิอย่างช้าๆ ได้แก่ glycerol (Hubalek, 2003) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแช่แข็งของเซลล์อสุจิ (สุณีรัตน์, 2542; Alvarenga et al., 2005) และนิยมใช้เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อกระบือโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 5-7% (Perera, 2008; Andrabi, 2009) ซึ่ง Glycerol จะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิทำให้น้ำที่มีอยู่ถูกขับออกจากเซลล์ไปบางส่วน และส่งผลต่ออุณหภูมิที่สามารถทำให้เกิดสภาพแช่แข็งภายในเซลล์ลดต่ำลง สภาพความหนาแน่นของสารละลายภายในเซลล์จึงลดต่ำลงด้วย นอกจากนี้ Glycerol ที่อยู่ภายนอกเซลล์จะจับกับน้ำทำให้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดสภาพแช่แข็งของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำลง ดังนั้นจึงสารถลดความเสียหายของเซลล์อสุจิจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ (สุรชัย, 2545) ซึ่ง Kumar et al. (1992) พบว่าการใช้น้ำนมและทริสเป็นสารละลายโดยใช้ไข่แดง 5% และการใช้ Glycerol 6% เหมาะสมสำหรับป้องกันเซลล์อสุจิจากความเสียหายจากการแช่แข็ง ส่วนการใช้ Glycerol ในระดับ 3 และ 9% ไม่สามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิได้ และโชค (2552) ได้ศึกษาถึงระดับของ Glycerol ในน้ำยาเจือจางสูตร tris-base ที่ระดับ 4, 6 และ 8% โดยทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที พบว่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 20.03, 33.48 และ 35.65% ตามลำดับ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิหลังการละลายที่ 5 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 15.23, 19.40 และ 20.00% ตามลำดับ ส่วนอัตราของเซลล์อสุจิมีชีวิตภายหลังการละลายที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 34.35, 34.78 และ 30.78% ตามลำดับ และ Rasul et al. (2007) ได้ศึกษาการใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งร่วมกับ DMSO โดยใช้ในอัตราส่วน 0:0, 0:1.5, 0:3, 3:0, 3:1.5, 3:3, 6:0, 6:1.5, 6:3% พบว่าน้ำเชื้อที่ละลายในน้ำยาเจือจางที่ไม่มี Glycerol ไม่พบการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลาย ส่วนความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมปกติอยู่ที่ 10 และ 30% ตามลำดับ ซึ่งการใช้ Glycerol ร่วมกับ DMSO จะส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังการละลายและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลง และการเติม Glycerol ร่วมกับ DMSO ในอัตราส่วน 6:0, 6:1.5 และ 6:3% ทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายมีค่าเท่ากับ 47±6.9, 29±3.1 และ 21±3.1% ตามลำดับ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีค่าเท่ากับ 47±4.3, 32±2.6 และ 32±2.6% ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลาย ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมปกติจะสูงขึ้นเมื่อเติม Glycerol ลงในน้ำยาเจือจางในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 3% ส่งผลทำให้ค่าการเคลื่อนที่

แบบตรงของเซลล์อสุจิสูงขึ้นและการเคลื่อนที่เป็นวงกลม (circular motility) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ Glycerol ความเข้มข้น 6% และ ALH หลังละลายมีค่าเท่ากับ 3.2±0.2 และ 4.2±0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ ส่วนค่า LIN, STR และอะโครโซมของเซลล์อสุจิที่ปกติไม่แตกต่างกันระหว่างการเติม Glycerol ที่ความเข้มข้น 3 และ 6%

อย่างไรก็ตาม Rasul et al. (2007) ได้ศึกษาถึงอุณหภูมิที่เติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่เข็ง พบว่าการเติม Glycerol ความเข้มข้น 6% ที่อุณหภูมิ 37°C เปรียบเทียบกับการเติม Glycerol 6% ที่อุณหภูมิ 4°C ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น (38±3.5 และ 40±3.9% เปรียบเทียบกับ 27±3.4 และ 34±3.5%) และการเติม Glycerol 6% ที่อุณหภูมิ 37°C ยังส่งผลทำให้ค่า VSL, VAP และ VCL สูงกว่าการเติม Glycerol 6% ที่อุณหภูมิ 4°C โดย สุรชัย (2545) รายงานว่าการเติม Glycerol สูงกว่าอุณหภูมิ 5°C ทำให้การมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลง ทั้งนี้เพราะเกิดจากการสูญเสียเอนไซม์ GOT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์อสุจิและเมื่อหลั่งออกมาอยู่ในเซมินอลพลาสมาแสดงว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจินั้นเกิดความเสียหาย (Bhosrekar, 2005)

**2.7.3 การเจือจางน้ำเชื้อ การลดอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง**

น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำเชื้อที่มีเซลล์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 70% ขึ้นไป จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 35°C โดยเจือจางในอัตรา 1:1 ซึ่งในกระบือต้องให้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิสุดท้ายอยู่ประมาณ 20-30 ล้านตัวต่อโด๊ส (Vale, 2010)

เซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นจะไวต่อความเย็นจากอุณหภูมิของร่างกายจนใกล้จุดเยือกแข็ง ความเสียหายของเซลล์อสุจิส่วนมากคือการเกิด cold shock ซึ่งจะส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ลดลง cold shock เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ ซึ่งจะไปลดความสามารถในการผ่านเข้าออกของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มอะโครโซม (acrosomal membranes) และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มไมโตครอนเดรีย ซึ่งทำให้สูญเสียโปรตีนในส่วนของ midpiece (Iqbal et al., 1987) ในสุกรจะไวต่อการเกิด cold shock มากที่สุดรองลงมาคือ โค กระบือ แกะ และม้า โดยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อความเสียหายของเซลล์อสุจินั้นจะเกิดขึ้นเมื่อทำการลดอุณหภูมิมาจนถึง 0°C (Bhosrekar, 2005)

อย่างไรก็ตามสามารถลดการเกิด cold shock ได้โดยควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิให้เหมาะสม (Bhosrekar, 2005) ซึ่ง Talevi et al. (1994) อ้างโดย Sansone et al. (2000) ได้ศึกษาถึงการลดอุณหภูมิแบบช้า (1 ชั่วโมง) และแบบเร็ว (15 นาที) จากอุณหภูมิ 28°C มาที่ 5°C พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน และ Ramakrishnan and Ariff (1994) อ้างโดย Sansone et al. (2000)

ได้ศึกษาการลดอุณหภูมิมาที่ 5°C ภายในเวลา 45, 60 และ 90 นาที พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิภายหลังละลายน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน และ Dhami et al. (1996) ศึกษาถึงอัตราการลดอุณหภูมิ โดยละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่มีส่วนประกอบของ Glycerol ที่อุณหภูมิ 32°C จากนั้นบรรจุใส่หลอดฟางและลดอุณหภูมิโดยใส่ในตู้เย็นที่มีน้ำ 10°C และ 37°C พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 10°C และ 37°C มาที่อุณหภูมิ 5°C แต่การลดอุณหภูมิจาก 37°C มาที่อุณหภูมิ 5°C จะมีอัตราการผสมติดสูงกว่าการลดอุณหภูมิจาก 10°C มาที่อุณหภูมิ 5°C ซึ่งที่เวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 63.4% เปรียบเทียบกับ 59.5% และที่เวลา 2 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 68.1% เปรียบเทียบกับ 65.4% ตามลำดับ และ Sansone et al. (2000) รายงานว่าน้ำเชื้อกระบือควรลดอุณหภูมิมาที่ 5°C ด้วยอัตราเร็ว 0.2-0.4°C ต่อนาทีก่อนการแช่แข็ง ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมและนิยมใช้ในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อกระบือมาที่ 4-5°C จะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง (Rasul et al., 2000; Sukhato et al., 2001; Andrabi et al., 2008) เมื่อลดอุณหภูมิมาที่ 5°C น้ำเชื้อกระบือควรอยู่ที่อุณหภูมิ 5°C ไม่ต่ำกว่า 2 ชั่วโมงและไม่ควรเกิน 6 ชั่วโมง (Sansone et al., 2000) โดยงานทดลองส่วนใหญ่อยู่ประมาณ 4 ชั่วโมง (Andrabi et al., 2008; Vale, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับ Tuli et al. (1981) พบว่าระยะเวลาในการบ่มน้ำ เชื้อเจือจางกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งสำหรับน้ำเชื้อกระบือปลักแบบแช่แข็งที่ดีที่สุด คือ 4 ชั่วโมง

**2.7.4 การแช่แข็งน้ำเชื้อ**

การแช่แข็งโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวเป็นวิธีที่นิยมกันมากที่สุด โดยไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิ -196°C การแช่แข็งโดยใช้ไอของไนโตรเจนเหลวสามารถใช้ได้กับกล่องธรรมดา โดยวางหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อให้อยู่เหนือไนโตรเจนเหลว 4-5 เซนติเมตร เป็นเวลา 8-10 นาที (Ahmad et al., 1988; McCool et al.,1998; Mustafa et al., 1998; Vale, 2010) หรือแช่แข็งด้วยอุปกรณ์ที่สามารถตั้งโปรแกรมการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์ โดยอัตราการลดอุณหภูมิในแต่ละขั้นก็จะแตกต่างกัน ซึ่ง Rasul et al. (2000); Rasul et al. (2007); Andrabi et al. (2008) แช่แข็งน้ำเชื้อกระบือโดยลดอุณหภูมิจาก 4°C มาที่ -15°C ด้วยอัตราเร็ว 3°C ต่อนาทีจากนั้นลดอุณหภูมิจาก -15°C มาที่ -80°C ด้วยอัตราเร็ว 10°C ต่อนาที และ Koonjaenak et al. (2007a) แช่แข็งน้ำเชื้อกระบือโดยลดอุณหภูมิจาก 4°C มาที่อุณหภูมิ -40°C ด้วยอัตราเร็ว 18°C ต่อนาที และลดอุณหภูมิจาก -40°C มาที่อุณหภูมิ -140°C ด้วยอัตราเร็ว 8°C ต่อนาที ซึ่งอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวของน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือปลักอยู่ระหว่าง -80 ถึง -140°C โดย Sukhato et al. (2001) พบว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120°C จะส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิหลังละลายสูงกว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -40 และ -80°C และการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 4°C มาที่อุณหภูมิ -120°C ที่อัตราเร็ว 20 และ 30°C ต่อนาที โดยใช้เครื่องที่สามารถตั้งโปรแกรมลดอุณหภูมิ

อัตโนมัติ เมื่อนำไปผสมเทียมโดยการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที และทำการตรวจการตั้งท้องหลังผสมเทียม 60 วัน พบว่ามีการตั้งท้องอยู่ที่ 43 และ 40% ตามลำดับ จากกระบือเพศเมียที่ได้รับการผสมจำนวน 60 และ 58 ตัว ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ทำการแช่แข็งโดยใช้วิธีการอังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -120°C นาน 10 นาที พบว่ามีการตั้งท้องอยู่ที่ 28% จากกระบือเพศเมียที่ได้รับการผสมเทียม 60 ตัว

**2.7.5 การละลายน้ำเชื้อ**

น้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดฟาง (straw) นิยมทำละลายน้ำเชื้อโดยจุ่มลงในน้ำอุณหภูมิประมาณ 37°C โดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาที (Andrabi et al., 2008) และ Sansone et al. (2000) รายงานว่า น้ำเชื้อกระบือควรละลายที่อุณหภูมิประมาณ 37-45°C นาน 15-60 วินาที โดย Sukhato et al. (2001) พบว่าการละลายน้ำเชื้อกระบือปลักแช่แข็งที่อัตราเร็ว 1000°C ต่อนาที (rapid warming) ดีกว่าการละลายน้ำเชื้อที่อัตราเร็ว 200°C ต่อนาที (slow warming) ซึ่งสอดคล้องกับ Hashemi et al. (2007) พบว่าการละลายน้ำเชื้อแบบเร็ว 37°C นาน 12-15 วินาที (rapid) ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อแบบช้า 5°C นาน 2 นาที (slow) แต่ Dhami et al. (1992) ได้ศึกษาถึงอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อของกระบือพันธุ์มูร่าห์ ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 60 วินาที, 60°C นาน 15 วินาที และ 80°C นาน 5 วินาที พบการเคลื่อนของเซลล์อสุจิหลังละลายสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 40°C ถึง 80°C มีค่าเท่ากับ 41.72±2.45, 47.45±2.09 และ 51.61±2.06% โดยอัตราการมีชีวิตรอดหลังละลายที่อุณหภูมิ 38°C นาน 1 ชั่วโมง เท่ากับ 9.22±1.47, 11.79±1.63 และ 12.27±1.53% และ Rao et al. (1986) ศึกษาอัตราการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 วินาที, 37°C นาน 15 วินาที, 37°C นาน 30 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลัก พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายที่ 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 66.9, 66.6, 72.1 และ 64.6 % ตามลำดับ ซึ่งอัตราการละลายน้ำเชื้อที่ดีที่สุดคือ 37°C นาน 30 วินาที และ Ahmad et al. (1988) ได้ศึกษาถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์อสุจิกระบือพันธุ์นิลิราวีที่ละลายในอุณหภูมิต่างกัน พบว่าการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 วินาที ส่งผลทำให้มีอัตราการผสมติดสูงที่สุดคือประมาณ 49.46% เมื่อเปรียบเทียบกับการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 20°C นาน 1 นาที และ 5°C นาน 2 นาที คือ 40.05 และ 44.30% ตามลำดับ และ Ahmad (1983) ศึกษาการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือนิลิราวีที่อุณหภูมิ 0°C นาน 2 นาที, 37°C นาน 15 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที พบว่ามีการเคลื่อนที่หลังละลายเท่ากับ 30.28±2.25, 40.00±1.43 และ 50.00±0.99% ตามลำดับ และได้ทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิซึ่งทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งไม่มีการเคลื่อนที่พบว่าการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที พบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิอยู่ที่ 4.67±0.12 และ 5.28±0.10 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าและมีความแตกต่างกัน

กับการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 0°C นาน 2 นาที โดยพบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิอยู่ที่ 3.89±0.12 ชั่วโมง