บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลักแบบแช่แข็ง พบว่าเซมินอลพลาสมามีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็ง โดยพบว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ปั่นแต่ไม่แยกเซมินอลพลาสมา และกลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมานั้นมีค่า distribution (rapid) และ BCF หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4-1 ผลของเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	เซมินอลพลาสมา			SEM
	กลุ่มควบคุม	ไม่แยกเซมินอลพลาสมา	แยกเซมินอลพลาสมา	
MOT (%)	39.50^{a}	38.44^{a}	33.97^{b}	1.51
PMOT (%)	20.41^{a}	21.22^{a}	16.28^{b}	1.18
Velocity distribution				
Rapid (%)	28.72^{a}	28.72^{a}	24.25^{b}	1.26
Medium (%)	10.59	9.80	9.78	0.76
Slow (%)	34.50	37.63	36.09	1.97
Static (%)	26.06	23.88	30.06	2.01
Velocity				
VAP (µm/s)	74.22	74.23	73.92	0.96
VSL (µm/s)	57.06	57.53	55.07	0.96
VCL (µm/s)	127.70	126.43	129.07	1.84
Kinetic movement				
ALH (µm)	5.96	5.78	5.99	0.13
BCF (Hz)	26.60^{a}	27.28^{a}	24.71^{b}	0.60
STR (%)	76.94	78.19	75.50	0.84
LIN (%)	46.69	48.22	45.25	0.97

^{a,b} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ปั่นแต่ไม่แยกเซมินอลพลาสมาให้ค่า MOT, PMOT, velocity distribution rapid และ BCF หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ส่วนค่า velocity distribution (medium, slow และ static), VAP, VSL, VCL, ALH, STR และ LIN ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-1

จากการศึกษาผลของเซมินอลพลาสมาต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักแช่แข็ง พบว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออกก่อนการแช่แข็งส่งผลให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็งลดลง ซึ่งกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ปั่นแต่ไม่แยกเซมินอลพลาสมา และกลุ่มที่ปั่นและแยกเซมินอลพลาสมา นั้นมีค่า intact acrosome และ damaged acrosome หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ปั่นแต่ไม่แยกเซมินอลพลาสมา ให้ค่า intact acrosome หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและกลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาให้ค่า damaged acrosome หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ปั่นแต่ไม่แยกเซมินอลพลาสมา ส่วนค่า missing acrosome นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลของเซมินอลพลาสมาต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	เซมินอลพลาสมา			SEM
	กลุ่มควบคุม	ไม่แยกเซมินอลพลาสมา	แยกเซมินอลพลาสมา	
Acrosome integrity				
Intact acrosome	67.06^{a}	64.34^{a}	58.03^{b}	1.36
Damaged acrosome	30.44^{b}	33.30^{b}	39.47^{a}	1.33
Missing acrosome	2.50	2.36	2.50	0.24

^{a,b} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.01)

เซมินอลพลาสมาประกอบด้วยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งทำให้เกิดความเสียหายและส่ง ผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (Al-Somai et al., 1994) อีกทั้งยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหลั่งของ amino acid oxidase ซึ่งส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลง (Martinus et al., 1991 อ้างโดย Ahmad et al., 1996) และ Ahmad et al. (1996) ยังพบว่าการแยกเซมินอลพลาสมาช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37°C จะเห็นได้ว่าเซมินอลพลาสมานั้นส่งผลเสียต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปแบบเหลว แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซมินอลพลาสมาส่งผลบวกต่อการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักที่ผ่าน

การแช่แข็ง ดังนั้นจึงไม่ควรแยกเซมินอลพลาสมาออกก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อ สอดคล้องกับรายงานของ Jobim et al. (2004) พบว่าเซมินอลพลาสมาจะช่วยรักษาการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิโคและม้า และเพิ่มความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิม้า อีกทั้งยังป้องกันเซลล์อสุจิจากผลของ reactive oxygen species (ROS) (Love et al., 2005) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อสุจิในระหว่างการเก็บรักษา (Castellini et al., 2000) โดย ROS ที่สร้างขึ้นจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ การมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ ความพร้อมของอสุจิที่จะเข้าผสมกับไข่ และการผสมติดลดลง (Gomez et al., 1998 อ้างโดย Aitken and Baker, 2006; Michael et al., 2007; Bucak et al., 2008)

เซมินอลพลาสมายังมีบทบาทต่อการทำงานของเซลล์อสุจิ (Kareskoski and Katila, 2008) โดยเซมินอลพลาสมาโปรตีนจะช่วยลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการเกิด cold shock เพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Martinez-pastor et al., 2006) ซึ่ง Asadpour et al. (2007) พบว่าเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อกระบือประกอบด้วยเซมินอลพลาสมาโปรตีนขนาด 24.5 kDa มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อสดและการรอดชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็ง โปรตีนขนาด 45 kDa มีความสัมพันธ์กับรูปร่างของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติของน้ำเชื้อแช่แข็ง และโปรตีนขนาด 55 kDa มีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของน้ำเชื้อสด อีกทั้งยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ โดย Tuli et al. (1984) พบว่าในเซมินอลพลาสมากระบือมีระดับของ luteinizing hormone (LH) อยู่ระหว่าง 0.598±0.200-1.22±0.334 ng/ml และ follicle stimulating hormone (FSH) อยู่ระหว่าง 8.98±3.08-18.40±2.19 ng/ml ซึ่งความเข้มข้นของฮอร์โมน FSH และ LH นั้นส่งผลบวกต่อการเคลื่อนที่รวมและความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ

การแยกเซมินอลพลาสมานั้นยังส่งผลทำให้ค่า BCF ลดลงเนื่องจากเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายมากกว่ากลุ่มที่แยกเซมินอลพลาสมา ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่บอกถึงความถี่ของจังหวะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ โดยมีความสัมพันธ์กับลักษณะคลื่นของการเคลื่อนที่บริเวณส่วนหางของเซลล์อสุจิ (flagellar wave) (Serres et al., 1984 อ้างโดย Mortimer, 2000) ดังนั้นค่า BCF ที่ต่ำจึงส่งผลให้เซลล์อสุจิเคลื่อนที่ได้ช้าลง เนื่องจากเซมินอลพลาสมามีความสำคัญต่อกระบวนการแช่แข็ง ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งจะส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายโดยเซลล์อสุจิสูญเสียสารบางอย่าง เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (GOT และ GPT) โดย Tuli and Holtz (1994) พบว่าการแยกเซมินอลพลาสมาจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้นเนื่องจากการสูญเสียเอนไซม์ GOT ออกจากเซลล์อสุจิ ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ GOT ภายในเซลล์อสุจิลดลงและจะพบในของเหลวมากขึ้น โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เอนไซม์ที่อยู่ในอะโครโซม (hyaluroidase และ acrosin) รวมถึงสารพลังงาน (ATP) จากเซลล์อสุจิ ซึ่งส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายน้ำเชื้อลดลง (Iqbal et al., 1987;

Graham and Moce, 2005; Akhtar et al., 1990 อ้างโดย Rasul et al., 2007) ดังนั้นการแยกเซมินอลพลาสมาจึงส่งผลทำให้การเคลื่อนที่และความเข็งแรงของเซลล์อสุจิหลังแช่แข็งลดลง (Azeredo et al., 2001)

4.2 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อลักษณะการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลักแช่แข็ง พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง คือ Glycerol, DMSO, DMA และ DMF ที่ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% มีค่า MOT, PMOT, velocity distribution (rapid, medium, slow และ static), VAP, VSL, ALH, BCF และ STR หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยกลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% ให้ค่า velocity distribution rapid, velocity distribution medium และ VAP หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% โดยกลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5 และ 7% ให้ค่า MOT หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 9%, DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และกลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5% พบค่า PMOT, VSL, BCF และ STR สูงที่สุด ส่วนค่า VCL และ LIN นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

จากการศึกษาผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักแบบแช่แข็ง พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง คือ Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% นั้นมีค่า intact acrosome และ damaged acrosome หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)โดยกลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% ให้ค่า intact acrosome หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่โดยกลุ่มที่ใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และให้ค่า damaged acrosome หลังการแช่แข็งต่ำกว่ากลุ่มอื่น ส่วนค่า missing acrosome นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-4

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่ระดับ 5% ในสูตรน้ำยาเจือจางมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือปลักแบบแช่แข็ง ซึ่งสอดคล้องกับ โชค (2552) พบว่าการใช้ Glycerol ในน้ำยาเจือจางสูตร tris-base ที่ความเข้มข้น 8% พบอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิกระบือปลักหลังการละลายที่ 0 และ 5 ชั่วโมงสูงที่สุด (35.65 และ 20.00%) เมื่อเปรียบกับการใช้ Glycerol ความเข้มข้น 4% (20.03 และ 15.23%) และ 6%

(33.48 และ19.40%) ตามลำดับ และ Jainudeen and Das (1982) อ้างโดย Andrabi (2009) ศึกษาผลของกระบวนการเติม Glycerol แบบ one step และ two step โดยใช้ Glycerol 3 ระดับคือ 3, 5 และ 7% พบว่าการเติม Glycerol แบบ one step และ two step ไม่มีความแตกต่างของการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซม พบว่าการใช้ Glycerol 5% ส่งผลทำให้การเคลื่อนของเซลล์อสุจิสูงที่สุด และ Kumar et al. (1992) พบว่าระดับของ Glycerol ที่เหมาะสมสำหรับน้ำยาเจือจางสูตรทริสและน้ำนมคือ 6% ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือหลังละลายดีที่สุด และ Abbas and Andrabi (2002) ศึกษาผลของการใช้ Glycerol ที่ความเข้มข้น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 และ 12% ต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือหลังละลายพบว่าการใช้ Glycerol 7% ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสูงที่สุด และ Rasul (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 และ 6:3% พบว่า การใช้ Glycerol ร่วมกับ DMSO ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลง เนื่องจากจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ส่งผลทำให้เอนไซม์จากเซลล์อสุจิออกมา เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (GOT และ GPT) เอนไซม์ที่พบอยู่ในส่วนอะโครโซม (hyaluroidase และ acrosin) รวมถึงสารพลังงาน (ATP) จากเซลล์อสุจิ ส่งผลให้การเคลื่อนที่หลังละลายลดลง (Iqbal et al., 1987; Graham and Moce, 2005; Akhtar et al., 1990 อ้างโดย Rasul et al., 2007)

การใช้ Glycerol ส่งผลต่อ velocity distribution (rapid, medium, slow และ static), VAP และ VSL ที่สูงขึ้นเนื่องจาก Glycerol ประกอบด้วยไฮดรอกซิลหลายตัว สามารถเชื่อมไฮโดรเจนกับน้ำและซึมผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Fuller and Paynter, 2004) ซึ่ง Glycerol จะแทนที่น้ำในเซลล์อสุจิเพื่อรักษาปริมาตรของเซลล์ระหว่างไอออนและสารโมเลกุลใหญ่ และลดจุดเยือกแข็งของน้ำ (Holt, 2000; Medeiros et al., 2002b) น้ำที่อยู่ในเซลล์อสุจิถูกขับออกจากเซลล์ไปบางส่วน และส่งผลต่ออุณหภูมิที่สามารถทำให้เกิดสภาพแช่แข็งภายในเซลล์ลดต่ำลง สภาพความหนาแน่นของสารละลายภายในเซลล์จึงลดต่ำลงด้วย นอกจากนี้ Glycerol ที่อยู่ภายนอกเซลล์จะจับกับน้ำทำให้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดสภาพแช่แข็งของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำลง ดังนั้นจึงลดความเสียหายของเซลล์อสุจิจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ (สุรชัย, 2545)

การใช้ DMSO, DMA และ DMF นั้นส่งผลต่อ velocity distribution (rapid, medium, slow และ static), VAP และ VSL ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Glycerol ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าแสดงความเร็วของการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (sperm velocity) ใช้ในการพิจารณาทางอ้อมโดยชี้ ให้เห็นถึงการทำงานของไมโตครอนเดรียของเซลล์อสุจิ (Graham et al., 1984 อ้างโดย Bag et al., 2002) และมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์อสุจิ (Budworth et al., 1988) โดยในกระบวนการแช่แข็ง

และการละลายน้ำเชื้อนั้นจะส่งผลทำให้ไมโตครอนเดรียของเซลล์อสุจิเกิดความเสียหาย (Wolley and Richardson, 1978) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก DMSO, DMA และ DMF เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในกลุ่มที่ซึมผ่านผนังเซลล์อสุจิอย่างรวดเร็ว (Hubalek, 2003) ซึ่งส่งผลต่อแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้น โดยจากรายงานของ Chelmonska et al. (2006) พบว่าน้ำเชื้อสดของนกกระทาญี่ปุ่นที่ไม่ได้เจือจางเปรียบเทียบกับการใช้ DMA ในระดับ 2, 4 และ 6% ในน้ำยาเจือจางที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที แล้วนำไปผสมเทียม พบว่าแรงดันออสโมติกมีค่าเพิ่มขึ้นคือ 307±28.636, 664±18.130, 929±44.850 และ 1200±77.460 mOsmol/kg แต่ pH ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.25±0.13, 7.31±0.170, 7.30±0.120 และ 7.37±0.220 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ของเซลล์อสุจิปกติมีชีวิตหลังทำการผสมเทียมมีค่าเท่ากับ 43.8±7.80, 12.8±5.20, 12.43±6.37 และ 6.5±3.47% ตามลำดับ และอัตราการผสมติดมีค่าเท่ากับ 71.5±17.90, 2.3±5.47, 3.9±6.90 และ 2.8±5.60% ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อของกระบือมีแรงดันออสโมติกประมาณ 283.75±2.31 mOsm/kg (Sansone et al., 2000) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติม DMSO, DMA และ DMF ในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะส่งผลทำให้เกิดความร้อนและเกิดการตกตะกอนของไข่แดงทำให้โปรตีนเสียสภาพ ซึ่งในไข่แดงจะมีองค์ประกอบของ lecithin และ lipoprotein ช่วยป้องกันส่วน lipoprotein sheath ของเซลล์อสุจิ (Kumar et al., 1992) อีกทั้งยังช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไม่ให้ถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (สุณีรัตน์, 2542) ดังนั้นเมื่อโปรตีนเสียสภาพ จึงส่งผลทำให้เซลล์อสุจิเกิดความเสียหาย (Bearden et al., 2004) และเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ (Bhosrekar, 2005)

4.3 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 3 ระดับคือ -100, -120 และ -140°C ร่วมกับอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ 2 ระดับ คือที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 วินาที พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และ 4-6

4.3.1 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวต่อลักษณะการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 3 ระดับคือ -100, -120 และ -140°C พบว่าค่า MOT, PMOT, BCF และ velocity distribution (rapid, medium และ slow) หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยกลุ่มที่อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -120 และ -140°C ให้ค่า MOT, PMOT, velocity distribution rapid และ velocity distribution medium

หลังแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -100°C ส่วนในกลุ่มที่อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -120°C พบว่าให้ค่า BCF (26.23 Hz) สูงกว่ากลุ่มอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -100°C แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่อุณหภูมิ -140°C ส่วนค่า velocity distribution (static), VAP, VSL, VCL, ALH, STR และ LIN นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-5

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 3 ระดับคือ -100, -120 และ -140°C พบว่าค่า intact acrosome, damaged acrosome และ missing acrosome หลังการแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-6 ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อกระบือปลักคืออุณหภูมิระหว่าง -120 ถึง -140°C สอดคล้องกับ Sukhato et al. (2001) พบว่าการลดอุณหภูมิจาก 4°C มาที่ -120°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อัตราเร็ว 20 และ 30°C ต่อนาที ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิกระบือปลักหลังละลายสูงสุด (44±4 และ 44±4%) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -40°C (26±4 และ 34±4%) และ -80°C (38±3 และ 43±4%) และการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 4°C มาที่อุณหภูมิ -120°C ที่อัตรา 20 และ 30°C ต่อนาที โดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เมื่อนำไปผสมเทียมโดยละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที และตรวจการตั้งท้องหลังผสมเทียม 60 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตั้งท้องอยู่ที่ 43 และ 40% ตามลำดับ จากกระบือเพศเมียที่ได้รับการผสม 60 และ 58 ตัว ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ทำการแช่แข็งโดยอังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -120°C นาน 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์การตั้งท้องอยู่ที่ 28%

เนื่องจากอุณหภูมิวิกฤตสำหรับเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง คืออุณหภูมิระหว่าง -5 ถึง -50°C (Kumar et al., 2003) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งและทำละลายน้ำเชื้อ โดยขณะแช่แข็งที่ -196°C สภาวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มี เนื่องจากหากอุณหภูมิของการแช่แข็งต่ำกว่า -130°C สภาพน้ำเชื้อจะเป็นผลึกที่คงตัว (สุรชัย, 2545) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -120 ถึง -140°C ส่งผลกระทบต่อลักษณะการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิต่ำกว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -100°C

4.3.2 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อลักษณะการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ 2 ระดับ คือที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที และ 50°C นาน 15 วินาที พบว่าค่า velocity distribution (medium) หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยกลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที ให้ค่า velocity

distribution medium สูงกว่ากลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ส่วนค่า MOT, PMOT, velocity distribution (rapid, slow และ static), BCF, VAP, VSL, VCL, ALH, STR และ LIN หลังการแช่แข็งนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-5

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ 2 ระดับ คือที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที และ 50°C นาน 15 วินาที พบว่าการละลายน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของกระบือปลักที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ดีที่สุดโดยพบค่า intact acrosome และ damaged acrosome หลังการแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยกลุ่มละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ให้ค่า intact acrosome หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที ในกลุ่มละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที ให้ค่า damaged acrosome สูงกว่ากลุ่มละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ส่วนค่า missing acrosome หลังการแช่แข็งนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4-6

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อกระบือปลักที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที สอดคล้องกับ Rao et al. (1986) พบว่าอัตราการละลายน้ำเชื้อที่ดีที่สุด คือ 37°C นาน 30 วินาที โดยศึกษาอัตราในการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 วินาที, 37°C นาน 15 วินาที, 37°C นาน 30 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลัก พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังละลายที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 66.9, 66.6, 72.1 และ 64.6% ตามลำดับ และ Ahmad (1983) ได้ศึกษาการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือพันธุ์นิลิราวีที่อุณหภูมิ 0°C นาน 2 นาที และ 37°C นาน 15 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที พบการเคลื่อนที่หลังละลายมีค่าเท่ากับ 30.28±2.25, 40.00±1.43 และ 50.00±0.99% ตามลำดับ และทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิโดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งไม่มีการเคลื่อนที่พบว่าการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 วินาที และ 75°C นาน 9 วินาที พบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิที่ 4.67±0.12 และ 5.28±0.10 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าและมีความแตกต่างกันกับการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 0°C นาน 2 นาทีพบการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิอยู่ที่ 3.89±0.12 ชั่วโมง แต่ Dhami et al. (1992) พบว่าการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิของกระบือมูร่าห์หลังละลายเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจาก 40°C ถึง 80°C โดยศึกษาอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C นาน 60 วินาที, 60°C นาน 15 วินาที และ 80°C นาน 5 วินาที การเคลื่อนของเซลล์อสุจิมีค่าเท่ากับ 41.72±2.45, 47.45±2.09 และ 51.61±2.06% อัตราการมีชีวิตรอดหลังละลายของเซลล์อสุจิที่อุณหภูมิ 38°C นาน 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 9.22±1.47, 11.79±1.63 และ 12.27±1.53% ตามลำดับ

เนื่องจากโดยทั่วไปประมาณ 50% ของเซลล์อสุจิจะเกิดความเสียหายระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Watson et al., 2000) ซึ่งอสุจิจะถูกควบคุมโดยทางเคมี แรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และกลไกของความเครียดต่างๆ ซึ่งจะแสดงให้เห็นหลังจากการทำการเจือจางน้ำเชื้อ การลดอุณหภูมิ การบ่ม

น้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันการแช่แข็ง กระบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ โดยเซลล์อสุจิกระบือจะเกิดความเสียหายมากหลังจากการบ่มน้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันการแช่แข็ง ซึ่งจะเกิดขึ้นในระหว่างการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ (Rasul et al., 2001)

ความเสียหายดังกล่าวเป็นผลจากการเกิด warm shock เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อสุจิซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ โดยจะพบความเสียหายของอะโครโซมเป็นส่วนใหญ่ (Bhosrekar, 2005) แต่อย่างไรก็ตามส่วน acrosome cap ของเซลล์อสุจิกระบือจะได้รับความเสียหายน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนแช่แข็งของเซลล์อสุจิกระบือ (Rasul et al., 2007) ซึ่ง Rasul et al. (2001) รายงานว่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมปกติของเซลล์อสุจิกระบือจะลดลงตามระยะเวลาของกระบวนการแช่แข็ง โดยพบว่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากเจือจางน้ำเชื้อมีค่าเท่ากับ 80.2±3.9% หลังบ่มน้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันการแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 60.4±5.6% หลังจากแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อมีค่าเท่ากับ 32.6±3.8% ส่วนอะโครโซมปกติของเซลล์อสุจิไม่เปลี่ยนแปลงหลัง จากเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางและบ่มน้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง โดยมีค่าเท่ากับ 73.2±2.4% แต่หลังจากแช่แข็งและละลายน้ำเชื้ออะโครโซมปกติของเซลล์อสุจิมีค่าเท่ากับ 61.8±2.4% ซึ่งอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือระหว่างกระบวนการแช่แข็งจะเกิดความเสียหายประมาณ 20%

ตารางที่ 4-3 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง												SEM
	Glycerol			DMSO			DMA			DMF			
	5%	7%	9%	5%	7%	9%	5%	7%	9%	5%	7%	9%	
MOT (%)	34.06^{a}	34.06^{a}	33.53^{b}	20.81^{b}	14.19^{c}	10.84^{d}	5.34^{e}	4.38^{e}	3.78^{e}	5.06^{e}	3.06^{e}	3.06^{e}	1.10
PMOT (%)	21.56^{a}	18.91^{b}	18.50^{b}	12.72^{c}	6.69^{d}	4.91^{d}	1.72^{e}	1.69^{e}	1.38^{e}	2.06^{e}	1.25^{e}	1.13^{e}	0.80
Velocity distribution													
Rapid (%)	26.25^{a}	25.66^{a}	25.28^{a}	16.13^{b}	9.69^{c}	7.34^{c}	2.97^{d}	2.53^{d}	2.22^{d}	2.94^{d}	1.59^{d}	1.63^{d}	0.89
Medium (%)	7.94^{a}	8.53^{a}	8.22^{a}	4.88^{b}	4.53^{b}	3.66^{b}	2.44^{c}	1.91^{c}	1.59^{c}	2.25^{c}	1.53^{c}	1.50^{c}	0.44
Slow (%)	43.34^{bc}	46.03^{abc}	43.25^{bc}	44.16^{bc}	55.06^{ab}	58.09^{a}	52.88^{abc}	43.44^{bc}	48.38^{abc}	51.28^{abc}	41.38^{c}	41.91^{c}	3.93
Static (%)	22.56^{ef}	19.91^{f}	23.31^{ef}	35.06^{cde}	30.69^{def}	30.88^{def}	41.81^{bcd}	52.16^{ab}	47.84^{ab}	43.59^{abc}	55.56^{a}	55.16^{a}	4.10
Velocity													
VAP (µm/s)	73.99^{a}	73.31^{a}	73.05^{a}	70.76^{ab}	69.38^{abc}	68.11^{abcd}	62.48^{d}	63.13^{cd}	67.14^{abcd}	69.47^{abc}	68.24^{abcd}	65.68^{bcd}	2.10
VSL (µm/s)	61.18^{a}	58.23^{ab}	57.39^{ab}	57.64^{ab}	53.27^{bc}	51.29^{bc}	46.23^{c}	48.57^{c}	51.57^{bc}	53.58^{bc}	51.89^{bc}	53.45^{bc}	2.33
VCL (µm/s)	119.80	120.58	122.98	117.61	117.98	117.93	115.15	114.21	115.58	116.85	117.61	106.84	3.43
Kinetic movement													
ALH (µm)	5.33^{c}	5.73^{bc}	5.79^{bc}	5.70^{bc}	6.92^{ab}	6.76^{abc}	7.44^{a}	6.58^{abc}	7.58^{a}	7.05^{ab}	7.12^{ab}	6.03^{abc}	0.48
BCF (Hz)	30.12^{a}	27.78^{ab}	25.74^{bc}	26.51^{abc}	23.51^{cd}	23.20^{cd}	23.40^{cd}	20.43^{de}	19.52^{de}	18.49^{e}	20.17^{de}	16.48^{e}	1.38
STR (%)	82.34^{a}	79.28^{abc}	78.53^{abc}	80.53^{ab}	76.19^{bcd}	74.84^{cd}	73.41^{d}	80.13^{ab}	78.94^{abc}	76.22^{bcd}	79.66^{abc}	82.09^{a}	1.60
LIN (%)	53.28	50.78	49.22	50.75	47.00	45.94	44.03	48.38	49.06	48.72	51.94	50.50	2.19

$^{a, b, c, d, e, f}$ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตารางที่ 4-4 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง												SEM
	Glycerol			DMSO			DMA			DMF			
	5%	7%	9%	5%	7%	9%	5%	7%	9%	5%	7%	9%	
Acrosome integrity													
Intact acrosome	62.34[a]	64.27[a]	61.13[a]	48.09[b]	45.72[b]	37.59[c]	30.95[d]	27.55[de]	27.59[de]	26.92[de]	25.70[e]	25.78[e]	1.33
Damaged acrosome	34.91[e]	33.66[e]	35.98[e]	49.41[d]	51.70[d]	59.39[c]	66.92[b]	69.63[ab]	70.13[ab]	70.27[ab]	72.16[a]	71.75[a]	1.32
Missing acrosome	2.75	2.08	2.89	2.50	2.58	3.02	2.13	2.83	2.59	2.81	2.14	2.47	0.24

[a, b, c, d] อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 4-5 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว			อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ		อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว x อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ	SEM
	-100°C	-120°C	-140°C	37°C 30 sec	50°C 15 sec		
MOT (%)	42.20^{b}	49.75^{a}	53.48^{a}	47.60	49.35	ns	2.41
PMOT (%)	24.75^{b}	30.31^{a}	32.33^{a}	29.02	29.24	ns	2.30
Velocity distribution							
Rapid (%)	34.36^{b}	40.73^{a}	43.89^{a}	39.15	40.18	ns	2.55
Medium (%)	7.91^{b}	9.00^{a}	8.89^{a}	8.05^{b}	9.15^{a}	ns	0.48
Slow (%)	38.91^{a}	34.88^{b}	32.38^{b}	34.91	35.87	ns	1.97
Static (%)	18.66	15.31	14.06	17.42	14.60	ns	1.98
Velocity							
VAP (µm/s)	80.08	80.56	81.18	80.42	80.78	ns	1.36
VSL (µm/s)	60.73	62.07	62.83	62.08	61.67	ns	1.50
VCL (µm/s)	136.50	136.41	137.21	135.94	137.47	ns	2.06
Kinetic movement							
ALH (µm)	6.15	6.05	6.06	6.01	6.16	ns	0.10
BCF (Hz)	24.58^{b}	26.23^{a}	25.85^{ab}	25.69	25.42	ns	0.66
STR (%)	76.11	77.61	77.44	77.39	76.72	ns	0.75
LIN (%)	46.50	47.94	47.72	47.69	47.08	ns	0.87

[a, b] อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตารางที่ 4-6 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว			อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ		อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว x อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ	SEM
	-100°C	-120°C	-140°C	37°C 30 sec	50°C 15 sec		
Acrosome integrity							
Intact acrosome	71.65	70.63	70.65	76.09^{a}	65.86^{b}	ns	1.15
Damaged acrosome	26.02	27.26	27.17	21.66^{b}	31.98^{a}	ns	1.14
Missing acrosome	2.33	2.11	2.18	2.25	2.16	ns	0.19

^{a,b} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)