ผลและวิจารณ์การทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u>

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกรดูรอค ก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ ระดับ 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

1. <u>ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ</u>

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 213.15×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่หลังปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) โดยค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำเชื้อหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55, 47.22, 34.44 และ 25 ($\times10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้นของอสุจิต่ำสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับน้ำเชื้อหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.001$) นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 6 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.001$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.001$) การลดลงของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน เนื่องจากอสุจิต้องเจาะผ่านความเข้มข้นของสารละลาย ซึ่งมีความหนืดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย ทำให้พบอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดลดลง สอดคล้องกับรายงานต่างๆที่พบว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อ คน (Flaherty *et al.,* 1997), โค (White *et al.,* 1984), กระต่าย (Farrell *et al.,* 1993) และในสุกร (Estienne *et al.,* 1988;1989) หลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน จะมีผลให้ความเข้มข้นของอสุจิลดลง

2. <u>เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า</u>

ผลการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินในทุกระดับความเข้มข้น ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า พบว่ามีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.44 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังจากนำน้ำเชื้อมาปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6 และ8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเท่ากับ 73.88, 76.11 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่าน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ6 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าระหว่างน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) ดังตารางที่ 2

การปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน สามารถแยกกลุ่มอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวดีออกจากกลุ่มอสุจิที่เคลื่อนไหวช้า หรือไม่เคลื่อนไหว เป็นการคัดแยกอสุจิโดยอาศัยการเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงทำให้อสุจิหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงมากกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลาย เนื่องจากอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวดีจะสามารถเจาะผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินได้ดีกว่า และเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่าอสุจิกลุ่มอื่นๆ (Estienne *et al.,*1988) อีกทั้งการนำน้ำเชื้อมาปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินจะช่วยขจัดน้ำกามออกจากอสุจิ (Glaub *et al.,* 1976) โดยน้ำกามมีผลลดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (Jeng *et al.,* 1993) จึงพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินสูงขึ้น จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้น(Dixon *et al.,*1980; Estienne *et al.,*1988;1989; Wall *et al.,*1984; White *et al.,* 1984) แต่มีบางการทดลอง พบว่าการเคลื่อนไหวของอสุจิที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิน้อยกว่า หรือไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลาย (Bredderman and Foote, 1971; Harrison *et al.,* 1978) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินในทุกๆกลุ่มความเข้มข้นจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) สอดคล้องกับ

รายงานการทดลองในน้ำเชื้อคน(Chen *et al.,* 1997;Flaherty *et al.,* 1997), โค (Wall *et al.,*1984; White *et al.,* 1984), สุกร(Estienne *et al.,* 1988;1989) และกระต่าย (Farrell *et al.,* 1993; Wall *et al.,*1984) Estienne *et al.,* 1989 รายงานการประเมินลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง video micrographic ของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งหลังจากอุ่น (Thawed) แล้วปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าอสุจิจากส่วนล่างของหลอดมี ลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motile spermatozoa; MOT) และ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (high velocity; VEL) สูงกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.008$) และยังมีรายงานต่างๆว่าลักษณะของอสุจิหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน มีค่าการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรง (linearity) ความถี่ในการสั่นของหางอสุจิ (beat frequency) สูงกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายอย่างมีนัยสำคัญโดยเป็นการวัดประเมินด้วยเครื่อง computer-assisted semen analysis (CASA) (Bakst and Cecil, 1992; Pyrzak, 1994)

3. <u>การเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิ</u>

จากผลการทดลองพบว่าคะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.66, 2.33, 1.94 และ 1.55 ตามลำดับ โดยมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.05 ดังตารางที่ 2

คะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.001$) นอกจากนี้คะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 8 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 6 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.001$) และพบว่าคะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินระหว่าง 4 และ6 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.001$)

หากพิจารณาเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน น่าจะส่งเสริมให้คะแนนการเคลื่อนไหวอสุจิหมู่สูงขึ้น แต่จากผลการทดลอง พบว่าคะแนนการเคลื่อนไหวอสุจิหมู่มีค่าลดลงต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ยังไม่ผ่านการปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่สูงขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.0001$) ซึ่งสอดคล้องกับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นน้ำเชื้อ และคะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิ พบว่ามีสหสัมพันธ์ในทางบวกซึ่งกัน (ฉัตรชัย, 2538) จึงทำให้ลักษณะเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.0001$)

4. <u>เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น</u>

การทดลองครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 80.70, 81.44, 85.69 และ 89.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเทียบกับอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อที่ยังไม่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นเท่ากับ 77.07 ดังตารางที่ 2

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นมากกว่าน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) และมากกว่าน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P>0.001$) นอกจากนี้พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ 4, 6 และ8 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.001$) จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินสามารถแยกอสุจิมีชีวิต เพราะค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ทำให้พบอสุจิมีชีวิตที่ส่วนล่างของหลอดเพิ่มขึ้น การนำน้ำเชื้อมาปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินสามารถกรองตัวอสุจิที่ตาย, อสุจิไม่เคลื่อนที่, อสุจิรูปร่างผิดปกติ ที่ปนอยู่ในน้ำเชื้อออก โดยเซลล์อสุจิเหล่านี้จะมีการเคลื่อนไหวช้า หรือยังคงค้างอยู่

บนผิวหน้าของสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน (Estienne *et al.,* 1989; Glaub *et al.,* 1976) อีกทั้งสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน มีคุณสมบัติช่วยลดการเกิดขบวนการ lipid peroxidation ที่มีอันตรายต่อตัวเซลล์อสุจิ จึงทำให้อสุจิมีชีวิตมากขึ้น (Krieder *et al.,* 1985)

ตารางที่ 2 ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน

Semen Characteristics	Before BSA separation	After BSA separation				P-value
		4%	6%	8%	10%	
Concentration ($\times 10^6$/ml.)	213.15 [a]	55 [b]	47.22 [bc]	34.44 [cd]	25 [d]	P<0.001
Progressive Movement (%)	69.44 [d]	73.88 [c]	76.11 [c]	80 [b]	83.33 [a]	P<0.01
Mass Movement (0-5)	4.05 [a]	2.66 [b]	2.33 [bc]	1.94 [cd]	1.55 [d]	P<0.001
Live sperm (%)	77.07 [c]	80.7 [bc]	81.44 [bc]	85.69 [ab]	89.94 [a]	P<0.001

หมายเหตุ [a, b, c, d] : ค่าเฉลี่ย ที่มีอักษรต่างกันในแถวนอนเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. ลักษณะอสุจิที่รูปร่างผิดปกติ (Sperm abnormal)

การเกิดลักษณะอสุจิรูปร่างปกติ สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ระยะคือ 1) ความผิดปกติขั้นปฐมภูมิ (primary abnormalities) เกิดขึ้นจากความผิดปกติระหว่างกระบวนการสร้างอสุจิในอัณฑะ และระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านระบบท่อของอัณฑะ และขณะผ่านระบบท่อของอัณฑะ 2) ความผิดปกติขั้นทุติยภูมิ (secondary abnormalities) เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระบบท่อภายหลังจากอสุจิเคลื่อนผ่านท่อขอฝอย (seminiferous tubule) ในการประเมินลักษณะความผิดปกติของอสุจิ สามารถแบ่งความผิดปกติได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ head, midpiece and tails และ cytoplasmic droplet (Noakes *et al.,* 2001)

จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิรูปร่างผิดปกติโดยรวมลักษณะความผิดปกติของ head, midpiece, tails และ cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อภายหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมเท่ากับ 16.12, 14.56, 11.54 และ 7.23 ตามลำดับ โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.001) กับ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมของน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายซึ่งมีเท่ากับ 27.46 (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับรายงานในคน (Ericsson *et al.,* 1973; Dmowski *et al.,* 1979; Singer *et al.,* 1980), โค (Wall *et al.,*1984), สุกร (Estienne *et al.,* 1988;1989) และกระต่าย (Farrell *et al.,* 1993; Wall *et al.,*1984) ที่พบว่าหลังนำน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน จะมีลักษณะความผิดปกติต่างๆของอสุจิลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมของน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมลดลงต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.001$) นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมของน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.001$) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้แยกประเมินความผิดปกติของอสุจิไว้ดังนี้

ตารางที่ 3 ลักษณะอสุจิที่รูปร่างผิดปกติก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน

		sperm abnormality		
semen sample	Abnormality (%)	Head	Midpiece and Tails	cytoplasmic droplet
Before BSA separation	27.46[a]	2.90[a]	10.3[a]	14.26[a]
After BSA separation				
4%	16.12[b]	1.46[b]	6.14[b]	8.52[b]
6%	14.56[b]	0.65[b]	7.04[b]	6.87[bc]
8%	11.04[bc]	0.70[b]	5.40[b]	4.94[bc]
10%	7.23[c]	0.37[b]	4.68[b]	2.18[c]

หมายเหตุ [a, b, c, d] : ค่าเฉลี่ย ที่มีอักษรต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

5.1 <u>ลักษณะส่วนหัวผิดปกติ</u>

พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่ส่วนหัวหลังผ่านความเข้มข้นของ โบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วนหัว / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) ดังนี้ 1.46 (2.92 / 200), 0.65 (1.3 / 200), 0.70 (1.4 / 200) และ 0.37 (3.54 / 200) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) กับค่าเฉลี่ยของน้ำเชื้อก่อนบนความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติในส่วนหัวอสุจิเท่ากับ 2.90 (5.8 / 200) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของน้ำเชื้อหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าลดลงกว่าน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.001$) ดังตารางที่ 3 เมื่อแยกวิเคราะห์แยกวิเคราะห์ความผิดปกติของส่วนหัวแบบต่างๆ คือ detached head, macrohead, microhead, pyriform ซึ่งเป็นความผิดปกติขั้นปฐมภูมิ พบว่าลักษณะ detached head ของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าลดลงกว่าน้ำเชื้อก่อนผ่านความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ detached head ของน้ำเชื้อก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 1.05 (2.1 / 200), 0.65 (1.3 / 200), 0.16 (0.32 / 200), 0.32 (0.64 / 200) และ 0.21 (0.42 / 200) ตามลำดับ

ลักษณะหัวอสุจิแบบ macrohead และ microhead พบว่าหลังนำน้ำเชื้อปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติทั้ง 2 ลักษณะ มีค่าเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนผ่านความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมิน แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความผิดปกติทั้ง 2 ลักษณะภายในกลุ่มน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยความผิดปกติลักษณะ macrohead ทั้งก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน macrohead / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) มีค่าเท่ากับ 0.84 (1.68 / 200), 0.32 (0.64 / 200), 0.21 (0.42 / 200), 0.11 (0.22 / 200) และ 0.10 (0.2 / 200) ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยความผิดปกติลักษณะ microhead ทั้งก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน microhead / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว)มีค่าเท่ากับ 0.78 (1.56 / 200), 0.33 (0.66 / 200), 0.26 (0.52 / 200), 0.10 (0.2 / 200) และ 0 (0 / 200) ตามลำดับ

ลักษณะอสุจิแบบ pyriform head ของน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความผิดปกติของอสุจิแบบ pyriform head ทั้งก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน pyriform / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) มีค่าเท่ากับ 0.21(0.42 / 200), 0.21 (0.42 / 200), 0.05 (0.1 / 200), 0.05 (0.1 / 200) และ 0.04 (0.08 / 200) ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

การลดลงของลักษณะความผิดปกติที่ส่วน head ของอสุจิ ในแต่ละลักษณะหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินมีความสอดคล้องกับรายงานในน้ำเชื้อโค (White *et al.,* 1984) สุกร (Estienne *et al.,* 1988; 1989) หลังนำน้ำเชื้อมาปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่ามีลักษณะความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหัวลดลง (ตารางที่ 3) การลดลงของลักษณะความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหัว เนื่องจากอสุจิที่ส่วนหัวผิดปกติส่วนใหญ่ ยังคงค้างอยู่ที่ผิวหน้าความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน (White *et al.,* 1984) ดังนั้นจึงพบลักษณะความผิดปกติที่ส่วนหัวของอสุจิลดลงหลังผ่านความเข้มข้นของโบวาซีรั่มอัลบูมิน และการเพิ่มความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินทำให้มีประสิทธิภาพการคัดเลือกอสุจิได้ดีขึ้น (Estienne *et al.,* 1989)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของอสุจิที่มีส่วนหัวผิดปกติในลักษณะต่างๆ ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินในระดับต่างๆ

Abnormal head	Before BSA separation	After BSA separation				P-value
		4%	6%	8%	10%	
detached head (%)	1.05 [a]	0.65 [b]	0.16 [b]	0.32 [b]	0.21 [b]	P<0.01
macrohead (%)	0.84 [a]	0.32 [b]	0.21 [b]	0.11 [b]	0.10 [b]	P<0.01
microhead (%)	0.78 [a]	0.33 [b]	0.26 [b]	0.10 [b]	0 [b]	P<0.01
pyriform (%)	0.21	0.21	0.05	0.05	0.04	P>0.05

หมายเหตุ [a, b, c, d] : ค่าเฉลี่ย ที่มีอักษรต่างกันในแถวนอนเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.2 <u>ลักษณะความผิดปกติ Midpiece และ Tails</u>

ลักษณะความผิดปกติที่ส่วน Midpiece และ Tails ของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยความผิดปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของส่วน Midpiece และ Tails (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน Midpiece และ Tails / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) ดังนี้ เท่ากับ 10.30 (20.6 / 200), 6.14 (12.28 / 200), 7.04 (14.08 / 200), 5.40 (10.8 / 200) และ 4.68 (9.36 / 200) ตามลำดับดังตารางที่ 3 เมื่อแยกพิจารณา 2 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะความผิดปกติที่ Midpiece ได้แก่ double tail, off-center tail, swollen tail และ lasso tail และ 2) ลักษณะความผิดปกติที่ Tails ได้แก่ ball tail, coiled tail และ step tail โดยพบว่าลักษณะความผิดปกติที่ Midpiece คือ double tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยความผิดปกติแตกต่างกันไม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) โดยค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ double tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน double tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 0.20 (0.04 / 200), 0 (0 / 200), 0 (0 / 200), 0 (0 / 200) และ 0.05 (0.1 / 200) ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ lasso tail และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ swollen tail ของน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทั้ง 2 ลักษณะแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ lasso tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน lasso tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 0.27 (0.54 / 200), 0.56 (1.12 / 200), 0.21 (0.42 / 200), 0.05 (0.1 / 200) และ 0.05 (0.1 / 200) ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ swollen tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน swollen tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 0.47 (0.94 / 200), 0.6 (1.2 / 200), 0.28 (0.56 / 200), 0.11 (0.22 / 200) และ 0.11 (0.22 / 200) ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ off-center tail พบว่าน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าลดลงกว่าน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0001$) โดยมีค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ off-center tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติส่วน off-center tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 2.10 (4.2 / 200), 0.44 (0.88 / 200), 0.1 (0.2 / 200), 0 (0 / 200) และ 0 (0 / 200) ตามลำดับ ดังตารางที่ 5

ส่วนค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติที่ Tails คือ ball tail, coiled tail และ step tail ของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่ามีแนวโน้มค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่ส่วนหางของทั้ง 3 ลักษณะลดลง แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน ($P>0.05$) ดังตารางที่ 5 โดยค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ ball tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติแบบ ball tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 2.52 (5.04 / 200), 2.13 (4.26 / 200), 1.5 (3 / 200), 1.49 (2.98 / 200) และ 1.47 (2.94 / 200) ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ coiled tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติแบบ coiled tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 4.57 (9.14 / 200), 2.98 (4.26 / 200), 4.33 (8.66 / 200), 3.67 (7.34 / 200) และ 2.98 (4.26 / 200) ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ step tail ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่ผิดปกติแบบ step tail / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 0.109 (0.21 / 200), 0 (0 / 200), 0 (0 / 200), 0.05 (0.1 / 200) และ 0 (0 / 200) ตามลำดับ

ลักษณะความผิดปกติที่ Midpiece and Tails ของอสุจิจัดเป็นความผิดปกติขั้นปฐมภูมิ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) ภายหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ทั้งนี้ความผิดปกติของ Midpiece และ Tails มีผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง (Noakes *et al.,* 2001) ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้ การปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน สามารถแยกอสุจิที่เคลื่อนที่ออกจากอสุจิไม่เคลื่อนที่ หรือมีลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำออกไป โดยอสุจิที่มีการ

เคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่า (Ericsson *et al.,* 1973; White *et al.,* 1984; Estienne *et al.,* 1988; 1989)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของอสุจิที่มีส่วนหางผิดปกติในลักษณะต่างๆ ของน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินในระดับต่างๆ

Abnormal Tail	Before BSA separation	After BSA separation				P-value
		4%	6%	8%	10%	
double tail (%)	0.20	0	0	0	0.05	P>0.01
off-center tail (%)	2.10[a]	0.44[b]	0.10[b]	0[b]	0[b]	P<0.0001
swollen tail (%)	0.47	0.6	0.28	0.11	0.11	P>0.05
lasso tail (%)	0.27	0.56	0.21	0.05	0.05	P>0.05
ball tail (%)	2.52	2.13	1.5	1.49	1.47	P>0.05
coiled tail (%)	4.57	2.98	4.33	3.67	2.98	P>0.05
step tail (%)	0.109	0	0	0.05	0	P>0.05

หมายเหตุ [a, b, c, d] : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแถวนอนเดียวกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.3 อสุจิมีลักษณะ Cytoplasmic droplet

ลักษณะ cytoplasmic droplet หลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ cytoplasmic droplet เท่ากับ 14.26, 8.52, 6.87, 4.94 และ 2.18 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของหยดน้ำที่ส่วนหางอสุจิหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยลดลงกว่าที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ cytoplasmic droplet

หลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (P>0.001) ดังตารางที่ 3 ลักษณะความผิดปกติของ cytoplasmic droplet ถือเป็นความผิดปกติขั้นทุติยภูมิ ซึ่งสามารถแยกวิเคราะห์ได้ 3 ลักษณะคือ proximal cytoplasmic droplet, medial cytoplasmic droplet และdistal cytoplasmic droplet ดังตารางที่ 6 โดยพบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ proximal cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ proximal cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อที่ผ่านที่ความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.001) กับน้ำเชื้อก่อนผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ proximal cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อก่อนและหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่มี proximal cytoplasmic droplet / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 7.91 (15.82 / 200), 4.72 (9.44 / 200), 3.97 (7.94 / 200), 2.98 (5.96 / 200) และ 1.37 (2.74 / 200) ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ medial cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อหลังปล่อยผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.0001) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ medial cytoplasmic droplet หลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยลดลงกว่าที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.0001) แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ medial cytoplasmic droplet หลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 6 และ8 เปอร์เซ็นต์ (P>0.001) โดยมีค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ medial cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่มี medial cytoplasmic droplet / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 6.24 (12.48 / 200), 3.97 (7.94 / 200), 2.89 (5.78 / 200), 1.96 (3.92 / 200) และ 0.81 (1.62 / 200) ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของ distal cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อทั้งก่อน และหลังปล่อยผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยลักษณะความผิดปกติ distal cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนอสุจิที่มี distal

cytoplasmic droplet / จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด 200 ตัว) เท่ากับ 0.1 (0.2 / 200), 0 (0 / 200), 0 (0 / 200), 0 (0 / 200) และ 0 (0 / 200) ตามลำดับ

ลักษณะ cytoplasmic droplet ถือเป็นอสุจิที่ยังพัฒนารูปร่างที่ไม่สมบูรณ์ (immature) ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิ (spermiogenesis) ทำให้อสุจิเกิดการสูญเสียส่วนของไซโตปลาสซึม จึงเกิดลักษณะ proximal cytoplasmic droplet, medial cytoplasmic droplet และ distal cytoplasmic droplet ในระหว่างการสร้างส่วนหาง (Bearden and Fuquay, 1992) มีผลทำให้อสุจิชนิดนี้เคลื่อนที่ได้ต่ำ (Noakes *et al.,* 2001) ดังนั้นจึงพบว่าอสุจิภายหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมีลักษณะ cytoplasmic droplet ลดลง (ตารางที่ 3) โดยเฉพาะในกลุ่มของน้ำเชื้อที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่สูงขึ้น สามารถแยกอสุจิที่มีการเคลื่อนที่สูง ออกจากอสุจิที่เคลื่อนที่ต่ำ หรือไม่เคลื่อนที่ให้คงค้างอยู่ผิวหน้าของความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน (White *et al.,* 1984; Estienne *et al.,* 1988;1989; Pyrzak,1994)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของอสุจิที่มีหยดน้ำที่ส่วนหางผิดปกติในลักษณะต่างๆ ของน้ำเชื้อก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน

cytoplasmic droplet	Before BSA separation	After BSA separation				P-value
		4%	6%	8%	10%	
Proximal cytoplasmic droplet (%)	7.91^{a}	4.72^{ab}	3.97^{ab}	2.98^{b}	1.37^{b}	P<0.001
Medial cytoplasmic droplet (%)	6.24^{a}	3.97^{b}	2.89^{bc}	1.96^{bc}	0.81^{c}	P<0.001
Distal cytoplasmic droplet (%)	0.1	0	0	0	0	P>0.05

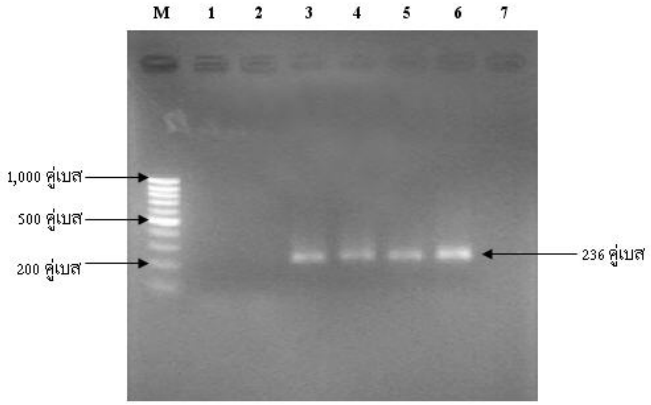
หมายเหตุ $^{a, b, c, d}$: ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแถวนอนเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2

การศึกษาสัดส่วนระหว่างอสุจิ X ต่ออสุจิ Y ก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ ระดับ 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยตรวจสอบอสุจิ Y ด้วยเทคนิค Non radioactive in *situ* hybridization พบว่า

1. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ porcine male-specific probe

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก porcine male specific primer ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 236 คู่เบส (ภาพที่ 2) และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส พบว่ามีขนาด 236 คู่เบส และมีลำดับเบสดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 แถบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส สังเคราะห์จากคู่ไพร์เมอร์ porcine male-specific primers, M = marker 100 คู่เบส., 1,2 = porcine female, 3,4,5,6 = porcine male, 7 = control (No DNA)

ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR และ Gel electrophoresis พบว่า porcine male specific primers เกิดสัญญาณต่อสุกรเพศผู้ดูรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สุกรเพศเมียดูรอดไม่เกิดสัญญาณ ดังตารางที่ 7 แสดงว่า porcine male specific primers มีความจำเพาะต่อสุกรเพศผู้ดูรอด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่ใช้เทคนิค *in situ* hybridization ในการตรวจเพศตัวอ่อน หรือชนิดของอสุจิ โดยการใช้ porcine male specific primers ในเตรียม porcine male-specific probe ด้วยเทคนิค พีซีอาร์ เพื่อติดตามโครโมโซมวายจากเนื้อเยื่อที่สนใจ (Kawarasaki *et al.,* 1995; 1996; 2000)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจแยกเพศของสุกรด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Gender sample	Examine	Detected signal[a]	Not detected signal[a]	Rate of detected signal[a](%)
porcine female (XX)	30	-	30	-
porcine male (XY)	30	30	-	100

หมายเหตุ : a = PCR product

AAGTGGTCAGCGTGTCCATA GGAAGGGATGACTATGGGAA GTATGGTTTAAGGCTGACCT
AGTTGGGGTGTCTCCACAC GCACAGGAAGTCTTTCAGGA CCACGGAATTTATATGCGAT
CAGACCTAGGATGACAGGGA GAAAAGGCTGGGGGATAACT TGGAGCATTCTCTTGGCTAA
TATATTTGATCCATTATTACC CCAGGTCGAATTGTAGCAGGA GGATACAGGAGAAA

ภาพที่ 3 การเรียงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จาก porcine male-specific primers

นำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ได้นี้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จากฐานข้อมูล http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST ดังภาพที่ 4

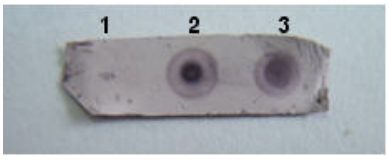
```
> gi|2106|emb|X12696.1|SSRPTMS  Pig DNA for male-specific repeat 1
Length=3832

 Score =  444 bits (224),  Expect = 6e-122
 Identities = 233/236 (98%), Gaps = 0/236 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AAGTGGTCAGCGTGTCCATAGGAAGGGATGACTATGGGAAGTATGGTTTAAGGCTGACCT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2023  AAGTGGTCAGCGTGTCCATAGGAAGGGATGACTATGGGAAGTATGGTTTAAGGCTGACCT  2082

Query  61    AGTTGGGGTGTCTCCACACAGCACAGGAAGTCTTTCAGGACCACGGAATTTATATGCGAT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2083  AGTTGGGGTGTCTCCACACAGCACAGGAAGTCTTTCAGGACCACGGAATTTATATGCGAT  2142

Query  121   CAGACCTAGGATGACAGGGAGAAAAGGCTGGGGGATAACTTGGAGCATTCTCTTGGCTAA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||| ||
Sbjct  2143  CAGACCTAGGATGACAGGGAGAAAAGGCTGGGGGATAACTTGGACGATTCTCTTGGCAAA  2202

Query  181   TATATTTGATCCATTATTACCCCAGGTCGAATTGTAGCAGGAGGATACAGGAGAAA  236
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2203  TATATTTGATCCATTATTACCCCAGGTCGAATTGTAGCAGGAGGATACAGGAGAAA  2258
```

ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์จาก porcine male-specific primers กับยีน pig DNA for male-specific repeat 1 บนตำแหน่งโครโมโซม Y ของสุกรจากข้อมูล GenBank (Mc Graw *et al* .,1988)

ผลการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส ที่สังเคราะห์จาก porcine male-specific primers (ภาพที่ 3) กับยีนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนในตำแหน่ง pig DNA for male-specific repeat 1 บนโครโมโซม Y ของสุกร ในรายงานของ Mc Graw *et al.* (1988) ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) แสดงว่า porcine male-specific primers มีความจำเพาะต่อโครโมโซม Y ในสุกรเพศผู้

2. <u>ประสิทธิภาพการตรวจสอบโครโมโซม Y</u>

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดสุกรเพศผู้ดูรอด และน้ำเชื้อเพศผู้ดูรอด เมื่อนำมาทดสอบกับ porcine male-specific probe สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น ในขณะที่ตัวอย่างเลือดสุกรเพศเมียดูรอดไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น กับ porcine male-specific probe ดังภาพที่ 5



<u>ภาพที่ 5</u> การเกิดปฏิกิริยา dot blot hybridization บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน, 1 = porcine female, 2 = porcine male, 3 = semen

<u>ตารางที่ 8</u> ผลการตรวจสอบความจำเพาะของ porcine male-specific probe ในการแยกเพศของสุกรด้วยเทคนิค dot blot hybridization

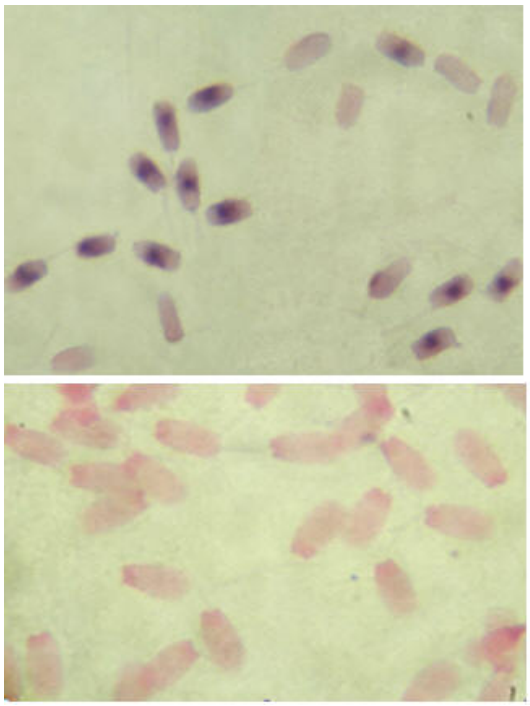
Gender sample	Examine	Detected	Not detected	Rate of detected
		Dig signal[a]	Dig signal[a]	Dig signal[a] (%)
porcine female (XX)	15	-	15	-
porcine male (XY)	15	15	-	100
semen	15	15	-	100

<u>หมายเหตุ</u> **:** a = digoxigenin

การศึกษาครั้งนี้ พบว่า porcine male-specific probe สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น เป็นสีม่วงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส กับดีเอ็นที่สกัดได้จาก เลือดสุกรเพศผู้ดูรอด (100 เปอร์เซ็นต์) และน้ำเชื้อของสุกรเพศผู้ดูรอด (100 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดสุกรเพศเมียดูรอดจะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น ดังตารางที่ 8 แสดงว่า การเตรียมดีเอ็นเอติดตามความจำเพาะของโครโมโซม Y โดยเทคนิคพีซีอาร์ มีความแม่นยำ หลังจากทำการตรวจสอบปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่นของ porcine male-specific probe กับดีเอ็นของสุกรเพศผู้ดูรอด ด้วยเทคนิค dot -blot hybridization และสามารถนำ porcine male-specific probe ไปใช้ในการตรวจเพศของสุกรดูรอดด้วยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization ต่อไป

3. <u>การตรวจสอบสัดส่วนอสุจิ Y ก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน</u>

หลังจากตรวจโดยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization ด้วย digoxigenin-labeled porcine male-specific probe พบว่าอสุจิ Y จะแสดงสีม่วงขึ้นที่ส่วนหัวอสุจิ ดังภาพที่ 6



<u>ภาพที่ 6</u> ความจำเพาะของ porcine male-specific probe หลังเกิดปฏิกิริยา hybridization (ก) ตำแหน่งจำเพาะสำหรับอสุจิสุกรที่นำโครโมโซม Y (จุดสีม่วง) และอสุจิที่นำโครโมโซม X (ไม่ปรากฏจุดสีม่วง) (ข) ตัวอย่างอสุจิ negative control (no probe)