18537

ห้องสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

T100656

เรื่อง

การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต ที่มีระดับไข่แดงต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Egg-yolk Citrate Diluter with Different Levels of Egg Yolk

โดย

นางสาวนันทวดี ศรีเพิ่ม

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2544

ปพ.
น423ก
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.100656
วัน,เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

เรื่อง

การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต ที่มีระดับไข่แดงต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Egg-yolk Citrate Diluter with Different Levels of Egg Yolk

โดย

นางสาวนันทวดี ศรีเพิ่ม

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(รศ. สมศักดิ์ บัณฑุชัย)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

วันที่ 5 เดือน เม.ย. พ.ศ 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รศ.สมศักดิ์ บัณฑุชัย ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความรู้ทั้งทางด้านข้อมูลและการทำการทดลอง รวมถึงวิธีการเขียนปัญหาพิเศษ ทำให้การจัดทำปัญหาพิเศษสำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มกระต่ายที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดีและขอขอบคุณเพื่อนที่ร่วมทำการทดลองที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทดลองทำให้การทดลองสำเร็จได้ด้วยดี

นันทวดี ศรีเพิ่ม

29 มี.ค. 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต ที่มีระดับไข่แดงต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Egg-yolk Citrate Diluter with Different Levels of Egg Yolk

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรตที่มีระดับไข่แดงต่างกัน 3 ระดับ (5% 10%และ 20%) และถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 4 วัน วางแผนการทดลองแบบ 3 x 5 Factorial Experiment in Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวสูงกว่าที่ระดับ 10% และ 5% ไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ตลอดช่วงอายุการเก็บรักษายกเว้นในวันที่ 4 การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิจะสูงที่สุดในวันที่ตรวจสอบทันทีหลังจากเจือจางน้ำเชื้อ (วันที่ 0) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวันที่ 1 2 3 และ 4 เมื่อคิดเฉลี่ยจากสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 สูตร สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิที่สูงตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา 1 วัน และสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 5% และ 10%ไข่แดงภายหลังการเก็บรักษาตั้งแต่ 1 วัน ส่วนที่ระดับ 10%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงเช่นเดียวกับที่ระดับ 20%ไข่แดง และสูงกว่าที่ระดับ 5%ไข่แดงเมื่อตรวจสอบทันทีหลังการเจือจาง ส่วนเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 สูตรมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา สารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่สูงและแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บรักษาไว้ 2 วัน แต่ภายหลังการเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 2 สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่สูงกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% และ 10%ไข่แดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญตารางผนวก	(2)
สารบาญภาพผนวก	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	8
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์	15
สรุป	16
เอกสารอ้างอิง	17
ภาคผนวก ก	19
ภาคผนวก ข	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบทางเคมีบางอย่างในน้ำเชื้อกระต่ายและโค	3
2	เปอร์เซ็นต์ NRR (49 วัน) ใน CAPROGEN ที่ระดับไข่แดงแตกต่างกัน	6
3	การเคลื่อนไหวรายตัวที่มีผลจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C และระดับไข่แดงต่างๆ	6
4	แสดงส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อกระต่ายสูตรต่างๆ	9
5	แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเนื่องจากอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อ เมื่อคิดเฉลี่ยจากทุกช่วงอายุการเก็บรักษา	13
6	แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเนื่องจากอิทธิพลของอายุการเก็บรักษา เมื่อคิดเฉลี่ยจากสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตร	13
7	แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน	14

สารบาญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		
1	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน	22
2	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน	24
2	แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต ที่มีระดับไข่แดงต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Egg-yolk Citrate Diluter with Different Levels of Egg Yolk

คำนำ

การเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต นอกจากจะเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อสำหรับฉีดให้แม่กระต่ายได้มากตัวขึ้นแล้วยังช่วยในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระต่ายไว้ที่อุณหภูมิ 5°C ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง นอกจากนี้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรตยังเป็นสารเจือจางที่เป็นที่นิยม สามารถเตรียมได้ง่ายและสะดวกในการใช้งาน ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเติมไข่แดงแล้วจะช่วยให้เม็ดไขมันของไข่แดงกระจายตัว ทำให้มองเห็นเซลล์อสุจิแต่ละเซลล์ได้ง่ายและชัดเจน ในการทดลองครั้งนี้ได้มุ่งศึกษาถึงระดับของไข่แดงที่เป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ระดับของไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรตให้ได้ระดับของไข่แดงที่มีแนวโน้มจะส่งผลดีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต ที่ระดับไข่แดงต่างๆ กัน ในการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะและองค์ประกอบของน้ำเชื้อกระต่าย

Hafez (2000) รายงานว่า น้ำเชื้อกระต่ายที่หลั่งออกมาแต่ละครั้งมีปริมาตร 0.4-0.6 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของอสุจิ 0.5-3.5x10^8 ต่อมิลลิลิตร Hafez (1970) รายงานว่าน้ำเชื้อกระต่ายมีความเข้มข้นของอสุจิ 10-1000x10^6 ต่อมิลลิลิตร ส่วน Lebas *et al.* (1986) รายงานว่าน้ำเชื้อกระต่ายมีความเข้มข้นของอสุจิ 150-500x10^6 ต่อมิลลิลิตรและการหลั่งน้ำเชื้อแต่ละครั้งมีปริมาตร 0.3-0.6 มิลลิลิตร Mathur *et al.* (1992) รายงานว่า ตัวอสุจิจะมีการเคลื่อนที่ดีที่สุดในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีความเป็นกรดด่าง (pH) 7.1-7.3 และสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นด่างจะส่งผลเสียต่อตัวอสุจิน้อยกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นกรด

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อกระต่ายประกอบด้วยฟรุคโตสและกรดซิตริค ในกระต่ายโตเต็มวัยมีค่าเฉลี่ย 292 $\pm$ 48.7 และ 178.0 $\pm$ 27.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ (Skinner, 1967 อ้างโดย สมศักดิ์และทรงศักดิ์, 2532) เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างระหว่างน้ำเชื้อกระต่ายและน้ำเชื้อโค พบว่าในน้ำเชื้อกระต่ายมีกลูโคส ฟรุคโตส ซอร์บิตอล กรดซิตริค กลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน โปแตสเซียมและโซเดียม น้อยกว่าน้ำเชื้อโค ดังแสดงในตารางที่1 และเมื่อเปรียบเทียบสารให้พลังงานระหว่างน้ำเชื้อกระต่ายกับน้ำเชื้อกระบือ พบว่าน้ำเชื้อกระบือมี ฟรุคโตส ซอร์บิตอลและกลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน (GPC) มากกว่าน้ำเชื้อกระต่าย (623.8, 10-140, 100-500 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ) (Payne, 1990)

สารเจือจางและการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระต่าย

Bearden and Fuquay (1980) ได้รายงานว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. ต้องมีสภาพเป็น isotonic ต่อน้ำเชื้อ คือมีความเข้มข้นของไอออนอิสระเหมือนกัน เช่น 2.9% โซเดียมซิเตรต ไดไฮเดรต หรือเกลือที่เหมาะสมอื่นๆ

2. สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างโดยทำให้สภาพกรดที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของอสุจิเป็นกลาง (buffering capacity) เช่น สารละลายโซเดียมซิเตรตที่เป็น isotonic

3. ต้องป้องกันอสุจิมิให้ช็อคเนื่องจากความเย็น (cold shock) ระหว่างการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิร่างกายเหลือ 5°C เช่น เลซิธิน (lecithin) และโปรตีนไขมัน (lipoprotein) จากไข่แดงหรือน้ำนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ต้องมีโภชนะสำหรับเมตาบอลิซึมที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนของอสุจิ (Salisbury and Vandemark, 1961) เช่น ไข่แดง น้ำนม และน้ำตาล (simple sugar) บางชนิด

5. สามารถควบคุมการติดเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลินและสเตรปโต-มัยซิน

6. สามารถป้องกันอสุจิไม่ให้เกิดอันตรายระหว่างการแช่แข็งหรือการละลาย เช่น กลีเซอรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์

7. สามารถยืดอายุการเก็บรักษา โดยให้มีการลดความสมบูรณ์พันธุ์น้อยที่สุด

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีบางอย่างในน้ำเชื้อกระต่ายและโค (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบทางเคมี	กระต่าย[1]	โค
กลูโคส	น้อยมาก	300[1]
โปแตสเซียม	29	140[2]
โซเดียม	82	230[2]
ฟรุคโตส	40-150	460-600[3]
ซอร์บิตอล	80	10-136[3]
กลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน	280	350[2]
กรดซิตริค	110-550	720[2]

ที่มา : [1]Skinner (1967) อ้างโดย สมศักดิ์และทรงศักดิ์ (2532); [2]Bearden and Fuquay (1992); [3]Hafez (2000)

คุณสมบัติของสารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ

สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer solution)

Bearden and Fuguay (1980) รายงานว่า สารละลายโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรตถูกค้นพบในปี 1941 เตรียมขึ้นโดยการใช้โซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต (sodium citrate dihydrate) มีสูตรทางเคมีคือ $Na_3C_6H_5O_7 .2H_2O$ จำนวน 2.9 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 มิลลิลิตรหรืออาจผสมโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต 2.12 กรัม กับ citric acid monohydrate 0.183 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 100 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์นี้ถูกนำมาใช้ในการเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทดแทนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เนื่องจากเมื่อเติมไข่แดงแล้วจะช่วยให้เม็ดไขมันของไข่แดงกระจายตัว ทำให้มองเห็นเซลล์อสุจิแต่ละเซลล์ได้ง่ายและชัดเจน ส่วนฟอสเฟตนอกจากจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดส่วนผสมทึบแสงยากต่อการมองดูเซลล์อสุจิแล้วยังยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของกรดแลคติค ทำให้มีปริมาณกรดแลคติคเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Vishwanath and Shannon,2000)

ไข่แดง (egg yolk)

Salisbury and Vandemark (1961) รายงานว่า ไข่แดงประกอบด้วยกลูโคส มีโปรตีนหลากหลายชนิด มีวิตามินทั้งที่ละลายในน้ำและไขมัน และมีค่าดัชนีความหนืดที่เหมาะสมซึ่งเป็นประโยชน์ต่อเซลล์ ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่มีออกซิเจน (aerobic conditions) กรดอะมิโน L-tyrosine L-tryptophan และ L-phenyalanine ในไข่แดงซึ่งจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากขบวนการสลายกรดอะมิโนโดยใช้ออกซิเจน(oxidative deamination) โดยถูกปล่อยออกมาจากเซลล์อสุจิที่ตายแล้วและไปทำความเสียหายต่อตัวอสุจิที่ยังมีชีวิต (Vishwanath and Shannon,2000) โดยกรดอะมิโนเหล่านี้จะถูกผ่านกระบวนการ dialysis (การแยกโมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่) ก่อนที่จะถูกใช้ไปเป็นสารตั้งต้นจึงสามารถป้องกันผลกระทบจากสารพิษที่จะเกิดขึ้นได้ การทำลายสารพิษในรูปไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจทำได้โดยการเติมเอนไซม์ลงในสารละลายไข่แดง แต่ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic conditions) จะไม่เกิดกระบวนการดังกล่าว ไข่แดงประกอบด้วย คลอเลสเตอรอล (cholesterol) และแคโรทีน (carotene) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นขบวนการสร้าง succinic, malic, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และให้สารประกอบอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมากซึ่งอาจใช้เป็นตัวรับออกซิเจน ป้องกันเอนไซม์ sulfhydryl และป้องกันการเกาะติดกันของเซลล์อสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้

Vishwanath and Shannon (2000) พบว่าไข่แดงมีส่วนประกอบของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotective agents) ได้แก่ phosphatidylcholine (lecithin), phospholipids, lipid extracts, lipoprotein fractions และ specific lipoprotein จากการศึกษาพบว่าเลซิธีนมีความสามารถในการป้องกันเซลล์อสุจิจากการช็อคเนื่องจากความเย็นและการแช่แข็ง แต่ก็มีผลเสียคือเลซิธีนไม่ละลายน้ำ

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics)

Salisbury and Vandemark (1961) รายงานการใช้ยาปฏิชีวนะในสารเจือจางน้ำเชื้อว่าการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ใช่เพื่อปรับปรุงความสมบูรณ์พันธุ์และจำนวนอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อโค แต่การเติมเพนนิซิลลินทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง จากการทดลองในโค 5 ตัวที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำโดยให้เพนนิซิลลิน 1000 หน่วยต่อมิลลิลิตรในสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิเตรต พบว่าอัตราการตั้งท้องของโค 3 ตัวเพิ่มขึ้น ในการศึกษาโดยใช้เพนนิซิลลิน 1000 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซัลฟานิลาไมด์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเพนนิซิลลินกับซัลฟานิลาไมด์ พบว่าอัตราการตั้งท้องเท่ากับ 67.2 74.4 และ 74.3 % ตามลำดับ และพบว่าเมื่อใช้เพนนิซิลลิน 1000 หน่วยต่อมิลลิลิตรและสเตรปโตมัยซิน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต สามารถเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ได้ ส่วนสเตรปโตมัยซินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio fetus* ซึ่งเพนนิซิลลินและซัลฟานิลาไมด์ไม่สามารถทำได้ อย่างไรก็ตามสามารถใช้ทั้งสเตรปโตมัยซินและเพนนิซิลลินเพื่อยับยั้งการติดเชื้อในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ Sorensen (1979) พบว่า การใช้ยาปฏิชีวนะในสารเจือจางน้ำเชื้อมีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ 1. เพื่อทำลายเชื้อโรคในน้ำเชื้อ 2. เพื่อลดอัตราเมตาบอลิซึมของตัวอสุจิลง

สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต

Salisbury *et al.* (1978) ทำการศึกษาน้ำเชื้อโคโดยใช้โซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต 3.6% หรือ 3.92% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังกล่าวมีสภาพเป็น hypertonic (มีความเข้มข้นมากกว่าของเหลวภายในเซลล์อสุจิ) แต่เมื่อใช้ไข่แดงที่ระดับ 50%แล้วพบว่าไม่มีปัญหาเกี่ยวกับความดันออสโมซิส ต่อมาจึงได้มีการแนะนำให้ใช้โซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต 2.9% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และลดปริมาณไข่แดงลงจาก 50% เหลือเพียง 20-25% ซึ่งเป็นสัดส่วนเดียวกันกับเมื่อใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็งและอาจเติมกลูโคสหรือฟรุคโตสในบางครั้งได้ Salisbury and Vandemark (1961) รายงานว่า เมื่อลดปริมาณซิเตรตลงหรือเพิ่มปริมาณไข่แดงให้มากขึ้นจะส่งผลต่อแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อทำให้เกิดสภาวะ hyperosmotic (มีความเข้มข้นมากกว่าของเหลวภายในเซลล์อสุจิ) ดังนั้นเมื่อใช้โซเดียมซิเตรตซึ่งมีสภาพเป็น isotonic (มีความเข้มข้นเท่ากับของเหลวภายในเซลล์อสุจิ) พบว่าระดับไข่แดงที่เหมาะสมอยู่ที่ 12.5 ถึง 20.0% ซึ่งสามารถป้องกันการช็อคของอสุจิเนื่องจากความเย็น และที่ระดับ 20.0%เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของตัวอสุจิที่อุณหภูมิ 5°C ปริมาณไข่แดงที่ระดับ 20%ในสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรตฟรุคโตส สามารถลดแนวโน้มการเกาะติดกันของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C ส่วนการเติมไข่แดงลงในสารเจือจางน้ำเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ ร่างกายไม่เป็นผลดีต่อเซลล์อสุจิเนื่องจากการกระตุ้นกิจกรรมของเซลล์อสุจิที่อุณหภูมินี้จะเร่งให้เซลล์อสุจิตายเร็วขึ้น

Vishwanath and Shannon (2000) ทำการศึกษาน้ำเชื้อโคที่อุณหภูมิห้องโดยการลดระดับไข่แดงลงจาก 20% ถึง 5% ผลปรากฏว่า การลดปริมาณไข่แดงลงไม่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์แต่มีผลต่อบางระดับดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ NRR (49 วัน) ใน CAPROGEN ที่ระดับไข่แดงแตกต่างกัน

การทดลอง	ไข่แดง (%)			
	20	5	2	1
1	66.5 ± 0.4	67.6 ± 0.4		
2		67.4 ± 0.3	67.9 ± 0.3	
3		67.6 ± 0.7	67.4 ± 0.7	66.1 ± 0.7

ที่มา : Vishwanath และ Shannon (2000)

Pampapathi *et al.* (1997) ทำการศึกษาน้ำเชื้อกระบือพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสูตร ไข่แดง-ซิเตรต กลีเซอรอล (EYCG) ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวที่ยอมรับได้เพียงแค่ 48 ชั่วโมงเท่านั้น โดยที่ 48 ชั่วโมงการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิที่ระดับไข่แดง 5% มีค่าสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ดังตารางที่ 3 การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิที่ระดับไข่แดง 10% และ 20% ลดลงอย่างรวดเร็วกว่าที่ระดับไข่แดง 5% นั่นคือไข่แดงที่ระดับ 5% ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวดีกว่าระดับ 10% และ 20%

ตารางที่ 3 การเคลื่อนไหวรายตัวที่มีผลจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C และระดับไข่แดงต่างๆ ในสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต กลีเซอรอล

สูตร	ระดับไข่แดง (%)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัว			
		0 ชั่วโมง[1]	24 ชั่วโมง[1]	48 ชั่วโมง[1]	72 ชั่วโมง[1]
EYCG	5	73.75±0.42[a]	57.30±1.14[a]	39.17±1.50[a]	23.19±1.51[a]
	10	73.61±0.43[a]	54.93±1.22[ab]	36.04±1.50[a]	20.14±1.43[b]
	20	73.47±0.42[a]	52.43±1.22[b]	32.60±1.64[c]	17.64±1.30[c]

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pampapathi *et al.* (1997)

Walton (1957) อ้างโดย Kishk (2000) รายงานว่า กลีเซอรอลทำให้เซลล์อสุจิไม่เกิดการช็อคเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C ซึ่งเซลล์อสุจิของกระต่ายจะมีความไวต่อความเย็นและอาจตายได้เมื่อถูกแช่เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็ง Kishk (2000) แนะนำว่าเนื่องจากเซลล์อสุจิของกระต่ายมีความไวมากต่อการเก็บรักษาด้วยการแช่เย็น ดังนั้นสารเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำเชื้อที่ใช้ต้องมีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant agent) เช่น กลีเซอรอล แต่จะต้องใช้ที่ความเข้มข้นต่ำซึ่งระดับที่แนะนำคือ 1%กลีเซอรอลเมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสไข่แดง Satish *et al.* (1993) พบว่าในสภาพแช่แข็งสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบแต่ขาดไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวหลังจากละลายแล้วดีกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงแต่ขาดกลีเซอรอล ซึ่งบ่งชี้ว่ากลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) ที่ดีกว่าไข่แดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พ่อกระต่ายโตเต็มวัยและให้คุณภาพน้ำเชื้อดีจำนวน 5 ตัว

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ ได้แก่ ช่องคลอดเทียม สารหล่อลื่น(lubricant) ที่อัดอากาศ หลอดเก็บน้ำเชื้อ

3. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบน้ำเชื้อ เจือจางน้ำเชื้อและเก็บรักษาน้ำเชื้อ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้เย็นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ขวดเก็บน้ำเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์ น้ำเกลือ0.9% ปิเปต สไลด์ Hemocytometer สีย้อม nigrosin-eosin solution

วิธีการ

1. **แผนการทดลอง**

ใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 5 Factorial Experiment in Completely Randomized Design สิ่งทดลองประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต และปัจจัย B เป็นอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยที่

ปัจจัย A : a_1 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% ไข่แดง

a_2 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 10% ไข่แดง

a_3 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20% ไข่แดง

ปัจจัย B : b_1 คือ น้ำเชื้อภายหลังการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแล้วนำมาตรวจคุณภาพทันที หรือมีอายุการเก็บรักษา 0 วัน

b_2 คือ อายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 1 วัน

b_3 คือ อายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 2 วัน

b_4 คือ อายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 3 วัน

b_5 คือ อายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 4 วัน

การทดลองครั้งนี้มี 15 combination แต่ละ combination มี 5 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทดลอง

2.1 ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อกระต่าย โดยน้ำเชื้อที่ได้จากพ่อกระต่ายทั้ง 5 ตัวจะนำมารวมกันแล้วนำมาวัดปริมาตรน้ำเชื้อที่ได้ ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการตรวจหาการเคลื่อนที่เป็นหมู่ การเคลื่อนที่รายตัว ความเข้มข้นอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิต จากนั้นจึงแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน เติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% 10%และ 20% ไข่แดงลงไป แล้วแบ่งน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วแต่ละสูตรออกเป็น 15 ส่วน (ตัวอย่าง)

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อกระต่ายสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	1[1]	2[2]	3[3]
บัฟเฟอร์ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)			
โซเดียมซิเตรต ไดไฮเดรต (Sodium citrate dihydrate)	2.9	2.9	2.9
เพนนิซิลิน (Penicillin) (หน่วยสากลต่อ 100 มิลลิลิตร)	100,000	100,000	100,000
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	0.1	0.1	0.1
ไข่แดง (Egg yolk), (%โดยปริมาตร)	5	10	20
บัฟเฟอร์ (%โดยปริมาตร)	95	90	80

[1] หมายถึง สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% ไข่แดง

[2] หมายถึง สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ10% ไข่แดง

[3] หมายถึง สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20% ไข่แดง

2.2 นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรและแบ่งออกเป็นส่วนๆ ตามข้อ 2.1 มาตรวจหาการเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตทันที (อายุการเก็บรักษา 0 วัน) เสร็จแล้วจึงนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วส่วนที่เหลือไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C เพื่อรอการตรวจหาการเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ในวันที่ 1 2 3 และ 4 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การบันทึกข้อมูล

3.1 บันทึกการเคลื่อนที่รายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ก่อนเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตร

3.2 บันทึกการเคลื่อนที่รายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ภายหลังการเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทันทีและอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อในวันที่ 1 2 3 และ 4

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมุลการเคลื่อนที่รายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of variance ด้วยโปรแกรม SAS และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ สิทธิชัย (2542)

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการผสมเทียม ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

6. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่ วันที่ 18 ตุลาคม 2544 ถึงวันที่ 22 ตุลาคม 2544 รวมระยะเวลาทำการทดลอง 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

อิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต (ตารางที่ 5) ผลปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงที่สุด รองลงมาคือที่ระดับ 10% และ 5% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเท่ากับ 36.4 23.2 และ 16.0 ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 สูตร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเท่ากับ 83.04 82.64 และ 82.88 เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20% 10% และ 5%ไข่แดง ตามลำดับ

อิทธิพลของอายุการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอายุการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต (ตารางที่ 6) ผลปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิหลังจากทำการเก็บรักษาไว้ 0 1 2 3 และ 4 วัน เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ยกเว้นเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตหลังจากทำการเก็บรักษาไว้ในวันที่ 0 และ 1 ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเท่ากับ 76.00 37.33 8.33 4.33 และ 0.0 และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเท่ากับ 86.73 86.00 83.33 80.66 และ 77.53 ตามลำดับ

อิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อและอายุการเก็บรักษาที่มีต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อและอายุการเก็บรักษา (ตารางที่ 7) ซึ่งเป็นการแสดงผลรวมของสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตรและอายุการเก็บรักษาทุกช่วง ผลปรากฏว่าในวันที่ทำการตรวจสอบทันทีหลังจากเจือจางน้ำเชื้อแล้ว (วันที่ 0) สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 10%และ 20%ไข่แดงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะแตกต่างกับที่ระดับ 5%ไข่แดง ส่วนในวันที่ 1 สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับไข่แดงทั้ง 3 ระดับมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่ระดับ 20%ไข่แดงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงที่สุด รองลงมาคือที่ระดับ 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

และ 5% ไข่แดงตามลำดับ สำหรับวันที่ 2 และ 3 ของการเก็บรักษาพบว่าที่ระดับ 20%ไข่แดงยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิดีกว่าที่ระดับ 10% และ 5%ไข่แดง โดยที่ระดับ 5% ไข่แดงไม่พบการเคลื่อนไหวของอสุจิเลยและที่ระดับ 10% และ 20%ไข่แดงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนในวันที่ 4 ไม่พบการเคลื่อนไหวของอสุจิเลยทั้ง 3 ระดับไข่แดง สำหรับทางด้านเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตนั้นพบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% 10% และ 20%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติตลอดอายุการเก็บรักษา แต่สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5%ไข่แดง มีแนวโน้มที่เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตจะลดลงเร็วกว่าที่ระดับ 10% และ 20%ไข่แดงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อ เมื่อคิดเฉลี่ยจากทุกช่วงอายุการเก็บรักษา

สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อ	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[1] (%)	อสุจิมีชีวิต[1] (%)
5 % ไข่แดง-ซิเตรต	16.00[c]	82.88[a]
10 % ไข่แดง-ซิเตรต	23.20[b]	82.64[a]
20 % ไข่แดง-ซิเตรต	36.40[a]	83.04[a]

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P <0.01)

ตารางที่ 6 แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของอายุการเก็บรักษา เมื่อคิดเฉลี่ยจากสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตร

อายุการเก็บรักษา (วัน)	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[1] (%)	อสุจิมีชีวิต[1] (%)
0	76.00[a]	86.73[a]
1	37.33[b]	86.00[a]
2	8.33[c]	83.33[b]
3	4.33[d]	80.66[c]
4	0.00[e]	77.53[d]

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P <0.01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

	อายุการเก็บรักษา (วัน)	สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อ[1]	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[2] (%)	อสุจิมีชีวิต[2] (%)
1.	0	สูตร 1	68.00^{b}	87.60^{a}
2.	0	สูตร 2	80.00^{a}	86.60^{a}
3.	0	สูตร 3	80.00^{a}	86.00^{abc}
4.	1	สูตร 1	12.00^{e}	86.80^{a}
5.	1	สูตร 2	34.00^{c}	86.40^{ab}
6.	1	สูตร 3	66.00^{b}	84.80^{abc}
7.	2	สูตร 1	0.00^{f}	83.00^{abcd}
8.	2	สูตร 2	1.00^{f}	82.60^{abcde}
9.	2	สูตร 3	24.00^{d}	84.40^{abc}
10.	3	สูตร 1	0.00^{f}	79.20^{def}
11.	3	สูตร 2	1.00^{f}	81.20^{cdef}
12.	3	สูตร 3	12.00^{e}	81.60^{bcde}
13.	4	สูตร 1	0.00^{f}	77.80^{ef}
14.	4	สูตร 2	0.00^{f}	76.40^{ef}
15.	4	สูตร 3	0.00^{f}	78.40^{def}

[1]สูตร 1 2 และ 3 หมายถึง สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร 5% ไข่แดง-ซิเตรต 10% ไข่แดง-ซิเตรต และ 20% ไข่แดง-ซิเตรต ตามลำดับ

[2]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

จากผลการทดลองจะเห็นว่า สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5%ไข่แดงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิต่ำกว่าที่ระดับ 10%และ 20%ไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเจือจางแล้วนำมาตรวจสอบทันที (อายุการเก็บรักษา 0 วัน) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่ระดับ 5%ไข่แดงมีแรงดันออสโมติกไม่เหมาะสม เพราะระดับไข่แดงที่เหมาะสมกับการใช้โซเดียมซิเตรตที่ระดับ 2.9% อยู่ที่ 12.5-20.0% (Salisbury and Vandemark, 1961) หลังจากนั้นเมื่อนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 1 วัน พบว่าสารเจือจางที่ระดับ 20%ไข่แดงยังคงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวที่สูงและดีกว่าที่ระดับ 10% และ 5%ไข่แดง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่ระดับ 20%ไข่แดงยังคงมีสารให้พลังงานเพียงพอต่อการดำรงชีวิตและสารป้องกันการช็อคเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษา ส่วนที่ระดับ 10% และ 5%ไข่แดงมีการเคลื่อนไหวรายตัวที่ลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเป็นผลมาจากแหล่งพลังงานและสารป้องกันการช็อคเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษาไม่เพียงพอทั้งนี้เพราะโดยธรรมชาติแล้วน้ำเชื้อกระต่ายมีสารให้พลังงาน เช่น ฟรุคโตส ซอร์บิตอลและกลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน (GPC) ต่ำอยู่แล้วเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อโค (Skinner, 1967 อ้างโดย สมศักดิ์และทรงศักดิ์, 2532; Bearden and Fuquay, 1992; Hafez, 2000) และน้ำเชื้อกระบือ (Payne, 1990) ซึ่งน้ำเชื้อกระบือสามารถใช้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรไข่แดง-ซิเตรต กลีเซอรอลที่มีไข่แดง 5% ได้เป็นอย่างดีเพราะมีสารให้พลังงานใน seminal plasma สูง และใช้กลีเซอรอลเป็นสารช่วยป้องกันการช็อคเนื่องจากความเย็น ซึ่งผลการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 2 และ 3 วันจะมีสาเหตุเช่นเดียวกันกับเมื่อเก็บรักษาไว้ 1 วัน

อย่างไรก็ตามพบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสอดคล้องกับรายงานของ Bearden and Fuquay (1980) ที่ว่า เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตจะสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาทดลองเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตระหว่างน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% 10% และ 20% ไข่แดงโดยเก็บรักษาไว้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C ปรากฏว่า

1. สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิที่สูงตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา 1 วัน และสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 5% และ 10%ไข่แดง ภายหลังการเก็บรักษาตั้งแต่ 1 วัน ส่วนที่ระดับ 10%ไข่แดงให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงเช่นเดียวกับที่ระดับ 20%ไข่แดง และสูงกว่าที่ระดับ 5%ไข่แดงเมื่อตรวจสอบทันทีหลังการเจือจาง

2. สารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่สูงและแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บรักษาไว้ 2 วัน แต่ภายหลังการเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 2 สารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 20%ไข่แดงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่สูงกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 5% และ 10%ไข่แดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2528. การผสมเทียม. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 411 น.

สมศักดิ์ บัณฑุชัย และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์. 2532. การเคลื่อนไหวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงและไข่แดง-ซิเตรต. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 22 น.

สมศักดิ์ บัณฑุชัย. 2533. การผสมเทียม. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 295 น.

สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์. 2542. การวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 219 น.

Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1980. Applied Animal Reproduction. 3rd ed., Prentice-Hall, Inc. 352 p.

Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction. 3rd ed., Prentice-Hall, Inc. 352 p.

Hafez, E. S. E. 1970. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Lea & Febiger, USA. 375 p.

Hafez, E. S. E. 1980. Reproduction in Farm Animal. Balliere Tindall, London. 627 p.

Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animal. 7th ed., Lippincott Williams&Wilkins, USA. 509p.

Kishk, W. H. 2000. Effect of Semen Extender Components on Rabbit Sperm Motility. Tropenlandwirt,-Beiheft. 69 : 26-32.

Lebas, F., P. Coudert, R. Rouvier and H. de Rochambeau. 1986. The Rabbit : Husbandry, Health and Production. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome. 235 p.

100656

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pampapathi, J., G. Mohan, K. Satish and K. L. Sahni. 1997. Effect of Dilution Rate and Yolk Levels on Preservability of Murrah Buffalo Semen. Indian J. of Dairy Science. 50 : 352-358.

Payne, W. J. A. 1990. An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics. 4th ed. Longman Scientific& Technical, England. 881p.

Salisbury, G. W. and N. L. Vandemark. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination. W. H. Freman and Co., New York. 639 p.

Salisbury, G. W., N. L. Vandemark and J.R. Lodge. 1978. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle. 2nd ed., W. H. Freman and Co., San Francisco. 798 p.

Satish, K., K. L. Sahni and G. Mohan. 1993. Freezing of Buffalo Semen in Milk, Tris and Sodium Citrate Dilutors with Different Levels of Yolk and Glycerol in Relation to pH of Dilutors. Indian Journal of Animal Sciences. 63 : 499-504.

Vishwanath, R. and P. Shannon. 2000. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. Animal Reproduction Science 62 : 23-53.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเคลื่อนที่เป็นหมู่ (mass activity) ตามรายงานของพีรศักดิ์ (2528)

นำน้ำเชื้อมาหยดบนกระจกส่องกล้องซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C โดยไม่ปิดกระจกบางทับหยดน้ำเชื้อ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ในขนาดกำลังขยายต่ำ 50-100 เท่า แบ่งระดับคะแนนของการเคลื่อนที่เป็นหมู่ออกตามความแรงของการเคลื่อนที่เป็นกลุ่มก้อน ซึ่งตัวอย่างน้ำเชื้อที่ใช้มีระดับคะแนน 3

การเคลื่อนที่รายตัว (motility) ตามรายงานของพีรศักดิ์ (2528)

นำน้ำเชื้อมาหยดบนกระจกส่องกล้อง ปิดด้วยกระจกบาง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ในขนาดกำลังขยาย 300-400 เท่า ค่าของการเคลื่อนที่รายตัวเป็นการกะประมาณจำนวนร้อยละของตัวอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ ดังนั้นจึงนับเฉพาะตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่านั้น ไม่รวมถึงตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไม่ตรงทิศทาง เคลื่อนที่ไปข้างหลัง เคลื่อนที่เป็นวงกลม เคลื่อนที่ไปด้านข้าง รวมทั้งตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่แต่ยังคงเคลื่อนไหวได้หรือตัวอสุจิที่ไหลไปตามการไหลของของเหลวในน้ำเชื้อด้วย ซึ่งตัวอย่างน้ำเชื้อที่ใช้มีระดับคะแนน 4 คือ ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเป็นจำนวนร้อยละ 80

ความเข้มข้นอสุจิ (concentration) ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

มีหน่วยเป็นจำนวนตัวอสุจิต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร วิธีการหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้คือ การใช้เครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer/ direct cell count) ประกอบด้วยสไลด์ที่มีช่องนับ (counting chamber) 2 ช่อง แบบ Neubauer และปิเปตเจือจางน้ำเชื้อ (dilution pipette) โดยใช้หลักการทำให้ตัวอสุจิตายเสียก่อนเพื่อง่ายในการนับ แล้วเจือจางในขนาดที่แน่นอนโดยปิเปตเฉพาะที่ใช้นับเม็ดเลือด มีขั้นตอนดังนี้

1.กลับหลอดน้ำเชื้อไปมาเพื่อให้น้ำเชื้อเข้ากันดี

2.ดูดน้ำเชื้อเข้าไปในปิเปตเจือจางน้ำเชื้อถึงขีดบอก 0.5 จะได้อัตราการเจือจาง 1 ต่อ 200

3.ดูดปิเปตเจือจางน้ำเชื้อให้มีอากาศเข้ามาตรงปลายเล็กน้อยแล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด (อากาศช่วยไม่ให้น้ำเชื้อไหลออกมาระหว่างการทำความสะอาดก่อนที่จะจุ่มปิเปตลงในสารเจือจางน้ำเชื้อ)

4.ดูดสารเจือจางน้ำเชื้อให้ถึงขีดบอก 101 ด้วยปิเปตเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในข้อ 2 ทำให้ได้น้ำเชื้อที่มีอัตราการเจือจาง 1 ต่อ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.ใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มืออุดปลายทั้งสองข้างของปิเปตและเขย่าปิเปตให้เคลื่อนที่ครั้งละประมาณ 12 นิ้ว ประมาณ 100 ครั้ง หรือใช้เวลาประมาณ 3 นาที เพื่อให้น้ำเชื้อและสารเจือจางน้ำเชื้อเข้ากันดี

6.ปล่อยส่วนผสมทิ้งไป 4 ถึง 5 หยด

7.วางแผ่นกระจกบางเหนือช่องนับของสไลด์

8.หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่ขอบของแผ่นกระจกบางเพื่อให้น้ำเชื้อนั้นเข้าไปเต็มพื้นที่ใต้แผ่นกระจก การหยดน้ำเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องให้พอดีกับพื้นที่ใต้แผ่นกระจกบาง ถ้าหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมากเกินไป จะทำให้น้ำเชื้อล้นออกจากขอบของแผ่นกระจกบางทำให้การตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิเป็นไปได้ยากและไม่เที่ยงตรง

9.ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เซลล์อสุจิอยู่คงที่ แล้วจึงเริ่มตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิ

วิธีการนับจำนวนเซลล์อสุจิ ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิเรียบร้อยแล้ว ให้ใช้กล้องจุลทรรศน์และมองด้วยกำลังขยายต่ำก่อน เพื่อหาตารางบนช่องนับและตรวจสอบดูความสม่ำเสมอในการกระจายตัวของเซลล์อสุจิหลังจากนั้นจึงใช้กำลังขยายสูง เพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิภายในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่จำนวน 5 ช่อง โดยนับจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ที่อยู่ตามมุมทั้ง 4 ช่องและตรงกลางอีก 1 ช่อง โดยยึดส่วนหัวของเซลล์อสุจิเป็นหลักว่าจะนับเข้ามาอยู่ในช่องนั้นหรือไม่ ถ้าส่วนหัวของเซลล์อสุจิทับอยู่บนเส้นแบ่งด้านบนและซ้ายมือก็จะนับเข้ามาอยู่ในช่องนั้น แต่ถ้าส่วนหัวของเซลล์อสุจิทับอยู่บนเส้นแบ่งด้านล่างและขวามือจะไม่นับรวมเข้ามาในช่องนั้น

วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์อสุจิจากการใช้ Neubauer hemocytometer

ตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 5 ช่อง ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 0.1x 5/25 เท่ากับ 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และมีจำนวนเซลล์อสุจิ 53 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ = 53 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ = 53 x 50 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีอสุจิ = 53 x 50 x1000 เซลล์

เจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 200

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ = 53 x 50 x1000 x 200

$= 5.3 \times 10^8$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18537

หลังจากนั้นจึงแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆกัน แล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดง 5% 10% และ 20% ลงไป

เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ตามรายงานของพีรศักดิ์ (2528)

ตรวจหาได้โดยใช้หลักของการซึมผ่านของอีโอซิน (eosin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการซึมผ่านผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายแล้วเท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำน้ำเชื้อที่มีอุณหภูมิเท่ากับร่างกาย มาหยดลงบนแผ่นกระจกที่อุ่น แล้วผสมกับสารละลายของไนโกรซิน-อีโอซิน(nigrosin-eosin solution) ที่อุ่นเช่นกัน ทำการแผ่สารละลายให้เป็นแผ่นบางๆ โดยใช้กระจกอีกแผ่นหนึ่งโดยวิธีป้ายเป็นแผ่นบาง ทำให้แห้งในอากาศ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบว่าสีม่วงของไนโกรซินจะติดอยู่เป็นสีพื้นทำให้เห็นตัวอสุจิได้ง่ายขึ้น ส่วนสีแดงของอีโอซินจะซึมผ่านผนังของตัวอสุจิที่ตายทำให้ส่วนหัวของตัวอสุจิที่ตายมีสีแดง ส่วนตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่ในขณะที่เริ่มการทดสอบจะมีส่วนหัวใส เนื่องจากสีซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปไม่ได้ เมื่อนับจำนวนตัวอสุจิที่ติดสีแดงในตัวอสุจิที่พบทั้งหมด ร้อยตัวก็จะเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่ตาย ซึ่งสามารถคำนวณหาร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	14	71382.00	5098.71	478.00**
A	2	5352.00	2676.00	250.87**
B	4	61242.00	15310.50	1435.36**
AB	8	4788.00	598.50	56.11**
Error	60	640.00	10.66	
Total	74	72022.00		

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

(สูตร3)	(สูตร2)	(สูตร1)
36.4	23.2	16.0

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอายุการเก็บรักษาของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
76.0	37.3	8.3	4.3	0.0

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพวกของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

$T_{7,10,13,14,15}$	$T_{8,11}$	$T_{4,12}$	T_9	T_5	T_6	T_1	$T_{2,3}$
0	1	12	24	34	66	68	80

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ไม่ได้อยู่บนเส้นตรงเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$) ส่วนค่าเฉลี่ยบนเส้นตรงเดียวกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	14	927.78	66.27	9.71^{**}
A	2	2.02	1.01	0.15^{ns}
B	4	874.05	218.51	32.01^{**}
AB	8	51.70	6.46	0.95^{ns}
Error	60	409.60	6.82	
Total	74	1337.38		

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

(สูตร3)	(สูตร2)	(สูตร1)
83.0	82.8	82.6

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอายุการเก็บรักษาของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

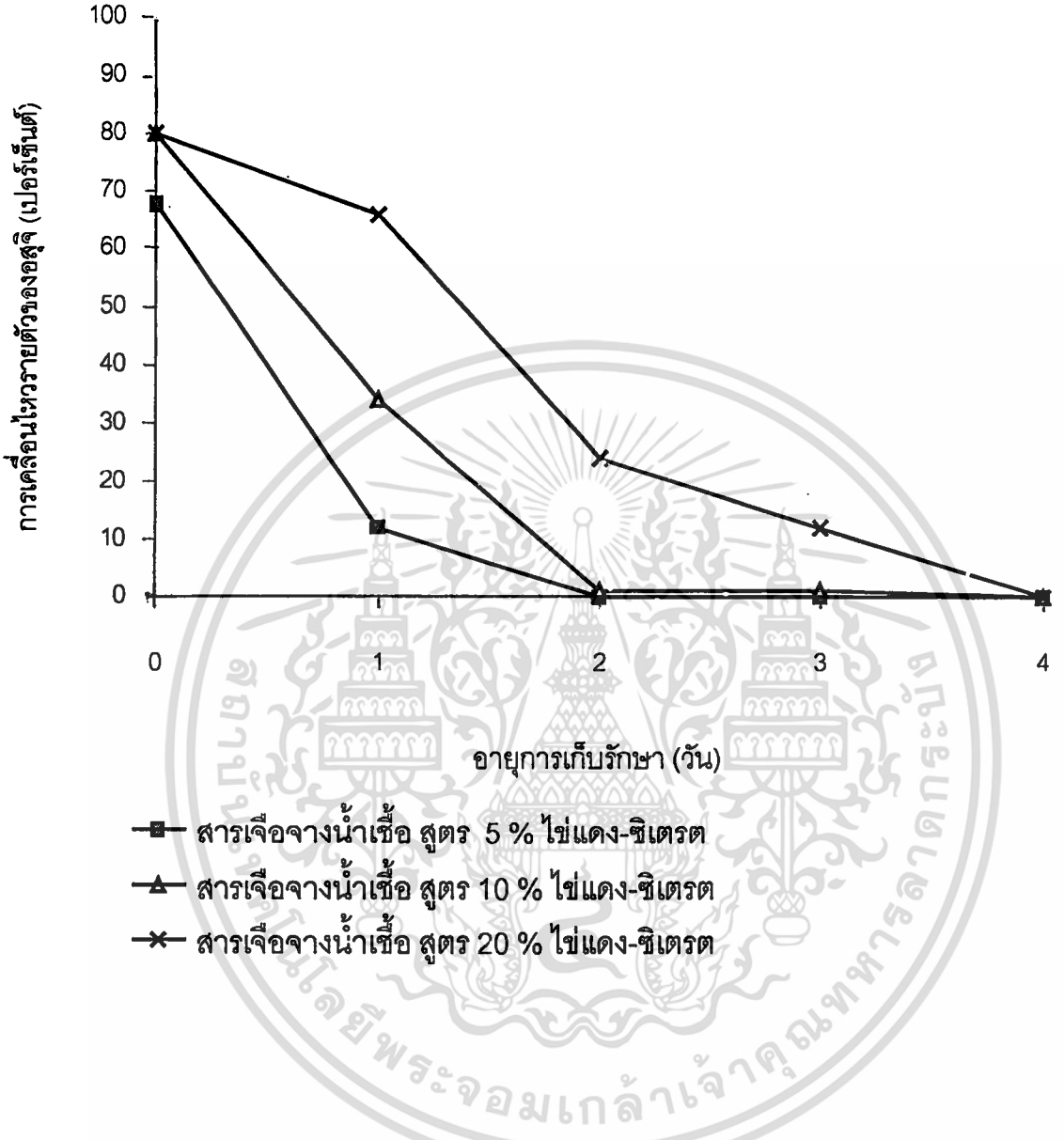
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
86.7	86.0	83.3	80.6	77.5

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพวกของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

T_{14}	T_{15}	T_{13}	T_{12}	T_{11}	T_{10}	T_8	T_9	T_7	T_4	T_1	T_5	T_2	T_6	T_3
76.4	77.8	78.4	79.2	81.2	81.6	82.6	83.0	84.4	84.8	86.0	86.4	86.6	86.8	87.6

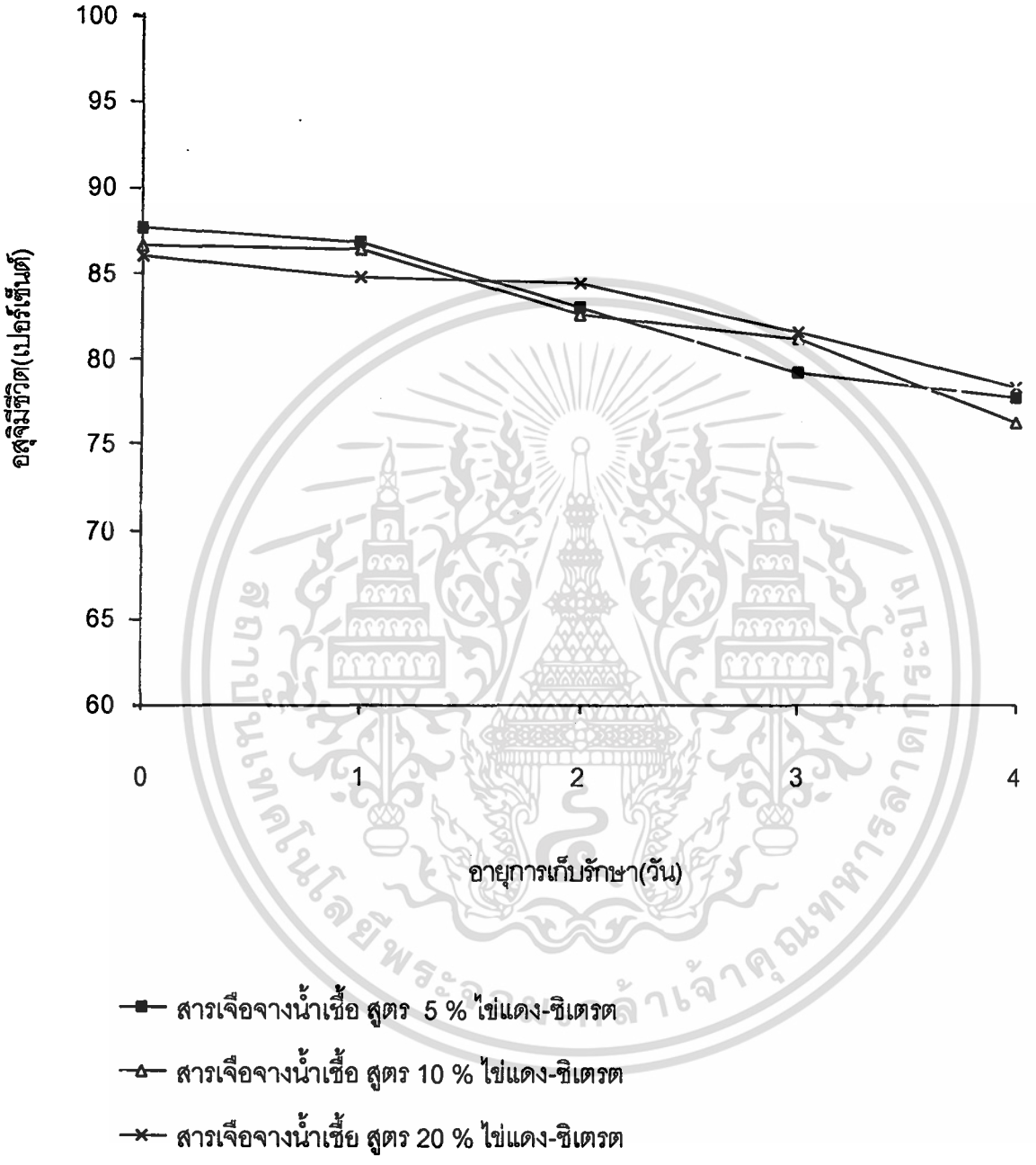
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ไม่ได้อยู่บนเส้นตรงเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$) ส่วนค่าเฉลี่ยบนเส้นตรงเดียวกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้