18515

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

T100749

เรื่อง

การเคลื่อนไหวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์ – ไข่แดง ที่มีระดับของสารไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Tris buffer – Yolk Diluter with Different Levels of DMSO

โดย

นายสิทธัตถ์ ธนาพร

ปค.
ส 7191
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 100749
21 JUN 2009

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

เรื่อง

การเคลื่อนไหวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจาง
สูตรทริสบัฟเฟอร์ – ไข่แดง ที่มีระดับของสารไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ต่างกัน
Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Tris buffer – Yolk Diluter
with Different Levels of DMSO

โดย
นาย สิทธัตถ์ ธนาพร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย
อาจารย์ที่ปรึกษา .....
(รศ.สมศักดิ์ บัณฑุชัย)

ภาควิชารับรองแล้ว
.....
(รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
วันที่ 5 เดือน เมษ. พ.ศ.2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รศ.สมศักดิ์ บัณฑุชัย ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้สละเวลากรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยให้คำปรึกษาและแนะนำ ช่วยเหลือและให้ความรู้ความเข้าใจในเรื่องการทดลอง และการเขียนปัญหาพิเศษในครั้งนี้เป็นอย่างมาก รวมทั้งให้ความเอาใจใส่และให้ความคิดเห็นทำให้การจัดทำปัญหาพิเศษสำเร็จได้โดยสมบูรณ์ และขอบคุณเพื่อนร่วมทำการทดลองปัญหาพิเศษที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้จนสำเร็จลงได้ด้วยดี

สิทธัตถ์ ธนาพร

29 มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเคลื่อนไหวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์ – ไข่แดง ที่มีระดับของสารไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Tris buffer – Yolk Diluter with Different Levels of DMSO

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์ – ไข่แดง ที่ระดับของ DMSO ต่างกัน (0 5 และ 12.5%) ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0 1 2 3 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 5°C วางแผนการทดลองแบบ 3 × 5 Factorial Experiment in Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิที่สูงที่สุดตลอดอายุการเก็บรักษา เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ระดับ 12.5 % และเปรียบเทียบกับที่ระดับ 0 และ 5 % อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งที่ระดับ 0 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลงค่อนข้างรวดเร็วกว่าสูตรอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรยังให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ในการเก็บรักษา 0 ถึง 4 วันหลังจากทำการเก็บรักษา ยกเว้นในวันที่ 1 และ 2 ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ สำหรับเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตในแต่ละวันของการเก็บรักษาของสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 5 และ 12.5 % มีค่าใกล้เคียงกันและลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 0 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญตารางผนวก	(2)
สารบาญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์	7
วิธีการ	7
ผลการทดลอง	10
วิจารณ์ผลการทดลอง	13
สรุป	14
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก (ก)	17
ภาคผนวก (ข)	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตาราง หน้า

1. แสดงส่วนประกอบทางเคมีบางอย่างในน้ำเชื้อกระต่ายและโค 1
2. แสดงส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อกระต่ายสูตรต่างๆ 8
3. แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อเมื่อคิดเฉลี่ยจากทุกช่วงอายุการเก็บรักษา 11
4. แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของอายุการเก็บรักษา เมื่อคิดเฉลี่ยจากสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตร 11
5. แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ และเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน 12

สารบาญตารางผนวก

ตารางภาคผนวก

1. แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน 21
2. แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพ หน้า

1. แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน 23
2. แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิต เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเคลื่อนไหวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายเมื่อเจือจางด้วยสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์ – ไข่แดง ที่มีระดับของสารไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ต่างกัน

Motility and Live Sperm of Rabbit Semen in Tris buffer – Yolk Diluter with Different Levels of DMSO

คำนำ

การเจือจางน้ำเชื้อมีความสำคัญในกระบวนการผสมเทียม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณน้อยและมีความเข้มข้นอยู่มาก การแบ่งนำไปใช้ทำให้เกิดความยุ่งยากจึงได้มีการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อมาช่วยในการเพิ่มปริมาตรและทำให้ความเข้มข้นของของน้ำเชื้อลดลง นอกจากนี้สารเจือจางน้ำเชื้อยังมีคุณสมบัติในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้สามารถเก็บไว้ใช้ในการผสมเทียมเป็นเวลานานขึ้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อเหลวที่ทำการเจือจางด้วยสารเจือน้ำเชื้อแล้วนั้นต้องเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ 5°C ซึ่งจำเป็นต้องมีสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการรักษาคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำเชื้อไว้จนกว่าจะนำมาใช้ สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อกระต่ายที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีอยู่ด้วยกันหลายสูตร ในการทดลองครั้งนี้ต้องการศึกษาคุณสมบัติของสารป้องกันอสุจิช็อคเนื่องจากความเย็นในระหว่างการเก็บรักษา โดยใช้สาร ไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ (DMSO) เติมลงไปในสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์–ไข่แดง ในระดับต่างๆ กัน โดยดูผลที่มีต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต หลังจากทำการเก็บรักษาไว้ในช่วงเวลาหนึ่ง เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ระดับของ DMSO ในสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์–ไข่แดง ที่มีผลดีต่อการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยสารเจือจางสูตรทริสบัฟเฟอร์–ไข่แดง ที่ระดับของ DMSO ต่างๆ กัน ในการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะและองค์ประกอบของน้ำเชื้อกระต่าย

Hafez (1980) รายงานว่า น้ำเชื้อกระต่ายที่หลั่งออกมาแต่ละครั้งมีปริมาตร 0.4-0.6 ซีซี มีความเข้มข้นของอสุจิ 0.5-3.5x10^8 /ซีซี หรือเฉลี่ยประมาณ 1.5x10^8 /ซีซี ส่วน Lebas และคณะ (1986) รายงานว่าน้ำเชื้อกระต่ายมีความเข้มข้นของอสุจิ 150-500x10^6 /ซีซี และการหลั่งน้ำเชื้อแต่ละครั้งมีปริมาตร 0.3-0.6 ซีซี ส่วนค่าความเป็นกรดด่างมีค่าเท่ากับ 6.9 หรืออยู่ในช่วง 6.59-7.5 ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าโค (Cole ,1977 อ้างโดย สมศักดิ์ และทรงศักดิ์, 2532) Mathur และคณะ (1992) รายงานว่าตัวอสุจิจะมีการเคลื่อนที่ดีที่สุดในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีความเป็นกรดด่าง (pH) 7.1-7.3 และสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นด่างจะส่งผลเสียต่อตัวอสุจิน้อยกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นกรด

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อกระต่ายประกอบด้วย ฟรุคโตส และกรดซิตริค ในกระต่ายโตเต็มวัยมีค่าเฉลี่ย 292 ± 48.7 และ 178.0 ± 27.5 มก./ 100 ซีซี ตามลำดับ (Skinner, 1967 อ้างโดย สมศักดิ์ และทรงศักดิ์, 2532) เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างระหว่างน้ำเชื้อกระต่ายและน้ำเชื้อโค พบว่าในน้ำเชื้อกระต่ายมีกลูโคส ฟรุคโตส ซอร์บิตอล กรดซิตริค กลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน ไบคาร์บอเนต โปแตสเซียม และโซเดียม น้อยกว่าน้ำเชื้อโค ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีบางอย่างในน้ำเชื้อกระต่ายและโค (มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบทางเคมี	กระต่าย	โค
กลูโคส	น้อยมาก	300
ไบคาร์บอเนต	-	16
โปแตสเซียม	29	172
โซเดียม	82	258
ฟรุคโตส	40-150	120-540
ซอร์บิตอล	80	10-136
กลีเซอรีลฟอสฟอรีลโคลีน	280	350
กรดซิตริค	110-550	720

ที่มา : Weisbroth (1974) ; Cole (1977) ; White (1958) อ้างโดยสมศักดิ์ และทรงศักดิ์ (2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเจือจางน้ำเชื้อและคุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระต่าย

ในการผสมเทียมสิ่งหนึ่งที่จำเป็นมาก คือ สารเจือจางที่จะนำมาใช้ เนื่องจากปริมาณน้ำเชื้อของพ่อกระต่ายที่หลั่งออกมาในแต่ละครั้งมีปริมาณน้อย แต่มีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิอยู่เป็นจำนวนมาก การจะแบ่งน้ำเชื้อไปใช้งานจึงทำได้ยากและไม่เพียงพอในการผสมพันธุ์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นสารเจือจางน้ำเชื้อจึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นต่อการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อที่จะนำไปฉีดให้แก่แม่พันธุ์ โดยน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วยังคงมีจำนวนอสุจิเพียงพอต่อการให้การปฏิสนธิสูงสุด นอกจากการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่หลั่งออกมาแต่ละครั้งแล้ว สารเจือจางน้ำเชื้อยังช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์อสุจิตายระหว่างการทำให้เย็นลงและยืดอายุของเซลล์อสุจิ โดยเซลล์อสุจิยังคงมีความสมบูรณ์พันธุ์อยู่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสดจะมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และเมื่อนำมาทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ จนถึงอุณหภูมิ 5° C จะทำให้เซลล์อสุจิตายเป็นจำนวนมาก (สมศักดิ์, 2533)

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีสารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดย Bearden และ Fuquay (1980) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการนำมาใช้งานดังนี้

1.ต้องมีสภาพเป็น isotonic ต่อน้ำเชื้อ (มีความเข้มข้นของไอออนอิสระเหมือนกัน) เช่น 2.9 % โซเดียมซิเตรต ไดไฮเดรต

2.สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง โดยทำให้สภาพกรดที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของอสุจิเป็นกลาง (buffering capacity) เช่น สารละลายโซเดียมซิเตรต ที่เป็น isotonic

3.ต้องป้องกันอสุจิมิให้ช็อคเนื่องจากความเย็น (cold shock) ระหว่างการลดอุณหภูมิร่างกายเหลือ 5° C เช่น เลซิธิน (lecithin) และโปรตีนไขมัน (lipoprotins) จากไข่แดงหรือน้ำนม

4.ต้องมีโภชนะสำหรับเมตาบอลิซึมของอสุจิ เช่นไข่แดง น้ำนม และน้ำตาลธรรมดา (simple sugar) บางชนิด

5.สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเชื้อได้ เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะพวกเพนนิซิลลิน และสเตรปโตมัยซิน

6.สามารถป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายระหว่างการแช่แข็งหรือการละลาย เช่น กลีเซอรอล ไดเมททิลซัลฟอกไซด์

7.สามารถยืดอายุเซลล์อสุจิขณะเก็บรักษา โดยให้มีการลดความสมบูรณ์พันธุ์น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระต่ายมีอยู่ด้วยกันหลายสูตร ซึ่งสารเจือจางน้ำเชื้อที่สามารถใช้ได้ดีสูตรหนึ่ง คือ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง โดยให้ผลดีแม้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5°C และข้อได้เปรียบของสารเจือจางสูตรนี้ เนื่องจากสามารถใช้กลีเซอรอลเติมในสารเจือจางได้ตั้งแต่เริ่มต้น (initial diluter) ทำให้ไม่ต้องมีขั้นตอนซึ่งต้องใช้เวลาในการเติมกลีเซอรอลภายหลังน้ำเชื้อถูกทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 5°C ทำให้ไม่เสียเวลาในการปรับสภาพ (equilibration time) เหมือนกับสารเจือจางน้ำเชื้ออื่นๆ (สมศักดิ์, 2533)

David (1963) อ้างโดย Salisbury และคณะ (1978) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโคที่อุณหภูมิ 5°C ในสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง พบว่าให้ผลเท่ากับหรือดีกว่าสูตรไข่แดง-ซิเตรต และ CUE Good (1966) อ้างโดย Salisbury และคณะ (1978) รายงานว่าได้เริ่มมีการพัฒนามาใช้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงในน้ำเชื้อโค ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงนี้ค่อนข้างไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของอสุจิ และเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เหมาะสม Bearden และ Fuquay (1980) รายงานว่าสูตรที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้ใช้ ทริส 3.028 กรัม / 100 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกันกับ Salisbury และคณะ (1978) สำหรับปริมาณของไข่แดงที่ใช้ในสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง Salisbury และคณะ (1978) ให้ใช้ 25 มิลลิลิตร ส่วน Bearden และ Fuquay (1980) รายงานว่าให้ใช้ 20 มิลลิลิตร

การช็อคของอสุจิเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

สิ่งที่มักเกิดขึ้นในกระบวนการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อในขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ คือ การช็อคของอสุจิเนื่องจากความเย็น การช็อคนี้อาจเกิดอาจเกิดจากการที่อุณหภูมิลดลงอย่างกระทันหัน หรืออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างกระทันหัน โดยพบว่าการช็อคนี้ทำให้มีการสูญเสียตัวอสุจิไปทั้งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง การช็อคของอสุจิเนื่องจากความเย็นเกิดขึ้นเมื่อตัวอสุจิได้พบกับความเย็นโดยทันทีทันใดในกระบวนการเก็บรักษาอสุจิโดยการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อจาก 37° C มาเป็น 5° C ทั้งนี้ความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิของน้ำเชื้อแตกต่างจากอุณหภูมิที่สัมผัสเท่าใด มีอัตราการลดอุณหภูมิลงเร็วมากน้อยหรือไม่ อัตราการเจือจางน้ำเชื้อ และระยะเวลาที่อสุจิพบกับความเย็น เมื่อตัวอสุจิเกิดการช็อคขึ้นจะทำให้มีการเคลื่อนที่ลดลง เพิ่มจำนวนอสุจิที่ผิดปกติ ลดกระบวนการหายใจและการย่อยไกลโคเจนลงอย่างชัดเจน มีการเปลี่ยนแปลงธาตุต่างๆ ในตัวอสุจิ เช่น มีการเพิ่มโซเดียมและแคลเซียมอย่างชัดเจน และมีการลดโพแทสเซียม ไลปิด ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียมลง ความผิดปกติของอสุจิที่พบได้ คือ ลักษณะหางขดของอสุจิ และมีการเล็ดลอดของไขมันและเอนไซม์เข้าสู่เซมินอลพลาสมา ตัวอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ละตัวจะมีความต้านทานต่อการช็อคเนื่องจากความเย็นแตกต่างกันออกไป ตัวอสุจิในท่อพักอสุจิมีความต้านทานมากกว่าอสุจิที่หลั่งออกมา และตัวอสุจิที่หลั่งออกมาครั้งแรกมีความต้านทานมากกว่าที่หลั่งครั้งต่อไปถ้าช่วงห่างระหว่างการรีดเก็บน้ำเชื้อนานกว่า 2 วัน การเกิดการช็อคเนื่องจากความเย็นนี้ สามารถป้องกันได้โดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ และในบางครั้งสามารถใส่สารบางชนิดลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อช่วยลดอันตรายจากการเกิดการช็อคเนื่องจากความเย็นนี้ได้ สารดังกล่าวได้แก่ หางนม เคซีน ไข่ขาว เป็นต้น การป้องกันของสารเหล่านี้เกิดจากการไปลดความสามารถในการยอมให้ซึมผ่านของเซลล์เมมเบรนนั่นเอง (พีรศักดิ์, 2528)

สารป้องกันการช็อคของอสุจิเนื่องจากความเย็นที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ กลีเซอรอล (glycerol) โดยกลีเซอรอลจะจับกับน้ำและลดจุดเยือกแข็งของสารละลาย ซึ่งจะทำให้ผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นน้อย และความเข้มข้นของสารละลายลดลง นอกจากนี้ยังมีสารตัวอื่น ได้แก่ ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ไดแซคคาไรด์ (disaccharide) เช่น แลกโตส (lactose) และไตรแซกคาไรด์ เช่น แรฟฟิโนส (reffinose) เป็นต้น โดย DMSO จะเป็นตัวปรับสมดุลของเกลือ (salt-buffering) และแทรกตัวเข้าไปในเซลล์อสุจิได้เช่นเดียวกับกลีเซอรอล ดังนั้นเพื่อให้กลีเซอรอลและ DMSO ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงควรให้มีอัตราการแช่เย็นน้ำเชื้อหลังเจือจางแล้วอย่างช้าๆ ส่วนไดแซคคาไรด์และไตรแซกคาไรด์ไม่ได้แทรกเข้าไปในเซลล์อสุจิ (สมศักดิ์, 2533)

คุณสมบัติของสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ

ทริส (Tris) มีสูตรทางเคมี คือ $C_4H_{11}NO_3$ มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ในสารเจือจางน้ำเชื้อ สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5° C และ – 196° C (Bearden และ Fuquay, 1980)

ไข่แดง มีส่วนประกอบที่เป็น เลซิธีน และโปรตีนไขมัน ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันไม่ให้อสุจิช็อคเนื่องจากความเย็น นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งของโภชนะสำหรับเมตาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ (Bearden และ Fuquay, 1980)

ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) มีสูตรทางเคมี คือ $(CH_3)_2SO$ เป็นสารละลายที่มีขั้ว ซึ่งประกอบกันระหว่างสารประกอบที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (ประกอบด้วย น้ำ แอลกอฮอล์ อะซิโตน เบนซิน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์) ด้วยเหตุผลนี้จึงใช้เป็นตัวทำละลายในปฏิกริยาอินทรีย์หลายปฏิกริยา (Baum, 1987) ดังนั้น DMSO จึงสามารถรวมตัวกันได้ดีกับน้ำ ละลายได้บ้างในสารละลายอื่นๆ และละลายได้น้อยในสารละลายที่มีขั้ว สามารถซึมผ่านผิวหนังได้อย่างรวดเร็วและสามารถนำพาโมเลกุลของสารอื่นที่ละลายไปได้ด้วย (Fox และ Whitesell, 1997) ซึ่ง DMSO ยังสามารถใช้ในการรักษาอาการเจ็บปวดต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อเคล็ด ข้ออักเสบ ปวดศีรษะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างรุนแรง และการติดเชื้อที่ผิวหนังบางชนิด (Baum, 1987) นอกจากนี้ยังเป็นสารช่วยป้องกันการช็อคของเซลล์อสุจิเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เมื่อเติมลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อ DMSO จะสามารถแทรกเข้าในเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและมีคุณสมบัติในการรักษาสมดุลของเกลือ และยังช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (พีรศักดิ์, 2528) โดยในสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง Stranzinge และคณะ (1971) อ้างโดย Battaglini (1982) แนะนำให้ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 12.5 % และ Andriea และ Courot (1976) อ้างโดย Battaglini (1982) แนะนำให้ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 5 %

กรดซิตริก (โมโนไฮเดรต) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ มีคุณสมบัติในการช่วยปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารเจือจางน้ำเชื้อ (Salisbury และคณะ, 1978)

ดี – กลูโคส โมโนไฮเดรต มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_{12}O_6$ เป็นแหล่งพลังงานต่อเซลล์อสุจิเช่นเดียวกับฟรุกโตส (Salisbury และคณะ, 1978)

ยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซิน ช่วยในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสารเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งมีส่วนผสมของไข่แดงที่เป็นอาหารที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ (Salisbury และคณะ, 1978)

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 ตู้เย็น ขวดเก็บน้ำเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์ น้ำเกลือ0.9% ปิเปต สไลด์ Hemocytometer สีย้อม nigrosin-eosin solution

วิธีการ

1. **การวางแผนการทดลอง**

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

ปัจจัย A : a_1 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 0 %

a_2 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 5 %

a_3 คือ สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 12.5 %

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 ตัว จะนำมารวมกันแล้วนำมาวัดปริมาตรน้ำเชื้อที่ได้ ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการตรวจหาการเคลื่อนไหวเป็นหมู่ การเคลื่อนไหวรายตัว ความเข้มข้นอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิต

หลังจากนั้นจึงแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆกัน (ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 20 ล้านเซลล์/ซีซี) เติมสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงที่ระดับ DMSO 0 5 และ 12.5 % ลงไป แล้วแบ่งน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วแต่ละสูตรออกเป็น 15 ส่วน (ตัวอย่าง) เพื่อใช้ตรวจสอบที่อายุเก็บรักษา 0 1 2 3 และ 4 วัน

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อกระต่ายสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	1[1]	2[2]	3[3]
ทริส อมิโน มีเทน (Tris amino methane), กรัม	3.028	3.028	3.028
ซิตริก แอซิด โมโนไฮเดรต (Citric acid monohydrate), กรัม	1.675	1.675	1.675
ดี – กลูโคส โมโนไฮเดรต (D – glucose monohydrate), กรัม	1.250	1.250	1.250
ไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ (DMSO, Dimethyl sulfoxide), ซีซี	0	6	15
น้ำกลั่น, ซีซี	100	94	85
ไข่แดง (Egg yolk), ซีซี	20	20	20
เพนนิซิลลิน (Penicillin), หน่วยสากล/100ซีซี	100,000	100,000	100,000
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin), กรัม/100ซีซี	0.1	0.1	0.1

[1]สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 0 %

[2]สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 5%

[3]สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง DMSO 12.5 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตร และแบ่งออกเป็นส่วนๆ ตามข้อ 2.1 มาตรวจหาการเคลื่อนไหวรายตัวและเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตโดยใช้การย้อมสีอีโอซินทันที (อายุเก็บรักษา 0 วัน) ตามขั้นตอนในภาคผนวก เสร็จแล้วจึงนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วส่วนที่เหลือไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C เพื่อรอการตรวจหาการเคลื่อนไหวรายตัว เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ในวันที่ 1 2 3 และ 4 ต่อไป

3. การบันทึกข้อมูล

3.1บันทึกเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต ก่อนเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตร

3.2บันทึกเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต ภายหลังการเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทันที (วันที่ 0) และอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อในวันที่ 1 2 3 และ 4

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต 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 25 ตุลาคม 2544 ถึงวันที่ 29 ตุลาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

อิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 0 5 และ 12.5 % ที่มีต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต (ตารางที่ 3) ผลปรากฏว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงที่ระดับ DMSO ต่างกัน มีผลทำให้การเคลื่อนไหวรายตัวและอสุจิมีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่ระดับ DMSO 12.5 % ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตสูงที่สุด รองลงไปได้แก่ DMSO ที่ระดับ 5 และ 0 % โดยให้ผลการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเท่ากับ 74.80 63.60 และ 54.00 % และให้อสุจิมีชีวิตเท่ากับ 93.42 92.31 และ 88.65% ตามลำดับ

อิทธิพลของอายุการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

อิทธิพลของอายุการเก็บรักษาที่มีต่อการการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต (ตารางที่ 4) ผลปรากฏว่าหลังจากทำการเก็บรักษาไว้ 0 1 2 3 และ 4 วัน เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ยกเว้นเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตหลังจากทำการเก็บรักษาไว้ในวันที่ 1 และ 2 ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเท่ากับ 84.66 76.00 68.66 52.66 และ 38.66 % และอสุจิมีชีวิตเท่ากับ 96.17 92.76 91.70 89.72 และ 86.96 % ตามลำดับ

อิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อและอายุการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อและอายุการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต (ตารางที่ 5) ผลปรากฏว่าในแต่ละช่วงอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อในวันที่ 0 ถึง 4 ของการทดลอง หลังจากทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับต่างๆ สูตรที่ใช้ DMSO ที่ระดับ 12.5 % ให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงกว่าที่ระดับ 5 และ 0 % อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วทั้ง 3 สูตร ไว้เป็นระยะเวลานานขึ้นจะส่งผลให้การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลง โดยสูตรที่ใช้ DMSO ที่ระดับ 12.5 %การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิมีแนวโน้มลดลงช้ากว่าอีก 2 สูตร ส่วนที่ระดับ 0 % มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18515

สำหรับทางด้านเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต พบว่าในแต่ละอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 สูตร ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้นสูตรที่ใช้ DMSO ที่ระดับ 5 และ12.5 % มีแนวโน้มว่าอสุจิมีชีวิตมีอัตราการลดลงอย่างช้าๆ แต่ในสูตรที่ใช้ DMSO ที่ระดับ 0 % มีแนวโน้มว่าอสุจิมีชีวิตมีอัตราการลดลงเร็วกว่า

ตารางที่ 3 แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อ เมื่อคิดเฉลี่ยจากทุกช่วงอายุการเก็บรักษา

สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อ	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[1] (%)	อสุจิมีชีวิต[1] (%)
DMSO 0%	54.00[a]	88.65[a]
DMSO 5%	63.60[b]	92.31[b]
DMSO 12.5%	74.80[c]	93.42[c]

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P< 0.01)

ตารางที่ 4 แสดงผลเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิต เนื่องจากอิทธิพลของอายุการเก็บรักษา เมื่อคิดเฉลี่ยจากสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตร

อายุการเก็บรักษา (วัน)	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[1] (%)	อสุจิมีชีวิต[1] (%)
0	84.66[a]	96.17[a]
1	76.00[b]	92.76[b]
2	68.66[c]	91.70[b]
3	52.66[d]	89.72[c]
4	38.66[e]	86.96[d]

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P< 0.01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

	อายุการเก็บรักษา (วัน)	สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อ[1]	การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ[2] (%)	อสุจิมีชีวิต[2] (%)
1.	0	สูตร 1	80.0^{c}	95.37^{ab}
2.	0	สูตร 2	84.0^{b}	96.63^{a}
3.	0	สูตร 3	90.0^{a}	96.51^{a}
4.	1	สูตร 1	72.0^{e}	89.54^{abc}
5.	1	สูตร 2	76.0^{d}	93.63^{ab}
6.	1	สูตร 3	80.0^{c}	95.13^{ab}
7.	2	สูตร 1	60.0^{g}	88.88^{abc}
8.	2	สูตร 2	68.0^{f}	92.71^{ab}
9.	2	สูตร 3	78.0^{cd}	93.51^{ab}
10.	3	สูตร 1	38.0^{i}	86.48^{bc}
11.	3	สูตร 2	52.0^{h}	90.32^{abc}
12.	3	สูตร 3	68.0^{f}	92.37^{abc}
13.	4	สูตร 1	20.0^{j}	82.99^{c}
14.	4	สูตร 2	38.0^{i}	88.28^{abc}
15.	4	สูตร 3	58.0^{g}	89.60^{abc}

[1] สูตร 1 2 และ 3 หมายถึง สารเจือจางน้ำเชื้อ สูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่มีระดับ DMSO 0 5 และ 12.5 % ตามลำดับ

[2] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P< 0.01)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงที่มีการเติม DMSO ลงไป ในระดับ 5 และ12.5 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่ใช้ DMSO เลย โดยในสูตรที่ไม่ใช้ DMSO จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลงอย่างรวดเร็วในแต่ละวัน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการช็อคของเซลล์อสุจิเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษา การเติม DMSO ที่มีคุณสมบัติช่วยป้องกันการช็อคของเซลล์อสุจิเนื่องจากความเย็นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°C ลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่ง DMSO จะสามารถแทรกเข้าในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (พีรศักดิ์, 2528) และ DMSO ยังสามารถทำละลายโมเลกุลของสารอินทรีย์อื่นและสามารถนำพาโมเลกุลของสารอื่นที่ละลายไปได้ด้วย (Marye และ James, 1997) ซึ่งพาสารต่างๆ เข้าไปยังเซลล์ของอสุจิและเป็นประโยชน์ต่อเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ DMSO ยังช่วยปรับสภาพความเป็นกรดที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ เพราะ DMSO มีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของเกลือ (salt buffering) จึงทำให้สารเจือจางมีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอสุจิ (พีรศักดิ์, 2528)

ทั้งนี้สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดงที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 12.5 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงที่สุดตลอดอายุการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สมศักดิ์ และทรงศักดิ์ (2532) ที่พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 12.5 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตค่อนข้างสูงในการเก็บรักษาจนถึง 30 ชั่วโมง

การที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น พีรศักดิ์ (2528) รายงานไว้ว่า เมื่อเซลล์อสุจิมีการแตกสลายน้ำตาลฟรักโตส เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งสารให้พลังงานถูกใช้หมดไป และยังจะทำให้เกิดกรด แลกติกขึ้นเป็นผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง มีผลไปลดการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิจนหยุด และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อีก

ส่วนเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตจะเห็นได้ว่า สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 12.5 % และ 5 % มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าที่ระดับ 0 % เช่นเดียวกัน โดย DMSO มีส่วนช่วยป้องกันเซลล์อสุจิได้ดีกว่า และจะพบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตมีค่าสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bearden และ Fuquay (1980) อ้างโดย สมศักดิ์ และทรงศักดิ์ (2532) ที่รายงานว่าเปอร์เซนต์อสุจิมีชีวิตจะสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิและอสุจิมีชีวิตระหว่างน้ำเชื้อกระต่ายที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับต่างๆ ในช่วงเวลาการเก็บรักษา 0 ถึง 4วัน ที่อุณหภูมิ 5°C ผลปรากฏว่า

1. สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 12.5 % ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิสูงที่สุดตลอดอายุการเก็บรักษา เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ DMSO 5 และ 0 %

2. สารเจือจางน้ำเชื้อในแต่ละสูตรให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตค่อนข้างสูง และแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญในการเก็บรักษาในวันที่ 1 และ 2 ของการเก็บรักษา แต่สารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทริสบัฟเฟอร์-ไข่แดง ที่ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่ระดับ 5 และ 12.5 % มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตสูงกว่าที่ระดับ 0 % ในแต่ละช่วงอายุการเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พีรศักดิ์ สุธิโยธิน. 2528. การผสมเทียม. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่. 411 น.

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

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

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

Battaglini, M. 1982. Resent Advances on Rabbit Artificial Insimination Techniques. Commercial Rabbit. December :15-18.

Baum,J.S.1987. Introduction to Organic and Biological Chemistry. 4th ed. Macmillan Publishing Company, USA. 526 p.

Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1980. 3rd ed. Applied Animal Reproduction. Englewood Cliffs Prentic - Hall, Inc., New Jersey. 352 p.

Fox, A.M., and K.J. Whitesell. 1997. Core Organic Chemistry. Jones and Bartlett Publishers, Inc,UK. 832 p.

Hafez , E.S.E. 1980. Reproduction in Farm Animals. 4th ed. School of Medicine Wayne State University, Detroit, Michican. 627 p.

Lebas, F., P. Coudert, R. Rouvier and H. ed Rochambeau. 1986. The Rabbit : Husbandry, Food and Agiculture Oganization of the United Nations Rome. 235 p.

Mathur, A. K., R. S. Srivastava, A. Joshi and P. S. Rawat. 1992. Effect of pH and Temperature on *in vitro* Preservability of Rabbit Semen. Indian Journal of Animal Sciences. 62 : 144-146.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salisbury, G.W., N.L. Van Demark and J.R. Lodge. 1978. Physiology of Reproduction and Artifitial Insimination of Cattle. 2nded. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 789 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการตรวจสอบการเคลื่อนไหวเป็นหมู่ (mass activity) ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

การประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิแบบนี้จะใช้กับน้ำเชื้อสด (fresh หรือ undiluted semen) ที่เพิ่งรีดเก็บมา วิธีการประเมินนี้สามารถตรวจดูการเคลื่อนไหวของอสุจิได้อย่างหยาบๆ เพราะไม่สามารถสังเกตเห็นเซลล์อสุจิที่ตายได้ เนื่องจากเซลล์อสุจิที่ตายจะเคลื่อนที่ไปตามการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิมีชีวิต การประเมินการคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นหมู่หรือกลุ่มมีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. อุ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาดให้ได้อุณหภูมิประมาณ 37°C ด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์หรือเตาทำความร้อน อุณหภูมิจัดว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ โดยถ้าอุณหภูมิต่ำเซลล์อสุจิจะเคลื่อนไหวช้าลง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเซลล์อสุจิจะเคลื่อนไหวเร็วผิดปกติ ดังนั้นการอุ่นสไลด์ให้มีอุณหภูมิคงที่ในขณะตรวจน้ำเชื้อ จึงอาจวางสไลด์ไว้บนที่อุ่นสไลด์บนแท่นวางแผ่นสไลด์

2. กลับหลอดน้ำเชื้อ 2 ถึง 3 ครั้ง (อย่าเขย่า) เพื่อให้น้ำเชื้อเข้ากันดี

3. หยดน้ำเชื้อ 1 หยด ลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ในข้อ 1

4. ตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิทันที โดยใช้กำลังขยายต่ำ

5.สังเกตตามขอบน้ำเชื้อที่กระจายออกไป เพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและแข็งแรงก่อนที่ขอบน้ำเชื้อจะแห้ง

6. สังเกตใกล้บริเวณตรงกลางของน้ำเชื้อ เพื่อดูคลื่น (wave) ที่เกิดจากการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ และการเคลื่อนไหวทั้งหมด

7.จากการสังเกตในข้อ 5 และ 6 นำมาประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิและให้คะแนนออกมา โดยใช้ระบบการให้คะแนนตั้งแต่ 0 - 5 ดังนี้

คะแนน 5 คือ ระดับดีเลิศ มีเซลล์อสุจิ80 % หรือมากกว่า เคลื่อนไหวอย่างแรงและรวดเร็ว

คะแนน 4 คือ ระดับดีมาก มีเซลล์อสุจิ 70 - 80% เคลื่อนไหวอย่างแรงและรวดเร็ว

คะแนน 3 คือ ระดับดี มีเซลล์อสุจิ 50 - 75% เคลื่อนไหวอย่างแรงและรวดเร็ว

คะแนน 2 คือ ระดับพอใช้ มีเซลล์อสุจิ 20 - 50 % เคลื่อนไหวอย่างแรงและรวดเร็ว

คะแนน 1 คือ ระดับเลว มีเซลล์อสุจิน้อยกว่า 30 % เคลื่อนไหวอย่างแรงและรวดเร็ว

คะแนน 0 คือ ระดับที่ไม่มีการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
100749

วิธีการตรวจสอบการเคลื่อนไหวรายตัว (motility) ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

นำน้ำเชื้อมาหยดบนสไลด์ที่อุ่นไว้ให้มีอุณหภูมิ 37°C ปิดด้วยกระจกบาง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ในขนาดกำลังขยาย 300-400 เท่า ค่าของการเคลื่อนที่รายตัวเป็นการกะประมาณจำนวนร้อยละของตัวอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ ดังนั้นจึงนับเฉพาะตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่านั้น ไม่รวมถึงตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไม่ตรงทิศทาง เคลื่อนที่ไปข้างหลัง เคลื่อนที่เป็นวงกลม เคลื่อนที่ไปด้านข้าง รวมทั้งตัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่แต่ยังคงเคลื่อนไหวได้หรือตัวอสุจิที่ไหลไปตามการไหลของของเหลวในน้ำเชื้อด้วย เนื่องจากการวัดการเคลื่อนไหวดังกล่าวเป็นการวัดจากความรู้สึกของผู้ประเมินแต่ละบุคคล ดังนั้นผู้ประเมินน้ำเชื้อส่วนใหญ่จะวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัวออกมาเป็นจำนวนเต็ม 10 เช่น 30 40 50 60 หรือ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยตรวจดูเซลล์อสุจิประมาณ 10 เซลล์ในแต่ละครั้งหรือแต่ละตำแหน่ง และเปลี่ยนไปดูตำแหน่งอื่นๆ อีก เพื่อให้ได้เซลล์อสุจิครบ 100 เซลล์ แล้วประเมินการเคลื่อนไหวของอสุจิเป็นรายตัวว่ามีอยู่กี่เปอร์เซ็นต์

วิธีการตรวจสอบความเข้มข้นอสุจิ (concentration) ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

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

1.กลับหลอดน้ำเชื้อไปมาเพื่อให้น้ำเชื้อเข้ากันดี

2.ดูดน้ำเชื้อเข้าไปในปิเปตเจือจางน้ำเชื้อถึงขีดบอก 0.5 จะได้อัตราการเจือจาง 1 ต่อ 200

3.ดูดปิเปตเจือจางน้ำเชื้อให้มีอากาศเข้ามาตรงปลายเล็กน้อย แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด (อากาศช่วยไม่ให้น้ำเชื้อไหลออกมาระหว่างการทำความสะอาดก่อนที่จะจุ่มปิเปตลงในสารเจือจางน้ำเชื้อ)

4.ดูดสารเจือจางน้ำเชื้อให้ถึงขีดบอก 101 ด้วยปิเปตเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในข้อ2 ทำให้ได้น้ำเชื้อที่มีอัตราการเจือจาง 1 ต่อ 200

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

6.ปล่อยส่วนผสมทิ้งไป 4 ถึง 5 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.วางแผ่นกระจกบางเหนือช่องนับของสไลด์

8.หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่ขอบของแผ่นกระจกบางเพื่อให้น้ำเชื้อนั้นเข้าไปเต็มพื้นที่ใต้แผ่นกระจก การหยดน้ำเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องให้พอดีกับพื้นที่ใต้แผ่นกระจกบาง ถ้าหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมากเกินไป จะทำให้น้ำเชื้อล้นออกจากขอบของแผ่นกระจกบาง ทำให้การตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิเป็นไปได้ยากและไม่เที่ยงตรง

9.ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เซลล์อสุจิอยู่คงที่ แล้วจึงเริ่มตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิ

วิธีการนับจำนวนเซลล์อสุจิ ตามรายงานของสมศักดิ์ (2533)

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

วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์อสุจิจากการใช้ Neubauer hemocytometer

น้ำเชื้อที่ตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 5 ช่อง ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 0.1x 5/25 เท่ากับ 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และมีจำนวนเซลล์อสุจิ 36 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ = 36 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ = 36 x 50 เซลล์

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีอสุจิ = 36 x 50 x1000 เซลล์

เจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 200

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ = 36 x 50 x1000 x 200

$= 3.6x\ 10^{8}$

การย้อมสีอสุจิเพื่อตรวจหาเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ตามรายงานของพีรศักดิ์ (2528)

หลักของการซึมผ่านของอีโอซิน (eosin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการซึมผ่านผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายแล้วเท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำน้ำเชื้อที่มีอุณหภูมิเท่ากับร่างกาย มาหยดลงบนแผ่นกระจกที่อุ่น แล้วผสมกับสารละลายของไนโกรซิน-อีโอซิน (nigrosin-eosin solution) ที่อุ่นเช่นกัน ทำการแผ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายให้เป็นแผ่นบางๆ โดยใช้กระจกอีกแผ่นหนึ่งโดยวิธีป้ายเป็นแผ่นบาง ทำให้แห้งในอากาศ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบว่าสีม่วงของไนโกรซินจะติดอยู่เป็นสีพื้น ทำให้เห็นตัวอสุจิได้ง่ายขึ้น ส่วนสีแดงของอีโอซินจะซึมผ่านผนังของตัวอสุจิที่ตาย ทำให้ส่วนหัวของตัวอสุจิที่ตายมีสีแดง ส่วนตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่ในขณะที่เริ่มการทดสอบจะมีส่วนหัวใส เนื่องจากสีซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปไม่ได้ เมื่อนับจำนวนตัวอสุจิที่ติดสีแดงในตัวอสุจิที่พบทั้งหมดร้อยตัวก็จะเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่ตาย ซึ่งสามารถคำนวณหาร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	14	27538.67	1967.04	92.21**
A	2	5418.67	2709.33	127.00**
B	4	20445.33	5111.33	239.59**
AB	8	1674.67	209.33	9.81**
Error	60	1280.00	21.33	
Total	74	28818.67		

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

(สูตร3)	(สูตร2)	(สูตร1)
74.80	63.60	54.00

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอายุการเก็บรักษาของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
84.66	76.00	68.66	52.66	38.66

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพวกของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ

T_3	T_2	$T_{1,6}$	T_9	T_5	T_4	$T_{8,12}$	T_7	T_{15}	T_{11}	$T_{10,14}$	T_{13}
90	84	80	78	76	72	68	60	58	52	38	20

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ไม่ได้อยู่บนเส้นตรงเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P< 0.01$) ส่วนค่าเฉลี่ยบนเส้นตรงเดียวกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตภายหลังเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	14	1069.09	76.36	35.44**
A	2	311.59	155.79	72.30**
B	4	707.79	176.94	82.12**
AB	8	49.70	6.21	2.88**
Error	60	129.29	2.15	
Total	74	1198.38		

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

(สูตร3)	(สูตร2)	(สูตร1)
93.42	92.31	88.65

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอายุการเก็บรักษาของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

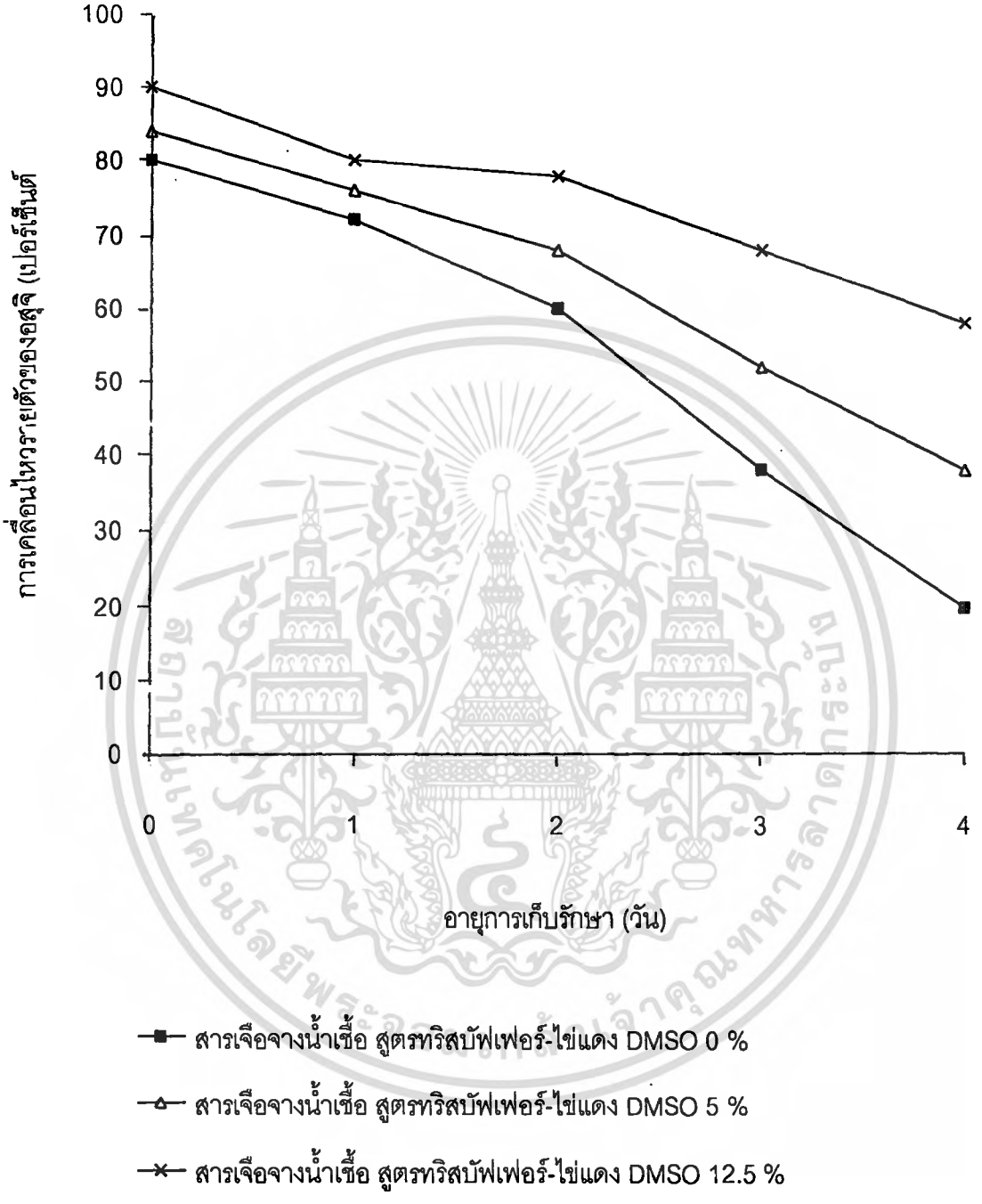
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)
96.17	92.76	91.70	89.72	86.96

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพวกของเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

T_2	T_3	T_1	T_6	T_5	T_9	T_8	T_{12}	T_{11}	T_{15}	T_4	T_7	T_{14}	T_{10}	T_{13}
96.63	96.51	95.37	95.13	93.63	93.51	92.71	92.37	90.32	89.60	89.54	88.88	88.28	86.48	82.99

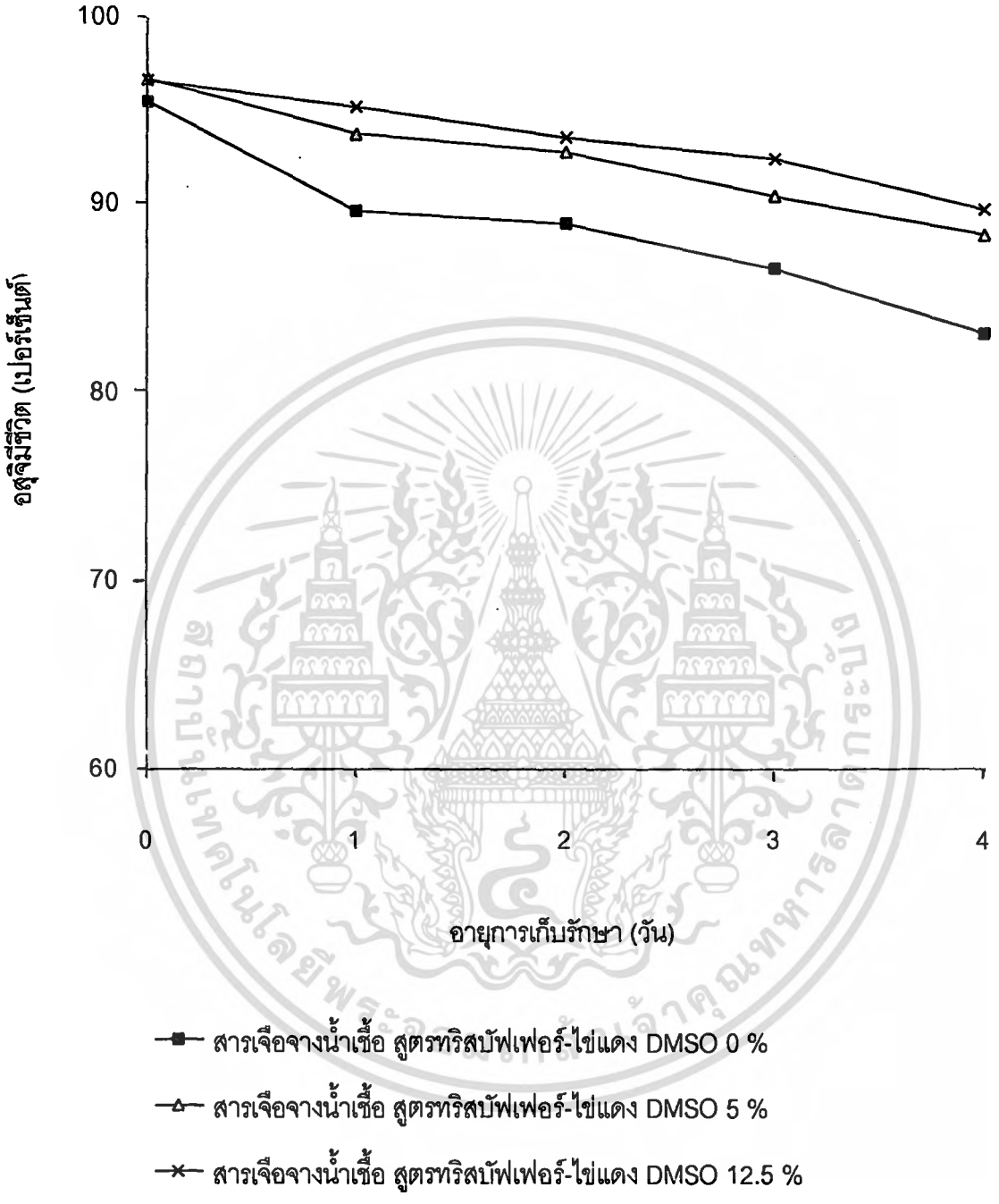
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ไม่ได้อยู่บนเส้นตรงเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$) ส่วนค่าเฉลี่ยบนเส้นตรงเดียวกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิเมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในช่วงอายุการเก็บรักษา 0-4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้