การพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็นชนิดผงพร้อมใช้

นางสาว วรัทยา ประสมทรัพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF A READY-TO-USE POWDERED EXTENDER FOR CHILLED DOG SEMEN

Miss Waratthaya Prasomsap

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment od the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็นชนิดผงพร้อมใช้
โดย	นางสาว วรัทยา ประสมทรัพย์
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุดสรร ศิริไวทยพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. เสรี กุญแจนาค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรัทยา ประสมทรัพย์ : การพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็นชนิดผงพร้อมใช้ (DEVELOPMENT OF A READY-TO-USE POWDERED EXTENDER FOR CHILLED DOG SEMEN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.น.สพ. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์, 47 หน้า.

การขยายตัวของธุรกิจฟาร์มสุนัข ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขพ่อพันธุ์มีความสำคัญ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ 1) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ไข่แดงผงแทนการใช้ไข่แดงสดเป็นส่วนประกอบ ในสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็น และ 2) พัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบผงในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขโดยการแช่เย็น การศึกษานี้ใช้สุนัขทั้งหมด 5 ตัว รีดเก็บน้ำเชื้อจากสุนัขครั้งละ 3 ตัวรวมน้ำเชื้อ แล้วแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อปรับให้มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร โดยกลุ่มที่ 1 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด กลุ่มที่ 2 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง และกลุ่มที่ 3 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด แล้วนำมาทำให้เป็นผงโดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งประเมินคุณภาพอสุจิ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต (สีย้อมไซเบอร์-โพรพิเดียม) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (สีย้อมฟิทซี พีเอ็นเอ-โพรพิเดียม) การทำงานของไมโทคอนเดรีย (สีย้อมเจซี-วัน) และการเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ (สีย้อมสนาฟ โยโปร และเอ็ทธิเดียมโฮโมไดเมอร์ ประเมินด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์) หลังการแช่เย็น ที่เวลา 3 48 96 ชั่วโมง 7 วัน และ10 วัน ทำการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง พบว่าการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสามชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ ไม่แตกต่างกันในทุกเวลาที่ทำการประเมิน อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด แต่ไม่ต่างจากสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ที่ 3 ชั่วโมง : 3.9±0.3 4.6±0.5 และ 4.2±0.4 ตามลำดับ) และ (ที่ 48 ชั่วโมง : 3.2±0.7 3.8±0.4 และ 3.7±0.5 ตามลำดับ) มีจำนวนอสุจิที่มีผนังหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (ไม่เกิดอะพ็อพโทซิส) ต่ำกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ที่ 3 ชั่วโมง : 54.3±8.4 67.5±8.3 และ 63.7±6.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ที่ 48 ชั่วโมง : 43.6±9.5 57.4±5.3 และ 52.5±10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เพราะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มผนังเซลล์มากกว่า และมีจำนวนอสุจิที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด (ที่ 48 ชั่วโมง : 65.6±3.8 และ 60.4±6.8 ตามลำดับ) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ไข่แดงผงสามารถใช้แทนไข่แดงสดเป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขได้ และการเปลี่ยนรูปสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด โดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มความสะดวกของการใช้ และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาสารเจือจางน้ำเชื้อได้อีกด้วย

ภาควิชา สูติศาสตร์-เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....วรัทยา ประสมทรัพย์.....

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5275567531 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEYWORDS : CANINE / CHILLED SEMEN / SEMEN EXTENDER / EGG YOLK POWDER

WARATTHAYA PRASOMSAP: DEVELOPMENT OF A READY-TO-USE POWDERED EXTENDER FOR CHILLED DOG. ADVISOR: ASSOC. PROF. KAYWALEE CHATDARONG, Ph.D., CO-ADVISOR : SUPPIWIWAT PONGLOWHAPAN, Ph.D., 47pp.

An increase interest of dog breeding farm business has contributed to a desire to preserve stud dog semen. The present study aimed to; 1) investigate feasibility of replacing fresh egg yolk with powder egg yolk in an extender for chilling of dog semen, and 2) develop tris egg yolk semen extender in a powder form. A total of five dogs were included. Semen were collected from three out of five dogs, pooled and allocated to; Group 1, chilled in tris fresh egg yolk extender, Group 2, chilled in tris powder egg yolk extender, and Group 3, chilled in lyophilized tris fresh egg yolk extender. The sperm in each group was adjusted to 200 million sperm/mL. Sperm qualities; motility, progressive motility, viability (Sybr-14/PI), acrosome integrity (FITC-PNA/PI), mitochondrial activity (JC-1) and apoptosis (SNARF-1/YOPRO-1/ethidium homodimer) were assessed at 3, 48 and 96 hrs, and 7 and 10 days after cooling at 4 °C. Experiments were repeated nine times. The sperm motility, viability and acrosome integrity were similar in all groups at all times of evaluation. However, the progressive motility of sperm in the tris powder egg yolk extender was lower than that in the tris fresh egg yolk extender but similar to the lyophilized tris fresh egg yolk extender (at 3 hrs: 3.9±0.3, 4.6±0.5 and 4.2±0.4, respectively) and (at 48 hrs: 3.2±0.7, 3.8±0.4 and 3.7±0.5, respectively). Moreover, the number of non-apoptotic sperm with intact membrane was lower in the tris powder egg yolk extender compared to the tris fresh egg yolk extender and lyophilized tris fresh egg yolk extender (at 3 hrs: 54.3±8.4, 67.5±8.3 and 63.7±6.5 %, respectively) (at 48 hrs: 43.6±9.5, 57.4±5.3 and 52.5±10.0 %, respectively), whereas the number of sperm with high mitochondrial membrane potential in the tris powder egg yolk extender was higher than the tris fresh egg yolk extender (at 48 hrs: 65.6±3.8 and 60.4±6.8 %, respectively). In conclusions, powder egg yolk feasibly substitutes fresh egg yolk in the tris extender for chilling of dog semen. The tris fresh egg yolk extender in a lyophilized powder form is as potential as in the liquid form to preserve dog semen for 10 days.

Department:Obstetrics Gynaecology and Reproduction Student's Signature.....
Field of Study:Theriogenology Advisor's Signature.....
Academic Year:2010 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตสนับสนุนโดยบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีทางการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องอบแห้ง ไลโอฟิไลซ์ ขอบคุณ คุณมงคล วิภาตะศิลปิน เจ้าของฟาร์มสุนัขเอ็นวาย เคนเนล สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง น.สพ.วิกรม เจตนาวณิช และน.สพ.ธีรัตต์ ธนไพศาลกิจที่ช่วยเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณ รศ.สพ.ญ.ดร.เกวลี ฉัตรดรงค์ และ อ.น.สพ.ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์ สำหรับโอกาสดีๆที่ให้ คำปรึกษาต่างๆ รวมทั้งความเอาใจใส่และความห่วงใยที่มีให้เสมอมา ขอบคุณ สพ.ญ.ปวีณา ธุวะนุช สพ.ญ.อรทัย ชัยเวชการ และนายปิยะ วงศ์ยานิน สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิคในห้องปฏิบัติการและคำแนะนำดีๆที่มีให้ ขอบคุณ สพ.ญ.อัจจิมา จันทร์แสนโรจน์ และน.สพ.กฤษณรงค์ วงศ์บ้านดู่ สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างนอกสถานที่ ขอบคุณสพ.ญ.เอมอร โอฬารรัตน์มณี สำหรับข้อแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยสูติกรรม สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดี ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนในภาควิชาสูติฯ ที่ให้มิตรภาพดีๆเช่นนี้ ตลอดจนขอขอบคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวถึงซึ่งมีส่วนช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์

สุดท้ายที่สำคัญที่สุดขอขอบคุณพ่อแม่ที่ทำให้มีวันนี้ ก้าวมาจนถึงทุกวันนี้จนประสบความสำเร็จอย่างทุกวันนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญรูปภาพ.....ฏ

บทที่

1. บทนำ.....1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3

ขอบเขตของการวิจัย.....3

ข้อตกลงเบื้องต้น.....3

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4

วิธีดำเนินการวิจัย.....4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

แนวคิดและทฤษฎี.....5

การเก็บรักษาอสุจิ.....5

สารเจือจางน้ำเชื้อ.....6

ส่วนประกอบและโครงสร้างของไข่แดง.....8

ผลของไข่แดงต่อคุณภาพของอสุจิ.....9

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง.....10

3. วิธีดำเนินการวิจัย.....11

สัตว์ทดลอง.....11

การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง.....11

การรีดเก็บน้ำเชื้อ.....11

การประเมินคุณภาพอสุจิ.....11

สารเจือจางน้ำเชื้อ.....15

การแช่เย็นน้ำเชื้อ.....17

แผนการทดลอง.....18

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....19

4. ผลการทดลอง.....20

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ.....20

ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ.....22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

อัตราการมีชีวิตของอสุจิ.....23

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ.....24

การทำงานของไมโตคอนเดรียของอสุจิ.....25

การเกิดอะพอพโทซิสของอสุจิ.....26

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....31

รายการอ้างอิง.....36

ภาคผนวก.....42

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สัดส่วนของส่วนประกอบต่างๆ ในไข่แดง (เปอร์เซ็นต์).....8

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดเอ ชนิดบี และชนิดซี.....16

ตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ 21

ตารางที่ 4 ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....22

ตารางที่ 5 อัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....23

ตารางที่ 6 ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....24

ตารางที่ 7 ระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในเยื่อหุ้มเซลล์ในระดับสูง (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ..... 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

ตารางที่ 8 อสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....27

ตารางที่ 9 อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสระยะแรก(เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....28

ตารางที่ 10 การตายในระยะแรกของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....29

ตารางที่ 11 การตายในระยะท้าย (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ.....30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงแผนการทดลอง.....18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สุนัขเป็นสัตว์เลี้ยงเป็นเพื่อนที่มีคุณค่าทางจิตใจอย่างมากในปัจจุบัน ประชาชนมักเลี้ยงสุนัขพันธุ์แท้กันมากขึ้น ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สุนัขเป็นไปอย่างกว้างขวาง การผสมพันธุ์สุนัขในปัจจุบันมีด้วยกันหลายรูปแบบ คือ การผสมพันธุ์ตามธรรมชาติและการผสมเทียม การผสมพันธุ์ตามธรรมชาติมักพบปัญหาการติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์ การติดเชื้อ ปรสิต และพยาธิทั้งภายในและภายนอกระหว่างคู่ผสม จึงทำให้การผสมเทียมเข้ามามีบทบาทเพิ่มมากขึ้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นกระบวนการเริ่มต้นที่สำคัญในการผสมเทียม และยังเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมสุนัขที่มีลักษณะดีตรงตามสายพันธุ์ โดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ การแช่เย็น และการแช่แข็ง (Linde-Forsberg, 2001) ส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยสารเจือจางน้ำเชื้อจะมีคุณสมบัติในการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง มีออสโมลาริตี้เหมาะสม เป็นแหล่งพลังงานให้อสุจิ และป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับอสุจิ ในปัจจุบันมีสารเจือจางน้ำเชื้อที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าหลายชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในสุกรและโค แต่มีค่อนข้างน้อยในสุนัข สารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็นทางการค้าที่มีใช้ในสุนัข เช่น สารเจือจางน้ำเชื้อ CLONE Chilled Semen Extender (Cryogenetic laboratories of New England Inc., Philadelphia, PA, USA) และ Canirep (Uppsala, Sweden) ซึ่งไม่มีการเปิดเผยส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ

ในทางปฏิบัติ การเก็บน้ำเชื้อสุนัขที่ฟาร์มเพาะพันธุ์สุนัขจะเป็นการหลีกเลี่ยงความเครียดจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ จึงต้องมีการใส่สารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อรักษาคุณภาพอสุจิในเบื้องต้นก่อนนำไปใช้กับแม่พันธุ์ที่อยู่ห่างไกลออกไป หรือแบ่งผสมแม่พันธุ์หลายตัว รวมทั้งอาจขนส่งโดยการแช่เย็นมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแช่แข็งต่อไป ในปัจจุบันสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดง (tris egg-yolk) (Iguer-Ouada and Verstegen, 2000; Tsuitsui et al., 2000) ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ ทริส (tris) น้ำตาล กรดซิตริก ยาปฏิชีวนะ และไข่แดง (Linde-Forseberg, 2001) โดยไข่แดงเป็นส่วนประกอบหลักในสารเจือจางน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิในสัตว์หลายชนิดมาเป็นเวลากว่า 60 ปีแล้ว (Witte et al., 2009) ไข่แดงจะช่วยป้องกันการเกิดความเสียหายจากการลดอุณหภูมิ (cold shock) จึงช่วยรักษา

คุณสมบัติในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและการทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิได้ (Salamon and Maxwell, 1995) แต่ไข่แดงที่เป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กันแพร่หลาย มักเป็นไข่แดงสดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือสารปนเปื้อนอื่นๆ ที่ส่งผลให้คุณภาพของอสุจิลดลงได้ (Gil et al., 2003) สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสดจะเก็บไว้ได้ในระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือน ภายใต้อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส แต่หากนำไข่แดงออกแล้วส่วนประกอบอื่น ๆ ของสารเจือจางน้ำเชื้ออยู่ในรูปแบบผงที่ยังไม่ละลายน้ำ จะสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง การใช้ไข่แดงผงแทนไข่แดงสดนอกจากจะลดการปนเปื้อนแล้ว ยังเป็นการลดความแตกต่างของไข่แดงสดที่มีคุณภาพหลากหลายด้วย

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการใช้ไข่แดงผงแทนการใช้ไข่แดงสดจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบพร้อมใช้ เนื่องจากไข่แดงผงผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่น ซึ่งทำลายเชื้อแบคทีเรียและสารปนเปื้อนได้บางส่วน นอกจากนี้ไข่แดงผงยังสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานและสะดวกในการขนส่งไปยังฟาร์มเพาะพันธุ์สุนัขอีกด้วย เคยมีการศึกษาในแกะโดยการใช้ไข่แดงผงเป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีกว่าการใช้ไข่แดงสด (Marco-Jimenez et al., 2004) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในสุนัข

อย่างไรก็ตามการที่ไข่แดงผงต้องผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นซึ่งต้องผ่านอุณหภูมิสูงอาจทำให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในไข่แดงมีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายไปบางส่วน (Landfield et al., 2002) แต่ยังไม่มีข้อมูลที่ยืนยันว่ามีผลต่อคุณภาพของอสุจิหรือไม่ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้มีการนำสารเจือจางน้ำเชื้อที่เตรียมแล้วในรูปของเหลวไปผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชั่น (lyophilization) ซึ่งเป็นกระบวนการระเหิดเอาน้ำออกจากสารเจือจางน้ำเชื้อภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีความเสียหายต่ำ โครงสร้างมีรูพรุนมาก ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (rehydration) ได้อย่างรวดเร็ว การทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้กับการเตรียมผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมและการแพทย์ จำพวกโปรตีน ฮอร์โมน เอนไซม์ วัคซีน แบคทีเรีย ยีสต์ รวมไปถึงสารปฏิชีวนะ แต่ยังไม่เคยมีการนำกระบวนการนี้มาใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อ นอกจากนี้สามารถเก็บได้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้องจึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนารูปแบบสารเจือจางน้ำเชื้อมาใช้ในสุนัขอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ไข่แดงผงแทนการใช้ไข่แดงสดเป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็น
2. เพื่อพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบผงพร้อมใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขโดยการแช่เย็น

ขอบเขตของการวิจัย

เปรียบเทียบคุณสมบัติอสุจิสุนัขที่เก็บรักษาในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสด สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงผง และสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ แล้ว นำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ให้อยู่ในรูปแบบผง ภายหลังการแช่เย็นเป็นระยะเวลาต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ในการเปรียบเทียบดังนี้ อัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโตคอนเดรีย และการเกิดอะพ็อพโทซิส (apoptosis) ของอสุจิ

ข้อตกลงเบื้องต้น

น้ำเชื้อที่ให้อสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิมีลักษณะรูปร่างปกติมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ จึงจะผ่านเกณฑ์และนำมาใช้ในการทดลองได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเจือจางน้ำเชื้อ หมายถึง ของเหลวที่เติมลงไปในน้ำเชื้อสุนัข เพื่อเจือจางอสุจิ และเพื่อยืดระยะการมีชีวิตของอสุจิเมื่ออยู่ภายนอกร่างกาย
2. ไข่แดงสด หมายถึง ส่วนประกอบของไข่ไก่ ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมอยู่บริเวณกึ่งกลางของไข่ขาว ได้มาจากการแยกไข่ขาวออกให้หมด
3. ไข่แดงผง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการนำไข่แดงสดมาผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นและนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายให้เป็นผง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การทำแห้งแบบเยือกแข็ง หมายถึง กระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขที่อยู่ในรูปแบบผง
2. ทราบขั้นตอนการผลิตสารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบผงที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อสุนัขก่อนขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการผสมพันธุ์หรือแช่แข็งต่อไป
3. ทราบถึงผลของการแช่เย็นเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ต่อคุณภาพอสุจิสุนัข

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเชิงวิเคราะห์ไปข้างหน้า (Prospective analytical research)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

1. ไข่แดงสด เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือสารปนเปื้อนอื่น ๆ เมื่อนำมาเป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ จะเก็บแช่แข็งได้ในระยะเวลาไม่เกิน 2-3 เดือน และต้องแช่เย็นในระหว่างการขนส่ง
2. กระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นในการทำไข่แดงผง ทำลายเชื้อแบคทีเรียและสารปนเปื้อนในไข่แดงสดได้
3. การเปลี่ยนรูปแบบของสารเจือจางน้ำเชื้อจากลักษณะเป็นของเหลว ให้เป็นผงแห้ง เก็บในซองสูญญากาศ และละลายน้ำเมื่อต้องการใช้ จะทำให้สะดวกในการเก็บรักษาและนำไปใช้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเก็บรักษาอสุจิ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขเป็นวิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมสุนัขที่มีลักษณะดีตรงตามสายพันธุ์ โดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีด้วยกันหลายรูปแบบ คือ การแช่เย็น และการแช่แข็ง (Linde-Forsberg, 2001) โดยการแช่เย็นจะประหยัดค่าใช้จ่ายและเกิดการเสียหายของอสุจิน้อยกว่าการแช่แข็ง (Ponglowhapan et al., 2004) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อสุนัข คือ 4-5 องศาเซลเซียส (Morton and Bruce, 1989) การแช่เย็นน้ำเชื้อจะสามารถรักษาระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิได้ 5 ถึง 7 วัน (Salamon and Maxwell, 1995) โดยการเก็บน้ำเชื้อสุนัขที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิดีกว่าการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 22 และ 37 องศาเซลเซียส (Bouchard et al, 1990) นอกจากนี้การแช่เย็นน้ำเชื้อจะยืดระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิได้โดยจะลดการเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมของอสุจิ แต่ในทางกลับกันจะเหนี่ยวนำให้เกิด cold shock ได้ในระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ (Hermansson and Axner, 2007) ข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่งของการแช่เย็นน้ำเชื้อสุนัข คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่จำกัด (Shahiduzzaman and

Linde-Forsberg, 2007) ในทางปฏิบัติน้ำเชื้อแช่เย็นควรนำมาใช้โดยเร็วที่สุด ไม่ควรแช่เย็นนานกว่า 48 ชั่วโมง (Pena et al., 2006) การแช่เย็นน้ำเชื้อเป็นเวลานานจะลดคุณภาพของอสุจิลงได้ ถ้าในสารเจือจางน้ำเชื้อไม่มีส่วนประกอบของสารป้องกันการแข็งตัว โดยเฉพาะ นมผง (skimmed milk) และไข่แดงจะส่งผลให้อสุจิมีระยะเวลาการมีชีวิตสั้นลงอีก (Bouchard et al., 1990)

สารเจือจางน้ำเชื้อ

สารเจือจางน้ำเชื้อ คือ สารที่เติมลงไปเพื่อเจือจางน้ำเชื้อและช่วยยืดระยะการมีชีวิตของอสุจิเมื่ออยู่ภายนอกร่างกายสุนัข ในปัจจุบันสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในสุนัขมีด้วยกันหลายชนิด เช่น น้ำมะพร้าว (coconut water) นมผง (skimmed milk) (Ponglowhapan et al., 2004) และสารเจือจางน้ำเชื้อที่พัฒนาในเชิงพาณิชย์

น้ำมะพร้าว (Coconut water)

สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้แช่เย็นน้ำเชื้อของสัตว์หลายชนิด เช่น แกะ สุกรและสุนัข สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวมีราคาถูก เตรียมได้ง่าย มีการศึกษาการเติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าว พบว่าสามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อสุนัขได้ (Cardoso et al., 2005) แต่สารเจือจางน้ำเชื้อน้ำมะพร้าวสามารถเก็บไว้ใช้ได้ในระยะเวลาสั้น และมีข้อจำกัดของการมีอยู่ของผลไม้ชนิดนี้เพียงในบางภูมิภาคของโลก นอกจากนี้ส่วนประกอบทางชีวเคมีของน้ำมะพร้าวแต่ละผลยังมีความแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อความสามารถของสารเจือจางน้ำเชื้อในการเก็บรักษาน้ำเชื้ออีกด้วย (Cardoso et al., 2005) ดังนั้นการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวในรูปแบบผงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เคยมีการศึกษาโดยการนำสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวในรูปแบบผงไปใช้ในแพะ (Salgueiro et al., 2002) ม้า (Sampaio Neto et al., 2002) และสุนัข (Cardoso et al., 2004) จากการศึกษาในสุนัขพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวในรูปแบบผงสามารถรักษาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ และรูปร่างลักษณะของอสุจิภายหลังการแช่แข็งได้ไม่แตกต่างจากการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดน้ำมะพร้าวในรูปแบบของเหลว (Cardoso et al., 2005)

***นมผง** (skimmed milk)*

สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดนมผง ใช้กันมากในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหนูและแพะ มีการศึกษาในสุนัขโดยการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของนมผง และกลูโคส พบว่าสามารถรักษาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็งได้คล้ายกับการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงกลูโคส (tris egg yolk-glucose) (Abe et al., 2008) ถึงแม้ว่าสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดนมผงจะสามารถนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้แต่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์อาจมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนและส่งผลเสียต่อเซลล์ได้ (Marco-Jimenez et al., 2004)

***ไข่แดง** (egg yolk)*

ปัจจุบันสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สารเจือจางน้ำเชื้อทริส ซิเตรต (tris citrate buffer) ผสมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตส (Pena et al., 2006) มีการศึกษาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษาในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดง ให้อัตราการตั้งท้องสูงสุด (62.5 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสบัฟเฟอร์ (57.1 เปอร์เซ็นต์) และครีมไข่แดง (29.4 เปอร์เซ็นต์) (Linde-Forsberg, 1995) และอสุจิสุนัขที่เก็บรักษาในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดง ทริสบัฟเฟอร์ และครีมไข่แดงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิคือ 53.6 30.4 และ 14.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Rota et al., 1995) นอกจากนี้พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสุนัขได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส (Ponglowhapan et al., 2004)

***สารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบเชิงพาณิชย์** (commercial extender)*

สารเจือจางน้ำเชื้อที่อยู่ในรูปแบบเชิงพาณิชย์ได้มีการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลายในทางปฏิบัติในสุกรและวัว ส่วนในสุนัข สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อคือ 1) CLONE Chilled Semen Kit (Cryogenic Laboratories of New England Inc., Philadelphia, PA, USA) และ 2) สารเจือจางน้ำเชื้อที่พัฒนามาจากสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดง คือ Uppsala Chilled Semen Extender (Rota et al., 1995) สารเจือจางน้ำเชื้อ CLONE มีคุณสมบัติเฉพาะคือหยุดการเคลื่อนที่ของอสุจิในขณะแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และทำให้อสุจิกลับมาเคลื่อนที่ได้เช่นเดิมหลังการอุ่นกลับมาใช้ การทดลองพบว่าคุณสมบัติดังกล่าวไม่ได้ช่วยยืด

ระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดง (Shahiduzzaman and Linde Forseberg, 2007)

ส่วนประกอบและโครงสร้างของไข่แดง

ไข่ไก่สดมีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ 36 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่ไก่ โดยส่วนประกอบของไข่ไก่สดและไข่ที่ผ่านการกระบวนการทำแห้ง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัดส่วนของส่วนประกอบต่าง ๆ ในไข่แดงจากไข่ไก่สด (เปอร์เซ็นต์)

	ไข่แดงสด	ไข่แดงผง
น้ำ	51.1	-
ไขมัน	33.6	62.5
โปรตีน	16.0	33.0
คาร์โบไฮเดรต	0.6	1.2
แร่ธาตุ	1.7	3.5

ดัดแปลงจาก Powrie และ Nakai (1986)

ส่วนประกอบหลักของไข่แดง คือไขมัน โดยหลังการระเหยน้ำออกไปแล้ว สัดส่วนของไขมันต่อโปรตีน ของไข่แดงผงยังคงใกล้เคียงกับไข่แดงสด คือ 1.8 : 1 โดยไขมันส่วนใหญ่จะรวมตัวกับโปรตีนอยู่ในรูปของไลโปโปรตีน (lipoprotein) 2 ชนิดคือ ชนิดที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein) และชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein) เคยมีการศึกษาพบว่า ไลโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำเป็นส่วนประกอบในไข่แดง สามารถนำมาใช้ในการเก็บรักษาอสุจิได้ โดยไลโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำจะเกาะที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Graham and Foote, 1987) และประกอบกันเป็นเยื่อบางๆ (Anton et al., 2003) ทำหน้าที่ปกป้องเยื่อหุ้มตัวอสุจิ มีการศึกษาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อโคพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารเจือจางน้ำเชื้อโคที่มีไลโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำเป็นส่วนประกอบมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิดีกว่าการใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบ

ในสารเจือจางน้ำเชื้อ 2 เท่า (Moussa et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสุนัขโดยใช้ไลโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำเป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสกลูโคสแทนไข่แดง พบว่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็งดีกว่า (Varela et al., 2009) ดังนั้น ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำจึงเป็นส่วนสำคัญในไข่แดงที่มีบทบาทในการป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการลดอุณหภูมิในกระบวนการเก็บรักษา

ผลของไข่แดงต่อคุณภาพของอสุจิ

ไข่แดงเป็นส่วนประกอบหนึ่งในสารเจือจางน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัข โดยไข่แดงมีคุณสมบัติรักษาสภาพการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ลดความเสียหายของอะโครโซม และรักษาสภาพการทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิได้ (Salamon and Maxwell, 1995) โดยไข่แดงจะปกป้องอสุจิผ่าน 2 กระบวนการ คือ เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานการช็อคเนื่องจากความเย็น (cold shock) และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของอสุจิระหว่างการเก็บรักษา (Amirat et al., 2007) สารไลโปโปรตีนและฟอสโฟไลปิดที่เป็นส่วนประกอบของไข่แดงจะช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์สืบพันธุ์ระหว่างการแช่เย็นได้ (Beccaglia et al., 2009) ความเข้มข้นของไข่แดงที่เหมาะสมใช้เป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อ คือ 1.5 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Salamon and Maxwell, 1995) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทริส ซิเตรต บัฟเฟอร์ (tris citrate buffer) ที่มีส่วนผสมของไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ (Rota et al., 1995) และในตัวสัตว์ (Linde-Forsberg et al., 1999) แต่พบว่าไข่แดงที่ใช้เป็นไข่แดงสดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือสารปนเปื้อนอื่นๆ ที่ส่งผลให้คุณภาพของอสุจิลดลงได้ (Gil et al., 2003) เชื้อแบคทีเรียมักเจริญเติบโตในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงที่อุณหภูมิ 22 และ 35 องศาเซลเซียส (Shahiduzzaman and Linde Forsberg, 2007) เคยมีการศึกษาในคน พบว่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (Diemer et al., 2003) จากการที่สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงสดจะสามารถเก็บไว้ได้ในระยะเวลาจำกัดหลังการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ แล้ว จึงมีการพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อโดยใช้ไข่แดงผงแทนการใช้ไข่แดงสด เพราะไข่แดงผงผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่น ซึ่งจะสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียและสารปนเปื้อนได้ (Macro-Jimenez et al., 2004) ในปัจจุบันเริ่มมีการใช้ไข่แดงผงเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไข่แดงผงสามารถเก็บรักษาไว้ได้ระยะเวลานาน สะดวกและมีความคงที่ของผลิตภัณฑ์ (Kim et al., 2008) แต่การที่ไข่แดงผงต้องผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นซึ่ง

ต้องผ่านอุณหภูมิสูงอาจทำให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในไข่แดงมีการเปลี่ยนแปลงหรือหายไปบางส่วน (Landfield et al., 2002) เคยมีการศึกษาในแกะโดยการใช้ไข่แดงผงเป็นส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีกว่าการใช้ไข่แดงสด (Marco-Jimenez et al., 2004)

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization) เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ ใช้เวลาการทำแห้งค่อนข้างนาน เนื่องจากต้องการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เดิมมากที่สุด ทั้งคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส โครงสร้าง สี กลิ่น และรสชาด ผลิตภัณฑ์ที่นิยมนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้แก่ อาหาร เครื่องสำอาง รวมถึงผลิตภัณฑ์ด้านเภสัชกรรมและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่มักจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างระดับโมเลกุล ซึ่งจำเป็นต้องรักษาองค์ประกอบและการเกิดปฏิกิริยาของสารที่ไวต่อการเสื่อมสลายเนื่องจากความร้อน ดังนั้นการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้กับการเตรียมผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมและการแพทย์จำพวกโปรตีน ฮอร์โมน เอนไซม์ วัคซีน แบคทีเรีย ยีสต์ รวมไปถึงสารปฏิชีวนะ แต่ยังไม่เคยมีการนำกระบวนการนี้มาใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีความเสียหายต่ำ โครงสร้างมีรูพรุนมาก ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (rehydration) ได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทำแห้งแบบเยือกแข็งมีความไวต่อความเสียหายในสภาพบรรยากาศปกติ และคุณสมบัติการดูดความชื้นกลับ ดังนั้นควรเลือกบรรจุภัณฑ์แบบสูญญากาศ (vacuum pack) จะสามารถเก็บได้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้อง จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าการเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบผงพร้อมใช้ โดยผ่านกระบวนการนี้ น่าจะช่วยเพิ่มความสะดวกในการนำไปใช้ โดยการผสมน้ำกลั่นลงไปก่อนใช้และนำไปเก็บรักษาน้ำเชื้อสุนัขที่รีดเก็บมาได้ นอกจากนี้สารเจือจางน้ำเชื้อในรูปแบบผงพร้อมใช้ยังสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาและเก็บได้ง่ายที่อุณหภูมิห้องอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้สุนัขเพศผู้ พันธุ์ ไซบีเรียน ฮัสกี้ ที่มีประวัติการผสมติดมาก่อน จำนวน 5 ตัว อายุ 3-5 ปี เลี้ยงที่ฟาร์มสุนัขเอ็น วาย (NY Kennel) อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยระหว่างการศึกษาไม่มีการนำสุนัขมาผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาเป็นตัวอย่างจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาได้จากสุนัข 3 ใน 5 ตัว มารวมกัน แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มเท่า ๆ กัน โดยแต่ละกลุ่มใส่สารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อปรับให้มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่ 1 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสที่มีส่วนผสมของไข่แดงสด (tris fresh egg-yolk extender) กลุ่มที่ 2 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสที่มีส่วนผสมของไข่แดงผง (tris powder egg-yolk extender) และกลุ่มที่ 3 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสที่มีส่วนผสมของไข่แดงสด แล้วนำมาทำให้เป็นผงโดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized tris egg-yolk extender) จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ละลายในสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิดทั้ง 3 กลุ่มไปแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสุนัขด้วยมือ (digital manipulation) สัปดาห์ละครั้ง โดยจะเลือกเก็บน้ำเชื้อเฉพาะส่วนกลาง (sperm rich fraction) ลงในหลอดพลาสติกสำหรับเก็บน้ำเชื้อชนิดมีขีดบอกปริมาตร

การประเมินคุณภาพอสุจิ

ทำการตรวจคุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บมาได้จากสุนัข 3 ตัวรวมกันอีกครั้ง บันทึกปริมาตรน้ำเชื้อตามขีดบอกปริมาตรข้างหลอด และบันทึกค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้กระดาษทดสอบความเป็นกรดด่าง จากนั้นประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ จำนวนอสุจิทั้งหมด ลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ อัตราการมี

ชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ และการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ โดยทุกตัวชี้วัดจะทำการประเมินอีกภายหลังการแช่เย็นที่ 3 48 และ 96 ชั่วโมง 7 วันและ 10 วัน ตามลำดับ ยกเว้นความเข้มข้นของอสุจิ และลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ จะทำการประเมินเพียงครั้งเดียวก่อนเติมสารเจือจางน้ำเชื้อและแช่เย็น

ความเข้มข้นของอสุจิ

ทำการตรวจประเมินทันทีภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อสารละลายฟอร์มัลซาลีน (formal saline) 200 ส่วน จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกมา 10 ไมโครลิตรใส่ในฮีโมไซโตมิเตอร์ แชมเบอร์ (hemocytometer chamber) (Boeco, Humburg, Germany) แล้วนับจำนวนอสุจิ คำนวณความเข้มข้นของอสุจิต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และจำนวนอสุจิทั้งหมด

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์อุ่น 37 องศาเซลเซียส และปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (Olympus CX31, Japan) กำลังขยาย 200 เท่า และประเมินเป็นร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

ทำการประเมินระดับความเร็วของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าในลักษณะเป็นเส้นตรง โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์อุ่น ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (Olympus CX31, Japan) กำลังขยาย 200 เท่า และทำการประเมินเป็นระดับคะแนนน้อยไปมาก คือ 0 ถึง 5 (0=อสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ และ 5=อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ด้วยความเร็วมาก) (Rota et al., 1995)

ลักษณะรูปร่างของอสุจิ

ความผิดปกติส่วนหัวของอสุจิ

ป้ายตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตรลงบนแผ่นสไลด์ รอให้แห้งจุ่มลงในเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์นาน 4 นาที รอให้แห้ง หลังจากนั้นนำสไลด์มาย้อมสีวิลเลียม (William's stain) (Lagerlof, 1934) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง กำลังขยาย 1000 เท่า คำนวณเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีส่วนหัวปกติและผิดปกติแบบต่าง ๆ จากอสุจิทั้งหมด 500 ตัว

ความผิดปกติส่วนกลางและส่วนหางของอสุจิ

ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อสารละลายฟอร์มัลซาลีน (formal saline) 200 ส่วน ผสมให้เข้ากัน หยดลงบนสไลด์และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง กำลังขยาย 400 เท่า คำนวณเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีส่วนกลางและส่วนหางปกติและผิดปกติแบบต่าง ๆ จากอสุจิทั้งหมด 200 ตัว

อัตราการมีชีวิตของอสุจิ

ประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อสด

ทำการประเมินภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อทันทีที่ฟาร์มสุนัข โดยหยดตัวอย่างน้ำเชื้อสดและสีอะนิลีนบลู (aniline blue) อย่างละ 10 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ ผสมให้เข้ากันแล้วทำการ ป้ายบนสไลด์โดยใช้ปลายปิเปต ทิป (pipette tip) จากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง กำลังขยาย 1000 เท่า และทำการประเมินจากอสุจิ 200 ตัว โดยอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายแล้วจะติดสีแดง

ประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อแช่เย็น

ทำการประเมินในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนส์ 2 ชนิด คือ ไซเบอร์โบรไมด์ 14 (SyBr-14) (Fertilight, Sperm viability kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide) (Fertilight, Sperm viability kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) ความเข้มข้น 0.03 ไมโครโมลาร์ โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อ 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ทริส บัฟเฟอร์ (tris buffer) 112.5 ไมโครลิตรให้เข้ากันและนำมาผสมกับสีไซเบอร์โบรไมด์ 14 จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นดูดส่วนผสม 50 ไมโครลิตร นำมาผสมกับสีโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide) 0.625 ไมโครลิตร เก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที ส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการประเมินจากอสุจิ 200 ตัว โดยใช้เกณฑ์อสุจิที่มีชีวิตจะติดสีเขียว ส่วนอสุจิที่ตายแล้วจะติดสีแดง (Garner and Johnson, 1995)

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ

ทำการประเมินโดยใช้สีย้อมฟลูออเรสซีน FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมในสารละลายพีบีเอส 1 มิลลิลิตร และสีโพรพิเดียม ไอโอไดด์ (Molecular probes Inc., Eugene, OR, USA) ความเข้มข้น 18 ไมโครโมลาร์ โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตรมาป้ายลงบนแผ่นสไลด์ รอให้แห้งแล้วจุ่มลงในเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์นาน 40 วินาที จากนั้นผสมสารละลายพีบีเอส 90 ไมโครลิตร สี FITC-PNA 10 ไมโครลิตรกับสีโพรพิเดียม ไอโอไดด์ 5 ไมโครลิตร แล้วนำสีที่ผสมแล้วมาเกลี่ยลงบนสไลด์ให้ทั่ว นำไปเก็บไว้ในกล่องทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเย็น 4 องศาเซลเซียส รอให้แห้งแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซ้นส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการประเมินจากอสุจิ 200 ตัว โดยอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์จะติดสีเขียว อสุจิที่มีอะโครโซมเสียหายบางส่วนจะติดสีเขียวเป็นจุด ๆ ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนอสุจิที่มีอะโครโซมเสียหายจะไม่ติดสีเขียวเลย

การทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิ

ทำการประเมินโดยใช้สีย้อมฟลูออเรสซีน JC-1 (5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตรผสมกับสี JC-1 1 ไมโครลิตรให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำมาหยดลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซ้นส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการประเมินจากอสุจิ 200 ตัว โดยอสุจิที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงจะติดสีส้ม ส่วนอสุจิที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับกลางถึงต่ำจะติดสีเขียว (Huo et al., 2002)

การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ

ทำการประเมินโดยใช้สีย้อม YOPRO-1 iodide (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ Carboxy SNARF-1 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และ ethidium homodimer-1 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) ความเข้มข้น 1.167 มิลลิโมลาร์ ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 100 ไมโครลิตรผสมกับ SNARF-1 1 ไมโครลิตรในพีบีเอส 100 ไมโครลิตร YOPRO-1 3 ไมโครลิตรและ ethidium homodimer 1 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมทริสบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร

และนำไปตรวจด้วยเครื่อง flow cytometer (Beckman Coulter Cytomic FC 500 MPL, Washington, USA) โดยอสุจิที่ติดสี YOPRO-1 อยู่ในพื้นที่ FL1 อสุจิที่ติดสี SNARF-1 อยู่ในพื้นที่ FL2 และ อสุจิที่ติดสี ethidium homodimer-1 อยู่ในพื้นที่ FL3

การแปลผลแบ่งเป็น 1) อสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (SNARF-1 +/ YOPRO-1 -/ ethidium homodimer -) 2) อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพรอพโทซิสระยะแรก คือเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (SNARF-1 -/ YOPRO-1 +/ ethidium homodimer -) 3) อสุจิที่เกิดการตายในระยะแรก (SNARF-1 -/ YOPRO-1 +/ ethidium homodimer +) และ 4) อสุจิที่เกิดการตายในระยะท้าย (SNARF-1 -/ YOPRO-1 -/ ethidium homodimer +) (Pena et al., 2005) โดยจะทำการประเมินจากอสุจิทั้งสิ้น 20,000 ตัว

สารเจือจางน้ำเชื้อ

สารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2) ได้แก่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด แต่ใช้ไข่แดงผง 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แทนไข่แดงสด และสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด โดยเตรียมเสร็จแล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) แล้วบรรจุซองสูญญากาศก่อนนำมาผสมน้ำกลั่นใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ชนิดสารเจือจางน้ำเชื้อ	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	สารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
ทริส (กรัม)	3.025	3.025	3.025
กรดซิตริก (กรัม)	1.7	1.7	1.7
Na-benzylpenicillin (กรัม)	0.06	0.06	0.06
Streptomycin sulfate (กรัม)	0.1	0.1	0.1
ไข่แดงสด(เปอร์เซ็นต์,ปริมาตร/ปริมาตร)	20		20
ไข่แดงผง(เปอร์เซ็นต์,ปริมาตร/ปริมาตร)		20	
ฟรุกโตส (กรัม)	1.275	1.275	1.275
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	เติมเป็น 100	เติมเป็น 100	เติมเป็น 100
ออสโมลาริตี้ (มิลลิออสโมล/กิโลกรัม)	330		330
ความเป็นกรด-ด่าง	6.05	6.05	6.05

การเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด (tris fresh egg-yolk extender)

สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด เตรียมโดยผสม ทริส 3.025 กรัม ซิตริกแอซิด 1.7 กรัม กลูโคส 1.25 กรัม โซเดียมเบนซิลเพนนิซิลิน 0.1 กรัม สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะได้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดเอ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง (tris powder egg-yolk extender)

สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง เตรียมโดยผสม ทริส 3.025 กรัม ซิตริกแอซิด 1.7 กรัม กลูโคส 1.25 กรัม โซเดียมเบนซิลเพนนิซิลิน 0.1 กรัม สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมไข่แดงผงที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่น (CPF, Bangkok, Thailand) ผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน ไข่ผง 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร นำไข่ผงที่ผสมแล้ว 20 มิลลิลิตร เติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เตรียมไว้แล้ว จะได้สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดบี ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ส่วนผสมเข้ากันนาน 30 นาที

การเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized tris egg-yolk extender)

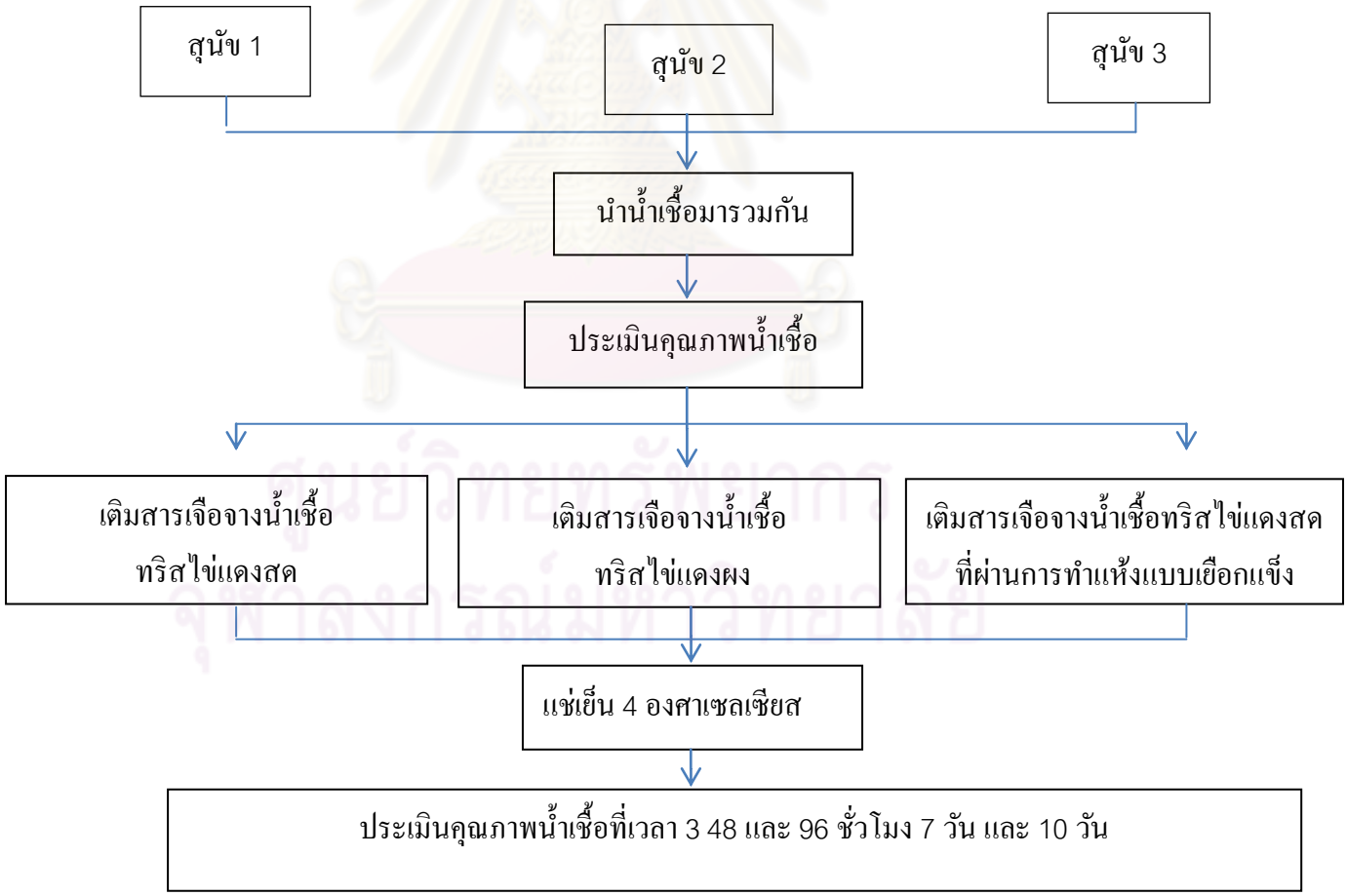
สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดซี เตรียมโดยผสม ทริส 3.025 กรัม ซิตริกแอซิด 1.7 กรัม กลูโคส 1.25 กรัม โซเดียมเบนซิลเพนนิซิลิน 0.1 กรัม สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต 0.1 กรัม และไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดเอ หลังจากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ -55 องศาเซลเซียสและความดัน 0.001 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารเจือจางน้ำเชื้อรูปแบบผงน้ำหนัก 0.38 กรัม (Christ Alpha 1-2, Insitute of pharmacy of Saint-Petersberg, Saint-Petersberg, Russia) หลังจากนั้นนำมาแบ่งบรรจุซองป้องกันความชื้นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการนำสารเจือจางน้ำเชื้อมาใช้จะเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 1 ซองเพื่อละลายสารเจือจางน้ำเชื้อและนำมาใช้ผสมกับน้ำเชื้อสุนัขที่รีดเก็บมา

การแช่เย็นน้ำเชื้อ

หลังจากทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มในปริมาตรเท่า ๆ กัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 600 g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละกลุ่มลงไปในตะกอนอสุจิโดยปรับให้มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และเก็บน้ำเชื้อโดยค่อยๆ ลดอุณหภูมิถึง 4 องศาเซลเซียสภายในเวลา 30 นาทีในตู้ปรับระดับความเย็น และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แผนการทดลอง

รีดเก็บน้ำเชื้อจากสุนัข 3 ตัวใน 5 ตัวและนำน้ำเชื้อมารวมกัน หลังจากนั้นแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนปริมาตรเท่าๆกัน ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดเอ บี และซี โดยปรับให้มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่ 1 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด กลุ่มที่ 2 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง และกลุ่มที่ 3 ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นำตัวอย่างอสุจิที่เจือจางแล้วไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ และการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ โดยทำการประเมินภายหลังการแช่เย็น 3 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง 96 ชั่วโมง 7 วันและ 10 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงแผนการทดลอง

ตัวแปรอิสระ

1. กลุ่มตัวอย่าง (treatment group) คือ กลุ่มสารเจือจางน้ำเชื้อ tris ที่มีส่วนผสมของไข่แดงผง 20 เปอร์เซ็นต์ (tris powder egg-yolk extender) และกลุ่มสารเจือจางน้ำเชื้อ tris ที่มีส่วนผสมของไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ และผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized tris egg-yolk extender) สำหรับแช่เย็นอสุจิ
2. ระยะเวลาในการแช่เย็นที่ 3 48 96 ชั่วโมง 7 วัน และ 10 วัน

ตัวแปรตาม

1. อัตราการเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)
2. ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (0 ถึง +5)
3. อัตราการมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
4. ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)
5. การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)
6. การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) (Int. Inc. Cary. N.C. USA) เวอร์ชั่น 9 ข้อมูลผลการทดลองแสดงผลด้วย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของตัวแปรอิสระโดยใช้ two-way ANOVA (General Linear Model (GLM)) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ ของตัวแปรดังต่อไปนี้ อัตราการเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์) ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

คุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บมาได้จากสุนัข 3 ตัวรวมกัน จากการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง ก่อนนำมาทำการทดลอง พบว่ามีปริมาตร 5.9±1.3 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่าง 6.7±0.4 ความเข้มข้น 252.6±139.5 ล้านตัวต่อ 1 มิลลิลิตรอสุจิที่มีส่วนหัวปกติ 86.3±5.4 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่มีส่วนหางปกติ 87.2±6.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนที่ 84.8±7.4 เปอร์เซ็นต์ อัตราการมีชีวิต 93.1±2.5 เปอร์เซ็นต์

1. *อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ*

การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสามชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3) แต่ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิที่นานขึ้นส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงในทุกกลุ่ม ($p < 0.05$) โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงภายใน 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และลดลงอีกครั้งเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p<0.05$) ตามลำดับ ส่วนการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผงและสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเริ่มลดลงที่ 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ซึ่งอัตราการลดลงของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิช้ากว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$80\pm3.5^{a,,A}$	$78.3\pm2.5^{a,,A}$	$80\pm3.5^{a,,A}$
48 ชั่วโมง	$72.2\pm2.6^{a,B}$	$74.4\pm3.9^{a,,AB}$	$75.6\pm3.9^{a,,AB}$
96 ชั่วโมง	$67.8\pm4.9^{a,B}$	$70\pm2.5^{a,B}$	$70\pm5.6^{a,B}$
7 วัน	$50.6\pm8.8^{a,C}$	$52.2\pm7.1^{a,C}$	$54.4\pm8.5^{a,C}$
10 วัน	$38.3\pm6.1^{a,D}$	$41.1\pm6.0^{a,D}$	$40.6\pm8.1^{a,D}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C และ D)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) *ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ*

การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสามชนิด ที่เวลา 3 และ 48 ชั่วโมงพบว่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง ต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4) ส่วนการแช่เย็นอสุจิที่เวลา 96 ชั่วโมง 7 และ 10 วัน พบว่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังการแช่เย็นลดลง ($p < 0.05$) ตามระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้น 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง = 9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$4.56 \pm 0.5^{a,A}$	$3.89 \pm 0.3^{b,A}$	$4.22 \pm 0.4^{ab,A}$
48 ชั่วโมง	$3.78 \pm 0.4^{a,B}$	$3.22 \pm 0.7^{b,B}$	$3.67 \pm 0.5^{ab,B}$
96 ชั่วโมง	$3 \pm 0.7^{a,C}$	$2.56 \pm 0.5^{a,C}$	$2.89 \pm 0.8^{a,C}$
7 วัน	$2.11 \pm 0.6^{a,D}$	$1.89 \pm 0.3^{a,D}$	$2.11 \pm 0.6^{a,D}$
10 วัน	$1.22 \pm 0.4^{a,E}$	$1.0 \pm 0.0^{a,E}$	$1.22 \pm 0.4^{a,E}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$) (a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C,D และ E)

3) *อัตราการมีชีวิตของอสุจิ*

อัตราการมีชีวิตของอสุจิแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันในทุกเวลาที่ทำการประเมิน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 5) ในขณะที่อัตราการมีชีวิตของอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดและทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ลดลงตามระยะเวลาการแช่เย็นน้ำเชื้อที่นานขึ้น 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ10 วัน ($p < 0.05$) ส่วนการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีการลดลงของอัตราการมีชีวิตของอสุจิ 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และยังคงเท่าเดิมที่เวลา 96 ชั่วโมง ($p > 0.05$) แต่ลดลงอีกครั้งที่เวลา 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 5 อัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$83.8 \pm 4.3^{a,,A}$	$84.4 \pm 2.8^{a,,A}$	$85 \pm 3.5^{a,,A}$
48 ชั่วโมง	$73.7 \pm 4.3^{a,B}$	$73 \pm 3.2^{a,B}$	$74.3 \pm 4.0^{a,B}$
96 ชั่วโมง	$67.6 \pm 4.5^{a,C}$	$69.8 \pm 2.5^{a,B}$	$69.8 \pm 3.2^{a,C}$
7 วัน	$57 \pm 7.1^{a,D}$	$57.7 \pm 7.5^{a,C}$	$60.1 \pm 6.4^{a,D}$
10 วัน	$47.7 \pm 4.9^{a,E}$	$47.6 \pm 4.3^{a,D}$	$49.4 \pm 4.3^{a,E}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p<0.05$)(A,B,C,D และ E)

4) *ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ*

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 6) การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิภายหลังการแช่เย็นลดลงตามระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้น 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ในขณะที่การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีการลดลงของจำนวนอะโครโซมที่สมบูรณ์หลังการแช่เย็นที่ 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) เท่าเดิมที่ 96 ชั่วโมง ($p > 0.05$) แล้วจึงลดลงอีกครั้งที่ 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p<0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$73.3\pm7.3^{a,,A}$	$73.8\pm5.0^{a,,A}$	$74.9\pm11^{a,,A}$
48 ชั่วโมง	$61.5\pm8.6^{a,B}$	$64.4\pm6.6^{a,B}$	$61.5\pm9.3^{a,B}$
96 ชั่วโมง	$52.1\pm5.9^{a,C}$	$53.6\pm5.0^{a,C}$	$53.6\pm11.4^{a,B}$
7 วัน	$33.3\pm6.5^{a,D}$	$37.3\pm8.1^{a,D}$	$40.3\pm14^{a,C}$
10 วัน	$21.4\pm2.4^{a,E}$	$27.4\pm6.3^{a,E}$	$27.8\pm14.2^{a,D}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C,D และ E)

5) *การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ*

การแช่เย็นที่เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงสูงกว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7) ในขณะที่แช่เย็นที่เวลา 96 ชั่วโมงพบว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงสูงกว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($p < 0.05$) อสุจิที่มีระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงลดลงตามระยะเวลาการแช่เย็นน้ำเชื้อที่นานขึ้น โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด มีการลดลงของการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) แต่พบว่าการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีการลดลงของการทำงานของไมโทคอนเดรียในอสุจิลดลงทุกช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในเยื่อหุ้มเซลล์ในระดับสูง (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$68.8 \pm 6.2^{a,A}$	$70.4 \pm 4.6^{a,A}$	$68.7 \pm 3.0^{a,A}$
48 ชั่วโมง	$60.4 \pm 6.8^{a,B}$	$65.6 \pm 3.8^{b,AB}$	$61.9 \pm 4.2^{ab,B}$
96 ชั่วโมง	$54.2 \pm 8.7^{ab,B}$	$60.7 \pm 6.7^{b,B}$	$53.4 \pm 5.0^{a,C}$
7 วัน	$40.1 \pm 6.2^{a,C}$	$48.4 \pm 9.4^{b,C}$	$41.4 \pm 8.3^{ab,D}$
10 วัน	$31.6 \pm 7.4^{a,D}$	$39.2 \pm 8.1^{a,D}$	$34.1 \pm 8.1^{a,E}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$) (a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C และ D)

6) *การเกิดอะพ็อพโทซิสของอสุจิ*

การแช่เย็นอสุจิที่เวลา 3 และ 48 ชั่วโมง พบจำนวนอสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง ($p<0.05$) (ตารางที่ 8) การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดบี (ไข่แดงผง) สามารถรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ให้สมบูรณ์เท่ากับในชั่วโมงที่ 48 จนถึง 7 วัน ($p > 0.05$) แล้วจึงมีการลดลงในวันที่ 10 ($p < 0.05$) ขณะที่อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด มีการลดลงของอสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ต่อเนื่องที่เวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ส่วนในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีการลดลงของอสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) 7 วัน ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ตามลำดับ

การแช่เย็นอสุจิที่เวลา 3 ชั่วโมง อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะแรกในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 9) ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมง อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะแรกในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($p < 0.05$) อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะแรกลดลงตามระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้น โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีอสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสระยะแรกลดลงที่เวลา 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$)

การแช่เย็นอสุจิที่เวลา 10 วัน พบจำนวนอสุจิที่ตายในระยะแรกในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10) อสุจิที่ตายในระยะแรกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้น โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีอสุจิที่ตายในระยะแรกสูงขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ส่วนในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และทริสไข่แดงผง มีอสุจิที่ตายในระยะแรกสูงขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ตามลำดับ

การแช่เย็นอสุจิที่เวลา 10 วัน อสุจิที่ตายในระยะท้ายในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง สูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) อสุจิที่ตายในระยะท้าย

เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่เย็นที่นานขึ้น โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีอสุจิที่ตายในระยะท้ายสูงขึ้นที่เวลา 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ส่วนในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีอสุจิที่ตายในระยะท้ายสูงขึ้นที่เวลา 96 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ 10 วัน ($p < 0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 8 อสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$67.5 \pm 8.3^{a,A}$	$54.3 \pm 8.4^{b,A}$	$63.7 \pm 6.5^{a,A}$
48 ชั่วโมง	$57.4 \pm 5.3^{a,B}$	$43.6 \pm 9.5^{b,B}$	$52.5 \pm 10.0^{a,B}$
96 ชั่วโมง	$48.3 \pm 8.9^{a,C}$	$40.5 \pm 8.3^{a,B}$	$47.9 \pm 7.7^{a,BC}$
7 วัน	$46 \pm 9.8^{a,C}$	$36.5 \pm 9.6^{a,B}$	$42.2 \pm 9.8^{a,C}$
10 วัน	$29.4 \pm 6.7^{a,D}$	$26.6 \pm 5.8^{a,C}$	$32.6 \pm 8.2^{a,D}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$) (a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C และ D)

ตารางที่ 9 อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะแรก ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่างๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$14.6\pm8.2^{a,,A}$	$24.6\pm9.8^{b,A}$	$15.3\pm11.1^{ab,A}$
48 ชั่วโมง	$10.4\pm3.4^{a,,AB}$	$19.8\pm9.2^{b,B}$	$12.4\pm6.0^{a,AB}$
96 ชั่วโมง	$6.9\pm3.1^{a,B}$	$10.5\pm11.9^{a,,AB}$	$7.5\pm7.3^{a,BC}$
7 วัน	$6.3\pm2.8^{a,B}$	$13.3\pm10.5^{a,BC}$	$6.9\pm5.3^{a,BC}$
10 วัน	$2.8\pm2.0^{a,C}$	$4.4\pm3.4^{a,BC}$	$3.5\pm3.9^{a,C}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p<0.05$)(a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p<0.05$)(A,B และ C)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การตายในระยะแรกของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	สารเจือจางน้ำเชื้อ		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$9.0\pm8.0^{a,,A}$	$14.1\pm13.5^{a,,A}$	$10.8\pm9.3^{a,,A}$
48 ชั่วโมง	$21.9\pm9.1^{a,B}$	$29.6\pm12.2^{a,B}$	$22.6\pm12.7^{a,B}$
96 ชั่วโมง	$27.5\pm8.7^{a,B}$	$35.4\pm15.0^{a,B}$	$28.7\pm9.2^{a,BC}$
7 วัน	$28.5\pm10.7^{a,B}$	$36.2\pm11.0^{a,B}$	$31.4\pm11.0^{a,BC}$
10 วัน	$39.7\pm6.1^{a,C}$	$49.2\pm2.9^{b,C}$	$35.8\pm9.7^{a,C}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$) (a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B และ C)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การตายในระยะท้ายของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) ภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ทริสไข่แดงผง และทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง=9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระยะเวลาในการแช่เย็นอสุจิ	การตายในระยะท้ายของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)		
	ทริสไข่แดงสด	ทริสไข่แดงผง	ทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
3 ชั่วโมง	$3.7\pm4.7^{a,,A}$	$3.4\pm4.2^{a,,A}$	$4.5\pm4.8^{a,,A}$
48 ชั่วโมง	$8.8\pm6.4^{a,AB}$	$9.1\pm7.0^{a,AC}$	$10.3\pm6.4^{a,AB}$
96 ชั่วโมง	$14.9\pm8.6^{a,B}$	$13.7\pm7.8^{a,BCD}$	$14\pm8.9^{a,B}$
7 วัน	$16.2\pm10.8^{a,B}$	$12.6\pm7.7^{a,BC}$	$17.8\pm9.7^{a,BC}$
10 วัน	$26.1\pm3.8^{a,C}$	$19.7\pm5.6^{b,DE}$	$24.5\pm6.0^{ab,C}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละสดมภ์ ($p < 0.05$) (a,b)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถว ($p < 0.05$) (A,B,C,D และ E)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ พบว่าอสุจิที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด (tris fresh egg-yolk extender) สารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง (tris powdered egg-yolk extender) และสารเจือจางน้ำเชื้อทริสที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized tris egg-yolk extender) มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไม่แตกต่างกัน เมื่อแช่เย็นไว้เป็นเวลา 10 วัน

การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสดและไข่แดงผง พบว่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการแช่แข็งอสุจิของแกะ (Macro-Jimenez et al., 2004) และอัตราการมีชีวิตของอสุจิไม่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการแช่เย็นอสุจิของโคเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสดและไข่แดงผงก่อนการนำไปแช่แข็ง (Ansari et al., 2010) อย่างไรก็ตาม อัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลงตามระยะเวลาในการแช่เย็นที่นานขึ้น ในการศึกษานี้การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงมีอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลงช้ากว่าในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิด โดยการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงที่เวลา 48 และ 96 ชั่วโมงอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48

นอกจากนี้หลังการแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง แต่ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผง และในสารเจือจางน้ำเชื้อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีการศึกษาพบว่าไข่แดงสดที่เป็นส่วนผสมในสารเจือจางน้ำเชื้อโคที่ได้จากฟาร์ม ตลาด และโรงงานมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและไมโคพลาสมา (Bousseau et al., 1998) และไข่สดจะมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น (Shenga et al., 2010) เคยมีการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสารเจือจางน้ำเชื้อทริส ไข่แดง กลูโคส ที่นำมาใช้ในการแช่เย็นอสุจิสุนัขพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในวันที่ 8 และ 14 (Shahiduzzaman and Linde-Forsberg, 2007) โดยเชื้อ *E. coli* จะไปจับกับโมเลกุล ชนิด type

1 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีอยู่ที่พิลไลของเชื้อแบคทีเรียและบริเวณผิวของอสุจิและส่งผลต่อบริเวณส่วนกลางและส่วนหางของอสุจิ ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงและส่งผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิด้วย (Diemer et al., 2000) นอกจากนี้เคยมีการศึกษาในสารเจือจางน้ำเชื้อไลซิฟอสซึ่งเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อเชิงพาณิชย์ของโคที่มีส่วนผสมของไข่แดงสด พบว่ายาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน สเตร็ปโตมัยซิน ลินโคมัยซิน และ สเป็คติโนมัยซิน ที่เป็นส่วนผสมไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในสารเจือจางน้ำเชื้อได้ (Bousseau et al., 2003) ดังนั้นสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้มีการผสมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และสเตร็ปโตมัยซิน อาจลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้เพียงบางส่วน ในขณะที่ไข่แดงผงผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นจะสามารถช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและสิ่งปนเปื้อนที่อาจส่งผลลดอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ สำหรับกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นโดยใช้อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน โคลิฟอร์ม สแตฟฟิโลคอคคัสได้ (Shenga et al., 2010) นอกจากนี้การที่ไข่แดงสดมีส่วนที่เรียกว่าแกรนูลที่มีไลโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นสูง อาจส่งผลยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์อสุจิและลดอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Pace and Graham, 1974) กระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นที่ใช้ในการทำไข่แดงผงอาจจะทำลายส่วนประกอบดังกล่าวได้ (Kampschmidt et al., 1953) ทำให้สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ดีกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสด

การแช่เย็นที่เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงสูงกว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ในขณะที่แช่เย็นที่เวลา 96 ชั่วโมงพบว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผง มีระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียในระดับสูงสูงกว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงผงที่ลดลงช้ากว่าอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด สอดคล้องกับการศึกษาในอสุจิสุนัขที่พบว่าระดับการทำงานของอสุจิมีความสอดคล้องกับอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิอีกด้วย (Volpe et al., 2009)

จากการศึกษานี้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่ผงมีระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิต่ำกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิดที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงจะมีความหนืดมากขึ้น เพราะกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นจะใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำลายโปรตีนบางส่วนในไข่แดงและเหนี่ยวนำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น (Miranda et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ansari และคณะ (2010) ที่ศึกษาการแช่เย็นอสุจิของโคที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียสก่อนการนำไปแช่แข็งในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสด พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสดเมื่อเทียบกับไข่แดงผง

การแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงที่เวลา 3 และ 48 ชั่วโมง มีผลให้จำนวนอสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ต่ำกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิด อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสระยะแรกที่เวลา 3 ชั่วโมงสูงกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสด การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบการตายที่มีแบบแผนการตายของเซลล์ เกิดจากการควบคุมโดยหน่วยพันธุกรรม มีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำนวนเซลล์ จากการศึกษานี้ทำการตรวจอะพอพโทซิสโดยวิธีการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยการใช้สีย้อม SNARF-1 YO-PRO-1 และ Ethidium homodimer และทำการประเมินโดยใช้เครื่อง flow cytometer ซึ่งเป็นเทคนิคที่ประยุกต์มาจากรายงานในสุกร (Pena et al., 2005) สีฟลูออเรสซีนที่ใช้ในการย้อมจะติดเฉพาะเซลล์อสุจิเท่านั้น ทำให้สามารถแยกระหว่างอสุจิและอนุภาคอื่นๆที่ไม่ใช่เซลล์อสุจิได้จากคุณสมบัติของสีฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งจำเป็นในการศึกษานี้ เนื่องจากสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัขที่ใช้ในการศึกษามีส่วนประกอบของไข่แดง อนุภาคของไข่แดงที่ปนอยู่อาจทำให้ประเมินผิดพลาดเป็นเซลล์อสุจิได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในโคที่มีส่วนประกอบของไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อด้วย (Nagy et al., 2003) เทคนิคนี้สามารถจำแนกอสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (SNARF-1+/YO-PRO-1-/Ethidium homodimer-) เป็นอสุจิที่มีคุณภาพดี ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Pena et al., 2005) อัตราการเคลื่อนที่สูง ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระดับสูงและการแตกหักของดีเอ็นเอต่ำ (Paasch et al., 2005; Said et al., 2006) ซึ่งจะเป็นอสุจิที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผสมเทียมและแช่แข็งต่อไป อสุจิมีชีวิตที่เกิดอะพอพโทซิสระยะแรก (SNARF-1-/YO-PRO-1+/Ethidium homodimer-) เป็นอสุจิที่มีชีวิตที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ มีการกระจายตัวของฟอสโฟลิปิดอย่างไม่สมมาตร แต่ยังมีความสามารถในการปฏิสนธิได้ อสุจิที่เกิดการตายในระยะแรก (SNARF-1-/YO-PRO-1+/Ethidium homodimer+) เป็นอสุจิเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอมากขึ้น ความสามารถในการปฏิสนธิต่ำ และอสุจิที่เกิดการตายในระยะท้าย (SNARF-1-/YO-PRO-1-/Ethidium homodimer+) เป็นอสุจิที่มีความเสียหายมากที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าส่วนประกอบที่สำคัญในไข่แดงที่ช่วยป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็นคือไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ โดยจะเกาะยึดรวมเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Foulkes, 1977; Graham and Foote, 1987) จากผลการศึกษานี้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงมีการ

เปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิค่อนข้างเร็วกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิดอาจเนื่องมาจากบางขั้นตอนของกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชั่นส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ ทำให้ความสามารถในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลง ความสำเร็จในการปฏิสนธิของอสุจิจะต้องเป็นอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสมบูรณ์ (Zini et al., 2008) ดังนั้นอสุจิแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงเมื่อนำไปใช้ในการผสม อสุจิน่าจะมีความสารถในการปฏิสนธิต่ำกว่าในสารเจือจางน้ำเชื้ออีก 2 ชนิดด้วย

สารเจือจางในรูปแบบผงที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อทริสที่ผสมไข่แดงสด 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทำให้เป็นผงโดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สามารถนำมาใช้เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็นสุนัขแทนสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงสดได้ เนื่องจากพบว่าคุณภาพอสุจิภายหลังการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ระดับการทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดอะพอพโทซิสไม่แตกต่างจากสารเจือจางน้ำเชื้อทริสไข่แดงสด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Moustacas และคณะ (2010) ที่ทำการศึกษาแช่แข็งน้ำเชื้อแกะโดยการใช้สารไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งแทนไลโปโปรตีนที่สกัดออกมาได้จากไข่แดง พบว่าภายหลังการแช่แข็งอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ กระบวนการนี้นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต้องรักษาองค์ประกอบและการเกิดปฏิกิริยาของสารที่ไวต่อการเสื่อมสลายเนื่องจากความร้อน เช่นจำพวกโปรตีน ฮอร์โมน เอนไซม์ วัคซีน แบคทีเรีย ยีสต์ รวมไปถึงสารปฏิชีวนะ ยังไม่เคยมีการนำกระบวนการนี้มาใช้ในการผลิตสารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็น มีการศึกษาพบว่ากระบวนการแช่แข็งไข่แดงมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะคล้ายเจล ซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยการผสมสารอื่น ๆ เข้าไปด้วยเช่นเกลือหรือน้ำตาล (Thomas et al., 2007) ซึ่งในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสที่อาจช่วยลดลักษณะคล้ายเจลที่จะเกิดขึ้นกับสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิไม่แตกต่างจากสารเจือจางน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมที่ผสมไข่แดงสด จากการศึกษานี้พบว่ากระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งสามารถรักษาคุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อได้และยังช่วยให้สะดวกในการนำไปใช้และยืดระยะเวลาในการเก็บได้อีกด้วย

กล่าวโดยสรุป การใช้ไข่แดงผงแทนไข่แดงสด อาจทำให้สารเจือจางน้ำเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การเปลี่ยนรูปแบบของสารเจือจางน้ำเชื้อ จึงอาจใช้วิธีผสมส่วนประกอบทั้งหมดโดยใช้ไข่แดงสด แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพอสุจิสุนัขโดยการแช่เย็นได้เช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อทริส ไข่แดง ในรูปแบบของเหลว

จากที่กล่าวมาว่าการใช้ไข่แดงผงอาจทำให้สารเจือจางน้ำเชื้อมีความหนืดมากขึ้น อาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความหนืดของสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิด และจากผลการศึกษาอาจจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิด เช่นทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียในสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิดเพื่อดูชนิดของเชื้อแบคทีเรียและกลไกที่ส่งผลลดคุณภาพของอสุจิ และจะเห็นได้ว่าสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งให้เป็นรูปแบบผงมีประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพอสุจิสุนัขโดยการแช่เย็นได้เช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อทริส ไข่แดงสด ดังนั้นอาจทำการศึกษาและพัฒนาต่อถึงขั้นตอนและปัจจัยในกระบวนการการทำแห้งแบบเยือกแข็งว่าไม่มีผลต่อส่วนประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัข นอกจากนี้เพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิต้องมีการนำอสุจิที่ผ่านการแช่เย็นในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผสมไข่แดงผงและสารเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งไปใช้ในการผสมทั้งภายในและภายนอกตัวสัตว์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Abe, Y., Lee, D.S., Sano, H., Akiyama, K., Yanagimoto-Ueta, Y., Asano, T., Suwa, Y. and Suzuki, H. 2008. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose based extender. J. Reprod. Dev. 54: 290-94.

Amirat, L., Tainturier, D. and Anton, M. 2007. Use of egg compounds for cryoprotection of spermatozoa. In: Bioactive egg compound. 259-64.

Ansari, M.S., Rakha, B.A., Andrabi, S.M.H. and Akhter, S. 2010. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. Reprod. Biol. 10(3): 235-40.

Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E. and Rabesona, H. 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. Food. chem. 83: 175-83.

Beccaglia, M., Anastasi, P. and Luvoni, G.C. 2009. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. Vet. Res. Commun. 33(Suppl. 1): S77-S80.

Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D. and Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology. 34: 147-57.

Bousseau, S., Brillard, J.P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A. and Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based extender. Theriogenology. 50: 699–706.

Cardoso, R.C.S., Silva, A.R. and Silva, L.D.M. 2004. Use of the alternative extender powder coconut water (PCW 106®) for canine semen freezing. In: Abstracts of 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. 2004. UNESP/FMVZ: 96-7.

Cardoso, R.C.S., Silva, A.R. and Silva, L.D.M. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. Anim. Reprod. 2: 257-62.

Diemer, T., Huwe, P., Michelmann, H.W., Mayer, F., Schiefer, H.G. and Weidner, W. 2000. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. Int. J. Androl. 23: 178-86.

Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michel-mann, H.W. and Schiefer, H.G. 2003. Influence of autologous leucocytes and Escherichia coli on sperm motility parameters in vitro. Andrologia. 35(2): 100-5.

Foulkes, J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the Motility and integrity of bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 49: 277– 84.

Garner, D. and Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol. Reprod. 53: 276-84.

Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriiuez-Martinez, H. 2003. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 59: 1241-55.

Graham, J.K. and Foote, R.H. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturatation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology. 24: 42-52.

Hermansson, U. and Axner, E. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. Theriogenology. 67: 1239-48.

Huo, L.J., Ma, H.X. and Yang, Z.M. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long term storage. Theriogenology. 58: 1349-60.

Iguer-Ouada, M. and Verstegen, J.P. 2000. Long term preservation of chilled canine semen : effect of commercial and laboratory prepared extenders. Theriogenology. 55: 671-84.

Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T. and Herman, H.A. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. J. Dairy. Sci. 36: 733-42.

Kim, M.R., Shim, J.Y., Park, K.H. and Imm, J.Y. 2008. Functional properties of enzymatically modified egg yolk powder produced by phospholipase A_2 treatment. Food. Sci.Biotechnol. 17: 1289-93.

Lagerlof, N. 1934. Morphological studies on the changes in the spermstructure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 19: 254–67.

Landfield, A., Zitny, R., Houska, M., Kyhos, K. and Novotna, P. 2002. Residence time distribution during egg yolk pasteurization. Czech. J. Food. Sci. 20: 193-201.

Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. Sem. Vet. Med. Surg. 10: 48-58.

Linde-Forsberg, C., Ström Holst, B. and Govette, G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs uterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology. 52: 11-23.

Linde-Forsberg, C. 2001. Biology of reproduction and modern reproductive technology. In: Ruvinsky, A. and Sampson, J. (ed). The Genetics of the Dog. 402-3.

Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Moce, E., Viudes-de-Cartro, M.P., Vicente, J.S. and Rodriguez, M. 2004. Use of Powdered egg yolk vs Fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. Anim. Reprod. Dom. 39: 438-41.

Miranda, J., Guerrero, A.F. and Partal, P. 2000. Reologia de derivados de la yema de huevo Deshidratada. Grasas. y. Aceites. 51: 244-50.

Morton, D.B. and Bruce, S.G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. J. Reprod. Fertil. Suppl. 39: 311-6.

Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D. and Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 57: 1695-1706.

Moustacas,V.S., Zaffalon, F.J., Lagares, M.A., Loaiza-Eccheverria, A.M., Varago, F.C., Neves, M.M., Heneine, L.G.D., Arrudab, R.P., Henry, M. 2010. Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. Theriogenology. 75: 300–7.

Paasch, U., Grunewald, S., Wuendrich, K., Jope, T. and Glander, H.J. 2005. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. Asian. J. Androl. 7(1): 61–9.

Pace, M.M., Graham, E.F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39: 1144–9.

Pena, F.J., Saravia, F., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodriguez, M.H. 2005. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. Int. J. Androl. 28: 107–14.

Pena, F.J., Nunez-Martinez, I. and Moran, J.M. 2006. Semen technologies in dog breeding: an update. Anim. Reprod. Dom. 41(Suppl.2): 21-9.

Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., Linde Forsberg, C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. Theriogenology. 62: 1498-1517.

Powrie, W.D. and Nakai, S. 1986. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O.J. (eds.) Egg Science and Technology. 97-139.

Rota, A., Ström, B. and Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4ºC. Theriogenology. 44: 885-900.

Said, T.M., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.J., Thomas, A.J., Jr. and Paasch, U. 2006. Selection of non-apoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: An in-vitro model. Biol. Reprod, 74: 530-507.

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 1995. Storage of ram semen. Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review). Anim. Reprod. Sci. 37: 185-249.

Salgueiro, C.C.M., Nunes, J.F., Oliveira, K.P.L., Vieira, V.L., Gondim, J.M., Mateos-Rex, E. 2002. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl. 5: 96-8.

Sampaio Neto, J.C., Salgueiro, C.C.M., Mateos-Rex, E., Nunes, J.F. 2002. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do semen eqüino. Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl. 5: 137-39.

Shahiduzzaman, A.K.M. and Linde-Forsberg, C. 2007. Induced immotility during long-term storage at 5°C does not prolong survival of dog spermatozoa. Theriogenology. 68: 920-33.

Shenga, E., Singh, R.P., Yadav, A.S. 2010. Effect of pasteurization of shell egg on its quality characteristics under ambient storage. J. Food. Sci. Technol. 47(4): 420–5.

Thomas, J., Kirsten, D. and Waldemar, T. 2008. Preserving functional properties of hen's egg yolk during freeze-drying. Journal of food engineering. 87: 522-6.

Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Ito, T. and Kawakami, E. 2000. Effects of orvus ES paste on canine spermatozoal longetivity after freezing and thawing. J. Vet. Med. Sci. 62: 533-35.

Varela junior, A.S., Corcini, C.D., Ulguim, R.R., Alvarenga, M.V., Bianchi, I., Correa, M.N., Lucia, T.Jr. and Ceschamps, J.C. 2009. Anim. Reprod. sci. 115(1-4): 323-7.

Volpe, S., Leoci, R., Aiudi, G. and Lacalandra, G.M. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. Reprod. Dom. Anim. 44(Suppl. 2): 275-8.

Witte, T.S., Schafer-Somi, S., Kuchar, A., Mostl, E., Iben, C. and Aurich, C. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 110: 293-305.

Zini, A., Zhang, X. and Gabriel, M.S. 2008. Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. Asian. J. Androl. 10 (6): 865–71.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. หลอดเก็บน้ำเชื้อชนิดมีขีดบอกปริมาตร
2. พาสเจอร์ไปเปตพลาสติก สำหรับดูดตัวอย่างน้ำเชื้อ
3. หลอดพลาสติกบรรจุน้ำเชื้อ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
4. ปิเปตทิป ขนาด 10,20-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
5. สไลด์แก้วและแผ่นปิดสไลด์
6. แร็ค สำหรับวางหลอดทดลอง
7. หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (Eppendrof)
8. ถุงมือยาง
9. กรวยแก้วสำหรับรองรีดน้ำเชื้อ
10. กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์
11. ตู้ควบคุมความเย็น
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง
13. อ่างอุ่น
14. สารเคมีสำหรับเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อ
15. เครื่อง flow cytometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บข้อมูลในการทดลอง เก็บข้อมูลโดยใช้ตารางรวบรวมข้อมูล (Dummy table) ดังนี้

ตารางเก็บข้อมูลลักษณะของตัวอสุจิ คุณภาพของตัวอสุจิ ในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นในช่วงเวลาที่ต่างกัน

Date…… n=……

Semen Profile

Fresh: (Dog1)

Name……Age……Breed……

Volume……Color……pH……Concentration……

Total number of sperm count……Viability……..

Motility……

Morphology:

Head: Normal……Narrow……Narrow at the base……

Pear-shape……Giant, broad, round……..Abnormal contour……

Undeveloped……..Abaxial……Loose……

Tail: Normal……..Distal droplet……Simple bent tail……

Coil tail……Abnormal midpiece……..Acrosome defect……

Pouch form……Loose……

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fresh: (Dog2)

Name…….Age……Breed……

Volume……Color……pH……Concentration……

Total number of sperm

count……Viability……..

Motility……

Morphology:

Head: Normal……Narrow……Narrow at the base……

Pear-shape……Giant, broad, round……..Abnormal contour……

Undeveloped……..Abaxial……Loose……

Tail: Normal……..Distal droplet……Simple bent tail……

Coil tail……Abnormal midpiece……..Acrosome defect……

Pouch form……Loose……

Fresh: (Dog3)

Name…….Age……Breed……

Volume……Color……pH……Concentration……

Total number of sperm

count……Viability……..

Motility……

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Morphology:

Head: Normal……Narrow……Narrow at the base……

Pear-shape……Giant, broad, round……..Abnormal contour……

Undeveloped……..Abaxial……Loose……

Tail: Normal……..Distal droplet……Simple bent tail……

Coil tail……Abnormal midpiece……..Acrosome defect……

Pouch form……Loose……

Chilled: (group1)

Time	Motility+Progressive	Viability	Acrosome integrity	Apoptosis detection	Mitochondrial activity
3 hours					
48 hours					
96 hours					
7 days					
10 days					

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chilled: (group2)

Time	Motility+Progressive	Viability	Acrosome integrity	Apoptosis detection	Mitochondrial activity
3 hours					
48 hours					
96 hours					
7 days					
10 days					

Chilled: (group3)

Time	Motility+Progressive	Viability	Acrosome integrity	Apoptosis detection	Mitochondrial activity
3 hours					
48 hours					
96 hours					
7 days					
10 days					

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรัทยา ประสมทรัพย์ เกิดวันที่ 13 มิถุนายน พ.ศ.2528 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย