คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของตัวอสุจิรูปร่างผิดปกติที่เก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อแมว

นางสาวกนกวรรณ ธรรมประดิษฐ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์-เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

Frozen-thawed quality of morphologically abnormal epididymal and ejaculated cat sperm

Miss Kanokwan Thammapradit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of 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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของตัวอสุจิรูปร่างผิดปกติที่เก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อแมว
โดย	นางสาวกนกวรรณ ธรรมประดิษฐ์
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุดสรร ศิริไวทยพงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุกัญญา มณีอินทร์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กนกวรรณ ธรรมประดิษฐ์ : คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของตัวอสุจิรูปร่างผิดปกติที่เก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อแมว. (Frozen-thawed quality of morphologically abnormal epididymal and ejaculated cat sperm) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: น.สพ. ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. สพ.ญ. ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์, 46 หน้า.

สัตว์ป่าตระกูลแมวมีการสร้างน้ำเชื้อที่มีอสุจิรูปร่างผิดปกติในสัดส่วนที่มากกว่าอสุจิรูปร่างปกติ และอสุจิรูปร่างผิดปกติจะถูกคัดทิ้งก่อนได้รับการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งและก่อนการทำเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การปฏิสนธินอกร่างกาย (ไอวีเอฟ และอิ๊กซี่) ทำให้มีการสูญเสียสารพันธุกรรมของสัตว์ตระกูลนี้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์คือ 1) ประเมินประสิทธิภาพของการปั่นแยกชั้นเดียว (single-layer centrifugation, SLC) ในการแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ 2) เพื่อประเมินคุณภาพของตัวอสุจิที่รูปร่างผิดปกติก่อนการแช่แข็งและภายหลังการแช่แข็งที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและจากการเก็บจากอิพิดิไดมิส และ3) เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพตัวอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติก่อนแช่แข็งและภายหลังแช่แข็งที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและจากเก็บจากอิพิดิไดมิส โดยใช้ตัวอย่างอสุจิจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสจากแมวบ้าน 12 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างเก็บจากอิพิดิไดมิส 4 ชิ้น และจากการรีดน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นไฟฟ้าจากแมว 26 ตัว และทำการแยกเซลล์ด้วยเทคนิค SLC เมื่อได้อสุจิรูปร่างปกติและผิดปกตินำมาประเมินคุณภาพและแยกเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง และทำการการละลายเพื่อตรวจคุณภาพอีกครั้ง ผลที่ได้พบว่าการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ในตัวอย่างอสุจิรูปร่างปกติจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่า recovery rate เท่ากับ 31.0 ± 23.0 และ 30.8 ± 20.6 (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ตามลำดับ ส่วนร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และคุณภาพอสุจิดีขึ้นในส่วนของรูปร่างหาง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของอสุจิรูปร่างปกติ มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างผิดปกติ ($p < 0.05$) และอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อยังมีรูปร่างส่วนหัวปกติที่สูงกว่า ($p < 0.05$) และหลังจากการแช่แข็งและจากการละลายพบว่าอสุจิรูปร่างปกติยังคงมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และรูปร่างส่วนหางปกติที่สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากทั้งสองแหล่ง ความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมของอสุจิทั้งจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างในอสุจิทั้ง 2 กลุ่ม ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงของการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังจากการแช่แข็งและการละลายพบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติพบว่ามีค่ามากกว่าอสุจิรูปร่างปกติ ($p < 0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่า SLC สามารถคัดแยกความแตกต่างเรื่องการเคลื่อนที่ รูปร่างส่วนหาง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมได้ และอสุจิรูปร่างผิดปกติสามารถเก็บรักษาโดยกระบวนการแช่แข็งได้ ถึงแม้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของอะโครโซมลดลงอย่างมาก ($p < 0.05$)

ภาควิชา	สูติศาสตร์-เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5575301131 : MAJOR THERIOGENOLOGY
KEYWORDS: CAT / FREEZING SEMEN / SPERM

KANOKWAN THAMMAPRADIT: FROZEN-THAWED QUALITY OF MORPHOLOGICALLY ABNORMAL EPIDIDYMAL AND EJACULATED CAT SPERM. ADVISOR: SUPPAWIWAT PONGLOWHAPAN,PH.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KAYWALEE CHATDARONG,PH.D., 46 pp.

Feline semen samples that contain high number of morphologically abnormal sperm are discarded from semen freezing protocol and biotechnology i.e. IVF and ICSI. This may lead to a loss of genetic materials. The aims of study were 1) to evaluate the efficiency of single-layer centrifugation (SLC) to separate morphologically normal and abnormal sperm 2) to compare frozen-thawed quality of normal and abnormal versus ejaculated and epididymal spermatozoa and 3) to evaluate the quality of morphologically abnormal ejaculated and epididymal spermatozoa following freezing-thawing. Twelve unit samples; each contained sperm from the caudal epididymis of four cats and thirteen ejaculated sperm samples; each collected from two cats were studied and to separate morphologically normal and abnormal sperm by SLC and follow frozen – thawed process. Sperm quality was evaluated; head and tail morphology, sperm membrane integrity, acrosome integrity and DNA integrity, after centrifugation and freezing and thawing. After SLC, the normal morphologically epididymal and ejaculated spermatozoa had recovery rate of 31.0 ± 23.0 and 30.8 ± 20.6 (mean ± SD), respectively and improved total motility (TM), progressive motility (PM), tail morphology, integrity of sperm membrane and acrosome than abnormal ones ($p < 0.05$). Moreover, the normal morphologically ejaculated spermatozoa had better normal head morphology ($p < 0.05$). After thawing, TM, PM, and normal tail of normal morphologically epididymal and ejaculated ones except intact sperm membrane and acrosome were higher than abnormal ones ($p < 0.05$). However, DNA integrity of normal morphologically epididymal and ejaculated spermatozoa did not differ from abnormal morphologically spermatozoa after SLC and thawing ($p > 0.05$). In conclusion, SLC was efficient at separating morphologically normal/abnormal spermatozoa of both sources, i.e. epididymal and ejaculated particularly tail morphology defect. Abnormal morphologically spermatozoa can be preserved following freezing and thawing protocol. However, TM, PM and intact plasma membrane and acrosome were significantly low ($p < 0.05$)

Department: Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Field of Study: Theriogenology
Academic Year: 2013

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอ.น.สพ.ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ.สพ.ญ.ดร. เกวลี ฉัตรณดรงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับการให้คำปรึกษาและคำแนะนำอย่างดีเสมอมา ขอขอบคุณสพ.ญ.ดร. ปวีณา ธุวนุติ ที่ให้ความรู้และคำปรึกษาในส่วนของการวิจัย ขอขอบคุณกองสัตวแพทย์สาธรณสุขที่อนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณสำนักอนุรักษ์วิจัยและการศึกษาองค์กรสวนสัตว์ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (computer assisted sperm analysis: CASA) ขอขอบคุณโรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและโรงพยาบาลสัตว์พลับพลาชัย ที่อนุเคราะห์สถานที่ให้การรีดน้ำเชื้อ ขอขอบคุณสพ.ญ.ณิโคล ศิริโศภิษฐ์ เมห์ล และสพ.ญ.วัลยา ทิพย์กันทา ที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดีในการรีดน้ำเชื้อและตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณสพ.ญ. ดวงกมล ภูพิชพงษ์ สพ.ญ.ศิริรักษ์ บัวพึ่ง สพ.ญ. นวรัตน์ ประไพวรรณ สพ.ญ. มรกต นันทไพฑูรย์ และ น.สพ. พรรษวุติ สุดใจดี ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการรีดน้ำเชื้อ ขอขอบคุณสพ.ญ. ธิติดา ภักดีเสน่หา น.สพ. ศิริชัย เตชะรุ่งชัยสกุล และน.สพ. เศรษฐ์ เชาวรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการติดต่อการเก็บตัวอย่างที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณผศ.น.สพ. ดร. ธีรวัตน์ ธาราศานิต สพ.ญ.เพราพิราส ภักดีดินแดน สพ.ญ.ชมนาท ทองกิตติ น.สพ.ณรงค์ ทิพย์ธนวัฒนะ ที่ให้คำปรึกษาและในการวิจัย ขอขอบคุณนางสาวจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีรบุตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดซื้ออุปกรณ์ทางการวิจัย ขอขอบคุณน.สพ.เนติ์ ตันประดิษฐ์ น.สพ. สฤษฏ์วิชญ์ ปัญญาบริบาลบ์ สพ.ญ. กาญจนรัตน์ มั่นคง สพ.ญ. ศราวณี ขันมณี สพ.ญ. พรรณธิภา บริกัปปกุล ที่ให้ปรึกษาในระหว่างเรียน ขอขอบคุณน.สพ.ดร.นัทธี เอมอินทร์ และ สพ.ญ. ดร. เอมอร โอฬารรัตนมณี ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในข้อมูลเรื่องสถิติ ขอขอบคุณน.สพ. พชร เพียรรอดวงษ์ เพื่อนร่วมเรียนด้วยกันมาจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัวที่ให้ความสนับสนุนในการศึกษาเล่าเรียนเป็นอย่างดีและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ขอขอบคุณนางสาว อารยา อัลเบอร์ต้า ฮาร์เกต ที่เป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด และขอขอพระคุณ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง 1
สารบัญรูป 3
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของโครงการ 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
พื้นหลังคุณลักษณะของสัตว์ตระกูลแมว 4
การเก็บน้ำเชื้อสัตว์ตระกูลแมว 5
การคัดแยกอสุจิในสัตว์ตระกูลแมว 6
การเก็บรักษาอสุจิ 8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10
การออกแบบการทดลอง 10
การเก็บน้ำเชื้อ 10
ก. จากการเก็บอิพิดิไดมิส 10
ข. จากการหลั่งน้ำเชื้อ 12
การเตรียมสารเคมี (Media) 12
การคัดแยกเซลล์โดยใช้วิธี SLC 13
วิธีการแช่แข็งและการละลาย 15
อัตราการถูกคัดเลือก (recovery rate) 15
อัตราการสูญเสีย (sperm loss) 16
การประเมินคุณภาพอสุจิ 16
ก. ความเข้มข้นอสุจิ รูปร่างอสุจิ และการเคลื่อนที่ 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ข. การประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรม 17
การวิเคราะห์ทางสถิติ 18
บทที่ 4 ผลการศึกษา 20
1. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ 20
1.1 คุณภาพน้ำเชื้อหลังจากการเก็บตัวอย่าง 20
1.2 คุณภาพอสุจิที่ได้จากการเก็บอิพิดิไดมิส (epididymal sperm) และจากการหลั่งน้ำเชื้อด้วยวิธีการรีดด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี SLC 20
1.2.1 ความเข้มข้น (concentration) และจำนวนอสุจิทั้งหมด (total sperm count) 21
1.2.2 ร้อยละการเคลื่อนที่ (percentage of motility) และ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility) 21
1.2.3 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity) 22
1.3 คุณภาพอสุจิที่ได้จากการเก็บอิพิดิไดมิส (epididymal sperm) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sperm) หลังการแช่แข็งและการละลาย 23
1.3.1 ร้อยละการเคลื่อนที่ (percentage of motility) และ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility) 23
1.3.2 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity) 25
2. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ 26
3. ประสิทธิภาพของ SLC ที่ใช้ในการคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ 27
บทที่ 5 การอภิปราย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ 31
1. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ 31
1.1 คุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติภายหลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี SLC 31

หน้า

1.2 คุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติภายหลังจากการแช่แข็งและการละลาย 32
2. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ 34
3. ประสิทธิภาพของ SLC ที่ใช้ในการคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ 35
สรุป 36
รายการอ้างอิง 38
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงร้อยละการเคลื่อนที่ ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ (ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ ก่อนและหลังการแยกด้วยsingle-layer centrifugation (SLC).....22

2 แสดงร้อยละอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (intact plasma membrane) อะโครโซมสมบูรณ์ (intact acrosome) และสารพันธุกรรมสมบูรณ์ (intact DNA) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติจากตัวอย่างที่เก็บจากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี single-layer centrifugation (SLC) 23

3 แสดงร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ (intact plasma membrane) อะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) และสารพันธุกรรมที่สมบูรณ์ (intact DNA) ของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) จากตัวอย่างที่เก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการแช่แข็งและการละลาย.....25

4 แสดงค่าการประเมินรูปแบบการเคลื่อนที่ของอสุจิ จากการตรวจด้วยcomputer assisted sperm analysis (CASA) โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่มีอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) จากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการแช่แข็งและละลาย.....26

5 ร้อยละการลดลงของอัตราเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample).....27

6 แสดงร้อยละความผิดปกติในส่วนหางรูปแบบต่างๆของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากคัดแยกเซลล์ด้วย single-layer centrifugation (SLC).....29

ตารางที่ หน้า

7 แสดงร้อยละความผิดปกติในส่วนหัวรูปแบบต่างๆของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี single-layer centrifugation (SLC).....30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

รูป หน้า

1 สัดส่วนร้อยละของอสุจิรูปร่างปกติในสัตว์ตระกูลแมว 23 ชนิด โดยแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E.M. และตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนสัตว์เพศผู้ที่ถูกประเมิน (Pukazhenthi et al., 2006).....5

2 แสดงแผนภาพวิธีดำเนินงานวิจัย.....11

3 แสดงก่อนและหลังการคัดแยกเซลล์ด้วย SLC.....14

4 แสดงร้อยละอัตราการคัดเลือก (recovery rate) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและส่วนอสุจิที่สูญหาย (sperm loss) ไประหว่างชั้นคอลลอยด์.....28

5 แสดงร้อยละอัตราการคัดเลือก (recovery rate) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและส่วนอสุจิที่สูญหาย (sperm loss) ไประหว่างชั้นคอลลอยด์.....28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการรายงานของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์หรือ CITES (CITES, 1973) สัตว์ตระกูลแมวที่มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 37 ชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) ยกเว้นตระกูลแมวบ้าน (domestic cat) ซึ่งถือได้ว่ามีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในสัตว์ตระกูลแมวทั้งหมดและเป็นเพียงชนิดเดียวในสัตว์ตระกูลนี้ที่ยังไม่ถูกจัดเป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำแมวบ้านมาเป็นรูปแบบในการทำวิจัยทางระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ (Donoghue et al., 1992; Wildt et al., 1992) โดยสามารถจำแนกสัตว์ตระกูลแมวออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของรูปร่างอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อคือ กลุ่มที่มีการสร้างตัวอสุจิที่ผิดปกติทางรูปร่างมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 60 เรียกว่า teratospermia ซึ่งร้อยละ 70 ของสัตว์ตระกูลนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มนี้ และอีกกลุ่มคือมีการสร้างตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติน้อยกว่าร้อยละ 40 เรียกว่า normospermia (Pukazhenthi et al., 2001)

การเก็บน้ำเชื้อในสัตว์ตระกูลแมวสามารถทำได้หลากหลายวิธีเช่นการใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) การรีดน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) หรือการสอดท่อปัสสาวะเก็บน้ำเชื้อโดยสารเคมี (medetomidine) กระตุ้น (chemical-induced urethral catheterization) (Axner, 2008; Zambelli et al., 2008) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บอสุจิที่มีชีวิตและเคลื่อนไหวได้จากอิพิดิไดมิสส่วนท้าย (caudal epididymis) หลังจากการทำหมันหรือเก็บตัวอย่างจากสัตว์ที่เพิ่งเสียชีวิต มีการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพอสุจิที่เก็บได้จากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาแช่แข็งและการละลาย พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันในตัวแปรต่างๆเช่น การเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรูปร่างของสุจิ (Tebet et al., 2006) การเก็บตัวอย่างจากอิพิดิไดมิสส่วนท้าย พบว่ามีจำนวนอสุจิที่ผิดปกติ (abnormal sperm) และอสุจิที่ตายแล้ว (dead sperm) จำนวนมากอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับสิ่งปนเปื้อนอื่นๆเช่น เยื่อบุผิวเซลล์ (epithelium) เซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) เม็ดเลือดขาว (white blood cell) แบคทีเรีย และเศษเซลล์ (cell debris) เป็นที่ทราบกันดีว่าสิ่งปนเปื้อนเหล่านั้นสามารถผลิตสารอนุมูลอิสระ (reactive oxidative stress หรือ ROS) ซึ่งมีผลทำให้การคุณภาพของการปฏิสนธิด้อยลง (Nichi et al., 2007) และมีการรายงานการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุนัขที่มีการปนเปื้อนของเลือดหลังจากการเก็บน้ำเชื้อโดยการหลั่ง พบว่าคุณภาพของอสุจิสุนัข เช่น การเคลื่อนที่

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงภายหลังการแช่แข็งและการละลาย (Rijsselaere et al., 2004) นอกจากนี้ของเหลวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อหรือ seminal plasma ที่สร้างจากต่อมเพศ (accessory sex gland) ที่หลั่งออกมาพร้อมตัวอสุจิขณะการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculation) โดยส่วนประกอบในของเหลวดังกล่าวมีปัจจัยที่ไปขัดวางหรือยับยั้งความสามารถของอสุจิ เช่น decapacitation factor (Oliphant et al., 1985; Boue et al., 1996) และ sperm motility inhibiting ทำให้มีผลต่อความอยู่รอดของอสุจิ เหตุนี้เองจึงมีการนำเทคนิกการคัดแยกเซลล์ (cell separation) เพื่อคัดแยกอสุจิที่รูปร่างปกติ เคลื่อนที่ได้ และมีชีวิตออกจากสิ่งปนเปื้อนดังกล่าว เทคนิคนี้มีการใช้ในสัตว์หลายชนิดรวมถึงแมวบ้าน (Chatdarong et al., 2010b) เทคนิคการคัดแยกเซลล์มีหลากหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันออกไป เช่น วิธี swim-up เป็นวิธีการที่ใช้คัดเลือกอสุจิรูปร่างปกติและเคลื่อนที่ได้ โดยอสุจิที่คุณสมบัติดังกล่าวจะว่ายขึ้นมาด้านบน แต่มีข้อเสียคือวิธีการนี้จะได้จำนวนของอสุจิและอัตราการคัดเลือกอสุจิ (recovery rate) น้อยเพียงร้อยละ 10-20 (Hallap et al., 2004) การใช้สารเคมี Percoll หรือ Accudenz โดย Percoll ไม่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) เพราะว่าสารนี้มีการปนเปื้อนของ endotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิเสียหายและอาจเป็นสารก่อมะเร็งหากนำไปใช้ต่อไป ในขณะที่ Accudenz ได้การยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) ให้ใช้ในสัตว์ได้ และพบว่าหลังจากการใช้สารตัวนี้ให้การคัดเลือกอสุจิ คุณภาพของการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร Percoll (Marco et al., 1996) แต่สาร Accudenz ยังมีข้อจำกัดในเรื่องเทคนิคของการเตรียมสารเพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและได้ปริมาณของอสุจิที่จะนำมาใช้ต่อได้น้อย เนื่องจากมีการสูญเสียอสุจิไปในขั้นตอนการเก็บภายหลังการปั่นแยกจำนวนมาก ในปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่นำเข้าใช้ในการคัดแยกเซลล์โดยใช้ single-layer centrifugation (SLC) เป็นการใช้เทคนิคแยกเซลล์ผ่านสารคอลลอยด์โดยใช้หลักการปั่นเหวี่ยงตามความหนาแน่นของสาร (conventional density gradient centrifugation) (Morrell et al., 2008) จากการศึกษาพบว่า SLC ที่ใช้ในการคัดแยกเซลล์ในน้ำเชื้อม้า ทำให้คุณภาพของอสุจิดีขึ้นหลังการแช่แข็งและการละลาย (Morrell et al., 2009) และเมื่อใช้ในการคัดแยกเซลล์ในน้ำเชื้อวัวภายหลังการแช่แข็งและการละลายพบว่าความสามารถในการปฏิสนธิดีขึ้น (Thys et al., 2009) ส่วนในแมวบ้านมีการใช้ SLC ในตัวอย่างอสุจิที่เก็บจากอิพิดิไดมิส พบว่าสามารถแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติได้ คุณภาพของอสุจิที่เก็บดีขึ้นในส่วนของรูปร่าง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity) เช่นเดียวกับวิธี swim-up แต่อย่างไรก็ตาม recovery rate หลังจากคัดแยกเซลล์ด้วย SLC ดีกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี swim-up (Chatdarong et al., 2010b).

เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำเชื้อของสัตว์ตระกูลแมวมีอสุจิรูปร่างผิดปกติอยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะในบางสายพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการเก็บรักษาสารพันธุกรรมโดยขบวนการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติจำนวนมากจะถูกทิ้งไป ไม่นำมาเก็บรักษาไว้ ซึ่งทำให้สูญเสียสารพันธุกรรมไปโดยไม่เกิดประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ของการแช่แข็งอสุจิรูปร่างผิดปกติเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติ โดยทำการคัดแยกรูปร่างอสุจิก่อนเข้าสู่การเก็บรักษาแช่แข็งผ่านเทคนิคการคัดแยกเซลล์ด้วย SLC

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพตัวอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติก่อนแช่แข็งและภายหลังแช่แข็งที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและจากเก็บจากอิพิดิไดมิส

2.เพื่อประเมินคุณภาพของตัวอสุจิที่รูปร่างผิดปกติก่อนการแช่แข็งและภายหลังการแช่แข็งที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและจากการเก็บจากอิพิดิไดมิส

3.เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ single-layer centrifugation ที่ใช้แยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางพัฒนาการเก็บรักษาอสุจิที่รูปร่างผิดปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและจากการเก็บจากอิพิดิไดมิส เพื่อเป็นการเก็บพันธุกรรมของสัตว์ในตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ให้เป็นประโยชน์สูงสุดโดยอาจนำไปศึกษาเพื่อใช้ในการปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

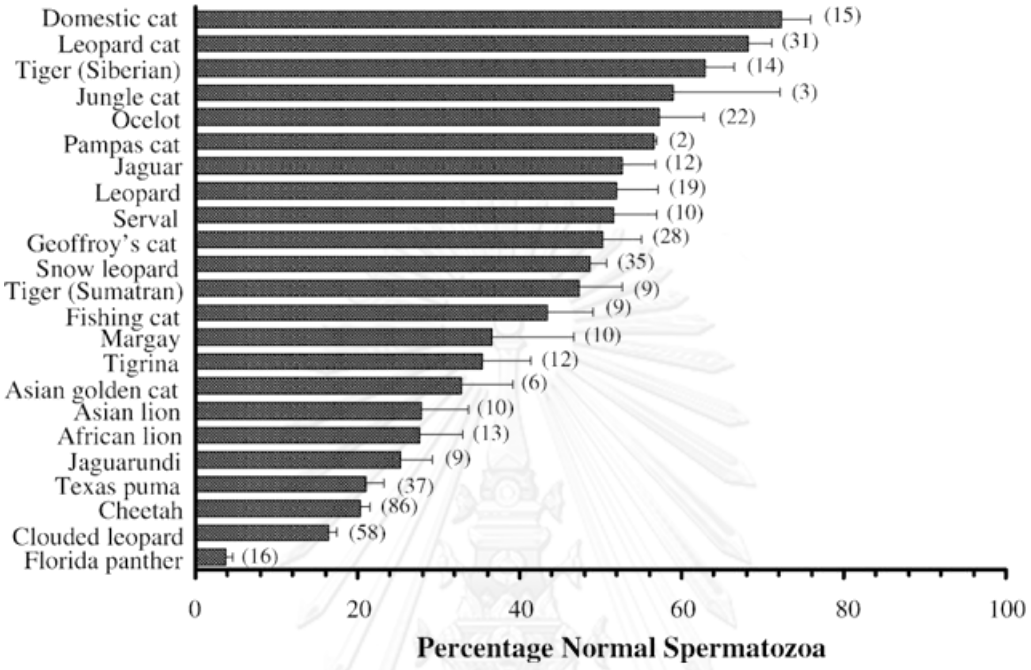
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พื้นหลังคุณลักษณะของสัตว์ตระกูลแมว

สัตว์ตระกูลแมวป่ามีสมาชิกทั้งหมด 37 ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ ยกเว้นแมวบ้าน จากการรายงานของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์หรือ CITES มีการศึกษาถึงคุณลักษณะของน้ำเชื้อในสัตว์ตระกูลนี้พบว่ามีการสร้างอสุจิที่รูปร่างผิดปกติในสัดส่วนที่มากกว่าอสุจิที่รูปร่างปกติ ดังภาพที่ 1 หากมีการสร้างอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติมากกว่าร้อยละ 60 จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ teratospermia แต่ในทางกลับกันหากมีการสร้างอสุจิรูผิดปร่างปกติน้อยว่าร้อยละ 40 จะอยู่ในกลุ่มของ normospermia (Pukazhenthi et al., 2001) การที่สัตว์ตระกูลนี้มีการสร้างอสุจิรูปร่างผิดปกติเป็นจำนวนมาก เป็นผลมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง เนื่องจากมีการผสมพันธุ์ด้วยเชื้อสายที่ใกล้ชิด (inbreeding) เป็นสิ่งที่กังวลที่จะเกิดขึ้นในสัตว์ตระกูลแมวป่า (Luvoni et al., 2003) ซึ่งเป็นปัญหาหลักของสัตว์ตระกูลนี้ที่มีผลกระทบและนำไปสู่ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ หรือ ผสมไม่ติด (infertility) และความไม่สมบูรณ์พันธุ์แบบเงียบ (subfertility) (Wildt, 1994) ในมนุษย์ก็มีปัญหาเช่นเดียวกับสัตว์ตระกูลนี้ คือมนุษย์ที่มีภาวะไม่สมบูรณ์พันธุ์หรือเป็นหมัน (infertility) ร้อยละ 78 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม teratospermic ซึ่งเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้ความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิด้อยลง (Ali and Grimes, 1989)

ในปัจจุบันเรื่องของเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์เข้ามามีบทบาทอย่างมาก เช่นการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization หรือ IVF) และการทำอิ๊กซี่ (intracytoplasmic sperm injection หรือ ICSI) โดยกระบวนการเหล่านี้จำเป็นต้องทำการคัดเลือกตัวอสุจิที่มีคุณภาพดี รูปร่างปกติก่อนเข้าสู่กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยอสุจิรูปร่างผิดปกติหรือที่มีการสร้างไม่สมบูรณ์จะถูกคัดออกก่อนเข้าสู่กระบวนการของเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากข้อบกพร่องของความผิดปกติด้านรูปร่างของเซลล์ ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิ และจากการศึกษาพบว่าอสุจิรูปร่างปกติจากแมวตัวผู้ที่อยู่ในกลุ่มของ teratospermia ก็ลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ลดความสามารถในการยึดและแทรกผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (zona pellucida) และลดความสามารถในการเข้าไปรวมกับเซลล์ไข่เช่นกัน (Pukazhenthi et al., 2001) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสัตว์ตระกูลนี้มีข้อจำกัดด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำนวนสัตว์ การคัดทิ้งน้ำเชื้อที่มีอสุจิรูปร่างผิดปกติมากทิ้งไป อาจเป็นการลดความหลากหลายทางพันธุกรรมลง

อีก เทคนิคการคัดแยกเซลล์อสุจิที่มีรูปร่างปกติและผิดปกติออกจากกันจึงเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างมากสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ เพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ในสัตว์ตระกูลแมว



รูปภาพที่ 1 สัดส่วนร้อยละของอสุจิรูปร่างปกติในสัตว์ตระกูลแมว 23 ชนิด โดยแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E.M. และตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนสัตว์เพศผู้ที่ถูกประเมิน (Pukazhenthi et al., 2006)

การเก็บน้ำเชื้อสัตว์ตระกูลแมว

การเก็บน้ำเชื้อในสัตว์ตระกูลแมวสามารถทำได้หลากหลายวิธี อาทิเช่น การใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) การรีดน้ำเชื้อผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) และการสวนท่อสวนปัสสาวะเพื่อเก็บน้ำเชื้อ (urethral catheterization) ภายใต้การวางยาในกลุ่มแอลฟ่าทูอะดรีเนอจิก อะโกนิส (medetomidine) นอกจากนี้การเก็บน้ำเชื้อสามารถทำได้โดยการเก็บจากส่วนท้ายของอิพิดิไดมิส ภายหลังการทำหมันหรือหลังจากสัตว์เสียชีวิตทันที เทคนิคการเก็บน้ำเชื้อแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน เช่นการเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) เป็นวิธีปลอดภัยเนื่องจากไม่ต้องมีการใช้สารเคมีใดๆเพื่อวางยาหรือต้องบังคับสัตว์ แต่ไม่เหมาะสมกับสัตว์ที่ดุร้าย หวาดกลัวหรือสัตว์ตระกูลแมวป่าอื่นๆ เช่นเสือ แมวดาว เป็นต้น อีกทั้งวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้แมวเพศเมียที่แสดงอาการเป็นสัดมากระตุ้น อัตราความสำเร็จของวิธีนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะจิตใจของแมว

เพศผู้ (Sojka et al., 1970) การรีดน้ำเชื้อด้วยวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เก็บน้ำเชื้อในสัตว์ตระกูลแมว เพราะวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องมีการฝึกในสัตว์มาก่อน และสามารถทำได้ในสัตว์เพศผู้ทุกตัวแต่จำเป็นต้องวางยาสลบก่อนทำการรีดน้ำเชื้อ หากแต่ต้องเตรียมอุปกรณ์เฉพาะและสัตว์อาจมีความเสี่ยงจากการวางยาสลบ ในปัจจุบันวิธีการสอดท่อสวนปัสสาวะเพื่อเก็บน้ำเชื้อ (urethral catheterization) หลังจากการวางยาด้วย medetomidine โดยตัวยานี้มีผลทำให้อสุจิเคลื่อนตัวออกมาจากอิพิดิไดมิสส่วนท้ายไปตามท่อนำน้ำเชื้อเข้ามาอยู่ในท่อปัสสาวะส่วนต้น เมื่อใช้ในยาในขนาด 130 ถึง 140 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Zambelli et al., 2007) มีการรายงานว่าประสบความสำเร็จและเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นทางเลือกในการเก็บน้ำเชื้อในแมวบ้าน (domestic cat) (Zambelli et al., 2008) ส่วนการเก็บน้ำเชื้อจากอิพิดิไดมิสส่วนท้ายหลังจากการทำหมันหรือหลังจากสัตว์ที่เพิ่งเสียชีวิต วิธีนี้มักใช้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อทำในการวิจัย และเพื่อเป็นการรักษาพันธุกรรมสำหรับสัตว์ตระกูลแมวป่าหลังจากสัตว์เสียชีวิตกระทันหัน ตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บได้จากส่วนของอิพิดิไดมิส มักจะปนเปื้อนด้วยเยื่อบุเซลล์ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว แบคทีเรีย และเศษเซลล์ต่างๆ ซึ่งสิ่งที่ปนเปื้อนมาเหล่านี้รวมถึงอสุจิที่รูปร่างผิดปกติและอสุจิที่ตายแล้ว มีการรายงานว่าสิ่งปนเปื้อนต่างๆเหล่านี้สามารถผลิตสารอนุมูลอิสระ (ROS) เป็นผลทำให้อสุจิมีความสามารถในการปฏิสนธิลดลงและมีคุณภาพด้อยลง (Nichi et al., 2007) นอกจากสิ่งปนเปื้อนเหล่านั้น ของเหลวที่อยู่ในน้ำเชื้อหรือ seminal plasma ที่สร้างจากต่อมเพศ โดยจะหลั่งออกมาระหว่างการรีดน้ำเชื้อ พบว่าในของเหลวเหล่านั้น มีปัจจัยหลายปัจจัยที่ไปขัดวางหรือยับยั้งความสามารถของอสุจิ ตัวอย่างเช่น decapacitation factor โดยไปยึดกับตัวอสุจิ และ เช่นเดียวกันมีปัจจัยบางปัจจัยที่คอยส่งเสริมในการทำหน้าที่ของอสุจิ (Oliphant et al., 1985) อีกทั้งยังมีปัจจัยบางตัวเช่น sperm motility inhibiting factor ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ภายนอกสิ่งมีชีวิต เช่น การทำ IVF และนอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีผลเสียต่อการอยู่รอดของตัวอสุจิเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน (Hammadeh et al., 2008) ดังนั้นการคัดแยกเซลล์จึงมีบทบาทสำคัญและมีความจำเป็นที่จะนำมาใช้คัดแยกเซลล์ก่อนเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาอสุจิด้วยวิธีการแช่แข็งและก่อนเข้าสู่กระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

การคัดแยกอสุจิในสัตว์ตระกูลแมว

เป็นที่ทราบกันดีว่าสัตว์ตระกูลแมวมีการสร้างอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการคัดเลือกอสุจิจึงมีบทบาทสำคัญต่อสัตว์ตระกูลนี้เป็นอย่างมาก การคัดแยกเซลล์เป็นวิธีที่ช่วยคัดเลือกแต่อสุจิที่คุณภาพดี เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์

(reproductive biotechnology) เช่นการทำปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF) และการทำอิ๊กซี่ (ICSI) ซึ่งมีความต้องการใช้เพียงเซลล์ของอสุจิที่ปกติปราศจากของเหลวที่เป็นองค์ประกอบของน้ำเชื้อ (seminal plasma) เศษเซลล์ และเม็ดเลือดแดง (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2009). ถึงแม้มีการศึกษาพบว่าการทำ IVF โดยใช้อสุจิจากแมวบ้านกลุ่ม normospermia จะให้อัตราการปฏิสนธิที่สูงกว่าใช้อสุจิจากแมวบ้านกลุ่ม teratospermia อีกทั้งความสมบูรณ์ของโครมาติน (chromatin integrity) ของแมวบ้านกลุ่ม teratospermic ยังมีคุณภาพน้อยกว่า แต่ผลของการทำอิ๊กซี่ (ICSI) ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบในแมวบ้านทั้ง 2 กลุ่ม (Penfold et al., 2003) ด้วยเหตุนี้จึงมาความเป็นไปได้ที่จะนำเอาอสุจิรูปร่างผิดปกติไปใช้ประโยชน์ต่อไปเช่นเดียวกับอสุจิรูปร่างปกติภายหลังการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง

จากการศึกษาการคัดแยกเซลล์จากอดีตจนถึงปัจจุบัน มีหลากหลายวิธีที่สามารถทำได้โดย วิธีแรกที่จะกล่าวถึงคือวิธี swim-up เป็นวิธีทีที่ใช้สำหรับการคัดเลือกอสุจิที่มีรูปร่างปกติและสามารถเคลื่อนที่ได้ หลักการคืออสุจิที่มีชีวิตและเคลื่อนที่ได้จะเคลื่อนที่ไปด้านบน วิธีการนี้ยึดหลักความสามารถของอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่ได้เป็นการคัดเลือกที่ยึดเกี่ยวกับรูปร่างของหัวที่ปกติ ความสมบูรณ์ของโครมาติน หรือ การมีชีวิตของอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Somfai et al., 2002) วิธีการนี้ให้ผลร้อยละของการเคลื่อนที่ของอสุจิและรูปร่างปกติของอสุจิที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการชะล้างอสุจิธรรมดา (simple sperm washing) (Howard et al., 1993) ข้อเสียของวิธีนี้คือได้อสุจิปริมาณค่อนข้างน้อย โดยมี recovery rate เพียงร้อยละ 10 ถึง 20 (Hallap et al., 2004) จึงไม่เป็นที่นิยมในการปฏิบัติสำหรับเตรียมเพื่อที่จะผสมเทียมในสัตว์บางชนิด มีการรายงานว่าอสุจิที่ได้จากการใช้สารคัดเลือกตามความหนาแน่นเมื่อใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (density gradient centrifugation) จะให้ผลดีกว่าการใช้วิธีคัดเลือกแบบ swim-up (Serafini et al., 1990) การคัดเลือกตามความหนาแน่นเมื่อใช้ density gradient centrifugation สารที่ใช้ในวิธีนี้คือ Percoll และ Accudenz โดยสามารถแยกอสุจิที่เคลื่อนที่ รูปร่างปกติ และสารโครมาตินที่สมบูรณ์ได้ (Morrell, 2006) และเทคนิคนี้ยังมีการรายงานใช้ในการคัดแยกเซลล์ในน้ำเชื้อมนุษย์พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย (Nicholson et al., 2000) และไวรัส (Englert et al., 2004; Loskutoff et al., 2005; Morrell and Geraghty, 2006) ได้อีกด้วย แต่ได้ recovery rate น้อย (Rodriguez-Martinez et al., 1997; Morrell et al., 2005) นอกจากนี้สาร Percoll ยังไม่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) เพราะว่าสารนี้สร้างสารที่เป็นพิษต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิทำให้เกิดความเสียหายได้ ในขณะที่ Accudenz มีการรายงานว่าได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) ให้ใช้ได้ในสัตว์และทำให้คุณภาพของอสุจิดีขึ้น ในส่วนของการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร Percoll (Marco et al., 1996) และในปัจจุบันมีการพัฒนาสารที่ใช้ในการคัดเลือกอสุจิขึ้นมาใหม่ โดยเป็นการใช้สารคอลลอยด์เป็นตัวแยก ซึ่งขั้นตอนทำ

การค่อนข้างง่ายว่าการใช้ Percoll และ Accudenz โดยใช้สารคอลลอยด์เพียงชั้นเดียวในการปั่นเหวี่ยง หรือเรียกว่าวิธี single-layer centrifugation หรือ SLC สารคอลลอยด์ที่ใช้คือ silica colloids (Morrell et al., 2008) โดยสารคอลลอยด์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อชนิดสัตว์ จากการรายงานการใช้วิธี SLC ในการคัดแยกน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งในม้า พบว่าสามารถคัดเลือกประชากรส่วนน้อยของอสุจิที่ยังมีคุณภาพดี (Morrell et al., 2009) โดยพบว่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้น (Macias Garcia et al., 2009b) และรูปร่างความผิดปกติส่วนหัวลดลง (Macias Garcia et al., 2009a) เช่นเดียวกับในวัวเพศผู้ (Thys et al., 2009) ส่วนในแมวบ้านมีการรายงานการศึกษาเปรียบเทียบวิธี swim-up กับวิธีชะล้างอสุจิแบบง่าย (simple sperm washing) พบว่าถึงแม้วิธี swim-up จะให้ผลร้อยละการเคลื่อนที่สูงกว่า (Howard et al., 1993) แต่ recovery rate ของอสุจิยังค่อนต่ำ และจากที่ทราบว่าสารคอลลอยด์ที่ใช้ในวิธี SLC มีความจำเพาะต่อชนิดสัตว์ จึงได้มีการคิดสูตรผสมคอลลอยด์ใหม่ที่เหมาะกับสัตว์ตระกูลนี้ โดยมีการศึกษาพบว่าเมื่อการคัดแยกอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสด้วยวิธี SLC ก่อนทำการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งกับวิธี swim-up พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลของคุณภาพอสุจิหลังจากการละลายดีขึ้นในด้านรูปร่าง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และสารพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามการวิธีคัดแยกเซลล์ด้วย SLC ให้ recovery rate ที่ดีกว่าวิธี swim-up (Chatdarong et al., 2010b)

การเก็บรักษาอสุจิ

การเก็บรักษาอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและเก็บจากอิพิดิไดมิสเป็นวิธีที่คงรักษาสารพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อทางเทคโนโลยีชีวภาพ แต่ในทางกลับกันการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งและการละลาย (frozen-thawed process) มีผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิไม่ว่าจะเป็นเรื่องความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity) (Mazur, 1984) แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลกระทบต่อคุณภาพอสุจิในแง่ต่างๆเหล่านั้น อาทิเช่น ภาวะช็อคของอสุจิด้วยความเย็น (cold shock) โดยความเย็นมีผลต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Pukazhenthi et al., 2001) แรงดันของสารละลายไหลผ่านเนื้อเยื่อ (osmotic pressure) (Watson, 2000) และสารอนุมูลอิสระต่างๆ oxidative stress (Aitken and Krausz, 2001)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าน้ำเชื้อของสัตว์ตระกูลแมวมีคุณลักษณะที่ประกอบด้วยอสุจิที่รูปร่างผิดปกติจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติ และมีเพียงอสุจิที่รูปร่างปกติเท่านั้นที่ถูกคัดเลือกในไปใช้ต่อในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเช่นการผสมเทียม (AI) การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (IVF) และการทำอิ๊กซี่ (ICSI) จึงเป็นเหตุให้มีการคัดทิ้งอสุจิรูปร่างผิดปกติไปโดยที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ใดๆ เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับสมาชิกสัตว์ตระกูลแมวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม teratospermia ทางคณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและเก็บจากอิพิดิไดมิสโดยทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง เพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปใช้ประโยชน์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

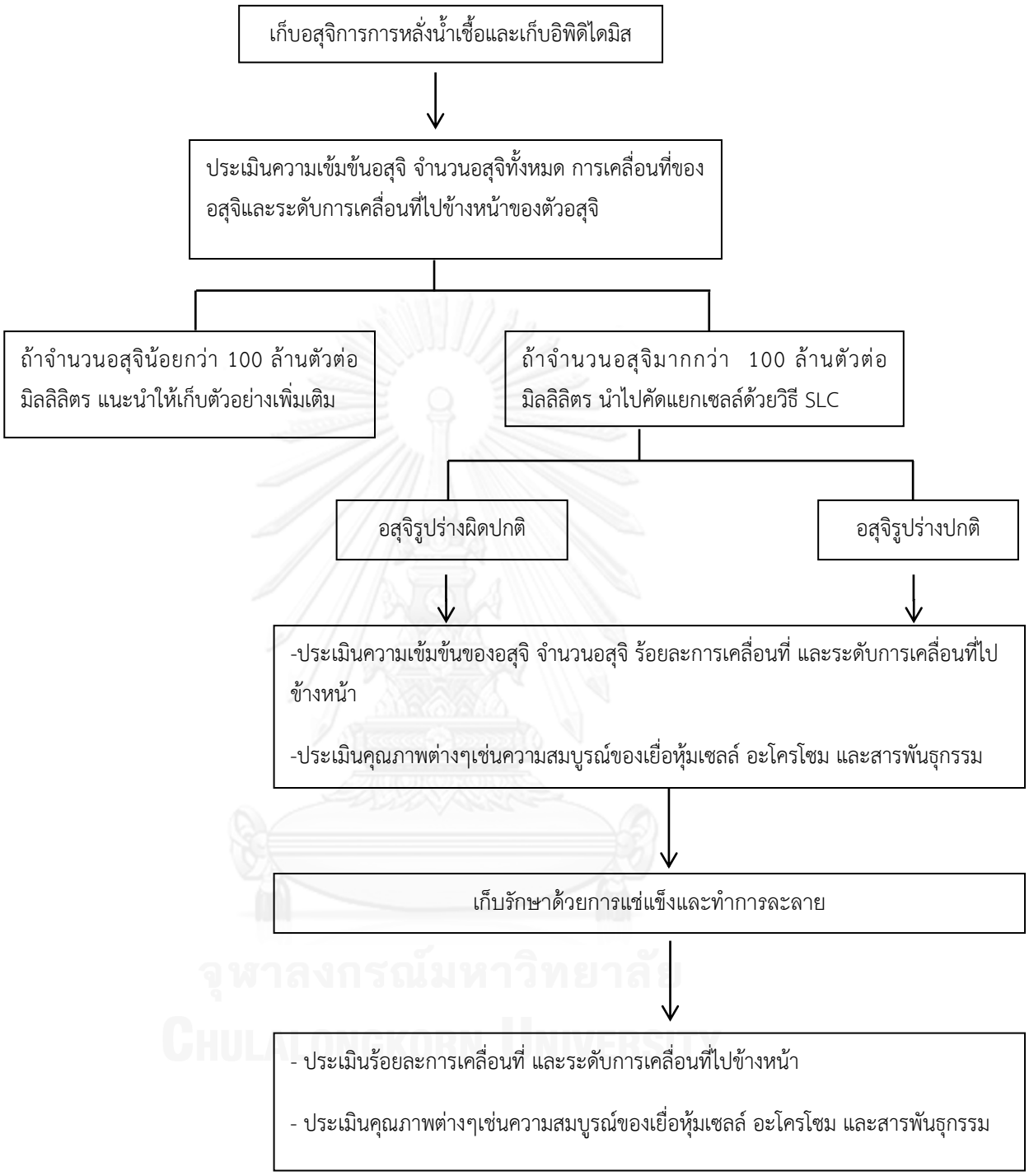
การออกแบบการทดลอง

ทำการเก็บอสุจิการการหลั่งน้ำเชื้อและเก็บอิพิดิไดมิสเพื่อประเมินความเข้มข้นอสุจิ จำนวนอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิและระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และตัวอย่างจะผ่านกระบวนการแยกเซลล์โดยใช้ single-layer centrifugation (SLC) เพื่อแยกอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิรูปร่างผิดปกติ โดยตัวอย่างทั้งสองจะถูกประเมินความเข้มข้นอสุจิ จำนวนอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ รูปร่างส่วนหัวและหางของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม หลังจากนั้นทำการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งตามขั้นตอนและภายหลังจากการแช่แข็งตัวอย่างทั้งสองจะถูกนำมาประเมินผลด้วยตัวแปรเดียวกันยกเว้นความเข้มข้นและจำนวนอสุจิ

การเก็บน้ำเชื้อ

ก. จากการเก็บอิพิดิไดมิส

การเก็บน้ำเชื้อทำได้โดยการเก็บตัวอย่างจากอิพิดิไดมิสภายหลังการทำหมันแมวตัวผู้สุขภาพดี (Chatdarong et al., 2010b) จากกองสัตวแพทย์สาธรณสุขและจากโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแต่ละตัวอย่างทำการรวมอสุจิที่ได้จากส่วนอิพิดิไดมิสจำนวน 4 ชิ้น ซึ่งทำได้โดยการตัดส่วนท้ายของอิพิดิไดมิสเป็นชิ้นเล็กๆใส่ในสารละลาย Tris buffer 1 มิลลิลิตร



รูปภาพที่ 2 แสดงแผนภาพวิธีดำเนินงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และนำตัวอย่างไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของอิพิดิไดมิสออกและทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในส่วนของความเข้มข้นอสุจิ จำนวนอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิก่อนการปั่นแยกเซลล์ SLC โดยการทำการทดลองซ้ำ 12 ครั้ง หมดรวมใช้อิพิดิไดมิสส่วนท้าย ทั้ง 48 ชิ้น

ข. จากการหลั่งน้ำเชื้อ

แมวที่ใช้ในการวิจัยเป็นแมวบ้านเพศผู้จำนวนทั้งหมด 26 ตัว โดยทำการรีดน้ำเชื้อ 2 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง อายุ 1-4 ปี มีเจ้าของและสุขภาพดี โดยแมวจะถูกทำการวางยาสลบด้วยยา medetomidine ขนาด 70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเคตามีน ไฮโดรคลอไรด์ (ketamine HCL) ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ทางกล้ามเนื้อ ก่อนการรีดน้ำเชื้อผ่านการกระตุ้นไฟฟ้าด้วยเครื่อง electro-ejeculation ตามการศึกษาของ Horward และคณะในปี 1990 เมื่อได้น้ำเชื้อจะมีการเติมปริมาณสารละลาย Tris buffer ในปริมาณที่เท่ากัน เพื่อคงรักษาสภาพของอสุจิหลังจากการรีด หลังจากนั้นทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในส่วนของความเข้มข้นอสุจิ จำนวนอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิก่อนการคัดแยกเซลล์ด้วย SLC

การเตรียมสารเคมี (Media)

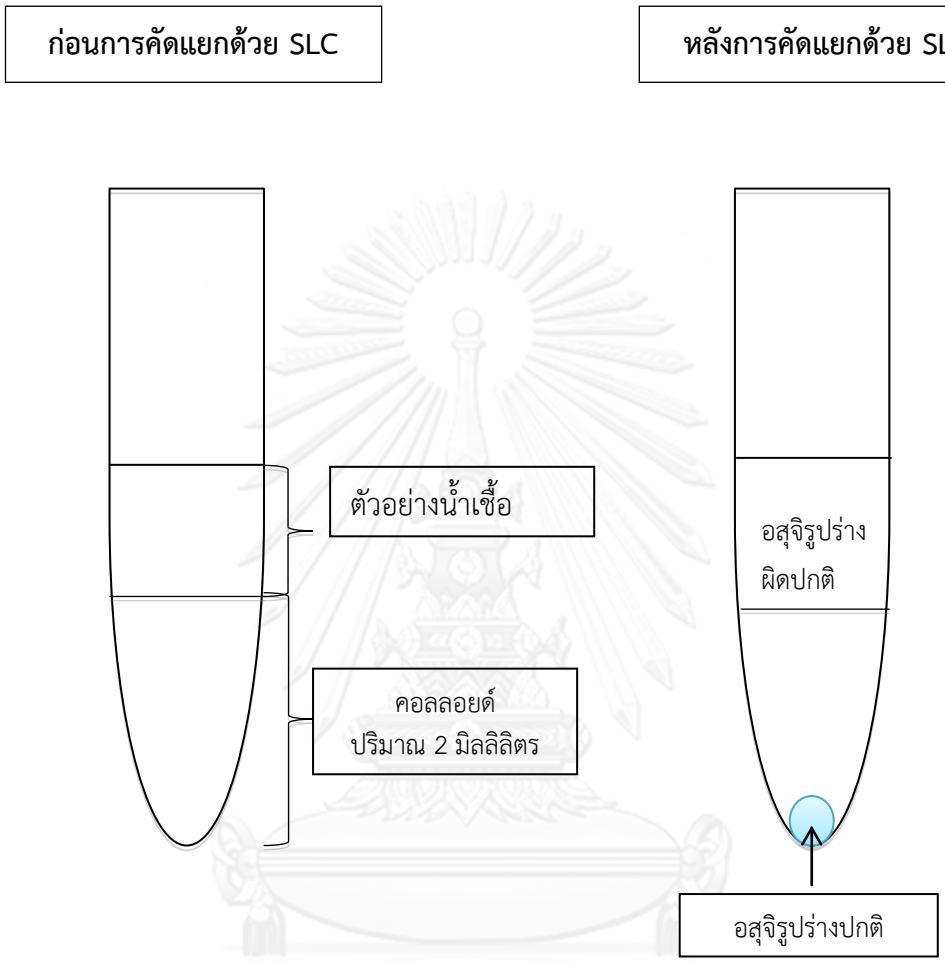
การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ (extender) สำหรับอสุจิและสื่อกลางการละลายแช่แข็งตามระเบียบการของ Axnér และคณะในปี 2004 โดยสื่อกลางการละลายและช่วยฟื้นตัวของอสุจิซึ่งประกอบด้วย Tris 3.025 กรัม กรดซิตริคร้อยละ 1.4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) sodium benzylpenicillin ร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ streptomycin sulphate ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สื่อกลางที่ใช้ในการแช่แข็งอสุจิมี 2 ชนิดโดยแต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบของtrisและไข่แดงเป็นพื้นฐาน (EYT) โดยชนิดแรกคือ egg yolk-I (EYT-I) มีส่วนประกอบคล้าย Tris buffer ตามที่กล่าวมาข้างต้น และมีการเพิ่มส่วนประกอบของไข่แดง ร้อยละ 20 และ กลีเซอรอล ร้อยละ 3 สำหรับใช้ในการเตรียมแช่แข็งอสุจิ โดยการเติมสื่อกลางนี้จะต้องเติมที่อุณหภูมิห้อง หรือ 25 องศาเซลเซียส และนำไปเข้าตู้ลดอุณหภูมิลงเหลือ 4 องศาเซลลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ส่วนสื่อกลางชนิดที่ 2 สำหรับแช่แข็งอสุจิ คือ EYT-II จะมีส่วนประกอบเหมือนกับสื่อกลางชนิดแรก (EYT-I) แต่มีการเพิ่ม Equex STM paste (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเพิ่ม

ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น ร้อยละ 7 หลังจากเตรียมสื่อกลางทั้งหมดเรียบร้อยแล้ว จะแบ่งสื่อกลางแต่ละชนิด โดยแบ่งชนิดละ 1 มิลลิลิตรและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สำหรับส่วนประกอบของคอลลอยด์ที่ใช้ในวิธี SLC ที่ใช้ในการแยกเซลล์โดยมีส่วนประกอบของ glycidoxypropyl- trimethoxysilane-coated silica จะมีความจำเพาะต่อสัตว์ชนิดนั้นๆซึ่งเป็นสารละลาย buffered salt (Androcoll-F; SLU, Sweden) การเตรียมคอลลอยด์จะเตรียมจำนวนหนึ่งชุดใหญ่ทีเดียวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ้าต้องการนำมาใช้งานจะต้องนำออกจากมาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้งาน 1 ชั่วโมง

การคัดแยกเซลล์โดยใช้วิธี SLC

นำสารคอลลอยด์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ออกมาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน โดยตัวอย่างของอสุจิที่ใช้ควรมีความเข้มข้นอย่างน้อย 100 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างอสุจิปริมาณ 1 มิลลิลิตรปล่อยลงอย่างช้าๆลงชั้นด้านบนของคอลลอยด์และระมัดระวังอย่าให้ผสมกับคอลลอยด์ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 300 g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระหว่างที่รอการปั่นเหวี่ยง ทำการเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ EYT-I 1 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการปั่นเหวี่ยงเสร็จสมบูรณ์แล้วจะสามารถแยกได้ 3 ชั้น โดยชั้นแรกหรือด้านบนสุดของคอลลอยด์ ชั้นนี้จะประกอบด้วยอสุจิรูปร่างผิดปกติ อสุจิตัวตาย เม็ดเลือดแดงและเศษเซลล์ ชั้นที่สองเป็นชั้นคอลลอยด์ และชั้นล่างสุดจะเป็นอสุจิรูปร่างปกติ โดยชั้นแรกจะต้องทำการดูดออกด้วยความระมัดระวังและนำไปใส่หลอดแบ่งอันใหม่ ส่วนชั้นที่สองทำการดูดออกอย่างช้าๆจนกระทั่งเหลือคอลลอยด์เพียง 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนหัวปิเปตอันใหม่และสอดผ่านคอลลอยด์เข้าไปชั้นล่างสุดจนกระทั่งถึงอสุจิด้านล่าง และทำการดูดเพียงอสุจิมาใส่สารละลายน้ำเชื้อ EYT-I ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการข้างต้นแล้ว จะทำการประเมินคุณภาพของอสุจิปกติและผิดปกติ โดยตัวแปรที่ประเมินมีดังนี้ ความเข้มข้นของอสุจิ จำนวนอสุจิทั้งหมด ร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ รูปร่างในส่วนหัวและหาง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม



รูปภาพที่ 3 แสดงภาพก่อนและหลังการคัดแยกเซลล์ด้วย SLC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีการแช่แข็งและการละลาย

หลังจากทำการปั่นแยกเซลล์และประเมินคุณภาพข้างต้นแล้ว จะเข้าสู่วิธีการแช่แข็งโดยเริ่มจากนำสารละลายน้ำเชื้อ EYT-I เติมใส่ในตัวอย่างอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิผิดรูปร่างปกติที่อุณหภูมิห้อง และทำการลดอุณหภูมิลงที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1ชั่วโมง และหลังจากนั้นนำสารละลายน้ำเชื้อ EYT-II เติมเข้าไปในตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากันกับการเติมสารละลายน้ำเชื้อชนิดแรก หลังจากนั้นทำการผสมให้เข้ากันและทำการบรรจุตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างในหลอดบรรจุขนาด 0.25 มิลลิลิตร และทำการแช่แข็งด้วยวิธีแนวตั้ง 3 ขั้นตอน ในถังไนโตรเจนเหลว (A three-step vertical freezing) (Millenium 2000 SC-20; MVE Cryogenetics, New Prague, MN, USA) (Rota et al., 1997)

สำหรับวิธีการละลายจะนำหลอดบรรจุแต่ละอันของอสุจิปกติและผิดปกติจุ่มลงในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และนำไปใส่ในหลอดที่มีสารละลาย Tris บรรจุอยู่ 0.25 มิลลิลิตร และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีก่อนนำไปประเมินคุณภาพ (Chatdarong et al., 2010a) ต่อไป

อัตราการถูกคัดเลือก (recovery rate) คือ จำนวนอสุจิที่ถูกคัดเลือก (อสุจิรูปร่างปกติ/ผิดปกติ) เมื่อเทียบกับจำนวนอสุจิทั้งหมด โดยคิดเป็นร้อยละ

อัตราการถูกคัดเลือก (%) (recovery rate)

$$= \frac{\text{จำนวนอสุจิที่ถูกคัดเลือก} \times 100}{\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด}}$$

หมายเหตุ อสุจิที่ถูกคัดเลือก คือ อสุจิรูปร่างอสุจิ หรืออสุจิรูปร่างผิดปกติ

อัตราการสูญเสีย (sperm loss) คือจำนวนอสุจิที่สูญหายในชั้นคอลลอยด์ระหว่างทำการคัดเลือกอสุจิ โดยคิดเป็นร้อยละและคำนวณได้ดังนี้

อัตราการสูญเสีย (%) (sperm loss)

$$= \frac{\text{(จำนวนอสุจิทั้งหมด – จำนวนอสุจิที่ถูกคัดเลือกทั้งอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ) x100}}{\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด}}$$

การประเมินคุณภาพอสุจิ

ก. ความเข้มข้นอสุจิ รูปร่างอสุจิ และการเคลื่อนที่

การประเมินความเข้มข้นอสุจิ จะต้องเจือจางตัวอย่างอสุจิ 10 มิลลิลิตร ในฟอร์มอล ซาไลน์ 100 มิลลิลิตร และนับในสไลด์นับเม็ดเลือด Bürker chamber จำนวน 25 ช่อง และแบ่งตัวอย่างที่เจือจางปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปประเมินคุณภาพในส่วนรูปร่างของหาง โดยจะนับจำนวนตัวอสุจิทั้งหมด 200 ตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 400 เท่า สำหรับการประเมินคุณภาพในส่วนรูปร่างของหัว ทำได้โดยการนำตัวอย่างของอสุจิปริมาณ 10 มิลลิลิตร ป้ายบางๆลงบนสไลด์และย้อมด้วยสี carbolfuchsine และทำการประเมินโดยการนับจำนวนอสุจิ 200 ตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า(Lagerlo ̈f, 1934; Bane, 1961) ส่วนการประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิและระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ทำได้โดยการแบ่งตัวอย่างอสุจิปริมาณ 10 มิลลิลิตร วางลงบนสไลด์อุ่นและปิดด้วยที่ปิดสไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 200 เท่า และทำการประเมินด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (computer assisted sperm analysis หรือ CASA) (IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, USA) อีกทางหนึ่ง หลังจากการละลายส่วนในหัวข้อการประเมินความเร็วของอสุจิด้วยเครื่อง CASA 3 หัวข้อดังนี้ คือ

- Average path velocity (VAP) คือค่าความเร็วเฉลี่ยของอสุจิที่ใช้ในการเคลื่อนที่วิถีตรงในระยะทาง 1 ไมครอนต่อวินาที หน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที
- Straight-line velocity (VSL) คือความเร็วที่เคลื่อนที่ในวิถีตรงจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดในหนึ่งวินาที มีหน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที

- Curvillnear velocity (VCL) คือความเร็วของการเคลื่อนที่วิถีโค้งหรือระยะทางการเคลื่อนที่จริงที่เคลื่อนที่ได้ในหนึ่งวินาที มีหน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที

ข. การประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรม

การประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ทำได้โดยการผสมสารละลายของ SYBR-14 (Dead/Alive Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) และ EthD-1 (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) นำตัวอย่างอสุจิ 5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย SYBR-14 ใน DMSO (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) ความเข้มข้น 0.38 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร และสารละลาย EthD- 1 (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) ใน PBS (Sigma Chemical Co. ST. Louis Missouri, USA) ความเข้มข้น 14 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร และนำไปอุ่นที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างวางบนสไลด์และปิดด้วยที่ปิดสไลด์ และทำการประเมินโดยการนับจำนวนอสุจิ 200 ตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (BX31, Olympus, Tokyo, Japan) การจำแนกความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 3 หมวดหมู่คือ อสุจิที่มีชีวิต (lived sperm) จะย้อมติดสีเขียวซึ่งเกิดจากสาร SYBR-14 อสุจิที่ตาย (dead sperm) จะย้อมติดสีแดงซึ่งเกิดจากสาร EthD-1 และอสุจิที่เสียหาย (damaged sperm) จะย้อมติดทั้งสีแดงและสีเขียว

การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) ใช้เทคนิค double-fluorescent labeling (Axner et al., 2004) ทำได้โดยการนำตัวอย่างอสุจิ 10 ไมโครลิตร ป้ายบนสไลด์และทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นทำการทำลายความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซนต์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นผสมสาร FITC-PNA จำนวน 90 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS (Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri, USA) และสาร PI (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) จำนวน 5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 340 มิลลิโมลาร์ โดยความเข้มข้นสุดท้ายคือ 18 มิลลิโมลาร์ และนำสารละลายที่ผสมข้างต้นจำนวน 20 ไมโครลิตร ป้ายลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ และนำไปอุ่นในที่มืดและมีความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำสไลด์ไปชะล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นและทิ้งให้แห้งในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการประเมินโดยการนับจำนวนอสุจิ 200 ตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ การจำแนกความสมบูรณ์ของอะโครโซมแบ่งออกเป็น 3 หมวดหมู่คือ อะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) จะย้อมติดสีเขียวสว่างสะท้อนแสงจากสาร FITC-PNA ตำแหน่งหมวกของอะโครโซม อะโครโซมที่เสียหาย (damaged acrosome) จะย้อมติดสีเขียวเพียงบางส่วนของ

ตำแหน่งหมวกอะโครโซม และอะโครโซมที่สูญหาย (missing acrosome) จะติดสีเขียวเพียงแค่รอยต่อของหมวกอะโครโซมหรือไม่ติดสีเขียวเลย

การประเมินความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity) โดยใช้สาร Acredine orange (Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri, USA) (Thuwanut et al., 2008) ทำได้โดยนำตัวอย่างอสุจิ 10 ไมโครลิตรป้ายลงบนสไลด์และทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำสไลด์ทำให้ตัวอย่างติดแน่นโดยการโดยใช้กรด methanol-glacial acetic ที่ต้องเตรียมสดใหม่ (Carnoy's solution โดยมีอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำสไลด์ออกมาผึ่งให้แห้งและทำการย้อมด้วยสารละลาย AO ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที หลังนั้นนำไปชะล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการอบด้วยไอน้ำและทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการประเมินโดยการนับจำนวนอสุจิ 200 ตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ โดยตำแหน่งหัวของอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอสายคู่) จะเปล่งแสงสีเขียวเมื่อดูผ่านกล้อง ในทางกลับกันสารพันธุกรรมที่ถูกแปรสภาพหรือเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะเปล่งแสงสีส้ม สีเหลือง หรือสีแดง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ด้วยชุดวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis Systems software, Version 9.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) ข้อมูลจะถูกทดสอบความแปรปรวนด้วยโปรแกรมทางสถิติด้วยวิธีการ UNIVARIATE เพื่อให้เป็นการกระจายตัวแบบปกติ แบบจำลองทางสถิติประกอบด้วยตัวแบบอิทธิพลกำหนดคืออสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการหลั่งและอิพิดิไดมิส (อสุจิที่ได้จากการหลั่งและจากอิพิดิไดมิสโดยแบ่งได้ดังนี้ก่อนการคัดเลือกอสุจิ อสุจิปกติหลังจากการคัดเลือกอสุจิผิดปกติหลังจากการคัดเลือก อสุจิปกติหลังจากการละลาย และอสุจิผิดปกติหลังจากการละลาย) และตัวแปรอิสระประกอบด้วยร้อยละของการเคลื่อนที่อสุจิ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ร้อยละของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมที่ไม่เสียหาย รูปร่างของอสุจิที่ส่วนหัวและหางปกติและรูปร่างที่ผิดปกติ โดยข้อมูลจะถูกทดสอบตามหัวข้อดังนี้

ก. การทดสอบด้วย pair *t*-test โดยมีระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

1. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิก่อนทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และอสุจิรูปร่างปกติหลังจากคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และ เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิก่อนทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC กับอสุจิรูปร่างปกติหลังจากคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   1.1 ร้อยละการเคลื่อนที่อสุจิ

2. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิรูปร่างผิดปกติหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   2.1 ร้อยละการเคลื่อนที่อสุจิ
   2.2 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์
   2.3 ความสมบูรณ์อะโครโซม
   2.4 ความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม
   2.5 รูปร่างของอสุจิส่วนหัว
   2.6 รูปร่างอสุจิส่วนหาง
3. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิรูปร่างผิดปกติหลังจากการละลาย โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   3.1 ร้อยละการเคลื่อนที่อสุจิ
   3.2 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์
   3.3 ความสมบูรณ์อะโครโซม
   3.4 ความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม
   3.5 รูปร่างของอสุจิส่วนหัว
   3.6 รูปร่างอสุจิส่วนหาง
   3.7 ค่า VAP จากการตรวจด้วยเครื่อง CASA
   3.8 ค่า VSL จากการตรวจด้วยเครื่อง CASA
   3.9 ค่า VCL จากการตรวจด้วยเครื่อง CASA

ข. การทดสอบด้วย sign-rank test โดยมีระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

1. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิก่อนทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และอสุจิรูปร่างปกติหลังจากคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และ เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิก่อนทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC กับอสุจิรูปร่างปกติหลังจากคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   1.1ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
2. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิรูปร่างผิดปกติหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   2.1 ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
3. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและอสุจิรูปร่างผิดปกติหลังจากการละลาย โดยเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆดังนี้
   3.1ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ

1.1 คุณภาพน้ำเชื้อหลังจากการเก็บตัวอย่าง

Epididymal sperm

ผลจากการเก็บตัวอย่างอสุจิจากอิพิดิไดมิสจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าความเข้มข้น(sperm concentration) 273.4 ± 130.8 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) มีจำนวนอสุจิทั้งหมด (total sperm) 166.4 ± 81.8 ล้านเซลล์ ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ (percentage of motility) มีค่าเท่ากับ 64.2 ± 11.7 และมีค่าระดับความเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility) เท่ากับ 3.6 ± 0.5

Ejaculated sperm

ผลจากการเก็บตัวอย่างอสุจิจากการหลั่งน้ำเชื้อจำนวน 13 ตัวอย่าง ตัวอย่างอสุจิมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย 97.3 ± 68.8 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิทั้งหมดเฉลี่ย 49.8 ± 35.3 ล้านเซลล์ ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ มีค่าเท่ากับ 56.2 ± 11.2 และมีค่าระดับความเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่ากับ 3.3 ± 0.5

1.2 คุณภาพอสุจิที่ได้จากการเก็บอิพิดิไดมิส (epididymal sperm) และจากการหลั่งน้ำเชื้อด้วยวิธีการรีดด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี SLC

หลังจากทำการคัดแยกเซลล์ด้วยสารคอลลอยด์ผ่านวิธีการ SLC โดยจะแยกได้ตัวอย่าง 2 ชนิด คืออสุจิรูปร่างปกติ (morphologically normal spermatozoa) และอสุจิรูปร่างผิดปกติ (morphologically abnormal spermatozoa)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2.1 ความเข้มข้น (concentration) และจำนวนอสุจิทั้งหมด (total sperm count)

Epididymal spermatozoa

อสุจิรูปร่างปกติมีความเข้มข้น 82.2 ± 49.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิรูปร่างปกติทั้งหมด 46.2 ± 28.9 ล้านเซลล์ อสุจิรูปร่างผิดปกติมีความเข้มข้น 59.5 ± 34.8 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติทั้งหมด 64.8 ± 46.3 ล้านเซลล์

Ejaculated spermatozoa

อสุจิรูปร่างปกติมีความเข้มข้น 33.1 ± 35.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิรูปร่างปกติทั้งหมด 19.6 ± 21.3 ล้านเซลล์ ส่วนอสุจิรูปร่างผิดปกติมีความเข้มข้น 7.1 ± 6.8 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติทั้งหมด 2.9 ± 2.8 ล้านเซลล์

1.2.2 ร้อยละการเคลื่อนที่ (percentage of motility) และ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility)

Epididymal spermatozoa

ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างปกติหลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วย SLC ผลที่ได้มีค่าดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบก่อนการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ส่วนค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างผิดปกติมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบก่อนการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และค่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในอสุจิทั้งรูปร่างปกติและผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอสุจิก่อนการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ($p < 0.05$) แสดงผลในตารางที่ 1

Ejaculated spermatozoa

ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างปกติหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วย SLC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการคัดแยก ($p > 0.05$) แต่ค่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลง ($p < 0.05$) แต่ในทางกลับกันพบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติหลังจาการคัดแยก มีร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC กับอสุจิก่อนการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ แสดงผลดังตารางที่ 1

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละการเคลื่อนที่ (ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ ก่อนและหลังการแยกด้วย single-layer centrifugation (SLC)

ชนิดตัวอย่าง	ร้อยละการเคลื่อนที่ (ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า)	
	Epididymal sperm	Ejaculated sperm
ก่อนการคัดแยกด้วย SLC	64.2 ± 11.7^{c} (3.6 ± 0.5^{c})	56.2 ± 11.2^{x} (3.3 ± 0.5^{z})
- อสุจิรูปร่างปกติ	73.3 ± 22.5^{a} (3.3 ± 0.5^{a})	53.1 ± 13.8^{x} (2.8 ± 0.6^{x})
- อสุจิรูปร่างผิดปกติ	22.5 ± 11.4^{b} (2.5 ± 0.5^{b})	21.5 ± 8.0^{y} (2.2 ± 0.6^{y})

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

1.2.3 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity)

Epididymal spermtozoa

โดยผลของการศึกษาพบว่าอสุจิรูปร่างปกติมีค่า intact plasma membrane สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนค่า intact acrosome และ intact DNA ของอสุจิรูปร่างปกติไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงผลในตารางที่ 2

Ejaculated spermatozoa

ผลจากการประเมินคุณภาพในทั้ง 3 หัวข้อ พบว่าอสุจิรูปร่างปกติมีค่า intact plasma membrane และค่า intact acrosome สูงกว่าอสุจิผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ intact DNA ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยแสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (intact plasma membrane) อะโครโซมสมบูรณ์ (intact acrosome) และสารพันธุกรรมสมบูรณ์ (intact DNA) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติจากตัวอย่างที่เก็บจากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี single-layer centrifugation (SLC)

Sperm quality (%)	Epididymal sample		Ejaculated sample	
	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
Intact plasma membrane	55.4±15.7[a]	42.6±10.0[b]	48.4±18.0[x]	11.4±7.9[y]
Intact acrosome	49.3±24.2[a]	41.1±25.2[a]	44.2±21.8[x]	24.1±12.9[y]
Intact DNA	53.4±22.7[a]	43.0±19.2[a]	30.5±15.2[x]	32.3±12.1[x]

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

1.3 คุณภาพอสุจิที่ได้จากการเก็บอิพิดิไดมิส (epididymal sperm) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sperm) หลังการแช่แข็งและการละลาย

1.3.1 ร้อยละการเคลื่อนที่ (percentage of motility) และ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility)

Epididymal spermatozoa

หลังจากการละลายพบว่าร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ มีค่าลดลง และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงของการเคลื่อนที่ของตัวอย่างอสุจิตั้งแต่แรกเริ่มก่อนการคัดแยกด้วย SLC เปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติและรูปร่างผิดปกติหลังการละลาย พบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติมีร้อยละการเคลื่อนที่ลดลงจากเดิมมากถึง 92.1 มีความแตกต่างต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติ ซึ่งลดลงร้อยละ 27.8

ส่วนผลจากการประเมินร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ด้วยเครื่องตรวจ CASA ของอสุจิรูปร่างปกติ มีค่าเท่ากับ 34.4 ± 13.7 และ 0.9 ± 0.5 ตามลำดับ ส่วนอสุจิรูปร่างผิดปกติมีค่าเท่ากับ 4.2 ± 2.9 และ 0.1 ± 0.0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเคลื่อนที่และค่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่าอสุจิรูปร่างปกติหลังการแช่แข็งและการละลายมีค่าสูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่องตรวจ CASA

Ejaculated spermatozoa

หลังจากการแช่แข็งและการละลายพบว่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของทั้งรูปร่างปกติและผิดปกติลดลง และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงของการเคลื่อนที่ตัวอย่างอสุจิตั้งแต่แรกเริ่มก่อนการคัดแยกด้วย SLC เปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติและรูปร่างผิดปกติหลังการละลาย พบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติมีร้อยละการเคลื่อนที่ลดลงจากเดิมมากถึง 92.1 ซึ่งมีค่าลดลงเท่ากับอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสมีความแตกต่างต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติ ซึ่งลดลงร้อยละ 41.7 ซึ่งลดลงมากกว่าอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส

ส่วนผลจากการประเมินร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ด้วยเครื่องตรวจ CASA ของอสุจิรูปร่างปกติ มีค่าเท่ากับ 22.6 ± 16.2 และ 0.2 ± 0.5 ตามลำดับ ส่วนอสุจิรูปร่างผิดปกติมีค่าเท่ากับ 3.3 ± 3.5 และ 0.1 ± 0.1 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเคลื่อนที่และค่าระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่าอสุจิรูปร่างปกติหลังการแช่แข็งและการละลายมีค่าสูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่องตรวจ CASA)

ผลจากการตรวจผ่านเครื่อง CASA อสุจิรูปร่างปกติที่เก็บได้จากทั้งอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่ามีค่า VAP และ VSL สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนค่า VCL อสุจิรูปร่างปกติที่เก็บจากจากอิพิดิไดมิสอย่างเดียวที่มีค่าสูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ ($p < 0.05$) แต่อสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการเก็บการหลั่งน้ำเชื้อจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในส่วนของ VCL แสดงผลดังตารางที่ 4

1.3.2 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity)

Epididymal spermatozoa

หลังการแช่แข็งและการละลาย พบว่าตัวแปรทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ไม่ว่าจะเป็น intact plasma membrane intact acrosome และ intact DNA เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ โดยผลแสดงดังตารางที่ 3

Ejaculated spermatozoa

หลังจากการแช่แข็งและการละลายพบว่าอสุจิรูปร่างปกติมีค่า intact plasma membrane intact acrosome สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ค่า intact DNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ (intact plasma membrane) อะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) และสารพันธุกรรมที่สมบูรณ์ (intact DNA) ของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) จากตัวอย่างที่เก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการแช่แข็งและการละลาย

Sperm quality (%)	Epididymal sample		Ejaculated sample	
	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
TM	44.2 ± 15.1^{a}	5.0 ± 5.4^{b}	32.3 ± 10.1^{x}	4.6 ± 5.8^{y}
PM (0-5)	2.5 ± 0.5^{a}	1.8 ± 0.8^{b}	2.1 ± 0.4^{x}	0.7 ± 0.6^{y}
Intact plasma membrane	19.2 ± 13.5^{a}	17.3 ± 15.9^{a}	22.9 ± 16.8^{x}	6.2 ± 5.9^{y}
Intact acrosome	22.5 ± 17.4^{a}	16.0 ± 13.7^{a}	16.3 ± 6.6^{x}	11.6 ± 7.8^{y}
Intact DNA	26.0 ± 16.9^{a}	21.8 ± 19.2^{a}	24.8 ± 19.6^{x}	23.9 ± 16.5^{x}

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่าการประเมินรูปแบบการเคลื่อนที่ของอสุจิ จากการตรวจด้วยcomputer assisted sperm analysis (CASA) โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่มีอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) จากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการแช่แข็งและละลาย

	Epididymal sample		Ejaculated sample	
Motile pattern* (μm/s)	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
VAP	84.6 ± 11.9^{a}	56.9 ± 32.2^{b}	63.2 ± 21.12^{x}	36.1 ± 32.1^{y}
VSL	74.6 ± 11.3^{a}	49.5 ± 27.6^{b}	55.7 ± 19.5^{x}	31.6 ± 27.2^{y}
VCL	139.0 ± 18.1^{a}	98.3 ± 54.2^{b}	114.5 ± 47.9^{x}	78.1 ± 70.6^{x}

หมายเหตุ -*VAP คือ ค่าความเร็วเฉลี่ยของอสุจิที่ใช้ในการเคลื่อนที่วิถีตรงในระยะทาง 1 ไมครอนต่อวินาที หน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที *VSL คือ ความเร็วที่เคลื่อนที่ในวิถีตรงจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดในหนึ่งวินาที มีหน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที *VCL คือ ความเร็วของการเคลื่อนที่วิถีโค้งหรือระยะทางการเคลื่อนที่จริงที่เคลื่อนที่ได้ในหนึ่งวินาที มีหน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$) x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ

จะเห็นว่าผลที่กล่าวมาข้างต้นของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติมีค่าของร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม สารพันธุกรรม มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการแช่แข็งและการละลาย ดังนั้นจึงมีการหาค่าร้อยละที่ลดลงในแต่ละตัวแปรของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ พบว่าเมื่อหลังจากการแช่แข็งและการละลาย ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างผิดปกติจากทั้งการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อมีค่าลดลงมากกว่าอสุจิรูปร่างปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการ

หลั่งน้ำเชื้อเพียงอย่างเดียวที่มีร้อยละในการลดลงมากกว่าอสุจิรูปร่างปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ในส่วนของระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อ ร้อยละในการลดลงของตัวแปรต่างเหล่านั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ร้อยละการลดลงของอัตราเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample)

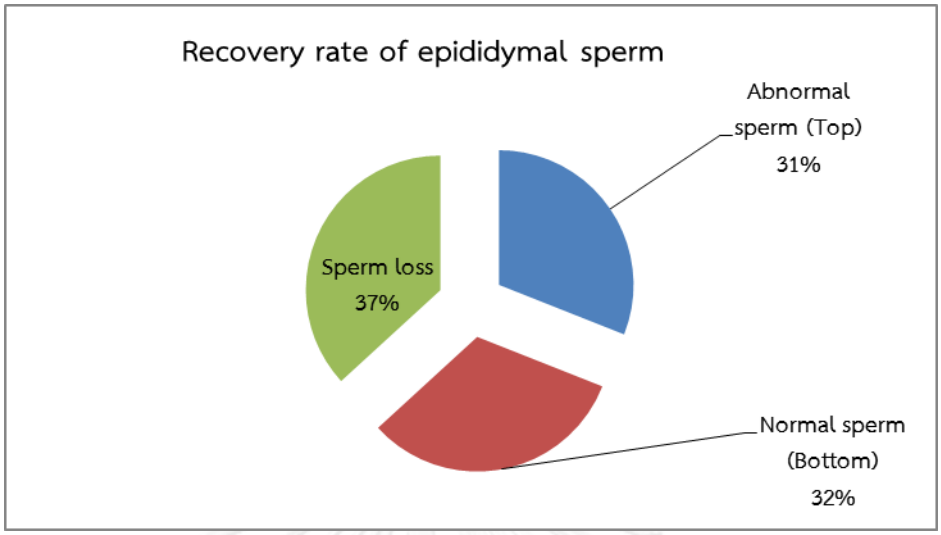
	Epididymal sample		Ejaculated sample	
Sperm quality (%)	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
%TM	60.5 ± 16.7^{a}	25.9 ± 20.7^{b}	62.3 ± 15.9^{x}	18.1 ± 20.3^{y}
PM	91.0 ± 24.5^{a}	95.8 ± 50.3^{a}	78.2 ± 18.5^{x}	34.6 ± 35.7^{y}
Intact plasma membrane	34.8 ± 22.1^{a}	39.4 ± 36.5^{a}	48.1 ± 28.1^{x}	63.0 ± 70.3^{x}
Intact acrosome	52.8 ± 35.6^{a}	61.5 ± 86.6^{a}	41.0 ± 15.0^{x}	55.0 ± 32.7^{x}
Intact DNA	49.1 ± 26.1^{a}	62.8 ± 71.0^{a}	84.9 ± 53.2^{x}	80.3 ± 48.1^{x}

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

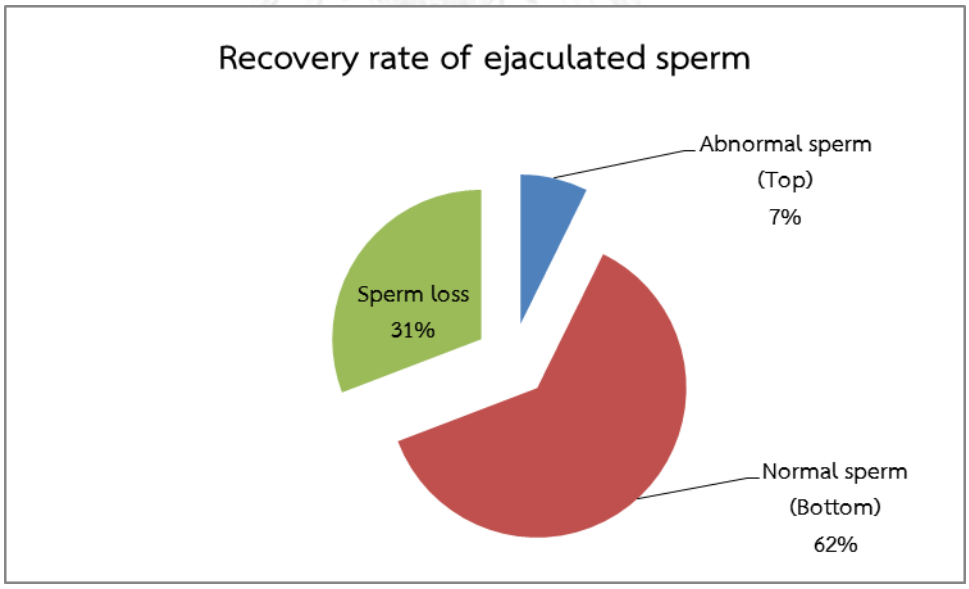
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. ประสิทธิภาพของ SLC ที่ใช้ในการคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ

SLC สามารถคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติออกจากอสุจิรูปร่างผิดปกติได้ หลังจากการคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติจะอยู่ด้านล่างสุดของคอลลอยด์ ส่วนอสุจิรูปร่างผิดปกติอยู่ด้านบนคอลลอยด์ โดยสามารถคำนวณอัตราการคัดเลือก (recovery rate) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ และสามารถหาอัตราการสูญหาย (sperm loss) ไประหว่างชั้นคอลลอยด์ได้เช่นกัน แสดงดังแผนภาพที่ 4 และ 5



ภาพที่ 4 แสดงร้อยละอัตราการคัดเลือก (recovery rate) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและส่วนอสุจิที่สูญหาย (sperm loss) ไประหว่างชั้นคอลลอยด์



ภาพที่ 5 แสดงร้อยละอัตราการคัดเลือก (recovery rate) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อและส่วนอสุจิที่สูญหาย (sperm loss) ไประหว่างชั้นคอลลอยด์

นอกจากนี้ SLC สามารถคัดเลือกอสุจิที่มีความผิดปกติทางรูปร่างในส่วนหางออกมาได้โดยประกอบด้วยส่วนปกติ (normal tail) และผิดปกติดังนี้ proximal droplet distal droplet bent tail coiled tail midpeice defect และ loose โดยพบว่าอสุจิรูปร่างปกติมีส่วนหางที่ปกติมากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากทั้งการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ แต่ทั้งนี้ยังมีความผิดปกติแทรกอยู่ในบางรูปแบบเช่น proximal droplet distal drople bent tail และ coiled tail แต่พบว่ามีปริมาณที่น้อยกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงร้อยละความผิดปกติในส่วนหางรูปแบบต่างๆของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากคัดแยกเซลล์ด้วย single-layer centrifugation (SLC)

	Epididymal sample		Ejaculated sample	
	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
Proximal droplet	7.0 ± 6.3^{a}	1.3 ± 1.6^{b}	0.8 ± 1.3^{x}	2.3 ± 2.8^{x}
Distal droplet	7.7 ± 4.6^{a}	2.7 ± 1.7^{b}	1.1 ± 1.6^{x}	4.1 ± 3.1^{y}
Bent tail	36.2 ± 15.9^{a}	8.7 ± 8.0^{b}	32.0 ± 16.5^{x}	45.6 ± 11.6^{y}
Coiled tail	6.5 ± 2.8^{a}	0.4 ± 0.4^{b}	3.9 ± 4.2^{x}	21.6 ± 11.5^{y}
Midpeice defect	4.1 ± 1.5^{a}	3.0 ± 2.6^{a}	3.5 ± 4.2^{x}	5.3 ± 6.6^{x}
Loose	0.2 ± 0.6^{a}	0.3 ± 0.5^{a}	0.7 ± 1.2^{x}	0.1 ± 0.3^{x}
Normal	38.2 ± 14.1^{a}	83.7 ± 8.8^{b}	53.2 ± 19.1^{x}	20.9 ± 14.1^{y}

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในส่วนรูปร่างส่วนหัวประกอบด้วยลักษณะปกติ (normal head) และผิดปกติดังนี้ ลักษณะ narrow narrow at base pear varies sizes (small large round) abnormal contour abaxial และ loose โดยหลังจากการใช้ SLC พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่างส่วนได้ชัดเจน เช่นเดียวกับส่วนหาง แต่ก็พบว่าส่วนที่ผิดปกติแบบ abnormal contour และ loose ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ อสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ในส่วนความผิดปกติแบบอื่นๆไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่อสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าในส่วนที่ผิดปกติมีเพียงความผิดปกติเดียวคือ loose และส่วนหัวปกติ (normal head) ของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติมีความผิดปกติแบบ loose มากกว่าอสุจิรูปร่างปกติ ในทางกลับกันอสุจิรูปร่างปกติมีส่วนหัวที่ปกติมากกว่า แต่ในส่วนความผิดปกติแบบอื่นๆไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยแสดงผลในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงร้อยละความผิดปกติในส่วนหัวรูปแบบต่างๆของอสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) และผิดปกติ (abnormal sperm) ที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส (epididymal sample) และจากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculated sample) หลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี single-layer centrifugation (SLC)

	Epididymal spermatozoa		Ejaculated spermatozoa	
	Normal sperm	Abnormal sperm	Normal sperm	Abnormal sperm
Narrow	6.5 ± 2.8^{a}	8.2 ± 3.8^{a}	18.7 ± 10.3^{x}	17.9 ± 10.5^{x}
Narrow at base	7.9 ± 3.6^{a}	7.0 ± 2.7^{a}	7.8 ± 8.3^{x}	9.0 ± 5.1^{x}
Pear - shape	1.9 ± 0.8^{a}	1.8 ± 1.3^{a}	3.6 ± 3.0^{x}	3.8 ± 4.1^{x}
Varies (small, large, round)	3.0 ± 1.7^{a}	1.9 ± 1.2^{a}	2.8 ± 1.8^{x}	3.0 ± 3.4^{x}
Abnormal contour	0.3 ± 0.5^{a}	0.7 ± 0.6^{b}	0.1 ± 0.5^{x}	0.5 ± 0.9^{x}
Abaxial	3.1 ± 1.7^{a}	2.8 ± 1.4^{a}	1.1 ± 13^{x}	0.7 ± 1.0^{x}
loose	1.1 ± 0.8^{a}	4.3 ± 3.2^{b}	2.4 ± 4.2^{x}	14.1 ± 10.9^{y}
Normal	76.3 ± 5.1^{a}	73.5 ± 7.0^{a}	63.5 ± 15.7^{x}	51.0 ± 12.6^{y}

หมายเหตุ a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม epididymal sperm ($p < 0.05$)
x และ y แสดงความแตกต่างทางสถิติของกลุ่ม ejaculated sperm ($p < 0.05$)

บทที่ 5
การอภิปราย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

1. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างจากทั้ง 2 แหล่ง พบว่าการเก็บจากการหลั่งน้ำเชื้อด้วยการรีดด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า พบว่าปริมาณของอสุจิ และร้อยละการเคลื่อนที่ค่อนข้างน้อยตั้งแต่เริ่มแรก อาจด้วยปัจจัยจากตัวสัตว์เป็นหลักเนื่องจากสัตว์ตระกูลแมวมีความหลากหลายในการผลิตน้ำเชื้อและคุณภาพน้ำเชื้อมีความหลากหลายเฉพาะตัวสัตว์เช่นกัน (Axner, 2008) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางด้านอัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรูปร่างของอสุจิ (Tebet et al., 2006)

1.1 คุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติภายหลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี SLC

โดยจากผลของตัวอย่างที่เก็บได้จากทั้งอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิรูปร่างปกติมีค่าสูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงถึงว่าการใช้การคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC นั้นสามารถแยกอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ (motile sperm) เช่นเดียวกับวิธี swim-up (Hallap et al., 2004) ซึ่งวิธีนี้อาศัยหลักการของการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างปกติเพียงอย่างเดียว (Somfai et al., 2002)

เมื่อตรวจคุณภาพอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าหลังจากการคัดเลือกเซลล์ด้วย SLC คุณภาพของความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) และความสมบูรณ์ของอะโครโซมดีขึ้น (acrosome integrity) ในส่วนของรูปร่างหัวและหางคุณภาพดีขึ้น สามารถคัดแยกส่วนหางที่ปกติได้ และส่วนที่ผิดปกติเช่น distal droplet bent tail และ loose จะพบในอสุจิรูปร่างผิดปกติมากกว่าในทั้ง 2 แหล่ง แต่อสุจิที่เก็บจากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าคุณภาพของหัวดีขึ้น โดยอสุจิรูปร่างปกติมีรูปร่างส่วนปกติมากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อม้าที่ผ่านการแช่แข็งและการละลายพบว่ามีระดับการเคลื่อนที่สูงขึ้นและอสุจิที่มีชีวิตอยู่สูงขึ้น อีกทั้งความผิดปกติของส่วนหัวลดลงในอสุจิที่ถูกคัดเลือกด้วย SLC (Macias Garcia et al., 2009b) และเมื่อเปรียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการศึกษาในแมวโดยเก็บน้ำเชื้อจากอิพิดิไดมิส

พบว่าวิธีการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และวิธี swim-up ให้คุณภาพอสุจิที่ดีขึ้นในด้านรูปร่าง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และสารพันธุกรรม (Chatdarong et al., 2010b) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมไม่มีความแตกต่างกันในอสุจิทั้งรูปร่างปกติและผิดปกติ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการศึกษานี้ พบว่าการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC สามารถแยกอสุจิที่รูปร่างปกติและผิดปกติออกมาได้อย่างชัดเจนทั้งในทางรูปร่างในส่วนหางและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม แต่อะโครโซมของอสุจิจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสให้ผลไม่แตกต่างกันระหว่างอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ ส่วนความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมของอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

1.2 คุณภาพอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติภายหลังจากการแช่แข็งและการละลาย

หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย คุณภาพของอสุจิจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังจากการผ่านกระบวนการดังกล่าว ร้อยละการเคลื่อนที่ในแต่ละตัวอย่างลดลง แต่อสุจิรูปร่างปกติก็ยังคงมีร้อยละการเคลื่อนที่ (percentage of motility) และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (score of progressive motility) สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ และเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของร้อยละการเคลื่อนที่ตั้งแต่แรกเริ่มของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการเก็บจากการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติมีร้อยละที่ลดลงเท่ากันในทั้ง 2 แหล่งตัวอย่างคือลดลงร้อยละ 92.1 แต่อสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อลดลงมากกว่า โดยลดลงร้อยละ 41.7 ส่วนตัวอย่างจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสลดลงเพียงร้อยละ 27.8 และเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CASA พบว่าผลของร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าผลไปในแนวทางเดียวกันคืออสุจิรูปร่างปกติมีค่าสูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ และเครื่องนี้ยังสามารถประเมินรูปแบบการเคลื่อนที่แบ่งออกได้ 3 ลักษณะ คือ ค่าความเร็วเฉลี่ยของอสุจิที่ใช้ในการเคลื่อนที่วิถีตรง (VAP) ความเร็วที่เคลื่อนที่ในวิถีตรงจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุด (VSL) และ ความเร็วของการเคลื่อนที่วิถีโค้งหรือระยะทางการเคลื่อนที่จริงที่เคลื่อนที่ได้ (VCL) พบว่าอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อ มีค่าของทั้ง 3 รูปแบบการเคลื่อนที่สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ ยกเว้นค่า VCL ของอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในอสุจิทั้ง 2 รูปร่าง จากรูปแบบการเคลื่อนที่ทั้ง 3 ค่าสามารถบ่งบอกได้ว่าอสุจิที่รูปร่างปกติสามารถเคลื่อนที่ได้หลากหลายและมีความเร็วมากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติซึ่งสอดคล้องกับร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ตรวจได้

นอกจากนี้กระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งและการละลายยังมีผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิไม่ว่าจะเป็นเรื่องความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (sperm membrane integrity) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม (DNA integrity)

(Mazur, 1984) แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลกระทบต่อคุณภาพอสุจิเช่น ภาวะช็อคของอสุจิด้วยความเย็น (cold shock) แรงดันของสารละลายไหลผ่านเนื้อเยื่อ (osmotic pressure) (Watson, 2000) และสารอนุมูลอิสระต่างๆ (oxidative stress) (Aitken and Krausz, 2001) ผลการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างอสุจิทั้ง 2 รูปร่างมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมลดลง เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าความเย็นมีผลต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Pukazhenthi et al., 2001) แต่ในส่วนรูปร่างส่วนหางปกติพบว่าอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อยังคงมีรูปร่างในส่วนของหางปกติมากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อมีรูปร่างส่วนหัวปกติ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมมีค่ามากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติเช่นกัน เนื่องจากอสุจิรูปร่างผิดปกติและสิ่งที่ปนเปื้อนเช่นเม็ดเลือดแดง เศษเซลล์ และของเหลวที่เป็นองค์ประกอบของน้ำเชื้อสามารถสร้างสารอนุมูลอิสระ จึงมีการกระทบต่อความมีชีวิต และ ทำให้คุณภาพของการปฏิสนธิด้อยลงได้ (Nichi et al., 2007) แต่การศึกษานี้ได้ประเมินเพียงคุณภาพของอสุจิเท่านั้น อาจจะต้องทำการศึกษาโดยการนำอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการคัดแยกเซลล์และการแช่แข็งและการละลาย นำไปเข้าสู่กระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อทดสอบกระบวนการปฏิสนธิว่าอัตราการปฏิสนธิที่ได้ระหว่างอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติให้ผลต่างกันหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้พบว่าหลังจากการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และหลังเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งและการละลายแล้ว พบว่าอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ มีค่าความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ถึงแม้หลังจากการแช่แข็งและการละลายจะลดลง แต่ตัวอย่างทั้ง 2 มีค่าใกล้เคียงกัน จาการศึกษาก่อนหน้าที่ว่าความสมบูรณ์ของโครมาติน (chromatin integrity) ของแมวบ้านกลุ่ม teratospermia มีคุณภาพน้อยกว่ากลุ่ม normospermia แต่ผลของการทำอิ๊กซี่ (ICSI) ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบในแมวบ้านทั้ง 2 กลุ่ม (Penfold et al., 2003)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีข้อเสนอแนะว่า ควรมีการนำอสุจิรูปร่างผิดปกติไปทำอิ๊กซี่ (ICSI) เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างอสุจิปกติและผิดปกติ หากผลการศึกษาไม่มีความแตกต่างกัน อาจไม่จำเป็นต้องคัดทิ้งอสุจิรูปร่างผิดปกติเพื่อลดการสูญเสียสารพันธุกรรม เนื่องจากสัตว์ตะกูลแมวนี้มีการสร้างอสุจิรูปร่างผิดปกติในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงและสัตว์ตระกูลนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ นอกจากนี้อสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ คุณภาพที่ได้ภายหลังจากการแช่แข็งและการละลาย พบว่าร้อยละการเคลื่อนที่ลดลงเช่นกัน การนำไปใช้ประโยชน์ต่อด้านกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ อาจจะต้องคำนึงถึงในหลายๆปัจจัยเช่น หากค่าร้อยละการเคลื่อนที่มีค่าน้อย อาจจะไม่เหมาะสมต่อการนำไปผสมเทียม แต่การศึกษาก่อนหน้านี้ในการผสมเทียมแมวโดยฉีดผ่านทางมดลูก (IUI) มีการรายงานว่าเมื่อใช้อสุจิภายหลังจากการแช่แข็งและการละลายที่มีร้อยละการเคลื่อนที่เท่ากับ 30 สามารถให้อัตราการตั้งท้องถึงร้อยละ 57 (Tsutsui et al., 2000) แต่ทั้งนี้นอกเหนือจากคุณภาพของ

อสุจิแล้ว อาจจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆเช่น ความสามารถและประสบการณ์ของผู้ทำเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น AI IVF หรือ ICSI หรือความสมบูรณ์พันธุ์ของสัตว์เพศเมีย เป็นต้น

2. คุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ

เนื่องด้วยตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อนั้นมีค่าเริ่มต้นของตัวแปรต่างๆเช่น ร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรม ไม่เท่ากัน จึงมีการคำนวณหาร้อยละการลดลงเพื่อเป็นการเปรียบเทียบคุณภาพภายหลังการแช่แข็งของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อมีค่าลดลงมากกว่าอสุจิรูปร่างปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อเพียงอย่างเดียวที่มีค่าลดลงมากกว่าอสุจิรูปร่างปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p <0.05$) แต่ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และสารพันธุกรรมของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงหลังจากการแช่แข็งและการละลาย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ แสดงว่าคุณภาพของอสุจิภายหลังการแช่แข็งในตัวแปรต่างๆเหล่านั้น ได้รับผลกระทบจากกระบวนการแช่แข็ง (Mazur, 1984) ภาวะช็อคของอสุจิด้วยความเย็น (cold shock) แรงดันของสารละลายไหลผ่านเนื้อเยื่อ (osmotic pressure) (Watson, 2000) และสารอนุมูลอิสระต่างๆ (oxidative stress) (Aitken and Krausz, 2001) เช่นกัน แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ จึงไม่สามารถบอกได้ว่าคุณภาพของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสหรือจากการหลั่งน้ำเชื้อมีคุณภาพที่ดีกว่ากัน แต่การศึกษาก่อนหน้า ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพหลังจากการแช่แข็งและการละลายของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในส่วนของร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และรูปร่างของอสุจิ (Tebet et al., 2006) แต่การศึกษาดังกล่าวไม่ได้ศึกษาในส่วนของคัดแยกเซลล์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แน่ชัดอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

นอกจากนี้อสุจิรูปร่างผิดปกติที่มีค่าร้อยละการลดลงในส่วนของร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่านั้น อาจเป็นเพราะอสุจิรูปร่างผิดปกติยังคงมีสิ่งปนเปื้อนเช่น เม็ดเลือดแดง เศษเซลล์ และของเหลวที่เป็นองค์ประกอบของน้ำเชื้อสามารถสร้างสารอนุมูลอิสระ ทำ

ให้ผลของคุณภาพของอสุจิรูปร่างผิดปกติด้อยกว่าอสุจิรูปร่างปกติในแง่ของร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

3. ประสิทธิภาพของ SLC ที่ใช้ในการคัดแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ

หลังจากทำการคัดแยกเซลล์ด้วยสารคอลลอยด์ผ่านวิธีการ SLC โดยจะแยกตัวอย่างได้ 2 ชนิด คืออสุจิรูปร่างปกติ (morphologically normal spermatozoa) และอสุจิรูปร่างผิดปกติ (morphologically abnormal spermatozoa) การศึกษานี้พบว่าให้ผลของ recovery rate หลังจากการใช้วิธี SLC โดยตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสมี recovery rate เท่ากับร้อยละ 36.8 ± 20.9 และตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อมีค่าเท่ากับร้อยละ 30.8 ± 20.6 มีค่าสูงกว่าวิธี swim-up ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบดูว่าการใช้คัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ก่อนการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งกับวิธี swim-up พบว่า recovery rate ของการใช้วิธี SLC สูงกว่าวิธี swim-up (Chatdarong et al., 2010b) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่า recovery rate ที่ได้มีสูงกว่า ทั้งนี้ยังมีการหา recovery rate ของอสุจิผิดปกติที่สามารถแยกได้โดยพบว่า recovery rate ของอสุจิรูปร่างผิดปกติที่เก็บได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสคิดเป็นร้อยละ 31.0 ± 23.0 และจากการหลั่งน้ำเชื้อเท่ากับร้อยละ 7.3 ± 7.4 และพบว่ามีอสุจิบางส่วนที่หายไประหว่างชั้นของคอลลอยด์ (sperm loss) ตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสคิดเป็นร้อยละ 35.2 ± 26.3 ส่วนตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อคิดเป็นร้อยละ 61.8 ± 19.0 จะเห็นได้ว่าในส่วนของตัวอย่างที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อพบว่ามีส่วนที่หายไปมากกว่า อาจจะเป็นเพราะตัวอย่างที่ได้จากการรีดน้ำเชื้อมีปริมาณน้อย จำนวนอสุจิทั้งหมดมีจำนวนน้อย ทำให้เกิดการสูญหายของอสุจิระหว่างชั้นคอลลอยด์คิดเป็นร้อยละค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส หรืออาจเป็นเพราะน้ำเชื้อที่ได้จากการหลั่งมีลักษณะเป็นสีขาวใส สีเดียวกับคอลลอยด์ จึงทำให้เมื่อถึงบริเวณรอยต่อการเก็บตัวอย่างบริเวณนั้นค่อนข้างลำบากในการแยก อาจทำให้ได้ตัวอย่างไม่ครบถ้วน ซึ่งต่างจากตัวอย่างที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส พบว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเม็ดเลือด ทำให้ตัวอย่างมีสีแดงอ่อนๆ จึงเห็นรอยต่อระหว่างคอยลอยด์ชัดเจนและง่ายต่อการเก็บและสามารถเก็บได้ครบถ้วนหรือเก็บได้ปริมาณมากกว่า หรืออาจจะเป็นที่ตัวสูตรของคอลลอยด์เองที่มีความจำเพาะต่อชนิดสัตว์ (Morrell et al., 2008) เนื่องจากคอลลอยด์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสูตรสำหรับน้ำเชื้อแมวที่ได้ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิส วิธีแก้ไขปัญหาเพื่อลดการสูญเสียอสุจิในชั้นคอลลอยด์หากต้องใช้วิธี SLC ในตัวอย่างอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อ อาจจำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวนอสุจิหรือเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อโดยการรวมจากการรีดน้ำเชื้อแมวหลายตัว หรือลดปริมาณของคอลลอยด์ลงหากได้อสุจิปริมาณน้อย หรืออาจจะต้องปรับความเร็วหรือเวลาในการปั่นเหวี่ยง แต่ทั้งนี้การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในการคัดแยก SLC ในตัวอย่างน้ำเชื้อแมวที่ได้จากการรีดน้ำเชื้อ ดังนั้นอาจ

จำเป็นต้องมีการปรับสูตรคอลลอยด์เพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างและชนิดสัตว์ ส่วนตัวอย่างของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสสามารถปั่นแยกเซลล์อสุจิได้เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า (Chatdarong et al., 2010b) โดยที่อสุจิรูปร่างปกติจะอยู่ด้านล่างสุด ส่วนอสุจิรูปร่างผิดปกติจะอยู่ด้านบนซึ่งปนกับสิ่งปนเปื้อนต่างๆเช่นเม็ดเลือดแดง เศษเซลล์ เป็นต้น เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ได้จากการเก็บจากการหลั่งน้ำเชื้อ อสุจิรูปร่างปกติจะตกลงมาด้านล่างเช่นเดียวกัน และอสุจิที่ผิดปกติและของเหลวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อ (seminal plasma) จะอยู่ด้านบน เหตุที่ต้องคัดแยกเซลล์อสุจิรูปร่างปกติออกจากอสุจิรูปร่างผิดปกติและสิ่งปนเปื้อนต่างๆเช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เศษเซลล์ หรือแม้กระทั่งของเหลวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อ (seminal plasma) เป็นที่ทราบกันดีว่าสิ่งเหล่านั้นลดคุณภาพของการปฏิสนธิเนื่องจากสิ่งเหล่านี้สามารถสร้างอนุมูลอิสระ ทำให้อสุจิตายได้ (Pukazhenthi et al., 2001)

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC ในตัวอย่างอสุจิจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่า recovery rate ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งก่อน สามารถแยกอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติได้ หลังจากทำการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC แล้ว ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและคุณภาพอสุจิดีขึ้นในส่วนของรูปร่างหาง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม ส่วนร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนทำการคัดแยก และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าระหว่างอสุจิรูปร่างปกติและผิดปกติ พบว่าอสุจิรูปร่างปกติมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ และอสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อยังมีรูปร่างส่วนหัวปกติที่สูงกว่า และหลังจากการแช่แข็งและจากการละลายพบว่าอสุจิรูปร่างปกติยังคงมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และรูปร่างส่วนหางปกติที่สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติที่ได้จากทั้งสองแหล่ง นอกจากนี้อสุจิรูปร่างปกติที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อยังมีรูปร่างส่วนหัวปกติ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมที่สูงกว่าอสุจิรูปร่างผิดปกติ แต่ทั้งนี้ความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมของอสุจิทั้งจากการเก็บจากอิพิดิไดมิสและการหลั่งน้ำเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างในอสุจิทั้ง 2 รูปร่าง ทั้งจากหลังการคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี SLC และหลังจากการแช่แข็งและการละลาย จึงแสดงให้เห็นว่าการคัดแยกด้วยวิธี SLC สามารถคัดแยกความแตกต่างเรื่องการเคลื่อนที่ รูปร่างส่วนหาง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมได้ และอสุจิรูปร่างผิดปกติสามารถนำไปเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งได้โดยใช้วิธีการเดียวกับการเก็บรักษาอสุจิรูปร่างปกติหรือวิธีทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของอสุจิรูปร่างผิดปกติมีอัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไป

ข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมที่ลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิรูปร่างปกติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Aitken RJ and Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction. 122(4): 497-506.

Ali JI and Grimes EM. 1989. Sperm morphology: unstained and stained smears in fertile and infertile men. Arch Androl. 22(3): 191-195.

Axner E. 2008. Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial insemination in the domestic cat. Reprod Domest Anim. 43 Suppl 2: 144-149.

Axner E, Hermansson U and Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim Reprod Sci. 84(1-2): 179-191.

Bane A. 1961. Acrosomal abnormality associated with sterility in a boar. Proceedings of the 4th International Congress in Animal Reproduction and AI. 810–817.

Boue F, Blais J and Sullivan R. 1996. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. Biol Reprod. 54(5): 1009-1017.

Chatdarong K, Thuwanut P, Manee-in S, Lohachit C and Axner E. 2010a. Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. Reprod Domest Anim. 45(2): 221-227.

Chatdarong K, Thuwanut P and Morrell JM. 2010b. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. Theriogenology. 73(9): 1284-1292.

CITES. 1973. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, part of the Endangered Species Act (PL 93-205,93rd congress) and in 50 appendices. Code Fed. Reg., part23.

Donoghue AM, Johnston LA, Munson L, Brown JL and Wildt DE. 1992. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. Biol Reprod. 46(5): 972-980.

Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, Emiliani S and Delbaere A. 2004. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. Hum Reprod Update. 10(2): 149-162.

Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson B and Rodriguez-Martinez H. 2004. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? Theriogenology. 62(3-4): 702-713.

Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W and Fischer Hammadeh C. 2008. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. Arch Gynecol Obstet. 277(6): 515-526.

Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA and Wildt DE. 1993. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. Biol Reprod. 49(1): 131-139.

Lagerlo¨f N. 1934. Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. Acta Pathol Microbiol Scand. (19): 254-267.

Loskutoff NM, Huyser C, Singh R, Walker DL, Thornhill AR, Morris L and Webber L. 2005. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. Fertil Steril. 84(4): 1001-1010.

Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S and Ruggiero C. 2003. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. J Feline Med Surg. 5(4): 203-208.

Macias Garcia B, Gonzalez Fernandez L, Morrell JM, Ortega Ferrusola C, Tapia JA, Rodriguez Martinez H and Pena FJ. 2009a. Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. Reprod Domest Anim. 44(3): 523-526.

Macias Garcia B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Rodriguez-Martinez H and Pena FJ. 2009b. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. Anim Reprod Sci. 114(1-3): 193-202.

Marco s, Nabil s, John G, Lynne V and Gabor H. 1996. Sperm function and choice of preparation media: comparision of Percoll and Accudenz discontinuous density gradients. J Androl. 17: 61-67.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 247: 125-142.

Morrell J, Dalin A-M and Rodriguez-Martinez H. 2008. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. Anim Reprod Sci. 5: 121-126.

Morrell JM. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. Reprod Domest Anim. 41(1): 63-67.

Morrell JM, Dalin AM and Rodriguez-Martinez H. 2009. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. Equine Vet J. 41(1): 53-58.

Morrell JM and Geraghty RM. 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. Equine Vet J. 38(3): 224-229.

Morrell JM, Persson B, Tjellstrom H, Laessker A, Nilsson H, Danilova M and Holmes PV. 2005. Effect of semen extender and density gradient centrifugation on the motility and fertility of turkey spermatozoa. Reprod Domest Anim. 40(6): 522-525.

Morrell JM and Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. The Open Andrology Journal. 1: 1-9.

Nichi M, Goovaerts IG, Cortada CN, Barnabe VH, De Clercq JB and Bols PE. 2007. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. Theriogenology. 67(2): 334-340.

Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE and Bjurulf E. 2000. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. Hum Reprod. 15(3): 662-666.

Oliphant G, Reynolds AB and Thomas TS. 1985. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am J Anat. 174(3): 269-283.

Penfold LM, Jost L, Evenson DP and Wildt DE. 2003. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. Biol Reprod. 69(5): 1730-1735.

Pukazhenthi BS, Wildt DE and Howard JG. 2001. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. J Reprod Fertil Suppl. 57: 423-433.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S and de Kruif A. 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology. 61(7-8): 1589-1602.

Rodriguez-Martinez H, Larsson B and Pertoft H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod Fertil Dev. 9(3): 297-308.

Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 degrees C. Theriogenology. 47(5): 1093-1101.

Serafini P, Blank W, Tran C, Mansourian M, Tan T and Batzofin J. 1990. Enhanced penetration of zona-free hamster ova by sperm prepared by Nycodenz and Percoll gradient centrifugation. Fertil Steril. 53(3): 551-555.

Sojka NJ, Jennings LL and Hamner CE. 1970. Artificial insemination in the cat (Felis catus L.). Lab Anim Care. 20(2): 198-204.

Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E and Kovacs A. 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. Reprod Domest Anim. 37(5): 285-290.

Tebet JM, Martins MI, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D and Lopes MD. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. Theriogenology. 66(6-7): 1629-1632.

Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M and Axner E. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. Theriogenology. 70(2): 233-240.

Thys M, Vandaele L, Morrell JM, Mestach J, Van Soom A, Hoogewijs M and Rodriguez-Martinez H. 2009. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. Reprod Domest Anim. 44(3): 390-394.

Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M and Hori T. 2000. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. J Vet Med Sci. 62(12): 1247-1251.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci. 60-61: 481-492.

Wildt D. 1994. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: Bartke A, editor. Functions of Somatic Cells in the Testis. New York, NY: Springer-Verlag Inc.: 1-24.

Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA and Howard J. 1992. Embryogenesis in conservation biology, how to make an endangered species embryo. Theriogenology. 37: 161-184.

Zambelli D, Cunto M, Prati F and Merlo B. 2007. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. Theriogenology. 68(5): 796-803.

Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E and Merlo B. 2008. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. Theriogenology. 69(4): 485-490.

Chulalongkorn University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลิตภัณฑ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

Single- layer centrifugation	Androcoll-F; SLU, Sweden
Equex STM paste	Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA
SYBR-14	Dead/Alive Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
EthD-1	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
DMSO	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
FIT-C	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
PI	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA
Acridine orange	AO; Sigma Chemical Co.
CASA Sperm Analyzers	IVOS, Hamilton Thorne Bioscienes, Beverly, USA
Fluorescence microscope	BX31, Olympus, Tokyo, Japan
Liquid nitrogen tank	Millenium 2000 SC-20; MVE Cryogenetics, New Prague, MN, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

ใบยินยอมของเจ้าของสัตว์เลี้ยง

โครงการวิจัยเรื่อง คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของตัวอสุจิปกติและผิดปกติที่เก็บจากอิพิดิไดมิสและจากการหลั่งน้ำเชื้อในแมว

ผู้วิจัย สพ.ญ. กนกวรรณ ธรรมประดิษฐ์

อาจารย์ที่ปรึกษา อ.น.ส.พ. ดร. ศุภวิวัธน์ พงษ์เลาหพันธุ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.สพ.ญ. ดร เกวลี ฉัตรดรงค์

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีความเห็นชอบให้ผู้วิจัยรีดน้ำเชื้อแมวของข้าพเจ้าก่อนการทำหมัน ที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ลงนาม.....ผู้ทำวิจัย

(.....)

วันที่ให้คำยินยอม

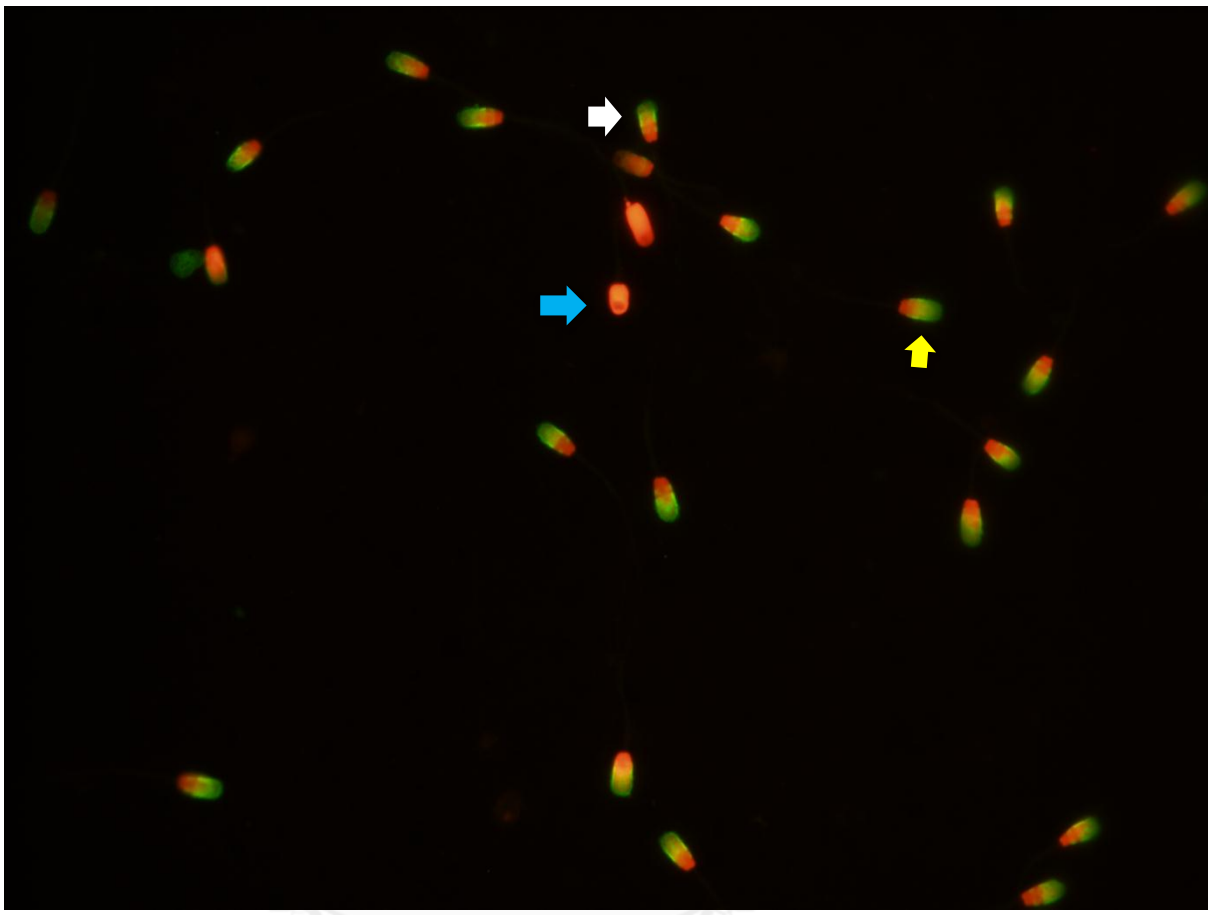
วันที่.....เดือน.....

พ.ศ.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

ภาพแสดงการประเมินคุณภาพความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยการย้อม FIT-C/PI



- อะโครโซมที่ไม่เสียหาย (intact acrosome) จะย้อมติดสีเขียวสว่างสะท้อนแสงจากสาร FITC-PNA ตำแหน่งหมวกของอะโครโซม (ลูกศรสีเหลือง)
- อะโครโซมที่เสียหาย (damaged acrosome) จะย้อมติดสีเขียวเพียงบางส่วนของตำแหน่งหมวกอะโครโซม (ลูกศรสีขาว)
- อะโครโซมที่สูญหาย (missing acrosome) จะติดสีเขียวเพียงแค่รอยต่อของหมวกอะโครโซมหรือไม่ติดสีเขียวเลย (ลูกศรสีฟ้า)

ภาพแสดงการประเมินคุณภาพความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรมด้วยการย้อม AO

-	ดีเอ็นเอสายคู่	จะเปล่งแสงสีเขียว (ลูกศรสีขาว)
-	ดีเอ็นเอสายเดี่ยว	จะเปล่งแสงสีส้ม สีเหลือง หรือสีแดง (ลูกศรสีชมพู)

Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว กนกวรรณ ธรรมประดิษฐ์ เกิดวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2529 ที่อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2552 หลังจากสำเร็จการศึกษาเข้าทำงานด้านสัตวแพทย์สัตว์เล็ก โรงพยาบาลสัตว์เอกชนเป็นเวลา 2 ปี และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาตร์ มหาบัณฑิต สาขาวิทยการสืบพันธุ์สัตว์ ที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University