รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่และการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแพะ

Swimming behaviour and motility of the buck spermatozoa

โดย

พีรศักดิ์ สุทธิโอธิน

สมอ
SF383.7
พ64 2543
ฉ.1

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2543

การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่และการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแพะ

Swimming behaviour and motility of the buck spermatozoa

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะทำในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางด้วยสารละลายที่มีทริสเป็นส่วนประกอบ และได้ทำการศึกษาด้วยวิธีการบันทึกภาพวีดีทัศน์และฉายภาพทีละภาพเพื่อศึกษาการว่ายในแต่ละขั้นตอน ในแต่ละภาพได้ทำการวาดอสุจิและศึกษาการเคลื่อนที่รวมทั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ใน 1 วินาที (22 ภาพ) และได้นำระยะระหว่างแต่ละภาพมาคำนวณหาความเร็วของอสุจิ โดยแบ่งออกเป็น 'ความเร็วตามทาง' ซึ่งคำนวณจากระยะทางทุกช่วงระหว่างภาพรวมกัน (21 ช่วง), 'ความเร็วทางลัด' ซึ่งคำนวณจากระยะทางจากภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 8 รวมกับระยะระหว่างภาพที่ 8 และภาพที่ 22, และ 'ความเร็วทางตรง' ซึ่งคำนวณจากระยะทางจากภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 22

การศึกษาในน้ำเชื้อสดพบว่า จากอสุจิที่ตรวจวัดจำนวนทั้งสิ้น 266 ตัว ในน้ำเชื้อสด 16 ตัวอย่าง มีความเร็วตามทางของอสุจิเฉลี่ย 135.7 $\pm$ 2.8 ไมครอน/วินาที ความเร็วทางลัดของอสุจิเฉลี่ย 49.6 $\pm$ 1.1 ไมครอน/วินาที และความเร็วทางตรงเฉลี่ย 44.7 $\pm$ 1.1 ไมครอน/วินาที ร้อยละของการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อสดมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 70.6 $\pm$ 3.5 ร้อยละของการว่ายในแนวเส้นตรงมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 55.0 $\pm$ 4.4 ส่วนร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 13.8 $\pm$ 3.1

ความเย็น 0 ถึง 3 นาที ไม่มีผลกระทบต่อความเร็วตามทางของอสุจิ (155.1 $\pm$ 18.8 ถึง 165.7 $\pm$ 17.1 ไมครอน/วินาที) และความเร็วทางตรง (44.2 $\pm$ 2.5 ถึง 48.8 $\pm$ 2.6 ไมครอน/วินาที) ส่วนความเร็วทางลัดในกลุ่มควบคุมต่างจากกลุ่มกระทบกับความเย็น 3 นาที (52.8 $\pm$ 1.5 และ 61.5 $\pm$ 2.5 ไมครอน/วินาที ตามลำดับ, $p < 0.01$)

ร้อยละของการเคลื่อนที่มีค่าลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบกับความเย็นนานขึ้น โดยลดลงจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 77.5 $\pm$ 2.5) เป็นร้อยละ 67.5 $\pm$ 2.5 ($p < 0.05$), 45.0 $\pm$ 2.9 ($p < 0.01$) และ 40.0 $\pm$ 0.0 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 1, 2 และ 3 นาทีตามลำดับ ร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 71.3 $\pm$ 7.2) เริ่มมีผลกระทบเมื่อกระทบ

กับความเย็นเป็นเวลา 2 และ 3 นาที (ร้อยละ 27.5 ± 15.0 และ 35.0 ± 4.1 ตามลำดับ, $p < 0.01$) ส่วนร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งไม่ได้รับผลกระทบจากความเย็นในการทดลองนี้

การกระทบด้วยความร้อนจาก 0 ถึง 5 วินาที ไม่มีผลต่อความเร็วตามทางของอสุจิ (106.6 ± 2.7 ถึง 125.2 ± 15.7 ไมครอน/วินาที) ความเร็วทางลัด (28.0 ± 1.6 ถึง 34.1 ± 1.5 ไมครอน/วินาที) และ ความเร็วทางตรง (21.6 ± 1.6 ถึง 26.6 ± 1.3 ไมครอน/วินาที) ร้อยละของการเคลื่อนที่ลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบกับความร้อนนานขึ้น และลดลงจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 57.5 ± 2.5) เป็นร้อยละ 40.0 ± 0.0 ($p < 0.01$), 25.0 ± 2.7 ($p < 0.01$) และ 11.3 ± 3.1 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 1, 2 และ 5 วินาทีตามลำดับ ร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 31.3 ± 6.6) ลดลงเมื่อกระทบกับความร้อนเป็นเวลา 2 วินาที (ร้อยละ 13.8 ± 1.3, $p < 0.05$) และ 5 วินาที (ร้อยละ 3.8 ± 1.3, $p < 0.01$) ส่วนอสุจิที่ว่ายในแนวเส้นโค้งไม่ได้รับผลกระทบจากความร้อน (ร้อยละ 7.5 ± 2.5 ถึง 23.8 ± 6.3)

ความเร็วของอสุจิโดยภาพรวมลดลงเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 3 ชั่วโมง ความเร็วตามทางของอสุจิในกลุ่มควบคุม (120.2 ± 4.0 ไมครอน/วินาที) มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ 1 ชั่วโมง (99.9 ± 2.7 ไมครอน/วินาที, $p < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างจากกว่าน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ 2 และ 3 ชั่วโมง (114.1 ± 8.0 และ 108.3 ± 3.3 ไมครอน/วินาที ตามลำดับ, $p > 0.05$) ความเร็วทางลัดมีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม (46.3 ± 1.5 ไมครอน/วินาที) เป็น 34.9 ± 1.6, 40.2 ± 1.6 และ 35.0 ± 1.6 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนความเร็วทางตรงมีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม (39.8 ± 1.8 ไมครอน/วินาที) เป็น 29.7 ± 1.5 ($p < 0.01$), 35.1 ± 1.6 ($p < 0.05$) และ 29.7 ± 1.7 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

ร้อยละของของการเคลื่อนที่ในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 70.0 ± 4.1) เริ่มลดลงเมื่ออุ่นไว้เป็นเวลา 2 และ 3 ชั่วโมง (ร้อยละ 17.5 ± 4.8 และ 17.5 ± 2.5 ตามลำดับ, $p < 0.01$) ส่วนร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงได้ผลในทำนองเดียวกันคือ กลุ่มควบคุม (ร้อยละ 53.8 ± 4.7) เริ่มลดลงเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ร้อยละ 10.0 ± 3.5 และ 15.0 ± 3.5 ตามลำดับ, $p < 0.01$) และร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 16.3 ± 2.4) เริ่มลดลงเมื่ออุ่นไว้ 2 และ 3 ชั่วโมง (ร้อยละ 5.0 ± 2.0, $p < 0.05$ และ 2.5 ± 1.4, $p < 0.01$ ตามลำดับ)

Abstract

Swimming behaviour and motiliy of goat spermatozoa were studied in semen diluted with Tris base diluent. Images of swimming pattern (400X) were recorded with the aid of a video recorder connected with a microscope. The images were later playbacked for motility evaluation. The images were also displayed frame by frame and tracks of spermatozoa moving were drawn on a transparancy attached to a monitor screen. Sperm velocity was calculate from path of traveling against time.

Track velocity, mean path velocity and progressive velocity in fresh semen were 135.7 ± 2.8, 49.6 ± 1.1 and 44.7 ± 1.1 micron/sec respectively. The percentage of motile cells, progressive motile cells and arch motile cells in fresh semen were 70.6 ± 3.5, 55.0 ± 4.4 and 13.8 ± 3.1 % respectively.

Cold shock for 0 to 3 min had no effect on track velocity (155.1 ± 18.8 to 165.7 ± 17.1 micron/sec) and path velocity (44.2 ± 2.5 to 48.8 ± 2.6 micron/sec). The progressive velocity in control group, however, was significantly lower than that of cold shocked (52.8 ± 1.5 VS 61.5 ± 2.5 micron/sec, $p < 0.01$)

The percentages of motile cells decreased with increasing time of cold exposure and it decreased from 77.5 ± 2.5 % in control group to 67.5 ± 2.5 ($p < 0.05$), 45.0 ± 2.9 ($p < 0.01$) and 40.0 ± 0.0 ($p < 0.01$) in semen cold shocked for 1, 2 and 3 min respectively. The percentages of spermatozoa swimming in straight direction were started to show significant effects when semen was exposed to cold shock for 2 and 3 min (27.5 ± 15.0 and 35.0 ± 4.1 % respectively) when compared to control group (71.3 ± 7.2 %, $p < 0.01$). The percentages of spermatozoa swimming in curve, however, had little effects from the shock

Hot shock for upto 5 seconds had no effects on track velocity, path velocity and progressive velocity. However, exposure of semen to hot shock for 0 to 5 sec had no effects on track velocity (range from 106.6 ± 2.7 to 125.2 ± 15.7 micron/sec), path velocity (28.0 ± 1.6 to 34.1 ± 1.5 micron/sec) and progressive velocity (21.6 ± 1.6 to 26.6 ± 1.3 micron/sec). The percentages of motile spermatozoa decline with increasing time of hot exposure and it decreased from 57.5 ± 2.5 % in control group to 40.0 ± 0.0, 25.0 ± 2.7 and 11.3 ± 3.1 % (all $p < 0.01$) in semen hot shocked for 1, 2 and 5 sec respectively. The percentages of direct swimming spermatozoa also decreased 31.3 ± 6.6 % in control group to 13.8 ± 1.3 % ($p < 0.05$), 3.8 ± 1.3 % ($p < 0.01$) in semen hot shocked for 2 and 5 sec respectively. The

percentages of curve swimming spermatozoa, however, had little effects from hot shock, ranged from 7.5 ± 2.5 to 23.8 ± 6.3 %)

In general, sperm velocity declined with increasing incubation time from 1 to 3 hours. The track velocity declined from 120.2 ± 4.0 micron/sec in control group to 99.9 ± 2.7 % in semen incubated for 1 hour ($p < 0.01$) but the value for those of 2 and 3 hours (114.1 ± 8.0 and 108.3 ± 3.3 micron/sec respectively, $p > 0.05$) were not significantly different from the control. For path velocity, it decreased from 46.3 ± 1.5 micron/sec in control group to 34.9 ± 1.6, 40.2 ± 1.6 and 35.0 ± 1.6 micron/sec in semen incubated for 1, 2 and 3 hours respectively (all $p < 0.01$). The progressive velocity decreased in the same manner from 39.8 ± 1.8 micron/sec in control group to 29.7 ± 1.5 ($p < 0.01$), 35.1 ± 1.6 ($p < 0.05$) and 29.7 ± 1.7 ($p < 0.01$) micron/sec in semen incubated for 1, 2 and 3 hour respectively.

The percentages of motile spermatozoa started to show significant decline when semen reached incubation time of 2 and 3 hour (17.5 ± 4.8 and 17.5 ± 2.5 % respectively, $p < 0.01$) when compare to the control (70.0 ± 4.1 %). The percentages of direct swimming spermatozoa showed similar reduction and it decreased from 53.8 ± 4.7 % in control group to 10.0 ± 3.5 and 15.0 ± 3.5 % in semen incubated for 2 and 3 hours respectively (all $p < 0.01$). The percentages of curve swimming spermatozoa also decreased from 16.3 ± 2.4 % in control group to 5.0 ± 2.0 % ($p < 0.05$) and 2.5 ± 1.4 % ($p < 0.01$) in semen incubated for 2 and 3 hours respectively.

สารบัญ

บทคัดย่อ 1

ABSTRACT 3

บทนำ 5

อุปกรณ์และวิธีการ 5

น้ำเชื้อและการรีดเก็บน้ำเชื้อ 5

การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ 6

การตรวจลักษณะของการเคลื่อนที่ 7

การตรวจวัดความเร็วของอสุจิ 7

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด 8

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 8

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 9

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37 ^{o} เซลเซียส 9

การวิเคราะห์ข้อมูล 9

ผลการทดลอง 9

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด 9

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 12

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 12

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37 ^{o} เซลเซียส 15

วิจารณ์ 17

กิตติกรรมประกาศ 19

บรรณานุกรม 20

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ความเร็วในการเคลื่อนที่ (ไมครอน/วินาที) ของอสุจิในน้ำเชื้อสดแพะเมื่อคำนวณโดยใช้ระยะทางรวม (ความเร็วตามทาง) ระยะทางลัด (ความเร็วทางลัด) และระยะทางตรง (ความเร็วทางตรง) 10

ตารางที่ 3 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะในน้ำเชื้อสด 11

ตารางที่ 4 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 13

ตารางที่ 5 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน..... 14

ตารางที่ 6 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส..... 16

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 13
รูปที่ 3 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 14
รูปที่ 4 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส 16

บทนำ

การว่ายของเชื้ออสุจิเป็นลักษณะเฉพาะ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่นำอสุจิเข้าผสมกับไข่ ลักษณะที่หัวอสุจิมีลักษณะแบนและมีหางคล้ายงู ทำให้ลักษณะของการว่ายของอสุจิไม่เป็นเส้นตรงที่เดียว แต่จะมีลักษณะเฉพาะซึ่งทำให้อสุจิสามารถว่ายผ่านเมือกที่หลั่งจากคอมดลูก (cervical mucous) ในช่วงที่สัตว์เพศเมียเป็นสัด เข้าในทางเดินระบบสืบพันธุ์จนกระทั่งไปผสมกับไข่ได้ เมือกดังกล่าวมีลักษณะพิเศษซึ่งต้องสัมพันธ์กับลักษณะของการว่ายของอสุจิ ลักษณะการว่ายของอสุจิจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อความสามารถในการผสมติด

เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีรายงานการว่ายของอสุจิแพะในสารละลายซึ่งมีทริส (Tris) เป็นส่วนประกอบ (Suttiyotin *et al.*, 1992; Suttiyotin and Thwaites, 1992) สารละลายดังกล่าวเป็นส่วนประกอบที่สำคัญและใช้เป็นประจำในสารเจือจางน้ำเชื้อของแพะและแกะ (Evans and Maxwell, 1987) และยังไม่เป็นที่ทราบกันว่าตัวอสุจิของแพะมีการว่ายเช่นไรในสารเจือจางน้ำเชื้อดังกล่าว ข้อมูลการว่ายของตัวอสุจิจะช่วยให้การศึกษาทางด้านการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอสุจิกับสารเจือจางน้ำเชื้อมีความชัดเจนขึ้น และเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

ความเร็วของอสุจิยังคงเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ประกอบการตัดสินว่า น้ำเชื้อมีคุณภาพดีเพียงใด สิ่งที่ย้ำให้ค่าความเร็วอสุจิมีความสำคัญหนักแน่นขึ้นอีกก็คือ รายงานความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วอสุจิกับความสมบูรณ์พันธุ์ (Harvey, 1960; Holt *et al.*, 1985; Aitken, 1990) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความเร็วอสุจิอาจเป็นตัวบ่งชี้ความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิได้อีกทางหนึ่ง การว่ายของอสุจิในสารละลายนั้นสามารถวัดความเร็วของอสุจิได้โดยการบันทึกและแสดงผลทีละภาพเพื่อวัดระยะการเคลื่อนที่ที่แท้จริงของอสุจิ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ก) เพื่อศึกษาการว่ายและความเร็วของตัวอสุจิของแพะในสารละลายซึ่งมีทริสเป็นส่วนประกอบ โดยใช้วิธีการบันทึกลงบนแถบบันทึกภาพและฉายภาพศึกษาทีละขั้นตอน และ ข) เพื่อศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของแพะในสารละลายซึ่งมีทริสเป็นส่วนประกอบ ในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำเชื้อและการรีดเก็บน้ำเชื้อ

การรีดเก็บน้ำเชื้อทำในแพะโตเต็มวัยที่เลี้ยงอยู่ในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ การรีดเก็บทำในช่วงเช้าของแต่ละวันที่จะทำการทดลอง โดยใช้วิธีการกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (พีรศักดิ์, 2528)

และใช้หลอดทดลองปลายแหลมที่มีขีดวัดปริมาตรเป็นตัวรองรับน้ำเชื้อเพื่อสะดวกในการวัดปริมาตร เมื่อรีดเก็บได้แล้วนำน้ำเชื้อใส่ในกระติกควบคุมอุณหภูมิเพื่อนำมายังห้องปฏิบัติการ กรณีที่มีการรีดเก็บหลายตัวอย่าง ในทุกครั้งที่รีดเก็บได้ใช้เวลารวมกันไม่เกิน 45 นาที ตั้งแต่รีดเก็บจนนำน้ำเชื้อมาถึงห้องทดลอง

การปฏิบัติการในห้องทดลอง ในเบื้องต้นนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาหล่อเลี้ยงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่

1. **ปริมาตร** โดยดูจากขีดวัดปริมาตรที่หลอดเก็บน้ำเชื้อ
2. **ความหนืด (consistency)** ประมาณด้วยสายตาออกเป็น 6 ระดับ (Salamon, 1976) คือ
   - ก. คล้ายครีมข้น
   - ข. คล้ายครีม
   - ค. คล้ายครีมจาง
   - ง. คล้ายนม
   - จ. ขุ่นเล็กน้อย
   - ฉ. ใสคล้ายน้ำ
3. **การเคลื่อนที่ (motility)** หยดน้ำเชื้อลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยไม่ทำการปิดกระจกบางทับ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 11 ระดับ ตั้งแต่ 0 จนถึง 10 โดยค่า 10 เป็นค่าที่ดีที่สุด และ 0 เป็นค่าที่ต่ำที่สุด (Salamon, 1976)
4. **ความเข้มข้น (concentration)** ตรวจความเข้มข้นโดยใช้วิธีเทียบความเข้มข้นของแสงโดยการวัดค่าความเข้มข้นของแสง (optical density) ด้วยคัลเลอริมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และทำการเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นจากกราฟที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

ทำการคัดเลือกเฉพาะน้ำเชื้อที่มีความหนืดคล้ายครีมขึ้นไป, มีการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 8 และมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2×10^{9} เซลล์/มล. มาใช้ในการทดลอง

การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่

การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ในแต่ละการทดลองเป็นการตรวจในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางแล้ว ดังนั้นจึงทำการตรวจการเคลื่อนที่โดยใช้น้ำเชื้อ 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ใช้กระจกบางขนาด 22×22 มม. ปิดทับ โดยใช้ความระมัดระวังให้กระจกบางปิดทับทุกส่วนของน้ำเชื้อและไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้กระจกบางหลังจากที่

ได้ทำการปิดทับแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มีความหนาของน้ำเชื้อในการส่องตรวจมีค่าคงที่เพื่อลดความแปรปรวนในการประมาณค่าการเคลื่อนที่ การปฏิบัติดังกล่าวจะได้ความหนา (ความสูง) ของน้ำเชื้อที่ใช้ตรวจประมาณ 103 ไมครอน ซึ่งจะได้ค่าไม่ต่ำกว่า 60 ไมครอน เพื่อลดการรบกวนการว่ายในแนวตั้งของอสุจิตามที่ได้แนะนำไว้ (Rickmenspoel, 1962) หลังจากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขั้นเพิ่มครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์

การตรวจลักษณะของการเคลื่อนที่

ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจำนวน 15 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส และปิดด้วยกระจกบาง (cover glass) ขนาด 22×22 มม. เพื่อบีบบังคับให้ความสูงของน้ำเชื้อลดลงและอสุจิว่ายในแนวดิ่งได้น้อยลง ดังนั้น การส่องตรวจจะมีการว่ายในแนวระนาบมากขึ้นสามารถตรวจได้ดียิ่งขึ้นโดยที่อสุจิไม่ว่ายออกลึกลงไปหรือตื้นขึ้นมาซึ่งอาจทำให้ภาพไม่ชัดเจนและตรวจได้ยาก ทำการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า ซึ่งต่อไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพวีดีทัศน์ เครื่องบันทึกภาพวีดีทัศน์ และจอโทรทัศน์แสดงภาพการเคลื่อนไหว ทำการเลือกบริเวณที่ส่องตรวจและบันทึกภาพวีดีทัศน์เป็นเวลา 1 นาที

ในการตรวจ ทำการเดินเครื่องวีดีทัศน์เพื่อฉายภาพทางจอโทรทัศน์ ตรวจลักษณะการว่ายของอสุจิโดยรวมและแบ่งกลุ่มอสุจิออกเป็น

1) ร้อยละของการเคลื่อนที่ทั้งหมด

2) การว่ายเป็นเส้นตรงหรือค่อนข้างตรงและเคลื่อนไปทางด้านหน้า ทั้งนี้ดูโดยภาพรวมจากจุดแรกไปถึงจุดสุดท้ายว่ามีการหักเหออกจากแนวมากน้อยเพียงใด

3) การว่ายในแนวเส้นโค้ง จากจุดแรกถึงจุดสุดท้ายมีการว่ายในทิศทางโค้งมากกว่า 90°

การตรวจวัดความเร็วของอสุจิ

ตรวจลักษณะการว่ายหรือการเคลื่อนที่โดยการฉายภาพนิ่งและตรวจดูทีละภาพ ทำการตรวจโดยใช้ลักษณะการเตรียมเช่นเดียวกับการตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ ดังที่ได้อธิบายข้างต้น ทำการตรวจเคลื่อนที่ของอสุจิโดยการสุ่มเลือกอสุจิในจอโทรทัศน์ และทำการฉายภาพและหยุดนิ่งไว้เพื่อให้วาดลักษณะการว่ายได้สะดวกขึ้น แล้วจึงวาดรูปอสุจิลงบนแผ่นใสที่แนบกับจอโทรทัศน์ เมื่อเสร็จแล้วจึงปล่อยให้ภาพเคลื่อนไปหนึ่งภาพ ทำการวาดอสุจิตัวเดิมที่เคลื่อนที่มายังตำแหน่งใหม่จนเสร็จ ทำดังนี้ทีละภาพจนกระทั่งอสุจิเคลื่อนที่ได้ 1 วินาที (22 ภาพ) ทำการวัดระยะการเคลื่อนที่ในแต่ละช่วงจากภาพหนึ่งไปยังอีกภาพหนึ่งโดยใช้ปลายสุดของหัวอสุจิเป็นตำแหน่งที่วัด และคำนวณระยะทางดังนี้คือ

1) ระยะทางรวม คำนวณจากระยะทางแต่ละช่วงรวมกันจากภาพที่ 1 จนถึงภาพที่ 22 (21 ช่วง)

2) ระยะทางลัด คำนวณจากระยะทางตรงจากภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 8 รวมกับระยะทางตรงจากภาพที่ 8 ถึงภาพที่ 22 เป็น

3) ระยะทางตรง คำนวณจากระยะทางตรงจากภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 22

นำระยะทางที่วัดได้มาคำนวณเป็นระยะทางที่แท้จริง โดยเทียบกับตารางของเครื่องนับเม็ดเลือดที่ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ ในขนาดกำลังขยาย 400 เท่าและฉายขึ้นจอแสดงภาพอันเดียวกัน ทำการวัดเส้นตรงที่ปรากฏบนจอโทรทัศน์ และเทียบกับความยาวที่แท้จริงของเส้นในตารางของเครื่องนับเม็ดเลือด ทำให้ได้ระยะทางของการเคลื่อนที่ที่แน่นอน

คำนวณความเร็วในการว่ายของอสุจิโดยใช้ระยะทางที่วัดจากข้อ 1, 2 และ 3 และให้ความเร็วที่ได้จากการคำนวณในข้อ 1 เป็น ความเร็วตามทาง (track velocity) ความเร็วจากข้อ 2 เป็น ความเร็วทางลัด (path velocity) และความเร็วที่ได้จากข้อ 3 เป็น ความเร็วทางตรง (progressive velocity)

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะวันละ 2-5 ตัว และทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วแต่ละตัวอย่างมาควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° เซลเซียส, เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส (ประกอบด้วยทริส 300 mM, กลูโคส 28 mM ในน้ำกลั่น และปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดซิตริก จนได้ค่าเป็นกลาง; Suttiyotin and Thwaites, 1991) ที่อุณหภูมิเท่ากัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์/มล. ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ และทำการตรวจการเคลื่อนที่ตามที่อธิบายข้างต้น ในแต่ละตัวอย่างน้ำเชื้อทำการวัดอสุจิจำนวน 9-20 ตัว ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อและทำการทดลองวัดจนได้ตัวอย่างจากน้ำเชื้อจำนวน 16 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะ 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการช้อคโดยการจุ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำแข็ง โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมคุม (ไม่จุ่มน้ำเย็น) กลุ่มที่ 2 จุ่มไว้เป็นเวลา 1 นาที กลุ่มที่ 3 จุ่มไว้เป็นเวลา 2 นาที และกลุ่มที่ 4 จุ่มไว้เป็นเวลา 3 นาที หลังจากกระทบด้วยความเย็นแล้วนำหลอดทดลองมาควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส ก่อนทำการบันทึกภาพวีดีทัศน์และตรวจการเคลื่อนที่ดังอธิบายข้างต้น

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะ 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการช็อคโดยการจุ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำอุณหภูมิที่ 80° เซลเซียส โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม (ไม่จุ่มน้ำร้อน) กลุ่มที่ 2 จุ่มไว้เป็นเวลา 1 วินาที กลุ่มที่ 3 จุ่มไว้เป็นเวลา 2 วินาที และกลุ่มที่ 4 จุ่มไว้เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากกระทบด้วยความร้อนแล้ว นำหลอดทดลองมาควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส ทำการบันทึกภาพวีดีทัศน์และตรวจการเคลื่อนที่ดังอธิบายข้างต้น

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะ 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการอุ่นน้ำเชื้อในหลอดทดลองโดยควบคุมไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม (อุ่นนาน 0 ชั่วโมง) กลุ่มที่ 2 อุ่นไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 อุ่นไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 4 อุ่นไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนทำการบันทึกภาพวีดีทัศน์และตรวจการเคลื่อนที่ดังอธิบายข้างต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และค่าร้อยละของการเคลื่อนที่ของอสุจิ นำมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

จากการตรวจสอบอสุจิและวาดเพื่อตรวจวัดจำนวนทั้งสิ้น 266 ตัว ในน้ำเชื้อสด 16 ตัวอย่าง ได้ศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ พบว่าความเร็วตามทางของอสุจิมีค่าตั้งแต่ 68.3 $\pm$ 4.9 จนถึง 189.2 $\pm$ 7.1 ไมครอน/วินาที และมีค่าเฉลี่ย 135.7 $\pm$ 2.8 ไมครอน/วินาที (ตารางที่ 1) ความเร็วทางลัดของอสุจิมีค่าตั้งแต่ 28.9 $\pm$ 2.0 จนถึง 82.2 $\pm$ 3.1 ไมครอน/วินาที และมีค่าเฉลี่ย 49.6 $\pm$ 1.1 ไมครอน/วินาที ส่วนความเร็วทางตรงมีค่าตั้งแต่ 26.7 $\pm$ 1.7 จนถึง 80.5 $\pm$ 2.8 ไมครอน/วินาที และมีค่าเฉลี่ย 44.7 $\pm$ 1.1 ไมครอน/วินาที

ตารางที่ 1 ความเร็วในการเคลื่อนที่ (ไมครอน/วินาที) ของอสุจิในน้ำเชื้อสดแพะเมื่อคำนวณโดยใช้ระยะทางรวม (ความเร็วตามทาง) ระยะทางลัด (ความเร็วทางลัด) และระยะทางตรง (ความเร็วทางตรง)

	ความเร็วตามทาง	ความเร็วทางลัด	ความเร็วทางตรง
น้ำเชื้อชุดที่ 1	135.3 ± 6.9	56.4 ± 3.2	52.9 ± 3.5
น้ำเชื้อชุดที่ 2	189.2 ± 7.1	82.8 ± 3.1	80.5 ± 2.8
น้ำเชื้อชุดที่ 3	80.2 ± 4.2	32.9 ± 1.6	30.7 ± 1.6
น้ำเชื้อชุดที่ 4	130.0 ± 5.7	59.5 ± 2.1	57.4 ± 2.0
น้ำเชื้อชุดที่ 5	163.1 ± 8.9	57.3 ± 3.9	52.3 ± 4.2
น้ำเชื้อชุดที่ 6	173.6 ± 5.7	53.5 ± 3.3	46.3 ± 3.4
น้ำเชื้อชุดที่ 7	68.3 ± 4.9	28.9 ± 2.0	26.7 ± 1.7
น้ำเชื้อชุดที่ 8	155.6 ± 5.9	55.5 ± 2.3	53.5 ± 2.6
น้ำเชื้อชุดที่ 9	124.1 ± 10.6	39.9 ± 3.1	35.0 ± 1.9
น้ำเชื้อชุดที่ 10	185.3 ± 9.9	59.3 ± 2.7	49.4 ± 2.5
น้ำเชื้อชุดที่ 11	119.9 ± 6.0	40.7 ± 2.7	37.0 ± 2.8
น้ำเชื้อชุดที่ 12	159.5 ± 6.7	52.5 ± 2.5	49.0 ± 2.5
น้ำเชื้อชุดที่ 13	129.8 ± 8.4	42.4 ± 3.2	35.8 ± 3.2
น้ำเชื้อชุดที่ 14	161.9 ± 9.0	59.0 ± 4.3	45.2 ± 3.1
น้ำเชื้อชุดที่ 15	106.3 ± 7.9	37.2 ± 1.3	31.3 ± 1.8
น้ำเชื้อชุดที่ 16	89.3 ± 5.6	35.8 ± 2.1	32.3 ± 2.2
เฉลี่ย	135.7 ± 2.8	49.6 ± 1.1	44.7 ± 1.1

ตารางที่ 2 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะในน้ำเชื้อสด

	การเคลื่อนที่ (%)	ว่ายเป็นเส้นตรง (%)	ว่ายในแนวเส้นโค้ง (%)
น้ำเชื้อชุดที่ 1	90.0	80.0	10.0
น้ำเชื้อชุดที่ 2	80.0	60.0	20.0
น้ำเชื้อชุดที่ 3	50.0	40.0	10.0
น้ำเชื้อชุดที่ 4	80.0	80.0	0.0
น้ำเชื้อชุดที่ 5	80.0	60.0	20.0
น้ำเชื้อชุดที่ 6	80.0	50.0	30.0
น้ำเชื้อชุดที่ 7	50.0	50.0	0.0
น้ำเชื้อชุดที่ 8	80.0	80.0	0.0
น้ำเชื้อชุดที่ 9	50.0	40.0	10.0
น้ำเชื้อชุดที่ 10	90.0	60.0	30.0
น้ำเชื้อชุดที่ 11	60.0	50.0	10.0
น้ำเชื้อชุดที่ 12	80.0	80.0	0.0
น้ำเชื้อชุดที่ 13	70.0	50.0	20.0
น้ำเชื้อชุดที่ 14	70.0	30.0	40.0
น้ำเชื้อชุดที่ 15	60.0	40.0	20.0
น้ำเชื้อชุดที่ 16	60.0	30.0	0.0
เฉลี่ย	70.6 $\pm$ 3.5	55.0 $\pm$ 4.4	13.8 $\pm$ 3.1

การเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดทั้ง 16 ตัวอย่างที่ตรวจ พบว่าร้อยละของการเคลื่อนที่มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึง 80 และมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 70.6 ± 3.5 (ตารางที่ 2) มีค่าร้อยละของการว่ายในแนวเส้นตรงตั้งแต่ 30 ถึง 80 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 55.0 ± 4.4 ส่วนร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 40 และมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 13.8 ± 3.1

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

ความเย็น 0 ถึง 3 นาที ไม่มีผลกระทบต่อความเร็วตามทางของอสุจิ (รูปที่ 1) ซึ่งมีค่า 155.1 ± 18.8, 137.4 ± 3.9, 165.7 ± 17.1 และ 156.5 ± 4.8 ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที ตามลำดับ ($p > 0.05$) ความเร็วทางลัดในกลุ่มควบคุม (52.8 ± 1.5 ไมครอน/วินาที) ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 1 และ 2 นาที (56.4 ± 1.9 และ 54.9 ± 2.4 ตามลำดับ, $p > 0.05$) และเริ่มมีค่าสูงขึ้นเมื่อกระทบกับความเย็นเป็นเวลา 3 นาที (61.5 ± 2.5, $p < 0.01$) ส่วนความเร็วทางตรงในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และมีค่า 46.2 ± 1.8, 46.7 ± 1.8, 44.2 ± 2.5 และ 48.8 ± 2.6 ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 นาทีตามลำดับ ($p > 0.05$)

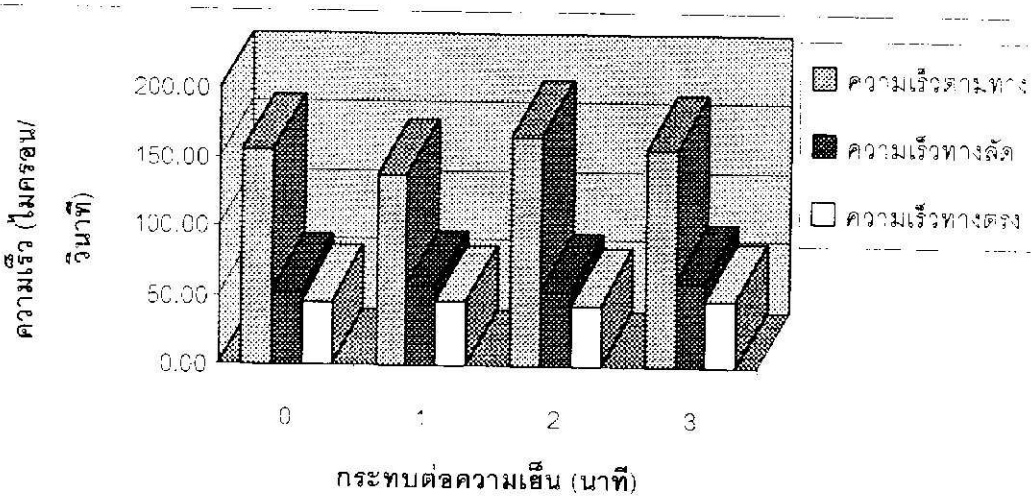
ร้อยละของการเคลื่อนที่มีค่าลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบกับความเย็นนานขึ้น ร้อยละของการเคลื่อนที่ลดลงจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 77.5 ± 2.5) เป็นร้อยละ 67.5 ± 2.5 ($p < 0.05$), 45.0 ± 2.9 ($p < 0.01$) และ 40.0 ± 0.0 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 1, 2 และ 3 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 3) ร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงหรือเกือบตรงลดลงในทำนองเดียวกันเมื่อกระทบกับความเย็น โดยค่าในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 71.3 ± 7.2) มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติจากน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 1 นาที (ร้อยละ 48.8 ± 11.6, $p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบเมื่อกระทบกับความเย็นเป็นเวลา 2 และ 3 นาที (ร้อยละ 27.5 ± 15.0 และ 35.0 ± 4.1 ตามลำดับ, $p < 0.01$)

ร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งมีค่าต่ำและไม่ได้รับผลกระทบจากความเย็นในการทดลองนี้ ค่าร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งในน้ำเชื้อที่กระทบกับความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที มีค่าร้อยละ 6.3 ± 4.7, 18.7 ± 9.7, 17.5 ± 7.5 และ 16.3 ± 11.4 ตามลำดับ ($p > 0.05$)

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

การกระทบด้วยความร้อนจาก 0 ถึง 5 วินาที ไม่มีผลต่อความเร็วตามทางของอสุจิ (รูปที่ 2) ซึ่งมีค่า 106.6 ± 2.7, 115.7 ± 8.0, 123.8 ± 9.6 และ 125.2 ± 15.7 ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 5 วินาที ตามลำดับ ($p > 0.05$) ความเร็วทางลัดให้ผล

ในทำนองเดียวกันกับความเร็วตามทางคือมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่า 31.6 ± 1.4, 33.7 ± 1.5, 34.1 ± 1.5 และ 28.0 ± 1.6 ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 5 วินาที ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนความเร็วทางตรงในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และมีค่า 23.4 ± 1.2, 26.6 ± 1.3, 25.9 ± 1.4 และ 21.6 ± 1.6 ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 5 วินาทีตามลำดับ ($p > 0.05$)



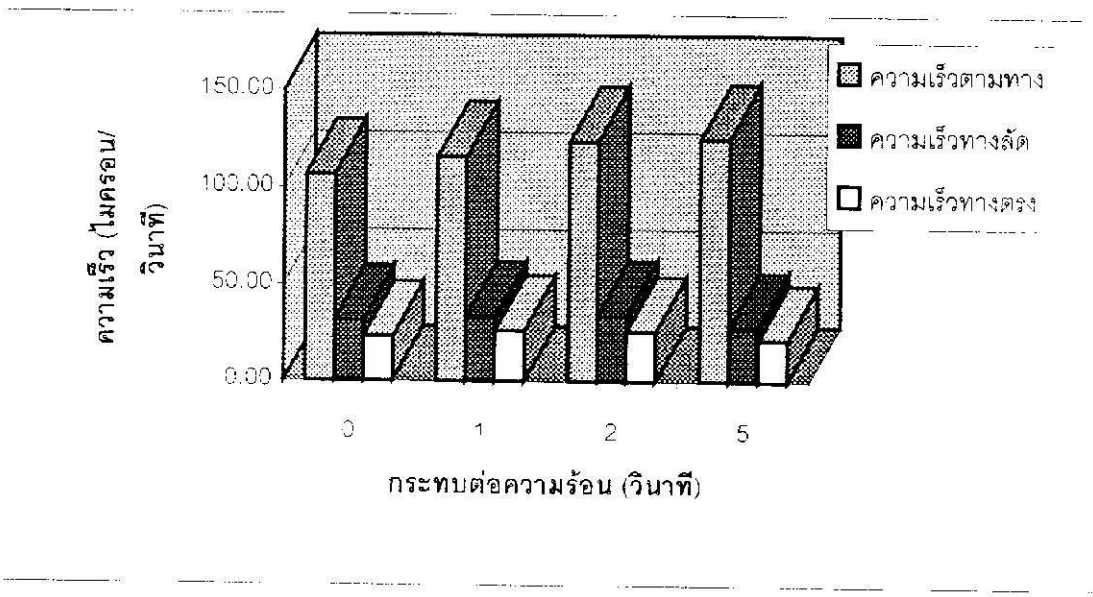
รูปที่ 1 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

ตารางที่ 3 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

การกระทบต่อความเย็น (นาที)	การเคลื่อนที่ (%)	ว่ายเป็นเส้นตรง (%)	ว่ายในแนวเส้นโค้ง (%)
0	77.5 ± 2.5	71.3 ± 7.2	6.3 ± 4.7
1	67.5 ± 2.5*	48.8 ± 11.6	18.7 ± 9.7
2	45.0 ± 2.9**	27.5 ± 15.0**	17.5 ± 7.5
3	40.0 ± 0.0**	35.0 ± 4.1**	16.3 ±11.4

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 นาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 นาที) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 2 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

ตารางที่ 4 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

การกระทบต่อความร้อน (วินาที)	การเคลื่อนที่ (%)	ว่ายเป็นเส้นตรง (%)	ว่ายในแนวเส้นโค้ง (%)
0	57.5 ± 2.5	31.3 ± 6.6	23.8 ± 6.3
1	40.0 ± 0.0**	18.8 ± 5.9	18.8 ± 5.2
2	25.0 ± 2.7**	13.8 ± 1.3*	11.3 ± 3.8
5	11.3 ± 3.1**	3.8 ± 1.3**	7.5 ± 2.5

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 วินาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

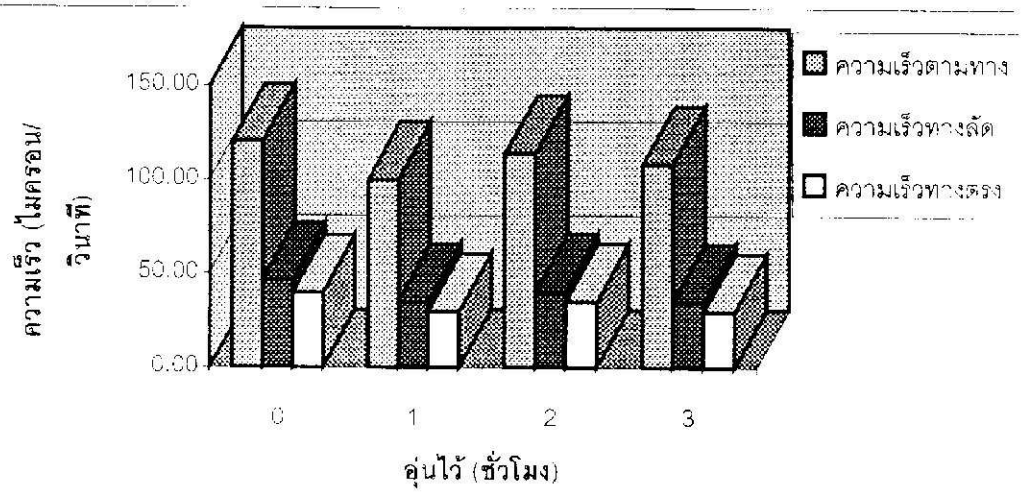
** แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 วินาที) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

จากการทดลองนี้พบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบกับความร้อนนานขึ้น ร้อยละของของการเคลื่อนที่มีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 57.5 ± 2.5) เป็นร้อยละ 40.0 ± 0.0 ($p < 0.01$), 25.0 ± 2.7 ($p < 0.01$) และ 11.3 ± 3.1 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 1, 2 และ 5 วินาทีตามลำดับ (ตารางที่ 4) ความร้อนให้ผลลบต่อร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงหรือเกือบตรงและมีค่าลดลงในทำนองเดียวกัน โดยค่าในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 31.3 ± 6.6) มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 1 วินาที (ร้อยละ 18.8 ± 5.9, $p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบเมื่อกระทบกับความร้อนเป็นเวลา 2 วินาที (ร้อยละ 13.8 ± 1.3, $p < 0.05$) และ 5 วินาที (ร้อยละ 3.8 ± 1.3, $p < 0.01$)

อสุจิที่ว่ายในแนวเส้นโค้งไม่ได้รับผลกระทบจากความร้อน โดยค่าร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 5 วินาที มีค่าร้อยละ 23.8 ± 6.3, 18.8 ± 5.2, 11.3 ± 3.8 และ 7.5 ± 2.5 ตามลำดับ ($p > 0.05$)

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ความเร็วของอสุจิโดยภาพรวมลดลงเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 3 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาที่ความเร็วตามทางของอสุจิพบว่า ความเร็วตามทางของอสุจิในกลุ่มควบคุม (120.2 ± 4.0 ไมครอน/วินาที) มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (99.9 ± 2.7 ตามทางไมครอน/วินาที, $p < 0.01$) แต่มีค่าไม่แตกต่างจากกว่าน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 3 ชั่วโมง (114.1 ± 8.0 และ 108.3 ± 3.3 ไมครอน/วินาที ตามลำดับ, $p > 0.05$) จากการทดลองนี้พบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบกับความร้อนนานขึ้น ความเร็วทางลัดมีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม (46.3 ± 1.5 ไมครอน/วินาที) เป็น 34.9 ± 1.6 ($p < 0.01$), 40.2 ± 1.6 ($p < 0.01$) และ 35.0 ± 1.6 ไมครอน/วินาที ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 3) ส่วนความเร็วทางตรงให้ผลในทำนองเดียวกันและมีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม (39.8 ± 1.8 ไมครอน/วินาที) เป็น 29.7 ± 1.5 ($p < 0.01$), 35.1 ± 1.6 ($p < 0.05$) และ 29.7 ± 1.7 ($p < 0.01$) ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 3 ความเร็วของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ตารางที่ 5 ร้อยละของการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ระยะเวลาอุ่น (ชั่วโมง)	การเคลื่อนที่ (%)	ว่ายเป็นเส้นตรง (%)	ว่ายในแนวเส้นโค้ง (%)
0	70.0 ± 4.1	53.8 ± 4.7	16.3 ± 2.4
1	65.0 ± 2.9	45.0 ± 2.8	20.0 ± 4.1
2	17.5 ± 4.8**	10.0 ± 3.5**	5.0 ± 2.0*
3	17.5 ± 2.5**	15.0 ± 3.5**	2.5 ± 1.4**

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

เมื่ออุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง ร้อยละของของการเคลื่อนที่ในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 70.0 ± 4.1) มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ร้อยละ 65.0 ± 2.9, $p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ร้อยละ 17.5 ± 4.8, $p < 0.01$) และ 3 ชั่วโมง (ร้อยละ 17.5 ± 2.5, $p < 0.01$, ตารางที่ 5)

ร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรงหรือเกือบตรง ได้รับผลกระทบในทำนองเดียวกันคือมีค่าในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 53.8 ± 4.7) ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ร้อยละ 45.0 ± 2.8, $p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ร้อยละ 10.0 ± 3.5, $p < 0.01$) และ 3 ชั่วโมง (ร้อยละ 15.0 ± 3.5, $p < 0.01$)

อสุจิที่ว่ายในแนวเส้นโค้งมีค่าลดลงเมื่ออุ่นไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น โดยค่าร้อยละของการว่ายในแนวเส้นโค้งในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 0 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุม) มีค่าร้อยละ 16.3 ± 2.4 มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ร้อยละ 20.0 ± 4.1, $p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบเมื่ออุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ร้อยละ 5.0 ± 2.0, $p < 0.05$) และ 3 ชั่วโมง (ร้อยละ 2.5 ± 1.4, $p < 0.01$)

วิจารณ์

เป็นที่ทราบกันดีว่า ลักษณะของการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญที่สามารถแสดงถึงความสมบูรณ์พันธุ์ อย่างไรก็ตามยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ว่าลักษณะของการเคลื่อนที่ลักษณะใดที่สามารถบ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) เป็นดัชนีตัวสำคัญที่สุดตัวหนึ่งสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (Bishop, 1962) และประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ ค่าของการเคลื่อนที่ที่ตรวจวัดมีหลากหลายตั้งแต่การเคลื่อนที่ (motility) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ (percentage of motile cells) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (percentage of progressive motile cells) และความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (sperm velocity) ได้มีรายงานออกมาเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ในสัตว์หลายชนิด เช่น โค (Lasley, 1944; Bishop *et al.*, 1954; Uwland, 1984; Wood *et al.*, 1986) ในแกะ (Hulet and Ercanbrack, 1962; Wierzbowski and Kareta, 1988) และในคน (MacLeod and Gold, 1951; Harvey, 1960; Hartman, 1965; Milligan *et al.*, 1980; Holt et al., 1985; Aitken, 1990)

ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นอีกค่าหนึ่งซึ่งมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนกว่าค่าอื่น และได้มีการประเมินค่าความเร็วอสุจิเพื่อใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแพร่หลายมากขึ้นเรื่อย ๆ (Holt *et al.*, 1985; Milligan *et al.*, 1980) ผลจากการทดลองในครั้งนี้ซึ่งได้ทำการวัดค่าความเร็วตามทาง

(track velocity) ค่าความเร็วทางลัด (path velocity) และค่าความเร็วทางตรง (progressive velocity) ทำให้ทราบได้จากทุกการทดลองไปในทิศทางเดียวกันเป็นภาพโดยรวมซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี คือ ค่าความเร็วตามทาง มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ค่าความเร็วทางลัดและค่าความเร็วทางตรง ตามลำดับ ค่าทั้ง 3 ค่านี้มีความสัมพันธ์กันคือ หากค่าทั้ง 3 มีค่าใกล้เคียงกันแสดงว่าอสุจิเดินทางในแนวเส้นตรง และหากค่าความเร็วตามทางมีค่ามากกว่าความเร็วทางลัดและความเร็วทางตรงมากเท่าใดก็แสดงถึงการว่ายที่เป็นทางโค้งไปมา มากขึ้นเท่านั้น

ความเร็วตามทางของอสุจิในน้ำเชื้อสดที่ตรวจพบมีค่าเฉลี่ย 135.7 $\pm$ 2.8 ไมครอน/วินาที ซึ่งมีค่ามากกว่ารายงานในโค (64-84 ไมครอน/วินาที; Ford and Lees, 1990) ส่วนความเร็วทางลัดและทางตรงมีค่าน้อยกว่าความเร็วตามทางประมาณครึ่งหนึ่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อวัดจากจุดแรกไปยังจุดสุดท้าย หรืออีกนัยหนึ่งระยะทางจริงที่เคลื่อนที่ได้ (จากจุดเดิม) มีค่าน้อยกว่าระยะทางที่สุจิว่ายไปจริง ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าอสุจิไม่ได้ว่ายในแนวเส้นตรง แต่ว่ายอ้อมไปมาทำให้ได้ระยะทางจริงๆ น้อย ชี้ไปถึงการสำเลียงอสุจิจากท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมียเข้าไปด้านในเพื่อผสมกับไข่ จะต้องใช้ความพยายามสูง และอาจต้องมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่อหนุนด้วย อย่างไรก็ตามลักษณะการเคลื่อนที่ที่ตรวจเป็นการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะในสารละลายทริสกลูโคส ซึ่งมีความแตกต่างจากสภาพจริงภายในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

ในน้ำเชื้อสดมีร้อยละของการเคลื่อนที่เฉลี่ย 70.6 $\pm$ 3.5 ซึ่งเป็นการว่ายในแนวเส้นตรงมากที่สุด (ร้อยละ 55.0 $\pm$ 4.4) และมีการว่ายในแนวเส้นโค้งอยู่บ้าง (ร้อยละ 13.8 $\pm$ 3.1) ผลของลักษณะที่มีการว่ายในแนวเส้นตรงนี้แสดงให้เห็นว่าอสุจิเคลื่อนที่มีทิศทางไปทางใดทางหนึ่งอย่างมีทิศทาง และจากผลของความเร็วตามทาง ความเร็วทางลัด และความเร็วทางตรง ชี้ให้เห็นว่าในระยะของการเดินทางนั้นมีการเคลื่อนที่ในทิศทางโค้งเป็นยะยะทางสั้นๆ แต่ยังวกกลับมา วนไปมาคล้ายการเคลื่อนที่ส่ายของงู การเดินทางของอสุจิจึงยังคงมีทิศทางอยู่ด้วย

ความเย็นมีผลให้ร้อยละของการเคลื่อนที่ลดลงในขณะที่ความเร็วยังคงที่ (การทดลองที่ 2) การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าความเย็นมีผลต่อประชากรหรือจำนวนของอสุจิที่ได้รับผลกระทบ จึงทำให้จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ลดลง ในขณะที่ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ไม่ได้รับผลกระทบจากความเย็น ที่เห็นได้ชัดเจนคือร้อยละของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นตรงมีค่าลดลง ซึ่งแสดงว่าอสุจิที่มีคุณภาพดีอยู่เดิมได้รับผลกระทบ ส่วนอสุจิที่ว่ายในแนวโค้งมีแนวโน้มสูงขึ้นแม้จะไม่มีค่าแตกต่างทางสถิติก็ตาม ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มปริมาณของอสุจิในการผสมเทียมในกรณีที่น้ำเชื้อกระทบต่อความเย็น เช่น การลดอุณหภูมิ จะช่วยให้อัตราการผสมติดดีขึ้นได้

ความร้อนทำให้ร้อยละของการเคลื่อนที่ลดลงเช่นกัน ในขณะที่ความเร็วยังคงที่ (การทดลองที่ 3) ดังนั้นลักษณะของผลกระทบจึงมีผลต่อจำนวนของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้น้อยลง ส่วนความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เคลื่อนที่ยังคงระดับเดิม ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับการกระทบจากความเย็นซึ่งปริมาณของอสุจิได้รับผลกระทบส่วนอสุจิที่ไม่ได้รับผลกระทบยังคงสามารถว่ายได้ในระดับความเร็วเดิม

การอุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ให้ผลแตกต่างออกไป ทั้งความเร็วและร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ลดลง แสดงว่าไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นระยะเวลานานได้ น้ำเชื้อที่อุ่นไว้เป็นระยะเวลานานจะทำให้คุณภาพลดลง (Maxwell and Johnson, 1997) และอาจใช้ได้ไม่ดีในการผสมเทียม

รายงานนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้งการกระทบต่อความเย็นและความร้อน ไม่มีผลต่อ ความเร็วตามทาง ความเร็วทางลัด และ ความเร็วทางตรงของอสุจิ แต่มีค่าลดลงในการอุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นไปได้ว่าผลกระทบต่างๆ มีต่อ 'คุณภาพเชิงปริมาณ' ของน้ำเชื้อซึ่งอาจแสดงออกทางค่าการเคลื่อนที่ว่ามีอสุจิที่เคลื่อนที่ลดลงในอัตราส่วนเท่าใด แต่ค่าความเร็วซึ่งวัดจากเฉพาะตัวที่เคลื่อนที่ อาจเป็นตัวบ่งชี้ทาง 'คุณภาพ' ว่าในกลุ่มที่เคลื่อนที่นั้นเคลื่อนที่ไปได้เร็วเพียงใด ดังนั้น การกระทบต่อความเย็นและความร้อนในการทดลองนี้ อาจมีผลเพียงแต่ลดปริมาณอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่ลดความเร็วของอสุจิที่ยังสามารถจะเคลื่อนที่ได้ หรืออีกนัยหนึ่งผลกระทบดังกล่าวทำให้ลดจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ แต่ไม่ลด'คุณภาพ'ของการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการใช้น้ำเชื้อผสมเทียมจึงยังอาจสามารถใช้น้ำเชื้อที่กระทบต่อปัจจัยเหล่านี้ได้ แต่ต้องเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อมากขึ้นเพื่อให้สมดุลย์กับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่น้อยลง

เหตุที่เป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือการกระทบต่อความเย็น (0 ถึง 3 นาที) และความร้อน (0 ถึง 5 วินาที) เป็นผลกระทบที่ยังไม่รุนแรงเพียงพอที่จะมีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้ความเร็วโดยส่วนใหญ่ของอสุจิจะไม่ลดลงเนื่องจากผลกระทบดังกล่าว แต่คุณภาพน้ำเชื้ออื่นๆ คือ ร้อยละของการเคลื่อนที่ และ ร้อยละของอสุจิที่ว่ายในแนวตรง มีค่าลดลง แสดงว่าอสุจิบางส่วนได้รับผลกระทบและหยุดการเคลื่อนที่ หรือปริมาณของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองที่ 4 เมื่อดูผลกระทบจากการที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส แสดงให้เห็นว่าการอุ่นไว้จะมีผลกระทบทั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ ซึ่งแตกต่างจากผลกระทบของความร้อนและความเย็น ปัจจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าควรจะใช้น้ำเชื้อให้เร็วที่สุดจะดีกว่าการอุ่นไว้ และไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ'การศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่และการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแพะ' ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน (NAT39009)

โครงการวิจัยได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากห้องปฏิบัติการการสืบพันธุ์ของสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากร ธรรมชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

Prince of Songkla U

บรรณานุกรม

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2528. การผสมเทียม. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

Aiken, R.J. 1990. Motility parameters and fertility. In C. Gagnon (Ed.) "Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects". CRC Press, Boca Raton. pp. 285-302.

Bishop, D.W. 1962. Sperm motility. Physiol. Rev., 42:1-59.

Bishop, M.W.H., Campbell, R.C., Hancock, J.L. and Walton, A. 1954. Semen characteristics and fertility in the bull. J. Agric. Sci., 44:227-248.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.

Ford, W.C.L. and Lees, J.M. 1990. The bioenergetics of mammalian sperm motility. In C. Gagnon (Ed.) "Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects". CRC Press, Boca Raton, pp. 175-202.

Harvey, C. 1960. The speed of human spermatozoa and the effect on it of various diluents, with some preliminary observations on clinical material. J. Reprod. Fertil., 1: 84-95.

Hartman, C.G. 1965. Correlations among criteria of semen quality. Fertil. Steril., 16:632-637.

Holt, W.V., Moore, H.D.M. and Hillier, S.G. 1985. Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: Correlation of results with in vitro fertilization assays. Fertil. Steril., 44:112-119.

Hulet, C.V. and Ercanbrack, S.K. 1962. A fertility index for rams. J. Anim. Sci., 21:489-493.

Lasley, J.F. 1944. The relationship between spermatozoan motility and the percentage of live spermatozoa and fertilizing capacity of bull semen. J. Anim. Sci., 3:433.

MacLeod, J. and Gold, R.Z. 1951. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. Fertil. Steril., 2:187-204.

Maxwell, W.M.C. and Johnson, L.A. 1997. Membrane status od boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology, 48:209-219.

Milligan, M.P., Harris, S.J. and Dennis, K.J. 1980. Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. Fertil. Steril., 34:509-511.

Rickmenspoel, R. 1962. Biophysical approaches to the measurement of sperm motility in D.W. Bishop (Ed.) "sperm motility". American Association for the Advancement of Science, Washington DC, pp. 31-54.

Salamon, S. 1976. Artificial insemination of sheep. Publicity Press, Chippendale, N.S.W., 104 pp.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill, Singapore. 633 pp.

Suttiyotin, P. and Thwaites, C.J. 1991. The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 25:209-224.

Suttiyotin, P. and Thwaites, C.J. 1992. Comparison of a swim-up technique with the Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. Reprod. Fertil. Dev., 4:153-160.

Suttiyotin, P., Thwaites, C.J. and Baillie, N.D. 1992. Relationships between the results of a modified sperm penetration test and a swim-up technique and the fertility of ram semen. Theriogenology, 37:851-857.

Uwland, J. 1984. Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In M. Courot (Ed.) "The Male in Farm Animal Reproduction" Martinus Nijhoff Publishers, Boston. Pp> 269-289.

Wierzbowski, S. and Kareta, W. 1988. The comparison of semen motility estimation with factual fertility in rams. Proc. 11th Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., 3:314-316.

Wood, P.D.P., Foulkes, J.A., Shaw, R.C. and Melrose, D.R. 1986. Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI. J. Reprod. Fert., 76:783-795.