วิธีการ

การทดลองทำที่ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการการสืบพันธุ์ของสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สัตว์ทดลอง

สุกรที่ใช้ในการทดลองเป็นสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์โตเต็มวัยจำนวน 4 ตัว เลี้ยงในสภาพการเลี้ยงดูของฟาร์มทดลองภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยแต่ละตัวขังแยกในแต่ละคอก ทำการตรวจสุขภาพเป็นประจำ สุกรได้รับการฝึกให้ขึ้นหุ่นเพื่อทำการรีดน้ำเชื้อ และได้ทดสอบแล้วว่าสุกรทุกตัวสามารถให้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีก่อนเริ่มทำการทดลอง

การรีดน้ำเชื้อ

การรีดน้ำเชื้อสุกรทำในเวลาเช้าหรือในเวลาที่อุณหภูมิภายนอกอยู่ในช่วงที่สบาย (อุณหภูมิประมาณ 28° เซลเซียส) ไม่มีอากาศร้อนหรือสภาพอากาศที่เปียกแฉะ ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากความเครียดและอากาศร้อนซึ่งจะทำให้พ่อสุกรเหนื่อยและอาจเป็นอันตรายได้

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรโดยวิธีใช้มือร่วมกับหุ่น (พีรศักดิ์, 2528) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ เตรียมเครื่องมือเก็บน้ำเชื้อให้พร้อม นำพ่อสุกรเข้าในคอกรีดน้ำเชื้อซึ่งมีหุ่นล่อเตรียมพร้อมอยู่แล้ว เมื่อสุกรเริ่มแสดงอาการสนใจหุ่น ดุน ดม จนกระทั่งเกิดความกำหนัดเต็มที่ก็จะกระโดดใช้ 2 ขาหน้าขึ้นพาดหุ่น หลังจากที่พ่อสุกรขึ้นหุ่นและมีการแข็งตัวขององคชาตโผล่พ้นหนังหุ้มออกมา ผู้รีดทำการจับปลายองคชาติโดยให้ร่องมือเข้าพอดีกับเกลียวของปลายองคชาต เมื่อเกิดความกระชับ พ่อสุกรจะทำการหลั่งน้ำเชื้อโดย ผู้รีดน้ำเชื้อนำขวดเก็บน้ำเชื้อที่มีผ้าก๊อซปิดปากขวดเพื่อกรองเม็ดสาคูออก ทำการเก็บเฉพาะส่วนที่เป็น sperm rich fraction โดยส่วนแรกที่พ่อสุกรหลั่งออกมาจะเป็นส่วนใสทำการทิ้งไป และเก็บเฉพาะส่วนที่ 2 คือส่วน sperm rich fraction ซึ่งจะมีสีขาวขุ่น ปล่อยให้พ่อสุกรหลั่งน้ำเชื้อจนหมดโดยสังเกตจากการที่พ่อสุกรเกิดการอ่อนตัวขององคชาตและลื่นหลุดจากมือผู้รีด หลังจากนั้นพ่อสุกรจึงลงจากหุ่น

นำขวดเก็บน้ำเชื้อสุกรใส่ในกระติกควบคุมอุณหภูมิและแสง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ นำน้ำเชื้อมายังห้องปฏิบัติการเพื่อดำเนินการต่อไป กรณีที่มีการรีดเก็บหลายตัวอย่าง ในทุกครั้งที่รีดเก็บได้ใช้เวลารวมกันไม่เกิน 45 นาที ตั้งแต่รีดเก็บจนนำน้ำเชื้อมาถึงห้องทดลอง

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อมาหล่อเลี้ยงไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 27° เซลเซียส ตรวจคุณภาพเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้น ร้อยละของการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้แล้ว (พีรศักดิ์ และวรวิทย์, 2545) เพื่อคัดกรองน้ำเชื้อที่ดีมาใช้ในการทดลอง

ปริมาตร วัดจากขวดเก็บน้ำเชื้อ

ดัชนีการเคลื่อนที่ของอสุจิ หยดน้ำเชื้อหยดเล็กๆ ลงบนสไลด์โดยไม่ปิด cover glass ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยายประมาณ 60-100 เท่า ประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นกลุ่มก้อน โดยให้คะแนนดังนี้คือ

คะแนน 0 ไม่มีการเคลื่อนที่
คะแนน 1 มีการเคลื่อนที่เล็กน้อย ไม่มีคลื่น
คะแนน 2 มีการเคลื่อนที่ปานกลาง อาจมีคลื่นเกิดขึ้นบ้าง
คะแนน 3 มีการเคลื่อนที่หมุนวนเป็นคลื่นอย่างรุนแรง

ร้อยละของอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ในแต่ละการทดลองเป็นการตรวจในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางแล้ว หยดน้ำเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ปิดด้วย cover glass ขนาด 20x20 มิลลิเมตร โดยใช้ความระมัดระวังให้ cover glass ปิดทับทุกส่วนของน้ำเชื้อและไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้ cover glass หลังจากที่ได้ทำการปิดทับแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มีความหนาของน้ำเชื้อในการส่องตรวจมีค่าคงที่เพื่อลดความแปรปรวนในการประมาณค่าการเคลื่อนที่ การปฏิบัติดังกล่าวจะได้ความหนา (ความสูง) ของน้ำเชื้อที่ใช้ตรวจประมาณ 103 ไมครอน ซึ่งจะได้ค่าไม่ต่ำกว่า 60 ไมครอน ทำให้อสุจิสามารถเคลื่อนที่ในแนวดิ่งได้สะดวก ไม่เป็นการปิดกั้นการเคลื่อนที่ในแนวใดแนวหนึ่ง และเพื่อลดการรบกวนการว่ายในแนวตั้งของอสุจิตามที่ได้แนะนำไว้ (Rickmenspoel, 1962) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยายประมาณ 400 เท่าประเมินค่าการเคลื่อนที่เป็นร้อยละโดยให้คะแนนขั้นละ 5 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้น ตรวจความเข้มข้นโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดแดง ใช้ปิเปตสำหรับนับเม็ดเลือดแดงดูดน้ำเชื้อและดูดสารละลายซิเตรทคลอรามีนที (ตารางที่ 1) เพื่อเจือจางน้ำเชื้อ 100 เท่า เขย่าให้เข้ากัน และใส่น้ำเชื้อที่เจือจางแล้วลงในช่องนับของสไลด์นับเม็ดเลือด นำสไลด์นับ

ตารางที่ 1 สารละลายซิเตรทคลอรามีนที สำหรับเจือจางน้ำเชื้อในการตรวจหาความเข้มข้น

สาร	จำนวน	
โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	30	กรัม
คลอรามีน ที (Chloramine T)	40	กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 สารละลายอีโอซิน-ไนโกรซิน สำหรับย้อมอสุจิเพื่อตรวจร้อยละของอสุจิมีชีวิตและร้อยละของอสุจิผิดปกติ (Hancock, 1951)

สาร	จำนวน	
อีโอซิน (Eosin)	1.67	กรัม
ไนโกรซิน (Nigrosin)	10.00	กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100.00	มิลลิลิตร

เม็ดเลือดไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการนับอสุจิที่มองเห็นในตารางจนครบตามกำหนดและคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ร้อยละของอสุจิมีชีวิต ทำการย้อมอสุจิด้วยสารละลายอีโอซิน-ไนโกรซิน (ตารางที่ 2) เพื่อตรวจร้อยละของอสุจิมีชีวิต ดูดน้ำเชื้อ จำนวน .01 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่อุ่นไว้ในอ่างน้ำควบคุมมีอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียสเท่ากัน ดูดสารละลายไนโกรซิน-อีโอซินที่มีอุณหภูมิ 37° เซลเซียส หยดลงในหลอดทดลองจำนวน 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วอุ่นไว้นาน 5 นาที นำสารละลายที่ได้มามาแผ่ให้สารละลายกระจายเป็นแผ่นบางบนสไลด์ด้วยวิธีสเมียร์บนสไลด์ แล้วทำให้แห้งในอากาศ ทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อนับอสุจิที่ติดสีอีโอซิน (ตาย) และที่ไม่ติดสี (มีชีวิต) รวมอย่างน้อย 200 เซลล์ แล้วคำนวณหาร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต การนับอสุจิทำให้แล้วเสร็จในวันเดียวกันกับที่เตรียมสไลด์

ร้อยละของอสุจิผิดปกติ ทำการนับอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติจากสไลด์ที่ย้อมตรวจหาร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตด้วยสารละลายอีโอซิน-ไนโกรซินดังอธิบายไว้ด้านบน การนับอสุจิผิดปกติทำโดยนับอสุจิที่ผิดปกติที่ส่วนหัวและส่วนหางรวมกัน

ตารางที่ 3 สารเจือจาง BTS (Johnson, et al., 2000)

สาร	จำนวน	
กลูโคส (glucose)	37.00	กรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	1.25	กรัม
โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	6.00	กรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)	1.25	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์ (Potessium chloride)	0.75	กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

น้ำเชื้อที่ใช้เป็นน้ำเชื้อที่มีปริมาตรไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิลิตร มีความหนาแน่นในระดับ 2 ขึ้นไป มีการเคลื่อนที่หมู่ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป และมีร้อยละของอสุจิที่มีการเคลื่อนที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

ทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพด้วยสารเจือจาง BTS (ตารางที่ 3) ในอัตราส่วน 1:2 แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่างๆ

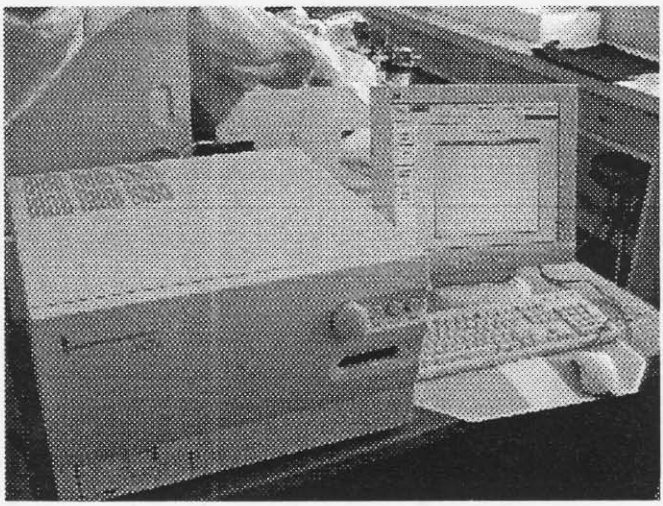
การตรวจการเคลื่อนที่ด้วยเครื่องตรวจ

การทดลองส่วนที่ 3 ใช้เครื่องมือทางการค้าเพื่อตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิคือ Hamilton Thorn Motility Analyser รุ่น Coros V12.2L (Hamilton Thorn Research, USA, รูปที่ 1) ในการตรวจแต่ละครั้งได้ใช้มาตรฐานในการตรวจคือ ตรวจอสุจิไม่น้อยกว่า 500 เซลล์ ตั้งค่าเครื่องมือตามมาตรฐานที่ได้แนะนำไว้โดยบริษัทผู้ผลิต มีจำนวนภาพ 60 ภาพ/วินาที จำนวนภาพที่ใช้ 45 ภาพ ค่า contrast ต่ำสุด 30 ขนาดเซลล์ต่ำสุด 7 พิกเซล ค่า contrast ต่ำสุดของเซลล์ที่ไม่เคลื่อนไหว 30 ร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรุนแรง เมื่อ average path velocity (VAP, ไมครอน/วินาที) มากกว่า 45 และ straightness (STR, %) มากกว่า 45

ค่าความเข้มของเซลล์ 50 ค่าที่ใช้แบ่งเซลล์เคลื่อนที่ช้า–ไม่เคลื่อนที่ ใช้ VAP (ไมครอน/วินาที) 20 และ VSL (ไมครอน/วินาที) 5 ขนาดหัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ 0.65 ถึง 4.99 ความเข้มของหัวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ 0.50 to 2.50 ความยาวอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ 2 ถึง 87 ใช้อุณหภูมิ 37° เซลเซียส และความลึกของช่องใส่น้ำเชื้อ 20.0 ไมครอน

ค่าที่ตรวจวัดคือ

1. linearly motile spermatozoa (LIN) วัดได้โดยใช้ค่า VSL หารด้วย VCL (%)



รูปที่ 1 เครื่องมือตรวจวัดคุณภาพการเคลื่อนที่ของอสุจิ Hamilton Thorn Motility Analyser รุ่น Coros V12.2L (Hamilton Thorn Research, USA)

2. straight linear velocity (VSL) คือค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิเฉลี่ยในแนวตรงตั้งแต่เริ่มตรวจเป็นแนวจนจบ (ไมครอน/วินาที)

3. average path velocity (VAP) เป็นค่าเฉลี่ยของความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในแนวตัดในโค้งมน (ไมครอน/วินาที)

4. curvilinear velocity (VCL) ซึ่งคือค่าเฉลี่ยของความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในนแวทางลัดที่วัดโดยตรงจากแต่ละจุดที่เชื่อมต่อเป็นแนวตามที่ตรวจวัด (ไมครอน/วินาที)

5. straightness (STR) คือค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง VSL/VAP (%)

6. amplitude of lateral head displacement (ALH) คือค่าเฉลี่ยของการส่ายของหัวไปทางด้านข้าง (ไมครอน)

7. beat cross frequency (BCF) เป็นความถี่ที่หัวอสุจิขยับผ่านเส้นทางเดินเฉลี่ย (Hz)

8. motility (MOT, %) คือการเคลื่อนที่ของสุจิ

9. progressive motility (PMOT, %) คือการเคลื่อนที่ของอสุจิไปข้างหน้าอย่างรุนแรง

การทดลองที่ 1 ขนาดรู (pore size) ของกระดาษกรอง

รีดน้ำเชื้อสุกร ทำการตรวจคุณภาพเบื้องต้นแล้วเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ BTS ในอัตราส่วน 1:2 ทำการกรองน้ำเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำเชื้อ โดยใช้เครื่อง suction ที่ได้ทำการปรับแรงดูดที่ 12 ม.ม.ปรอท แล้วนำมาทำการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรู 4 ขนาด เป็นเวลา 10 นาที

แยกน้ำเชื้อเป็น 4 ชุด ชุดละ 4 ซ้ำ เพื่อทดสอบการกรอง

ชุดที่ 1 กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 6 ไมครอน

ชุดที่ 2 กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 8 ไมครอน

ชุดที่ 3 กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 11 ไมครอน

ชุดที่ 4 กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 16 ไมครอน

เก็บน้ำเชื้อทั้งส่วนที่ค้างอยู่บนแผ่นกรอง และส่วนที่ผ่านแผ่นกรองออกมา ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (พีรศักดิ์ และวรวิทย์, 2545) ได้แก่

ปริมาตร

ดัชนีของการเคลื่อนที่

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ร้อยละของการเคลื่อนที่

ย้อมสีเพื่อตรวจร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต

ร้อยละของอสุจิที่ผิดปกติ

ทำซ้ำตั้งแต่เริ่มต้น โดยใช้น้ำเชื้อชุดใหม่ รวมการทดลองทั้งหมดใช้น้ำเชื้อ 6 ชุด

การทดลองที่ 2 แรงดูดของ suction : คุณภาพน้ำเชื้อ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบแรงดูดของ suction ในขนาดต่างๆ กันในการกรองว่ามีผลต่อและคุณภาพน้ำเชื้อมากน้อยเพียงใด ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นแล้วเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ BTS ในอัตราส่วน 1:2 ทำการกรองน้ำเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรู 11 ไมครอน โดยใช้แรงดูด 5, 6, 8 และ 10 ม.ม.ปรอท เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บน้ำเชื้อทั้งส่วนที่ค้างอยู่บนแผ่นกรอง และส่วนที่ผ่านแผ่นกรองออกมา ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (พีรศักดิ์ และวรวิทย์, 2545) เหมือนการทดทลองที่ 1

ทำซ้ำตั้งแต่เริ่มต้น โดยใช้น้ำเชื้อชุดใหม่ รวมการทดลองทั้งหมดใช้น้ำเชื้อ 5 ชุด

การทดลองที่ 3 แรงดูดของ suction : ลักษณะการเคลื่อนที่

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบแรงดูดของ suction ในขนาดต่างๆ กันในการกรองว่ามีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิที่วัดด้วยเครื่องมือมากน้อยเพียงใด วิธีการทดลองทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นแล้วเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ BTS ในอัตราส่วน 1:2 ทำการกรองน้ำเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรู 11 ไมครอน โดยใช้แรงดูด 5, 6, 8 และ 10 ม.ม.ปรอท เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บน้ำเชื้อทั้งส่วนที่ค้างอยู่บนแผ่นกรอง และส่วนที่ผ่านแผ่นกรองออกมา ทำการตรวจคุณภาพการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่องมือ Hamilton Thorn Motility Analyser ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

ทำซ้ำตั้งแต่เริ่มต้น โดยใช้น้ำเชื้อชุดใหม่ รวมการทดลองทั้งหมดใช้น้ำเชื้อ 4 ชุด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ร้อยละของการเคลื่อนที่ ร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต ร้อยละของอสุจิที่ผิดปกติ และค่าลักษณะการเคลื่อนที่ที่วัดด้วยเครื่องวิเคราะห์น้ำเชื้อ มาวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)