รายงานวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการใช้วิธีการอย่างง่ายและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดการเคลื่อนไหวและความเร็วของตัวอสุจิโดยวิธีการว่ายขึ้นด้านบน (swim-up technique)

Development of a simple, objective 'swim-up technique' for measurement of sperm motility and velocity

โดย

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 19175

BIB Key 157360

เลขหมู่ SF383.7 ...

เลขทะเบียน ...

- 3 / W.A. 2542

การพัฒนาการใช้วิธีการอย่างง่ายและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดการเคลื่อนไหวและความเร็วของตัวอสุจิโดยวิธีการว่ายขึ้นด้านบน (swim-up technique)

Development of a simple, objective 'swim-up technique' for measurement of sperm motility and velocity

---

บทคัดย่อ

การทดลองและพัฒนาการตรวจวัดการเคลื่อนไหว และความเร็วของตัวอสุจิโดยวิธีการว่ายขึ้นด้านบน ได้ดัดแปลงและเสนอแนวคิดในการวัดความเร็วของอสุจิ โดยการวัดความเข้มข้นของแสงด้วยคัลเลอริมิเตอร์ การวัดมีหลักที่สำคัญคือการส่งน้ำเชื้อเข้าไปอยู่ใต้สารละลายที่อยู่ในคิวเวทสำหรับวัดค่าความเข้มข้นของแสง

น้ำเชื้อที่ส่งลงไปจะประสานกับสารละลายในคิวเวทเป็นแนวเส้นแบ่งโดยน้ำเชื้ออยู่ทางด้านล่างของสารละลาย เมื่อปล่อยทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง อสุจิในน้ำเชื้อที่มีอสุจิที่เคลื่อนที่ได้จะว่ายขึ้นไปในส่วนของสารละลาย ทำให้เกิดความขุ่นขึ้น เมื่อความขุ่นนี้แผ่กระจายไปถึงส่วนที่แสงผ่าน จะทำให้ความเข้มข้นของแสงเพิ่มขึ้นจนสามารถตรวจวัดได้ จากนั้นสามารถจับเวลาที่ความขุ่นเริ่มเข้ามาในส่วนของทางผ่านแสง (แสดงว่าอสุจิว่ายเข้าถึงส่วนนี้แล้ว) และวัดระยะทางจากบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลาย (บริเวณที่อสุจิเริ่มว่ายขึ้น) จนถึงบริเวณที่แสงผ่าน ค่าทั้ง 2 นำมาคำนวณหาความเร็วของการว่ายของอสุจิ

การทดลองใช้วัดความเร็วของอสุจิในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส พบว่าความเร็วเฉลี่ยของอสุจิ ในน้ำเชื้อสดมีค่าเฉลี่ยทั้งสิ้น 99.6 ± 66.9 ไมครอน/วินาที มีค่าร้อยละของการเคลื่อนที่เฉลี่ย 58.8 ± 6.5 และความเร็วที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.010$, $p > 0.05$)

ความเย็นลดความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ค่าความเร็วที่วัดได้มีค่าลดลงจาก 196.4 ไมครอน/วินาที ในกลุ่มควบคุมเป็น 101.5 $\pm$ 16.4 ($p < 0.01$) และ104.7 $\pm$ 20.4 ($p < 0.01$) ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นเป็นเวลา 1 และ 2 นาทีตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างจาก น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นเป็นเวลา 3 นาที (128.8 $\pm$ 26.8 ไมครอน/วินาที, $p > 0.05$) ส่วนร้อยละของการเคลื่อนที่มีแนวโน้มในทำนองเดียวกันกับความเร็ว โดยมีเริ่มมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 67.5 $\pm$ 5.0) เมื่อกระทบต่อความเย็นนาน 3 นาที (ร้อยละ 50.6 $\pm$ 5.3, $p < 0.01$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.277$, $p > 0.05$)

ไม่พบความแตกต่างของความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนตั้งแต่ 0 ถึง 5 วินาที ($p > 0.05$) ความเร็วในการเคลื่อนที่มีค่าตั้งแต่ 159.2 $\pm$ 26.9 ถึง 213.3 $\pm$ 42.7 ไมครอน/วินาที อย่างไรก็ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิมีแนวโน้มลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบต่อความร้อนนานขึ้น

ร้อยละของการเคลื่อนที่เมื่อกระทบด้วยความร้อน (ร้อยละ 82.5 $\pm$ 2.7, 76.9 $\pm$ 4.1 และ 71.3 $\pm$ 4.0 ในน้ำเชื้อที่กระทบกับความร้อนเป็นเวลา 1, 2 และ 5 วินาที ตามลำดับ) มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 80.6 $\pm$ 3.2, $p > 0.05$) แต่ร้อยละของการเคลื่อนที่เมื่อกระทบด้วยความร้อน 1วินาที มีค่ามากกว่า 5 วินาที ($p < 0.01$) ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่พบว่ามีค่าเข้าใกล้นัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.455$, $p > 0.05$)

เมื่ออุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลกระทบต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ค่าความเร็วที่วัดได้มีค่า 315.4 $\pm$ 58.3 ถึง 412.3 $\pm$ 82.5 ไมครอน/วินาที ($p > 0.05$) ส่วนร้อยละของการเคลื่อนที่ไม่ได้รับผลกระทบจากการอุ่นน้ำเชื้อ ($p > 0.05$) เช่นกัน โดยพบว่ามีค่าร้อยละ 75.0 $\pm$ 4.7 ถึง 83.1 $\pm$ 2.7

ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.073$, $p > 0.05$)

Abstract

Sperm velocity in goat semen was measured by a swim up technique. The principle of the technique relies on the tubidity formed as spermatozoa swam up into a clear medium. A Chemtrix® Type 24 Digital Colorimeter was used to recorded optical density as spermatozoa swam up. As spermatozoa swam up into the light beam, optical density increases and the time was recorded. The sperm velocity was then estimated in micron/sec from the distance between semen-medium interface and the light path divided by the time recorded.

Sperm velocity estimations were made in fresh, cold-shocked, hot-shock and aged semen. In fresh semen, the mean velocity recoderd was 99.6 ± 66.9 micron/sec and the percentage of motile cells was 58.8 ± 6.5. No significant correlation between sperm velocity and percentage of motile cells was recorded ($r = 0.010$, $p > 0.05$)

Cold shock reduced sperm velocity from 196.4 micron/sec in control group to 101.5 ± 16.4 ($p < 0.01$) and 104.7 ± 20.4 ($p < 0.01$) micron/sec in semen shocked for 1 and 2 minutes respectively but did not differ from 3 minute shocked semen (128.8 ± 26.8, $p > 0.05$). The percentage of motile cells declined in the same manner but started to show significant difference when the semen was shocked for 3 minutes (67.5 ± 5.0 VS 50.6 ± 5.3, $p < 0.01$). Sperm velocity was not significantly correlated with percentage of motile cells ($r = 0.277$, $p > 0.05$).

Sperm velocity in hot-shocked semen was not affected by the treatment ($p > 0.05$) and ranged from 159.2 ± 26.9 to 213.3 ± 42.7 micron/sec. The percentage of motile spermatozoa in shocked semen (82.5 ± 2.7, 76.9 ± 4.1 and 71.3 ± 4.0 % in semen hot shocked for 1, 2 and 5 second respectively) did not differ from the control (80.6 ± 3.2). However, the value of 1 second was higher than that of 5 seconds ($p < 0.01$). The correlation between sperm velocity and percentage of motile cells was not significant, although the value approached significant ($r = 0.455$, $p > 0.05$).

Incubation of semen at 37° C for upto 3 hours neither reduce sperm velocity (ranged from 315.4 ± 58.3 to 412.3 ± 82.5 micron/sec, $p > 0.05$) nor the percentage of motile spermatozoa recorded (ranged from 75.0 ± 4.7 to 83.1 ± 2.7, $p > 0.05$). The correlation between sperm velocity and percentage of motile cells was not significant ($r = 0.073$, $p > 0.05$).

สารบัญ

บทคัดย่อ _____ 1

Abstract _____ 3

บทนำ _____ 5

อุปกรณ์และวิธีการ _____ 6

การดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์ _____ 6

น้ำเชื้อและการรีดเก็บน้ำเชื้อ _____ 9

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด _____ 10

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น _____ 10

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน _____ 11

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส _____ 11

การวิเคราะห์ข้อมูล _____ 12

ผลการทดลอง _____ 13

การดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์ _____ 13

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด _____ 16

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น _____ 16

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน _____ 18

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส _____ 20

วิจารณ์ _____ 23

กิตติกรรมประกาศ _____ 25

บรรณานุกรม _____ 26

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ 15

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 17

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน..... 19

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส..... 21

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 17

รูปที่ 2 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น 18

รูปที่ 3 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 19

รูปที่ 4 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 20

รูปที่ 5 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส 21

รูปที่ 6 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ... 22

บทนำ

การเคลื่อนที่และความเร็วของอสุจิเป็นค่าที่มีความสำคัญในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ มีรายงานหลายรายงานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเลื่อนที่และความเร็วของอสุจิ กับความสมบูรณ์พันธุ์ (Holt *et al.*, 1985; Aiken, 1990) การวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิทำกันมานานและใช้กันมาถึงปัจจุบัน โดยมีวิธีการหลากหลาย อย่างไรก็ตามการวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิวิธีการต่างๆ มีสิ่งที่คล้ายกันคือ เป็นการวัดโดยการประมาณค่า ขึ้นกับผู้วัดเป็นส่วนใหญ่ และมีความแปรปรวนระหว่างผู้วัดและระหว่างห้องปฏิบัติการ ส่วนการวัดที่ใช้การตัดสินใจของคนน้อยลงและใช้เครื่องมือวัดมากขึ้นเช่น ค่าความเร็วในการว่ายของอสุจิจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความละเอียดอ่อน ซับซ้อน และมีราคาแพง เครื่องมือที่ดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์เพื่อวัดความเร็วของอสุจิ (Suttiyotin and Thwaites, 1992) สามารถวัดความเร็วของอสุจิได้ แต่ยังคงเป็นการวัดความเร็วของ"กลุ่ม"อสุจิที่เคลื่อนตัวเร็วกว่ากลุ่มอื่นๆ และสามารถว่ายเข้ามาในส่วนแสงผ่านทำให้ถูกตรวจวัดได้โดยคัลเลอริมิเตอร์ วิธีการวัดดังกล่าวยังคงต้องการการพัฒนาและตรวจสอบการใช้งานในน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ มากขึ้น และทำในน้ำเชื้อหลากหลายรูปแบบมากขึ้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ก) พัฒนาชุดเครื่องมือตรวจวัดความเร็วของอสุจิของแพะ และ ข) ทดลองใช้เครื่องมือดังกล่าวตรวจวัดความเร็วของอสุจิแพะ ในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

อุปกรณ์และวิธีการ

การดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์ (colorimeter)

คัลเลอริมิเตอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นคัลเลอริมิเตอร์ที่มีชื่อการค้า Chemtrix® Type 24 Digital Colorimeter ใช้กับไฟฟ้าขนาด 220 โวลท์ การดัดแปลงเพื่อใช้ในการวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิจะได้ทำในส่วนของ ตัวจับคิวเวท (cuvette holder), ตัวคิวเวท (cuvette) และ วิธีการใส่น้ำเชื้อใต้สารละลายในคิวเวท

ตัวจับคิวเวท

ตัวจับคิวเวทของเครื่องเป็นแบบที่ใช้สำหรับคิวเวทรูปทรงกระบอก มีขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 10×10×45 มม โดยมีสลักสำหรับดันให้คิวเวทแนบไปด้านหนึ่งและอยู่นิ่งในขณะที่วัดค่าความเข้มข้นของแสง

ลำแสงจากแหล่งกำเนินแสง ส่องผ่านทางเข้าเป็นช่องรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม ส่องผ่านคิวเวท ผ่านสารละลายในคิวเวท และเมื่อผ่านคิวเวทแล้วจะผ่านทางออกเป็นช่องรูปทรงกลมในขนาดเดียวกับช่องแรก และผ่านไปยังเครื่องวัดแสงที่จะแปรเป็นสัญญาณตัวเลขบนหน้าปัทม์

ได้ทำการทดลองเพื่อหาทางดัดแปลงตัวจับคิวเวทเพื่อให้สามารถเลื่อนคิวเวทขึ้นลงได้ในขณะที่วัดความเข้มข้นของแสง ตามที่ได้มีรายงานไว้ (Suttiyotin *et al.*, 1992) แต่ติดปัญหาในเรื่องตัวเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่มีตัวจับคิวเวทอยู่ในพื้นที่จำกัด และไม่สามารถดัดแปลงเครื่องมือเลื่อนคิวเวทได้

คิวเวท

คิวเวทที่ใช้กับคัลเลอริมิเตอร์เครื่องนี้ มีรูปสี่เหลี่ยมทรงกระบอก ขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 10×10×45 มม หลักของการวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนนี้คือ มีสารละลายอยู่ในคิวเวท ทำการใส่น้ำเชื้อให้อยู่ส่วนล่างของสารละลายที่อยู่ในคิวเวท ส่วนนี้จะอยู่นอกขอบเขตของส่วนที่แสงผ่านทำให้ไม่เป็นการรบกวนต่อการอ่านค่าความเข้มข้นของแสง การใส่น้ำเชื้อลงด้านล่างจะทำให้เกิดรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายขึ้น การใส่น้ำเชื้อจะต้องทำให้เกิดรอยต่อที่นิ่งเรียบ ไม่เป็นระลอกคลื่น และไม่รบกวนการว่ายขึ้นด้านบนของอสุจิ หลังจากนั้นอสุจิจะว่ายขึ้นมาอยู่ในส่วนของสารละลาย ทำให้ความขุ่นของสาร

ละลายจะแผ่ขึ้นด้านบนในขณะที่อสุจิว่ายขึ้น ทำให้สารละลายในส่วนที่แสงผ่านมีมากขึ้น สามารถอ่านได้จากคัลเลอริมิเตอร์ เพื่อให้สามารถส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท (ใต้สารละลายในคิวเวท) ได้อย่างเหมาะสม ได้ทำการดัดแปลงคิวเวทคือ

- ดัดแปลงคิวเวทโดยใช้ท่อโพลีเอธีลีน (polyethylene) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มม ติดกับมุมด้านในมุมหนึ่งของคิวเวท
- ให้ปลายท่อด้านล่างห่างจากก้นคิวเวท 2.0 มม และท่อมีความยาวพอดีถึงขอบบนของคิวเวท
- ใช้กาวชนิดที่ไม่ละลายในน้ำและไม่เกิดความขุ่นเมื่อทาลงบนคิวเวท หรือเมื่อแห้ง ทำการทากาวพอประมาณเพื่อไม่ให้บริเวณที่ติดกาวล้ำเข้ามาในส่วนที่แสงผ่าน

การส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท

เมื่อทำการใส่น้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงด้านล่างของสารละลายในคิวเวท (3.0 มล) จะเกิดรอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลาย หลังจากนั้นอสุจิจะเคลื่อนขึ้นมาในสารละลายผ่านเข้ามาในลำแสงทำให้คัลเลอริมิเตอร์ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงได้

ทำการคำนวณระยะห่างจากรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายจนถึงลำแสงดังนี้คือ

- สารละลายที่อยู่ในคิวเวทมีปริมาตร 3.0 มล อยู่ในคิวเวท ขนาด กว้าง×ยาว เท่ากับ 10×10 มม ทำให้มีความสูงของสารละลาย 30.0 มม
- เมื่อใส่น้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงใต้สารละลาย ทำให้น้ำเชื้อมีความสูง 1.0 มม
- ลำแสงเส้นผ่าศูนย์กลาง 10.0 มม ลอยอยู่บริเวณส่วนกลางของคิวเวทโดยมีขอบล่างของลำแสงอยู่ห่างจากก้นของคิวเวท 10.0 มม
- ความหนาส่วนก้นของคิวเวทมีขนาด 1.0 มม
- ดังนั้นก้นด้านในของคิวเวท (ส่วนที่มีสารละลาย และส่วนที่ใส่น้ำเชื้อ) จะอยู่ห่างจากขอบล่างของลำแสงเป็นระยะทาง 9.0 มม หรืออยู่ห่างจากกึ่งกลางลำแสงเป็นระยะทาง 14.0 มม
- และรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายจะอยู่ห่างจากขอบล่างของลำแสงเป็นระยะทาง 8.0 มม หรืออยู่ห่างจากกึ่งกลางลำแสงเป็นระยะทาง 13.0 มม (รูปที่ 2)

ได้ทำการทดลองใส่น้ำเชื้อด้วยวิธีการหลายวิธีดังนี้คือ

การใช้เข็มฉีดยาต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน

วิธีการนี้ทำได้โดย

- ใส่สารละลาย ทริส-กลูโคส-กรดซิตริก ปริมาตร 3.0 มล ลงในคิวเวท
- ใช้เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว ต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1.0 มล ดูดน้ำเชื้อเข้าในกระบอกฉีดยา
- ไล่อากาศออกจากกระบอกฉีดยา โดยการดันก้านของกระบอกฉีดยาตามความเหมาะสม
- ค่อย ๆ สอดส่วนของเข็มฉีดยาที่เตรียมไว้นี้ ลงที่ขอบข้างหนึ่งของคิวเวทจนปลายเข็มถึงก้นคิวเวท
- หันปลายตัดของเข็มเข้าด้านในของคิวเวท
- ค่อย ๆ เดินน้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงในคิวเวท
- ดึงเข็มฉีดยาออกจากคิวเวท

การทำท่อให้เข็มฉีดยาสอดผ่าน

วิธีการนี้ทำได้โดย

- ดัดแปลงคิวเวทโดยใช้ท่อโพลีเอธีลีนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มม ติดกับมุมด้านในของคิวเวทตามที่อธิบายข้างต้น
- ใส่สารละลาย ทริส-กลูโคส-กรดซิตริก ปริมาตร 3.0 มล ลงในคิวเวท
- ใช้เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว ต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1.0 มล ดูดน้ำเชื้อเข้าในกระบอกฉีดยา
- ไล่อากาศออกจากกระบอกฉีดยา โดยการดันก้านของกระบอกฉีดยาตามความเหมาะสม
- ค่อย ๆ สอดส่วนของเข็มฉีดยาที่เตรียมไว้นี้ ลงในท่อที่ได้ติดไว้กับคิวเวท จนปลายเข็มถึงก้นคิวเวท
- หันปลายตัดของเข็มเข้าด้านในของคิวเวท
- ค่อย ๆ เดินน้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงในคิวเวท
- ค่อย ๆ ดึงเข็มฉีดยากลับ

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 ส่องดูด้วนกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 11 ระดับ ตั้งแต่ 0 จนถึง 10 โดยค่า 10 เป็นค่าที่ดีที่สุด และ 0 เป็นค่าที่ต่ำที่สุด (Salamon, 1976)
4. ความเข้มข้น (concentration) ตรวจความเข้มข้นโดยใช้วิธีเทียบความเข้มข้นของแสง โดยการวัดค่าความเข้มข้นของแสง (optical density) ด้วยคัลเลอริมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และทำการเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นจากกราฟที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

ทำการคัดเลือกเฉพาะน้ำเชื้อที่มีความหนืดคล้ายครีมขึ้นไป, มีการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 8 และมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2×10^9 เซลล์/มล. มาใช้ในการทดลอง การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ของอสุจิในแต่ละการทดลอง เป็นการตรวจโดยใช้บุคคลเป็นผู้ให้คะแนน และทำในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางแล้ว ดังนั้นจึงทำการตรวจการเคลื่อนที่โดยใช้น้ำเชื้อ 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ใช้กระจกบางขนาด 22×22 มม. ปิดทับ โดยใช้ความระมัดระวังให้กระจกบางปิดทับทุกส่วนของน้ำเชื้อ และไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้กระจกบางหลังจากที่ได้ทำการปิดทับแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มีความหนาของน้ำเชื้อในการส่องตรวจมีค่าคงที่และเพื่อลดความแปรปรวนในการประมาณค่าการเคลื่อนที่ การปฏิบัติดังกล่าวจะได้ความหนา (ความสูง) ของน้ำเชื้อที่ใช้ตรวจประมาณ 103 ไมครอน ซึ่งจะได้ค่าไม่ต่ำกว่า 60 ไมครอน เพื่อลดการรบกวนการว่ายในแนวตั้งของอสุจิตามที่ได้แนะนำไว้ (Rickmenspoel, 1962) หลังจากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขั้นเพิ่มครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะวันละ 2-5 ตัว และทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วแต่ละตัวอย่างมาควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° เซลเซียส, เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส (ประกอบด้วยทริส 300 mM, กลูโคส 28 mM ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วยกรดซิตริก จนได้ค่าเป็นกลาง; Suttiyotin and Thwaites, 1991) ที่อุณหภูมิเท่ากัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^8 เซลล์/มล. ทำการวัดความเร็วที่อสุจิเคลื่อนที่เข้ามาในช่องผ่านแสงของคัลเลอริมิเตอร์ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว ทำซ้ำในแต่ละตัวอย่างให้ได้ทั้งสิ้น 4 ซ้ำ

รีดเก็บน้ำเชื้อและทำการทดลองวัดจนได้ตัวอย่างจากน้ำเชื้อจำนวน 16 ตัวอย่าง

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 ก่อนทำการวัดความเร็วที่อสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนในน้ำเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความเย็น และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

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

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความร้อน และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

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 ทำการวัดความเร็วที่อสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ อุ่นเป็นระยะเวลาต่างๆ และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

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

อุปกรณ์และวิธีการ

การดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์ (colorimeter)

คัลเลอริมิเตอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นคัลเลอริมิเตอร์ที่มีชื่อการค้า Chemtrix® Type 24 Digital Colorimeter ใช้กับไฟฟ้าขนาด 220 โวลท์ การดัดแปลงเพื่อใช้ในการวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิจะได้ทำในส่วนของ ตัวจับคิวเวท (cuvette holder), ตัวคิวเวท (cuvette) และ วิธีการใส่น้ำเชื้อใต้สารละลายในคิวเวท

ตัวจับคิวเวท

ตัวจับคิวเวทของเครื่องเป็นแบบที่ใช้สำหรับคิวเวทรูปทรงกระบอก มีขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 10×10×45 มม โดยมีสลักสำหรับดันให้คิวเวทแนบไปด้านหนึ่งและอยู่นิ่งในขณะที่วัดค่าความเข้มข้นของแสง

ลำแสงจากแหล่งกำเนินแสง ส่องผ่านทางเข้าเป็นช่องรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม ส่องผ่านคิวเวท ผ่านสารละลายในคิวเวท และเมื่อผ่านคิวเวทแล้วจะผ่านทางออกเป็นช่องรูปทรงกลมในขนาดเดียวกับช่องแรก และผ่านไปยังเครื่องวัดแสงที่จะแปรเป็นสัญญาณตัวเลขบนหน้าปัทม์

ได้ทำการทดลองเพื่อหาทางดัดแปลงตัวจับคิวเวทเพื่อให้สามารถเลื่อนคิวเวทขึ้นลงได้ในขณะที่วัดความเข้มข้นของแสง ตามที่ได้มีรายงานไว้ (Suttiyotin *et al.*, 1992) แต่ติดปัญหาในเรื่องตัวเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่มีตัวจับคิวเวทอยู่ในพื้นที่จำกัด และไม่สามารถดัดแปลงเครื่องมือเลื่อนคิวเวทได้

คิวเวท

คิวเวทที่ใช้กับคัลเลอริมิเตอร์เครื่องนี้ มีรูปสี่เหลี่ยมทรงกระบอก ขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 10×10×45 มม หลักของการวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนนี้คือ มีสารละลายอยู่ในคิวเวท ทำการใส่น้ำเชื้อให้อยู่ส่วนล่างของสารละลายที่อยู่ในคิวเวท ส่วนนี้จะอยู่นอกขอบเขตของส่วนที่แสงผ่านทำให้ไม่เป็นการรบกวนต่อการอ่านค่าความเข้มข้นของแสง การใส่น้ำเชื้อลงด้านล่างจะทำให้เกิดรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายขึ้น การใส่น้ำเชื้อจะต้องทำให้เกิดรอยต่อที่นิ่งเรียบ ไม่เป็นระลอกคลื่น และไม่รบกวนการว่ายขึ้นด้านบนของอสุจิ หลังจากนั้นอสุจิจะว่ายขึ้นมาอยู่ในส่วนของสารละลาย ทำให้ความขุ่นของสาร

ละลายจะแผ่ขึ้นด้านบนในขณะที่อสุจิว่ายขึ้น ทำให้สารละลายในส่วนที่แสงผ่านมีมากขึ้น สามารถอ่านได้จากคัลเลอริมิเตอร์ เพื่อให้สามารถส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท (ใต้สารละลายในคิวเวท) ได้อย่างเหมาะสม ได้ทำการดัดแปลงคิวเวทคือ

- ดัดแปลงคิวเวทโดยใช้ท่อโพลีเอธีลีน (polyethylene) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มม ติดกับมุมด้านในมุมหนึ่งของคิวเวท
- ให้ปลายท่อด้านล่างห่างจากก้นคิวเวท 2.0 มม และท่อมีความยาวพอดีถึงขอบบนของคิวเวท
- ใช้กาวชนิดที่ไม่ละลายในน้ำและไม่เกิดความขุ่นเมื่อทาลงบนคิวเวท หรือเมื่อแห้ง ทำการทากาวพอประมาณเพื่อไม่ให้บริเวณที่ติดกาวล้ำเข้ามาในส่วนที่แสงผ่าน

การส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท

เมื่อทำการใส่น้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงด้านล่างของสารละลายในคิวเวท (3.0 มล) จะเกิดรอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลาย หลังจากนั้นอสุจิจะเคลื่อนขึ้นมาในสารละลายผ่านเข้ามาในลำแสงทำให้คัลเลอริมิเตอร์ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงได้

ทำการคำนวณระยะห่างจากรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายจนถึงลำแสงดังนี้คือ

- สารละลายที่อยู่ในคิวเวทมีปริมาตร 3.0 มล อยู่ในคิวเวท ขนาด กว้าง×ยาว เท่ากับ 10×10 มม ทำให้มีความสูงของสารละลาย 30.0 มม
- เมื่อใส่น้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงใต้สารละลาย ทำให้น้ำเชื้อมีความสูง 1.0 มม
- ลำแสงเส้นผ่าศูนย์กลาง 10.0 มม ลอยอยู่บริเวณส่วนกลางของคิวเวทโดยมีขอบล่างของลำแสงอยู่ห่างจากก้นของคิวเวท 10.0 มม
- ความหนาส่วนก้นของคิวเวทมีขนาด 1.0 มม
- ดังนั้นก้นด้านในของคิวเวท (ส่วนที่มีสารละลาย และส่วนที่ใส่น้ำเชื้อ) จะอยู่ห่างจากขอบล่างของลำแสงเป็นระยะทาง 9.0 มม หรืออยู่ห่างจากกึ่งกลางลำแสงเป็นระยะทาง 14.0 มม
- และรอยต่อของน้ำเชื้อกับสารละลายจะอยู่ห่างจากขอบล่างของลำแสงเป็นระยะทาง 8.0 มม หรืออยู่ห่างจากกึ่งกลางลำแสงเป็นระยะทาง 13.0 มม (รูปที่ 2)

ได้ทำการทดลองใส่น้ำเชื้อด้วยวิธีการหลายวิธีดังนี้คือ

การใช้เข็มฉีดยาต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน

วิธีการนี้ทำได้โดย

- ใส่สารละลาย ทริส-กลูโคส-กรดซิตริก ปริมาตร 3.0 มล ลงในคิวเวท
- ใช้เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว ต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1.0 มล ดูดน้ำเชื้อเข้าในกระบอกฉีดยา
- ไล่อากาศออกจากกระบอกฉีดยา โดยการดันก้านของกระบอกฉีดยาตามความเหมาะสม
- ค่อย ๆ สอดส่วนของเข็มฉีดยาที่เตรียมไว้นี้ ลงที่ขอบข้างหนึ่งของคิวเวทจนปลายเข็มถึงก้นคิวเวท
- หันปลายตัดของเข็มเข้าด้านในของคิวเวท
- ค่อย ๆ เดินน้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงในคิวเวท
- ดึงเข็มฉีดยาออกจากคิวเวท

การทำท่อให้เข็มฉีดยาสอดผ่าน

วิธีการนี้ทำได้โดย

- ดัดแปลงคิวเวทโดยใช้ท่อโพลีเอธีลีนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มม ติดกับมุมด้านในของคิวเวทตามที่อธิบายข้างต้น
- ใส่สารละลาย ทริส-กลูโคส-กรดซิตริก ปริมาตร 3.0 มล ลงในคิวเวท
- ใช้เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว ต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1.0 มล ดูดน้ำเชื้อเข้าในกระบอกฉีดยา
- ไล่อากาศออกจากกระบอกฉีดยา โดยการดันก้านของกระบอกฉีดยาตามความเหมาะสม
- ค่อย ๆ สอดส่วนของเข็มฉีดยาที่เตรียมไว้นี้ ลงในท่อที่ได้ติดไว้กับคิวเวท จนปลายเข็มถึงก้นคิวเวท
- หันปลายตัดของเข็มเข้าด้านในของคิวเวท
- ค่อย ๆ เดินน้ำเชื้อปริมาตร 0.1 มล ลงในคิวเวท
- ค่อย ๆ ดึงเข็มฉีดยากลับ

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 ส่องดูด้วนกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 11 ระดับ ตั้งแต่ 0 จนถึง 10 โดยค่า 10 เป็นค่าที่ดีที่สุด และ 0 เป็นค่าที่ต่ำที่สุด (Salamon, 1976)
4. ความเข้มข้น (concentration) ตรวจความเข้มข้นโดยใช้วิธีเทียบความเข้มข้นของแสง โดยการวัดค่าความเข้มข้นของแสง (optical density) ด้วยคัลเลอริมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และทำการเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นจากกราฟที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

ทำการคัดเลือกเฉพาะน้ำเชื้อที่มีความหนืดคล้ายครีมขึ้นไป, มีการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 8 และมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2×10^9 เซลล์/มล. มาใช้ในการทดลอง การตรวจร้อยละของการเคลื่อนที่ของอสุจิในแต่ละการทดลอง เป็นการตรวจโดยใช้บุคคลเป็นผู้ให้คะแนน และทำในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางแล้ว ดังนั้นจึงทำการตรวจการเคลื่อนที่โดยใช้น้ำเชื้อ 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ใช้กระจกบางขนาด 22×22 มม. ปิดทับ โดยใช้ความระมัดระวังให้กระจกบางปิดทับทุกส่วนของน้ำเชื้อ และไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้กระจกบางหลังจากที่ได้ทำการปิดทับแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มีความหนาของน้ำเชื้อในการส่องตรวจมีค่าคงที่และเพื่อลดความแปรปรวนในการประมาณค่าการเคลื่อนที่ การปฏิบัติดังกล่าวจะได้ความหนา (ความสูง) ของน้ำเชื้อที่ใช้ตรวจประมาณ 103 ไมครอน ซึ่งจะได้ค่าไม่ต่ำกว่า 60 ไมครอน เพื่อลดการรบกวนการว่ายในแนวตั้งของอสุจิตามที่ได้แนะนำไว้ (Rickmenspoel, 1962) หลังจากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขั้นเพิ่มครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะวันละ 2-5 ตัว และทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วแต่ละตัวอย่างมาควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° เซลเซียส, เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส (ประกอบด้วยทริส 300 mM, กลูโคส 28 mM ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วยกรดซิตริก จนได้ค่าเป็นกลาง; Suttiyotin and Thwaites, 1991) ที่อุณหภูมิเท่ากัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^8 เซลล์/มล. ทำการวัดความเร็วที่อสุจิเคลื่อนที่เข้ามาในช่องผ่านแสงของคัลเลอริมิเตอร์ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว ทำซ้ำในแต่ละตัวอย่างให้ได้ทั้งสิ้น 4 ซ้ำ

รีดเก็บน้ำเชื้อและทำการทดลองวัดจนได้ตัวอย่างจากน้ำเชื้อจำนวน 16 ตัวอย่าง

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 ก่อนทำการวัดความเร็วที่อสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนในน้ำเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความเย็น และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

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

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความร้อน และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

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 ทำการวัดความเร็วที่อสุจิโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ อุ่นเป็นระยะเวลาต่างๆ และวัดความเร็วของอสุจิ ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการทดลอง

การดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์

ตัวจับคิวเวท

จากการทดลองดัดแปลงตัวจับคิวเวทเพื่อให้สามารถเลื่อนคิวเวทขึ้นลงได้ในขณะที่วัดความเข้มข้นของแสง พบว่าการติดเครื่องกลเพื่อประคองคิวเวทให้อยู่ในตำแหน่ง และสามารถเลื่อนคิวเวทขึ้นลงตามระยะที่ต้องการนั้น ติดปัญหาในเรื่องตัวเครื่องคัลเลอริมิเตอร์ที่มีตัวจับคิวเวทอยู่ในพื้นที่จำกัด ไม่สามารถเชื่อมเครื่องกลนี้ได้ จึงไม่สามารถดัดแปลงเครื่องมือเลื่อนคิวเวทได้

คิวเวท

การดัดแปลงคิวเวท มีจุดประสงค์หลักเพื่อให้สามารถส่งน้ำเชื้อให้เข้าไปอยู่ใต้สารละลายที่อยู่ในคิวเวทได้ โดยให้กระทบกระเทือนต่อรอยต่อระหว่างสารละลายและน้ำเชื้อที่จะเกิดขึ้นน้อยที่สุด สำหรับวิธีการใช้เข็มฉีดยาต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลินนั้น สามารถทำได้โดยไม่จำเป็นต้องดัดแปลงคิวเวท

ส่วนวิธีการทำท่อให้เข็มฉีดยาสอดผ่านต้องทำการดัดแปลงคิวเวทโดยการติดท่อโพลีเอธีลีนด้านในของคิวเวท ผลจากการทดลองติดท่อโพลีเอธีลีนพบว่าสิ่งที่มีผลกระทบต่อการทำงานของคิวเวทที่ดัดแปลงมีหลายประการ กาวที่ใช้ติดท่อโพลีเอธีลีน เป็นประการแรก การเลือกกาวอาจจะมีผลต่อสารละลายหรือน้ำเชื้อในคิวเวท กาวส่วนใหญ่ที่ใช้ในท้องตลาดมีทั้งแบบย่อยผนังของส่วนที่จะติดบางส่วนเพื่อให้การเชื่อมดีขึ้น หรือแข็งและเปราะเมื่อแห้งแล้ว หรือมีความขุ่นเมื่อแห้ง โดยเฉพาะการบางชนิดสามารถทำให้คิวเวทที่เป็นพลาสติกใสเกิดการขุ่นฝ้าเมื่อกาวแห้งแล้ว กาวบางชนิดแห้งติดดีแต่เมื่อโดนสารละลายทำให้เกิดการลอกหลุดออกได้ง่าย จากการทดลองใช้กาวหลายชนิดพบว่า กาวที่เหมาะสำหรับติดท่อโพลีเอธีลีนเข้ากับคิวเวทพลาสติกคือ กาวติดตู้ปลา

ระยะทางจากก้นคิวเวท มีผลต่อการส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท ระยะทางนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของปากฉลาม (ปลายหน้าตัด) ของเข็มที่ใช้ส่งน้ำเชื้อ เพื่อให้ปลายหน้าตัดไม่มีส่วนใดส่วนหนึ่งถูกปกคลุมโดยท่อโพลีเอธีลีน ควรเว้นระยะจากก้นคิวเวทไม่น้อยกว่า 2 มม. ในทำนองเดียวกันพบว่าเมื่อเว้นระยะจากก้นคิวเวทมากกว่า 4 มม. จะทำให้น้ำเชื้อที่ส่งลงด้านล่างและค้างอยู่ในบริเวณปลายเข็ม ถูกดึงขึ้นมาตามเข็มในขณะที่ถอนเข็มออกจากท่อโพลี

เอธีลีน และเกิดการฟุ้งกระจายของน้ำเชื้อ ทำให้รบกวนต่อการอ่านค่าความเข้มข้นของแสงได้

ขนาดของท่อโพลีเอธีลีนมีความสำคัญเช่นกัน ขนาดต้องเล็กพอที่จะไม่รบกวนทางเดินของแสงสำหรับการวัดความเข้มข้นของแสง และในทำนองเดียวกันต้องใหญ่พอที่จะสอดเข็มลงไปได้ ขนาดที่พบว่าเหมาะสมสำหรับเข็มขนาดเบอร์ 21 คือขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มม

การส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวท

การใช้เข็มฉีดยาต่อกับกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน

จากการที่ได้ทำการทดสอบหลายครั้งพบว่าการเดินน้ำเชื้อให้อยู่ด้านล่างของสารละลายทำได้ยาก โดยพบปัญหาที่เป็นอุปสรรคที่สำคัญ และข้อสังเกตคือ

- หากทำด้วยความระมัดระวังจะสามารถเดินน้ำเชื้อ และทำให้เกิดรอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลายได้ การหันปลายปากฉลามของเข็มเข้าด้านในของคิวเวท จะให้ผลดีกว่า
- รอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลายอยู่ในลักษณะนิ่งและมีระลอกคลื่นน้อย เมื่อเดินน้ำเชื้ออย่างช้า ๆ และต่อเนื่อง
- เมื่อเดินน้ำเชื้อได้ตามกำหนดแล้ว ไม่สามารถถอนเข็มฉีดยาออกจาก คิวเวทได้ เนื่องจากจะทำให้รอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลายได้รับแรงกระทบ ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของน้ำเชื้อได้
- วิธีนี้ต้องประคองให้กระบอกฉีดยาและเข็มอยู่ในสภาพคงที่จนเสร็จสิ้นการวัด ซึ่งเป็นการไม่สะดวกประการหนึ่ง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ

	ความเร็ว (ไมครอน/วินาที)	ร้อยละของการเคลื่อนที่
น้ำเชื้อชุดที่ 1	103.9 ± 6.7	50
น้ำเชื้อชุดที่ 2	91.0 ± 11.5	60
น้ำเชื้อชุดที่ 3	82.1 ± 14.6	60
น้ำเชื้อชุดที่ 4	137.8 ± 25.4	60
น้ำเชื้อชุดที่ 5	157.9 ± 29.4	50
น้ำเชื้อชุดที่ 6	90.4 ± 19.2	30
น้ำเชื้อชุดที่ 7	49.8 ± 10.7	50
น้ำเชื้อชุดที่ 8	53.3 ± 13.0	60
น้ำเชื้อชุดที่ 9	57.5 ± 7.6	50
น้ำเชื้อชุดที่ 10	56.8 ± 9.4	60
น้ำเชื้อชุดที่ 11	59.4 ± 15.3	40
น้ำเชื้อชุดที่ 12	48.7 ± 9.3	60
น้ำเชื้อชุดที่ 13	43.4 ± 3.4	50
น้ำเชื้อชุดที่ 14	203.2 ± 42.1	60
น้ำเชื้อชุดที่ 15	144.1 ± 53.6	70
น้ำเชื้อชุดที่ 16	214.2 ± 15.8	40
เฉลี่ย	99.6 ± 66.9	58.8 ± 6.5

การทำท่อให้เข็มฉีดยาสอดผ่าน

วิธีการนี้ทำได้สะดวกขึ้นและจากการทดสอบพบว่า การเดินน้ำเชื้อให้อยู่ด้านล่างของสารละลายทำให้เกิด รอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลายได้ และมีข้อสังเกตคือ

- ท่อที่ติดไว้กับคิวเวท ทำให้การสอดเข็มลงด้านล่างของ คิวเวท และการดึงเข็มกลับ ทำได้ดีกว่า โดยไม่กระทบต่อรอยต่อระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลายที่เกิดขึ้น
- กาวชนิดต่างกันให้ผลต่อการเชื่อมติด กาวบางชนิดทำปฏิกริยากับท่อและคิวเวท ทำให้เกิดฝ้าและความขุ่นทำให้ไม่สามารถวัดค่าได้ บางชนิดละลายในน้ำทำให้เกิดการลอกหลุดในขณะทำการทดลอง
- ยังคงต้องเดินน้ำเชื้ออย่างช้า ๆ และต่อเนื่อง เพื่อให้เกิดระลอกคลื่นน้อย
- สามารถดึงกระบอกฉีดยาและเข็มออกจาก คิวเวท ได้ก่อนเสร็จสิ้นการวัด

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

ความเร็วเฉลี่ยของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อสดมีค่าเฉลี่ยทั้งสิ้น 99.6 $\pm$ 66.9 ไมครอน/วินาที (ตารางที่ 1) ความเร็วที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.010$, $p > 0.05$)

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

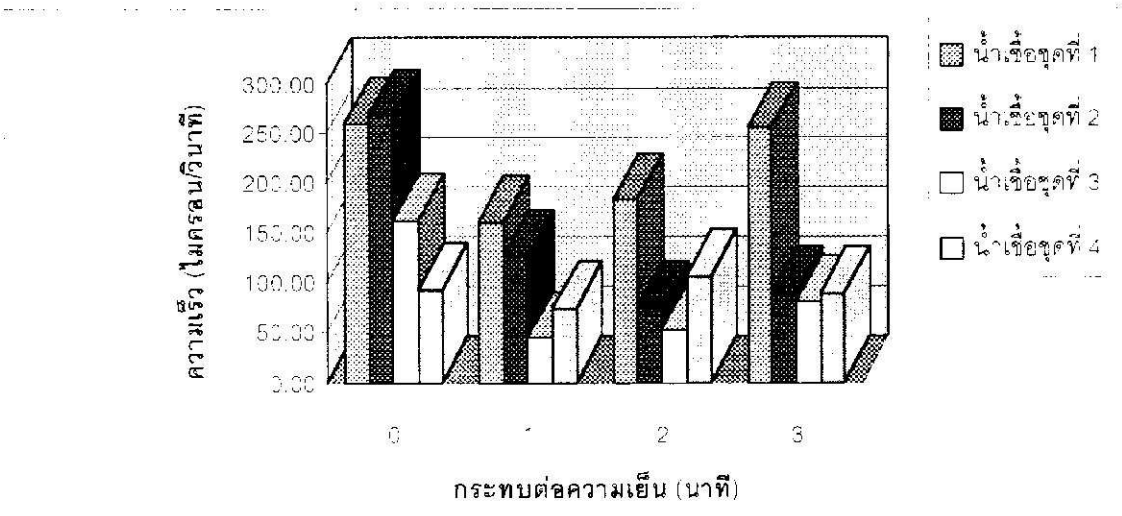
การกระทบต่อความเย็น ทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนลดลง ค่าความเร็วที่วัดได้มีค่าลดลงจาก 196.4 ไมครอน/วินาที ในกลุ่มควบคุมเป็น 101.5 ($p < 0.01$) และ104.7 ($p < 0.01$) ไมครอน/วินาที ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นเป็นเวลา 1 และ 2 นาทีตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างจาก น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นเป็นเวลา 3 นาที (128.8 ไมครอน/วินาที, $p > 0.05$, ตารางที่ 2) ส่วนร้อยละของการเคลื่อนที่มีแนวโน้มในทำนองเดียวกันกับความเร็ว โดยมีเริ่มมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 67.5) เมื่อกระทบต่อความเย็นนาน 3 นาที (ร้อยละ 50.6, $p < 0.01$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.277$, $p > 0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

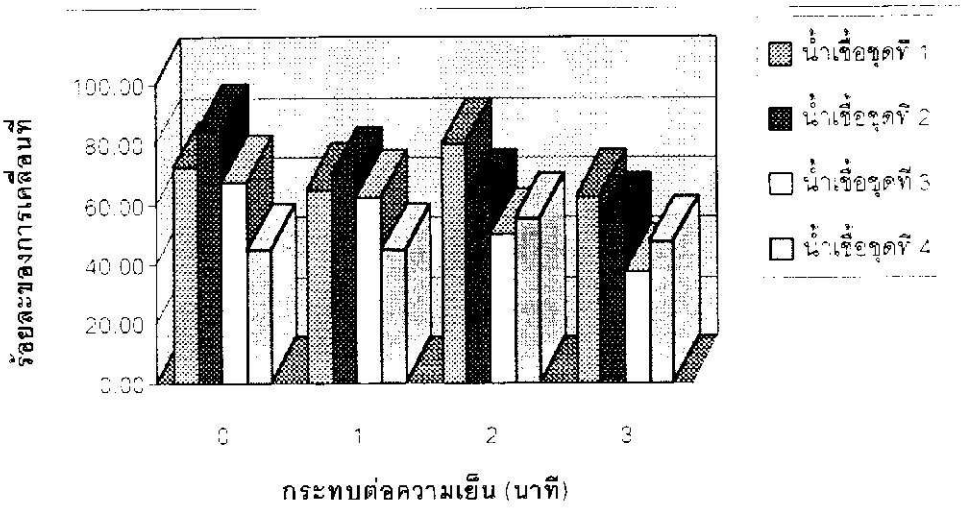
การกระทบต่อความเย็น (นาที)	ความเร็ว (ไมครอน/วินาที)*	ร้อยละของการเคลื่อนที่*
0	196.4 ± 30.0^{a}	67.5 ± 5.0^{a}
1	101.5 ± 16.4^{b}	60.6 ± 4.3^{ab}
2	104.7 ± 20.4^{b}	61.9 ± 4.8^{ab}
3	128.8 ± 26.8^{ab}	50.6 ± 5.3^{b}

* ค่าในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อแต่ละชุด (น้ำเชื้อรวมจากแพะ 5 ตัว เป็น 1 ชุด) มีความแตกต่างกัน ($p < 0.001$, รูปที่ 1) ในทำนองเดียวกันจากการทดลองนี้พบว่าร้อยละของการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแต่ละชุดมีความแตกต่างกัน ($p < 0.005$, รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น



รูปที่ 2 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

จากการทดลองไม่พบความแตกต่างของความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนตั้งแต่ 0 ถึง 5 วินาที ($p > 0.05$, ตารางที่ 3) ความเร็วในการเคลื่อนที่มีค่าตั้งแต่ 159.2 ± 26.9 ถึง 213.3 ± 42.7 ไมครอน/วินาที อย่างไรก็ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิมีแนวโน้มลดลงเมื่อน้ำเชื้อกระทบต่อความร้อนนานขึ้น แม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม

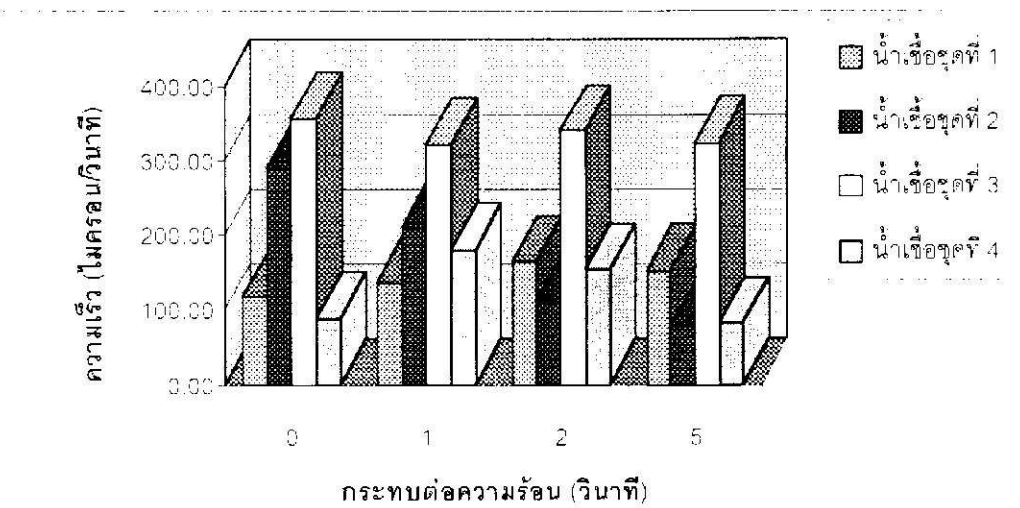
ร้อยละของการเคลื่อนที่มีแนวโน้มลดลงแม้ว่าจะไม่มีกลุ่มใดแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$, ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามพบว่าค่าร้อยละของการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน 1วินาที (ร้อยละ 82.5) มีค่าสูงกว่าในกลุ่มที่กระทบต่อความร้อนเป็นเวลา 5 วินาที (ร้อยละ 71.3, $p < 0.01$) เมื่อตรวจดูความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่พบว่ามีค่าเข้าใกล้นัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.455$, $p > 0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

การกระทบต่อความร้อน (วินาที)	ความเร็ว (ไมครอน/วินาที)	ร้อยละของการเคลื่อนที่*
0	213.3 ± 42.7	80.6 ± 3.2 ^{ab}
1	212.7 ± 26.0	82.5 ± 2.7 ^{a}
2	192.3 ± 23.8	76.9 ± 4.1 ^{ab}
5	159.2 ± 26.9	71.3 ± 4.0 ^{b}

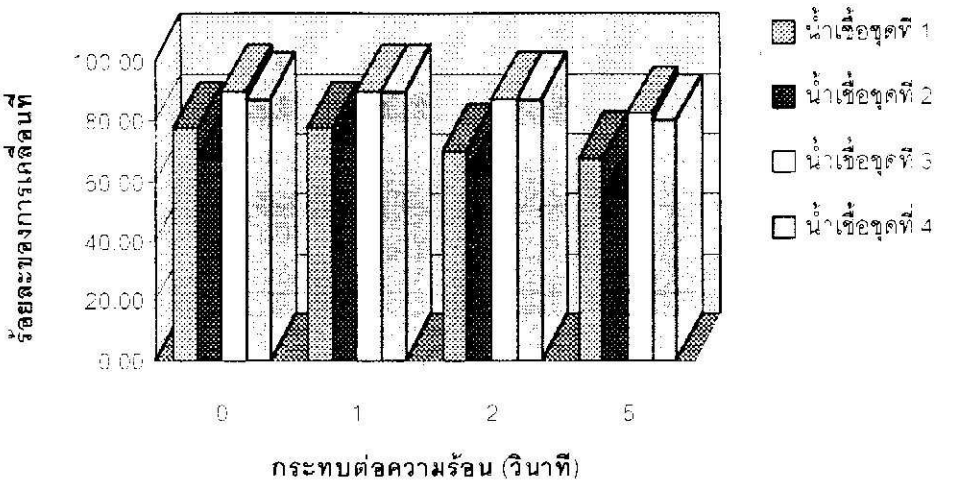
* ค่าในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ชุดน้ำเชื้อมีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และพบว่าน้ำเชื้อแต่ละชุดมีความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างกัน ($p < 0.001$, รูปที่ 3) และร้อยละของการเคลื่อนที่แตกต่างกันในแต่ละชุดน้ำเชื้อ ($p < 0.001$, รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



รูปที่ 4 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

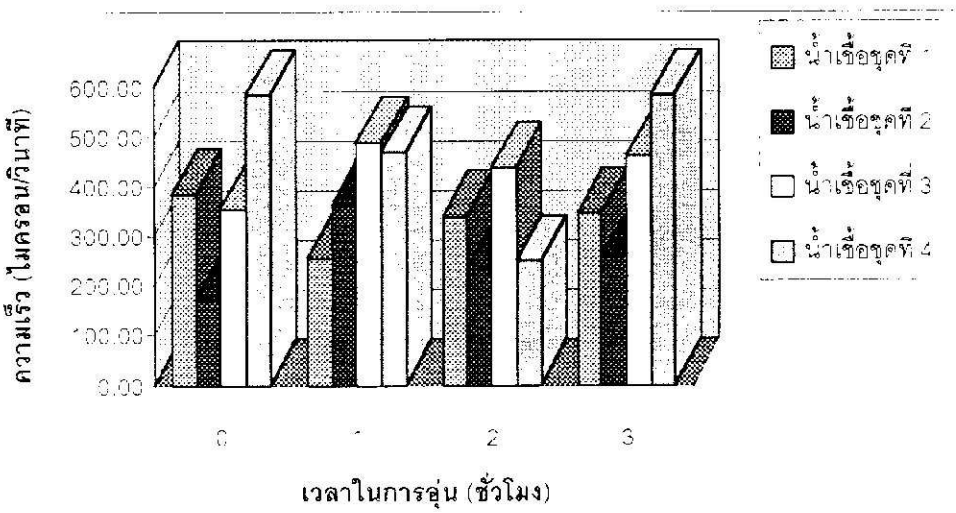
การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

เมื่ออุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลกระทบต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ค่าความเร็วที่วัดได้มีค่า 315.4 $\pm$ 58.3 ถึง 412.3 $\pm$ 82.5 ไมครอน/วินาที ($p > 0.05$, ตารางที่ 4) ส่วนร้อยละของการเคลื่อนที่มีค่าในทำนองเดียวกับความเร็วคือไม่ได้รับผลกระทบจากการอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียส ($p > 0.05$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่ ($r = 0.073$, $p > 0.05$)

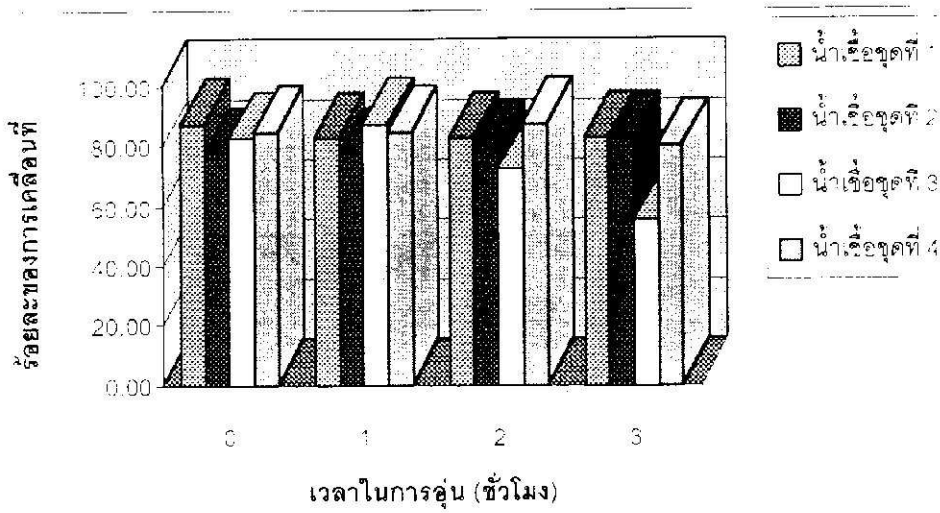
เมื่อพิจารณาแต่ละชุดของน้ำเชื้อพบว่า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิของน้ำเชื้อแต่ละชุดไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$, รูปที่ 5) ส่วนร้อยละของการเคลื่อนที่จากการทดลองนี้ พบว่าไม่ได้รับผลกระทบจากชุดน้ำเชื้อเช่นกัน ($p > 0.05$, รูปที่ 6)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน และร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส (ชั่วโมง)	ความเร็ว (ไมครอน/วินาที)	ร้อยละของการเคลื่อนที่
0	374.8 ± 71.3	83.1 ± 2.7
1	393.2 ± 83.4	83.1 ± 2.2
2	315.4 ± 58.3	80.6 ± 2.3
3	412.3 ± 82.5	75.0 ± 4.7



รูปที่ 5 ความเร็วของอสุจิจากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบน ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส



รูปที่ 6 ร้อยละของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดแพะ ในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

วิจารณ์

การทดลองในรายงานนี้ เน้นหนักไปทางด้านการพัฒนาเพื่อดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์เพื่อวัดค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิแพะ และทดลองใช้วัดในน้ำเชื้อชนิดต่างๆ คือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

การพัฒนาดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์เพื่อตรวจวัดความเร็วของอสุจิ เน้นที่หลักการคือสามารถทำให้ส่งน้ำเชื้อลงที่ก้นคิวเวทภายใต้สารละลายได้ วิธีที่ใช้ท่อนำทาง (Suttiyotin *et al.*, 1992) มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้กระบอกฉีดยาต่อกับเข็มเพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นตามสามัญสำนึกคือ ท่อจะช่วยลดการฟุ้งกระจายของน้ำเชื้อในขณะที่ส่งน้ำเชื้อลงใต้สารละลาย เป็นการบีบบังคับให้น้ำเชื้อแผ่กระจายลงที่ก้นคิวเวท และไม่ติดตามเข็มฉีดยาขึ้นมาในขณะที่ถอนเข็มออกมา

ค่าการเคลื่อนที่และความเร็วของอสุจิ ยังคงเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ประกอบการตัดสินว่าน้ำเชื้อมีคุณภาพดีเพียงใด สิ่งที่ย้ำให้ค่าความเร็วอสุจิมีความสำคัญหนักแน่นขึ้นอีกก็คือรายงานความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วอสุจิกับความสมบูรณ์พันธุ์ (Harvey, 1960; Holt *et al.*, 1985; Aitken, 1990) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความเร็วอสุจิอาจเป็นตัวบ่งชี้ความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิได้อีกทางหนึ่ง

วิธีการวัดความเร็วอสุจิมีหลากหลาย แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป การวัดโดยวิธีจับเวลาอสุจิว่ายผ่านตาราง (Baker *et al.*, 1957; Harvey, 1960) ไม่สามารถควบคุมทิศทางการว่ายของอสุจิได้ ทำให้มีความผิดพลาดเกี่ยวกับระยะทาง แต่เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว วิธีการถ่ายภาพ (Rothchild, 1953a, b; Janick and MacLeod, 1970; Revell and Wood, 1978; Overstreet *et al.*, 1979; Makler, 1978, 1980) ใช้เวลานานในการถ่ายภาพ ล้างภาพ และวัดความเร็ว แต่มีความละเอียดในการวัดดี วิธีการบันทึกวีดีทัศน์ (Katz and Overstreet, 1981) ให้ความละเอียดและความถูกต้องมากยิ่งขึ้น สามารถบันทึกและตรวจสอบได้นานกว่า แต่ก็ยังคงต้องใช้เวลาในการไล่ตามอสุจิแต่ละตัว ซึ่งต้องทำโดยใช้แรงงานคน วิธีการที่ดีและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือการใช้คอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย (Katz and Dott, 1975; Holt *et al.*, 1985; Ruzick *et al.*, 1987; Knuth and Nieschlag, 1988; Mahony *et al.*, 1988; Vantman *et al.*, 1988) โดยอิงจากการบันทึกด้วยวีดีทัศน์ และใช้คอมพิวเตอร์เป็นตัวตรวจวัดการเคลื่อนที่และความเร็วแทนแรงงานคน

วิธีการนี้สะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องสูงขึ้น แต่เครื่องมือมีราคาแพงและไม่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือการวัดในห้องที่ที่ไม่ต้องการความละเอียด

การวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิวิธีการต่างๆ เช่น ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ มีสิ่งที่คล้ายกันคือ เป็นการวัดโดยการประมาณค่า ขึ้นกับผู้วัดเป็นส่วนใหญ่ และมีความแปรปรวนระหว่างผู้วัดและระหว่างห้องปฏิบัติการ ส่วนการวัดที่ใช้การตัดสินใจของคนน้อยลงและใช้เครื่องมือวัดมากขึ้นเช่น ค่าความเร็วในการว่ายของอสุจิ จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความละเอียดอ่อน ซับซ้อน และมีราคาแพง ทางเลือกระหว่างความแปรปรวนในการวัดและราคาของเครื่องมือทำให้มีผู้เสนอแนวคิดในการใช้วิธีที่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ไม่ต้องการความละเอียดในระดับของการวัดด้วยคอมพิวเตอร์ มีการวัดที่เชื่อถือได้ ราคาถูกลง คือเครื่องมือที่ดัดแปลงคัลเลอริมิเตอร์เพื่อวัดความเร็วของอสุจิ (Suttiyotin and Thwaites, 1992) วิธีการนี้สามารถวัดความเร็วของอสุจิได้ แต่ยังคงเป็นการวัดความเร็วของ "กลุ่มอสุจิ" ที่เคลื่อนตัวเร็วกว่ากลุ่มอื่นๆ และสามารถว่ายเข้ามาในส่วนแสงผ่านทำให้ถูกตรวจวัดได้โดยคัลเลอริมิเตอร์

ความเย็นมีผลในการลดทั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวัดโดยวิธีว่ายขึ้นด้านบนและร้อยละของการเคลื่อนที่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายรายงาน (Chong and Wales, 1962; Salamon and Lightfoot, 1967; Watson, 1981; Watson and Morris, 1987; Holt *et al.*, 1988)

ความร้อนมีผลน้อยต่อทั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และร้อยละของการเคลื่อนที่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระยะเวลาที่กระทบต่อความร้อนมีระยะเวลาสั้น (0 ถึง 5 วินาที) ส่วนการอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมง ในรายงานนี้ไม่มีผลกระทบต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิและร้อยละของการเคลื่อนที่ แม้ว่าค่าทั้ง 2 จะมีแนวโน้มลดลงก็ตาม

จากในทุกการทดลอง ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วที่ตรวจกับร้อยละของการเคลื่อนที่ (r ระหว่าง 0.010 ถึง 0.455, $p > 0.05$) เป็นไปได้ว่าความเร็วและร้อยละของการเคลื่อนที่อาจสัมพันธ์กันบางส่วนและบางส่วนอาจไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ในน้ำเชื้อตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่ง อาจมีอสุจิที่ว่ายเร็วหรือช้าอยู่ โดยไม่เกี่ยวข้องกับจำนวนหรือสัดส่วนของอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ก็เป็นได้ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งในอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ (ซึ่งจะมีจำนวนเท่าใดก็ตาม) อาจมีอสุจิที่ว่ายเร็วหรือช้าก็ได้ น้ำเชื้อที่มีร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่น้อยอาจมีอสุจิที่สามารถว่ายได้อย่างรวดเร็วก็เป็นได้ หากเป็นไปตามทฤษฎีนี้ ก็จะเป็นตัวชี้ได้ว่าค่าร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่บ่งบอกถึงปริมาณอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนค่าความเร็วของ

อสุจิจะบ่งบอกถึงคุณภาพว่าในจำนวนที่เคลื่อนที่ได้นั้นอสุจิเคลื่อนที่ได้เร็ว (หรือแรง) มากน้อยเพียงใด ค่าทั้ง 2 ค่าจึงน่าจะได้นำมาประกอบกันในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ 'การพัฒนาการใช้วิธีการอย่างง่ายและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดการเคลื่อนไหวและความเร็วของตัวอสุจิโดยวิธีการว่ายขึ้นด้านบน (swim-up technique)' ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

โครงการวิจัยได้รับความร่วมมืออย่างดีจากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

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.

Baker, F.N., Cragle, R.G., Salisbury, G.W. and VanDemark, N.L. 1957. Spermatozoan velocities in vitro: a simple method of measurement. Fert. Steril., 8:149-155.

Chong, C.H. and Wales, R.G. 1962. The effect of cold shock on spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 15:543-551.

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.

Holt, W.V., Morris, G.J., Coulson, G. And North, R.D. 1988. Direct observation of cold-shocked effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. J. Exp. Zool., 246:305-314.

Janick, J. and MacLeod, J. 1970. The measurement of human spermatozoan motility. Fert. Steril., 21:140-146.

Katz, D.F. and Dott, H.M. 1975. Method of measuring swimming speed of spermatozoa. J. Reprod. Fert., 45:263-272.

Katz, D.F. and Overstreet, J.W. 1981. Sperm motility assessment by videomicrography. Fertil. Steril., 35:188-193.

Knuth, U.A. and Nieschlag, E.N. 1988. Comparison of computerized semen analysis with the conventional procedure in 322 patients. Fertil. Steril., 49:881-885.

Mahony, M.C., Alexander, N.J. and Swanson, R.J. 1988. Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers. Fertil. Steril., 49:876-880.

Makler, A. 1978. A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility etermination. Fert. Steril., 30:192-199.

Makler, A. 1980. Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analysis and for research purposes. Fert.Steril., 33:160-166.

Overstreet, J.W., Katz, D.F., Hanson, F.W. and Fonseca, J.R. 1979. A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. Fertil. Steril., 31:162-172.

Revell, S.G. and Wood, P.D.P. 1978. A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa. J. Reprod. Fert., 54:123-126.

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

Rothshild, L. 1953a . A new method of measuring sperm speeds. Nature, London, 171:512-513.

Rothshild. L. 1953b. A new method of measuring the activity of spermatozoa. J. Exp. Biol., 30:178-199.

Ruzich, J.V., VanArsdalen, K., Gill, H., Hypolite, J., Wein, A.J. and Levin, R.M. 1987. Objective assessment of the effect of caffeine on sperm motility and velocity. Fert. Steril., 48:819-893.

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

Salamon, S. and Lightfoot, R.J. 1967. Effect of cold shock, liquid storage, and pellet-freezing on successive ram ejaculates. Aust. J. Agric. Res. 18:959-972.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. MaGraw-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 sim-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.

Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M. and Sherin, R.J. 1988. Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. Fertil. Steril., 49:510-515.

Watson, P.F. 1981. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In G.J. Morris and A. Clarke (Eds.) "Effects of Low Temperature on Biological Membranes". Academic Press, London, pp.189-218.

Watson P.F. and Morris, G.J. 1987. Cold shock injury in aminal cells. In K. Bowler and B.J. Fuller (Eds.) "Temperature and Animal Cells". The company of Biologist Ltd., Cambridge, pp. 311-340.