เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2549;4(1):25-29.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของวิธีการละลายน้ำเชื้อต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโค

สราวุธ ฉายประสาท,[1] วิญญู เบ็ญจกุล,[2] อภิชาติ ชาติเชื้อ,[1] พิชิตดวง เจิมปลั่ง,[1] วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา[3]

[1]ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ อ. แม่วาง,
[2]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ [3]สาขาวิชาคลินิกสัตว์เคี้ยวเอื้อง
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาอิทธิพลของการละลายน้ำเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ น้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 96 หลอดจากพ่อพันธุ์โคถูกแบ่งออกโดยการสุ่มเข้าสู่กลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 24 หลอด ในแผนการทดลองการสุ่มแบบสมบูรณ์ กลุ่มทดลองได้แก่ การละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 1) อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 2) อุณหภูมิ 25 °ซ นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 3) และการละลายโดยใช้การสัมผัสกับอุ้งมือ นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 4) ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในหลอดน้ำเชื้อแต่ละหลอดภายหลังการละลาย ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยโปรแกรม SAS ด้วยคำสั่ง PROC GLM เพื่อหาความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในแต่ละกลุ่มผลการศึกษาพบว่าวิธีการละลายน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในน้ำเชื้อกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า 51.04±12.33, 40.41±7.50, 39.79±10.26 และ 10.00±8.20 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีค่าสูงสุดและต่ำสุดในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการละลายน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2549; 4(1):25-29.

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ การละลายน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

บทนำ

การผสมเทียมได้ทำให้เกิดการพัฒนาการเลี้ยงโคนม โดยเป็นการกระจายพันธุกรรมที่ดีไปในแหล่งต่างๆ ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์โคนม ความสำเร็จของการผสมเทียมขึ้นกับปัจจัยหลายปัจจัยและปัจจัยที่มีความสำคัญปัจจัยหนึ่ง

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : สราวุธ ฉายประสาท, ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ 50; E-mail:019927574@gsmadvance.com

ได้รับบทความวันที่ 14 พฤศจิกายน 2548

คือ คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

การละลายน้ำเชื้อ (thawing) เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการผสมเทียม โดยปกติจากการปฏิบัติงานในภาคสนาม การละลายน้ำเชื้อจะใช้การละลายด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35-37 °ซ นาน 30วินาที[1] แต่อย่างไรก็ตามในการปฏิบัติงานในพื้นที่ เจ้าหน้าที่ผสมเทียมต้องทำงานตลอดทั้งวัน และเปิด-ปิดกระติกน้ำอุ่นหลายๆ ครั้ง ทำให้อุณหภูมิลดลง จึงศึกษาเพื่อให้เห็นผลชัดเจน พบว่ามีการละลายน้ำเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างจากวิธีการข้างต้น ด้วยเหตุนี้การศึกษาถึงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังจากการละลายจึงเป็นแนวทางในการแสดงถึงคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการละลายด้วยวิธีต่างๆ กับการละลายน้ำเชื้อที่ได้ปฏิบัติกันโดยทั่วไป เพื่อที่จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจอย่างถูกต้องและใช้ในการแนะนำส่งเสริมต่อไป

การศึกษานี้ใช้การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (sperm progressive motility) เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการละลาย เนื่องจากการตรวจด้วยวิธีการนี้ไม่ต้องการอุปกรณ์และเครื่องมือที่ยุ่งยากหรือราคาแพงและมีความสะดวกในการนำไปใช้ในระดับหน่วยหรือพื้นที่ ทั้งนี้ค่าดัชนีดังกล่าวมีรายงานชัดเจนว่าเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในการผสมเทียมกับตัวโคในภาคสนาม[2-5] ประกอบกับรายงานในลักษณะนี้ในประเทศไทยยังมีค่อนข้างจำกัด

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของการละลาย น้ำเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลอง

น้ำเชื้อแช่แข็งบรรจุหลอดจากพ่อโคที่ใช้รีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข ITN019 XF พันธุ์แท้โฮล-สไตน์ ฟรีเซียน ผลิตชุดน้ำเชื้อเดียวกันซึ่งบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 ซี.ซี. มีความเข้มข้นของอสุจิภายในหลอด 30 ล้านตัว จำนวน 96 หลอดถูกนำมาใช้ในการศึกษาโดยใช้แบบแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (random complete design) ซึ่งแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ละลายด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 วินาที (GR1) กลุ่มที่ละลายด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 30 °ซ นาน 30 วินาที (GR2) กลุ่มที่ละลายด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 25 °ซ นาน 30 วินาที (GR3) และกลุ่มละลายด้วยอุ้งมือหรือการปั่นน้ำเชื้อด้วยอุ้งมือเป็นเวลานาน 30 วินาที (GR4)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

หลังจากทำการละลาย (thawing) น้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละหลอดตามวิธีการละลายในแต่ละกลุ่มทดลองทำการตัดปลายหลอดน้ำเชื้อและหยดน้ำเชื้อ 1 หยดบนสไลด์ปิดด้วยสไลด์บาง (cover slide) นำไปวางบน slide warmer plate ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้นนำไปส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ(sperm progressive motility) ภายหลังการละลายโดยผู้ตรวจเพียงคนเดียวที่ได้รับการฝึกปฏิบัติและมีประสบการณ์ในการตรวจเป็นอย่างดีเพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่

ของตัวอสุจิ

การวิเคราะห์สถิติ

ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ PROC GLM ในโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 9.00[6] หากพบว่ามีความแตกต่างกันจากการทดสอบ F-test ของ Type III ใช้การทดสอบ Duncan's New Multiple Range Test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเป็นขั้นตอนต่อมา การทดสอบกำหนดระดับนัยสำคัญไว้ที่ $\alpha = 0.05$

การทดสอบเขียนตัวแบบ ได้ดังต่อไปนี้

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

เมื่อ

y_{it} = ค่าสังเกตที่ *t* ของการละลายน้ำเชื้อวิธีการที่ *i*

β = overall mean

α_i = อิทธิพลคงที่ (fixed effect) ของการละลายน้ำเชื้อวิธีการที่ *i*

ε_{ijk} = ค่าความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม (random error) ที่มีคุณสมบัติ NID $(0,O^2)$[7]

ผลการทดลอง

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละวิธีของการละลายน้ำเชื้อ ดังแสดงในตาราง โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในกลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °ซ มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และกลุ่มละลายน้ำเชื้อด้วยการปั่นในอากาศมีค่าต่ำที่สุด ส่วนการละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่น 30 และ 25 °ซ ไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจากการละลายน้ำเชื้อด้วยวิธีต่างๆ

Thawing method	Sperm progressive motility (%)
Water temp. 37 °C	51.04±12.33[a]*
Water temp. 30 °C	40.41±7.50[b]
Water temp. 25 °C	39.79±10.26[b]
Hand surface temp.	10.00±8.20[c]

* Different superscripts within the same column indicate significance ($p<0.05$)

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการละลายน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยการละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 วินาที จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงสุดเมื่อเทียบกับวิธีละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 30 วินาที,วิธีละลายที่อุณหภูมิ 25 °ซ นาน 30 วินาที และการละลายโดยใช้การสัมผัสกับอุ้งมือ นาน 30 วินาที ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการแนะนำและส่งเสริมโดยกรมปศุสัตว์ที่กำหนดให้ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนที่จะทำการผสมเทียม[1] และใกล้เคียงกับข้อกำหนดของ NAAB (National Association of Animal Breeders) ที่ได้กำหนดวิธีการละลายน้ำเชื้อที่ 35-37 °ซ เป็นเวลา 40 วินาที[8] ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าวจึงเป็นวิธีการที่

เหมาะสมในการปฏิบัติงานด้านผสมเทียมในภาคสนามส่วนการปั่นหลอดน้ำเชื้อด้วยมือเป็นวิธีการที่ไม่ควรปฏิบัติเนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งจะกระทบต่ออัตราการผสมติดตามมา การละลายน้ำเชื้ออย่างถูกวิธีจึงเป็นแนว ทางที่ควรปฏิบัติและได้รับการส่งเสริม เพื่อให้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมได้ปฏิบัติอย่างถูกต้องและถูกวิธี ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจะมีความสัมพันธ์สูงมากกับอัตราผสมติด แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการตรวจเพียงลักษณะเดียว ดังนั้นการวัดคุณภาพของน้ำเชื้อโดยใช้การตรวจทางด้านคุณภาพด้วยวิธีอื่นๆ และการประเมินจากการนำน้ำเชื้อที่ผ่านการละลายด้วยวิธีต่างๆ ไปผสมเทียมกับแม่โคจึงเป็นงานที่น่าศึกษาในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. กรมปศุสัตว์ การผสมเทียมโค. 2547; Available from:http://www.dld.go.th/biotech/Source% 20 Docs/From%20Dr% 20Chirut/ AI_Article/ E-1_AI.htm
2. Nadir S, Saacke RG, Bame J, Mullins J, Degelos S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. J Anim Sci 1993;71:199-204.
3. Correa JR, Pace M, Zavos PM. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programme. Theriolgenology 1997;48:721–31.
4. Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-MartinezH H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology 2001;55:947-61.
5. Verberckmoes S, Van Soom A, de Kruif A. Intra-uterine insemination in farm animals and humans. Reprod Dom Anim 2004;39: 195-204.
6. SAS. SAS/STAT User's guide in SAS 9.1 .SAS institute, Cary, NC 2004.
7. Montogomery DC. Design and analysis of experiments. 5th ed. New York: John Wiley, 2001.
8. Nebel RL. Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen. In: Yongquist RS, editor. Current veterinary therapy in large animal theriogenology. Philadelphia: W.B Saunders, 1991. p. 251-6.