บทที่ 8
การรีดเก็บน้ำเชื้อและการเก็บรักษา

บทนำ

การคัดเลือกพ่อพันธุ์สัตว์นำมารีดน้ำเชื้อ เพื่อการเก็บรักษานั้น จะเลือกจากประวัติการให้ผลผลิตที่เป็นความต้องการของตลาด ประกอบกับประวัติพ่อแม่ ปู่ย่า ตายาย และจากการประมวลผลผลิตที่ถ่ายทอดสู่รุ่นลูก ดังนั้น พ่อพันธุ์สัตว์ที่จะนำมารีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมควรเป็นพ่อพันธุ์ที่ผ่านการพิสูจน์แล้วว่าถ่ายทอดพันธุกรรมที่ดี โดยในปัจจุบัน ในต่างประเทศมีระบบการประเมินค่าถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือค่าการผสมพันธุ์ (breeding index) การดักเก็บน้ำเชื้อเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการผสมเทียม มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการได้รับน้ำเชื้อที่มีคุณภาพ มีจำนวนตัวอสุจิสูงสุด เพื่อการใช้ประโยชน์สูงสุดจากพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพ ผลสำเร็จของการรีดน้ำเชื้อมักขึ้นอยู่กับความรู้ ความชำนาญของผู้รีด ความพร้อมของอุปกรณ์ ความพร้อมของตัวสัตว์ และสิ่งแวดล้อม

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

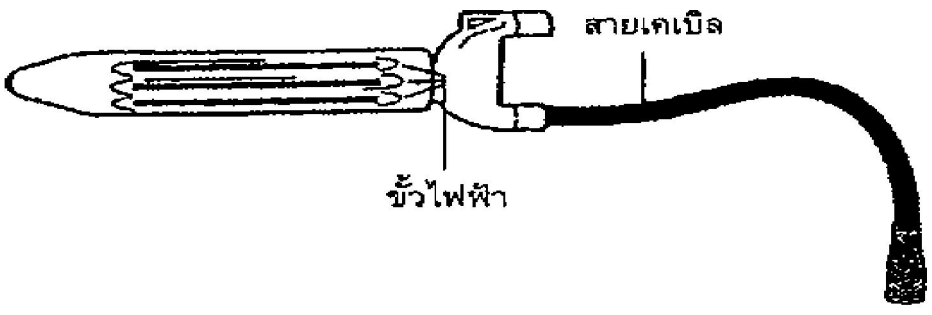
ในระยะแรกของการรีดเก็บน้ำเชื้อในโคและแกะ ใช้วิธีให้พ่อพันธุ์ผสมกับแม่พันธุ์ตามธรรมชาติ แล้วเก็บน้ำเชื้อออกมาจากช่องคลอดโดยการดูดออกมา หรือใช้ช้อนตัก หรือใช้ฟองน้ำซับออกมา แต่วิธีการนี้น้ำเชื้อที่ได้มักจะมีน้ำคัดหลั่ง (secretion) จากแม่ปนเปื้อนมาด้วย และอาจจะมีเชื้อแบคทีเรียปะปน และเสี่ยงต่อการติดโรคใน ค.ศ. 1932 มีการออกแบบถุงยางสอดเข้าไปในช่องคลอดให้พ่อพันธุ์หลั่งน้ำเชื้อเข้าไปในถุง สามารถป้องกันปัญหาการปนเปื้อนได้ แต่หยิบจับลำบาก ค.ศ. 1914 ชาวอิตาลีชื่อ อะมานเทีย (Amantea) ประดิษฐ์โยนีเทียมสำหรับสุนัขประมาณ ค.ศ. 1933 โคมารอฟ (Komarov) และนาเกียฟ (Nagaev) ชาวรัสเซียได้ออกแบบโยนีเทียมสำหรับโค เป็นการเริ่มใช้โยนีเทียมเก็บน้ำเชื้อพ่อโค วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อสามารถกระทำได้ 3 วิธีดังนี้

1. การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการบีบนวด (Massage method)

ในตอนต้น ค.ศ. 1925 เคส (Case) เป็นผู้ค้นพบวิธีบีบนวดต่อมเซมินอลเวสซิเคิลผ่านทางทวารหนัก สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ ต่อมามิลเลอร์ (Miller) และอีแวนส์ (Evans) ใช้วิธีสอดมือเข้าไปในทวารหนักลึก 7-10 นิ้ว (18-25 เซนติเมตร) นวดต่อมเซมินอลเวสซิเคิล (Seminal vesicle) จากส่วนต้นไปยังส่วนท้าย และนวดแอมพูลเล่ (Ampullae) ด้วย เป็นเวลา 2 นาที จะมีน้ำเชื้อไหลออกมา วิธีการนี้เป็นประโยชน์ใช้ในพ่อโคที่ไม่สามารถปีนขึ้นขี่ผสมพันธุ์ได้ แต่น้ำเชื้อที่ได้อาจจะมีน้ำปัสสาวะปะปน หรือมีน้ำคัดหลั่งจากต่อมเซมินอลเวสซิเคิลมากเกินไป ทำให้น้ำเชื้อที่ได้มีส่วนประกอบไม่สมดุลเหมือนน้ำเชื้อที่เกิดจากการหลั่ง และวิธีการนี้ไม่แนะนำให้ใช้ในแพะแกะ

2. การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electro-Ejaculation Method)

การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าให้มีการหลั่งน้ำเชื้อ กระทำเป็นครั้งแรกโดยบาเทลลี (Batelli) ใน ค.ศ. 1922 ในหนูตะเภาโตเติมวัยตัวผู้ โดยช็อตด้วยไฟฟ้า 30 โวลท์ 47 ไซเคิล กระแสสลับ ที่ด้านล่างของสมอง ใน ค.ศ. 1936 กันน์ (Gunn) กระตุ้นไขสันหลังแกะบริเวณกระดูกสันหลังส่วนเอวชิ้นที่ 4 และกระดูกเชิงกราน โดยการใช้อิเล็กโทรดขนาดเล็ก ใน ค.ศ. 1948 นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสประดิษฐ์อิเล็กโทรดแบบไบโพลาร์ มีวงแหวนหลายวงสอดเข้าไปในทวารหนักของโค ใช้ไฟ 30 โวลท์ 700 มิลลิแอมแปร์ กระแสสลับ ต่อมาด๊วก (Dziuk) และคณะ พัฒนาอิเล็กโทรดแบบไบโพลารีให้เป็นโพรบขนาด 1.5 X 22 นิ้ว ด้านปลายมีวงแหวน 6 วง ห่างกัน $1\frac{3}{4}$ นิ้ว ชะล้างทวารหนักด้วยสารละลายเกลือ สอดโพรบเข้าไปเตะพื้นทวารหนัก เพิ่มกำลังไฟให้ถึง 10-15 โวลท์ โดยเพิ่มทีละ 2 โวลท์ ในเวลา 5-10 วินาที แล้วกลับไปที่ศูนย์ทำให้ลึงค์แข็งตัวและหลั่งน้ำเชื้อออกมา น้ำเชื้อที่ได้มีปริมาตรมากกว่าการรีดด้วยโยนีเทียมแต่มีตัวอสุจิน้อยกว่า มาร์เดน (Marden) ได้พัฒนาโพรบสำหรับใช้กระตุ้นในโคเป็นอีเล็กโทรดทรงกระบอกยาว 1.8 X 13 นิ้ว (4.6 X 33.0 เซนติเมตร) มีแถบโลหะตามแนวนอน 4 แถบ ยาว 11 นิ้ว (28 เซนติเมตร) กระตุ้นด้วยไซน์เวฟ (sine wave) ให้มีความถี่ 20-30 รอบต่อวินาที ในเวลา 3-8 วินาที แล้วลดลงเป็นศูนย์ มีระยะพัก 5-15 วินาที การใช้เครื่องกระตุ้นด้วยไฟฟ้ามีประโยชน์พ่อพันธุ์ที่พิการ ปฏิเสธการหลั่งในโยนีเทียม หรือใช้ในกรณีที่ตัวผู้ไม่สามารถฝึกได้ ไม่ยอมหลั่งน้ำเชื้อในโยนีเทียม ใช้ได้ผลในโค แกะ แพะ และสามารถเก็บน้ำเชื้อสุกรได้ โดยปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้จะน้อยกว่าปกติ ไม่สมควรเก็บและใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น ขาดความกำหนด เป็นต้น สมควรพิจารณาคัดพ่อพันธุ์เช่นนี้ทิ้ง เนื่องจากเป็นลักษณะถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังลูกหลานได้ การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้เครื่องกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ควรสวนมูลออกจากทวารหนักเสียก่อน และควรหล่อลื่นโพรบก่อนการสอดโพรบเข้าไป



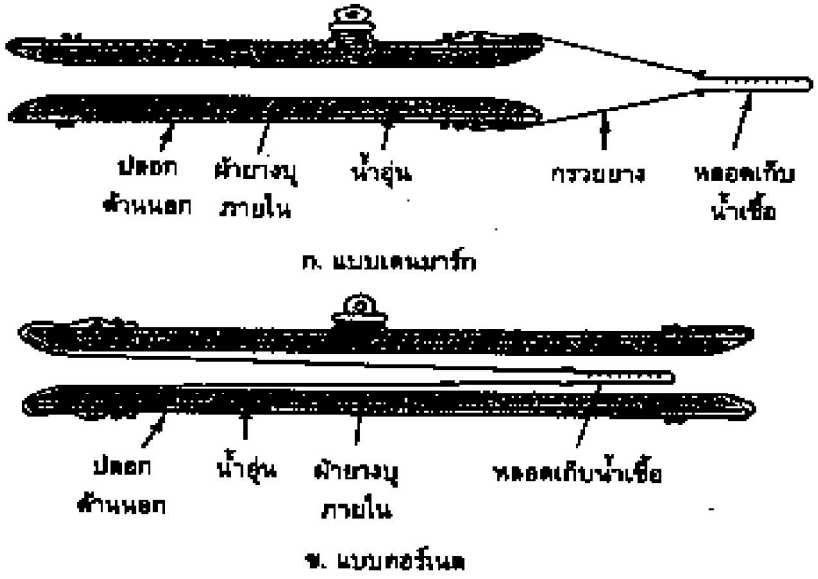
ภาพที่ 8.1 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้าสำหรับรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโค
ที่มา : มงคล (2546)

ภาพที่ 8.2 อุปกรณ์เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (ภาพจากการเรียนการสอน)
ที่มา : วิชชุดา (2564)

ภาพที่ 8.3 การรีดน้ำเชื้อโคด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (ภาพจากการเรียนการสอน)
ที่มา : วิชชุดา (2564)

3. การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina หรือ AV)

เป็นวิธีการที่ดีที่สุดและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการรีดเก็บน้ำเชื้อจากโคนม โคเนื้อ และสุกรที่ใช้วิธีการผสมเทียม เนื่องจากสามารถขจัดปัญหาที่มาจากการติดเชื้อ น้ำเชื้อที่ได้สะอาด มีส่วนประกอบสมบูรณ์ตามปกติ รัสเซียเป็นชาติแรกที่คิดประดิษฐ์โยนีเทียมขึ้น มีลักษณะเป็นกระบอกยางยาวประมาณ 60 เซนติเมตร (24 นิ้ว) ภายในมีผ้ายางบุ ปลายผ้ายางทั้งสองด้านพับกลับขึ้นไปบนขอบของกระบอกทำให้เกิดเป็นช่องว่างสำหรับใส่น้ำอุ่น เพื่อทำให้โยนีเทียมมีความร้อนมากกว่าอุณหภูมิร่างกาย อีกปลายด้านหนึ่งมีภาชนะแก้วเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่ากระบอกเก็บสำหรับรองรับน้ำเชื้อ ในภายหลังมีผู้นำไปดัดแปลงพัฒนาใช้ เช่น แบบของอังกฤษ มีการอัดอากาศเข้าไปในกระบอก เพื่อทำให้เกิดความดันในขณะพ่อโคหลั่งน้ำเชื้อ ต่อมามีปัญหาเรื่องน้ำเชื้อได้รับผลกระทบจากความเย็น เกิด cold shock ในฤดูหนาว ทีมงานวิจัยมหาวิทยาลัยคอร์เนลจึงประดิษฐ์โยนีเทียมให้ขวดเก็บน้ำเชื้ออยู่ภายในกระบอกรีดเก็บ มีผนัง 3 ชั้น (triple-walled AV) ประกอบด้วยตัวกระบอกพลาสติกยาว 24 นิ้ว ภายในบุยาง 2 ชั้น ผ้ายางชั้นนอกหุ้มด้านในของกระบอกพับขอบขึ้นมารัดหัวท้ายกระบอก ผ้ายางชั้นในมีลักษณะเป็นกรวยยางปลายบนรัดอยู่กับขอบกระบอกด้านสำหรับสอดลึงค์ อีกปลายต่อกับหลอดเก็บน้ำเชื้อซึ่งอยู่ภายในกระบอกเก็บน้ำเชื้อ ป้องกันอุณหภูมิภายนอก เหมาะสำหรับประเทศที่มีอากาศหนาวเย็น และในกรณีที่มีพ่อโคมาก โยนีเทียมมีน้อยกว่าจำนวนพ่อโค การเปลี่ยนเฉพาะผ้ายางบุภายในและน้ำร้อนในกระบอกสะดวกและสะอาด



ภาพที่ 8.4 โยนีเทียม

ที่มา : มงคล (2546)

การเตรียมโยนีเทียม

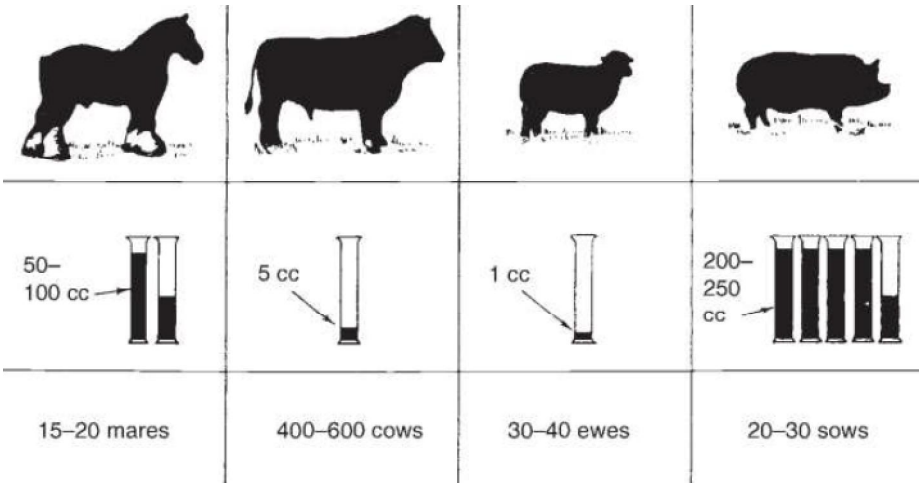
โยนีเทียมจะต้องสะอาด ปราศจากเชื้อก่อนการนำมาใช้ เลือกใช้เฉพาะโยนีเทียมและยางที่มีคุณภาพดีไม่เสื่อมอายุ ควรล้างผ้ายางให้สะอาดด้วยน้ำร้อนและสบู่ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่ง ผึ่งให้แห้ง เก็บยางไวในตู้ที่ไม่มีฝุ่น อาจจะไม่ใช้แอลกอฮอล์เช็ดแต่ใช้วิธีต้มผ้ายางในน้ำเดือด ใส่ในกล่องที่มีแสงอัลตราไวโอเลตฆ่าเชื้อและทำให้ยางแห้งด้วย นำยางมาประกอบกับกระบอกเก็บน้ำเชื้อ แน่ใจว่ายางไม่บิด ต่อหลอดเก็บน้ำเชื้อกับกรวยยาง รัดส่วนต่อกันให้แน่นด้วยแผ่นยางบางๆ ถ้าเป็นแบบคอร์เนล นำไปสอดเข้าไปในกระบอกพลิกปลายกรวยยางทับไปบนแผ่นยางขึ้นแรก ถ้าเป็นแบบเดนมาร์กนำกรวยยางไปต่อที่ด้านนอกของปลายโยนีเทียม รัดแผ่นยางทั้งสองด้านกับกระบอกให้แน่นด้วยแถบยางบางๆ หรือใช้เชือกรัดให้แน่น ระมัดระวังมิให้เกิดการเลื่อนหลุด รินน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42-43 องศาเซลเซียส เข้าทางจุกก๊อกของตัวกระบอก เพื่อทำให้อุณหภูมิภายในโยนีเทียมเป็น 40 องศาเซลเซียส อย่าเติมมากเกินไป ผ้ายางอาจจะขาดหรือหลุดขณะพ่อโคกระแทกขณะหลั่งน้ำเชื้อ ควรเติมน้ำอุ่นให้พอดีกับขนาดของลึงค์คือประมาณครึ่งหนึ่ง หรือ 2/3 ถ้าเติมน้อยเกินไปผ้ายางภายในยังขยายตัวไม่พอ เวลาพ่อโคกระแทก (thrust) ส่วนของผ้ายางอาจไปกระแทกถูกกระบอก ทำให้น้ำไหลออกมาได้ บางครั้งถ้าเติมน้ำลงไปน้อยต้องเติมลมด้วย จะทำให้เกิดแรงตันที่เหมาะสม เมื่อเตรียมโยนีเทียมเสร็จแล้ว เก็บไว้ในตู้อบขึ้นอุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ หล่อลื่นภายในโยนีเทียมด้วยวาสลีนสะอาด หรือเค-วายเจลลี่ หรือน้ำมันพืชบริสุทธิ์ทาบางๆ โดยการใช้แท่งแก้วสะอาดกวาดลงไปในผ้ายางลึก 3-5 นิ้ว ไม่ควรทามากเกินไป เพราะจะลงไปปนเปื้อนกับน้ำเชื้อได้ ควรตรวจสอบอุณหภูมิของโยนีเทียมก่อนการใช้ (มงคล, 2546)

พฤติกรรมการขึ้นทับตัวเมียในการผสมตามธรรมชาติหรือตัวล่อในการรีดเก็บน้ำเชื้อ

ตามธรรมชาติพ่อโคจะแสดงความสนใจตัวเมียที่เป็นสัด โดยการเอาคางเข้าไปเกยที่บั้นท้ายของแม่โค มีการเลียและดมที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ต่อมาจะมีการยกริมฝีปากบนขึ้น ซึ่งเชื่อว่าเป็นการกระตุ้นฮอร์โมน ทำให้พ่อโคขึ้นปีน (mount) ตัวแม่โค หรือตัวล่อ และพยายามผสมโดยที่ลึงค์จะสอดส่าย (seeking) หาช่องคลอด และจะยื่นออกมาตลอดความยาว เพื่อการสอดเข้าไปในช่องคลอด (intromission) ในจังหวะที่ลึงค์ของพ่อโคเริ่มออกมาจากหนังหุ้มลึงค์ ผู้รีดเก็บน้ำเชื้อจะสอดโยนีเทียมอย่างนิ่มนวลให้ลำลึงค์อยู่ในโยนีเทียมที่มีความตึงและอุ่นเหมือนช่องคลอดแม่โค ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้มีการกระแทกตัว (thrust) แล้วมีการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculation) ซึ่งผู้รีดเก็บน้ำเชื้อจะค่อยๆ ถอนโยนีเทียมออกมาหลังจากที่การหลั่งน้ำเชื้อสิ้นสุดแล้ว และพ่อโคจะลงมาจากหลังตัวล่อ ผู้รีดเก็บน้ำเชื้อ เอียงโยนีเทียมขึ้นเพื่อป้องกันน้ำเชื้อหกออกมาจากโยนีเทียม เขย่าให้ น้ำเชื้อที่เหลือติดตามผนังบุภายในลงในหลอดเก็บ

การรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สัตว์เลี้ยง

วิธีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อที่ใช้ในฟาร์มสัตว์ จะมีรูปแบบที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง เช่น ในม้าตัวผู้ก่อนที่จะมีการหลั่งน้ำเชื้อออกมา มักจะมีของเหลวใสที่เกิดขึ้นจากต่อมร่วมออกมาก่อน โดยเฉพาะออกมาจากต่อมลูกหมาก ในการหลั่งครั้งแรกมักมีตัวอสุจิจำนวนมาก ตามมาด้วยเซมินอลพลาสมาที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเจือจาง ปริมาณของน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์เลี้ยง ดังภาพที่ 8.3



ภาพที่ 8.5 ปริมาณน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงที่หลั่งออกมา
ที่มา: Gordon (2005)

1. การรีดน้ำเชื้อในโค

จูงพ่อโคออกมาที่บริเวณรีดเก็บน้ำเชื้อ จูงให้เดินห่างจากตัวล่อพอควร ยังไม่ให้พ่อโคปีนขึ้นทันทีจูงเดินวน 2-3 ครั้งเพื่อกระตุ้นความกำหนัด สังเกตว่ามีน้ำเซมินอลเวสชิเคิลหยดจากรูเปิดของหนังหุ้มลึงค์บางตัวลึงค์อาจจะโผล่มานอกหนังหุ้มลึงค์ แสดงว่าเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการรีดเก็บน้ำเชื้อแล้ว คนรีดเก็บน้ำเชื้อควรสวมรองเท้าพิเศษคือหนังแข็งป้องกันโคเหยียบ ยืนอยู่ใกล้ตำแหน่งที่พ่อโคจะปีนขึ้นขี่ตัวล่อ ผู้รีดควรเอาไหล่ซ้ายแตะที่สีข้างพ่อโค ลากขาซ้ายไปด้านหลังป้องกันมิให้โคเหยียบ ถือโยนีเทียมด้วยมือขวา เอียงให้ทำมุมกับพื้นประมาณ 35 องศาเซลเซียส ให้ปลายที่จะสอดลึงค์อยู่ด้านล่าง เมื่อพ่อโคปีนขึ้นขี่ตัวล่อ ห้ามเอามือจับตัวลึงค์ ให้ใช้มือซ้ายจับหนังหุ้มลึงค์เบาๆ ให้ลึงค์สอดเข้าไปในโยนีเทียม การสอดลึงค์เข้าไปในโยนีเทียมให้พ้นพอดี พ่อโคจะหลั่งน้ำเชื้อออกมาในขณะกระแทก โยนีเทียมจะถูกผลักไปข้างหน้า การหลั่งน้ำเชื้อเสร็จสิ้นลง ให้ถือโยนีเทียมด้านที่ใช้สอดลึงค์ตั้งขึ้น ค่อยๆ ดึงพ่อโคออกจากตัวล่อ ในบางครั้งพ่อโคจะพุ่งเข้าชนคนรีด ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ มีการบังคับพ่อโคให้ดีเขย่าน้ำเชื้อที่ค้างอยู่ในกระบอกให้ลงไปในหลอดแกะถุง

หุ้มหลอดออก นำหลอดออกจากกรวยยางไปห้องปฏิบัติการระวัง ไม่ให้มีสิ่งอื่นใดตกลงไปในหลอดเก็บน้ำเชื้อ

2. การรีดน้ำเชื้อในสุกร

ใช้หุ่นตัวล่อ (dummy) ที่ทำด้วยไม้หรือโลหะมีกระสอบคลุม อาจจะเปลี่ยนเป็นแม่สุกร แต่สิ่งแวดล้อมรอบๆ ควรเงียบไม่มีเสียงอื่นรบกวนทำลายความกำหนัดของพ่อพันธุ์ โยนีเทียมของสุกรมีหลายแบบ กระบอกยางที่ใช้เป็นท่อยางหนา เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ($1\frac{3}{4}$ นิ้ว) ยาว 12.5 เซนติเมตร (5 นิ้ว) มีผ้ายางบุอยู่ภายใน และมีแผ่นฟองน้ำเล็กๆ อยู่ระหว่างตัวกระบอกกับผ้ายาง ช่วยเพิ่มความดันให้แก่ลึงค์ เติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส (113-122 องศาฟาเรนไฮต์) ลงในโยนีเทียม สอดผ้ายางที่บางเรียบทรงกระบอกยาว 40 เซนติเมตร (16 นิ้ว) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-3.5 เซนติเมตร ($1-\frac{1}{4}$ $1\frac{3}{8}$ นิ้ว) และมีรูเล็กๆ ที่ด้านบน เข้าไปในโยนีเทียม ด้านหนึ่งผูกติดกับด้านนอกทาสารหล่อลื่น ปลายอีกด้านหนึ่งต่อกับขวดพลาสติกหรือถุงความจุ 500 มิลลิลิตร สำหรับรองรับน้ำเชื้อแช่อยู่ในน้ำอุ่น 39 องศาเซลเซียส (102 องศาฟาเรนไฮต์) เมื่อลึงค์ของพ่อสุกรสอดเข้าไปในโยนีเทียม มือของคนรีดบีบที่ปลายของลึงค์ (glans penis) ผ่านทางผ้ายางเพื่อกระตุ้นให้เกิดความดัน สุกรจะหลั่งน้ำเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีโดยในนาทีที่ 3 หรือ 4 จึงจะมีส่วนของตัวอสุจิออกมา

มีการดัดแปลงโยนีเทียม โดยเพิ่มขดลวดเกลียวใส่ไว้ภายในโยนีเทียมให้คล้ายกับหลืบของช่องคลอดสุกร การรีดน้ำเชื้อโดยการใช้มือที่สวมถุงมือ โดยไม่ใช้โยนีเทียมก็สามารถรีบเก็บน้ำเชื้อได้เช่นกัน

การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้า โดยใช้โพรบสอดเข้าทางทวารหนัก (rectal probe) อาจจะใช้ชนิดเดียวกับโค ก่อนการใช้เครื่องมือ ควรฉีดยาสลบอย่างอ่อนหรือยาชาเพื่อไม่ให้พ่อสุกรเคลื่อนไหวและต้องสวนเอามูลออกมาก่อนที่จะสอดโพรบเข้าไป เปิดสวิตช์ไฟกระตุ้นด้วยความถี่ 12-17 โวลต์ เป็นเวลา 5-10 วินาที จะได้น้ำเชื้อชนิดที่มีอสุจิเข้มข้นสูงเนื่องจากไม่มีน้ำคัดหลั่งออกมาจากต่อมร่วม (accessory gland)

3. การรีดน้ำเชื้อในไก่

วิธีการรีดน้ำเชื้อที่ใช้ผู้ปฏิบัติ 2 คน เป็นวิธีที่นิยมที่สุด โดยคนหนึ่งเป็นผู้ควบคุมสัตว์จับบังคับด้วยความนุ่มนวล โดยหันหัวไก่สอดเข้าใต้รักแร้ รวบปีกและขาด้วยมือทั้ง 2 ข้าง ให้ขาไก่ถ่างในท่าธรรมชาติ ลำตัวสัตว์เอียงลงเป็นมุมประมาณ 15-30°C ผู้ปฏิบัติงานอีกคนเป็นตัวกระตุ้น รีดโดยใช้มือข้างหนึ่งลูบบริเวณหลังไก่ จากบริเวณใกล้โคนปีกไปทางด้านหางอย่างรวดเร็ว จากน้ำหนักที่เบาไปหาหนัก เมื่อนิ้วมือไปถึงโดนหาง ใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือโอบรอบโดนหาง จากทางด้านหลังของไก่ ณ เวลาในขณะนี้ไก่จะเกร็งและเผยอก้น ให้ใช้นิ้วบีบบริเวณโคนก้น พร้อมใช้หลอดเก็บน้ำเชื้อจ่อรองรับน้ำเชื้ออารมณ์การตอบสนองของไก่ จะเป็นไปอย่างรวดเร็วประมาณ 1-2 วินาที การลูบหลัง

และการรีดต้องสัมพันธ์กัน มิเช่นนั้นแล้ว จะรีดน้ำเชื้อไม่ออกหรือออกปริมาณน้อยและต้องใช้แรงบีบคั้นหนักหน่วง ทำให้ไก่บาดเจ็บบริเวณก้น ไก่ที่ผอมบริเวณก้นมักจะสีซีดและไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น ไก่ที่ขนาดโตมากหรืออ้วนเกินไป อาจปรับวิธีรีดเล็กน้อย โดยใช้มือข้างหนึ่งลูบหลัง และอีกข้างหนึ่งลูบบริเวณใต้ท้องมาทางด้านก้น ประสานกันกับการลูบท้อง จากนั้นใช้มือข้างหนึ่ง ข้ามหางมาวางกดโดนหางไปทางด้านหลังของไก่พร้อมกับใช้ปลายนิ้วชี้และหัวแม่มือ กดบริเวณโคนก้น 2 ข้าง และตวัดออกไปทางหาง ก็สามารถรีดน้ำเชื้อได้เช่นกัน การตอบสนองของไก่จะเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก จึงต้องมีการฝึกฝนผู้รีดก่อนทำการรีดเพื่อหวังผลจริง การรีดน้ำเชื้อไก่อาจดำเนินการได้โดยคนเดียว โดยจับไก่ และใช้ขาหนีบขาไก่ไว้ทั้ง 2 ข้าง ขณะที่คนรีดอยู่ในท่านั่ง และดำเนินขั้นตอนการรีดเช่นเดียวกับที่กล่าวมา เนื่องจากในธรรมชาติไก่มักผสมพันธุ์ในช่วงบ่าย และส่วนใหญ่ไก่ตัวเมียจะวางไข่ในช่วงก่อนเที่ยง มีเพียงเล็กน้อยที่วางไข่ในช่วงบ่ายแก่ การรีดน้ำเชื้อไก่เพื่อการผสมเทียมจึงดำเนินการในช่วงบ่าย การรีดน้ำเชื้อในช่วงเช้าสามารถทำได้ แต่ควรเป็นช่วงสว่างแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 8.1

ตารางที่ 8.1 ผลของวิธีการรีดต่อปริมาตรและคุณภาพน้ำเชื้อของนกกระจอกเทศ

วิธีการรีด	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้น ($\times 10^9$ เซลล์)	จำนวนอสุจิ ($\times 10^9$ เซลล์)
ใช้นกเพศเมียกระตุ้น (n=12)	1.44[a]	4.10	5.86
ใช้สิ่งเทียมกระตุ้น (n=16)	0.83[b]	4.30	3.78
ใช้นกเพศเมียกระตุ้น (n=251)	1.52	2.76	3.92
ใช้สิ่งเทียมกระตุ้น (n=251)	1.06	3.91	4.74

[a], [b] แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : เทวินทร์ (2559)

ภาพที่ 8.6 การรีดน้ำเชื้อไก่ (ภาพจากการเรียนการสอน)
ที่มา : วิชชุดา (2564)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินศักยภาพของน้ำเชื้อว่าน่าจะมีความเป็นไปได้ในแง่ของความสมบูรณ์พันธุ์ หรืออัตราการผสมติดอยู่ในระดับใด เพื่อประกอบการพิจารณาตัดสินใจนำน้ำเชื้อนั้นไปใช้ในการผสมเทียม ตลอดจนทราบถึงสถานภาพทางการสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์ เพื่อการนำไปประกอบการพิจารณาจัดการด้านการผสมพันธุ์ต่อไป ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์พันธุ์ มีมาตรฐานแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด

Alkan et al. (2001) รายงานว่า การผสมเทียมเป็นหนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเป็นเทคนิคที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในฟาร์มปศุสัตว์ และในปัจจุบัน การผสมเทียมในสัตว์ปีกนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง และคุณภาพของน้ำเชื้อที่ดีจะทำให้การผสมเทียมมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ความสำเร็จของการผสมเทียมนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการคัดเลือกคุณภาพของน้ำเชื้อ ทั้งจากการเคลื่อนที่แบบคลื่น จำนวนตัวเป็น ตัวตาย และรูปร่างลักษณะของอสุจิ ซึ่งรูปร่างลักษณะของอสุจิสัตว์ปีกนั้น จะมีความแตกต่างจากอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยอสุจิสัตว์ปีกจะมีลักษณะรูปร่างยาว คล้ายกระสวย ซึ่งการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ นิยมทำในหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไป ได้แก่การประเมิน สี กลิ่น การปนเปื้อน โดยปกติน้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิเข้มข้นจะมีลักษณะขาวขุ่น หากน้ำเชื้อที่มีลักษณะใส แสดงว่ามีตัวอสุจิในปริมาณน้อยซึ่งไม่ควรนำไปใช้ ในน้ำเชื้อสัตว์ปีกมักจะมี urate ปนมา หากน้ำเชื้อที่ได้มีลักษณะเป็นสีชมพูหรือสีน้ำตาล แสดงให้เห็นถึงการบาดเจ็บหรือติดเชื้อในระบบท่อ ซึ่งถ้าน้ำเชื้อมีลักษณะผิดปกติดังกล่าว และน้ำเชื้อมีสิ่งสกปรกปนออกมาควรทิ้ง (มงคล, 2546; เทวินทร์, 2553)

2. การเคลื่อนที่แบบหมู่ น้ำเชื้อที่รีดมาใหม่ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40-100 เท่า จะพบการเคลื่อนที่ของอสุจิมีลักษณะคล้ายคลื่น วิธีการทำโดยการหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด อุณหภูมิ 37°C โดยไม่ปิด cover slip และต้องทำการตรวจในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากน้ำเชื้อไก่นั้นแห้งเร็วมาก การประเมินทำได้โดยการให้ค่าคะแนน 0-5 คะแนน ดังได้แสดงในตารางที่ 8.2

ตารางที่ 8.2 การให้คะแนนการเคลื่อนที่แบบคลื่นของอสุจิ

คะแนน	ระดับ	ลักษณะการเคลื่อนที่
5	ดีมาก	น้ำเชื้อเข้มข้นสูง เคลื่อนที่เป็นลูกคลื่น เร็ว สังเกตเป็นรายตัวไม่ได้ อสุจิประมาณ 90 % หรือสูงกว่าที่เคลื่อนที่ได้
4	ดี	อสุจิเคลื่อนที่แรง แต่ความแรงของคลื่นไม่เท่าระดับ 5 อสุจิเคลื่อนที่ประมาณ 70-85 %
3	ปานกลาง	การเคลื่อนที่เป็นคลื่นเล็กน้อย เคลื่อนที่ช้า สามารถสังเกตการเคลื่อนที่รายตัวได้ อสุจิเคลื่อนที่ประมาณ 45-65 %
2	ต่ำ	ไม่พบลักษณะคลื่น เคลื่อนที่อ่อน มีอสุจิเคลื่อนที่ได้ประมาณ 20-40 %
1	ต่ำมาก	ประมาณ 10 % ของอสุจิเท่านั้นที่เคลื่อนที่ได้
0	อสุจิตาย	ไม่พบการเคลื่อนที่

ที่มา : Evan and Maxwell (1987)

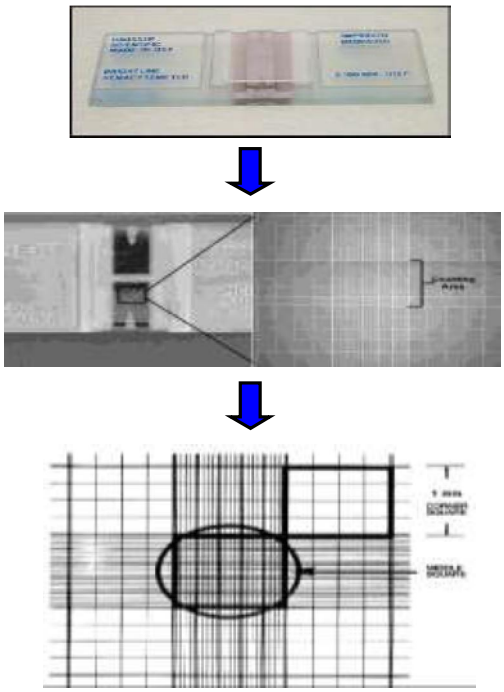
3. การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า เป็นการสังเกตอสุจิเคลื่อนที่รายตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยการหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด และปิดด้วย cover slip สังเกตการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิโดยสังเกตดูในหลายๆ พื้นที่ของแผ่นสไลส์ ควรเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางเพื่อไม่ให้มีความเข้มข้นของอสุจิมากเกินไป จากนั้นนับอสุจิจำนวนที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้ารวมประมาณ 300 ตัว แล้วนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (มงคล, 2546; เทวินทร์, 2553)

4. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ เป็นการประมาณความเข้มข้นของอสุจิต่อมิลลิลิตร อาจทำได้หลายวิธี เช่น การสังเกตความขุ่นของน้ำเชื้อ (consistency of semen) ซึ่งเป็นการประเมินแบบหยาบ การนับจำนวนอสุจิโดยตรงจากอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haematocytometer) หรือวัดจาก electronic particle ซึ่งแต่ละวิธีมีความแม่นยำและความรวดเร็วแตกต่างกัน สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการผสมพันธุ์ได้ด้วย (มงคล, 2546) การประมาณความเข้มข้นของอสุจิต่อมิลลิลิตร อาจทำได้หลายวิธีเช่น โดยการสังเกตดูความขุ่นข้นของน้ำเชื้อ ซึ่งเป็นการประเมินระบบหยาบ, การ

นับโดยตรงจากอุปกรณ์นับเม็ดเลือด, วัดจาก Colorimeter หรือวัดจาก electronic particle ซึ่งแต่ละวิธีมีความแม่นยำและรวดเร็วที่แตกต่างกัน

การนับความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) เป็นแท่นนับเม็ดเลือดมีอยู่หลายแบบ ส่วนใหญ่ ใน 1 ตร. มม. มี 25 ตารางใหญ่ ในแต่ละตารางใหญ่จะมี 16 ตารางเล็ก ดังภาพที่ 2.2 เมื่อปิด cover slip ลงไปบน haemacytometer จะมีช่องที่น้ำเชื้อเจือจางอยู่ได้ มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของตาราง 25 ช่อง จะมีน้ำเชื้ออยู่ 1/10 X 1/10 x 1/100 = 1/10,000 มล. (เทวินทร์, 2553; Lake and Stewart, 1978)



ภาพที่ 8.7 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด haemacytometer
ที่มา : Alkan et al. (2001)

วิธีการประเมิน

1. ในไก่ควรเจือจางน้ำเชื้อ 1 : 1,000 เท่า เนื่องจากน้ำเชื้อไก่จะมีความเข้มข้นสูง ประมาณ 4,000-6,000 ล้าน/มิลลิลิตร โดยเจือจางด้วย 3.6% sodium citrate หรือ 4% NaCl/eosin (หากต้องการเจือจางน้ำเชื้อ 1,000 เท่า ทำได้โดยใช้ไปเปตดูดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 3.6% sodium citrate หรือ 4% NaCl/eosin 10 มิลลิลิตร)

2. หยดส่วนผสมของน้ำเชื้อในข้อที่ 1 ลงบนตารางทั้ง 2 ด้านของแท่นนับ จากนั้นปิด cover slip ตรวจดูว่าน้ำเชื้อเหลวบรรจุอยู่เต็มช่องว่าง ไม่มีฟองอากาศ และไม่มีน้ำเชื้อเหลวไหล

เกิน หรืออาจใช้ cover slip ปิดวางบนแผ่น haemacytometer ก่อน แล้วจึงหยดส่วนผสมของน้ำเชื้อที่ขอบส่วนบนของ cover slip

3. ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้อสุจิโรยตัวลงบนพื้นระนาบเดียวกัน จากนั้นนับจำนวนอสุจิใน 5 ตารางใหญ่จาก 25 ช่องของทั้ง 2 ข้าง โดยนับจาก 4 มุม และตรงกลาง 1 ตาราง

4. คำนวณความเข้มข้น โดยหาค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิที่นับได้ 5 ตารางใหญ่ของทั้ง 2 ข้างนำค่าเฉลี่ยนั้นมาคูณด้วย 107 จะเป็นจำนวนอสุจิใน 1 มิลลิลิตรของน้ำเชื้อ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนตัวอสุจิต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร} = \frac{N \times D \times 10^3}{V} \text{ ตัว}$$

N = จำนวนอสุจิที่นับได้ใน 5 ช่อง

D = อัตราการเจือจาง

V = ปริมาณน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วนับใน 5 ช่องใหญ่

ดังนั้นจึงสามารถหาค่าความเข้มข้นของการเจือจางน้ำเชื้อ 1 : 1,000 เท่า ดังนี้

พื้นที่ 25 ตาราง = 0.1 x 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

มีปริมาตร (ลึก 0.01 ซม.) = 0.1 x 0.1 x 0.01 มิลลิลิตร

= 1/10,000 มิลลิลิตร

เจือจางน้ำเชื้อ = 1: 1,000 เท่า

น้ำเชื้อ 5/25 ตาราง = 1: 5

ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิที่นับได้ 5 ช่องจาก 25 ช่อง = N

ฉะนั้นความเข้มข้นของอสุจิใน 1 มิลลิลิตร = N x 10,000 x 1,000 x 5 ตัว

= $N \times 10^7$ ตัว

หากทำการเจือจาง 1:1,000 ต้องคูณด้วย 5 จะได้เป็นความเข้มข้นของน้ำเชื้อ/ มิลลิลิตร

5. ร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต เป็นวิธีการที่นิยมและสะดวกคือการย้อมสีเพื่อแยกอสุจิที่มีชีวิต และอสุจิที่ตาย (Lukaszewicz et al, 2008) โดยทำการดูตัวอสุจิที่มีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสี eosin – nigrosin โดย eosin จะไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์อสุจิที่มีชีวิตได้ ส่วนอสุจิที่ตายหรือผนังเซลล์มีความผิดปกติจะติดสีชมพูของ eosin (เทวินทร์, 2553) ในการย้อมสี นอกจากจะใช้ 1 % eosin แล้ว ยังใช้สีพื้นเพื่อให้มองเห็นชัดเจนขึ้น ได้แก่ 2 % aniline blue หรือ 5 % nigrosin เป็นต้น (เทวินทร์, 2553; Chalah and Brillard, 1998)

วิธีการย้อมสี ตัวเป็นตัวตาย แบบ eosin-nigrosin (เทวินทร์, 2553)

1) หยดน้ำเชื้อ 1 หยด ลงในหลอดแก้วที่อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 35°c

2) หยดสีย้อม 10 หยด ลงในหลอดน้ำเชื้อในข้อ 1 และสีที่ใช้ย้อมต้องมีอุณหภูมิเท่ากับน้ำเชื้อเสมอ

3) คนสีย้อมและน้ำเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที

4) หยดส่วนผสมในข้อ 3 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นทำการ smear

5) ทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว โดยอาจใช้ลมเป่า หรือวางสไลด์บน hot plate

6) นับและตรวจดูอสุจิจากหลากหลายบริเวณบนแผ่นสไลด์ นับจำนวนอสุจิโดยแยกตัวอสุจิที่ตายและมีชีวิต รวมทั้งหมด 300 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X)

6. รูปร่างอสุจิ โดยปกตินำ้เชื้อไก่จะมีอสุจิรูปร่างผิดปกติประมาณ 5 % จะไม่มีผลเสียต่อการผสมติด หากน้ำเชื้อมีตัวผิดปกติถึง 20-25 % ก็มีผลทำให้การประเมิน progressive motility ต่ำลงด้วย เนื่องจากอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติจะเคลื่อนที่ไม่ตรง (เทวินทร์, 2553)

7. การนับ ควรตรวจดูอสุจากหลายๆ บริเวณบนสไลด์ นับจำนวนอสุจิทั้งหมด 300 ตัว ใช้กล้องกำลังขยาย 1000เท่า ซึ่งใช้ oil emersion หยดบนสไลด์

7.1 รูปร่างอสุจิ (sperm cell morphology) โดยปกติแล้วน้ำเชื้อจะมีรูปร่างผิดปกติประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ การผสมติดจะไม่กระทบกระเทือน หากตัวอสุจิที่ผิดปกติไม่ถึง 20-25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอสุจิที่ผิดปกตินี้จะเคลื่อนที่ไม่ตรง ดังนั้นการประเมิน progressive จึงเป็นการตรวจอสุจิรูปร่างผิดปกติทางอ้อม การตรวจความผิดปกติของอสุจิมักตรวจเช็คภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา การย้อมสีจะทำให้การตรวจเช็คทำได้ง่ายยิ่งขึ้น และควรใช้กล้องกำลังขยาย 100 เท่า และใช้ oil emersion จะทำให้ตรวจได้ชัดเจนขึ้น

ความผิดปกติของอสุจิอาจแบ่งง่ายได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. Primary abnormalities หรือความผิดปกติปฐมภูมิ โดยอสุจิจะผิปกติตั้งแต่เมื่ออยู่บริเวณอัณฑะซึ่งพบความผิดปกติดังนี้

ความผิดปกติที่หัว ได้แก่

1. หัวกึ่งที่บริเวณต่อกับ midpiece หรือ (pyriform –shaped)
2. หัวกลม (round)
3. หัวยาว (elongated or slender)
4. หัวเล็กกว่าปกติ (microcephalic or small)
5. หัวขนาดโตกว่าปกติ (microcephalic or paint)
6. มี 2 หัว (double or twin)
7. มีอะโครโซมผิดปกติ (abnormalacrosome)

ความผิดปกติที่ midpiece

1. การโค้งงอ (bent)

2. มี 2 หาง (double)

3. บวม (swollen)

4. ตำแหน่งไม่อยู่ที่ศูนย์กลางของหัว (off center atta chment)

ความผิดปกติของหาง

1. หางม้วน (coiled or curled)

2. หาง 2 แฉก (double tail)

2. Secondary abnormalities หรือความผิดปกติแบบทุติยภูมิ เป็นความผิดปกติที่ปรากฏภายหลังผ่าน seminiferous tubule แล้วซึ่งคือความผิดปกติที่เกิดภายนอกก้อนอัณฑะเป็นความผิดปกติที่เกิดในระบบท่อ ความผิดปกติที่เกิดขึ้น ได้แก่

1. หัวขาด (detached heads)

2. มีเม็ดตุ่มที่คอหรือที่หาง (protoplasmic droplet on the neck or tail)

3. หางงอพับ (shock hook tail)

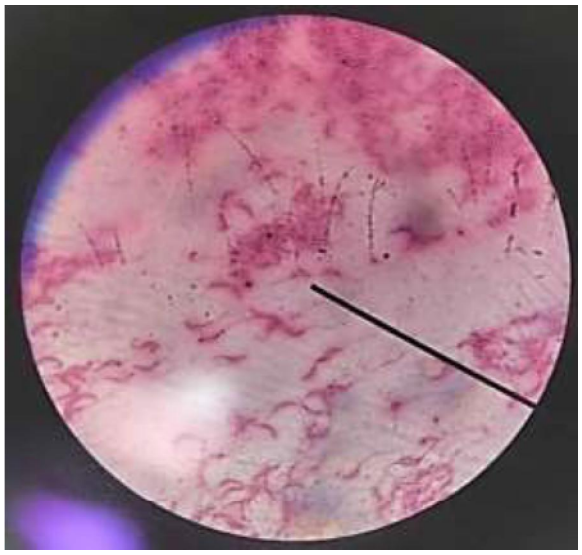
4. สูญเสีย acrosome (loose cap from the head)

อสุจิหัวขาดมักพบในกรณีการได้รับความกระทบกระเทือนของอสุจิในภาชนะภายหลังการรีด ส่วนพวกมีเม็ดตุ่มที่คอหรือหางมักเป็นพวกอสุจิที่อายุน้อย มักพบในกรณีใช้งานพ่อพันธุ์บ่อยครั้งเกินไป ความผิดปกติของอสุจิมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการผสมติด โดยในโคพบว่าหากอสุจิมีความผิดปกติ 10-20 % อัตราการสมติดจะเป็น 66 % หากอสุจิมีความผิดปกติ 20-30 % อัตราการผสมติดจะคิดเป็น 62 % และถ้าหากความผิดปกติ 30-45 % อัตราการผสมติดจะคิดเป็น 61 % ศูนย์ผสมเทียมบางแห่งจะไม่ยอมรับน้ำเชื้อที่มีอสุจิผิดปกติสูงกว่า 25% หรือ พวกที่มี protoplastmic droplets หรือ หัวผิดปกติเกินกว่า 12% นอกจากนี้แล้วในน้ำเชื้อเจือจางหลายวัน หรือน้ำเชื้อแช่แข็งจะพบความเสียหายที่ acrosome ซึ่งจะมีการสูญเอนไซม์ที่จำเป็นในขบวนการปฏิสนธิไป การประเมินรูปร่าง acrosome อาจใช้วิธีการต่อไป

1. ตรวจด้วยกล้อง phase-contrast differential interence contrast (DIC) โดยใช้ได้กับอสุจิที่มีชีวิตลำลังเคลื่อนที่ (สไลด์เปียก) เหมาะที่จะใช้กับสัตว์ที่อสุจิมีอะโครโซมขนาดใหญ่ เช่นหนูตะเภาและหนูแฮมเตอร์ เป็นต้น ส่วนพวกที่อสุจิมีอะโครโซมขนาดเล็ก เช่น กระต่าย สุนัข สุกรและโค ทำได้ลำบากยกเว้นทำให้อสุจิหยุดการเคลื่อนที่

2. ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาภายหลังการย้อมสีอสุจิ ตัวอย่างสีที่ใช้ย้อม ได้แก่ eosin-nigrosin, Giemsa stain, periodic acid-Schiffs reagent, triple stain และ dual stain เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 8.8 และ 8.8

ภาพที่ 8.8 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพจากการเรียนการสอน)
ที่มา : วิชชุดา (2564)



ภาพที่ 8.9 ลักษณะน้ำเชื้อไก่ จากการย้อมสี eosin-nigrosin (ภาพจากการเรียนการสอน)
ที่มา : วิชชุดา (2564)

การประเมินลักษณะอื่นๆ

การตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิ

แม้ว่าวิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อต่างๆ จะเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันอยู่เป็นงานประจำ แต่ก็ยังเป็นตัวชี้วัดถึงความสามารถในการผสมติดได้ดีพอ ห้องปฏิบัติการหลายแห่งได้พัฒนาวิธีการอื่นๆ ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ตัวอย่างเช่น ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอด ความสามารถในการเดินทางและความสามารถในการปฏิสนธิเป็นต้น วิธีการตรวจสอบความสามารถของอสุจิในการปฏิสนธิกับไข่หนูแฮมเตอร์เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมกัน นอกจากวิธีนี้ก็มีวิธี hypo-osmotic swelling test เป็นต้น

วิธีการตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่หนู Hamster (Zona-free hamster ova tast) โดยกระตุ้นการตกไข่ในหนูแฮมเตอร์ แล้วใช้ prypsin กำจัด zona pellucida ของไข่ออก จากนั้นนำอสุจิของสัตว์ที่ต้องการทดสอบมาทำการ capacitation นำไข่หนูลงบ่มในหยดอสุจิขนาด 0.2-0.3 ม.ล. ที่ 37-38 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเซลล์ 5 % CO_2 95 % อากาศ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำไข่มาล้างด้วยน้ำยาเพื่อกำจัดอสุจิตามผิวไข่ จากนั้นฟิกซ์ในส่วนผสมของ ethanol และกรด acetic 2-3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีด้วย acetoplacmoid stain จึงนำไปส่องใต้กล้องกำลังขยาย 400-1,000 เท่า เมื่อตรวจดูอสุจิที่มีลักษณะการบวมของหัว หรือ pronclei ในผนัง vitelus ผลสำเร็จในการปฏิสนธิของอสุจิสัตว์ชนิดต่างๆ กับไข่หนูแฮมเตอร์ แสดงในตารางที่ 8.3

ตารางที่ 8.3 การปฏิสนธิภายนอกร่างกายของอสุจิสัตว์ชนิดต่างๆกับไข่หนูแฮมเตอร์

อสุจิ	ร้อยละการปฏิสนธิ
หนูตะเภา (Guinea pig)	100
หนู Gerbil	8
หนู mouse	100
คน	95
สุกร	36
กระต่าย	63
โค	90

ที่มา : เทวินทร์ (2542)

9. Hypo-osmotic Swelling Test

เป็นวิธีการที่ใช้มากสำหรับประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิคน โดยหยดน้ำเชื้อ 1 หยด ผสมกับน้ำยา ซึ่งประกอบไปด้วย fructose และ sodium citrate ซึ่งมีความดัน

สารละลาย 150 m/osmol 1 หยด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที จากนั้น นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิด phase contrast เมื่อตรวจดูอัตราส่วนของอสุจิที่มีการบวมที่หาง

10. การวัดเมตาบอลิซึม (Metabolic Reaction Rates)

การตรวจวัดความสามารถในการเมตาบอลิซึมของอสุจิในน้ำเชื้อสามารถวัดจากขบวนการ Glycolysis ตลอดจนการหายใจ (Respiration) โดยน้ำเชื้อที่มีอสุจิที่แข็งแรง จะเกิด Glycolysis และอัตราการหายใจสูง ซึ่งสามารถวัดโดยเครื่องมือและอุปกรณ์

11. Methylene blue reduction test

เป็นวิธีการบ่งบอกถึงความสามารถของการเมตาบอลิซึมของอสุจิ โดยหากน้ำเชื้อมีอสุจิ โดยหากน้ำเชื้อมีอสุจิเข้มข้น และอสุจิที่มีความแข็งแรง การใช้ออกซิเจนของอสุจิจะเป็นไปอย่างรวดเร็วกว่า น้ำเชื้อที่อสุจิอ่อนแอ เมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นจะทำให้มี Hydrogen ซึ่งจะไปจับกิน methylene blue (สีน้ำเงิน) (Chloride) ได้ leuco methylene blue ซึ่งไม่มีสี วิธีการดังนี้

1. เตรียมน้ำยา methylene blue โดยเติม methylene blue 50 ม.ก. ในสารละลาย 3.6 % sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7,2H_2O$)

2. เจือจางน้ำเชื้อ 0.2 ม.ล. ในน้ำยา egg-yolk-citrate 0.8 ม.ล. และคนให้เข้ากัน

3. เติมน้ำยา methylene blue ที่เตรียมไว้ลงไป 0.1 ม.ล. คนให้เข้ากัน

4. เท mineral oil ปิดสูงครึ่งนิ้ว

5. นำหลอดน้ำเชื้อที่เจือจางดังกล่าวไปไว้ที่อุณหภูมิ 43-46 องศาเซลเซียส

6. สังเกตการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นเหลือง หากจางหายไปภายใน 3-6 นาทีแสดงว่าน้ำเชื้อมีคุณภาพดี หากนานกว่า 9 นาที ไม่ควรใช้น้ำเชื้อดังกล่าว

12. การวัดคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยวิธีอื่นๆ

1. การสูญเสียเอนไซม์ น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมักพบเอนไซม์บางชนิด ซึ่งสูญเสียจากการบกพร่องของผนังเซลล์อสุจิ ตัวอย่างเช่น glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)

2. ความสามารถในการมีชีวิตรอด (Live ability of sperm cells) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิ 46.5 องศาเซลเซียส ภายใน 60 นาที และ 5 องศาเซลเซียส ภายใน 10 วัน โดยมีค่าสหสัมพันธ์ 0.91

3. เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีโครโมโซมปกติภายหลังการบ่ม น้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อทำการละลายและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. พบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติ จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดซึ่งสูงกว่า

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง มีผลทำให้อสุจิเสื่อมสภาพในด้านต่างๆ ซึ่งในน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่เก็บรักษายาวนานจะเสื่อมสภาพรุนแรงกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลาสั้น ส่วนน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น จะมีระดับความเสียหายที่รุนแรงกว่าน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็น ลักษณะที่ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษา มีดังนี้ คือ

1. การเคลื่อนที่ของอสุจิ

สามารถประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound หรือเครื่อง computer assisted sperm analysis (CASA) และ sperm quality analyzer ซึ่งวัดค่าคุณลักษณะการเคลื่อนที่ได้ละเอียด ในปัจจุบันงานทดลองส่วนใหญ่ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายใต้เครื่อง CASA ซึ่งมีราคาแพง โดยเครื่องที่มีคุณภาพดี มักมีราคาประมาณ 3-4 ล้านบาท ซึ่งหน่วยงานที่มีงบประมาณจำกัด ไม่สามารถสามารถเข้าถึงเครื่องดังกล่าวได้ อาจใช้ทางเลือกโดยการขอความอนุเคราะห์แต่อาจมีความสะดวกในระดับที่แตกต่างกันไป ในคู่มือการใช้งานต้องเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 25 ล้าน/มล. ซึ่งมีผลให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ต่ำลง ค่าการเคลื่อนที่ ที่ได้จากการอ่านของเครื่อง CASA ต่ำกว่าค่าสังเกตจากกล้องแบบ compound และบางตัวอย่างที่อสุจิเคลื่อนที่เร็วมาก เครื่องจะอ่านไม่ออกจนกว่าจะเคลื่อนที่ช้าลงจนถึงระดับหนึ่ง

2. สเปอร์มโมบิลิตี้

การประเมินร้อยละของอสุจิมีชีวิต โดยวิธีการย้อมสี (staining techniques) เป็นวิธีที่สะดวก สีที่นิยมใช้คือ eosin 1 กรัม และ nigrosin 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมซิเตรท ร้อยละ 2.9 ปริมาตร 100 ม.ล. หรือน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ eosin จะซึมเข้าสู่เซลล์ที่ตายแล้วหรือเยื่อหุ้มเซลล์ที่บกพร่อง ส่วนสี nigrosin จะมีบทบาทเป็นสีพื้น ทำให้สามารถแยกตัวอสุจิที่ติดสี อสุจิไม่มีชีวิต หรือเสมือนไม่มีชีวิต ด้วยอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี เป่าสไลด์ที่ทำการสเมียร์ให้แห้ง การประเมินร้อยละของอสุจิมีชีวิตนี้ ควรให้กำลังขยาย 100X และหยด oil immersion ภายหลังการสเมียร์น้ำเชื้อ

3. การประเมินร้อยละของอสุจิมีชีวิต

อาจใช้วิธีการย้อมสี eosin-nigrosin ซึ่งมีราคาถูก ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound มีรายงานการย้อมสีดังกล่าวในการประเมินร้อยละของอสุจิมีชีวิตในวารสารที่ตีพิมพ์ระดับนานาชาติเช่นกัน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันงานวิจัยจำนวนมาก ประเมินการรอดชีวิต ของอสุจิด้วยสี SYBR – 14 และ propidium iodide (PI) ซึ่งต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ในการตรวจ โดยอสุจิมีชีวิตจะมีสีเขียว จากการติดสี SYBR – 14 ซึ่งซึมเข้าเซลล์ ติดสี nucleic acid ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีแดงจากสี PI ซึ่งสีนี้ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นปกติได้

4. การประเมินร้อยละของอสุจิที่มีอะโครโซมปกติ

ถุงอะโครโซมที่บริเวณปลายหัวของอสุจิ มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิ ซึ่งเยื่อหุ้มถุงอะโครโซมมักเสื่อมสลายไปกับกระบวนการเก็บรักษาทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่งแข็ง สามารถประเมินคุณภาพของอะโครโซมได้ โดยใช้สี fluorescein isothiocyanate – conjugated peanut agglutinin (FITC - PNA) แต่เนื่องจากรูปร่างของอสุจิสัตว์ปีกมีลักษณะคล้ายไส้เดือน หรือเรียวเล็ก จึงทำให้การประเมินอะโครโซมมีความลำบาก แตกต่างจากอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

5. การประเมินร้อยละของอสุจิที่ไมโทคอนเดรียยังทำหน้าที่ปกติ

สามารถประเมินจากการย้อมด้วยสี rhodomine (R123) และ 5,5', 6,6'- tetrachloro-1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolyl – conbocyanineiodide (JC - 1) โดยการย้อมด้วยสี JC – 1 นี้ ระดับของการติดสีที่บริเวณ ไมโทคอนเดรียเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือสีส้ม แสดงถึง ไมโทคอนเดรียยังทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ สีส้มเขียว ถือว่าเป็นระดับปานกลาง และสีเขียว หมายถึง ไมโทคอนเดรียทำหน้าที่ได้น้อย

6. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยศึกษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอื่นๆ ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพของอสุจิได้อย่างครบถ้วนในปัจจุบันสามารถทำได้โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) เช่น สี fluorescent isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC - PNA), propidium iodide (PI), rhodomine (R123) และ 5,5', 6,6'- tetrachloro-1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolyl – conbocyanineiodide (JC - 1) สามารถทำการย้อมได้พร้อมกันหลายๆสี และนำไปประเมินคุณภาพอสุจิที่ย้อมติดสีโดยใช้การวิเคราะห์เซลล์ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ ซึ่งมีระบบกำเนิดแสง ประกอบด้วย 3 เลเซอร์ ได้แก่ ลำแสงสีน้ำเงิน ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร ลำแสงสีแดงความยาวคลื่น 633 นาโนเมตร และลำแสงสีม่วง ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ลงสู่เซลล์ แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์และไหลผ่านเครื่อง เทคนิคนี้มีความไวสูง สามารถวัดเซลล์ได้จำนวนมากพร้อมกับคัดแยกได้ในความเร็วสูง และมีการแยกความเข้มของแสงหรือขนาดของเซลล์ได้อย่างแม่นยำ

7. การประเมินระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น

เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง จึงไวต่อการเกิดลิปิดเปอร์ออก-ซิเดชั่น (lipid peroxidation) เมื่อลดความเย็นและระหว่างการแช่แข็ง มีการผลิต reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ไมโตคอนเดรีย และ DNA เซลล์เกิดความเสียหาย การตรวจวัดสภาวะดังกล่าวดำเนินการโดยตรวจหา malondialdehyde (MDA) ซึ่งสัมพันธ์กับความเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์

8. การประเมินความสามารถของอสุจิในการชำแรกผ่านเยื่อหุ้มไข่

เยื่อหุ้มไข่ (inner perivitelline layer; IPL) เป็นเยื่อที่หุ้มห่อไข่ (yolk) พบเมื่อตอนตกไข่ เป็นเยื่อซึ่งอสุจิต้องชำแรกผ่าน ทำให้เกิดช่องเพื่อไปยัง germinal disc และทำการปฏิสนธิ โดยอสุจิจะทาบกับเยื่อหุ้มไข่จากนั้นจะมีการหลั่งเอนไซม์อะโครซิน (trypsin – like enzyme) ซึ่งจะสลายเยื่อหุ้มไข่ เป็นช่องทางให้อสุจิชำแรกเข้าไปภายใน การประเมินความสามารถของอสุจิในการชำแรกเจาะเยื่อหุ้มไข่นี้ จะนับจำนวนรูที่ปรากฏที่เยื่อหุ้มไข่บริเวณ germinal disc นี้ มากน้อยต่างกันไป เสมือนว่าเกิด polyspermy แต่แท้จริงแล้วในธรรมชาติมีอสุจิเพียง 1 ตัว เท่านั้นที่เข้าไปปฏิสนธิ ส่วนที่เหลือจะสลายไป ในงานวิจัย พบอสุจิที่ติดอยู่ระหว่างเยื่อชั้นนอกและชั้นในของเยื่อหุ้มไข่ จำนวนอสุจิที่พบดังกล่าวนี้ บ่งชี้ถึงจำนวนอสุจิที่สามารถเดินทางไปถึงท่อกักเก็บอสุจิ

9. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าต่างๆ ที่ได้จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในห้องปฏิบัติการกับอัตราการผสมติด

ประเด็นต่างๆ ที่นำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เป็นที่ยอมรับว่ามีความสัมพันธ์กับการผสมติดของน้ำเชื้อเมื่อนำไปผสมเทียมในระดับหนึ่ง ในไก่ค่าร้อยละของอสุจิมีชีวิตที่มีรูปร่างปกติของน้ำเชื้อมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดในน้ำเชื้อสด สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น คุณสมบัติด้านความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane fluidity) มีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดสูงสุด รองลงมาคือ ร้อนละของอสุจิมีชีวิตที่มีรูปร่างปกติ ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า และร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ ตามลำดับ (เทวินทร์, 2559)

ในธรรมชาติการผสมพันธุ์ของสัตว์ปีกเกิดขึ้นภายใต้ความเหมาะสมของสภาวะแวดล้อมภายนอกตัวสัตว์และปัจจัยตัวสัตว์ และปัจจัยภายในตัวสัตว์เอง อันได้แก่ ปัจจัยทางสรีรวิทยานำไปสู่ความสมบูรณ์พร้อมทางการสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ มีสื่อสัญญาณทางธรรมชาติโน้มนำสู่กิจกรรมการสืบพันธุ์ พ่อพันธุ์ส่งมอบน้ำเชื้อ อสุจิและน้ำกามเข้าสู่ช่องคลอดของแม่พันธุ์ที่อยู่ในสภาวะพร้อมทางการสืบพันธุ์ โดยบริเวณส่วนต่อระหว่างช่องคลอดและมดลูก (utero – vaginal junction) จะมีภารกิจทางธรรมชาติในการคัดกรองอสุจิ และเกื้อกูลการดำรงชีพของอสุจิในท่อกักเก็บ (sperm storage tubes; SST) ให้ยาวนาน ในไก่งวงพบว่าอสุจิสามารถมีชีวิตและปฏิสนธิได้ยาวนานถึง 16 สัปดาห์ นับเป็นสิ่งน่าอัศจรรย์ทางธรรมชาติ ที่มนุษย์ยังไม่อาจจำลองสภาพให้ทัดเทียมธรรมชาติในขั้นตอนของเทคโนโลยีการผสมเทียม ซึ่งเป็นเทคโนโลยีช่วยธรรมชาติ ที่ทำให้มีการใช้ประโยชน์จากพ่อพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพนั้น คือ การเก็บน้ำเชื้อไว้นอกตัวพ่อพันธุ์ให้ได้ยาวนานที่สุด โดยที่ยังมีคุณภาพดี สามารถใช้กับเทคโนโลยีการผสมเทียมได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อน้ำเชื้อหลั่งสู่ภายนอกตัวสัตว์ (In vitro) อสุจิจะเข้าสภาวะเสื่อมสภาพโดยทันที ด้วยปัจจัยคุกคามต่างๆ จึงได้มีการคิดค้นน้ำยาเจือจาง (extender หรือ diluents หรือ dilutor) เพื่อชะลอสภาวะการเสื่อมสภาพ ทั้งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่เย็น และสภาวะแบบแช่แข็ง

องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำยาเจือจาง (เทวินทร์, 2559)

น้ำเชื้อที่รีดเก็บมาจากพ่อพันธุ์สัตว์ปีก จะมีการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วในไก่ น้ำเชื้อที่ไม่เจือจางจะมีสภาพเสื่อม ภายหลังการรีดประมาณ 20 นาที หากต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนานกว่า 1 ชม. จึงต้องเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง ดังนั้นการยืดอายุน้ำเชื้อให้มีความยาวนาน จำเป็นจะต้องเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่สังเคราะห์ขึ้น โดยอาศัยความรู้พื้นฐานที่ได้จากองค์ประกอบของน้ำเลี้ยงเชื้อของสัตว์ปีก องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำยาเจือจาง มีดังนี้

1. การเป็นแหล่งพลังงาน

อสุจิต้องการพลังงานเพื่อดำรงชีพและการเคลื่อนที่ โดยอาศัยการเคลื่อนไหวของส่วนหาง การสร้างพลังงานของอสุจิ ผ่านวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathways) โดยกิจกรรมนี้เกิดขึ้นที่ไมโตคอนเดรียลชีท (mitochondrial sheath) บริเวณหางส่วนฟรุคโตส และกลูโคส เป็นแหล่งพลังงานที่นิยมใช้องค์ประกอบของน้ำยาเจือจางสัตว์ปีก ส่วนกลูตาเมทนับเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำเชื้อสัตว์ปีก มีรายงานว่าอสุจิ สัตว์ปีกสามารถใช้กรดกลูตามิคได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่ถือว่าสารนี้เป็นแหล่งพลังงานในน้ำเชื้อไก่และไก่งวง แต่เป็นแหล่งของสารที่ให้ประจุบวกในน้ำเชื้อและมีในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อของสัตว์ปีกแทบทุกสูตร นอกจากนี้พบ acetylcarnitine (ซึ่งเป็นผลผลิตจากคาร์นิทีน) ในน้ำกามของไก่ ซึ่งอาจมีอิทธิพลต่อการเมตาบอลิซึมของอสุจิ เมื่อไม่นานนี้ รายงานว่าการเสริม L – carnitine ในยาเจือจางน้ำเชื้อไก่มี ผลดีต่อการเคลื่อนที่ การรอดชีวิต และการดำรงรูปร่างปกติของอสุจิ

2. การควบคุมระดับ pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

โดยทั่วไปแล้วน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะมี pH อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงกว้าง อาจจะส่งผลเสียต่อการรอดชีวิตและอัตราการผสมติดของอสุจิ อสุจิของไก่และไก่งวงสามารถทนต่อ pH ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 ได้ ในน้ำเชื้อไก่อัตราการรอดชีวิตและร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ในน้ำยาเจือจางจะมีอัตราที่สูง เมื่อมี pH ในช่วง 6.8 – 7.1 หากเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °C แต่ค่าดังกล่าวจะลดต่ำลงหากระดับ pH ต่ำกว่า 5.8 หรือสูงกว่า 7.4 สำหรับไก่งวงน้ำยาเจือจางที่ pH 6.5 และความดันสารละลายของน้ำยาเจือจางที่ 355 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม (mOsm/kg) ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษา สำหรับในไก่ค่า pH ควรจะต่ำว่า 7 หากความดันสารละลายของน้ำยาเจือจางมีค่าสูงกว่า 280 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม (mOsm/kg) สารเคมีใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางเพื่อควบคุม pH มักเป็นกลุ่มฟอสเฟต ซิเตรทและสารอินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง (zwitterionic molecule) ตัวอย่างเช่น BES [N,N – bis (2 – hydroxyethyl) - 2 – aminoethane sulfonic acid] และ TES [N – Tris hydroxymethyl)methyl - 2 – aminoethane sulfonic acid] เนื่องจากอสุจิของสัตว์ปีกไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วง

กว้าง ดังนั้น จึงควรเลือกใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติควบคุมระดับ pH ในช่วงแคบเป็นองค์ประกอบของน้ำยา

3. ความดันออสโมซิสที่เหมาะสม

ความดันออสโมซิส (osmotic pressure) ขึ้นกับจำนวนอนุภาคของตัวถูกละลายในสารละลายมีหน่วยวัดเป็น ออสโมล/กิโลกรัม ตัวทำละลาย หรือออสโมล/กิโลกรัม ตัวทำละลายเป็นการวัดจำนวนอนุภาคที่แตกตัวของสารที่มีในของเหลว หากอสุจิอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีจำนวนอนุภาคต่ำ หรือมีความดันสารละลายต่ำกว่าน้ำเลือดของสัตว์นั้นๆ (hypotomic soluton) น้ำจะไหลเข้าเซลล์เพื่อปรับสมดุล แต่หากอสุจอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความดันสารละลายสูง (hypotomic soluton) น้ำก็จะไหลออกจากเซลล์การอยู่ภายใต้ความดันสารละลายที่ไม่เหมาะสมในระดับที่ไม่สามารถต่อต้านได้ จะพบปรากฏการณ์ช็อคจากความดันสารละลาย โดยอสุจิจะมีลักษณะงอที่ส่วนคอ

4. ออกซิเจน

ในบรรดาสัตว์ปีก อสุจิไก่งวงเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) จึงได้มีการศึกษาหาวิธีที่จะให้ออกซิเจนแก่น้ำเชื้อไก่งวง ในขณะที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่เย็น ในเวลาต่อมาพบว่าการเสริม perfluorochemicals (PFC) ในน้ำยาเจือจางสามารถเพิ่มออกซิเจนให้น้ำยาเจือจางได้ ซึ่งเมื่อให้เจือจางน้ำเชื้อไก่งวงแล้ว พบว่าสามารถยืดอายุความสามารถในการผสมติดได้ยาวนานขึ้นเสมือนวิธีการเดิมที่ใช้วิธีเขย่าน้ำเชื้อเจือจางอย่างต่อเนื่องในอ่างควบคุมอุณหภูมิสำหรับอสุจิของสัตว์ปีกชนิดอื่น เช่น ไก่ เมตาบอลิซึมเกิดได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ส่วนเป็ดและห่าน จากหลักฐานทางชีวเคมีบ่งชี้ว่า เมตาบอลิซึมเกิดขึ้นได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน

5. น้ำบริสุทธิ์

น้ำยาเจือจางจะต้องไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ตลอดจนแคลเซียม ซึ่งจะไปมีผลต่อการสูญเสียสภาพของอะโครโซม ทำให้มีอัตราการผสมติดต่ำ รายงานว่าในขณะที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่ 5 °C แคลเซียมจะไหลเข้าเซลล์ในปริมาณมาก การลดพิษของโลหะหนักและแคลเซียมอาจทำได้โดยการเติม ethylene diamine tetra – acetic acid (EDTA) รายงานว่าการนำ ultrapure เป็นองค์ประกอบของน้ำยาเจือจาง มีผลดีต่ออัตราการผสมติดสูงกว่าน้ำกลั่น อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากการใช้น้ำบริสุทธิ์แล้ว การใช้สารเคมีที่บริสุทธิ์เป็นสิ่งที่จำเป็นในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

6. ยาปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเชื้อมักมาจากบริเวณก้นของไก่ จึงมักมีการเสริมยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ในน้ำยาเจือจางยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ระดับ ขนาดที่สามารถควบคุมแบคทีเรียได้นั้นอีก

ด้านหนึ่งก็เป็นพิษต่ออสุจิสัตว์ปีกเช่นเดียวกัน แต่ก็มียาปฏิชีวนะหลายชนิดที่มีผลควบคุมแบคทีเรียและไม่มีผลเสียต่ออสุจิ เช่น neomycin เป็นต้น

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น

การผสมเทียมในสัตว์ปีก สามารถดำเนินการได้โดยฉีดน้ำเชื้อที่รีดมาในปริมาตรที่เหมาะสมเข้าช่องคลอดตัวเมียโดยไม่ต้องเจือจาง ซึ่งควรดำเนินการโดยทันที ภายหลังการรีด หรือหากเจือจางด้วยน้ำยาที่มีความดันสารละลายเท่ากับน้ำเชื้อ (isotonic) ตัวอย่างเช่น น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.9 %) เป็นต้น ควรใช้ผสมเทียมภายในเวลา 30–60 นาที ภายหลังการรีด เนื่องจากไม่มีคุณสมบัติที่สามารถเกื้อกูลการดำรงชีพของอสุจิให้ยาวนานได้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น เป็นการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ โดยนำน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง ในอัตราเจือจางที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มศักยภาพในการใช้ประโยชน์น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ให้มากกว่าธรรมชาติ หรือเพิ่มจำนวนโด๊ส (dose) ของการผสม จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายของสัตว์ เพื่อลดกระบวนการเมตาบอลิซึมของอสุจิ อุณหภูมิที่เก็บรักษาส่วนใหญ่ คือ 5 – 15 องศาเซลเซียส โดยในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงน้ำยาเจือจางที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ

น้ำยาเจือจางใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจึงมีองค์ประกอบที่ค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งจำลองสูตรให้ใกล้เคียงกับองค์ประกอบน้ำเชื้อสัตว์ปีกตามธรรมชาติ มีการดัดแปลงแตกต่างกันไปจึงมีสูตรน้ำยาที่ใช้กันในปัจจุบันจำนวนมากทั้งที่เปิดเผยองค์ประกอบและสูตรการค้าที่สงวนข้อมูลองค์ประกอบ แต่มักมีกรดกลูตามิคเป็นองค์ประกอบที่สำคัญคุณสมบัติของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในสัตว์ปีก

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่ที่อุณหภูมิประมาณ 4–5 องศาเซลเซียส สูตรน้ำยาที่นิยมใช้แสดงในตารางที่ 8.4 ส่วนน้ำยาเจือจางเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่งเย็นในนกกระจอกเทศ นกกระทา และไก่ต๊อก เนื่องจากในสัตว์ปีกกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มนกที่นำมาเลี้ยงยังไม่นาน การพัฒนาองค์ความรู้ด้านการผสมเทียม ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น ส่วนใหญ่แล้วเป็นน้ำยาเจือจางที่มีการใช้ในไก่ ไก่งวง และห่าน ดังนี้ คือ

น้ำยาเจือจางที่ใช้ในนกกระจอกเทศ ได้แก่ EK, Lake

น้ำยาเจือจางที่ใช้ในนกอีมู ได้แก่ BPSE, Lake

น้ำยาเจือจางที่ใช้ในนกกระทา ได้แก่ Lake

นอกจากน้ำยาสูตรดังกล่าว ยังมีการใช้น้ำยา minimum essential (MEM) แต่โดยภาพรวมคุณภาพน้ำเชื้อยังไม่ดีนักโดยเฉพาะในนกอีมูและนกกระทา

มีข้อสังเกตว่าการเสริมสิ่งคัดหลั่งที่มีลักษณะโฟม จาก foam gland ของนกกระทา ในน้ำเชื้อนกกระทาเจือจาง มีผลดีต่อการรอดชีวิตของอสุจิ

ตารางที่ 8.4 องค์ประกอบของสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อของไก่

องค์ประกอบ (กรัม/100 มล.)	สูตร					
	Lake[1/]	EK[2/]	Tselutin[3/]	BPSE[4/]	C-2[5/]	IGGKPH[6/]
Potassium acetate			0.05			
Magnesium acetate	0.08					
chloride Magnesium				0.034		
Sodium acetate	0.51			0.43	1.00	
Potassium citrate H_2O	0.128	0.14		0.064		0.14
Sodium glutamate	1.35	1.40	1.92	0.867		1.40
Dipotassium Hydrogen				1.27		
Phosphate $3H_2O$				0.065		
Potassium dihydrogen phosphate						
Sodium Hydrogen phosphate	0.98				0.15	0.98
Sodium bicarbonate					0.15	
TES				0.195		
Protamine sulfate		0.02	0.32			

ตารางที่ 8.4 องค์ประกอบของสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อของไก่ (ต่อ)

องค์ประกอบ (กรัม/100 มล.)	สูตร					
	Lake[1/]	EK[2/]	Tselutin[3/]	BPSE[4/]	C-2[5/]	IGGKPH[6/]
Polyvinyl pyrrolidone		0.1	0.3			
Glucose	0.8	0.7			1.0	0.9
Fructose		0.2	0.8	0.5		
Inositol		0.7				0.9
Sucrose					4.0	
Raffinose						
Glacal acetic acid (mL.)					0.02	
pH	7.2	7.3	7.05	7.5		6.95
Osmotic pressure (mOsm/kg)	310	390	320	310		380

ที่มา : เทวินทร์ (2559)

สารต้านอนุมูลอิสระ

บทบาทและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ มีดังนี้

ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD)

ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) นับเป็นอนุมูลอิสระหลักที่เป็นผลผลิตจากเซลล์ และ superoxide dismutase เป็นสารต่อต้านอนุมูลขั้นที่ 1 ในการปกป้องเซลล์โดยมีสมการการทำงานคือ

$$O_2 + O_2 + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

เอนไซม์ superoxide dismutase ที่มีในน้ำกามของสัตว์ปีก ประกอบด้วย 3 รูปแบบ คือ

1. Mn – SOD เป็นรูปแบบที่พบในไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ คาดว่า Mn – SOD มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาพออกซิเจน และปรับตัวต้านทานพิษของอนุมูลอิสระที่มาจากออกซิเจน (oxygen radical mediated toxicity)

2. Cu, Zn – SOD เป็นรูปแบบที่พบในเซลล์ (cytosol)

3. เป็นรูปแบบที่พบภายนอกเซลล์ (extra – cellular SOD) เป็นรูปแบบที่ CU^{2+} และ ZN^{2+} จับกับไกลโคโปรตีน พบในพื้นที่ระหว่างเนื้อเยื่อและของเหลวภายนอกเซลล์

บทบาทของ superoxide dismutase ในสัตว์ปีกจะต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่น จากข้อมูลของสัตว์ปีก 5 ชนิด ได้พบเอนไซม์นี้ ในน้ำเลี้ยงอสุจิเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ ไก้ต๊อก ไก่ ห่าน เป็ด และไก่งวง และรูปแบบของซูเปอร์ออกไซด์ ที่พบในสัตว์ปีกแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน

ซีลีเนียม และกลูต้าไธโอนเปอร์ออซิเดส (GSH – Px)

บทบาทของซีลีเนียมต่อการสืบพันธุ์ มีการศึกษากันมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศผู้ โดยมีความสำคัญต่อคุณภาพของอสุจิโดยเฉพาะการมีรูปร่างปกติ ตลอดจนการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ระดับของซีลีเนียมในน้ำเชื้อของสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป และที่พบมีหลายรูปแบบ ตัวอย่างเช่น ซิลีโนซีสเตอีน (selenocysteine) พบมากในอสุจิของหนู ซิลีโนซีสเตอีนและซิลีโนเมทไธโอนีน (selenomethionine) พบมากในอสุจิของแกะ เป็นต้น

กลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GSH - Px) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม ซิลีโนโปรตีน โดยกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส นี้ แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส
2. ฟอสโฟลิปิด ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ กลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (PH – GSH - Px)
3. พลาสมา กลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (PI – GSH – Px)
4. แกสโตรอินเตอตินอล กลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GI – GSH - Px)

เอนไซด์เหล่านี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันไป และถูกควบคุมโดยยีนที่แตกต่างกัน ทั้งนี้บทบาทโดยภาพรวมของเอนไซม์เหล่านี้คือ กำจัดและลดพิษ โฮโดรเจน เปฮร์ออกไซด์ และลิพิด ไฮโดสเปอร์ – ออกไซด์ ดังแผนปฏิกิริยาดังนี้

$$H_2O_2 + GSH – Px \longrightarrow H_2O$$

$$ROOH – GSH – Px \longrightarrow ROH$$

SOD จะเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ ให้อยู่ในรูป H_2O_2 ซึ่งมีความเป็นพิษต้องกำจัดออกจากเซลล์ แต่ในกรณีที่ระดับการทำงาน GSH – Px ต่ำ และมี trasition metals (F^{2+} และ Cu^{2+}) H_2O_2 นี้ สามารถย้อนกลับไปเป็นอนุมูลอิสระที่มีพลานุภาพสูงได้เป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ดังสมการ

$$H_2O_2 + Fe2^{+} \longrightarrow OH^{*} + OH + Fe3^{+}$$

อนุมูลอิสระไอดรอกซิลนี้ เป็นอนุมูลอิสระทางชีววิทยาที่มีการทำลายสูงต่อโมเลกุลต่างๆ ซึ่งเป็นลิพิด โปรตีน DNA และคาร์โบไฮเดรท ดังนั้นการป้องกันไม่ให้มีปฏิกิริยาย้อนกลับในการเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ดังตัวอย่างเช่น OH ซึ่งกระทบต่อการอยู่รอดของอสุจิเป็นสิ่งที่สำคัญ

โดยตัวเซลล์เองไม่มีความสามารถที่จะซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้ได้ดั้งนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นกุญแจสำคัญในการปกป้องเซลล์เพื่อคงความสามารถในการปฏิสนธิได้ของอสุจิสัตว์ปีก

วิตามินอี

วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาต่ออนุมูลอิสระตามแผนผังคือ

วิตามินอี + R – OO* ⟶ วิตามินอี + ROOH

จากการที่วิตามินอีอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เป็นส่วนเชื่อมระหว่างน้ำและพิลิด วิตามินอีจึงมีประสิทธิภาพในการนำอนุมูลอิสระออกจากเซลล์ จากรายงานของหลายการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิตามินอีสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้อีก (recycle) โดยการทำหน้าที่ทั้งทางตรงและทางอ้อม อย่างไรก็ตามอัตราการคืนสภาพกลับมาทำหน้าที่ของวิตามินอีที่อยู่ในรูปสารต้านอนุมูลอิสระนั้นความคงทนของสภาวะทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องมีบทบาทที่สำคัญ แต่จะมีสัดส่วนการกลับมาที่ลดลง จึงทำให้ร่างกายต้องการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร (เช่น วิตามินอี และ แคโรทินอยด์) หรือสังเคราะห์ขึ้นใช้ภายในเนื้อเยื่อ (เช่น แอสคอร์บิค และกลูต้าไธโอน) ซึ่งในสัตว์ปีกวิตามินอีส่วนใหญ่พบอยู่ในอสุจิมากกว่าอยู่ในน้ำกาม ตัวอย่างเช่น ในไก่พบในตัวอสุจิถึง 88 % ของวิตามินอีที่พบในน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามวิตามินอีที่พบในน้ำเชื้อสัตว์ปีก มีปริมาณที่ต่ำกว่าที่พบในน้ำเชื้อสัตว์ลูกด้วยนม ดังนั้นในสัตว์ปีกการเพิ่มสูงขึ้นของวิตามินอีในอสุจิและไก่งวงจึงมีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด เช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid)

กรดแอสคอร์บิค เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ในน้ำ ซึ่งพบในปริมาณที่สูงในทั้งอสุจิ และน้ำเลี้ยงอสุจิของสัตว์สำหรับสัตว์ปีกกรดแอสคอร์บิคทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเลี้ยงอสุจิ ซึ่งมีการศึกษาในหลากหลายประเทศและหลากหลายสัตว์ทดลอง ดังนี้

Yousef et al. (2003) ทำการศึกษาผลของการเสริมวิตามินซี และวิตามินอี และการรวมกันของทั้ง 2 วิตามินในน้ำดื่ม เพื่อหาคุณภาพของตัวอสุจิ, lipid peroxidation (LPO) และเอนไซม์น้ำเชื้อพลาสมาของกระต่ายเพศผู้ นิวซีแลนด์ขาว กระต่ายอายุ 5 เดือนได้รับน้ำดื่มเสริมวิตามินซี 1.5 กรัมต่อลิตร วิตามินอี 1.0 กรัมต่อลิตร และวิตามินซี + วิตามินอี (1.5+1.0 g/ l) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำให้การเพิ่มของน้ำหนักตัวไม่ได้รับผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้มข้นของ thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) ลดลงในน้ำเชื้อของกลุ่มที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้มข้น จำนวนอสุจิทั้งหมด ดัชนีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ทั้งหมด ปริมาณตัวอสุจิ ความเข้มข้นไฮโดรเจนไอออนเริ่มต้น (pH) และความเข้มข้นฟรุกโตสเริ่มต้น ตัวที่ผิดปกติและสเปิร์มที่ตายแล้วลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

วิชชุดา (2563) ทำการศึกษาเรื่องผลของการเสริมกรดแอสคอร์บิคในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาต่างๆ การศึกษาผลของการเสริมกรดแอสคอร์บิคในน้ำยาเจือจาง ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสดและแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) โดยทดสอบถึงระดับที่เหมาะสมในการเสริมกรดแอสคอร์บิคต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด และแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) ด้วยการเสริมกรดแอสคอร์บิคในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM. ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm diluents หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อสดและแบบเหลวที่เจือจางแล้ว ที่ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบหมู่ เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่เคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต ผลการทดลองพบว่า การเสริมกรดแอสคอร์บิคแต่ละระดับ ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ในคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต และความเข้มข้นของตัวอสุจิ และการเสริมกรดแอสคอร์บิคในระดับที่แตกต่างกันในคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการเสริม ascorbic acid 30 mM. ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิดีที่สุด (3.12±1.41) รองลงมาคือการเสริม ascorbic acid 20, 10 และ 0 mM. ตามลำดับ (2.75±2.36, 2.75±2.62 และ 2.25±1.15 ตามลำดับ) แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Andrzej and Konrad (1995) ทำการศึกษาคุณภาพอสุจิและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกในน้ำอสุจิปลาเรนโบว์เทราท์โดยการเสริมวิตามินซีในอาหาร: การศึกษาข้ามฤดู มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับวิตามินซีในอาหารและระดับกรดแอสคอร์บิกในเซมินัลพลาสมาและความเข้มข้นของวิตามินซีในเลือดและคุณภาพของตัวอสุจิปลาเรนโบว์เทราท์ ปริมาณความเข้มข้นของวิตามินซีในพลาสมาน้ำเชื้อและความเข้มข้นของสเปิร์มการเคลื่อนไหวและน้ำหนัก กรดแอสคอร์บิคในน้ำเชื้อในพลาสมา ความเข้มข้นได้รับผลกระทบโดยตรงจากระดับวิตามินซีในอาหาร ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคในน้ำเชื้อและพลาสมาก็ได้รับผลกระทบจากฤดูกาล

Khana et al. (2012) ทำการศึกษาผลของวิตามินโปรไบโอติกและโปรตีนต่อลักษณะน้ำอสุจิของพ่อพันธุ์ไก่เนื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเปรียบเทียบของวิตามินอีและซี โปรไบโอติก ที่ต่ำกว่าระดับโปรตีนปกติและการรวมกันของการรักษาเหล่านี้ในไก่เนื้อเพศผู้ เสริมซิงค์ออกไซด์ในอาหารในอัตรา 3,000 ม.ก. / กก.ของอาหาร และการเสริม วิตามินอี (100 IU / กก.อาหาร:) วิตามินซี (500 IU / kg), โปรไบโอติก (50 mg / L ของน้ำ) ลดระดับโปรตีนในอาหาร (14%) ผลการวิจัยพบว่าการเสริมวิตามินซีและอี ทำให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิและความอุดมสมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มที่เสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียว

Ping-Chi Hsu et. al. (1998) ศึกษาผลของวิตามินอีและซี ต่อออกซิเจนชนิดที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาตะกั่วที่เป็นพิษในตัวอสุจิหนู การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบว่าการเสริมด้วยวิตามินอี (VE) และหรือวิตามินซี (VC) ปกป้องสเปิร์มของหนูโดยการยับยั้งการสร้างออกซิเจนชนิดปฏิกิริยาที่เกิดพิษจากการสัมผัสตะกั่ว พบว่าความสามารถของตัวอสุจิต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจะทำให้เกิดการสร้าง ROS สูงขึ้น และลดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลง

กลูต้าไธโอน (Gutathione)

กลูต้าไธโอนที่ไม่ใช่โปรตีน พบมากที่สุดในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กลูต้าไธโอนที่อยู่ในเซลล์มีบทบาทเกี่ยวข้องในขั้นตอนต่างๆ ภายในเซลล์ เช่นการสังเคราะห์ DNA และโปรตีน การเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ การควบคุมการเสื่อมสลายของเซลล์ การควบคุมภูมิคุ้มกัน การขนส่งกรดอะมิโน xenibiotic metabolism และ redox – sensitive signal transduction นอกจากนี้กลูต้าไธโอนยังทำปฏิกิริยาโดยตรงต่อ H_2O_2 superoxide anion, อนุมูลอิสระ, hydroxyl และ alkoxyl และ hydroperoxides ได้ ดังนั้นกลูต้าไธโอนจึงทำหน้าที่จำกัดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะต่อต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม hydroxyl ซึ่งยังคงสภาพอยู่ในที่ที่มีเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยลดระดับความเข้มข้นของกลูต้าไธโอนในเนื้อเยื่อ จะเกิดการเพิ่มสูงขึ้นของลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น ความเข้มข้นของกลูต้าไธโฮนในน้ำเชื้อมีปริมาณ 83.7 $\pm$ 9.12 ไมโครเมตรหรือประมาณ 2.34 นาโนโมล/10^8 เซลล์ กลูต้าไธโอนมีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ และเมตาบอลิซึมของอสุจิ ตลอดจนป้องกันการเกิดอะโครโซมรีแอคชั่นในอสุจิมนุษย์ จากงานวิจัยของวิชชุดา และคณะ (2563) ทำการศึกษาเรื่องผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (กลูต้าไธโอน) ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลวและอัตราการผสมติดของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง ที่ได้รับการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (กลูต้าไธโอน) ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง กลุ่มการทดลอง มีจำนวน 4 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มที่ทำการเสริมกลูต้าไธโอนในน้ำยาเจือจางระดับ 0, 1, 2 และ 3 mM. ตามลำดับ แต่ละกลุ่มการทดลองทำ 4 ซ้ำ นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New multiple range test (DMRT) ผลการทดลองที่ 1 พบว่าการเสริมกลูต้าไธโอน ที่ระดับ 0, 1, 2 และ 3 mM. ในน้ำยาเจือจาง ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลูต้าไธโอน ที่ระดับ 1, 2 และ 3 mM. ในน้ำยาเจือจาง ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เท่ากับ 84.99±1.35, 83.74±1.59 และ 83.33±2.35 (ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (80.83±1.66) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า พบว่า กลูต้าไธโอนที่ระดับ 2 และ 3 mM. ในน้ำยาเจือจาง ให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า เท่ากับ 70.75±1.5 และ 72±2.30 (ตามลำดับ) สูงกว่ากลูต้าไธโอนที่ระดับ 1 mM. (63.5±4.35) ในน้ำยาเจือจาง และสูงกว่ากลุ่มควบคุม (54±4.96) การเสริมกลูต้าไธโอน ที่ระดับ 0, 1,

2 และ 3 mM. ในน้ำยาเจือจาง ให้เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิต แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการเสริมกลูต้าไธโอนที่ระดับ 2 และ 3 mM. ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของอสุจิสูงที่สุด เท่ากับ 84.25 ± 2.36 และ 84 ± 1.41 (ตามลำดับ) แตกต่างจากการเสริมกลูต้าไธโอนในระดับ 1 และ 0 mM. เท่ากับ 72.75 ± 2.62 และ 61 ± 1.15 (ตามลำดับ) ส่วนการเสริมกลูต้าไธโอนที่ระดับ 0, 1, 2 และ 3 mM. ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่ทำการเก็บรักษาด้วยอุณหภูมิ 5°C นาน 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และจากการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริม กลูต้าไธโอน ที่ระดับ 0, 1, 2 และ 3 mM. ต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบเหลวที่ทำการเก็บรักษาด้วยอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ให้อัตราการผสมติด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ระบบการต้านอนุมูลอิสระของน้ำเชื้อ

ระบบต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบ่งเป็น 3 ระดับหลัก ซึ่งบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของอสุจิในสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การเจือจางในน้ำยา สภาวะของการเก็บรักษา สภาวะของกระบวนการแช่แข็ง เป็นต้น โดยมีระดับการทำงานดังนี้

ระดับที่ 1 เป็นการทำงานของซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) ร่วมกับglutathione peroxidase (GSH - Px) และ metal – binding proteins มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันการก่อตัวของ อนุมูลอิสระ

ระดับที่ 2 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ร่วมกับ GSH – Px ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ โดยคาดว่าเป็นการป้องกัน หรือควบคุมการเกิดห่วงโซ่ของอนุมูลอิสระ

ระดับที่ 3 เป็นการทำงานของระบบเอนไซม์ทำหน้าที่ซ่อมแซมและกำจัด หรือทำงานโมเลกุลที่เสื่อมสลายภายในเซลล์ในธรรมชาติน้ำเชื้อไก่จะประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี และกลูต้าไธโอน รวมถึงเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ GSH – Px และ SOD มีการพบวิตามินอีในน้ำเชื้อไก่งวง เป็ด และห่าน นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในอสุจิ และน้ำเลี้ยงเชื้อของสัตว์เหล่านี้เช่นเดียวกัน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น เป็นการเก็บน้ำเชื้อในสภาพของเหลวในที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส จะช่วยให้น้ำเชื้อมีอายุอยู่ได้ประมาณหนึ่งเดือน แต่หากเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาได้ประมาณ 4 - 5 วัน เท่านั้น

จากงานวิจัยของเพชรรีและวิชชุดา (2563) ที่ทำการศึกษาเรื่องผลของอายุ ขนาดของอัณฑะ และขนาดของท่อพักอสุจิส่วนหางต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อคเจอร์ซี่ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาช่วงอายุที่เหมาะสม ขนาดของอัณฑะ และขนาดของท่อพักอสุจิส่วนหางที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพันธุ์ดูร็อคเจอร์ซี่ จำนวน 30 ตัว ที่มีอายุระหว่าง 9-14 เดือน แบ่งเป็น 3

กลุ่มการทดลอง กลุ่มที่ 1 อายุ 9-10 เดือน กลุ่มที่ 2 อายุ 11-12 เดือน และกลุ่มที่ 3 อายุ 13-14 เดือน จากการศึกษาผลของอายุ ขนาดของอัณฑะ และขนาดของท่อพักอสุจิส่วนหางของพ่อสุกร ค่าเฉลี่ยของขนาดความกว้างและความยาวของอัณฑะ และขนาดความกว้างของท่อพักอสุจิส่วนหางของพ่อสุกร ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งเมื่ออายุสุกรเพิ่มมากขึ้น ทำให้ขนาดของอัณฑะ และขนาดของท่อพักอสุจิส่วนหางมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยใช้ CASA โปรแกรม Swine Dynamic Sperm Analysis พบว่า กลุ่มที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงที่สุด เท่ากับ 86.62± 0.03 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ 1 (84.53 ± 0.80) แต่ในกลุ่มที่ 1 ไม่มีความแตกต่างกัน กับกลุ่มที่ 2 (85.48 ± 0.68) ($P>0.05$) และกลุ่มที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันกับพ่อสุกรกลุ่มที่ 1 และ3 ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของตัวอสุจิ และจำนวนตัวตายของตัวอสุจิ ของทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่แข็ง

ในอดีตนั้นมีความพยายามในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่มานานแล้ว ซึ่งวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่วิธีการแรกๆ ค้นพบโดย Lake and Stewart (1978) เมื่อ 30 ปีก่อน โดยใช้วิธีการนำสารป้องกันการแช่แข็งคือ glycerol มาใช้ และใช้กระเปาะแก้วในการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง โดยต่อมามีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งแบบต่างๆเรื่อยมาโดยการใช้สารเคมีตัวอื่นๆ นอกเหนือจากการใช้ glycerol เช่น ใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl formamide (DMF) และ dimethyl acetamide (DMA) เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง และใช้หลอดฟางแทนการใช้กระเปาะแก้ว ในการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง (Blesbois, 2006) นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงด้วย เช่น นก, สัตว์ที่ให้ความบันเทิงหรือสัตว์ที่ใช้ในการชมเพื่อพักผ่อนหย่อนใจ รวมไปถึงนกเหยี่ยว ซึ่งเป็นสัตว์ที่อันตราย และสัตว์จำพวก ไก่ฟ้า, ห่าน และนกกระเรียน ในปัจจุบันยังมีความพยายามในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของสัตว์เหล่านี้ และยังมีการพัฒนาวิธีการแช่แข็ง และวิธีการผสมเทียมอยู่อย่างต่อเนื่อง (Donoghue and Wishart, 2000)

เทวินทร์ (2542) รายงานว่า ในสัตว์ปีกน้ำยาที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อนิยมใช้สูตร Beltsville Poultry Semen Extender และสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectant) ที่ใช้คือ คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) ในระดับ 4-10 % การลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งมักทำในอ่างแอลกอฮอล์โดยใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นตัวลดอุณหภูมิ จากการอังบนไอไนโตรเจนเหลว โดยมีการลดอุณหภูมิจาก 5 องศาเซลเซียสถึง -20 องศาเซลเซียส ในอัตรา 1 องศาเซลเซียสต่อนาที และจากนั้นวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อในไอไนโตรเจนเหลวเหนือไนโตรเจนเหลวเล็กน้อย ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิจะเป็น 50 องศาเซลเซียสถึง 80 องศาเซลเซียสต่อนาที ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเข้าถังไนโตรเจนเหลว

อุณหภูมิในการเก็บรักษา

เนื่องจากน้ำเชื้อไก่มีการเคลื่อนที่เร็ว และมีความหนาแน่นมาก ทำให้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายหรือเท่ากับอุณหภูมิร่างกาย อสุจิไก่จะสูญเสียพลังงานเป็นอย่างมาก น้ำเชื้อที่รีดมาแล้วแต่ยังไม่เจือจางจะไวต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ในขณะที่น้ำเชื้อเจือจางจะทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่า การลดอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังจากการรีดไปที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มักใช้เวลาประมาณ 20 – 30 นาที (Chalah et al, 1999) ในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อที่ 4, 21 และ 41 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางเป็นเวลา 8 ชั่วโมงทำการประเมินคุณภาพโดยตรวจดูการเคลื่อนที่ อสุจิที่รอดชีวิตพบว่า คุณภาพของน้ำเชื้อจะค่อยๆ ลดต่ำลงเป็นลำดับๆ ในทุกกลุ่ม และการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ น้ำเชื้อจะมีคุณภาพดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิร่างกายของไก่ (Dumpala et al, 2006)

วิธีการแช่แข็ง

โดยทั่วไปแล้วในการแช่แข็งน้ำเชื้อ จะเริ่มจากการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อเจือจางไปที่ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมน้ำยาที่มี cryoprotectant และทิ้งไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จึงดำเนินการแช่แข็งตามขั้นตอนต่อไป ซึ่งแบ่งได้เป็น 5 ระบบ ดังตารางที่ 8.5

ตารางที่ 8.5 วิธีการแช่แข็ง

การแช่แข็ง	ขั้นตอน
แบบเม็ด แบบที่ 1	หยดน้ำเชื้อ 0.2 ml. ที่ solid CO_2 จากนั้นไปยังไนโตรเจนเหลว
แบบเม็ด แบบที่ 2	หยดน้ำเชื้อ 0.2 ml. ที่ fluoroplastic plate อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายไปยังไนโตรเจนเหลว
แบบเม็ด แบบที่ 3	หยดน้ำเชื้อ 0.2 ml. ไปที่ไนโตรเจนเหลวน้ำเชื้อ 1 ml. ในขวด 10 ml. หมุนขวดที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นปิดขวด และย้ายไปยังไนโตรเจนเหลว
ใช้เครื่องอัตโนมัติ	บรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง ลดอุณหภูมิจาก 5 ไปที่ -35 องศาเซลเซียส ในอัตรา 1 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นย้ายไปยังไนโตรเจนเหลว

ที่มา: Donoghue and Wishart (2000)

การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และฟิสิกส์ในเซลล์อสุจิภายหลังการลดอุณหภูมิ

ในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์แต่ละชนิด มีปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณา ความเหมาะสมของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อให้น้ำเชื้อหลังการทำละลายมีคุณภาพดีที่สุด คือ

1) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย

2) อัตราการลดอุณหภูมิจนถึงสภาพแข็งเพื่อควบคุมการเกิดผลึกน้ำแข็ง

3) อัตราการทำละลายเพื่อให้เซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติ ซึ่งควรป้องกันการกลับคืนมาก่อตัวของผลึกน้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่เซลล์จะกลับสู่สภาพปกติ สิ่งที่สำคัญที่เข้ามาเกี่ยวข้องคือ คุณสมบัติของผนังเซลล์อสุจิ องค์ประกอบของสารที่เคลือบเซลล์อสุจิ ตลอดจนการคงอยู่ของส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์อสุจิ เช่น อะโครโซม ไมโตคอนเดรีย และมีผนังของเซลล์ตัวเอง นอกจากนี้มีคุณสมบัติเฉพาะแตกต่างออกไป ซึ่งภายหลังจากการแช่แข็งและทำละลายแล้ว จะต้องคงสภาพปกติให้มากที่สุด จึงจะสามารถทำให้อสุจิมีความสมบูรณ์ได้

การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อสุจิเมื่อลดอุณหภูมิก่อนถึงจุดเยือกแข็ง

ในกระบวนการแช่แข็งนั้น เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงกว่าจุดเยือกแข็งของเหลวที่อยู่โดยรอบนอกของเซลล์อสุจิก็เริ่มมีการก่อตัวของเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์อสุจิ ซึ่งก็ส่งผลให้ความเข้มข้นที่อยู่ภายนอกเซลล์อสุจิมีความเข้มข้นสูงขึ้น และมีการเคลื่อนย้ายน้ำจากภายในเซลล์อสุจิออกไปภายนอกเซลล์อสุจิ ถ้าหากว่าอัตราการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ก็ส่งผลทำให้น้ำเคลื่อนตัวออกจากเซลล์อสุจิมากขึ้น ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง ผลจากการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์อย่างมากทำให้ความเข้มข้นสูงเกินไปหรืออาจอยู่ในสภาพตกผลึกซึ่งเป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ แต่หากอัตราการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การเคลื่อนย้ายน้ำออกไปยังภายนอกเซลล์ก็เกิดได้เล็กน้อย ส่งผลให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์และเซลล์อสุจิก็ได้รับอันตรายจากการทิ่มแทงของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Watson, 2000)

การเปลี่ยนแปลงของอสุจิขณะทำการแช่แข็งและทำละลาย

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิวิกฤตสำหรับเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง คือ อุณหภูมิระหว่าง -15 ถึง -60 องศาเซลเซียส อสุจิจะพบอุณหภูมิวิกฤต 2 ครั้ง โดยครั้งแรกเกิดขึ้นในขณะแช่แข็ง ครั้งที่สองในขณะทำละลาย ในขณะแช่แข็งที่ -196 องศาเซลเซียส สภาวะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มี เนื่องจากหากอุณหภูมิต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียส แล้ว สภาพน้ำเชื้อจะเป็นผลึกที่คงตัว (เทวินทร์, 2553)

การทำละลาย

น้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำการแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้น้ำยังคงเหลืออยู่ในเซลล์ปริมาณมากนั้น หากทำการละลายด้วยอัตราการละลายช้า จะทำให้อสุจิมีอัตรารอด

ต่ำ เนื่องจากทำให้เกิดการก่อตัวของน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เกิดผลึกน้ำรูปทรงแหลม ตลอดจนเกิด Dilution shock น้ำเชื้อแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิช้า ซึ่งภายในเซลล์เหลือน้ำอยู่น้อย จะต้องทำการละลายอย่างช้า เพื่อให้น้ำมีโอกาสได้ซึมเข้าเซลล์ได้ในอัตราที่เหมาะสม หากทำการละลายด้วยอุณหภูมิที่สูง ซึ่งทำให้การละลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว ผนังเซลล์อสุจิอาจเกิดความเสียหายจากการไหลเข้าหาน้ำได้ (เทวินทร์, 2553)

สารป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิในกระบวนการแช่แข็งและการละลาย (cryoprotectant)

ในการแช่แข็งอสุจิมีความจำเป็นที่ต้องมีการเติมสาร cryoprotectant โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อบรรเทาความเสียหายแก่อสุจิ จากกระบวนการแช่แข็งและการละลาย โดยแบ่งสารที่มีคุณสมบัติของ cryoprotectant เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) กลุ่มผลผลิตจากธรรมชาติ (organic materials)

ไข่แดงและนม นับว่าเป็นองค์ประกอบของสูตรน้ำยาที่นิยมใช้ในน้ำยาแช่แข็งเกือบทุกสูตร โดยไข่แดงจะประกอบด้วย lipoprotein, phospholipids และ lecithin ส่วนในน้ำนมจะมี casein ซึ่งมีคุณสมบัติป้องกันการเกิด cold shock ในปัจจุบันไม่นิยมใช้นมและไข่แดงในการเป็นสารป้องกันการแช่แข็งในน้ำเชื้อไก่

2) กลุ่มที่เป็นสารเคมี (cryoprotective agent, CPA) แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

(1) กลุ่มที่ไม่ซึมผ่านผนังเซลล์ ได้แก่ น้ำตาลในกลุ่ม di-saccharide และ tri-saccharide ซึ่งอสุจิไม่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ น้ำตาลพวกนี้จะทำหน้าที่รักษาสมดุลของความดันสารละลาย โดยมีบทบาทแทนการ electrolyte กลุ่มนี้ไม่สามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ในขณะแช่แข็ง และการละลาย บางทีอาจมีบทบาทบรรเทาความรุนแรงของผลที่เกิดจากความเข้มข้นของสารละลาย โดยปกติแล้วมักเติมพร้อมกับ glycerol ก่อนการแช่แข็ง และมักไม่เติมเป็นองค์ประกอบในระยะที่ลดอุณหภูมิ จากอุณหภูมิห้องไปยัง 5 องศาเซลเซียส

(2) กลุ่มที่ซึมผ่านผนังเซลล์อสุจิ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol และ propylene glycol โดย glycerol เป็นสารที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโค แพะ แกะ และม้า ส่วน DMSO, DMA และ DMF ใช้กับสัตว์ปีก (เทวินทร์, 2553)

สรุป

การคัดเลือกพ่อพันธุ์สัตว์นำมารีดน้ำเชื้อ เพื่อการเก็บรักษานั้น เลือกจากประวัติการให้ผลผลิตที่เป็นความต้องการของตลาด ประกอบกับประวัติพ่อแม่ ปู่ย่า ตายาย และจากการประมวลผลผลิตที่ถ่ายทอดสู่รุ่นลูก วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อสามารถกระทำได้ 3 วิธีคือ การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการบีบนวด (Massage method) การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electro-Ejaculation Method) การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina หรือ AV) การรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สัตว์เลี้ยง วิธีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อที่ใช้ในฟาร์มสัตว์ จะมีรูปแบบที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินศักยภาพของน้ำเชื้อว่าน่าจะมีความเป็นไปได้ในแง่ของความสมบูรณ์พันธุ์ หรืออัตราการผสมติดอยู่ในระดับใด เพื่อประกอบการพิจารณา ตัดสินใจนำน้ำเชื้อนั้นไปใช้ในการผสมเทียม ตลอดจนทราบถึงสถานภาพทางการสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์ เพื่อการนำไปประกอบการพิจารณาจัดการด้านการผสมพันธุ์ต่อไป การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ นิยมทำในหัวข้อดังต่อไปนี้ คือ ลักษณะทั่วไป ได้แก่การประเมิน สี กลิ่น การปนเปื้อน การเคลื่อนที่แบบหมู่ การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต รูปร่างอสุจิ การนับควรตรวจดูอสุจากหลายๆ บริเวณบนสไลด์ นับจำนวนอสุจิทั้งหมด 300 ตัว ใช้กล้องกำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งใช้ oil emersion หยดบนสไลด์ วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อนั้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น อุณหภูมิที่เก็บรักษาส่วนใหญ่ คือ 5–15 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่แข็งโดยทั่วไปแล้วในการแช่แข็งน้ำเชื้อ จะเริ่มจากการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อเจือจางไปที่ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมน้ำยาที่มี cryoprotectant และทิ้งไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จึงดำเนินการแช่แข็งตามขั้นตอนต่อไป การเปลี่ยนแปลงของอสุจิขณะทำการแช่แข็งและทำละลาย โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิวิกฤตสำหรับเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง คือ อุณหภูมิระหว่าง -15 ถึง -60 องศาเซลเซียส อสุจิจะพบอุณหภูมิวิกฤต 2 ครั้ง โดยครั้งแรกเกิดขึ้นในขณะแช่แข็ง ครั้งที่สองในขณะทำละลาย ในขณะแช่แข็งที่ -196 องศาเซลเซียส สภาวะต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มี เนื่องจากหากอุณหภูมิต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียส แล้ว สภาพน้ำเชื้อจะเป็นผลึกที่คงตัว

คำถามท้ายบท

1. การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการบีบนวด (Massage method) สามารถทำได้อย่างไร จงอธิบายถึงวิธีการนี้

2.การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electro-Ejaculation Method) สามารถทำได้อย่างไร จงอธิบายถึงวิธีการนี้

3. การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina หรือ AV) สามารถทำได้อย่างไร จงอธิบายถึงวิธีการนี้

4. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยการตรวจการเคลื่อนที่แบบหมู่ สามารถกระทำได้อย่างไร

5. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยการตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิ สามารถกระทำได้อย่างไร

6. จงบอกถึงลักษณะความผิดปกติของตัวอสุจิแบบ Primary abnormalities

7. องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำยาเจือจางที่ดีควรประกอบไปด้วยอะไรบ้าง

8. จงอธิบายถึงวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่เย็น

9. จงอธิบายถึงวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่แข็ง

10. จงอธิบายคุณสมบัติของ cryoprotectant มาอย่างละเอียด

เอกสารอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. (2542). **การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. (2553). **คู่มือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. (2559). **การเก็บรักษาน้ำเชื้อและการผสมเทียมในสัตว์ปีก.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพชรรี กุลวุฒิ และวิชชุดา ยินดี. (2563). **ผลของอายุ ขนาดของอัณฑะ และขนาดของท่อพักอสุจิส่วนหางต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อคเจอร์ซี่.** การเกษตรราชภัฏ. 19: 2. 19-24.

มงคล โปร่งเจริญ. (2546). **การผสมเทียมม้า.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิชชุดา ยินดี, ณัฏฐวรรณ สมนึก และนิติพัฒน์ พัฒนฉัตรชัย. (2563). **ผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (กลูต้าไธโอน) ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลวและอัตราการผสมติดของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง.** การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชมงคลสุรินทร์ ครั้งที่ 11 วิจัยและนวัตกรรมวิถีใหม่.

Alkan, S., A. Baran, B. Ozdas and M. Evecen. (2001). **Sperm Quality and Ascorbic Acid Concentration in Rainbow Trout Semen Are Affected by Dietary Vitamin C: An Across-Season Study.** Bio. of Repro. 52, 982-988.

Andrzej Ciereszko and Konrad Dabrowski. (1995). **Morphological defects in Turkey semen.** J. Vet. Anim. Sci. 26:1087-1092.

Blesbois, E. (2006). **Advances in avian semen cryopreservation.** URA-INRA, 37380, Nouzilly, France.

Chalah, T. and J. P. Brillard. (1998). **Comparison of Assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI).** Theriogenology 50:487-493. Anim. Repro.Sci. 100: 311-317.

Chalah, T., Seigneurin, E. Blesbosis and J.P. Brillard. (1999). **In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculated frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo.** Cryobiology 39:185-191.

Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. (2000). **Storage of poultry semen.** Anim. Reprod. Sci. 62:213-232.

Dumpala, P.R., H.M. Parker and C.D. McDaniel. (2006). **The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen.** Poult. Sci. 5:838-845.

Evans, G. and W.M.C. Maxwell. (1987). **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Butterworths, Sydney.

Gordon Ian. (2005). **Reproductive Technologies in Farm Animals.** Department of Animal Science and Production University College Dublin Ireland. CABI Publishing is a division of CAB International.

Khana R.U., Zia-ur Rahmanb, I. Javedc, and F. Muhammad. (2012). **Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders.** Animal Reproduction Science 135: 85– 90.

Lake P.E. and J.M. Stewart. (1978). **Artificial insemination in poultry.** Ministry Of Agriculture, Fisheries and Food. HMSO. Press: London.

Lukaszewicz, E., A. Jerysz, A. Partyka and A. Siudzinska. (2008). **Efficacy of evaluation of rooster morphology using different staining methods.** Res.Vet. Sci. 85:583-588.

Ping-Chi Hsu, M.Y. Liu, C.C. Hsu, L.Y. Chen and Y.L. Guo. (1998). **Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm.** Toxicology. 128: 3. 169-179.

Watson, P.F. (2000). **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** Anim. Reprod. Sci. 60-61:481-492.

Yousef M.I., G.A. Abdallah, and K.I. Kamelb. (2003). **Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits.** Animal Reproduction Science 76. 99–111.