



รูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อ  
โดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในช่วงเวลาต่างๆ  
Morphology and Sperm Motility of Domestic Cat Semen  
after Cryopreservation at 4°C in Different Cooled Storage Time

ชาตรี ชำนาญดี<sup>1</sup> และ นวรัตน์ ผอบงา<sup>1</sup>  
Chatree Chumnandee<sup>1</sup> and Nawarat Pha-Obnga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาสัตวศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ในช่วงเวลาต่างๆ โดยเก็บน้ำเชื้อแมวบ้านเพศผู้ 2 ตัว แบบรวมกัน (pooled semen) ด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า และทำซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม), กลุ่มที่ 2 แช่เย็น 0 ชั่วโมง, กลุ่มที่ 3 แช่เย็น 24 ชั่วโมง, กลุ่มที่ 4 แช่เย็น 48 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 5 แช่เย็น 72 ชั่วโมง แช่เย็นน้ำเชื้อที่เจือจาง กับสารละลายเจือจางที่ 1 (Tris+20% egg yolk; EYT) และสารละลายเจือจางที่ 2 (EYT เสริม 6% glycerol และ 1% Equex STM paste) ทำการประเมินปริมาตร และความเข้มข้น เฉพาะในกลุ่มน้ำเชื้อสด ส่วนการประเมินเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ (% motility) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า หรือคุณภาพการเคลื่อนที่ (progressive หรือ quality of motility) ค่าดัชนีการเคลื่อนที่ (Semen motility index; SMI) และการประเมินลักษณะความผิดปกติของส่วนหัวและส่วนหางของ อสุจิปฏิบัติทุกกลุ่มการทดลอง ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ คุณภาพการเคลื่อนที่ และค่า SMI (71.67±1.44, 4.17±0.14 และ 77.50±2.17 % ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหัว และค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหางในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ คุณภาพการเคลื่อนที่ และค่า SMI ในกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแมวบ้านของการศึกษามีค่าลดลงภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่ 4 °C

คำสำคัญ : แมวบ้าน / น้ำเชื้อแช่เย็น / รูปร่างอสุจิ / การเก็บรักษาด้วยความเย็น

ABSTRACT

The aims of this study were to examine sperm morphology and motility of cooled domestic cat semen after cryopreservation at 4 °C in different storage time. The electro-ejaculated semen from two males were pooled and the experiments were replicated three times. The treatments were divided into five groups; group 1, fresh semen (control), group 2, storage in 0 hr, group 3 storage in 24 hrs, group 4 storage in 48 hrs and group 5 storage in 72 hrs. The electro-ejaculated semen volume and sperm concentration were evaluated before cooling and then were cooled in 1st extender (Tris with 20% egg yolk; EYT) and in 2nd extender (EYT supplemented with 6% glycerol and 1% Equex STM paste). The percentage motility, quality of motility, semen motility index (SMI), morphology of abnormal sperm head and morphology of abnormal sperm tail were assessed in all groups. The results showed that the percentage motility, quality of motility and SMI of fresh semen group were significantly (p<0.05) higher than those in other groups (71.67±1.44, 4.17±0.14 and 77.50±2.17 % respectively). The mean total of abnormal head and abnormal tail were not different among groups (p>0.05). In conclusion, the present study suggested that percentage motility, quality of motility and SMI of cooled domestic cat semen tended to decreased after cryopreservation at 4°C in different storage time.

Keywords : Domestic Cat / Cooled Semen / Sperm Morphology / Cryopreservation



## บทนำ

สัตว์ป่าตระกูลแมวมีสถานะเป็นสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ โดยจัดอยู่ในแฟมิลี ฟิเลดี้ (Felidae) ซึ่งกลุ่มแมวเล็ก (Small cats) มีทั้งหมด 26 สปีชีส์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2007) การศึกษาโดยใช้แมวบ้านเป็นต้นแบบสามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการไปศึกษาในสัตว์ป่าโดยตรง ซึ่งสามารถประยุกต์ไปสู่การศึกษาทางด้านเทคนิคช่วยการสืบพันธุ์ (Assisted Reproduction Techniques; ART) เช่น การศึกษาการผสมเทียม (Artificial Insemination; AI) (Zambelli and Cunto. 2005) หรือการศึกษาในด้านเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย (*In Vitro* Production of Embryo; IVP) อาทิ การปฏิสนธินอกร่างกาย (*In Vitro* Fertilization; IVF) และการฉีดอสุจิเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ (Intracytoplasmic Sperm Injection; ICSI) (Karja et al. 2002)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแมวอาจอยู่ในรูปของการเก็บรักษาโดยการแช่เย็น (Cooled Semen) และการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (Frozen Semen) (Axnér and Linde-Forsberg. 2002 ; Luvoni et al. 2003) การเก็บรักษาโดยการแช่เย็นเป็นวิธีการที่สามารถเตรียมได้ทั้งจากน้ำเชื้อที่เก็บจากการหลัง (Pukazhenthii et al. 1999 ; Hermansson and Axnér. 2007) และจากอภิติดิไมซิส (Epididymis) (Villaverde et al. 2006 ; Filliers et al. 2008) ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นช่วงเวลาสั้นๆ โดยจะช่วยยืดอายุของอสุจิเพราะเป็นการลดเมทาบอลิซึมของอสุจิลง แต่อสุจิสามารถถูกทำลายจากสภาวะการช็อคจากความเย็น หรือ Cold Shock (Hermansson and Axnér. 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงรูปร่างของอสุจิภายใต้การเก็บรักษาด้วยการแช่เย็นอาจบ่งบอกถึงสมรรถนะต่อความสามารถในการปฏิสนธิทั้งแบบในร่างกาย (*In Vivo*) และแบบนอกร่างกาย (*In Vitro*) ของสัตว์ตระกูลแมวได้

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นต่อการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของเพศผู้ก่อนนำไปทำ ART และในงานวิจัยต่างๆ (Rodriquez-Martinez. 2003) การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของแมวบ้านมีข้อจำกัดในการเลือกวิธีประเมินเนื่องจากมีปริมาณน้อยต่อการหลังน้ำเชื้อแต่ละครั้ง (Zambelli and Cunto. 2006) ดังนั้นการประเมินที่ควรทำเป็นประจำ ได้แก่ ปริมาณน้ำเชื้อ (Volume) ความเข้มข้น (Concentration;  $\times 10^6$  sperm/mL) และการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Motility) ซึ่งรวมทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Percent of Motility; 0 to

100%) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive หรือ Quality of Motility; scale 0 to 5) (Howard et al. 1990 ; Tebet et al. 2006) นอกจากนี้การประเมินรูปร่างมีความจำเป็นเช่นเดียวกันต่อการบ่งชี้คุณภาพของน้ำเชื้อในการปฏิสนธิ (Zambelli and Cunto. 2006) เนื่องจากการแสดงสัดส่วนของอสุจิที่มีความผิดปกติในลักษณะต่างๆ ที่สามารถพบได้จากน้ำเชื้อแมวบ้าน เช่น pear shape, small head, big head, acrosome abnormality, two heads, two tails, abaxial, coiled tail, mid piece abnormality, undeveloped, proximal droplet, detached heads, bent tail เป็นต้น (Platz and Seager. 1978) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะมีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับรูปร่างความผิดปกติในแมวบ้าน (Howard et al. 1990 ; Zambelli and Cunto. 2006) แต่การศึกษาในกลุ่มแมวบ้านของไทยยังมีน้อยมาก ซึ่งอาจมีความเกี่ยวพันสืบเนื่องไปถึงการปรับปรุงพันธุ์หรือการอนุรักษ์กลุ่มแมวไทยที่มีลักษณะดี เช่น แมวสีสวาด, แมวขาวมณี, แมววิเชียรมาศ และแมวศุภลักษณ์ สืบไป ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้น (Preliminary Study) เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานต่อการศึกษาในอนาคตต่อไป

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### การรีดเก็บน้ำเชื้อ

เก็บน้ำเชื้อจากแมวบ้านเพศผู้จำนวน 2 ตัว แบบรวมกัน (Pooled Semen) ด้วยเครื่องกระตุ้นการหลังด้วยไฟฟ้า (Electroejaculator) โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ ในการรีดเก็บน้ำเชื้อจะทำการฉีดยาสลบที่ประกอบด้วย Xylazine HCL (2 mg/kg) และ Ketamine (5 mg/kg) (Axnér et al. 1997 ; Baran et al. 2004) รวมเข็มเดียวกันฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เมื่อสลบจัดทำให้แมวนอนตะแคง (Lateral Recumbency) ใช้โพรบที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm ยาว 12 cm และมีแถบอิเล็กโทรด 2 แถว (แถบอิเล็กโทรดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 mm และยาว 3 cm) หล่อลื่นด้วยสารหล่อลื่นสอดใส่เข้าไปในทวารหนักลึกประมาณ 9 cm ประยุกต์การปล่อยกระแสไฟฟ้าตามหลักการของ Howard et al (1990) ดังนี้ ครั้งที่ 1 กระตุ้นด้วยไฟฟ้าประมาณ 10 mA จำนวน 10 ครั้ง (ครึ่งละ 5 วินาที) หยุดพัก 5 นาที ครั้งที่ 2



กระตุ้นด้วยไฟฟ้าประมาณ 20 mA จำนวน 10 ครั้ง หยุดพัก 5 นาที และครั้งที่ 3 กระตุ้นด้วยไฟฟ้าประมาณ 40 mA จำนวน 10 ครั้ง โดยใช้ Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 mL รองรับน้ำเชื้อจากอวัยวะเพศ ซึ่งระหว่างการรีดน้ำเชื้อจะเก็บน้ำเชื้อที่ได้แต่ละครั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ใน Mobile Incubator

#### การเตรียมน้ำเชื้อแช่เย็น

การเตรียมน้ำเชื้อแช่เย็นโดยประยุกต์วิธีของ Pursel and Johnston (1975) อ้างโดย Karja et al. (2002) ดังนี้ เมื่อได้น้ำเชื้อจากแมว 2 ตัวรวมกัน (เฉลี่ยประมาณ 50  $\mu$ L) นำมาเจือจางกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ซึ่งแบ่งเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ 1 (1<sup>st</sup> Extender) ปริมาตร 200  $\mu$ L โดยตัดแปลงจากวิธีของ Rota et al. (1997) [ประกอบด้วย 2.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร; w/v) Tris, 1.4% (w/v) Citric Acid Monohydrate, 0.8% (w/v) Glucose, 50  $\mu$ g/mL Gentamicin และ 20% Egg Yolk (ปริมาตรต่อปริมาตร; v/v) ในน้ำกลั่น] (EYT) จากนั้นนำมาลดอุณหภูมิจาก 35°C ลงจนถึงอุณหภูมิ 4°C (อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ 0.5°C /min) ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิ Biocool (FTS System, Stone Ridge, USA) หลังจากนั้นย้ายมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ 2 (2<sup>nd</sup> Extender) ปริมาตร 250  $\mu$ L [ประกอบด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ 1 (EYT), กลีเซอรอล 6 % Glycerol (v/v) และ 1 % Equex STM paste (v/v)] โดยแบ่งเติมครั้งที่ 1 ปริมาตร 125  $\mu$ L และเติมครั้งที่ 2 ในปริมาตร 125  $\mu$ L ประเมินน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนการประเมินน้ำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน Mobile Incubator นาน 2-5 นาที

#### การประเมินน้ำเชื้อ

การประเมินปริมาตร (Volume;  $\mu$ L) และความเข้มข้น (Concentration;  $\times 10^6$  Sperm/mL) ทำเฉพาะในกลุ่มน้ำเชื้อสดหลังการรีด ซึ่งความเข้มข้นของน้ำเชื้อประเมินโดยเจือจางน้ำเชื้อกับ Formal Saline ในอัตราส่วน 1 : 20 นับจำนวนอนุภาคในตารางของสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) และนำมาคำนวณหาความเข้มข้น ส่วนการประเมินอื่นๆ ทำทุกกลุ่มการทดลอง โดยการประเมินกลุ่มน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ตั้งแต่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จะทำการแบ่งน้ำเชื้อปริมาตร 50  $\mu$ L มาเจือจางในสารละลาย Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP-Hepes) (Parrish et al. 1986 อ้างโดย Freistedt et al. 2001) ปริมาตร 30  $\mu$ L ปั่นเหวี่ยง

ด้วยเครื่อง Low Speed Centrifuge 2500 rpm นาน 1 นาที ดูดส่วน Sperm Pellet ปริมาตร 30  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน Mobile Incubator แล้วจึงประเมินดังนี้ คือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (% Motility) โดยให้คะแนนจาก 0 ถึง 100 % การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า หรือคุณภาพการเคลื่อนที่ (Progressive หรือ Quality of Motility) ให้คะแนน 0 ถึง 5 ซึ่งคะแนน 0 คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ 5 คือเคลื่อนที่เร็ว และตรงไปข้างหน้า โดยดู 4 จุด ภายในแผ่นสไลด์ จากนั้นนำมาคำนวณหาดัชนีการเคลื่อนที่ (Semen Motility index; SMI) ซึ่งมีสูตรในการคำนวณคือ (% Sperm Motility + [Quality of Motility  $\times 20$ ]) / 2 (Ganan et al. 2009 ; Zambelli et al. 2008) การประเมินความผิดปกติทั้งส่วนหัวและส่วนหางใช้การย้อมสีแบบ William's Stain สำหรับการนับความผิดปกติของส่วนหัวจะนับทั้งหมด 500 ตัว ความผิดปกติของส่วนหางจะนับทั้งหมด 200 ตัว โดยนำน้ำเชื้อปริมาตร 5  $\mu$ L มา smear ลงบนสไลด์ปล่อยให้แห้ง (Air Dry) แล้วจึง fix ด้วยเปลวไฟ (Fix in Flame) นำสไลด์ที่ Fix แล้วแช่ใน Absolute Alcohol (95-100%) 3-4 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นจุ่มลงในสารละลาย 0.5% Chloramin-T นาน 1-2 นาที เพื่อละลาย Mucus ที่ติดอยู่ออก จะทำให้สไลด์ใสขึ้น นำสไลด์ไปล้างในน้ำกลั่น และจุ่มลงใน 95% Alcohol 2-3 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสี Carbol-Fuchsin Eosin นาน 8-10 นาทีล้างสีย้อมออกด้วยน้ำ แล้วปล่อยให้แห้งนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (Light Microscope) กำลังขยาย 400 ถึง 1,000 เท่า (Williams. 1920 ; Lagerlof. 1934 อ้างโดย Axner and Linde-Forseberg. 2007)

#### การออกแบบการทดลอง

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อสดภายหลังการรีดน้ำเชื้อ (ควบคุม), กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อแช่เย็นที่ 0 ชั่วโมง (ภายหลังเสร็จสิ้นการเตรียมน้ำเชื้อแช่เย็นทันที), กลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อแช่เย็นที่ 24 ชั่วโมง, กลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อแช่เย็นที่ 48 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 5 น้ำเชื้อแช่เย็นที่ 72 ชั่วโมง ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

#### การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี One way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่ (Multiple Comparison) ด้วยค่าตัวทดสอบแบบ LSD โดยรายงานผลในรูป Mean $\pm$ SD ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดให้ค่านัยสำคัญทางสถิติคือ  $p < .05$



## ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อสดมีปริมาตรเท่ากับ  $46.67 \pm 15.2 \mu\text{L}$  (Range 30-60  $\mu\text{L}$ ) และมีค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อสดภายหลังการรีดเท่ากับ  $49.73 \pm 15.61$  ( $\times 10^6$  Sperm/mL) (Range 39.5-67.7)

ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มการทดลองต่างๆ (ตารางที่ 1) พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิมิแนวโน้มลดลง โดยกลุ่มน้ำเชื้อสดมีสัดส่วนที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) คือ  $71.67 \pm 1.44$  % ในขณะที่ค่าคุณภาพของการเคลื่อนที่พบว่ากลุ่มน้ำเชื้อสดไม่แตกต่างจากกลุ่มแช่เย็นที่ 0 ชั่วโมง แต่มีสัดส่วนที่สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) คือ  $4.17 \pm 0.14$  % และ  $3.83 \pm 0.14$  % ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาค่าดัชนีการเคลื่อนที่หรือค่า SMI พบว่ามีแนวโน้มลดลง ซึ่งกลุ่มน้ำเชื้อสดมีสัดส่วนที่สูงและแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) คือ  $77.50 \pm 2.17$  %

ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติ (ภาพที่ 1) พบว่า ค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหัว และค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหางในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > .05$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาความผิดปกติลักษณะ

ต่างๆ (ตารางที่ 2) พบว่ากลุ่มที่แช่เย็นที่ 72 ชั่วโมงมีลักษณะความผิดปกติของหัวแบบ two heads ( $\geq 2$  heads) และความผิดปกติของหางแบบ bent tail มากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) คือ  $1.73 \pm 0.81$  % และ  $1.73 \pm 0.81$  % ตามลำดับ

## การวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าค่าการเคลื่อนที่ของกลุ่มน้ำเชื้อสดมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ค่าคุณภาพการเคลื่อนที่ และค่า SMI สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) นั้นแสดงให้เห็นว่าดัชนีต่างๆมีแนวโน้มที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Villaverde et al (2006) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ  $4.8^\circ\text{C}$  โดยทำการประเมินน้ำเชื้อหลังจากเก็บจากอภิติโดมิส (0 ชั่วโมง) และภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่เย็นที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิเริ่มลดลงตั้งแต่ภายหลังเก็บน้ำเชื้อ ( $83.7 \pm 7.6$ ,  $76.9 \pm 7.9$ ,  $68.1 \pm 8.3$  และ  $60.3 \pm 14.9$  % ตามลำดับ) เช่นเดียวกับการศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  รายงานว่าสามารถเก็บได้เป็นเวลานาน 3 วัน (Gómez et al. 2003)

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่  $4^\circ\text{C}$  ในช่วงเวลาต่างๆ

| การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ                  | เวลาเก็บรักษาโดยการแช่เย็น (ชั่วโมง) |                      |                      |                      |                    |
|---|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
|   | น้ำเชื้อสด                           | 0                    | 24                   | 48                   | 72                 |
| ปริมาตร ( $\mu\text{L}$ ) (range)         | $46.67 \pm 15.2$<br>(30-60)          | -                    | -                    | -                    | -                  |
| ความเข้มข้น ( $\times 10^6$ / mL) (range) | $49.73 \pm 15.61$<br>(39.5-67.7)     | -                    | -                    | -                    | -                  |
| การเคลื่อนที่ (%)                         | $71.67 \pm 1.44^a$                   | $57.50 \pm 2.50^b$   | $54.17 \pm 1.44^b$   | $46.67 \pm 2.89^c$   | $42.50 \pm 2.50^d$ |
| คุณภาพการเคลื่อนที่ (ระดับ 0 ถึง 5)       | $4.17 \pm 0.14^a$                    | $3.83 \pm 0.14^{ab}$ | $3.42 \pm 0.14^{bc}$ | $3.17 \pm 0.38^{cd}$ | $2.83 \pm 0.29^d$  |
| ค่าดัชนีการเคลื่อนที่ของอสุจิ (SMI)       | $77.50 \pm 2.17^a$                   | $67.08 \pm 2.60^b$   | $61.25 \pm 2.17^c$   | $55.00 \pm 4.33^d$   | $49.58 \pm 4.02^d$ |
| ลักษณะความผิดปกติส่วนหัว (%)              | $11.93 \pm 6.51$                     | $12.73 \pm 1.33$     | $12.67 \pm 2.64$     | $17.00 \pm 2.11$     | $20.47 \pm 7.77$   |
| ลักษณะความผิดปกติส่วนหาง (%)              | $24.33 \pm 5.84$                     | $27.67 \pm 15.78$    | $35.83 \pm 20.70$    | $43.67 \pm 27.19$    | $53.17 \pm 5.01$   |

อักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c,d) ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ )

ค่าดัชนีการเคลื่อนที่ของอสุจิ (sperm motility index; SMI) = (%sperm motility + [quality of motility  $\times 20$ ]) / 2

ผลการศึกษาเสนอค่า % mean  $\pm$  SD



จากการศึกษานี้ได้แสดงผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่เย็นที่ 0 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากการเตรียมสารละลายเจือจางที่ 1 ของการศึกษาซ้ำที่ 1 มีการใช้ citric acid trisodium salt dehydrate ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นเกลือเมื่อรวมกับ Tris ในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะทำให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นด่าง ในขณะที่การศึกษานี้ควรใช้ citric acid monohydrate ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) ที่มีฤทธิ์เป็นกรดเมื่อรวมกับ Tris จะทำให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกลาง จากเหตุดังกล่าวทำให้มีผลต่อค่า pH ของสารละลายและมีผลต่อตัวอสุจิได้ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ในกลุ่มแช่เย็นที่ 0 ชั่วโมงยังมีค่าอยู่ในช่วงปกติของแมวบ้านคือ 56% ถึง 84% (Axner and Linde-Forsberg, 2002) นอกจากนี้ในการประเมินน้ำเชื้อการศึกษานี้ใช้ TALP-Hepes เนื่องจากให้สอดคล้องกับการเตรียมน้ำเชื้อให้เหมาะต่อการ IVF กับไอโอไซต์ของแมวบ้าน (Freistedt et al, 2001) การศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจิแมวบ้านพบว่าค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหัว และค่าเฉลี่ยรวมของความผิดปกติส่วนหางในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > .05$ ) ในขณะที่ความผิดปกติของอสุจิแบบ two heads ( $\geq 2$  heads) และ bent tail ในกลุ่มแช่เย็นที่ 72 ชั่วโมงสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยการเพิ่มของอสุจิแบบ two heads ไม่ได้เกิดจากระยะเวลาในการแช่เย็น แต่อาจเนื่องมาจากการประเมิน

ในแต่ละช่วงเวลาจะนำตัวอย่างมาจากหลอด Pooled Semen เดียวกัน ในขณะที่ความผิดปกติอสุจิแบบ Bent Tail ได้มีการศึกษารายงานว่ามีสาเหตุส่วนหนึ่งจาก Cold Shock โดยจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อพลาสมาบวมและทำให้ฟลอกเจลล่าตึงส่งผลให้หางบิดงอได้ (Bamba and Cran, 1988) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาในการแช่เย็นอาจมีผลต่อความผิดปกติดังกล่าว อย่างไรก็ตามความผิดปกติของหัวและหางเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากปัจจัยภายในตัวสัตว์เอง ซึ่ง Luvoni et al (2003) ได้อ้างถึงการอธิบายของ Wildt et al (1983) และ Howard et al (1986) ถึงลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของอสุจิจากการประเมินน้ำเชื้อสดสามารถแบ่งออกเป็น 2 สาเหตุ ดังนี้คือ ความผิดปกติระหว่างกระบวนการผลิตอสุจิ (Spermatogenesis) ซึ่งจะพบลักษณะรูปร่างเช่น Coiled Tail, Small Head และ Big Head เป็นต้น ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญและการเคลื่อนย้ายของอสุจิตลอดออดิโอดีไมซิส เช่น Bent Tail, Proximal Droplet และ Acrosome Abnormality เป็นต้น โดยความผิดปกติจากสาเหตุแรกจะมีผลต่อการปฏิสนธิมากกว่าสาเหตุที่สอง นอกจากนี้การประเมินความผิดปกติของอสุจิภายหลังการเก็บรักษาทั้งโดยการแช่เย็นและการแช่แข็ง นิยมประเมินส่วนของอะโครโซม ซึ่งมีความอ่อนไหวต่อกระบวนการแช่เย็น อีกทั้งยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิได้

ตารางที่ 2 ลักษณะความผิดปกติส่วนหัวและส่วนหางของอสุจิแมวบ้านภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่ 4°C ในช่วงเวลาต่างๆ

| ลักษณะความผิดปกติของอสุจิ               | เวลาเก็บรักษาโดยการแช่เย็น (ชั่วโมง) |                          |                          |                          |                           |
|---|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   | น้ำเชื้อสด                           | 0                        | 24                       | 48                       | 72                        |
| <b>ลักษณะความผิดปกติส่วนหัวของอสุจิ</b> |                                      |                          |                          |                          |                           |
| Pear shape                              | 1.67±1.33                            | 1.33±0.47                | 1.27±0.50                | 2.33±1.5                 | 1.53±0.23                 |
| Narrow at base                          | 2.47±2.61                            | 1.27±0.12                | 1.27±1.14                | 3.00±1.06                | 3.20±0.80                 |
| Detached head                           | 2.40±0.53 <sup>a</sup>               | 0.73±0.76 <sup>b</sup>   | 0.73±0.70 <sup>bc</sup>  | 0.80±0.53 <sup>bd</sup>  | 1.13±0.92 <sup>abcd</sup> |
| Acrosome abnormality                    | 1.47±1.36                            | 0.87±0.70                | 2.47±1.36                | 1.60±1.06                | 1.53±0.83                 |
| Undeveloped                             | 0.73±0.95                            | 1.00±1.00                | 1.00±1.11                | 1.73±1.14                | 2.40±0.72                 |
| Big head                                | 0.33±0.58                            | 0.40±0.20                | 0.27±0.12                | 0.60±0.53                | 3.00±4.67                 |
| Little head                             | 1.80±0.92                            | 3.80±3.52                | 3.20±2.60                | 3.20±0.20                | 2.93±0.31                 |
| Abaxial                                 | 0.80±0.80                            | 1.00±0.20                | 1.67±1.17                | 6.40±6.79                | 2.67±1.10                 |
| Two head ( $\geq 2$ head)               | 0.67±0.31 <sup>a</sup>               | 1.33±0.61 <sup>a</sup>   | 1.07±0.42 <sup>a</sup>   | 1.33±0.12 <sup>a</sup>   | 1.73±0.81 <sup>b</sup>    |
| <b>ลักษณะความผิดปกติส่วนหางของอสุจิ</b> |                                      |                          |                          |                          |                           |
| Proximal droplet                        | 3.00±3.04 <sup>a</sup>               | 1.50±0.50 <sup>a</sup>   | 1.67±0.29 <sup>a</sup>   | 0.00±0.00 <sup>b</sup>   | 0.50±0.50 <sup>a</sup>    |
| Mid piece abnormality                   | 6.67±4.37                            | 1.83±1.76                | 4.17±2.52                | 4.83±4.48                | 5.17±3.82                 |
| Bent tail                               | 10.17±8.01 <sup>a</sup>              | 21.17±13.58 <sup>a</sup> | 26.17±20.19 <sup>a</sup> | 26.17±19.55 <sup>a</sup> | 37.50±7.70 <sup>b</sup>   |
| Coiled tail                             | 4.17±0.76                            | 2.00±1.00                | 3.17±2.08                | 11.50±13.48              | 9.33±8.78                 |
| Two tail                                | 0.33±0.29                            | 1.17±0.76                | 0.67±0.76                | 0.67±0.76                | 0.67±1.15                 |

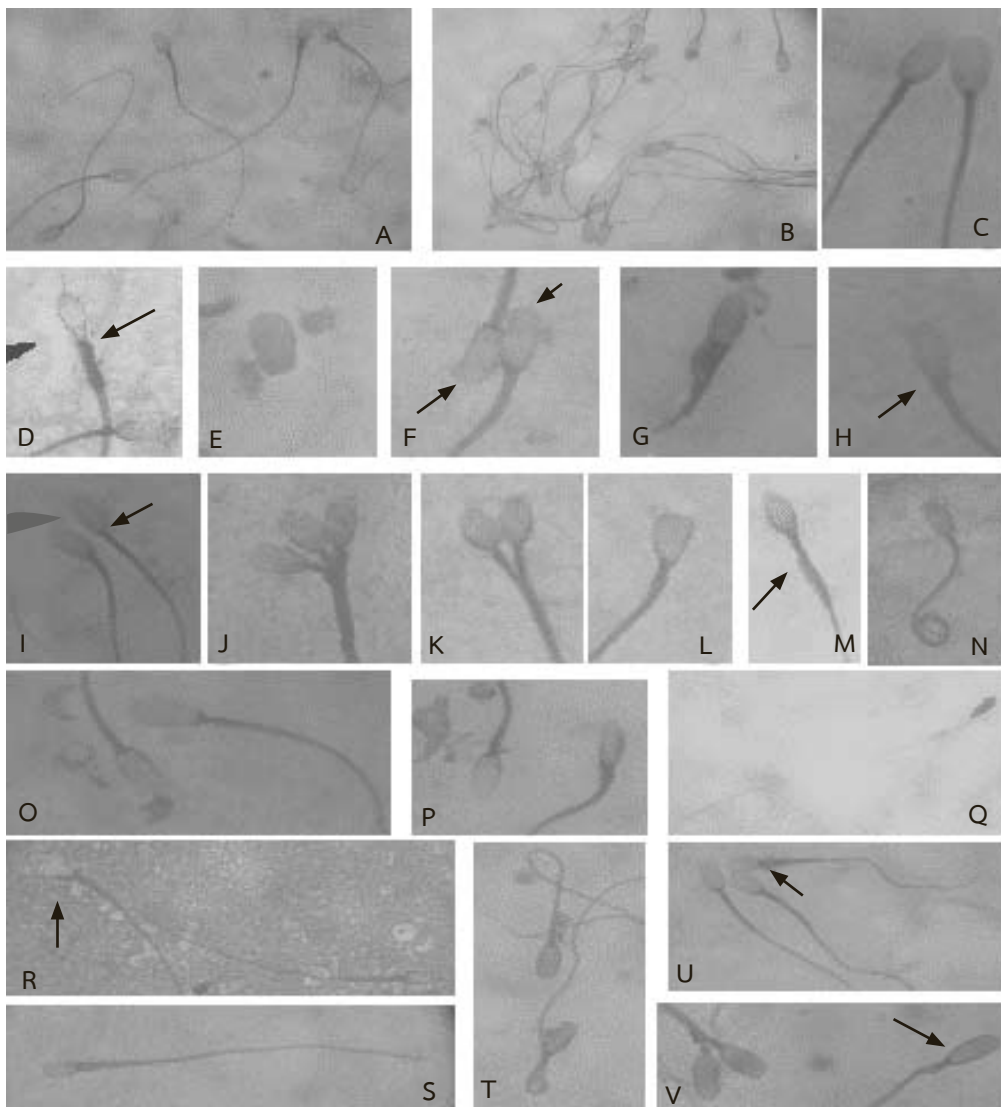
อักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c,d) ในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < .05$ ) ผลการศึกษาเสนอค่า % mean ± S.D.



นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะผิดปกติของตัวอสุจิจัดว่าแมวบ้านเป็นต้นแบบได้อย่างดี เนื่องจากแมวเพศผู้บางตัวผลิตตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติในอัตราที่สูง โดยแมวเพศผู้ที่โตเต็มที่และผลิตตัวอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติมากกว่า 60 % จัดอยู่ในกลุ่ม Teratospermic และ กลุ่มที่ผลิตตัวอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติน้อยกว่า 40 % จัดอยู่ในกลุ่ม normospermic (Howard et al. 1990 ; Pukazhenthii et al. 1999) ซึ่งในการศึกษานี้แสดงให้เห็นผลรวมของสัดส่วนของอสุจิที่มีลักษณะความผิดปกติต่ออสุจิที่มีความปกติเท่ากับ 21.24 % และ 78.76 % ตามลำดับ

จึงจัดอยู่ในกลุ่ม normospermic อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษานี้เป็นเพียงผลจากกลุ่มตัวอย่าง

ขนาดเล็ก เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งผลได้แสดงแนวโน้มให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าการเคลื่อนที่กับระยะเวลาการเก็บ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของงานวิจัย ในการศึกษาถัดไปควรจะต้องมีการปรับปรุงในส่วนการออกแบบการทดลองและควรมีการประเมินความผิดปกติของอะโครโซมซึ่งน่าจะแสดงถึงความสัมพันธ์กับเวลาในการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นได้



ภาพที่ 1 รูปร่างอสุจิแมวบ้านที่ปกติ (A), อสุจิที่แสดงความผิดปกติส่วนหางและส่วนหัว (B). Normal acrosome (C), pear shape with narrow at base (D), detached head (E), acrosome abnormality (F), undeveloped sperm (G), abaxial (H and I), three heads (tricephalic) (J), two heads (bicephalic) (K), pear shape (L and O), mid piece abnormality (M), coiled tail (N), small head (microcephalic) (P and Q), big head (macrocephalic) (R), two tail (biflagellum) (S), bent tail (T), proximal droplet (U), narrow at base (V) ประเมินด้วยการย้อมสี William's stain กำลังขยาย 400-1000 เท่า



### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสรุปได้ว่าระยะเวลาในการ เก็บรักษา น้ำเชื้อแมวบ้านโดยการแช่เย็นที่ 4 °C มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ คุณภาพการเคลื่อนที่ และค่า SMI ในกลุ่มตัวอย่าง ของการศึกษานี้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยี นครพนม ซึ่งได้รับการจัดสรรงบประมาณจากมหาวิทยาลัย นครพนม ประจำปีงบประมาณ 2552 และความอนุเคราะห์ใน การใช้ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### เอกสารอ้างอิง

- Axner, E., Ström, B., and Linde-Forsberg, C. (1997). "Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia," **Theriogenology**. 47 : 929-934.
- Axner, E. and Linde-Forsberg, C. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. Retrieved [Online], Available : <http://www.ivis.org>. [September 15, 2002].
- Axner, E. and Linde-Forsberg, C. (2007). "Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility : A retrospective study," **Reproduction Domestic Animal**. 42 : 282-291.
- Bamba, K. and Cran, D.G. (1988). "Effect of rapid warming of bull and rabbit semen," **Journal of Reproduction and Fertility**. 82 : 501-507.
- Baran, A., et al. (2004). "Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender," **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**. 28 : 545-552.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (2007).

Appendices I, II and III. [Online], Available : <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml> [September 13, 2007].

- Filliers, M., et al. (2008). "Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 °C) on sperm quality," **Theriogenology**. 70 : 1550-1559.
- Freistedt, P., Stojkovic, M. and Wolf, E. (2001). "Efficient in vitro production of cat embryos in Modified Synthetic Oviduct Fluid medium : Effects of season and ovarian status," **Biology of Reproduction**. Biol. 65 : 9-13.
- Ganan, N., Gomendio, M. and Roldan, E.R.S. (2009). "Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on sperm quality and cryopreservation," **Theriogenology**. 72 : 1268-1277.
- Gómez, M.C., et al. (2003). "Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer," **Theriogenology**. 60 : 239-251.
- Hermansson, U., and Axner, E. (2007). "Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C.," **Theriogenology**. 67 : 1239-1248.
- Howard, J., et al. (1990). "Teratospermic and normospermic domestic cats : ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing," **Journal of Andrology**. 11 : 204-215.
- Karja, N.W.K., et al. (2002). "In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of reproductive cycle," **Theriogenology**. 57 : 2289-2298.



- Luvoni, G.C., et al. (2003). "Conservation of feline semen part I : cooling and freezing protocols," **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 5 : 203-208.
- Platz, C.C., and Seager, S.W. (1978). "Semen collection by electroejaculation in the domestic cat [Abstract]," **Journal of American Veterinary Medicine Association**. 173 : 1353-1355.
- Pukazhenti, B., et al. (1999). "Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced chromosomal damage," **Biology of Reproduction**. 61 : 135-141.
- Rodriguez-Martinez, H. (2003). "Laboratory semen assessment and prediction of fertility : still utopia?," **Reproduction Domestic Animal**. 38 : 312-318.
- Rota, A., et al. (1997). "Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C," **Theriogenology**. 47 : 1093-1101.
- Tebet, J.M., et al. (2006). "Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa," **Theriogenology**. 66 : 1629-1632.
- Villaverde, A.I.S.B., Martins, M.I.M., Castro, V.B., and Lopes, M.D. (2006). "Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*)," **Theriogenology**. 66 : 1641-1644.
- Zambelli D., Cunto M. (2005). "Transcervical artificial insemination in the cat," **Theriogenology**. 64 : 698-705.
- Zambelli, D. and Cunto, M. (2006). "Semen collection in cats : techniques and analysis," **Theriogenology**. 66 : 159-165.
- Zambelli, D., Iacono, E., Raccagni, R. and Merlo, B. (2008). "Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen With or without Equex STM Paste," **Theriogenology**. 73 : 886-892.