The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 33
Issue 3 *September, 2003*

Article 5

9-1-2003

THE EPIDIDYMAL SPERM SURVIVAL INTERVAL FOLLOWING ORCHIDECTOMY IN DOGS

Sudson Sirivaidyapong

Theerawat Swangchan-uthai

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Sirivaidyapong, Sudson and Swangchan-uthai, Theerawat (2003) "THE EPIDIDYMAL SPERM SURVIVAL INTERVAL FOLLOWING ORCHIDECTOMY IN DOGS," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 33: Iss. 3, Article 5.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol33/iss3/5

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาช่วงเวลาในการมีชีวิตรอดของอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส ซึ่งเก็บภายหลังการทำหมันในสุนัข

สุดสรร ศิริไวทยพงศ์* ธีรวัฒน์ สว่างจันทร์อุทัย

Abstract

Sudson Sirivaidyapong* Theerawat Swangchan-uthai

THE EPIDIDYMAL SPERM SURVIVAL INTERVAL FOLLOWING ORCHIDECTOMY IN DOGS

The aim of the study was to investigate the motility and viability of canine epididymal spermatozoa, collected from the epididymides following orchidectomy (castration), over a period of time. Sperm samples were collected at 25-28°C from the caudal epididymis, 0, 1, 3, 6, and 12 hours, after the castration of 75 fertile dogs (1-10 years old). Progressive motility and viability of the epididymal sperm decreased over a period of time, after the collection. The epididymal sperm motility was 82.3±6, 76.3±8, 72.0±7, 60.3±9, and 22.7±20% while the percentage of viable spermatozoa was 85.5±5, 78.8±7, 77.5±7, 64.4±7, and 27.1±21 at 0, 1, 3, 6 and 12 h, respectively. At 12 h, some samples showed neither motility nor viability, after flushing from the epididymides, while some samples still demonstrated high motility and viability (60-70%). An additional study showed that the motility of epididymal sperm, stored and collected at temperatures higher than 37°C, dramatically decreased within 3 hours. It can be suggested that any delay in epididymal sperm collection results in a deterioration in sperm quality. However, when the epididymis is processed at 25-28°C, within 3 hours, the sperm characteristics remain little affected and the spermatozoa can be used as gamete resources.

Keywords : dog, sperm, epididymis, time, motility, viability

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330
***Corresponding author**

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

สุดสรร ศิริไวทยพงศ์* ธีรวัฒน์ สว่างจันทร์อุทัย

การศึกษาช่วงเวลาในการมีชีวิตรอดของอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส ซึ่งเก็บภายหลังการทำหมันในสุนัข

วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือการตรวจการรอดชีวิตของตัวอสุจิของสุนัข ที่เก็บได้จากท่ออิพิดิไดมิส ในช่วงเวลาต่างๆ คือ ที่ 0, 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ภายหลังการทำหมันในสุนัข ทำการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส (ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25-28°ซ.) จากสุนัขที่มีประวัติการเจริญพันธุ์ ซึ่งอายุอยู่ในช่วง 1-10 ปี จำนวน 75 ตัว โดยทำการเก็บภายหลังได้รับการทำหมันโดยการผ่าตัดนำอัณฑะออก ทำการชะล้างน้ำเชื้อโดยแยกเอาเฉพาะส่วนหางของท่ออิพิดิไดมิส และท่อนำน้ำเชื้อ ทำการตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และตัวอสุจิที่มีชีวิต พบการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่ากับร้อยละ 82.3±6, 76.3±8, 72.0±7, 60.3±9, 22.7±20 และ ร้อยละของอสุจิมีชีวิตเท่ากับ 85.5±5, 78.8±7, 77.5±7, 64.4±7, 27.1±21 ในชั่วโมงที่ 0, 1, 3, 6 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า คุณภาพอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการเก็บรักษาท่ออิพิดิไดมิสไว้ที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. นาน 6 ชั่วโมง และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า เมื่อเก็บรักษาท่ออิพิดิไดมิสไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 °ซ. อสุจิจะตายหมดภายในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง สรุปได้ว่า แม้ว่าอสุจิจะด้อยคุณภาพลงตามระยะเวลาของการเก็บ อสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสจากสุนัขนั้น สามารถเก็บและนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้เช่นเดียวกับอสุจิที่ได้จากการรีดเก็บน้ำเชื้อ อย่างไรก็ดี ควรทำการเก็บน้ำเชื้อให้ได้เร็วที่สุดเพื่อให้ได้อสุจิที่มีชีวิตและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีที่สุด โดยคุณภาพอสุจิจะยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ได้ถ้าทำการเก็บอสุจิภายในเวลา 3 ชั่วโมงภายหลังอัณฑะและท่ออิพิดิไดมิสถูกตัดออกและถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 °ซ.

คำสำคัญ : สุนัข, อสุจิ, อิพิดิไดมิส, ช่วงเวลา, การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ ตัวอสุจิที่มีชีวิต

บทนำ

การเก็บน้ำเชื้อ สามารถกระทำได้โดยการรีดด้วยมือ (digital manipulation) การใช้โยนีเทียม (artificial vagina) และการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electroejaculator) (Concannon, 1986; Johnston, 1991; Linde-Forsberg, 1991) น้ำเชื้อที่ได้ประกอบด้วย 3 ส่วน (fraction) ส่วนที่หนึ่ง (pre-sperm fraction) มีลักษณะเป็นของเหลวใสหลั่งออกมาจากต่อมลูกหมาก (prostate gland) และต่อมของเยื่อบุทางเดินปัสสาวะ (England and Allen, 1990) ส่วนที่สอง (sperm-rich fraction) มีลักษณะขาวขุ่นหรือสีครีม เป็นส่วนที่มีอสุจิจำนวนมาก (Arthur et al., 1982) สร้างมาจากท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) จากนั้นมาเจริญเติบโตเต็มที่และถูกเก็บไว้ที่ท่ออิพิดิไดมิสส่วนหาง หรือ tail of epididymis (Waites and Setchell, 1969) ส่วนที่สามเป็นของเหลวใสที่มาจากต่อมลูกหมาก (Andersen, 1980; Arthur et al., 1982; Morton and Bruce, 1989)

คุณภาพน้ำเชื้อสามารถบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของสุนัข และสามารถใช้น้ำเชื้อในการผสมเทียมได้ทั้งชนิดน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเก็บไว้ได้นาน และขนส่งได้ในระยะทางไกลๆ (Linde-Forsberg, 1995) สำหรับการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสนั้น จะไม่ได้น้ำเชื้อส่วนที่หนึ่ง และสาม แต่จะได้ส่วนที่สอง วิธีการเก็บนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการเจาะที่ท่ออิพิดิไดมิสจากอัณฑะที่อยู่ที่ตัวสัตว์ และวิธีการเก็บจากอัณฑะที่ตัดออกมาจากการทำหมันถาวรแล้วนำท่ออิพิดิไดมิสมาสับละเอียดเพื่อปล่อยอสุจิ หรือนำมาชะล้างอสุจิผ่านเข้าทางท่อนำน้ำเชื้อ อภิสิทธิ์ และคณะ (1996) รายงานว่า วิธีการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสของสุนัข โดยใช้วิธีการชะล้างด้วยสารละลาย TCM 199 (TCM 199 : M199 Powder No. 0887 Gibco BRL U.S.A. ± Hepes No. H3375 Sigma U.S.A. ± $NaHCO_3$ ± Penicillin ± Streptomycin) ชะล้างอสุจิผ่านเข้าทางท่อนำน้ำเชื้อ เมื่อประเมินคุณภาพอสุจิที่ได้ตามวิธีของ Johnston and

Johnston (1985) พบว่า อยู่ในเกณฑ์ปกติ นอกจากนี้ การชะล้างท่อนำน้ำเชื้อ ด้วย Egg Yolk Tris extender ยังได้อสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสส่วนหางในเกณฑ์ดีกว่าการตัดท่ออิพิดิไดมิสออกเป็นชิ้นเล็กๆ หรือสับละเอียด อีกด้วย (Sirivaidyapong, 2002)

อนึ่งเมื่อสัตว์ที่มีสายพันธุ์ดี แต่มีความจำเป็นต้องตัดอัณฑะออก หรือในกรณีที่สัตว์ไม่สามารถหลั่งน้ำเชื้อได้ตามปกติ รวมทั้งสัตว์ป่าหายากที่ใกล้จะสูญพันธุ์ เช่น Fox (*Vulpes spp.*) Grey wolf (*Canis lupus*) Bush dog (*Speathos venticus*) และหมาไน (Asian wild dog: *Cunon alpinus*) ซึ่งตายกะทันหัน วิธีหนึ่งที่จะช่วยเก็บรักษาสายพันธุ์และสงวนพันธุ์สัตว์นั้นไว้ และมีความเหมาะสมก็คือ การเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสโดยใช้วิธีการชะล้าง

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่า หลังจากตัดอัณฑะและอิพิดิไดมิสออกจากสัตว์ที่ยังมีชีวิต นานเท่าไหร่ที่คุณภาพอสุจิที่เก็บได้จากท่ออิพิดิไดมิสจะยังคงไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะเวลาในการมีชีวิตรอดของอสุจิ และคุณภาพอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสหลังจากการทำหมันโดยการตัดอัณฑะ (orchidectomy) ในสุนัข

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้สุนัขเพศผู้ สุขภาพแข็งแรง มีลักษณะทางเพศสมบูรณ์ และมีประวัติการสมบูรณ์พันธุ์ในเกณฑ์ปกติ อายุระหว่าง 1-10 ปี จำนวน 75 ตัว ที่ได้รับการทำหมัน ที่หน่วยสูติกรรม โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการทดลองเพิ่มเติม ใช้สุนัขอีกจำนวน 12 ตัว ที่มีประวัติการสมบูรณ์พันธุ์ในเกณฑ์ปกติ และมีอายุระหว่าง 1-8 ปี

ขั้นตอนการเก็บอสุจิ

ทำหมันสุนัขที่ผ่านเกณฑ์การประเมินข้างต้น โดยการผ่าตัดนำอัณฑะออก (orchidectomy) นำอัณฑะของสุนัขที่ได้ทั้งหมดแบ่งเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 15 ตัว ทำการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งการเก็บจะกระทำที่อุณหภูมิห้อ คือประมาณ 25-28°ซ. โดยกลุ่มที่ 1 เก็บอสุจิในระยะเวลา 0 ชั่วโมง (ทันที)

- กลุ่มที่ 2 เก็บอสุจิในระยะเวลา 1 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 3 เก็บอสุจิในระยะเวลา 3 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 4 เก็บอสุจิในระยะเวลา 6 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 5 เก็บอสุจิในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

นอกจากนี้ ในการทดลองเพิ่มเติม ได้ทำการแบ่งท่ออิพิดิไดมิสจากสุนัข 12 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่มเท่าๆกัน ในกลุ่มแรกเก็บอสุจิที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. ส่วนกลุ่มที่ 2 เก็บอสุจิที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในระยะเวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

การเตรียม Egg Yolk Tris extender โดยใช้สูตรของ Sirivaidyapong et al. (2000)

นำ Tris (hydroxymethyl aminomethane) 0.20 M., Citric acid monohydrate 0.06 M., Glucose 0.05 M., Penicillin, Potassium salt 500 IU/ml., Streptomycin sulphate 1000 ug/ml. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) เติมน้ำกลั่นให้เป็นสารละลาย 80 มล. ละลายให้เข้ากัน นำไข่แดงที่แยกจากไข่ขาวโดยวิธีการกลิ้งบนกระดาษกรองมา 20 มล. ทำการตีโดยใช้แท่งแก้วคนสารสลายโมเลกุลให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำไปผสมกับสารละลายที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ทำการผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปส่องดูความเป็นเนื้อเดียวกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงนำแบ่งใส่ภาชนะบรรจุ (eppendorf) หลอดละ 1 มล. และเก็บรักษาโดยใส่ในช่องแช่แข็ง

การเก็บน้ำเชื้อจากท่ออิพิดิไดมิส

นำ Egg Yolk Tris extender แช่แข็งที่เตรียมไว้ไปละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. จากนั้นนำอัณฑะที่ได้จากสุนัขภายหลังการทำหมันโดยตัดอัณฑะเตรียมไว้บนถาด ทำการตัดเปิดชั้น tuniga vaginalis ของอัณฑะด้วยกรรไกรตัดเนื้อเยื่อตัดแยกส่วน caudal ligament ของ อิพิดิไดมิส เพื่อแยกอิพิดิไดมิสออกจากอัณฑะ และตัดแยกส่วนของอิพิดิไดมิสออกจากนั้นตัดแยกเฉพาะส่วนหางของอิพิดิไดมิส (caudal part) ออกจากส่วนหัวและส่วนกลางของอิพิดิไดมิส สอดเข็มฉีดยาเบอร์ 21 หรือ 22 หรือ 23 (ขึ้นกับขนาดของท่อนำน้ำเชื้อ) ที่ตัดปลายแหลมออกแล้วเข้าไปในท่อนำน้ำเชื้อที่ต่อกับส่วนหางของอิพิดิไดมิส ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลาย extender ปริมาตร 1 มล. ต่อเข้ากับเข็ม ทำการชะล้างไล่อสุจิให้ออกมาทางอีกปลายของท่ออิพิดิไดมิสลงในภาชนะรองรับ นำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และตรวจตัวอสุจิมีชีวิต ทำการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสอีกข้างหนึ่งเช่นเดียวกัน โดยในลำดับแรกจะทำการรวมอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสทั้งสอง

ข้างของสุนัขตัวเดียวกัน เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นไม่พบความแตกต่างของคุณภาพอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสทั้งสองข้างของสุนัขตัวเดียวกันที่มีประวัติความสมบูรณ์พันธุ์ โดยมีขนาดและลักษณะของท่ออิพิดิไดมิสอยู่ในเกณฑ์ปกติ(Sirivaidyapong, 2002)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

หยดสารละลายน้ำเชื้อบนแผ่นสไลด์แก้วจำนวน 1 หยด ที่อุ่นไว้ในถาดควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ. ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ สังเกตโดยใช้กำลังขยายของกล้อง 400 เท่า ประเมินเฉพาะตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวไปข้างหน้า และทำการบันทึกผลเป็นร้อยละการเคลื่อนไหว

การตรวจตัวอสุจิมีชีวิตและตัวไม่มีชีวิต

ใช้สารละลายน้ำเชื้อเจือจาง 1 หยด หยดลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย eosin-nigrosin 1 หยด คนให้เข้ากันประมาณ 3-5 วินาที ปาดบนแผ่นสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยนับตัวอสุจิ 100 ตัว แล้วทำการบันทึกผล โดยอสุจิเฉพาะตัวตายที่จะติดสีย้อมเป็นสีชมพูม่วง อสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพอสุจิ ทั้งร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและร้อยละอสุจิมีชีวิต ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้วิธี ANOVA และ Tukey's Studentized Range (HSD) Test ($p<0.05$)

ผล

จากท่ออิพิดิไดมิสของสุนัข 15 ตัวในแต่ละกลุ่ม พบว่าร้อยละของอสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงตามระยะเวลา (ตารางที่ 1a) โดยเมื่อทำการเก็บอสุจิภายหลังการผ่าตัดอัณฑะออกจากตัวสุนัขทันที จะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 82.3±6 และเมื่อทิ้งไว้ 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงเหลือร้อยละ 76.3±8, 72.0±7, 60.3±9 และ 22.7±20 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1

ส่วนร้อยละของอสุจิมีชีวิตก็จะลดลงเช่นกัน (ตารางที่1b) โดยค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 85.5±5 เมื่อเก็บทันที และลดลงเหลือ 78.8±7, 77.5±7, 64.4±7 และ 27.1±21 % เมื่อเก็บในชั่วโมงที่ 1, 3, 6 และ 12 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 (a) และ (b) แสดงร้อยละของอสุจิในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และร้อยละของอสุจิมีชีวิตของอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสสุนัข 5 กลุ่ม (กลุ่มชั่วโมงที่ 0, 1, 3, 6 และ 12) กลุ่มละจำนวน 15 ตัว รวม 75 ตัว ที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการทำหมันโดยการตัดอัณฑะ

(a)

ชั่วโมง	0	1	3	6	12
สุนัข	การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (%)				
1	85	80	80	70	60
2	90	70	70	75	0
3	80	80	75	60	40
4	85	75	75	65	25
5	80	85	70	65	45
6	80	70	80	50	30
7	85	75	75	55	20
8	90	85	65	55	0
9	85	90	60	45	0
10	85	70	65	60	25
11	80	65	70	75	0
12	70	60	85	50	25
13	90	80	65	55	0
14	70	85	70	60	50
15	80	75	75	65	20

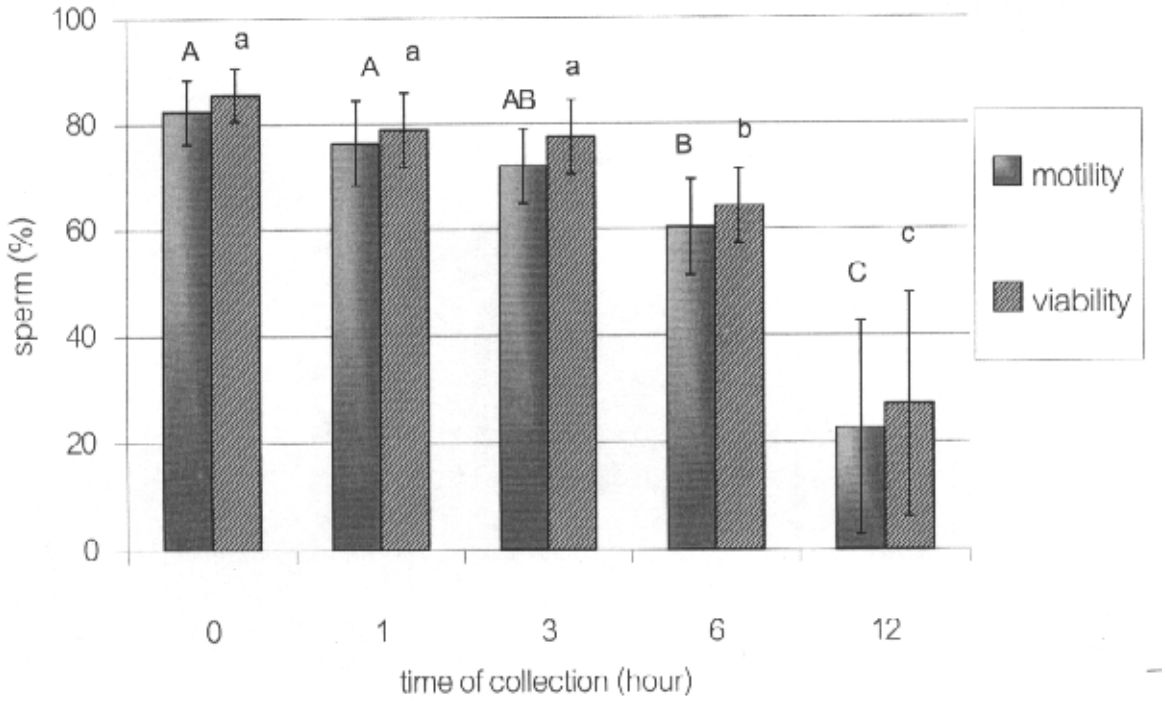
(b)

ชั่วโมง	0	1	3	6	12
สุนัข	อสุจิที่มีชีวิต (%)				
1	89	84	85	72	64
2	92	72	75	74	0
3	85	82	80	68	43
4	88	78	77	65	28
5	86	85	84	69	46
6	82	74	71	56	39
7	87	78	75	59	30
8	94	87	83	62	0
9	85	90	88	54	3
10	82	76	74	65	28
11	84	68	69	78	9
12	78	66	65	54	29
13	91	82	78	62	0
14	76	83	85	62	61
15	83	77	74	66	27

ในการทดลองเพิ่มเติมพบว่าการเก็บอสุจิจากอิพิดิไดมิสที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. ในทันที และที่เวลา 3 ชั่วโมง ร้อยละของอสุจิในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยเท่ากับ 85.5±3 และ 81.8±3 พบอสุจิมีชีวิตร้อยละ 88.3±4 และ 85.5±3 ตามลำดับ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในทันที และที่ 3 ชั่วโมงนั้น การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 86.5±5 และ 0 อสุจิมีชีวิตเท่ากับร้อยละ 87.8±3 และ 0 ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อทำการทำหมันสุนัขเพศผู้โดยวิธีการตัดอัณฑะ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันอยู่ทั่วไป แล้วนำอัณฑะมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. ก่อนนำมาตัดแยกท่ออิพิดิไดมิส แล้วทำการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสส่วนหางด้วยวิธีการ fine needle flushing (Sirivaidyapong, 2002) พบว่าเมื่อทิ้งอัณฑะไว้ภายนอกร่างกาย 3 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บอสุจิ ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิค่อยๆ ลดลง แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1) เมื่อทำการเก็บในชั่วโมงที่ 6 จึงพบว่า ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงเหลือ 60.3±9 % ซึ่งแตกต่างจากการเก็บ



ภาพที่ 1 แสดงแผนภาพค่าเฉลี่ยร้อยละของอสุจิในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และร้อยละของอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส ที่มีชีวิตจากสุนัขจำนวน 75 ตัวที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการทำหมันโดยการตัดอัณฑะ โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน (A, B, C, D และ a, b, c, d ตามลำดับ)

ที่ชั่วโมงที่ 0 และ 1 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่เก็บในชั่วโมงที่ 3 จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 12 จึงการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าจึงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนจำนวนอสุจิที่มีชีวิตนั้น สามารถเห็นได้ชัดว่า จะลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเก็บไว้ที่ 12 ชั่วโมง โดยก่อนหน้านั้นที่ 6 ชั่วโมง แม้จำนวนอสุจิมีชีวิตจะลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ต่างจากการเก็บอสุจิที่ชั่วโมงที่ 0, 1 และ 3 แต่เมื่อตรวจการมีชีวิตของอสุจิที่ 6 ชั่วโมง ยังพบร้อยละการรอดชีวิตของอสุจิถึง 64.4±7 (ภาพที่ 1) การลดลงของร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และตัวอสุจิมีชีวิตอาจเนื่องมาจากเมื่อเก็บไว้ที่ระยะเวลาหนึ่ง ของเหลวภายในอัณฑะ และในท่ออิพิดิไดมิส จะลดปริมาณลง หรือเริ่มแห้งลง ทำให้คุณสมบัติของอสุจิลดลงตามมา ในกรณีการตัดอัณฑะ และท่ออิพิดิไดมิสออก แล้วนำมาแช่ในของเหลวบางชนิด เช่นสารละลายบัฟเฟอร์ หรือน้ำยาละลายน้ำเชื้อ อาจทำให้การแห้งระเหยของของเหลวภายในท่ออิพิดิไดมิสช้าลงก็เป็นได้

อนึ่ง ได้มีรายงานของการเก็บรักษาอัณฑะในตู้เย็น หรือแช่น้ำแข็ง หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 4-7°ซ. โดย Yu and Leibo (2002) พบว่าเมื่อเก็บอัณฑะและอิพิดิไดมิสไว้ในตู้เย็น 4°ซ. เป็นเวลา 5 ชั่วโมง อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิจากอิพิดไดมิสจะลดลงจากร้อยละ 50 ไปอยู่ประมาณร้อยละ 30 และลดลงเรื่อยๆ และสามารถพบอัตราการเคลื่อนที่ได้ที่เวลา 196 ชั่วโมง หรือ 8 วันหลังการแช่อัณฑะไว้ในตู้เย็น โดยมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำไปเป็นข้อมูลการเก็บอสุจิของสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ แต่อย่างไรก็ดี การทดลองดังกล่าวได้ทำการแช่อัณฑะไว้นำน้ำเกลือ (0.9% saline solution) ทันทีภายหลังอัณฑะถูกตัดออกจากตัวสัตว์ และเก็บไว้ในตู้เย็นในน้ำเกลือเช่นกัน

ซึ่งในทางปฏิบัติแล้ว ในกรณีที่มีสัตว์ป่าหายากตายลง ความเป็นไปได้ที่จะนำอัณฑะแช่ในน้ำเกลือทันทีนั้นมีน้อยมาก ส่วนใหญ่อัณฑะจะคงอยู่ที่ตัวสัตว์ภายหลังการตาย ซึ่งอุณหภูมิร่างกายจะค่อยๆ ลดต่ำลง ใกล้เคียงกับอุณหภูมิแวดล้อม ซึ่งมีสภาพใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้มากกว่า

ถ้าอสุจิไม่ได้รับการเติมสารละลายน้ำเชื้อ (semen extender) หรืออัณฑะไม่ได้รับการทำให้ชุ่มชื้นเช่นในการศึกษาของ Yu and Leibo (2002) จะทำให้การเคลื่อนไหวของอสุจิลดลงอย่าง อย่างรวดเร็ว (Morton and Bruce, 1989) เนื่องจากการลดอุณหภูมิลงโดยไม่ได้มีการเติมน้ำยาละลายน้ำเชื้อ ให้กับตัวอสุจิ จะทำให้อสุจิเสียหายจากอุณหภูมิที่ต่ำลง (cold shock)

นอกจากนี้ การศึกษาเพิ่มเติมถึง การเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส ที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. เปรียบเทียบกับการเก็บอสุจิที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในระยะเวลา 0 และ 3 ชั่วโมง ยังพบว่า การเก็บอัณฑะ และท่ออิพิดิไดมิส ไว้ 3 ชั่วโมงก่อนการเก็บอสุจิที่อุณหภูมิ 37°ซ. จะพบการลดลงของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและตัวอสุจิมีชีวิตถึงร้อยละ 0 หรือ อสุจิได้ตายทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่อุณหภูมิในระดับอุณหภูมิร่างกาย หรือที่ 37°ซ. อาจทำให้เกิดการระเหยของของเหลวในอัณฑะ และท่ออิพิดิไดมิส อย่างรวดเร็ว ทำให้อสุจิตาย หรือที่อุณหภูมิในระดับนี้ อสุจิอาจเกิดคาร์ปาสิเตชั่น (capacitation) และเกิดปฏิกิริยาอโครโซม (acrosome reaction) ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้อสุจิตายลงได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน (Sirivaidyapong et al., 2000)

นอกจากนี้ การศึกษานี้ส่วนหนึ่งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานในท้องที่ ซึ่งสัตวแพทย์อาจจำเป็นที่จะต้องเก็บอสุจิที่อยู่ในท่ออิพิดิไดมิสจากสัตว์ที่ตายลงอย่างกระทันหัน เช่น ในสัตว์ป่ามีค่า หรือใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส ควรจะกระทำที่อุณหภูมิระหว่าง 25-28°ซ. ซึ่งไม่มีความยุ่งยากนักในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 25-28°ซ. ได้ อาจมีความจำเป็นต้องทำการเก็บอสุจิให้ได้เร็วที่สุด หรือถ้าไม่สามารถทำการเก็บอสุจิได้ อาจทำการแช่เย็นอัณฑะและท่ออิพิดิไดมิสไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ. โดยแช่อัณฑะในน้ำเกลือ หรือ 0.9% saline solution (Yu and Leibo, 2002)

สรุป

การพัฒนาเทคนิค ทักษะวิธีการเก็บ และประเมินคุณภาพอสุจิ ที่เก็บจากท่ออิพิดิไดมิสส่วนหางในสุนัขด้วยวิธีการชะล้าง จะเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้า และพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ในตระกูลสุนัข ผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่า การเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสของสุนัข ภายหลังการตัดแยกอัณฑะออกด้วยการทำหมันโดยการตัดอัณฑะ ควรควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษาอัณฑะ และอุณหภูมิในการชะล้างอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสส่วนหาง ให้อยู่ระหว่าง 25-28°ซ. โดยอาจทิ้งไว้ได้ถึง 3-6 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถเก็บได้อาจต้องทำการเก็บรักษาท่ออิพิดิไดมิสไว้ในน้ำเกลือ 0.9% ในตู้เย็นที่ประมาณ 4°ซ. อย่างไรก็ดี การเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสสุนัข ภายหลัง

การเก็บตัดอัณฑะออก 6-12 ชั่วโมง จะได้อสุจิที่มีคุณภาพต่ำ อาจนำอสุจิจำนวนน้อยที่อยู่ในเกณฑ์ปกตินั้นไปใช้ได้ โดยใช้เทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ เช่น การปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*In vitro* fertilization) หรือ การฉีดตัวอสุจิเข้าสู่โอโอไซต์โดยตรง (Intra-cytoplasmic sperm injection; ICSI) ผลการศึกษานี้เป็นการเพิ่มพูนความรู้ด้านระยะเวลาที่เหมาะสม ในการเก็บอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิส เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการเก็บรักษาอสุจิ สำหรับการสงวนพันธุ์ และรักษาสายพันธุ์สัตว์ที่ดี และหายากต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยเงินทุนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

อภิสิทธิ์ ปราการกมานันท์ อังคณา เลิศฤทธิ์ศิริกุล ชัยณรงค์ โลหชิต สุดสรร ศิริไวทยพงศ์ และ เกวลี ฉัตรดรงค์ 1996 (2539) การเก็บและประเมินคุณภาพอสุจิจากท่ออิพิดิไดมิสในสุนัข โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2539 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Andersen, K. 1980. Artificial insemination and storage of canine semen. In: Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals. D.A. Morrow (ed). Philadelphia: W. B. Saunders. 661-665.

Arthur, G.H., Noakes, D.E. and Pearson, H. 1982. Normal sexual apparatus. In: Veterinary Reproduciton and Obstetrics (Theriogenology). 5thed. London: Bailiere Tindall. 417-430.

Concannon, P.W. 1986. Canine physiology of reproduction. In: Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment. T.J. Burke (ed). Philadelphia: Lea & Febiger. 22-77.

England, G.C.W. and Allen, W.E. 1990. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. Res. Vet. Sci. 49: 66-70.

Johnston, S.D. and Johnston, G.R. 1985. Finding the cause of male reproductive insufficiency. In: Fall Conference for Veterinarian; Diagnosis of Reproductive Disease in the Dog and Cat. Minnesota. 32-54.

Johnston, S.D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Vet. Clin. North. Am. Sm. Anim. Pract. 21: 545.

Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet. Clin. North. Am. Sm. Anim. Pract. 21: 467-485.

Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. In: Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal). 10(1): 48-58.

Morton, D.B. and Bruce, S.G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. J. Reprod. Fertil. Suppl. 39: 311-316.

Sirivaidyapong, S. 2002. Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods. Proc. of The 3rd EVSSAR Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liege, Belgium. May: 170.

Sirivaidyapong, S., Cheng, F.P., Marks, A., Voorhout, W.F., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. Theriogenology. 53(3): 789-802.

Waites, G.M.H. and Setchell, B.P. 1969. Physiology of the testis, epididymis and scrotum. In: Advances in Reproductive Physiology. Vol. 4. New York. 27-33.

Yu, I. and Leibo, S.P. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. Theriogenology. 57: 1179-1190.