

ผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและการเสริมกลูตาไทโอน
หลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพพอสุจิและอัตราการผสมติด
ในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

พัชรา ธนานุรักษ์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์
มิถุนายน 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม



ผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและการเสริมกลูตาไทโอน
หลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพพอสุจิและอัตราการผสมติด
ในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

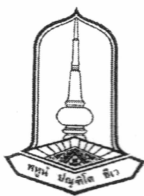
พัชรา ธนานุรักษ์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

มิถุนายน 2558

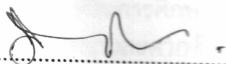
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม





คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวพัชรา ธนานุรักษ์
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

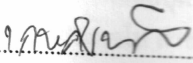
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....

(อาจารย์ ดร.จักรพงษ์ ชายคง)

ประธานกรรมการ


(กรรมการบัณฑิตศึกษาประจำคณะ)


.....

(อาจารย์ ดร.เกษศิรินทร์ ศักดิ์วิวัฒน์กุล)

กรรมการ

(อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก)


.....

(รศ.ดร.เวรินทร์ วงษ์พระลับ)

กรรมการ

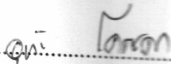
(อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)


.....

(รศ.ดร.ทรงศักดิ์ จำปาหวาด)

กรรมการ

(กรรมการบัณฑิตศึกษาประจำคณะ)


.....

(ผศ.ดร.อุทัย โคตรคก)

กรรมการ

(ผู้ทรงคุณวุฒิ)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม


.....

(รศ.ดร.อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี


.....

(ศ.ดร.ประดิษฐ์ เทอดทูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 เดือน 10 พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการพัฒนาในระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก อาจารย์ ดร. เกษศิรินทร์ ศักดิ์วิวัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร.จักรพงษ์ ชายคง ประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.ทรงศักดิ์ จำปาวะดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทัย โคตรดก กรรมการสอบ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ที่ให้ความอนุเคราะห์ฟาร์มไก่พื้นเมือง ขอขอบพระคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และสำนักเทคโนโลยีทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ ร.ต.ท.เวียงชัย ธนานุรักษ์ และ ดร.รัตนวรรณ ธนานุรักษ์ ผู้ให้ความรักคอยดูแลอบรมสั่งสอนบุตริ สนับสนุนให้มีโอกาสทางการศึกษา และเป็นกำลังในที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จการศึกษา

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

พัชรา ธนานุรักษ์



ชื่อเรื่อง	ผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและการเสริมกลูตาไทโอนหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง
ผู้วิจัย	นางสาวพัชรา ธนานุรักษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวศาสตร์
กรรมการควบคุม	อาจารย์ ดร.เกษศิริพันธ์ ศักดิ์วิวัฒน์กุล และรองศาสตราจารย์ ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีที่พิมพ์ 2558

บทคัดย่อ

ไก่พื้นเมืองมีความสำคัญทั้งในแง่สังคม เศรษฐกิจ และความมั่นคงทางด้านอาหารของชาชนบท แต่พบว่าในปัจจุบันมีความเสี่ยงต่อการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพที่สำคัญต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมของไก่ คือ เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองด้วยการแช่แข็ง จึงทำการศึกษาใน 3 การทดลองเพื่อศึกษาผลน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ, ผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และผลของการเสริมกลูตาไทโอนหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

การทดลองที่ 1 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ) และอัตราการผสมติด ระหว่างน้ำยาเจือจาง 4 สูตร คือ Schramm, IGGKPh, EK diluent และ PVP based medium ศึกษาในไก่พันธุ์ประดู่หางดำ โดยใช้ DMF เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรน้ำเชื้อบรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร มีอสุจิประมาณ 500×10^6 ตัว/หลอด แช่แข็งโดยอองไอนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที และ -135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อที่ 5 องศาเซลเซียส จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งจากการศึกษาพบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และ EK diluent ให้ผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง ในลักษณะของอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ ($p < 0.05$) และอัตราการเคลื่อนที่ใหม่ ($p < 0.01$) มากกว่าน้ำยาสูตร IGGKPh และ PVP based medium ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผสมติด ($p < 0.01$) และผลของปฏิกริยาการเกิดลิดเปอร้ออกซิเดชันต่อตัวอสุจิที่ผ่านการแช่แข็งและการละลาย ($p < 0.01$)

การทดลองที่ 2 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางสูตร EK ศึกษาในไก่พันธุ์ประดู่หางดำ โดยใช้ DMF เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรน้ำเชื้อ บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร มีอสุจิประมาณ 500×10^6 ตัว/หลอด แช่แข็งโดยอองไอนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที และ -135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อที่ 5 องศาเซลเซียส จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง จากการศึกษพบว่า



น้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล นั้นช่วยปรับปรุงอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติด ($p < 0.01$)

การทดลองที่ 3 ศึกษาการเสริมกลูตาไทโอนภายหลังการละลายเมื่อผ่านการเก็บรักษา น้ำเชื้อแบบแช่แข็งไ้พื้นเมืองภายใต้วิธีการลดอุณหภูมิแช่แข็งโดยการอังไ้ไนโตรเจน โดยใช้ไ้พื้นเมือง ประดู๋ทางดำ อายุ 10 เดือน จำนวน 24 ตัว และแม่ไ้พันธุ์ทางการค้า อายุ 51 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว ทำการศึกษาการเสริมกลูตาไทโอนภายหลังการละลายที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนระดับ 1 มิลลิโมล ภายหลังการละลาย มีผลทำให้ระดับการเกิดลิดเปอร้ออกซิเดชัน น้อยที่สุด แต่มีผลทำให้อัตราการผสมติดต่ำลงตามไปด้วย แต่ในการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล ภายหลังการละลาย ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอด อัตราการเคลื่อนที่ เปอร์เซนต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซม เปอร์เซนต์การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติดของอสุจิไ้พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง จากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำข้อมูลไปพิจารณาไปใช้ ประโยชน์ในการเพาะขยายพันธุ์ หรือการอนุรักษ์สายพันธุ์ไ้พื้นเมืองไทยในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm สามารถปรับปรุงอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติด ให้ดีขึ้น และการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล ภายหลังการละลาย สามารถช่วยลดระดับการเกิดปฏิกิริยาลิดเปอร้ออกซิเดชันในตัวอสุจิไ้พื้นเมืองได้

คำสำคัญ : น้ำยาเจือจาง, ทรีฮาโลส, กลูตาไทโอน, การแช่แข็ง, ไ้พื้นเมือง



TITLE Effects of Supplementation of Trehalose in Semen Extender and Glutathione in Thawing Medium on the Quality and Fertility of Cryopreserved Native Chicken Spermatozoa

AUTHOR Miss Pachara Thananurak

DEGREE Master Degree of Science **MAJOR** Animal Sciences

ADVISORS Kedsirin Sakwivatkul, Ph.D
Assoc. Prof. Thevin Vongpralub, Ph.D

UNIVERSITY Mahasarakham University **DATE** 2015

ABSTRACT

Native chickens are important to the village community, not only as a source of income but also food security. But, it was found in the present that it is risky for the lost of genetic diversity. The reproductive technology for genetic conservation of chickens, is the semen cryopreservation. The objective of this study was to the cryopreservation technique for native chicken semen. Three experiments were conducted to determine the effects of various extender, effects of supplementation of trehalose in semen extender and effects of glutathione in thawing medium on quality and fertility of cryopreserved native chicken spermatozoa

Experiment 1, The aim of this present study was to compare various diluents on the semen qualities (motility and viability rate) and fertility rate between diluted semen with various diluent (Schramm, IGGKPh, EK diluent, and PVP based medium). The semen was collected from Thai native (Pradu Hang Dam), cooled down to 5 °C and diluents which DMF was added (6% DMF of final volume). Semen was loaded into 0.5 ml straws with sperm concentration of 500×10^6 /straw. Semen straws were placed in stylofoam box containing liquid nitrogen at -35 °C for 10 min. and located at -135 °C for 5 min. Then plunged into liquid nitrogen Straws were thawed in cold water at 5 °C. The result of experiment showed that Schramm and EK diluents were superior to IGGKPh and PVP based medium. The post-thaw viability of sperm ($p < 0.05$), motility of sperm ($p < 0.01$), fertility rate ($p < 0.01$) and level of lipid peroxidation ($p < 0.01$)

Experiment 2, The aim of this present study was to effects of supplementation of trehalose in semen extender. The semen was collected from Thai native (Pradu Hang Dam). Semen sample were diluted with Schramm diluents, than, diluted with extender with difference concentrations of trehalose (0, 5, 10 and 15 mM) and diluted with EK diluents, than diluted with extender with different concentrations of trehalose (0, 25, 50 and 75 mM). Cooled down to 5°C and diluents which DMF was added (6% DMF of final volume). Semen was loaded into 0.5 ml straws with sperm concentration



of 500×10^6 /straw. Semen straws were placed in stylofoam box containing liquid nitrogen at -35°C for 10 min. and located at -135°C for 5 min. Then plunged into liquid nitrogen Straws were thawed in cold water at 5°C . The result of experiment showed that supplementation of 5 mM trehalose in Schramm extender significantly improved the post-thaw sperm motility, sperm viability, acrosomal integrity, mitochondria activity and fertility rate ($P < 0.01$)

Experiment 3, In this study present evaluated the effects of glutathione (GSH; 0, 0.1, 0.5 and 1 mM) supplementation of the thawing extender on parameter of frozen-thawed chicken semen. The semen was collected from 24 Thai native (Pradu Hang Dam) and fertility tests in 48 laying hens (Isa Brown). The result of experiment showed that the effect of addition of GSH level to the mitochondrial potential, Integrity of plasma and acrosomal membranes did not have significant effect on standard semen parameter. And adding 5 mM GSH to thawing media resulted in a decrease in the number of spermatozoa with reduction of the reactive oxygen species generation and fertility rate. The information derived from this study suggests the importance of oxidative stress as responsible for cryo-injury to spermatozoa and opens new windows to explore the practical application to improve the quality of post-thaw chicken semen.

In conclusion, this is the report in native chicken spermatozoa showing that supplementation of 5 mM trehalose in Schramm extender significantly improve the motility, viability, membrane integrity, acrosome integrity and fertility of cryopreserved native chicken spermatozoa. Supplementation of GSH in the semen thawing medium can reduce lipid peroxidation in post-thawed native chicken spermatozoa.

Key Words: extender, trehalose, glutathione, cryopreserved, native chicken



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพประกอบ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 อสุจิของสัตว์ปีก (spermatozoas)	4
2.2 ท่อส่งอสุจิ (excurrent ducts)	5
2.3 การหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculation)	6
2.4 การเมตาบอลิซึมของอสุจิ	6
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเมตาบอลิซึม	7
2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการผสมติดในไก่	7
2.5 การผสมเทียมในสัตว์ปีก (Artificial Insemination in Poultry)	9
2.5.1 ความลึกและตำแหน่งในการผสมเทียม	9
2.5.2 ความถี่ของการผสมเทียม	9
2.5.3 จำนวนอสุจิและปริมาตร	10
2.5.4 การเดินทางของอสุจิและการปฏิสนธิ	10
2.6 การเก็บรักษาตัวอสุจิด้วยวิธีแช่แข็ง (cryopreservation of spermatozoa)	10
2.6.1 การเจือจางน้ำเชื้อ (semen dilution)	10
2.6.2 หลักการทั่วไปในการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง	13
2.6.3 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง (pre-freeze cooling)	14
2.6.4 การเติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant addition)	14
2.7 ทรีฮาโลส (Trehalose)	16
2.8 การแช่แข็งตัวอสุจิ (sperm freezing)	24
2.9 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง	25
2.10 การเกิด Reactive Oxygen Species (ROS)	25
2.11 การเกิด oxidative stress และการเกิด lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ	26
2.12 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเกิด oxidative stresses และการทำงานของอสุจิ	27



	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	32
3.1 แผนการดำเนินการวิจัย	32
3.1.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง	32
3.1.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับของการเสริมทรีฮาโลสในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	39
3.1.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพของอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง	41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย	44
4.1 การทดลองที่ 1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง	44
4.1.1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการรอดชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	44
4.1.2 ผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	45
4.1.3 ผลของน้ำยาเจือจางต่อระดับลิวติเนอโรออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	47
4.1.4 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	48
4.2 การทดลองที่ 2 ผลของระดับการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	50
4.2.1 ผลของระดับการเสริมทรีฮาโลสต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	50
4.2.2 ผลของระดับทรีฮาโลสต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	54
4.2.3 ผลของระดับทรีฮาโลสต่อการของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	55
4.2.4 ผลของระดับทรีฮาโลสที่ต่อระดับลิวติเนอโรออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	58
4.2.5 ผลของระดับทรีฮาโลสที่เหมาะสมต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	58



4.3 การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อคุณภาพและอัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	60
4.3.1 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	60
4.3.2 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	64
4.3.3 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง	66
4.3.4 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	68
4.3.5 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง	70
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	72
5.1 สรุปผลการทดลอง	72
5.2 ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารอ้างอิง	73
ประวัติผู้วิจัย	87



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสุตรน้ำยาเจือจางต่อ 1,000 มิลลิลิตร	12
ตารางที่ 2.2 ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสต่อเปอร์เซ็นต์ motility, membrane integrity และ acrosome integrity ของอสุจิในสัตว์แต่ละชนิด	20
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสุตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ	33
ตารางที่ 3.2 ค่า Analysis setup	36
ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งจากการทำการทดลอง 6 ซ้ำ (Mean \pm SE; n=6)	46
ตารางที่ 4.2 อัตราการผสมติดของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ชนิดของน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)	49
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไวก์พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง (Mean \pm SE; n=6)	53
ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (Mean \pm SE; n=6)	57
ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (Mean \pm SE; n=6)	57
ตารางที่ 4.6 ระดับทรีฮาโลสที่เหมาะสมต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไวก์พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง (Mean \pm SE; n=6)	58
ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมทรีฮาโลสในระดับที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)	59
ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไวก์พื้นเมืองที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการแช่แข็ง ประเมินในช่วงเวลาที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)	62
ตารางที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไวก์พื้นเมืองที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการแช่แข็ง ประเมินในช่วงเวลาที่ 1 (Mean \pm SE; n=6)	63
ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางหลังการละลายประเมินในช่วงเวลาที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)	65
ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางหลังการละลายประเมินในช่วงเวลาที่ 1 (Mean \pm SE; n=6)	65
ตารางที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายในช่วงเวลาที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)	67



ตารางที่ 4.13	เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายในชั่วโมงที่ 1 (Mean \pm SE; n=6)	67
ตารางที่ 4.14	ปริมาณ malondialdehyde (MDA) จากอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอน (GSH) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย (Mean \pm SE; n=6)	69
ตารางที่ 4.15	เปอร์เซ็นต์การผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อที่มีการเสริมกลูตาไทโอน (GSH) ในระดับที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)	70



สารบัญภาพประกอบ

	หน้า	
ภาพประกอบ 2.1	ลักษณะอสุจิของสัตว์ปีก	4
ภาพประกอบ 2.2	ส่วนประกอบของตัวอสุจิสัตว์ปีกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
ภาพประกอบ 2.3	sertoli cells (ซ้าย) และ spermatogonia (ขวา) ที่อยู่ภายใน seminiferous tubule	5
ภาพประกอบ 2.4	cloaca ไก่ตัวผู้	6
ภาพประกอบ 2.5	แผนภาพของผลกระทบที่เป็นไปได้ในการลดอนุมูลอิสระและการกลับมาทำให้อุ่นขึ้นอีกครั้งต่อการกระจายตัวของไขมันรอบเยื่อหุ้มโปรตีน	16
ภาพประกอบ 2.6	โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโลส	17
ภาพประกอบ 2.7	กระบวนการการทำงานของทรีฮาโลส	18
ภาพประกอบ 2.8	สภาพเซลล์อสุจิของสัตว์ทั่วไปเมื่อมีการลดอนุมูลอิสระและการละลายในอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน	25
ภาพประกอบ 2.9	กลไกในการผลิต ROS เพิ่มขึ้นจากตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ	28
ภาพประกอบ 2.10	กระบวนการเกิดปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชันและระบบการป้องกันของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอสุจิ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจจะไปลดการทำงานของ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) ตามเส้นประ (----) ซึ่งเป็นกรายอมให้ผลิตผลของ ROS ภายนอกมีผลต่อการสะสม lipid peroxides ที่เป็นพิษและพัฒนาเป็นปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน	29
ภาพประกอบ 3.1	อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)	34
ภาพประกอบ 4.1	ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง	44
ภาพประกอบ 4.2	ลักษณะของอสุจิที่ย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยสี SYBER -14 ร่วมกับ propidium iodide (PI) และประเมินคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า สีเขียว คือ ลักษณะอสุจิไก่พื้นเมืองที่มีชีวิตที่ติดสี SYBRE-14 สีแดง คือ ลักษณะอสุจิไก่พื้นเมืองที่ไม่มีชีวิตที่ติดสี PI	45
ภาพประกอบ 4.3	ค่าเฉลี่ยปริมาณ malondialdehyde (MDA) จากตัวอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ชนิดของน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกัน (ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์)	48
ภาพประกอบ 4.4	ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง ประเมินด้วยสี fluorescein Isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)	56



ภาพประกอบ 4.5	<p>การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง ประเมินโดยใช้ 5, 5', 6, 6'- tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl- carbocyanine iodide (JC-1) และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)</p>	56
ภาพประกอบ 4.6	<p>ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)</p>	66
ภาพประกอบ 4.7	<p>การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินโดยใช้ 5, 5', 6, 6'- tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl- carbocyanine iodide (JC-1) และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)</p>	68



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ไก่พื้นเมือง (*Gallus domesticus*) เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของสังคมชนบทไทย สืบเนื่องยาวนานจากอดีตจนถึงปัจจุบัน ไก่พื้นเมืองสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิศาสตร์และอุณหภูมิของประเทศไทยเป็นอย่างดี การอนุรักษ์พันธุ์กรรมจึงมีความสำคัญต่อความหลากหลายทางชีวภาพ เทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ คือ การผสมเทียม (artificial insemination; AI) ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมและขยายพันธุ์สัตว์ ในขณะที่การเก็บรักษาตัวอสุจิแบบแช่แข็งจัดเป็นวิธีที่ยืดอายุการเก็บรักษาพันธุ์กรรมที่สำคัญของสัตว์ให้ยาวนานขึ้น (Hu et al., 2009) จึงถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงหลายชนิด และเป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์ในการรักษาพันธุ์กรรมจากสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ด้วย (Axner et al., 2004)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อและการผสมเทียมนั้นสามารถกระจายพันธุ์กรรมสัตว์ที่ต้องการได้โดยสะดวกและเป็นประโยชน์ในเรื่องการประหยัดต้นทุนในการเลี้ยงดูพ่อพันธุ์ การควบคุมโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์สามารถจัดคู่ผสมพันธุ์ของไก่ที่อยู่ห่างไกลกันได้ และยังช่วยลดปัญหาการผสมในธรรมชาติที่อาจเกิดปัญหาจากคู่ผสมมีขนาดตัวต่างกัน (Phillips et al., 1996; Blesbois, 2007) การทำน้ำเชื้อแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่ จะพบปัญหาการผสมติดต่ำ (Donoghue and Wishart, 2000) จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการผสมติดของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำเชื้อสดเท่านั้นเอง ทั้งนี้เนื่องจากตัวอสุจิไก่มีไซโทพลาสซึมปริมาณน้อยและมีพื้นที่ผิวมากเมื่อเทียบกับอสุจิโค ดังนั้นจึงพบว่าเมื่อทำการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อไก่ อสุจิไก่จะพบความเสียหายของโครงสร้างต่างๆ รวมถึง mitochondria โดยมีการสูญเสีย ATP ไปประมาณ 3-6 เท่า เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด จึงทำให้อสุจิไก่ไม่สามารถดำรงชีวิตได้อย่างยาวนานในระบบสืบพันธุ์ไก่ตัวเมีย (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550)

ข้อจำกัดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่แข็ง คือ ในขั้นตอนการแช่แข็ง ความเย็นเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ตัวอสุจิเกิดความเสียหายอย่างรุนแรง ทำให้คุณภาพของตัวอสุจิลดลง มีผลกระทบต่อ การเคลื่อนที่ (motility) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosomal integrity) (Blesbois et al., 2008) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิยังทำให้เกิดการช็อคจากความเย็น (cold shock) เนื่องจากเกิดการก่อรูปและการละลายของผลึกน้ำแข็ง (ice crystals) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (Luvoni et al., 2003) ดังนั้น ขั้นตอนในการแช่แข็งตัวอสุจิมีเป้าหมายหลัก คือ ทำให้ตัวอสุจิลดการเคลื่อนที่และการอยู่รอดปกติ โดยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จนทำให้เซลล์ตาย ลดความเสียหายของอะโครโซม (acrosome) และเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (plasma membrane) ระหว่างการแช่แข็ง (Hu et al., 2009) ด้วยการเติมสารป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิ (cryoprotectants)



จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า น้ำตาลโมเลกุลคู่สามารถป้องกันโครงสร้างผนังตัวอสุจิที่เสียหายจากการเกิดความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation stress) และการซึบจากความเป็นระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายได้ น้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เช่น ซูโครส (sucrose) และทรีฮาโลส (trehalose) มีความสามารถในการป้องกันเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับทั้งผลกระทบจากแรงดันออสโมติก (osmotic effect) และปฏิกิริยาที่จำเพาะกับโครงสร้างผนังส่วนที่เป็น ฟอสโฟลิปิด (phospholipid membrane) (Uysal and Bucak, 2009) โดยทรีฮาโลส สามารถทำให้เซลล์ทนต่อการสูญเสียน้ำ (dehydration) และการแช่แข็งได้ (Westh and Ramlv, 1991) การทำงานของทรีฮาโลส สามารถแทนที่น้ำที่บริเวณจุดเชื่อมระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และสารละลาย จึงได้นำทรีฮาโลสมาใช้เป็นสารป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิ เพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็งจากน้ำภายในเซลล์ (Aisen et al., 2002)

โดยปกติแล้วในกระบวนการแช่แข็งน้ำแข็งจะประสบปัญหาที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยมีสาเหตุหนึ่งมาจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation; LPO) ทั้งระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งและการบ่มหลังอุ่นละลาย เนื่องจากเป็นสภาวะที่ผนังของตัวอสุจิ ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) จำนวนมาก ทำให้ไวต่อการเกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (Maxwall and Watson, 1996) นอกจากนี้เมตาบอลิซึม (metabolism) ของออกซิเจนที่อยู่ในรูป reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิแดนท์สูง (Kasimanickam et al., 2007; กัมพล แก้วเกษ, 2552) ยังเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย โดยเป็นสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มอัตราการตายของเซลล์ ปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเป็นกลไกสำคัญในการสร้าง ROS ที่เป็นสาเหตุทำให้ตัวอสุจิเกิดความเสียหาย (Sikka et al., 1995)

กลูตาไทโอน (glutathione; L-~~V~~-glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งและเป็นสารประกอบไตรเปปไทด์ (tripeptide) แสดงบทบาทสำคัญในการเป็นกลไกป้องกันภายในเซลล์ให้ต่อต้านการเกิดความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Irvine, 1996; Gadea et al., 2005) จากการศึกษาของ Triwulanningsih และคณะ (2008) ที่พบว่า การเติมกลูตาไทโอน ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ สามารถลดและป้องกันการปรากฏขึ้นของอนุมูลอิสระที่จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ กล่าวคือ กลูตาไทโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถปกป้องไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จากการเกิดอนุมูลอิสระได้ และสามารถควบคุม homeostatic ได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้นการเติมกลูตาไทโอนเพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นถูกคาดหวังว่าจะสามารถช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิอันเป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ (Parris, 1998)

เป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้เพื่อตอบสมมติฐานที่ว่า การเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื่อนั้นจะส่งผลต่อคุณภาพอสุจิโกพื้นเมืองหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง



1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และหาระดับความเข้มข้นของการเสริมทรีฮาโลสที่เหมาะสมต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง และระดับกลูตาไทโอนที่เหมาะสมต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดที่ให้ผลดีที่สุด และศึกษาผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยจะประเมินคุณภาพตัวอสุจิทั้งก่อนและหลังการเสริม ซึ่งรวมถึงการประเมินการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และประสิทธิภาพในการลดปฏิกริยา लिปิดออกซิเดชันในตัวอสุจิ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเสริมสารทั้งสองชนิดนี้ในกระบวนการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแช่แข็งแล้วได้ประสิทธิภาพสูงสุด และมีอัตราการผสมติดสูงที่สุด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบถึงผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

1.4.2 ได้ทราบถึงผลของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง และทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารทรีฮาโลสที่ทำให้สุมิไก่พื้นเมืองมีคุณภาพดีที่สุดหลังการละลาย

1.4.3 ได้ทราบถึงผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง และทราบถึงระดับความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ทำให้สุมิไก่พื้นเมืองมีระดับปฏิกริยา लिปิดออกซิเดชันต่ำที่สุดหลังการละลาย

1.4.4 สามารถนำข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ไก่พื้นเมืองโดยใช้สารทรีฮาโลสและกลูตาไทโอนที่ได้นี้ ไปดัดแปลงใช้กับสัตว์ที่ใกล้เคียงสุมิพันธุ์ได้



บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

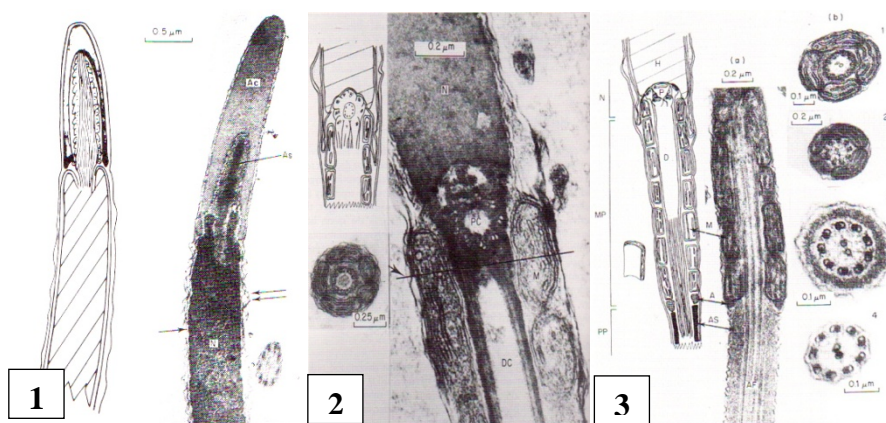
2.1 อสุจิของสัตว์ปีก (spermatozoa)

อสุจิของสัตว์ปีกมีลักษณะคล้ายไส้เดือนทำหน้าที่นำ DNA มีความยาวประมาณ 100 ไมโครเมตร มีรูปร่างของอะโครโซมคล้ายกระสุนปืน มีนิวเคลียสทรงกระบอกโค้งเล็กน้อย มีส่วน axoneme และมี mitochondria ประมาณ 30 อัน มี cytoplasm น้อยมาก ดังแสดงในภาพประกอบ 2.1 และภาพประกอบ 2.2 (Polge, 1951; Etches, 1996; Thuston and Hess, 1987; Donoghue and Wishart, 2000) ในสภาพไร้อากาศ mitochondria จะเป็นแหล่งพลังงานซึ่งทำให้ axoneme มีการเคลื่อนไหว (Ashizawa et al., 1989) ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตรอดของอสุจิ (Bakst et al., 1980) และมีความสามารถในการดำรงชีพของอสุจิในช่องคลอด (Froman and Thuston, 1984; Lake and Ravie, 1988; Froman and Thuston, 1994) และความสามารถในการปฏิสนธิ โดยเจาะผนัง perivitelline layer ซึ่งภายหลังเจาะผ่านผนังดังกล่าวอสุจิจะเชื่อมกับ oocyte และ nucleus ของอสุจิจะก่อตัวเป็น pronucleus ของตัวผู้ แม้ว่า organelle ต่างๆ ของอสุจิและโครงสร้างในสัตว์ปีกจะคล้ายคลึงกัน แต่ขบวนการเมตาบอลิซึมและความทนทานในขบวนการเก็บรักษามีความแตกต่างกัน (Bakst et al., 1980)



ภาพประกอบ 2.1 ลักษณะอสุจิของสัตว์ปีก
ที่มา : Etches (1996)





ภาพประกอบ 2.2 ส่วนประกอบของตัวอสุจิสัตว์ปีกโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 1) ส่วนหัวและอะโครโซมของตัวอสุจิ
- 2) ภาพตัดขวางส่วนคอของอสุจิ
- 3) ภาพตัดขวางส่วนหางของอสุจิ

ที่มา: Etches (1996)

2.2 ท่อส่งอสุจิ (excurrent ducts)

ภายหลังจากที่อสุจิถูกขับออกมา อสุจิจะถูกแวดล้อมด้วยของเหลวที่เรียกว่า seminiferous tubule fluid ซึ่งของเหลวดังกล่าวผลิตโดย sertoli cells ดังแสดงในภาพประกอบ 2.3 ในระยะนี้ อสุจิจะไม่เคลื่อนไหว ดังนั้นจึงเคลื่อนที่ไปโดยอาศัยการไหลของของเหลว ซึ่งเกิดจาก myoepithelial cell ท่อ seminiferous เข้าสู่ rete testis และในที่สุดจะผ่านเข้าสู่ excurrent duct, efferent ducts, connecting ducts และ epididymal duct ท่อเหล่านี้เองก่อตัวเป็น epididymis ซึ่งเริ่มจากผิวของอัณฑะออกมา (Etches, 1996) อย่างไรก็ตาม efferent ducts จะเป็นท่อพื้นฐานภายใน epididymis ของไก่ นกกระทา และไก่ต๊อก (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550)

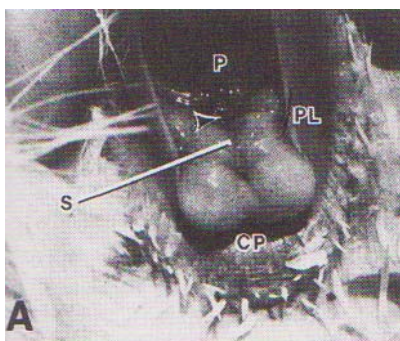


ภาพประกอบ 2.3 sertoli cells (ซ้าย) และ spermatogonia (ขวา) ที่อยู่ภายใน seminiferous tubule

ที่มา: Etches (1996)

2.3 การหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculation)

อสุจิผ่านมาตามระบบท่อสุดท้ายอยู่ที่ท่อ deferent ซึ่งออกสู่ cloaca ซึ่งเป็นจุดรวมของท่อที่มาจากระบบย่อยอาหาร ระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์ ดังแสดงในภาพประกอบ 2.4 cloaca ถูกแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ coprodeum, urodeum และ proctodeum แต่ละท่อมมีลักษณะคล้ายนมหนู จาก lateral wall ของ urodeum ตรงนมหนูนี้ เรียกว่า papilla (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550) การหลั่งน้ำเชื้อ คือ การขับน้ำเชื้อจาก papilla การเก็บน้ำเชื้อสามารถทำได้โดยการควบคุมพ่อพันธุ์ไว้ จาก นั้นกระตุ้น spinal reflex ด้วยการนวดบริเวณรอบๆ กัน จากนั้นเก็บน้ำเชื้อใส่ภาชนะ (Burrows and Quinn, 1937; Lake and Stewart, 1978) การหลั่งน้ำเชื้อมาจากการตอบสนองต่อการกระตุ้น โดยการรับรู้การสัมผัสที่ได้รับการกระตุ้นจะถ่ายทอดผ่าน sensory neurons ไปยัง motor neurons ซึ่งถ่ายทอดสัญญาณประสาทสู่กล้ามเนื้อเรียบบริเวณผนังของ receptaculum การบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบภายในผนังของ receptaculum ซึ่งเป็นที่กักเก็บอสุจิรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว บีบน้ำเชื้อออกมาสู่ lumen ของ papilla กระบวนการต่างๆ จะรวดเร็วมาก การรีดน้ำเชื้อมักจะได้ของเหลวสีใส (lymph – like fluid) ปนมา ซึ่งมาจาก tumescent lymphatic tissue (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550)



ภาพประกอบ 2.4 cloaca ไก่ตัวผู้
ที่มา: Knight และคณะ (1984); Froman (1995)

2.4 การเมตาบอลิซึมของอสุจิ

Bearden และคณะ (2004) กล่าวว่าพลังงานที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม คือ พลังงานที่อสุจิเปลี่ยนวัตถุดิบต่างๆ ให้อยู่ในรูปของพลังงาน ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้สำหรับกระบวนการเปลี่ยนนี้ จะสามารถพบได้ในส่วนของ mitochondrial sheath ซึ่งแหล่งพลังงาน ได้แก่ fructose, sorbitol และ GPC สามารถพบได้ใน seminal plasma นอกจากนี้ plasmalogen และไขมันจะถูกเก็บไว้เป็นพลังงานสำรองโดยจะพบใน spermatozoon และจะถูกนำมาใช้เมื่อวัตถุดิบอื่น ๆ ถูกใช้หมดไป



2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเมตาบอลิซึม

อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการเมตาบอลิซึมจะสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ผลของการเกิดเมตาบอลิซึมที่สูงขึ้นจะทำให้ค่า pH ในน้ำเชื้อลดต่ำลง เนื่องจากเกิดจากกรดแลคติก (Salisbury et al., 1978)

pH ที่เหมาะสมจะอยู่ประมาณ 7.0 (6.9–7.5 ขึ้นกับชนิดของสัตว์) เมื่อ pH เข้าใกล้ 7.0 จะมีการเมตาบอลิซึมสูง หาก pH เป็นกรดหรือด่าง การเมตาบอลิซึมก็จะลดลง (Bearden et al., 2004)

Osmotic pressure สารละลายที่เป็น hypotonic และ hypertonic จะทำให้การเมตาบอลิซึมของน้ำเชื้อลดลงและเซลล์อสุจิเกิดความเสียหาย ดังนั้นในน้ำยาเจือจางนั้นจะต้องมี osmotic pressure ที่มีคุณสมบัติเป็น isotonic (Bearden et al., 2004)

ฮอร์โมน ซึ่ง testosterone และ androgen อื่นๆ จะลดการเมตาบอลิซึมของอสุจิของเหลวในท่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียจะมีผลกระทบทำให้เกิดการเมตาบอลิซึมเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากฮอร์โมน estrogen (Salisbury et al., 1978; Bearden et al., 2004)

Gas ถ้าความเข้มข้นของ CO₂ น้อย จะกระตุ้นให้เกิด aerobic metabolism ของอสุจิ ถ้ามี CO₂ ประมาณ 5 –7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเมตาบอลิซึมจะลดลง ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ O₂ ในระดับที่สูงจะเป็นพิษและอัตราการเมตาบอลิซึมจะลดลง (Salisbury et al., 1978; Bearden et al., 2004)

แสง มีผลกระทบต่อการศึกษาการเกิดอัตราเมตาบอลิซึมในการเคลื่อนที่ และการผสมติดของอสุจิ ซึ่งแสงทำปฏิกิริยากับน้ำเชื้อทำให้ได้ hydrogen peroxide ดังนั้น ไม่ควรให้น้ำเชื้อสัมผัสกับแสงโดยตรง (Bearden et al., 2004)

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการผสมติดในไก่

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการผสมติดมีหลายปัจจัย ดังนี้

2.4.2.1 พันธุ์กรรม

สายพันธุ์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพอสุจิ โดยพบว่าถึงแม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ให้อาหารแบบเดียวกัน มีการจัดการแบบเดียวกัน แต่ก็ยังสามารถพบพ้อพันธุ์แต่ละตัวมีคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกัน (Peter et al., 2008)

Siudzinkg และ Lakaszewicz (2008) ได้ทำการศึกษาผลของน้ำยาเจือจางและระยะเวลาของการเก็บรักษาต่อสัณฐานวิทยา และการมีชีวิตรอดของอสุจิภายหลังการเก็บรักษา 48 ชั่วโมง ในไก่ 4 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ไก่ที่แตกต่างกันมีผลต่อความสามารถของการอยู่รอดของอสุจิที่แตกต่างกัน

2.4.2.2 การจัดการพ้อพันธุ์

Das (2002) รายงานว่า การให้พ้อพันธุ์ได้กินอาหารแบบเต็มทีและความบอ่ยของการให้อาหารต่อวันเพิ่มขึ้น มีผลดีต่อการให้น้ำเชื้อของไก่ Pana และคณะ (2000) รายงานว่าการให้อาหาร 130 กรัม/ตัว/วัน ไม่มีผลต่อการหลั่งน้ำเชื้อและความเข้มข้นรวม เมื่อเปรียบเทียบกับการให้กินอาหารแบบเต็มที Hocking และ Bernard (1997) กล่าวว่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนรวมในสุทธอาหารและการกินได้ของอาหาร มีผลต่อการผลิตน้ำเชื้อ



2.4.2.3 ฤดูกาล

Schneider และคณะ (1957) และ Cooper (1964) รายงานว่าน้ำเชื้อไก่จะมีการเคลื่อนที่ดีในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม และจะมีการเคลื่อนที่ต่ำลงในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม ส่วน Kamar (1960) รายงานว่าในช่วงฤดูหนาวอสุจิจะมีความผิดปกติของรูปร่างที่บริเวณส่วนหัวในเปอร์เซ็นต์ที่สูงมาก ส่วนในฤดูร้อนอสุจิจะมีความผิดปกติของรูปร่างบริเวณหางมากกว่า Obidi และคณะ (2008) รายงานว่าน้ำเชื้อไก่จะมีปริมาตรและความเข้มข้นสูงในช่วงฤดูฝน และมีปริมาตรและความเข้มข้นต่ำในช่วงฤดูฝน Sonseeda และคณะ (2013) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยใน 1 รอบปี พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

2.4.2.4 อายุของพ่อพันธุ์

จากการศึกษาของ Cerolini และคณะ (1997) พบว่า เมื่อพ่อพันธุ์มีอายุมากขึ้น องค์ประกอบของ phospholipid ของอสุจิจะลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น โดย lipid และ fatty acid ต่างๆ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอสุจิและการผสมติด โดย Cooper (1964) รายงานว่าอายุของพ่อพันธุ์ไก่ Leg horn ที่ให้คุณภาพน้ำเชื้อดีนั้นอยู่ในช่วงอายุ 26 – 28 สัปดาห์ จนถึงช่วงอายุ 32 – 36 สัปดาห์ และ Wineland (1994) รายงานว่าพ่อพันธุ์ไก่จะให้คุณภาพน้ำเชื้อดีที่สุด เมื่ออายุ 34 – 37 สัปดาห์ ทั้งนี้ Sonseeda (2013) ได้ศึกษาผลของอายุพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองต่อคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่า น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ 10-20 เดือน มีคุณภาพไม่แตกต่างกัน

2.4.2.5 วิธีการรีด

การรีดน้ำเชื้อในไก่นิยมทำตามวิธีของ Burrows และ Quinn (1937) โดยใช้ 2 คนทำงานร่วมกัน คนหนึ่งเป็นผู้จับไก่ อีกคนหนึ่งเป็นผู้รีด มีการกระตุ้นก่อนการรีดโดยการลูบหลังพ่อพันธุ์ด้วยฝ่ามือข้างหนึ่ง (อาจใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบท้องช่วย) เมื่อลูบถึงโคนหางและก้นพ่อพันธุ์ ใช้แรงบีบบริเวณโคนหางน้ำเชื้อจะพุ่งหรือไหลออกมา (Lake and Stewart, 1978) การรีดเก็บน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์ควรระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนมูลไก่ และ Urates ซึ่งจะมีผลต่ออัตราการผสมติด ถ้ามีการปนเปื้อนจะคัดน้ำเชื้อทิ้งทันที การมี urete ปนอยู่ในปริมาณมากจะทำให้มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำ (Blanco et al., 2001) Blesbois และ Reviers (1992) รายงานว่าใน seminal plasma ของสัตว์ปีกนั้น มีสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นโทษต่อการผสมติด

คุณภาพเบื้องต้นของน้ำเชื้อมีผลต่อการเก็บรักษา น้ำเชื้อที่จะนำไปใช้จึงต้องมีคุณภาพดี กล่าวคือ มีอสุจิที่แข็งแรง เคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และมีความเข้มข้นสูง (Tajima et al., 1989; Buss, 1993; Thurston, 1995; Blesbois et al., 2007) ภายหลังจากการรีดต้องดำเนินการเจือจางน้ำเชื้อโดยเร็วภายใน 10-15 นาที (Sexton, 1997; Van Voorst and Leenstra, 1995) การเจือจางในอัตราที่รวดเร็วจะทำให้มีน้ำเชื้อที่ดี มีคุณภาพดีกว่าการดำเนินการที่ช้า (Park and McDaniel, 2006)

ความบ่อยครั้งในการรีดน้ำเชื้อมีผลต่อคุณภาพภายหลังจากแช่แข็ง โดย Van Voorst และ Leenstra (1995) รายงานว่าในการรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่ โดยรีดติดต่อกัน 4 วัน น้ำเชื้อที่รีดในวันที่ 3 และ 4 ให้อัตราการผสมติดดีกว่าน้ำเชื้อที่รีดและทำน้ำเชื้อแช่แข็งในวันที่ 1 และ 2 เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข (2550) ได้แสดงความเห็นว่าน่าจะเป็นการดีกว่าที่จะไม่มีการใช้ epididymis กักเก็บอสุจิที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นน้ำเชื้อในช่วงแรกจึงเป็นน้ำเชื้อเก่า



โดยทั่วไป การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่เพื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งจะรีดเก็บเป็นประจำ สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง (Chalah et al., 1999; Tselutin et al., 1999) อายุของพ่อพันธุ์มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ส่วนใหญ่แล้วมักใช้พ่อพันธุ์ที่อยู่ในช่วงอายุ 7-12 เดือน (Van Voorst and Leenstra, 1995; Kirby et al., 1998)

2.5 การผสมเทียมในสัตว์ปีก (Artificial Insemination in Poultry)

เทคโนโลยีด้านการผสมเทียมในสัตว์ปีก ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไข่แดง แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของการทดลองส่วนใหญ่จะทำในไก่พันธุ์ไข่ (Hammerstedt, 1995) โดยมีประวัติความเป็นมาซึ่งอ้างโดย Lake (1995) ดังนี้ บุคคลแรกที่เก็บน้ำเชื้อสัตว์ปีก คือ Ivanov ในปี 1913 โดยการบีบจาก ductus deferent ของไก่ตัวผู้ที่ถูกฆ่าใหม่ๆ จากนั้นนำไปฉีดเข้าไปใน vagina ของไก่เพศเมีย ซึ่งมีผลการผสมติดเพียงเล็กน้อย ในปี 1914 Payne เก็บน้ำเชื้อจากกันไกตัวเมียภายหลังผสมพันธุ์และนำไปผสมเทียมให้กับตัวเมียอื่น และรายงานว่าการผสมติดของไข่ ปี 1932 Nikitina ถ่างกันไกเพื่อให้ผสมติดง่าย ต่อมาปี 1934 Serebrovski และ Sokolovskaja และปี 1937 Letard และ Tinet เป็นกลุ่มนักวิจัยที่นำ electroejaculator มาใช้กระตุ้นรีดน้ำเชื้อไก่ แต่ไม่มีรายงานถึงผลการทดลอง ปี 1935 Warren และ Scolt เป็นกลุ่มแรกที่ประสบความสำเร็จในการเก็บน้ำเชื้อไก่วงขณะผสมพันธุ์กัน แล้วนำไปผสมเทียมโดยใช้ pipette สอดเข้าไปในช่องคลอด ในปี 1935 Quinn ค้นพบวิธีการรีดน้ำเชื้อไก่พันธุ์ไข่ตัวผู้ โดยวิธีการลูบหลังแล้วบีบที่บริเวณก้น ผลการค้นพบดังกล่าวถูกนำไปดัดแปลงใช้ในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ ทั้งในกลุ่มสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550)

2.5.1 ความลึกและตำแหน่งในการผสมเทียม

ความลึกของการสอดผ่านอุปกรณ์ในการผสมเทียมนั้น เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่ออัตราการผสมติด โดย Donoglu และ Wishart (2000) ได้รายงานว่าการผสมเทียมที่เหมาะสมที่ระดับความลึกที่ 3-4 เซนติเมตร เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข (2550) ได้ศึกษาถึงความลึกของการสอดใส่ไซริงค์ ในการผสมเทียมที่ 3 และ 6 เซนติเมตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วน Van Voorst และ Leenstra (1995) รายงานว่าการผสมเทียมที่ระดับความลึก 6 เซนติเมตร ให้อัตราการผสมติดที่ดีและ Bacon และคณะ (1985) ได้ศึกษาตำแหน่งของการผสมเทียมที่ช่องคลอด มดลูก และแอมกนัมของท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ปรากฏว่าการผสมเทียมที่แอมกนัมให้อัตราการผสมติดและฟักออกดีที่สุด แต่ไม่สะดวกสำหรับการปฏิบัติงานและการผสมเทียมไก่ที่ระดับความลึกที่ 5 เซนติเมตร เป็นความลึกที่เหมาะสมในการผสมเทียม

2.5.2 ความถี่ของการผสมเทียม

Cooper (1964) รายงานว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดในไก่ 1 ครั้ง/สัปดาห์ ให้อัตราการผสมติด 80 เปอร์เซ็นต์ และหากมีการผสมเทียมถี่ขึ้นเป็น 2 ครั้ง/สัปดาห์ ให้อัตราการผสมติดสูงขึ้นเป็น 92-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Pym (1966) รายงานว่าหากมีการผสมเทียมบ่อยครั้งขึ้น เช่น สัปดาห์ละ 2 ครั้ง จะให้อัตราการผสมติดดีขึ้นกว่าการผสมเทียมสัปดาห์ละครั้ง และเทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข (2550) รายงานว่าการผสมเทียมไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อสดโดยไม่ได้เก็บรักษาสัปดาห์ละครั้งให้อัตราการผสมติด 96 เปอร์เซ็นต์



2.5.3 จำนวนอสุจิและปริมาตร

ในการผสมเทียมไก่ด้วยน้ำเชื้อสดควรมีอสุจิ 100 ล้านตัว ผสมเทียมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง แต่หากผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจางที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง ควรมีความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ 200 ล้านตัว (Christensen, 1995) และปริมาตรที่ใช้ในการผสมเทียมนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งของการผสมเทียม หากปริมาตรน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมน้อยเกินไปจะทำให้ น้ำเชื้อติดที่ปลายหลอดจนไม่ได้จำนวนอสุจิที่ต้องการได้ หากใช้ปริมาตรในการผสมเทียมมากเกินไปอาจมีปัญหาเวลาที่ผสมเทียมจะทำให้ น้ำเชื้อทะลักออกมา Christensen (1995) รายงานว่า ปริมาตรน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจางควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.4 มิลลิลิตร ขึ้นกับจำนวนอสุจิที่ต้องการใช้ เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข (2550) ได้รายงานว่าการผสมเทียมไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จำนวนอสุจิ 600 ล้านตัวขึ้นไป มีความเหมาะสมที่สุด ให้อัตราการผสมติดและฟักออกในระดับที่น่าพอใจ

2.5.4 การเดินทางของอสุจิและการปฏิสนธิ

ความสามารถของการเคลื่อนที่ (motility) ของอสุจิเป็นปัจจัยสำคัญในการคงระดับอัตราการผสมติด ในสัตว์ตระกูลนก บริเวณช่องคลอดจะควบคุมการเดินทางของอสุจิผ่านเข้าสู่ภายในและมีเพียงอสุจิที่เคลื่อนที่ได้เท่านั้นที่สามารถเดินทางไปถึงบริเวณท่ออสุจิ (sperm storage tubules, SST) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่บริเวณส่วนต่อระหว่างท่อนำไข่กับช่องคลอด กลไกการควบคุมดังกล่าวยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดในปัจจุบัน โครงสร้างของบริเวณส่วนต่อของท่อนำไข่กับช่องคลอดจะเป็นที่พักพิงของอสุจิ และอสุจิจะค่อยๆ เดินทางออกจากบริเวณดังกล่าวตลอดเวลา เพื่อประกันว่าจะมีอสุจิไปถึงบริเวณที่มีการปฏิสนธิ (Bakst, 1993; King et al., 2000) การผสมพันธุ์ที่ทำให้มีประชากรอสุจิจำนวนมาก บรรจุอยู่ใน SST จะเกี่ยวข้องกับอัตราการผสมติดสูง อย่างไรก็ตามประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์ ของอสุจิจะถูกขับออกไปภายใน 1 ชั่วโมง ภายหลังการผสมพันธุ์ และมีไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่พบหลงเหลือในบริเวณ SST (Brillard and Bakst, 1990) การปฏิสนธิเกิดขึ้นบริเวณท่อนำไข่ส่วน infundibulum โดยอสุจิของสัตว์ปีกจะไม่มี capacitation ก่อนการปฏิสนธิดังเช่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมักพบ polyspermy เมื่อตกไข่ oocyte อสุจิจะทำการเจาะผ่าน perivitelline membrane และทำการปฏิสนธิกับไข่ (Froman et al., 2000)

2.6 การเก็บรักษาตัวอสุจิด้วยวิธีแช่แข็ง (cryopreservation of spermatozoa)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่แข็งนั้นสร้างประโยชน์ได้มากมายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยในการขยายพันธุ์สัตว์สายพันธุ์ดี โดยการผสมเทียม (artificial insemination; AI) (Tanaka et al., 2000)

2.6.1 การเจือจางน้ำเชื้อ (semen dilution)

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทั้งหมดที่นำมาใช้ทั้งแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์ทุกชนิด ควรมีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) เพื่อช่วยป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และความเข้มข้นของ electrolytes ที่เหมาะสม มีการป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยการเติมยาปฏิชีวนะ



และควรป้องกันไม่ให้อัตวสุจิเกิดการช็อคจากความเย็น โดยการเติมสารป้องกันการเยือกแข็ง เพื่อลดจำนวนความเสียหายที่จะเกิดขึ้นขณะแช่แข็งน้ำเชื้อ (Bateman, 2001)

การเสริมสารที่เป็นพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และกาแลคโตส นั้นถูกจัดเป็นแหล่งพลังงานภายนอกให้กับอสุจิ นอกจากนี้ยังมีการเสริมสารป้องกันการเยือกแข็งอื่นๆ เช่น glycerol, dimethyl sulfoxide และ trehalose เป็นต้น โดย glycerol จัดเป็นสารป้องกันการเยือกแข็งที่มีการใช้อย่างกว้างขวาง glycerol ที่ใช้ความเข้มข้นต่ำ (4 เปอร์เซ็นต์) มีความเป็นพิษกับอสุจิน้อยกว่าความเข้มข้นสูง (>8 เปอร์เซ็นต์) และการเอาสารป้องกันการเยือกแข็งออกในหลายขั้นตอนด้วยสารละลาย isotonic จะช่วยให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และการเคลื่อนที่ของอสุจิน้อยที่สุด นอกจากนี้ glycerol ที่เติมลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อยังช่วยเพิ่มจำนวนอสุจิที่มีชีวิตรอดหลังการทำละลายด้วย (Pukazhenthii et al., 2002)

ความดันของสารละลายของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหากสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้ตัวอสุจิเสียหาย น้ำเชื้อเจือจางแล้วใช้ผสมเทียมเลยโดยไม่ต้องเก็บรักษา สามารถเจือจางด้วยน้ำยาที่มีความดันสารละลายระหว่าง 250-330 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม (Sexton and Fewlass, 1978; Bakst, 1980) อย่างไรก็ตาม Donoghue and Wishant (2000) รายงานว่าอสุจิของสัตว์ปีกสามารถทนต่อความดันสารละลายในช่วง 250-410 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม

ระดับ pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ โดยระดับ pH ที่เหมาะสมของน้ำยาเจือจางสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่ 5 องศาเซลเซียส ระดับ pH ที่เหมาะสม คือ 6.8-7.1 (Lake and Ravie, 1979; Christensen, 1995) สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางโดยทั่วไปมักเป็นกลุ่มฟอสเฟต ซิเตรท พวก zwitterionic molecules เช่น BES [N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid] และ TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] (Sexton and Fewlass 1978; Lake and Ravie, 1979; Chistenson, 1995)

น้ำที่ใช้เตรียมน้ำยาหากเป็นน้ำที่ไม่บริสุทธิ์ มีการปนเปื้อนโลหะหนักและ Ca^{+} จะมีผลเสียต่ออสุจิ (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550) Froman และ Thurston (1985) รายงานว่าน้ำเชื้อเจือจางที่เก็บรักษาในอุณหภูมิเย็นจะมีการไหลเข้าของ Ca^{+} สูงขึ้นส่งผลให้มีการไหลออกของ acrosin ที่หัวอสุจิ ซึ่งส่งผลต่อการผสมติดที่ระดับต่ำ

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเชื้อ ส่วนใหญ่มีแหล่งมาจากกันของไก่ น้ำยาเจือจางส่วนใหญ่จึงมีการเสริมยาปฏิชีวนะลงไป ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมได้โดยไม่มีผลเสียต่ออัตราการผสมติด (Chistenson, 1995)

เนื่องจากการแช่แข็งน้ำเชื้อก่อให้เกิดความเสียหายแก่ตัวอสุจิจำนวนหนึ่ง ดังนั้นในการผสมเทียมจึงต้องการอสุจิจำนวนมาก จึงทำให้อัตราการเจือจางต่ำกว่าน้ำเชื้อในสภาพเหลว โดยรวมการเจือจางด้วยน้ำยาที่มี cryoprotectant (CPAs) แล้ว การเจือจางจะอยู่ประมาณ 1:2-1:5 (Sexton, 1979; Chalah et al., 1999) สารเคมีที่เสริมในน้ำยาเจือจาง เพื่อบรรเทาความเสียหายแก่ตัวอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง ที่นิยมใช้ ได้แก่ glycerol, dimethylsulphoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA), ethyleneglycol (EG), dimethylformamid (DFM) และ propyleneglycol (PG) ผลการวิจัยส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่า glycerol มีพิษต่อตัวอสุจิน้อยที่สุด และมีผลทำให้อสุจิมีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการละลายสูงสุด แต่เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นอันตรายต่อ



ช่องคลอดไก่อตัวเมีย จึงมีการกำจัดออกก่อนการผสมเทียมด้วยวิธีต่างๆ เช่น dialysis เป็นต้น (Donoghue and Wishart, 2000)

Tselutin และคณะ (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความเป็นพิษในความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ CPAs 3 ชนิด คือ glycerol, DMA และ DMSO บ่มที่ระดับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที พบว่า glycerol มีพิษน้อยที่สุด ตามด้วย DMA ส่วน DMSO มีความเป็นพิษสูงมากขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่า DMSO เป็นพิษสูงกว่า glycerol แต่ไม่เป็นอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์ของไก่อตัวเมีย การใช้ DMSO จึงมีความสะดวกสูง ดังนั้นจึงยังคงมีความนิยมใช้อยู่พอสมควร ซึ่ง Van Voorst และ Leenstra (1995) พบว่าการแช่แข็งโดยมี DMSO เป็น CPAs ให้ผลการผสมติดในระดับที่สูง

2.6.1.1 น้่าน้ำยาเจือจาง

วัตถุประสงค์ในการทำน้่าน้ำยาเจือจาง เพื่อต้องการให้ได้สารละลายที่มีส่วนประกอบและคุณสมบัติคล้ายกับน้ำเชื้อจริงมากที่สุด หลังจากที่ทำการรีดน้ำเชื้อแล้วจะมีการเติมน้่าน้ำยาเจือจาง เพื่อเป็นการถนอมและเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อที่ได้จากการหลั่งของพ่อพันธุ์แต่ละครั้ง ทำให้สามารถนำไปผสมกับแม่พันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก และทำให้การเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อเป็นไปได้ดีและยาวนานขึ้น โดยองค์ประกอบทางเคมีในน้่าน้ำยาเจือจางมักมีองค์ประกอบที่คล้ายกับน้ำเชื้อของสัตว์ปีก (Lake, 1995) Dumpala และคณะ (2006) รายงานว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการประเมินคุณภาพทุก ๆ ชั่วโมง คุณภาพของน้ำเชื้อจะค่อย ๆ ลดต่ำลงเป็นลำดับๆ ในการเจือจางน้ำเชื้อและผสมเทียมภายหลังการรีดน้ำเชื้อโดยไม่เก็บรักษา ไม่พบความแตกต่างในเรื่องอัตราการผสมติดและฟักออก (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550) ตัวอย่างของน้่าน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ในสัตว์ปีกมี 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้่าน้ำยาเจือจางต่อ 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบทางเคมีของน้่าน้ำยาเจือจาง (กรัม/ลิตร)	ชนิดของน้่าน้ำยาเจือจาง				
	1	2	3	4	5
Magnesium acetate	0.7	0.7			
Magnesium chloride			0.34		
Sodium acetate			4.3		
Potassium citrate			6.4		1.4
Sodium glutamate	19.2	28.5	8.67	19.2	14
Dipotassium hydrogen phosphate			12.7		9.8
Potassium dihydrogen phosphate			0.65		
Sodium dihydrogen phosphate					2.1
Glucose	8.0	5.0			9.0
Fructose			5.0	8.0	
Inositol		2.5			9.0
TES			1.95		



ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางต่อ 1,000 มิลลิลิตร (ต่อ)

ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำยาเจือจาง (กรัม/ลิตร)	ชนิดของน้ำยาเจือจาง				
	1	2	3	4	5
Potamine sulfate				0.32	
Potassium acetate	5.0	5.0		5.0	
PVP (polyvinyl pyrrolidone)	3.0			3.0	

หมายเหตุ สูตรที่ 1 คือ Prefreezing Lake' diluent (Lake, 1960)
 สูตรที่ 2 คือ Tselutin (Tselutin et al., 1995)
 สูตรที่ 3 คือ Schramm (Schramm, 1976)
 สูตรที่ 4 คือ BPSE (Sexton, 1977)
 สูตรที่ 5 คือ IGGKP (Surai and Wishart, 1996)

2.6.2 หลักการทั่วไปในการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและทางเคมีซึ่งส่งผลทำให้เซลล์อสุจิกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ตายไปหรือไม่เคลื่อนที่ (Salisbury et al., 1978)

แนวทางในการแช่แข็งเซลล์ต่างๆ, เซลล์สืบพันธุ์ และอวัยวะนั้นไม่ใช่เรื่องแปลกใหม่ โดยทฤษฎีในอดีตการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งนั้นเป็นการทำให้เซลล์ที่มีชีวิตสามารถถูกทำให้เย็นลงและทนอยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำมากที่สุดได้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวที่ใช้ในการแช่แข็ง) น้ำจะมีลักษณะเป็นผลึกหรืออยู่ในสภาพคล้ายแก้ว ซึ่งทำให้มีความเหนียวหนืดสูงไม่สามารถแพร่กระจายได้ ยิ่งไปกว่านั้น คือ ที่อุณหภูมิต่ำนี้จะขาดแคลนพลังงานความร้อนเพื่อไปใช้ในปฏิกิริยาเคมี (Bateman, 2001) เหลือเฉพาะเพียงบางปฏิกิริยาเท่านั้น ที่สามารถสร้างอนุมูลอิสระและทำลายให้อยู่ในรูปโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นผลมาจากพื้นฐานของการแผ่รังสีแยกอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้า เมื่อเวลาผ่านไปการแยกอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้านี้จะสามารถทำลายหรือทำให้เกิดความเสียหายอื่นๆ ต่อ DNA จนกลายมาเป็นอันตรายต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์ไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในอุณหภูมิที่ -196 องศาเซลเซียส แต่ช่วงระหว่างกลางของอุณหภูมิที่เป็นอันตราย คือ -15 ถึง -60 องศาเซลเซียส ซึ่งเซลล์จะต้องทำให้อยู่ในลักษณะขนานกับพื้นผิวภาชนะ (horizontal) ระหว่างแช่แข็งและในระหว่างการทำลายอีกครั้ง (Watson, 2000) และ Hammerstedt และคณะ (1990) ได้เคยอธิบายขั้นตอนของกระบวนการเก็บรักษาตัวอสุจิด้วยวิธีแช่แข็งไว้ 5 ขั้นตอน ดังนี้ 1) การเจือจางน้ำเชื้อและลดอุณหภูมิลง 2) การปล่อยให้สารป้องกันการเยือกแข็งนั้นแทรกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และบรรจุใส่หลอดพลาสติก 3) ทำการแช่แข็ง 4) เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 5) ทำละลาย โดย 5 ขั้นตอนนี้ได้รับการยอมรับและแต่ละขั้นตอนจะมีความสัมพันธ์พิเศษกับโครงสร้าง หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ และกระบวนการเผาผลาญของเซลล์ด้วย ซึ่งวิธีการในแต่ละขั้นตอนนั้นต้องนำไปพัฒนาต่อในสัตว์แต่ละชนิด เนื่องจากแต่ละขั้นตอนจะมีผลกระทบเฉพาะตัวที่ไม่เหมือนกันต่อการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

อสุจิไวต่อความเสียหายของการแช่แข็งสูงมาก (Donoghue and Wishart, 2000) แต่น้ำเชื้อแช่แข็งมีประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์เนื่องจากสามารถเก็บรักษาได้นาน



2.6.3 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง (pre-freeze cooling)

การลดอุณหภูมิจะมีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด (Hammerstedt et al., 1990) ถึงแม้ว่าจะยังไม่ชัดเจนแต่พบว่าอาจมีการจัดเรียงตัวของไขมันโปรตีนใหม่ ดังแสดงในภาพที่ 2.5 เป็นผลให้สูญเสียความสามารถในการเลือกผ่านซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษเฉพาะทางชีวภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยังมีชีวิต (Watson, 1995)

โปรตีนที่สมบูรณ์ในเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมดจะถูกนำมารวมกันเป็นก้อนโดยการแยกชั้นไขมัน (lipid phase separation) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของไขมันอาจจะเปลี่ยนตำแหน่งและหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้นด้วย (Watson, 2000) ดังเช่นการลดอุณหภูมิจะเหนี่ยวนำให้เกิดการไหลของแคลเซียมและส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าการควบคุมแคลเซียมเป็นหนึ่งในการควบคุมกระบวนการคาปาซิเตชัน (Dragileva et al., 1999; Parrish et al., 1999) ซึ่งโดยความเป็นจริงแล้ว อาจจะเป็นผลมาจากความเย็นที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการควบคุมแคลเซียมภายในเซลล์ (Watson, 2000; Bateman, 2001)

2.6.4 การเติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant addition)

สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotective agent; CPAs) ทำหน้าที่ในการป้องกันความเสียหายแก่อสุจิ โดยอาจมีผลต่อขนาดและรูปร่างของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งดังกล่าว หากเป็นผลึกขนาดใหญ่และเหมาะสม จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อสุจิได้ CPAs จะทำให้ขนาดผลึกของน้ำแข็งเล็กลง สมมติฐานที่ค่อนข้างยอมรับกัน คือ CPAs ทำหน้าที่ผ่านกลไกของความเป็นเกลือบัฟเฟอร์โดยการจับกับน้ำ ทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายต่ำลง เกิดการก่อตัวของน้ำแข็งในปริมาณต่ำในทุกระดับอุณหภูมิ ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลายในของเหลวที่เหลือต่ำลงด้วย ความเสียหายที่เกิดจากความเข้มข้นของสารละลายที่เกิดขึ้นนี้ ขึ้นกับระดับอุณหภูมิ CPAs ไปลดอุณหภูมิที่จะถึงจุดเยือกแข็งของสารละลายภายในเซลล์ จึงไปลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้น บทบาทส่วนหนึ่งของ CPAs เป็นไปได้ว่าไปลดปริมาณน้ำภายในเซลล์และการจับตัวกับไอออนของโลหะ โดยทั่วไปแล้วความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ในขณะแช่แข็งเกิดได้ 2 ด้าน คือ จากความเสียหายที่เป็นผลจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็ง และความเสียหายที่เกิดจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารละลายภายในเซลล์ ซึ่งทำให้ pH ลดต่ำลงอย่างมาก

จากการศึกษาการทำงานของ glycerol ในการป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง เพื่อนำมาใช้ในการแช่แข็งอสุจิ พบว่าการเติม glycerol ลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจะช่วยลดความเสียหายจากการแช่แข็งได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามการเติมและเอา glycerol ก็ยังคงเป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวอสุจิเสียหายได้ (Watson, 1995; Rota, 1998) โดย glycerol เป็นตัวที่ไวต่อแรงดันออสโมติกด้วยเหตุนี้การเติม glycerol ไปชั่วคราวนั้นเป็นเหตุให้กลุ่มเซลล์เปลี่ยน เกิดการเคลื่อนย้ายไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจาก glycerol อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเหมือนพลาสติกได้ (Hammerstedt et al., 1990) และเซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ จึงมีการปรับปรุงความสามารถของ glycerol เพื่อให้ตอบสนองต่อ osmotic stress ซึ่ง glycerol จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการรวมตัวกันของน้ำจำนวนมากให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ดังนั้นจึงทำให้มีเวลามากขึ้นในการดึงน้ำออกจากเซลล์ก่อนที่น้ำจะเกิดการแข็งตัวและกลายเป็นผลึกน้ำแข็งที่สามารถทำลายส่วนสำคัญภายในเซลล์ สารป้องกันการเยือกแข็งรวมถึง glycerol เริ่มทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำโดยแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวกระตุ้นให้

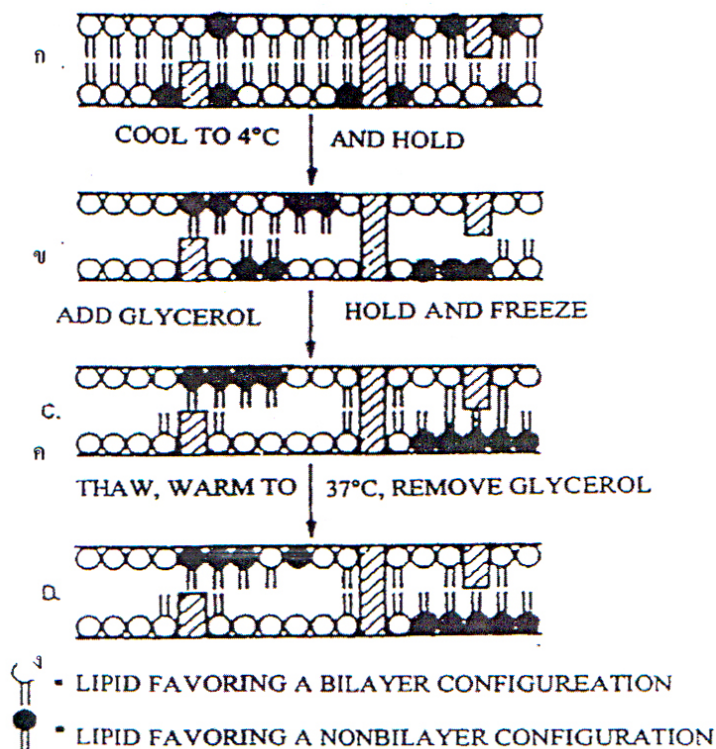


เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์และเนื่องจาก glycerol มีความสามารถเฉพาะตัวในการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ช้า (Watson, 1995)

ถึงแม้ว่าการแช่แข็งที่ใช้ glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งจะได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ โดยสามารถทำให้อัตราการผสมติดของไก่ในสายพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ มีอัตราการผสมติดที่ดี (Blesbois, 2007) อย่างไรก็ตามก็มีความจำเป็นต้องกำจัด glycerol ซึ่งมีความเป็นพิษต่อ utero vaginal junction ของแม่ไก่ออกไป ดังนั้นจึงเพิ่มความซับซ้อนในการปฏิบัติงานในภาคสนาม (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550) สุนทร สุนาทัย และคณะ (2552) ได้รายงานว่าการใช้ glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายแก่อสุจิในไก่พื้นเมืองในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีผลดีต่ออสุจิภายหลังการแช่แข็ง แต่การลดความเข้มข้นของ glycerol ในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการเติมน้ำยาเจือจาง เพื่อลดความเป็นพิษต่อ utero vaginal junction และให้ง่ายต่อการปฏิบัติในภาคสนาม พบว่าไม่ประสบความสำเร็จในเรื่องอัตราการผสมติดในแม่ไก่

นอกเหนือจาก glycerol แล้วสารจำพวกน้ำตาลยังมีบทบาทหน้าที่หลายอย่าง ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ มีทั้งเป็นสารที่ให้พลังงานแก่อสุจิขณะบ่ม (Fukuhata and Nishikawa, 1973; Iordachescu and Imai, 2008) รักษาแรงดันออสโมติก (Salamon and Ritar, 1982; Aboagla and Terada, 2003) เป็นตัวทำให้ผนังอสุจิเกิดความมั่นคง และลดความเสียหายของเซลล์อสุจิในการก่อดัวของปลีคน้ำแข็ง (Liu et al., 1998)





ภาพประกอบ 2.5 แผนภาพของผลกระทบที่เป็นไปได้ในการลดอุณหภูมิและการกลับมาทำให้อุ่นขึ้นอีกครั้งต่อการกระจายตัวของไขมันรอบเยื่อหุ้มโปรตีน

ก) แสดงให้เห็นเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่รีดเก็บได้

ข) แสดงให้เห็นการจัดกลุ่มที่เหมาะสมของไขมันชนิด non-bilayer ซึ่งเป็นผลจากการลด อุณหภูมิลงไปที่ 4 องศาเซลเซียส

ค) แสดงให้เห็นการจัดกลุ่มของไขมันในระหว่างแช่แข็ง

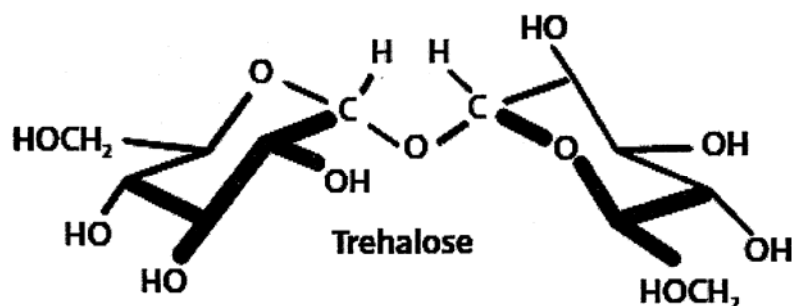
ง) แสดงให้เห็นรูปแบบของไขมันที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากทำให้อุ่นขึ้นอีกครั้ง

ที่มา: Hammerstadt และคณะ (1990)

2.7 ทรีฮาโลส (Trehalose)

จากการศึกษาพบว่า ทรีฮาโลสจัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีประโยชน์ต่อการมีชีวิตรอดหลังการทำลายของเซลล์อสุจิในสัตว์หลายชนิด (Bucak et al., 2007; Ejaz and Melih, 2012) รวมถึงช่วยรักษาแรงดันออสโมติกของการเจือจาง และทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการเยือกแข็งได้อีกด้วย น้ำตาลโมเลกุลคู่อย่างทรีฮาโลส (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) ซึ่งเชื่อมด้วยพันธะ alpha-1, 1 glucosidic bond (Elbein, 2003; Branca et al., 2004; Patist and Zoerb, 2005) ดังแสดงในภาพประกอบ 2.6 เป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งเมื่อถูกเติมลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ



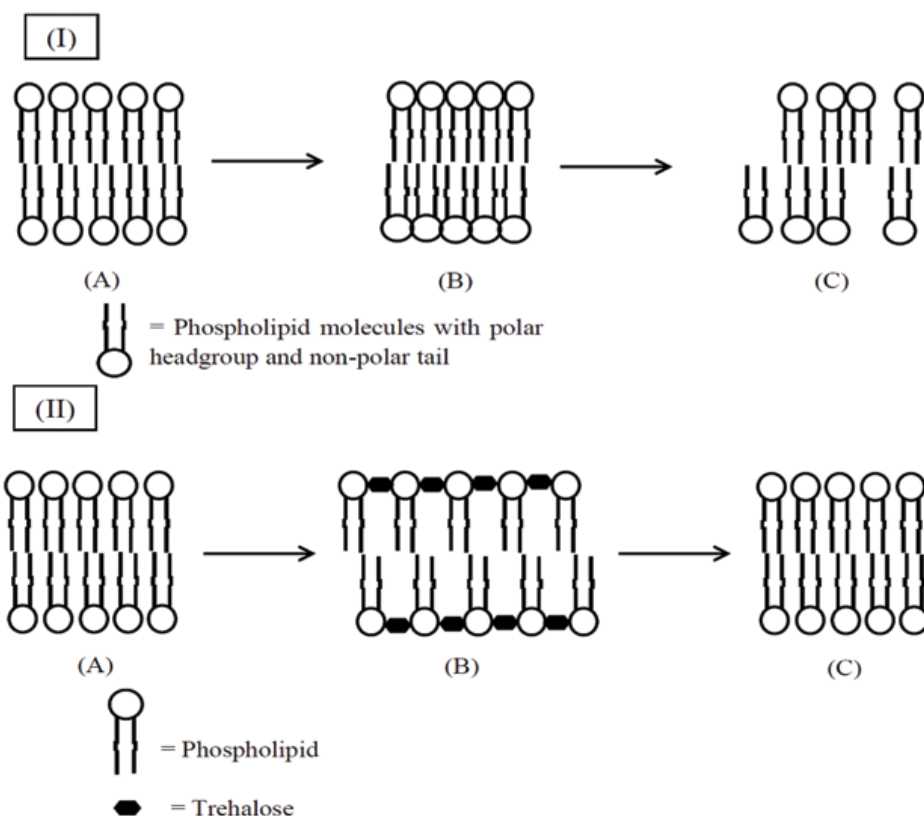


ภาพประกอบ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโลส
ที่มา: Branca และคณะ (2004)

ทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไม่ให้เกิดความเสียหายจากการถูกแช่แข็งได้ เนื่องจากนำน้ำตาลโมเลกุลคู่มาใส่น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้มีสภาวะ hypertonic จะมีการตอบสนองต่อการทำงานทางสรีรวิทยาทางเคมีของตัวอสุจิที่แตกต่างกัน โดยทรีฮาโลสจะไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ส่งผลให้เกิดการดึงน้ำออกและช่วยลดอัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิได้ ดังนั้นจึงมีการนำทรีฮาโลสมาใช้เป็นสารป้องกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าทรีฮาโลสจะทำงานเป็นตัวป้องกันซึ่งสัมพันธ์กับผลกระทบจากแรงดันออสโมติก และมีปฏิกิริยาที่จำเพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็นฟอสโฟลิปิดตรงบริเวณที่มีชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) ซึ่งผลของแรงดันออสโมติกนี้จะไปลดความสามารถในการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์และช่วยลดความบาดเจ็บของตัวอสุจิอันเกิดจาก cold shock และผลึกน้ำแข็งได้ (Storey et al., 1998)

การทำงานของทรีฮาโลสจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแทนที่น้ำตรงบริเวณจุดเชื่อมต่อของเยื่อหุ้มเซลล์และสารละลาย (Patist and Zoerb, 2005) ดังแสดงในภาพประกอบ 2.7 จึงเป็นการแทนที่โมเลกุลของน้ำขณะเกิดการสูญเสียน้ำ (Meyers, 2005) นอกจากนี้การป้องกันที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการก่อตัวของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลและบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนฟอสโฟลิปิดที่มีขั้ว (Holt and North, 1994; Watson, 1995) โดยทรีฮาโลสได้แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยากับบริเวณขั้วของเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนฟอสโฟลิปิดและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเกิดความมั่นคงแข็งแรงเมื่ออยู่ระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ทรีฮาโลสมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น (Aisen et al., 2002)





ภาพประกอบ 2.7 กระบวนการการทำงานของทรีฮาโลส
ที่มา: Patist และ Zoerb (2005)

มีการนำทรีฮาโลสมาใช้เป็นสารป้องกันการเยือกแข็งเพื่อเสริมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อในกระบวนการรักษาด้วยวิธีแช่แข็งน้ำเชื้อโค (Chen et al., 1993; Woelders et al., 1997; Uysal et al., 2007; Sariozkan et al., 2009; Hu et al., 2010) หนู (Storey et al., 1998) แกะ (Lopez-Saaz et al., 2000; Aisen et al., 2002; Mustafa and Necmettin, 2007; Bucak et al., 2007; 2008; Uysal and Bucak, 2009; Nur et al., 2010; Cirit et al., 2013; Najafi et al., 2013) กระบือ (Reddy et al., 2010) สุกกร (Funahashi and Sano, 2005; Gutierrez-Perez et al., 2008; Hu et al., 2009) สุนัข (Yildiz et al., 2000; Yamashiro et al., 2007; Michael et al., 2007; Martins-Bessa et al., 2009) กระต่าย (Dalimata and Graham, 1997; Kozdrowski, 2009) และแพะ (Aboagla and Terada, 2003; 2004; Atesshin et al., 2008; Khalili et al., 2009; Tuncer et al., 2013) และมีอีกหลายการศึกษาที่พบว่าทรีฮาโลสมีบทบาทในการป้องกันผลจากแรงดันออสโมติก และสามารถสร้างโครงร่างที่จำเพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดฟอสโฟลิปิดได้ ทำให้เซลล์มีการดึงน้ำออกจากเซลล์ก่อนการแช่แข็งจึงช่วยลดจำนวนเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง และสามารถลดการตายและความเสียหายของตัวอสุจิได้ (Chen et al., 1993; Raddy et al., 2010) ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของอสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อจะอยู่ระหว่าง 25-400 มิลลิโมล ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยทั่วไปแล้วระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่ 100 มิลลิโมล และ 70 มิลลิโมล เป็นระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุด (Ejaz and Melih, 2012) ซึ่ง Aisen และ



คณะ (2002) ได้รายงานไว้ว่าน้ำตาลทรีฮาโลสและเดกซ์เทรนส์ (dextrans) ที่ไม่สามารถแพร่ข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์สุจิได้แต่จะสร้างแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำและมีอัตราการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ต่ำลง เช่นเดียวกับการรายงานของ Yildiz et al. (2000) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของการเสริมน้ำตาลต่างชนิดกัน (กาแลคโตส, กลูโคส, ฟรุคโตส, โซโลส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว), แลคโตส, ทรีฮาโลส, มอลโตส, ซูโครส (น้ำตาลโมเลกุลคู่) และราฟิโนส (น้ำตาลสามโมเลกุล) ลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ผลปรากฏว่าตัวสุจิสุนัขที่แช่แข็งด้วยน้ำยาเจือจางที่มีการเสริมทรีฮาโลส สามารถปรับอัตราการทำงานทั้งหมดหลังการละลายของตัวสุจิขึ้นได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น ($p < 0.05$) สอดคล้องกับ Aboagla และ Terada (2003) ที่พบว่าการเติมทรีฮาโลสที่ความเข้มข้นสูงลงในน้ำยาเจือจางสามารถช่วยป้องกันอสุจิแพะไม่ให้เสียหายจากการแช่แข็งได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยน้ำตาลโมเลกุลคู่จะเพิ่มการไหลเวียนของของเหลว (fluidity) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ก่อนแช่แข็งทำให้ตัวสุจิสามารถทนต่อความเสียหายที่เกิดในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการทำละลายได้ นอกจากนี้การเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางเพื่อใช้ในการแช่แข็งอสุจิสุกรและแกะของ Hu และคณะ (2009) และ Uysal และ Bucak (2009) โดยพบว่าการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 100 มิลลิโมล นั้นทำให้อสุจิสุกรและแกะมีการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด และส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการละลายสูงที่สุดด้วย ($P < 0.05$) ซึ่ง Aisen และคณะ (2000) ยังพบว่าทรีฮาโลสสามารถช่วยให้การรอดชีวิตของอสุจิแกะดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อประเมินจากการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซม สอดคล้องกับอีกหลายการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่พบว่า ทรีฮาโลสสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้น้ำเชื้อหมีมีชีวิตรอดหลังการละลายได้ยาวนานขึ้น (Storey et al., 1998) และตัวสุจิแกะมีการเคลื่อนที่และการมีชีวิตหลังการแช่แข็งและการละลายดีขึ้น เมื่อมีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางก่อนการแช่แข็ง (Aisen et al., 2005; Matsuoka et al., 2006) แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเสริมทรีฮาโลสที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป เช่น เสริมที่ระดับ 150 มิลลิโมล และ 200 มิลลิโมล จะส่งผลเสียต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สุจิ ภายหลังจากแช่แข็งและการละลายได้ เนื่องจากความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่สูงจะเป็นพิษต่อตัวสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย (Hu et al., 2009; Uysal and Bucak, 2009)

Aboagla และ Terada (2003) รายงานว่าทรีฮาโลสช่วยคำนวณความสมบูรณ์ของอสุจิได้ยาวนานกว่ากลูโคสที่เติมลงในน้ำยาเจือจางที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมทรีฮาโลสและซูโครสลงในสารเจือจางน้ำเชื้อ พบว่าช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิสุกรภายหลังจากการละลาย (Woelder, 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gutierrez-Perez (2009) พบว่าตัวสุจิสุกรมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ดีขึ้นเมื่อมีการนำทรีฮาโลสมาเสริมร่วมกับกลีเซอรอลในสารเจือจางน้ำเชื้อ

นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการเสริมทรีฮาโลส พบว่าสามารถช่วยปรับปรุงให้การเคลื่อนที่ของตัวสุจิโคที่ถูกแช่แข็งดีขึ้นเล็กน้อย (Chen et al., 1993) และทรีฮาโลสสามารถปรับให้ตัวสุจิสุนัขทนต่อการแช่แข็งได้ (Yamashiro et al., 2007) แต่ Kozdrowski (2009) รายงานว่าทรีฮาโลสไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของตัวสุจิกระต่ายยุโรปสีน้ำตาลภายหลังจากการละลาย และ Squires และคณะ (2004) ได้รายงานว่าการเสริมทรีฮาโลสลงในสารเจือจางน้ำเชื้อไม่ได้ทำให้ตัวสุจิม้าที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งมีอัตราการเคลื่อนที่สูงขึ้น



ตารางที่ 2.2 ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสต่อเปอร์เซ็นต์ motility, membrane integrity และ acrosome integrity ของอสุจิในสัตว์แต่ละชนิด

ชนิดสัตว์	ความเข้มข้น	Motility (%)		Membrane integrity (%)		Acrosome Integrity (%)		ที่มา
		ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	
กระป๋อง	100 mM	41.67±1.67 ^b	31.67±1.67 ^a	50 ^b	35 ^a	-	-	Reddy et al. (2010) ^{***}
	25 mM	43.75±2.39 ^{cd}	41.25±4.32 ^d	-	-	17.75±1.89 ^b	23.5±1.85 ^a	Badr et al. (2010) ^{***}
	50 mM	51.25±1.25 ^{bc}	41.25±4.32 ^d	-	-	15.5±1.32 ^{bc}	23.5±1.85 ^a	
	100 mM	61.25±1.25 ^a	41.25±4.32 ^d	-	-	10.25±2.39 ^d	23.5±1.85 ^a	
	150 mM	56.25±2.39 ^{ab}	41.25±4.32 ^d	-	-	12.00±1.29 ^{cd}	23.5±1.85 ^a	
	200 mM	52.5±4.79 ^{abc}	41.25±4.32 ^d	-	-	12.75±1.49 ^{cd}	23.5±1.85 ^a	
กระต่าย	-	37 ^{ab}	31 ^a	-	-	-	-	Dalimata and Graham (1997) ^{***}
	50 mM	12.75±3.61 ^{AFa}	28.87±8.69 ^{ABE}	41.52±6.14	42.82±4.47	38.36±4.18	38.25±5.03	Kozdrowski (2009) ^{**}
	100 mM	8.25±3.54 ^{BGa}	28.87±8.69 ^{ABE}	42.23±3.46	42.82±4.47	38.53±2.25	38.25±5.03	
กวาง	400 mM	49.8±4.2	61.1±2.9	56.3±3.8	55.5±4.7	50.4±5.5	52.0±4.1	Fernández-Santos et al. (2007) [*]
แกะ	50 mOsm	52 ^{ab}	48 ^b	58 ^{a,b}	42 ^{b,c}	68 ^b	68 ^b	Aisen et al. (2002) ^{**}
	100 mOsm	68 ^a	48 ^b	60 ^a	42 ^{b,c}	77 ^a	68 ^b	
	200 mOsm	30 ^c	48 ^b	39 ^c	42 ^{b,c}	60 ^c	68 ^b	
	400 mOsm	17 ^c	48 ^b	32 ^c	42 ^{b,c}	56 ^c	68 ^b	
	76 g/L	-	-	64.0±0.9	37.5±1.0	-	-	Aisen et al. (2005) ^{***}

หมายเหตุ : * (P<0.1), ** (P<0.01), *** (P<0.05), **** (P<0.001), ***** (P<0.0001)

ตารางที่ 2.2 ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสต่อเปอร์เซ็นต์ motility, membrane integrity และ acrosome integrity ของอสุจิในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดสัตว์	ความเข้มข้น	Motility (%)		Membrane integrity (%)		Acrosome Integrity (%)		ที่มา
		ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	
แกะ	435 mM	50.0±2.0 ^b	38.8±4.3 ^a	17.3±2.8	-	93.4±2.1	94.0±1.8	Matsuoka et al. (2006) ^{***}
	50 mM	59.0±2.9 ^b	47.5±4.3 ^a	49.0±8.9	44.0±1.2	5.4±0.68	9.7±2.60	Bucak et al. (2007) ^{**}
วัว	100 mM	56.0±2.9 ^{ab}	47.5±4.3 ^a	44.8±5.7	44.0±1.2	6.2±0.58	9.7±2.60	Soylu et al. (2007) ^{***}
	62.5 mM	17	4	27	17	26	28	
	50 mM	68.0±2.9 ^c	62.5±3.3 ^{bc}	66.1±2.8 ^c	61.4±3.1 ^{bc}	-	-	Uysal and Bucak (2009) ^{****}
	100 mM	72.0±3.7 ^c	62.5±3.3 ^{bc}	68.2±3.9 ^c	61.4±3.1 ^{bc}	-	-	Tonieto et al. (2010) ^{***}
	150 mM	28.5±4.2 ^a	62.5±3.3 ^{bc}	26.9±3.8 ^a	61.4±3.1 ^{bc}	-	-	
	100 mM	49.2±2.7 ^a	23.7±2.7 ^b	36.5±2.6 ^a	16.4±2.6 ^b	65.3±3.5	49.2±3.5	Jafaroghli et al. (2010) ^{****}
	50 mM	51 ^{bcd}	40 ^e	49 ^{bc}	42 ^d	12 ^{bc}	14 ^a	
	70 mM	55 ^{bc}	40 ^e	55 ^{ab}	42 ^d	9 ^{ed}	14 ^a	Cirit et al. (2013) ^{****, **, *****}
	100 mM	62 ^a	40 ^e	59 ^a	42 ^d	7 ^e	14 ^a	
	50 mM	32.6 ^{ef}	26.8 ^{cde}	48.5 ^{abc}	36.9 ^a	6.3 ^{ab}	10.0 ^{bc}	Najafi et al. (2013) ^{***}
	100 mM	26.6 ^{cde}	26.8 ^{cde}	54.6 ^c	36.9 ^a	5.7 ^{ab}	10.0 ^{bc}	
	50 mM	52 ^b	44 ^c	49 ^b	40 ^d	-	-	
	100 mM	62 ^a	44 ^c	56 ^a	40 ^d	-	-	

หมายเหตุ : * (P<0.1), ** (P<0.01), *** (P<0.05), **** (P<0.001), ***** (P<0.0001)

ตารางที่ 2.2 ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสต่อเปอร์เซ็นต์ motility, membrane integrity และ acrosome integrity ของอสุจิในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดสัตว์	ความเข้มข้น	Motility (%)		Membrane integrity (%)		Acrosome Integrity (%)		ที่มา
		ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	
โค	0.2 M	3.0	57.7	-	-	59.0	57.3	Woelder et al. (1997)***
	25 mM	38.34±1.35 ^b	36.88±1.53 ^b	36.87±1.95 ^b	36.32±2.11 ^b	55.26±1.32 ^c	53.40±1.85 ^c	Hu et al. (2010)***
	50 mM	44.36±1.83 ^a	36.88±1.53 ^b	38.73±1.74 ^b	36.32±2.11 ^b	59.47±1.03 ^b	53.40±1.85 ^c	
	100 mM	46.61±1.62 ^a	36.88±1.53 ^b	44.33±1.71 ^a	36.32±2.11 ^b	64.78±1.35 ^a	53.40±1.85 ^c	
	200 mM	35.30±1.37 ^b	36.88±1.53 ^b	34.43±2.14 ^b	36.32±2.11 ^b	51.33±1.77 ^c	53.40±1.85 ^c	
แพะ	100 mM	47±1.15	36±3.05	50±1.52	37.667±3.38	-	-	Chhillar et al. (2012)***
	25 mM	66.0±2.9 ^{ab}	62.0±1.8 ^a	-	-	49 ^a	40 ^a	Aboagla and Terada (2003)***
	50 mM	69.0±3.1 ^{bc}	62.0±1.8 ^a	-	-	50 ^a	40 ^a	
	75 mM	73.0±2.5 ^{bc}	62.0±1.8 ^a	-	-	60 ^{bc}	40 ^a	
	100 mM	78.0±1.8 ^c	62.0±1.8 ^a	-	-	65 ^c	40 ^a	
	50 mM	43.54±0.72 ^{de}	35.45±0.69 ^f	45.72±0.94 ^c	35.65±0.74 ^e	10.11±0.47 ^b	16.11±0.49 ^c	Khalili et al. (2009)***
	75 mM	50.36±0.54 ^b	35.45±0.69 ^f	49.32±0.81 ^b	35.65±0.74 ^e	9.15±0.47 ^{ab}	16.11±0.49 ^c	
	100 mM	52.36±0.60 ^a	35.45±0.69 ^f	54.54±0.70 ^a	35.65±0.74 ^e	8.05±0.47 ^a	16.11±0.49 ^c	
12.5 mM	54.4±5.21 ^{bc}	46.3±6.32 ^b	50.9±2.74 ^{bc}	51.4±3.35 ^{bc}	2.6±0.38 ^a	2.5±0.33 ^a	Tuncer et al. (2013)****, **, ***	
25 mM	61.9±3.40 ^c	46.3±6.32 ^b	56.1±2.57 ^c	51.4±3.35 ^{bc}	1.3±0.16 ^a	2.5±0.33 ^a		

หมายเหตุ : * (P<0.1), ** (P<0.01), *** (P<0.05), **** (P<0.001), ***** (P<0.0001)

ตารางที่ 2.2 ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสต่อเปอร์เซ็นต์ motility, membrane integrity และ acrosome integrity ของอสุจิในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)

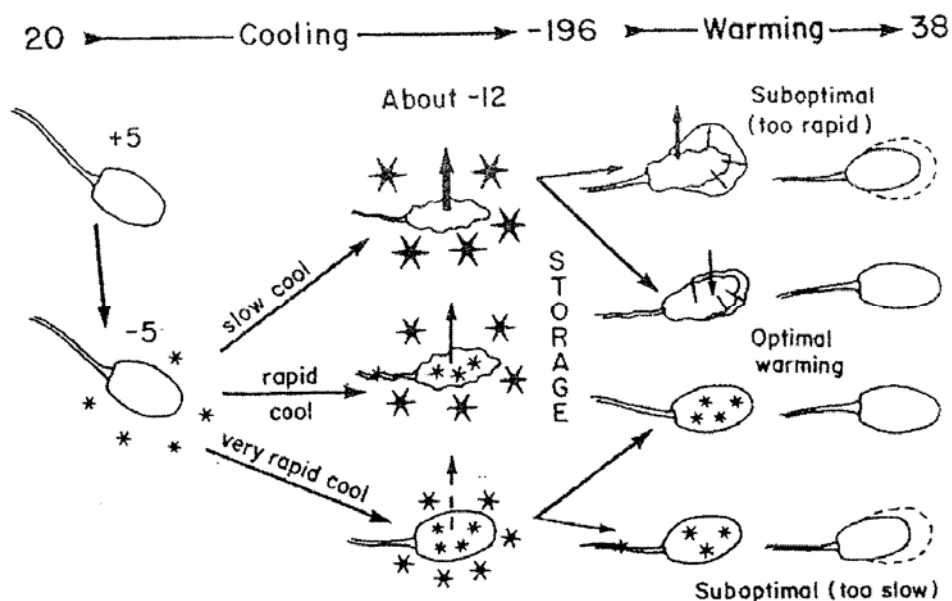
ชนิดสัตว์	ความเข้มข้น	Motility (%)		Membrane integrity (%)		Acrosome Integrity (%)		ที่มา
		ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	ทรีฮาโลส	-	
แพะ	50 mM	61.9±4.11 ^c	46.3±6.32 ^b	53.9±1.89 ^c	51.4±3.35 ^{bc}	1.8±0.31 ^a	2.5±0.33 ^a	Tuncer et al. (2013) ****, **, ***
	75 mM	55.0±4.01 ^{bc}	46.3±6.32 ^b	51.3±3.53 ^{bc}	51.4±3.35 ^{bc}	2.0±0.38 ^a	2.5±0.33 ^a	
	100 mM	48.1±2.30 ^{bc}	46.3±6.32 ^b	44.0±2.08 ^a	51.4±3.35 ^{bc}	3.3±0.37 ^a	2.5±0.33 ^a	
	150 mM	28.1±5.59 ^a	46.3±6.32 ^b	42.5±2.44 ^a	51.4±3.35 ^{bc}	8.3±3.61 ^b	2.5±0.33 ^a	
ม้า	9 mM	66	63	-	-	-	-	Squires et al. (2004) ***
สุกร	250 mM	18.59±8.4 ^a	20.31±9.18 ^a	-	-	70.0±4.33 ^a	35.78±3.57 ^b	Gutiérrez-Pérez et al. (2009) ***
	25 mM	37 ^b	30 ^c	36 ^b	30 ^c	54 ^b	38 ^c	Hu et al. (2009) ***
	50 mM	47 ^b	30 ^c	38 ^b	30 ^c	63 ^a	38 ^c	
	100 mM	50 ^a	30 ^c	45 ^a	30 ^c	67 ^a	38 ^c	
	200 mM	38 ^b	30 ^c	39 ^b	30 ^c	65 ^a	38 ^c	
สุนัข	70 mM	59.3±2.8 ^{de}	50.7±4.3 ^{bcd}	-	-	42.1±2.3 ^a	55.1±2.2 ^c	Yildiz et al. (2000) ***
	0.375 M	68.3±1.6 ^b	55.0±2.8 ^a	-	-	76.3±2.0	77.3±2.6	Yamashiro et al. (2007) ***
		72.0±2.5 ^b	63.3±4.4 ^{ab}	-	-	83.0±1.7	81.0±4.6	
หนู	0.3 M	62	42	42	24	-	-	Sztejn et al. (2001) **

หมายเหตุ : * (P<0.1), ** (P<0.01), *** (P<0.05), **** (P<0.001), ***** (P<0.0001)

2.8 การแช่แข็งตัวอสุจิ (sperm freezing)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์แต่ละชนิด มีปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาเพื่อกำหนดความเหมาะสมในวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อให้ได้น้ำเชื้อเมื่อทำละลายแล้วมีคุณภาพดีที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ คือ 1) ชนิดและระดับของสารที่ใช้ป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย 2) อัตราการลดอุณหภูมิจนถึงสภาพแข็งเพื่อควบคุมการเกิดผลึกน้ำแข็ง 3) อัตราการทำละลายเพื่อให้เซลล์กลับคืนสู่สภาพปกติ (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550) โดยธรรมชาติแล้วเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง จะเกิดผลต่อตัวอสุจิไม่มากนักน้อย ขึ้นอยู่กับสูตรน้ำยาเจือจาง และระยะเวลาเมื่อลดอุณหภูมิลงอสุจิมักเกิดการ ช็อค (cold shock) เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ โดยเฉพาะการลดอุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว โดยปรากฏการณ์ที่พบ คือ หางอสุจิองพับ สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่เมื่อสารป้องกันการเยือกแข็งถูกเติมลงไปและปรับสมดุลกับน้ำเชื้อ จะเริ่มเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง อัตราในการแช่แข็งนั้นค่อนข้างหลากหลายขึ้นอยู่กับสัตว์แต่ละชนิด และลักษณะภาชนะบรรจุ โดยขณะที่การแช่แข็งเริ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลงจาก 5 ถึง -15 องศาเซลเซียส (ซึ่งอธิบายได้ว่าเป็นช่วงเวลาที่ผลึกน้ำแข็งเริ่มก่อตัวขึ้นในสารละลายรอบๆ เซลล์ ในขณะที่ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ยังไม่แข็งตัว) โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิลดลงสำหรับเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง คือ อุณหภูมิระหว่าง -15 ถึง -16 องศาเซลเซียส อสุจิจะพบอุณหภูมิลดลง 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะเกิดขึ้นในขณะที่แช่แข็ง ครั้งที่สองในขณะที่ทำละลาย ขณะแช่แข็งที่ -196 องศาเซลเซียส สภาพต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่างๆ ไม่มี เนื่องจากอุณหภูมิต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียส และสภาพน้ำเชื้อจะเป็นผลึกที่คงตัว สันนิษฐานได้ว่าอาจเป็นเพราะรูของเยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดเล็กเกินไปที่ผลึกน้ำแข็งจะแพร่กระจายเข้ามาได้ ด้วยเหตุนี้การที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์จึงถูกขัดขวางไว้ (Hammerstedt et al., 1990; Parks and Graham, 1992) เนื่องจากน้ำที่เย็นมากภายในเซลล์มีคุณสมบัติทางเคมีต่างจากน้ำภายนอกเซลล์ ดังนั้นจึงเกิดการไหลออกและแข็งตัวอยู่ภายนอก และเมื่ออุณหภูมิลดลงอย่างต่อเนื่องและน้ำภายนอกเริ่มแข็งตัว เซลล์จะตกอยู่ในสภาวะไฮเปอร์โทนิก (hypertonic) และความเข้มข้นของเกลือภายนอกเซลล์ก็สูงขึ้นด้วย เป็นเหตุให้น้ำไหลออกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการที่น้ำไหลออกนอกเซลล์นั้นจะช่วยลดความเสียหายที่มีโอกาสเกิดขึ้นจากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 2.8 ดังนั้นอัตราในการแช่แข็งจึงกลายเป็นสิ่งสำคัญต่อจำนวนการก่อตัวขึ้นของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ถ้าหากว่าจัดช่วงเวลาเร็วเกินไปไม่เพียงพอที่จะทำให้ น้ำออกจากเซลล์ได้ทันและผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์สามารถก่อตัวขึ้นได้ จะไปเพิ่มโอกาสทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งหรือเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงปริมาตรอย่างรวดเร็วจนเยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถรองรับได้ (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995) แต่ถ้าใช้เวลาในการแช่แข็งช้าเกินไปก็จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำและลดการก่อตัวขึ้นของผลึกน้ำแข็ง อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ตกอยู่ในสารละลายเข้มข้นเป็นเวลานาน เซลล์จะมีการสูญเสียเฉพาะในขณะที่เกิดการดึงน้ำกลับเข้าเซลล์อีกครั้งเท่านั้น จึงทำให้เห็นได้ว่าอัตราการแช่แข็งที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของภาชนะบรรจุ ปริมาตร และขั้นตอนในการแช่แข็ง ซึ่งต้องมีการพิจารณาไปตามสัตว์แต่ละชนิด





ภาพประกอบ 2.8 สภาพเซลล์อสุจิของสัตว์ทั่วไปเมื่อมีการลดอุณหภูมิและการละลาย
ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

ที่มา: Hammerstedt (1995)

2.9 การละลายน้ำแข็งแช่แข็ง

น้ำแข็งแช่แข็งที่ทำการแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้น้ำยังคงเหลืออยู่ในเซลล์ในปริมาณมากนั้น หากทำการละลายด้วยอัตราการละลายช้า จะทำให้อสุจิรอดตายต่ำ เนื่องจากทำให้เกิดการก่อตัวของน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เกิดผลึกรูปทรงแหลมตลอดจนเกิด dilution shock น้ำแข็งแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิช้าซึ่งภายในเซลล์เหลือน้ำอยู่น้อยจะต้องทำการละลายอย่างช้า เพื่อให้มีโอกาสซึมเข้าเซลล์ได้ในอัตราที่เหมาะสม หากทำการละลายด้วยอุณหภูมิที่สูง ซึ่งทำให้การละลายเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ผนังเซลล์อสุจิอาจเกิดความเสียหายจากการไหลเข้าหาน้ำได้ (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550)

2.10 การเกิด Reactive Oxygen Species (ROS)

เมื่อเซลล์ที่มีชีวิตถูกเก็บอยู่ในสถานะที่ใช้ออกซิเจน เช่น ระหว่างการแช่เย็น แช่แข็ง และละลายตัวอสุจิ จะต้องการออกซิเจนเพื่อไปช่วยในกระบวนการสันดาป แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตจากการสันดาปออกซิเจนที่มากเกินไป คือ ROS จะเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เสียหายและเกิดการตายได้ โดย ROS คือพวกอนุมูลอิสระ ที่มีอิเล็กตรอนไม่เข้าคู่ เช่น superoxide radicals (O_2^-), hydroxyl radicals (OH^\cdot) หรือ hydrogen peroxide (H_2O_2) (Thuwanut, 2007) ซึ่งในระหว่างกระบวนการแช่แข็งอสุจิ จะถูกทำให้เกิดการช็อคจากความเย็นและสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศ ทำให้ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา लिปิดเปอร์ออกซิเดชัน เนื่องจากการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่สูงขึ้น ความเสียหายที่ยิ่งไปกว่านั้น คือ ROS มีความเกี่ยวข้องทางสรีรวิทยาในการรักษาความสามารถในการปฏิสนธิและ



กระบวนการคาปาซิเตชัน (capacitation)/อะโครโซมรีแอคชัน (acrosome reaction) ของตัวอสุจิ โดย ROS ที่มากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการปฏิสนธินั้นลดน้อยลง (Baumber et al., 2000; Bucak et al., 2008) นอกจากนี้การผลิต ROS ในปริมาณมากจากตัวอสุจิที่ไม่โตเต็มที่และอสุจิที่มีรูปร่างไม่ปกติ และระดับของ ROS (superoxide, hydroxyl, hydrogen peroxide, nitric oxide, peroxy nitrile) ที่สูงนั้นเป็นอันตรายต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิตรอด และการทำงานของตัวอสุจิ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โพรตีน นิวเคลียสและ mitochondrial DNA ซึ่งกระบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายขึ้นอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของสัตว์ที่เต็มไปด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแหลมมาก แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้เวตต่อการที่พวกอนุมูลอิสระจะเหนี่ยวนำให้ตัวอสุจิเกิดความเสียหายเนื่องจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (peroxidation damage) (Sikka, 2004)

2.11 การเกิด oxidative stress และการเกิด lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ

ความเสียหายจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเริ่มต้นจากการผลิต ROS ในปริมาณมาก ระหว่างการเกิด oxidative stress ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงเกิดความเสียหายของ DNA ที่ส่วนหัวของอสุจิด้วย (Agarwal and Said, 2003) ภายใต้สภาวะปกติตัวอสุจิที่ DNA เสียหายนั้นจะไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิได้ ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นนั้นได้ไปเพิ่มความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิด้วยเช่นกัน โดยปกติในเนื้อเยื่อทุกชนิดจะปรากฏกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์และสารที่หลั่งออกมาจะไปยังยังการผลิต ROS และต่อต้านป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้น ในทางทฤษฎี การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถป้องกันและขัดขวางไม่ให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยา ROS ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสิ่งที่มีอิทธิพลต่อการเกิดปฏิกิริยาอ็อกซิเดชันในเซลล์มากที่สุดคือ การเข้าไปรบกวนโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งจากกลไก การป้องกันที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การที่เยื่อหุ้มเซลล์มี NADH และกลูตาไทโอนในระดับต่ำนั้นจะส่งผลให้ไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ในการขนย้ายผลิตภัณฑ์จากการสลายปฏิกิริยาอ็อกซิเดชัน (metabolites of lipid peroxidation) และจะส่งผลต่อปริมาณแคลเซียม (Ca^{2+}) และสภาวะการปรับสมดุล (homeostasis) ของเซลล์อีกด้วย (Sikka, 2004) และเมื่อความสมดุลของแคลเซียมมีการเปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Aaberg et al., 1989; Sikka, 2004) ตามมา

อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาอ็อกซิเดชัน ขึ้นอยู่กับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระที่ทำงานโดยตัวอสุจิ โดยหนึ่งในผลิตภัณฑ์ของการสลายปฏิกิริยาอ็อกซิเดชัน คือ malondialdehyde ซึ่งผลิตภัณฑ์ตัวนี้ถูกใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีเพื่อตรวจวัดระดับความเสียหายของตัวอสุจิจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (Aitken et al., 1989; Aitken and Fisher, 1994)

มีรายงานว่าอนุมูลออกซิเจนอิสระ (superoxide radicals; $O_2^{\cdot-}$) จะถูกผลิตขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งและทำลายตัวอสุจิโค (Chatterjee and Gagnon, 2001) และสุนัข (Michael et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกด้วยว่า วงรอบในการแช่แข็งและการทำลายทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกกลูตาไทโอน (GSH) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase;



SOD) ลดลง ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่า ROS สามารถเป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวอสุจิเกิดความเสียหายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งได้ (Thuwanut, 2007)

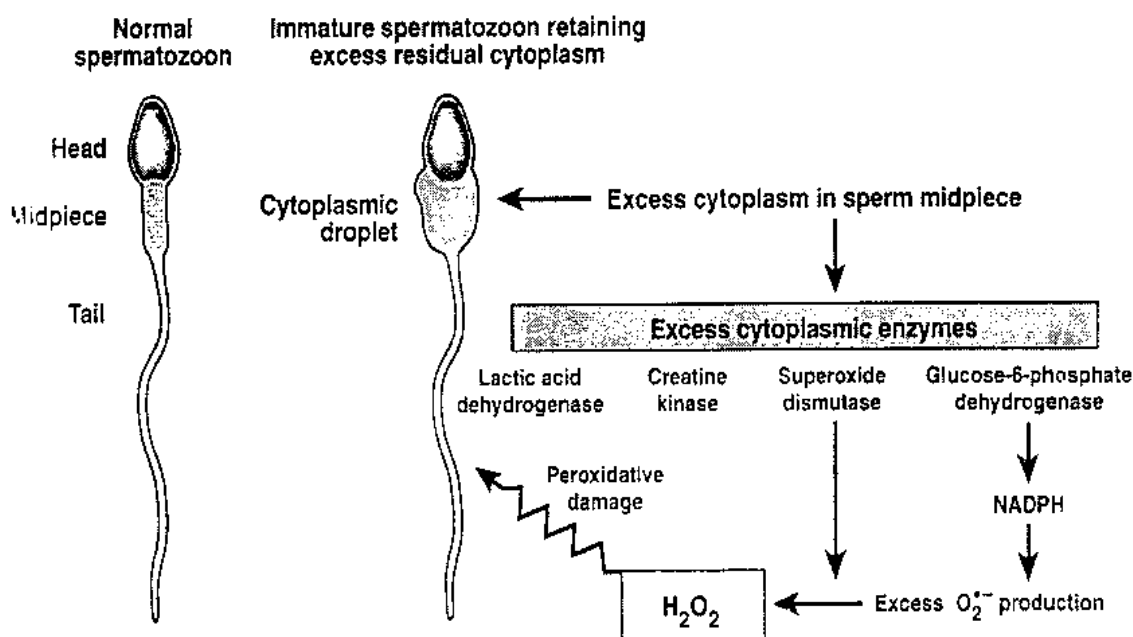
2.12 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเกิด oxidative stress และการทำงานของอสุจิ

สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติจากการเมตาบอลิซึมของออกซิเจน จะอยู่ในรูป reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิแดนท์สูง ประกอบด้วย ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2), เพอร์ออกซ์ซิวล (peroxyl radicals) และ ไฮดรอกซ์ซิวล (hydroxyl radicals, HO^\cdot) โดยสภาวะปกติที่มีการมีสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อจะสามารถพบได้ในปริมาณเล็กน้อยเนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดสมดุลขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกริยา capacitation ของตัวอสุจิ กระตุ้นการเกิดการยึดเกาะกันของตัวอสุจิกับชั้น zona pellucida ของไข่ และเป็นสารช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกริยา acrosome reaction อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำให้ปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วย ทำให้เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายกับตัวอสุจิได้ โดยพบว่าการมีระดับสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดปฏิกริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบหลักส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความชุ่มฉ่ำลดลง (decrease fluidity) และพบการแตกออกของสาย DNA (DNA fragmentation) การเกิดปฏิกริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่มากเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิน้อยลงและลดความสามารถในการเกิดการรวมตัวกันของอสุจิและไข่ในการเกิดการปฏิสนธิ (Kim and Parthasarathy, 1998; Roca et al., 2005; Sheweita et al., 2005; Robaire, 2006)

ภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยาปกติ (normal physiologic conditions) เซมิโนล พลาสมา และตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ปกติจะไม่ผลิต ROS ในระดับสูง ซึ่งจะไม่ตรวจพบในน้ำเชื้อของคนหรือสัตว์ปกติ ในทางกลับกันจะมีการตรวจพบระดับ ROS จากคนไข้ที่ไม่สมบูรณ์พันธุ์ (infertile patients) และอสุจิที่มีรูปร่างไม่ปกติก็สามารถผลิต ROS เพิ่มขึ้นได้เช่นกัน (Sharma, Agarwal, 1996; Ramanda et al., 2002) ดังแสดงในภาพประกอบ 2.9 โดย ROS จะเกิดขึ้นจากความหลากหลายขององค์ประกอบของอสุจิ เช่น การไม่เคลื่อนที่หรือการที่อสุจิมีรูปร่างผิดปกติ มีเม็ดเลือดขาวปน และอสุจิที่มีรูปร่างปกติ แต่การทำงานไม่ปกติ โดยทั่วไปเอนไซม์ที่เป็นตัวกำจัด ROS ประกอบด้วย เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเคยตรวจพบในตัวอสุจิของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้ง แกะ มนุษย์ กระต่าย และหนู โดยระดับของ SOD ในตัวอสุจินั้นจะสัมพันธ์โดยตรงกับช่วงเวลาในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ รวมถึงเอนไซม์ catalase ที่เป็นตัวป้องกันความเสียหายอันเกิดจาก ROS เช่นเดียวกับเอนไซม์ selenium-containing antioxidase ที่มีระบบการขนย้าย ROS รวมทั้งเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GSSG) และเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเตส (glutathione reductase; GSH) ที่ซึ่งมีอยู่ในตัวอสุจิ นอกจากนี้ระบบอาจจะทำงานโดยตรงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยังป้องกันการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และอัตราส่วนระหว่าง GSH/GSSG ที่สูงจะช่วยให้ตัวอสุจิต่อสู้กับ



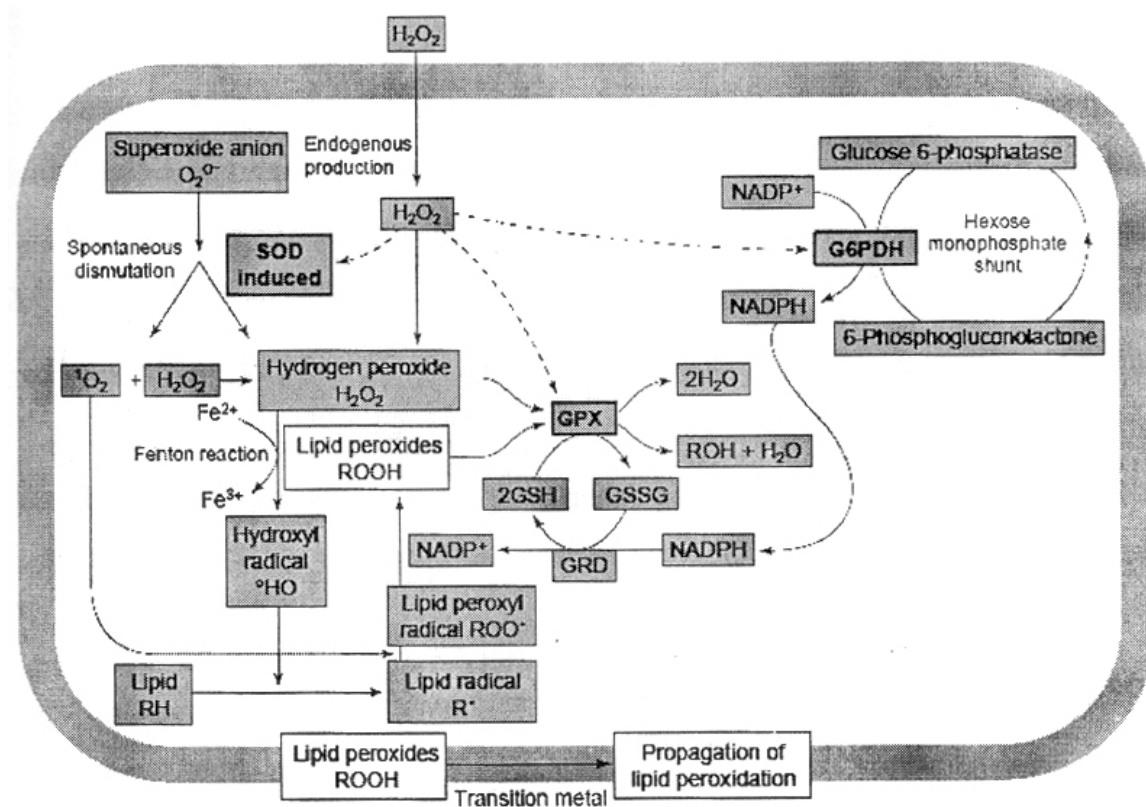
ความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี โดยปกติแล้วความสมดุลคือ การรักษาจำนวนการผลิต ROS และการที่เซลล์กำจัด ROS ออก โดยที่ความเสียหายของเซลล์จะเกิดขึ้นต่อเมื่อความสมดุลนี้ถูกรบกวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อระบบการขจัด (scavenging system) ไม่สามารถกำจัดการเพิ่มขึ้นของ ROS และการไม่สามารถทราบสาเหตุของความไม่สมบูรณ์พันธุ์ได้ (Sikka, 2004)



ภาพประกอบ 2.9 กลไกในการผลิต ROS เพิ่มขึ้นจากตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ
ที่มา: Ramanda และคณะ (2002)

จากการศึกษาโดยใช้เซลล์อสุจิที่ไม่มีเซมินอล พลาสมา พบความสัมพันธ์ระหว่างความบกพร่องในการทำงานของตัวอสุจิกับระดับ SOD และการผลิต ROS ทั้งเกิดขึ้นตามธรรมชาติหรือภายหลังการกระตุ้นด้วย calcium ionophore ซึ่งสารอื่นๆ ในน้ำเชื้อก็สามารถทำหน้าที่ขจัด ROS ได้ด้วยเช่นกัน โดยจะทำงานเหมือนกับการทำงานของ SOD หรือ catalase นอกจากนี้โปรตีนจำพวก albumin และสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ เช่น กลูตาไทโอน ไพรูเวท (pyruvate) ทัวรีน (taurine) และไฮโปทัวรีน (hypo-taurine) รวมถึงวิตามินอี และวิตามินซีด้วย ที่สามารถปกป้องเนื้อเยื่อจากการเกิด oxidative stress ได้ (Sharma and Agarwal, 1996) และจากการรายงานพบว่ากลูตาไทโอนในเซลล์มีบทบาทต่อกระบวนการทางชีวภาพมากมาย ประกอบด้วยการสังเคราะห์โปรตีน DNA และการขนส่งกรดอะมิโน แต่กลูตาไทโอนจะมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ชัดเจนกว่าบทบาทอื่น โดยกลูตาไทโอนมีส่วนร่วมในกลไกการป้องกันที่เกี่ยวกับการยับยั้งการเกิด ROS รวมถึงการก่อดำเนินของ peroxides ในกระบวนการสันดาปออกซิเจนของเซลล์ด้วย และความเป็นพิษที่เกิดขึ้นนี้อาจจะถูกขจัดออกในกระบวนการผ่านทางปฏิกิริยา รีดักชัน โดย glutathione peroxidase (GPX) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น oxidized glutathione (GSSG) ในทางกลับกัน GSSG จะถูกเปลี่ยนโดย

glutathione reductase (GRD) ในขณะที่มี NADPH ร่วมด้วยในปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพประกอบ 2.10 (Irvine, 1996) นอกจากนี้สารประกอบอื่นๆ เช่น xenobiotics อาจจะช่วยขจัดความเป็นพิษได้ โดยมีการทำงานร่วมกันของ glutathione S-transferases และกลูตาไทโอน (Den Boer et al., 1990b; Irvine, 1996)



ภาพประกอบ 2.10 กระบวนการเกิดปฏิกิริยาลิปดออกซิเดชันและระบบการป้องกันของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตัวของสุจิ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจจะไปลดการทำงานของ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) ตามเส้นประ (----) ซึ่งเป็นการยอมให้ผลิตภัณฑ์ของ ROS ภายนอกมีผลต่อการสะสม lipid peroxides ที่เป็นพิษและพัฒนาเป็นปฏิกิริยาลิปดเปอร์ออกซิเดชัน
ที่มา: Irvine (1996)

จากการศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย (semen thawing media; Tm) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็ง เสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล ร่วมกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย พบว่าอัตราการปฏิสนธิเป็น 85.08±3.46 และ 97.46±1.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (18.52±3.36 เปอร์เซ็นต์) สามารถสรุป ได้ว่าการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายมี

ประสิทธิภาพเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิสุกรได้ ($P < 0.05$) (Gadea et al., 2004)

จากการศึกษาข้างต้นทำให้มีการศึกษาต่อเนื่อง โดยทำการประเมินผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย เพื่อชดเชยปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอสุจิที่สูญเสียไประหว่างกระบวนการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า การเสริมกลูตาไทโอน ที่ระดับ 1 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล ทำให้มีจำนวนของตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการคาปาซิเตชันต่ำกว่า (15.07 ± 0.59 และ 14.35 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (16.44 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์) ($p = 0.03$) และมีจำนวนอสุจิที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (6.83 ± 0.29 และ 6.41 ± 0.21 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (7.24 ± 0.31 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์) ($P < 0.04$) จากการศึกษากระบวนการคาปาซิเตชัน (39.02 ± 1.65 และ 42.13 ± 1.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และจำนวนอสุจิที่เปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลในเยื่อหุ้มเซลล์ (32.38 ± 1.08 และ 32.73 ± 1.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ที่เสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล ไม่พบความแตกต่างระหว่างการตายของตัวอสุจิ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (39.96 ± 1.6 และ 32.61 ± 0.95 ตามลำดับ) ($p < 0.01$) นอกจากนี้ยังมีการลดลงของการสร้าง ROS ในเซลล์ (1 มิลลิโมล GSH: 74.64 ± 1.64 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล GSH: 66.32 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (140.45 ± 3.75 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.0001$) และตัวอสุจิที่มีความสามารถในการเจาะโอโอไซต์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (1 มิลลิโมล GSH: 51.94 ± 2.85 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล GSH: 58.95 ± 2.92 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (35.18 ± 2.73 เปอร์เซ็นต์) และยังมีการรายงานอีกด้วยว่าการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายสามารถให้ประโยชน์ในการปรับหน้าที่การทำงานและเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิสุกรที่ผ่านการแช่แข็งให้ดีขึ้นได้ (Gadea et al., 2005)

Gadea และคณะ (2011) ทำการศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย ที่ระดับ 1 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล ในอสุจิมนุษย์ เพื่อหาอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มมากขึ้น (1 มิลลิโมล: 47.10 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล: 48.44 ± 0.70 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (39.68 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์) ($P < 0.01$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ (1 มิลลิโมล: 39.27 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล: 39.11 ± 0.92 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (39.42 ± 0.78 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$) จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการเสริมกลูตาไทโอนในสารเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย สามารถช่วยให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเพิ่มมากขึ้น

Gadea และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายในอสุจิแพะ ที่ระดับ 1 มิลลิโมล และ 5 มิลลิโมล พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ (1 มิลลิโมล: 60.3 ± 1.1 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล: 59.9 ± 1.3 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (53.8 ± 1.5 เปอร์เซ็นต์) ลดจำนวนตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการคาปาซิเตชัน (1 มิลลิโมล: 49.75 ± 1.44 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล: 46.50 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (51.51 ± 1.66 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.01$) ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนอะโครโซมที่ไม่ถูกทำลาย ที่ระดับ 5 มิลลิโมล (47.87 ± 1.46 เปอร์เซ็นต์) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (42.29 ± 1.54



เปอร์เซ็นต์) ($P < 0.01$) แต่ไม่พบความแตกต่างที่ระดับ 1 มิลลิโมล (44.15 ± 1.37 เปอร์เซ็นต์) ลดอัตราการเกิดปฏิกิริยา ROS ภายในเซลล์ (1 มิลลิโมล: 12.57 ± 1.23 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์, 5 มิลลิโมล: 11.76 ± 0.97 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (21.40 ± 2.33 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์) ($p < 0.01$) และช่วยลดอัตราการเกาะกลุ่มของโครมาติน (1 มิลลิโมล: 8.38 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์, 5 มิลลิโมล: 3.36 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (21.47 ± 5.63 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบการเสริมระหว่าง reduced glutathione (GSH) ที่ระดับ 5 มิลลิโมล และ oxidized glutathione (GSSG) ที่ระดับ 2.5 มิลลิโมล ในสารเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตและลดการเกิดปฏิกิริยา ROS ภายในเซลล์ พบว่าการเสริม GSH ที่ระดับ 5 มิลลิโมล สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตและลดการเกิดปฏิกิริยา ROS ภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (55.35 ± 0.84 , 45.54 ± 1.35 เปอร์เซ็นต์, 3.22 ± 0.23 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (50.23 ± 0.84 , 41.00 ± 1.26 เปอร์เซ็นต์ และ 4.66 ± 0.43 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างของการเสริม GSSG ที่ระดับ 2.5 มิลลิโมล (49.03 ± 0.88 , 42.15 ± 1.21 เปอร์เซ็นต์, 4.46 ± 0.40 ไมโครเมตร/มิลลิลิตร/ 5×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการเสริมกลูตาไทโอนลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย ช่วยเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ (Gadea et al., 2004; 2005) ช่วยลดจำนวนตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการคาปาซิเตชัน ลดการเกิดปฏิกิริยา ROS ภายในเซลล์ และเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิได้ เมื่อผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง (Gadea et al., 2005; 2011; 2013)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมที่มีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และการเสริมกลูตาไทโอนในสารเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อต่ออสุจิไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังต่อไปนี้ คือ

3.1.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด ในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง โดยกลุ่ม การศึกษาทั้งหมดแบ่ง ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ
วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและโรงเรือน

ทำการศึกษาโดยใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ อายุเฉลี่ย 10 เดือน จำนวน 24 ตัว แยกเลี้ยงขังกรงเดี่ยว และได้รับอาหารประมาณ 130 กรัม/ตัว/วัน ทำการถ่ายพยาธิ ภายในและตัดขนรอบทวาร การทดสอบอัตราการผสมติด ใช้แม่ไก่ไข่น้ำหนักตัวจำนวน 48 ตัว อายุ 35 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การไข่ไม่ต่ำกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ได้รับอาหารประมาณ 120 กรัม/ตัว/วัน สัตว์ได้รับน้ำสะอาดเต็มที่ เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ได้รับแสงตามธรรมชาติ ทั้งนี้ได้รับอนุญาตจาก คณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่ ศธ 0514.1.12. 2/31)

แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 น้ำยาเจือจางสูตร Schramm

กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh

กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจางสูตร EK

กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจางสูตร PVP base medium

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจางที่ใช้ศึกษา ได้แก่ สูตร Schramm (Schramm, 1991), สูตร IGGKPh (Surai and Whishart, 1996), สูตร EK (Partyka et al., 2010) และสูตร PVP based Medium (Santiago-Moreno et al., 2012) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยา เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง ซึ่งทำการเตรียมน้ำยาเจือจางครั้ง 100 มิลลิลิตร/สูตร



ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

ส่วนประกอบทางเคมี ของน้ำยาเจือจาง	ชนิดของน้ำยาเจือจาง (กรัม/100 มิลลิลิตร)			
	Schramm	IGGKPh	EK	PVP
Magnesium acetate	0.07			0.08
Potassium citrate		0.14	0.14	
Potassium acetate	0.50			0.50
Sodium glutamate	2.85	1.40	1.40	1.92
Dipotassium hydrogen phosphate		0.98		
Sodium dihydrogen phosphate		0.21	0.21	
Protamine sulfate			0.02	
Anhydrous sodium hydrogen phosphate			0.98	
Glucose	0.50	0.90	0.70	
Fructose			0.20	
Inositol	0.25	0.90	0.70	
Polyvinylpyrrolidone (PVP)			0.10	0.30
Osmolality (mOsm)	416	397	395	348

หมายเหตุ: น้ำยาเจือจางสูตร Schramm diluents (Schramm, 1991), สูตร IGGKPh (Surai and Whishart, 1996), สูตร EK diluents (Partyka et al., 2010) และสูตร PVP based Medium (Santiago-Moreno et al., 2012)

วิธีการวิจัย

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

ดำเนินการรีดโดยใช้ 2 คนช่วย ตามวิธีการ (Burrow and Quinn, 1935) มีการดัดแปลงวิธีการเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน โดยคนหนึ่งเป็นผู้จับไก่อีกคนหนึ่งเป็นผู้รีด มีการตัดขนและทำความสะอาดบริเวณ cloaca การกระตุ้นก่อนการรีด กระทำโดยการลูบหลังพ่อพันธุ์ด้วยฝ่ามือ (อาจใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบท้องช่วยด้วย) เมื่อลูบถึงโคนหางพ่อพันธุ์จะมีการตอบสนอง โดยการกระดกหางขึ้นและมีอาการเกร็งที่ขา รีบเก็บน้ำเชื้อโดยใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือกดเข้าไปทั้งสองข้างของ cloaca คือบริเวณที่นุ่มของฐานกระดูกทันทึ่ ไข่แรงบีบพอประมาณน้ำเชื้อจะพุ่งหรือไหลออกมา รองรับน้ำเชื้อด้วยหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร การรีดเก็บน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์ควรต้องระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของมูลไก่ น้ำเชื้อไก่ที่รีดได้มีปริมาตรประมาณ 100-500 ไมโครลิตร มีสีขาวขุ่น ความเข้มข้นของสเปิร์มประมาณ 5,000 ล้านตัว/มิลลิลิตร จากนั้นทำการตรวจคุณภาพก่อน โดยเลือกการเคลื่อนที่ไม่ว่ากว่า 80 เปอร์เซ็นต์และการเคลื่อนที่เป็นคลื่น นำน้ำเชื้อที่รีดได้มารวมกัน (pooled semen) เพื่อนำไปใช้ในงานทดลองต่อไป



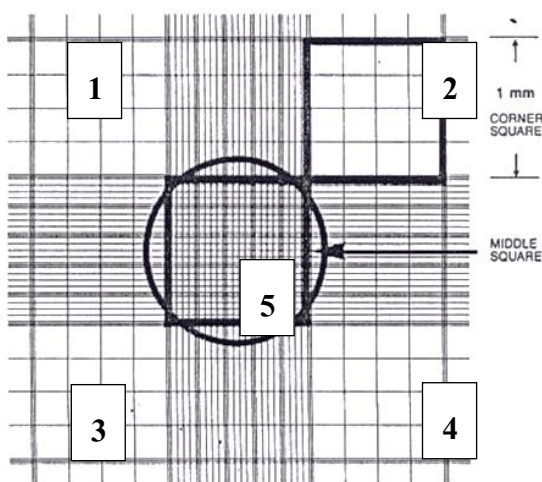
การเจือจางน้ำเชื้อ

ในการเจือจางน้ำเชื้อ ทั้งน้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางต้องมีอุณหภูมิใกล้เคียงกัน เจือจางน้ำเชื้อภายหลังการรีดเก็บและตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายในระยะเวลา 15 นาที ภายหลังการรีดเก็บลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยใช้เวลาลดอุณหภูมิจาก 20 องศาเซลเซียส ไปที่ 5 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง อัตราการเจือจางที่ใช้ขึ้นอยู่กับแต่ละการทดลอง (พรจิต สอนสีตา, 2552)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทั้งหมดนั้นจะประเมินโดยผู้วิจัยเพียงคนเดียว ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดหลังการรีดเก็บทันที โดยจะประเมินจากสี, วัดปริมาตรโดยใช้ไมโครปิเปต (micropipette), การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตรอด รวมถึงการประเมินความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมของตัวอสุจิได้ด้วย

1. การประเมินความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยใช้ haemocytometer เป็นแท่นนับเม็ดเลือด มีอยู่หลายแบบ ส่วนใหญ่ใน 1 ตารางมิลลิเมตร จะมี 25 ช่องใหญ่ ที่บนหมายเลข 5 จากนั้นสุมนับ 5 ช่อง เลือกบริเวณช่องที่มีการกระจายสม่ำเสมอและปริมาตรที่อยู่บนหมายเลข 5 คือ 25 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 3.1 จะมีน้ำเชื้ออยู่ประมาณ $0.1 \times 0.1 \times 0.01 = 0.00001$ มิลลิลิตร (เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2550; Chatdarong et al., 2010)



ภาพประกอบ 3.1 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
ที่มา: ดัดแปลงจาก เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข (2550)

ขั้นตอนวิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

1) เจือจางน้ำเชื้อ 1 ใน 1,000 เท่า โดยเจือจางด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ NaCl/eosin โดยใช้ปิเปตดูดน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร และดูด 4 เปอร์เซ็นต์ NaCl/eosin 4,995 ไมโครลิตร ใส่ลงใน test tube และกลับหลอดไปมาให้เข้ากัน

2) ใช้ cover slip ปิดวางบนแท่น haemocytometer แล้วหยดส่วนผสมของน้ำเชื้อในข้อที่ 1 ลงบนตารางทั้ง 2 ด้านของแท่นนับ ตรวจสอบดูของเหลวบรรจุอยู่เต็มช่องว่าง ไม่มีฟองอากาศ

3) ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้อสุจิโรยตัวลงบนพื้นระนาบเดียวกัน จากนั้นนับจำนวนอสุจิในตาราง 5 ช่องใหญ่จาก 25 ช่องของทั้ง 2 ข้าง โดยนับจาก 4 มุม และตรงกลาง 1 ตาราง

4) คำนวณความเข้มข้น โดยหาค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิที่นับได้ 5 ตารางใหญ่ของทั้ง 2 ข้าง นำมาค่าเฉลี่ยนั้นมาคูณด้วย 10^7 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 = 0.1×0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

มีปริมาตร (ลึก 0.01 cm) = $0.1 \times 0.1 \times 0.01$ มิลลิลิตร

= $1/10,000$ มิลลิลิตร

เจือจางน้ำเชื้อ = 1 : 1,000 เท่า

น้ำเชื้อ 5/25 = 1 : 5

ค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิที่นับได้ 5 ช่อง จาก 25 ช่อง = N

ฉะนั้นความเข้มข้นของอสุจิใน 1 มิลลิลิตร = $N \times 10,000 \times 1,000 \times 5$ เซลล์

= $N \times 10^8$ เซลล์

2. ประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยหยดน้ำเชื้อ 1 หยด (5-10 ไมโครลิตร) ลงบนแผ่นสไลด์กระจกอุ่น (35 องศาเซลเซียส) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาด 18×18 มิลลิเมตร นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 – 400 เท่า ประเมิน 5 จุด บนแผ่นสไลด์และหาค่าเฉลี่ยที่ได้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เป็น 0-100 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก NAFA and ESHRE-SIGA, 2002)

3. การประเมินคุณภาพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) โดยใช้เครื่อง Computer-Assisted Sperm Analyser ด้วยระบบเครื่องของ CASA; HTM-IVOS รุ่น 10.0D (Hammilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA) โดยการนำน้ำเชื้อแช่แข็งเจือจางด้วยสารละลายเจือจางอีกครั้ง ที่อัตราการเจือจาง 1 : 15 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) หยดตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์ ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร โหลดลงบน Dual Slided Sperm Analysis ปิดด้วย cover glass (Hammilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA) โดยตั้งค่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แต่ละตัวอย่างจะวัดค่าของ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไป



ข้างหน้า, เปอร์เซ็นต์ตัวตาย, เปอร์เซ็นต์ตัวเคลื่อนที่ช้า, เปอร์เซ็นต์ตัวเคลื่อนที่เร็ว, VAP, VCL, ALH, BCF, STR และ LIN โดยมีการกำหนดค่า Analysis setup ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่า Analysis setup

ค่า Analysis setup	
Temperature (°C)	37.0
Apply sort	0
Frames Acquired	30
Frames rate (Hz)	60
Minimum contrast	25
Minimum Cell Size (pixels)	4
Minimum Static Contrast	15
Straightness (STR) Threshold (%)	80
VAP Cutoff (µm/sec)	5
Prog. Min VAP (µm/sec)	20
VSL Cutoff (µm/sec)	20
Cell Size (pixels)	4
Cell Intensity	50
Static Head Size	0.72-8.82
Static Head Intensity	0.14-1.84
Static Elongation	0-47
Slow Cell Motile	Yes
Magnification	1.92
Video Frequency	60
Bright Field	No
Chamber depth (µm)	20
Field Selection Mode	Auto

หมายเหตุ : ค่าที่ได้จากการตั้งค่าอุปกรณ์ก่อนทำการวิเคราะห์น้ำเชื้อไก่



4. ประเมินการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิไก่อหลังการแช่แข็ง ด้วยการย้อมสี Fluorescent ประเมินด้วยวิธีการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยสี SYBER -14 ร่วมกับ propidium iodide (PI) (Live/dead[®] sperm viability kit L7011 Invitrogen USA) ดัดแปลงจากวิธีการของ Partyka และคณะ (2010) โดยมีวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 150×10^6 ตัว/มิลลิลิตร เติม 5 ไมโครลิตร ของสี SYBR-14 บ่ม 10 นาที และ เติม propidium iodide 5 ไมโครลิตร บ่ม 5 นาที ทำการ fixed cell ด้วย 30 ไมโครลิตร 20 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde จากนั้นทำการประเมินภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope; Inverted Microscope with Micromanipulator Olympus IX71) ที่กำลังขยาย 400 เท่า ที่ประกอบด้วยฟิวเตอร์ 3 ชนิด คือ UV-2E/C (excitation 340-380 นาโนเมตร และ emission 435-485 นาโนเมตร), B-25/C (excitation 465-495 นาโนเมตร และ emission 515-555 นาโนเมตร) และ G-2E/C (excitation 540-525 นาโนเมตร และ emission 605-655 นาโนเมตร)

5. ประเมินระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการวิเคราะห์จากปริมาณ malonaldehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive species (TBARS) ซึ่งตัว อสุจิจะถูกแยกออกจากสารเจือจางโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 3,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที และเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อให้อสุจิมีความเข้มข้นสุทธิ 50×10^6 ตัว/หลอดบรรจุ เยื่อ หุ้มเซลล์อสุจิจะถูกทำลายโดยใส่ลงในสารที่มีอัตราส่วนของ chloroform/methanol (2 : 1) และนำไป เจือจางด้วยสารละลายที่มีส่วนประกอบ ดังนี้ 2 มิลลิลิตร 0.36 เปอร์เซ็นต์ thiobarbituric acid (Sigma, T550-0), 1 มิลลิลิตร 35 เปอร์เซ็นต์ trichloroacetic acid (Sigma, T6399), 0.1 มิลลิลิตร 2.78 เปอร์เซ็นต์ ferrous sulfate.7H₂O (Ajex, 0906251) และ 0.1 มิลลิลิตร 0.22 เปอร์เซ็นต์ butylated hydroxytoluene (Sigma, B1378) ใน ethanol ส่วนผสมทั้งหมดจะถูกนำไปต้มเพื่อทำ ให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ TBARS จะถูกสกัดโดยเติม 1 มิลลิลิตร acetic acid ร่วมกับ 2 มิลลิลิตร chloroform จากนั้นจะเห็นการแยกชั้นของสารในหลอด ทดลองดูดเอาส่วนบนที่มีสีชมพูออกมา นำไปวัดหาปริมาณ MDA ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometry (Analytikjena Model Specord 250 plus) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ซึ่งจะใช้สาร 1, 1', 3, 3' tetramethoxy-propane (Sigma, 108383) เป็นสารมาตรฐาน เพื่อสร้าง กราฟค่ามาตรฐานออกมา โดยนำค่าที่ได้จากการวัดจากตัวอสุจิไปเทียบหาปริมาณ TBARS ที่เกิดขึ้น (ดัดแปลงจาก Aisen et al., 2005; Partyka et al., 2007)

การแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ

การทำน้ำเชื้อแช่แข็งดัดแปลงจาก Vongpralub และคณะ (2011) โดยภายหลังจาก การรีดน้ำเชื้อ น้ำเชื้อสดที่ได้ในแต่ละครั้งจะถูกนำไปประเมินคุณภาพตามวิธีต่างๆ ข้างต้น โดยน้ำเชื้อ ของไก่อแต่ละตัวต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำน้ำเชื้อไก่อทั้งหมดที่ได้มา รวมกัน (pooled semen) และแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 4 ส่วน ทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางทั้ง 4 สูตร ได้แก่ Schramm, IGGKPh, EK และสูตร PVP based Medium ในสัดส่วน (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) 1 : 3 ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยทำการลดอุณหภูมิไปที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำยาเจือจางที่มี 6 เปอร์เซ็นต์ DMF (N, N-Dimethylformamide) (v : v) จากนั้นจึงบรรจุ น้ำเชื้อเจือจางลงในหลอดพลาสติก (straw) (IMV ref. A201, AAA 414) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และอุด ปลายด้านที่ปิดด้วยผง polyvinyl alcohol (IMV ref. A508) เช็ดหลอดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดโดยใช้



เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่อง โฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลว จุ่มในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาแช่ดให้แห้งแล้วตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงในหลอดรับน้ำเชื้อที่สะอาดและแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เพื่อให้น้ำไปผสมเทียมหรือน้ำไปตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ หรือทำการผสมเทียมต่อไป

การผสมเทียม

ดำเนินการตรวจสอบอัตราการผสมติดของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งในแม่ไก่ไข่ทางการค้า โดยการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดไก่ ตามวิธีการของ Burrows and Quinn, 1937 และมีการดัดแปลงโดยดำเนินการใช้คน 2 คน คือ ผู้ปลิ้นกันไก่แม่พันธุ์และผู้ผสมเทียม (แม่ไก่ที่ใช้เป็นไก่ที่มีสภาพร่างกายที่สมบูรณ์) ทำการฉีดสอดกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (tuberculin syringe) ที่ถอดเข็มออกและบรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร สอดเข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 เซนติเมตร ดำเนินการผสมเทียมแม่ไก่เพียง 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ในช่วงเวลา 15.00-17.00 น. ทดสอบซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง

การเก็บข้อมูลอัตราการผสมติด

เริ่มเก็บไข่ในวันที่ 3 ภายหลังการผสมเทียม รวบรวมไข่ติดต่อกัน 7 วัน นำไข่เข้าฟักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่เพื่อดูการเจริญของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

$$\text{อัตราการผสมติด} = \frac{\text{จำนวนไข่มีเชื้อทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนไข่ที่เข้าฟักทั้งหมด}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) นำข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดมาทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (SAS, 1998)



3.1.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพและอัตราการผสมติดของสุกไข่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการ แช่แข็ง

โดยใช้น้ำยาเจือจางสูตรที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ น้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร EK นำมาเสริมทรีฮาโลส 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมล และ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล ตามลำดับ แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm โดยไม่มีการเสริมทรีฮาโลส

กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 5 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร EK โดยไม่มีการเสริมทรีฮาโลส

กลุ่มที่ 6 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร EK ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 7 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร EK ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 8 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร EK ร่วมกับการเสริมทรีฮาโลส ที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิโมล

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและโรงเรือน

ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ อายุเฉลี่ย 10 เดือน จำนวน 24 ตัว แยกเลี้ยงขังกรงเดี่ยว และได้รับอาหารประมาณ 130 กรัม/ตัว/วัน และใช้แม่ไก่ไข่วันการค้ำ อายุ 43 สัปดาห์ ในการทดสอบอัตราการผสมติด ได้รับอาหารประมาณ 120 กรัม/ตัว/วัน สัตว์ได้รับน้ำสะอาดเต็มที่ เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ได้รับแสงตามธรรมชาติ ทั้งนี้ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่ ศธ 0514.1.12.2/31)

วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ

ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อไก่ทั้งหมดที่ได้มารวมกัน แล้วทำการแบ่งออกเป็น 8 ส่วน เท่าๆ กัน โดยใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร EK ที่มีการเสริมทรีฮาโลส 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมล และ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล ตามลำดับ เจือจางในสัดส่วน 1 : 3 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) ทำการลดอุณหภูมิไปที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นจึงบรรจุน้ำเชื้อเจือจางลงในหลอดพลาสติก (straw) (IMV ref. A201, AAA 414) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และอุดปลายด้านที่เปิดด้วยผง polyvinyl alcohol (IMV ref. A508) เช็ดหลอดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่อง



โคมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (Vongpralub et al., 2011)

การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลว จุ่มในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาแช่ดปล่อยให้แห้งแล้วตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงในหลอดรับน้ำเชื้อที่สะอาดและแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้น้ำไปผสมเทียมหรือนำไปตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ หรือทำการผสมเทียมต่อไป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

1. การประเมินคุณภาพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) โดยใช้เครื่อง Computer-Assisted Sperm Analyser ด้วยระบบเครื่องของ CASA; HTM-IVOS รุ่น 10.0D (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA)
2. ประเมินระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการวิเคราะห์จากปริมาณ malonaldehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive species (TBARS)
3. การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma, L7381) ร่วมกับ propidium iodide (PI) (Sigma, 28, 707-5) ขั้นตอนมีดังนี้ นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 15×10^6 ตัว/มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 ไมโครลิตร ของสี FITC-PNA (2 มิลลิกรัม ของ FITC-PNA ใน 1 มิลลิลิตร PBS ที่ pH 7.4) บ่ม 5 นาที และเติม propidium iodide 5 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่ม 5 นาที จากนั้นทำการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม โดยใช้ Flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Andrade et al., 2007)
4. ประเมินคุณภาพการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดย 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) (Sigma, C50390) นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 15×10^6 ตัว/มิลลิลิตร เติมน้ำ 2 ไมโครลิตร JC-1 (0.153 มิลลิโมล ใน dimethylsulfoxide; DMSO) บ่ม 30 นาที ในที่มืด จากนั้นทำการประเมินคุณภาพการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยใช้ Flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Andrade et al., 2007)

การผสมเทียม

การตรวจสอบอัตราการผสมติดด้วยการผสมเทียมกับแม่ไก่ไข่ทางการค้า โดยการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดไก่ ตามวิธีการของ Burrows and Quinn (1937) การฉีดน้ำเชื้อด้วยกระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร และบรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร การผสมเทียมแม่ไก่เพียง 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ในช่วงเวลา 15.00 -17.00 น. ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เริ่มเก็บไข่ในวันที่ 3 ภายหลังจากการผสมเทียม รวบรวมไข่ติดต่อกัน 7 วัน นำไข่เข้าฟัก สัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่เพื่อดูการเจริญของ คัพภะภายหลังฟัก 7 วัน



$$\text{อัตราการผสมติด} = \frac{\text{จำนวนไข่มีเชื้อทั้งหมด}}{\text{จำนวนไข่ที่เข้าฟักทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (SAS, 1998)

3.1.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพของสุจิและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ประกอบด้วย ปัจจัยแรก ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด คือ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร schramm และน้ำยาเจือจางสูตร scharmm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล ซึ่งเป็นสูตรน้ำยาเจือจางที่ให้ผลดีจากการทดลองที่ 2 ปัจจัยที่สอง การเสริมกลูตาไทโอนหลังการทำละลายน้ำเชื้อ ที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล โดยกลุ่มศึกษาทั้งหมดแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm และหลังการละลายที่ไม่มีการเสริมกลูตาไทโอน

กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm และหลังการละลายมีการเสริมกลูตาไทโอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm และหลังการละลายมีการเสริมกลูตาไทโอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm และหลังการละลายมีการเสริมกลูตาไทโอน ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 5 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล และหลังการละลายไม่เสริมกลูตาไทโอน

กลุ่มที่ 6 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิ โมล และหลังการละลายมีการเติมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 7 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล และหลังการละลายมีการเติมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.5 มิลลิโมล

กลุ่มที่ 8 น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล และหลังการละลายมีการเติมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมล

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและโรงเรือน

ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ อายุเฉลี่ย 10 เดือน จำนวน 24 ตัว แยกเลี้ยงขังกรงเดี่ยว และได้รับอาหารประมาณ 130 กรัม/ตัว/วัน และใช้แม่ไก่พื้นทางการค้า อายุ 51 สัปดาห์ ในการทดสอบอัตราการผสมติด ได้รับอาหารประมาณ 120 กรัม/ตัว/วัน สัตว์ได้รับน้ำสะอาดเต็มที่ เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ได้รับแสงตามธรรมชาติ ทั้งนี้ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการ



ด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่ ศธ 0514.1.12.2/31)

การแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ

ภายหลังการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ทำการแบ่งออกเป็น 8 ส่วน เท่าๆ กัน โดยใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm และ Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล ซึ่งให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ในน้ำยาเจือจาง ในสัดส่วน 1 : 3 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) ทำการลดอุณหภูมิไปที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บรรจุน้ำเชื้อเจือจางลงในหลอดพลาสติก (straw) (IMV ref. A201, AAA 414) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และอุดปลายด้านที่ปิดด้วยผง polyvinyl alcohol (IMV ref. A508) เช็ดหลอดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (Vongpralub et al., 2011)

การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลว จุ่มในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงในหลอดรับน้ำเชื้อที่สะอาด และแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ หรือทำการผสมเทียมต่อไป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

1. การประเมินคุณภาพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) โดยใช้เครื่อง Computer-Assisted Sperm Analyser ด้วยระบบเครื่องของ CASA; HTM-IVOS รุ่น 10.0D (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA)
2. ประเมินระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการวิเคราะห์จากปริมาณ malonaldehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive species (TBARS)
3. การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma, L7381) ร่วมกับ propidium iodide (PI) (Sigma, 28, 707-5) ขั้นตอนมีดังนี้ นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 15×10^6 /ต่อมิลลิลิตร เติมน้ำ 5 ไมโครลิตร ของสี FITC-PNA (2 มิลลิกรัม ของ FITC-PNA ใน 1 มิลลิลิตร PBS ที่ pH 7.4) บ่ม 5 นาที และเติม propidium iodide 5 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่ม 5 นาที จากนั้นทำการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม โดยใช้ Flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Andrade et al., 2007)
4. ประเมินคุณภาพการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดย 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) (Sigma, C50390) นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 15×10^6 ตัว/มิลลิลิตร เติมน้ำ 2 ไมโครลิตร JC-1 (0.153 มิลลิโมล ใน dimethylsulfoxide; DMSO) บ่ม 30 นาที ในที่มืด จากนั้นทำการประเมินคุณภาพการทำงานของ



ไมโตคอนเดรีย โดยใช้ Flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Andrade et al., 2007)

การผสมเทียม

การตรวจสอบอัตราการผสมติดด้วยการผสมเทียมในแม่ไก่ไข่ทางการค้า ตามวิธีการของ Burrows and Quinn (1937) โดยใช้กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร (tuberculin syringe) บรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร สอดเข้าช่องคลอด ลึกประมาณ 4 เซนติเมตร ดำเนินการผสมเทียมแม่ไก่เพียง 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ในช่วงเวลา 15.00 -17.00 น. ทำซ้ำ 6 ครั้ง

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เริ่มเก็บไข่ในวันที่ 3 ภายหลังการผสมเทียม รวบรวมไข่ติดต่อกัน 7 วัน นำไข่เข้าฟักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่เพื่อดูการเจริญของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

$$\text{อัตราการผสมติด} = \frac{\text{จำนวนไข่มีเชื้อทั้งหมด}}{\text{จำนวนไข่ที่เข้าฟักทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2x4 Factorial in Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (SAS, 1998)



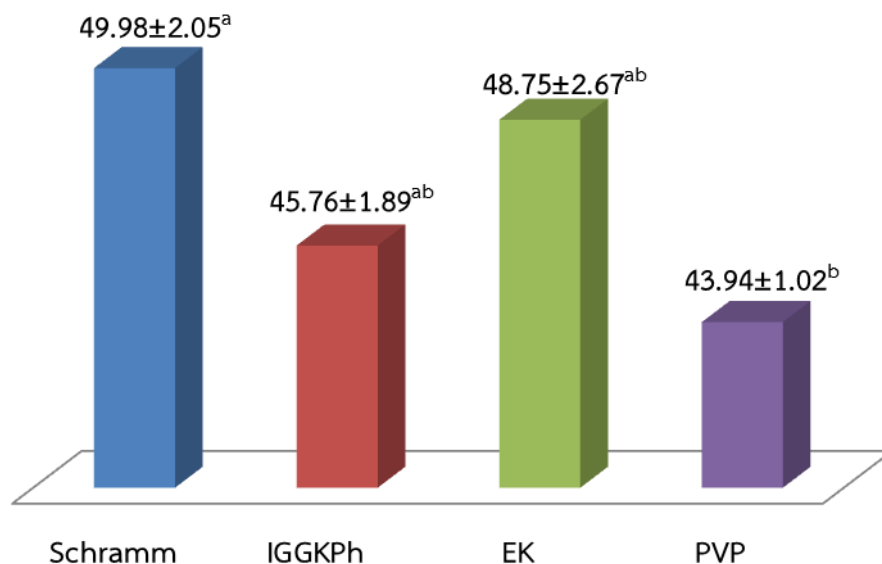
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 การทดลองที่ 1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

4.1.1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการรอดชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

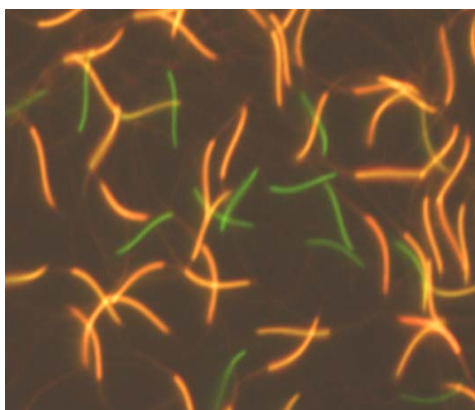
ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็งต่อชนิดของน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ด้วยวิธีการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยสี SYBER -14 ร่วมกับ propidium iodide (PI) พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงที่สุด (49.98 ± 2.05 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างจากสูตร PVP base medium (43.94 ± 1.02 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับสูตร IGGKPh และสูตร EK diluents (45.76 ± 1.89 และ 48.75 ± 2.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพประกอบ 4.1



ภาพประกอบ 4.1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

หมายเหตุ : (^{a, b})ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)





ภาพประกอบ 4.2 ลักษณะของอสุจิที่ย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยสี SYBER -14 ร่วมกับ propidium iodide (PI) และประเมินคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 400 เท่า สีเขียว คือ ลักษณะอสุจิโก่งพื้นเมืองที่มีชีวิตที่ติดสี SYBRE-14 สีแดง คือ ลักษณะอสุจิโก่งพื้นเมืองที่ไม่มีชีวิตที่ติดสี PI

4.1.2 ผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อโก่งพื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง ผลการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่น้ำเชื้อโก่งพื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ประเมินคุณภาพพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร EK diluents มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (MOT) สูงที่สุด (60.17 ± 0.95 และ 60.00 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh และสูตร PVP base medium (51.33 ± 1.32 และ 47.83 ± 0.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMOT) น้ำยาเจือจางสูตร Schramm สูตร IGGKPh สูตร EK และสูตร PVP base medium (26.83 ± 1.02 , 27.02 ± 1.18 , 25.15 ± 1.52 และ 27.00 ± 0.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh และสูตร EK มีผลต่อการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของอสุจิ (VAP) (108.27 ± 0.63 และ 104.27 ± 1.94 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) สูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร PVP (89.43 ± 1.53 และ 80.83 ± 2.01 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และพบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm สูตร IGGKPh และสูตร EK มีผลทำให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่เป็นวิถีโค้ง (VSL) (76.82 ± 1.35 , 85.03 ± 1.80 และ 91.47 ± 2.03 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) และอัตราการเคลื่อนที่ระยะสั้น (VCL) (129.18 ± 0.85 , 138.32 ± 0.97 และ 130.12 ± 1.22 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) สูงกว่าอสุจิที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร PVP (62.63 ± 1.72 ไมโครเมตร/วินาที) และ (105.22 ± 1.31 ไมโครเมตร/วินาที) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



ตารางที่ 4.1 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไวก์พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งจากการทำการทดลอง 6 ซ้ำ (Mean \pm SE; n=6)

ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ	ชนิดของน้ำยาเจือจาง			
	Schramm	IGGKPh	EK	PVP
MOT (%)	60.17 \pm 0.95 ^A	51.33 \pm 1.32 ^B	60.00 \pm 1.54 ^A	47.83 \pm 0.72 ^B
PMOT (%)	26.83 \pm 1.02	27.02 \pm 1.18	25.15 \pm 1.52	27.00 \pm 0.63
VAP (μ m/s)	89.43 \pm 1.53 ^B	108.27 \pm 0.63 ^A	104.27 \pm 1.94 ^A	80.83 \pm 2.01 ^B
VSL (μ m/s)	76.82 \pm 1.35 ^A	85.03 \pm 1.80 ^{AB}	91.47 \pm 2.03 ^A	62.63 \pm 1.72 ^C
VCL (μ m/s)	129.18 \pm 0.85 ^A	138.32 \pm 0.97 ^A	130.12 \pm 1.22 ^A	105.22 \pm 1.31 ^B

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01), (^{a, b}) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของน้ำยาเจือจางต่างชนิดกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง มีสูตรน้ำยาเจือจางจำนวนมากที่นิยมใช้ในการผสมเทียมสัตว์ปีกทั้งทางด้านวิชาการและการค้า และได้มีการเปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติด เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติโดยรวมของน้ำยาเจือจางเหล่านี้ คือ การรักษาระดับ pH, ความดันสารละลายที่เหมาะสมใกล้เคียงกับ seminal fluid ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา โดยทั่วไปค่า pH และค่าออสโมลาลิตีที่เหมาะสมกับสัตว์ปีกจะอยู่ระหว่าง 6.0-8.0 และ 250-460 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม ตามลำดับ (Christensen, 1995; Siudzinsks and Lukaszewicz, 2008) และมีแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ การมี pH ที่ต่ำจะทำให้มีการเกิดออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น มีการผลิตกรดแลคติก ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง ในขณะที่ pH สูงเป็นผลทำให้อัตราการเมตาโบลิซึมสูง สำหรับสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำจะทำให้เซลล์อสุจิบวม และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูงจะทำให้เซลล์อสุจิมีการสูญเสียน้ำและเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยว เมื่อทำการศึกษาภายนอกร่างกาย (Lake, 1995) การศึกษาครั้งนี้ น้ำยาเจือจางมี pH ระหว่าง 7.1-7.4 และความดันสารละลายน้ำยาเจือจางระหว่าง 340-420 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม ซึ่งอยู่ในระดับมาตรฐาน ซึ่งน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh มีความดันสารละลายสูงสุด น้ำตาลฟรุคโตสเป็นน้ำตาลที่อสุจิไวก์สามารถใช้ได้ดีกว่ากลูโคส และ inositol อย่างไรก็ตามมีหลายรายงานที่ระบุว่ากลูโคสและฟรุคโตสต่างให้ผลดีในการเป็นองค์ประกอบของน้ำยาเจือจาง (Blanco et al., 2008; Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในสัตว์ปีกมีองค์ประกอบพื้นฐานที่มีบทบาทต่างๆ ดังนี้ 1) บัฟเฟอร์ (TES, phosphates (Na⁺ หรือ K⁺) หรือ Tris) 2) พลังงาน (fructose, glucose, inositol และ raffinose) 3) chelator (glutamate, albumin) 4) องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับความดันสารละลาย (magnesium choride, sodium acetate, potassium citrate, glutamic acid และ sodium chloride) (Donoghue et al., 2003; Wishart, 2009) โดยพบว่า sodium glutamate เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำยาเจือจางทั้ง 4 สูตร ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติในการควบคุมแรงดันออสโมติก (Lake, 1960) และมีคุณสมบัติในการยืดระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Donoghue and Wishart, 2000) ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร PVP มีสารเคมี



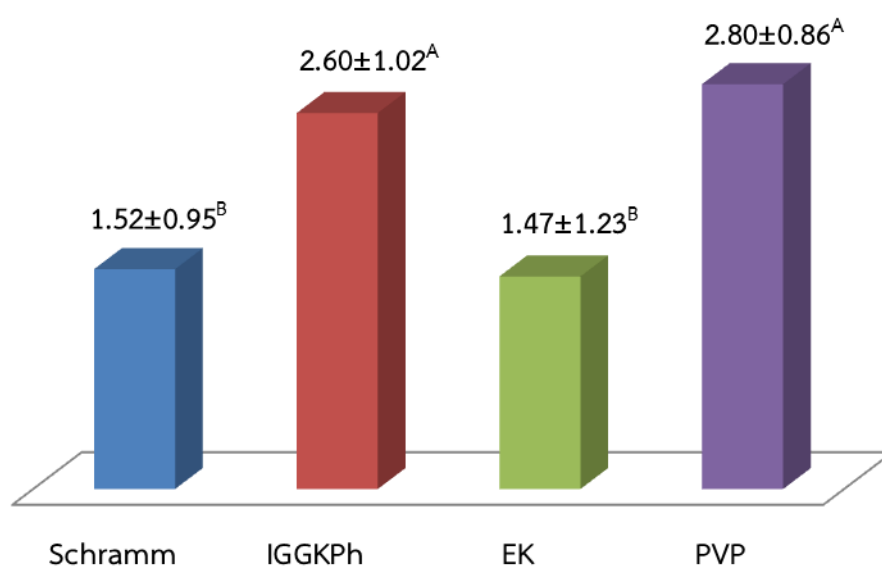
กลุ่ม acetate เป็นองค์ประกอบ ในส่วนของน้ำยาเจือจางสูตร IGKPh และสูตร EK มีสารเคมีกลุ่ม citrate เป็นองค์ประกอบ จากการรายงานของ Douard และคณะ (2004) พบว่าสารเคมีกลุ่ม acetate เป็นสารที่สำคัญที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าทั้ง fructose และ citrate โดยสารเคมีกลุ่ม acetate จะถูกเปลี่ยนรูปให้เป็นอนุพันธ์ของ coenzyme A (Co A) และจะเข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริก หรือ tricarboxylic acid cycle เพื่อให้ได้พลังงาน และในน้ำยาเจือจางสูตร PVP มีสารเคมีกลุ่ม Poly vinylpyrrolidone (PVP) เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง PVP มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จึงทำให้เซลล์อสุจิได้รับการปกป้องเมื่อเก็บรักษาแบบวิธีแช่แข็ง (Santiago-Moreno et al., 2012) และในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm สูตร IGKPh และสูตร EK มี glucose เป็นแหล่งพลังงาน แต่ตัวอสุจิสามารถเปลี่ยนน้ำตาล glucose ให้เป็นน้ำตาล fructose เพื่อใช้ประโยชน์ได้ (Donoghue et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ น้ำยาเจือจางสูตร Schramm สูตร IGKPh และสูตร EK ให้ผลดีด้านคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่อมากกว่าน้ำยาเจือจางสูตร PVP ซึ่งน้ำยาเจือจางแต่ละสูตรต่างก็มีองค์ประกอบพื้นฐานที่กล่าวมาข้างต้น จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำเชื้อในสูตรน้ำยาที่แตกต่างกัน ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง มีคุณภาพที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามระดับ pH และความดันสารละลายของน้ำยาเจือจางแต่ละสูตร ยังอยู่ในช่วงที่ไม่มีผลเสียอย่างรุนแรงต่ออสุจิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจะอาศัยการทำงานน้ำยาเจือจางร่วมกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง โดยสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งนี้จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายเซลล์อสุจิระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของไก่อพื้นเมืองไว้ในรูปของ sperm bank ถึงแม้พ่อพันธุ์จะไม่มีชีวิตอยู่ โดยมีการรายงานว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งได้นานถึง 9 ปี โดยไม่ลดอัตราการผสมติด (Lake, 1995)

4.1.3 ผลของน้ำยาเจือจางต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

ผลการศึกษานิดของน้ำยาเจือจางต่อระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของอสุจิไก่อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ malonaldehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ที่วัดได้ด้วยวิธี triobarbituric acid reactive species (TBARS) ซึ่งวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่นที่ 532 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) หลังการละลาย พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร EK และสูตร Schramm มีปริมาณ MDA ที่วัดได้ (1.47 ± 1.23 และ 1.52 ± 0.95 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) ต่ำกว่าน้ำยาเจือจางสูตร IGKPh และสูตร PVP (2.60 ± 1.02 และ 2.80 ± 0.86 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แสดงให้เห็นว่าสูตรน้ำยาเจือจางสูตร EK และ สูตร Schramm มีผลดีต่อการลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ นอกจากนี้พบว่าอสุจิกลุ่มที่มีความทนต่อการแช่แข็งได้ดีกว่านั้น ให้ผลผลิตของ MDA ต่ำกว่ากลุ่มที่ทนต่อการแช่แข็งต่ำ (Lenzi et al., 1996; Paulenz et al., 1999; Strezezek et al., 2004) แม้ว่ากลุ่มอสุจิที่มีความทนต่อการแช่แข็งได้ดีกว่านั้นอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย ซึ่งได้แก่ ปริมาณ antioxidant ในเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อซึ่งไม่เท่ากัน และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มอสุจิมีความแตกต่างกัน (Lenzi et al., 1996) เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจินั้นจะมีส่วนประกอบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจำนวนมาก ทำให้ไวต่อการเกิดความเสียหายเนื่องจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งผลที่ตามมาคือ เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสมบูรณ์ การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และสูญเสียความ สามารถใน



การปฏิสนธิในที่สุด โดยเป็นผลมาจากปฏิกิริยา ROS ระหว่างการป่ม (Bucak et al., 2007; Uysal et al., 2007) ในการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งจะเปลี่ยนสถานะของหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl status) ซึ่งหมู่ซัลไฮดริลจะเปลี่ยนแปลงอยู่ภายใต้การควบคุมของปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะเชื่อมโยงกับการเกิดปฏิกิริยา ROS ที่จะเกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิ แช่แข็งและการละลายตัวอสุจิ เนื่องจากตัว ROS เองและผลผลิตสุดท้ายของ ROS เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) นั้นเป็นพิษต่อตัวอสุจิ (Aitken, 1995) โดยจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งถือเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่สุดของการลดความสมบูรณ์ทางระบบสืบพันธุ์ (Agarwal et al., 2003; Aitken et al., 2007) นอกจากนี้ Kelso et al. (1997) รายงานว่าองค์ประกอบของน้ำเชื้อสัตว์ปีกมีสัดส่วนของ PUFA ในเซมินอลพลาสมาสูง แต่กระบวนการแช่แข็งจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ทำให้อสุจิเกิดการแตกหักและเกิดอาการ cold shock และอะโครโซมเสียหาย



หมายเหตุ : (^{A, B}) ตัวอักษร ที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ภาพประกอบ 4.3 ค่าเฉลี่ยปริมาณ malondialdehyde (MDA) จากตัวอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ชนิดของน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกัน (ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์)

4.1.4 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

ผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่แตกต่างกันต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยทำการผสมเทียมในแม่ไก่ไข่อันธุ์ทางการค้า จำนวน 48 ตัว ที่มีอายุ 35 สัปดาห์ ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร EK (89.24 ± 1.34 และ 85.04 ± 0.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ให้อัตราการผสมติดสูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh และสูตร PVP (77.50 ± 0.81 และ 64.98 ± 1.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่มีการใช้น้ำยาเจือจางสูตร EK



ในห่านสายพันธุ์ White Italian โดยวิธีการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที และทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -140 องศาเซลเซียส อัตราการลดอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีอัตราการผสมติด 66.1 เปอร์เซ็นต์ (Lukaszewicz, 2001) และ 83.78 เปอร์เซ็นต์ (Lukaszewicz, 2002) สายพันธุ์ Greylag และสายพันธุ์ White Koluda 37.5 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Lukaszewicz et al., 2004) และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่มีการใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm ในไก่พื้นเมือง สายพันธุ์เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ และซีแซ่แข็งโดยอั้งไอนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาทีและ -135 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำแข็งที่ 5 องศาเซลเซียส มีอัตราการผสมติด 60.8, 59.1 และ 66.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (พรจิต สอนสีดา, 2556) ในส่วนของอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่มีการใช้น้ำยาเจือจางสูตร PVP โดยทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Biological freezer unit; Computer Freezer-Icetube 1810, Minitub, Tiefenbach, Germany) ที่มีการลดอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส มีอัตราการลดอุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส/นาที และจาก -35 องศาเซลเซียส ถึง -140 องศาเซลเซียส มีอัตราการลดอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส/นาที และทำการละลายน้ำเชื้อ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ในไก่พื้นเมืองสเปน 12 สายพันธุ์ (Black-Barred Andaluza, Black-Red Andaluza, Blue Andaluza, Black Castellana, Buff Prat, White Prat, Red-Barred Vasca, Red Villafranguina, Birchen Leonesa, Blue Leonesa, White-Faced Spanish, Black Menorca) มีอัตราการผสมติดเฉลี่ย 13.9 เปอร์เซ็นต์ (Santiago-Moreno et al., 2012)

ตารางที่ 4.2 อัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ชนิดของน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)

ชนิดของน้ำยาเจือจาง	จำนวนไข่เข้าฟัก	อัตราการผสมติด (%)
Schramm	321	89.24 \pm 1.34 ^A
BIGGKPh	311	77.50 \pm 0.81 ^B
EK	320	85.04 \pm 0.92 ^A
PVP	315	64.98 \pm 1.14 ^C

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01)



4.2 การทดลองที่ 2 ผลของระดับการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

4.2.1 ผลของระดับการเสริมทรีฮาโลสต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

ผลการศึกษาการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม) 5, 10 และ 15 มิลลิโมล/มิลลิลิตร ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และในระดับ 0 (กลุ่มควบคุม) 25, 50 และ 75 มิลลิโมล/มิลลิลิตรในน้ำยาเจือจางสูตร EK ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่นำมาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการประเมินคุณภาพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm กลุ่มควบคุม และน้ำยาเจือจางสูตร EK กลุ่มควบคุม มีอัตราการเคลื่อนที่รวม (PMOT) สูง (53.00 ± 1.48 และ 54.25 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกับน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล/มิลลิลิตร (52.00 ± 1.25 , 50.25 ± 1.45 , 51.50 ± 1.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล/มิลลิลิตร (47.00 ± 1.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับอสุจิที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 10 และ 15 มิลลิโมล/มิลลิลิตร (36.75 ± 1.70 และ 35.25 ± 1.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMOT) พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ได้รับการเสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล/มิลลิลิตร มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูง (27.25 ± 1.06 และ 27.85 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกับอสุจิก่อนที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลส 10 และ 15 มิลลิโมล/มิลลิลิตร และน้ำยาเจือจางสูตร EK (กลุ่มควบคุม) (26.50 ± 1.73 , 23.25 ± 1.70 และ 23.00 ± 1.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) กับอสุจิก่อนที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล/มิลลิลิตร ที่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลง (22.50 ± 1.20 , 21.00 ± 0.74 และ 21.00 ± 1.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) น้ำยาเจือจางสูตร EK (กลุ่มควบคุม) มีผลทำให้อสุจิเคลื่อนที่ในลักษณะ VAP และ VSL สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) (85.32 ± 1.04 และ 76.17 ± 1.09 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) รองลงคือน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่เสริมทรีฮาโลส ระดับ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล/มิลลิลิตร (80.67 ± 1.26 , 81.35 ± 1.19 และ 81.2 ± 1.95 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) และ (72.50 ± 1.55 , 71.32 ± 0.95 และ 73.15 ± 1.74 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) โดยกลุ่มที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เสริมทรีฮาโลส ระดับ 5, 10 และ 15 มิลลิโมล/มิลลิลิตร มีอัตราการเคลื่อนที่ลักษณะ VAP และ VSL ต่ำที่สุด (77.40 ± 1.54 , 74.35 ± 1.37 , 74.07 ± 0.86 และ 75.30 ± 1.45 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) และ (61.30 ± 1.54 , 58.55 ± 1.37 , 63.70 ± 0.86 และ 63.32 ± 1.45 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่าชนิดของน้ำยาเจือจางไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ในลักษณะ VCL



จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางเพื่อใช้ในการแช่แข็ง อสุจิสุกรและแกะของ Hu et al. (2009) และ Uysal and Bucak (2009) ตามลำดับ พบว่าการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 100 มิลลิโมล ทำให้อสุจิสุกรและแกะมีการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตหลังการแช่แข็งสูงด้วย ($p < 0.05$) ซึ่ง Aisen และคณะ (2000; 2005) และ Matsuoka et al. (2006) พบว่าทรีฮาโลส สามารถช่วยให้อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเคลื่อนของอสุจิแกะ หลังการแช่แข็งดีขึ้น เมื่อประเมินจากการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซม และการศึกษาของ Gutierrez-Perez (2009) พบว่าอสุจิสุกรมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ดีขึ้นเมื่อนำทรีฮาโลสเสริม ร่วมกับกลีเซอรอลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับอีกหลายการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ พบว่า ทรีฮาโลส ช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหนูหลังการละลายได้ยาวนานขึ้น (Storey et al., 1998) และยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการเสริมทรีฮาโลสได้ระบุว่า สามารถช่วย ปรับปรุงให้การเคลื่อนที่ของอสุจิโคผ่านกระบวนการแช่แข็งได้ (Chen et al., 1993) และทรีฮาโลส สามารถช่วยปรับให้อสุจิสุนัขทนต่อกระบวนการแช่แข็งได้ (Yamashiro et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าน้ำตาล 3 โมเลกุล ไม่มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของ อสุจิโคหลังการละลายได้เท่ากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Malo et al., 2010) แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเสริมทรีฮาโลสที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป เช่น เสริมที่ระดับ 150 และ 200 มิลลิโมล จะส่งผลเสียต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งและละลายละลายได้ เนื่องจากความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่สูง จะเป็นพิษต่อตัวอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย (Hu et al., 2009; Uysal and Bucak, 2009)

ผลของทรีฮาโลสต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษามาก่อน พบว่า ทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิไม่ให้เกิดความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งได้ เองจากจากน้ำตาลโมเลกุลคู่มาใส่น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้มีสภาวะ hypertonic จะมีการตอบสนองต่อการทำงานทางสรีรวิทยาทางเคมีของตัวอสุจิที่แตกต่างกัน โดยทรีฮาโลสจะไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ส่งผลให้เซลล์เกิดการดึงน้ำออกและช่วยลดอัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในอสุจิได้ ดังนั้นจึงมีการนำทรีฮาโลสมาใช้เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ซึ่งสัมพันธ์กับผลกระทบจาก แรงดันออสโมติก และมีปฏิกิริยาที่จำเพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็นฟอสโฟลิปิดตรงบริเวณที่มีชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) ซึ่งผลของแรงดันออสโมติกนี้จะไปช่วยลดความสามารถในการแข็งตัวของน้ำ ภายในเซลล์และช่วยลดความเสียหายของตัวอสุจิ อันเกิดจาก cold shock และผลึกน้ำแข็งได้ (Storey et al., 1998) การทำงานของทรีฮาโลสเกี่ยวข้องกับความสามรถในการแทนที่น้ำตรงบริเวณจุดเชื่อมต่อกันของเยื่อหุ้มเซลล์ และในขั้นตอนการละลายจึงเป็นการแทนที่โมเลกุลของน้ำ ขณะเกิดการสูญเสีย น้ำ (Meyers, 2000) นอกจากนี้การป้องกันที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการก่อตัวของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง หมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลและบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนฟอสโฟลิปิดที่มีขั้ว (Holt and North, 1994; Watson, 1995) โดยทรีฮาโลสได้แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยากับบริเวณขั้วของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนฟอสโฟลิปิดและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิเกิดความมั่นคงแข็งแรง เมื่ออยู่ระหว่างกระบวนการแช่แข็งและกระบวนการละลาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ทรีฮาโลสมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ น้ำตาลชนิดอื่น (Aisen et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกที่แท้จริงในการป้องกันตัวอสุจิในระหว่าง กระบวนการแช่แข็งและกระบวนการละลายของทรีฮาโลสยังคงต้องศึกษาต่อไปและกลไกที่แน่นอนของ



การเกิดความเสียหายเนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วยังคงมีข้อโต้แย้งกันอยู่ ถึงแม้ว่าทรีฮาโลสจะมีความสำคัญในการทำให้อสุจิสามารถทนต่อการสูญเสียน้ำภายในเซลล์อย่างรวดเร็วในระหว่างการแช่แข็งได้ แต่ก็อาจมีความเสี่ยงเล็กน้อยของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างรวดเร็วที่เกิดขึ้นในระหว่างที่น้ำภายในเซลล์ไหลออกอย่างรวดเร็วเช่นกัน นอกจากนี้การมี ทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางมีโอกาที่จะส่งผลกระทบต่อรูปแบบของการเกิดผลึก, รูปร่าง และความกว้างของช่องการไหลของน้ำในสารละลายที่ไม่ถูกแช่แข็ง ซึ่งช่วยลดและป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วได้ และยังมีความเป็นไปได้ที่ทรีฮาโลสจะแทรกตัวลงไปในชั้นไขมันในฟอสโฟลิปิด ซึ่งสามารถปรับเนื้อหุ้มเซลล์อสุจิให้เกิดการไหลเวียน (fluidity) ของสารจนทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถทนต่อความเสียหายจากการแช่แข็งได้ก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง (Aboagla and Terada, 2003)



ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไ้พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง (Mean ± SE; n=6)

ลักษณะการเคลื่อนที่ ของอสุจิ	ชนิดของน้ำยาเจือจาง							
	สูตร Schramm				สูตร EK			
	ระดับทรีฮาโลส (mM/mL)							
	0	5	10	15	0	25	50	75
MOT (%)	53.00±1.48 ^A	47.00±1.12 ^{ABC}	36.75±1.70 ^{DC}	35.25±1.50 ^D	54.25±1.88 ^A	52.00±1.25 ^{AB}	50.25±1.45 ^{AB}	51.50±1.14 ^{AB}
PMOT (%)	27.25±1.06 ^A	27.85±1.00 ^A	26.50±1.73 ^{AB}	23.25±1.70 ^{ABC}	23.00±1.65 ^{ABC}	22.50±1.20 ^{BC}	21.00±0.74 ^C	21.00±1.63 ^C
VAP (µm/s)	77.40±1.41 ^C	73.35±1.75 ^C	78.07±1.29 ^C	75.30±1.71 ^C	85.32±1.04 ^A	80.67±1.26 ^B	81.35±1.19 ^B	80.92±1.95 ^B
VSL (µm/s)	61.30±1.54 ^D	58.55±1.37 ^D	63.70±0.86 ^{CD}	63.32±1.45 ^{CD}	76.17±1.09 ^A	72.50±1.55 ^B	71.32±0.95 ^B	77.15±1.74 ^B
VCL (µm/s)	122.82±1.5	114.35±0.94	119.35±1.41	121.75±1.42	121.45±0.65	119.10±1.16	118.47±1.28	116.65±0.90

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01)

4.2.2 ผลของระดับทรีฮาโลสต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

อสุจิไม่สามารถที่จะปฏิสนธิกับไข่ได้ทันทีหลังการลั่น และอสุจิจะมีความสามารถในการปฏิสนธิโดยได้รับการกระตุ้นจากช่องทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Hamner et al., 1970) และการเชื่อมกันของ zona pillucila จะกระตุ้นให้อสุจิเข้าสู่ปฏิกิริยาอะโครโซมรีแอคชั่น (acrosome reaction) ตรงบริเวณเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นนอกจะเกิดการหลอมรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนบน (overly plasma membrane) โดยเหตุการณ์ทางกายภาพนอกเซลล์นี้เป็นผลสัมพันธ์กับการหลั่งเอนไซม์ย่อยสลายที่เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการปฏิสนธิ ด้วยเหตุนี้ตัวอสุจิที่ถูกทำให้สูญเสียอะโครโซมจะไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ ดังนั้นความสมบูรณ์ของอะโครโซมจึงเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นเพิ่มเติมของศักยภาพการทำงานของตัวอสุจิในการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ ขณะผสมเทียม (Hu et al., 2009) จากการรายงานก่อนหน้ามีความเป็นไปได้ ในการนำสาร fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin มาใช้เพื่อศึกษาถึงปฏิกิริยาอะโครโซม รีแอคชั่นของอสุจิ (Axner et al., 2004)

ผลการศึกษาระดับของทรีฮาโลสต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งและนำมาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ที่ประเมินด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และนำไปวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตและมีอะโครโซมสมบูรณ์ (PI-PNA-) ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมล มีค่าสูงสุด (33.30 ± 1.27 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0, 10 และ 15 มิลลิโมล (28.50 ± 0.70 , 24.70 ± 0.84 และ 24.50 ± 0.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิโมล (26.65 ± 0.63 , 27.95 ± 1.20 , 24.95 ± 0.21 และ 23.60 ± 0.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) น้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0 มีเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของอะโครโซม (PI-PNA+) (19.70 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 10 และ 15 มิลลิโมล (13.75 ± 0.77 และ 16.20 ± 1.55 เปอร์เซ็นต์) และน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร EK ที่เสริมทรีฮาโลสในทุกๆระดับ (15.65 ± 0.91 , 16.65 ± 0.21 , 15.45 ± 1.48 และ 12.65 ± 0.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมด้วยทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (17.20 ± 1.27 เปอร์เซ็นต์) ในส่วนของเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิต (PI+PNA-) พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 10 และ 15 มิลลิโมล มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่ไม่มีชีวิตสูงสุด (21.70 ± 0.70 และ 22.25 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลส ที่ระดับ 5 มิลลิโมล (17.25 ± 1.06 เปอร์เซ็นต์) และน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิโมล (17.70 ± 0.56 , 14.80 ± 1.68 , 13.75 ± 1.06 และ 15.70 ± 0.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างกับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (กลุ่มควบคุม) (19.70 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและมีอะโครโซมถูกทำลาย (PI+PNA+) พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร EK เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 50 และ 75 มิลลิโมล มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและมีอะโครโซมถูกทำลายสูงสุด (45.85 ± 0.63 และ 48.05 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm

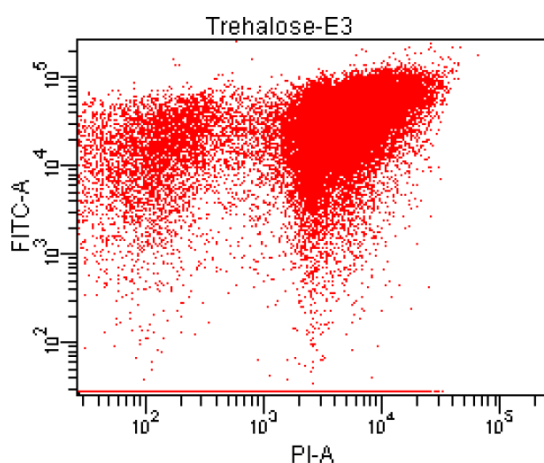


ในกลุ่มควบคุม และน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5, 10 และ 15 มิลลิโมล (32.10 ± 0.98 , 32.25 ± 1.06 , 39.85 ± 0.63 และ 37.05 ± 1.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลส (กลุ่มควบคุม) และน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่เสริมด้วยทรีฮาโลส ที่ระดับ 25 มิลลิโมล (40.00 ± 0.98 และ 40.60 ± 1.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่ง Aboagla และ Terada (2003) รายงานว่าน้ำตาลทรีฮาโลสช่วยคำนวณความสมบูรณ์ของตัวอสุจิได้ยาวนานกว่ากลูโคสที่เสริมในน้ำยาเจือจางที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการเสริมทรีฮาโลสและซูโครสลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ พบว่าช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิสุกรภายหลังการแช่แข็ง (Woelders, 1997) นอกจากนี้การศึกษาของ Yildiz และคณะ (2000), Thuwanut และคณะ (2008) และ Chatdarong และคณะ (2010) ซึ่งให้เห็นว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่สามารถลดจำนวนอสุจิที่ไม่มีชีวิตและลดอัตราการเกิดความเสียหายบริเวณอะโครโซมของตัวอสุจิสุนัขได้ ในขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยกเว้นกาแลคโตสและกลูโคส สามารถช่วยให้อัตราการความสมบูรณ์ของอะโครโซมดีขึ้น (Yildiz et al., 2000)

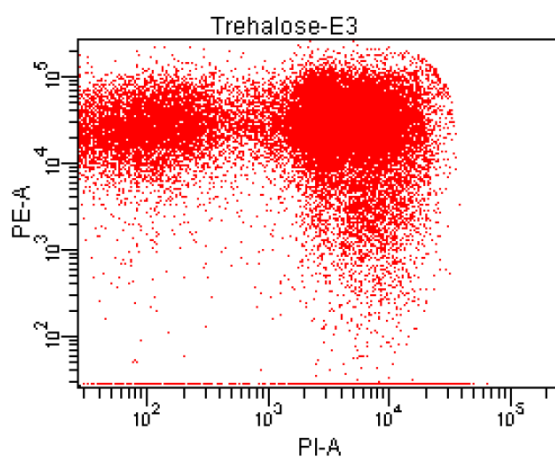
4.2.3 ผลของระดับทรีฮาโลสต่อการของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

ผลการศึกษาระดับของทรีฮาโลสต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งและนำมาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ที่ประเมินคุณภาพการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยการใช้ 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethyl-benzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.5 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (กลุ่มควบคุม) และน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล มีผลทำให้ตัวอสุจิมียเปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียสูงสุด (PI-/JC-1+) (45.40 ± 1.55 และ 48.75 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมด้วยทรีฮาโลสที่ระดับ 10 และ 15 มิลลิโมล (36.80 ± 0.42 และ 39.20 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์) และน้ำยาเจือจางสูตร EK (กลุ่มควบคุม) และน้ำยาเจือจางสูตร EK ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล (40.60 ± 1.83 , 42.00 ± 1.97 , 38.95 ± 1.05 และ 34.40 ± 0.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)





ภาพประกอบ 4.4 ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่มีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง ประเมินด้วยสีย fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และ วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)



ภาพประกอบ 4.5 การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่มีการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง ประเมินโดยการใช้ 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl- carbocyanine iodide (JC-1) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)



ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (Mean ± SE; n=6)

ความสมบูรณ์ ของอะโครโซม (%)	ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ							
	สูตร Schramm				สูตร EK			
	ระดับทรีฮาโลส (mM/mL)							
	0	5	10	15	0	25	50	75
LIA : PI- FITC-PNA-	28.50±0.70 ^B	33.30±1.27 ^A	24.70±0.84 ^{CD}	24.50±0.84 ^{CD}	26.65±0.63 ^{BC}	27.95±1.20 ^B	24.95±0.21 ^{CD}	23.60±0.84 ^D
LRA : PI- FITC-PNA+	19.70±0.14 ^A	17.20±1.27 ^{AB}	13.75±0.77 ^{CD}	16.20±1.55 ^D	15.65±0.91 ^{BC}	16.65±0.21 ^B	15.45±1.48 ^{BC}	12.65±0.63 ^{BC}
DIA : PI+ FITC-PNA-	19.70±0.14 ^{AB}	17.25±1.06 ^{BC}	21.70±0.70 ^A	22.25±1.20 ^A	17.70±0.56 ^{BC}	14.80±1.68 ^{CD}	13.75±1.06 ^D	15.70±0.56 ^{CD}
DRA : PI+ FITC-PNA+	32.10±0.98 ^C	32.25±1.06 ^C	39.85±0.63 ^B	37.05±1.90 ^B	40.00±0.98 ^B	40.60±1.67 ^B	45.85±0.63 ^A	48.05±0.35 ^A

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01), LIA; Live with intact acrosome, LRA; Live with ruptured acrosome, DIA; Dead with intact acrosome, DRA; Dead with ruptured acrosome, FITC-PNA; fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin, PI; propidium iodide

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่มีการเสริมทรีฮาโลสและผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (Mean ± SE; n=6)

การทำงานของ ไมโทคอนเดรีย (%)	ชนิดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ							
	สูตร Schramm				สูตร EK			
	ระดับทรีฮาโลส (mM/mL)							
	0	5	10	15	0	25	50	75
PI- / JC-1+	45.40±1.55 ^A	48.75±0.35 ^A	36.80±0.42 ^{CD}	39.20±0.28 ^{BC}	40.60±1.83 ^B	42.00±1.97 ^B	38.95±1.05 ^{BC}	34.40±0.34 ^D
PI- / JC-1-	2.80±0.42	1.80±0.42	1.65±0.35	1.50±0.42	1.70±0.28	1.75±0.21	1.45±0.35	1.85±0.07

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01), JC-1; 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide, PI; propidium iodide

4.2.4 ผลของระดับทรีฮาลอสที่ต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

ศึกษาถึงผลในการช่วยลดปฏิกิริยาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของทรีฮาลอสที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ malon dialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่วัดได้ด้วยวิธี triobarbituburic acid reactive species (TBARS) ซึ่งวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่นที่ 532 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์ที่ในช่วงที่ 0 (5 นาที) หลังการละลาย ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (กลุ่มควบคุม), น้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 5, 10 และ 15 มิลลิโมล (1.42 ± 0.99 , 1.48 ± 0.26 , 1.62 ± 0.90 และ 1.54 ± 0.20 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) และน้ำยาเจือจางสูตร EK (กลุ่มควบคุม), น้ำยาเจือจางสูตร EK เสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 25, 50 และ 75 มิลลิโมล (1.24 ± 0.17 , 1.49 ± 0.10 , 1.68 ± 0.60 และ 1.61 ± 0.90 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) มีระดับของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.6 ระดับทรีฮาลอสที่เหมาะสมต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง (Mean \pm SE; n=6)

ชนิดของน้ำยาเจือจาง	MDA (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อ 50×10^6 เซลล์)
Sch+T0mM	1.42 ± 0.99
Sch+T5mM	1.48 ± 0.26
Sch+T10mM	1.62 ± 0.90
Sch+T15mM	1.54 ± 0.20
EK+T0mM	1.24 ± 0.17
EK+T25mM	1.49 ± 0.10
EK+T50mM	1.68 ± 0.60
EK+T75mM	1.61 ± 0.09

หมายเหตุ Sch; น้ำยาเจือจางสูตร Schramm, EK; น้ำยาเจือจางสูตร EK, T; ระดับของทรีฮาลอส

4.2.5 ผลของระดับทรีฮาลอสที่เหมาะสมต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

อัตราการผสมติดโดยทำการผสมเทียมในแม่ไก่ไขพันธุ์ทางการค้า จำนวน 48 ตัว ที่มีอายุ 43 สัปดาห์ ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (87.67 ± 1.26 เปอร์เซ็นต์) ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกลุ่มอื่นๆ และพบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 0 และ 10 มิลลิโมล (77.78 ± 1.79 และ 72.29 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์) และน้ำยาเจือจางสูตร EK เสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 0 และ 25 มิลลิโมล (74.69 ± 1.90 และ 72.07 ± 1.40 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาลอสที่ระดับ 15 มิลลิโมล (70.75 ± 1.47



เปอร์เซ็นต์) และน้ำยาเจือจางสูตร EK เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 50 และ 75 มิลลิโมล (70.02 ± 1.21 และ 68.00 ± 1.44 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งน้ำยาเจือจางสูตร EK เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 75 มิลลิโมล ให้อัตราการผสมติดต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมทรีฮาโลสในระดับที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)

ชนิดของน้ำยาเจือจาง	ระดับทรีฮาโลส (mM)	จำนวนไข่เข้าฟัก	อัตราการผสมติด (%)
Sch	0	232	77.78 ± 1.79^B
	5	253	87.67 ± 1.26^A
	10	245	72.29 ± 1.58^{BCD}
	15	250	70.75 ± 1.47^{CD}
EK	0	241	74.69 ± 1.90^{BC}
	25	232	72.07 ± 1.40^B
	50	254	70.02 ± 1.21^{CD}
	75	245	68.00 ± 1.44^D

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

อย่างไรก็ตามที่มีการรายงานถึงประโยชน์ของการเสริมทรีฮาโลสลงในน้ำยาเจือจาง แต่ก็ไม่ทั้งหมดที่ให้ผลการทดลองเหมือนกัน ความแตกต่างที่พบในส่วนหนึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่น้อยหรือมากเกินไป หรือต่างกันที่ชนิดของสัตว์ที่นำมาทดลอง Kazdrowski (2009) รายงานว่าทรีฮาโลสไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของอสุจิกระต่ายยุโรปสีน้ำตาลภายหลังจากการแช่แข็ง และ Squires และคณะ (2004) รายงานว่าการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่ทำให้อสุจิน้ำที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง มีการเคลื่อนที่สูงขึ้น รวมถึงการศึกษาของ Molinia และคณะ (1994) พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมาะสมกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ในการเก็บรักษาอสุจิแกะด้วยวิธีการแช่แข็ง

กลไกการทำงานของทรีฮาโลสในการป้องกันอสุจิระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งและขั้นตอนการละลายยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป นอกเหนือจากประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและหน้าที่ในการเป็นสารที่ให้พลังงานแล้ว น้ำตาลจะช่วยทำให้เซลล์เกิดการคายน้ำออกก่อนเข้ากระบวนการแช่แข็ง ในสถานะที่มีน้ำตาล ความสมบูรณ์ของโครงสร้างและคุณสมบัติในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะยังคงอยู่ การกลับมาเริ่มทำงานอีกครั้งของอสุจิกายหลังจากการแช่แข็งและการละลายจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์มีความสามารถในการให้สารไหลผ่านสูง และ Malo และคณะ (2010) รายงานว่าทรีฮาโลสช่วยเพิ่มความสามารถในการไหลผ่านของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในสถานะที่เซลล์ถูกดึงน้ำออก เนื่องจากทรีฮาโลสสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟอสโฟลิปิดได้ และเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ จึงเป็นการแทนที่โมเลกุลของน้ำ ด้วยเหตุการณีนี้อสุจิจึงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างน้อยลง ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการไหลย้อนกลับของน้ำที่เข้าเซลล์อย่างรวดเร็ว



4.3 การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อคุณภาพและอัตราการผสมติดของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการ แช่แข็ง

4.3.1 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

ผลการศึกษาระดับของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่น้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ประเมินคุณภาพอสุจิด้วย Computer-Assisted Sperm Analyser (CASA) ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ทำการประเมินในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที)

ผลของน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (MOT) (46.58 ± 2.70 เปอร์เซ็นต์) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMOT) (28.50 ± 1.62 เปอร์เซ็นต์) และอัตราการเคลื่อนที่แบบ VSL (80.35 ± 1.69 ไมโครเมตร/วินาที) สูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลส (40.33 ± 2.70 , 24.66 ± 2.09 เปอร์เซ็นต์ และ 61.35 ± 2.29 ไมโครเมตร/วินาที) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm มีผลต่อการเคลื่อนที่แบบ VCL (126.40 ± 1.76 ไมโครเมตร/วินาที) มากกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm เสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมล (117.68 ± 1.69 ไมโครเมตร/วินาที) ($p < 0.01$) และพบว่าชนิดของน้ำยาเจือจางไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่แบบ VAP

ผลของระดับการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0 มิลลิโมล ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (49.33 ± 1.76 เปอร์เซ็นต์) และการเคลื่อนที่แบบ VAP (82.70 ± 1.86) สูงที่สุด แตกต่างจากการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล (40.83 ± 1.87 , 41.66 ± 2.41 และ 43.00 ± 1.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และ (77.53 ± 1.36 , 76.46 ± 1.31 และ 75.71 ± 1.42 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P > 0.01$) ทั้งนี้ระดับการเสริมกลูตาไทโอนภายหลังการละลาย ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (29.16 ± 1.49 , 26.33 ± 1.80 , 25.50 ± 1.08 และ 25.33 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) การเคลื่อนที่แบบ VSL (68.20 ± 1.51 , 68.76 ± 1.70 , 73.15 ± 1.83 และ 73.30 ± 1.94 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ) และการเคลื่อนที่แบบ VCL (123.93 ± 1.41 , 116.10 ± 1.45 , 124.50 ± 1.71 และ 123.65 ± 1.71 ไมโครเมตร/วินาที ตามลำดับ)

การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่มีการเสริมกลูตาไทโอนลงในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ในชั่วโมงที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (42.66 ± 1.75 เปอร์เซ็นต์) และการเคลื่อนที่แบบ VCL (78.17 ± 1.78 ไมโครเมตร/วินาที) สูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลส (36.25 ± 2.02 เปอร์เซ็นต์ และ 59.36 ± 1.57 ไมโครเมตร/วินาที) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่น้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลสมีอัตราการเคลื่อนที่แบบ VSL (78.17 ± 1.78 ไมโครเมตร/วินาที) สูงกว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (59.36 ± 1.57 ไมโครเมตร/วินาที) และพบว่าชนิดของน้ำยาเจือจางไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (23.17 ± 1.68 และ 25.16 ± 1.15 เปอร์เซ็นต์) และอัตราการเคลื่อนที่แบบ VAP (72.10 ± 1.88 และ 73.06 ± 1.98 ไมโครเมตร/วินาที)



ผลของระดับการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย พบว่ากลุ่มที่ไม่มีการเสริมกลูตาไทโอน (กลุ่มควบคุม) ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (45.00 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์) และอัตราการเคลื่อนที่แบบ VAP (76.53 ± 1.61 ไมโครเมตรต่อวินาที) สูงที่สุด แตกต่างจากกลุ่มที่มีการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) (38.16 ± 1.05 , 36.83 ± 1.21 และ 37.83 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และ (74.05 ± 1.35 , 71.88 ± 1.86 และ 67.88 ± 1.69 ไมโครเมตรต่อวินาที ตามลำดับ) แต่ระดับของการเสริมกลูตาไทโอนภายหลังการละลายไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการเคลื่อนที่แบบ VSL และอัตราการเคลื่อนที่แบบ VCL



ตารางที่ 4.8 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไ้พื้นเมืองที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการแช่แข็ง ประเมินในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)

		รูปแบบการเคลื่อนที่				
		MOT	PMOT	VAP	VSL	VCL
ชนิดน้ำยาเจือจาง	Sch+T0mM	40.33 \pm 2.70 ^B	24.66 \pm 2.09 ^b	76.55 \pm 1.55	61.35 \pm 2.29 ^B	126.40 \pm 1.76 ^A
	Sch+T5mM	46.58 \pm 2.72 ^A	28.50 \pm 1.62 ^a	79.65 \pm 1.81	80.35 \pm 1.69 ^A	117.68 \pm 1.69 ^B
ระดับนัยสำคัญ		0.001	0.03	0.07	0.001	0.002
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	49.33 \pm 1.76 ^A	29.16 \pm 1.49	82.70 \pm 1.86 ^A	68.20 \pm 1.51	123.93 \pm 1.41
	0.1	40.83 \pm 1.87 ^B	26.33 \pm 1.80	77.53 \pm 1.36 ^B	68.76 \pm 1.70	116.10 \pm 1.45
	0.5	41.66 \pm 2.41 ^B	25.50 \pm 1.08	76.46 \pm 1.31 ^B	73.15 \pm 1.83	124.50 \pm 1.71
	1	43.00 \pm 1.41 ^B	25.33 \pm 1.58	75.71 \pm 1.42 ^B	73.30 \pm 1.94	123.65 \pm 1.71
ระดับนัยสำคัญ		0.003	0.38	0.03	0.13	0.06
A*B		0.28	0.50	0.12	0.057	0.052

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$), (^{a, b}) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), T; ระดับการเสริมทรีฮาโลส

ตารางที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไก่อพื้นเมืองที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการแช่แข็ง ประเมินในชั่วโมงที่ 1 (Mean ± SE; n=6)

		รูปแบบการเคลื่อนที่				
		MOT	PMOT	VAP	VSL	VCL
ชนิดน้ำยาเจือจาง	Sch+T0mM	36.25±2.02 ^B	23.17±1.68	72.10±1.88	59.36±1.57 ^B	125.62±1.49 ^A
	Sch+T5mM	42.66±1.75 ^A	25.16±1.15	73.06±1.98	78.17±1.78 ^A	116.30±1.76 ^B
ระดับนัยสำคัญ		0.001	0.23	0.49	0.001	0.004
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	45.00±1.54 ^A	26.50±1.32	76.53±1.61 ^A	65.63±1.05	124.63±1.78
	0.1	38.16±1.05 ^B	23.00±1.22	74.05±1.35 ^B	67.01±1.00	124.63±1.19
	0.5	36.83±1.21 ^B	23.33±1.54	71.88±1.86 ^B	71.80±1.49	121.41±1.02
	1	37.83±1.25 ^B	23.83±1.71	67.88±1.69 ^B	70.63±1.00	123.60±1.59
ระดับนัยสำคัญ		0.001	0.43	0.03	0.07	0.05
A*B		0.12	0.72	0.12	0.052	0.06

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01), T; ระดับการเสริมทรีฮาโลส

4.3.2 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

ผลการศึกษากการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่ประเมินในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) ด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และนำไปวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.6 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลสและน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตและอยู่ในสภาพสมบูรณ์ (PI-PNA-) (33.93 ± 1.21 และ 33.53 ± 1.32 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ความเสียหายของอะโครโซม (PI-PNA+) (19.80 ± 1.40 และ 20.00 ± 1.24 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิต แต่ อะโครโซมยังมีความสมบูรณ์ (PI+PNA-) (19.07 ± 1.31 และ 20.90 ± 1.93 ตามลำดับ) และ เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมเสียหาย (PI+PNA+) (27.18 ± 1.71 และ 25.56 ± 0.73 ตามลำดับ) ($p > 0.05$)

ผลของระดับของการเสริมกลูตาไทโอนที่ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล ลงในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) พบว่าไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต (PI-PNA-) (34.00 ± 1.38 , 34.37 ± 1.35 , 34.42 ± 1.41 และ 32.15 ± 1.25 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ความเสียหายของอะโครโซม (PI-PNA+) (19.87 ± 1.24 , 19.42 ± 1.35 , 19.62 ± 1.34 และ 20.67 ± 0.72 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมยังสมบูรณ์ (PI+PNA-) (20.37 ± 1.68 , 18.20 ± 1.32 , 18.67 ± 1.62 และ 22.70 ± 1.40 ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมเสียหาย (PI+PNA+) (25.75 ± 1.39 , 28.00 ± 1.14 , 27.27 ± 1.31 และ 24.47 ± 1.63 ตามลำดับ) ($p > 0.05$) และไม่พบปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของน้ำยาเจือจางและระดับของการเสริมกลูตาไทโอน ($p < 0.05$)

ผลการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมในชั่วโมงที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลสและน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ ระดับ 5 มิลลิโมล ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตและอยู่ในสภาพสมบูรณ์ (PI-PNA-) (29.87 ± 1.28 และ 31.62 ± 1.14 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ความเสียหายของอะโครโซม (PI-PNA+) (20.37 ± 1.34 และ 18.22 ± 0.58 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตแต่อะโครโซมยังมีความสมบูรณ์ (PI+PNA-) (21.28 ± 1.42 และ 22.86 ± 1.48 ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมเสียหาย (PI+PNA+) (28.46 ± 1.63 และ 27.28 ± 0.94 ตามลำดับ) ($p > 0.05$)

ผลของระดับของการเสริมกลูตาไทโอนที่ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล ลงในน้ำยาเจือจางหลังการละลายในชั่วโมงที่ 1 พบว่าไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต (PI-PNA-) (31.97 ± 1.34 , 32.67 ± 0.49 , 31.85 ± 0.97 และ 30.50 ± 0.81 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ความเสียหายของอะโครโซม (PI-PNA+) (17.65 ± 0.65 , 17.92 ± 1.18 , 19.05 ± 1.20 และ 18.57 ± 0.35 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมยังสมบูรณ์ (PI+PNA-) (22.72 ± 1.03 , 20.40 ± 1.64 , 21.37 ± 1.21 และ 23.80 ± 0.58 ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ไม่มีชีวิตและอะโครโซมเสียหาย (PI+PNA+) (27.65 ± 1.78 , 29.00 ± 1.48 , 27.20 ± 1.43 และ 27.12 ± 0.37 ตามลำดับ) ($p > 0.05$) และไม่พบปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของน้ำยาเจือจางและระดับของการเสริมกลูตาไทโอน ($p > 0.05$)



ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)

		ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (%)			
		PI-PNA-	PI-PNA+	PI+PNA-	PI+PNA+
ชนิดน้ำยา	Sch+T5mM	33.93 \pm 1.21	19.80 \pm 1.40	19.07 \pm 1.31	27.18 \pm 1.71
เจือจาง	Sch+T5mM	33.53 \pm 1.32	20.00 \pm 1.24	20.90 \pm 1.93	25.56 \pm 0.73
ระดับนัยสำคัญ		0.70	0.81	0.06	0.07
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	34.00 \pm 1.38	19.87 \pm 1.24	20.37 \pm 1.68	25.75 \pm 1.39
	0.1	34.37 \pm 1.35	19.42 \pm 1.35	18.20 \pm 1.68	25.75 \pm 1.39
	0.5	34.42 \pm 1.41	19.62 \pm 1.34	18.67 \pm 1.62	27.27 \pm 1.31
	1.0	32.15 \pm 1.25	20.67 \pm 0.72	22.70 \pm 1.40	24.47 \pm 1.31
ระดับนัยสำคัญ		0.39	0.72	0.07	0.18
A*B		0.52	0.84	0.86	0.88

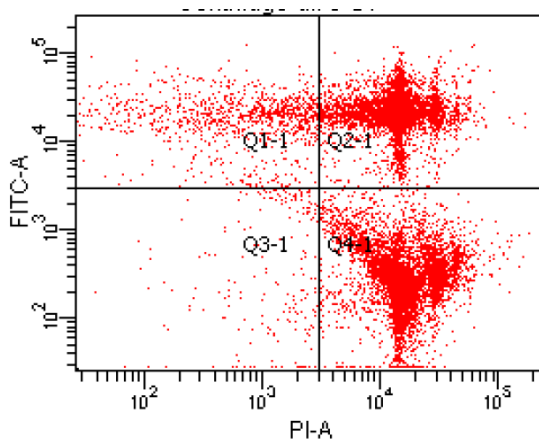
หมายเหตุ: T; ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินในชั่วโมงที่ 1 (Mean \pm SE; n=6)

		ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (%)			
		PI-PNA-	PI-PNA+	PI+PNA-	PI+PNA+
ชนิดน้ำยา	Sch+T0mM	29.87 \pm 1.28	20.37 \pm 1.34	21.28 \pm 1.42	28.46 \pm 1.63
เจือจาง	Sch+T5mM	31.62 \pm 1.14	18.22 \pm 0.58	22.86 \pm 1.48	27.28 \pm 0.94
ระดับนัยสำคัญ		0.61	0.76	0.10	0.13
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	31.97 \pm 1.34	17.65 \pm 0.65	22.72 \pm 1.03	27.65 \pm 1.78
	0.1	32.67 \pm 0.49	17.92 \pm 1.18	20.40 \pm 1.64	29.00 \pm 1.48
	0.5	31.85 \pm 0.97	19.05 \pm 1.20	21.37 \pm 1.21	27.20 \pm 1.43
	1.0	30.50 \pm 0.81	18.57 \pm 0.35	23.80 \pm 0.58	27.12 \pm 0.37
ระดับนัยสำคัญ		0.07	0.24	0.09	0.35
A*B		0.76	0.35	0.52	0.67

หมายเหตุ: T; ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง





ภาพประกอบ 4.6 ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)

4.3.3 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

ผลการศึกษาระดับกลูตาไทโอนที่เสริมลงในน้ำยาเจือจางหลังการละลายต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ที่ประเมินคุณภาพการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยการใช้ 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' tetraethylbenzimidazolyl-carbo cyanine iodide (JC-1) และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer ในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และภาพประกอบ 4.7 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลส และน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (51.32 ± 1.78 และ 51.25 ± 0.73 ตามลำดับ) ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิ (PI-/JC-1+) และในการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาหลังการเจือจางที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล นั้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรีย (51.02 ± 1.39 , 51.40 ± 0.45 , 52.10 ± 1.26 และ 50.62 ± 0.35 ตามลำดับ) ($p > 0.05$)

เมื่อทำการประเมินการทำงานของไมโทคอนเดรียในชั่วโมงที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 4.13 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลสและน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (46.96 ± 1.86 และ 47.67 ± 1.09 ตามลำดับ) ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิ (PI-/JC-1+) เช่นกัน การเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาหลังการเจือจางที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล นั้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรีย (47.27 ± 1.17 , 48.40 ± 1.67 , 49.00 ± 1.20 และ 46.60 ± 0.83 ตามลำดับ) ($p > 0.05$)



ตารางที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายในชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) (Mean \pm SE; n=6)

		การทำงานของไมโทคอนเดรีย (%)	
		PI-/JC-1+	PI-/JC-1-
ชนิดของน้ำยาเจือจาง	Sch+T0mM	51.32 \pm 1.78	2.41 \pm 0.77
	Sch+T5mM	51.25 \pm 0.73	2.28 \pm 0.35
ระดับนัยสำคัญ		0.93	0.66
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	51.02 \pm 1.39	2.85 \pm 0.65
	0.1	51.40 \pm 0.45	2.40 \pm 0.50
	0.5	52.10 \pm 1.26	1.95 \pm 0.23
	1	50.62 \pm 0.35	2.20 \pm 0.62
ระดับนัยสำคัญ		0.68	0.21
A*B		0.81	0.41

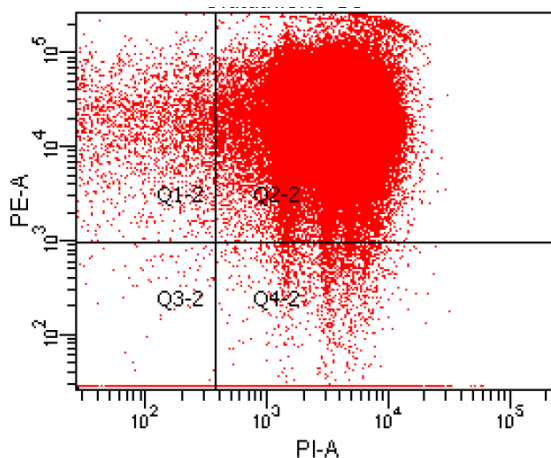
หมายเหตุ: T;ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง

ตารางที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่อพื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในระดับที่แตกต่างกันในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย ในชั่วโมงที่ 1 (Mean \pm SE; n=6)

		การทำงานของไมโทคอนเดรีย (%)	
		PI-/JC-1+	PI-/JC-1-
ชนิดของน้ำยาเจือจาง	Sch+T0mM	46.96 \pm 1.86	3.41 \pm 0.51
	Sch+T5mM	47.67 \pm 1.09	2.17 \pm 0.38
ระดับนัยสำคัญ		0.61	0.21
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	47.27 \pm 1.17	2.60 \pm 0.39
	0.1	48.40 \pm 1.17	2.20 \pm 0.54
	0.5	49.00 \pm 1.20	1.90 \pm 0.34
	1	46.60 \pm 0.83	2.47 \pm 0.27
ระดับนัยสำคัญ		0.68	0.09
A*B		0.35	0.15

หมายเหตุ: T;ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง





ภาพประกอบ 4.7 แสดงการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย ประเมินโดยใช้ 5, 5', 6, 6'- tetrachloro-1, 1', 3, 3'tetraethylbenzimidazolyl- carbocyanine iodide (JC-1) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer (จำนวนอสุจิ 100,000 เซลล์)

4.3.4 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจำนวนมาก ดังนั้นจึงไวต่อการเกิดความเสียหายเนื่องจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ผลที่ตามมาคือ เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสมบูรณ์ การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และสูญเสียความสามารถในการปฏิสนธิในที่สุด โดยเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยา ROS ระหว่างการบ่มที่ใช้ออกซิเจน (Uysal et al., 2007) ดังนั้นอนุมูลอิสระจะต้องถูกกำจัดออกโดยการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (จำพวก กลูตาไทโอน ซีสเทมีน และ ทัวรีน เป็นต้น) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายหรือระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (Bucak et al., 2007)

ผลของกลูตาไทโอนในการช่วยลดปฏิกิริยาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกลูตาไทโอนต่ออสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย โดยวิเคราะห์จากปริมาณ malonaldehyde (MDA) ที่วัดได้ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive species (TBARS) ซึ่งวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่นแสงที่ 532 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ในช่วงที่ 0 (5 นาที) หลังการละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.14 พบว่าผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm และน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลส ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ในส่วนของการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมล พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อนั้น ช่วยให้มีปริมาณ MDA ที่วัดได้ต่ำที่สุด (0.45 ± 0.90 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) กับกลุ่มที่มีการเสริม กลูตาไทโอนที่ระดับ 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล (1.35 ± 0.24 , 0.86 ± 0.08 และ 0.70 ± 0.61 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ)



ผลการวิเคราะห์ในชั่วโมงที่ 1 หลังการละลาย ดังแสดงในตารางที่ 4.14 พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล ไม่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของอสุจิ และการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายในระดับ 1 มิลลิโมลนั้น ช่วยให้ปริมาณ MDA ที่วัดได้มีค่าต่ำที่สุด (0.16 ± 0.09 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่มีการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายที่ระดับ 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล (1.21 ± 0.14 , 0.80 ± 0.08 และ 0.71 ± 0.05 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/ 50×10^6 เซลล์ ตามลำดับ)

จากการทดลองนี้ พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายที่ชั่วโมงที่ 0 (5 นาที) และชั่วโมงที่ 1 หลังการละลาย ทำให้ระดับปริมาณการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นน้อยกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ

ตารางที่ 4.14 ปริมาณ malondialdehyde (MDA) จากอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งที่มีการเสริมกลูตาไทโอน (GSH) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลาย ($\mu\text{M}/\text{mL}/50 \times 10^6 \text{ spz} \pm \text{SE}; n=6$)

		ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ($\mu\text{M}/\text{mL}/50 \times 10^6 \text{ spz}$)	
		ชั่วโมงที่ 0 (5 นาที)	ชั่วโมงที่ 1
น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ	Sch+T0mM	0.86 ± 0.40	0.73 ± 0.37
	Sch-T5mM	0.81 ± 0.31	0.69 ± 0.46
ระดับนัยสำคัญ		0.31	0.29
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	1.35 ± 0.24^A	1.21 ± 0.14^A
	0.1	0.86 ± 0.08^B	0.80 ± 0.08^B
	0.5	0.70 ± 0.61^C	0.71 ± 0.05^B
	1.0	0.45 ± 0.90^D	0.16 ± 0.09^C
ระดับนัยสำคัญ		0.001	0.001
A*B		0.671	0.054

หมายเหตุ: (^{A, B})ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$), T; ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง



4.3.5 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลายต่ออัตราการผสมติด โดยการใช้น้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง และทำการละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปผสมเทียมในแม่ไก่ไขพันธุ์ทางการค้า อายุ 51 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 4.15 พบว่า น้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่มีการเสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล (74.92 ± 1.22 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่ไม่มีการเสริมทรีฮาโลส (64.30 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

ผลของระดับการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางหลังการละลาย พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล มีอัตราการผสมติด (72.77 ± 1.55 , 71.62 ± 0.51 และ 69.46 ± 1.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่พบความแตกต่างเมื่อมีการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 1 มิลลิโมล (64.59 ± 1.01 เปอร์เซ็นต์) มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้น้ำยาเจือจางหลังการละลายน้ำเชื้อที่มีการเสริมกลูตาไทโอน (GSH) ในระดับที่แตกต่างกัน (Mean \pm SE; n=6)

		จำนวนไข่เข้าฟัก	อัตราการผสมติด (%)
น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ	Sch+T0mM	950	64.30 ± 1.71^B
	Sch-T5mM	948	74.92 ± 1.22^A
ระดับนัยสำคัญ			0.001
กลูตาไทโอน (mM/mL)	0	470	72.77 ± 1.55^A
	0.1	486	71.62 ± 0.51^A
	0.5	469	69.46 ± 1.11^A
	1	473	64.59 ± 1.01^B
ระดับนัยสำคัญ			0.003
A*B			0.052

หมายเหตุ: (^{A, B}) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$), T; ระดับของการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจาง

นอกจากนี้ขั้นตอนในการแช่แข็งยังเป็นขั้นตอนที่ทำให้ปริมาณกลูตาไทโอนภายในเซลล์อสุจิถูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gadea et al., 2004) เช่นเดียวกับบิลอดิว (Bilodeau et al., 2000) และมนุษย์ (Gadea et al., 2005) และจากการศึกษาที่ผ่านมาเห็นได้ว่าการเสริมกลูตาไทโอนลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งในอสุจิสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิออกร่างของอสุจิได้ (Gadea et al., 2004; 2005) และสามารถช่วยลดกระบวนการเกิดคาปาซิเตชัน



ลดการเกิดปฏิกิริยา ROS ภายในเซลล์เพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสุกร
แพะ และมนุษย์ได้ เมื่อผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง (Gadea et al., 2005; 2011; 2013)

การเสริมกลูตาไทโอนลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังแช่แข็งนั้นถูกคาดหวัง
ให้ช่วยปรับปรุงคุณภาพและความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิสุกรภายหลังการแช่แข็งและ
การละลาย (Gadea et al., 2004; 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bilodeau และคณะ (2001) และ
Funahashi และ Sano (2005) ที่เสริมกลูตาไทโอนแล้วพบว่าสามารถช่วยรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของ
อสุจิ และช่วยปกป้องอสุจิไม่ให้เสียหายจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้



บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm และสูตร EK ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเกิดปฏิกริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และอัตราการผสมติดดีที่สุด

การทดลองที่ 2 ผลของระดับการเสริมทรีฮาโลสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมทรีฮาโลสที่ระดับ 5 มิลลิโมล มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซม เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติดดีที่สุด แต่ไม่ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และระดับของการเกิดปฏิกริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมกลูตาไทโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายต่อคุณภาพและอัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง พบว่าการเสริมกลูตาไทโอนระดับ 1 มิลลิโมล ภายหลังจากการละลาย มีผลทำให้ระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันน้อยที่สุด แต่มีผลให้อัตราการผสมติดต่ำลงตามไปด้วย แต่ในการเสริมกลูตาไทโอนที่ระดับ 0.1 และ 0.5 มิลลิโมล ภายหลังจากการละลาย ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอด อัตราการเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซม เปอร์เซ็นต์การทำงานของไมโทคอนเดรีย และ อัตราการผสมติดของอสุจิไก่พื้นเมืองที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมทรีฮาโลสลงในน้ำยาเจือจางเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองด้วยวิธีแช่แข็งนั้น เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยพัฒนาเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ของไก่พื้นเมืองได้ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับการทำน้ำเชื้อแช่แข็งและการผสมเทียมในสัตว์ปีกในอนาคตต่อไป



เอกสารอ้างอิง



เอกสารอ้างอิง

- กัมพล แก้วเกษ. (2552). การพัฒนา FREEZING EXTENDERS สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร.
กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข. (2550). การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งและการผสมเทียมไก่
พื้นเมือง. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรจิต สอนสีดา. (2552). ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปแบบบ้วน ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และอัตราการ
ผสมติดในไก่พื้นเมือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุนทร สุนาทัย, ธีระชัย ช่อไม้, จตุรงค์ จริยะนรวิรัช และศิริพันธ์ โมราถบ. (2552). ศึกษาเปรียบเทียบ
การใช้ glycerol กับ dimethyl formamide เป็นสารป้องกันการสูญเสียของเซลล์อสุจิใน
กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมือง. การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552.
ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 70-72.
- Aboagla, E.M.E. and T. Terada. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm
membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod*, 69, 1245-1250.
- Aisen, E.G., V.H. Medina and A. Venturino. (2002). Cryopreservation and post-thawed
fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations.
Theriogenology, 57(7), 1801-1808.
- Aisen, E., M. Quintana, V. Medina, H. Morello and A. Venturino. (2005). Ultramicroscopic
and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-
based hypertonic extender. *Cryobiology*, 50, 239-249.
- Aitken, J. and H. Fisher. (1994). Reactive oxygen species generation and human
spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
- Ansah, G.A. and R.B. Bluckland. (1983). Eight generations of selection for duration of
fertility of frozen thawed semen in the chicken. *Poult. Sci*, 62, 1529-1539.
- Agarwal, A. and T.M. Said. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA
damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update*, 9(4), 331-345.
- Agarwal, A. and R.A. Saleh. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale,
significance, and treatment. *Urol. Clin. North. Am*, 29(4), 817-827.
- Andrade, A.F.C., R.P. Arruda, E.C.C. Celeghini, J. Nascimento, S.M.M.K. Martins, C.F.
Rephael and A.S. Moretti. (2007). Fluorescent stain method for the
simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma
and acrosome membranes in boar sperm. *Reprod. Dom. Anim*, 42, 190-194.
- Armstrong, J.S., M. Rajasekaran, W. Chamulitrat, P. Gatti, W.J. Hellstrom and S.C. Sikka.
1999. Characterization of reactive oxygen species induced effect on human
spermatozoa movement and energy metabolism. *Free. Radic. Biol. Med*.
26(7-8), 869-680.



- Ashizawa, K., Y. Suzuki and K. Okachi. (1989). Flagellar movement in demembrated preparations of ejaculated fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*, 86, 263-270.
- Atessahin, A., M.N. Bucak, P.B. Tuncer and M. Kizil. (2008). Effect of antioxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small. Rumin. Res*, 77, 38-44.
- Axner, E., U. Hermansson and C. Linde-Forsberg. (2004). The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*, 84(1-2), 179-191.
- Bacon, L.D., D.W. Salter, J.B. Motta, L.B. Crittenden and F.X. Ogasawara. (1986). Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized strains. *Poult. Sci*, 65, 1965-1971.
- Bakst, M.R. (1980). Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *J. Reprod. Fertil*, 60, 121-127.
- Barbas, J.P. and R.D. Mascarenhas. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell. Tissue. Bank*, 10(1), 49-62.
- Bateman, H.L. (2001). *Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival*. Canada: The Faculty of Graduate Studies, The University of Guelph.
- Baumber, J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina and M.C. Davies-Morel. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl*, 21(6), 895-902.
- Bearden, H.J., J.W. Fuquay and S.T. Willard. (2004). *Applied Animal Reproduction*. s.l.: s.n.
- Bilodeau, J.F., S. Chatterjee, M.A. Sirard and C. Gagnon. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod*, 55, 282-288.
- Bilodeau, J.F., S. Blanchette, C. Gagnon and M.A. Sirard. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56(2), 275-286.
- Blanco, J.M., G.F. Gee, D.E. Wildt and A.M. Donoghue. (2000). Species variation osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biol. Reprod*, 63, 1164-1171.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. (2005). Membrane fluidity and ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reprod*, 129, 371-378.
- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poul. Sci. J*. 63, 213-222.



- Blesbois, E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerella, P. Raut and M. Tixier-Boichard. (2007). Semen cryopreservation for *ex-situ* management of genetic diversity in chickens; creation of the French Avian Cryobank. *Poult Sci*, 86, 555-564.
- Blesbois, E. and J.P. Brillard. (2007). Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Aminal*, 1, 1472-1481.
- Blesbois, E., I. Grasseau, F. Seignerin, S. Mignon-Grasteau, M. Saint Jalme and M.M. Mialon-Richard. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69, 252-261.
- Branca, C., S. Magazu, G. Maisano and M.T.F. Telling. (2004). *Sugar coating for protection of biomembranes: Review of the Year/(Science Highlights) ISIS*. [online] from: [http://www.isis.stfc.ac.uk/about-isis/annual-report-pdf archive/annual-report-20049957.pdf](http://www.isis.stfc.ac.uk/about-isis/annual-report-pdf%20archive/annual-report-20049957.pdf). [Available 2013 June 10].
- Brillard JP. (1995). Artificial insemination: How many sperm, hoe often. In: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M.R. Bakst and G.J. Wishart, (ed.) *Poultry Science Association, Savoy, IL*. pp. 176-189
- Bucak, M.N., A. Atessahim, O. Varisli, A. Yuce, N. Tekin and A. Akcay. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after the freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67, 1060-1067.
- Bucak, M.N. and Necmettin Tekin. (2007). Protective effect of taurine, glutathione nadtrehalose on the liquid stronge of ram semen. *Small. Rumin. Res*, 73, 103-108.
- Bucak, M.N., A. Atessahin and A. Yuce. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process.. *Small. Rumin. Res*, 75, 128-134.
- Buss, E.G. (1993). Cryopreservation of rooster sperm. *Poult Sci*, 72, 944-954.
- Burrows W.H. and J.P. Quinn. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult. Sci*, 16, 19-24.
- Cabrita, E., R. Alvarez, E. Anel and M.P. Herraez. (1999). The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Anim. Reprod. Sci*, 55(3-4), 279-287.
- Cerolini, S., K.A. Kelso, R.C. Noble, B.K. Speake, F. Pizzi and L.G. Cavalchini. (1997). Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol. Reprod*, 57, 976-980.



- Chalah, T.F. Seigneurin, E. Blesbosis and J.P. Brillard. (1999). In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.
- Chatdarong, K., P. Thuwanut, S. Manee-in, C. Lohachit and E. Axner. (2010). Effect of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 45(2), 217-221.
- Chen, Y., R.H. Foot and C.C. Brockett. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30, 423-431.
- Cheng, F.P., J.T. Wu, J.P. Chan, J.S. Wang, H.P. Fung and B. Colenbrander. (2004). The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology*, 61(9), 1605-1616.
- Chhillar, S., V.K. Singh, R. Kumar and S.K. Atreja. (2012). Effect of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Anim. Reprod. Sci*, 135, 1-7.
- Chistensen, V.L. (1995). Diluent, dilution and storage of poultry semen for six hours. In: M.R. Baskin and G.J. Wishart (eds). *Proceeding of the 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL. p.90-106.
- Cirit, U., B. Haydar, D. Kamber, A. Cansu, P. Serhat, V. Omer, C. Clifford-Rathert and A. Yuksul. (2013). Comparison of cryoprotective effect of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 139, 38-44.
- Cooper, D.M. (1965). Artificial Insemination in Poultry. *World's Poultry Science Journal*, 21(1), 12-22
- Curry, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod*, 5(1), 46-52.
- Das, S.K. (2002). Effects of feeding on semen production in native cock in Bangladesh. *Biol. Sci*, 2, 2002.
- Dalimata, A.M. and J.K. Graham. (1997). Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, 48(5), 831-841.
- Donnelly, E.T., N. McClure and S.E. Lewis. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil. Steril*, 72(3), 484-495.
- Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. (2000). Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci*, 62(1-3), 213-232.



- Dragileva, E., S. Rubinstein and H. Breitbart. (1999). Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod*, 61(5), 1226-1234.
- Dumpala, P.R., H.M. Parker and C.D. McDaniel. (2006). The sperm quality index from fresh semen predicts chicken semen quality after storage. *Int J. Poult. Sci*, 5, 850-855.
- Elbein, A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Etches, R.J. (1996). Reproduction in Poultry. In: King G.J. (Ed), *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science publishers B.V., Amsterdam, Netherlands. pp. 493-530.
- Evan, G. and W.M.C. Maxwell. (1997). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Bwtterworths: Sydney.
- Fernandez-Santos, M.R., F. Martinez-Pastor, V. Garcia-Macias, M.C. Estes, A.J. Soler, P. dePaz, L. Anel and J.J.Garde. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphushispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67, 738-753.
- Filliers, M., T. Rijsselaere, P. Bossaert, D. Zambelli, P. Anastasi and M. Hoogewijs. (2010). In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, 74(1), 31-39.
- Froman, D.P. and R.J. Thurson. (1984). Effect of incubation at 4°C on calcium uptake and acrosin activity in turkey spermatozoa. *Poult. Sci*. 64, 396-400.
- Fukuhara, R. and Y. Nishikawa. (1973). Effect of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Japane J. Zootechn. Sci*, 44, 266-270.
- Fulton, J.E. (2006). Avian genetic stock preservation: An industry perspective. *Poult. Sci*. 85, 227-231.
- Funahashi, H. and T. Sano. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*, 63(6), 1605-1616.
- Gadea, J., E. Selles, M.A. Marco, P. Coy, C. Matas, R. Romar and S. Ruiz. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62, 690-701.



- Gadea, J., F. Garcia-Vazquez, C. Matas, J.C. Gardon, S. Canovas and D. Gumbao. (2005a). Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl*, 26(3), 396-404.
- Gadea, J., D. Gumbao, C. Matas and R. Romar. (2005b). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J. Androl*, 26(6), 749-756.
- Gadea, J., M. Molla, E. Selles, M.A. Marco, F.A. Garcia-Vazquez and J.C. Gardon. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62, 40-46.
- Gadea, J., D. Gumbao, B. Gomez-Gimenez and J.C. Gardon. (2013). Supplementation of the Thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat. *Reprod. Biol*, 13, 24-33.
- Graham, J.K. and E. Moce. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504.
- Gutierrez-Perez, O., M.L. Juarez-Mosqueda, S.U. Carvajal and M.E.T. Ortega. (2009). Boar Spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58, 287-292.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun*, 9(1), 1-32.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. (1998). Antioxidant defences. In: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, editors. *Free radicals in biology and medicine*. London: University Press. pp.21-30.
- Hammerstedt, R.H., J.K. Graham and J.P. Nolan. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Andro*, 11, 73-88.
- Hamner, C.E., L.L. Jennings, N.J. Sojka. (1970). Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. *J. Reprod. Fertil*, 23(3), 477-480.
- Han, X.F., Z.Y. Niu, F.Z. Liu and C.S. Yang. (2005). Effect of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *Poult. Sci*, 4, 197-201.
- Hermansson, U. (2006). *Studies of canine and feline sperm viability under different storage procedures*. Doctoral thesis in Comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health. Uppsala Swedish: Veterinary Medicine and Animal Science, Uppsala Swedish University.



- Holt, W.v., and R.D. North. (1994). Effect of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod*, 51, 414-424.
- Hu, J.H., Q.H. Li, G. Li, Z.L. Jiang, S.H. Bu and H. Yang. (2009). The cryoprotective effect of Trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci*. 112(1-2), 107-118.
- Hu, J.H., L.S. Zan, X.L. Zhao, Q.W. Li, Z.L. Jiang, Y.K. Li and X. Li. (2010). Effect of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *J. Anim. Sci*, 88, 1657-1662.
- Hocking, P.M. and R. Bernard. (1997). Effect of dietary crude protein content and food intake on production of semen in two lines of broiler breeder males. *Brit. Poult. Sci*, 38, 199-202.
- lordachescu, M. and R. Imai. (2008). Trehalose Biosynthesis in Response to Abiotic Stresses. *J. Int. Plant. Biol*, 50(10), 1223-1229.
- Irvine, D.S. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod*, 1(1), 6-12.
- Jafaroghli, M., B. Khalili, A. Farshad and M.J. Zamiri. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small. Rumin. Res*, 96, 58-63.
- Khalili, B., A. Farshad, M.J. Zamiri, A. Rashidi and P. Fazeli. (2009). Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. *Asian-Australasian J. Anim. Sci*, 22, 1614-1619.
- Kim, J.G. and S. Parthasarathy. (1998). Oxidation and the spermatozoa. *Semin. Reprod. Endocrinol*, 16(4), 235-239.
- Kirby, J.D., C.J. Tressler and Y.K. Kirby. (1998). Evaluation if the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poult. Sci*, 77,1688-1694.
- Kozdrowski, R. (2009). The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (*Lepuseuropaeus* Pallas, 1778) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*, 116, 326-334.
- Lake, P.E. (1995). Historical perpective of artificial insemination technology. *in: Proceedings: First Internationnal Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M.R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.). Poultry Science Association, Savoy, IL. pp. 1-20
- Lake, P.E. and J.M. Stewast. (1978). Artificial Insemination in Poultry. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London: H.M.S.O.



- Lake, P.E. and O. Ravie. 1979. Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5°C in fluids of different pH. *J. Reprod. Fertil*, 57, 149-155.
- Lewis, S.E., P.M. Boyle, K.A. McKinney, I.S. Young and W. Thompson. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Journal Article*, 64(4), 868-870.
- Liu, Z., R.H. Foote and C.C. Brockett. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37, 219-230.
- Long, J.A. (2006). Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges. *Poult. Sci*, 85, 232-236.
- Lopez-Saaz, A., N. Ortiz, L. Gallego, J.J. Gadre. (2000). Liquid storage (5 °C) of ram semen in different diluents. *Arch. Androl*, 44, 155-164.
- Luvoni, G.C., E. Kalchschmidt and G. Marinini. (2003). Conservation of feline semen. Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. *J. Feline. Med. Surg*, 5(5),257-263.
- Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, R. Cano, I. de Blas, E. Espinosa. (2010). Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, 61(1), 17-21.
- Martinez, A.I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci*, 82-83, 209-224.
- Matsuoka, T., H. Imai, H. Kohno and Y. Fukui. (2006). Effect of bovine serum albumin in trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J. Reprod. Developm*, 52, 675-683.
- Martins-Bessa, A., A. Rocha , A. Mayenco-Aguirre. (2009). Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 71, 248-253.
- Maxwell, W.M.C. and P.F. Watson. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 42, 55-65.
- Meyers, S.A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci*, 89, 57-74.
- Michael, A., C. Alexopoulos, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, P. Saratsis and C. Boscoc. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68(2), 204-212.
- Moce, E. and J.K. Graham. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci*, 105(1-2), 104-118.



- Molinia, F.C., G. Evans and W.M. Maxwell. (1994). In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nut.r Dev*, 34(5), 491-500.
- Morrell, J.M. (2006). Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Dom. Anim*, 41, 63-67.
- NAFA and ESHRE-SIGA. (2002). *Manual on Basic Semen Analysis. Nordic Association for Andrology*. New York: Special Interest Group on Andrology.
- Najafi, A., M. Zhandi, A. Towhidi, M. Sharafi, A.A. Sharif, M.K. Motlagh and F. Martinez-Pastor. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 66, 275-282.
- Nur, Z., B. Zik, B. Ustuner, H. Sagirkaya and C.G. Ozguden. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73, 1267-1275.
- Parks, J.E. and J.K. Graham. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.
- Park, H.M. and C.D. McDaniel. (2006). The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange and ionic balance of broiler breeder sperm. *Poult. Sci*, 85, 106-116.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and J.K. Graham. (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*, 51(2), 461-472.
- Patist, A. and H. Zoerb. 2005. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40, 107-113.
- Paulenz, H., L. Soderquist, R. Perez-Pe and K.A. Berg. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823-836.
- Phillips, J.J., R.K. Bramwell and J.K. Graham. (1996). Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poult. Sci*, 75, 915-923.
- Polge, C. (1951). Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -70°C. *Nature*. 167, 949-950.
- Pukazhenth, B., R. Spindler, D. Wildt and J. Howard. (2002). Osmotic properties of spermatozoa from felids productions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology*, 44(3), 288-300.
- Pukazhenth, B.S., K. Neubauer, K. Jewgenow, J. Howard and D.E. Wildt. (2006). The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, 66(1), 112-121.



- Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Rumin. Res*, 63, 215-225.
- Pym, R. (1966). The effect of frequency of insemination dilution and does rate of semen on the fertility of three breeds of chickens. *Aust. J. Experi. Agri. Anim. Hus*, 6, 448. (Abstr)
- Reddy, N.S.S., G.J. Mohanarao and S.K. Atreja. (2010). Effect of adding taurine and Trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci*, 119, 183-190.
- Rijsselaere, T., A. Van Soom, S. Tanghe, M. Coryn, D. Maes and A. de Kruif. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64(3), 706-719.
- Robaire, C.P. and B. Wa. (2006). Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during using in the Brown Norway rat. *J of Androl*, 54, 79-84.
- Roca, J., M.J. Rodriguez, M.A. Gil, G. Carvajal, E.M. Garcia, C. Cuello, J.M. Vazquez and E.A. Martinez. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl*, 26(1), 15-24.
- Rota, A., N. Penzo, L. Vincenti and R. Mantovani. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening. *Theriogenology*, 53(7), 1415-1420.
- Salamon, S. and A.J. Ritar. (1982). Deep freezind of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate or dilution on survival of spermatozoa. *Australian J. Bio. Sci*, 35, 295-303.
- Samardzija, M., T. Dobranic, S. Kruslin, S. Cerslin, M. Cergolj, N. Prvanovic and J. Grizelj. 2008. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. *Vet. Arh*, 78(4), 279-287.
- Sariozkan, S., M.N. Bucak, P.B. Tuncer et al. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58, 134-138.
- Sexton, T.J. (1977). A new poultry semen extender.1 effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poult. Sci*, 56, 1443-1446.
- Sexton, T.J. (1979). *Preservation of poultry semen*. A review. Beltsville Symp. Agric. Res. No. 3, Anim. Reprod.,Allanheld, Osmum Co., Montchair, N.J.
- Sharma, R.K. and A. Agarwal. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6), 835-850.
- Sheweita, S.A., A.M. Tilmisany and H. Al-Sawaf. (2005). Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr. Drug. Metab*, 6(5),495-501.



- Sikka, S.C., M. Rajasekaran and W.J. Hellstrom. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl*, 16(6), 464-468.
- Sikka, S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem*, 8(7), 851-862.
- Sikka, S.C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl*, 25(1), 5-18.
- Silva, P.F. and B.M. Gadella. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978.
- Soylu, M.K., Z. Nur, B. Ustuner, I. Dogan, H. Sagirkaya, U. Gunay and A.K. Kemal. (2007). Effect of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, 241-246.
- Squires, E.L., S.L. Keith and J.K. Graham. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 1056-1065.
- Storey, B.T., E.E. Noiles and K.A. Thompson. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37, 46-58.
- Surai, P.E. and G.J. Wishart. (1996). Poultry artificial insemination technology in the countries in vivo and USSR. *World's Poult. Sci. J*, 52, 227-243.
- Sztejn, J.M., K. Noble, J.S. Farley and L.E. Mobraaten. (2001). Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 41, 28-39.
- Tajima, A., E.F. Graham and D.M. Hawkins. (1989). Estimation of the relative fertilizing ability of frozen chicken spermatozoa during a heterospermic competition method. *J. Reprod. Fertil*, 85, 1-5.
- Tardif, S., J.P. Laforest, N. Cormier and J.L. Bailey. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52, 447-459.
- Thurston, R.J. and R.A. Hess. (1987). Ultrastructural of spermatozoa from domesticated birds: Comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. *Scanning Microsc*, 1, 1829-1838.
- Thurston, R.J. (1995). Storage of poultry semen above freezing for twenty-four to forty-eight hours. In: Baskst MR and Wishart GJ (eds). *Proceeding of the 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL. p.107-122.



- Thuwanut, P. (2007). *The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of post-thaw epididymal cat spermatozoa [Master thesis of Science]*. Uppsala Swedish: Veterinary Medicine and Animal Science, Uppsala Swedish University.
- Tonieto, R.A., K.L. Goularte, G.D.A., R.S. Gastal Schiavon, J.C. Deschamps and T. Lucia Jr. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small. Rumin. Res*, 93, 206-209.
- Triwulanningsih, E., P. Situmorang, T. Sugiarti, R.G. Sianturi and D.A. Kusumaningrum. (2008). The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. *Indonesian J. Agric*, 1(1), 64-69.
- Tselutin, K., F. Seigneurin and E. Blesbosis. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci*, 78, 586-590.
- Tuncer, P.B., T. Umut, B. Serhat, O. Taner, C. Erdem, H. Erol, F.N. Aydin and I.S. Gurcan. (2013). Effect of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. *Small. Rumin. Res*, 113, 383-389.
- Uysal, O., M.N. Bucak, I. Yavas and O. Varish. (2007). Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J. Anim. Vet. Adv*, 6(12), 1362-1366.
- Uysal, O., and M.N. Bucak. (2009). The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. *Ankara. Univ. Vet. FakDerg*, 56, 99-103.
- Van Voorst, A. and F.R. Leenstra. (1995). Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poult. Sci*, 74, 136-140.
- Vongpralub T., A. Utha, J. Pongpeng, P. Sonseeda and W. Yindee. (2011). *A comparison of simple vapour method and programmable freezer on motility and fertility of frozen Thai native chicken semen*. The 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries (SAADC2011); p.649-652.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Developm*, 7, 871-891.
- Watson, P.F., J.M. Plummer, P.S. Jones and J.C. Bredl. (1995). Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Developm*, 41, 513-520.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci*, 60-61, 481-492.
- Wen, J.C. (2006). The Role of Vitamin E in the Treatment of Male Infertility. *Nutrition Bytes*, 11(1), 1-6.



- Westh, P. and Ramlv, H. (1991). Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool*, 258, 303-311.
- Woelders, H., A. Matthij and B. Engel. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35, 93-105.
- Yamashiro, H., K. Narita, S. Sugimura, Y.J. Han, A. Sugawara, K. Morohaku, F. Nakazato, T. Konno, M. Yoshida and E. Sato. (2007). Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). *Anim. Reprod. Sci*, 102, 165-171.
- Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoy and T. Tekeli. (2000). Influence of suger supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54, 579-585.
- Zambelli, D. and M. Cunto. (2006). Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 66(2), 159-165.



ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล	นางสาวพัชรา ธนานุรักษ์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ. 2532
จังหวัด และประเทศที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย อำเภอโคกสำโรง จังหวัดลพบุรี
พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย อำเภอโคกสำโรง จังหวัดลพบุรี
พ.ศ. 2554	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2558	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	บ้านเลขที่ 13/2 หมู่ที่ 2 ตำบลโพชนไก่ อำเภอบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรี 16130
ทุนวิจัย และทุนการศึกษา	ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการพัฒนาบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

