วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง และลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะพันธุ์บอร์

Supplementation of antioxidants to enhance quality of frozen semen and alleviate lipid peroxidation of Boer goat

ฟารีดา สุวอ[1]*, สมร พรชื่นชูวงศ์[1], สรศักดิ์ ทองแพะ[2], อนนท์ เทืองสันเทียะ[3], จีรภา ขาวสุข[3] และ ศักดิ์สุดา แสงแก้ว[4]

Fareeda Suwor[1]*, Samorn Ponchunchoovong[1], Sorasak Thongpea[2], Anone Thuangsanthia[3], Jeerapha Khawsuk[3] and Saksuda Saengkaew[4]

[1] *สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000*
[1] *School of Animal Technology and Innovation, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000*
[2] *สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000*
[2] *Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000*
[3] *ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30130*
[3] *Embryo Transfer Technology Research and Development Center, Nakhon Ratchasima 30130*
[4] *สถานีทดสอบสมรรถภาพและฝึกสัตว์พ่อพันธุ์ผสมเทียมสระบุรี อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี 18260*
[4] *Saraburi performance test and training artificial insemination sire station, Saraburi 18260*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ กลูตาไธโอน (1, 3, และ 5 mM) ซิสตีอีน (6, 9, และ 12 mM) และ วิตามินอี (1, 2, และ 3 mM) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ แบบแช่แข็ง นำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วย Tris-based extender จากนั้น เติมสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีสูตรทางการค้า (Andromed) เป็นกลุ่มควบคุม ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 6 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ นำน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว หลังจากเก็บเป็นเวลา 10 วัน นำน้ำเชื้อไปประเมินคุณภาพ ผลการศึกษา พบว่า เมื่อใช้กลูตาไธโอน 1 mM สามารถเพิ่มความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ได้ดีกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ ที่ทำการศึกษา ($P<0.05$) นอกจากนี้ พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน หรือ วิตามินอี 1 mM สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.01 และ 2.96 นาโนโมล/มล.ตามลำดับ และมีค่าไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.91 นาโนโมล/มล. ($P>0.05$) อีกทั้งการเสริม กลูตาไธโอน 1 mM ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เมื่อเทียบกับสูตรทางการค้า ($P>0.05$) เมื่อนำไปทดสอบการผสมเทียม พบว่า กลูตาไธโอน 1 mM มีอัตราการผสมติด เท่ากับ 6/9 (66.67%) ซึ่งสูตรทางการค้า มีค่าเท่ากับ 3/8 (37.50%) ดังนั้น การเสริมกลูตาไธโอน 1 mM น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง นำไปสู่การเพิ่มผลผลิตแพะในอนาคต

คำสำคัญ: การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง; สารต้านอนุมูลอิสระ; ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน; ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน; แพะบอร์

ABSTRACT: This research aimed to investigate the effects of different concentrations of antioxidants glutathione **(GSH)**, cysteine, and vitamin E) on the cryopreservation of Boer goat sperm. The sperm was diluted with a tris-based extender and different concentrations of each antioxidant with respective concentrations (1, 3 and 5 mM for

* Corresponding author: fareedasuwor@kkumail.com

Received: date; March 29, 2024 Revised: date; September 4, 2024

Accepted: date; September 24, 2024 Published: date; February 13, 2025

GSH), (6, 9 and 12 mM for cysteine) and (1, 2 and 3 mM for vitamin E) were supplemented. Extender with no antioxidant supplementation was also tested, and Andromed was used as control. A completely randomized design (CRD) with six replications was examined for each semen parameter. Straws were frozen in liquid nitrogen vapor. After storage for ten days, the frozen straws were thawed and evaluated for sperm quality. The results showed that the addition of 1 mM GSH in tris-based semen extenders yielded higher membrane integrity and acrosome integrity compared to the other treatments ($P<0.05$). Furthermore, adding 1 mM GSH or 1 mM vitamin E to the buck semen extender decreased the lipid peroxidation of the frozen semen (3.01 and 2.96 nmol/mL, respectively). These showed significantly better results than the other treatment groups at $P<0.05$ but did not show a significant difference to Andromed ($P>0.05$). Nevertheless, supplementation with 1 mM GSH did not show a significant difference in DNA methylation compared to that of Andromed ($P>0.05$) and yielded a fertilization rate of 66.67% (n=6/9) compared to Andromed 37.50% (n=3/8). Thus, this study suggests that 1 mM of GSH can be considered a suitable alternative antioxidant for semen cryopreservation of Boer goat, which can increase goat production in the future.

Keywords: sperm cryopreservation; antioxidant; lipid peroxidation; DNA methylation; Boer goat

บทนำ

ในช่วงปีที่ผ่านมาประเทศไทย มีจำนวนแพะและคนประกอบอาชีพเลี้ยงแพะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับทุกปี ในปี 2560 มีจำนวนแพะประมาณ 650,000 ตัว และในปี 2566 มีจำนวนแพะประมาณ 1,568,000 ตัว ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 2.4 เท่า (นวรัตน์, 2566) แพะจึงจัดได้ว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจตัวใหม่ที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงมากขึ้น โดยแพะพันธุ์บอร์เลือดร้อย มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว ให้เปอร์เซ็นต์ซากและเปอร์เซ็นต์เนื้อแดงสูง นอกจากนี้ยังมีความทนทานต่อโรค และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตอากาศร้อนได้ดี (Naing et al., 2010) จึงนิยมนำแพะพันธุ์บอร์มาผสมข้ามพันธุ์เพื่อผลิตเป็นแพะเนื้อลูกผสม (Anothaisinthawee et al., 2010) แต่การขยายการผลิตยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากแพะส่วนหนึ่งมีการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยในระหว่างปี 2563-2565 มีการนำเข้าแพะ จำนวน 2,936 ตัว ส่วนใหญ่มาจากประเทศแอฟริกาใต้ สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย (คมสัน และ อินทุอร, 2566) ส่งผลให้มีราคาสูง เกษตรกรส่วนใหญ่จึงอาศัยการปรับปรุงพันธุ์แพะ โดยใช้เทคนิคการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากแพะพันธุ์ดี เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต ปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์แพะให้ดีขึ้น แทนการใช้พ่อพันธุ์ที่มีมูลค่าสูง (Zuidema et al., 2021) สามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดจากการผสมพันธุ์ เช่น โรคบลูเซลโลซิส (Lone et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมโดยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งยังพบปัญหาการผสมติดต่ำ เนื่องมาจากขาดการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพ

จากการตรวจสอบเอกสารการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งนั้น ส่วนใหญ่นิยมใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นสารเจือจางและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในแพะทุกพันธุ์ (พันธุ์เนื้อ พันธุ์นม และพันธุ์กึ่งนมกึ่งเนื้อ) ซึ่งพบปัญหาการผสมติดต่ำประมาณ 32-41% (Nordstoga et al., 2011; Liang et al., 2022) สมร และคณะ (2563; 2564) ทำการศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อ และสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิของแพะโดยใช้เทคนิค Synchrotron-FTIR spectroscopy (SR-FTIR) และเปอร์เซ็นต์การผสมติด โดยใช้สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้ อยู่ในช่วง 321$\pm$1.83 - 371$\pm$1.00 mOsm/kg พบว่า ในการเลือกใช้สารเจือจาง เพื่อรักษาสมดุลของ seminal fluid ควรพิจารณาทั้งปริมาณและส่วนประกอบของไอออน เช่น Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเชื้อแพะในแต่ละพันธุ์ เพื่อป้องกันการเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยวหรือเซลล์บวมจากแรงดันออสโมติก (สมร และคณะ, 2563) โดยในแพะบอร์ พบว่า ค่าออสโมลาลิตี้ของสารเจือจางที่มีค่าเท่ากับ 321$\pm$1.83 mOsm/kg มีเปอร์เซ็นต์ของ α-helix สูงกว่าเมื่อเทียบกับสูตรทางการค้า ($p<0.05$ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ α-helix ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ capacitation ของเซลล์อสุจิ ที่มีส่วนช่วยในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ และในการศึกษาของ Paul et al. (2019) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแกะพันธุ์ Patanwadi พบว่า การใช้สารเจือจาง soy lecithin-tris-fructose (SLTF) ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ 360 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อ (375.45$\pm$6.44 mOsm/kg) สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูง (390 และ 450 mOsm/kg) เนื่องจาก สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูง น้ำภายในเซลล์เกิดการออสโมซิสออกจากเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เหี่ยว ทำให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และกระบวนการเมทาบอลิซึมลดลง สำหรับงานวิจัยที่ผ่านมา การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะที่เปรียบเทียบการใช้

สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้ในกลุ่มต่างๆ (iso-osmolality, hypo- osmolality และ hyper-osmolality) ยังมีการศึกษาน้อยมาก มีเพียงรายงานการใช้สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่แตกต่างกันออกไปในแพะแต่ละพันธุ์ เช่น แพะพันธุ์ซาร์ดา (Sarda) ใช้สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้เท่ากับ 385 mOsm/kg (Chelucci et al., 2015), พันธุ์บาลาดิ (Baladi) 300 mOsm/kg (Hassan et al., 2021), พันธุ์ซาแนน (Saanen) 370 mOsm/kg (Zhao et al., 2023), พันธุ์มาฮาบาดิ (Mahabadi) 420 mOsm/kg (Salmani et al., 2014) เป็นต้น

นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น เซลล์อสุจิอาจถูกทำลายเนื่องจากภาวะเครียดของเซลล์ ซึ่งได้แก่ ภาวะเครียดที่เกิดจากออสโมติก (osmotic stress) การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นต้น (Shafiei et al., 2015) ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการปฏิสนธิลดลง และลดความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ Gangwar et al. (2015) รายงานว่า เซลล์อสุจิแพะมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในปริมาณสูง จึงมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ทำให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การทำงานของเซลล์บกพร่อง สูญเสียความสามารถในการรักษาสภาวะสมดุลของปริมาตรและเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ มีผลต่อโมเลกุลของโปรตีน เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เปลี่ยนการทำหน้าที่ของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับโปรตีนภายในเซลล์ ต่อโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนลำดับเบสของดีเอ็นเอ หรือสายดีเอ็นเอแตกหัก และเกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ได้ (Ozer et al., 2018; Frau et al., 2020) การเปลี่ยนแปลงทางเอพิเจเนติกส์ (epigenetics) อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ซึ่งสามารถวัดได้จากการเปลี่ยนของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ของอสุจิ มีการรายงานพบว่า ความผิดปกติในเซลล์อสุจิมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดต่ำ (Capra et al., 2019) การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง ประกอบกับความไม่สมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้อัตราการมีชีวิต การเคลื่อนที่ การผสมติดลดลงและยับยั้งการเจริญของบลาสโตซิสต์ (Simon et al., 2017; Souza et al., 2019; Al-Mutary et al., 2020) โดยปรกติในเซมินอลพลาสมาของเซลล์อสุจิมีส่วนประกอบสารต้านอนุมูลอิสระทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์ และไม่ใช่เอนไซม์ (กลุ่มของกรดอะมิโน และวิตามิน) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ จะลดลงในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Frau et al., 2020) ดังนั้น ในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการศึกษาการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสูตรน้ำเชื้อ เช่น superoxide dismutase **(SOD)**, catalase **(CAT)** glutathione **(GSH),** cysteine, vitamin E และ vitamin C เป็นต้น GSH เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เป็นสารประกอบกลุ่ม tripeptide ซึ่งประกอบด้วย glutamic acid, cysteine และ glycine และสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ glutathione peroxidase **(GPx)** ในการเปลี่ยน hydrogen peroxides **(H_2O_2)** ให้กลายเป็นน้ำ มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์อสุจิจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Abdullah et al., 2021; Zou et al., 2021) การศึกษาของ Zou et al. (2021) พบว่า ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Guanzhong เมื่อเสริม GSH 2 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และการผสมติดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม GSH ($P<0.05$) และการศึกษาของ Gadea et al. (2013) พบว่าการเสริม GSH 5 mM สามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Murciano-Granadina ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การศึกษาของ Das et al. (2021) พบว่า การเสริม SOD (100 และ 150 IU/mL), GSH (1 และ 2 mM) และ CAT (200 และ 400 IU/mL) ในน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Black Bengal ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) cysteine เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มกรดอะมิโน ประกอบด้วยกลุ่ม thiol ที่มีคุณสมบัติในการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Adekunle et al., 2022) ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์ GSH ภายในเซลล์ ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ โดยปกป้องโครงสร้างของโปรตีน ไขมัน บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และป้องกันการแตกหักของ ดีเอ็นเอ (Atessahin et al., 2008) มีรายงานการศึกษาของ Adekunle et al. (2022) พบว่า การเสริม cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 8 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซมเพิ่มขึ้น และระดับของ malondialdehyde **(MDA)** ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการศึกษาของ Anghel et al. (2010) ใช้ cysteine 10 mM ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต การเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Alpine ($P<0.05$) นอกจากนี้ vitamin E เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมัน ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระกลุ่ม superoxide,

peroxyl และ hydroxyl (Anghel et al., 2010) จึงสามารถปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ จากการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ (Merati and Farshad, 2021) การศึกษาของ Goswami et al. (2021) พบว่า การเสริม vitamin E 2 mM สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของแพะพันธุ์ Sirohi และพันธุ์ Beetal ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และ Sarangi et al. (2017) พบว่า การเสริม vitamin E 3 mM สามารถลดระดับการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เพิ่มระดับของเอนไซม์ GPx และ SOD ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Beetal จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์แพะ ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง ตลอดจนศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

แพะพ่อพันธุ์บอร์ จำนวน 2 ตัว อายุประมาณ 2-3 ปี มีระดับคะแนนร่างกาย 3.0 น้ำหนักอยู่ในช่วง 60-70 กก. เลี้ยงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการเลี้ยงแบบแยกคอกเป็นรายตัว ให้อยู่ในสภาพแวดล้อม กินอาหารแบบเดียวกัน คือ อาหารข้นผสมสำเร็จรูปที่มีปริมาณโปรตีน 18% อาหารหยาบ (ข้าวโพดหมัก) โดยให้อาหาร 2.5% ของน้ำหนักตัว และให้กินน้ำแบบเต็มที่ ทำการถ่ายพยาธิ ฉีดยาบำรุงให้กับพ่อพันธุ์แพะทุกตัว โดยงานวิจัยนี้มีการขออนุญาตใช้สัตว์ดังหมายเลขคำขอคือ U1-02632-2559

การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์

ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ที่ระดับ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mM, cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 6, 9 และ 12 mM และ vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 3 mM โดยทำการศึกษา 6 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 70% ขึ้นไป ตรวจวัดความเข้มข้น จำนวนอสุจิ/มล. ด้วยเครื่อง photometer (SDM 1, Minitab International AG, Germany) น้ำเชื้อที่นำมาศึกษาต้องมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,100–6,500 ล้านตัว/มล. นำน้ำเชื้อแพะแต่ละตัวมาผสมรวมกัน เนื่องด้วย น้ำเชื้อที่รีดได้ในบางครั้งมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอกับจำนวนทรีตเมนต์ที่ทำการศึกษา อีกทั้งการรวมน้ำเชื้อยังช่วยให้น้ำเชื้อที่นำมาศึกษามีความสม่ำเสมอกันในแต่ละทรีตเมนต์ จากนั้นทำการเติม tris-base extender ที่มีการดัดแปลงส่วนประกอบ ให้มีค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อแพะบอร์ ตามวิธีการศึกษาของ Memon et al. (2011) ซึ่งประกอบด้วย tris (250 mM), citric acid (88.5 mM), fructose (69.38 mM), lincospecs (300 µL) มีค่าออสโมลาลิตี้ เท่ากับ 321$\pm$1.83 mOsm/kg และค่า pH เท่ากับ 6.08 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อแพะบอร์ซึ่ง มีค่าออสโมลาลิตี้ เท่ากับ 321$\pm$4.42 mOsm/kg และค่า pH เท่ากับ 6.18 ทำการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และมีการเติมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (18% egg yolk + 8% glycerol) ซึ่งเป็นสารที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต ที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ผ่านมาของ สมร และคณะ (2564) โดยให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 150 ล้านตัว/มล. และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อไปบรรจุในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มล. นำไปทำการลดอุณหภูมิ ด้วยวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว โดยวางห่างจากผิวไนโตรเจน 5 เซนติเมตร (อุณหภูมิ -120 °C) เป็นเวลา 13 นาที ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

จากรายงานที่ผ่านมาของ Mazur (1984) และ Gao and Critser (2000) พบว่า ระยะเวลาการเก็บส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (-196 °C) แต่คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็ง เช่น สารเจือจาง สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง และอัตราการลดอุณหภูมิ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เซลล์อาจมีผลกระทบมาจากรังสีชนิดก่อไอออนในไนโตรเจนเหลวได้ แต่เกิดได้น้อยมาก (Woods et al., 2016) ดังนั้นในการศึกษานี้ ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ประสิทธิภาพในการลดปฏิกิริยาลิพิด

เปอร์ออกซิเดชัน โดยวัดจากปริมาณของ MDA ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย อัตราการผสมติด และการเปลี่ยนของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์อสุจิ

การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ

ตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิ ด้วยเครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ computer assisted semen analysis (CASA) (HTT-CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)

ประเมินอัตราการมีชีวิต โดยใช้เทคนิคการย้อมสี eosin และ nigrosin ตามวิธีการศึกษาของ Salmani et al. (2014)

การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการประเมินการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ประเมินโดยการบ่มเซลล์อสุจิด้วยสาร propidium iodide (PI), hoechst 33342 (H342), fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) และ 5,5', 6,6'-tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) โดยมีวิธีการเตรียมสาร ตามการศึกษาของ Celeghini et al. (2007) และเตรียมตัวอย่างตามการศึกษาของ Nguyen et al. (2019) จากนั้นประเมินความสมบูรณ์เซลล์อสุจิ อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon/Ni-E, Japan) ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า นับเซลล์อสุจิจำนวน 200 เซลล์/ตัวอย่าง โดยพบการติดสีของอสุจิบริเวณอะโครโซม เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ เยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีน้ำเงินหรือแดง บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีน้ำเงิน และบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียติดสีแดงอมส้ม ในส่วนของเซลล์อสุจิที่ไม่สมบูรณ์ หรือถูกทำลาย จะมีส่วนของเยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีเขียว บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีแดง และไมโทคอนเดรียที่ติดสีเขียว ดังแสดงใน **Figure 1**

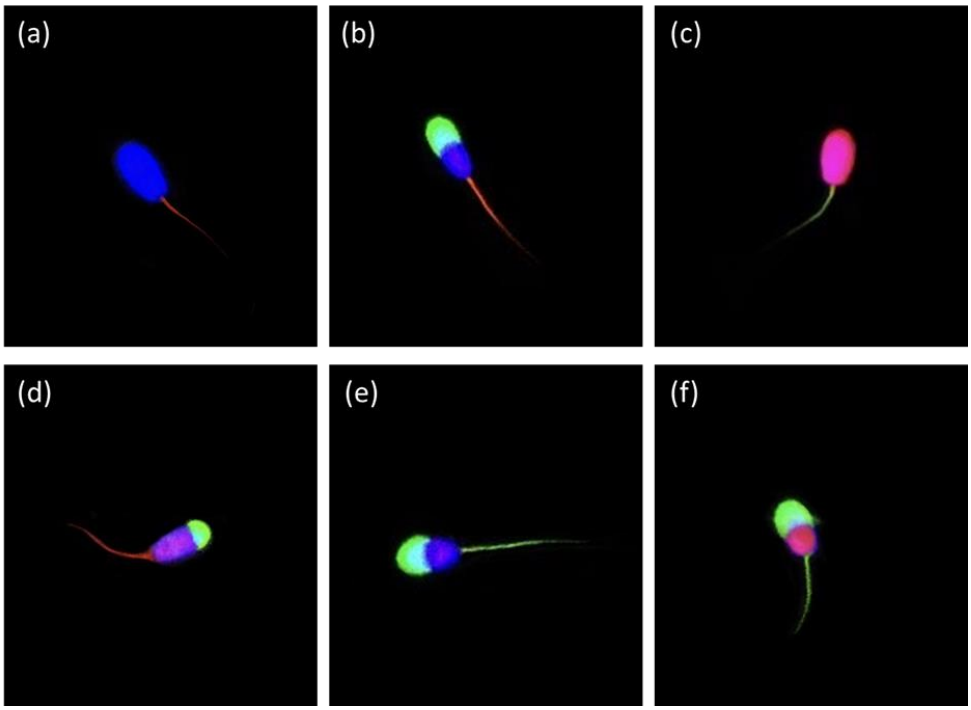


Figure 1 Goat spermatozoa were stained with spermatozoa were stained with the fluorescent combination of H324, PI, FITC-PSA, and JC-1. They were examined under a confocal laser scanning microscope (40X). There are signs of high levels of mitochondrial activity in the intact plasma membrane and the acrosome membrane (a), an intact plasma membrane, a damaged acrosome membrane, and high mitochondrial activity (b), low mitochondrial activity, damage to the plasma membrane, and an intact acrosome membrane (c), and an intact plasma membrane which was damaged an acrosome membrane and high levels of mitochondrial activity (d), and an intact plasma membrane, a damaged acrosome membrane, and reduced mitochondrial activity (e). There are impairments to the acrosome and plasma membranes and a weak mitochondrial function in goat spermatozoa (f).

การประเมินระดับการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยประเมินจากปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substant (TBARS) โดยมีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงตามวิธีการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) และนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง multiskan go with thermo scientific skanIt software (Thermo fisher sciencetific, N.Y.R. limited partnership, Bangkok, Thailand) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การประเมินผลของ GSH ต่อการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

เพื่อเป็นการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะบอร์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรียสูง และมีปริมาณการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่ำ ซึ่งได้แก่ GSH มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเอพิเจเนติกส์ ที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งของแพะ โดยใช้ชุดสกัดและวิธีการตามคู่มือของ tissue genomic DNA extraction kit (favorgen biotech corp, Ping-Tung, Taiwan) จากนั้นทำการตรวจสอบความเข้มข้น gDNA ที่สกัดได้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยใช้เครื่อง nano drop 2000c UV-vis spectrophotometer (thermo scientific, Wilmington, USA) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 260/280 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ควรอยู่ในช่วง 1.6-1.8 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Santella, 2006) และทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยการใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis

จากนั้น วิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยการใช้ชุด global DNA methylation assay kit (5 methyl cytosine, colorimetric, abcam) และวิเคราะห์ปริมาณด้วยการวัดสี โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงใน microplate spectrophotometer ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นแปรผันตามความเข้มของ optical density **(OD)** ที่วัดได้ ประเมินการเปลี่ยนของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เกิดขึ้นโดยการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ 5 methyl cytosine **(5-mC)** โดยใช้สูตร ดังนี้ 5–mC (%) = [(sample OD - negative control OD) / slope x S] x 100 โดย S คือปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างในแต่ละทรีตเมนต์ที่เติมลงในหลุมมีหน่วยเป็นนาโนกรัม (ในการศึกษานี้ใช้ 100 นาโนกรัม)

การประเมินอัตราการผสมติด

ประเมินอัตราการผสมติด โดยคัดเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีจากพารามิเตอร์ต่างๆ ไปทดสอบอัตราการผสมติด เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า โดยใช้แพะเนื้อเพศเมียพันธุ์บอร์ อายุ 11 เดือน ระดับคะแนนร่างกาย 2.5-3.0 เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ให้หญ้าสดเป็นแหล่งอาหารหยาบ และน้ำสะอาดให้กินอย่างเต็มที่ ใช้แม่แพะทั้งหมด 17 ตัว จากฟาร์มแพะของเกษตรกร บ้านหนองกราด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ใช้วิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ ด้วยวิธีการสอด CIDR เข้าไปภายในช่องคลอด เป็นระยะเวลา 13 วัน และฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน prostaglandin F2: PGF2$\propto$ (Estrumate) 0.5 มล.ต่อตัว และ pregnant mare serum gonadotrophin: PMSG (Folligon) 200 IU ต่อตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ สังเกตการเป็นสัดและทำการผสมเทียมแพะโดยกำหนดเวลา ทำการผสมเทียม 2 ครั้ง โดยผสมเทียมครั้งแรกที่ 36 ชั่วโมง หลังจากถอดฮอร์โมน และผสมเทียมครั้งที่ 2 ที่ 56 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน ในช่วงเดือน ธันวาคม 2566 – มกราคม 2567

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ GSH (1, 3, และ 5 mM) cysteine (6, 9, และ 12 mM) และ vitamin E (1, 2, และ 3 mM) เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ และใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) จำนวน 6 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และปริมาณ MDA ไป transformed โดยใช้ Box-Cox นำข้อมูลไปทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ The proc univariate และ Shapiro-wilk tests จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริมต้านอนุมูลอิสระกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริมต้านอนุมูลอิสระกับสูตรทางการค้า โดยใช้ orthogonal contrasts กำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

ผลการศึกษา

การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

จากการศึกษาการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง พบว่า การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (63.50$\pm$0.56%) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (41.15$\pm$1.02%) สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ต่ำกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รวม และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ 69.40$\pm$0.49% และ 43.53$\pm$0.28% ตามลำดับ ดังแสดงใน **Table 1** นอกจากนี้ การใช้ GSH 1 mM และ vitamin E 1 mM สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิต (65.50$\pm$0.92%, 65.00$\pm$0.37%) ความสมบูรณ์อะโครโซม (62.00$\pm$0.37%, 61.00$\pm$0.58%) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ (70.50$\pm$0.56%, 71.50$\pm$0.43%) และกิจกรรมของไมโทคอนเดรีย (63.50$\pm$0.43%, 62.50$\pm$0.22%) อีกทั้งสามารถลดระดับของ

MDA (3.01 นาโนโมล/มล. และ 2.96 นาโนโมล/มล.) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงใน **Table 1** และ **Table 2** เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์แบบ orthogonal contrasts พบว่า การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง (ค่าอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ กิจกรรมของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลง) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม (P<0.05) ดังแสดงใน **Table 1** และ **Table 2** และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกับสูตรทางการค้า พบว่า กลุ่มที่เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถเพิ่มความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ (P<0.05) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการทำงานของไมโทคอนเดรีย (P<0.05) ดังแสดงใน **Table 1** และ **Table 2**

การศึกษาผลของ GSH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 1, 3 และ 5 mM ต่อการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน พบว่าการเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของ 5-mC มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ (P<0.05) แต่มีค่าไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงใน **Figure 2**

Table 1 The total motility, progressive motility and viability of frozen–thawed semen of Boer goat in tris-based extender supplemented with different concentrations of antioxidants (glutathione, cysteine, and vitamin E) and combinations of egg yolk (18%) and glycerol (8%) (means ± SE)

Antioxidant	Concentration (mM)	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
Glutathione	1.00	63.50±0.56^{b}	41.15±1.02^{b}	65.50±0.92^{ab}
	3.00	55.85±0.78^{d}	34.50±0.78^{d}	56.00±0.37^{d}
	5.00	52.10±0.77^{e}	31.70±0.82^{e}	53.50±0.67^{e}
Cysteine	6.00	60.50±0.56^{c}	38.50±0.56^{c}	62.00±0.82^{c}
	9.00	57.50±0.76^{d}	37.57±0.43^{c}	56.00±0.37^{d}
	12.00	48.50±1.16^{f}	28.38±0.65^{f}	50.50±0.43^{f}
Vitamin E	1.00	61.05±1.02^{c}	38.52±0.44^{c}	65.00±0.37^{b}
	2.00	56.50±0.43^{d}	35.05±0.68^{d}	60.50±0.56^{c}
	3.00	52.50±1.12^{e}	30.77±0.46^{e}	56.50±0.43^{d}
No antioxidant		52.60±0.24^{e}	31.18±0.97^{e}	53.50±0.22^{e}
Andromed		69.40±0.49^{a}	43.53±0.28^{a}	67.00±0.58^{a}
Orthogonal contrasts				
1		<0.01	<0.01	<0.01
2		<0.01	<0.01	<0.01

$^{a-f}$ In each column, values denoted by different letters indicate a significant difference at P<0.05. Orthogonal contrasts 1 = antioxidant supplementation (glutathione, cysteine, vitamin E) vs no antioxidant supplementation, contrasts 2 = antioxidant supplementation (glutathione, cysteine, vitamin E) vs Andromed.

Table 2 Frozen–thawed Boer goat sperm quality in tris-based extender supplemented with different concentrations of antioxidants (glutathione, cysteine, and vitamin E) and combinations of egg yolk (18%) and glycerol (8%) (means ± SE)

Antioxidant	Concentration (mM)	Acrosome integrity (%)	Membrane integrity (%)	Mitochondrial activity (%)	MDA (nmol/mL)
Glutathione	1.00	62.00±0.37^{a}	70.50±0.56^{a}	63.50±0.43^{b}	3.01^{cd}
	3.00	54.00±0.26^{d}	65.00±0.26^{c}	53.50±0.56^{e}	3.52^{b}
	5.00	51.50±0.43^{e}	58.50±0.43^{e}	46.50±0.56^{f}	4.19^{a}
Cysteine	6.00	58.50±0.43^{b}	68.00±0.26^{b}	59.00±0.63^{c}	3.31^{bc}
	9.00	53.00±0.58^{d}	63.50±0.22^{d}	52.50±0.92^{e}	3.59^{b}
	12.00	45.50±0.56^{g}	54.50±0.56^{f}	43.00±0.26^{h}	4.16^{a}
Vitamin E	1.00	61.00±0.58^{a}	71.50±0.43^{a}	62.50±0.22^{b}	2.96^{cd}
	2.00	59.50±0.43^{b}	67.50±0.43^{b}	55.50±0.56^{d}	3.53^{b}
	3.00	53.50±0.56^{d}	58.00±0.37^{e}	52.00±0.45^{e}	4.05^{a}
No antioxidant		47.00±0.37^{f}	50.00±0.78^{g}	44.50±0.43^{g}	4.16^{a}
Andromed		57.00±0.63^{c}	53.50±0.56^{f}	65.50±0.40^{a}	2.91^{d}
Orthogonal contrasts					
1		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
2		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

$^{a-h}$ In each column, values denoted by different letters indicate a significant difference at P<0.05. Orthogonal contrasts 1 = antioxidant supplementation (glutathione, cysteine, vitamin E) vs no antioxidant supplementation, contrasts 2 = antioxidant supplementation (glutathione, cysteine, vitamin E) vs Andromed.

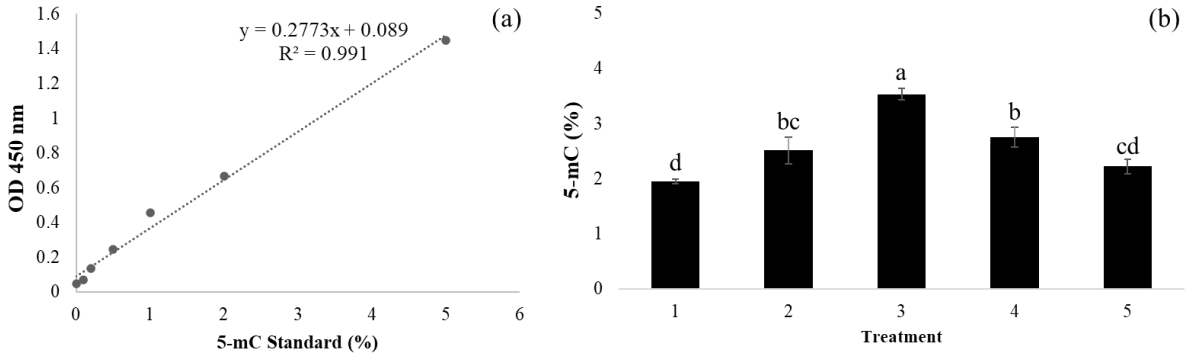


Figure 2 Standard curve for measuring 5-mC (a), 5-mC amount representing spermatozoa DNA methylation in various concentrations of GSH (b) Note: T1, T2, T3: GSH 1, 3, 5 mM; T4: no antioxidant; T5: Andromed Superscripts with different letters indicate significant differences at P<0.05.

นำทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุด (GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM) ไปทดสอบอัตราการผสมติด เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า (Andromed) โดยใช้เทคนิคการผสมเทียม พบว่า GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM มีอัตราการผสมติด เท่ากับ 66.67% (n=6/9) ซึ่งไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า ที่มีอัตราการผสมติดเท่ากับ 37.50% (n=3/8)

วิจารณ์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง และการผสมเทียมถูกนำมาใช้สำหรับเทคโนโลยีการเจริญพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โครงสร้างของเซลล์อสุจิอาจถูกทำลายเนื่องจากการเลือกใช้ชนิด ส่วนประกอบของสารเจือจาง และปริมาณที่ไม่เหมาะสมซึ่งส่งผลต่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันออสโมติก เช่น หากใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูง (hyper-osmolality) จะเกิดภาวะเซลล์เหี่ยว หรือหากใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำ (hypo-osmolality) จะทำให้เซลล์บวม เป็นต้น นอกจากนี้ ต้องคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย (สาร cryoprotectant) ให้เหมาะสมเพื่อช่วยควบคุมปริมาณและป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และคำนึงถึงอัตราการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็งให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) คือภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเกินกว่าที่เซลล์จะทำลายได้หมด ส่งผลให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม ไมโทคอนเดรีย ถูกทำลาย ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล เช่น เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงของเอพิเจเนติกส์ การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่กล่าวมาข้างต้น ส่งผลทำให้เซลล์อสุจิมี การเคลื่อนที่ การมีชีวิต การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติดลดลง (Yong et al., 2016; Ugur et al., 2019; Frau et al., 2020) นอกจากนี้ พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของแพะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในปริมาณสูง มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนปกติ (Asadpour et al., 2011; Azimi et al., 2020)

จากการศึกษาในครั้งนี้ใช้สารเจือจาง tris-based ร่วมกับ glycerol (8%) และ egg yolk (18%) ร่วมกับการเสริมสาร GSH ที่ความเข้มข้น 1 mM พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็งได้ โดยมีความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การใช้สารเจือจางที่มีค่าออสโมลาลิตี้เท่ากับ 321$\pm$1.83 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อแพะบอร์ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ เท่ากับ 321$\pm$4.42 mOsm/kg สามารถรักษาความดันออสโมติกภายในเซลล์อสุจิ และการใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งร่วมกันระหว่าง glycerol (8%) ที่เป็นสารป้องกันการแช่แข็งแบบซึมผ่านเซลล์ ป้องกันการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ และ egg yolk (18%) ที่เป็นสารป้องกันการแช่แข็งแบบไม่ซึมผ่านเซลล์ เป็นแหล่งของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein; LDL) และมีฟอสโฟลิพิดชนิด phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS) และ sphingomyelin (SM) (Zhao et al., 2023) ซึ่งช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และไมโทคอนเดรีย ไม่ให้ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง เนื่องจากความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซม มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ sperm capacitation และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ โดยเมื่อเสริมสาร GSH ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่น ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (reactive oxygen species; **ROS**) และไนโตรเจน (reactive nitrogen species; RNS) โดย GSH จะถูกออกซิไดซ์เป็น oxidized glutathione (GSSG) จะถูกเปลี่ยนให้กลับมาอยู่ในรูป GSH อีกครั้ง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glutathione reductase ร่วมกับ NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) และพร้อมที่จะจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GPx ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ และเปลี่ยน lipid peroxide (lipid-OOH) ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ (Lushchak, 2012) ทำให้การเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันลดลง และลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์หลักในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณอะโครโซม ซึ่งทำหน้าที่บรรจุ

เอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ (Gadella and Luna, 2014) นอกจากนี้ปริมาณของ H_2O_2 ที่ลดลงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะโครซินที่บรรจุอยู่ในอะโครโซมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้บริเวณอะโครโซมมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Lin et al., 2023)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การใช้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เช่น vitamin E, cysteine, GSH, SOD และ CAT เสริมลงในสารละลายเจือจาง ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายได้ (Sarangi et al., 2017; Das et al., 2021; Adekunle et al., 2022) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ พบว่า การใช้ GSH ที่ความเข้มข้นสูง (3 และ 5 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง และมีปริมาณการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ GSH 1 mM ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GSH ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้ความดันออสโมติกของเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลเสียต่อโครงสร้างของเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อแพะ โค และสุกร (Tuncer et al., 2010; Estrada et al., 2017; Zou et al., 2021) ซึ่งรายงานว่า การใช้ความเข้มข้นของ GSH ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้ อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังจากละลายลดลง อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สูตรทางการค้า มีอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และกิจกรรมของไมโทคอนเดรียสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ($P<0.05$) แต่มีค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ต่ำกว่ากลุ่มของทรีตเมนต์ที่ทำการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก อัตราการเคลื่อนที่สูงแสดงถึงประสิทธิภาพในการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ แต่อย่างไรก็ตาม ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อาจถูกทำลายเนื่องจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยอะโครโซมที่สมบูรณ์บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Paoli et al. (2011) รายงานว่า อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิขึ้นอยู่กับการทำงานของไมโทคอนเดรีย และการศึกษาของ Kommisrud et al. (2002) พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่ระยะเวลา 6, 30 และ 54 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ ($P>0.05$) แต่ทำให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงในช่วงระยะเวลาการเก็บที่ 6, 30, 54, 72 และ 102 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การเสริม vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก vitamin E เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ดีในไขมัน มีบทบาทสำคัญในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking antioxidant) โดยการปลดปล่อยอะตอมของไฮโรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เพื่อที่จะหยุดหรือลดการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) พบว่า การเสริม vitamin E 1 mM ร่วมกับกรดอะมิโน 10 mM ลงในสารเจือจาง tris based ร่วมกับ glycerol (5%) และ egg yolk (5%) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น อีกทั้งสามารถลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ ที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Anghel et al. (2010) พบว่า การเสริม vitamin E (1 mM) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Alpine สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม การใช้ vitamin E ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (2 และ 3 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย) ในแพะพันธุ์บอร์ลดลง ($P<0.05$) อีกทั้งมีปริมาณของ MDA เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ vitamin E ที่สูงขึ้น ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันมากกว่าการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Dewry et al., 2015; Prastiya et al., 2021) อีกทั้งทำให้ความสามารถในการจับอนุมูล peroxyl ลดลง ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (Cao and Cutler, 1993; Cerolini et al., 2006; Hu et al., 2011) ซึ่ง Benhenia et al. (2018) รายงานว่า vitamin E ความเข้มข้นสูง (4 และ 6 mM) ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P<0.05$)

ในทำนองเดียวกัน การเสริม cysteine ที่ความเข้มข้น 6 mM และ 9 mM ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย) สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ ($P<0.05$) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก cysteine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

GSH โดย GSH ที่ผลิตจาก cysteine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GPx และช่วยกำจัด H_2O_2 ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่ทำความเสียหายต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ จากการศึกษาของ Anghel et al. (2010) พบว่า การเสริม cysteine 10 mM ในน้ำเชื้อแพะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($P<0.05$) และการศึกษาของ Adekunle et al. (2022) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแคระพันธุ์ West African พบว่า เมื่อเสริม cysteine 8 mM ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต และกระบวนการ sperm capacitation เพิ่มสูงขึ้น และสามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเสริม cysteine ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 12 mM พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ ซึ่งส่งผลเสียต่อเซลล์ทำให้อัตราเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง และปริมาณความเข้มข้นของ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Memon et al. (2011) พบว่า การเสริม cysteine ความเข้มข้นสูงส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลงในน้ำเชื้อแพะและน้ำเชื้อปลา (Da Costa et al., 2020)

กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับเอพิเจเนติกส์ (Choudhuri et al., 2010) โดยการเปลี่ยนแปลงทางเอพิเจเนติกส์อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความผิดปกติของเซลล์อสุจิและทำให้อัตราการผสมติด อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Capra et al., 2019) และสามารถทำให้เกิดโรคเอพิเจเนติกส์ในรุ่นลูกหลานได้ ซึ่งในการศึกษานี้ ทำการประเมินดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากเปอร์เซ็นต์ 5-mC พบว่า ในแพะพันธุ์บอร์ เมื่อทำการเสริมสาร GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ส่งผลให้ปริมาณของดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 3 และ 5 mM ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันกับสูตรทางการค้า ($P>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น 3 และ 5 mM อาจจะทำให้การแสดงออกของยีนส์ผิดปกติ จึงเห็นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ transcriptomic เพื่อดูการแสดงออกของยีน (gene expression) จากการศึกษาของ Khosravizadeh et al. (2022) ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในน้ำเชื้อม้าซึ่ง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของ cytosine methylation ที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Aurich et al., 2016) และปริมาณการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ลดลง ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนส์เกิดขึ้นได้ตามปรกติ (Maeder et al., 2013)

สรุปและข้อเสอแนะ

การเสริมสาร GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การถูกทำลายของอะโครโซม เพิ่มเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะได้ และสามารถลดปริมาณการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ นำไปสู่การเพิ่มผลผลิตแพะพันธุ์บอร์ ด้วยวิธีการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งจะส่งผลดีต่อกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดสอบการผสมติดในฟาร์มแพะของเกษตรกร มีข้อจำกัดในจำนวนแม่พันธุ์ที่มีความพร้อม (17 ตัว) ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มจำนวนแม่พันธุ์ในการทดสอบอัตราการผสมติด

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สัญญาเลขที่ FF3-303-65-36-78 (17) และขอขอบคุณการให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

คมสัน รุ่งเรือง และอินทุอร ธีรานุวัฒน์. 2567. การวิเคราะห์ความเสี่ยงเชิงคุณภาพในการนำเข้าโรคบลูทังก์จากการนำโค กระบือ แพะ และแกะเข้ามาในราชอาณาจักรผ่านทางท่าอากาศยานสุวรรณภูมิระหว่างปี พ.ศ. 2563-2565. สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งข้อมูล:

https://dcontrol.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu/2018-08-31-02-35-00/8887-2563-2565. ค้นเมื่อ 23 กรกฎาคม 2567.

นวรัตน์ บุญทองเนียม. 2566. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และปศุสัตว์. ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งข้อมูล: https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/413-report-thailand-livestock/reportservey2566. ค้นเมื่อ 23 กรกฎาคม 2567.

สมร พรชื่นชูวงศ์, ปราโมทย์ แพงคำ, ธารา วงศ์ดี และสรศักดิ์ ทองแพะ. 2563. การวิจัยและพัฒนาด้านน้ำเชื้อแช่แข็ง และการผสมเทียมแพะเพื่อสนับสนุนเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. สนับสนุนโดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.

สมร พรชื่นชูวงศ์, ปราโมทย์ แพงคำ, ธารา วงศ์ดี และสรศักดิ์ ทองแพะ. 2564. การวิจัยและพัฒนาด้านน้ำเชื้อแช่แข็ง และการผสมเทียมแพะเพื่อสนับสนุนเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. สนับสนุนโดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.

Abdullah, F., M. N. Khan Nor-Ashikin, R. Agarwal, Y. S. Kamsani, M. A. Malek, N. S. Bakar, A. A. Mohammad Kamal, M. S. Sarbandi, N. S. Abdul Rahman, and N. H. Musa. 2021. Glutathione (GSH) improves sperm quality and testicular morphology in streptozotocin-induced diabetic mice. Asian Journal of Andrology. 23: 281–287.

Adekunle, E. O., O. A. Iyanda, B. C. Majekodunmi, O. A. Akosile, S. T. Ojo, A. J. Odeyemi, M. Logunleko, O. A. Oderinwale, T. A. Sorongbe, and J. O. Daramola. 2022. Preservative effects of cysteine on sperm viability of West African dwarf goat bucks chilled at 4°C. Nigerian Journal of Animal Production. 49: 49-59.

Al-Mutary, M. G., M. Q. Al-Ghadi, A. A. Ammari, A. R. Al-Himadi, A. H. Al-Jolimeed, M. W. Arafah, R. A. Amran, M. S. Aleissa, and A. A. Swelum. 2020. Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. Theriogenology. 152: 139–146.

Anghel, A., S. Zamfirescu, C. Dragomir, D. Nadolu, S. Elena, and B. Florica. 2010. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. Romanian Biotechnological Letters. 15: 26-32.

Anothaisinthawee, S., K. Nomura, T. Oishi, and T. Amano. 2010. Goat genetic resources and breeding strategies in Thailand. The Journal of Animal Genetics. 38: 41–48.

Asadpour, R., R. Jafari, and H. Tayefi-Nasrabadi. 2011. Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. Veterinary Research Forum. 2: 218-221.

Atessahin, A., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, and M. Kizil. 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Ruminant Research. 77: 38-44.

Aurich, C., B. Schreiner, N. Ille, M. Alvarenga, and D. Scarlet. 2016. Cytosine methylation of sperm DNA in horse semen after cryopreservation. Theriogenology. 86: 1347–1352.

Azimi, G., A. Farshad, A. Farzinpour, J. Rostamzadeh, and M. Sharafi. 2020. Evaluation of used Purslane extracts in tris extenders on cryopreserved goat sperm. Cryobiology. 94: 40-48.

Benhenia, K., H. Rahab, M. A. Smadi, H. Benmakhlouf, A. Lamara, T. Idres, and M. Iguer-Ouada. 2018. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. Animal Reproduction Science. 195: 266–273.

Cao, G., and R. G. Cutler. 1993. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. Archives of Gerontology and Geriatrics. 17: 189–201.

Capra, E., B. Lazzari, F. Turri, P. Cremonesi, A. M. R. Portela, P. Ajmone-Marsan, A. Stella, and F. Pizzi. 2019. Epigenetic analysis of high and low motile sperm populations reveals methylation variation in satellite regions within the pericentromeric position and in genes functionally related to sperm DNA organization and maintenance in Bos taurus. BMC Genomics. 20: 1-12.

Celeghini, E. C. C., R. P. de Arruda, A. F. C. de Andrade, J. Nascimento, and C. F. Raphael. 2007. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Reproduction in Domestic Animals. 42: 479-488.

Cerolini, S., L. Zaniboni, A. Maldjian, and T. Gliozzi. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and α-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology. 66: 877–886.

Chelucci, S., V. Pasciu, S. Succu, D. Addis, G. G. Leoni, M. E. Manca, S. Naitana, and F. Berlinguer. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. Theriogenology. 83: 1064–1074.

Choudhuri, S., Y. Cui, and C. D. Klaassen. 2010. Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. Toxicology and Applied Pharmacology. 245: 378–393.

Da Costa, B. B., L. S. Marques, P. G. Lassen, R. B. Rodrigues, H. T. R. Silva, J. C. F. Moreira, and D. P. Streit. 2019. Effects of cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. Aquaculture Research. 51: 455–464.

Das, S., P. R. Nandi, P. Sarkar, K. C. Tudu, S. Rai, R. Behera, A. Mandal, M. Mondal, and M. Karunakaran. 2021. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase supplementation on cryopreservation of Black Bengal buck semen. Tropical Animal Health and Production. 53: 1-7.

Dewry, R. K., B. C. Deka, D. Bhuyan, R. K. Biswas, S. Sinha, Z. Hussain, A. Das, P. Borah, and S. B. Hazarika. 2015. Effect of vitamin E on the quality of frozen buck semen. The Indian Journal of Small Ruminants. 21: 343-346.

Estrada, E., J. E. Rodriguez-Gil, M. M. Rivera Del Alamo, A. Pena, and M. Yeste. 2017. Effects of reduced glutathione on acrosin activity in frozen-thawed boar spermatozoa. Reproduction Fertility and Development. 29: 283–293.

Frau, P. P., A. J. Soler, M. Iniesta-Cuerda, A. Martín-Maestro, I. Sánchez-Ajofrín, D. A. Medina-Chávez, M. R. Fernández-Santos, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, V. Montoro, and J. J. Garde. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. International Journal of Molecular Sciences. 21: 1-22.

Gadea, J., D. Gumbao, B. Gomez-Gimenez, and J. Carlos-Gardon. 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. Reproductive Biology. 13: 24-33.

Gadella, B. M., and C. Luna. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. Theriogenology. 81: 74–84.

Gangwar, C., S. D. Kharche, R. Ranjan, S. Kumar, A. K. Goel, S. K. Jindal, and S. K. Agarwal. 2015. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. Small Ruminant Research. 129: 104-107.

Gao, D., and J. K. Critser. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. Institute for Laboratory Animal Research Journal. 41: 187-196.

Goswami, M. K., S. Sinha, B. C. Deka, M. Bhuyan, and R. K. Biswas. 2021. Effect of addition of vitamin E and caffeine on quality of frozen goat semen. The Pharma Innovation Journal. 10: 1-4.

Hassan, S. A., W. A. Khalil, M. A. E. Hassan, A. I. Yousif, O. M. Sabry, M. Wink, and M. Sobeh. 2021. Antioxidant and antiapoptotic effects of a *Turraea fischeri* leaf extract on cryopreserved goat sperm. Animals. 11: 1-13.

Hu, J. H., X. L. Zhao, W. Q. Tian, L. S. Zan, and Q. W. Li. 2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. Animal. 5: 107–112.

Khosravizadeh, Z., K. Khodamoradi, Z. Rashidi, M. Jahromi, E. Shiri, E. Salehi, and A. Talebi. 2022. Sperm cryopreservation and DNA methylation: possible implications for ART success and the health of offspring. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 39: 1815–1824.

Kommisrud, E., H. Paulenz, E. Sehested, and I. S. Grevle. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. Acta Veterinaria Scandinavica. 43: 49–55.

Liang, J., A. Larbi, C. Lv, S. Ali, G. Wu, and G. Quan. 2022. Fertility results after exocervical insemination using goat semen cryopreserved with extenders based on egg yolk, skim milk, or soybean lecithin. Reproduction in Domestic Animals. 58: 431-442.

Lin, M., P. Ling, Q. He, D. Chen, L. Zheng, L. Tang, and S. W. Jiang. 2023. Low acrosin activity is associated with decreased Spam1/acrosin expression and GSH deficiency-caused premature acrosome release of human sperm cells. Cell and Tissue Research. 394: 529–545.

Lone, S. A., T. K. Mohanty, M. Bhakat, R. K. Baithalu, and R. Kumar. 2017. Effect of dilution on cryosurvival of low sperm doses: A review. Cryo Letters. 38: 471–476.

Lushchak, V. I. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. Journal of Amino Acids. 2012: 1-26.

Maeder, M. L., J. F. Angstman, M. E. Richardson, S. J. Linder, V. M. Cascio, S. Q. Tsai, Q. H. Ho, J. D. Sander, D. Reyon, B. E. Bernstein, J. F. Costello, M. F. Wilkinson, and J. K. Joung. 2013. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. Nature Biotechnology. 31: 1137–1142.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology. 247: 125-142.

Memon, A. A., H. Wahid, Y. Rosnina, Y. M. Goh, M. Ebrahimi, F. M. Nadia, and G. Audrey. 2011. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in tris egg yolk extender. Animal Reproduction Science. 129: 44-49.

Merati, Z., and A. Farshad. 2021. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. Cryobiology. 100: 151-157.

Naing, S. W., H. Wahid, K. M. Azam, Y. Rosnina, A. B. Zuki, S. Kazhal, M. M. Bukar, M. Thein, T. Kyaw, and M. M. San. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. Animal Reproduction Science. 122: 23–28.

Nguyen, V. V., S. Ponchunchoovong, S. Kupittayanant, and P. Kupittayanant. 2019. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. Veterinary Medicine and Science. 5: 345-360.

Nordstoga, A. B., L. Soderquist, T. Adnoy, and H. Paulenz. 2011. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. Reproduction in Domestic Animals. 46: 82-86.

Ozer Kaya, S., S. Gur, and E. Kaya. 2018. Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen. Andrologia. 50: 1-5.

Paoli, D., M. Gallo, F. Rizzo, E. Baldi, S. Francavilla, A. Lenzi, F. Lombardo, and L. Gandini. 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. Fertility and Sterility. 95: 2315–2319.

Paul, R. K., K. Balaganur, D. Kumar, and R. Singh. 2019. Mimicking the cauda epididymal plasma-like osmolality in extender improves liquid preservation of ram semen at 3–5°C. Systems Biology in Reproductive Medicine. 65: 474–482.

Prastiya, R. A., M. M. Munir, and A. P. Nugroho. 2021. The protective impacts of **α**-tocopherol supplementation on the semen quality of Sapera goat preserved at 4°C. Tropical Animal Science Journal. 44: 261-266.

Salmani, H., A. Towhidi, M. Zhandi, M. Bahreini, and M. Sharafi. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk-based diluents for cryopreservation of goat semen. Cryobiology. 68: 276-280.

Santella, R. M. 2006. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. 15: 1585–1587.

Sarangi, A., P. Singh, M. Virmani, A. S. Yadav, S. Sahu, H. M. Ajithakumar, A. Kumari, and A. P. Rath. 2017. Effect of antioxidants supplementation on the quality of Beetal buck semen stored at 4°C. Veterinary World. 10: 1184-1188.

Shafiei, M., M. Forouzanfar, S. M. Hosseini, and M. H. Esfahani. 2015. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of post thawed goat semen. Theriogenology. 83: 1321-1327.

Simon, L., B. R. Emery, and D. T. Carrell. 2017. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. 44: 38–56.

Souza, C. V., F. Z. Brandão, J. D. R. Santos, V. A. P. Alfradique, V. Santos, M. Morais, P. S. C. Rangel, A. A. D. Silva, and J. M. G. Souza-Fabjan. 2019. Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. Cryobiology. 89: 104–108.

Tuncer, P. B., M. N. Bucak, S. Buyukleblebici, S. Sariozkan, D. Yeni, A. Eken, P. P. Akalın, H. Kinet, F. Avdatek, A. F. Fidan, and M. Gundogan. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology. 61: 303–307.

Ugur, M. R., A. S. Abdelrahman, H. C. Evans, A. A. Gilmore, M. Hitit, R. I. Arifiantini, B. Purwantara, A. Kaya, and E. Memili. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. Frontiers in Veterinary Science. 6: 1-15.

Woods, E. J., S. Thirumala, S. S. Badhe-Buchanan, D. Clarke, and A. J. Mathew. 2016. Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. Cytotherapy. 18: 697-711.

Yong, K. W., J. R. Choi, and W. K. Z. Wan Safwani. 2016. Biobanking of human mesenchymal stem cells: Future strategy to facilitate clinical applications. Advances in Experimental Medicine and Biology. 951: 99-110.

Zhao, F., R. Li, Y. Liu, and H. Chen. 2023. Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. Frontiers in Nutrition. 9: 1-8.

Zhao, J., P. Meng, M. Jin, X. Ma, H. Ma, H. Yang, Y. Chen, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Luo, and J. Liu. 2023. Combined addition of l-carnitine and l-proline improves cryopreservation of dairy goat semen. Animal Reproduction Science. 257: 1-11.

Zou, J., L. Wei, D. Li, Y. Zhang, G. Wang, L. Zhang, P. Cao, S. Yang, and G. Li. 2021. Effect of glutathione on sperm quality in Guanzhong dairy goat sperm during cryopreservation. Frontiers in Veterinary Science. 8: 1-6.

Zuidema, D., K. Kerns, and P. Sutovsky. 2021. An exploration of current and perspective semen analysis and sperm selection for livestock artificial insemination. Animals. 11: article ID 3563.