

การเปรียบเทียบการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-Egg Yolk) กับสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า
(Andromed[®]) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะต่อคุณภาพตัวอสุจิด้วยเครื่อง CASA
Comparison of Semen Diluted Basis (Tris-Egg Yolk) with Diluted Commercial Semen
(Andromed[®]) in Frozen Goat Semen on Sperm Quality by CASA

วาสนา สมประสงค์^{1*}, จตุพร ป้องกัน¹ และ สุกัญญา ลีทองดี¹
Wassana Somprasong^{1*}, Jaturaporn Ponggun¹, and Sukanya Leethongdee¹

บทคัดย่อ

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะมีขั้นตอนการเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ยุ่งยาก รวมถึงมีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ทำให้คุณภาพของตัวอสุจิลดลง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) กับสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า (Andromed[®]) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะต่อคุณภาพตัวอสุจิด้วยเครื่อง CASA หลังละลายที่ 0, 1 และ 3 ชั่วโมง โดยใช้แพะพันธุ์บอร์ จำนวน 1 ตัว รีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีการใช้ช่องคลอดเทียม เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองชนิดแล้วเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) กับสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ โดยการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ค่า VAP, VSL, VCL, ALH, BCF (HZ), STR (%), และ LIN (%) ที่ 0 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ 1 ชั่วโมง พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed[®] มีการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ $87.20 \pm 2.71\%$ และ $46.98 \pm 6.03\%$ สารเจือจางน้ำเชื้อ Tris-egg yolk เท่ากับ $68.55 \pm 11.5\%$ และ $34.20 \pm 4.42\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) และที่ 3 ชั่วโมง พบว่า Andromed[®] มีการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ $73.45 \pm 3.04\%$ และ $31.58 \pm 6.63\%$ ส่วน Tris-egg yolk เท่ากับ $10.43 \pm 1.63\%$ และ $1.37 \pm 0.06\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ 1 และ 3 ชั่วโมง ค่า VAP, VSL, VCL, ALH, และ STR ของตัวอสุจิที่ผ่านการเจือจางด้วย Andromed[®] สูงกว่า Tris-egg yolk จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า (Andromed[®]) ช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดี ช่วยลดขั้นตอนในการเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อและยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในฟาร์มหรือหน่วยงานต่างๆ ได้

คำสำคัญ: สารเจือจางน้ำเชื้อ น้ำเชื้อแช่แข็ง คุณภาพน้ำเชื้อ แพะ

Abstract

The process of producing frozen goat semen involves a preparation of semen diluents, which is complicated. Since it involves a rapid temperature reduction, the quality of the sperm deteriorates. This study aimed to determine the comparison of semen diluted basis (Tris-egg yolk) with diluted commercial semen (Andromed[®]) in frozen goat semen on sperm quality by Computer aided sperm analysis (CASA) after thawing at 0, 1 and 3h. by using 1 Goat (Boer) semen. The semen was collected by means of an artificial vagina diluted with both types of semen diluent. Then the semen was preserved by a freezing method. The results showed that the preliminary assessment of fresh semen quality was good and suitable for use in frozen semen production. Additionally, it was found that frozen goat semen diluted basis (Tris-egg yolk) and diluted commercial semen (Andromed[®]) had no significant difference in motility, progressive motility, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF (HZ), STR (%) and LIN (%) at 0h. However, at 1h, the motility and the progressive motility of Andromed[®] were $87.20 \pm 2.71\%$ and $46.98 \pm 6.03\%$, while those of Tris-egg yolk were $68.55 \pm 11.5\%$ and $34.20 \pm 4.42\%$ respectively which these values were significantly different ($P < 0.05$). At 3h, the motility and the progressive motility of Andromed[®] were $73.45 \pm 3.04\%$ and $31.58 \pm 6.63\%$, while those of Tris-egg yolk were $10.43 \pm 1.63\%$ and $1.37 \pm 0.06\%$ respectively which these values were significantly different ($P < 0.01$). In addition, at 1 and 3h, the VAP, VSL, VCL, ALH, and STR values of Andromed[®] diluted sperm were higher than those of Tris-egg yolk. From

¹ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44000

¹ Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44000, Thailand.

* Corresponding author. wassana.s@msu.ac.th

this study, it was found that commercial semen diluent (Andromed[®]) helps to maintain the quality of frozen goat semen and reduce the steps of semen diluent preparation. It can also be applied in farms or agencies.

Keywords: semen diluted, frozen semen, sperm quality, goat

คำนำ

ปัจจุบันการผสมเทียมได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการผลิตปศุสัตว์ของไทยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์กรรมและผลผลิต เพื่อให้สัตว์มีพันธุ์กรรมที่ดี จำนวนเพิ่มมากขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว (Majarune et al., 2013) การผสมเทียมนิยมผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งมีขนาดเล็ก สะดวกต่อการขนส่งและเก็บรักษา สามารถนำไปใช้ผสมเทียมได้ทุกหนแห่ง นอกจากนี้เกษตรกรยังสามารถเลือกพ่อพันธุ์ได้ตามที่ต้องการโดยไม่ต้องจำกัดพ่อพันธุ์เพียงตัวใดตัวหนึ่งเหมือนที่ผ่านมา (Bureau of Biotechnology in Livestock Production, 2017)

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะให้มีคุณภาพที่ดี ทนทานต่อเชื้อโรค ให้ผลผลิตที่ดี และเป็นที่ต้องการของเกษตรกรไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด เหตุผลเหล่านี้เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมาก และยิ่งอีกอย่างที่สำคัญ คือ กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีขั้นตอนการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวสุจิ เยื่อหุ้มตัวสุจิ และอะโครโซมอย่างมาก เพราะตัวสุจิจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเย็นจนทำให้เกิด cold shock ขึ้นได้ ดังนั้นจึงต้องมีการใช้สาร cryoprotectants เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายนี้ ซึ่งสาร cryoprotectants ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การใช้ไข่แดงร่วมกับกลีเซอรอล เพราะไข่แดงจะมีเลซิธินที่ช่วยป้องกันความเสียหายต่อเยื่อเซลล์ของตัวสุจิและอะโครโซม แต่ต้องเติมในปริมาณที่เหมาะสม (Foote, 1970) ซึ่งในน้ำเชื้อแพะจะแตกต่างจากน้ำเชื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ คือ ในน้ำเลี้ยงอสุจิที่ขับออกมาจะมีส่วนผสมของ BUS (Bulbourethral gland secretion) เรียกว่า egg yolk coagulating enzyme หรือ phospholipase A (Iritani & Nishikawa, 1972) เมื่อทำปฏิกิริยาทางเคมีกับไข่แดงในสารเจือจางน้ำเชื้อแล้วจะก่อให้เกิดสารพิษต่อตัวสุจิ ทำให้ตัวสุจิเสียหายหรือตายได้ ดังนั้นในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจึงต้องมีการพัฒนาสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อขึ้นมาเรื่อยๆ เช่น สูตรที่รวมกับไข่แดง (Tris-egg yolk) สูตรน้ำนม (milk diluents) และสูตรอื่นๆ อีกมากมาย (Salamon & Maxwell, 2000) ถึงแม้ว่าสูตรต่าง ๆ เหล่านี้จะได้ผลดี แต่ก็ยังพบปัญหาในการเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อ เพราะมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก หลายขั้นตอน ใช้เวลานาน และยังคงคำนึงถึงปริมาณไข่แดงที่เติมในสารเจือจางน้ำเชื้ออีกด้วย ซึ่งถ้ามีมากเกินไป 30% ก็จะมีผลต่อการอยู่รอดของตัวสุจิหลังการแช่แข็ง (Pongpeng et al., 2008) รวมไปถึงความเสียหายของตัวสุจิจากขั้นตอนการปั่นล้างเซมินอลพลาสมา ซึ่งขั้นตอนนี้จะส่งผลทำให้ตัวสุจิมีความบอบช้ำอย่างมาก ดังนั้นจึงมีผู้คิดค้นวิธีการผลิต การเก็บรักษา รวมถึงสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้ามากมาย เพื่อเพิ่มทางเลือกที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ เช่น สารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า Andromed[®] ซึ่งสารเจือจางชนิดนี้สามารถป้องกันความเสียหายของตัวสุจิจากความเย็นได้ดี ไม่มีส่วนผสมของเลซิธินจากไข่แดงแต่จะใช้เป็นเลซิธินจากถั่วเหลืองแทน เพื่อช่วยลดการเกิดพิษต่อตัวสุจิ (Rastegarnia et al., 2014) นอกจากนี้ Andromed[®] ยังมีขั้นตอนการเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อที่สั้น รวดเร็ว สะดวกต่อการใช้งาน และยังลดการบอบช้ำของตัวสุจิจากขั้นตอนการปั่นล้างเซมินอลพลาสมาได้อีกด้วย

การผลิตและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแพะให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย แต่สารเจือจางน้ำเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ต้องพิจารณา โดยสารเจือจางน้ำเชื้อที่เลือกใช้นั้นต้องสามารถรักษาคณภาพน้ำเชื้อให้คงสภาพเดิมมากที่สุด ทั้งในช่วงของการแช่เย็น การลดอุณหภูมิ จนกระทั่งแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่จะนำไปผสมเทียมต้องมีคุณภาพดี มีตัวสุจิที่แข็งแรง มีสัดส่วนของตัวสุจิมีชีวิตและความสามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูง ตัวสุจิยังคงความสมบูรณ์ทั้งรูปร่างไม่ผิดปกติและให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากการผสมจริง (Thongtip & Pattanawong, 2015) การพัฒนาเทคนิคในการเก็บรักษาคณภาพน้ำเชื้อแพะเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ดังกล่าวจึงถูกริเริ่มและปรับปรุงให้ดีขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบันได้เริ่มมีการใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์คณภาพน้ำเชื้อตรวจคณภาพน้ำเชื้อ (Computer aided sperm analysis; CASA) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถตรวจวิเคราะห์คณภาพน้ำเชื้อได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ ดังนั้นถ้าหากมีวิธีการผสมเทียมที่สะดวกควบคู่กับน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่มีคุณภาพดี ก็จะช่วยทำให้งานผสมเทียมแพะมีประสิทธิภาพมากขึ้น มีแพะสายพันธุ์ที่ดีเกิดขึ้นมากมาย และยังสามารถบ่อนแพะเข้าสู่ตลาดได้อย่างรวดเร็ว

จากสาเหตุที่ได้กล่าวไปข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) กับสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า (Andromed[®]) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะต่อคณภาพตัวสุจิด้วยเครื่องคาซ่า (CASA) หลังละลายที่ 0, 1 และ 3 ชั่วโมง

วิธีการศึกษา

น้ำเชื้อทดลอง

ใช้น้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (Boer) อายุ 2-3 ปี น้ำหนัก 50-70 กก. จำนวน 1 ตัว โดยรีดเก็บน้ำเชื้อเดือนละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 รอบ ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน น้ำเชื้อสดที่รีดได้ต้องมีคุณภาพที่ดี ได้มาตรฐาน มีปริมาณอยู่ระหว่าง 1-2 มล./ครั้ง มีการเคลื่อนไหวไม่ต่ำกว่า ++ หรือ 30% และมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 70% ขึ้นไป (Settergren, 1934) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ปฏิบัติตามกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องกับการใช้สัตว์เพื่องานวิทยาศาสตร์

การเจือจางและการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ

นำน้ำเชื้อสดที่รีดได้ในแต่ละครั้ง แบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน คือ

ส่วนที่ 1 เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรพื้นฐาน (Tris-egg yolk) ที่มีไข่แดงเป็นส่วนผสมอยู่ 25% ซึ่งน้ำเชื้อในส่วนนี้จะต้องนำไปปั่นแยกน้ำเลี้ยงอสุจิและตัวอสุจิออกจากกันก่อน โดยนำน้ำเชื้อที่รีดได้ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มล. ทำการเติม diluter non glycerol ให้ครบ 10 มล. แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกจนเหลือเฉพาะส่วนสีขาวขุ่นด้านล่าง ซึ่งเป็นส่วนของตัวอสุจิ แล้วจึงเติมสารเจือจางน้ำเชื้อลงไปตามปริมาณที่ต้องการ

ส่วนที่ 2 เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรทางการค้า (Andromed®) ซึ่งสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรนี้มีขั้นตอนการเตรียมสารละลายที่ง่ายและรวดเร็ว โดยการนำเอา Andromed® กับ DI-Water ที่ 35 °C มาผสมกันในอัตราส่วน 2:10 เมื่อผสมสารละลายเข้ากันดีแล้ว ก็นำมาเติมลงในน้ำเชื้อส่วนที่ 2 จนกว่าจะครบตามปริมาณที่ต้องการ

หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อแพะที่ผ่านการเจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 2 สูตร บรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอสุจิ 20-30x10⁶/มล. แล้วนำไปลดอุณหภูมิที่ 4 °C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาแช่แข็งด้วยกล่องโฟม ที่บรรจุไนโตรเจนเหลว โดยวางบนแท่นเรียงเหนือระดับไนโตรเจนเหลว 4 ซม. ที่อุณหภูมิ -120 °C นาน 14 นาที แล้วจึงเก็บรักษา น้ำเชื้อไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำออกมาตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องคาซ่า

การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

นำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งแพะมาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำเข้าตรวจประเมินโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อด้วยคอมพิวเตอร์ (Computer assisted sperm analysis; CASA) ด้วยโปรแกรม HT CASA : CEROS III version 1.11 ทันที (0 ชั่วโมง) และเก็บน้ำเชื้อที่เหลือไว้ใน Water bath ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจซ้ำอีกครั้ง ตามลำดับ โดยใช้ตัวชี้วัดต่าง ๆ ดังนี้ 1) อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดของตัวอสุจิ (motility) 2) อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบตรงไปข้างหน้า (progressive motility) 3) ความเร็วเฉลี่ยในการเดินทางของตัวอสุจิแบบราบเรียบ (path velocity; VAP) 4) ความเร็วเฉลี่ยในการเดินทางของตัวอสุจิที่วัดได้จากเส้นทางตรงจากจุดเริ่มต้นไปจนถึงจุดสิ้นสุด (straight-line velocity; VSL) 5) ความเร็วเฉลี่ยที่วัดได้จากการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (curvilinear velocity; VCL) 6) ความกว้างเฉลี่ยของส่วนหัวอสุจิที่แกว่งขณะที่มีการเคลื่อนที่ (lateral head displacement; ALH) 7) ความถี่เฉลี่ยในการขยับหัวของอสุจิระหว่างเส้นทางในทิศทางใดทิศทางหนึ่ง (beat cross frequency; BCF) 8) ค่าเฉลี่ยอัตราความเร็วของตัวอสุจิที่วัดได้จากความเร็วเฉลี่ยเป็นเส้นตรงหารด้วยความเร็วเฉลี่ยที่วัดได้จากการเดินทางของตัวอสุจิแบบราบเรียบ (straightness; STR) และ 9) ความเร็วเฉลี่ยที่วัดได้จากการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิหารด้วยความเร็วเฉลี่ยที่วัดได้จากการเดินทางของตัวอสุจิแบบราบเรียบ (linearity; LIN)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติสำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อสดเบื้องต้นของแพะที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ พบว่า น้ำเชื้อมีลักษณะเป็นสีครีม ปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ยอยู่ที่ 1.00 ± 0.09 มล./ครั้ง มีความหนาแน่น (D-4D) เท่ากับ 3D (คล้ายน้ำมัน) มีความหนืด (C-5C) เท่ากับ 4C (คล้ายนม) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย เท่ากับ 6.46 ± 0.28 ความเข้มข้น $11,235 \pm 1,141.29 \times 10^6$ /มล. มีการเคลื่อนไหวหุ้ม +++ หรือ $56.5 \pm 0.15\%$ และมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ $75.02 \pm 0.84\%$ ซึ่งน้ำเชื้อสดที่รีดได้นั้นมีลักษณะที่ดี อยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เพราะน้ำเชื้อมีปริมาตรอยู่ระหว่าง 1-2 มล./ครั้ง มีการเคลื่อนไหวหุ้มไม่น้อยกว่า ++ หรือ 30% และมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 70% ขึ้นไป (Settergren, 1934) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 The result of macroscopic and microscopic quality of fresh semen.

Parameter	Fresh semen quality
Macroscopic	
Volume (ml)	1.00 ± 0.09
Color	Cream
Density (D-4D)	Milky opalescent
Consistency (C-5C)	Milky
pH	6.46 ± 0.28
Microscopic	
Concentration (10^6 /ml)	$11,235 \pm 1,141.29$
Mass movement (%)	56.5 ± 0.15
Motility (%)	75.02 ± 0.84

±SD; Standard Deviation.

ผลของการเปรียบเทียบการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) กับสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า (Andromed®) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะต่อคุณภาพตัวอสุจิด้วยเครื่องแช่แข็งละลายที่ 0, 1 และ 3 ชั่วโมง พบว่า น้ำเชื้อแพะแช่แข็งที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองสูตรมีการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ (um/s) ได้แก่ VAP, VSL, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่ ALH, BCF (HZ), STR (%), LIN (%) หลังละลายที่ 0 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่หลังจากละลายอุ่นไว้ใน Water bath อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed® มีการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ $87.20 \pm 2.71\%$ และ $46.98 \pm 6.03\%$ สารเจือจางน้ำเชื้อ Tris-egg yolk เท่ากับ $68.55 \pm 11.5\%$ และ $34.20 \pm 4.42\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากละลายน้ำเชื้ออุ่นไว้ 3 ชั่วโมง พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed® มีการเคลื่อนที่ $73.45 \pm 3.04\%$ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า $31.58 \pm 6.63\%$ ส่วนสารเจือจางน้ำเชื้อ Tris-egg yolk เท่ากับ $10.43 \pm 1.63\%$ และ $1.37 \pm 0.06\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ 1 ชั่วโมง ตัวอสุจิที่ผ่านการเจือจางด้วย Andromed® มีค่า VAP, VSL, VCL และ ALH (77.55 ± 15.64 , 62.16 ± 10.93 , 131.07 ± 23.72 และ 5.96 ± 0.79 ตามลำดับ) สูงกว่าตัวอสุจิที่ผ่านการเจือจางด้วย Tris-egg yolk ซึ่งมีค่าเท่ากับ 38.85 ± 8.75 , 33.17 ± 8.09 , 66.19 ± 12.13 และ 3.76 ± 0.46 ตามลำดับ ($P < 0.05$) และพบว่าที่ 3 ชั่วโมง ตัวอสุจิที่ผ่านการเจือจางด้วย Andromed® มีค่า VAP, VSL, VCL, ALH และ STR (53.82 ± 7.20 , 44.04 ± 6.03 , 89.22 ± 16.15 , 5.00 ± 0.87 และ 81.27 ± 6.67 ตามลำดับ) สูงกว่าตัวอสุจิที่ผ่านการเจือจางด้วย Tris-egg yolk ซึ่งมีค่าเท่ากับ 17.43 ± 8.38 , 11.09 ± 1.88 , 16.88 ± 0.15 , 1.71 ± 0.70 และ 61.57 ± 7.59 ตามลำดับ ($P < 0.01$) ดังแสดงใน Table 2

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า (Andromed®) มีขั้นตอนการเตรียมสารที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) และสารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed® ยังสามารถคงคุณภาพของน้ำเชื้อและตัวอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อได้ดี สามารถป้องกันไม่ให้อสุจิได้รับความเสียหายจากขั้นตอนการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานสูงให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vidal et al. (2013) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Rastegarnia et al. (2014) ที่รายงานไว้ว่าการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed® และ Bioxcell® ที่ระดับ 1% ส่งผลให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการเคลื่อนที่โดยรวม ค่า VAP และ LIN ในการละลายทันที (0 ชั่วโมง) ดีกว่ากลุ่มที่ละลายไว้นาน 4 ชั่วโมง และดีกว่ากลุ่มที่การเจือจางด้วย Tris-citrate

egg yolk ($P<0.05$) และพบว่าค่า VCL, VSL และ STR เมื่อทำการละลายทันที สารเจือจางน้ำเชื้อ Bioxcell[®] ดีกว่า Andromed[®] และ Tris-citrate egg yolk แต่เมื่อละลายทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง Andromed[®] และ Bioxcell[®] ดีกว่า Tris-citrate egg yolk อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Abdussamad et al. (2016) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบสารเจือจางน้ำเชื้อรูปแบบต่างๆ ในโค โดยเปรียบเทียบสารเจือจาง 3 สูตร ได้แก่ สูตรไข่แดงผสมกลีเซอรอล (Tris-egg yolk-glycerol) ที่ผลิตขึ้นเอง สูตรทางการค้า Triladyl[®] ที่มีส่วนประกอบจากไข่แดง และสูตร Andromed[®] ที่มีส่วนประกอบจากถั่วเหลือง จากการศึกษาพบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อสูตร Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิดีกว่าสูตร Triladyl[®] และสูตรไข่ผสมกลีเซอรอล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ($59\pm3\%$, $53\pm2\%$ และ $53\pm2\%$ ตามลำดับ) และสอดคล้องกับ Herold et al. (2002) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า 2 สูตร ได้แก่ สูตร Triladyl[™] กับสูตร Andromed[®] ต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิวัวโบฮอร์สที่โตเต็มวัย 6 ตัว พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ หลังทำการละลายทันที ดีกว่าสูตร Triladyl[™] ($18.3\pm9.8\%$ และ $8.3\pm6.1\%$ ตามลำดับ) ($P=0.07$) และสอดคล้องกับ Thammasiri et al. (2018) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า Andromed[®] กับสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ พบว่าสารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ของอสุจิดีกว่า Tris-egg yolk อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแพะเพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด สามารถลดขั้นตอนในการเตรียมสารละลาย และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ภายในฟาร์มของเกษตรกรและหน่วยงานต่าง ๆ ได้ เพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากที่สุด นอกจากนี้ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอัตราการตั้งท้องของแม่แพะที่ได้รับการผสมเทียมจากน้ำเชื้อแช่แข็งดังกล่าวนี้ยังทำให้การศึกษานี้สมบูรณ์มากขึ้น

Table 2 Effect of comparison of semen diluted basis (Tris-egg yolk) with diluted commercial semen (Andromed[®]) in frozen goat semen on sperm quality by CASA at 0,1 and 3 hours.

Parameters	0h		1h		3h	
	Tris-egg yolk	Andromed [®]	Tris-egg yolk	Andromed [®]	Tris-egg yolk	Andromed [®]
Total motility (%)	74.58 $\pm$ 15.10	81.18 $\pm$ 5.41	68.55 ^b $\pm$ 11.52	87.20 ^a $\pm$ 2.71	10.43 ^B $\pm$ 1.63	73.45 ^A $\pm$ 3.04
Progressive motility (%)	45.53 $\pm$ 12.54	48.67 $\pm$ 5.34	34.20 ^b $\pm$ 4.42	46.98 ^a $\pm$ 6.03	1.37 ^B $\pm$ 0.06	31.58 ^A $\pm$ 6.63
VAP (um/s)	74.95 $\pm$ 7.09	75.82 $\pm$ 5.63	38.85 ^b $\pm$ 8.75	77.55 ^a $\pm$ 15.64	17.43 ^B $\pm$ 8.38	53.82 ^A $\pm$ 7.20
VSL (um/s)	62.83 $\pm$ 8.14	58.25 $\pm$ 8.80	33.17 ^b $\pm$ 8.09	62.16 ^a $\pm$ 10.93	11.09 ^B $\pm$ 1.88	44.04 ^A $\pm$ 6.03
VCL (um/s)	122.94 $\pm$ 11.34	128.84 $\pm$ 4.56	66.19 ^b $\pm$ 12.13	131.07 ^a $\pm$ 23.72	16.88 ^B $\pm$ 0.15	89.22 ^A $\pm$ 16.15
ALH (μm)	5.85 $\pm$ 0.05	5.93 $\pm$ 1.06	3.76 ^b $\pm$ 0.46	5.96 ^a $\pm$ 0.79	1.71 ^B $\pm$ 0.70	5.00 ^A $\pm$ 0.87
BCF (HZ)	25.81 $\pm$ 4.38	27.19 $\pm$ 4.81	25.69 $\pm$ 2.71	27.23 $\pm$ 3.27	33.38 $\pm$ 12.27	28.32 $\pm$ 4.52
STR (%)	82.63 $\pm$ 4.28	81.41 $\pm$ 2.87	84.22 $\pm$ 1.54	79.99 $\pm$ 4.12	61.57 ^B $\pm$ 7.59	81.27 ^A $\pm$ 6.67
LIN (%)	51.48 $\pm$ 5.70	48.67 $\pm$ 3.20	49.83 $\pm$ 2.67	48.37 $\pm$ 2.66	48.33 $\pm$ 2.08	52.13 $\pm$ 12.49

^{a,b} Different letters in the same row indicate statistical differences ($p<0.05$).

^{A,B} Different letters in the same row indicate statistical differences ($p<0.01$).

$\pm$ SD; Standard Deviation.

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าคุณภาพน้ำเชื้อสดของแพะพันธุ์บอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีลักษณะที่ดี สามารถนำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ และน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อทางการค้า Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ (um/s) ได้แก่ VAP, VSL, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่ ALH, BCF (HZ), STR (%), LIN (%) หลังละลายที่ 0 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันกับสารเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน (Tris-egg yolk) แต่หลังจากละลาย ที่ 1 และ 3 ชั่วโมง สารเจือจางน้ำเชื้อ Andromed[®] มีการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ค่า VAP, VSL, VCL, ALH และ STR สูงกว่าสารเจือจางน้ำเชื้อ Tris-egg yolk

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564 และขอขอบคุณศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแพะมาตรฐานสต็อกโฮล์ม บ้านหัวเข้าแตก อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม ที่อนุเคราะห์สัตว์ทดลอง สถานที่ในการทดลอง และห้องปฏิบัติการในการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Abdussamad, A. M., Detterer, J., Gauly, M. & Holtz, W. (2016). Comparison of various semen extenders and addition of prostaglandin F_{2α} on pregnancy rate in cows. **Journal of Animal Science**. 10(4), 655-659.
- Bureau of Biotechnology in Livestock Production. (2017). **Frozen semen used in artificial insemination of cattle**. Retrieved from: <http://biotech.dld.go.th/webnew/index.php/th>. (in Thai).
- Foot, R. H. (1970). Influence of extenders, extension rate and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. **Journal of Dairy Science**. 53, 1478-1482.
- Herold, F. C., Gerber, D. & Aurich, J. E. (2002). Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Trilady[®] or AndroMed[®]. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**. 90, 8-61.
- Iritani, A. & Nishikawa, Y. (1972). Studies on the egg yolk coagulation enzyme (phospholipase) in goat semen. IX. Enzyme concentration in the semen collected from the Cowper's gland removal goat. **Men Coll Agric Kyoto Univ Journal**. 101, 57-63.
- Majorune, S., Phungchai, R., Raungprim, T., Maitreejet, W., Poonko, S., Soisongnoen, D., Saeton, W. & Kasemsawas, U. (2013). A Comparison of the Chicken Duck and Quail Egg Yolk in the Egg Yolk-Tris Extender for the Cryopreservation of Kamphaeng Saen Bull Semen. In **The 10th KU-KPS Conference**. (pp. 3134-3140). NakhonPathom: Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus. (in Thai).
- Pongpeng, J., Leingcharoen, N., Ratanapaskorn, M., Suthunmapinata, P., Kaewmarg, T. & Apimeteetumrong, M. (2008). Study on acrosome integrity of goat spermatozoa frozen in tris-based extender at different egg yolk percentages by flow cytometer. **Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine**. 3(1), 13-20. (in Thai).
- Rastegarnia, A., Shahverdi, A., Rezaei, T. T. & Shafiepour, V. (2014). In vitro comparison of soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Comparative Clinical Pathology Journal**. 23, 893-900.
- Salamon, S. & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science Journal**. 62, 77-111.
- Settergren, I. (1934). Bull fertility examination. Andrology. Short note concerning methods for examination of breeding bulls and different methods for morphological examination of sperm. **FAO/SIDA International Postgraduate Programme on Animal Reproduction**. Uppsala: College of Veterinary Medicine.
- Thammasiri, J., Navanuraw, C., Guntaprom, S. & Natthatorntul, J. (2018). Effect of semen extenders and storage time on sperm quality of fresh and frozen goat semen. **Journal of Agricultural Research and Extension**. 35(2) (suppl. 2), 772-780. (in Thai).
- Thongtip, N. & Pattanawong, W. (2015). Comparison of semen diluted basis (Tris-egg yolk) and diluted commercial semen (MJ-EX2[™] Extender) in frozen goat semen on sperm quality after freezing. In **The 4th Phayao research conference**. (pp. 829-834). Phayao: Phayao University. (in Thai).
- Vidal, A. H., Batista, A. M., Bento da Silva, E. C., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V. & Guerra, M. M. P. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research Journal**. 109, 47-51.

วันรับบทความ (Received date) : 23 มี.ย. 65

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 7 เม.ย. 66

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 1 พ.ค. 66

<https://doi.org/10.55003/kmaj.2023.08.31.005>