

ผลของระดับความเข้มข้นคาเฟอีนและระยะเวลาการอุ่นที่ต่างกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกร จากการเก็บรักษา 3 วัน

The Effects of Different Caffeine Concentration Levels and Warming Durations on the Quality of Boar Semen after 3 Days of Storage

วรรณลักษณ์ ถาวร^{1*}, เฉลิมพร จิระปัญญาเลิศ², กิตติพงษ์ ทิพย์¹ และวิวัฒน์ พัฒนาวงศ์¹
Wannaluk Thaworn^{1*}, Chalermpon Jirapanyalect², Kittipong Thipaya¹ and Wiwat Pattanawong¹

Received date: 24 มี.ค. 68 Revised date: 25 พ.ค. 68 Accepted date: 27 พ.ค. 68

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.266618>

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนและระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์สุกร โดยทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกร 4 ตัว ตัวละ 3 ครั้ง แล้วเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Beltsville Thawing Solution (BTS) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 17°C เป็นเวลา 3 วัน ออกแบบการทดลองแบบ Factorial in RCBD โดยมีปัจจัยคือระดับคาเฟอีน (0, 10 และ 100 µg/mL) และระยะเวลาอุ่นน้ำเชื้อที่ 37°C (5, 15 และ 30 นาที) ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนที่ ความผิดปกติ และจลศาสตร์การเคลื่อนที่ ผลการทดลองพบอิทธิพลร่วมระหว่างระดับคาเฟอีนและระยะเวลาอุ่นน้ำเชื้อมีต่อค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive) และความผิดปกติที่มีหยดน้ำส่วนโคนหาง (Proximal Droplet) ($P<0.05$) โดยคาเฟอีนระดับ 100 µg/mL ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ Progressive และ Proximal Droplet สูงสุด ($P<0.05$) การอุ่นน้ำเชื้อเป็นเวลา 15 นาที เพิ่มค่า Progressive, ความผิดปกติบริเวณกึ่งกลางของอสุจิ (DMR) และ Proximal Droplet สูงสุด ($P<0.05$) ขณะที่การอุ่นน้ำเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ให้ค่าการเคลื่อนที่โดยรวมสูงสุด ($P<0.05$) ด้านจลศาสตร์การเคลื่อนที่พบว่าระยะเวลาอุ่นมีผลต่อค่าความตรงของการเคลื่อนที่ (STR), ขนาดของการแกว่งของหัวอสุจิ (LIN), ความถี่ของการแกว่งหาง (BCF) และความแกว่งของการเคลื่อนที่ (WOB) ($P<0.05$) โดย 15 และ 30 นาที ให้ค่า STR และ BCF สูงกว่า 5 นาที ส่วนค่า LIN สูงสุดที่ 15 นาที และ WOB สูงสุดที่ 30 นาที ($P<0.05$) คาเฟอีนระดับ 100 µg/mL เพิ่มค่า Proximal Droplet และ ขนาดของการแกว่งของหัวอสุจิ (ALH) แต่ระดับ 0 µg/mL ให้ค่า BCF สูงที่สุด ($P<0.05$)

คำสำคัญ: คาเฟอีน น้ำเชื้อ การเคลื่อนที่ จลศาสตร์การเคลื่อนที่ พ่อพันธุ์สุกร

Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of caffeine concentration and semen warming duration on semen quality in boar semen. Semen was collected from four boars, with three ejaculates per boar. The semen was diluted using Beltsville Thawing Solution (BTS) and stored at 17°C for three days. The experiment was designed as a factorial in a randomized complete block design (RCBD), with two factors: caffeine concentrations (0, 10, and 100 µg/mL) and semen warming durations at 37°C (5, 15, and 30 minutes). Semen quality was evaluated based on motility, abnormality, and kinematic parameters. The results revealed a significant interaction between caffeine concentration and warming duration on progressive motility and proximal droplet abnormalities ($P<0.05$). The highest percentages of progressive motility and proximal droplet abnormalities were observed in the group supplemented with 100 µg/mL of caffeine ($P<0.05$). Warming semen for 15 minutes significantly increased values of progressive motility, DMR, and proximal droplet abnormalities ($P<0.05$), whereas warming for 5 minutes yielded the highest motility ($P<0.05$). For kinematic parameters, warming duration had a significant effect on Straightness (STR), Linearity (LIN), Beat Cross Frequency (BCF), and Wobble (WOB) ($P<0.05$). Specifically, warming for 15 and 30 minutes resulted in higher STR and BCF values compared to 5 minutes, while LIN was highest at 15 minutes, and WOB was highest at 30 minutes ($P<0.05$). Regarding caffeine concentration alone, 100 µg/mL significantly increased proximal droplet abnormalities and Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH), whereas 0 µg/mL resulted in the highest BCF value ($P<0.05$).

¹ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

² สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคเหนือ จ. ตาก 63180

¹ Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai 50290

² Northern Institute of Vocational Education in Agriculture, Tak 63180

* Corresponding author: wannaluk.333@gmail.com

Keywords: caffeine, semen, motility, kinematic parameters, boar

คำนำ

น้ำเชื้อแช่เย็นถูกนำมาใช้แพร่หลายในระบบการผลิตสุกรเพื่อเพิ่มอัตราการปฏิสนธิและการกระจายพันธุ์กรรม อย่างไรก็ตามคุณภาพของน้ำเชื้อแช่เย็นอาจลดลงเนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเก็บรักษา และปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลล์อสุจิ ซึ่งมีงานวิจัยที่ให้ความสำคัญเกี่ยวกับการเสริมคาเฟอีนเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อ โดยคาเฟอีน (Caffeine) เป็นสารกระตุ้นที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มพลังงานให้กับเซลล์อสุจิ ช่วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phosphodiesterase (PDE) ส่งผลให้ระดับ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) เพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิและเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิ หลายงานวิจัยพบว่าการเติมคาเฟอีนลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสุกรสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและเพิ่มความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิต่ำ (Funahashi and Nagai, 2001a) สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Sperm Motility Activation) คาเฟอีนมีบทบาทในการกระตุ้นกระบวนการ capacitation ซึ่งเป็นกระบวนการที่อสุจิเตรียมตัวให้พร้อมสำหรับการปฏิสนธิกับไข่ โดยเพิ่มระดับ cAMP และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำให้อสุจิมีความสามารถในการแทรกผ่านเซลล์รอบไข่และปฏิสนธิได้ดีขึ้น (Aparicio et al., 2005) ช่วยในการเพิ่มพลังงานให้เซลล์อสุจิ (Mitochondrial Activation and Energy Production) นอกจากนี้คาเฟอีนยังช่วยกระตุ้นการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์อสุจิ ทำให้มีการผลิต adenosine triphosphate (ATP) มากขึ้น ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับการเคลื่อนที่ของอสุจิและกระบวนการปฏิสนธิ (Borges et al., 2017) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยการป้องกันภาวะออกซิเดชัน (Antioxidant Properties and Oxidative Stress Reduction) ถึงแม้ว่าคาเฟอีนจะไม่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระโดยตรง แต่มีการศึกษาพบว่าสามารถลดความเสียหายของเซลล์อสุจิจากภาวะ oxidative stress ได้โดยการรักษาสสมดุลของพลังงานและลดอัตราการเสื่อมสภาพของอสุจิเมื่อถูกเก็บรักษาในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ (Funahashi and Nagai, 2001b) และยังมีผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาของตัวอสุจิ (sperm longevity) ในน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยคาเฟอีนช่วยคงสภาพการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อแช่เย็น โดยช่วยลดการลดลงของระดับพลังงานภายในเซลล์อสุจิ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (Hernandez et al., 2007) ในอุตสาหกรรมการผลิตลูกสุกร การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเพื่อการผสมเทียมเป็นกระบวนการสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิและผลผลิตของฟาร์ม การเสริมสารคาเฟอีนยังช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิและคงคุณภาพของน้ำเชื้อได้นานขึ้น (Hernández et al., 2012)

การอุ่นน้ำเชื้อสุกรก่อนนำไปใช้ในการผสมเทียม (AI) เป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของอสุจิและประสิทธิภาพในการปฏิสนธิ การแช่เย็นน้ำเชื้อช่วยยืดอายุการใช้งานของอสุจิ แต่ในขณะเดียวกันอสุจิที่ถูกเก็บรักษาในสภาวะแช่เย็นเป็นระยะเวลานานอาจมีความไวต่อความเครียดจากอุณหภูมิเมื่อถูกอุ่นขึ้นก่อนใช้งาน ซึ่งในน้ำเชื้อที่แช่เย็นระยะสั้น (1–2 วัน) น้ำเชื้อที่ถูกแช่เย็นในระยะเวลาสั้นยังคงมีความสามารถในการฟื้นตัวได้ดีเมื่อถูกอุ่นขึ้น โดยทั่วไปการอุ่นน้ำเชื้อสุกรที่เก็บไว้ไม่เกิน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 37°C เป็นเวลา 10–15 นาที จะช่วยให้การเคลื่อนที่ของอสุจิกลับมาใกล้เคียงกับสภาวะปกติ โดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Flowers, 2002) การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แช่เย็นระยะกลาง (3–5 วัน) น้ำเชื้อที่ถูกเก็บไว้นานขึ้นเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และเมแทบอลิซึมของอสุจิ ทำให้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมากขึ้น การอุ่นอย่างรวดเร็วอาจทำให้เกิด thermal shock จึงควรอุ่นน้ำเชื้ออย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22–25°C) เป็นเวลา 5–10 นาที ก่อนจะอุ่นต่อที่ 37°C เพื่อให้เซลล์ปรับตัว (Johnson et al., 2000) หากเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แช่เย็นระยะยาว (5–7 วันหรือนานกว่า) การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเกิน 5 วันมีผลต่อความเสถียรของโครงสร้างเซลล์อสุจิอย่างชัดเจน โดยเฉพาะเยื่อหุ้มพลาสมาและไมโทคอนเดรีย การอุ่นน้ำเชื้อในระยะนี้ควรทำด้วยความระมัดระวังมากที่สุด โดยอาจใช้วิธีการอุ่นแบบเป็นขั้นตอน (stepwise warming) เช่น เริ่มจากอุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 10 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 30°C อีก 5 นาที ก่อนจะอุ่นสุดท้ายที่ 37°C อีก 5 นาที การอุ่นแบบเพิ่มอุณหภูมิเป็นระยะนี้ช่วยลดความเสียหายจากความเครียดทางอุณหภูมิที่อสุจิสะสมระหว่างการเก็บรักษา (Kuster and Althouse, 1997) จากการศึกษาของ Pereira et al. (2019) พบว่าการเติมคาเฟอีนที่ความเข้มข้น 8.0 mM ในระหว่างการอุ่นน้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาไว้ที่ 15°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และกิจกรรมของไมโทคอนเดรียของอสุจิได้ อย่างไรก็ตามการเติมคาเฟอีนในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้เพียง 0 หรือ 24 ชั่วโมง ไม่แสดงผลที่ชัดเจน และการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 10 และ 120 นาที พบว่าการอุ่นน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ 72 ชั่วโมงในที่มีคาเฟอีนแสดงผลที่ดีที่สุดหลังการอุ่น 10 นาที โดยการอุ่นที่นานเกินไปอาจลดคุณภาพของอสุจิได้

ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นคาเฟอีนและระยะเวลาการอุ่นที่แตกต่างกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรจากการเก็บรักษา 3 วัน

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์สุกรโตเต็มวัยทั้งหมด 4 ตัว (สายพันธุ์ดูร็อกเจอร์ซี่ 2 ตัว และ ลาจันไวท์ 2 ตัว) มีอายุใกล้เคียงกันประมาณ 1.5-2 ปี พ่อพันธุ์สุกรมีสุขภาพดี ได้รับอาหารวันละ 2 ครั้งและได้รับน้ำอย่างอิสระ ถูกเลี้ยงในคอกเลี้ยงเดี่ยวขนาด 2X2 เมตร ณ ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ หมายเลขอนุญาตใช้สัตว์ทดลอง (approval number) MACUC024A/2566

การรีดน้ำเชื้อตัวอย่าง การเจือจางน้ำเชื้อสุกรและการเก็บรักษา

ทำการรีดน้ำเชื้อด้วยมือจากพ่อสุกรแต่ละตัวต่อวันละ 3 ครั้ง ได้ตัวอย่างน้ำเชื้อทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ทำการเก็บน้ำเชื้อส่วนที่มีความเข้มข้นของอสุจิสูง ซึ่งมีค่ามาตรฐานในการคัดเลือกว่าน้ำเชื้อคือมีอัตราการเคลื่อนที่ $>70\%$ ความผิดปกติของอสุจิ $\leq 15\%$ ความเข้มข้นของอสุจิ $\geq 200 \times 10^6$ ตัว/mL (Nuntapaitoon et al., 2024) ทำการเจือจางน้ำเชื้อแต่ละตัวอย่างด้วยสารละลายสูตร Beltsville Thawing Solution (BTS) ที่ประกอบไปด้วย glucose 37 g, sodium citrate 6.0 g, Sodium bicarbonate 1.25 g, EDTA 1.25 g, Potassium chloride 0.75 g, Penicillin 1.10 g, Streptomycin 1.10 g ผสมในน้ำกลั่น 1,000 mL ปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่า 7.2 ต่อจากนั้นทำการเจือจางน้ำเชื้อตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่ 3×10^9 ตัวในปริมาตร 100 mL หลังจากการเจือจางด้วย BTS แล้วนำน้ำเชื้อแต่ละตัวอย่างมาแบ่งใส่หลอดตัวอย่าง ตัวอย่างละ 9 หลอด รวมเป็นหลอดน้ำเชื้อทั้งหมด 108 หลอดแต่ละหลอดจะมีน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วหลอดละ 50 mL นำหลอดน้ำเชื้อตัวอย่างไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 17°C ในตู้แช่เย็น (Thai stainless argon) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาทำการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

การเสริมคาเฟอีนในน้ำเชื้อสุกรหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 17°C และระยะเวลาการอุ่นน้ำเชื้อที่ต่างกัน

ภายหลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรนาน 3 วัน ทำการเติมคาเฟอีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น (0 (กลุ่มควบคุม), $10\ \mu\text{g/mL}$ และ $100\ \mu\text{g/mL}$) ลงไปในหลอดน้ำเชื้อแต่ละตัวอย่างจำนวนตัวอย่างละ 9 หลอด โดยให้มีความเข้มข้นของคาเฟอีนแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 หลอดตัวอย่าง จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อทั้งหมดไปทำการอุ่นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5, 15 และ 30 นาทีในอ่างน้ำอุ่น (water bath) ทำการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อเรื่องการเคลื่อนที่ ความผิดปกติของตัวอสุจิ และจุลศาสตร์การเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง Computer assistance analysis (CASA) (Figure 1)

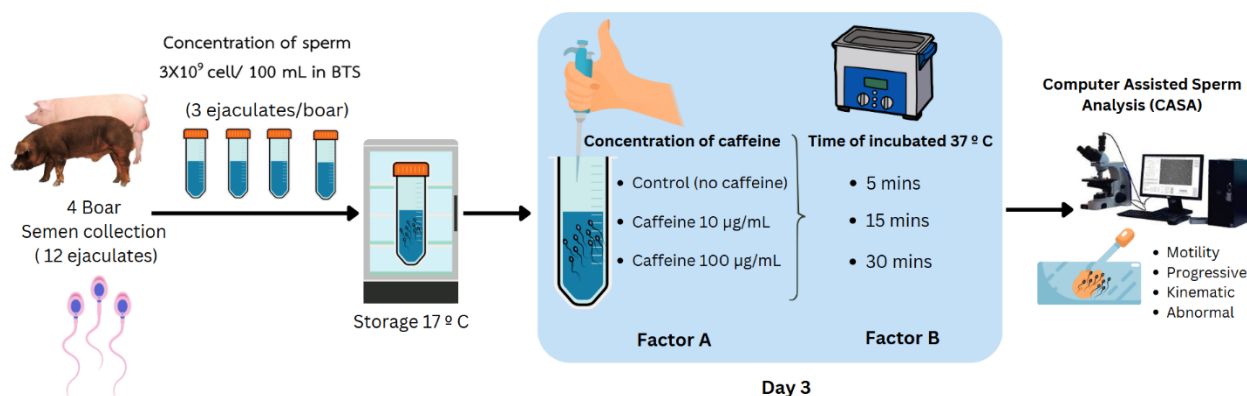


Figure 1 Flow chart diagram for the present study

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; ยี่ห้อ: HAMILTON THORNE; รุ่น: CEROS II) (Nuntapaitoon et al., 2024) ทำการตรวจประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile, %) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive, %) จลศาสตร์การเคลื่อนที่ (kinematic parameters) ได้แก่ ระยะทางเฉลี่ยตามเส้นทางเคลื่อนที่ของอสุจิ (Distance Average Path, DAP; µm), ระยะทางเป็นเส้นตรงของการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Distance Straight Line, DSL; µm), ระยะทางแบบโค้งของการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Distance Curvilinear, DCL; µm), ความเร็วตามแนวโค้ง- ความเร็วของอสุจิตามแนวเส้นทางจริงที่เคลื่อนที่ (Curvilinear Velocity, VCL; µm/sec), ความเร็วเป็นเส้นตรง- ความเร็วจากจุดเริ่มต้นไปยังจุดสิ้นสุดในเส้นตรง (Straight-Line Velocity, VSL, µm/sec), ความเร็วเฉลี่ยตามแนวเส้นทาง- ความเร็วเฉลี่ย

ตามเส้นทางที่อสุจิเคลื่อนที่ (Average Path Velocity, VAP; $\mu\text{m}/\text{sec}$), ความเป็นเส้นตรงของการเคลื่อนที่ – แสดงถึงอสุจิสามารถเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงได้มากเพียงใด (Linearity = VSL/VCL , LIN; %), ความตรงของการเคลื่อนที่ – บอกถึงการเบี่ยงเบนจากเส้นตรง (Straightness = VSL/VAP , STR; %), ขนาดของการแกว่งของหัวอสุจิ – ระยะการส่ายของหัวอสุจิซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของหาง (Amplitude of Lateral Head Displacement, ALH; μm), ความถี่ของการแกว่งหาง – จำนวนครั้งที่หัวอสุจิตัดผ่านเส้นทางเฉลี่ยในหนึ่งวินาที (Beat Cross Frequency, BCF; Hz) และ ความกว้างของการเคลื่อนที่ – อธิบายการเคลื่อนที่ของหัวอสุจิไปทางด้านข้าง (Wobble = VAP/VCL , WOB; %) การประเมินความผิดปกติของอสุจิ (abnormal sperm, %) ได้แก่ อสุจิที่มีหางโค้งงอ (Bent Tail, %), อสุจิที่มีหางขดเป็นวง (Coiled Tail, %), ความผิดปกติบริเวณกึ่งกลางของอสุจิ (Distal Midpiece Reflex, DMR; %), อสุจิที่มีหยดน้ำส่วนปลายหาง (Distal Droplets, %) และอสุจิที่มีหยดน้ำส่วนโคนหาง (Proximal Droplet, %)

การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistics Analysis)

วางแผนการทดลองแบบ 3×3 factorial in Randomized Complete Block Design ปัจจัยที่ศึกษาระดับความเข้มข้นของคาเฟอีน 3 ระดับ ได้แก่กลุ่มที่ได้รับคาเฟอีนที่ 0, 10 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และในทุกๆระดับจะทำการอุ่นน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (บล็อก) ได้แก่ ระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อที่ 5, 15 และ 30 นาที โดยน้ำเชื้อสุกรที่รีดได้แต่ละครั้งของแต่ละตัวจะถูกแบ่งออกเป็น 9 หลอดเพื่อทำการผสมหลอดน้ำเชื้อให้ได้รับแต่ละทรีตเมนต์คอมบินชัน (treatment combination) จากการรีดน้ำเชื้อทั้งหมด 12 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้จากการบันทึกไปวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ในแต่ละกลุ่มทดลองทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 เปอร์เซนต์ (Gomez and Gomez, 1984) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS 29 (Statistics Package for Social Sciences) (IBM, 2022)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการทดลองของระดับความเข้มข้นคาเฟอีน (0, 10 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับระยะเวลาการอุ่นน้ำเชื้อ (5, 15 และ 30 นาที) ผลการทดลองพบว่า มีอิทธิพลร่วมของระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนและระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อต่อค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive) และความผิดปกติของอสุจิที่มีหยดน้ำส่วนโคนหาง (Proximal Droplet) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Table 1) ซึ่งการเสริมคาเฟอีนที่ระดับ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการอุ่นน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาทีส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและ Proximal Droplet มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่น ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อที่แตกต่างกันส่งผลต่อค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า, DMR และ Proximal droplet เมื่ออุ่นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที มีผลทำให้ค่าดังกล่าวสูงขึ้นเมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่น ($P < 0.05$) และพบว่าระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อยังส่งผลต่อค่าการเคลื่อนที่โดยรวม (motility) ซึ่งเมื่ออุ่นน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 5 นาที มีค่าเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่โดยรวมมากกว่าเมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่น (79.83, 71.67, 70.32; $P < 0.05$) (Table 4) การเสริมคาเฟอีนในน้ำเชื้อผลที่ได้ อาจเกิดจากฤทธิ์ของคาเฟอีนที่กระตุ้นการเผาผลาญพลังงานของอสุจิ โดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ cyclic AMP (cAMP) ซึ่งมีบทบาทต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Funahashi and Nagai, 2001b) คาเฟอีนอาจกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกลูโคสและกรดแลคติก ซึ่งสามารถส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกในน้ำเชื้อได้ การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกอาจช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวและพัฒนาการของอสุจิในกรณีที่อสุจิในปริมาณของคาเฟอีนที่เหมาะสม แต่หากเสริมคาเฟอีนในปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชันซึ่งมีผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อได้ (Hernández et al., 2012) ค่าการเพิ่มขึ้นของค่า Proximal Droplet แสดงถึงความผิดปกติในการเจริญเติบโตของอสุจิหรืออสุจิที่เจริญเติบโตเต็มที่ผิดปกติ อาจเกิดจากการสัมผัสกับคาเฟอีนในระดับที่สูงและระยะเวลานานเกินไป แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของอสุจิส่วนที่เป็นหยดน้ำที่ติดอยู่ใกล้หัวอสุจิเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อซึ่งอาจสะท้อนถึงความเครียดของเซลล์อสุจิ (Borges et al., 2017) โดยมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการใช้คาเฟอีนในความเข้มข้นสูงหรือเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลเสียต่อคุณภาพของอสุจิ เช่น เพิ่มอัตราการตายของอสุจิและลดความสมบูรณ์ของ DNA (Mocé et al., 2010) การเสริมคาเฟอีนอาจมีผลต่อการเกิด Proximal Droplet ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างอสุจิเมื่อได้รับคาเฟอีน หากใช้คาเฟอีนในความเข้มข้นสูงและเป็นเวลานาน มีแนวโน้มที่จะส่งผลเสียต่อความสมบูรณ์ของโครงสร้างอสุจิ เช่น การเพิ่มขึ้นของ Proximal Droplets ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการปฏิสนธิที่ลดลง (Schulze et al., 2021) จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานานแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงอาจไม่ได้เกิดจากความเข้มข้นของคาเฟอีนเพียงอย่างเดียวแต่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการอุ่นน้ำเชื้อด้วย เมื่อเซลล์อสุจิสัมผัสกับคาเฟอีนในระยะเวลาที่นาน ซึ่งหมายความว่าคาเฟอีนอาจมีบทบาทในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในระยะเวลา

เริ่มต้น แต่หากอสุจิได้รับคาเฟอีนเป็นเวลานานเกินไป อาจนำไปสู่ความเสียหายของโครงสร้างเซลล์อสุจิ และเพิ่มอัตราความผิดปกติของหาง (Aitken and Clarkson, 1987)

Table 1 Percentage of total motility, progressive motility, and abnormal sperm of different caffeine concentration levels and warming boar semen at 37°C to 5, 15 and 30 minutes on storage for 3 days

Concentration of caffeine	Time of incubated 37 °C (mins)			SEM	P-value		
	5	15	30		Treatment	Time	Interaction
Progressive (%)							
Control	50.40±4.47 ^{b,x}	46.93±3.59 ^{b,x}	49.23±5.23 ^{b,x}	0.77	0.055	0.031	0.011
10 µg/mL	50.32±7.80 ^{ab,x}	54.03±4.78 ^{ab,x}	46.74±4.36 ^{ab,y}	1.06			
100 µg/mL	50.82±5.83 ^{a,x}	54.48±2.13 ^{a,x}	49.97±5.25 ^{a,y}	0.93			
Motile (%)							
Control	75.83±16.31 ^x	69.97±20.99 ^y	75.92±13.57 ^x	2.83	0.873	0.035	0.497
10 µg/mL	79.92±11.02 ^x	71.84±18.61 ^y	67.08±19.25 ^y	2.85			
100 µg/mL	83.78±6.45 ^x	73.21±18.79 ^y	67.98±18.83 ^y	2.79			
Bent Tail (%)							
Control	10.31±4.20	7.75±3.19	7.93±3.92	0.65	0.966	0.545	0.381
10 µg/mL	8.12±4.23	8.47±1.87	8.79±3.95	0.57			
100 µg/mL	8.63±3.86	9.27±2.24	7.56±3.84	0.56			
Coiled Tail (%)							
Control	1.26±0.82	0.98±0.78	1.09±1.21	0.16	0.439	0.553	0.617
10 µg/mL	1.07±0.85	1.46±1.06	1.32±1.34	0.18			
100 µg/mL	1.03±0.70	1.69±1.11	1.58±1.42	0.19			
DMR (%)							
Control	0.32±0.23 ^y	0.49±0.26 ^x	0.41±0.29 ^x	0.05	0.353	0.012	0.869
10 µg/mL	0.36±0.24 ^y	0.75±0.71 ^x	0.47±0.45 ^x	0.09			
100 µg/mL	0.35±.026 ^y	0.70±0.66 ^x	0.57±0.42 ^x	0.08			
Distal Droplet (%)							
Control	5.56±3.52	5.51±3.36	5.04±3.49	0.56	0.385	0.675	0.917
10 µg/mL	6.22±4.08	6.81±3.90	6.04±3.76	0.64			
100 µg/mL	5.47±3.21	7.00±3.10	6.60±2.70	0.5			
Proximal Droplet (%)							
Control	4.65±1.77 ^{b,x}	4.18±1.29 ^{b,y}	4.11±1.12 ^{b,z}	0.23	0.002	0.019	0.019
10 µg/mL	4.18±1.15 ^{ab,y}	5.25±1.48 ^{ab,x}	5.13±1.32 ^{ab,x}	0.23			
100 µg/mL	4.26±0.92 ^{a,y}	6.33±1.81 ^{a,x}	5.82±1.14 ^{a,x}	0.26			

DMR: Distal Midpiece Reflex.

SEM: standard error of the mean.

^{a-b} Means within a column with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

^{x-z} Means within a row with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

จาก Table 2 ไม่พบอิทธิพลร่วมของระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนและระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อต่อค่าจุลศาสตร์การเคลื่อนที่ ($P > 0.05$) แต่พบว่าระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อส่งผลต่อค่า STR, LIN, BCF และ WOB ($P < 0.05$) ระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อที่ 15 และ 30 นาที มีค่า STR และ BCF สูงกว่าระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อที่ 5 นาที การอุ่นน้ำเชื้อที่ 15 นาที ส่งผลต่อค่า LIN สูงกว่าเมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่น และการอุ่นน้ำเชื้อที่ 30 นาทีส่งผลต่อค่า WOB มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่น

($P < 0.05$; Table 3) ระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนส่งผลต่อค่า Proximal droplet, ALH และ BCF ($P < 0.05$) จากการเสริมคาเฟอีนที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า Proximal droplet และ ALH สูงกว่ากลุ่มอื่น และการเสริมคาเฟอีนที่ระดับ 0 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า BCF สูงกว่ากลุ่มที่มีการเสริมคาเฟอีนที่ 10 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$; Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Henning et al. (2020) ศึกษาผลของการเสริมคาเฟอีนลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรหลังการแช่แข็งพบว่าการเสริมคาเฟอีนช่วยเพิ่มค่า ALH ของอสุจิหลังการละลายซึ่งแสดงถึงการเคลื่อนไหวที่สูงและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งคาเฟอีนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (PDE) ส่งผลให้ระดับ cAMP ภายในเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้น และกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนส A (PKA) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Henkel and Schill, 2003) ค่า BCF ที่แสดงในกลุ่มของการเสริมคาเฟอีนลดลงอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นมากเกินไปจากคาเฟอีน แม้ว่าคาเฟอีนจะช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิผ่านการเพิ่มระดับ cAMP แต่การเสริมในระดับสูงเกินไปอาจรบกวนสมดุลของกลไกการควบคุมการเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการเคลื่อนไหวที่ไม่ประสานกัน และอาจเกิดภาวะ Oxidative Stress ซึ่งการเสริมคาเฟอีนในระดับสูงอาจกระตุ้นการเกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างภายใน ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการเคลื่อนไหวของอสุจิ รวมถึงการลดลงของค่า BCF (Aitken and Clarkson, 1987) โดยค่า BCF มักถูกใช้ร่วมกับพารามิเตอร์อื่น เช่น ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของอสุจิในการเคลื่อนที่และปฏิสนธิ (Funahashi and Nagai 2001b)

Table 2 The kinematic parameters sperm of different caffeine concentration levels and warming boar semen at 37°C to 5, 15 and 30 minutes on storage for 3 days

Concentration of caffeine	Time of incubated 37 °C (mins)			SEM	P-value		
	5	15	30		Treatment	Time	Interaction
DAP (μm)							
Control	32.05 $\pm$ 4.08	32.86 $\pm$ 5.48	35.30 $\pm$ 5.19	0.82	0.552	0.586	0.346
10 $\mu\text{g/mL}$	34.20 $\pm$ 3.09	31.24 $\pm$ 5.89	31.29 $\pm$ 3.42	0.74			
100 $\mu\text{g/mL}$	34.26 $\pm$ 5.98	32.79 $\pm$ 7.66	33.17 $\pm$ 4.75	1.02			
DSL (μm)							
Control	23.83 $\pm$ 2.61 ^y	23.63 $\pm$ 4.58 ^y	25.48 $\pm$ 2.60 ^x	0.42	0.146	0.046	0.312
10 $\mu\text{g/mL}$	24.30 $\pm$ 1.89 ^x	23.69 $\pm$ 2.43 ^y	24.11 $\pm$ 2.23 ^x	0.36			
100 $\mu\text{g/mL}$	24.31 $\pm$ 3.35 ^y	25.02 $\pm$ 2.48 ^y	27.00 $\pm$ 1.99 ^x	0.60			
DCL (μm)							
Control	62.89 $\pm$ 9.28	62.89 $\pm$ 11.00	68.14 $\pm$ 10.28	1.71	0.669	0.26	0.492
10 $\mu\text{g/mL}$	68.31 $\pm$ 6.92	60.16 $\pm$ 12.89	61.70 $\pm$ 9.55	1.74			
100 $\mu\text{g/mL}$	62.13 $\pm$ 15.12	58.95 $\pm$ 18.50	65.14 $\pm$ 11.23	2.50			
VAP ($\mu\text{m/sec}$)							
Control	72.38 $\pm$ 13.03	70.59 $\pm$ 12.84	70.01 $\pm$ 14.80	2.21	0.489	0.827	0.935
10 $\mu\text{g/mL}$	72.15 $\pm$ 14.57	77.30 $\pm$ 14.17	75.23 $\pm$ 17.39	2.53			
100 $\mu\text{g/mL}$	72.41 $\pm$ 13.65	75.37 $\pm$ 15.77	74.44 $\pm$ 13.89	2.35			
VSL ($\mu\text{m/sec}$)							
Control	55.75 $\pm$ 7.20	55.18 $\pm$ 6.13	57.18 $\pm$ 9.95	1.29	0.685	0.139	0.637
10 $\mu\text{g/mL}$	53.64 $\pm$ 10.15	60.82 $\pm$ 8.11	58.81 $\pm$ 8.91	1.56			
100 $\mu\text{g/mL}$	54.54 $\pm$ 7.84	58.30 $\pm$ 9.97	58.30 $\pm$ 6.46	1.36			
VCL ($\mu\text{m/sec}$)							
Control	138.46 $\pm$ 29.82	132.89 $\pm$ 28.55	134.35 $\pm$ 29.98	4.78	0.448	0.904	0.964
10 $\mu\text{g/mL}$	140.97 $\pm$ 28.79	145.07 $\pm$ 33.60	147.81 $\pm$ 43.31	5.81			
100 $\mu\text{g/mL}$	138.01 $\pm$ 31.25	143.27 $\pm$ 32.08	145.48 $\pm$ 32.94	5.22			
STR (%)							

Concentration of caffeine	Time of incubated 37 °C (mins)			SEM	P-value		
	5	15	30		Treatment	Time	Interaction
Control	77.64±5.34 ^y	79.31±6.90 ^x	79.49±7.78 ^x	1.10	0.555	0.026	0.848
10 µg/mL	74.52±2.37 ^y	79.30±5.85 ^x	79.53±7.60 ^x	1.00			
100 µg/mL	74.96±4.50 ^y	77.48±5.02 ^x	79.38±7.42 ^x	0.99			
LIN (%)							
Control	41.97±4.52 ^y	43.78±5.31 ^x	42.80±4.69 ^y	0.80	0.692	0.031	0.845
10 µg/mL	39.40±2.78 ^y	44.12±5.61 ^x	42.58±6.54 ^x	0.91			
100 µg/mL	40.29±3.88 ^x	42.85±4.25 ^x	42.70±5.67 ^x	0.78			
ALH (µm)							
Control	7.20±1.06 ^b	6.80±1.16 ^b	6.66±1.27 ^b	0.19	0.014	0.222	0.853
10 µg/mL	8.02±0.34 ^a	7.60±1.03 ^a	7.41±1.72 ^a	0.20			
100 µg/mL	7.37±0.67 ^{ab}	7.61±0.89 ^{ab}	7.13±1.41 ^{ab}	0.17			
BCF (Hz)							
Control	32.72±2.55 ^{a,z}	33.70±2.91 ^{a,y}	33.66±2.70 ^{ab,x}	0.45	0.007	0.000	0.817
10 µg/mL	29.72±2.70 ^{b,y}	32.52±3.53 ^{b,x}	32.77±3.70 ^{b,x}	0.58			
100 µg/mL	30.67±2.04 ^{ab,y}	33.34±2.69 ^{ab,x}	35.05±2.38 ^{a,x}	0.46			
WOB (%)							
Control	53.60±2.42 ^y	54.46±2.49 ^x	53.37±1.22 ^y	0.35	0.797	0.019	0.892
10 µg/mL	52.43±2.00 ^y	54.87±3.02 ^x	52.87±3.43 ^y	0.50			
100 µg/mL	53.14±2.14 ^y	54.55±3.63 ^x	53.07±2.19 ^{xy}	0.48			

SEM, standard error of the mean. VCL: Curvilinear Velocity; VSL: Straight-Line Velocity; VAP: Average Path Velocity; LIN: Linearity = VSL/VCL; STR: Straightness = VSL/VAP; WOB: Wobble = VAP/VCL; ALH: Amplitude of Lateral Head Displacement; BCF: Beat Cross Frequency

^{a-c} Means within a row with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

^{x-z} Means within a column with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 3 Effect of different warming boar semen at 37°C on storage for 3 days

Items	Time of incubated 37 °C (mins)			SEM	P-value
	5	15	30		
Motile & abnormal					
Progressive (%)	50.51 ^{ab}	51.81 ^a	48.64 ^b	0.92	0.031
Motile (%)	79.83 ^a	71.67 ^b	70.32 ^b	2.9	0.035
DMR (%)	0.34 ^b	0.64 ^a	0.48 ^{ab}	0.08	0.012
Proximal Droplet (%)	4.36 ^b	5.25 ^a	5.01 ^a	0.26	0.190
Kinematic parameter					
STR (%)	75.71 ^b	78.69 ^a	79.46 ^a	1.14	0.260
LIN (%)	40.55 ^b	43.58 ^a	42.69 ^{ab}	0.89	0.310
BCF (Hz)	31.03 ^b	33.18 ^a	33.82 ^a	0.84	0.000
WOB (%)	53.05 ^b	53.10 ^b	54.62 ^a	0.51	0.019

SEM, standard error of the mean. STR: Straightness = VSL/VAP; WOB: Wobble = VAP/VCL; ALH: Amplitude of Lateral Head Displacement; BCF: Beat Cross Frequency

^{a-c} Means within a row with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 4 Effect of different caffeine concentration levels on storage for 3 days

Items	Concentration caffeine ($\mu\text{g/mL}$)			SEM	P-value
	0	10	100		
Abnormal sperms					
Proximal Droplet (%)	4.31 ^b	4.85 ^{ab}	5.46 ^a	0.33	0.002
Kinematic parameter					
ALH (μm)	6.88 ^b	7.36 ^{ab}	7.67 ^a	0.22	0.140
BCF (Hz)	33.82 ^a	32.55 ^{ab}	31.66 ^b	0.62	0.007

SEM, standard error of the mean. ALH: Amplitude of Lateral Head Displacement; BCF: Beat Cross Frequency

a-c Means within a row with superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้พบว่าระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนร่วมกับระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อส่งผลต่อค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและความผิดปกติของสperm ที่มีหยดน้ำส่วนโคนหาง ซึ่งการเสริมคาเฟอีนระดับ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในการอุ่นน้ำเชื้อที่ 15 นาที ให้ผลดีที่สุดต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้นและลดความผิดปกติของสperm การอุ่นน้ำเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ให้ค่าการเคลื่อนที่โดยรวมสูงสุด ส่วนการใช้คาเฟอีนในระดับต่ำ คือ 10 $\mu\text{g/mL}$ ส่งผลต่อความถี่ของการแกว่งหางสperm ที่ดีที่สุด ดังนั้นการเลือกใช้ระดับคาเฟอีนและระยะเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อของสุกร แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลระยะยาวของการใช้คาเฟอีนในน้ำเชื้อเพื่อประเมินผลต่อประสิทธิภาพการผสมพันธุ์และอัตราการตั้งท้อง

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้เขียนขอประกาศว่าบทความนี้ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากฟาร์มสุกรและห้องปฏิบัติการระบบสืบพันธุ์ทางปศุสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

ความคิดริเริ่ม และสมมติฐาน: วรณลักษณ์ ถาวร, วิวัฒน์ พัฒนาวงค์. การปฏิบัติงานวิจัย การมีส่วนร่วมในการออกแบบการทดลอง การทดสอบ เครื่องมือวัด วิธีการเก็บข้อมูล และ criteria: วรณลักษณ์ ถาวร, วิวัฒน์ พัฒนาวงค์, เฉลิมพร จิระปัญญาเลิศ, กิตติพงษ์ ทิพย์ะ. การจัดเก็บข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล การแปลผล: วรณลักษณ์ ถาวร, วิวัฒน์ พัฒนาวงค์, เฉลิมพร จิระปัญญา. การมีส่วนร่วมในการเขียนต้นฉบับบทความ: วรณลักษณ์ ถาวร, เฉลิมพร จิระปัญญา. การให้การสนับสนุนเครื่องมือ ห้องปฏิบัติการ และ คุรุภัณฑ์: วิวัฒน์ พัฒนาวงค์, กิตติพงษ์ ทิพย์ะ.

เอกสารอ้างอิง

- Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 81(2), 459-469.
- Aparicio, I. M., Garcia-Herreros, M., Gil, M. C., & Fernandez, J. L. (2005). Caffeine induces capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, 26(4), 578-586.
- Borges, A. M., Pereira, R. J., & Andrade, A. F. (2017). The role of caffeine on mitochondrial function and sperm motility. **Theriogenology**, 98(1), 122-128.
- IBM Corp. (2022). IBM SPSS Statistics for Windows (Version 29.0) [Computer software]. IBM Corp.
- Flowers, W. L. (2002). Control of boar fertility through regulation of testicular temperature: A review. **Swine Health and Production**, 10(2), 59-64.
- Funahashi, H., & Nagai, T. (2001). Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. **Molecular Reproduction and Development**, 58(4), 424-431. <https://doi.org/10.1002/mrd.1040>
- Funahashi, H., & Nagai, T. (2001). Regulation of in vitro penetration of pig oocytes by caffeine and adenosine. **Journal of Reproduction and Development**, 47(1), 103-109.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. A. (1984). **Statistical Procedures for Agriculture Research**. John Wiley & Sons. Inc.
- Henkel, R. R., & Schill, W.-B. (2003). Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 1(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>.
- Henning, H., Petrunkina, A. M., & Waberski, D. (2020). Improvement of the motility of boar sperm after cryopreservation. **Theriogenology**, 146(1), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.013>.
- Hernandez, C. R., Rocha, L. G., & Sousa, P. C. (2007). Effects of caffeine supplementation on cooled boar semen: motility and oxidative stress parameters. **Animal Reproduction Science**, 102(1-2), 80-89.
- Hernández, M., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., & Martínez, E. A. (2012). Effects of caffeine supplementation on boar sperm motility and fertilization success. **Theriogenology**, 78(8), 1685-1693.
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, 62(1-3), 143-172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3).
- Kuster, C. E., & Althouse, G. C. (1997). The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and Beltsville Thawing Solution. **Theriogenology**, 48(7), 1075-1084. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00310-0).
- Mocé, E., Gadea, J., & Matas, C. (2010). Effect of caffeine treatment on boar sperm head membrane changes assessed by flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, 117(3-4), 196-204.
- Nuntapaitoon, M., Tummaruk, P., & Suwimonteerabutr, J. (2024). Supplementation of glutamine in a short-term boar semen extender during 17°C holding time enhances post-thaw sperm quality for cryopreservation. **Porcine Health Management**, 10(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40813-024-00403-8>.
- Pereira, B. A., Rocha, L. G. P., Teles, M. C., Silva, W. E., Barbosa, J. A., Rabelo, S. S., Uchoa, A. S., Rodriguez-Gil, J. E., Pereira, L. J., & Zangeronimo, M. G. (2019). Addition of chlorogenic acid and caffeine during the processing of cooled boar semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 71(2), 489-499. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10415>.
- Schulze, M., Hensel, B., Rüdiger, K., & Waberski, D. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (Part I): Boar, bull and stallion. **Animal Reproduction Science**, 226(1), 106712. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106712>.