

ผลของการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ต่อคุณภาพของอสุจิหลังการละลาย

Effects of Hemp Extract Supplementation in Frozen Bull Semen Extender on Post-Thaw Sperm Quality

กรัณท์รัตน์ ไนเวียง¹ วาที คงบรรทัด² พชรพร ตาดี¹ ตะวัน จัตรสูงเนิน³
วรรณลักษณ์ ถาวร¹ พัชรี พรหมตัน¹ และ วิวัฒน์ พัฒนาวงค์^{1*}
Karantarai Naiweang¹, Watee Kongbuntad², Phacharaporn Tadee¹, Tawan Chatsungnoen³,
Wannaluk Thaworn¹, Patcharee Promtan¹ and Wiwat Pattanawong^{1*}

¹คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

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

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

²Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

³สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จ. แพร่ 54140

³Department of Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae 54140, Thailand

*Corresponding author: Email: wpattanawong@gmail.com

(Received: 3 April 2023; Accepted: 22 June 2023)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of hemp extract supplemented in frozen bull semen extender on post-thaw sperm quality. The control group consisted of an egg yolk-based basic semen diluent (Tris-egg yolk: EG). Two experiments were divided, experiment 1, tested the changes in osmotic pressure values of hemp extract diluent containing CBD at levels of 5, 10, 50, and 100 µg/mL, respectively. The retention time in the preservation of the osmosis diluent at 4 °C was 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 hours, and 1 week. It was found that the osmotic pressure values of all experimental groups were optimal for the freezing of bull semen and had no effect on the quality of the frozen bull semen. Experiment 2, the supplementation of hemp extract in frozen bull semen diluent on sperm quality after thawing at concentrations of 5, 10, 50, and 100 µg CBD/mL, respectively, was tested in 3 Tropical Holstein (TH) dairy cows. Twenty million sperm per tube and packed into 0.25 mL ministraw tubes, incubated at 4 and -121 °C for 4 hours and 15 minutes, respectively, and stored in liquid nitrogen at -196 °C. After that, semen quality was assessed by computer-assisted sperm analysis (CASA) at 24 hours, 1 week, 2 weeks, and 1 month after cryopreservation. It was found that 5 µg CBD/mL hemp extract supplementation affected sperm motility (49.43 %) significantly more than the control group ($P < 0.05$). Hemp extract supplementation at a CBD level of 5 µg/mL in semen dilution found sperm with a bent tail and proximal droplet were significantly lower than the control group ($P < 0.05$). In conclusion, the use of a hemp extract supplementation in frozen bull semen extender level at 5 µg CBD/mL showed good sperm quality tendencies. It is an adjuvant in the supplementation of frozen bull semen.

Keywords: Hemp extract, extender, semen quality, bull

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคต่อคุณภาพอสุจิโคหลังการละลาย โดยมีน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคพื้นฐานที่ใช้ไข่แดง (Tris-egg yolk: EG) เป็นกลุ่มควบคุม แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับ 5, 10, 50 และ 100 µg CBD/mL ตามลำดับ ในการเก็บรักษาน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลากการเก็บรักษาที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ พบว่า ค่าความดันออสโมติกของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความดันออสโมติกที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งอสุจิของโคและไม่กระทบต่อคุณภาพการผลิตน้ำเชื้อโคแช่แข็ง การทดลองที่ 2 การเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคแช่แข็งต่อคุณภาพตัวอสุจิภายหลังการละลาย ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 50 และ 100 µg CBD/mL ตามลำดับ โดยทดสอบในน้ำเชื้อพ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ (Tropical Holstein: TH) จำนวน 3 ตัว ทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นอสุจิ 20 ล้านตัวต่อหลอด และบรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อ (ministraw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ -121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 15 นาที ตามลำดับ และเก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) ที่เวลา 24 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน หลังแช่แข็ง พบว่า การเสริมสารสกัดจากกัญชงระดับ CBD 5 µg/mL ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ (49.43 เปอร์เซ็นต์) มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับผลสืบพันธุ์ทางของอสุจิ การเสริมสารสกัดจากกัญชงระดับ CBD 5 µg/mL ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อพบว่า มีอสุจิที่มีความผิดปกติในลักษณะหางคดและอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณกลางตัว น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สรุปการใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่มีสารสกัดจากกัญชงเป็นส่วนประกอบที่ระดับความเข้มข้น CBD 5 µg/mL มีแนวโน้มคุณภาพอสุจิที่ดีในการนำมาใช้เป็นสารเสริมในการทำน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนม

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชง น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ คุณภาพอสุจิ โคพ่อพันธุ์

คำนำ

การทำอาชีพการเลี้ยงโค กระบือ ในประเทศไทย มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นทุกปี (Department of Livestock Development, 2012) และมีการนำเทคโนโลยีการผสมเทียม (artificial insemination: AI) เข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์กรรมโค กระบือ ให้มีประสิทธิภาพและผลผลิตมากขึ้น อย่างไรก็ตามการผสมเทียมนั้นต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จำเป็นต้องมีการเติมน้ำยาสำหรับรักษาสภาพเซลล์อสุจิ โดยมีส่วนประกอบของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) สารเจือจางมีองค์ประกอบที่ช่วยควบคุมความเป็นกรดต่างช่วยให้สอสุจิมีอายุยืนยาวดำรงชีวิตอยู่ได้นาน ทั้งนี้ อาจมี

การเติมยาปฏิชีวนะบางกลุ่มในสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อโดยควบคุมการเจริญเติบโตและทำลายแบคทีเรียที่อาจปะปนมาในกระบวนการรีดน้ำเชื้อหรือกระบวนการอื่น ๆ สารเจือจางน้ำเชื้อช่วยลดการตายของตัวอสุจิในกระบวนการลดอุณหภูมิ เนื่องจากเมื่อตัวอสุจิอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิเย็นลงมาก ๆ จะมีการตกผลึกน้ำแข็งของของเหลวภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ ดังนั้น จึงมีการใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติเข้าแทนที่ของเหลวก่อนการแข็งตัว เช่น glycerol สามารถช่วยลดอันตรายต่อตัวอสุจิได้ (Forouzanfar *et al.*, 2010)

ในกระบวนการเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็ง สารที่นิยมใช้ในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง คือ ไข่แดง หรือ สารสกัดเลซิตินจากถั่วเหลือง (Rehman *et al.*, 2013) ซึ่ง

น้ำเชื้อโคในในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้ไข่แดงเป็นส่วน
ของ cryoprotectant ในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ (extender)
ซึ่งการใช้ไข่แดงเพื่อป้องกันความเสียหายของอสุจิจาก
การเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง ร่วมกับ glycerol ส่งผลที่
ดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ไข่แดงยังพบปัญหา
เนื่องจากการใช้ไข่แดงเป็นโปรตีนที่ได้จากสัตว์ปีกซึ่ง
อาจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ ที่
สามารถลดความสมบูรณ์ของอสุจิได้ (El-Sisy *et al.*,
2016) ทั้งนี้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ควรเลือกใช้นั้น
สามารถรักษาคุณภาพอสุจิให้ดีที่สุดทั้งในช่วงของการแช่
เย็น ตลอดจนการลดอุณหภูมิจนกระทั่งแช่แข็งในถัง
ไนโตรเจนเหลว (Apimeteetumrong *et al.*, 2013) ดังนั้น
ในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาวิจัยการเสริมสารป้องกัน
อันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) โดยการ
ใช้สารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด แต่มีพืชชนิดหนึ่งที่มี
ความน่าสนใจ และประเทศไทยได้อนุญาตให้สามารถ
ผลิตและใช้ทางการวิจัย ผู้วิจัยสนใจศึกษากัญชง
(*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) ประกอบด้วยสาร
สำคัญหลายชนิด ได้แก่ trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
(Δ^9 -THC) และสาร cannabidiol (CBD) ซึ่งมีปริมาณ
มากในกัญชง ซึ่งสาร CBD ที่สกัดจากกัญชงเป็นสารต้าน
อนุมูลอิสระ ลดความเครียด จากปฏิกิริยาออกซิเดชันใน
น้ำเชื้อเป็นสารที่ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยา
ออกซิเดชันช่วยกำจัดและลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไป
ทำลายสารประกอบของเซลล์ที่เป็นสาเหตุการตายของ
อสุจิ (Alagbonsi *et al.*, 2019) จากการศึกษา
สาระสำคัญของสาร CBD ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตสามารถ
ส่งผลกระทบต่อทั้งทางบวกและลบในระดับความเข้มข้นที่
แตกต่างกัน ซึ่งสาร CBD มีความน่าสนใจในการเสริมใน
น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคแชนซ์ เนื่องจากอาจทดแทนสาร
ต้านจุลชีพในน้ำเชื้อ การลดความเครียดจากการ
ออกซิเดชันของระยะเวลาการเก็บรักษา และยังมีการ
ศึกษาวิจัยน้อยในการเป็นสารเสริมในน้ำยาเจือจาง
น้ำเชื้อโคแชนซ์ ซึ่งหากประสบผลสำเร็จเกษตรกรจะมี
ทางเลือกในการใช้น้ำยาเจือจางที่สามารถคงคุณภาพ
ของน้ำเชื้อได้นานมากขึ้น จึงมีความน่าสนใจในการเสริม
ในน้ำยาเจือจางเนื่องจากอาจทดแทนสารต้านอนุมูล
อิสระและสารต้านจุลชีพในน้ำเชื้อโคได้ จึงเป็นที่มาของ

การเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคต่อ
คุณภาพของอสุจิหลังการละลายในการศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

พ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ (Tropical
Holstein: TH) จำนวน 3 ตัว อายุ 9 - 10 ปี น้ำหนัก 900 -
1,000 กิโลกรัม ซึ่งมีอายุและน้ำหนักตัวใกล้เคียงกัน
ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โครงการหลวง
อินทนนท์ หมายเลขขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง (Approval
No.) MACUC052A/2565

การสกัดกัญชง

นำใบกัญชงไปอบที่ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ
45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำใบกัญชง
ที่อบแห้งแล้วมาทำการบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด
เมื่อได้ผงกัญชงแล้วนำไปแช่ในไอโซโพรพานอล 99.9
เปอร์เซ็นต์ (ผงกัญชง 5 กรัม : ไอโซโพรพานอล 100
มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมา
กรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วย
เครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นทำการระเหยไอโซโพร-
พานอลออกให้เหลือเพียงกัญชงที่เข้มข้น ด้วยเครื่อง
Evaporator (ยี่ห้อ : HAHNSHIN; รุ่น : HS-10SP) ที่
อุณหภูมิ 54.85 องศาเซลเซียส ความดัน 34 MPa หรือ
4931.28 psi (Rovetto, 2017) ซึ่งมี Distiller ในการกลั่น
ไอของไอโซโพรพานอลให้เป็นของเหลว และนำเข้าสู่ตู้อบ
ลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
เพื่อระเหยไอโซโพรพานอล ให้เหลือแค่น้ำมันกัญชงที่ใช้
ในการศึกษาครั้งนี้ จากนั้นนำน้ำมันกัญชงที่ได้ส่งตรวจ
วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกัญชง คือ สาร CBD
ด้วยวิธีการ High Performance Liquid Chromatography
(HPLC) ซึ่งปริมาณสารที่ได้ เท่ากับ 189.72 มิลลิกรัมต่อ
มิลลิลิตร ซึ่งสาร CBD นั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่
ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยกำจัด
และลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายสารประกอบ
ของเซลล์ สิ่งมีชีวิตมีระบบการสร้างสารต้านการ
ออกซิเดชันเพื่อป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มการทดลองคือ สูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่ใช้ไข่แดง (Tris-egg yolk: EG) เป็นกลุ่มควบคุม เตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคในปริมาณ 1,000 mL โดยมีส่วนผสมของ Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris 30.28 g, Citric acid 17.00 g, Fructose 12.50 g, Glycerol 80 mL, Egg yolk 200 mL, Sterile water 660.22 mL ร่วมกับปรับ pH ที่ 6.5 - 6.7) และสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่มีการเสริมสารสกัดจากกัญชง (hemp extract: CBD) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 50 และ 100 ug/mL ตามลำดับ เตรียมในปริมาณ 1,000 mL เช่นเดียวกัน โดยมีส่วนผสมเหมือนกับสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่ใช้ไข่แดง เพียงแค่เติมสารสกัดจากกัญชงตามระดับความเข้มข้นที่ได้กำหนดไว้

การทดลองที่ 1 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโค

ตรวจวัดค่าความดันออสโมติกของ 5 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบ (Tris-egg yolk: EG) เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่มีสารสกัดจากกัญชงเป็นส่วนประกอบ (hemp extract: CBD) ที่ระดับความเข้มข้น CBD 5, 10, 50 และ 100 ug/mL ตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดความดันออสโมติก (osmometer) (ยี่ห้อ: Gonotec; รุ่น: Osmomat3000 Basic) ในการตรวจวัดค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการอุ่นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคให้มีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ละกลุ่มในปริมาตร 5 mL (Wadood *et al.*, 2016)

การทดลองที่ 2 การเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคแช่แข็งต่อคุณภาพตัวอสุจิภายหลังการละลาย

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคโดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) เมื่อเตรียมตัวล่อและช่องคลอด

เทียมแล้ว นำฟอพันธุ์มาเดินวนบริเวณด้านท้ายของตัวล่อ เพื่อกระตุ้นให้เกิดความกำหนัดมากที่สุด ก่อนรีดน้ำเชื้อ เมื่อฟอโคขึ้นท่อน้ำครั้งแรกให้ทำการเบี่ยงลึงค์ออกมาและใช้น้ำสะอาดในการล้างลึงค์ และเมื่อขึ้นท่อน้ำครั้งที่สองให้เบี่ยงลึงค์เข้ามาสวมในช่องคลอดเทียมอย่างนุ่มนวลและรวดเร็ว เมื่อฟอพันธุ์กระแทก แสดงว่าหลังน้ำเชื้อแล้ว กระบวนการรีดน้ำเชื้อและการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นกระบวนการตามมาตรฐานของกรมปศุสัตว์ (Uavechanichkul, 2008) อย่างถูกต้องทุกประการ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น

ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น (ประเมินด้านกายภาพ) โดยตรวจวัดปริมาณน้ำเชื้อที่ได้ สีนํ้าเชื้อ ความขุ่น-ใส และการเคลื่อนที่หมุน ซึ่งประเมินจากสายตา จากนั้นนำไปตรวจหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำไปคำนวณเพื่อหาจำนวนเซลล์อสุจิในการบรรจุลงหลอดน้ำเชื้อ โดยเครื่องจะคำนวณจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโค} = ((A \times B) / 20,000,000) \times 0.21 - A$$

โดย A = ปริมาตรน้ำเชื้อ (mL)

B = ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

และใส่นํ้ายาสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ ประกอบด้วย สูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่ใช้ไข่แดง (Tris-egg yolk: EG) เป็นกลุ่มควบคุม และสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่มีการเสริมสารสกัดจากกัญชง (hemp extract: CBD) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 50 และ 100 ug/mL ตามลำดับ ซึ่งจากการคำนวณแล้วน้ำเชื้อจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ล้านตัวต่อหลอด

กระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

หลังจากเจือจางน้ำเชื้อแล้วนำมาบรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อ (ministraw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อังเหนือไอนโตรเจนที่อุณหภูมิ -121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อลงแช่ใน

ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และนำไปเก็บรักษาในถังสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อโคแชน้ำแข็ง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีการละลายน้ำเชื้อโคแชน้ำแข็งโดยนำมาอุ่นในน้ำสะอาดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) (ยี่ห้อ: HAMILTON THORNE; รุ่น: CEROS II) ทำการตรวจประเมินคุณภาพ โดยประเมินผลร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) การตายของอสุจิ (static) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive) ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และพื้นฐานวิทยาของอสุจิ ที่เวลา 24 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS (Statistics Package for Social Sciences) ใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเปลี่ยนแปลงของค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโค

ในการเก็บรักษาน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงของระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า ค่าความดันออสโมติก (mOsmol/kg) ของกลุ่ม control (EG), CBD 5 µg/mL และ CBD 10 µg/mL ไม่มีความแตกต่างกันซึ่งมีค่าความดันออสโมติกอยู่ในระหว่าง 400 - 500 mOsmol/kg

แต่ในกลุ่ม CBD 50 µg/mL และ CBD 100 µg/mL มีค่าความดันออสโมติกสูงกว่าทั้ง 3 กลุ่ม ที่กล่าวมาซึ่งมีค่าความดันออสโมติกอยู่ในระหว่าง 500 - 600 mOsmol/kg (Table 1) อย่างไรก็ตาม ค่าความดันออสโมติกของทุกกลุ่มการทดลอง ยังคงมีค่าความดันออสโมติกที่เหมาะสมสำหรับอสุจิและไม่กระทบต่อคุณภาพการผลิตน้ำเชื้อโคแชน้ำแข็ง โดยปกติแล้วค่า osmotic pressure มาตรฐาน ของน้ำเชื้อจะเท่ากับ 320 mOsmol/kg (Ahmadi *et al.*, 2020) แต่ไม่ควรเกิน 1,537 mOsmol/kg (Liu and Foote, 1998)

เมื่ออสุจิที่อาศัยอยู่ในน้ำเชื้อกระทบกับน้ำซึ่งมีความดันออสโมติกต่ำกว่า 320 mOsmol/kg (Ahmadi *et al.*, 2020) ส่งผลทำให้อสุจิมีหางคด มีความผิดปกติกับส่วนกลาง (mid piece) ทำให้พบอสุจิที่มีความผิดปกติทางสัณฐานวิทยามากขึ้น ซึ่งมีการทดสอบผลเสียของค่าแรงดันออสโมติกระดับที่ต่ำในน้ำเชื้อโค Padrik *et al.* (2012) พบว่า การลดลงของค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อส่งผลให้เกิดการบวมน้ำ และเกิดการแตกตัวของเยื่อหุ้มอสุจิ เนื่องจากการออสโมซิสของของเหลวภายนอกเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่ำเข้าสู่เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงเช่นเดียวกับการเกิดหยदनน้ำบริเวณหางของตัวอสุจิ ดังนั้นในกระบวนการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจึงได้มีการเติมสารเคมีต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น น้ำตาลหรือเกลือซึ่งช่วยปรับแรงดันออสโมติกให้มีความใกล้เคียงกับน้ำเชื้อจากตัวสัตว์ (Jarassang, 1999)

คุณภาพน้ำเชื้อ

จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากร้อยละการตายของอสุจิ (static) พบว่า ในช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 2 สัปดาห์ กลุ่ม CBD 100 µg/mL (81.07 เปอร์เซนต์) มีร้อยละการตายมากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่หลังจากการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มอื่น ($P > 0.05$) (Figure 1)

Table 1. Comparison of osmotic pressure (mOsmol/kg) of egg yolk base extender and hemp base extender (CBD) semen diluent for different storage periods (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 hours and 1 week) at a storage temperature of 4 °C

Period (hr)	Osmotic pressure (mOsmol/kg)					P-value
	EG Extender	CBD 5 µg/mL	CBD 10 µg/mL	CBD 50 µg/mL	CBD 100 µg/mL	
0	478 ± 8.19 ^c	484 ± 8.14 ^c	491 ± 8.19 ^c	515 ± 6.39 ^b	540 ± 4.41 ^a	0.001
12	452 ± 2.40 ^d	480 ± 4.91 ^c	476 ± 6.93 ^c	512 ± 5.04 ^b	545 ± 8.09 ^a	0.000
24	469 ± 4.06 ^b	484 ± 8.45 ^b	495 ± 10.02 ^b	525 ± 11.85 ^a	543 ± 7.06 ^a	0.001
48	475 ± 6.33 ^b	484 ± 8.95 ^b	494 ± 9.24 ^b	525 ± 10.60 ^a	550 ± 10.71 ^a	0.001
72	447 ± 2.33 ^c	458 ± 2.85 ^c	485 ± 5.78 ^b	520 ± 9.26 ^a	538 ± 7.97 ^a	0.000
96	475 ± 7.00 ^b	487 ± 7.06 ^b	495 ± 8.14 ^b	523 ± 9.84 ^a	539 ± 7.02 ^a	0.001
120	449 ± 2.03 ^d	482 ± 5.93 ^c	491 ± 7.45 ^c	522 ± 8.65 ^b	547 ± 1.53 ^a	0.000
144	483 ± 8.50 ^c	491 ± 9.87 ^c	507 ± 12.71 ^{bc}	534 ± 8.97 ^{ab}	552 ± 9.29 ^a	0.003
168	480 ± 11.05 ^c	488 ± 7.80 ^c	507 ± 10.26 ^{bc}	536 ± 11.02 ^{ab}	559 ± 11.24 ^a	0.001

^{a,b,c,d} show statistically significant differences ($P < 0.05$) in rows

^{*} EG: Tris-egg yolk, CBD: Cannabidiol from hemp extract

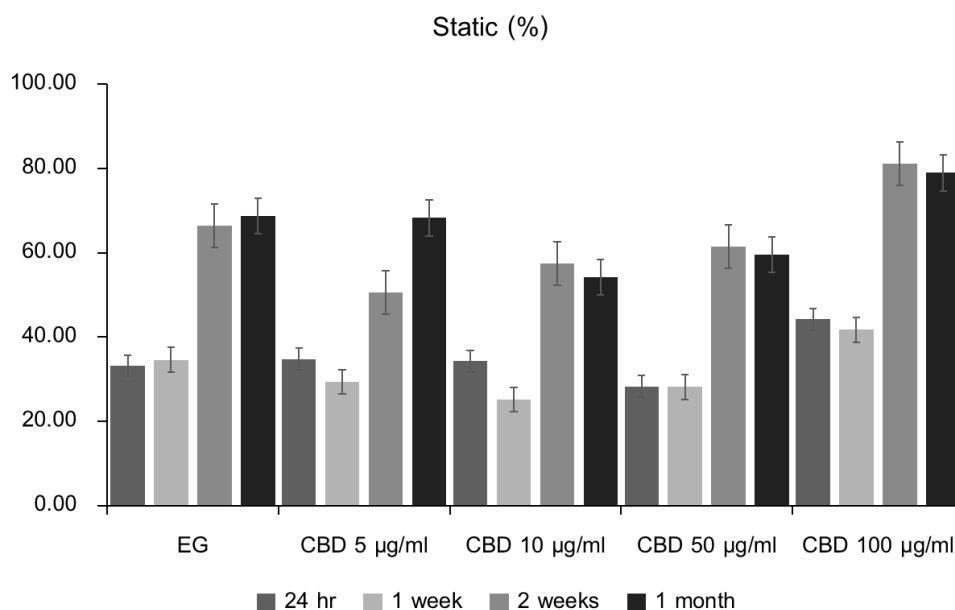


Figure 1. Percentage of mortality (static) of sperm treated with different semen freezing extender (EG: Egg yolk base extender, CBD: Hemp base extender)

สำหรับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive) พบว่า ที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่หลังจากการแช่แข็ง 2 สัปดาห์ กลุ่ม CBD 5 $\mu\text{g/mL}$ (15.39 เปอร์เซ็นต์) มีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่ากลุ่ม EG (8.67 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม CBD 50 $\mu\text{g/mL}$ (10.58 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 100 $\mu\text{g/mL}$ (2.93 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่ม CBD 10 $\mu\text{g/mL}$ (12.86 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และหลังจากการแช่แข็ง 1 เดือน กลุ่ม CBD 10 $\mu\text{g/mL}$ (15.42 เปอร์เซ็นต์) มีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่ากลุ่ม EG (4.99 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 100 $\mu\text{g/mL}$ (3.06 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่ม CBD 5 $\mu\text{g/mL}$ (7.67 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 50 $\mu\text{g/mL}$ (9.79 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Figure 2)

การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) ในช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ

กลุ่มอื่น ($P > 0.05$) ในขณะที่ช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 2 สัปดาห์ พบว่า กลุ่ม CBD 5 $\mu\text{g/mL}$ (49.43 เปอร์เซ็นต์) มีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่ากลุ่ม EG (33.63 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม CBD 50 $\mu\text{g/mL}$ (38.58 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 100 $\mu\text{g/mL}$ (18.93 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่ม CBD 10 $\mu\text{g/mL}$ (42.60 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Figure 3)

การเสริมสารสกัดกัญชงในระดับความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นได้ (ร้อยละการตายของอสุจิ, ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ, ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ และร้อยละการเคลื่อนไหวของอสุจิที่เคลื่อนที่ช้า) โดยมีรายงานว่าความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดทีฟทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งมีคุณภาพเสื่อมลง (El-Sisy *et al.*, 2007) ซึ่งส่งผลให้เกิดการผลิต reactive oxygen species (ROS) (Baumber *et al.*, 2000) ส่งผลต่อการเพิ่มระดับ lipid peroxidation ในเซลล์อสุจิที่เก็บรักษาสภาพด้วยความเย็น (Kadirvel *et al.*, 2009) ส่งผลต่อเยื่อหุ้มพลาสมาและความสมบูรณ์ของ DNA อีกทั้งการเสริม cannabidiol (CBD)

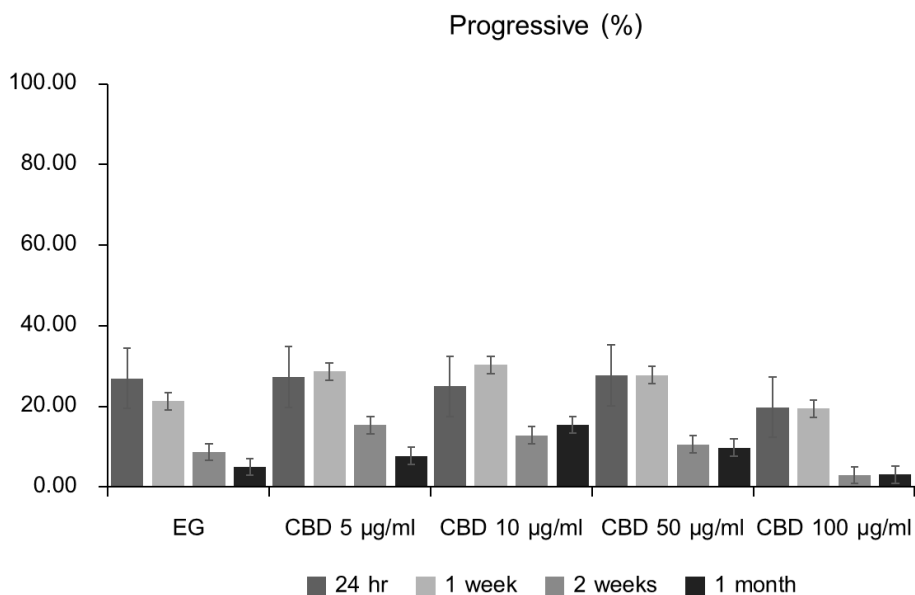


Figure 2. Percentage of forward motility (progressive) of sperm treated with different semen freezing extender (EG: Egg yolk base extender, CBD: Hemp base extender)

มีส่วนช่วยในการลดการผลิต reactive oxygen species (ROS) นอกจากนี้ยังพบว่า cannabidiol (CBD) ช่วยลดการก่อตัวของ amyloid ในเซลล์ประสาทโดยลดความเข้มข้นของไฮดรอกซีไลพิดและ cannabidiol (CBD) ยังเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการดูดซึมและการย่อยสลายของสารเอนโดแคนนาบินอยด์ ทำให้ความเข้มข้นของสารเหล่านี้เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alagbonsi *et al.* (2019) ที่ได้รายงานว่า สารสกัดกัญชาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเครียด จากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำเชื้อเป็นสารที่ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันช่วยกำจัดและลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายสารประกอบของเซลล์ที่เป็นสาเหตุการตายของอสุจิ หรือค่า static สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alagbonsi *et al.* (2019) รายงานว่าการเสริมสารสกัดกัญชาช่วยลดโปรแลคตินและเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพน้ำเชื้อหนูทดลอง โดยให้กินน้ำผสมน้ำมัน

กัญชา และทำการวิเคราะห์คุณภาพของอสุจิ จำนวนของอสุจิมีชีวิต และการเคลื่อนไหว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิ พบว่า การให้สารสกัดกัญชาช่วยเพิ่มจำนวนมีชีวิตของอสุจิ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิสมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม ในขณะที่การให้สารสกัดกัญชาและโปรโมคริปตินทำให้โปรแลคตินในเลือดในพลาสมาลดลง และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

สัณฐานวิทยาของอสุจิ

สำหรับอสุจิที่มีสัณฐานวิทยารูปแบบหางคด (bent tail) พบว่า ในช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง กลุ่ม CBD 100 µg/mL (41.16 เปอร์เซ็นต์) มีอสุจิที่มีหางคดมากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่หลังการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 2)

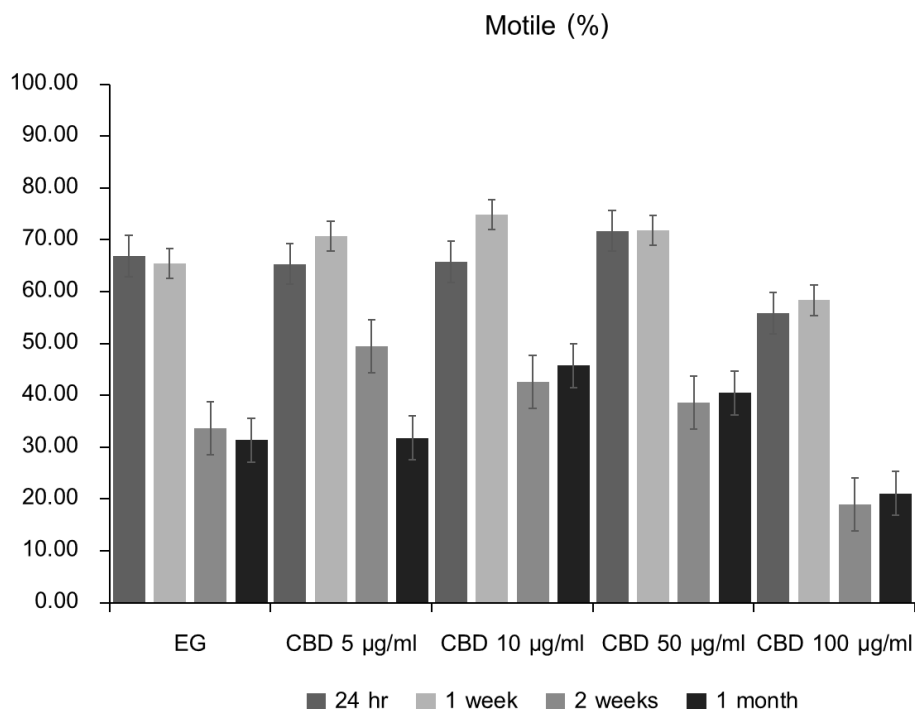


Figure3. Percentage of sperm motility (motile) that received different extender for freezing semen
(EG: Egg yolk base extender, CBD: Hemp base extender)

Table 2. Comparison results of morphology when receiving different semen extender after thawing (EG: Egg yolk base extender, CBD: Hemp base extender)

Concentration		24 hr	1 week	2 weeks	1 month
Bent Tail (%)	EG	37.92 ± 0.23 ^b	31.52 ± 0.64	17.74 ± 2.71	16.86 ± 1.93
	CBD 5 µg/mL	37.71 ± 1.11 ^b	34.28 ± 3.88	11.72 ± 2.47	11.91 ± 3.10
	CBD 10 µg/mL	36.74 ± 1.28 ^b	32.57 ± 3.12	12.88 ± 0.90	20.88 ± 1.23
	CBD 50 µg/mL	35.80 ± 0.84 ^b	29.63 ± 0.99	17.10 ± 2.97	24.06 ± 4.36
	CBD 100 µg/mL	41.16 ± 0.32 ^a	37.08 ± 0.20	18.87 ± 2.08	16.81 ± 2.47
	<i>P</i> -value	0.014	0.268	0.201	0.096
Coiled Tail (%)	EG	2.07 ± 0.34 ^a	1.59 ± 0.35	1.13 ± 0.20 ^{ab}	1.19 ± 0.45
	CBD 5 µg/mL	2.36 ± 0.27 ^a	1.46 ± 0.49	0.70 ± 0.09 ^c	1.07 ± 0.30
	CBD 10 µg/mL	1.83 ± 0.47 ^{ab}	1.09 ± 0.10	0.68 ± 0.10 ^c	1.27 ± 0.05
	CBD 50 µg/mL	0.78 ± 0.08 ^b	1.17 ± 0.16	0.80 ± 0.02 ^{bc}	1.06 ± 0.28
	CBD 100 µg/mL	2.72 ± 0.43 ^a	1.88 ± 0.17	1.18 ± 0.05 ^a	1.07 ± 0.12
	<i>P</i> -value	0.024	0.365	0.020	0.974
Proximal Droplet (%)	EG	3.10 ± 0.36	1.87 ± 0.12	4.49 ± 0.38	3.69 ± 0.66 ^b
	CBD 5 µg/mL	3.18 ± 0.51	1.90 ± 0.59	3.84 ± 0.07	3.27 ± 0.75 ^b
	CBD 10 µg/mL	2.66 ± 1.16	1.24 ± 0.43	3.77 ± 0.14	13.98 ± 1.79 ^a
	CBD 50 µg/mL	1.48 ± 0.45	1.38 ± 0.26	4.84 ± 1.11	11.81 ± 1.02 ^a
	CBD 100 µg/mL	4.39 ± 0.24	2.38 ± 0.16	5.09 ± 0.64	4.23 ± 0.21 ^b
	<i>P</i> -value	0.088	0.249	0.469	<0.001

^{a,b,c} show statistically significant differences ($P < 0.05$) in column

^a EG: Egg yolk base extender, CBD: Hemp base extender

ลักษณะสัณฐานวิทยาอสุจิที่มีรูปแบบหางคดเป็นวง (coiled tail) พบว่า ในช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง กลุ่ม CBD 100 µg/mL (2.72 เปอร์เซ็นต์) มีอสุจิที่มีหางคดเป็นวงมากกว่ากลุ่ม CBD 50 µg/mL (0.78 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มอื่น และช่วงเวลาหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่ช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 2 สัปดาห์ กลุ่ม CBD 100 µg/mL (1.18 เปอร์เซ็นต์) มีอสุจิที่หางคดเป็นวงมากกว่ากลุ่ม CBD 5 µg/mL (0.70 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม CBD 10 µg/mL (0.68 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 50 µg/mL (0.80 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่ม EG (1.13 เปอร์เซ็นต์) (Table 2)

อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัว (proximal droplet) พบว่า ในช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่ช่วงเวลาหลังการแช่แข็ง 1 เดือน กลุ่ม CBD 10 µg/mL (13.98 เปอร์เซ็นต์) มีอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัวมากกว่ากลุ่ม EG (3.69 เปอร์เซ็นต์) กลุ่ม CBD 5 µg/mL (3.27 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม CBD 100 µg/mL (4.23 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่ม CBD 50 µg/mL (11.81 เปอร์เซ็นต์) (Table 2)

จากการทดลองพบว่า สัณฐานวิทยาของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/mL มีค่าอสุจิที่มีหางคด (bent tail) และอสุจิที่มีหางคดเป็นวง (coiled tail) มากกว่าทุกกลุ่มการทดลอง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) มีรายงานว่า CBD ส่งผลต่อพฤติกรรมทางเพศ สัตว์ฐานวิทยาของตัวอสุจิ และความอุดมสมบูรณ์ของอะโครโซม และยังคงส่งผลต่อพฤติกรรมทางเพศของหนู (Carvalho *et al.*, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับ Payne *et al.* (2019) ได้รายงานไว้ว่า สารกลุ่ม แคนนาบินอยด์มีผลต่อความผิดปกติของลักษณะ สัตว์ฐานวิทยาของอสุจิสูง ในหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 35 วัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Thun *et al.* (2002) ยังพบความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ CASA ที่อาจตรวจนับผิดพลาดจากการเสริมสารสกัดกัญชงในระดับที่สูงขึ้นจึงพบปริมาณของอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณหางและบริเวณกลางตัวของอสุจิจากกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดกัญชงมากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่ง CBD เป็นหนึ่งในไฟโตแคนนาบินอยด์ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และมีสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังอยู่ในกลุ่มของสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการคลายความวิตกกังวล (Carvalho *et al.*, 2018) ดังนั้น ปริมาณ CBD ที่สูงขึ้นอาจช่วยลดความเครียดและมีส่วนทำให้สมรรถภาพทางเพศของสัตว์ดีขึ้น และปริมาณ CBD ที่ต่ำกว่าอาจส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อความเครียดและขัดขวางพฤติกรรมทางเพศ ดังนั้นการประเมินทางสัตวฐานวิทยาของเซลล์อสุจิของหนูแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัตวฐานวิทยาของอสุจิส่วนหางของ epididymis หลังการให้ CBD แบบเฉียบพลัน (Zimmerman *et al.*, 1982) ในทางกลับกันจากการประเมินเซลล์อสุจิของหนูที่อยู่ใน epididymal cauda (Patra and Wadsworth, 1991) และใน vas deferens (Carvalho *et al.*, 2018) หลังการให้ CBD เป็นระยะเวลานานส่งผลให้เกิดความผิดปกติในสัตวฐานวิทยาของหัวและหางของตัวอสุจิเพิ่มขึ้น

สรุป

จากการศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่าความดันออสโมติกของน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค พบว่า สารสกัดกัญชงสามารถใช้เสริมในน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคได้ที่มีความเข้มข้นที่ระดับ 5 และ

10 µg/mL เนื่องจากระดับการเสริมสารสกัดดังกล่าวยังคงค่าความดันออสโมติกของน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคให้อยู่ในระดับที่นำไปใช้งานได้ และจากการศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงความเข้มข้นที่ระดับ 5 µg CBD/mL ในน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค พบว่า เมื่อละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็งจากน้ำยาที่มีการเสริมสารสกัดกัญชง ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคพื้นฐานที่ไม่มีการเสริมสารสกัดกัญชง อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ดำเนินการอย่างต่อเนื่องคือการทดสอบคุณสมบัติของอสุจิในการทดสอบภาคสนาม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์ทดสอบ วิจัย และพัฒนากัญชงอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ใบกัญชงในการทำวิจัย และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อโครงการหลวงอินทนนท์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทดลอง สัตว์ทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทำให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Ahmadi, E., H. Nazari, N. Davoodian and A. Kadivar. 2020. Feasibility of long-term ovine epididymal spermatozoa preservation in a simple extender containing egg yolk. *Journal of Livestock Science and Technologies* 8(1): 59-67.
- Alagbonsi, A.I., L.A. Olayaki, H.A. Abdulrahim, T.S. Adetona and G.T. Akinyemi. 2019. Cannabinoid-deficient Benin republic hemp

- (*Cannabis sativa* L.) improves semen parameters by reducing prolactin and enhancing anti-oxidant status. BMC Complementary and Alternative Medicine 19(1): 132, doi: 10.1186/s12906-019-2541-5.
- Apimeteetumrong, M., J. Chansaad, B. Jongrakwattana, W. Khacheerum, A. Chumkaew and N. Leangcharuen. 2013. Pregnancy rate after timed insemination in goats synchronized for estrous for with short-term protocol. Agricultural Science Journal 44 1(Suppl.): 207-210. (in Thai)
- Baumber, J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina and M.C. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology 21(6): 895-902.
- Carvalho, R.K., M.L. Santos, M.R. Souza, T.L. Rocha, F.S. Guimarães, J.A. Anselmo-Franci and R. Mazaro-Costa. 2018. Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice. Journal of Applied Toxicology 38(9): 1215-1223.
- Jarassaeng, C. 1999. Semen Quality. Department of Surgery and Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University. Khon Kaen. 91 p. (in Thai)
- Department of Livestock Development. 2 012. Preparation of cattle strategic. (Online) . Available: <http://extension.dld.go.th/th1/> (June 5, 2021). (in Thai)
- El-Sisy, G.A., W.S. El-Nattat and R.I. El-Sheshtawy. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. Online Journal of Veterinary Research 11: 55-61.
- El-Sisy, G.A., W.S. El-Nattat, R.I. El-Sheshtawy and A.M.A. El-Maaty. 2016. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. Asian Pacific Journal of Reproduction 5(6): 514-518.
- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S.M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini and M.H. Nasr-Esfahani. 2010. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology 73: 480-487.
- Kadirvel, G., S. Kumar, A. Kumaresan and P. Kathiravan. 2009. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. Animal Reproduction Science 116(3-4): 244-253.
- Liu, Z. and R.H. Foote. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. Journal of Dairy Science 81(7): 1868-1873.
- Padrik, P., T. Hallap, T. Kaart, T. Bulitko and Ü. Jaakma. 2012. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. Czech Journal of Animal Science 57(10): 490-497.
- Patra, P.B. and R.M. Wadsworth. 1991. Quantitative evaluation of spermatogenesis in mice following chronic exposure to cannabinoids. Andrologia 23(2): 151-156.
- Payne, K.S., D.J. Mazur, J.M. Hotaling and A.W. Pastuszak. 2019. Cannabis and male

- fertility: A systematic review. The Journal of Urology: 202(4): 674-681.
- Rehman, F.U., C. Zhao, M.A. Shah, M.S. Qureshi and X. Wang. 2013. Semen extenders and artificial insemination in ruminants. Veterinaria 1(1): 1-8.
- Rovetto, L.J. and N.V. Aieta. 2017. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. The Journal of Supercritical Fluids 129: 16-27.
- Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology 57(3): 1087-1094.
- Uavechanichkul, R. 2008. Instruction Manual Control of Semen Quality Artificial Insemination Bull. Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development, Bangkok. 177 p. (in Thai)
- Wadood, F., M. Aleem, A. Ijaz, N. Ahmad, M.S. Yousaf and D.H. Mughal. 2016. Effect of extender osmolality and butylated hydroxy toluene supplementation on post thaw quality and fertility of Nili Ravi buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. The Journal of Animal & Plant Sciences 26(3): 605-611.
- Zimmerman, D.M., S.E. Smits, M.D. Hynes, B.E. Cantrell, M. Reamer and R. Nickander. 1982. Structural requirements for affinity and intrinsic activity at the opiate receptor defined in 4-phenylpiperidine and related series. pp. 112-118. In: Proceedings of the 41st Annual Scientific Meeting: Problems of Drug Dependence, 1981. The Committee on : Problems of Drug Dependence, Inc., San Francisco, CA.
-