

ผลของการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิต่ำ

Effects of Hemp Extract Supplementation in Semen Extender on Boar Semen Quality at Chilled Temperature

กัญญาณัฐ ไชยวรรณ¹ วาที คงบรรทัด² พชรพร ตาดี¹ ตะวัน ฉัตรสูงเนิน³
วรรณลักษณ์ ถาวร¹ พัชรพร พรหมตัน¹ และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์^{1*}

Kanyanat Chaiwan¹, Watee Kongbuntad², Phacharaporn Tadee¹, Tawan Chaisungnoen³,
Wannaluk Thawornand¹, 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

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

*Corresponding author: E-mail: Wpattanawong@gmail.com

(Received: 3 April 2023; Accepted: 23 June 2023)

Abstract: The main problem with artificial insemination on small farms in Thailand is the chilled storage of boar semen, which results in oxidative stress affecting to reduce semen quality of boar. Therefore, this study was conducted to supplement the hemp extract containing cannabinoids as antioxidants in chilled boar semen extenders. Semen samples from 2 boars (Duroc Jersey) were diluted with Beltsville thawing solution extender (BTS) enriched with hemp extract at 5 levels of cannabidiol (CBD) concentrations: 0, 5, 10, 25, and 50 µg CBD /ml. The semen samples were kept at 17 °C for 0, 12, 24, 48, and 72 hours and analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) to determine the percentages of motile, static, and progressive sperm. It was found that the static of the group supplemented with hemp extract with 5 µg CBD/ml tended to be the lowest, and the progressive tended to be the highest. Especially, 12 hours of storage were statistically significant ($P < 0.05$). Finally, the use of extenders containing 5 µg CBD/ml of hemp extract was shown to be a trend in maintaining the quality of sperm in boar semen extenders used as a chilled semen formula.

Keywords: Hemp extract, extender, semen quality, boar

บทคัดย่อ: ปัญหาหลักของกระบวนการผสมเทียมในฟาร์มเกษตรกรรมรายย่อยในประเทศไทยคือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งเกิดจาก oxidative stress ทำให้ลดคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเสริมสารสกัดกัญชงที่ประกอบด้วยสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidants ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยทำการรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ดรูคเจอร์ซี จำนวน 2 ตัว มาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรมาตรฐาน (Beltsville thawing solution extender; BTS) ที่เสริมสารสกัดกัญชงโดยคำนวณจากระดับความเข้มข้นของสาร cannabidiol (CBD) ที่เหมาะสม 5 ระดับได้แก่ 0, 5, 10, 25 และ 50 µg CBD/ml จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ศึกษาวิเคราะห์หรืออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) ร้อยละการตายของอสุจิ (static) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive) ด้วย computer assisted sperm analysis; CASA พบว่า ร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg CBD/ml มีแนวโน้มต่ำที่สุด และร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสารสกัดกัญชงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำเชื้อสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชง น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ คุณภาพน้ำเชื้อ สุกรพ่อพันธุ์

คำนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรนิยมใช้การ-จัดการด้วยเทคโนโลยีผสมเทียมที่ใช้น้ำเชื้อสดผ่านการ-เจือจาง เพื่อผสมเทียมให้แม่สุกรหลายตัว โดยต้องไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องและขนาดครอกเมื่อเปรียบเทียบกับการผสมแบบธรรมชาติ (Gadea, 2003) แต่ในความเป็นจริงมีหลายปัจจัยทั้งประสิทธิภาพการ-ผลิตน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ ระหว่างการเจือจางน้ำ และการ-เก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนผสมเทียมที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิ เช่น การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ความเครียดจากการออกซิเดชันระยะเวลาการเก็บรักษา ที่มีผลทำให้อสุจิมีประสิทธิภาพลดลงหากอุณหภูมิในการเก็บรักษาสูงกว่า 12 °C ระยะเวลามากกว่า 4 วัน (Lopez Rodriguez *et al.*, 2017) โดยส่วนใหญ่ น้ำ-เชื้อสุกรทำการเก็บรักษาด้วยที่อุณหภูมิ 15-18 °C เนื่องจากน้ำเชื้อสุกรมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำหรือเรียกว่า ปรากฏการณ์ช็อกจากความเย็น (cold shock phenomenon) (Wiebke *et al.*, 2021) แต่คุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ลดลงในขั้นตอนการแช่เย็นเพื่อเก็บรักษาสำหรับการใช้งานผสมเทียม มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ

(free radical) ไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งโปรตีน และไขมัน (Painupong, 2017) ซึ่งสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่าง ๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของเซลล์จากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หากมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไปหรือขาดสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานทำให้มีความเสี่ยงที่ทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มอสุจิ ความผิดปกติของอสุจิ และส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิในที่สุด (Bansal and Bilaspuri, 2011) และลดการผลิต ATP ในอสุจิสุกรส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Park *et al.*, 2018) ปัจจุบันจึงมีการ-เติมสาร antioxidants จากพืชต่าง ๆ เพื่อลดปฏิกิริยา ดังกล่าว (Ros-Santaella and Pintus, 2021) ทางผู้วิจัยมีความสนใจในพืชกัญชง (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) ที่มีองค์ประกอบของสารสำคัญได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids/ phytocannabinoids) (Taoufik *et al.*, 2017) โดยสาร CBD เป็นสารแคนนาบินอยด์ที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (nonpsychoactive

cannabinoid) โดยอาศัยการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ cannabinoids receptor 2 (CNR2), transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) และ orphan G-protein coupled receptor 55 (GPR55) เป็นต้น ที่ส่งผลต่อการผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (Jaidee and Sootanan, 2022) มีรายงานว่า การใช้ BHE (Benin republic hemp ethanol extract) ในระดับความเข้มข้นที่ 2 และ 10 mg/kg ช่วยเพิ่มจำนวนมีชีวิตของอสุจิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิสมบูรณ์ โปรแลคตินในเลือดในพลาสมาลดลง และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลอง (Alagbonsi *et al.*, 2019) ทั้งนี้การเพิ่มสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มเพิ่มความเป็นต่างในน้ำเชื้อทันทีหลังการเจือจาง (Vyt *et al.*, 2004) ดังนั้นจากคุณสมบัติดังกล่าวที่กัญชงมีสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสนใจในการนำสารสกัดกัญชงมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรพ่อพันธุ์ดอร์คเจอร์ซี อายุ 10 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 170 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว โดยเลี้ยงในคอกเลี้ยงเดี่ยวพื้นที่ 2 × 2 เมตร ภายในโรงเรือนแบบเปิด ณ ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และทำการรีดน้ำเชื้อสำหรับการทดลองจำนวน 2 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างในการรีด 1 สัปดาห์ (1 ครั้งต่อสัปดาห์) หมายเลขขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง Approval No. MACUC004A/2565

การเตรียมสารสกัดกัญชง

นำใบกัญชงสดหลังการเก็บเกี่ยวอบที่อุณหภูมิร้อน ที่อุณหภูมิ 45 °C (Chasiotis *et al.*, 2021) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำใบกัญชงที่อบแห้งแล้ว มาทำการบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด และทำการแช่ผงกัญชงในไอโซ-

โพรพิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ผงกัญชงปริมาณ 5 กรัม ต่อไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วยเครื่องสุญญากาศ ทำการระเหยไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ออกให้เหลือเพียงสารสกัดกัญชงที่เข้มข้น ด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมด (Manosroi *et al.*, 2019) และทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญคือ cannabidiol (CBD) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) โดยศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการแพทย์สำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การทดสอบความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงต่อแรงดันออสโมติกในน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกร

ศึกษาแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่เหมาะสมก่อนนำมาเจือจางน้ำเชื้อสุกร โดยนำสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกรมาตรฐาน (Beltsville thawing solution extender; BTS) ปรับค่าความเข้มข้นต่างที่ 7.2 แบ่งกลุ่มตัวอย่างเพื่อเสริมสารสกัดหยาบจากกัญชงโดยคำนวณจากระดับความเข้มข้นของสาร cannabidiol (CBD) 9 ระดับ ได้แก่ 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/ml จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่า osmotic pressure ด้วย osmometer ยี่ห้อ Gonotec model: osmomat 030-D ตามวิธีการของ Perez-Llano *et al.* (2001)

การศึกษาความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงในการเจือจางน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกร

ทำการรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์และมีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนทำการเจือจาง โดยความเป็นกรดต่างของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 6.8-7.5 ความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อไม่ต่ำกว่า 0.2×10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร จำนวนอสุจิมากกว่า 45×10^9 ตัว ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่า 60 % ตัวอสุจิที่รูปร่างปกติมากกว่า 60 % (Chomchai, 1999) จากนั้นจึงแบ่งน้ำเชื้อเจือจางที่ตามกลุ่มการทดลอง ดังนี้ BTS- extender, BTS+ CBD 5 µg/ml, BTS + CBD 10 µg/ml, BTS+ CBD 25 µg/ml

และ BTS+CBD 50 µg/ml (BTS= Beltsville thawing solution extender, CBD= สารสกัดกัญชง) โดยกำหนดให้ออสโมติกมีความเข้มข้นเฉลี่ย 3×10^9 ตัวต่อได้ส มีปริมาณ 85 ml/ได้ส บรรจุในหลอดสูญญากาศ (Chomchai, 1999) จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง computer assisted sperm analysis (CASA) ในการประเมินวิเคราะห์ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ ร้อยละการตายของอสุจิ ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ลักษณะการเคลื่อนที่และสัญญาณวิทยาของอสุจิ Amann and Waberski, 2014)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อถูกวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS 16.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบหาความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงต่อแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่มีความเข้มข้น 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/ml มีค่าแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเท่ากับ 337, 350, 356, 385, 387, 444, 588, 863 และ 1,421 mOsm/kg ตามลำดับ ดัง Figure 1 แสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงในน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกรจำนวน 5 ระดับได้แก่ระดับที่ 0 (กลุ่มควบคุม), 5, 10, 25, และ 50 µg/ml และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้ออยู่ที่ 7.2 - 8.0 ซึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงดันออสโมติกของน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกรเพื่อใช้ในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกรต่อไป

การทดลองสามารถเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อได้ทั้งหมด 5 ระดับได้แก่ 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, และ 50 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sonseeda et al. (2011) และ Rodríguez-Gil and Rigau (1996) ที่ระบุว่าโดยปกติแล้วมีค่า osmotic pressure

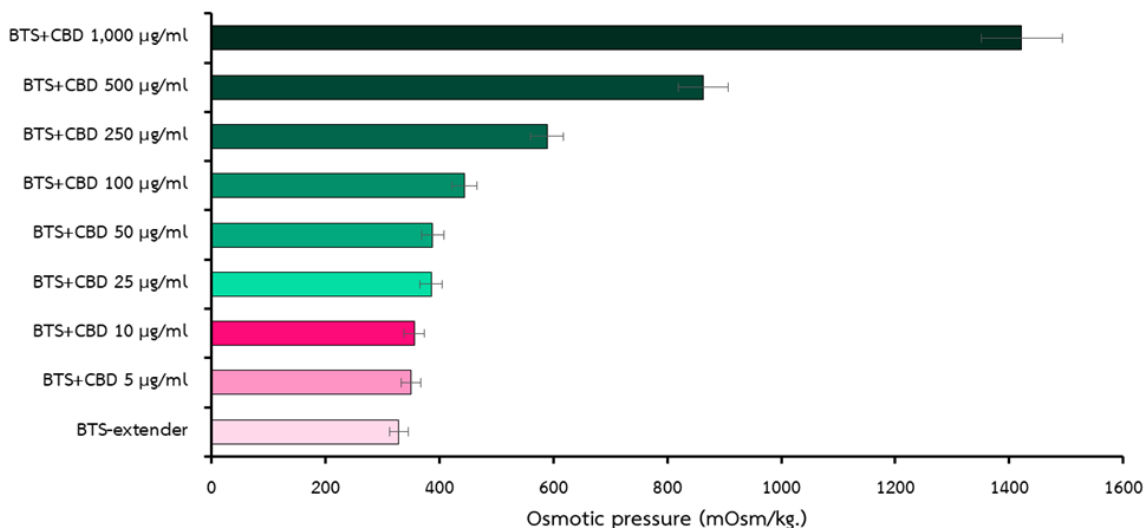


Figure 1. Effect of hemp extract levels in chilled boar extender of osmotic pressure

ของเหลวในร่างกายสุกรอยู่ที่ 290-300 mOsm/kg และอสุจิสุกรสามารถทนค่า osmotic pressure อยู่ได้ในช่วงระหว่าง 240-380 mOsm/kg (King and Macpherson, 1966) ค่า osmotic pressure ต่ำกว่า 200 mOsm/kg มีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่ำลง (Rodríguez-Gil and Rigau, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาแรงดันออสโมติกน้ำเชื้อสุกรของ Yeste *et al.* (2010) ได้กล่าวว่า โดยจากรายงาน Perez-Llano *et al.* (2001) พบว่า ค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อสูงกว่า 500 mOsm/kg หรือต่ำกว่า 200 mOsm/kg อสุจิที่มีร้อยละการมีชีวิตและร้อยละอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีการทดสอบผลเสียของค่าแรงดันออสโมติกในระดับที่ต่ำในน้ำเชื้อโค Padrik *et al.* (2012) พบว่า การลดลงของค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อส่งผลให้เกิดการบวมน้ำและเกิดการแตกตัวของเยื่อหุ้มอสุจิ เนื่องจากการออสโมซิสของของเหลวภายนอกเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่ำเข้าสู่เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงเช่นเดียวกับการเกิดหยดน้ำบริเวณหางของอสุจิ อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษาค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อแมวของ Prochowska *et al.* (2022) แต่ในทางกลับกันผลเสียของค่าแรงดันออสโมติกระดับสูง ซึ่ง Caiza de la Cueva *et al.* (1997a) ได้ศึกษาในน้ำเชื้อสุกรที่ค่า 600-4,000 mOsm พบว่า ร้อยละการมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการออสโมซิสของของเหลวภายในเซลล์ที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำออกจากเซลล์ ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่าจึงทำให้เกิดสภาวะ hyperosmotic (Einarsson *et al.*, 1970) เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อม้าอีกด้วย (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997b)

คุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นและจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

ร้อยละการตายของอสุจิ (static) พบว่า ร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มต่ำที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ($P < 0.05$) และมีแนวโน้มร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มควบคุม

(BTS-extender) และกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml ต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml (Table 1) ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive) พบว่า ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Table 1) ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) พบว่า ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Table 1)

กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml อสุจิมีความเร็วเฉลี่ยแบบจุดต่อจุด (VAP: average path velocity) ที่มีแนวโน้มสูงที่สุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2a) ความเร็วเฉลี่ยของอสุจิเป็นเส้นตรง (VSL: straight line velocity) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2b) ความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของอสุจิ (VCL: curvilinear velocity) พบว่า อสุจิก่อนที่ไม่เสริมสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มสูงที่สุดหลังระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 6 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2c) ความกว้างในการส่ายหัวของอสุจิ (ALH: amplitude of lateral head displacement) พบว่า อสุจิก่อนที่ไม่เสริมสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มสูงที่สุดหลังระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 6 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2d) ค่าความถี่ในการส่ายหัวของอสุจิเคลื่อนที่ผ่านระนาบการเคลื่อนที่ (BCF: beat cross frequency) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 25 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุดในระยะเวลาการเก็บรักษาชั่วโมงที่ 6, 12 และ 24 ($P < 0.05$) (Figure 2e) ค่าสัมประสิทธิ์ของระยะทางเส้นตรงของอสุจิ (STP: straightness coefficient) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2f) ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้เคียงที่อสุจิจะวายเป็นเส้นตรง (LIN: Linear Coefficient) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัด

Table 1. Storage period on the quality of boar semen (mean $\pm$ SE)

Semen quality		Treatment					P-value
		BTS	BTS+CBD 5 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 10 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 25 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 50 $\mu\text{g/ml}$	
Static (%)	0 hr	43.47 ^b $\pm$ 3.39	43.58 ^b $\pm$ 10.24	48.27 ^b $\pm$ 8.28	91.93 ^a $\pm$ 3.28	94.71 ^a $\pm$ 2.20	<0.01
	6 hr	37.70 ^b $\pm$ 4.53	30.98 ^b $\pm$ 4.52	38.40 ^b $\pm$ 3.93	92.63 ^a $\pm$ 2.54	99.55 ^a $\pm$ 0.11	<0.01
	12 hr	39.80 ^{ab} $\pm$ 6.60	28.48 ^c $\pm$ 5.89	51.58 ^b $\pm$ 5.53	93.35 ^a $\pm$ 1.79	99.45 ^a $\pm$ 0.20	<0.01
	24 hr	58.65 ^b $\pm$ 5.93	47.45 ^b $\pm$ 8.09	57.02 ^b $\pm$ 3.90	90.70 ^a $\pm$ 1.29	99.55 ^a $\pm$ 0.20	<0.01
	48 hr	56.07 ^b $\pm$ 8.29	75.32 ^{ab} $\pm$ 9.80	49.43 ^b $\pm$ 8.19	66.10 ^b $\pm$ 12.71	99.48 ^a $\pm$ 0.16	0.001
	72 hr	81.88 ^a $\pm$ 7.94	86.57 ^{bc} $\pm$ 4.67	93.73 ^{abc} $\pm$ 1.28	99.03 ^{ab} $\pm$ 0.97	102.76 ^a $\pm$ 1.39	0.031
Progressive (%)	0 hr	10.67 ^a $\pm$ 1.56	13.58 ^a $\pm$ 5.22	8.98 ^a $\pm$ 2.68	0.12 ^b $\pm$ 0.05	0.05 ^b $\pm$ 0.05	<0.01
	6 hr	15.87 ^a $\pm$ 1.98	15.72 ^a $\pm$ 3.27	8.67 ^b $\pm$ 2.80	0.47 ^c $\pm$ 0.18	0.00 ^c $\pm$ 0.00	<0.01
	12 hr	16.27 ^{ab} $\pm$ 4.04	22.07 ^a $\pm$ 5.03	7.50 ^{bc} $\pm$ 2.28	0.48 ^c $\pm$ 0.21	0.05 ^c $\pm$ 0.02	<0.01
	24 hr	7.10 ^{ab} $\pm$ 1.79	12.50 ^a $\pm$ 4.54	4.05 ^{bc} $\pm$ 1.15	0.52 ^{bc} $\pm$ 0.13	0.00 ^c $\pm$ 0.00	<0.01
	48 hr	10.48 ^a $\pm$ 3.35	2.83 ^{ab} $\pm$ 1.55	9.57 ^a $\pm$ 3.70	8.55 ^{ab} $\pm$ 3.84	0.00 ^c $\pm$ 0.00	0.048
	72 hr	2.87 ^a $\pm$ 1.38	1.45 ^{ab} $\pm$ 0.58	0.38 ^b $\pm$ 0.16	0.15 ^b $\pm$ 0.08	0.03 ^b $\pm$ 0.02	0.036
Motile (%)	0 hr	56.53 ^a $\pm$ 3.39	56.42 ^a $\pm$ 10.24	51.73 ^a $\pm$ 8.28	3.90 ^b $\pm$ 1.24	0.57 ^b $\pm$ 0.17	<0.01
	6 hr	62.30 ^a $\pm$ 4.53	69.02 ^a $\pm$ 4.52	61.60 ^a $\pm$ 3.93	7.37 ^b $\pm$ 2.54	0.45 ^b $\pm$ 0.11	<0.01
	12 hr	60.20 ^{ab} $\pm$ 6.60	71.52 ^a $\pm$ 5.89	48.42 ^b $\pm$ 5.53	6.65 ^c $\pm$ 1.79	0.55 ^c $\pm$ 0.20	<0.01
	24 hr	41.35 ^a $\pm$ 5.93	52.55 ^a $\pm$ 8.09	42.98 ^a $\pm$ 3.90	9.30 ^b $\pm$ 1.29	0.45 ^b $\pm$ 0.20	<0.01
	48 hr	43.93 ^a $\pm$ 8.29	24.68 ^{ab} $\pm$ 9.80	50.57 ^a $\pm$ 8.19	33.90 ^a $\pm$ 12.71	0.63 ^b $\pm$ 0.13	0.001
	72 hr	18.12 ^a $\pm$ 7.94	13.43 ^{ab} $\pm$ 4.67	6.27 ^{ab} $\pm$ 1.28	2.22 ^b $\pm$ 0.75	0.37 ^b $\pm$ 0.08	<0.01

^{a,b,c} There was a statistical difference in confidence levels $P < 0.05$ in row. SE: Standard error; BTS: Beltsville thawing solution extender

กัญชงระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีแนวโน้มสูงสุดในช่วงเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Figure 2g)

จากผลการทดลองพบว่า การเสริมสารสกัดกัญชงในระดับความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นได้ (ร้อยละการตายของอสุจิ, ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และ ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ) โดย Alagbonsi *et al.* (2019) ได้รายงานว่าการสกัดกัญชงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำเชื้อเป็นสารที่ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันช่วยกำจัดและลดปริมาณ

อนุมูลอิสระ ไม่ให้ไปทำลายสารประกอบของเซลล์ ที่เป็นสาเหตุการตายของอสุจิ หรือค่า static ดังรายงานข้างต้น หากได้รับในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Alagbonsi *et al.* (2019) ได้ศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงเพื่อลดโปรแลคตินและเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพน้ำเชื้อหนูทดลอง โดยให้กินน้ำผสมน้ำมันกัญชาวิเคราะห์คุณภาพของอสุจิ จำนวนของอสุจิมิชีวิต และการเคลื่อนไหว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิพบว่า การให้สารสกัดกัญชงทั้งสองขนาดช่วยเพิ่มจำนวนมีชีวิตของอสุจิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิสมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม ในขณะที่

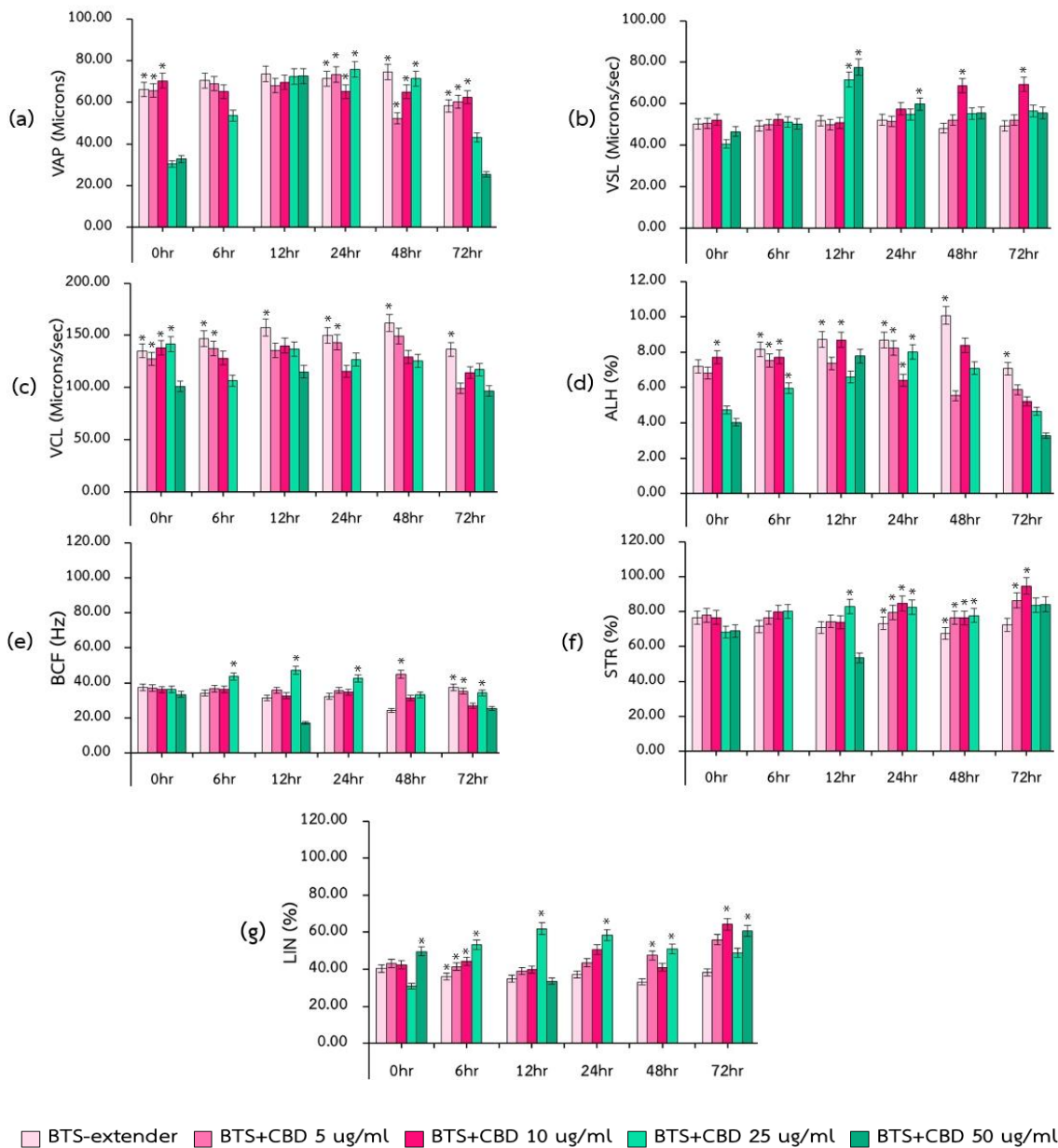


Figure 2. Sperm kinetics: VAP: average path velocity (a); VSL: straight line velocity (b); VCL: curvilinear velocity (c); ALH: amplitude of lateral head displacement (d); BCF: beat cross frequency (e); STP: straightness coefficient (f); LIN: linear coefficient (g). a statistical difference in confidence levels $P < 0.05$;

การให้สารสกัดกัญชาและโบรโมคริปทีน (bromocriptine) ทำให้โปรแลคตินในเลือดในพลาสมาลดลง และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังรายงานของ Shepherd *et al.* (2022) ที่ได้ศึกษาการเสริม GameteGuard®-CP ซึ่งเป็นส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชธรรมชาติในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกร ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการปฏิสนธิ พบว่า การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ GameteGuard®-CP ช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C อัตราการปฏิสนธิและอัตราการคลอดดีขึ้นเมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้นานถึง 4 วัน เนื่องจากน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่อุณหภูมิ 17 °C มีการเมตาบอลิซึมลดลง ส่งผลให้มีการผลิต reactive oxygen species (ROS) อย่างต่อเนื่องจากการประมิณปฏิกริยาต่อต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด พบว่า กลุ่มที่เสริม GameteGuard®-CP มีปฏิกริยาการต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยลดการผลิตของ ROS และส่งผลให้การผลิต malondialdehyde: MDA ลดลง ไมโทคอนเดรียของอสุจิที่ได้รับสารเสริมอยู่ได้นานขึ้น ซึ่งปกติแล้วเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเปิดการซึมผ่านเพื่อตอบสนองต่อ ROS ในปริมาณมากเมื่อความเข้มข้นของ ROS อยู่ในเกณฑ์เกินความจุของไมโทคอนเดรีย จึงเกิดการซึมผ่านทำให้สูญเสียศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและการส่งสัญญาณการเหนี่ยวนำกระบวนการ- apoptotic นำไปสู่การเพิ่มการผลิต ROS และ lipid peroxidation ส่งผลเสียต่อเซลล์ซึ่ง Gamete-Guard®-CP อาจส่งผลให้ความเข้มข้นของ ROS โดยรวมลดลง ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการซึมผ่านและส่งผลให้การตายของเซลล์ลดลงในที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vitorovic *et al.* (2021) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเมล็ดกัญชาในระดับ 12.5, 18.7, 31.2, 62.5 และ 125 µl/ml มีผลต่อความเครียดจากการออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำความเครียดด้วย H₂O₂ ของตัวอ่อนแมลงหวี่พบว่า น้ำมันเมล็ดกัญชาในระดับที่ 18.7 และ 31.2 µl/ml สามารถป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยน้ำมันเมล็ดกัญชามีปริมาณของไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงมีสาร secondary metabolites ที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และ

ลดการทำงานของ catalase ให้ถึงระดับที่เซลล์ไม่เกิดความเครียด แต่ระดับของน้ำมันเมล็ดกัญชาตั้งแต่ 125 µl/ml ขึ้นไปไม่มีผลต่อความสามารถในการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันและยังเพิ่มอัตราการตายของตัวอ่อนแมลงหวี่อีกด้วย เนื่องจากน้ำมันเมล็ดกัญชาที่มีความเข้มข้นสูงนั้นกระตุ้นการเกิด lipid peroxidation ในตัวอ่อนแมลงหวี่ เช่นเดียวกับการศึกษาความปลอดภัยและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจาก cannabidiol ต่อเซลล์ผิวหนังของ Tassaneesuwan *et al.* (2023) ซึ่งได้รายงานว่ารระดับ CBD ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.6 µg/ml) ปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังแต่เซลล์ที่ได้รับ CBD ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 2.5 µg/ml) สามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งสรุปได้ว่าระดับ CBD ที่มีความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์ โดย Schanknecht *et al.* (2023) ได้รวบรวมการศึกษการใช้กัญชา (*Cannabis sativa*) ในการรักษามะเร็งผิวหนัง เซลล์มะเร็งมีช่วงชีวิตสั้นลงเมื่อได้รับสาร THC และ CBD ร่วมกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับเพียงสาร THC และพบการตอบสนองของ LNCaP androgen-responsive ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ยับยั้ง cytokines ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดกัญชาที่มี CBD ต่ำ THC สูง ดังนั้น หากเซลล์อสุจิได้รับสารสกัดกัญชาที่มีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ในระดับที่ต่ำกว่า 5 µg/ml จึงไม่เพียงพอต่อการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันและไม่สามารถต้านการผลิต ROS และ lipid peroxidation จากการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Abdellatif *et al.*, 2022) ส่งผลให้เซลล์อสุจิและการเสื่อมสภาพตามระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งแสดงถึงผลการศึกษาระดับของการเสริมสารสกัดกัญชาที่เหมาะสมคือ 5 และ 10 µg/ml แต่หากเซลล์อสุจิได้รับสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในระดับสูงกว่า 10 µg/ml ไม่มีผลต่อความสามารถในการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชัน และยังส่งผลเสียต่อเซลล์อสุจิ (Tassaneesuwan *et al.*, 2023) คาดว่าเซลล์อสุจิได้รับสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปทำให้ไมโทคอนเดรียเปิดการซึมผ่านเพื่อตอบสนองต่อ ROS ในปริมาณมากเกินไปจนควบคุมและการส่งสัญญาณ

การเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptotic นำไปสู่การเพิ่มการผลิต ROS และ lipid peroxidation (Vitorovic *et al.*, 2021) ส่งผลเสีย และเกิดการตายของเซลล์อสุจิลงในที่สุดและมีแนวโน้มปรับปรุงจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิได้ (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STP และ LIN) โดยคาดว่าเป็นผลต่อเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดกัญชงที่เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกร สอดคล้องกับรายงานของ Shepherd *et al.* (2022) ได้กล่าวว่าการลด ROS สามารถผลกระทบต่อจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิได้ (Abdellatif *et al.*, 2022) สอดคล้องกับรายงานของ Ros-Santaella and Pintus (2021) ได้ศึกษาการเสริมสารสกัด Melissa officinalis ที่ความเข้มข้น 2.5-5 g/l สามารถเพิ่มค่า LIN และ STR ของน้ำเชื้อสุกรแข็งแรงหลังการละลาย 120 นาทีได้ และยังสามารถลดปริมาณการผลิต MDA ในน้ำเชื้อได้ และการเสริมสารสกัดจาก Salvia officinalis (Sage) ระดับความเข้มข้นที่ 5 g/l ในน้ำเชื้อสุกรแข็งแรง พบว่า การเสริมสารสกัดมีผลดีต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และเพิ่มตัวอสุจิมีชีวิตช่วยปกป้องอะโครโซม และความสมบูรณ์ของ DNA หลังการละลายน้ำเชื้ออีกด้วย แต่ผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองของ Pintus *et al.* (2018) จลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการเสริม Aminoguanidine มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับความเข้มข้น 0.1 - 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ Ros-Santaella and Pintus (2021) ได้กล่าวอีกว่า การใช้สารสกัดจากพืชสามารถให้สารทุติยภูมิจำนวนมาก (เช่น ฟีนอล เทอร์ปีนอยด์ ฯลฯ) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งโพลีฟีนอลบางชนิดสามารถปรับวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์และเปลี่ยนสารประกอบบางชนิดเป็นสารประกอบอื่น ๆ มีการแสดงโพลีฟีนอลบางชนิดเพื่อปรับเมแทบอลิซึมของอสุจิโดยการเพิ่มประสิทธิภาพของการหายใจระดับไมโทคอนเดรีย

สัณฐานวิทยาของอสุจิ

อสุจิที่มีหางคด (bent tail) อสุจิที่มีหางคดเป็นวง (coiled tail) อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณหาง (distal droplet) อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัว (proximal droplet) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริม

สารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ($P > 0.05$) (Figure 3)

สัณฐานวิทยาของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml มีค่าอสุจิที่มีหางคดต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการคดของหางอสุจิอาจเกิดได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงดันออสโมติกดังที่ Perez-Llano *et al.* (2001) ได้กล่าวไว้ และยังพบอีกว่าสัณฐานวิทยาของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml อสุจิที่มีหางคดเป็นวงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัวต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับ Payne *et al.* (2019) ได้พบรายงานว่าสารกลุ่มแคนนาบินอยด์มีผลต่อความผิดปกติของลักษณะสัณฐานวิทยาของอสุจิสูง ในหนูทดลองที่ทำการฉีดกระตุ้นทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 35 วัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Thun *et al.* (2002) ยังพบความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ CASA ที่อาจตรวจนับผิดพลาดจากการเสริมสารสกัดในระดับที่สูงขึ้นจึงพบปริมาณของอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณหางและบริเวณกลางตัวของอสุจิของกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดกัญชงมากกว่ากลุ่มควบคุม

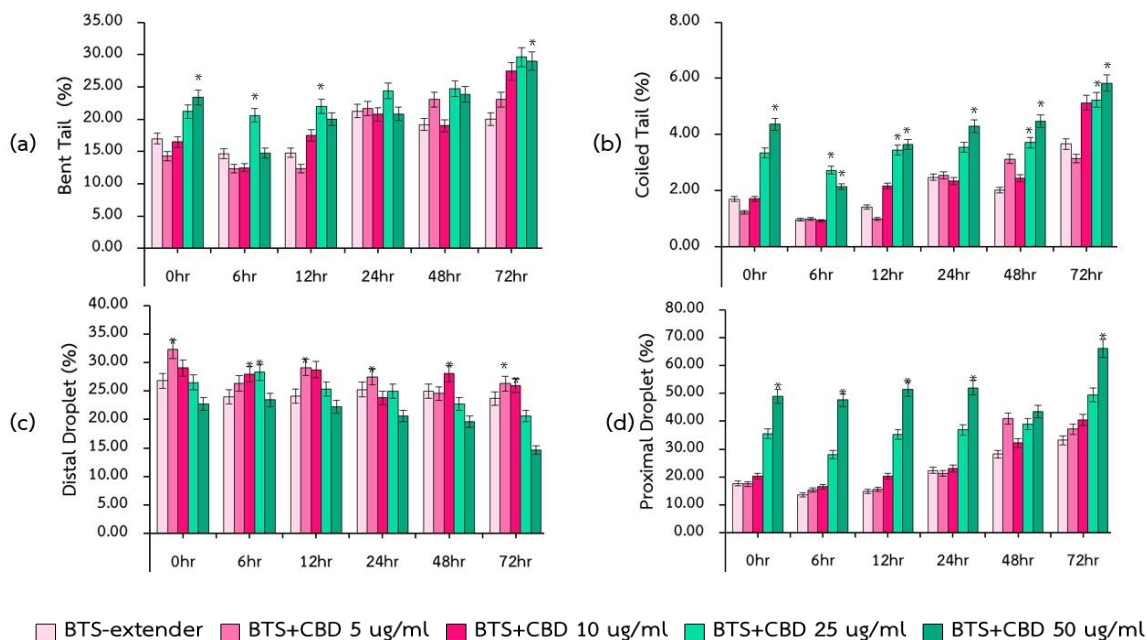


Figure 3. Sperm morpholog: Bent tail (a); Coiled tail (b); Distal droplet (c); Proximal droplet (d). a statistical difference in confidence levels $P < 0.05$

สรุป

สารสกัดกัญชงสามารถให้เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรสำหรับการแช่เย็น ที่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 50 μg CBD/ml เนื่องจากระดับการเสริมสารสกัดดังกล่าวยังคงค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรสำหรับการแช่เย็นให้อยู่ในระดับที่น่าไปใช้งานได้ การใช้ยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 μg CBD/ml มีแนวโน้มในการช่วยรักษาคุณภาพของอสุจิในน้ำเชื้อ อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น และเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิเย็น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยแม่โจ้ “ทุนศิษย์กัญญ์” ประจำปีการศึกษา 2563 ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยแม่โจ้และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทดลอง สัตว์ทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่เย็น การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Abdellatif, M.A., S.A. Gabr, M.A. El-Sherbieny and A.I.A. Yousif. 2022. Effect of aqueous and methanolic green tea extracts on motility, normal forms, and kinetic parameters of spermatozoa in Rahmani ram semen equilibrated at 5 °C for 4 hours. Journal of Animal and Poultry Production 13(5): 63-70.
- 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.
- Amann, R.P. and D. Waberski. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1): 5-17.
- Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International* 2011: 686137, doi: 10.4061/2011/686137.
- Caiza de la Cueva, F.I., T. Rigau, R. Pujol, J. Piedrafita and J.E. Rodríguez-Gil. 1997a. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: The role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 48(2-4): 301-315.
- Caiza de la Cueva, F.I., M.R. Pujol, T. Rigau, S. Bonet, J. Miró, M. Briz and J.E. Rodríguez-Gil. 1997b. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48(6): 947-968.
- Chasiotis, V.K., D.A. Tzempelikos and A.E. Filios. 2021. Assessment of constant and time-varying temperature schemes on the convective drying characteristics of hemp leaves. *Case Studies in Thermal Engineering* 26, doi:10.1016/j.csite.2021.101098.
- Chomchai, S. 1999. Manual for Artificial Insemination in Pigs. 3rd ed. National Swine Research and Training Center, Kasetsart University, Nakhon Pathom. 294 p. (in Thai)
- Einarsson, S., B. Crabo and L. Ekman. 1970. A comparative study on the chemical composition of plasma from the cauda epididymidis, semen fractions, and whole semen in boars. *Acta Veterinaria Scandinavica* 11(2): 156-180.
- Gadea Joaquin. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 17-27.
- Jaidee, T. and P. Sootanan. 2022. A survey on molecular biological processes of cannabinoids by functional module-based network analysis. *Burapha Science Journal* 27(1): 274-299. (in Thai)
- King, G.J. and J.W. Macpherson. 1966. Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 30(11): 304-307.
- Lopez Rodriguez, A., A.V. Soom, L. Arsenakis and D. Maes, 2017. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management* 3(15): 1-12.
- Manosroi A., C. Chankhampan, B. Kietthanakorn, W. Ruksiriwanich, P. Chaikul, K. Boonpisuttinant, M. Sainakham, W. Manosroi, T. Tangjai and J. Manosroi. 2019. Pharmaceutical and Cosmeceutical Biological Activities of Hemp (*Cannabis sativa* L. var. *sativa*) Leaf and Seed Extracts. *Chiang Mai Journal of Science* 46(2): 180-195.

- 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.
- Painupong, A. 2017. Free radicals and anti-oxidants in humen. PKRU SciTech Journal 1(2): 20-27. (in Thai)
- Park, Y.S., S.H. Lee, H.W. Choi, H.S. Lee, J.S. Lee and J.T. Seo. 2018. Abnormal human sperm parameters contribute to sperm DNA fragmentation in men with varicocele. The World Journal of Men's Health 36(3): 239-247.
- 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.
- Perez-Llano, B., J.L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo and P. Garcia-Casado. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. Theriogenology 56(3): 387-398.
- Pintus, E., M. Kadlec, M. Jovičić, M. Sedmíková and J.L. Ros-Santaella. 2018. Aminoguanidine protects boar spermatozoa against the deleterious effects of oxidative stress. Pharmaceutics 10(4): 212, doi: 10.3390/pharmaceutics10040212.
- Prochowska, S., W. Nizanski and A. Fontbonne. 2022. Hypo-osmotic swelling test (HOST) for feline spermatozoa: The simplified procedure and the aspect of sperm morphology. Animals 12(7): 903, doi: 10.3390/ani12070903.
- Rodríguez-Gil, J.E. and T. Rigau. 1996. Effects of ouabain on the response to osmotic changes in dog and boar spermatozoa. Theriogenology 45(4): 873-888.
- Ros-Santaella, J.L. and E. Pintus. 2021. Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. Antioxidants 10(5): 772, doi: 10.3390/antiox10050772.
- Schanknecht, E., A. Bachari, N. Nassar, T. Piva and N. Mantri. 2023. Phytochemical constituents and derivatives of *Cannabis sativa*; bridging the gap in melanoma treatment. International Journal of Molecular Sciences 24(1): 859, doi: 10.3390/ijms24010859.
- Shepherd, M.J., A.M. Minton, C. Schwab and L.A. Herickhoff. 2022. Effects of boar sperm antioxidant supplementation on fertility. Animal Reproduction Science 237: 106923, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106923.
- Sonseed, P., T. Vongphalup and J. Phongpeng. 2011. Effect of solid on subsequent quality of boar semen. KKU Veterinary Journal 21(2): 164-171. (in Thai)
- Taoufik, B., S. Hamid, E.B. Aziz, F. Abdellah, S. Seddik, E. Yassine, F. Mouhcine, C. Zoubida and T. Mohamed. 2017. Comparative study of three varieties of *Cannabis sativa* L. cultivate in different region of Morocco. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 9(5): 643-653.
- Tassaneesuwan, N., C. Thammarat and P. Khongkow. 2023. Safety and potential effects of cannabidiol on skin cells. Journal of Health Science and Medical Research

- 41(3): 2023919, doi: 10.31584/jhsmr.2023919.
- 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.
- Vitorovic, J., N. Jokovic, N. Radulovic, T. Mihajlov-Krstev, V.J. Cvetkovic, N. Jovanovic, T. Mitrovic, A. Aleksic and N. Bernstein. 2021. Antioxidant activity of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil in *Drosophila melanogaster* larvae under non-stress and H₂O₂-Induced Oxidative Stress Conditions. *Antioxidants* 10(6): 830, doi: 10.3390/antiox10060830.
- Vyt, P., D. Maes, E. Dejonckheere, F. Castryck and A. Van Soom. 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 39(1): 8-12.
- Wiebke, M., B. Hensel, E. Nitsche-Melkus, M. Jung and M. Schulze. 2022. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science* 246: doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106822.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, E. Bussalleu and S. Bonet. 2010. The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Animal Reproduction Science* 119(3-4): 265-274.