ผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรและประสิทธิภาพในการนำไปใช้

นางสาวบังอร บำรุงพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2551

EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON FRESH BOAR SEMEN QUALITY AND EFFICIENCY FOR USE

Bang-On Bamrungphong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2008

ผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรและประสิทธิภาพในการนำไปใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
ประธานกรรมการ

_____

(อ. น. สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ

_____

(ผศ. สพ. ญ. ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

_____

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)
กรรมการ

_____

(ศ. ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

บังอร บำรุงพงษ์ : ผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรและประสิทธิภาพในการนำไปใช้ (EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON FRESH BOAR SEMEN QUALITY AND EFFICIENCY FOR USE) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์, 124 หน้า.

ในปัจจุบัน นิยมใช้น้ำเชื้อสดที่ผ่านการเจือจางแล้วสำหรับการผสมเทียมในการผลิตสุกร ซึ่งภายหลังจากการเจือจางแล้วสามารถเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อสดแช่เย็น ไว้ที่อุณหภูมิ 17°C ได้นาน 3 วัน ซึ่งประสิทธิภาพของตัวอสุจิในน้ำเชื้อจะมีคุณภาพต่ำลง เนื่องจากผลจากการเกิด oxidative stress ด้วยกระบวนการ reactive oxygen species โดยปกติสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) จะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์ คือ ผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรและประสิทธิภาพในการนำไปใช้ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ แบ่งเจือจาง จำนวน 13 กลุ่ม [วิตามินซี (0.25 mg/ml) วิตามินอี (400 μg/L) กลูตาไธโอน (1 mM) CLA (200, 500 และ 1000 μg/L) ชาเขียว (0.1, 0.25 และ 0.5 mg/ml) และสารสกัดดอกคำฝอย (0.1, 0.25 และ 0.5 mg/ml)] รวมกลุ่มควบคุม เก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 17°C ผลการทดลองพบว่า การเสริมวิตามินอีและกลูตาไธโอน สามารถยืดระยะเวลาเก็บรักษาได้นานมากกว่า 3 วัน โดยคุณภาพน้ำเชื้อดีกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดดอกคำฝอยและสารอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เสริมในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ แบ่งเจือจาง จำนวน 15 กลุ่ม ทดลอง [กลูตาไธโอน (0.25, 0.50, 1.0, 1.5 และ 2.0 mM) วิตามินอี (100, 200, 400, 600 และ 800 μg/L) และสารสกัดดอกคำฝอย (0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml)] รวมกลุ่มควบคุม เก็บไว้ที่เก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 17°C ผลการทดลองพบว่า สารละลายน้ำเชื้อที่เสริมด้วยกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM ที่มีระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและการมีชีวิตของตัวอสุจิสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดดอกคำฝอยอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพการนำน้ำเชื้อที่เสริมด้วยสารต้านการเกิดออกซิเดชันไปใช้ต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร โดยแบ่งแม่สุกรออกเป็น 2 กลุ่ม ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้นาน 3 วัน (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM ที่เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน (กลุ่มทดลอง) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า อัตราการผสมติด ของกลุ่ม

ทดลองและกลุ่มควบคุมเท่ากับร้อยละ 60 และ 67 ตามลำดับ ทั้งสองกลุ่มมีอัตราการเข้าคลอด ร้อยละ 100 จำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่ของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเท่ากับ 10.3 และ 8.5 ตัวต่อแม่ตามลำดับ

ดังนั้น การเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM ในสารละลายน้ำเชื้อ สามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาได้นาน 5 วัน โดยไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อและประสิทธิภาพในการนำไปใช้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

BANG-ON BAMRUNGPHONG : EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON FRESH BOAR SEMEN QUALITY AND EFFICIENCY FOR USE. THESIS ADVISOR : PAKANIT KUPITTAYANANT, Ph.D. (DVM), 124 PP.

BOAR SEMEN/ANTIOXIDANT/GREEN TEA/VITAMIN E/GLUTATHIONE

Currently, diluted-fresh semen is mostly used for an artificial insemination in swine production. After dilution with an extender, semen can be stored up to 3 days at 17°C. This can lead to sperm efficiency loss as a result of oxidative stress and reactive oxygen species during the storage. Generally, antioxidants play an important role in controlling free radicals in cells. As an alternative for swine farmers, the objective of this study was to determine the effects of antioxidants on fresh boar semen quality and efficiency for use. The study was designed into 3 experiments as follows.

Experiment 1. The study of the effects of antioxidant supplementation in an extender on semen quality. Semen was collected from the boars. Sub-samples of each whole ejaculation were divided into thirteen parts [vitamin C (0.25 mg/ml) vitamin E (400 µg/L) glutathione (1 mM) CLA (200, 500 and 1000 µg/L) extract of green tea (0.1, 0.25 and 0.5 mg/ml) and extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flower (safflower) (0.1, 0.25 and 0.5 mg/ml)] and diluted with the different extender supplemental antioxidants and stored at 17°C. It was found that supplemental vitamin E and glutathione can extend semen quality more than 3 days. This was better than that of the groups supplemented with the extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flower (safflower) and other antioxidants ($P<0.05$).

Experiment 2. The study of the effects of types and concentrations of antioxidants supplemented in an extender on semen quality and period of storage.

Semen was collected from the boars. Sup-samples of each whole ejaculation were divided in to fifteen parts [glutathione (0.25, 0.50, 1.0, 1.5 and 2.0 mM) vitamin E (100, 200, 400, 600 and 800 µg/L) and extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flower (safflower) (0.025, 0.05, 0.10 and 0.15 mg/ml)] and diluted with selected antioxidants and stored at 17°C. The result showed that supplementation of glutathione at a concentration of 0.25 mM and storaged up to 5 days produced the highest percentage of sperm mobility and living cells. This reached a statistic difference when compared with the extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flower (safflower) ($P<0.05$).

Experiment 3. The study of the efficiency for use of semen supplemented with antioxidants on the reproductive efficiency of sows. Sixteen sows were divided into two groups. Each group was inseminated with the semen storaged for 3 days (control group) and with the semen supplemented with 0.25 mM glutathione storing for 5 days (treatment group), respectively. It was found that the conception rate of the treatment group and the control group was 60% and 67%, respectively. The farrowing rate of both groups was 100%. The total numbers of piglets born with the treatment group and the control group were 10.3 and 8.5 piglets/sow, respectively. There were no differences in the conception rate, farrowing rate, and total numbers of piglets between groups.

Thus, the supplementation of glutathione (0.25 mM) in a semen extender can extend the period of storage up to 5 days and the efficacy for use.

School of Animal Production Technology
Academic Year 2008

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยจากโครงการวิจัยของอาจารย์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธณสาร ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศจีรา คุปพิทยานันท์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ และกราบขอบพระคุณ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ชาญ ณ ลำปาง หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และ อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์ ประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีการสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ คุณจักร์ โนจากุล บุคลากรและพนักงาน โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และกลุ่มตัวอย่างในการเก็บข้อมูล ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ร่วมศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ตลอดจนพี่ ๆ บัณฑิตศึกษาจาก S14-B ที่ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบัวสอน และ คุณแม่สุบรรณ บำรุงพงษ์ ตลอดจนน้องชาย น้องสะใภ้ ญาติ พี่น้อง ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ที่ทุกท่านมีส่วนเกี่ยวข้อง ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในน้ำใจและความกรุณาของทุก ๆ คนเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งที่อยู่เบื้องหลังเป็นแรงบันดาลใจ ให้มีมานะพยายามฟันฝ่าอุปสรรคต่าง ๆ เพื่อบรรลุความมุ่งหวัง เป็นเกียรติเป็นศรีแก่วงศ์ตระกูลต่อไป

บังอร บำรุงพงษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3
1.3 สมมติฐานงานวิจัย 3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ 4
1.6 รายการอ้างอิง 4

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 อนุมูลอิสระ (Free radical) 6
2.2 สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidants) 9
2.2.1 วิตามินซี (Ascorbic acid) 9
2.2.2 วิตามินอี (Vitamin E, α-tocopherol) 12
2.2.3 ชาเขียว (Green tea) 15
2.2.4 กรดไขมันคอนจูเกตลิโนเลอิก (Conjugated linoleic acid) 19
2.2.5 ดอกคำฝอย (Safflower) 20
2.2.6 กลูตาไธโอน (Glutathione) 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 น้ำเชื้อสุกร (Boar semen) 21
2.3.1 ลักษณะของตัวอสุจิ 21
2.3.2 การสร้างตัวอสุจิ 22
2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อตัวอสุจิ 25
2.4 รายการอ้างอิง 31
3 ศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่ใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อ 36
3.1 บทคัดย่อ 36
3.2 คำนำ 36
3.3 วัตถุประสงค์ 37
3.4 อุปกรณ์และวิธีการ
3.4.1 การจัดการทั่วไป พ่อพันธุ์สำหรับการทดลอง
3.4.1.1 การจัดการพ่อพันธุ์สุกรทดลอง 37
3.4.1.2 การจัดการอาหารสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง 38
3.4.1.3 การจัดโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง 38
3.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง 38
3.4.2 วิธีการทดลองและการเก็บข้อมูล
3.4.2.1 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 43
3.4.2.2 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 44
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 45
3.6 สถานที่ทำการทดลอง 45
3.7 ระยะเวลาทำการทดลอง 45
3.8 ผลการทดลองและอภิปรายผล
3.8.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 46
3.8.2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 50

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9 สรุปผลการทดลอง 54
3.10 รายการอ้างอิง 55
4 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 58
4.1 บทคัดย่อ 58
4.2 คำนำ 58
4.3 วัตถุประสงค์ 59
4.4 อุปกรณ์และวิธีการ
4.4.1 การจัดการทั่วไป พ่อพันธุ์สำหรับการทดลอง
4.4.1.1 การจัดการพ่อพันธุ์สุกรทดลอง 59
4.4.1.2 การจัดการอาหารสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง 59
4.4.1.3 การจัดการโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง 60
3.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง 60
4.4.2 วิธีการทดลองและการเก็บข้อมูล
4.4.2.1 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 61
4.4.2.2 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 62
4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 63
4.6 สถานที่ทำการทดลอง 63
4.7 ระยะเวลาทำการทดลอง 64
4.8 ผลการทดลองและอภิปรายผล
4.8.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ
4.8.1.1 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 64
4.8.1.2 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 66

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.8.1.3 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 67

4.8.2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

4.8.2.1 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 69

4.8.2.2 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 70

4.8.2.3 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 70

4.9 สรุปผลการทดลอง 76

4.10 รายการอ้างอิง 76

5 ศึกษาประสิทธิภาพการนำน้ำเชื้อที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ไปใช้ต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร 78

5.1 บทคัดย่อ 78

5.2 คำนำ 78

5.3 วัตถุประสงค์ 79

5.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.4.1 การจัดการทั่วไป สัตว์สำหรับการทดลอง

5.4.1.1 การจัดการสัตว์ทดลอง 79

5.4.1.2 การจัดการอาหารสัตว์ทดลอง 80

5.4.1.3 การจัดการโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง 80

3.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง 80

5.4.2 วิธีการทดลองและการเก็บข้อมูล

5.4.2.1 เก็บข้อมูลอัตราการผสมติด (Conception rate) 83

5.4.2.2 เก็บข้อมูลอัตราสุกรแม่พันธุ์เข้าคลอด 83

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.4.2.3 เก็บข้อมูลจำนวนลูกแรกคลอด (Litter size) ต่อแม่สุกร 83
5.4.2.4 เก็บข้อมูลจำนวนลูกมีชีวิต 83
5.4.2.5 เก็บข้อมูลน้ำหนักลูกสุกรแรกคลอด 83
5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 83
5.6 สถานที่ทำการทดลอง 84
5.7 ระยะเวลาทำการทดลอง 84
5.8 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 84
5.9 สรุปผลการทดลอง 86
5.10 รายการอ้างอิง 87
6 สรุปและข้อเสนอแนะ 88
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกร 90
ภาคผนวก ข การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกร 93
ภาคผนวก ค การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรก่อนการเจือจาง 98
ภาคผนวก ง การเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร 106
ภาคผนวก จ โปรแกรมการถ่ายพยาธิและโปรแกรมวัคซีน 108
ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารเคมีในการทดลองและสารสกัด 111
ภาคผนวก ช แบบจำลองทางคณิตศาสตร์และตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ 117
ประวัติผู้เขียน 124

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวัดความสามารถของสารต้านการเกิดออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 8

2.2 ผลของการเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ ต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรโดยใช้เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน เก็บที่อุณหภูมิ 15°C 11

2.3 ผลของการเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ ในสารละลายน้ำเชื้อ 12

2.4 ผลของการเสริมวิตามินอี (α- tocopherol) ที่ระดับต่าง ๆ ในสารละลายน้ำเชื้อต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 14

2.5 การเสริมวิตามินอี (α- tocopherol) และซิลิเนียมในอาหารสุกรพ่อพันธุ์ และการเสริมซิลิเนียมในสารละลายน้ำเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 15

2.6 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำเลี้ยงเชื้อ (semen) ของสัตว์แต่ละชนิด 24

2.7 ความเข้มข้นนของกลูตาไธโอน ในน้ำเชื้อ (seminal plassma) ของสัตว์แต่ละชนิด 27

2.8 ปริมาณกลูตาไธโอน (glutathione: GSH) ในน้ำเชื้อที่มีการเก็บรักษาไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 28

2.9 สารละลายน้ำเชื้อที่ได้เสริมกลูตาไธโอน ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็น 29

2.10 สารละลายน้ำเชื้อที่ได้เสริมกลูตาไธโอน ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโคแช่แข็ง 29

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำเชื้อที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน 41

3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายน้ำเชื้อแช่เย็นที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน 42

3.3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร 49

3.4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร 52

3.5 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ตลอดการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน 53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ตลอดการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (เก็บรักษาไว้นาน 13 วัน) 73

4.2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เจือจางด้วยสารละลายเสริมกลูตาไธโอน วิตามินอี และ สารสกัดดอกคำฝอย 74

4.3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เจือจางด้วยสารละลายเสริมกลูตาไธโอน วิตามินอี และ สารสกัดดอกคำฝอย 75

5.1 จำนวนแม่สุกรที่ใช้ในการทดลอง 81

5.2 ผลของการผสมเทียม ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกแช่เย็น 85

5.3 ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตในสุกรแม่พันธุ์ 86

1.ข ประวัติสุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัย 94

1.ค ค่าความเข้มข้นของตัวอสุจิสุกรจากเครื่อง COLORIMETER 254 SHERWOOD 103

1.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติและการสังเคราะห์ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 119

2.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติและการสังเคราะห์ ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 119

3.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 120

4.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 120

5.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของการผสมเทียมแม่สุกร ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 122

6.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลูกแรกคลอดในแม่สุกร ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็น 122

7.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลูกสุกรมีชีวิตหลังคลอด 123

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic acid) 10
2.2 โครงสร้างของวิตามินอี (Vitamin E; α- tocopherol) 13
2.3 สารในกลุ่ม Polyphenol 16
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Linoleic acid และ Conjugated linoleic acid (CLA) 19
2.5 ตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 22
2.6 โครงสร้างภายใน seminiferous tubule ในการสร้างอสุจิ 23
2.7 การสร้าง glutathione ภายใน Sertoli cell 24
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อตัวอสุจิ 27
2.9 กลไกของ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ 31
3.1 ลักษณะคอกของสุกรพ่อพันธุ์ 37
3.2 แสดงตำแหน่งการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ 44
3.3 ลักษณะของตัวอสุจิที่มีชีวิต **A** (ไม่ติดสีย้อม) และตาย **B** (ติดสีย้อม) 45
4.1 แสดงตำแหน่งการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ 62
4.2 ลักษณะของตัวอสุจิที่มีชีวิต **A** (ไม่ติดสีย้อม) และตาย **B** (ติดสีย้อม) 63
4.3 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 65
4.4 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 66
4.5 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ 68
4.6 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรายตัวของตัวอสุจิ 69
4.7 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรายตัวของตัวอสุจิ 70
4.8 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรายตัวของตัวอสุจิ 71
4.9 คุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ให้ผลดี ในการเก็บรักษา วันที่ 3 และ 5 72
1.ข หุ่น (dummy) ที่ใช้ให้พ่อสุกรขึ้นทับในการเก็บน้ำเชื้อ 95
2.ข การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์โดยการใช้มือ 96
3.ข การจับลึงค์เพื่อรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ 97

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Acyl-CoA	=	Acetyl coenzyme A
ATP	=	Adenosine triphosphase
BHT	=	Butylated hydroxytoluene
BTS	=	Beltsville thaw solution
cAMP	=	Cyclic adenosine monophosphate
CAT	=	Catalase
CLA	=	Conjugated linoleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
EGC	=	Epigallocatechin
EGCG	=	Epigallocatechin gallate
FAS	=	Fatty acid synthase
GABA	=	Gamma-amino butyric acid
GPC	=	Glyceryl phosphoryl choline
GPx	=	Glutathione peroxidase
GR	=	Glutathione reductase
GSH	=	Glutathione (γ-glutamyl-cysteinyl-glycine)
GSH-Px	=	Glutathione peroxidase
GSSG	=	Glutathione peroxidase
GST	=	Glutathione S-transferase
HIV	=	Human immunodeficiency virus
HMG-CoA-reductase	=	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A-reductase
HO	=	Hydroxyl
IU	=	International Unit
LDL cholesterol	=	Low density lipoprotein cholesterol
LPO	=	Lipid peroxidation
L	=	Liter

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	milli Molar
MRSA	=	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
RNA	=	Ribonucleic acid
ROS	=	Reactive oxygen species
SOD	=	Superoxide dismutase
µg	=	microgram

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2549) ประมาณการการขยายตัวของการเลี้ยงและการผลิตสุกรมีแนวโน้มที่สูงขึ้น จำนวนสุกร ณ วันที่ 1 มกราคม ปี 2550 มีประมาณ 8.4 ล้านตัว เพิ่มร้อยละ 9 เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2549 ซึ่งสอดคล้องกับสมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก เปิดเผยถึงสถานการณ์การส่งออกสุกรว่า การส่งออกเนื้อสุกรของไทยในปี 2550 จะส่งออกได้รวม 12,000 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2549 ที่ส่งออกได้ 11,000 ตัน หรือเพิ่มขึ้นราวร้อยละ 9 เนื่องจากมีความต้องการเนื้อสุกรแปรรูปมากขึ้น (15 พ.ค. 2007) มีผลให้อุตสาหกรรมการผลิตลูกสุกรขุนนับวันมีแต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนเกิดปัญหาผลผลิตสุกรล้นตลาด ส่งผลให้ราคาสุกรตกต่ำ รัฐบาลจึงมีมาตรการปรับลดการผลิตสุกรด้วยวิธีการปลดแม่พันธุ์อายุมาก งดการนำแม่พันธุ์เข้าผสม ลดสัดส่วนการนำสุกรสามสายมาผลิตลูกสุกรขุน ตัดวงจรการผลิตไม่นำลูกสุกรเข้าเลี้ยงรุ่นละ 1 ตัว จำกัดจำนวนผู้เลี้ยงสุกรพันธุ์และสุกรขุนโดยการขึ้นทะเบียนผู้เลี้ยงสุกรทั้งหมด อย่างไรก็ดีจากมาตรการการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรรายใหญ่ไม่กล้าที่จะดำเนินการอย่างจริงจัง เนื่องจากเกรงว่าหากลดปริมาณลงจะทำให้เสียโอกาสเมื่อราคาปรับตัวสูงขึ้น ดังนั้นปริมาณการผลิตสุกรปี 2550 จึงยังคงเพิ่มขึ้นจากปี 2549 ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดของการผลิตลูกสุกรขุนจะใช้การผสมเทียม การผสมเทียมจะใช้น้ำเชื้อสดสุกรที่ผ่านการเจือจางแล้วมีความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ 2,000-3,000 ล้านตัวต่อโด๊ส (Gordon, 2004) ปกติในหนึ่งโด๊ส จะมีน้ำเชื้อปริมาตร 85-100 มิลลิลิตร ซึ่งการใช้สารละลายน้ำเชื้อก็เพื่อเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อให้มากขึ้นเพื่อนำไปผสมกับแม่สุกรได้หลายแม่ขึ้น และ “เมื่อทำการเจือจางน้ำเชื้อสุกรนำไปใช้ไม่หมดแบ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส เก็บรักษาได้ 3 วัน” (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2526; Waberski, Meding, Dirksaen, Weitze, Lewiding, and Hahn, 1994) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) แล้วมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของระยะเวลาการเก็บรักษาเพราะสามารถเก็บรักษาได้นานเป็นปีหรือหลายสิบปี ถ้ามีการดูแลถูกต้อง แต่มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากกว่าและมีคุณภาพหลังจากละลายพร้อมทั้งอัตราการเข้าคลอดต่ำ ดังนั้นถ้าทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อแช่เย็น (liquid semen) แล้วทำการยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาในนานมากขึ้นกว่าเดิม โดยการใช้สารละลายน้ำเชื้อ (extender) ที่มีสูตรของส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 17°C โดยคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้จะต้องสามารถนำไปผสมเทียมกับแม่สุกรได้คุณภาพน้ำเชื้อที่จะศึกษานั้นจะ

ประกอบไปด้วยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (percentage of lived sperm) ในการปฏิสนธิระหว่างไข่กับตัวอสุจินั้นก็มีปัจจัยหลายอย่าง ตัวอสุจิเองก็เป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่ง ถ้าตัวอสุจิไม่มีความสมบูรณ์ ก็ไม่สามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้ ดังนั้นจึงต้องคำนึงถึงส่วนนี้เป็นพิเศษ ซึ่งจากการศึกษาของ Dube, Beauleu, Reyes-Moreno, Guillemette, and Bailey (2004) ใช้สารละลายน้ำเชื้อสูตร BTS (Beltsville thaw solution) และ Androhep นำมาเจือจางกับน้ำเชื้อสุกรให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ $40x10^6$ ตัวต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 17°C พบว่า สารละลายน้ำเชื้อสูตร Androhep สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานมากกว่า 3 วัน คือ เก็บได้นาน 6 วัน ($P<0.05$) ในขณะที่คุณภาพของน้ำเชื้ออยู่ในเกณฑ์ที่ยังสามารถนำไปผสมเทียมกับแม่สุกรได้ ในส่วนของสารละลายน้ำเชื้อสูตร BTS เก็บได้เพียงวันที่ 3 โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดต่ำลงน้อยกว่า 50% (48±12.20) ดังนั้นการทำน้ำเชื้อแช่เย็นในสุกรนั้นต้องมีความระมัดระวังอย่างยิ่งเพราะเนื่องจากตัวอสุจิมีความไว (sensitivity) ต่ออิทธิพลต่าง ๆ ที่มากระทบตัวอสุจิ ซึ่งจะประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญในตัวอสุจิและสารเจือจางนั้นก็ต้องมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษาด้วยเช่นกัน เนื่องจากขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็น มีวิธีการต่าง ๆ ที่ง่าย ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการทำน้ำเชื้อ การเก็บรักษา และที่สำคัญการนำไปใช้ไม่ยุ่งยากในเรื่องการเตรียมสารละลายก่อนการนำไปใช้ จึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายหรือเกือบทั้งหมดของการนำมาใช้การผสมเทียมในปัจจุบัน แต่ก็มีข้อจำกัดด้านการเก็บรักษา สามารถเก็บรักษาได้เพียงช่วงเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาพัฒนาถึงสารละลายน้ำเชื้อเพราะเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีพอยู่ได้ของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษาและรอการผสม ปัจจุบันนี้สารละลายน้ำเชื้อที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไป ตัวอย่างเช่น BTS เป็นต้น เมื่อนำมาใช้เป็นสารละลายน้ำเชื้อ เก็บได้ 3 วัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 17°C จากข้อจำกัดในส่วนนี้เอง ถ้ามีการพัฒนาสารละลายที่มีประสิทธิภาพช่วยยืดอายุของการเก็บน้ำเชื้อให้ได้นานกว่านี้ก็จะเป็นผลดี

ในช่วงของวันที่มีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรไว้เพื่อใช้ในการผสมเทียมที่อุณหภูมิ 17°C หลังจากมีการรีดเก็บน้ำเชื้อจะพบว่าความสามารถในการเข้าผสมกับไข่ของตัวอสุจิ จะลดต่ำลงและยังมีการพบว่า “มีผลมาจากความเครียด (oxidative stress) ในระหว่างที่เก็บไว้ในหลอดเก็บน้ำเชื้อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Lipid Peroxidation (LPO) ในส่วนผนังเซลล์ โดยกระบวนการ Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งมีปัจจัยมาจากส่วนของ Unsaturated Fatty Acid และปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ของตัวอสุจิที่มีปริมาณลดลง” (Stewart, 1996) โดยสอดคล้องกับ Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, and Gagnon (1997) รายงานว่า การเกิด Oxidative Stress ภายในเซลล์จะเป็นตัวการที่เป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น ปฏิกิริยาดังกล่าวมีผลทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิ อย่างเช่น ส่วนที่ช่วยเป็นแหล่งพลังงานในการเคลื่อนไหว (mitochondria) และในส่วนของสารพันธุกรรม (genomic integrity) ได้มีการศึกษาถึงผลของการเสริมสารต้านอนุมูล

อิสระลงในสารละลายน้ำเชื้อทั้งการเก็บรักษาในรูปของน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าสามารถป้องกันการทำลายภายในตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษาไว้ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีการนำมาใช้เสริมนั้นมีอยู่มากมาย เช่น วิตามินอี วิตามินซี และกลูตาไธโอน (Suresh, Rajasekaran, and Hellstrom, 1995) ได้มีนักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจในด้านนี้ เพื่อที่จะคิดและพัฒนาหาวิธีที่จะทำให้รักษาตัวอสุจิ ได้นานและมีประสิทธิในการเข้าผสมกับไข่ จากงานวิจัยของ Funahashi and Sano (2004) พบว่า การเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อแช่เย็นในสุกร สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 14 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงกว่า 80% ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huo, Ma, and Yang (2002) ที่มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ 53.20±0.63 ของวันที่ 13 ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรด้วยสารละลายน้ำเชื้อแบบ long-term ของสูตร Androhep ซึ่งถือว่ามีคุณภาพน้ำเชื้อที่สูง นั่นก็แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บน้ำเชื้อสุกรได้นานมากกว่า 2-3 วัน แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบทางเคมีของแต่ละสูตรสารละลายน้ำเชื้อชนิดต่าง ๆ จึงเป็นการที่จะนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการนำไปใช้ของน้ำเชื้อสุกรสดที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เก็บไว้ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นต่อประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์และการให้ผลผลิตในแม่สุกร

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

1.3.1 การเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อของสุกรดีขึ้น ทั้งในส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility)และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (percentage of lived sperm)

1.3.2 การเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นมีผลทำให้สามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ที่อุณหภูมิ 17°C ได้ยาวนานยิ่งขึ้น

1.3.3 น้ำเชื้อสุกรที่ได้รับการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อ ที่เก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นกว่าปกติ ที่อุณหภูมิ 17°C เมื่อนำมาผสมเทียมให้แก่แม่สุกรพร้อมที่จะรับการผสมแม่สุกรนั้นสามารถให้ผลผลิตที่ดีกว่าหรืออย่างน้อยเทียบเท่ากับแม่สุกรที่ได้รับการ

ผสมจากน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นทั่วไปที่ไม่ได้เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เก็บไว้ในระยะเวลาปกติ (3 วัน)

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1 ศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วย วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (α- tocopherol) สารสกัดชาเขียว กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิค (Conjugated linoleic acid : CLA) สารสกัดดอกคำฝอย และ กลูตาไธโอน (Glutathione) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ โดยพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (percentage of lived sperm) เท่านั้น

1.4.2 ศึกษาผลของการนำน้ำเชื้อสุกรสดแช่เย็น ที่ได้รับการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่ให้ผลในการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นต่อประสิทธิภาพในการผลิต โดยพิจารณาจาก อัตราการผสมติด (conception rate) และจำนวนลูกแรกคลอด (living born) ต่อแม่สุกรเท่านั้น

1.5 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ

1.5.2 ทราบถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เหมาะสมในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรที่สามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นได้ยาวนานขึ้น

1.5.3 ทราบถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เหมาะสมที่จะนำมาเสริมลงในส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งอาจจะนำไปสู่การจดสิทธิบัตรในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6 รายการอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2549). **ภาวะเศรษฐกิจการเกษตรปี 2549 และแนวโน้มปี 2550** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.oae.go.th/1DEC48/ag49_50.pdf

สมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก. (15 พ.ค. 2007). **ผู้ส่งออกเนื้อหมู เร่งบุกตลาดญี่ปุ่น มั่นใจทั้งปี 50 โต 9%** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thaishipper.com/Content/Content.asp?ID=18926

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป. (2526). **การผสมเทียมในหมู; น้ำเชื้อแช่แข็ง**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Dubé, C., Beauleu, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C., and Bailey, J. L. (2004). Boar semen storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine Phosphorylation. **Theriogenology.** 62: 874-886.

Funahashi, H., and Sano, T. (2004). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. **Theriogenology**. 63(6): 1650-16.

Huo, L-J., Ma, X-H., and Yang, Z-M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**. 58: 1349-1360.

Gordon, I. R. (2004). **Artificial Insemination. Reproductive Technologies in Farm Animals.** UK.

Lamirande, E. D., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. **J. Reprod Fertil.** 2: 48 - 54.

Stewart, D. I. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. **J. Reprod Fertil**. 1: 6-12.

Suresh. C. S., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. J. G. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **J. Androl**. 16(6): 464-468.

Waberski, D., Meding, S., Dirksaen, G., Weitze, K. F., Lewiding, C., and Hahn, R. (1994). Fertility of long term-stored boar semen : influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Anim Reprod Sci.** 36: 145-151.

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ Reactive Oxygen Species (ROS) คือ โมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเลคตรอนเดี่ยว อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ $10^{-10} – 10^{-3}$ วินาที (พรทิพย์ วิรัชวงษ์, 2551) จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่เสถียรและว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัด ด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

จากวิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2551) “โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลามีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่เป็นจำนวนน้อย ๆ มักเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และร่างกายก็จะมีระบบของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ขจัดออกไป ถ้าร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ก็จะทำให้อนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ Reactive Oxygen Species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้”

ชนิดของอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งได้ คือ

1) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมทตาบอลิซึมของร่างกายปกติ
2) อนุมูลอิสระจากปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น การติดเชื้อ ทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoimmune disease) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ รังสี สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควัน การออกกำลังกายอย่างหักโหม

หลักการทางเคมีอนุมูลอิสระ และ ROS เกิดโดย

1) ปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (symmetric separation) $X – X \text{ ----}> X^{\cdot} + X^{\cdot}$
2) อนุมูลอิสระอื่น ๆ $X^{\cdot} – HR \text{-----}> HX + R^{\cdot}$

จากสมการ อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมทตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ และสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเอง คือ กระบวนการต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งประกอบด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (substrate) มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยซับสเตรทนี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน

คาร์โบไฮเดรต ดีเอนเอ (DNA) อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณของอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่กระบวนการต้านการเกิดออกซิเดชันจะจัดการได้จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอนเอ โปรตีน คาร์โบไอเดรต และเกิดการทำลายเซลล์ เป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และรุนแรงไปจนถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้น ๆ มาก่อน รวมไปจนถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ Reactive oxygen species (ROS) มีดังนี้

Superoxide anion radical	O_2^-
Hydroxyl radical	HO^-
Peroxide radicals	ROO^-
Peroxyl radical	LOO^-
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Ozone	O_3
Singlet oxygen	$1O_2$
Hydrogen radical	H^-
Methyl radical	CH_2^-

โมเลกุลของอนุมูลอิสระเมื่อล่องลอยอยู่ในร่างกายนาน ๆ ก็จะมีการชนกันกับโมเลกุลของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่มากมายในเซลล์ทำให้เกิดการหลุดออกของอิเล็กตรอน (electron) จากโมเลกุลของมันทำให้โมเลกุลของสารดังกล่าวเกิดประจุไฟฟ้าขึ้นและมีสถานะที่พร้อมจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารใด ๆ ก็ตามที่อยู่ภายในเซลล์ได้ตลอดเวลา ถ้าอนุมูลอิสระไปทำปฏิกิริยากับไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ก็จะส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเซลล์ถูกทำลายมีการไหลของสารต่าง ๆ ออกนอกเซลล์ เซลล์นั้นก็จะตายหรือโดนทำลายไป ถ้าเกิดปฏิกิริยาเช่นนี้ที่เซลล์บริเวณเดียวกันหลาย ๆ เซลล์ ก็จะส่งผลให้เกิดการเสื่อมของอวัยวะที่เซลล์เหล่านั้นอยู่นั่นเอง นอกจากอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาได้กับเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว ถ้าหากไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของอาร์เอ็นเอ (RNA) ในนิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์ก็อาจทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตของเซลล์ในภาวะที่สูงก่อให้เกิดภาวะมะเร็ง (cancer) ที่อวัยวะต่าง ๆ ได้เช่นกัน และถ้าหากอนุมูลอิสระดังกล่าวทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไลปิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) หรือไลโปฟุสชิน (lipofuchin) จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดฝ้าหรือกระ (สาโรช รัตนากร, 2551) ดังนั้นจึงไม่แปลกที่เราพบว่า เมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้นเรามักจะพบความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายอันเป็นผลสืบเนื่องจากความเสื่อมของเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ อนุมูลอิสระ

สามารถตรวจวัดความสามารถด้วยเครื่องมือที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งเครื่องมือและวิธีการวัด แสดงค่าที่รวดเร็วและแม่นยำ แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวัดความสามารถของสารต้านการเกิดออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

Author (ผู้แต่ง)	**Radical generator (ตัวกำเนิด)**	**Radical detector (วิธีตรวจวัด)**	**Measuring time (เวลาที่ใช้ตรวจ)**
Emanuel et al., 1961	Methyl oleate + O_2	Peroxide	12-16 h
Stocks et al., 1974	Brain homogenate + O_2	O_2 consumption	1 h
Frank et al., 1982	Oil + O_2	Electr. Conductivity	1-3 h
Wayner et al., 1985	ABAP	O_2 consumption	30-60 min
Popov et al., 1985/1999	Luminol + UV-A	Chemiluminescene	1-3 min
Niki et al., 1985	ABAP	O_2 consumption	30-60 min
Klebanov et al., 1988	Egg yolk + Fe^{2+}	Chemiluminescene	10-20 min
Miller et al., 1993	ABTS + Peroxidase	VIS	5 min
TEAC-Test	$+H_2O_2$	spectophotometry	
Cao et al., 1995	AAPH	Fluorecence,	70 min/sample
ORAC-Test		R/β-phycoerythrin	(12 paralle)
Nakano et al., 1994	Meth-Hb	Luminescene, O_2	20-40 min
Ghiselli et al., 1995	ABAP	Fluorecence,	20-40 min
TRAP-Test		R-phycoerythrin	
Saramet et al., 1996	Luminol + H_2O_2	Chemiluminescene	10-20 min

หมายเหตุ ABAP: 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane), ABTS: 2,2'azinobis(3-ethylbenzothiazline-6 sulfonic acid), AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochoride, ABAP and AAPH are same substances

2.2 สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidants)

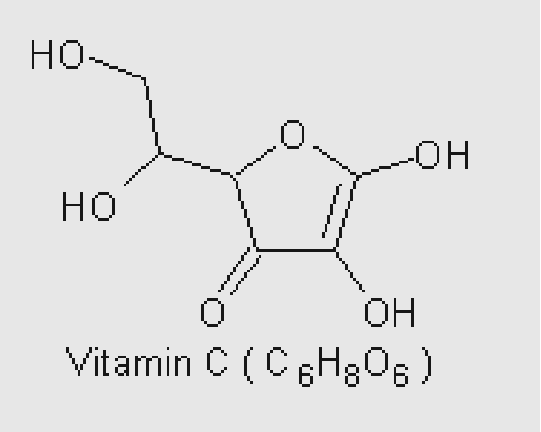
ในกระบวนการต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้องมีสารต้านการเกิดออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เข้าทำลายโมเลกุลที่เป็นสาเหตุการเกิดของอนุมูลอิสระนับเป็นกลไกการทำงานของกระบวนการต้านการเกิดออกซิเดชันที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ขึ้นกับชนิดของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione s-transferase (GST) เป็นต้น สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่พบในร่างกาย แต่ไม่จัดว่าเป็นเอ็นไซม์ ได้แก่ glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin, Cysteine เป็นต้น สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่พบในอาหาร แต่ไม่จัดว่าเป็นเอ็นไซม์ ได้แก่ tocopherols, carotinoids, ascorbic acid, steroids, ubiquinones, thiols, inosine, taurine, pyruvate, gallic acid, flavonoids, trolox เป็นต้น สารต้านการเกิดออกซิเดชันเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้นหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ “มีรายงานใหญ่ที่ติดตามการเป็นมะเร็งของประชากร 10,068 คน เป็นเวลาถึง 19 ปี ในจำนวนนี้พบมะเร็งปอด 248 คน พบว่าการทานผักและผลไม้ที่มีวิตามินเอ หรือ เบต้าแคโรทีน จะสามารถลดความเสี่ยงของมะเร็งปอดได้” (จักรพงศ์ ไพบูลย์, 2548)

สารต้านการเกิดออกซิเดชัน จากการรวบรวมและศึกษารายละเอียดของสารเหล่านี้จากรายงานการวิจัยหรือบทความทางวิชาการ สารต้านการเกิดออกซิเดชันนี้เป็นตัวที่พบในร่างกายและพบในอาหาร แต่เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่นำมาศึกษานี้ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มที่เป็นเอนไซม์ ที่จะนำมาใช้ในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น เพื่อการวิจัย

2.2.1 วิตามินซี (Ascorbic Acid)

วิตามินซี มี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิดคือ Ascorbic acid และ Dehydroascorbic acid ซึ่ง ascorbic acid ปกติจะอยู่ในรูปที่เป็นผลึกสีขาว เป็นวิตามินชนิดที่ละลายน้ำได้ (water soluble) เมื่อละลายน้ำมีฤทธิ์เป็นกรด มีความเสถียรที่ pH ต่ำกว่า6.8 ณ อุณหภูมิห้อง แต่จะถูกออกซิไดส์ได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในตัวกลางที่เป็นด่าง ในผลไม้หรือผักขบวนการออกซิเดชั่นจะเกิดอย่างช้า ๆ แต่ถ้านำมาบดหรือสับทำให้เกิดปฏิกิริยากับ ascorbic oxidase enzyme ที่มีอยู่ในผลไม้ เกิดออกซิเดชันอย่างรวดเร็ว และหรือเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น คุณสมบัติอย่างหนึ่งของวิตามินซีที่ทราบกันดีก็คือช่วยป้องกันและรักษาโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) ได้ โครงสร้างของวิตามินซีเป็นอนุพันธุ์ของน้ำตาลเฮกโซส และวิตามินซีสามารถที่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นได้จากกลูโคส วิตามินซีเมื่อถูกออกซิไดซ์สารตัวแรกที่ได้เป็น dehydroascorbic acid

เป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาทางเคมีในร่างกาย วิตามินซีร่วมในปฏิกิริยา oxidation-reduction หน้าที่ที่แน่ชัดของวิตามินซีคือ ทำให้เกิดการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) ขึ้นภายในเซลล์ เรืองลักขณา จามิกรณ์ (2543) ได้ให้รายละเอียดว่า “ascorbic acid มีบทบาทในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับโพรลีนเพื่อเกิดเป็นไฮดรอกซีโพรลีนอันเป็นกรดอมิโนที่พบในคอลลาเจน” เพราะวิตามินซีเป็นตัวสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นเส้นใยทำหน้าที่เชื่อมเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไว้ด้วยกัน (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, วิตามินซี) ปฏิกิริยาการขนส่งอนุมูลไฮโดรเจน (hydrogen) ด้วยเหตุนี้วิตามินซีจึงเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาทาง reducing agent หรือ antioxidant ที่มีพลัง และอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ (unpublished ascorbic, 2548) โดยที่วิตามินซีจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระของ superoxide และ hydroxyl (HO) ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งมาจากการสะลายตัวของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) วิตามินซีอาจจะทำปฏิกิริยาโดยทางอ้อมในการป้องกันการสะลายตัวของไขมันในเยื่อบุเซลล์โดยช่วยในการสังเคราะห์วิตามินอีที่ติดกับผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่เป็นการป้องกันโรคมะเร็ง อาจเนื่องมาจากวิตามินซีช่วยในการทำลายพิษของสารก่อมะเร็งโดยการยับยั้งขบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง เนื่องมาจากคุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและกระตุ้นให้มีภูมิต้านทาน



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic acid)
ที่มา: วีระพงษ์ เจนสุข (2007)

นอกจากนี้วิตามินซีช่วยในการสังเคราะห์คาร์นิทีน (carnitine) จากไลซีน และเมทไธโอนีน คาร์นิทีนมีประโยชน์ในการเผาผลาญกรดไขมันเพื่อสร้างพลังงานแก่ร่างกายแบบ active transport ซึ่งเป็นสารต้านการเกิดออกซิไดส์ (antioxidants) ช่วยป้องกันสารอื่นไม่ให้ถูกออกซิไดส์ เช่น วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง กรดโฟลิค กรดแพนโทเธนิค วิตามินเอและวิตามินอี ดำเกิง ปฐม

วาณิชย์ (2541) รายงานว่า ถ้าให้วิตามินซี 1 กรัมต่อวัน จนระดับวิตามินซีในเลือดปกติ ช่วยทำให้การทำงานของเกลือแร่บางชนิดออกฤทธิ์ช่วยให้ตัวอสุจิทำงานตามปกติ ในผู้ชายที่เป็นหมัน และ Szes′niak-Fabian′czyk, Bochenek, Smorag, และ Ryzka (2003) ได้มีการนำวิตามินซีเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร โดยการศึกษาถึงผลการเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ ต่อระยะเวลาในการเก็บรักษา

ตารางที่ 2.2 ผลของการเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ ต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร โดยใช้เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน เก็บที่อุณหภูมิ 15 °C

Treatment	Period (day)*	Source
Control	1.35[a]	Szes′niak-Fabian′czyk
0.25 mg/ml	3.33[b]	et al., 2003
0.50 mg/ml	3.33[b]	
2.50 mg/ml	3.67[b]	

[a,b] อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$), * ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จะใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ≥ 30 % ขึ้นไป

ระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิ 15 °C เมื่อเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ สามารถเก็บได้นานมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ผลที่ได้ของระดับที่เสริมทั้ง 3 ระดับนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ สามารถเก็บได้นานมากกว่า 3 วัน และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาในแพะเพศผู้ เสริมในระดับที่ใกล้เคียงกันกับระดับที่ใช้เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ในตารางที่ 2.3 พบว่า เมื่อเก็บที่ 4 °C เก็บนาน 24 ชั่วโมง เสริมวิตามินซีทุกระดับความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

ตารางที่ 2.3 ผลของการเสริมวิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ ในสารละลายน้ำเชื้อ

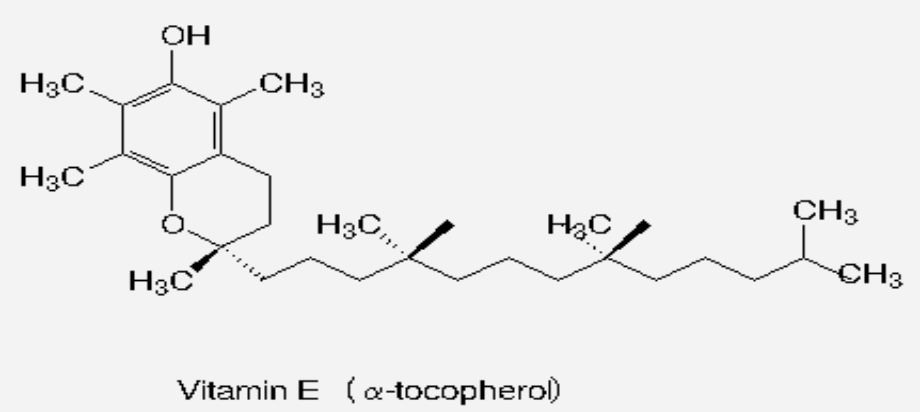
Treatment	Motility (%)	Percentage of lived sperm (%)	Source
For 0 h at 4°C			
Control	82.2	-	
Vitamin C 0.5 mg/ml	81.3	-	SÖNMEZ
Vitamin C 1.0 mg/ml	78.9	-	and
Vitamin C 2.0 mg/ml	79.2	-	DEMIRCI
For 24 h at 4°C			(2004)
Control	79.0±0.77[a]	72.38±0.16	
Vitamin C 0.5 mg/ml	78.8±0.68[a]	72.22±0.15	
Vitamin C 1.0 mg/ml	78.0±0.70[ab]	72.16±0.17	
Vitamin C 2.0 mg/ml	77.2±0.70[b]	71.92±0.16	

[a-c] อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

2.2.2 วิตามินอี (Vitamin E, α- tocopherol)

วิตามินอี เป็นสารประกอบสีเหลือง ละลายได้ในแอลกอฮอล์และไขมัน เป็นสารที่ไม่คงทน จะถูกทำลายเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงและรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด จะถูกทำลายเร็วขึ้นเมื่อมีแร่ธาตุและกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวรวมอยู่ด้วย วิตามินอีในรูป d-isomer มีปฏิกิริยาการทำงานมากกว่าอยู่ในรูป l-isomer ในทางการค้าวิตามินอีสังเคราะห์จะอยู่ในรูป dl-α-tocopheryl acetate สูตรโครงสร้างของวิตามินอี ดังแสดงในภาพที่ 2.2 วิตามินอีพบมากในน้ำมันพืช เช่น จากถั่วเหลือง ข้าวโพด และดอกคำฝอย น้ำมันจมูกข้าวสาลี น้ำมันตับปลา น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดทานตะวัน นอกจากนั้นยังพบในผักใบเขียว ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการปกป้องเซลล์ในร่างกายจากอนุมูลอิสระโดยวิตามินอีจะไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชัน อาศัยคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดออกซิไดส์ (วิตามินอี, 2551) ความสัมพันธ์กันระหว่างวิตามินอีและซีลิเนียมมีผลอย่างชัดเจน ในการป้องกันการเกิดการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และเปอร์ออกไซด์อื่นที่เกิดจากกรดไขมัน (fatty acid) สอดคล้องกับ Noguchi et al. (1973) อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo (2000) พบว่าซีลิเนียม มีหน้าที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ glutathione peroxidase: GSH-Px ช่วยลดการเกิดเปอร์ออกไซด์ (peroxide) และวิตามินอี มีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ GSH-Px จะไม่ทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะทำลายเซลล์ของ

ผนังเซลล์ในขณะที่วิตามินอีจะมีผลภายในผนังเซลล์จะทำการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของวิตามินอี (Vitamin E; α-tocopherol)
ที่มา: วิตามินอี (2551)

อย่างไรก็ตามของความสัมพันธ์จะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีการขาดอย่างใดอย่างหนึ่งไปซึ่งอาจจะก่อให้เกิดเสี่ยงต่อการเกิดโรคหรือความผิดปกติของเซลล์ ได้มีการนำ α-tocopherol เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ซึ่งมีการเสริมที่ระดับ 200, 500 และ 1000 μg/ml พบว่า เสริมที่ระดับ 200 μg/ml สามารถต้านการเกิด oxidative stress ที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อหลังจากการเจือจางด้วยสารละลายที่เสริมด้วย α-tocopherol ดังแสดงในตารางที่ 2.4 Breininger, Beorlegui, O'flaherty, and Beconi (2005) รายงานผลจากตารางว่า วิตามินอีและซิลิเนียมทำหน้าที่ร่วมกันในการป้องกันไม่ให้เกิดเปอร์ออกไซด์ โดยที่วิตามินอีอยู่ในเซลล์จะป้องกันไม่ให้เกิดกลุ่มอะตอมของไฮโดรเจนที่มีปฏิกิริยาไว ที่จะไปรวมตัวกับออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่กลุ่มอะตอมที่มีปฏิกิริยาไวซึ่งทำให้ไม่สามารถรวมตัวกับออกซิเจนได้ ส่วนซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ glutathione peroxidase ซึ่งเอนไซม์นี้อยู่ในพลาสมาและไซโตพลาส โดยจะทำหน้าที่กำจัดเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้แล้ว Smith and Akinbamijo (2000) ได้รายงานถึงผลของวิตามินอีกับซีลิเนียมในอาหารสุกรพ่อพันธุ์ การทดลองนี้ใช้พันธุ์ (Landrace x Yorkshire) x duroc ในช่วง growing phase (หย่านม-25 kg) และ finishing phase (25 -150 kg) โดยจะทำการให้อาหาร 4 สูตรมีการเสริมซีลิเนียม (0 หรือ 0.5 ppm) และวิตามินอี (0 หรือ 220 IU/kg diet) จากนั้นทำการเก็บน้ำเชื้อทั้งระยะเวลาที่ 16 สัปดาห์ในช่วงของ finishing phase เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม ซึ่งรายงานผลดังตารางที่ 2.5 ถึงผลของพ่อ

พันธุ์ที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลิเนียม พบว่า กลุ่มพ่อพันธุ์ได้รับอาหารเสริมซิลิเนียมมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่ดีกว่าทุกกลุ่ม แต่ไม่มีผลต่อตัวอสุจิ เมื่อเสริมซิลิเนียมลงในสารละลายน้ำเชื้อ

ตารางที่ 2.4 ผลการเสริมวิตามินอี (α-tocopherol) ที่ระดับต่าง ๆ ในสารละลายน้ำเชื้อ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

Treatment	Motility (%)	Lived sperm (%)	Source
Frozen-thawed sperm model			Breininger et al.,
After thawed for 0 h at 37°C			2005
Control	27.87[a]	58.5	
Vitamin E 200 µg/ml	37.87[b]	59.6	
Vitamin E 500 µg/ml	36.76[b]	57.7	
Vitamin E 1000 µg/ml	36.90[b]	56.8	
After thawed for 3 h			
Control	3.07[c]	28.16	
Vitamin E 200 µg/ml	5.86[d]	28.15	
Vitamin E 500 µg/ml	5.07[d]	26.17	
Vitamin E 1000 µg/ml	5.27[d]	24.16	

[a-d] อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2.5 การเสริมวิตามินอี (α-tocopherol) และซิลิเนียม ในอาหารสุกรพ่อพันธุ์ และการเสริมซิลิเนียมในสารละลายน้ำเชื้อ ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

Item and Time	**Boar dietary nutrient content**				
	Se, ppm		Vitamin E, IU/kg diet		
	0	0.5	0	220	SEM
Boar, no.	5	5	4	6	
	Motility, (%)				
Added in extender					
Initial	52.9	79.6	60.3	70.5	2.0[ab]
For 24 h					
0 ppm Se	33.3	41.7	37.4	37.6	3.4[a]
0.3 ppm Se	25.2	43.0	32.6	35.7	2.4[ac]
0.6 ppm Se	18.9	24.1	26.9	16.1	3.2
0.9 ppm Se	11.5	15.9	11.4	15.9	2.3
For 48 h					
0 ppm Se	24.3	37.7	32.8	29.1	3.7[d]
0.3 ppm Se	16.5	25.1	20.8	20.8	3.2
0.6 ppm Se	5.4	7.7	6.2	6.8	1.7
0.9 ppm Se	5.4	3.5	2.9	6.1	1.1
SEM	2.4[efg]	2.3[efg]	1.9[efg]	2.1[efg]	1.6

[a] Dietary Se response (P<0.01),[b] Dietary Vitamin E response (P<0.01),[c] Dietary Vitamin E response (P<0.05),[d] Dietary Se response (P<0.05),[e] Linear time response (P<0.01),[f] Extender Se level response (P<0.01),[g] Time x extender Se interaction response (P<0.01)

หมายเหตุ จาก Micronutrients and reproduction in farm animals. โดย Smith and Akinbamijo.

Anim Reprod Sci (2000)

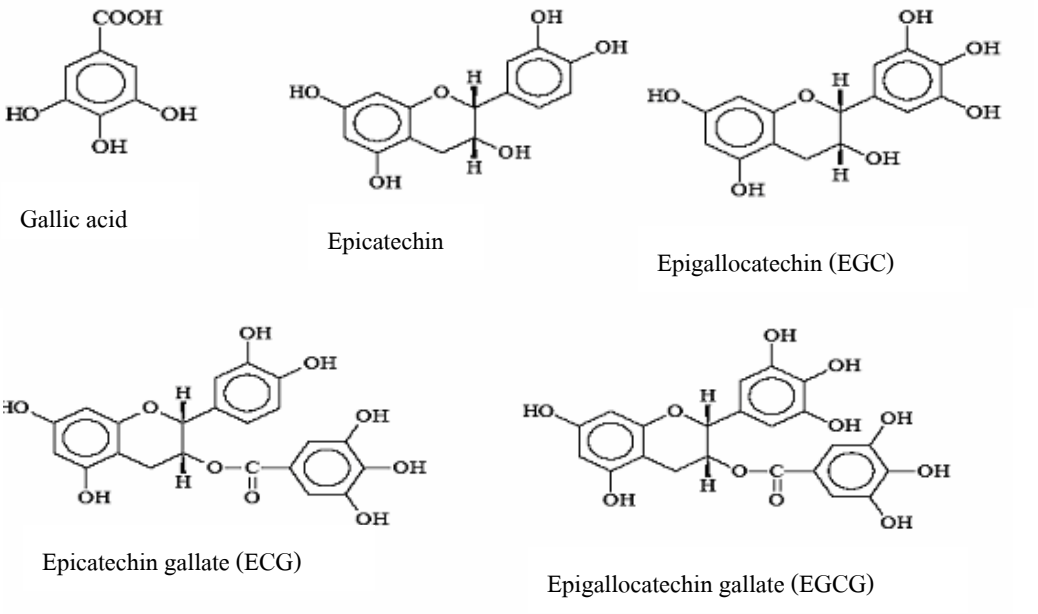
2.2.3 ชาเขียว (Green Tea)

มีทางชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* ชื่อวงศ์ Theacease มีชื่อเรียกอย่างอื่นว่า ชาดำ (black tea), ชาจีน (chinese tea), ชาไม่หมัก (unfermented tea), ชาอู่หลง (oolong tea), เซ็นซ่า (sencha) ชาที่มีคุณภาพดีจะต้องเลือกเด็ดเฉพาะยอดตูมกับใบอ่อนสองใบแรกเท่านั้น (โดยนับจาก

ปลายยอดเป็นใบที่หนึ่ง และใบที่สอง และก็ใบที่สามตามลำดับ) ส่วนใบชาที่ปลิดยอดยาว ติดใบชาที่สี่ หรือห้าใบ ถือกันว่าเป็นชาชั้นเลว ส่วนชาชั้นเลิศจะต้องเด็ดเฉพาะยอดชาสั้น ๆ หลักสำคัญในกรรมวิธีการผลิตอยู่ที่ oxidizing enzyme ได้แก่ polyphenol oxidase และ peroxidase ที่มีอยู่ในใบชา เมื่อใบชาถูกเด็ดออกจากต้น เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ หรือ เรียกปฏิกิริยาการหมัก (fermentation reaction) ทันทีที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นจะมีผลกระทบต่อปริมาณของ catechin ในใบชา เป้าหมายของการผลิตชาไม่หมัก คือ ป้องกันการเกิด oxidation reaction ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดทันทีที่ใบชาถูกเด็ดออกจากต้นชาเขียวเป็นชาที่นิยมดื่มกันที่ญี่ปุ่น มีกรรมวิธีการผลิตแบบไม่มีการหมัก (unfermented) โดยการนำเอายอดใบชามาอบไอน้ำและทำให้แห้งทันที จะไม่ผ่านกระบวนการนวดและหมัก ซึ่งทำให้พบสารที่มีฤทธิ์ (phytochemical) จำนวนมากกว่าชาชนิดอื่น ๆ และมีสภาพรสชาติของชาเขียวจะใกล้เคียงกับใบชาธรรมชาติมากที่สุด

สารประกอบ (Active compound) และสรรพคุณของชาเขียว มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับสารประกอบต่าง ๆ ที่พบอยู่ในชาเขียว ได้แก่

1) Polyphenols สารกลุ่มนี้พบมีในปริมาณสูงอยู่ในชาเขียว สารกลุ่มนี้มักมีชื่อเรียกว่า catechin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม polyphenols พบประมาณ 15-30% ของน้ำหนักชา สารในกลุ่ม polyphenol ที่น่าสนใจมีอยู่ 4 ชนิด คือ เอพิแคเทชิน (epicatechin), เอพิกัลโลแคเทชิน (epigallocatechin: EGC), เอพิแคเทชิน กัลเลต (epicatechin gallate) และ เอพิกัลโลแคเทชิน กัลเลต (epigallocatechin gallate: EGCG) ในชาเขียวมีปริมาณของสาร EGCG มากเป็นอันดับหนึ่ง โดยพบปริมาณครึ่งหนึ่งของสารกลุ่มนี้



ภาพที่ 2.3 สารในกลุ่ม Polyphenol

ที่มา: Dulloo, Duret, Rohrer, Girardier, Mensi, Fathi, Chantre, and Vandermander (1999)

2) Purine alkaloids เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในชาเขียว สารกลุ่มนี้อยู่ในกลุ่ม methyl xanthine ได้แก่ คาเฟอีน (caffein) 2.9-4.2%, ทีโอโบรมีน (theobromine) 0.15-0.2% และทีโอฟิลลีน (theophylline) 0.02-0.04%

3) แร่ธาตุ ที่พบในชาเขียวในปริมาณสูง ได้แก่ fluoride มีปริมาณ 130-160 mg/kg นอกจากนี้ก็ยังพบ potassium และ aluminium

4) วิตามิน ที่พบได้แก่ วิตามินบีรวม วิตามินซี และวิตามินอี

5) Other compound สารอื่น ๆ ที่พบอยู่ภายในชาเขียวได้แก่ flavonoids, triterpene saponins, GABA (gamma-amino butyric acid), theanine (เป็นกรดกรดอะมิโนชนิดหนึ่งช่วยเพิ่มรสอาหาร) polysaccharid, volatile oils และ caffeic acid derivatives

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชาเขียว (Biological activity)

1) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) จากโครงสร้างของสาร catechin จะพบว่ามี aromatic rings และ hydroxyl group เป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันที่แรง (Dulloo et al., 1999)

2) ฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง (Anticarcinogenic) สาร EGCG และ EGC มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดมะเร็งและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง โดยการเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นในการเจริญเติบโตหรือการลุกลามของเซลล์มะเร็ง และยังมีความสามารถที่จะทำลายหรือฆ่าเซลล์มะเร็งได้ มีการศึกษายืนยันเกี่ยวกับสาร EGC เมื่อได้รับสารนี้จะสามารถช่วยชะลอและป้องกันการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนั้นทั้งสาร EGCG และ EGC ยังสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการ apoptosis และยับยั้งอัตราการ replication ของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นจึงทำให้การเจริญและพัฒนาของเซลล์มะเร็งและเนื้องอกเกิดได้ช้า

3) ฤทธิ์ต้านเชื้อ (Antimicrobial) จากการศึกษาพบว่า สารสกัดของชาเขียวสามารถยับยั้งและต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermis*, *Samonella typhimurium*, *Samonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio* spp. (รวมทั้ง *Vibrio cholerrae*), *Clostridium* spp. สารสกัดชาเขียวสามารถป้องกัน rotavirus และ enterovirus ในเซลล์ไตของลิง และการศึกษาใน rabbit erythrocytes พบว่าสามารถยับยั้ง *Staphylococcus alphatoxin* และ *Vibrio parahaemolyticus* และยังมีรายงานเกี่ยวกับเครื่องดื่มชาเขียวที่มี catechin 3 mg/ml สามารถยับยั้ง *Bordetella pertussis* ได้พอกับ MRSA นอกจากนั้นก็ยังมีรายงานเพิ่มเติมในการยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton mentagrophyles* และ *Trichophyton rubrum* มีการศึกษาพบว่า สาร catechin ในชาเขียว โดยเฉพาะสาร EGCG ที่เป็นสารประกอบหลักมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้มีรายงานว่า ชาเขียวเข้มข้นสามารถช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อ HIV จับตัวกับเซลล์เม็ดเลือดขาว T- cells ซึ่งเป็นชนิดที่มีความสำคัญต่อภูมิคุ้มกันในร่างกายของคนเรา และเป็นด่านแรกที่ทำให้มีโอกาสติดเชื้อ HIV ได้ (Kawai, 2003)

4) ฤทธิ์ฝาดสมาน แก้ท้องเสีย ในชาเขียวมีสาร tannin ซึ่งมีฤทธิ์ฝาดสมาน สามารถใช้ในการรักษาอาการท้องเสียได้ และผลจากฤทธิ์ต้านเชื้อของชาเขียว ทำให้เสริมฤทธิ์ในการแก้อาการท้องเสีย โดยการฆ่าเชื้อที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการท้องเสีย

5) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเป็นผลจากการยับยั้งกระบวนการของ arachidonic acid metabolite เช่น สารพวก prostaglandin, leukotrien และ bradykinin เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุของ capillary sealing ได้ จึงสามารถช่วยในการป้องกันโรค ข้ออักเสบรูห์มาติก (rheumatoid arthritis)

6) Probiotic properties จากการศึกษาแม้จะไม่ทราบกลไกการเกิดแต่ก็พบว่า สาร catechin มีความสามารถในการช่วยทำให้การเจริญของ normal flora (*Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacteria* spp.) ดีขึ้น และเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตและลดจำนวนของ pathogen (*Clostridium perfingens* และ C. *difficile*)

7) ฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง เนื่องจากชาเขียวประกอบด้วย caffeine ซึ่งจะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาทส่วนกลางทำให้รู้สึกสดชื่น ตื่นตัว และกระปรี้กระเปร่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการกระตุ้นการซึมเศร้าได้ (ประทานพร พิพัฒน์จำเริญกุล, 2547)

8) ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ชาเขียวประกอบด้วยสาร caffeine และสาร theobromine ซึ่งทั้งสองมีความสามารถทำให้ renal vessel ขยายขนาดขึ้น และเพิ่มอัตราการกรองของไต แล้วส่งผลให้มีการขับปัสสาวะได้ และภายในชาเขียวยังมีสาร theophylline ในการช่วยขยายหลอดหลอดลมได้ด้วย

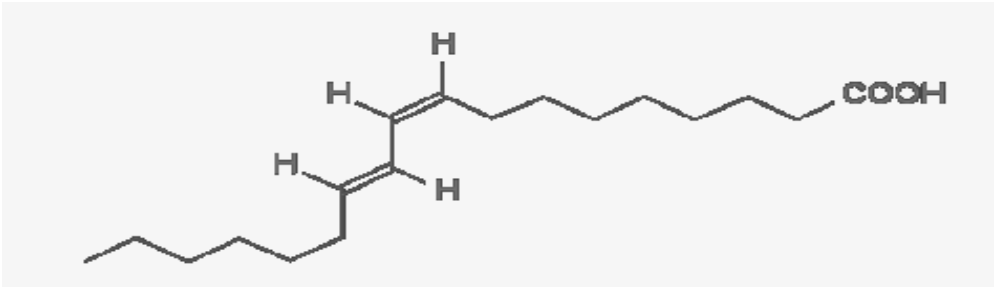
9) Dental hygiene properties การเกิดฟันผุเป็นเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ S. *sobrinus* ในช่องปาก ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลได้เป็นสาร glucans ที่มีลักษณะเหนียวข้นไม่ละลายน้ำเคลือบอยู่ที่ฟัน แล้วเชื้อจินทรีย์จะใช้ glucans นี้เป็นอาหาร ในระหว่างกระบวนการเมทตาบอลิซึมเกิดการสร้างกรดซึ่งไปทำลายสารเคลือบฟันเป็นสาเหตุทำให้ฟันผุ จากการทดสอบสาร catechin ภายในชาเขียวในห้องปฏิบัติการพบว่า สาร catechin มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการผลิต glucans ของเชื้อ M. *mutans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และภายในชาเขียวยังประกอบด้วย fluoride จำนวนมากซึ่งเป็นส่วนช่วยเสริมสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรงได้ จึงสามารถป้องกันฟันผุได้ นอกจากนั้นทั้งสาร catechin และ fluoride ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นปากได้อีกด้วย (Trevissanato and Kim, 2000)

10) ลดคลอเลสเตอรอล สาร catechin ในชาเขียวช่วยลดระดับ LDL cholesterol ในเลือดของหนูได้ โดยทำให้หนูถ่ายไขมันและ cholesterol ออกทางอุจจาระเพิ่มขึ้น แต่กลไกไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานที่แนะนำว่า catechin อาจมีฤทธิ์ hypolipidemic effect ซึ่งเกี่ยวพันธ์กับการลดระดับของ triacylglycerols และคลอเลตเตอรอลอาจมีกลไกออกฤทธิ์ในการลดการทำงานของการสังเคราะห์กรดไขมันที่ตับ (FAS), HMG-CoA-reductase และ acyl CO-A ที่ลำไส้เล็ก (intestinal

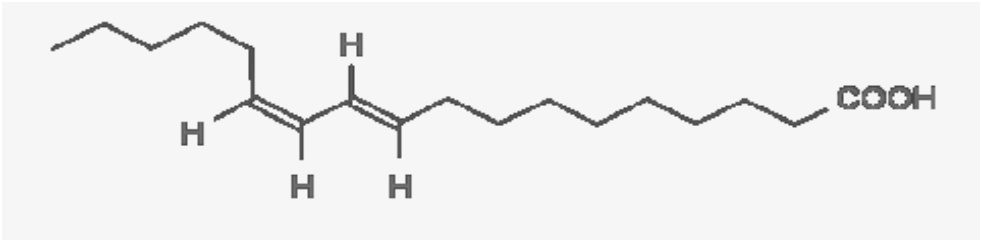
acyl Co-A: cholesterol acyltransferase) (Skrzydlewska, Ostrowska, Farbszewski, and Michalak, 2002)

2.2.4 กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (Conjugated linoleic acid: CLA)

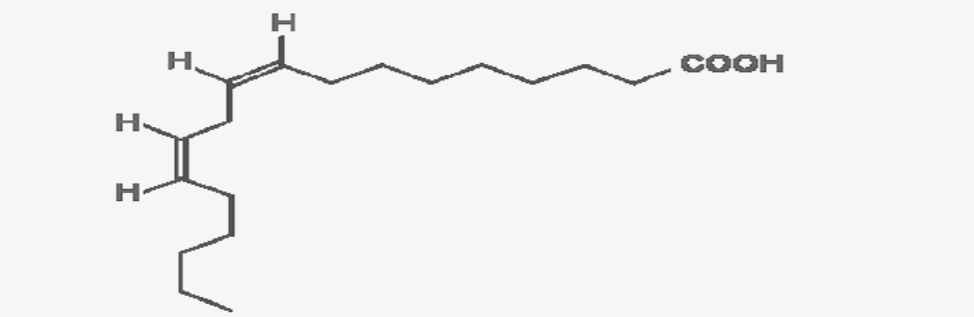
Conjugated linoleic acid (CLA) เป็นกรดไขมันที่จำเป็น โครงสร้างตรงตำแหน่งพันธะคู่ (double bond) 2 ตำแหน่ง และมีพันธะเดี่ยวคั่นอยู่ตรงกลางเพียง 1 ตำแหน่ง โดยจะมีอยู่ประมาณ 16 ไอโซเมอร์ และพบมากที่สุดในธรรมชาติเพียง 2 ไอโซเมอร์ คือ cis-9, trans-11-octadecadienoic acid และ trans-10,cis-12-octadecadicadienoic acid โดย Kepler, Hirons, McNeill, and Tove (1966) พบว่า CLA ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากขั้นตอนแรกของ biohydrogenetion ของ linoleic acid โดย linoleic acid isomerase ของแบคทีเรีย *Butyrivibrio brisolvens*



Cis 9, trans 11 conjugeted linoleic acid



Trans 10, cis 12 conjugeted linoleic acid



Linoleic acid

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Linoleic acid และ Conjugated linoleic acid (CLA)
ที่มา: Dakey (2004)

โดยการรายงานของ Ha, Storken, and Pariza (1989) พบว่า CLA มีคุณสมบัติเป็น antioxidant มากกว่าวิตามินอี (α-tocopherol) และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ Butylated hydroxytoluene (BHT) ซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ในร่างกาย CLA เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ส่งผลต่อหน้าที่ของผนังเซลล์โดยอาจมีผลต่อเนื่องไปถึงการตอบสนองของเอ็นไซม์และฮอร์โมน การแทรกผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ การเคลื่อนไหวของผนังเซลล์ รวมทั้งผลต่อจำนวนและหน้าที่ของ receptor ที่ทำหน้าควบคุมการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถพบกรดไขมันพิเศษนี้ในน้ำมันดอกคำฝอย (Safflower oil) และน้ำมันดอกทานตะวัน (Sunflower oil) โดยปริมาณที่พบในน้ำมันดอกคำฝอยจะมีมากกว่าปริมาณที่พบในน้ำมันดอกทานตะวัน (CLA, 2008)

2.2.5 ดอกคำฝอย (Safflower)

ชื่อภาษาอังกฤษว่า Safflower และมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Carthmus tinctorius* Lnn. เป็นพืชวงศ์เดียวกับเก็กฮวย เป็นพืชล้มลุกที่มีดอกออกรวมกันเป็นช่ออัดแน่นบนฐานดอก ดอกกลมเหมือนดอกดาวเรือง ดอกอ่อนมีสีเหลืองและจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีส้ม พอแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง สารสีแดงที่ชื่อคาร์ทามิน (carthamin) และสารสีเหลืองชื่อ แซฟฟลาวเวอร์เยลโล (safflower yellow) ซึ่งเป็นสีที่ละลายน้ำได้และเป็นสารประกอบของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Li, Han, Wang, Ma, Zhang, Wang, Ma, and Tu, 2009) ฟลาโวนอยด์เป็นสารเชิงซ้อนชนิดนี้สามารถทำงานร่วมกับวิตามินซี โดยสามารถเปลี่ยนให้เป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ ในเมืองไทยพบมากทางภาคเหนือ คนเหนือเรียกว่าดอกคำหรือดอกคำยอง ส่วนคนจีนเรียกว่า Honghua นอกจากนี้ยังมีการนำเสนอของ สมุนไพร: ยาไทยที่ควรรู้(1999) ว่ามีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวหลายชนิด เช่น โปรตีน เบต้าแคโรทีน วิตามินอี เป็นต้น ในน้ำมันจากเมล็ด (safflower seed oil) ซึ่งได้จากการบีบเมล็ด ประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวหลายชนิดในปริมาณสูง เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดลิโนลิก (linolic acid) และกรดโอเลอิก (oleic acid) เป็นต้น เบต้าแคโรทีน มีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการเป็น antioxidant ที่ช่วยในการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระ และความเครียดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxidation) (Health control, 2548) ให้ผลรายงานเช่นเดียวกันกับ สุภาณี ศุกระฤกษ์ (2540) ว่า เบต้าแคโรทีนเป็นสาร antioxidant ซึ่งคอยกำจัดอนุมูลอิสระ ก่อนที่มันจะไปทำปฏิกิริยาทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ จนทำให้เซลล์นั้นมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และมีนักวิทยาศาสตร์ได้พบว่า ดอกคำฝอยมี กรดไลโนลิค อยู่มาก

2.2.6 กลูตาไธโอน (Glutathione)

Glutathione (GSH) (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine) เป็นสารประเภทไตรเปปไทด์ (tripeptide) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ L-cysteine glycine และ L-glutamate ที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้เองและกระจายอยู่ทั่วไปภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (กลูตาไธโอน, 2551) มีความเข้มข้นที่ช่วง 0.5-10 mmol/L (Stewart, 1996) กลูตาไธโอนที่สร้างขึ้นจะนำมาใช้ร่วมกับซิลิเนียมสร้างเอนไซม์ต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant enzyme) ซึ่งพบได้ทั่วไปในรูปของ glutathione peroxidase (GSSG) โดยจะมีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระและยังช่วยสร้างและซ่อมแซม DNA สร้างโปรตีนและ protaglandin โดยเฉพาะในส่วนของ seminiferous tubule ซึ่ง GSH มีหน้าที่ป้องกันกลไกการเกิด oxidative stress กล่าวคือ GSH เป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้มีการทำงานของ glutathione peroxidase ลดหรือทำให้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ให้ได้น้ำ (H_2O) และ lipid peroxidation (LPO) ให้เปลี่ยนเป็น alkyl alcohols โดยจะมีการใช้ NADPH เป็น co-factor ร่วมด้วย และจาก Agrawal and Vanha-Perttula (1988, อ้างถึงใน Stewart, 1996) ว่า Sertoli cell ภายใน seminiferous tubule เป็นเซลล์พี่เลี้ยงทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์กลูตาไธโอนและ germ cell โดยกลูตาไธโอนจะกระจายอยู่ทั่วไปภายในอวัยวะต่าง ๆ ของระบบสืบพันธุ์ และน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิของการหลั่งน้ำเชื้อแต่ละครั้ง

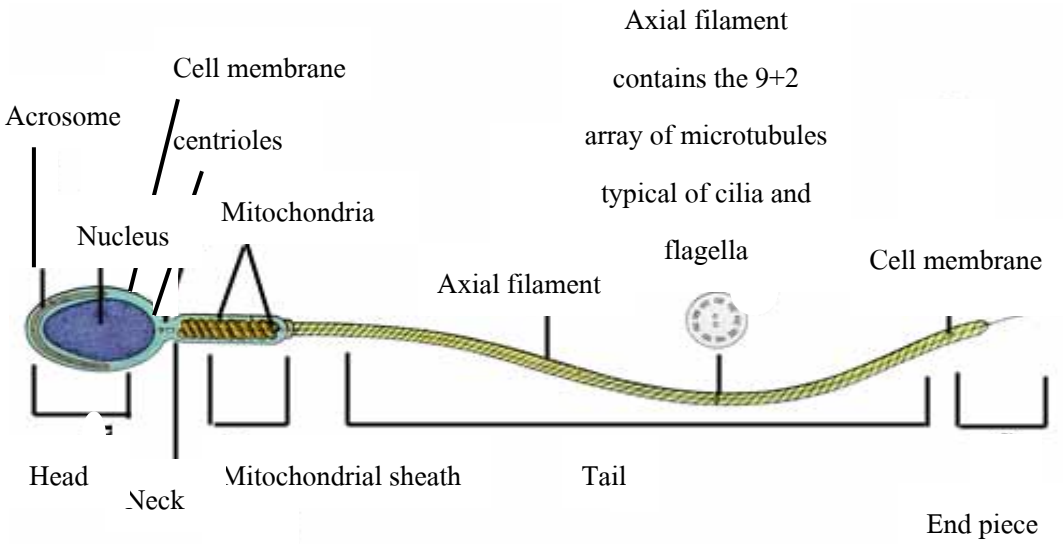
2.3 น้ำเชื้อสุกร (Boar semen)

ในการหลั่งน้ำเชื้อแต่ละครั้งของสุกรพ่อพันธุ์จะประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ตัวอสุจิ (spermatozoa) และน้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) ตัวอสุจิที่ปนอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยตัวอสุจิจะถูกกระบวนการภายใน seminiferous tubules ซึ่งเป็นท่อขดไปมาในลูกอัณฑะสร้างขึ้นมา เมื่อสร้างเสร็จก็ลำเลียงมาที่ epididymides มีการพัฒนาของตัวอสุจิเรื่อยมาจนสามารถเคลื่อนที่ได้ตัวตัวของมันเอง แล้วลำเลียงผ่านทางท่อนำน้ำเชื้อ (vas deference) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (semen) จะถูกสร้างและหลั่งมาจาก accessory gland ซึ่งประกอบด้วย Vesicular gland Prostate gland และ Bulbourethral gland ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันดังแสดงดังตารางที่ 2.6

2.3.1 ลักษณะของตัวอสุจิ

การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรแต่ละครั้งจะมีตัวอสุจิประมาณ 200 ล้านตัว ในน้ำเชื้อที่ดีควรจะมีลักษณะของตัวอสุจิปกติ 80-90% และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 60-70% เพราะมีความสำคัญต่อการนำไปใช้การผสมต่อไป ตัวอสุจิจะมีความยาวทั้งหมดประมาณ 60-70 μM โดยส่วนหัวยาว 8-10 μM ซึ่งส่วนหัวจะมีลักษณะแบน กว้าง 4 μM หนา 0.5 μM ดังนั้นความยาวที่เหลือก็เป็นความยาวของส่วนหาง ตัวอสุจิมีลักษณะแบ่งออกได้ 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (Head),

ส่วนชิ้นกลาง (Middle piece) และ ส่วนหาง (Tail) ในส่วนหัวจะมี Chromatin ทำหน้าที่ผสมกับไข่ โดยส่วนหัวจะประกอบด้วย nucleus และ acrosome ซึ่งภายใน nucleus จะมี DNA (deoxyribonucleic acid) เป็นส่วนใหญ่ และ arginine-rich histones เป็นสารประกอบโปรตีนใน nucleus จำนวน chromosome ใน nucleus เป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย อีกส่วนของส่วนหัวคือ acrosome เป็นเซลล์ห่อหุ้ม nucleus อยู่ด้านหน้าจะประกอบด้วยผนังหุ้ม 2 ชั้น เป็นถุง (granule) ภายในถุงจะมีเอ็นไซม์ acrosin hyaluronidase และ hydrolytic enzyme ทำหน้าที่ย่อย plasma membrane และ zona pellucida เพื่อให้สามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้และเกิดปฏิสนธิขึ้นภายในเซลล์ ส่วนถัดมาคือส่วนชิ้นกลาง (middle piece) จะประกอบไปด้วย axoneme เป็นแกนกลางของส่วนหางทั้งหมด ต่อจากนั้นจะมีเส้นใยหนาหุ้มรอบโดยจะมีคุณสมบัติการยืดหยุ่นและการหดตัวได้ดี สำหรับการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ในส่วนชิ้นกลางนี้จะมีส่วนของไมโตรคอนเดีย (mitochondria) เป็นแหล่งพลังงานให้แก่ตัวอสุจิใช้ในการเคลื่อนไหว ส่วนสุดท้ายเป็นส่วนหาง (Tail; end piece) นอกจาก axoneme จะมี plasma membrane หุ้มอยู่ทั้งหมด แสดงดังภาพที่ 2.5

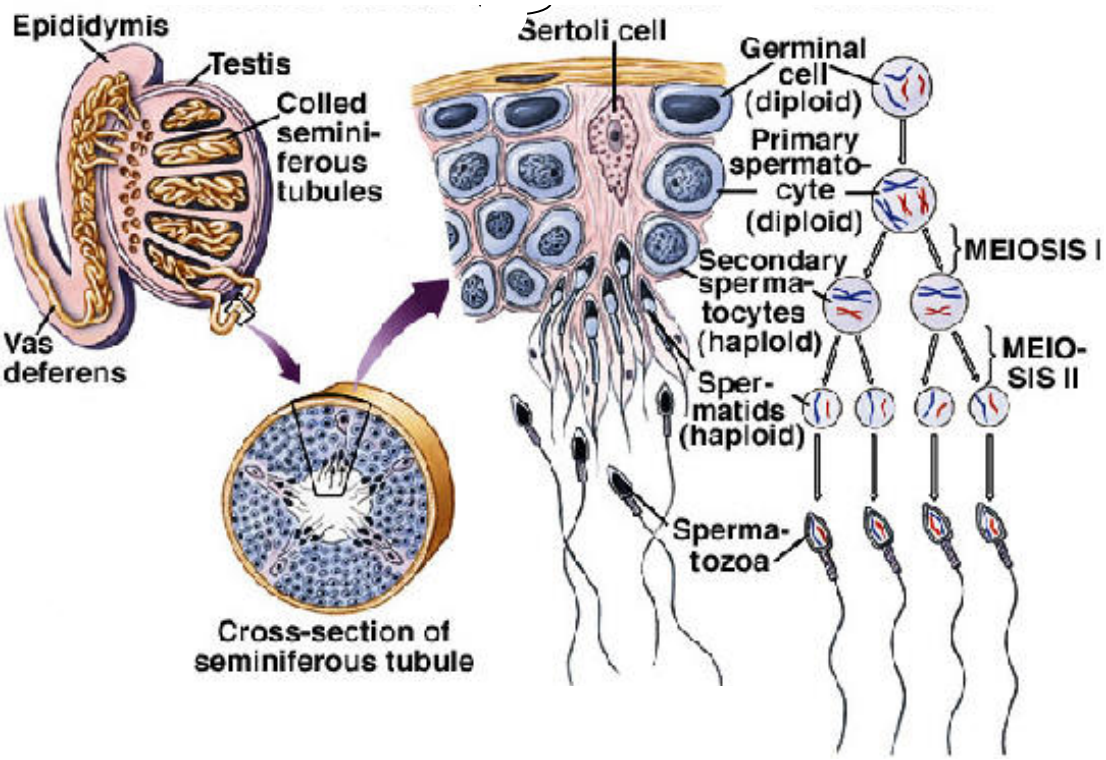


ภาพที่ 2.5 ตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
ที่มา: Montgomery [online]

2.3.2 การสร้างตัวอสุจิ

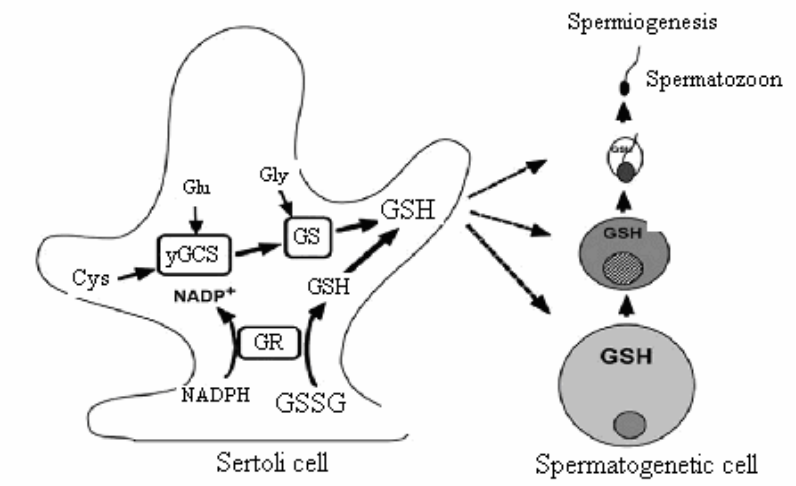
การสร้างเซลล์อสุจิใน seminiferous tubule ภายในอัณฑะของสัตว์เพศผู้ ดังในภาพที่ 2.6 จากกระบวนการสร้างตัวอสุจิ (spermatogenesis) ซึ่งจะเกิดขึ้นหลายระยะใน seminiferous tubule ได้แก่ spermatogonium และ spermatocyte จะมีการพัฒนาเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ จนไปเป็น

ตัวอสุจิที่สมบูรณ์ดังที่ได้กล่าวมา โดยปกติกระบวนการสร้างตัวอสุจิตั้งแต่แรกจนกระทั่งไปอยู่ในน้ำเชื้อ ในสุกรใช้เวลาประมาณ 21 วัน โดยที่การสร้างตัวอสุจิ (spermagenesis) เกิดขึ้นใน seminiferous tubule ใช้เวลาประมาณ 9 วัน แล้วมีการเคลื่อนย้ายไปที่ epididymis ใช้เวลาประมาณ 12 วัน (Hafez and Hafez, 2000) และมีเซลล์ที่คอยทำหน้าที่เป็นพี่เลี้ยงหรือสนับสนุนให้กับตัวอสุจิในระหว่างการเปลี่ยนแปลงของตัวอสุจิ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการกำจัดเซลล์อสุจิที่ผิดปกติหรือแม้แต่เซลล์ที่เสื่อมสภาพของตัวอสุจิ เรียกว่า Sertoli cell ดังในภาพที่ 2.7 นอกจากนั้นยังมีหน้าที่ในการรักษาความสมดุลให้กับตัวอสุจิ โดยจะสร้าง glutathione และหลั่งออกมากับน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิ ขณะที่อยู่ภายในลูกอัณฑะ



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างภายใน seminiferous tubule ในการสร้างอสุจิ

ที่มา: Unpublished Reproductive System (2005)



ภาพที่ 2.7 การสร้าง glutathione ภายใน Sertoli cell

ที่มา: Fuji, Luchi, Matsuki, and Ishii (2003)

น้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) จะประกอบไปด้วยสารคัดหลั่งจาก accessory gland ลำเลียงจากท่อนำน้ำเชื้อ (vas deference) การหลั่งของสารคัดหลั่งจาก accessory gland ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen hormone) และฮอร์โมนที่ทำงานยับยั้งฮอร์โมนแอนโดรเจน คือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen hormone) ในการหลั่งสารคัดหลั่งจาก accessory gland จะมารวมกันที่อิพิดิไดมิส (epididymis) โดยของเหลวจะหลั่งออกมาพร้อมกับตัวอสุจิกลายเป็นน้ำเชื้อในระดับที่เหมาะสม แต่ละต่อม (gland) จะมีการหลั่งของเหลวออกมาในปริมาณที่แตกต่างกันไป ในโคและแกะหลั่งน้ำเชื้อได้เร็วมากและมีการรวมของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้าด้วยกันอย่างรวดเร็ว และสุกรใช้เวลา 2 - 10 นาที ปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อนั้นจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของสัตว์และสภาพทางกายวิภาค ทำให้ความแตกต่างทั้งปริมาตรและส่วนประกอบต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.6 ในสุกรมีการหลั่งของน้ำเลี้ยงเชื้อออกมามากทำให้ปริมาตรน้ำเชื้อที่หลั่งออกมากและและมีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อย หน้าที่ของน้ำเลี้ยงเชื้อ คือ เป็นอาหารเลี้ยงตัวอสุจิและเป็นตัวลำเลียงตัวอสุจิจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เข้าไปยังอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเพื่อดำรงชีวิตในระหว่างรอการปฏิสนธิ

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำเลี้ยงเชื้อ (semen) ของสัตว์แต่ละชนิด

ส่วนประกอบต่าง ๆ (mg/ 100 ml)	Bull	Ram	Boar	Stallion	Cock
Ejaculate volume (ml)	5-8	0.8-1.2	150-200	60-100	0.2-0.5
Sperm concentration (million/ml)	800-2000	2000-3000	200-300	150-300	3000-7000
Sperm/ejaculate (billion)	5-15	1.6-3.6	30-60	5-15	0.06-3.5
Motile sperm (%)	40-75	60-80	50-80	40-75	60-80
Morphologically normal sperm (%)	65-95	80-95	70-90	60-90	85-90
pH	4-7.8	5.9-7.3	7.3-7.8	7.2-7.8	7.2-7.6
Fructose	460-600	250	9	2	4
Sorbitol	10-140	26-170	6-18	20-60	0-10
Citric acid	620-806	110-260	173	8-53	nil
Inositol	25-46	7-14	380-630	20-47	16-20
Glyceryl phosphoryl choline (GPC)	100-500	1100-2100	110-240	40-100	0-40
Magnesium	8±0.3	6±0.8	5-14	9	14
Chloride	174-320	86	260-430	448	147
Ergothioneine	0	0	17	40-110	0-2
Sodium	225±13	178±11	587	257	352
Potassium	155±6	89±4	197	103	63
Calcium	40±2	6±2	6	26	10

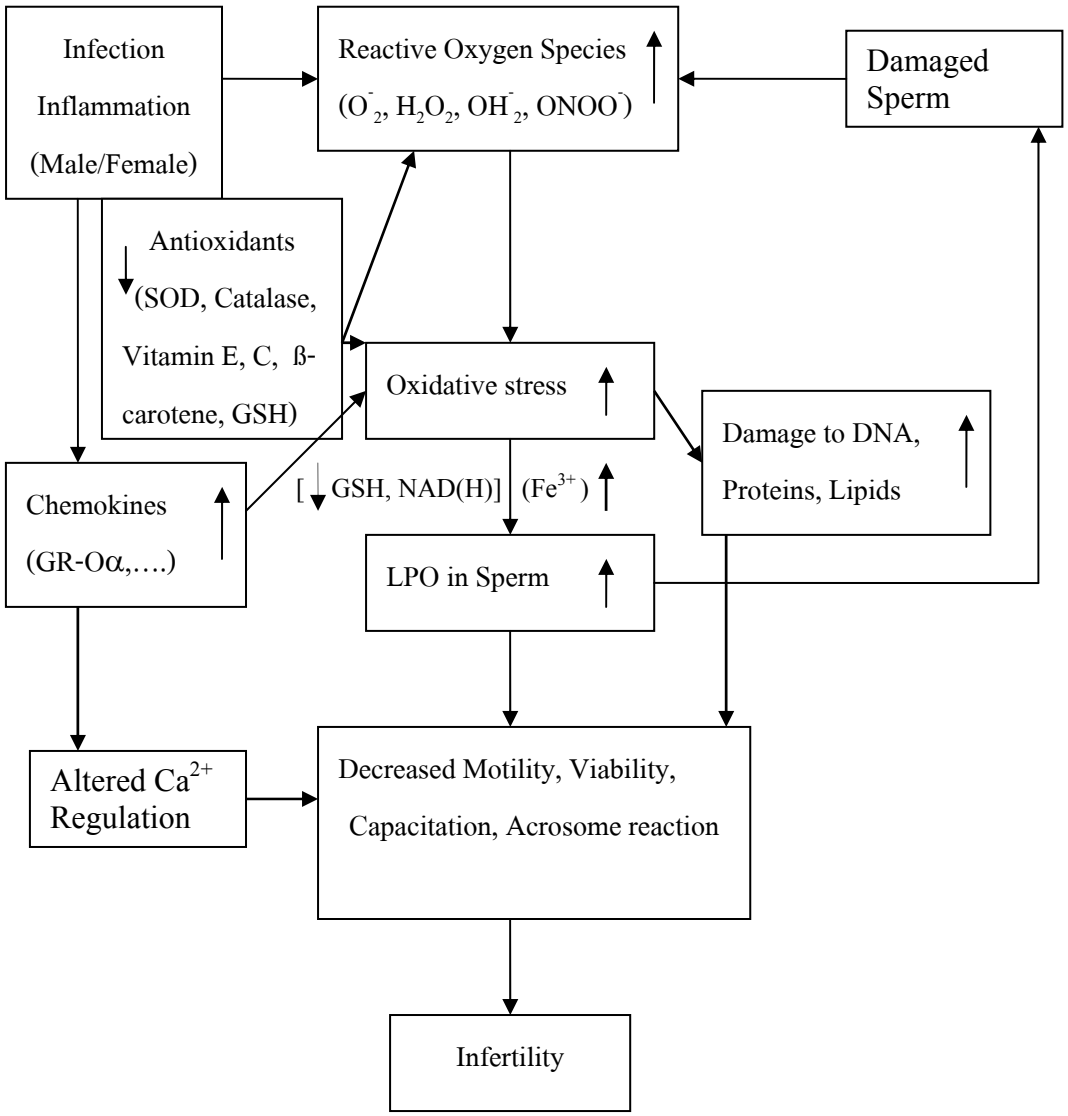
หมายเหตุ จาก Hafez and Hafez (2000)

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อตัวอสุจิ

ในช่วงของวันที่มีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรไว้เพื่อใช้ในการผสมเทียม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15-17˚C หลังจากมีการรีดเก็บน้ำเชื้อจะ พบว่า ความสามารถในการเข้าผสมกับไข่ของตัวอสุจิจะลดต่ำลง และยังพบว่า “มีผลมาจากการเกิดความเครียด (oxidative stress) ในระหว่างที่เก็บไว้ในหลอดเก็บน้ำเชื้อ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของ lipid peroxidation (LPO) ในส่วนของผนังเซลล์ ด้วยกระบวนการ reactive oxygen species (ROS) มีปัจจัยมาจากส่วนของ unsaturated fatty acid และ ปริมาณของกลูตาไธโอนของตัวอสุจิมีปริมาณที่ต่ำ” (Stewart, 1996) ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, and Gagnon (1997) ได้ให้ความเห็นว่า การลดลงของกลูตาไธโอน เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาของกระบวนการ ROS จะมีผลทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิ เช่น ไมโตรครอนเดีย และในส่วนของสารพันธุกรรม (Genomic integrity) โดยกลูตาไธโอนมีปริมาณที่ลดต่ำลงนี้ เป็นกลูตาไธโอนที่ถูกสร้าง และหลั่งจาก Sertoli cell ออกมา

พร้อมกับน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Semen) และได้มีการศึกษาถึงผลสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อทั้งการเก็บรักษาในรูปของน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่า สามารถป้องกันการทำลายภายในของตัวอสุจิ สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่มีการเสริมนั้นมีอยู่มากมาย เช่น Glutathione, Cysteine, N-acetyl-cysteine และ 2-mercaptoethanol (Suresh, Rajasekarn, and Hellstrom, 1995) มีนักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจในด้านนี้ เพื่อที่จะคิดและพัฒนาหาวิธีที่จะทำให้รักษาตัวอสุจิได้นานและมีประสิทธิในการเข้าผสมกับไข่ จากงานวิจัยของ Funahashi and Sano (2004) พบว่า การเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อแช่เย็นในสุกรสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานมากกว่า 14 วัน และรักษาความสามารถในการเข้าผสมกับไข่ของตัวอสุจิได้ดี ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จักรพงศ์ ไพบูลย์ (2548) รายงานว่า ถ้าการเกิดสารอนุมูลอิสระมากเกินไปออกซิเจนในร่างกายจะถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ oxidative stress เปลี่ยนตนเองเป็นสารมีพิษเพื่อที่จะมาทำลายสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ซึ่งถ้ามากเกินไปเนื้อเยื่อต่าง ๆ ถูกทำลายมากไปเรื่อย ๆ เกิดเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่กันไป อันนำมาให้เกิดความเสื่อมต่าง ๆ ของร่างกาย โดยการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ในสัตว์เพศผู้ล้วนอาศัยตัวอสุจิของสัตว์เป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม “ในอะโครโซม (Acrosome) ของตัวอสุจิมีลักษณะเป็น lipid peroxidation (LPO) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ อะโครโซมที่มีลักษณะ non-enzymatic membrane LPO และอีกลักษณะคือ enzymatic ($NADPH^-$ และ ADP-dependent) LPO เป็นลักษณะทั่วไปของอะโครโซมตัวอสุจิสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในตัวอสุจิจะประกอบไปด้วยกลุ่มอนุพันธ์ของกรดไขมันสายยาว (unsaturated fatty acid) ที่มีความไวต่อการเกิดกระบวนการของ ROS” (Suresh et al., 1995) และพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จะเกิดการสังเคราะห์ในส่วนของไมโตคอนเดรีย โดยส่วนของ enzymatic ภายในไมโตคอนเดรียและการแลกเปลี่ยน (translocation) แคลเซียมเข้าสู่เซลล์ (Johnson, Weitze, Fiser, and Maxwell, 2000) จากส่วนนี้เองจะทำให้การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลง วัดจากการลดลงของความสามารถการเข้าผสมกับไข่ (sperm-oocyte fusion) ได้ เพิ่มความผิดปกติส่วน midpiece ได้อีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2.8 ด้วยปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อตัวอสุจิ



SOD; Superoxide dismutase, GSH; Glutathione, NAD(H); Nicotinamide adenine dinucleotide (hydrogen), LPO; Lipid peroxidation, DNA; Deoxyribonucleic acid

ภาพที่ 2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อตัวอสุจิ

ที่มา: Suresh et al. (1995)

นอกจากนี้แล้ว Luberda (2005) ได้ศึกษาปริมาณของกลูตาไธโอนในสัตว์แต่ละชนิด โดยได้แสดงในตารางที่ 2.7 เพื่อเป็นการบ่งบอกถึงความต้องการถึงการนำไปใช้ในการเสริมในระดับต่าง ๆ ต่อการต้านการเกิดออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อไป

ตารางที่ 2.7 ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในน้ำเชื้อ (seminal plasma) ของสัตว์แต่ละชนิด

Species	Glutatione	References
Bull	13 – 19 μM	Agrawal and Vanha-Perttula, 1988
	17 ± 7 pmol / mg protein	Bilodeat et al., 2000
Stallion	77.27 ± 48.0 mg / 100 cm^3	Strzezek et al., 2000
Boar	185.8 ± 46.7 μM	Strzezek et al., 1999
	5.7 ± 1.4 mg / 100 cm^3	

หมายเหตุ จาก The role of glutathione in mammalian gametes. โดย Luberda**. Reprod Biol** (2005)

จากข้อมูลในตาราง 2.7 สามารถบ่งบอกได้ว่า ถ้าทำการรักษาปริมาณของกลูตาไธโอนในน้ำเชื้อให้คงที่ไว้เสมอ เพื่อไม่ให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ LPO ที่ผนังเซลล์ของอสุจิ กลูตาไธโอนที่มีอยู่ภายในน้ำเลี้ยงเชื้อ (semen) จะถูกใช้ไปจากกระบวนการป้องกันตัวเองของกระบวนการ oxidative stress ภายในเซลล์อสุจิ หลังจากที่รีดเก็บน้ำเชื้ออยู่ตลอดเวลา จึงมีผลทำให้มีปริมาณลดลง การลดลงของปริมาณกลูตาไธโอน ในช่วงเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน จะเกิดการเสื่อมสภาพของตัวอสุจิ มีสาเหตุจากระหว่างที่เก็บรักษาจะเกิดการสูญเสียพลังงาน (ATP: Adenosine triphosphase) และ cAMP มีผลให้ลดการนำแคลเซียม (calcium) เข้าสู่เซลล์ (Johnson et al., 2000) ซึ่งเป็นผลทำให้การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility) ลดลงและในขณะนั้น ผนังเซลล์ถูกทำลายด้วย ทั้งนี้เพราะ LPO เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ ซึ่ง unsaturated fatty acid ใน phospholipids ของผนังเซลล์ ส่วนไขมันที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย มีผลทำให้เปลี่ยนแปลงความสมดุลของไขมันที่ผนังเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ส่วน LPO จะถูกป้องกันกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase/reductase system และทั้งนี้ไม่มีการสร้างเพิ่มเติมจาก Sertoli cell เช่นเดียวกับภายในเซลล์ seminiferous tubule และการศึกษาของ Gadea, Selles, Marco, Coy, Matas, Romar, and Ruiz (2004) พบว่า ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จะมีผลทำให้ปริมาณกลูตาไธโอนในสารละลายน้ำเชื้อลดต่ำลง ดังแสดงตารางที่ 2.8 ซึ่งแสดงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่ระยะเวลาต่าง ๆ ต่อปริมาณของกลูตาไธโอน ดังนั้นแล้วถ้ามีการเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อ เพื่อเป็นการรักษาปริมาณของกลูตาไธโอนภายในเซลล์อสุจิให้มีระดับคงที่ จะมีผลต่อคุณภาพของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น Funahashi and Sano (2004) ได้ศึกษาถึงผลการกลูตาไธโอนในสารละน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น “โดย

ปกติสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant and free radical scavengers) ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไป หรือ ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของสารอนุมูลอิสระทำให้สามารถควบคุมการทำงานของอนุมูลอิสระได้ เช่น SOD อยู่ในไมโตครอนเดีย (mitochondria) เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำกับออกซิเจน catalase ยับยั้งและทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Glutathione Peroxidase ทำงานร่วมกันกับซิลิเนียม (Se) ต้านการเกิดพิษภายในเซลล์" (Chatri Ngmkitidechakul, 2005)

ตารางที่ 2.8 ปริมาณกลูตาไธโอน (glutathione: GSH) ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

Treatment	**GSH (nM /10^8 cell)**
Fresh semen	4.99 ± 0.23
Store for 24 h at 15°C	4.72 ± 0.18

หมายเหตุ จาก Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Gadea et al., **Theriogenology** (2004)

การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีส่วนที่ต้องอาศัยตัวตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ขึ้น ดังนั้นแล้วการเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อก็จึงเป็นผลที่ดีต่อการรักษาหรือคงคุณภาพของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากการเจือจางน้ำเชื้อ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 2.9 และ 2.10

ตารางที่ 2.9 สารละลายน้ำเชื้อที่ได้เสริมกลูตาไธโอน ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Animal	**Treatment**	**Percentage of lived sperm (%)**	**Sources**
Boar	Control for 24 h. at 10°C	90±2.3	Funahashi and
	Store for 7 d. at 10°C		Sano, 2004
	Control	78±1.2*	
	Glutathione 5 mM	86±2.1	(P<0.05)
	Store for 14 d. at 10°C		
	Control	72±1.1*	
	Glutathione 5 mM	83±2.0	

* เครื่องหมายที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งการทดลองเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 2.10 สารละลายน้ำเชื้อที่ได้เสริมกลูตาไธโอน ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโค แช่แข็ง

Animal	Treatment	Motility (%)	Sources
Bull	Frozen-thawed sperm model		Lindemann et al.,
	After thawed for 0 min		1988
	Control	36.7±4.1*	
	Glutathione 1 mM	59.3±3.5	(P<0.05)
	After thawed for 60 min		
	Control	0	
	Glutathione 1 mM	5.3±0.5	

* เครื่องหมายที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งการทดลองเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

โดยทั่วไปแล้วตัวอสุจิและน้ำเลี้ยงเชื้อจะมีส่วนของอนุมูลอิสระที่จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของ ROS ขึ้นได้เสมอ ขึ้นกับเอ็นไซม์ที่มีอยู่ภายในเซลล์ เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase และ glutathione peroxidase/reductase system เพราะเอ็นไซม์เหล่านี้ช่วยในการรักษาสมดุลของ ROS ภายในเซลล์ตัวอสุจิ แต่การเกิดเอ็นไซม์ขึ้นภายในเซลล์นั้นจะมีสารตั้งต้น (precursor) ประกอบขึ้นว่ามีปริมาณที่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิด โดยปกติแล้วภายในเซลล์จะมี glutathione เป็นสารตั้งต้น “และเมื่อปริมาณของสารตั้งต้นนี้ลดลงจะมีผลทำให้ LPO ในเซลล์ตัวอสุจิเพิ่มขึ้น จะมีผลไปทำลายส่วนของผนังเซลล์ (cellular และ organelle) โครงสร้างและหน้าที่ (transport processes, maintenance of ion และ metabolite gradients receptor-mediated signaltransduction) กล่าวคือเมื่อระดับของ NADH และ glutathione ลดต่ำลง มีผลทำให้เพิ่มการทำงานของ glutathione peroxidaseในกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนของ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ที่เกิดจาก hyperactivation, capacitation และ acrosome reaction ของตัวอสุจิ” (Schmidt and Kamp,2004) ดังนั้นเมื่อมีการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นสุกรไว้เป็นเวลานานหรือหลังจากที่ใช้ไม่หมดจะมีผลทำให้ปริมาณของกลูตาไธโอนในเซลล์ลดต่ำลงจะมีผลทำให้เซลล์ตัวอสุจิ ถูกทำลายในที่สุด (ภาพที่ 2.9) การใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์มีทั้งประโยชน์และโทษ มีการค้นพบว่าโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) มีลักษณะที่แปลก คือ มีอิเล็กตรอนอิสระ 2 ตัวอยู่ในชั้นนอกสุด (2 p orbital) และมีโมเมนต์ไปในทางเดียวกัน ซึ่งทำให้ออกซิเจนมีสภาพเหมือนขาดอิเล็กตรอนถึง 2 คู่ ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ได้ทุกชนิด เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ (Free Radical) ขึ้น ดังสมการเคมีนี้

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

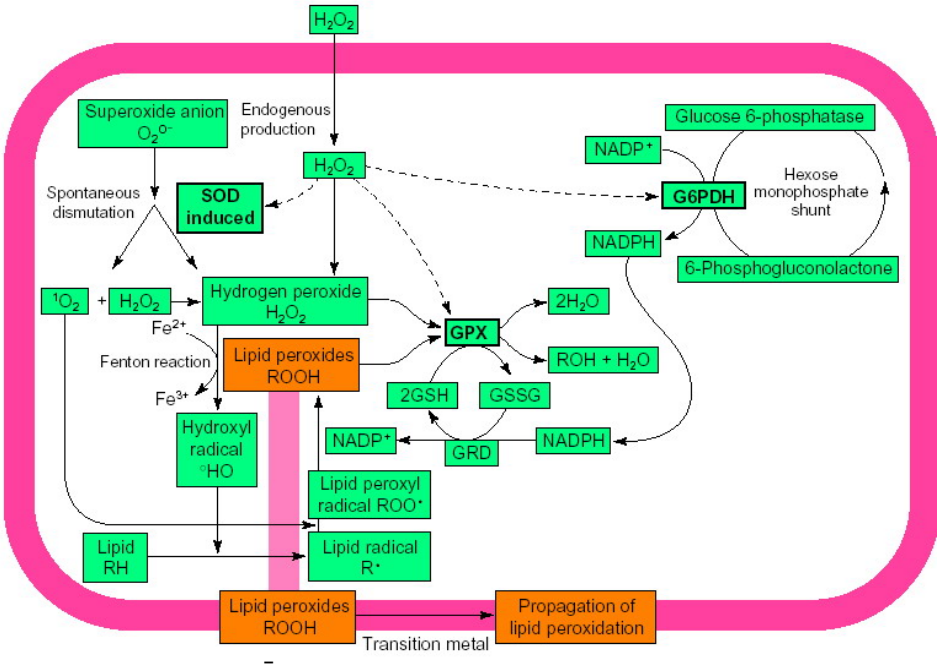
$$H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} H_2O + 1/2O_2^-$$

ซึ่งผลดังสมการข้างล่างนี้ กลูตาไธโอน (glutathione) ต่อการต้านการเกิดอนุมูลอิสระในสารละลายน้ำเชื้อสุกรหรือในเซลล์ต่าง ๆ

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2\,H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

จากสมการข้างต้นนี้หมู่ของ O_2^- (superoxide anion) และ H_2O_2 (hydrogen peroxide) เป็นกลุ่ม อนุมูลอิสระ (free radical) ที่เป็นอะตอมหรือโมเลกุลของสารใด ๆ ที่มีอิเล็กตรอนอิสระที่ขาดคู่ (unpaired electron) ซึ่งจะทำให้สารดังกล่าวไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและมีความเป็นพิษสูงมาก



Superoxide anion radical (O_2^-), Superoxide dismutase (SOD), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl (HO), Peroxide radicals (ROO^-), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione (γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) (GSH), Glutathione peroxidase (GSSG), Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PDH), Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)

ภาพที่ 2.9 กลไกของ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

ที่มา: Stewart (1996)

2.4 รายการอ้างอิง

กลูตาไธโอน. (2551). **เชิญทำความรู้จักกับเพื่อนใหม่ (L-Glutathione) แอล-กลูต้าไทโอน และ (Glutathione) กลูต้าไทโอน** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://topicstock.pantip.com/lumpini/topicstock/2007/01/L5019672/L5019672.html

จักรพงศ์ ไพบูลย์. (29 ส.ค. 2548). **สารต้านอนุมูลอิสระ Antioxidants** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thaiclinic.com

ดำเกิง ปฐมวาณิชย์. (2541). อาหารชะลอความแก่ (Anti-Aging Nutrients). **นิตยสารใกล้หมอ**. 12(4).

ประทานพร พิพัฒน์จำเริญกุล. (2547). **ชาเขียวน้ำทิพย์แห่งชีวิต.** Update ปีที่ 9. กรุงเทพฯ: Se-ed.

พรทิพย์ วิรัชวงษ์. (2551). **อนุมูลอิสระ (Free radical)/ สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.qpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html

สโรช รัตนากร. (2551). **อนุมูลอิสระ** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.school.net.th/library/snet4/feb18/health.htm

สมุนไพร: ยาไทยที่ควรรู้. (1999). **ดอกคำฝอย** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.tigerdragon.inith/thai%20herb-def.htm

สุภาณี ศุกระฤกษ์. (2540). เบต้าแคโรทีน สารสีส้มเพื่อสุขภาพ. **นิตยสารใกล้หมอ**. 21(8).

เรืองลักขณา จามิกรณ์. (2543). **ชีวเคมีเบื้องต้น (BASIC BIOCHEMISTRY)**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (2551). **อนุมูลอิสระ** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://th.wikipedia.org.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (2551). **วิตามินซี** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://th.wikipedia.org/wiki

วิตามินอี. (2551). **วิตามินอี** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.geocities.com/vitamin E

วีระพงษ์ เจนสุข. (2007). **วิตามินซี (Organic Chem)** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.vcharkarn.com/va2/index.php/my/show/3823

Breininger, E., Beorlegui, N. B., O'flaherty, C. M.,and Beconi, M. T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameter in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**. 63(8): 2126-35.

Chatri Ngmkitidechakul. (2005). **Free radical and antioxidant in the respiratory tract** [on-line]. Available: http://www.thaiclinic.com

CLA. (2008). CLA [online]. Available: http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=ans&month=08-2008&date=17&group=5&gblog=6

Dakey, C. A. (2004). **Contact information: conjugated linoleic acid. Grass Fed Beef** [on-line]. Available: http://www.csuchico.edu

Dulloo, A. G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., and Vandermander, J. (1999). Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am J. Clin Nutr**. 70: 1040-5.

Fuji, J., Luchi, Y., Matsuki, S., and Ishii, T. (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian J. Androl**. 5: 231-242.

Funahashi, H., and Sano, T. (2004). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. **Theriogenology**. 63(6): 1605-16.

Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R., and Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**. 62: 690-701.

Ha, Y. L., Storken, J., and Pariza, W. (1989). Newly recognized anticacinogenic fatty acid: identification and quantification in natural and processed cheese. **J. Agric Food Chem.** 37: 75-81.

Hafez, B., and Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Farm Animal 7th Edition**. USA.

Health control. (2548). **กินเพื่อสุขภาพ: เบต้าแคโรทีน** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://student.nu.ac.th/chalhong/food7.html

Jonhson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. **Anim Reprod Sci** 62: 143-172.

Kawai, K. (2003). **Green tea agent fights HIV infection** [on-line]. Available: http://www.nutraingredients-usa.com

Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., and Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by Btyrivibrio fibrisolvens. **J. Biol Chem.** 241: 1350-1354.

Lamirande, E. D., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. **J. Reprod Fertil**. 2: 48-54.

Li, H-X., Han, S-Y., Wang, X-W., Ma, X., Zhang, K., Wang, L., Ma, Z-Z., and Tu, P-F. (2009) Effect of the carthamins yellow from Carthamus tinctorius L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [on-line]. Available: www.sciencedirect.com.

Lindemann, C. B., O'Brien, J. A., and Giblin, F. J. (1988). An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. **Biol Reprod**. 38: 114 -120.

Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol**. 5(1): 5-17.

Montgomery, W. W. (2008). **The Miracle of human creation** [online]. Available: http://www.edutv.com

Skrzydlewska, E., Ostrowska, J., farbszewski, R., and Michalak, K. (2002). Protective effect of green tea against lipid peroxidation in rat liver, blood serum and brain. **Phytomedicine.** 9: 232-238.

Smith, O. B., and Akinbamijo, O. O. (2000). Micronutrients and reproduction in farm animals. **Anim Reprod Sci**. (60-61): 549-560.

Sönmez, M., and Demirci, E. (2004). The effect of ascorbic acid on the freezability of ram sperm diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turk J. Vet Anim Sci**. 28: 893-899.

Stewart, D. I. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. **J. Reprod Fertil.** 1: 6-12.

Suresh. C. S., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. J. G. (1995). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in male infertility. **J. Androl.** 16(6): 464-468.

Szezes′niak-Fabian′czyk, B., Bochenek, M., Smorag, Z., and Ryzka, F. (2003). Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. **Reprod Biol.** 3(1): 81-87.

Trevisanato, S., and Kim, Y. (2000). Tea and health. **International Life Sciences Institute.** 58: 1-10.

Unpublished ascorbic. (2548). **วิตามินซี (ascorbic acid)** [on-line]. Available: http://www.geocities.com/vitandmin/ASCORBIC.html

Unpublished Reproductive system. (2005). **Reproductive system lab** [on-line]. Availible: http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P2_reproductive_system_lab.htm

บทที่ 3
ศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

3.1 บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidants) ที่เสริมลงในสารสะลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ให้สามารถเก็บรักษาได้นานมากขึ้น โดยให้ความสนใจสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ซึ่งได้แก่ สารสกัดดอกคำฝอย (Extract of *Carthamus tinctorius* Linn. flower) ชาเขียว (Green tea) กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (Conjugated linoleic acid; CLA) เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร แล้วเปรียบเทียบกับสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) และ กลูตาไธโอน (Glutathione) โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ อายุ 1.5 ปี แล้วแบ่งเจือจางให้มีความเข้มข้น 30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร จำนวน 13 กลุ่มการทดลอง [สารสกัดดอกคำฝอย (0.1, 0.25 และ 0.5 mg/ml) ชาเขียว (0.1, 0.25 และ 0.5 mg/ml) CLA (200, 500 และ 1000 µg/L) วิตามินอี (400 µg/L) วิตามินซี (0.25 mg/ml) และ กลูตาไธโอน (1 mM)] (10 replications) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 17°C ทำการตรวจเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกวันหลังจากเก็บน้ำเชื้อ เป็นเวลา 7 แล้ววิเคราะห์ผลการทดลองแบบ ANOVA พบว่า กลุ่มที่เสริมวิตามินอีสามารถยืดระยะเวลาเก็บไว้ 5 วัน โดยคุณภาพของน้ำเชื้อ ทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม (43.52 และ 25.81 ตามลำดับ) ($P<0.01$) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (52.09 และ 53.37 ตามลำดับ) เช่นเดียวกับการเสริมกลูตาไธโอนมีผลคุณภาพของน้ำเชื้อที่น้อยกว่าวิตามินอี อย่างไรก็ตาม สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

3.2 คำนำ

ปัจจุบันผู้เลี้ยงสุกรในประเทศไทยที่เลี้ยงสุกรพันธุ์ได้นิยมนำเอาวิธีการผสมเทียมมาใช้แทนการผสมตามแบบธรรมชาติมากขึ้น ทั้งนี้เพราะว่ามีข้อดีหลายอย่างที่ผู้เลี้ยงได้รับจากการใช้วิธีการผสมเทียม เช่น ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น ลดปัญหาเรื่องการติดต่อของโรคทางระบบสืบพันธุ์ ลดจำนวนพ่อสุกรลง ทำให้พ่อสุกรและแม่สุกรที่มีขนาดที่แตกต่างกันสามารถผสมพันธุ์กันได้ และสามารถลดต้นทุนในการผลิตลงได้ ฟาร์มสุกรพันธุ์ที่ใช้ผสมเทียมมีอยู่ 2 ระบบคือ ฟาร์ม

ที่ผลิตน้ำเชื้อขึ้นใช้เองในฟาร์มกับฟาร์มที่ทำผสมเทียมโดยซื้อน้ำเชื้อจากที่อื่นเข้ามาผสมให้กับแม่สุกรในฟาร์มของตัวเอง น้ำเชื้อที่ได้มาจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยทางด้านสุขภาพ ความสำเร็จของการใช้การผสมเทียม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการควบคุมคุณภาพ เรื่องสุขภาพสุกรพ่อพันธุ์ในโรงเรือนโดยจะทำให้การทำผสมเทียมประสบความสำเร็จได้ทุก ๆ ด้าน รวมไปถึงรูปแบบของโปรแกรมพันธุกรรม กระบวนการในการผลิตน้ำเชื้อสุกรที่ได้มาตรฐานทั้งในฟาร์มที่ผลิตน้ำเชื้อใช้เองหรือที่ศูนย์ผสมเทียมผลิตน้ำเชื้อจำหน่ายนั้นจะต้องคำนึงถึงตั้งแต่มาตรฐานของสถานที่ตั้งโรงเรือนสุกรพ่อพันธุ์และห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อ โรงเรือนสุกรพ่อพันธุ์ โรงเรือนกักโรคสุกรพ่อพันธุ์ การคัดเลือกสุกรพ่อพันธุ์ที่จะนำมารีดน้ำเชื้อจะต้องปราศจากโรคติดต่อที่สำคัญที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกร

การใช้สารละลายน้ำเชื้อในเมืองไทยมีหลายสูตร ทั้งที่นำเข้าจากต่างประเทศหรือผลิตใช้เองภายในประเทศ ความสำคัญของสารละลายน้ำเชื้อต้องมีคุณสมบัติในการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมให้ตัวอสุจิทั้ง ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าระหว่าง pH 6.8-7.2 รักษาระดับแรงดันออสโมซิส (Osmolarity) มีค่าระหว่าง 265-320 mOsmoles รักษาสภาพการนำไฟฟ้า (Conductivity) 6-7 mS และต้องมีแหล่งอาหารและพลังงานให้ตัวอสุจิอย่างเพียงพอ (Nutritional requirements) สารละลายน้ำเชื้อในการทำน้ำเชื้อแช่เย็นในปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด ที่ใช้แล้วสามารถเก็บได้ 1-3 วัน เช่น BTS, KIEV และสารละลายที่สามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นได้นานมากกว่า 3 วัน เช่น Modena, Zorlescog Reading และ Zorpva (ทีมงาน ไลฟ์ อินโฟร์เมติคส์, 2004; Estienne, Harper, and Day, 2007) ซึ่งในปัจจุบัน BTS (Beltsville Thaw Solution) เป็นสารละลายน้ำเชื้อที่นิยมใช้กันมากที่สุดในประเทศไทย

ในการนำสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ชนิดต่าง ๆ นำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น จะต้องไม่ส่งผลทำให้คุณสมบัติของสารละลายเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติ เช่น การรักษาระดับแรงดันออสโมซิส (osmolarity) แสดงดังตารางที่ 3.1 และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายน้ำเชื้อหลังเจือจางน้ำเชื้อสดสุกร ซึ่งสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทุกวันในระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ ดังแสดงตารางที่ 3.2 ซึ่งผลในตารางที่แสดงเป็นผลที่ได้จากการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นปกติ และจากการศึกษาคุณสมบัติข้างต้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน นำมาใช้ไม่ได้ทำให้ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แตกต่างไปจากน้ำเชื้อที่ไม่ได้มีการเสริมต้านการเกิดออกซิเดชัน กระแสความนิยมสมุนไพรมีมาอย่างต่อเนื่องทั้งผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เพื่อความสวยงามหรือแม้แต่ยารักษาโรค ดังนั้นจึงได้นำมาใช้ในทางการผลิตสัตว์ เรื่องของการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาให้นานขึ้น

3.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility, %) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (percentage of lived sperm) ในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ

3.4 อุปกรณ์และวิธีการ

3.4.1 การจัดการทั่วไป พ่อพันธุ์สำหรับการทดลอง

3.4.1.1 การจัดการสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ (Large-white) มีอายุ 1.5 ปี สุกรพ่อพันธุ์ขังแยกเดี่ยว มีคอกขนาด 3x3 ตารางเมตร ภายในคอกมีจุ๊บน้ำให้กินได้ตลอดเวลาและรางอาหาร แสดงดังภาพที่ 3.1 โรงเรือน มีระบบละอองน้ำสเปรย์และพัดลมเพื่อช่วยลดอุณหภูมิภายในโรงเรือนเมื่อมีอากาศร้อน ควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ ถ้าอุณหภูมิภายในโรงเรือนร้อนเกินไประบบก็จะทำงาน โดยการสเปรย์ละอองน้ำและพัดลมทำงานร่วมด้วย เมื่ออุณหภูมิคงที่ก็หยุดทำงาน เพราะความร้อนมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ได้

ภาพที่ 3.1 ลักษณะคอกของสุกรพ่อพันธุ์

3.4.1.2 การจัดการอาหารสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

การให้อาหารสุกรพ่อพันธุ์ยึดตามโปรแกรมการให้อาหารสุกรพ่อ - แม่พันธุ์ ภายในโครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอาหารที่ให้มีโปรตีน 14% ให้กินวันละ 2 กิโลกรัม แบ่งเป็น 2 เวลา เช้า 8.30 น. และ เย็น 15.30 น. พร้อมทั้งโปรแกรมการฉีดวัคซีนต่าง ๆ ใช้ตามโปรแกรมการให้วัคซีนสุกรพ่อ - แม่พันธุ์[1] โครงการสุกร ภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อให้สุกรพ่อพันธุ์ที่มีร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ การได้รับอาหารคุณภาพดีและปริมาณที่เหมาะสม ตลอดจนการออกกำลังกายสม่ำเสมอก็จะส่งผลให้การใช้งานของสุกรพ่อพันธุ์นั้นมีคุณภาพดี

3.4.1.3 การจัดการโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

ความถี่ในการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรเป็นเรื่องที่ต้องคำนึงถึง การรีดน้ำเชื้อถี่เกินไปจะทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อต่อการรีดแต่ละครั้งลดลง ในพ่อสุกรจะหลั่งอสุจิเป็นจำนวนมากต่อการรีดน้ำเชื้อแต่ละครั้ง ทำให้อสุจิที่สะสมในอิพิดิไดมิส (epididymis) หมดเร็ว ดังนั้น สุกรพ่อพันธุ์ที่อายุ 1 ปีขึ้นไป ควรรีดทุก ๆ 3 หรือ 4 วันต่อครั้ง แม้จะไม่มีแม่สุกรผสมก็ควรรีดทิ้งเมื่อครบกำหนดระยะเวลา การศึกษาครั้งนี้โปรแกรมการรีดจะทำการรีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อง่ายต่อการจัดการและวางแผนการทดลองของการศึกษา

3.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง

น้ำเชื้อสุกรที่นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อนั้นได้มาจากการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร ขั้นตอนการนำน้ำเชื้อสดสุกรเพื่อใช้ในการตรวจ เริ่มตั้งแต่ การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ (ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ก, หน้า 90) การรีดเก็บน้ำเชื้อ (ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ข, หน้า 93) และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสดสุกรก่อนการเจือจาง (ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ค, หน้า 98) การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร (ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ง, หน้า 106) ในส่วนของขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกรนั้น จะมีการเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารละลาย โดยจะทำการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ลงในสารละลายน้ำเชื้อแล้วใช้สารละลายน้ำเชื้อที่เตรียมไว้เจือจางกับน้ำเชื้อสดของสุกร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (สารละลายน้ำเชื้อ* + น้ำเชื้อสดของสุกร)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเสริมวิตามินซี (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มเสริมวิตามินอี (400 µg/L)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มเสริม Glutathione (1 mM)

---

[1] ดูรายละเอียด ภาคผนวก จ โปรแกรมวัคซีน, หน้า 108

* ดูรายละเอียด ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารเคมีในการทดลองและสารสกัด, หน้า 111

กลุ่มที่ 5 กลุ่มเสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (200 µg/L)

กลุ่มที่ 6 กลุ่มเสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (500 µg/L)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มเสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (1000 µg/L)

กลุ่มที่ 8 กลุ่มเสริมสารสกัดชาเขียว** (0.10 mg/ml)

กลุ่มที่ 9 กลุ่มเสริมสารสกัดชาเขียว (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 10 กลุ่มเสริมสารสกัดชาเขียว (0.50 mg/ml)

กลุ่มที่ 11 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย** (0.10 mg/ml)

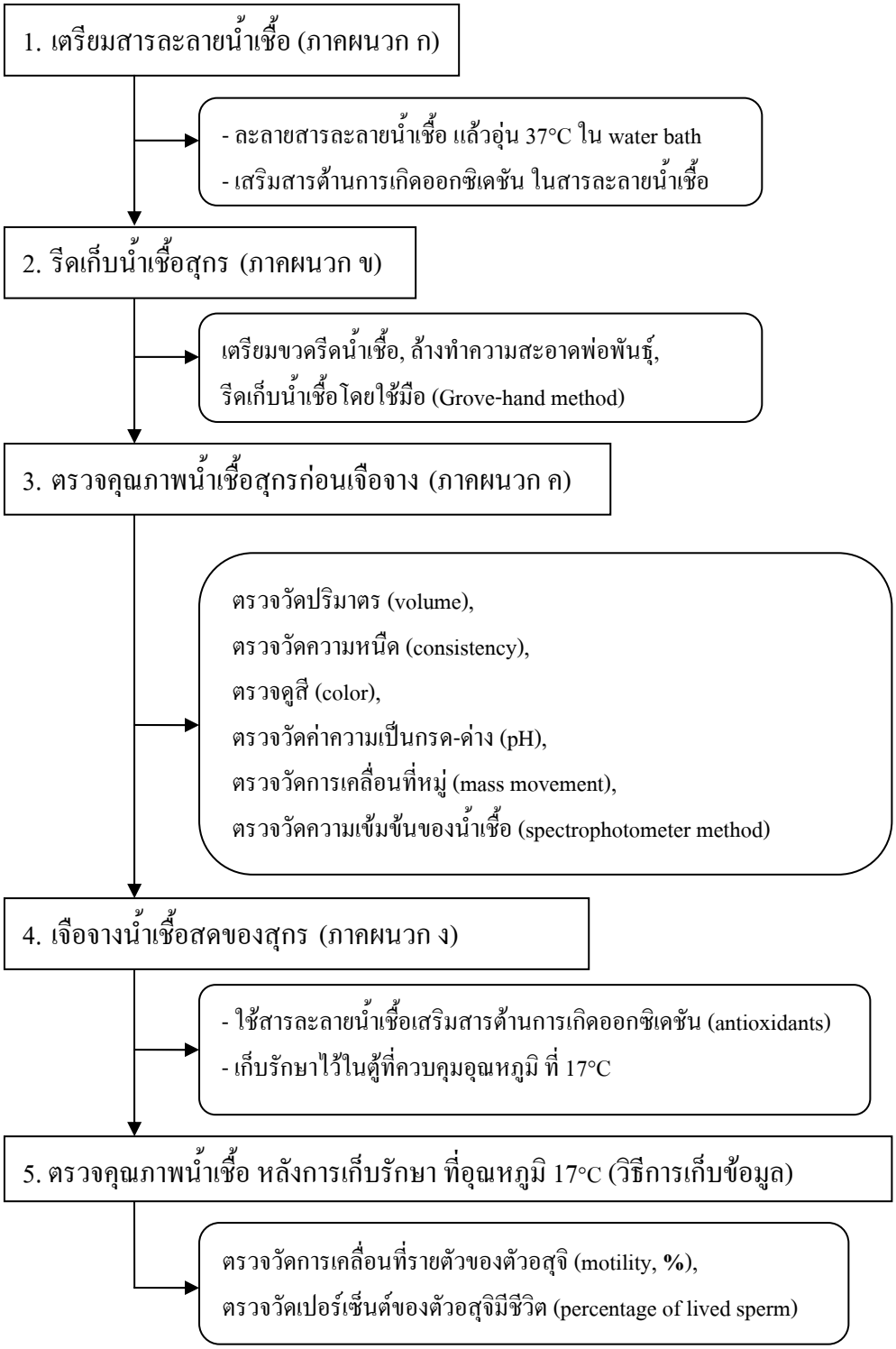
กลุ่มที่ 12 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 13 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.50 mg/ml)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4 ได้จากการรวมรวบงานวิจัยที่ให้ผลดีเรื่องคุณภาพของน้ำเชื้อ และในความเข้มข้นตั้งแต่กลุ่มที่ 5-13 เป็นการสุ่มระดับความเข้มข้นที่จะนำมาศึกษา ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ที่ตามมานั้นทำเหมือนดังเดิมของขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร สูตรและสารประกอบทางเคมี ในตารางที่ 3.1 ในการทดลอง สามารถสรุปขั้นตอนการเตรียมและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ดังแสดงต่อไปนี้

** ดูรายละเอียด ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารเคมีในการทดลองและการสกัด, หน้า 111

ขั้นตอนการเตรียมและตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสดสุกร



ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายน้ำเชื้อที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน

องค์ประกอบทางเคมี	กลุ่ม	Vit.C	Vit.E	Gluta	CLA			Green tea			safflower		
(g/L)	ควบคุม			thione	200	500	1000	0.10	0.25	0.50	0.10	0.25	0.50
Glucose	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
EDTA	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sodium citrate	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Sodium bicarbonate	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Potassium chloride	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Streptomycin	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Penicillin G (IU)	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$
Vitamin C (mg/ml)	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitamin E (µg/L)	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutathione (mM)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Safflower (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.25	0.50
Green tea (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.25	0.50	-	-	-
CLA (µg/L)	-	-	-	-	200	500	1000	-	-	-	-	-	-
ค่าออสโมลาลิตี้ (mOsm/kg)	317	318	316	317	318	318	319	320	318	320	318	320	320
ออสโม ฯ เจือจางน้ำเชื้อ	317	318	317	317	318	320	317	315	325	321	318	318	320

ตารางที่ 3.2 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของสารละลายน้ำเชื้อสุกร เมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน หลังการเจือจางและเก็บรักษาที่เวลาต่าง ๆ

ทรีตเมนต์	วันที่ทำการเก็บรักษา (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	7.17-7.88	7.23-7.84	7.21-7.82	7.21-7.81	7.23-7.81	7.20-7.77	7.37-7.74
Vitamin C (0.25 mg/ml)	7.13-7.70	7.23-7.67	7.15-7.60	7.21-7.63	7.09-7.50	7.16-7.56	7.23-7.54
Vitamin E (400 µg/L)	7.15-7.93	7.33-7.91	7.26-7.90	7.39-7.87	7.26-7.83	7.26-7.76	7.31-7.82
Glutathione (1 mM)	6.84-7.43	6.79-7.43	6.77-7.30	6.85-7.60	6.73-7.41	6.71-7.34	6.70-7.38
CLA (200 µg/L)	7.08-7.73	7.28-7.76	7.15-7.73	7.18-7.65	7.20-7.73	7.24-7.69	7.11-7.69
CLA (500 µg/L)	7.16-7.80	7.26-7.81	7.20-7.78	7.09-7.70	7.19-7.73	7.33-7.82	7.12-7.76
CLA (1000 µg/L)	7.13-7.80	7.27-7.88	7.23-7.86	7.16-7.87	7.27-7.87	7.25-7.96	7.18-7.95
Green tea (0.10 mg/ml)	7.20-7.82	7.34-7.89	7.24-7.86	7.30-7.84	7.25-7.91	7.37-7.94	7.19-7.90
Green tea (0.25 mg/ml)	7.18-7.83	7.29-7.89	7.24-7.82	7.23-7.86	7.32-7.87	7.33-7.88	7.21-8.02
Green tea (0.50 mg/ml)	7.14-7.82	7.29-7.85	7.21-7.83	7.15-8.15	7.31-7.88	7.35-7.88	7.08-7.89
Safflower (0.10 mg/ml)	7.18-7.88	7.32-7.91	7.30-7.89	7.23-7.86	7.31-7.86	7.38-7.87	7.19-7.86
Safflower (0.25 mg/ml)	7.16-7.88	7.33-7.88	7.26-7.86	7.28-7.90	7.29-7.88	7.32-7.86	7.23-7.82
Safflower (0.50 mg/ml)	7.30-7.86	7.32-7.93	7.25-7.89	7.23-7.89	7.30-7.85	7.53-7.79	7.23-7.94

3.4.2 วิธีการทดลองและเก็บข้อมูล

สุ่มเก็บน้ำเชื้อสุกรจากสุกรพ่อพันธุ์ โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกร จะทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสดของสุกรจากสุกรพ่อพันธุ์จำนวน 10 ครั้ง (ซ้ำ, replication) แต่ละครั้งจะเข้าสู่ขั้นตอนต่าง ๆ ตั้งแต่ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่าจนกระทั้งถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ตรวจคุณภาพ แล้วเก็บน้ำเชื้อไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 17˚C และมืด โดยสอดคล้องกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Zou and Yang (1999) ได้ให้ข้อสรุปว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 15-20˚C เหมาะสำหรับที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อใช้ในการผสมเทียม แต่ละครั้งการรีดเก็บน้ำเชื้อจะมีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรทุกครั้งและทุกกลุ่มการทดลอง ในการเก็บข้อมูลจะบันทึกผลการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บรักษาไว้ คือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility, %) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (percentage of lived sperm) ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งจะทำการตรวจและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิ 17˚C ดังนี้

3.4.2.1 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

โดยการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บไว้ที่ 17ºC ซึ่งจะตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า (40X) ก่อนทำการตรวจจะนำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บไว้ที่ 17ºC ออกมาวางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที (Estienne et al. (2007); Kommisrud, Paulenz, Sehested, and Grevle (2002)) และภายในห้องที่มืด ซึ่ง Bearden, Fuquay, and Willard (2004) ได้ให้เหตุผลว่า แสงจะไปกระตุ้นเร่งให้ตัวอสุจิสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) จากนั้นค่อย ๆ อุ่นน้ำเชื้อด้วย water bath ให้ได้อุณหภูมิ 37ºC ซึ่งเป็นอุณหภูมิร่างกายปกติของสุกร แล้วทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ของ Bearden et al. (2004) คือ

1) ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดน้ำเชื้อ 90 µL หยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและอุ่นมีอุณหภูมิประมาณ 37°C ปิดด้วยแผ่นสไลด์ (cover slip)

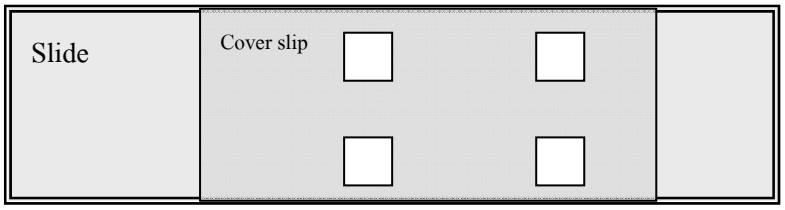
2) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายจากต่ำไปจนถึง 400X ซึ่งปรับความสว่างและความละเอียดให้เหมาะสมต่อการมองเห็นตัวอสุจิ ประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิเท่านั้น ไม่รวมตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไม่ตรงทิศทาง หรือเคลื่อนที่เป็นวงกลมและไม่รวมตัวที่ไม่เคลื่อนที่ แต่ยังคงสามารถเคลื่อนไหวได้ เลื่อนสไลด์ 4 จุดของแต่ละสไลด์ ตำแหน่งการประเมินค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 4 จุด บนสไลด์ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 3.2

3) อ่านผลที่ได้ใช้เวลา 2-3 นาที ตั้งแต่ปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ โดยจะประเมินการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ แบ่งเป็น 5 ระดับ (Mitchell and Doak, 2004) ได้แก่

20% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 20

40% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 40

60% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 60
80% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 80
100% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 100



☐ ตำแหน่งที่ประเมินค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

ภาพที่ 3.2 แสดงตำแหน่งการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

3.4.2.2 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

เป็นการตรวจหาร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อ และเพื่อยืนยันคุณภาพน้ำเชื้อว่ามีตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่เท่าไร โดยใช้หลักการผ่านของสี eosin ที่มีคุณสมบัติในการผ่านเข้าในผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายแต่ไม่ผ่านเข้าในผนังเซลล์ที่มีชีวิต (Bearden et al., 2004) ดังภาพที่ 3.2 โดยนำน้ำเชื้อออกมาอุ่น 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และภายในห้องที่มืด และอุ่นสีย้อมด้วย (eosin-nigrosin) จากนั้นมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) นำน้ำเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37˚C และสีย้อม (eosin-nigrosin) หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่อุ่นประมาณ 37˚C ในอัตราส่วน 1:1

2) ผสมน้ำเชื้อกับสีย้อม (eosin-nigrosin)

3) ใช้สไลด์อีกแผ่นเกลี่ยสารละลายในข้อ 2 ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ

4) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (40X) ลักษณะที่จะเห็นสีม่วงดำของ nigrosin ติดอยู่เป็นสีพื้นทำให้เห็นตัวอสุจิง่ายขึ้น และสีแดงของ eosin จะผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายทำให้ส่วนหัวของอสุจิที่ตายมีสีแดง ส่วนตัวที่มีชีวิตจะมีส่วนหัวใสไม่ติดสี

5) นับจำนวนตัวอสุจิที่ติดสีแดงจากจำนวนที่พบจำนวน 200 ตัว จากนั้นคำนวณร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตต่อไป (Bearden et al., 2004) ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งจะทำการตรวจและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิ 17˚C

6) ตำแหน่งการนับตัวอสุจิ 4 จุด บนสไลด์ แสดงดังภาพที่ 3.2 ตำแหน่งเดียวกันกับการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

ภาพที่ 3.3 ลักษณะของตัวอสุจิที่มีชีวิต **A** (ไม่มีการติดสีย้อม) และตาย **B** (ติดสีย้อม)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแบบ ANOVA ซึ่งทดสอบอิทธิพลเนื่องจากเวลา ด้วยวิธี multivariate ทดสอบแนวโน้มการตอบสนองเนื่องจากเวลาด้วยเทคนิค orthogonal polynomials และ Duncan's new multiple range test แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย (means±SE)

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อาคารเครื่องมือ 1, 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.7 ระยะเวลาทำการทดลอง

วันที่ 31 มีนาคม 2549 ถึง 11 กันยายน 2550 (เริ่มเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสดสุกร โครงการสุกรภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำน้ำเชื้อสุกรมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 17°C แล้วทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ และวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ของน้ำเชื้อสุกร ณ อาคารเครื่องมือ 1, 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี)

3.8 ผลการทดลอง และอภิปรายผล

3.8.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

การศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ทั้งที่ได้จากธรรมชาติ (สารสกัดชาเขียว สารสกัดดอกคำฝอย และ CLA) และได้จากการสังเคราะห์ (วิตามินซี วิตามินอี และกลูตาไธโอน) แสดงดังตารางที่ 3.3 พบว่า สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิมีค่าที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ วิตามินอี (400 µg/L) และกลูตาไธโอน (1 mM) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เท่ากับ 43.52±14.99 และ 35.81±15.85% ตามลำดับ และกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 25.81±18.89% โดยใช้เกณฑ์การศึกษาของ Baraera, Bochenek, Samorag, and Ryszka (2003) ได้ทำการศึกษาถึงระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นาน โดยการเสริมวิตามินซีลงในสารละลายน้ำเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°C ให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ≥30% การเสริมวิตามินอี มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงขึ้น เนื่องจากวิตามินอี มีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ GSH-Px จะไม่ทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะทำลายเซลล์ของผนังเซลล์ในขณะที่วิตามินอีจะมีผลภายในผนังเซลล์จะทำการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน (Noguchi et al. (1973) อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo, 2000) และการเสริมกลูตาไธโอน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูง เนื่องจาก กลูตาไธโอน มีหน้าที่ป้องกันกลไกการเกิด oxidative stress กล่าวคือ กลูตาไธโอน เป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้มีการทำงานของ glutathione peroxidase ลดหรือทำให้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ให้ได้น้ำ (H_2O) และ lipid peroxidation (LPO) ให้เปลี่ยนเป็น alkyl alcohols โดยจะมีการใช้ NADPH เป็น co-factor ร่วมด้วย (Stewart, 1996) จากงานวิจัยนี้ พบว่า วิตามินซี (0.25 mg/ml) ที่ได้นำมาศึกษา ตั้งแต่ 24 ชั่วโมง (1 วัน) ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิต่ำ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 28.94±28.43% ต่ำกว่าเกณฑ์การคัดเลือกที่จะนำไปใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อ โดยมีผลที่ขัดแย้งกับการศึกษาของ Baraera et al. (2003) สามารถเก็บได้นาน 3.33 วัน ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะ วิตามินซี จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระของ superoxide และ hydroxyl (HO) ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งมาจากการสะลายตัวของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) วิตามินซีอาจจะทำปฏิกิริยาโดยทางอ้อมในการป้องกันการสะลายตัวของไขมันในเยื่อบุเซลล์ โดยช่วยในการสังเคราะห์วิตามินอีที่ติดกับผนังเซลล์ ให้ขึ้นมาใหม่ (unpublished ascorbic, 2548) ด้วยเหตุผลนี้ วิตามินซี ไม่ได้ไปมีผลโดยตรงต่อตัวอสุจิ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน

ส่วนของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ ไม่พบว่ามีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ในส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัว พบว่า การเสริมสารสกัดชาเขียวในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ทุกระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเลย แม้หลังจากที่ทำการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อตัวอสุจิยังมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการเจือจางด้วยการเสริมต้านการเกิดออกซิเดชัน อื่น ๆ ($P<0.01$) ซึ่งจากตารางที่ 3.3 หลังการเจือจางน้ำเชื้อสดสุกรด้วยสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารสกัดชาเขียว (ชั่วโมงที่ 0) ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 49.50±35.23, 43.69±34.77 และ 74.51±7.81 ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) และจากการรายงานของ Dulloo, Duret, Rohrer, Girardier, Mensi, Fathi, Chantre, and Vandermander (1999) ได้รายงานว่า ชาเขียวมีสารกลุ่มที่เรียกว่า catechin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม polyphenols พบประมาณ 15-30% ของน้ำหนักชา และ Purine alkaloids เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในชาเขียว สารกลุ่มนี้อยู่ในกลุ่ม methyl xanthine ได้แก่ คาเฟอีน (caffein) 2.9-4.2%, ทีโอโบรมีน (theobromine) 0.15-0.2% และทีโอฟิลลีน (theophylline) 0.02-0.04% สารเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับการมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันที่แรง ซึ่งจากการศึกษาของ Glogowski, Danforth, and Ciereszka (2002) ในน้ำเชื้อสุกร ได้รายงานว่า สารในกลุ่ม methyl xanthines (caffein, theobromine และ theophylline) จะไปยับยั้งการทำงานของ alkaline phosphatase และอาจจะมีผลต่อการขนส่งแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ alkaline phosphatase ในส่วนของ mitochondria จึงส่งผลให้ไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้นและในการเคลื่อนที่ต้องอาศัยการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในเซลล์ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ตัวอสุจิไม่มีการเคลื่อนที่และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า ตัวอสุจิมีการเคลื่อนรายตัวที่รวดเร็ว (hyperactivity) หลังเจือจางด้วยสารละลายเสริมชาเขียว แต่เป็นช่วงเวลาอันสั้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากกระบวนการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิที่สูงอย่างรวดเร็ว ทำให้ใช้พลังงานภายในเซลล์ (mitochondria) หมด หรือมีการใช้แคลเซียมอย่างรวดเร็ว และอาจจะมีผลอย่างอื่น เนื่องจากยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติชนิดที่ 2 คือ กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (CLA) พบว่า การเสริม CLA ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิดีขึ้น เมื่อเก็บไว้นาน 3 วัน หลังจากเสริมมีผลให้เกิดการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ จึงทำให้มีค่าที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.01$) จากการศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง พบรายงานว่า CLA มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ในร่างกาย โดย CLA เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ส่งผลต่อหน้าที่ของผนังเซลล์โดยอาจมีผลต่อเนื่องไปถึงการตอบสนองของเอ็นไซม์และฮอร์โมน การแทรกผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ การ

เคลื่อนไหวของผนังเซลล์ รวมทั้งผลต่อจำนวนและหน้าที่ของ receptor ที่ทำหน้าควบคุมการทำงานของเซลล์ (Ha, Storken, and Pariza, 1989) อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยในครั้งนี้ พบว่า การเสริม CLA ระดับความเข้มข้น 200 µg/L ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงกว่าระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 µg/L (ตารางที่ 3.3) ในการวิจัยครั้งนี้ CLA ให้ผลในทางลบเมื่อเทียบกับการศึกษาจากเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ อาจเกิดจากผลขององค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสกัด CLA และสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติชนิดสุดท้ายที่นำมาศึกษา คือ สารสกัดดอกคำฝอย (Safflower) พบว่า การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml ทำให้เปอร์เซ็นต์การการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิทุกระดับความเข้มข้นมีการเคลื่อนที่รายตัวลดลงและต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงได้ชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บรักษา และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) (ตารางที่ 3.3) ซึ่งสารที่สำคัญในดอกคำฝอย ได้แก่ วิตามินอี กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (CLA) เบต้าแคโรทีน (Health control, 2548) แต่ยังพบว่าในดอกคำฝอย เมื่อสกัดด้วยน้ำจะได้สารสีเหลือง ชื่อ แซฟฟลาวเวอร์เยลโล (safflower yellow) ซึ่งเป็นสารประกอบของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Li, Han, Wang, Ma, Zhang, Wang, Ma, and Tu, 2009) ฟลาโวนอยด์เป็นสารเชิงซ้อนชนิดนี้สามารถทำงานร่วมกับวิตามินซี โดยสามารถเปลี่ยนให้เป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ อาจเป็นเหตุผลให้การเสริมสารสกัดดอกคำฝอย ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 mg/ml มีการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิมีค่าอยู่ในอันดับที่ 3 รองลงมาจาก การเสริมวิตามินอี และกลูตาไธโอน

อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยในตารางที่ 3.2 ของกลุ่มเสริมวิตามินซี CLA และสกัดดอกคำฝอย มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยที่สูง ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บรักษา เป็นต้นไป เนื่องจากในจำนวนซ้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ค่าเฉลี่ยที่ได้ของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ไม่มีการเคลื่อนที่รายตัว (มีค่าเป็น 0) และบางครั้งก็มีการเคลื่อนที่ ทั้งสูงและต่ำ แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บ ซึ่งไม่ได้หมายความว่าวิธีการ หรือขั้นตอนต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน โดยคุณภาพน้ำเชื้อ ในส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่ลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันสุดท้ายของการเก็บรักษา ซึ่งจะ พบว่า กลุ่มเสริมวิตามินอีและกลูตาไธโอน มีค่าเฉลี่ยที่ปกติ นั่นแสดงให้เห็นว่า สารต้านการเกิดออกซิเดชันสองชนิดนี้ มีผลดีต่อการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

ตารางที่ 3.3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาที่เก็บรักษา (วัน)*							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Control	74.51 ±7.18 [a]	68.27±7.38[a]	58.16±9.02[a]	43.50±15.03[a]	35.93±20.12[a]	25.81±18.89[b]	16.13±14.15[b]	13.73±10.66[a]
Vitamin C (0.25 mg/ml)	72.57±6.05[a]	28.94±28.43[c]	7.24±12.93[de]	2.40±4.77[d]	0.00	0.00	0.00	0.00
Vitamin E (400 µg/L)	76.29±5.17 [a]	66.82±4.84[a]	60.00±14.08[a]	54.83±11.71[a]	43.72±17.05[a]	43.52±14.99[a]	25.38±17.47[a]	20.22±15.77[a]
Glutathione (1 mM)	75.67±7.15 [a]	61.79±12.63[a]	57.94±15.21[a]	49.17±18.00[a]	38.02±15.28[a]	35.81±15.85[a]	22.54±17.98[ab]	17.41±14.03[a]
CLA (200 µg/L)	69.60±11.33 [a]	28.44±23.61[c]	20.45±24.70[cd]	17.17±20.81[c]	9.23±17.79[bc]	2.40±6.70[c]	0.00	0.00
CLA (500 µg/L)	70.04±9.05[a]	3.18±6.68[d]	4.78±13.28[e]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CLA (1000 µg/L)	68.11±9.36 [a]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Green tea (0.10 mg/ml)	65.31±21.95[a]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Green tea (0.25 mg/ml)	49.50±35.23[b]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Green tea (0.50 mg/ml)	43.69±34.77[b]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Safflower (0.10 mg/ml)	74.64±3.45[a]	52.77±14.68[ab]	37.83±23.64[b]	30.64±24.50[b]	13.41±17.68[b]	10.84±13.94[c]	4.89±7.69[c]	3.60±5.71[b]
Safflower (0.25 mg/ml)	74.82±3.08[a]	41.30±22.97[bc]	29.74±23.15[bc]	17.57±16.12[c]	4.83±8.14[bc]	4.40±8.31[c]	2.18±4.76[c]	1.57±3.20[b]
Safflower (0.50 mg/ml)	74.13±3.98[a]	29.00±26.99[c]	11.25±14.62[de]	2.87±4.34[d]	0.64±1.51[c]	1.05±2.78[c]	1.06±3.03[c]	0.63±1.46[b]
SEM	5.47	5.17	4.88	4.19	3.76	3.16	2.81	2.30
P-value	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

* Mean ± SE (n = 10), [a-e] อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

3.8.2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ทั้งที่ได้จากธรรมชาติ (สารสกัดชาเขียว สารสกัดดอกคำฝอย และ CLA) และได้จากการสังเคราะห์ (วิตามินซี วิตามินอี และกลูตาไธโอน) แสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่า เมื่อทำการย้อมสีตรวจการมีชีวิตจากตัวอสุจิ โดยตรวจทุกวันเป็นเวลา 7 ของการเก็บรักษา การเสริมชาเขียว ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ซึ่งจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงตั้งแต่วันแรกที่ทำการเสริมจนกระทั่งวันที่ 7 ของการเก็บรักษา ดังเช่น ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา ทุกระดับความเข้มข้น (0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml) ของการเสริมชาเขียวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 76.82±12.19, 76.58±16.87 และ 79.77±14.87 ตามลำดับ เนื่องจากสารชาเขียวมีวิตามิน ซึ่งวิตามินที่พบได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี และวิตามินบีรวม เป็นสารประกอบ (Dulloo et al., 1999) จึงเป็นผลดีต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิรองลงมา คือ การเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 400 µg/L พบว่า ไม่ได้มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่วันแรกหลังจากการเจือจางจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ดังเช่น ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 66.12±9.50 และ 69.73±9.30% (วิตามินอี และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) (ตารางที่ 3.4) เนื่องจากวิตามินอี มีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ GSH-Px จะไม่ทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะทำลายเซลล์ของผนังเซลล์ในขณะที่วิตามินอีจะมีผลภายในผนังเซลล์จะทำการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน (Noguchi et al., 1973 อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo, 2000) และจากการศึกษาของ Breininger, Beorlegui, O'flaherty, and Beconi (2005) ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ระดับความเข้มข้น 200 และ 500 µg/ml มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.15, 26.17 และ 28.16 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงดังตารางที่ 2.4) นอกจากนี้วิตามินอียังมีผลร่วมกับซีลิเนียมเมื่อเสริมลงในอาหารของสุกรพ่อพันธุ์ ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อทั้งความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หมู่ (mass movement) ของตัวอสุจิดีขึ้น และสุกรพ่อพันธุ์มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง (Smith and Akinbamijo, 2000) เช่นเดียวกับการเสริมกลูตาไธโอนให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ มีค่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ดังเช่น ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 64.78±14.59 และ 67.78±5.75% (กลูตาไธโอน และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) เนื่องจากกลูตาไธโอนมีหน้าที่ป้องกันกลไกการเกิด oxidative stress เป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้มีการทำงานของ glutathione peroxidase ลดลงหรือทำให้ ไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ให้ได้น้ำ (H_2O) และ lipid peroxidation (LPO) ในส่วนของผนังเซลล์ (Stewart, 1996)

การเสริมวิตามินซี ระดับความเข้มข้น 0.25 mg/ml ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร พบว่า มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.01$) ตั้งแต่วันแรกที่ได้รับการเสริม (แสดงดังตารางที่ 3.4) ดังนั้นแล้วจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร โดย Dalvit, Cetica, and Beconi (1997) ได้ให้ความเห็นว่า วิตามินซี (ascorbic acid) จะมีผลต่อตัวออกซิไดส์ที่มีความเข้มข้นต่ำและมีตัวต้านออกซิเดชันที่สูง และจากคุณสมบัติของวิตามินซี เมื่อละลายน้ำจะมีฤทธิ์เป็นกรด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารละลายน้ำเชื้อสุกรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง จะอยู่ในช่วงเดียวกันกับกลุ่มที่ทำการเสริมกลุ่มอื่น ๆ เช่นในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา การเสริมกลุ่มกลูตาไธโอน พบว่า มีความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่ากลุ่มอื่น ๆ มีค่าเท่ากับ 6.70 (ตารางที่ 3.2) ซึ่งอาจแสดงได้ว่า ความเป็นกรด-ด่าง ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ และการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml พบว่า ในวันที่ 1, 3 และ 4 ของการเก็บรักษา มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด การเสริม CLA ในสารละลายน้ำเชื้อ มีผลทางลบต่อคุณภาพน้ำเชื้อในส่วนของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ จากเอกสารที่เกี่ยวข้องได้รายงานว่า CLA เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จะมีผลต่อหน้าที่ของผนังเซลล์และโครงสร้างของผนังเซลล์ (CLA, 2008) ในการวิจัยในครั้งนี้อาจเกิดจากผลขององค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสกัด CLA ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และยังพบอีกว่า ค่าเฉลี่ยตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บรักษา มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยที่สูง เนื่องจากในจำนวนซ้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ค่าเฉลี่ยที่ได้ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ไม่มีตัวอสุจิที่มีชีวิต (มีค่าเป็น 0) และบางครั้งก็มีตัวอสุจิมีชีวิต ทั้งสูงและต่ำ แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บ ซึ่งไม่ได้หมายความว่าวิธีการ หรือขั้นตอนต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน และเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน เพียงชนิดเดียวที่ไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อของการมีชีวิตของตัวอสุจิ

ตารางที่ 3.4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาที่เก็บรักษา (วัน)*						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	75.36±6.63^{abc}	67.78±5.75^{b}	69.73±9.30^{b}	62.01±13.35^{b}	53.37±21.11^{b}	48.75±23.88^{b}	36.52±12.35^{bc}
Vitamin C (0.25 mg/ml)	58.71±11.75^{de}	38.59±13.86^{c}	34.55±8.18^{d}	26.43±12.89^{de}	26.06±14.08^{cd}	26.90±23.10^{c}	21.83±17.06^{c}
Vitamin E (400 µg/L)	71.03±10.63^{bcd}	68.59±12.39^{b}	66.12±9.50^{b}	60.54±16.60^{b}	52.09±22.08^{b}	47.77±22.46^{b}	41.18±15.67^{b}
Glutathione (1 mM)	67.91±10.57^{bcd}	64.78±14.59^{b}	57.62±17.48^{bc}	53.70±19.08^{bc}	44.78±25.16^{b}	39.74±23.44^{bc}	32.97±15.31^{bc}
CLA (200 µg/L)	36.99±18.91^{f}	21.66±22.02^{d}	19.12±19.59^{e}	16.90±21.30^{ef}	14.72±19.52^{de}	6.19±7.54^{d}	4.76±6.74^{d}
CLA (500 µg/L)	20.80±16.25^{g}	7.84±7.30^{de}	4.81±6.42^{f}	3.11±5.10^{f}	7.72±14.63^{e}	1.10±1.69^{d}	1.90±5.27^{d}
CLA (1000 µg/L)	5.44±4.64^{h}	2.35±4.77^{e}	2.27±5.88^{f}	1.28±2.97^{f}	0.10±0^{e}	0.00	0.00
Green tea (0.10 mg/ml)	75.55±7.62^{abc}	84.45±6.32^{a}	84.17±3.55^{a}	84.39±5.00^{a}	86.54±3.09^{a}	84.55±6.46^{a}	76.82±12.19^{a}
Green tea (0.25 mg/ml)	82.22±8.29^{ab}	88.08±5.91^{a}	88.60±3.59^{a}	87.99±4.66^{a}	86.54±3.27^{a}	85.75±6.27^{a}	76.58±16.87^{a}
Green tea (0.50 mg/ml)	88.39±4.82^{a}	82.89±19.67^{a}	89.30±3.83^{a}	88.06±6.89^{a}	90.04±3.20^{a}	89.49±3.96^{a}	79.77±14.87^{a}
Safflower (0.10 mg/ml)	60.68±17.32^{de}	62.26±18.64^{b}	47.17±21.12^{cd}	41.33±21.87^{cd}	39.95±21.34^{bc}	37.21±20.18^{bc}	27.70±15.90^{bc}
Safflower (0.25 mg/ml)	63.76±18.28^{cd}	55.11±24.91^{b}	44.26±23.46^{cd}	35.33±22.73^{d}	39.40±21.54^{bc}	37.75±22.98^{bc}	27.43±13.94^{bc}
Safflower (0.50 mg/ml)	48.31±18.74^{ef}	37.79±20.81^{c}	40.04±20.09^{d}	37.53±25.02^{cd}	35.30±17.66^{bc}	41.00±21.15^{bc}	35.23±17.23^{bc}
SEM	4.36	5.09	4.62	5.25	5.61	5.75	4.56
P-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

* Mean ± SE (n = 10), $^{a-h}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ตารางที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ตลอดการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (เก็บรักษาไว้นาน 7 วัน)

ทรีตเมนต์	คุณภาพน้ำเชื้อสุกร (%)	
	การเคลื่อนที่รายตัว	การมีชีวิตของตัวอสุจิ
Control	42.65±5.09^{a}	59.05±4.42^{b}
Vitamin C (0.25 mg/ml)	14.59±5.22^{cde}	33.38±4.42^{d}
Vitamin E (400 µg/L)	49.28±4.79^{a}	58.19±4.43^{b}
Glutathione (1 mM)	45.30±4.92^{a}	51.66±4.73^{bc}
CLA (200 µg/L)	19.00±5.25^{c}	17.26±4.52^{e}
CLA (500 µg/L)	10.26±4.93^{def}	6.77±3.38^{ef}
CLA (1000 µg/L)	8.96±4.84^{def}	1.65±2.02^{f}
Green tea (0.10 mg/ml)	8.59±4.86^{def}	82.42±2.84^{a}
Green tea (0.25 mg/ml)	6.51±4.60^{ef}	85.17±3.03^{a}
Green tea (0.50 mg/ml)	5.75±4.42^{f}	86.83±3.32^{a}
Safflower (0.10 mg/ml)	28.71±5.35^{b}	45.33±4.80^{cd}
Safflower (0.25 mg/ml)	22.86±5.32^{bc}	43.39±4.95^{cd}
Safflower (0.50 mg/ml)	15.27±5.21^{cd}	39.32±4.57^{d}
SEM	3.32	3.45
P-value	0.0001	0.0001

* Mean ± SE (n = 10), $^{a-f}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง จากการวัดซ้ำในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (repeated measurements in CRD) เพื่อทดสอบอิทธิพลเนื่องจากระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร ด้วยวิธี multivariate และการทดสอบแนวโน้มการตอบสนองเนื่องจากเวลา ด้วยเทคนิค orthogonal polynomials ของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นต่อคุณภาพนำเชื้อสุกร พบว่า อิทธิพลเนื่องจากเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีอิทธิพลต่อกลุ่มทดลอง (P<0.01) กล่าวคือ คุณภาพน้ำเชื้อสุกรได้รับอิทธิพลทั้งจากระยะเวลาในการเก็บรักษาและการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำเชื้อสุกรตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (7 วัน) ในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิด

ออกซิเดชัน แสดงดังตารางที่ 3.5 การเสริมวิตามินอี ความเข้มข้น 400 µg/L และกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 1 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงที่สุด (P<0.01) ซึ่งมีกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย ความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงรองลงมา (P<0.01) และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ พบว่า การเสริมชาเขียวทุกระดับความเข้มข้น (0.1, 0.25 และ 0.5 mg/ml) มีค่าสูงที่สุด (P<0.01) ซึ่งมีผลที่มีความตรงข้ามกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ในการนำน้ำเชื้อสุกรไปใช้จะมีการพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิมากกว่าที่จะใช้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เป็นเกณฑ์ในการนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผลิต เนื่องจากการเข้าไปผสมกับไข่ภายในท่อนำไข่ (oviduct) หลังจากทำการผสมตัวอสุจิต้องเคลื่อนที่ผ่านมดลูก (uterus) ปีกมดลูก (uterine horn) และท่อนำไข่ ดังนั้นการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิจึงมีความสำคัญยิ่งในอัตราการผสมติด (conception rate) ดังเช่นการรายงานค่ามาตรฐานต่าง ๆ เกี่ยวกับน้ำเชื้อ (semen) ของ Hafez and Hafez (2000) ในตารางที่ 2.6 จะพบว่า มีการรายงานเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motile sperm, %) ในสุกร (boar) เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งมีการเคลื่อนที่รายตัว อยู่ในช่วง 50-80% ที่มีการพิจารณานำน้ำเชื้อนั้น ๆ ไปใช้เพื่อทางการผลิตต่อไป จากตารางที่ 3.5 ส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ที่ทำการเก็บรักษาไว้นาน 7 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิของการเสริมวิตามินอี มีค่าเท่ากับ 49.28±4.79% กลูตาไธโอน มีค่าเท่ากับ 45.30±4.92% และสารสกัดดอกคำฝอย ความเข้มข้น 0.10 mg/ml มีค่าเท่ากับ 28.71±5.35% เป็นเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวที่ดี 3 อันดับแรก ไม่รวมกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ในการเสริมวิตามินอี กลูตาไธโอน และสารสกัดดอกคำฝอย มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ดังนั้น ถ้าทำการพิจารณาที่เวลาต่าง ๆ ของการเก็บรักษาและความเข้มที่เหมาะสม จะเป็นทางเลือกในการนำสารต้านการเกิดออกซิเดชันเสริมในสารละลายน้ำเชื้อแช่เย็น เพื่อให้มีการใช้น้ำเชื้อแช่เย็นให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการรีดน้ำเชื้อในแต่ละครั้ง

3.9 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิและการมีชีวิตของตัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น พบว่า กลุ่มเสริมวิตามินอี ความเข้มข้น 400 µg/L และกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 1 mM สามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาได้นาน 5 วัน ได้พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิมีค่าที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม คือ 43.52±14.99, 35.81±15.85 และ 25.81±18.89 ตามลำดับ (P<0.01) อย่างไรก็ตาม การเสริมชาเขียว ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิดีเท่ากับกลุ่มควบคุม เนื่องจากวันแรกเมื่อเสริมลงใน

สารละลายน้ำเชื้อไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แต่กลับมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงในระยะเวลาการเก็บรักษาที่นาน 7 วัน ($P<0.01$) และกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอยไม่มีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนั้น การนำวิตามินอี หรือ กลูตาไธโอนมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อให้ผลดีในระดับที่สามารถนำไปใช้ได้ ทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและการมีชีวิตของตัวอสุจิ มีค่าที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกัน แต่เพื่อให้แน่ชัดว่าได้ผลดีควรจะมีการศึกษาว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเสริมลงไปแล้วให้ผลดี ราคาถูกและสามารถนำไปผสมเทียมแล้วให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกับการใช้สารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นทั่วไป ที่เก็บไว้ในช่วงและเวลาปกติ

3.10 รายการอ้างอิง

เรืองลักขณา จามิกรณ์. (2543). **ชีวเคมีเบื้องต้น (BASIC BIOCHEMISTRY)**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ประทานพร พิพัฒน์จำเริญกุล. (2547). **ชาเขียวน้ำทิพย์แห่งชีวิต**. Update ปีที่ 9. กรุงเทพฯ: Se-ed. 198: 45-54.

ทีมงาน ไลฟ์ อินโฟร์เมติคส์. (2004). **สารละลายน้ำเชื้อคืออะไร** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.li.co.th

Baraera, S-F., Bochenek, M., Samorag, Z., and Ryszka, F. (2003). Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. **Reprod Biol.** 3: 81-87.

Bearden, H. J., Fuquay, W., and Willard, S. T. (2004). **Applied Animal Reproduction (6th ed.) : Semen Evaluation.** (pp183-197). Pearson prentice hall.

Breininger, E., Beorlegui, N. B., O'flaherty, C. M.,and Beconi, M. T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameter in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**. 63(8): 2126-35.

CLA. (2008). CLA [online]. Available: http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=ans&month=08-2008&date=17&group=5&gblog=6

Dalvit, G. C., Cetica, P. D., and Beconi, M. T. (1998). Effect of α-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. **Theriogenology.** 49: 619-627.

Dulloo, A. G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., and Vandermander, J. (1999). Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am J. Clin Nutr**. 70: 1040-5.

Estienne, M. J., Harper, A. F., and Day, J. L. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. **Reprod. Biol.** 7(3): 221-231.

Funahashi. H., and Sano, T. (2004). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10ºC. **Theriogenology** [on-line]. Available: www.sciencedirect.com.

Glogowski, J., Danforth, D. R., and Ciereszka, A. (2002). Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theopylline. **J. Androl**. 23(6): 783-792.

Ha, Y. L., Storken, J., and Pariza, W. (1989). Newly recognized anticacinogenic fatty acid: identification and quantification in natural and processed cheese. **J. Agric Food Chem.** 37: 75-81.

Hafez, B., and Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Farm Animal (7th ed.)**. USA. p. 96-109.

Health control. (2548). **กินเพื่อสุขภาพ: เบต้าแคโรทีน** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://student.nu.ac.th/chalhong/food7.html

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. **Anim Reprod Sci.** 62: 143-172.

Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., and Grevle, I. S. (2002). Influence of boar and parameters on motlity and acrosome integrity in liquid boar semen store for five days. **Acta vet. scand.** 43: 49-55.

Lamirande, E. D., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. **J. Reprod Fertil.** 2: 48 - 54.

Li, H-X., Han, S-Y., Wang, X-W., Ma, X., Zhang, K., Wang, L., Ma, Z-Z., and Tu, P-F. (2009) Effect of the carthamins yellow from Carthamus tinctorius L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [on-line]. Available: www.sciencedirect.com.

Mitchell, J. R. and Doak, G. A. (2004). **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle including information pertaining to goats, sheep, horses, swine, and other animal (9th ed.)**. New Jersey: Pearson education.

Montgomery, W. W. (2008). **The Miracle of human creation** [on-line]. Available: http://www.edutv.com

Smith, O. B., and Akinbamijo, O. O. (2000). Micronutrients and reproduction in farm animals. **Anim Reprod Sci**. (60-61): 549-560.

Stewart, D. I. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. **J. Reprod Fertil**. 1: 6-12.

Suresh. C. S., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. J. G. (1995). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in male infertility. **J. Androl.** 16(6): 464-468.

Unpublished ascorbic. (2548). **วิตามินซี (ascorbic acid)** [on-line]. Available: http://www.geocities.com/vitandmin/ASCORBIC.html

Zou, C-Z., and Yang, Z-M. (1999). Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. **Theriogenology.** 53: 1477-1488.

บทที่ 4
ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

4.1 บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อ (บทที่ 3) แสดงให้เห็นว่าวิตามินอีและกลูตาไธโอนเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ดีเมื่อเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร จึงได้นำสารต้านการเกิดออกซิเดชันดังกล่าวมาศึกษาระดับของการนำไปใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของสุกรที่เจือจางในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ อายุ 1-2 ปี แล้วแบ่งเจือจางให้มีความเข้มข้น 30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 กลุ่มการทดลอง [กลูตาไธโอน (0.25, 0.50, 1.0, 1.5 และ 2.0 mM) วิตามินอี (100, 200, 400, 600 และ 800 μg/L) และสารสกัดดอกคำฝอย (0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml)] และกลุ่มควบคุม โดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิเป็นดัชนีในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ 5 วัน สารละลายน้ำเชื้อสุกรเสริมกลูตาไธโอน 0.25 mM มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงที่สุด (52.59±19.63) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิให้ผลที่สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเช่นกัน (61.25±17.02) มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มเสริมวิตามินอีและกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอยอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

4.2 คำนำ

การศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น จากการทดลองบทที่ 3 พบว่า วันที่ 3 ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ กลุ่มเสริมวิตามินอีในสารละลายน้ำเชื้อมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิดีที่สุด เท่ากับ 54.83±11.71 ลำดับถัดมา คือ กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน และ กลุ่มควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเท่ากับ 49.17±18.00 และ 43.50±15.03 ตามลำดับ และสารต้านการเกิดออกซิเดชันตัวอื่น ๆ ไม่ได้มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสุกรดีขึ้น ดังนั้นจึงคัดเลือกวิตามินอีและกลูตาไธโอนมาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยืดระยะเวลาและรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสดสุกรได้นานกว่าปกติ (3 วัน) นอกจากนี้แล้วกลุ่มที่เสริมสารสกัดดอกคำฝอยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ราย

ตัวของตัวอสุจิที่สูง (30.64±24.50%) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ถ้านำมาพิจารณาแยกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมเช่นเดียวกับกลุ่มของวิตามินอีและกลูตาไธโอน ผลที่ได้ควรจะให้ผลที่ดีและเหมาะสมในการนำไปใช้ต่อไป น่าจะเป็นทางเลือกอีกทางที่จะนำเอาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ในการทดลองและการนำมาใช้ทางผลิตสัตว์ต่อไป

4.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ที่ใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของสุกรที่เจือจางในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ

4.4 อุปกรณ์และวิธีการ

4.4.1 การจัดการทั่วไป พ่อพันธุ์สำหรับการทดลอง

4.4.1.1 การจัดการสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ (Large-white) หรือดูร็อก (Duroc) มีอายุอยู่ในช่วง 1-2 ปี การจัดการด้านโรงเรือน สุกรพ่อพันธุ์ขังแยกเดี่ยว เป็นคอกที่มีขนาด 3x3 เมตร ภายในคอกมีจุ๊บน้ำให้กินได้ตลอดเวลาและรางอาหาร แสดงดังภาพที่ 3.1 โรงเรือนมีระบบละอองน้ำสเปรย์และพัดลมเพื่อช่วยลดอุณหภูมิโรงเรือนเมื่อมีอากาศร้อน ควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ ถ้าอุณหภูมิภายในโรงเรือนร้อนเกินไประบบก็จะทำงาน โดยให้มีการสเปรย์ละอองน้ำและพัดลมทำงานด้วยเมื่ออุณหภูมิคงที่ก็หยุดทำงาน เพราะความร้อนมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ได้

4.4.1.2 การจัดการอาหารสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

การให้อาหารสุกรพ่อพันธุ์ยึดตามโปรแกรมการให้อาหารสุกรพ่อ - แม่พันธุ์ โครงการสุกรภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอาหารที่ให้มีโปรตีน 14% ให้กินวันละ 2 กิโลกรัม แบ่งเป็น 2 เวลา เช้า 8.30 น. และ เย็น 15.30 น. พร้อมทั้งโปรแกรมการฉีดวัคซีนต่าง ๆ ใช้ตามโปรแกรมการให้วัคซีนสุกรพ่อ - แม่พันธุ์[1] โครงการสุกร ภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เช่นกัน เพื่อให้สุกรพ่อพันธุ์ที่มีร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ การได้รับอาหารคุณภาพดีและปริมาณที่เหมาะสม ตลอดจนการออกกำลังกายสม่ำเสมอก็จะส่งผลให้การใช้งานของสุกรพ่อพันธุ์นั้นมีคุณภาพดี การศึกษาครั้งนี้ใช้สุกรพ่อพันธุ์ จำนวน 2 ตัว ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 9 ครั้ง (9 ซ้ำ, replication)

---

[1] ดูรายละเอียด ภาคผนวก จ โปรแกรมการฉีดวัคซีนสุกร, หน้า 108

4.4.1.3 การจัดการโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

ความถี่ในการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรเป็นเรื่องที่ต้องคำนึงถึง การรีดน้ำเชื้อถี่เกินไปจะทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อต่อการรีดแต่ละครั้งลดลง ในพ่อสุกรจะหลั่งอสุจิเป็นจำนวนมากต่อการรีดน้ำเชื้อแต่ละครั้ง ทำให้อสุจิที่สะสมในอิพิดิไดมิส (epididymis) หมดเร็ว หลังจากที่มีการสร้างและเก็บไว้ที่ส่วนท้ายของ epididymis คิดเป็นร้อยละ 70 (Hafez and Hafez, 2000) ดังนั้นสุกรพ่อพันธุ์ที่อายุ 1 ปีขึ้นไป ควรรีด 3 หรือ 4 วันต่อครั้ง แม้จะไม่มีแม่สุกรผสมก็ควรรีดทิ้งเมื่อครบกำหนดระยะเวลา การศึกษาครั้งนี้โปรแกรมการรีดจะทำการรีดอาทิตย์ละ 1 ครั้ง เพื่อง่ายต่อการจัดการและวางแผนการทดลองของการศึกษา

4.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง

คัดเลือกสารต้านการเกิดออกซิเดชัน จากการทดลองที่ 1 มาจำนวน 3 ชนิด ที่ให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังเจือจางเก็บได้นานและมีระดับที่สามารถนำไปผสมเทียมได้ เพื่อนำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรที่ระดับความเข้มข้นที่ละเอียดกว่าเดิม ซึ่งจะแยกความเข้มข้นจากสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ในการทดลองที่ 1 จำนวน 3 ชนิด แยกออกเป็น 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ในกลุ่มของสารสกัดดอกคำฝอยมีการแยกออกเพียง 4 ระดับความเข้มข้น เพราะสารสกัดมีความไวต่อความชื้นมาก ระดับที่ต่ำมากไม่สามารถชั่งสารได้จึงใช้แค่ 4 ระดับความเข้มข้น ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บไว้มีวิธีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำการตรวจและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 17°C น้ำเชื้อสุกรที่นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อนั้นได้มาจากการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร ขั้นตอนเพื่อใช้ในการตรวจ เริ่มตั้งแต่ การรีดเก็บน้ำเชื้อ (ภาคผนวก ก, หน้า 90) และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสดสุกรก่อนการเจือจาง (ภาคผนวก ข, หน้า 93) การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกรในส่วนของขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกรนั้นจะมีการเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารละลายโดยจะทำการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ลงในสารละลายน้ำเชื้อแล้วใช้สารละลายน้ำเชื้อที่เตรียมไว้เจือจางกับน้ำเชื้อสดของสุกร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (สารละลายน้ำเชื้อ* + น้ำเชื้อสดของสุกร)
กลุ่มที่ 2 กลุ่มเสริม Glutathione (0.25 mM)
กลุ่มที่ 3 กลุ่มเสริม Glutathione (0.50 mM)
กลุ่มที่ 4 กลุ่มเสริม Glutathione (1.00 mM)
กลุ่มที่ 5 กลุ่มเสริม Glutathione (1.50 mM)
กลุ่มที่ 6 กลุ่มเสริม Glutathione (2.00 mM)

---

* ดูรายละเอียด ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารเคมีในการทดลองและสารสกัด, หน้า 111

กลุ่มที่ 7 กลุ่มเสริมวิตามินอี (100 μg/L)
กลุ่มที่ 8 กลุ่มเสริมวิตามินอี (200 μg/L)
กลุ่มที่ 9 กลุ่มเสริมวิตามินอี (400 μg/L)
กลุ่มที่ 10 กลุ่มเสริมวิตามินอี (600 μg/L)
กลุ่มที่ 11 กลุ่มเสริมวิตามินอี (800 μg/L)
กลุ่มที่ 12 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย** (0.025 mg/ml)
กลุ่มที่ 13 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.050 mg/ml)
กลุ่มที่ 14 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)
กลุ่มที่ 15 กลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.15 mg/ml)

4.4.2 วิธีการทดลองและเก็บข้อมูล

เก็บน้ำเชื้อสุกรจากสุกรพ่อพันธุ์ โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกร จะทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสดของสุกรจากสุกรพ่อพันธุ์จำนวน 9 ครั้ง (ซ้ำ, replication) แต่ละครั้งที่รีดน้ำเชื้อสดสุกรจะเข้าสู่ขั้นตอนต่าง ๆ ตั้งแต่ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่าจนกระทั้งถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ตรวจคุณภาพ แล้วเก็บน้ำเชื้อไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 17°C และในที่มืด โดยสอดคล้องกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Zou and Yang (1999) ซึ่งได้ให้ข้อสรุปว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 15-20°C เหมาะสำหรับที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อใช้ในการผสมเทียม ในแต่ละครั้งมีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นทุกครั้งและทุกกลุ่มการทดลอง การเก็บข้อมูลจะบันทึกผลการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บไว้ การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อมีสิ่งที่ต้องตรวจคุณภาพ คือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility, %) และเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มีชีวิต (percentage of lived sperm) ซึ่งจะแบ่งการตรวจออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

4.4.2.1 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

โดยการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บไว้ที่ 17ºC ซึ่งจะตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า (40X) ก่อนทำการตรวจจะนำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บไว้ที่ 17ºC ออกมาวางไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที (Estienne et al. (2007); Kommisrud, Paulenz, Sehested, and Grevle (2002)) และภายในห้องที่มืด ซึ่ง Bearden, Fuquay, and Willard (2004) ได้ให้เหตุผลว่าแสงจะไปกระตุ้นเร่งให้ตัวอสุจิสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) จากนั้นค่อย ๆ อุ่นน้ำเชื้อด้วย water bath ให้ได้อุณหภูมิ 37ºC แล้วทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ของ Bearden et al. (2004) คือ

1) ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดน้ำเชื้อ 90 μl หยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและอุ่นมีอุณหภูมิประมาณ 37°C ปิดด้วยแผ่นสไลด์ (cover slip)

** ดูรายละเอียด ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารเคมีในการทดลองและการสกัด, หน้า 111

2) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายจากต่ำไปจนถึง 400 เท่า ซึ่งปรับความสว่างและความละเอียดให้เหมาะสมต่อการมองเห็นตัวอสุจิ ประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิเท่านั้น ไม่รวมตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไม่ตรงทิศทาง หรือเคลื่อนที่เป็นวงกลมและไม่รวมตัวที่ไม่เคลื่อนที่ แต่ยังคงสามารถเคลื่อนไหวได้ เลื่อนสไลด์ 4 จุดของแต่ละสไลด์ ตำแหน่งการประเมินค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 4 จุด บนสไลด์ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 4.1

3) อ่านผลที่ได้ใช้เวลา 2-3 นาที ตั้งแต่ปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ โดยจะประเมินการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ แบ่งเป็น 5 ระดับ (Mitchell and Doak, 2004) ได้แก่

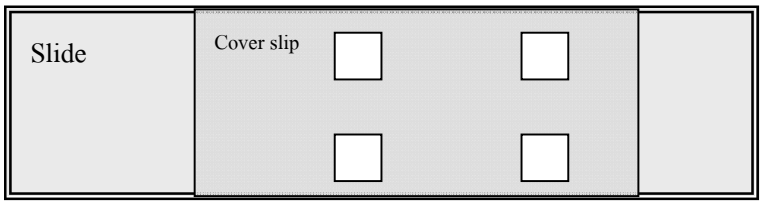
20% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 20

40% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 40

60% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 60

80% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 80

100% ใช้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละ 100



☐ ตำแหน่งที่ประเมินค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

ภาพที่ 4.1 แสดงตำแหน่งการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

4.4.2.2 เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

เป็นการตรวจหาร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อ และเพื่อยืนยันคุณภาพน้ำเชื้อว่ามีตัวอสุจิที่มีชีวิตอยู่เท่าไร โดยใช้หลักการผ่านของสี eosin ที่มีคุณสมบัติในการผ่านเข้าในผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายแต่ไม่ผ่านเข้าในผนังเซลล์ที่มีชีวิต (Bearden et al., 2004) ดังภาพที่ 3.2 โดยนำน้ำเชื้อออกมาอุ่น 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และภายในห้องที่มืด และอุ่นสีย้อมด้วย (eosin-nigrosin) จากนั้นมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) นำน้ำเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37˚C และสีย้อม (eosin-nigrosin) หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่อุ่นประมาณ 37˚C ในอัตราส่วน 1:1

2) ผสมน้ำเชื้อกับสีย้อม (eosin-nigrosin)

3) ใช้สไลด์อีกแผ่นเกลี่ยสารละลายในข้อ 2 ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ

4) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (40X) ลักษณะที่จะเห็นสีม่วงดำของ nigrosin ติดอยู่เป็นสีพื้นทำให้เห็นตัวอสุจิง่ายขึ้น และสีแดงของ eosin จะผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตาย ทำให้ส่วนหัวของอสุจิที่ตายมีสีแดง ส่วนตัวที่มีชีวิตจะมีส่วนหัวใสไม่ติดสี

5) นับจำนวนตัวอสุจิที่ติดสีแดงในตัวอสุจิจากจำนวนที่พบอย่างน้อย 200 ตัว จากนั้นคำนวณร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตต่อไป (Bearden et al., 2004) ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งจะทำการตรวจและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิ 17°C

6) ตำแหน่งการนับตัวอสุจิ 4 จุด บนสไลด์ แสดงดังภาพที่ 4.1 ตำแหน่งเดียวกันกับการประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

ภาพที่ 4.2 ลักษณะของตัวอสุจิที่มีชีวิต **A** (ไม่มีการติดสีย้อม) และตาย **B** (ติดสีย้อม)

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแบบ ANOVA ทดสอบอิทธิพลเนื่องจากเวลา ด้วยวิธี multivariate ทดสอบแนวโน้มการตอบสนองเนื่องจากเวลา ด้วยเทคนิค orthogonal polynomials และ Duncan's new multiple range test แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย (means ± SE)

4.6 สถานที่ทำการทดลอง

โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อาคารเครื่องมือ 1, 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.7 ระยะเวลาทำการทดลอง

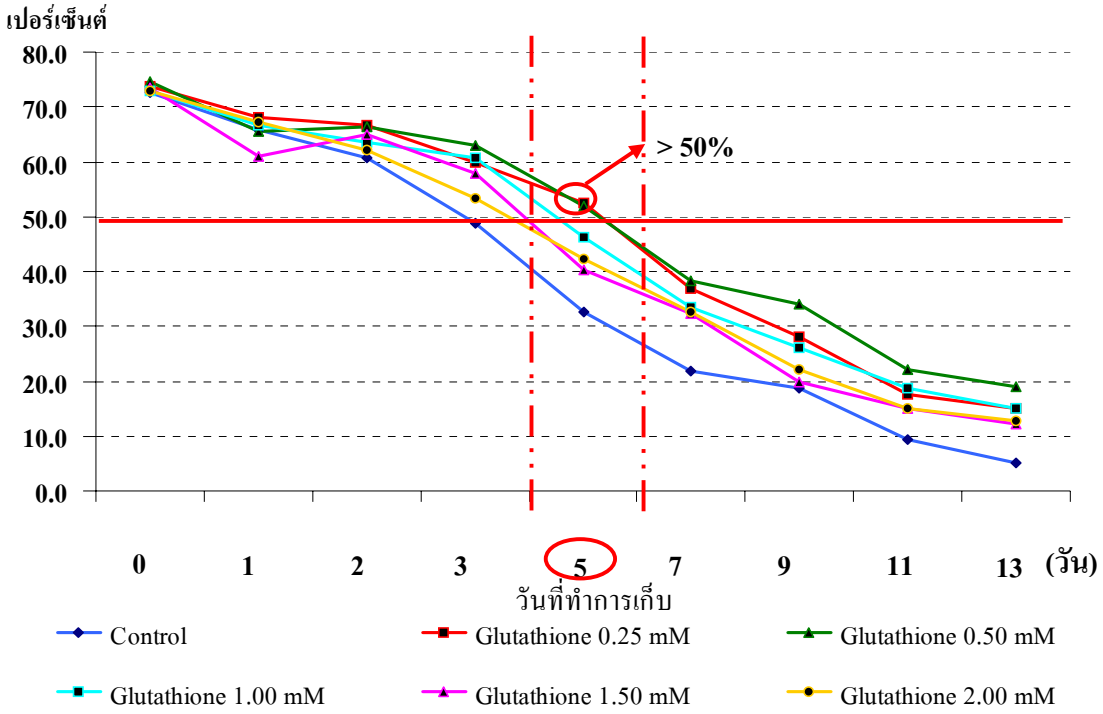
วันที่ 24 มิถุนายน 2549 ถึง 23 ตุลาคม 2550 (เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสดสุกร ภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำน้ำเชื้อสุกรมาเจือจางและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 17°C แล้วทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อและเก็บข้อมูลในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของวันที่เก็บน้ำเชื้อไว้ และวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ของน้ำเชื้อสุกร ณ อาคารเครื่องมือ 1, 2 และ 3 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี)

4.8 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.8.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

4.8.1.1 ผลของการเสริมกลูตาไธโอน ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

ผลการศึกษาการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ที่เสริมกลูตาไธโอน ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.0 mM ไว้ที่อุณหภูมิ 17°C จากการศึกษาพบว่า การเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mM มีผลทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรได้นาน 5 วัน (ปกติ 3 วัน) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิมากกว่า 50% (52.59±19.63 และ 51.89±13.37 ตามลำดับ) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เท่ากับ 32.54±21.83 และต่ำกว่าทุกระดับความเข้มข้นของการเสริมกลูตาไธโอน ในวันเดียวกันและจากภาพที่ 4.3 เมื่อเจือจางเก็บรักษาน้ำเชื้อนานตั้งแต่ 2 วัน ถึงวันสุดท้ายการเก็บรักษา คือ วันที่ 13 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิของกลุ่มควบคุมมีค่าที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมกลูตาไธโอนทุกระดับความเข้มข้น มีการศึกษาของ Lindemann, O'Brien, and Giblin (1988) ได้ทำการเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ในน้ำเชื้อโคแช่เย็น หลังจากการอุ่นน้ำเชื้อ พบว่า น้ำเชื้อที่ได้รับการเสริมกลูตาไธโอน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เท่ากับ 59.3±3.5 มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (36.4±4.1) จึงให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลอง ผลของการศึกษาการเสริมกลูตาไธโอน ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM (บทที่ 3)



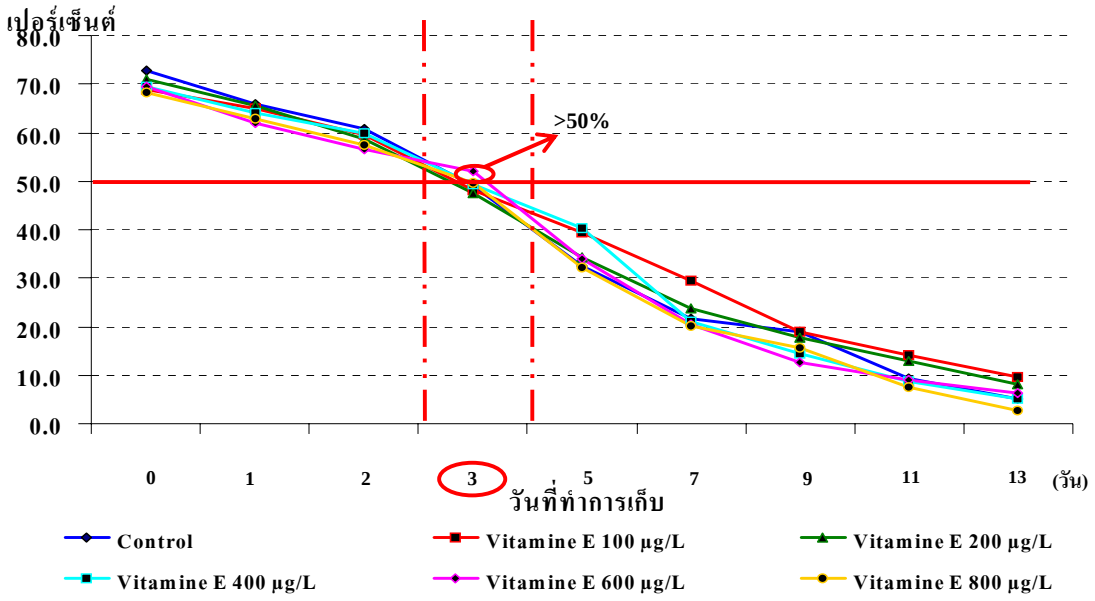
ภาพที่ 4.3 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

จากการทดลองนี้พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 1 mM มีผลที่สอดคล้องกับการศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ที่ใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น (บทที่ 3) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองการทดลอง และพบว่า ระดับความเข้มข้นมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิต่ำกว่าระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mM ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดของการใช้กลูตาไธโอนจากการทดลอง คือ ระดับความเข้มข้น 0.25 mM ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณ กลูตาไธโอน จากการศึกษาของ Luberda (2005) เท่ากับ 185.8±46.7 µM ที่พบในน้ำเชื้อ เมื่อเสริมกลูตาไธโอนจะมีผลทำให้ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่รายตัวที่ดี ซึ่งจากการศึกษาของ Gadea, Selles, Marco, Coy, Matas, Romar, and Ruiz (2004) พบว่า ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จะมีผลทำให้เกิดการลดลงของปริมาณกลูตาไธโอนในสารละลายน้ำเชื้อ ดังนั้นการรักษาปริมาณของ glutathione (GSH) ในน้ำเชื้อให้คงที่ไว้เสมอ เพื่อไม่ให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ LPO ที่ผนังเซลล์ของอสุจิ กลูตาไธโอนที่มีอยู่ภายในเซลล์จะถูกใช้ไปจากกระบวนการป้องกันตัวเองจาก oxidative stress ภายในเซลล์อสุจิ หลังจากที่รีดเก็บน้ำเชื้อตลอดเวลา จึงมีผลทำให้มีปริมาณลดลง และสอดคล้องกับการรายงานของ Johnson, Weitze, Fiser, and Maxwell (2000) ได้รายงานว่า ช่วงเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน จะเกิดการเสื่อมสภาพของตัวอสุจิ เพราะในระหว่างที่เก็บรักษาจะเกิดการสูญเสีย

พลังงาน (ATP: Adenosine triphosphase) และ cAMP มีผลให้ลดการนำแคลเซียม (calcium) เข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นผลทำให้การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility) ลดลงและในขณะนั้น ผนังเซลล์ถูกทำลายด้วย ทั้งนี้เพราะ LPO ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก และส่วนของ unsaturated fatty acid ใน phospholipids ในผนังเซลล์ จึงเป็นเหตุให้ส่วนไขมันที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งมีผลเปลี่ยนความสมดุลของไขมันที่ผนังเซลล์ ดังนั้นจะถูกป้องกันด้วย superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase/reductase system ซึ่งไม่มีการสร้างเพิ่มเติมจาก Sertoli cell เช่นเดียวกับภายในเซลล์ seminiferous tubule

4.8.1.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

ผลการศึกษาการเก็บรักคุณภาพน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ที่เสริมวิตามินอี ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 100, 200, 400, 600 และ 800 µg/L ไว้ที่อุณหภูมิ 17°C และในที่มืด ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากการศึกษาพบว่า การเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรระดับความเข้มข้น 600 µg/L มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิมีค่าสูงกว่าทุกระดับความเข้มข้น (100, 200, 400 และ 800 µg/L) ที่มีการเสริมวิตามินอีและกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่ามากกว่า 50% (52.08±15.22, 48.07±15.98, 47.50±20.87, 49.19±18.13, 49.76±16.72 และ 48.88±18.43 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) จากภาพที่ 4.2 เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อหลังเจือจางไว้นานมากกว่า 3 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมวิตามินอีมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่ลดลงต่ำทุกระดับความเข้มข้น เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

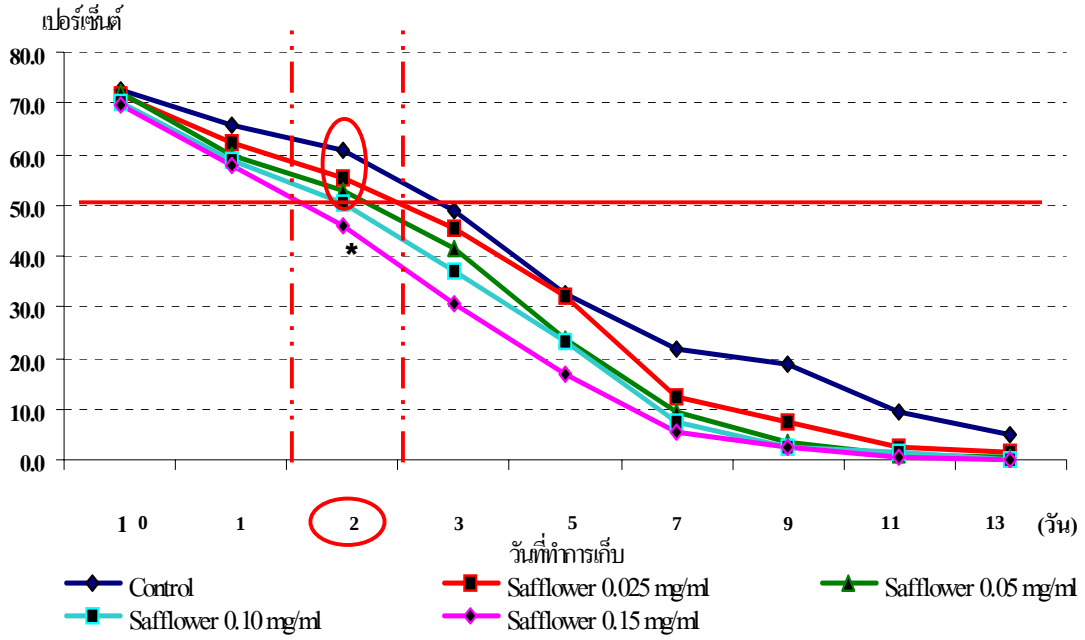


ภาพที่ 4.4 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา พบว่า ระดับความเข้มข้น 400 และ 100 μg/L มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูง (40.36±22.67 และ 39.38±22.80 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม และในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา ระดับความเข้มข้น 100 μg/L มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและระดับความเข้มข้นอื่น ๆ (200, 400, 600 และ 800 μg/L) มีค่า เท่ากับ 29.33±21.30, 21.80±23.72, 23.79±23.80, 21.02±19.53, 20.34±19.92 และ 20.03±20.08 ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ การเสริมวิตามินอี ระดับความเข้มข้น 400 μg/L จากการศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น (บทที่ 3) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้ง 7 วันของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ด้วยเหตุผลที่ว่า “วิตามินอีจะไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอาศัยคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดออกซิไดส์” (วิตามินอี, 2551) ซึ่งสอดคล้องกับ Noguchi et al. (1973, อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo, 2000) ได้รายงานว่า วิตามินอีมีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ โดย GSH-Px จะไม่เข้าทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะทำลายเซลล์ของผนังเซลล์ในขณะเดียวกัน วิตามินอีจะมีผลภายในเซลล์จะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน

4.8.1.3 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

ผลการศึกษาการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เสริมสารสกัดดอกคำฝอย ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.15 mg/ml ไว้ที่อุณหภูมิ 17°C และในที่มืด จากการศึกษาพบว่า การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นไม่มีผลต่อการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น แต่กลับมีผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิต่ำเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมตั้งแต่ได้รับการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากภาพที่ 4.5 พบว่า ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิของกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml) มีค่าเท่ากับ 55.35±14.84, 53.08±15.95, 50.22±17.39 และ 46.00±18.41 ตามลำดับความเข้มข้น ซึ่งลดต่ำลงกว่ากลุ่มควบคุม (60.79±11.84) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดดอกคำฝอย 0.15 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (45.99±18.41 และ 60.79±11.84 ตามลำดับ) และจะเห็นได้ชัดว่า วันที่ 2 ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อกลุ่มที่ได้รับการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยมีการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 4.5 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ

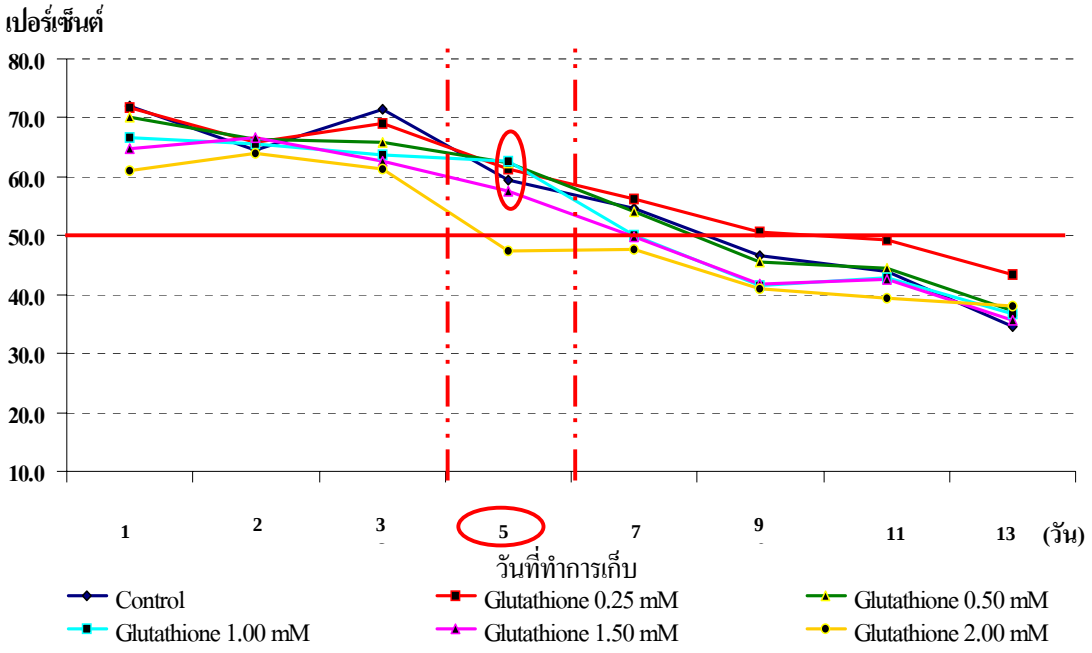
จากตารางที่ 4.2 พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา เป็นต้นไป กลุ่มควบคุม กลุ่มเสริมวิตามินอี และกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยที่สูง เนื่องจากในจำนวนซ้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ค่าเฉลี่ยที่ได้ของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ไม่มีการเคลื่อนที่รายตัว (มีค่าเป็น 0) และบางครั้งก็มีการเคลื่อนที่ ทั้งสูงและต่ำ แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บ ซึ่งไม่ได้หมายความว่าวิธีการ หรือขั้นตอนต่างๆ มีความแตกต่างกัน ซึ่งจากตารางนี้แสดงให้เห็นว่า กลุ่มเสริมกลูตาไธโอนมีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ตั้งแต่วันแรกที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อ จนกระทั่ง วันที่ 11 ของการเก็บรักษา ดังนั้นการเลือกใช้ กลูตาไธโอน เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันเสริมในสารละลายน้ำเชื้อมีผลที่ดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อต่อการนำไปใช้ต่อไป

อย่างไรก็ตามการแยกระดับของสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นเพื่อมีการนำไปใช้ในการผลิตสุกรต่อไป ได้แสดงให้เห็นว่าการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานมากกว่าปกติและมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงกว่า 50% ซึ่งให้ผลดีกว่าสารต้านการเกิดออกซิเดชันอื่น ๆ ที่ทำการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร และนอกจากคุณภาพของตัวอสุจิในส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวแล้วยังมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ควรจะเปรียบเทียบควบคู่ไปด้วยกัน

4.8.2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

4.8.2.1 ผลของการเสริมกลูตาไธโอน ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

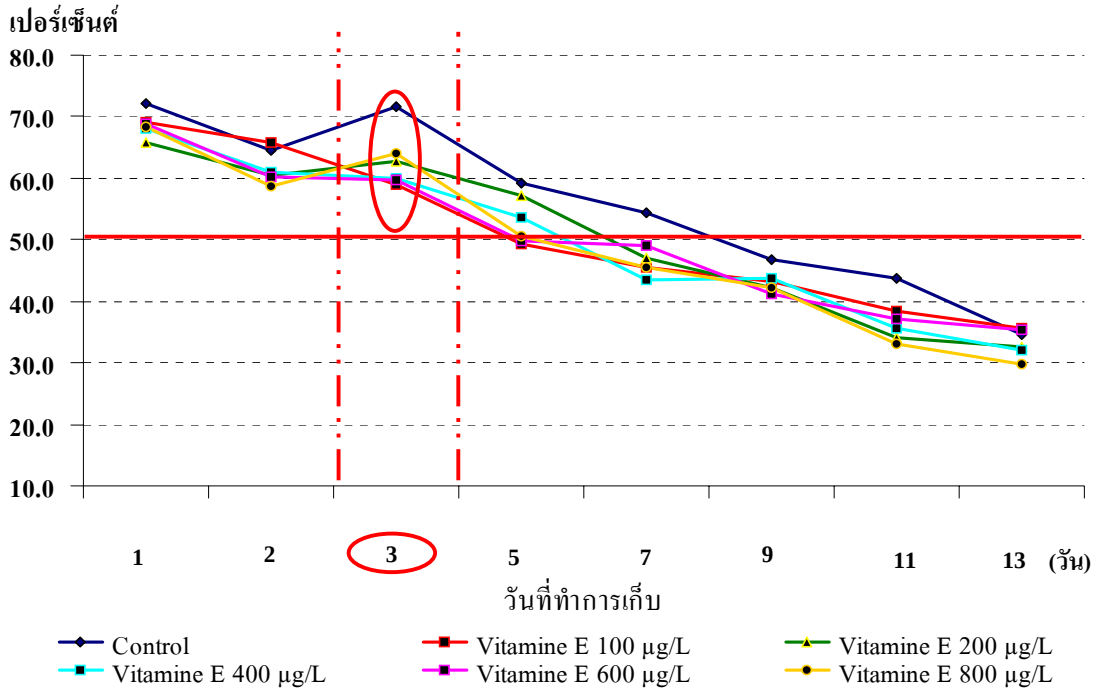
การศึกษาผลของการเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 และ 2.0 mM แสดงในภาพที่ 4.6 จากการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อสุกรเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อเสริมกลูตาไธโอนทุกระดับความเข้มข้นรวมกลุ่มควบคุม สามารถเก็บได้นานมากกว่า 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมากกว่า 50% ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 5 วัน มีค่าเท่ากับ 61.25±17.02, 62.29±15.50, 62.64±13.61, 57.46±16.33, 47.41±18.73 และ 59.31±16.04 (ตามลำดับความเข้มข้นของกลูตาไธโอนและกลุ่มควบคุม) การเก็บได้นาน 5 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 0.5 และ 0.25 mM มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และจากการทดลอง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกลูตาไธโอน เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร พบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำมีผลแปรผันตรงข้ามกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เพราะทำให้มีค่าสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงของการเสริมกลูตาไธโอน ซึ่งเห็นได้ชัดเจนที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงที่สุดในกลุ่มที่ทำการเสริม ยกเว้นวันที่ 2 และ 5 ของการเก็บรักษา ในทางตรงกันข้ามที่ระดับความเข้มข้น 2.0 mM มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิต่ำที่สุดของทุกระดับที่ทำการเสริมกลูตาไธโอน และในภาพที่ 4.6 พบว่า มีลำดับของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิค่อนข้างสม่ำเสมอจากทุกระดับความเข้มข้นที่เสริม แสดงว่า เสริมกลูตาไธโอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ



ภาพที่ 4.6 ผลของการเสริมกลูตาไธโอนต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

4.8.2.2 ผลของการเสริมวิตามินอี ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ซึ่งแยกการเสริมวิตามินอี แบ่งเป็น 5 ระดับความเข้มข้น คือ 100, 200, 400, 600 และ 800 µg/L แสดงในภาพที่ 4.7 จากการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อสุกรเมื่อเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อเสริมวิตามินอี มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ลดลงจากวันที่เริ่มเก็บรักษา เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิของกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มเสริมวิตามินอี ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บรักษาจนกระทั่งวันสุดท้ายของการเก็บรักษา คือวันที่ 13 ซึ่งการเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรทุกระดับความเข้มข้นมีลำดับของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิเป็นลำดับที่ไม่มีความสม่ำเสมอของค่าดังกล่าว แสดงว่า การเสริมด้วยวิตามินอีทุกระดับความเข้มข้นไม่ได้มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสุกรด้านเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิดีกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำวิตามินอีใช้ในทางการผลิตสัตว์ต่อการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

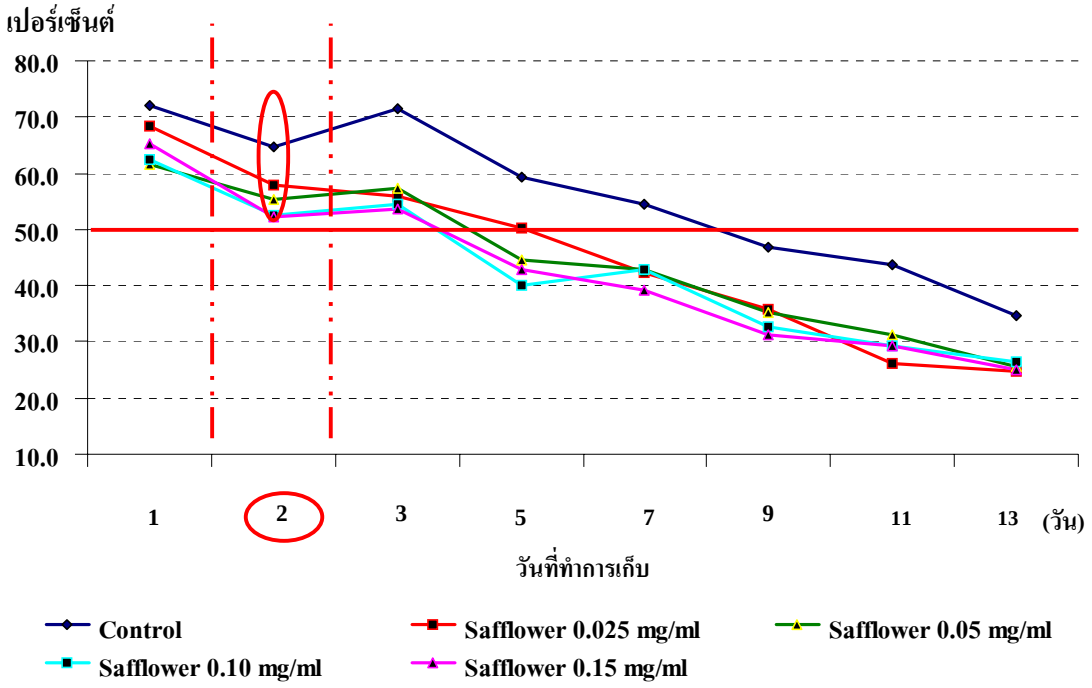


ภาพที่ 4.7 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

4.8.2.3 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอย ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยลงในสารละลายน้ำเชื้อ เพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ซึ่งแยกเป็น 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.025, 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml แสดงในภาพที่ 4.8 จากการศึกษาพบว่า เมื่อเสริมสารสกัดดอกคำฝอยลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร สารสกัดดอกคำฝอยไม่มีผลต่อการรักษาคุณภาพของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ตั้งแต่เมื่อได้รับการเสริม เนื่องจากมี

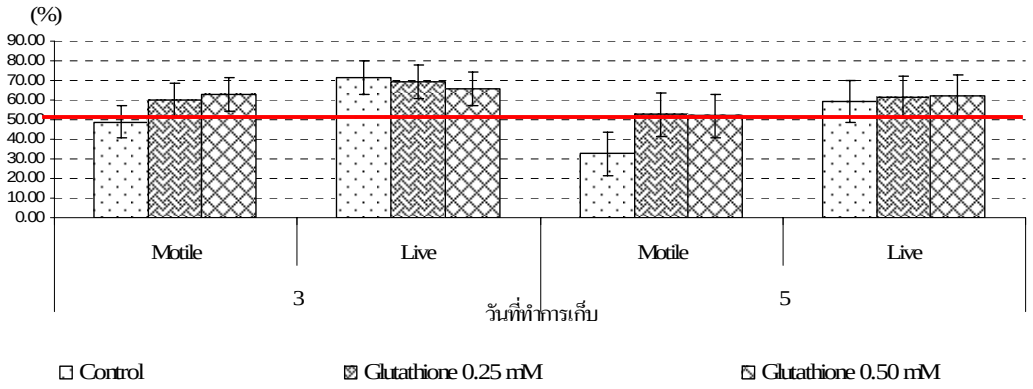
เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในทุกวันของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตาม การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยในสารละลายน้ำเชื้อให้ผลของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่คล้ายกันในทุกระดับความเข้มข้นของการเสริม เป็นเหตุผลแสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกคำฝอยไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อ



ภาพที่ 4.8 ผลของการเสริมสารสกัดดอกคำฝอยต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่เก็บรักษาต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและการมีชีวิตของตัวอสุจิที่สูง (>50%) ที่มีระยะเวลายาวนานมากกว่าปกติ (3 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม จากภาพที่ 4.9 พบว่า วันที่ 3 ของการเก็บรักษา เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงที่สุด คือ กลุ่มเสริม กลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.5 mM (62.97±7.69) รองลงมา คือ กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.25 mM (59.88±13.98) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (48.88±18.43) ซึ่งเป็นลำดับสุดท้ายในทางตรงกันข้ามกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ กลุ่มควบคุมมีค่าสูงที่สุด (71.56±12.00) รองลงมาคือ กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.25 mM (69.04±13.86) และสุดท้าย กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.5 mM (65.71±11.76) เมื่อเก็บไว้ยาวนานกว่าปกติที่แนะนำให้ใช้ในทางการผสมเทียม ภายใน 3 วัน หลังจากการเก็บรักษา (Johnson, Weitze, Fiser, and Maxwell, 2000; Huo, Ma, and Yang, 2002; Dubé, Beaulieu, Reyes-Moreno, Guillemette, and Bailey, 2004; Haugan, Gaustad, Reksen, Gröhn, and Hofmo, 2007; Estienne, Harper, and Day, 2007) คือ

การเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ สูงที่สุด (52.59±19.63) ลดลงจากวันที่ 3 ร้อยละ 7.29 ซึ่งลดลงน้อยกว่ากลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.5 mM และกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 11.8 และ 16.31 ตามลำดับ) และเช่นเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิของกลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.25 mM ลดลง ร้อยละ 7.79 ซึ่งใกล้เคียงกับการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ซึ่งต่างกับกลุ่มสังเกตของกลุ่มควบคุมและกลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.5 mM ในการนำน้ำเชื้อสุกรไปใช้จะมีการพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิมากกว่าที่จะใช้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เนื่องจากการเข้าไปผสมกับไข่ภายในท่อนำไข่ (oviduct) หลังจากทำการผสมตัวอสุจิต้องเคลื่อนที่ผ่านมดลูก (uterus) ปีกมดลูก (uterine horn) และท่อนำไข่ ดังนั้นการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิจึงมีความสำคัญยิ่งในอัตราการผสมติด (conception rate) ดังเช่นการรายงานค่ามาตรฐานต่าง ๆ เกี่ยวกับน้ำเชื้อ (semen) ของ Hafez and Hafez (2000) ในตารางที่ 2.6 จะพบว่า มีการรายงานเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motile sperm, %) ในสุกร (boar) เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งมีการเคลื่อนที่รายตัว อยู่ในช่วง 50-80% ที่มีการพิจารณานำน้ำเชื้อนั้น ๆ ไปใช้เพื่อทางการผลิตต่อไป



ภาพที่ 4.9 คุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ให้ผลดี ในการเก็บรักษาวันที่ 3 และ 5

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลอง จากการวัดซ้ำในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำการทดสอบอิทธิพลเนื่องจากระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร ด้วยวิธี multivariate และการทดสอบแนวโน้มการตอบสนองเนื่องจากเวลา ด้วยเทคนิค orthogonal polynomials ของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร พบว่า อิทธิพลเนื่องจากเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่มีอิทธิพลร่วมกับกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) กล่าวคือ คุณภาพน้ำเชื้อสุกรได้รับอิทธิพลทั้งจากระยะเวลาในการเก็บรักษาและการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน แต่ทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษาและการเสริมสารต้านการเกิด

ออกซิเดชันเป็นอิทธิพลที่เป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำเชื้อสุกรตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (13 วัน) ในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน แสดงดัง ตารางที่ 4.1 เห็นว่าการเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.5 และ 0.25 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM มีค่าสูงที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ จากการวิเคราะห์นี้สามารถที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจในการเลือกนำไปใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นและนำไปสู่การใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร เพื่อการผสมเทียมต่อไป

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเชื้อสุกร ตลอดการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (เก็บรักษาไว้นาน 13 วัน)

ทรีตเมนต์	คุณภาพน้ำเชื้อสุกร (%)*	
	การเคลื่อนที่รายตัว	การมีชีวิตของตัวอสุจิ^{ns}
กลุ่มควบคุม	38.03±5.41^{abcdef}	56.49±4.69
กลูตาไธโอน (0.25 mM)	47.06±5.24^{ab}	58.88±4.56
กลูตาไธโอน (0.50 mM)	48.83±4.90^{a}	56.21±4.50
กลูตาไธโอน (1.0 mM)	45.41±5.02^{abc}	54.24±4.59
กลูตาไธโอน (1.50 mM)	42.55±5.11^{abcd}	53.20±4.56
กลูตาไธโอน (2.0 mM)	42.92±5.08^{abcd}	50.48±4.60
วิตามินอี (100 µg/L)	39.84±5.21^{abcde}	51.32±4.74
วิตามินอี (200 µg/L)	38.41±5.34^{abcdef}	50.83±4.92
วิตามินอี (400 µg/L)	37.56±5.32^{abcdef}	50.28±4.82
วิตามินอี (600 µg/L)	36.54±5.31^{abcdef}	50.71±4.92
วิตามินอี (800 µg/L)	35.85±5.34^{bcdef}	49.44±4.88
สารสกัดดอกคำฝอย (0.025 mg/ml)	33.00±5.43^{cdef}	45.87±4.95
สารสกัดดอกคำฝอย (0.05 mg/ml)	30.16±5.41^{def}	44.84±4.86
สารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)	28.52±5.38^{ef}	43.18±4.97
สารสกัดดอกคำฝอย (0.15 mg/ml)	26.23±5.34^{f}	42.99±4.98
SEM	3.75	4.51
P-value	0.0001	0.0001

* Mean ± SE (n = 9), $^{a-f}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01), ns (non significant)

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เสริมด้วยกลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย

ทรีทเมนต์	ระยะเวลาที่เก็บรักษา (วัน)*								
	0	1	2	3	5	7	9	11	13
กลุ่มควบคุม	72.74±10.41	65.80±6.23^{ab}	60.79±11.84^{ab}	48.88±18.43^{abcd}	32.54±21.83^{abc}	21.80±23.72^{abcd}	18.84±19.85^{abc}	9.27±15.90^{abcd}	5.18±10.37^{ab}
กลูตาไธโอน (0.25 mM)	73.63±4.28	68.20±6.39^{a}	66.55±7.33^{a}	59.88±13.98^{ab}	52.59±19.63^{a}	36.86±24.30^{a}	28.12±23.41^{ab}	17.58±21.28^{abc}	15.10±19.02^{ab}
กลูตาไธโอน (0.50 mM)	74.49±7.17	65.58±8.19^{ab}	66.43±7.20^{a}	62.97±7.69^{a}	51.89±13.37^{a}	38.26±21.41^{a}	33.99±17.40^{a}	22.13±17.76^{a}	19.09±15.35^{a}
กลูตาไธโอน (1.0 mM)	73.03±7.15	66.74±5.49^{ab}	63.44±6.59^{ab}	60.60±9.47^{ab}	46.10±17.86^{ab}	33.40±18.41^{ab}	26.19±16.95^{ab}	18.73±17.53^{ab}	14.97±15.96^{ab}
กลูตาไธโอน (1.50 mM)	73.36±5.94	60.90±11.43^{ab}	64.88±5.83^{ab}	57.97±11.66^{ab}	40.24±17.86^{abc}	32.22±18.85^{ab}	19.87±16.69^{abc}	15.05±14.42^{abcd}	12.30±17.68^{ab}
กลูตาไธโอน (2.0 mM)	72.90±5.75	67.11±5.11^{ab}	62.09±9.40^{ab}	53.39±12.48^{abc}	42.28±16.95^{abc}	32.55±17.77^{ab}	22.24±19.67^{abc}	15.18±14.33^{abcd}	12.89±17.35^{ab}
วิตามินอี (100 µg/L)	68.79±11.93	65.02±6.86^{ab}	59.48±13.21^{abc}	48.07±15.98^{abcd}	39.38±22.80^{abc}	29.33±21.30^{abc}	18.97±20.42^{abc}	14.26±17.13^{abcd}	9.51±15.36^{ab}
วิตามินอี (200 µg/L)	71.00±11.53	65.65±5.81^{ab}	58.63±12.53^{abc}	47.50±20.87^{abcd}	34.22±24.04^{abc}	23.79±23.80^{abcd}	17.69±19.87^{abc}	13.00±16.36^{abcd}	8.05±11.03^{ab}
วิตามินอี (400 µg/L)	69.45±13.02	63.96±4.45^{ab}	59.96±9.41^{abc}	49.19±18.13^{abcd}	40.36±22.67^{abc}	21.02±19.53^{abcd}	14.45±18.45^{abc}	8.71±13.98^{abcd}	5.04±7.29^{ab}
วิตามินอี (600 µg/L)	69.41±11.27	61.86±7.15^{ab}	56.68±13.84^{abc}	52.08±15.22^{abc}	33.98±22.15^{abc}	20.34±19.92^{abcd}	12.78±20.04^{abc}	9.10±13.62^{abcd}	6.34±11.15^{ab}
วิตามินอี (800 µg/L)	68.14±12.88	62.78±6.40^{ab}	57.41±12.76^{abc}	49.76±16.72^{abcd}	32.13±21.00^{abc}	20.03±20.08^{abcd}	15.76±23.38^{abc}	7.61±12.11^{abcd}	2.68±5.18^{b}
สารสกัดดอกคำฝอย (0.025 mg/ml)	71.68±7.32	62.27±7.50^{ab}	55.35±14.84^{abc}	45.42±22.04^{abcd}	31.98±23.01^{abc}	12.30±13.32^{bcd}	7.34±11.07^{bc}	2.62±5.15^{bcd}	1.58±4.06^{b}
สารสกัดดอกคำฝอย (0.05 mg/ml)	72.27±6.79	59.57±9.18^{ab}	53.08±15.95^{abc}	41.51±20.81^{bcd}	23.57±19.90^{bc}	9.14±10.96^{cd}	3.56±6.09^{c}	1.22±2.03^{cd}	0.56±1.08^{b}
สารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)	70.10±9.71	58.63±9.42^{ab}	50.22±17.39^{bc}	36.89±21.64^{cd}	23.04±21.13^{bc}	7.29±8.34^{d}	2.56±3.75^{c}	1.32±3.60^{cd}	0.00
สารสกัดดอกคำฝอย (0.15 mg/ml)	69.86±8.69	57.65±13.60^{b}	46.00±18.41^{c}	30.61±20.83^{d}	16.72±17.48^{c}	5.48±6.30^{d}	2.66±6.96^{c}	0.54±1.15^{d}	0.00
SEM	3.32	2.82	4.39	6.02	7.22	6.61	6.20	4.91	4.28
P-value	0.9833	0.2049	0.0486	0.0118	0.0515	0.0020	0.0196	0.0261	0.0398

* Mean ± SE (n = 9), $^{a-d}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การการมีชีวิตของตัวอสุจิ ในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เสริมกลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาที่เก็บรักษา (วัน)*							
	1	2	3	5	7	9	11	13
กลุ่มควบคุม	72.11±13.79	64.63±12.90	71.56±12.00	59.31±16.04	54.51±19.87	46.71±21.58	43.85±17.94	34.61±23.60
กลูตาไธโอน (0.25 mM)	71.64±15.45	65.74±16.61	69.04±13.86	61.25±17.02	56.28±16.69	50.49±22.82	49.36±17.72	43.50±21.56
กลูตาไธโอน (0.50 mM)	70.04±12.89	66.26±10.88	65.71±11.76	62.29±15.50	54.03±19.06	45.41±20.80	44.55±15.66	37.22±21.51
กลูตาไธโอน (1.0 mM)	66.59±15.71	65.62±8.12	63.61±14.30	62.64±13.61	50.17±16.42	41.50±23.95	42.90±20.50	36.76±21.50
กลูตาไธโอน (1.50 mM)	64.90±16.39	66.58±9.16	62.60±12.21	57.46±16.33	49.74±18.27	41.90±23.74	42.52±16.02	35.55±21.49
กลูตาไธโอน (2.0 mM)	60.94±18.55	64.02±9.15	61.23±14.78	47.41±18.73	47.62±15.22	41.03±23.64	39.32±20.67	37.92±21.74
วิตามินอี (100 µg/L)	69.17±16.05	65.85±8.72	58.92±16.42	49.24±18.35	45.39±20.22	43.12±27.04	38.33±18.50	35.92±19.06
วิตามินอี (200 µg/L)	65.84±18.05	60.44±14.03	62.63±18.95	57.14±22.78	47.14±20.28	42.24±24.49	34.20±21.31	32.47±22.27
วิตามินอี (400 µg/L)	68.08±15.80	61.08±14.73	59.90±21.09	53.55±18.84	43.58±17.12	43.64±23.90	35.67±19.72	31.97±22.27
วิตามินอี (600 µg/L)	68.88±11.65	60.12±16.49	59.69±21.46	49.71±20.42	49.17±22.04	41.08±28.07	37.18±24.47	35.30±19.18
วิตามินอี (800 µg/L)	68.30±13.91	58.75±15.67	63.98±16.02	50.56±18.70	45.41±22.06	42.19±27.07	33.12±20.22	29.71±16.94
สารสกัดดอกคำฝอย (0.025 mg/ml)	68.49±17.04	57.90±10.75	55.91±17.95	50.21±21.15	42.22±22.15	35.82±23.28	26.02±20.82	24.76±16.11
สารสกัดดอกคำฝอย (0.05 mg/ml)	61.71±16.72	55.28±12.67	57.20±18.83	44.47±19.44	42.96±21.97	35.23±23.24	31.34±24.86	25.56±17.51
สารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)	62.32±14.22	52.46±12.15	54.40±22.48	40.12±22.43	42.80±23.25	32.71±24.88	29.32±25.43	26.39±19.27
สารสกัดดอกคำฝอย (0.15 mg/ml)	65.40±16.18	52.27±14.96	53.56±21.05	42.97±22.82	39.09±20.40	31.27±20.44	29.14±26.23	24.93±19.73
SEM	5.53	4.53	6.13	7.19	7.47	8.61	7.46	7.26
P-value	0.9765	0.2823	0.7805	0.5641	0.9706	0.9893	0.7555	0.9174

* Mean ± SE (n = 9)

4.9 สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสารต้านการเกิดออกซิเดชัน จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ กลูตาไธโอน วิตามินอี สารสกัดดอกคำฝอย นำมาแยกระดับความเข้มข้นเพื่อความเหมาะสมของสารต้านการเกิดออกซิเดชันของแต่ละชนิด จากการศึกษาพบว่า สารต้านการเกิดออกซิเดชันกลุ่มของกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีและสูงกว่าทุกสารต้านการเกิดออกซิเดชันอื่นๆ ที่คัดเลือกมา ซึ่งทั้งสองความเข้มข้น (0.25 และ 0.50 mM) ของกลูตาไธโอน สามารถเก็บได้นาน 5 วัน โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงกว่า 50% มีค่าเท่ากับ 52.59±19.63 และ 51.89±13.37 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเสริมสารสกัดดอกคำฝอย ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิให้ผลที่สอดคล้องเดียวกันกับกลูตาไธโอน ทั้งสองระดับความเข้มข้น 0.25 และ0.5 mM มีค่าเท่ากับ 61.25±17.02 และ 62.29±15.50 ตามลำดับ และสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงควรนำกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM มาเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 5 วัน โดยยังมีคุณภาพน้ำเชื้อที่อยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ผสมเทียมต่อไปได้

4.10 รายการอ้างอิง

วิตามินอี. (2551). [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.geocities.com/vitamin E

Bearden, H. J., Fuquay, W., and Willard, S. T. (2004). **Applied Animal Reproduction (6th ed.) : Semen Evaluation** (pp. 183-197). Pearson prentice hall.

Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C., and Bailey, J. L. (2004). Boar sperm storage capacity of BTS and Androhoep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphrylation. **Theriogenology.** 62: 874-886.

Estienne, M. J., Harper, A. F., and Day, J. L. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. **Biol Reprod.** 7(3): 221 -231.

Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R.,and ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**. 62: 690 - 701.

Hafez, B., and Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Farm Animal 7th Edition**. USA.

Haugan, T., Gaustad, A. H., Reksen, O., Gröhn, Y. T., and Hofmo, P. O. (2007). Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stored in X-Cell vs BTS extender. **Reprod Dom Anim.** 42: 94-99.

Huo, L-J., Ma, X-H., and Yang, Z-M. (2002). Assessment of sperm viability, mitrochondrial activity, capacitation and acrosome inactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology.** 58: 1349-1360.

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. **Anim Reprod Sci.** 62: 143-172.

Lindemann, C. B., O'Brien, J. A., and Giblin, F. J. (1988). An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. **Biol Reprod.** 38: 114 -120

Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol.** 5(1): 5–17.

Mitchell, J. R. and Doak, G. A. (2004). **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle including information pertaining to goats, sheep, horses, swine, and other animal (9th ed.).** New Jersey: Pearson education.

Smith, O. B. and Akinbamijo, O. O. (2000). Micronutrients and reproduction in farm animals. **Anim Reprod Sci.** 60-61: 549-560.

Zou, C-Z. and Yang, Z-M. (1999). Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. **Theriogenology.** 53: 1477-1488.

บทที่ 5
ศึกษาประสิทธิภาพการนำน้ำเชื้อที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ไปใช้ต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร

5.1 บทคัดย่อ

น้ำเชื้อสุกรที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เก็บได้ยาวนานขึ้นต่อการผลิตลูกสุกรและประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของแม่สุกร โดยการนำน้ำเชื้อสุกรเจือจางเก็บรักษาไว้นาน 3 และ 5 วัน ซึ่งน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น เก็บรักษาไว้ 5 วัน เสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM ลงในสารละลายน้ำเชื้อ ผลจากการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เหมาะสมในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น นำมาผสมให้กับแม่สุกรเป็นสัด โดยมีลำดับการให้ลูกท้องเฉลี่ย 2-4 ครอก จำนวน 16 แม่ ทำการผสมเทียม 2 ครั้ง ต่อ 1 รอบการเป็นสัด ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรเจือจางครั้งละ 1 โด๊ส ๆ ละ 100 มล. มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร แล้วตรวจการเป็นสัดทุก ๆ 21 วัน เช้า-เย็น จนกระทั่งคลอด จากการศึกษาพบว่า การใช้น้ำเชื้อเสริมด้วยกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM น้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน เมื่อผสมเทียมให้กับแม่สุกรเป็นสัด มีอัตราการผสมติด ร้อยละ 60 เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม มีอัตราการผสมติด ร้อยละ 67 และเมื่อติดตามการเข้าคลอดของแม่สุกร คิดเป็น 100% ทั้งสองกลุ่มการทดลองการให้ผลผลิตหลังจากผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเก็บรักษาไว้นาน 5 วัน มีจำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่สุกรเฉลี่ย 10.3 ตัว สูงกว่ากลุ่มควบคุม (8.5 ตัว) มีการสูญเสียของลูกสุกรต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (0.50 และ 0.75 ตามลำดับ) รวมทั้งลูกตายระหว่างคลอดและมัมมี่ นอกจากนั้นมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 1.47 กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (1.90 กก.) ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อสุกรเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นาน 5 วัน นำไปผสมเทียมสุกรแม่พันธุ์ทำให้ตั้งท้องได้และให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อที่ใช้ปกติ (เก็บรักษาไว้ 3 วัน)

5.2 คำนำ

ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เสริมในสารละลายน้ำเชื้อ ในบทที่ 4 พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM และ 0.50 mM มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสุกรดี ทั้งในส่วนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ซึ่งเก็บได้นาน 5 วัน (ปกติ 3 วัน) ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้เลือกใช้กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เสริมในสารละลายน้ำเชื้อ เนื่องจาก มีเปอร์เซ็นต์การ

เคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.50 mM เท่ากับ 52.59±19.63 และ 51.89±13.37% (กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mM ตามลำดับ) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ เท่ากับ 61.25±17.02 และ 62.29±15.50% ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่า 50% โดย Hafez and Hafez (2000) ได้มีการรายงานเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motile sperm, %) ในสุกร (boar) ในตารางที่ 2.6 มีค่า ≥50% นำไปใช้ในทางการผลิตต่อไปได้ การเลือกใช้ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เป็นการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันในสารละลายน้ำเชื้อในปริมาณที่ต่ำและมีราคาถูก ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมา ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพการนำน้ำเชื้อที่เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของแม่สุกรจากน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียม ในการศึกษานี้เลือกใช้ปัจจัยที่มาจากสารละลายน้ำเชื้อ โดยใช้สารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นสารละลายระยะสั้น (short-term extender) เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ให้ผลในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้นานมากกว่าปกติ (3 วัน) คือ กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น เก็บรักษาไว้ 5 วัน แล้วนำไปใช้ผสมเทียมให้กับแม่สุกร เพื่อศึกษาถึงอัตราการผสมติด (Conception rate) และจำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่สุกร (Litter size)

5.3 วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของประสิทธิภาพการนำน้ำเชื้อที่ได้รับการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ไปใช้ต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร โดยการศึกษาจากอัตราการผสมติด และจำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่พันธุ์

5.4 อุปกรณ์และวิธีการ

5.4.1 การจัดการทั่วไป สัตว์สำหรับการทดลอง

5.4.1.1 การจัดการสัตว์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสุกรสายพันธุ์ ลาร์จไวท์ (Large-white) และ แลนด์เรซ (Landrace) มีอายุอยู่ในช่วง 1-2 ปี สุกรพ่อพันธุ์ขังแยกเดี่ยว มีคอกขนาด 3x3 เมตร ภายในคอกมีจุ๊บน้ำให้กินได้ตลอดเวลาและรางอาหาร แสดงดังรูปที่ 3.1 โรงเรือนมีระบบละอองน้ำสเปรย์และพัดลมเพื่อช่วยลดอุณหภูมิภายในโรงเรือนเมื่อมีอากาศร้อน ควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ ถ้าอุณหภูมิภายในโรงเรือนร้อนเกินไประบบก็จะทำงาน (>25°C) โดยการสเปรย์ละอองน้ำและพัดลมทำงานร่วมด้วย เมื่ออุณหภูมิคงที่ก็หยุดทำงาน เพราะความร้อนมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ได้

สุกรแม่พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง สุกรแม่พันธุ์ภายในโครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 16 ตัว ลักษณะที่ใช้คัดเลือกคือ ลูกผสม มีลำดับการให้ลูก (parity) ท้องเฉลี่ย 2-4 ไม่มีประวัติการแท้ง หลังหย่านมจะจัดให้สุกรแม่พันธุ์ขังซองยืนหันหน้ามายังด้านที่มีสุกรพ่อพันธุ์ขังอยู่ เพื่อเป็นการกระตุ้นสุกรแม่พันธุ์ให้กลับสัดหลังหย่านม เมื่อสุกรแม่พันธุ์แสดงอาการเป็นสัดก็ทำการผสมเทียม และตรวจท้อง สุกรแม่พันธุ์ทุกตัวถูกเลี้ยงโดยการขังเดี่ยวในซองยืน จนกระทั่ง 1 สัปดาห์ ก่อนคลอดย้ายสุกรแม่พันธุ์ท้องแก่เข้ายังคอกคลอดรอจนคลอดและเลี้ยงลูกจนหย่านม

5.4.1.2 การจัดการอาหารสัตว์ทดลอง

การให้อาหารสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ยึดตามโปรแกรมการให้อาหารสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ ภายในโครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยปกติอาหารที่ให้มีโปรตีน 14% ให้กินวันละ 2 กิโลกรัม แบ่งเป็น 2 เวลา เช้า 8.30 น. และ เย็น 15.30 น. พร้อมทั้งโปรแกรมการฉีดวัคซีนต่าง ๆ ใช้ตามโปรแกรมการให้วัคซีนสุกรพ่อ - แม่พันธุ์[1] ภายในโครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เช่นกัน

5.4.1.3 การจัดการโปรแกรมรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ทดลอง

การรีดน้ำเชื้อถี่เกินไปจะทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อต่อการรีดแต่ละครั้งลดลง ในพ่อสุกรจะหลั่งอสุจิเป็นจำนวนมากต่อการรีดน้ำเชื้อแต่ละครั้ง ทำให้อสุจิที่สะสมในอิพิดิไดมิส (epididymis) หมดเร็ว สุกรพ่อพันธุ์ที่อายุ 1 ปีขึ้นไป ควรรีด 3 หรือ 4 วันต่อครั้ง แม้จะไม่มีแม่สุกรผสมควรรีดทิ้งเมื่อครบกำหนดระยะเวลา ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สุกรพ่อพันธุ์ 2 ตัว ตัวที่ 1 จะทำการรีดก่อนหย่านมสุกรแม่พันธุ์ที่ได้รับจัดกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ก่อนวันหย่านม 2 วัน และตัวที่ 2 จะทำการรีดน้ำเชื้อในวันที่หย่านม เพื่อให้ครบตามเวลาที่ได้กำหนดและเพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียมต่อไปในสุกรแม่พันธุ์ที่หย่าในแต่ละสัปดาห์

5.4.1.4 การแบ่งกลุ่มของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของการทดลอง

น้ำเชื้อสุกรที่นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อนั้นได้จากการเจือจางน้ำเชื้อสุกรเจือจางเพื่อตรวจ เริ่มตั้งแต่ การรีดเก็บน้ำเชื้อ และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสดสุกรก่อนการเจือจางดังภาคผนวก ก การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกรในส่วนของขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกรนั้นจะมีการเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารละลายโดยจะทำการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อแล้วใช้สารละลายน้ำเชื้อที่เตรียมไว้เจือจางกับน้ำเชื้อสดของสุกร ดังนี้

---

[1] ดูรายละเอียด ภาคผนวก ง โปรแกรมการถ่ายพยาธิและโปรแกรมวัคซีน, หน้า 108

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (สารละลายน้ำเชื้อ* + น้ำเชื้อสดของสุกร) เก็บรักษาไว้ 3 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน

โดยทั้ง 2 กลุ่ม มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร เก็บน้ำเชื้อไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 17°C และในที่มืด และมีการกลับหลอดน้ำเชื้อวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เพื่อป้องกันการติดกันส่วนของอะโครโซมที่หัวของอสุจิ

ก่อนนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมได้ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรคือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ และเช็คการเป็นสัดของสุกรแม่พันธุ์ให้แน่ใจว่า สุกรแม่พันธุ์พร้อมรับการผสมเทียม หรือเรียกว่า “เช็คนิ่ง” โดยการกดหลัง ขึ้นขี่หลัง สุกรแม่พันธุ์ไม่มีการกระวนกระวายหรือร้อง แสดงว่า สุกรแม่พันธุ์นั้นพร้อมรับการผสมเทียม

5.4.2 วิธีการทดลองและเก็บข้อมูล

การจัดกลุ่มสุกรแม่พันธุ์

จัดกลุ่มสุกรแม่พันธุ์ที่เป็นสัด เป็น 2 กลุ่มการทดลอง ทำการผสมเทียมให้สุกรแม่พันธุ์ โดยใช้น้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาไว้ในระยะเวลาต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 3 วัน และกลุ่มที่ 2 เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 5 วัน ทำการผสมเทียมสุกรแม่พันธุ์ตามจำนวนและลำดับท้องเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 จำนวนแม่สุกร ที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	จำนวนแม่พันธุ์ (ตัว)	ลำดับท้อง (เฉลี่ย)
กลุ่มควบคุม 3 วัน	6	3.83
กลุ่มเสริม Glutatione (0.25 mM) 5 วัน	10	2.70

การผสมเทียมสุกรแม่พันธุ์

การเตรียมแม่สุกร แม่สุกรหลังหย่านม 2 วัน จะทำการเริ่มเช็คสัด 2 ครั้งต่อวัน (เช้า 7.00 น. และเย็น 15.00 น.) โดยจะใช้พ่อพันธุ์เช็คสัดร่วมด้วยกับผู้ปฏิบัติงาน เมื่อมีการพบว่าแม่สุกรเป็นสัด ซึ่งจะแสดงอาการสนใจสุกรตัวผู้ที่ใช้ร่วมกับการตรวจสัดที่หน้าคอก และเมื่อผู้ปฏิบัติการ

* สูตร สารละลายน้ำเชื้อ บทที่ 3 ตารางที่ 3.1

กดหลังแม่สุกร ก็จะยืนนิ่ง แอ่นหลัง เมื่อกดหรือถูบริเวณข้างลำตัวจะตอบสนองต่อการกระทำนั้น ๆ ถ้ามีการตรวจพบอาการดังกล่าวใน ในเวลาเช้า จะทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 ในเวลาเย็น (15.00 น.) และครั้งที่ 2 จะผสมเทียมในตอนเช้า (7.00 น.) ของวันถัดไป

การเตรียมน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น น้ำเชื้อสุกรแช่เย็นก่อนนำไปใช้ผสมเทียมจะทำการตรวจคุณภาพ การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิก่อนนำไปผสมเทียม จะนำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นออกจากตู้ อุณหภูมิ 17 °C ออกมาวางภายนอกในห้องมืด นาน 15 นาที แล้วตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแบ่งน้ำเชื้อสุกรออกมา แล้วหยดน้ำเชื้อสุกรลงบนแผ่นสไลด์ที่อุ่น ประเมินค่าด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำเชื้อจะต้องมีคุณภาพที่สามารถนำไปผสมเทียมได้ เมื่อตรวจเช็คคุณภาพเรียบร้อยก็นำน้ำเชื้อนั้น ใส่กล่องทึบแสง เพื่อนำน้ำเชื้อเข้าไปผสมเทียมภายในฟาร์ม พร้อมท่อผสมเทียมที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

เมื่อมีการเช็คแม่สุกรและคุณภาพน้ำเชื้อเรียบร้อยแล้วจะมี ขั้นตอนการผสมเทียมปฏิบัติ ดังนี้

1) ล้างทำความสะอาดแม่สุกรด้วยน้ำสะอาด ก่อนทำการผสมเทียม โดยเฉพาะที่อวัยวะเพศให้สะอาด พร้อมปล่อยพ่อสุกรออกมาเดินที่หน้าคอกของแม่สุกร เพื่อกระตุ้นแม่สุกร

2) เมื่อล้างด้วยสะอาดเรียบร้อย จากนั้นล้างที่อวัยวะเพศ ด้วยน้ำกลั่นอีกรอบ แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระ

3) สอดท่อผสมเทียมผ่านทางอวัยวะเพศ ซึ่งเอียง 45 องศา เพื่อป้องกันปลายท่อผสมเทียมเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ แล้วหมุนเข้าตามเข็มนาฬิกา เมื่อท่อผสมเทียมเข้าไปถึงส่วนของคอมดลูก (cervix) จะล็อคเข้ากับส่วนปลายของปากมดลูก

4) นำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นตัดส่วนปลายแล้วต่อเข้ากับท่อผสมเทียม จากนั้นบีบน้ำเชื้อให้มีจังหวะที่สอดคล้องกับการบีบตัวของมดลูก ในระหว่างที่ปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่มดลูกให้ทำการกระตุ้นแม่สุกรร่วมด้วย เช่น กดสีข้าง กระตุ้นที่ต่อมคิสตรอริส

5) เมื่อน้ำเชื้อหมดให้ค้างท่อผสมเทียมไว้สักพักค่อยเอาออก โดยการหมุนออก ทวนเข็มนาฬิกา เนื่องจากคอมดลูก (cervix) มีลักษณะเป็นเกลียว และท่อผสมที่ใช้เป็นเกลียว หมุนทวนเข็มนาฬิกา เป็นการลดการบาดเจ็บจากการเอาท่อผสมออกจากอวัยวะสืบพันธุ์แม่สุกร

การผสมเทียมให้กับแม่สุกรควรจะทำก่อนการให้อาหาร และหลังจากผสมเทียมเสร็จก็ไม่ควรที่จะให้แม่สุกรนั่งหรือนอนทันที ป้องกันการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อหลังการผสม เนื่องจากการผสมเทียมไม่มีส่วนของเม็ดสาคู ปิดกั้นที่อวัยวะช่องคลอดหลังการผสม เหมือนการผสมจริงด้วยพ่อพันธุ์

การทดลองมีการเก็บบันทึกข้อมูล ดังนี้

5.4.2.1 เก็บข้อมูลอัตราการผสมติด (Conception rate)

ตรวจการกลับสัดของแม่สุกรว่ามีการกลับสัดของสุกรแม่พันธุ์หรือไม่ หลังการผสมเทียมสุกรแม่พันธุ์ 21 วัน (±2 วัน) โดยตรวจ เช้า-เย็น โดยปล่อยสุกรพ่อพันธุ์เดินหน้าคอกแล้วขึ้นขี่ กดหลัง ถูสีข้าง สุกรแม่พันธุ์ ถ้ามีลักษณะอาการ ร้อง กระวนกระวาย สนใจสุกรพ่อพันธุ์ เมื่อกดหลังจะนิ่ง แสดงว่า เกิดการกลับสัด ให้มีการจดบันทึก และทำการผสมเทียมให้อีกครั้ง หลังจากตรวจสัด 12 ชั่วโมง จนกระทั้งให้ได้สุกรแม่พันธุ์ตั้งท้องครบตามจำนวนในการทดลอง เนื่องจากตัวอ่อน (embryonic) จะมีการฝังตัวที่ปีกมดลูกในวันที่ 14 หลังจากได้รับการปฏิสนธิระหว่างไข่กับอสุจิ ซึ่งการทดสอบการผสมติดสามารถทำได้ตั้งแต่วันที่ 18-25 หลังจากทำการผสมเทียม ซึ่งมีความเชื่อมั่น 97% (Arthur, Noakes, Pearson, and Parkinson, 1996)

5.4.2.2 เก็บข้อมูลอัตราสุกรแม่พันธุ์เข้าคลอด

สุกรแม่พันธุ์จะตั้งท้องเป็นเวลา 114 วัน (±3 วัน) บันทึกจำนวนสุกรแม่พันธุ์ที่เข้าคอกคลอด ใน 1 สัปดาห์ก่อนกำหนดคลอด เพื่อเตรียมความพร้อมของสุกรแม่พันธุ์และเป็นการลดความเครียดก่อนการคลอด

5.4.2.3 เก็บข้อมูลจำนวนลูกแรกคลอด (Litter size) ต่อแม่สุกร

เมื่อสุกรแม่พันธุ์คลอด จดบันทึกข้อมูลจำนวนลูกแรกคลอด คือ ลูกมีชีวิต ลูกตายระหว่างคลอด ลูกมัมมี่ เป็นต้น

5.4.2.4 เก็บข้อมูลจำนวนลูกมีชีวิต

เมื่อแม่สุกรคลอด จดบันทึกข้อมูล ลูกมีชีวิต หลังการคลอดเสร็จของสุกรแม่พันธุ์ ซึ่งจะบันทึกในสุกรแม่พันธุ์ทุกตัวที่เข้าคลอด

5.4.2.5 เก็บข้อมูลน้ำหนักลูกสุกรแรกคลอด

หลังจากสุกรแม่พันธุ์คลอดลูกเสร็จ จนกระทั่งขับรกออกมาเรียบร้อย ให้นำลูกสุกรทั้งหมดนำมาชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักแรกคลอด (กก.) จนครบสุกรแม่พันธุ์ทั้งหมดของการทดลอง

5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of covariance; ANCOVA) ด้วยวิธี ด้วยวิธี multiple comparison

5.6 สถานที่ทำการทดลอง

โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ

อาคารเครื่องมือ 1, 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5.7 ระยะเวลาทำการทดลอง

วันที่ 31 ธันวาคม 2549 ถึง 16 กันยายน 2550 (หย่านมสุกรแม่พันธุ์ ชุดแรก หลังจากคลอดเลี้ยงลูกนาน 30 วัน เมื่อทำการหย่านม ทำการตรวจสอบการเป็นสัดทุกเช้า-เย็น จนกระทั้งทำการผสมเทียมชุดนั้น ๆ เสร็จ เมื่อผสมเทียมครบทุกตัวที่หย่านม ตรวจสัด 21 วัน หลังจากผสม ตรวจการเข้าคลอด ครบตามแผนการทดลอง)

5.8 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองในกลุ่มควบคุม เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 3 วัน ใช้แม่สุกรมีลำดับท้องเฉลี่ย 3.83 และกลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 5 วัน ใช้แม่สุกรมีลำดับท้องเฉลี่ย 2.70 (แสดงดังตารางที่ 5.1) จากเหตุผลของ Corrêa, Jr, Afonso, and Deschamps (2002) ได้ให้เหตุผลว่า แม่สุกรที่มีลำดับท้อง 2-4 เมื่อทำการผสมเทียม มีอัตราการเข้าคลอดสูงเฉลี่ย 83.33% ($P<0.01$) ซึ่งสูงกว่าแม่สุกรลำดับท้องแรก (50.0%) โดยมีความสอดคล้องกับ Thaker and Bilkei (2005) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการสูญเสียน้ำหนักตัวของแม่สุกรต่อประสิทธิภาพการให้ผลผลิตแม่สุกร พบว่า แม่สุกรที่มีลำดับท้อง 2-5 และมีการสูญเสียน้ำหนักตัว ต่ำกว่า 5% แต่ไม่เกิน 10% ในช่วงของการเลี้ยงลูก เมื่อทำการผสมเทียมให้กับกลุ่มแม่สุกร จะมีผลทำให้อัตราการเข้าคลอดสูง (78.9%) และระยะเวลาหลังจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัดพร้อมผสม (wean to estrus intervals) มีระยะเวลาที่สั้น (4.88 วัน) ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแม่สุกรลำดับท้องที่ 1 และมีลำดับท้องมากกว่า 5" ดังนั้นในแม่สุกรที่มีลำดับท้อง 2-5 จะมีระยะเวลาหลังจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัดพร้อมผสม (wean to estrus intervals) สั้น (<4 วัน) ซึ่งจะมีช่วงเวลาของการตกไข่ (estrus onset to ovulation) ยาวขึ้น เนื่องจากจะมีการเกิดการตกไข่ (ovulation) ในช่วงเวลาแสดงอาการเป็นสัดเมื่อเทียบกับปกติ คิดเป็นร้อยละ 70 (Garcia, Abad, and Kirkwood, 2007) และในแม่สุกรมีระยะเวลาหลังจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัดระยะเวลานานกว่าปกติ (>5 วัน) จะทำให้ระยะเวลาแสดงอาการเป็นสัดที่สั้น ยากต่อการสังเกตอาการหรือทำให้ไม่พบแสดงอาการเป็นสัดอาจผิดพลาดไม่ได้รับการผสมพันธุ์ในรอบการเป็นสัดนั้น ดังนั้นจึงมีความสำคัญมาก เพราะตัวอสุจิจะต้องเข้าไปรอภายในระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกร เพื่อให้เกิดปฏิสนธิกับไข่ ภายใน 8 ชั่วโมง ทั้งนี้ตัวอสุจิเมื่อเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์แม่สุกรจะมีอายุนาน 40 ชั่วโมง ต่างจากไข่มีอายุเพียง 8 ชั่วโมง

เท่านั้น หลังจากไข่ตกเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์แม่สุกร (Hunter, 1988a อ้างถึงใน Arthur et al., 1996) การใช้แม่สุกรที่มีลำดับท้อง 2-4 จึงง่ายต่อการสังเกตอาการเป็นสัดและมีระยะเวลาการตกไข่ที่นาน จึงเป็นผลดีต่อการผลิต จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of covariance; ANCOVA) ระหว่างลำดับท้องและการผสมติดของแม่สุกร ด้วยวิธี multiple comparison พบว่า การใช้แม่สุกรที่มีลำดับท้องต่างกัน ไม่ได้มีผลต่ออัตราการผสมติด ($P>0.6985$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ทั้งจากน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่ใช้ในปกติ เก็บรักษาไว้ 3 วัน และน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นเสริมกลูตาไธโอน เข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาไว้ยาวนาน 5 วัน เมื่อผสมเทียมกับแม่สุกร ดังแสดงในตารางที่ 5.2 จากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่า เมื่อนำน้ำเชื้อสุกรเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรนาน 5 วัน ผสมเทียมให้กับแม่สุกร มีอัตราการผสมติดร้อยละ 60 และในกลุ่มควบคุม เก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นไว้นาน 3 วัน มีอัตราการผสมติดร้อยละ 67 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งให้ผลที่ดีกว่างานวิจัยของ Mitchell and Doak (2004) ได้ทำการผสมเทียมในสุกร โดยการใช้น้ำเชื้อแช่เย็น ที่เก็บรักษาไว้นานกว่าปกติ (3 วัน) คือ 5 วัน ทำให้มีอัตราการผสมติดที่ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่เย็นเก็บรักษาในเวลาปกติ (3 วัน) โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5.2 ผลของการผสมเทียม ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

กลุ่มทดลอง	จำนวนแม่สุกร (ตัว)	อัตราการผสมติด (ร้อยละ)	สุกรเข้าคลอด (ร้อยละ)
ควบคุม เก็บรักษา 3 วัน	6	67 (4 ตัว)	100
เสริม Glutatione เก็บรักษา 5 วัน	10	60 (6 ตัว)	100

ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของแม่สุกรเมื่อได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ที่เก็บรักษาไว้ 3 วัน (กลุ่มควบคุม) และเก็บรักษาไว้นาน 5 วัน (กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM) ในสารละลายน้ำเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5.3 พบว่า กลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน มีจำนวนลูกแรกคลอดที่มากกว่ากลุ่มควบคุม เท่ากับ 10.33 และ 8.5 ตัว ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.7273$) และลูกมีชีวิตต่อคอกเฉลี่ย ในกลุ่มเสริม กลูตาไธโอน 0.25 mM มีจำนวนสูงกว่ากลุ่มควบคุม เท่ากับ 9.83 และ 7.5 ตัว ตามลำดับ ($P>0.7446$) โดยกลุ่มเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นาน 5 วัน มีจำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่เฉลี่ยและจำนวนลูกมีชีวิตต่อคอกเฉลี่ย ที่ใกล้เคียงกับ การทดลองของ Corrêa et al. (2002) ประสิทธิภาพของแม่สุกรช่วงต้นของการหย่านม ในแม่สุกรลำดับท้อง 2-4 จะมีลูกแรกคลอดเฉลี่ย

10.53 ตัวต่อแม่ และลูกมีชีวิตเฉลี่ย 9.97 ตัวต่อคอก และสอดคล้องกับ Thaker and Bilkei (2005) ในแม่สุกรลำดับท้อง 2-5 ที่มีการสูญเสียน้ำหนักตัวช่วงการเลี้ยงลูก 11-15% มีจำนวนลูกแรกคลอด 10.52 ตัวต่อแม่ และการศึกษาของ Garcia, Abad, and Kirkwood (2007) มีจำนวนลูกแรกคลอด 10.5 ตัวต่อแม่ ในแม่สุกรที่ให้ฮอร์โมน equine chorionic gonodotrophin (eCG) 600 IU และ porcine lutinizing hormone (pLH) 5 mg ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ $1.25x10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร ก่อนเวลาช่วงไข่ตก 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 5.3 ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของสุกรแม่พันธุ์

กลุ่มทดลอง	ลูกสุกรแรกคลอดต่อแม่ (ตัว)*	ลูกสุกรมีชีวิตต่อคอก (ตัว)*	น้ำหนักลูกต่อตัว (กก.)*	ลูกสุกรตายแรกคลอด (%)	ลูกสุกรตายมัมมี่ (%)
ควบคุม (3 วัน)	8.5 ±3.6	7.5 ±2.5	1.90 ±0.7	8.82	0
เสริมกลูตาไธโอน (0.25 mM) (5 วัน)	10.33 ±3.6	9.83 ±3.2	1.47 ±0.4	3.26	1.62

* Mean ± SD

5.9 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของการนำน้ำเชื้อสดของสุกรที่ได้รับการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ที่เก็บไว้ในระยะเวลายาวนานขึ้นต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์แม่สุกร โดยการนำกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เสริมในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น เก็บรักษาไว้นาน 5 วัน นำไปผสมเทียมให้กับแม่สุกร ที่มีลำดับท้องเฉลี่ย 2-4 ใช้ผสมเทียมแล้วทำให้สุกรเกิดการตั้งท้องได้ ซึ่งมีผลทำให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็นปกติเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม กลุ่มแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM มีประสิทธิภาพการให้ผลผลิตเฉลี่ยที่ดีกว่า ทั้งจำนวนลูกแรกคลอดต่อแม่ จำนวนลูกมีชีวิตต่อคอก นอกจากนั้นแล้วยังมีการสูญเสียลูกสุกรที่น้อยกว่าการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็นปกติทั่วไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมกลูตาไธโอนลงในสารละลายน้ำเชื้อ มีผลให้สามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไว้ได้นานกว่าปกติ สามารถใช้ผสมติดและให้ผลผลิตที่ดีในระดับที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตได้จริง

5.10 รายการอ้างอิง

Arthur, G. H., Noakes, D. E., Pearson, H., and Parkinson, T. J. (1996). **Veterinary reproduction and obstetrics 7th**. London, England: W.B. Saunders.

Corrêa, M. N., Jr, T. L., Afonso, J. A. B., and Deschamps, J. C. (2002). Reproductive performance of early-weaned female swine according to their estrus profile and frequency of artificial insemination. **Theriogenology**. 58: 103-112.

Garcia, J. C., Abad, M., and Kirkwood, R. N. (2007). Effect of sperm numbers and time of insemination relative to ovulation on sow fertility. **Anim Repod Sci**. 100: 397-401.

Hafez, B., and Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Farm Animal 7th Edition**. USA.

Heugten, E. V. (2000). Feeding recommendations for gestating sows. **Animal science facts; extension swine husbandry**. Carolina states university.

Mitchell, J. R. and Doak, G. A. (2004). **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle including information pertaining to goats, sheep, horses, swine, and other animal 9th**. New Jersey: Pearson education.

Santos, J. M. G., Wentz, I., Bortolozzo, F. P., Barioni, W., and Jr, T. L. (2004). Erly-weaned sows: altrenogest therapy, estrus, ovulation, and reproductive performance. **Anim ReprodSci**. 84: 407-413.

Thaker, N. Y. C. and Bilkei, G. (2005). Lactation weight loss influences subsequent reproductive performance of sows. **Anim Repod Sci**. 88: 309-318.

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งสารที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามินอี (α-thocopherol) วิตามินซี (ascorbic acid) ชาเขียว กรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (conjugated linoleic acis; CLA) สารสกัดดอกคำฝอย และกลูตาไธโอน (glutathione) โดยทำการเปรียบเทียบสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์และที่ได้จากธรรมชาติ ต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อจาก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ พบว่า

สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติไม่มีผลในการช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น แต่พบว่าสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ วิตามินอีและกลูตาไธโอนมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าทุกกลุ่มที่ทำการเสริม ทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัว ($P<0.05$) ในวันที่ 5 และ 6 ของการเก็บรักษา และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การเลือกใช้ชนิดของสารต้านการเกิดออกซิเดชันให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการให้ผลของคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ดี จึงได้นำมาหาระดับความเข้มข้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชันโดยชนิดที่คัดเลือกนำมาศึกษาต่อ พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM เก็บได้ยาวนาน 5 วัน มีคุณภาพน้ำเชื้อสุกรดีสามารถนำไปใช้ผสมเทียมได้

เมื่อเลือกใช้กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อเก็บรักษาไว้ยาวนาน 5 วัน แล้วนำไปผสมเทียมกับแม่สุกร โดยส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นมีสูตรทางเคมี ดังนี้ glucose 37 g, sodium bicarbornate 1.25 g, sodium citrate 6 g, EDTA 1.25 g, potassium chloride 0.75 g, streptomycin sulfate salt 1 g, penicillin G sodium salt 1000000 IU และ glutathione 0.25 mM ในน้ำกลั่น 1 ลิตร พบว่า สุกรแม่พันธุ์ที่ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM ลงในสารละลายน้ำเชื้อนั้นมีผลให้อัตราการผสมติดน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของแม่สุกร มีจำนวนลูกแรกคลอดและจำนวนลูกมีชีวิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมที่เก็บรักษาปกติ (3 วัน) นอกจากนี้ยังสูญเสียลูกสุกรต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บไว้ในเวลาปกติ

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การใช้สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ กลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

แล้วสามารถเก็บรักษาไว้นาน 5 วัน เมื่อใช้ผสมแล้วทำให้สุกรเกิดการตั้งท้องและมีผลผลิตที่ดีเหมือนกับการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เก็บรักษาไว้ 3 วัน

ข้อเสนอแนะ

การเสริมกลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM นี้จะมีผลดีต่อบริษัทที่ผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นขายให้แก่เกษตรกรฟาร์มขนาดเล็ก ทั้งตัวของบริษัทจะได้สารละลายที่มีต้นทุนต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดเก็บได้นาน (long-time extender) และส่งไปในฟาร์มที่ไกลจะได้เก็บได้นานทั้งที่คุณภาพน้ำเชื้อดี และดีแก่เกษตรกรคือน้ำเชื้อถึงมือเกษตรกรเมื่อเกิดผิดพลาดของการเช็คสัด ยังสามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ได้นานขึ้น

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกร

การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกร

สารละลายน้ำเชื้อ หรือ Extender คือสารละลายที่เกิดจากการนำเอาสารที่มีคุณสมบัติช่วยในการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ โดยสารเหล่านั้นจะต้องไม่ทำอันตรายตัวอสุจิ และสารดังกล่าวต้องมีคุณสมบัติช่วยยืดอายุของตัวอสุจิให้มีชีวิตนานขึ้น นอกจากจะทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตยาวนานขึ้น หลังจากที่รีดเก็บน้ำเชื้อจะพบว่า มีการเกิดกระบวนการสลาย (metabolic) เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา สารอาหารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อจะถูกใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแล้วสารละลายน้ำเชื้อต้องมีคุณสมบัติที่จะคงความสมบูรณ์ของตัวอสุจิไว้ได้อีกด้วย เพื่อรักษาความสามารถในการเข้าเจาะไข่เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิขึ้น จุดประสงค์หลักของการใช้สารละลายน้ำเชื้อก็เพื่อเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อให้มากขึ้นในการที่จะนำไปผสมกับแม่สุกรได้หลายแม่ ก่อนทำการรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม หรือการทดลองต้องมีการเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ ดังนั้นขั้นตอนนี้ก็มีส่วนสำคัญไม่น้อยกว่าขั้นตอนอื่น ซึ่งมีวิธีคิดดังนี้

ในกรณี การผสมเทียม ต้องทราบว่ามีแม่ที่เป็นสัดพร้อมรับการผสมกี่ตัว จะผสมเทียมให้แม่ละกี่ครั้ง ครั้งละกี่มิลลิลิตร ของน้ำเชื้อที่เจือจางและใช้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อเจือจางเท่าใด

ในฟาร์มทั่วไปจะใช้วิธีรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ได้เจือจางให้ได้ปริมาณที่จะผสมเทียมกับแม่พันธุ์ที่เป็นสัด โดยที่ไม่ต้องทิ้งน้ำเชื้อที่รีดได้

<u>วิธีการคำนวณ</u>

เมื่อทราบปริมาตรน้ำเชื้อเจือจางทั้งหมด จากสูตร

$$Vt = \frac{V_1(ml) \times N \times C_1}{C_2\left(3000 \times 10^6, 5000 \times 10^6, 10000 \times 10^6\right)}$$

เมื่อ $V_2 =$ ปริมาณสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้เจือจาง

ดังนั้น $V_2 = V_t - V_1$

เมื่อ $V_t =$ ปริมาณน้ำเชื้อเจือจางทั้งหมด

$V_1 =$ ปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่อโด๊ส ของน้ำเชื้อ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ ในช่วงเช้าก่อนการให้อาหาร โดยใช้บีกเกอร์พลาสติกมีผ้ากรองเม็ดสาคูน้ำเชื้อหรือเศษวัสดุต่าง ๆ ในระหว่างที่ทำการรีดน้ำเชื้อ เมื่อรีดเสร็จเอา

ส่วนที่ติดกับผ้ากรองออก แล้วนำบีกเกอร์น้ำเชื้อใส่กระติกน้ำแข็ง (ภาชนะทึบแสง) ขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อได้ ดังนี้

น้ำเชื้อมีปริมาตร เท่ากับ 235 มิลลิลิตร

การเคลื่อนที่แบบหมู่ ระดับ 4 คิดเป็นการเคลื่อนที่ร้อยละ 85

มีค่าความเป็นกรด- ด่าง 7.30

น้ำเชื้อมีความหนืดลักษณะคล้าย น้ำนม (Milky)

วัดความเข้มข้นของน้ำเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer มีค่า %T เท่ากับ 19 อ่านค่าจากตาราง %T เท่ากับ 1410.42 (x 10^6)/ml

เมื่อต้องการความเข้มข้นน้ำเชื้อ เท่ากับ 30 (x 10^6)/ml จะต้องเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ และปริมาตรที่เจือจาง เท่าไร

<u>วิธีคิด</u> จากสูตร $V_t = \dfrac{V_1(ml) \times N \times C_1}{C_2\left(3000 \times 10^6, 5000 \times 10^6, 10000 \times 10^6\right)}$

เมื่อ $V_1 =$ ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ เท่ากับ 235 ml

$C_1 =$ ค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่รีดได้ เท่ากับ 1410.42 (x 10^6)/ml

$C_2 =$ ค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสม มีค่าเท่ากับ 30 (x 10^6)/ml

$N =$ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 80%

$V_t =$ ปริมาตรน้ำเชื้อทั้งหมดหลังการเจือจางด้วยความเข้มข้นที่ต้องการ

$1Dose = 100ml$

จะได้ว่า

$$V_t = \frac{235(ml) \times 80(\%) \times 1410.42(10^6)}{\left(3000 \times 10^6\right)}$$

$$V_t = 8838.632 \approx 8838ml$$

ดังนั้น

$$V_2 = V_t - V_1$$
$$= 8838 - 235$$
$$= 8603$$

จะต้องเตรียมสารละลายน้ำเชื้อที่จะต้องเจือจางน้ำเชื้อที่รีดมาได้ เท่ากับ 8603 มิลลิลิตร # และจะสามารถผสมกับแม่พันธุ์ได้จำนวน 43 แม่ ๆ ละ 2 โด๊ส ๆ ละ 100 มิลลิลิตร ##

ภาคผนวก ข

การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกร

การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกร

การเก็บน้ำเชื้อเป็นวิธีการที่จะได้ของน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ เพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อว่ามีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ได้หรือไม่ ประโยชน์ของการเก็บน้ำเชื้อสามารถตรวจความสมบูรณ์ทางเพศของสุกรพ่อพันธุ์ ตรวจโรคทางพันธุกรรมและการสืบพันธุ์บางอย่าง และงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาและวิจัยคุณลักษณะของตัวอสุจิและน้ำเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งการนำไปใช้ในการผสมเทียม การเก็บน้ำเชื้อเป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งต้องกระทำอย่างถูกต้องและเหมาะสม ทั้งความถี่ในการรีดน้ำเชื้อจากสุกรพ่อพันธุ์ การเตรียมความพร้อมของสุกรพ่อพันธุ์ก่อนรีดน้ำเชื้อ และเทคนิคการรีดน้ำเชื้อ เพื่อที่จะได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่สุด และสามารถนำไปใช้งานได้

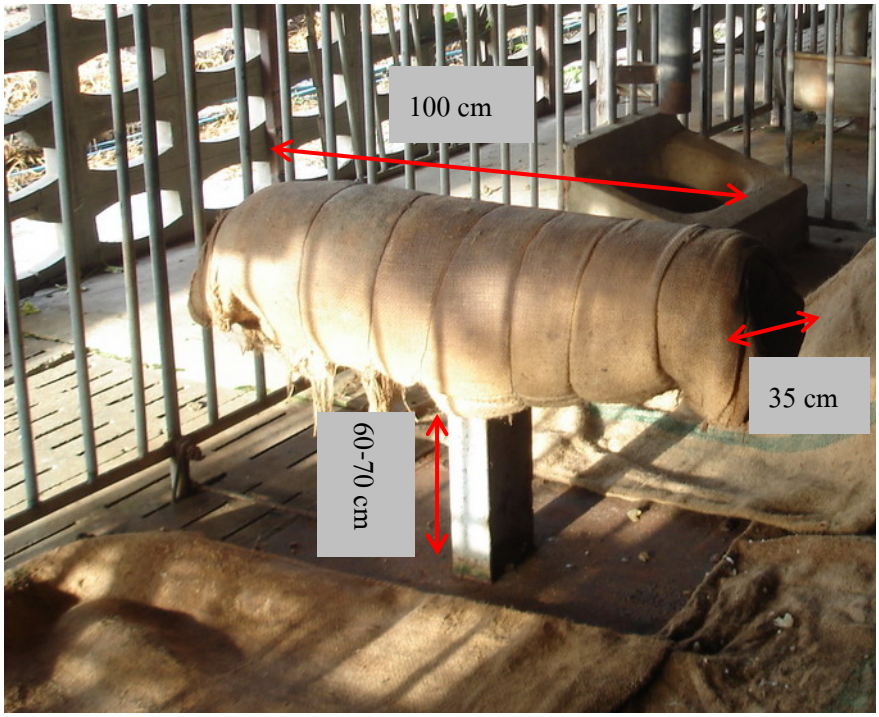
ในขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อจำเป็นต้องมีตัวล่อให้สุกรพ่อพันธุ์ขึ้นทับซึ่งเป็นหุ่น (dummy) ที่ทำด้วยวัสดุแข็งแรง มั่นคง สามารถรองรับน้ำหนักสุกรพ่อพันธุ์ได้ ด้านที่เป็นหลังหุ้มด้วยกระสอบ (ภาพที่ 1.ข) โดยจะยึดอยู่กับที่ การฝึกสุกรพ่อพันธุ์ให้ขึ้นทับหุ่นต้องฝึกตั้งแต่เริ่มเข้าสู่วัยหนุ่มและไม่เคยผสมจริงมาก่อน โดยให้สุกรพ่อพันธุ์มาใกล้ชิดกับหุ่นทุกวันจนชินและสนใจตัวล่อ และค่อย ๆ หัดให้ขึ้นทับหุ่นจนชำนาญและหลั่งน้ำเชื้อได้

ความถี่ในการรีดน้ำเชื้อจากสุกรพ่อพันธุ์เป็นเรื่องที่ต้องคำนึงถึง การรีดน้ำเชื้อถี่เกินไปจะทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อต่อการรีดแต่ละครั้งลดลง ในสุกรพ่อพันธุ์จะหลั่งอสุจิเป็นจำนวนมากต่อการรีดน้ำเชื้อแต่ละครั้ง ทำให้อสุจิที่สะสมในอิพิดิไดมิส (epididymis) หมดเร็ว สุกรพ่อพันธุ์ที่อายุ 1 ปีขึ้นไป ควรรีด 3 หรือ 4 วันต่อครั้ง แม้จะไม่มีแม่สุกรผสมก็ควรรีดทิ้งเมื่อครบกำหนดระยะเวลา เพื่อให้คุณภาพของตัวอสุจิดีสม่ำเสมอ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สุกรพ่อพันธุ์จำนวน 3 ตัว แบ่งการใช้สุกรพ่อพันธุ์ดังนี้ การทดลองที่ 1 สุกรพ่อพันธุ์ เบอร์ 24-I2801 โปรแกรมการรีดจะทำการรีดอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ส่วนการทดลองที่ 2 ใช้สุกรพ่อพันธุ์ จำนวน 2 ตัว ได้แก่ เบอร์ 27-100140 และ เบอร์ 27-1-100140

ตารางที่ 1.ข ประวัติสุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัย

เบอร์พ่อพันธุ์	วัน-เดือน-พ.ศ. เกิด	เบอร์พ่อ	เบอร์แม่	สายพันธุ์	มาจาก
24-I2801	22-08-2546	K4820	Y6141	LW	TDM
27-100140	27-10-2548	158063	8901	LW	Finnor-asai
27-1-100140	27-10-2548	158063	8901	LW	Finnor-asai

การจัดการทั่วไปของสุกรพ่อพันธุ์ มีความสำคัญเป็นอย่างมากซึ่งมีอยู่ 2 ปัจจัย คือ 1) การจัดการด้านเรื่องอาหารและการให้อาหาร เป็นปัจจัยที่สำคัญและจำเป็นมาก เพื่อให้ได้สุกรพ่อพันธุ์ที่มีร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ การได้รับอาหารคุณภาพดีและปริมาณที่เหมาะสม ตลอดจนการออกกำลังกายสม่ำเสมอก็จะส่งผลให้การใช้งานของสุกรพ่อพันธุ์นั้นมีคุณภาพดี การให้อาหารสุกรพ่อพันธุ์ยึดตามโปรแกรมการให้อาหารสุกรพ่อ - แม่พันธุ์ ภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โครงการสุกร โดยอาหารที่ให้มีโปรตีน 14% ให้กินวันละ 2 กิโลกรัม แบ่งเป็น 2 เวลา เช้า 8.30 น. และ เย็น 15.30 น. พร้อมทั้งโปรแกรมการฉีดวัคซีนต่าง ๆ ใช้ตามโปรแกรมการให้วัคซีนสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ ภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โครงการสุกรเช่นกัน 2) การจัดการด้านโรงเรือน เนื่องจากโรงเรือนที่ใช้เป็นโรงเรือนเปิดและใช้ร่วมกับโรงเรือนแม่พันธุ์ ดังนั้นจึงมีการจัดวางตำแหน่งสุกรพ่อพันธุ์ไว้ใกล้กับแม่พันธุ์รอการผสมและสุกรสาว สุกรพ่อพันธุ์ขังแยกเดี่ยวแต่ผนังคอกไม่ทึบสามารถมองเห็นสุกรพ่อพันธุ์ข้างเคียงเป็นคอกที่มีขนาด 3x3 เมตร ภายในคอกมีจุ๊บน้ำให้กินได้ตลอดเวลาและรางอาหาร และโรงเรือนมีระบบละอองน้ำสเปรย์และพัดลม เพื่อช่วยลดอุณหภูมิโรงเรือนเมื่อมีอาการร้อน ซึ่งควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ ถ้าอุณหภูมิภายในโรงเรือนร้อนเกินไประบบก็จะทำงาน โดยให้มีการสเปรย์ละอองน้ำและพัดลมทำงานด้วยเช่นกัน เมื่ออุณหภูมิคงที่ก็หยุดทำงาน เพราะความร้อนมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรได้



ภาพที่ 1.ข หุ่น (dummy) ที่ใช้ให้พ่อสุกรขึ้นทับในการเก็บน้ำเชื้อ

วิธีการเก็บน้ำเชื้อสุกรแบบการเก็บน้ำเชื้อโดยใช้มือ (Grove-hand method)

วิธีนี้ปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดเพราะง่ายและไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษเพียงแต่ใช้มือของผู้ปฏิบัติงาน การเก็บโดยวิธีนี้ใช้มือด้านที่ถนัดใส่ถุงมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อสุกรพ่อพันธุ์ขึ้นทับตัวล่อ และทันทีที่ลึงค์ยื่นออกมา ให้กำส่วนปลายลึงค์ที่เป็นเกลียวสว่านให้แน่น เว้นส่วนปลายลึงค์ไว้ (ภาพที่ 2.ข) หลังจากนั้นกระตุ้นให้สุกรหลั่งน้ำเชื้อโดยบีบรัดเป็นจังหวะ น้ำเชื้อสุกรที่หลั่งจะแบ่งออกเป็น 3 ช่วง น้ำเชื้อช่วงแรกจะมีลักษณะใสและอาจมีเม็ดสาคูปนบ้าง ส่วนนี้จะมีตัวอสุจิน้อยและมีเชื้อจุลินทรีย์ปะปน ดังนั้นจึงควรรีดทิ้งไป น้ำเชื้อในช่วงที่สองจะมีส่วนขาวขุ่นและมีตัวอสุจิมากเป็นน้ำเชื้อที่ต้องการ โดยรีดเก็บน้ำเชื้อเข้าในภาชนะที่เตรียมไว้ น้ำเชื้อช่วงสุดท้ายจะเป็นน้ำใสมีเม็ดสาคูมากซึ่งจะถูกเก็บเอาไว้ด้วย โดยเม็ดสาคูที่ไม่ต้องการจะติดค้างอยู่บนผ้ากรอง ผู้ที่จะทำการรีดสุกรพ่อพันธุ์ควรตัดเล็บมือให้สั้นและมีความชำนาญ หรือควรได้รับการฝึกฝนสมควร (ภาพที่ 3.ข)

ภาพที่ 2.ข การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์โดยการใช้มือ

ภาพที่ 3.ข การจับลึงค์เพื่อรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อสุกร

ในการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรต้องมีอุปกรณ์ที่ใช้ดังนี้

1) ตัวล่อ (dummy) ขนาดของตัวล่อควรใช้ตัวที่มีขนาดใกล้เคียงกับตัวพ่อสุกรที่จะรีดน้ำเชื้อ

2) โยนีเทียมหรือมือเปล่า ถ้าใช้มือเปล่าต้องสวมถุงมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3) ขวดหรือกระบอกเก็บน้ำเชื้อ ควรเป็นขวดสีชาหรือทึบแสง ปากขวดมีผ้าขาวบางไว้สำหรับกรองเม็ดสาคูและควรมีขนาดบรรจุไม่ต่ำกว่า 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร พร้อมควรมีหูจับกระบอกเก็บด้วยจะสะดวกยิ่งขึ้น

4) กระติกใส่น้ำเชื้อสุกรที่รีดเก็บ (กล่องทึบกันแสง)

ภาคผนวก ค

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรก่อนการเจือจาง

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการเจือจาง

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรมีความสำคัญอย่างยิ่ง น้ำเชื้อที่ได้จากการรีดเก็บจะถูกนำมาตรวจคุณภาพในห้องปฏิบัติการทันที โดยต้องระวังไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และไม่ถูกแสงแดด ผลการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจะบอกได้ว่าน้ำเชื้อที่รีดได้สมควรนำไปใช้หรือไม่ นอกจากนี้การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อยังมีประโยชน์ในด้านอื่นด้วย ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

ก) เพื่อตรวจและประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ของสุกรพ่อพันธุ์แต่ละตัว

ข) เพื่อตรวจดูความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ที่อาจเกิดจากโรคหรือความผิดปกติอื่น

ค) เพื่อตรวจสอบเทคนิคการรีดน้ำเชื้อและการเก็บรักษาน้ำเชื้อว่าดีพอหรือไม่

ง) เพื่อตรวจสอบว่าสมควรนำน้ำเชื้อไปใช้งานในการผสมเทียมหรือไม่

การตรวจและการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็นด้วยตาเปล่า 2) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และ 3) การตรวจโดยวิธีพิเศษ เช่น การตรวจเพาะเชื้อแบคทีเรียในน้ำเชื้อ การตรวจโรคแท้งติดต่อโดยใช้น้ำเชื้อ เป็นต้น ตามปกติน้ำเชื้อจะถูกตรวจสอบโดย 2 ขั้นตอนแรกเท่านั้น ส่วนการตรวจสอบโดยพิเศษจะกระทำในรายที่สงสัยเป็นกรณี ๆ ไป การแสดงค่ามาตรฐานของลักษณะต่าง ๆ ของน้ำเชื้อที่พบในตำราหรือเอกสารทางวิชาการต่าง ๆ อาจแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับ พันธุ์สัตว์ สภาพการเลี้ยงสัตว์ ผู้กำหนดและสถาบันที่กำหนดค่ามาตรฐานเหล่านั้น

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า ซึ่งจะทำก่อนที่จะมีการเจือจางน้ำเชื้อหลังจากที่มีการรีดเสร็จ ดังวิธีการต่อไปนี้

การตรวจวัดปริมาตร (volume)

การตรวจวัดปริมาตรน้ำเชื้อจะทำทันที โดยการตวงวัดจากน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ และไม่รวมเม็ดสาคู ปริมาตรที่วัดได้เป็นค่าที่บันทึกไว้ น้ำเชื้อของพ่อสุกรแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1) ส่วนที่เป็นเม็ดสาคู (gelationous)

2) ส่วนที่เป็นน้ำใส ๆ (pre-sperm fraction)

3) ส่วนที่เป็นน้ำขาวขุ่น (sperm-rich fraction)

ในการรีดแต่ละครั้งจะได้น้ำเชื้อเฉลี่ยประมาณ 200 - 250 มิลลิลิตร โดยมากจะเก็บน้ำเชื้อที่มีสีขาวขุ่นเท่านั้น ส่วนที่เป็นเม็ดสาคูและน้ำใส ๆ จะไม่เอา ปริมาตรของน้ำเชื้อจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ สุขภาพของพ่อพันธุ์ อายุ วิธีการเก็บน้ำเชื้อ สภาพแวดล้อมและการเลี้ยงดู และความถี่ของการรีดน้ำเชื้อ (Hafez and Hafez, 2000, p.365; ทัศนีย์ อภิชาติสรางกูร, 2544, หน้า 227; อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, 2545, หน้า 246; ปาริฉัตร สุขโต, 2544, หน้า 193) การตรวจวัดปริมาตรจะใช้

กระบอกตวง (graduated cylinder) หรือเครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล ซึ่งการทำวิจัยในครั้งนี้ใช้กระบองตวงในการวัดปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาได้และใช้ในการตวงปริมาตรของน้ำเชื้อพ่อสุกรผสมกับสารเจือจางน้ำเชื้อสุกร

การตรวจวัดความหนืด (consistency)

โดยการดูลักษณะด้วยตาเปล่าพร้อมกับการใช้แท่งแก้วแตะสัมผัสที่น้ำเชื้อ การดูความหนืดของน้ำเชื้อที่รีดได้ มีการแบ่งระดับคะแนนดังต่อไปนี้

0 Clear (watery) หมายถึง น้ำเชื้อที่ไม่มีความหนืด ลักษณะคล้ายน้ำ เป็นน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อยมาก มีจำนวนตัวอสุจิรวมทั้งหมดน้อย

1 Cloudy หมายถึง น้ำเชื้อที่มีลักษณะทึบ ไม่ใส เป็นน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ จำนวนของอสุจิทั้งหมดประมาณ 0.3–1.0 (x 10^9) ตัว

2 Milky หมายถึง น้ำเชื้อที่มีลักษณะคล้ายน้ำนมมีความหนืดเพิ่มขึ้น สามารถนำน้ำเชื้อระดับนี้เพื่อการเก็บรักษาและนำไปใช้ได้ จำนวนของอสุจิทั้งหมดประมาณ 1.0–2.5 (x 10^9) ตัว

3 Thin creamy หมายถึง น้ำเชื้อที่มีลักษณะคล้ายครีมมีความหนืดเล็กน้อย เป็นน้ำเชื้อที่อยู่ในขั้นดีมีความเข้มข้นของตัวอสุจิ และจำนวนอสุจิทั้งหมดสูงประมาณ 2.5–3.5 (x 10^9) ตัว

4 Creamy หมายถึง น้ำเชื้อที่มีลักษณะคล้ายครีมมีความหนืดปานกลาง เป็นน้ำเชื้อที่อยู่ในขั้นดีมีความเข้มข้นของตัวอสุจิ และจำนวนอสุจิทั้งหมดสูงประมาณ 3.5–4.5 (x 10^9) ตัว

5 Thick creamy หมายถึง น้ำเชื้อที่มีลักษณะความหนืดสูงมาก มีความเหนียวคล้ายกาว เป็นน้ำเชื้อที่มีปริมาตรต่ำ มีความเข้มข้นสูง จำนวนอสุจิทั้งหมดสูงประมาณ 4.5–6.0 (x 10^9) ตัว

ตามปกติน้ำเชื้อพ่อสุกรจะไม่ค่อยข้นนักจะค่อนข้างคล้ายน้ำนม (milky) มีความเข้มข้นประมาณ 6–10 (x 10^8) ตัว (Hafez and Hafez, 2000, p. 368; ทัศนีย์ อภิชาติสรางกูร, 2544, หน้า 228; อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, 2545, หน้า 247; ปาริฉัตร สุขโต, 2544, หน้า 194)

การตรวจดูสี (color)

โดยการสังเกตดูสีของน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จะมีสีที่แตกต่างกัน แบ่งได้ 3 ระดับคือ

ระดับที่ 1 เป็นสีเทาใส (transparent grey) เป็นลักษณะของน้ำเชื้อที่มีสีเทาใสเล็กน้อย มีคุณภาพน้ำเชื้อพอใช้ได้

ระดับที่ 2 เป็นสีเทาเข้ม (evident grey) เป็นลักษณะน้ำเชื้อที่มีสีเทาขุ่นเข้ม มีคุณภาพน้ำเชื้อดีมาก เป็นน้ำเชื้อในระดับที่พิจารณาใช้ในการเก็บรักษาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

ระดับที่ 3 สีขาวเข้มหรือสีขาวเหลือง (strongy white, yellowish white) เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาก พอ ๆ กับน้ำเชื้อที่มีสีเทาเข้ม

ตามปกติสีของน้ำเชื้อสุกรจะเป็นสีขาว อาจจะปนเหลืองเล็กน้อย การตรวจสอบสีจะบอกได้ว่ามีความผิดปกติอื่น ๆ ปนมาหรือไม่ เช่น ถ้าหากมีเลือดปนมาในน้ำเชื้อ สีอาจเปลี่ยนเป็นแดงน้ำตาล และถ้ามีหนองปนอาจจะเป็นสีเหลืองเขียว (แยกจากน้ำเชื้อที่มีปัสสาวะปนโดยการดมกลิ่น) หรือถ้ามีสิ่งสกปรก เช่น ดินปะปนมาอาจเป็นสีเทาน้ำตาล ดังนั้นการดูสีและบันทึกไว้จะบอกได้ว่าน้ำเชื้อที่รีดมีอะไรปลอมปนมาด้วยหรือไม่ (ทัศนีย์ อภิชาติสรางกูร, 2544, หน้า 227; อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, 2545, หน้า 247)

การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อสุกร โดยการใช้แท่งแก้วแตะเอาส่วนของน้ำเชื้อมาหยดลงบนกระดาษลิตมัสแล้วเทียบสี หรือใช้เครื่องวัด pH meter วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของน้ำเชื้อสุกร และน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ดีหลังจากการรีดควรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 7.0-7.8 การที่ pH ต่ำจะทำให้ความเคลื่อนไหวช้าลง หรือถ้าน้ำเชื้อมีสภาพความเป็นกรด แสดงถึงสภาพที่มีการทำลายเซลล์หรือการสูญเสียของเซลล์ เนื่องจากการติดเชื้อของอวัยวะสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อทำให้เปลี่ยนสภาพของน้ำเชื้อเป็นกรดได้ (ทัศนีย์ อภิชาติสรางกูร, 2544, หน้า 228; ปาริฉัตร สุขโต, 2544, หน้า 194; อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, 2545, หน้า 247)

การตรวจวัดการเคลื่อนที่หมู่ (mass movement)

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสดที่พึ่งรีดเก็บมาใหม่ ๆ จะตรวจการเคลื่อนไหวแบบกลุ่ม ซึ่งจะทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า (40X) โดยการหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์อุ่น ๆ (อุณหภูมิ 35-37°C) แล้วทำ การประเมินการเคลื่อนไหวแบบกลุ่ม ซึ่งออกเป็น 4 ระดับ (Mitchell และ Doak, 2004) ได้แก่

0 จะพบตัวอสุจิพลิกไปพลิกมาอยู่กับที่ บางตัวเท่านั้นจะมีแนวโน้มไม่เคลื่อนไหว

+ ตัวอสุจิเกาะเป็นกลุ่ม ๆ มากขึ้น และมีการเคลื่อนไหวเป็นคลื่นไปข้างหน้ามาก

++ มีการเคลื่อนไหวให้เห็น แต่ไม่รุนแรงเหมือนกับระดับ +++ จะมองเห็นตัวอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่ม ๆ

+++ น้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูง ตัวอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่ม ๆ มีความเคลื่อนไหวอย่างเร็วของตัวอสุจิ หมุนวนคล้ายพายุไซโคลน

การตรวจวัดความเข้มข้นของน้ำเชื้อสุกร

โดยการใช้เครื่องวัดความขุ่น (spectrophotometer method) เพื่อประมาณค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่รีดได้ และนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่อโดส ของน้ำเชื้อที่จะเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ มีขั้นตอนการวัดความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่รีดได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer 254 ดังนี้

1) เปิดเครื่อง spectrophotometer ก่อนวัด 15 นาที

2) ปรับความยาวคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร และปรับปุ่มไปที่การอ่านค่า % Transmitance (%T) ตั้งค่าให้ได้เท่ากับ 100% (set bank โดยใช้ Tri sodium citrate 2.5 ml ปรับค่า %T)

3) ผสมน้ำเชื้อสุกร 0.1 ml ต่อTri Sodium Citrate 3% 2.4 ml ในหลอด Test tube โดยใส่น้ำเชื้อลง test tube ก่อนนำ Tri sodium citrate ตามลงไป

4) เอาหลอดตามข้อ 3. ใส่ลงในช่องวัดแสง รอ 15 วินาที อ่านค่า %T

5) นำค่า %T ที่อ่านได้ไปเทียบกับตารางที่ 1.ข จะได้ค่า Diluting Factor

6) นำค่า Diluting Factor มาคูณกับปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้จริง ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำเชื้อทั้งหมดหลังจากเติม Diluter แล้ว โดยสุดท้ายน้ำเชื้อที่ได้จะมีความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ 30 ล้านตัวต่อ 1 มิลลิลิตร (ml)

น้ำเชื้อสดของสุกรที่รีดได้นั้นหลังจากทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเจือจางน้ำเชื้อ ด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเป็นการรักษาความสมดุลของตัวอสุจิระหว่างเก็บรักษาและเป็นเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ (Hafez and Hafez, 2000, p.367; อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, 2545, หน้า 249)

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ที่ใช้ในการการทดลองและการผสมเทียม

จากสูตร

$$V_t = \frac{V_1(ml) \times N \times C_1}{C_2\left(3000\times10^6, 5000\times10^6, 10000\times10^6\right)}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้

V_t = ปริมาตรน้ำเชื้อทั้งหมดหลังการเจือจางด้วยความเข้มข้นที่ต้องการ

C_1 = ค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่รีดได้

C_2 = ค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสม มีค่าเท่ากับ

$3000\times10^6\ cell$ หรือ $5000\times10^6\ cell$ หรือ $10000\times10^6\ cell$

N = เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

<u>หมายเหตุ</u> $1Dose = 100ml$ ปริมาตรน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียม 1 ครั้ง

ตารางที่ 1.ค ค่าความเข้มข้นของตัวอสุจิสุกรจากเครื่อง COLORIMETER 254 SHERWOOD

T%	CONC.($x10^6$)	%T	CONC.($x10^6$)	T%	CONC.($x10^6$)	T%	CONC.($x10^6$)
0	2110.91	12.5	1633.83	25	1219.19	37.5	867.01
0.5	2090.62	13	1616.04	25.5	1203.91	38	854.22
1	2070.44	13.5	1598.36	26	1188.72	38.5	841.53
1.5	2050.36	14	1580.77	26.5	1173.63	39	828.94
2	2030.38	14.5	1563.29	27	1158.65	39.5	816.45
2.5	2010.49	15	1545.9	27.5	1143.76	40	804.06
3	1990.71	15.5	1528.62	28	1128.97	40.5	791.77
3.5	1971.03	16	1511.43	28.5	1114.29	41	779.58
4	1951.45	16.5	1494.35	29	1099.7	41.5	767.5
4.5	1931.36	17	1477.36	29.5	1085.21	42	755.51
5	1912.58	17.5	1460.48	30	1070.82	42.5	743.62
5.5	1893.3	18	1443.69	30.5	1056.54	43	731.83
6	1874.11	18.5	1427.01	31	1042.35	43.5	720.14
6.5	1855.03	19	1410.42	31.5	1028.26	44	708.55
7	1836.05	19.5	1393.64	32	1014.27	44.5	697.06
7.5	1817.16	20	1377.55	32.5	1000.39	45	685.67
8	1798.38	20.5	1361.27	33	986.6	45.5	674.38
8.5	1779.7	21	1345.08	33.5	972.91	46	663.19
9	1761.11	21.5	1329	34	959.32	46.5	652.1
9.5	1742.63	22	1313.01	34.5	945.84	47	641.11
10	1724.25	22.5	1297.12	35	932.45	47.5	630.22
10.5	1705.96	23	1281.34	35.5	919.16	48	619.43
11	1687.78	23.5	1265.65	36	905.97	48.5	608.74
11.5	1669.69	24	1250.07	36.5	892.88	49	598.15
12	1651.71	24.5	1234.58	37	879.9	49.5	587.66

ตารางที่ 1.ค (ต่อ) ค่าความเข้มข้นของตัวอสุจิสุกรจากเครื่อง COLORIMETER 254 SHERWOOD

T%	CONC.(x10^6)	%T	CONC.(x10^6)	T%	CONC.(x10^6)	T%	CONC.(x10^6)
50	577.27	62.5	349.98	75	185.13	87.5	82.73
50.5	566.98	63	342.18	75.5	179.83	88	79.93
51	556.79	63.5	334.49	76	174.64	88.5	77.24
51.5	546.7	64	326.9	76.5	169.54	89	74.64
52	536.7	64..5	319.4	77	164.55	89.5	72.14
52.5	526.81	65	312.01	77.5	159.65	90	69.74
53	517.02	65.5	304.72	78	154.86	90.5	67.45
53.5	507.33	66	297.52	78.5	150.16	91	65.25
54	497.74	66.5	290.43	79	145.57	91.5	63.15
54.5	488.25	67	283.44	79.5	141.07	92	61.15
55	478.86	67.5	276.54	80	136.68	92.5	5926
55.5	497.57	68	269.75	80.5	132.38	93	57.46
56	460.37	68.5	263.06	81	128.18	93.5	55.76
56.5	451.28	69	256.46	81.5	124.09	94	54.16
57	442.29	69.5	249.67	82	120.09	94.5	52.66
57.5	433.4	70	243.57	82.5	116.2	95	51.27
58	424061	70.5	237.28	83	112.4	95.5	49.97
58.5	415.91	71	231.09	83.5	108.7	96	48.77
59	407.32	71.5	224.99	84	105.11	96.5	47.67
59.5	398.83	72	219	84.5	101.61	97	46.67
60	390.44	72.5	213.1	85	98.22	97.5	45.77
60.5	382.15	73	207.31	85.5	94.92	98	44.98
61	373.95	73.5	201.61	86	91.72	98.5	44.28
61.5	365.86	74	196.02	86.5	88.62	99	43.68
62	357.87	74.5	190.52	87	85.63	99.5	43.18

ตารางที่ 1.ค (ต่อ) ค่าความเข้มข้นของตัวอสุจิสุกรจากเครื่อง COLORIMETER 254 SHERWOOD

T%	**CONC.($x10^6$)**
100	42.78

หมายเหตุ T% (transmittance) หมายถึง เปอร์เซ็นต์ความสามารถของแสงผ่านวัตถุนั้น มีค่า 0-100

CONC. (concentration) หมายถึง ความเข้มข้นของตัวอสุจิใน 0.1 มิลลิลิตร

COLORIMETER 254 SHERWOOD, Serial No. 7568 Date 9626, Voltage 12 VDC, Current 300 mA, Weight 2.2 kg. Sherwood Scientific Ltd., Cambridge UK., CB4 4FZ, Made in UK.

ภาคผนวก ง

การเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร

การเจือจางน้ำเชื้อสดของสุกร (อ้างใน ปาริฉัตร สุขโต, 2544, หน้า 200)

การเจือจางน้ำเชื้อจะทำได้หลังจากที่มีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ก่อนการเจือจางเท่านั้น เพื่อให้สามารถนำน้ำเชื้อหลังเจือจางไปใช้ต่อไปได้ ซึ่งมีขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1) เตรียมกระบอกรีดน้ำเชื้อ โดยจะใช้ผ้าขาวบางกรองที่ปากกระบอกเพื่อกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเชื้อไม่รวมเม็ดสาคู

2) เตรียมสารละลายน้ำเชื้อ โดยจะใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบทางเคมี ประกอบด้วย glucose 37 g, sodium bicarbornate 1.25 g, sodium citrate 6 g, EDTA 1.25 g, potassium chloride 0.75 g, streptomycin sulfate salt 1 g, penicillin G sodium salt 1000000 IU ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ด้วยบีกเกอร์ แล้วทำการคนด้วยแท่งแก้วให้สารละลายน้ำเชื้อ ละลายจนหมด จากนั้นนำไปแช่ไว้ใน water bath อุณหภูมิ 37°C เพื่อรอเจือจางกับน้ำเชื้อสดของสุกรที่รีดเก็บได้ เมื่อรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรได้ โดยทำการบรรจุกระบอกน้ำเชื้อภายในภาชนะที่มืด และนำน้ำเชื้อมายังห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อสุกรภายในเวลา 15 นาที หลังจากรีดเก็บ ซึ่งจะทำการเปลี่ยนภาชนะใส่น้ำเชื้อ ห้ามนำภาชนะหรือขวดใส่น้ำเชื้อที่รีดจากคอกพ่อพันธุ์เข้าไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

3) ทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามวิธีดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น คือ ตรวจวัดปริมาตร ตรวจวัดความหนืด ดูสี ตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง การเคลื่อนไหวแบบหมู่ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อสดของสุกรที่รีดได้ (ภาคผนวก ค การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ) เมื่อได้ค่าต่าง ๆ เรียบร้อยแล้ว นำมาคำนวณหาปริมาณของสารละลายที่จะใช้ในการเจือจางจะต้องใช้เท่าไร กับปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ ตามความเข้มข้นที่ใช้ (30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ) ใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิของ สารละลายน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อให้มีอุณหภูมิที่เท่ากัน หรือใกล้เคียง (± 1°C) ก่อนที่จะทำการเจือจาง

4) เมื่อได้ปริมาตรของสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้ให้ทำการเจือจางน้ำเชื้อสดสุกร จากนั้นให้ค่อย ๆ เทสารละลายน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ ลงในน้ำเชื้อสด ซึ่งในการเทนั้นจะเทสารละลายน้ำเชื้อลงข้าง ๆ ภาชนะ จะไม่เทลงไปโดยตรงต่อน้ำเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วคนเบา ๆ ให้ทั่ว ในการเทสารละลายน้ำเชื้อนั้นจะแบ่งเทเป็น 2 ครั้ง เพื่อให้น้ำเชื้อสดกับสารละลายน้ำเชื้อให้ผสมกันได้ทั่วถึง

5) หลังจากเจือจางสารละลายน้ำเชื้อกับน้ำเชื้อสดของสุกรที่รีดเก็บได้ แบ่งบรรจุในหลอดพลาสติก และระบุข้างหลอดน้ำเชื้อ ผลิตวันที่เท่าไร พ่ออะไร แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 2 ชั่วโมง ในห้องที่มืด แล้วเก็บน้ำเชื้อไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 17°C เก็บไว้เพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษาในครั้งต่อไป (ศรีสุวรรณ ชมชัย, 2531; Bearden et al., 2004)

ภาคผนวก จ

โปรแกรมการถ่ายพยาธิและโปรแกรมวัคซีน

1) โปรแกรมการถ่ายพยาธิสุกร

การถ่ายพยาธิสุกรเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรทำในสุกรทุกตัว แม้ว่าสุกรตัวนั้นจะไม่เคยสัมผัสกับพื้นดิน หรือกินอาหารสดจากทุ่งหญ้า หรือเศษอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งของพยาธิก็ตาม ทั้งนี้เพราะไข่พยาธิและตัวอ่อน อาจติดมากับพาหะ ได้หลายทาง ได้แก่ เศษดินที่ติดมากับรองเท้า การปนเปื้อนมากับอาหารหรืออุปกรณ์ อีกทั้งมากับแมลง เช่น ยุง หรือแมลงวัน ก็ได้

การถ่ายพยาธิภายในของสุกร (Internal parasite) ควรทำครั้งแรกเมื่อลูกสุกรหย่านมได้ 1 สัปดาห์ ก่อนทำวัคซีนต่าง ๆ และทำซ้ำในระยะขุน เมื่อสุกรถูกย้ายเข้าคอกขุนได้ 1 เดือน อายุประมาณ 12 สัปดาห์ สำหรับสุกรพันธุ์ทดแทนควรถ่ายพยาธิประมาณ 1 สัปดาห์หลังจากย้ายเข้าคอกแม่พันธุ์ ที่อายุ 5-6 เดือน และทำครั้งต่อไปทุก 6 เดือน หรือก่อนการเริ่มโปรแกรมการทำวัคซีน 1 สัปดาห์ สำหรับการถ่ายพยาธิภายนอก เช่น โรคขี้เรื้อน (Sarcoptic mange) ควรทำก่อนย้ายแม่สุกรเข้าคอกคลอด เพื่อป้องกันการรบกวนของพยาธิภายนอกในลูกสุกร

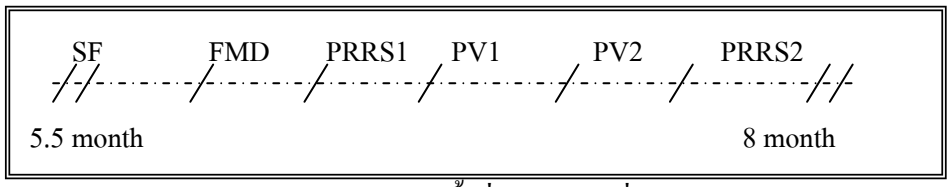
วิธีการถ่ายพยาธิ อาจทำได้โดยผสมอาหารหรือการฉีดยาถ่ายพยาธิที่นิยมได้แก่ Levamisol, Thiophanate, Fenbendazol, Cambendazole หรือ Ivermectin เป็นต้น

นอกจากนี้ นิยมให้ยาถ่ายพยาธิ 7 วันก่อนเริ่มโปรแกรมวัคซีนในแต่ละรอบ

2) โปรแกรมการให้วัคซีนสุกร

วัคซีนป้องกันโรคระบาดควรทำตามโปรแกรมวัคซีนในสุกรระยะต่าง ๆ ดังนี้ โรคอหิวาต์สุกร (Swine fever หรือ Hog cholera) โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease) โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudo rabies หรือ Aujeszky's disease) โรคพาร์โว ไวรัส (Parvo virus) โรคโพรงจมูกอักเสบ (Atrophic rhinitis) โรคปอดอักเสบจากเชื้อมัยโคพลาสมา หรือเอ็นโซติกนิวโมเนีย (Enzootic Pneumonia) รวมถึงโรคระบาดอื่น ๆ ซึ่งจำเป็นในบางท้องที่ เช่น โรคไฟลามทุ่ง (Swine erysipelas) โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบติดต่อ (Transmissible gastroenteritis) โรคท้องร่วงติดต่อในลูกสุกร (Porcine epidemic diarrhea) ซึ่งในสุกรแต่ละระยะของสุกร จะมีโปรแกรมที่แตกต่างกัน ในที่นี้จะกล่าวเพียงโปรแกรมการทำวัคซีนสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ ของโครงการสุกร ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดังนี้

โปรแกรมการทำวัคซีนพ่อ-แม่พันธุ์ทดแทน



หมายเหตุ 1, 2 หมายถึง จำนวนครั้งที่ให้วัคซีน เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

SF (swine fever หรือ hog cholera) วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

PV (parvo virus) วัคซีนป้องกันโรคพาร์โวไวรัส

FMD (foot and mouth disease) วัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อย

โปรแกรมการทำวัคซีนพ่อพันธุ์

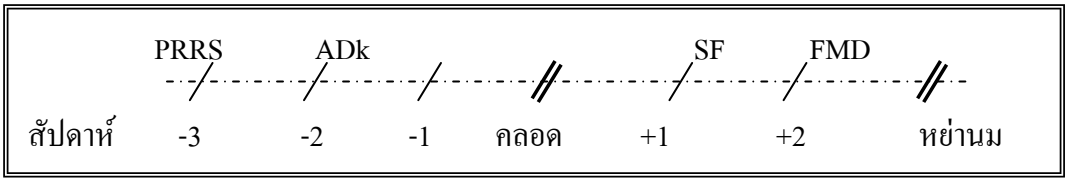
SF, FMD, PRRS ทุก ๆ 6 เดือน

หมายเหตุ SF (swine fever หรือ hog cholera) วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

PV (parvo virus) วัคซีนป้องกันโรคพาร์โวไวรัส

PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome) วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส

โปรแกรมการทำวัคซีนสุกรแม่พันธุ์



หมายเหตุ SF (swine fever หรือ hog cholera) วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

PV (parvo virus) วัคซีนป้องกันโรคพาร์โวไวรัส

FMD (foot and mouth disease) วัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อย

ADk (aujeszky's disease หรือ pseudo rabies) วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเทียม (วัคซีนเชื้อตาย)

PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome) วัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส

ภาคผนวก ฉ

การเตรียมสารเคมีในการทดลองและสารสกัด

1) การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อสุกร

การทดลองที่ 1

สารเคมี

กลุ่มที่ 1 ส่วนประกอบสารเคมีละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ศรีสุวรรณ ชมชัย, 2531)

Glucose $D^{(+)}$ anhydrous	37.00	g
Tri- Sodium citrate dehydrate	6.00	g
Sodium hydrogen carbonate	1.25	g
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)	1.25	g
Potassium chloride	0.75	g
Streptomycin sulfate salt	1.00	g
penicillin G sodium salt	0.04	g

กลุ่มที่ 2-13 กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เสริมในสารละลายน้ำเชื้อ

วิตามินซี

วิตามินอี

Glutathione

CLA (Conjugated Linoleic Acid)

สารสกัดชาเขียว

สารสกัดดอกคำฝอย

การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อสุกรเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 เสริมวิตามินอี (400 μg/L)

กลุ่มที่ 3 เสริมวิตามินซี (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 4 เสริมกลูตาไธโอน (1 mM)

กลุ่มที่ 5 เสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (200 μg/L)

กลุ่มที่ 6 เสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (500 μg/L)

กลุ่มที่ 7 เสริม Conjugated linoleic acid (CLA) (1000 μg/L)

กลุ่มที่ 8 เสริมสารสกัดชาเขียว (0.10 mg/ml)

กลุ่มที่ 9 เสริมสารสกัดชาเขียว (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 10 เสริมสารสกัดชาเขียว (0.50 mg/ml)

กลุ่มที่ 11 เสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)

กลุ่มที่ 12 เสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.25 mg/ml)

กลุ่มที่ 13 เสริมสารสกัดดอกคำฝอย (0.50 mg/ml)

การทดลองที่ 2

สารเคมี

กลุ่มที่ 1 ส่วนประกอบสารเคมีละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ศรีสุวรรณ ชมชัย, 2531)

Glucose $D^{(+)}$ anhydrous	37.00	g
Tri- Sodium citrate dehydrate	6.00	g
Sodium hydrogen carbonate	1.25	g
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)	1.25	g
Potassium chloride	0.75	g
Streptomycin sulfate salt	1.00	g
penicillin G sodium salt	0.04	g

กลุ่มที่ 2 กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เสริมในสารละลายน้ำเชื้อ

วิตามินอี

Glutathione

สารสกัดดอกคำฝอย

การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อสุกรเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 เสริม Glutathione (0.25 mM)

กลุ่มที่ 3 เสริม Glutathione (0.50 mM)

กลุ่มที่ 4 เสริม Glutathione (1.00 mM)

กลุ่มที่ 5 เสริม Glutathione (1.50 mM)

กลุ่มที่ 6 เสริม Glutathione (2.00 mM)

กลุ่มที่ 7 เสริมวิตามินอี (100 μg/L)

กลุ่มที่ 8 เสริมวิตามินอี (200 μg/L)

กลุ่มที่ 9 เสริมวิตามินอี (400 μg/L)

กลุ่มที่ 10 เสริมวิตามินอี (600 μg/L)

กลุ่มที่ 11 เสริมวิตามินอี (800 μg/L)

กลุ่มที่ 12 เสริม สารสกัดดอกคำฝอย (0.025 mg/ml)

กลุ่มที่ 13 เสริม สารสกัดดอกคำฝอย (0.05 mg/ml)
กลุ่มที่ 14 เสริม สารสกัดดอกคำฝอย (0.10 mg/ml)
กลุ่มที่ 15 เสริม สารสกัดดอกคำฝอย (0.15 mg/ml)

2) การเตรียมสารละลาย Tri- sodium citrate 3%

สารเคมี

Tri- Sodium citrate dehydrate	3.6	g

ละลาย Tri- Sodium citrate dehydrate ในน้ำกลั่น 100 ml

3) การเตรียมสีย้อม Nigrosin – Eosin

สารเคมี

Eosin Y disodium salt	1	g
Nigrosin	5	g

ละลายสี Eosin Y disodium salt ในน้ำกลั่น 50 ml ละลายสี Nigrosin ในน้ำอุ่น 50 ml (Nigrosin จะละลายยากในน้ำกลั่น จึงใช้น้ำอุ่นช่วยให้ละลายได้เร็วและดีขึ้น) เมื่อสีทั้ง 2 ละลายจนหมดแล้วให้นำทั้งสองส่วนมารวมกัน ให้สีทั้งสองผสมเข้ากันทั่วจนถึงแล้ว กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Filter Paper Whatman No. 4, 980 mm) ก่อนนำไปใช้ สีที่ได้ควรเก็บในที่เย็นและภาชนะทึบแสงหรือขวดสีชา เพื่อสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน เมื่อเห็นว่าสีย้อมติดเป็นตะกอนที่แผ่นสไลด์ ควรทำการกรองสีย้อมใหม่อีกครั้ง ก่อนมีการใช้สีย้อม

4) การเตรียมสารสกัดชาเขียวและดอกคำฝอย

การเลือกใช้ชาเขียวและดอกคำฝอย จะทำการสุ่มจากแหล่งผลิตต่าง ๆ ประมาณ 5–6 แห่ง ที่ทำการผลิตชาเขียวและดอกคำฝอยที่ได้คุณภาพ จากนั้นนำมาผสมรวมเป็นกลุ่มเดียว ซึ่งจะใช้ในปริมาณที่เท่ากัน เพื่อใช้ในการเตรียมสกัดต่อไป การสกัดชาเขียวและดอกคำฝอย ต้องอยู่ภายใต้ความสะอาดที่ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อ ทั้งในส่วนของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้หรือขั้นตอนกระบวนการสกัด และการเก็บสารที่สกัดได้ ต้องผ่านการฆ่าเชื้อและอบแห้งเรียบร้อย

อุปกรณ์

1) Hot plate
2) Graduated cylinder 100 ml
3) Beaker 200 ml
4) เครื่องปั่นเหวี่ยง
5) Erlenmeyer flask 250 ml
6) Tube 15 ml

อุปกรณ์ (ต่อ)

7) Stand champ	8) Pipette 10 ml
9) Thermometer 100°C	10) Auto pipett
11) Funnel	12) Rank
13) Paper filter	14) ข้อต่อ (Joint)
15) Liquid nitrogen	16) Nitrogen tank
17) Flask กลม 250 ml	18) ถุงมือกันความร้อน
19) ชาเขียวแห้ง	20) ดอกคำฝอยแห้ง

ขั้นตอนการชงชาเขียว

1) นำใบชาเขียวที่ได้จากการสุ่มจากแหล่งผลิตต่าง ๆ มาชั่งน้ำหนักแห้ง 5 กรัม

2) ต้มน้ำ (น้ำกลั่น) ให้เดือด จากนั้นทิ้งไว้ 3 นาที วัดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิประมาณ 90°C ตวงปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วเทน้ำกลั่นที่ร้อนลงบนใบชาเขียว จากนั้นทำการชงต่อเนื่องนาน 5 นาที

3) เทน้ำชาเขียวที่ได้ลงบนกรวยแก้วมีผ้าขาวบางกรองอีกชั้น แล้วรองด้วยขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flasks) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สะอาดผ่านการอบทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อได้น้ำชาเขียวที่ไม่มีส่วนของใบชาเขียว แล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 อีก 2 ครั้ง

4) น้ำชาเขียวที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 25°C เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของชิ้นส่วนต่าง ๆ ของใบชาเขียว

5) ดูดเอาน้ำชาเฉพาะส่วนที่ใสไม่มีตะกอน ใส่ในภาชนะที่สะอาด เตรียมน้ำชาเขียวที่ได้สกัดด้วยเครื่อง Freeze dryer

6) นำน้ำชาเขียวที่เตรียมไว้ใส่ลงในขวดกลม 2 ใน 4 ส่วน จากนั้นทำให้น้ำชาเขียวที่ได้แข็งตัวอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว โดยการกลิ้งขวดกลมในกล่องโฟมที่ใส่ไนโตรเจนเหลวพอท่วมขวดกลม กลิ้งจนกระทั่งน้ำชาเขียวในขวดกลมแข็งตัวหมด

7) นำขวดกลมที่มีชาเขียวแข็งตัวต่อเข้ากับเครื่อง Freeze dryer ด้วยข้อต่อ (อาคารเครื่องมือ 1 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) เครื่อง Freeze dryer จะทำงานไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้เป็นสารสกัดแห้งที่ติดกับขวดกลมในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

8) นำสารสกัดที่ได้มาเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและสะอาด ทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

การเตรียมสารสกัดดอกคำฝอยทำเช่นเดียวกันกับการสกัดชาเขียว ในขั้นตอนที่ 8 นี้ควรนำสารสกัดดอกคำฝอยออกจากขวดกลมอย่างรวดเร็ว เพราะสารสกัดดอกคำฝอยที่ได้มีความไวต่อความชื้นสูงมาก เมื่อสารสกัดโดนความชื้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นเหนียวสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ไม่สามารถนำมาใช้งานได้ การชงที่ใช้นี้เป็นการสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยความร้อน และเป็นการสกัดสารในเวลาที่จำกัด เพื่อไม่ให้สารที่ไม่ต้องการนั้นออกมามากเกินไป (พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2548)

วิธีการใช้เครื่อง Freeze dryer

1) ปิด วาล์วระบายน้ำออกจากเครื่อง freeze dryer วาล์วข้อต่อ และฝาครอบด้านบน

2) เปิดวาล์วเครื่องปั๊ม และเปิดเครื่อง Freeze dryer เสียบข้อต่อเข้ากับตัวเครื่อง freeze dryer อุ่นเครื่องนานประมาณ 15 นาที หรือให้ค่าอุณหภูมิต่ำกว่า -30°C และ ความดัน 0.5 Pa (พาสคาล Pasca; Pa)

3) นำตัวอย่างที่แช่แข็งต่อเข้ากับเครื่อง freeze dryer ด้วยข้อต่อ โดยการเปิดวาล์วที่ข้อต่อ เครื่องจะดูดเอาขวดตัวอย่างเข้ากับเครื่องเอง (ไม่ต้องดันขวดตัวอย่างเข้ากับข้อต่อ) ดูค่าดิจิตอลที่แสดงพบว่า ค่าต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เมื่อต่อตัวอย่างเข้ากับเครื่อง สักพักค่าต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้นนั้นจะลดลง ให้รอจนกระทั่งเท่ากับค่าเริ่มต้น จากนั้นจึงนำตัวอย่างตัวต่อไปต่อเข้ากับเครื่อง แล้วทำเช่นนี้จนกระทั่งตัวอย่างครบทั้งหมด

4) เครื่อง freeze dryer จะทำงานเรื่อยๆจนกระทั่งได้เป็นสารสกัดแห้งที่ติดกับขวดกลม ระยะเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง เมื่อตัวอย่างแห้งแล้ว เปิดวาล์วข้อต่อของตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างออกจากเครื่อง

5) ปิดเครื่อง freeze dryer เปิดวาล์วระบายน้ำออกจากเครื่อง freeze dryer ปิดวาล์วข้อต่อ และเปิดฝาครอบด้านบน แต่ยังคงเปิดเครื่องปั๊มไว้นานประมาณ 30 นาที แล้วค่อยปิดเครื่องปั๊ม

ภาคผนวก ช

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์และตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

การทดลองที่ 1 และ 2

การทดลองในแบบสุ่มตลอด (completely random design: CRD) ที่มีมากกว่า 2 ทรีทเมนต์

การวัดค่าสังเกต จากหน่วยทดลองเดิมหรือมีการวัดค่าสังเกตซ้ำจากสัตว์ตัวเดิมเมื่อเวลาต่าง ๆ การวิเคราะห์ข้อมูลแบบวัดซ้ำ โดยใช้ค่าสังเกตทั้งหมดจะช่วยให้ทราบถึงแนวโน้ม (trend) ในการตอบสนองของค่าสังเกตที่มีต่อทรีทเมนต์เมื่อเวลาเปลี่ยนไป เนื่องจากค่าสังเกตที่ได้จากการวัดซ้ำในแต่ละครั้งจะไม่อิสระต่อกันเนื่องจากหน่วยทดลองเดียวกัน ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความสัมพันธ์ (correlated) จึงซับซ้อนขึ้นเล็กน้อย **รูปแบบที่ใช้วิเคราะห์การวัดซ้ำในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Repeated Measurements in CRD)**

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{k(i)} + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \phi_{ijk}$$

โดยที่

Y_{ijk}	แทนค่าสังเกตจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ i และเวลา ที่ระดับ j ซ้ำที่ k เมื่อ $k = 1,...,r$
μ	แทน overall mean
α_i	แทนอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ i เมื่อ $i = 1,...,a$
$\delta_{k(i)}$	แทนอิทธิพลเนื่องจากตัวสัตว์หรือหน่วยทดลองที่ระดับ $k = 1,...,r$
τ_j	แทนอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยเวลาที่ระดับ $j = 1,...,t$
$\alpha\tau_{ij}$	แทนอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ i และเวลาที่ระดับ j
ϕ_{ijk}	แทน correlated error

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

การทดลองที่ 1

ตารางที่ 1.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติและการสังเคราะห์ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

Source	DF	SS	MS	F value	Pr>F
Model	220	744247.91	3382.95	30.66	0.0001
TRT	12	216877.20	18073.10	163.82	0.0001
REP(TRT)	117	67267.69	574.94	5.21	0.0001
TIME	7	388735.01	55533.57	503.38	0.0001
TRT*TIME	84	71368.00	849.62	7.70	0.0001
Error	765	84396.29	110.32		
Total	985	828644.19			

R-Square = 0.90, C.V. = 49.17

ตารางที่ 2.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติและการสังเคราะห์ ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร

Source	DF	SS	MS	F value	Pr>F
Model	207	789586.89	3814.43	31.96	0.0001
TRT	12	606878.32	50573.19	423.75	0.0001
REP(TRT)	117	117032.99	1000.28	8.38	0.0001
TIME	6	37301.83	6216.97	52.09	0.0001
TRT*TIME	72	28373.74	394.08	3.30	0.0001
Error	633	75547.78	119.35		
Total	840	865134.17			

R-Square = 0.91, C.V. = 23.19

การทดลองที่ 2

ตารางที่ 3.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Source	DF	SS	MS	F value	Pr>F
Model	254	819198.56	3225.19	25.49	0.0001
TRT	14	48689.97	3477.86	27.48	0.0001
REP(TRT)	120	140774.53	1173.12	9.27	0.0001
TIME	8	615672.83	76959.10	608.13	0.0001
TRT*TIME	112	14061.21	125.55	0.99	0.5077
Error	915	115792.83	126.55		
Total	1169	934991.38			

R-Square = 0.88, C.V. = 29.56

ตารางที่ 4.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Source	DF	SS	MS	F value	Pr>F
Model	239	397467.20	1663.04	9.10	0.0001
TRT	14	21821.39	1558.67	8.53	0.0001
REP(TRT)	120	230298.44	1919.15	10.50	0.0001
TIME	7	139097.44	19871.06	108.73	0.0001
TRT*TIME	98	6249.93	63.77	0.35	1.0000
Error	765	139812.40	182.76		
Total	1004	537279.60			

R-Square = 0.78, C.V. = 26.72

การทดลองที่ 3

สถิติที่ใช้ทดสอบ

การทดสอบ ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of covariance: ANCOVA) ด้วยวิธี multiple comparison

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta\left(x_{ij} + \bar{x}\right) + \varepsilon_{ij}$$

โดยที่

Y_{ij} แทน ค่าสังเกตจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ i ซ้ำที่ j

μ แทน ค่าเฉลี่ยกลางของประชากร

τ_i แทน อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ i

β แทน ค่า regression coefficient

x_{ij} แทน ค่า covariante จากปัจจัยทรีทเมนต์ i ซ้ำที่ j

$\bar{x}$ แทน ค่าเฉลี่ยของ x

ε_{ij} แทน ค่า error

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

ตารางที่ 5.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของการผสมเทียมแม่สุกร ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Model	2	2014.17	1007.09	0.37	0.6985
Error	13	35485.83	2729.68		
Total	15	37500.00			
R-Square = 0.05, C.V. = 83.59					
Source	**DF**	**Type I SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Parity	1	2003.31	2003.31	0.73	0.4071
TRT	1	10.86	10.86	0.00	0.9507

ตารางที่ 6.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลูกแรกคลอดในแม่สุกร ด้วยการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Model	2	11.86	5.93	0.33	0.7273
Error	7	124.54	17.79		
Total	9	136.40			
R-Square = 0.09, C.V. = 43.94					
Source	**DF**	**Type I SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Parity	1	9.26	9.26	0.52	0.4941
TRT	1	2.60	2.60	0.15	0.7135

ตารางที่ 7.ช ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลูกสุกรมีชีวิตหลังคลอด

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Model	2	8.64	4.32	0.31	0.7446
Error	7	98.26	14.04		
Total	9	106.90			
R-Square = 0.08, C.V. = 41.17					
Source	**DF**	**Type I SS**	**MS**	**F value**	**Pr>F**
Parity	1	3.94	3.94	0.28	0.6124
TRT	1	4.69	4.69	0.33	0.5813

ประวัติผู้เขียน

นางสาวบังอร บำรุงพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2523 เริ่มศึกษาชั้นประถมที่ 1-4 โรงเรียนบ้านหนองบัวลี ชั้นประถมศึกษาที่ 5-6 โรงเรียนบ้านไทยสามัคคี ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 โรงเรียนหนองหงส์พิทยาคม อำเภอหนองหงส์ จังหวัดบุรีรัมย์ และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ประจำปีการศึกษา 2545 โดยหลังจากสำเร็จการศึกษาได้เข้าทำงานที่บริษัท ฟินนอร์-เอเชีย จำกัด ตำแหน่งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

ปี 2547 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์