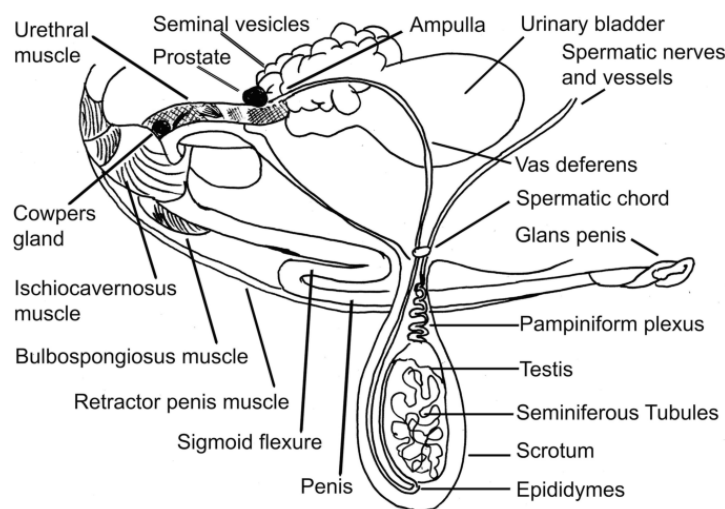


บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบสืบพันธุ์ในแพะเพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ของแพะเพศผู้มีรูปร่างคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ประกอบด้วย 1) อัณฑะ มีหน้าที่ผลิตอสุจิ และฮอร์โมนเพศผู้ 2) ระบบท่อส่งน้ำเชื้อ เมื่ออสุจิถูกผลิตแล้วจะส่งมาเก็บไว้ที่ท่อพักอสุจิ (Epididymis) เพื่อพักฟื้นรอให้อสุจิสมบูรณ์ก่อนหลั่งน้ำเชื้อออกนอกร่างกาย (Ejaculation) 3) ต่อมสำรองต่างๆ (Accessory gland) ในระหว่างทางของระบบท่อส่งอสุจิ จะมีต่อมมีท่อหลังสารมาเจือปนกับอสุจิเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับอสุจิ เช่น ต่อมลูกหมาก และต่อม Cowper's gland หรือต่อม Bulbourethral gland และ 4) อวัยวะเพศหรือองคชาติ (Penis) ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 อวัยวะสืบพันธุ์ของแพะเพศผู้

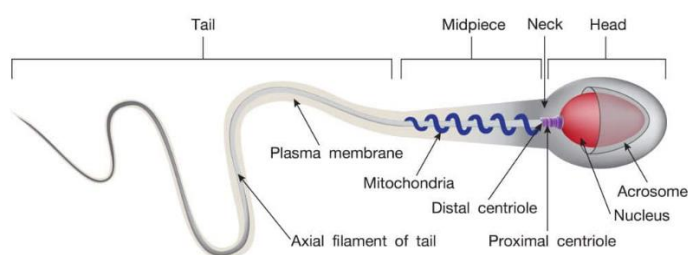
ที่มา : Das *et al.* (2023)

2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของอสุจิ

น้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

1) เซลล์อสุจิ (Spermatozoa) เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะ ไม่มีการเจริญเติบโต และการแบ่งตัว ประกอบไปด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (Head) เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยนิวเคลียส

(Nucleus) โดยมีอะโครโซม (Acrosome) อยู่บริเวณส่วนหัวด้านบน โดยภายในอะโครโซมบรรจุ เอนไซม์ช่วยในการเจาะผ่านเปลือกไข่ เพื่อเข้าไปปฏิสนธิ ส่วนกลาง (Midpiece) เป็นส่วนที่ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียเป็นส่วนใหญ่ ทำหน้าที่สร้างพลังงาน เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และส่วนหาง (Tail) ประกอบด้วยโครงสร้างที่เรียกว่า แฟลจเจลลา (Flagellum) ซึ่งมี Axoneme หรือ Microtubules เพื่อทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเซลล์อสุจิ

ที่มา : เสมอ (2561)

นอกจากนี้ เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ประกอบไปด้วยชั้นไขมัน และโปรตีน โดยเยื่อหุ้มชั้นไขมัน ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) ไกลโคลิพิด (Glycolipids) และคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ทำหน้าที่ควบคุมการไหลเข้าและออกของสารต่างๆ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และท่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Shan *et al.*, 2021) มีความสัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิ เมื่อเยื่อหุ้มอสุจิถูกทำลายหรือได้รับความเสียหาย ก็จะทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิลดลงด้วย

2) เซมินอลพลาสมา (Seminal plasma) ทำหน้าที่ในการนำตัวอสุจิจากอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวผู้เข้าสู่ทางเดินสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวเมีย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งอาหาร และสารรักษาสุขภาพ ความเป็นกรดต่างให้เซลล์อสุจิ มีแรงดันออสโมติกคล้ายเลือด เซมินอลพลาสมาของแพะ ประกอบด้วย 1) โปรตีน มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพของเซลล์อสุจิ และมีบทบาทต่อการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ 2) สารกลุ่มแร่ธาตุ ได้แก่ โซเดียม (Na^+) โพแทสเซียม (K^+) สังกะสี (Zn^{2+}) แคลเซียม (Ca^{2+}) คลอไรด์ (Cl^-) และแมงกานีส (Mn^{2+}) ทำหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่าง รักษาระดับแรงดันออสโมติก ภายในเซลล์อสุจิ และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการมีชีวิตรอดแก่เซลล์อสุจิ 3) สารให้พลังงาน ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโทส 4) เอนไซม์ ฮอร์โมน และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ กรดซิตริก (Citric acid) และกรดอะมิโน (Amino acid) นอกจากนี้ เอนไซม์บางตัวที่เป็นส่วนประกอบในเซมินอลพลาสมา ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant enzymes) เช่น Glutathione peroxidase (GPx), SOD, CAT, GSH, และ Vitamin E เป็นต้น และ 5) ไขมัน ประกอบด้วย Cholesterol,

Phospholipid, และ Triglycerides ซึ่งมีส่วนช่วยในกระบวนการเมแทบอลิซึม และมีบทบาทต่อการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่

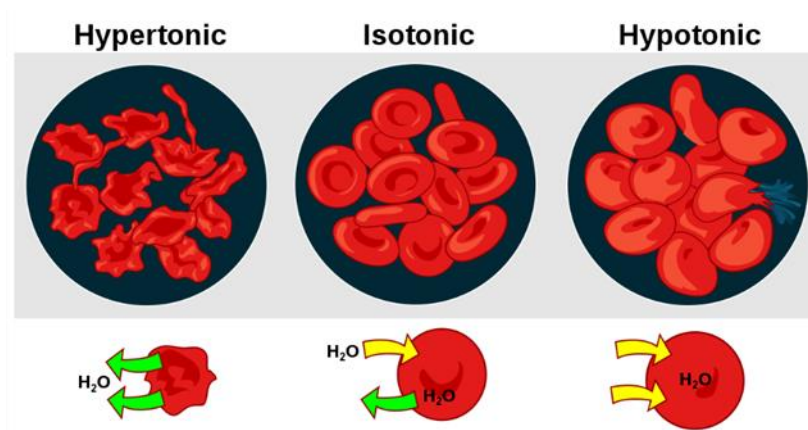
2.3 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสามารถเก็บได้ 2 วิธี คือ 1) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น และ 2) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยในการเก็บแบบแช่เย็นเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4-5°C โดยใช้สาร Extender สำหรับเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ มีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง จะต้องอาศัยการทำงานของสาร Extender ร่วมกับสาร Cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Cryopreservation) เป็นเครื่องมือตัวหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในระยะยาวเพื่อการผลิตและการศึกษาในอนาคต อีกทั้งการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196°C) สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีไว้ในรูปของธนาคารสเปิร์ม (Lone *et al.*, 2017) โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.4.1 สาร Extender ทำหน้าที่ในการเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ มีคุณสมบัติยืดอายุของอสุจิให้มีชีวิตนานขึ้นในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ทำให้อสุจิอยู่ในสภาวะ non active คือลดการเคลื่อนที่ แต่เซลล์อสุจิยังมีชีวิตอยู่ โดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์อสุจิ เป็นแหล่งอาหาร และพลังงานให้กับเซลล์อสุจิ ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) หรือทรีฮาโลส (Trehalose) มีการเติมสารบัฟเฟอร์ต่างๆ ลงในสารเจือจาง เช่น ซิเตรตฟอสเฟต (Citrate phosphate) หรือทริสบัฟเฟอร์ (Tris buffer) เป็นต้น เพื่อทำหน้าที่ปรับสภาพกรด-ด่าง และรักษาระดับแรงดันออสโมติกให้เหมาะสมกับตัวอสุจิ โดยในการเลือกใช้สาร Extender ควรคำนึงถึงค่าออสโมลาลิตี (Osmolality) และค่า pH ให้มีค่าใกล้เคียงกับ Seminal plasma ของสัตว์ที่สนใจศึกษา เพราะหากอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ เซลล์อสุจิมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และผลิตกรดแลกติก ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง หากอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH สูง จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น สำหรับสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำ (Hypo-osmolality) จะทำให้เซลล์อสุจิบวม และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง (Hyper-osmolality) เซลล์อสุจิจะเกิดการสูญเสียน้ำ ทำให้เกิดเซลล์เหี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 สภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง ค่าออสโมลาลิตีเท่ากัน และค่าออสโมลาลิตีต่ำ

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Tonicity>

สมร และคณะ (2563; 2564) ทำการศึกษาผลของการใช้สาร Tris-based extender ที่มีค่า Osmolality อยู่ในช่วง 321 ± 1.83 - 371 ± 1.00 mOsm/kg พบว่า ในการเลือกใช้สาร Extender เพื่อรักษาสมดุลของ Seminal fluid ควรพิจารณาค่า Osmolality ปริมาณและส่วนประกอบของ ไอออน เช่น Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเชื้อแพะในแต่ละพันธุ์ ดังแสดง ในตารางที่ 2.1 เพื่อป้องกันการเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยวหรือเซลล์บวมจากแรงดันออสโมติก ซึ่ง Purdy (2006) รายงานว่า ส่วนประกอบไอออนในเลือดมีค่าใกล้เคียงกับส่วนประกอบไอออนในน้ำเชื้อ นอกจากนี้ สมร และคณะ (2563) พบว่า การใช้สาร Extender ควรมีค่า Osmolality ของสาร ใกล้เคียงกับค่า Osmolality ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ศึกษา ซึ่งแพะแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อทรีตเมนต์ที่ แตกต่างกัน โดยในแพะพันธุ์บอร์ มีความเหมาะสมกับสาร Tris-based extender ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 321 ± 1.83 mOsm/kg ในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Paul *et al.* (2019) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแกะพันธุ์ Patanwadi พบว่า การใช้สาร Soy lecithin-tris-fructose extender (SLTF) ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 360 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อ (375.45 ± 6.44 mOsm/kg) สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร Extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง (390 และ 450 mOsm/kg) สำหรับงานวิจัยที่ผ่านมา การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะที่เปรียบเทียบการใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality ในกลุ่มต่างๆ (Iso-osmolality, Hypo-osmolality, และ Hyper-osmolality) ยังมีการศึกษาน้อยมาก มีเพียงรายงานการใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality ที่แตกต่างกันออกไปใน แพะแต่ละพันธุ์ เช่น แพะพันธุ์ชาร์ดา (Sarda) ใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 385 mOsm/kg (Chelucci *et al.*, 2015), พันธุ์บาลาดิ (Baladi) 300 mOsm/kg (Hassan *et al.*,

2021), พันธุ์ชาแนน (Saanen) 370 mOsm/kg (Zhao *et al.*, 2023), และพันธุ์มาฮาบาดี (Mahabadi) 420 mOsm/kg (Salmani *et al.*, 2014) เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบไอออนในเลือด ค่า Osmolality และค่า pH ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์ต่างๆ

Parameter/Breed	Saanen	Alpine	Anglo-Nubian	Boer
(mgL ⁻¹)	Blood serum	Blood serum	Blood serum	Blood serum
Cl ⁻	3657.52	3790.04	3782.16	3793.6
Na ⁺	3105.06	3338.27	3339.99	3359.72
K ⁺	163.06	194.88	182.4	212.78
Mg ²⁺	18.17	19.88	24.59	28.68
Ca ²⁺	91.35	89.77	92.66	93.87
Osmolality	345±1.87	366±2.52	338±2.25	321±4.42
(mOsm.kg ⁻¹)				
pH	6.12±0.03	6.02±0.06	6.04±0.10	6.18±0.11

ที่มา : สมาร และคณะ (2563; 2564)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การเลือกใช้สาร Extender ควรคำนึงถึงค่า pH และค่า Osmolality ให้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 321±1.83 mOsm/kg ที่มีค่าใกล้เคียงกับค่า Osmolality ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ 321±4.42 mOsm/kg

2.4.2 สาร Cryoprotectant ทำหน้าที่เป็นสารป้องกันอันตรายของเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย โดยจะมีผลต่อคุณสมบัติของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตหลังจากการแช่แข็งได้ เนื่องจาก สามารถป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ (Ugur *et al.*, 2019) โดยสารละลายที่มีการเติมสาร Cryoprotectant จะทำให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าสารละลายที่ไม่ได้เติม ช่วยทำให้น้ำเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ สามารถป้องกันการลดขนาดของเซลล์ได้ ซึ่งสาร Cryoprotectant จำแนกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) สาร Cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Permeating cryoprotectant) ได้แก่ Glycerol, Dimethyl acetamide (DMA), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol (MeOH), และ Ethylene glycol เป็นต้น สารเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ในขณะแช่แข็งและละลาย โดยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถ

แพร่เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ส่วนใหญ่นิยมใช้ Glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง

2) สาร Cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non-permeating cryoprotectant) ได้แก่ Sucrose, Polymers, Polyvinylpyrrolidone (PVP), และกลุ่มโปรตีน (Egg yolk, Skim milk, และ Soybean lecithin) เป็นต้น สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ ส่วนใหญ่นิยมใช้ Egg yolk ที่เป็นแหล่งเลซิธินจากสัตว์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง เป็นแหล่งของ Lipoprotein และ Phospholipid ที่สำคัญ ช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมในระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ (Sun *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตาม การใช้ Egg yolk ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะ มีข้อจำกัด คือใน Seminal plasma ของแพะ มีเอนไซม์ Egg yolk coagulating เป็นส่วนประกอบ ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยา Hydrolysis กับ Egg yolk ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และเกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Zou *et al.*, 2022) ในการศึกษาของ Egg yolk จึงปั่นล้างเอา Seminal plasma ออกก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการใช้สารทดแทน Egg yolk เช่น Soybean lecithin ที่เป็นแหล่งเลซิธินจากพืช เป็นต้น โดยการศึกษาของ Sun *et al.* (2020) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Chongming White พบว่า การใช้สาร Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Soybean lecithin 2% มีค่าอัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย ระดับของ ROS, SOD, และ MDA ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ Glycerol 6% ร่วมกับ Egg yolk 20% ($P>0.05$)

นอกจากนี้ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การใช้สาร Cryoprotectant ชนิดออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ รักษาสมดุลแรงดันออสโมติก ควบคุมการเข้าและออกของน้ำในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การใช้สาร Cryoprotectant ชนิดออกฤทธิ์ภายในเซลล์เพียงชนิดเดียวไม่เพียงพอต่อการรักษาโครงสร้างเซลล์อสุจิ เนื่องจากไม่สามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ได้ และเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้โครงสร้างโปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Ozturk *et al.*, 2020) การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลง ส่งผลต่ออัตราการผสมติดต่ำ (Purdy, 2006) ในขณะที่สาร Cryoprotectant ชนิดออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จะช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Mosca *et al.*, 2016) ดังนั้น จึงมีการศึกษาการใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant ทั้ง 2 ชนิด ร่วมกับ Glycerol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งมากขึ้น

การศึกษาของ Li *et al.* (2023) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์ซาแนน พบว่า การใช้ Soybean lecithin 1% ร่วมกับ Cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) 4 g/L สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซม

และอัตราการผสมติด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเสริม Soybean lecithin หรือ CLC เพียงชนิดเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษาของ Mosca *et al.* (2016) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ พบว่า การใช้ DMA 6% ร่วมกับ Trehalose 0.1 M สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ดีกว่ากลุ่มที่เสริม DMA เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Ozturk *et al.* (2020) พบว่า การใช้ Trehalose (60 และ 100 mM) ร่วมกับ Glycerol (1.5% และ 3%) สามารถลดการถูกทำลายของดีเอ็นเอได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Glycerol 5% ($P < 0.05$) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแกะ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant สามารถรักษาคุณภาพของเซลล์อสุจิ ป้องกันการผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายได้ดีกว่าการใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว แต่ยังมี การศึกษาน้อยมากในแพะพันธุ์บอร์ ดังนั้นการศึกษานี้มีแนวคิดที่จะศึกษาการใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

2.5 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง

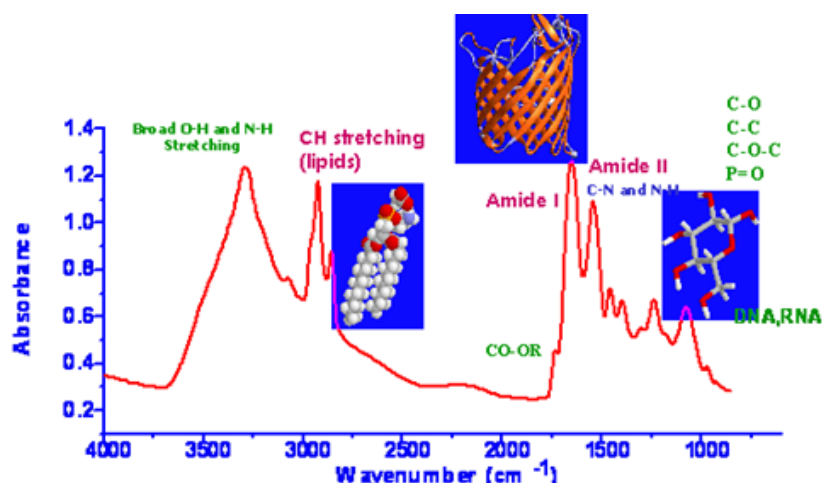
จากการรวบรวมเอกสารผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง การศึกษาของ Shama *et al.* (2020) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Gaddi พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Egg yolk (5 และ 10%) สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และลดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเสริม Egg yolk ที่ความเข้มข้น 15 และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษาของ Galian *et al.* (2023) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Murciano Granadina พบว่า การใช้ Egg-yolk-based extender ร่วมกับ Egg yolk 22.7%, Glycerol 8%, และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) 2.08 M มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) การศึกษาของ Fathi *et al.* (2019) ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Damascus พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Soybean lecithin 3% และ Glycerol 5% สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ และอัตราการผสมติดสูงให้ผลไม่แตกต่างกันกับสูตรทางการค้า ($P > 0.05$) นอกจากนี้ การศึกษาของ Sun *et al.* (2020) พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Soybean lecithin 2% สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) และพบว่ามีค่าอัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์อะโครโซมไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ใช้ Glycerol 6% ร่วมกับ Egg yolk 20% ($P > 0.05$) ใน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Chongming White การศึกษาของ Intawicha *et al.* (2022) ในน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ พบว่า การใช้ Tris-base extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Egg yolk 20% ส่งผลให้ค่าอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ใช้ Glycerol 6% ร่วมกับ Lyophilized egg yolk 10% ($P>0.05$) และการศึกษาของ จิตศักดิ์ และคณะ (2559) พบว่า การใช้ Glycerol 7% ร่วมกับ Sunflower lecithin (3 และ 4.5%) มีค่าอัตราการเคลื่อนที่รวม และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Sunflower lecithin 1.5 และ 6% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การเลือกใช้สาร Cryoprotectant ขึ้นอยู่กับพันธุ์แพะที่ใช้ในการศึกษา ชนิดของสาร Extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant โดยในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะส่วนใหญ่นิยมใช้ Tris-based extender ร่วมกับการใช้ Combination ของ Glycerol ร่วมกับ Egg yolk แต่การใช้แหล่งเลซิทินที่มาจากพืชยังมีข้อมูลน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีแนวคิดที่จะศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิทินที่มาจากพืชและสัตว์ (Glycerol + Soybean lecithin และ Glycerol + Egg yolk) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง นอกจากนี้ในการศึกษานี้มีแนวคิดในการใช้เทคนิค SR-FTIR ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำเชื่อน้อย และลดการวิเคราะห์ที่ต้องใช้สารเคมีลง อีกทั้งยังสามารถดูการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิ เพื่อนำมาประกอบการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เพื่อช่วยในการคัดเลือกทรีตเมนต์ได้แม่นยำมากขึ้น

2.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค SR-FTIR ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

เทคนิค SR-FTIR คือ การนำแสงซินโครตรอน มาใช้เทคนิค Infrared (IR) Spectroscopy ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค IR Spectroscopy ให้มีความสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก มีประโยชน์อย่างมากในงานวิจัยด้านชีววิทยา สามารถนำมาใช้ศึกษาองค์ประกอบของการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลจากตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่สนใจศึกษา โดยลักษณะสเปกตรัมจาก IR จะให้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของ Lipid, Protein หรือ Carbohydrate ที่เป็นลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง IR ในสารแต่ละชนิด ทำให้สามารถสร้างเป็น Molecular fingerprint ขององค์ประกอบสารชีวเคมีในตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง IR ของสารชีวโมเลกุล
ที่มา : <https://www.slri.or.th/th/beamline/bl41.html>

ในการศึกษาของ Amaral *et al.* (2018) ศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะเซลล์อสุจิของสัตว์ในแต่ละชนิด (มนุษย์ หนู ลิง และเม่นทะเล) โดยใช้เทคนิค Raman micro-spectroscopy พบว่าสามารถบ่งบอกความแตกต่างบริเวณส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหางเซลล์อสุจิของสัตว์ในแต่ละชนิดได้ และในการศึกษาของ Oldenhof *et al.* (2016) ได้ศึกษาโครงสร้างโครมาติน และดีเอ็นเอของเซลล์อสุจิ โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่าอัตราการเจริญพันธุ์ที่ลดลงของพ่อพันธุ์ม้า มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้แถบลักษณะเฉพาะที่เกิดขึ้นจาก DNA backbone และ Protein มีการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการควบแน่นของโครมาติน (Chromatin Condensation) พบว่าอัตราส่วนแถบฟอสเฟตแบบอสมมาตร/สมมาตร ($V_{1230}/V_{1086} \text{ cm}^{-1}$) ลดลง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติเพิ่มขึ้น ดังนั้น อัตราส่วนแถบลักษณะเฉพาะที่ได้จากสเปกตรัม IR ของเซลล์อสุจิ สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับโครงสร้างโครมาตินของเซลล์อสุจิ ช่วยในการประเมินคุณภาพของเซลล์อสุจิสำหรับเทคโนโลยีการผสมเทียมได้ การศึกษาของ Pachetti *et al.* (2020) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Lipid และ Protein ที่เกี่ยวข้องกับการ Capacitation ของเซลล์อสุจิมนุษย์ โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่าปริมาณ α -helix ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการ Capacitation ของเซลล์อสุจิ ในขณะที่ปริมาณของ β -sheet ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของเซลล์อสุจิต่ำ อีกทั้งบริเวณ Lipid CH_2/CH_3 ($2853/2870$) สามารถบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้ โดยส่วนใหญ่พบในเซลล์อสุจิของมนุษย์ที่มีบุตรยาก นอกจากนี้การศึกษาของ Shivanoor and David (2015) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลและโครงสร้างเซลล์อสุจิ โดยการเติมสารไซยาไนด์ลงในน้ำเชื้อของหนู ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.64, 1.2,

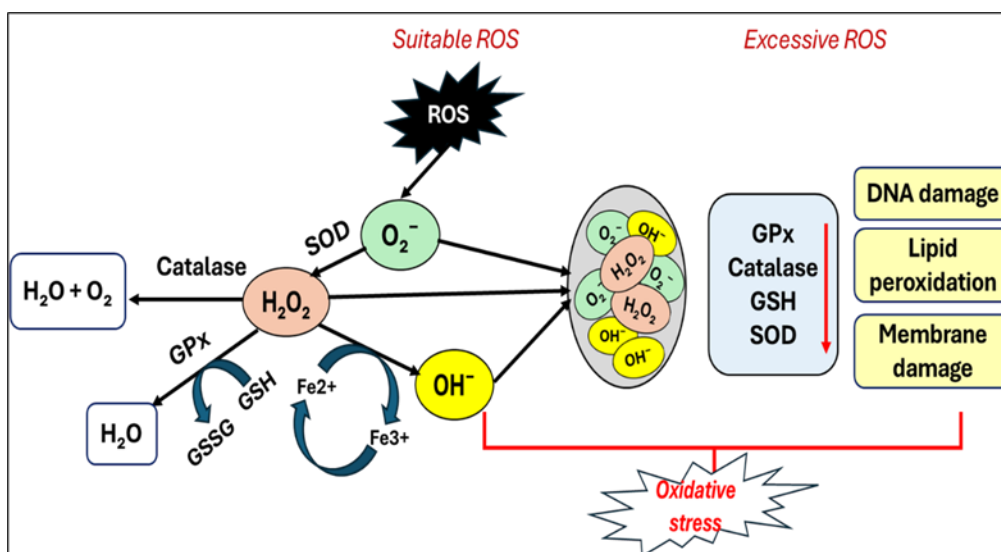
และ 3.2 mg/kg เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า การเสริมสารไซยาไนด์ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลของเซลล์สุจิหลุดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าในเซลล์สุจิที่เสริมสารไซยาไนด์ความเข้มข้นต่ำ (0.0 และ 0.64 mg/kg) มีปริมาณของ α -helix สูงและ β -sheet ต่ำกว่าเซลล์สุจิที่เสริมสารไซยาไนด์ความเข้มข้นสูง ($P < 0.05$)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า เทคนิค SR-FTIR สามารถดูการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์สุจิ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีแนวคิดในการใช้เทคนิค SR-FTIR เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์สุจิ เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดตัวหนึ่งสำหรับการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์ได้ และนำมาประกอบการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เพื่อช่วยในการคัดเลือกทรีตเมนต์ได้แม่นยำมากขึ้น

2.7 กลไกและบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น เซลล์สุจิอาจถูกทำลายเนื่องจากภาวะเครียดของเซลล์ ซึ่งได้แก่ ภาวะเครียดที่เกิดจากออสโมติก (Osmotic stress) การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) เป็นต้น (Shafiei *et al.*, 2015) อีกทั้งในเซลล์สุจิยังมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในปริมาณสูง จึงมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ส่งผลให้โครงสร้างเซลล์สุจิเกิดความเสียหาย อัตราการมีชีวิต การเคลื่อนที่ และการผสมติดลดลง (Al-Mutary *et al.*, 2020; Gangwar *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2019) โดยภายในเซมินอลพลาสมาของเซลล์สุจิ มีส่วนประกอบสาร Antioxidant ทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ SOD, CAT, และ GPx และชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น GSH, Cysteine, Vitamin E, Vitamin C, และ Methionine เป็นต้น

สาร Antioxidant หลักที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ได้แก่ SOD, CAT, GPx และ GSH ซึ่งสารแต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ Superoxide (O_2^-) ให้เปลี่ยนเป็น H_2O_2 จากนั้น CAT จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ และ O_2 นอกจากนี้ GPx ทำงานร่วมกับ GSH ในการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งกลไกดังกล่าวช่วยป้องกันการเกิด Lipid peroxidation ในเซลล์สุจิ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร และช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสาร Antioxidant เหล่านี้จะลดลงในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Frau *et al.*, 2020) และการผลิตสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลให้คุณภาพของเซลล์สุจิลดลง

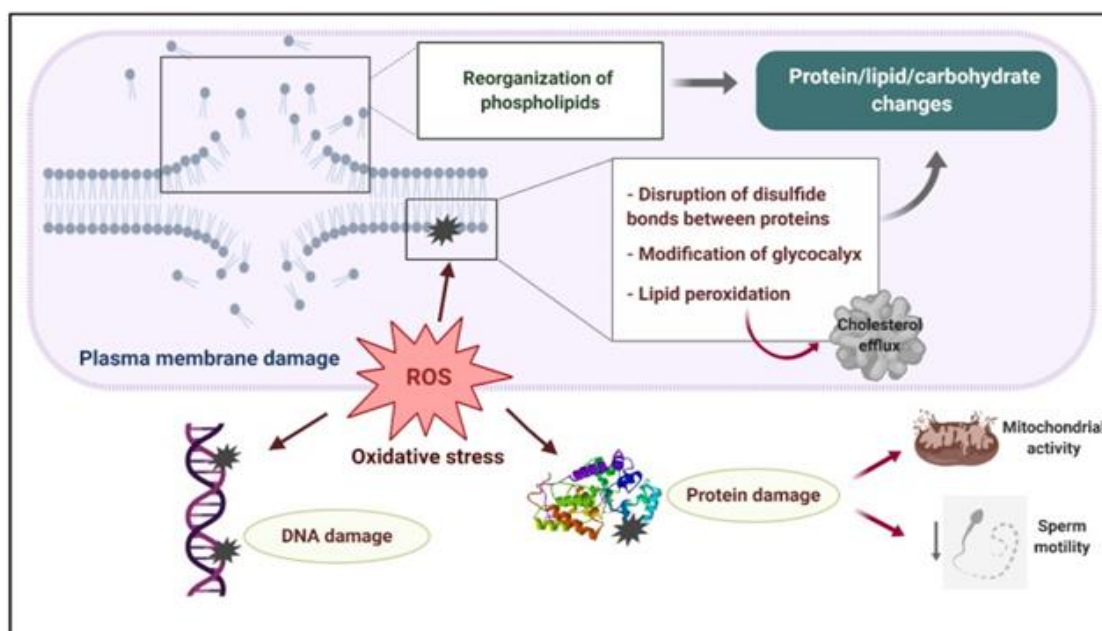


ภาพที่ 2.5 กลไกของสาร Antioxidant ภายในเซลล์
ที่มา : Lu *et al.* (2018)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน คือ ภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไปที่ร่างกายจะสามารถทำลายได้หมด เช่น อนุมูลอิสระชนิด ROS ที่เกิดจากการเผาผลาญพลังงานต่างๆ กระบวนการผลิต Adenosine triphosphate (ATP) และการหายใจระดับเซลล์ ส่งผลต่อโครงสร้างเซลล์อสุจิ การสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของเซลล์บกพร่อง สูญเสียความสามารถในการรักษาภาวะสมดุลของปริมาตรและเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ มีผลต่อโมเลกุลของโปรตีน เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เปลี่ยนการทำหน้าที่ของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับโปรตีนภายในเซลล์ ส่งผลต่อโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนลำดับเบสของดีเอ็นเอ หรือสายดีเอ็นเอแตกหัก และเกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ได้ (Frau *et al.*, 2020; Ozer *et al.*, 2018) ดังแสดงในภาพที่ 2.6

นอกจากนี้มียางานว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์อสุจิเสียหาย ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทาง Epigenetics ซึ่งสามารถวัดได้จากการเกิดกระบวนการ DNA methylation ที่มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดย Aurich *et al.* (2016) รายงานว่า ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อม้า พบว่าระดับของ Cytosine methylation ในน้ำเชื้อมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด ($P < 0.05$) มีผลต่อความสามารถในการผสมติดต่ำ และการศึกษาของ Yeste (2016) รายงานว่า ระดับของ DNA methylation จะเพิ่มขึ้นภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง นอกจากนี้ Maeder *et al.* (2013) รายงานว่า ปริมาณการเกิด DNA methylation ที่ลดลงส่งผลให้ยีนที่ถูกยับยั้งการแสดงออก มีการแสดงออกได้

ตามปกติ ดังนั้น เพื่อปกป้องเซลล์อสุจิจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จึงมีการนำสาร Antioxidant เข้ามาช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง



ภาพที่ 2.6 ผลของภาวะเครียดออกซิเดชันต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ โครงสร้างของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ที่มา : Frau *et al.* (2020)

2.8 ผลของสาร Antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

การศึกษาของ Heidari *et al.* (2022) พบว่าการใช้ Tris-based ร่วมกับ Soybean lecithin 1.5% และ Glycerol 5% ที่เสริมด้วย L-carnitine (LC) 5 mM สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ กิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และ ความมีชีวิตของเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation และการเกิด DNA methylation ของเซลล์อสุจิต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) การศึกษาของ Zou *et al.* (2021) พบว่า การเสริม GSH ที่ความเข้มข้น 2 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และการผสมติดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม GSH ($P < 0.05$) การศึกษาของ Rawash *et al.* (2018) ที่ใช้สาร Tris-base extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Egg yolk 20% เปรียบเทียบการเสริม GSH ที่ระดับต่างๆ (2, 5, 7, และ 10 mM) พบว่า การเสริม GSH ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถลด

การถูกทำลายของดีเอ็นเอ และช่วยเพิ่มการทำงานของสาร Antioxidant ภายในเซลล์อสุจิ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($P < 0.05$) การศึกษาของ Adekunle *et al.* (2022) พบว่า การเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 8 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซมเพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษาของ Goswami *et al.* (2021) พบว่า การเสริม Vitamin E ที่ความเข้มข้น 2 mM สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของแพะพันธุ์ Sirohi และพันธุ์ Beetal ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการศึกษาของ Das *et al.* (2021) พบว่า การเสริม SOD (100 และ 150 IU/mL), GSH (1 และ 2 mM) และ CAT (200 และ 400 IU/mL) ในน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Black Bengal ทำให้ อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการศึกษาของ Zhang *et al.* (2022) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์ Laoshan ที่ใช้สาร Tris-base extender ร่วมกับ Egg yolk 20% และ Glycerol 5% ทำการเสริม Proline ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1, 2, และ 4 mM) พบว่าการเสริม Proline 2 mM สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) และการศึกษาของ El-Khawagah *et al.* (2020) ที่เปรียบเทียบการใช้สาร Tris-base egg yolk (Egg yolk 15% และ Glycerol 6%) และสาร Tris-base soybean (Soybean lecithin 2.5% และ Glycerol 6%) ที่ทำการเสริมสาร Butylated hydroxytoluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, และ 4 mM พบว่า การเสริม BHT 1 และ 2 mM ในสาร Tris-base egg yolk และการเสริม BHT 0.5 และ 1 mM ในสาร Tris-base soybean สามารถเพิ่มความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และลดระดับของ MDA เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($P < 0.05$) ซึ่งสาร Antioxidant แต่ละชนิดมีบทบาทและการทำงานที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

จากการตรวจสอบเอกสารเกี่ยวกับการเสริมสาร Antioxidant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง พบว่า การเสริมสาร Antioxidant สามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง ลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และอะโครโซม เพิ่มการทำงานของไมโทคอนเดรีย อีกทั้งช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation และกระบวนการ DNA methylation ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าชนิดและความเข้มข้นของสาร Antioxidant ที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์แพะ ชนิดของสาร Extender และสาร Cryoprotectant ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเนื้อพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง ตลอดจนศึกษาการเกิด DNA methylation เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ตารางที่ 2.2 บทบาทของสาร Antioxidant ในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

Antioxidants	Functions/Effect	References
L-carnitine	เป็นกรดอะมิโนที่ละลายน้ำได้ สามารถยับยั้งกระบวนการ DNA methylation ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation และเพิ่มความสมบูรณ์ของเซลล์อสุจิ	Heidari <i>et al.</i> (2022) Species: Saanen
GSH	เป็นสารประกอบกลุ่ม Tripeptide ซึ่งประกอบด้วย Glutamic acid, Cysteine, และ Glycine ทำงานร่วมกับเอนไซม์ GPx ในการเปลี่ยน H ₂ O ₂ ให้กลายเป็นน้ำ ป้องกันเซลล์อสุจิจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และการผสมติดเพิ่มขึ้น	Zou <i>et al.</i> (2021) Species: Guanzhong
GSH	ลดการถูกทำลายของดีเอ็นเอ และช่วยเพิ่มการทำงานของสาร Antioxidant ภายในเซลล์อสุจิ	Rawash <i>et al.</i> (2018) Species: Boer
Cysteine	กรดอะมิโน ประกอบด้วยกลุ่ม Thiol ที่มีคุณสมบัติในการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ GSH ภายในเซลล์ และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซมเพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลง	Adekunle <i>et al.</i> (2022) Species: West African dwarf
Vitamin E	ละลายในไขมัน ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระกลุ่ม Superoxide Peroxyl และ Hydroxyl มีบทบาทสำคัญในการหยุดสายปฏิกิริยาการเกิดสารอนุมูลอิสระ เกิดปฏิกิริยาและทำหน้าที่ได้ดีในบริเวณของเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มอัตราการการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซม	Goswami <i>et al.</i> (2021) Species: Beetal and Sirohi
SOD	สาร Antioxidant ชนิดเอนไซม์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ O ²⁻ ให้เปลี่ยนเป็น H ₂ O ₂	Das <i>et al.</i> (2021)
CAT	สาร Antioxidant ชนิดเอนไซม์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H ₂ O ₂ ให้กลายเป็นน้ำ	Species: Black Bengal
Proline	เป็นกรดอะมิโนที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavengers) และรักษาระดับ GSH ภายในเซลล์ เพิ่มอัตราการเคลื่อนที่เซลล์อสุจิ	Zhang <i>et al.</i> (2022) Species: Laoshan
BHT	เป็นอนุพันธ์สังเคราะห์ของ Vitamin E ละลายได้ในไขมัน สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ รักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และลดการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation	El-Khawagah <i>et al.</i> (2020) Species: Boer

