รหัสโครงการ SUT3-303-49-12-09

รายงานการวิจัย

ผลของแอนติออกซิแดนท์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกร

Effects of antioxidants on fresh boar semen quality

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. น.สพ.ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยทำให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ.น.สพ.ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์

มิถุนายน 2553

บทคัดย่อภาษาไทย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแอนติออกซิแดนท์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกร โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิตลอดระยะเวลาเก็บรักษา เก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ อายุระหว่าง 1-2 ปี ด้วยวิธี Glove hand method เจือจางน้ำเชื้อที่รีดได้เติมแอนติออกซิแดนท์ได้แก่ สารสกัดดอกคำฝอย ชาเขียว คอนจูเกตไลโนเลอิค แอซิด วิตามินซี วิตามินอี และ กลูตาไธโอน เก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 17 °C ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อที่เวลาต่างๆกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองพบว่าการเติมสารสกัดดอกคำฝอย ชาเขียว คอนจูเกตไลโนเลอิค แอซิด และวิตามินซี ไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ แต่พบว่าการเสริมกลูตาไธโอน 0.25 mM สามารถยืดระยะการเก็บรักษาได้นานกว่าปกติถึง 5 วัน โดยมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ และ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าเท่ากับ 52.59±19.63 และ 61.25±17.02 ตามลำดับ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The aims of this study were to examine the effects of antioxidants on fresh boar semen quality.The percentage of sperm motility and living sperms were investigated throughout the period of storage. Fresh boar semen was collected from boar at 1-2 years of age using glove hand method. Semen sample was diluted and antioxidants including safflower extract, green tea, conjugated linoleic acid , vitamin C, vitamin E and glutathione were added. The samples were stored at 17 C and semen quality was examined under a light microscope throughout the period of storage. The results showed that the addition of Safflower extract, green tea and vitamin C had no effect on sperm quality. However, 0.25 mM glutathione can help maintain sperm quality up to five days. It increased the percentage of sperm motility and living sperms was significantly increased to 52.59 ± 19.63, 61.25 ± 17.02, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ข้อตกลงเบื้องต้น	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	3
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	3
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	4
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	6
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	12
ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ประวัติผู้วิจัย	20

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
3.1	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น	8
3.2	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น	9
3.3	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เมื่อเสริม กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น	10
3.4	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เมื่อเสริม กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น	11

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โปรตีนที่ได้จากเนื้อสุกรจัดเป็นแหล่งโปรตีนหลักของผู้บริโภค ในปัจจุบันปัญหาการระบาดของโรคไข้หวัดนกได้ทำให้ เนื้อสุกรเป็นที่ต้องการของตลาดมากขึ้นส่งผลให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว หัวใจของการเลี้ยงสุกรอยู่ที่การเพิ่มจำนวนของลูกสุกร ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับการจัดการด้านการสืบพันธุ์ ในปัจจุบันการผสมพันธุ์ในสุกรนิยมใช้วิธีการผสมเทียมเกือบ 100% โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ (extender) และทำการเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 17-20 °C การผสมเทียมสุกรมีข้อดีหลายประการ เช่น ช่วยป้องกันการติดต่อของโรคในระบบสืบพันธุ์ ไม่ต้องเลี้ยงพ่อพันธุ์จำนวนมาก เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมสุกรยังมีข้อจำกัดตรงที่ สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้เพียง 3-5 วันเท่านั้น และคุณภาพของตัวอสุจิก็ลดลงตามระยะเวลาการเก็บ ส่งผลให้อัตราการผสมติดลดลง สาเหตุสำคัญที่ทำให้ตัวอสุจิมีคุณภาพลดลงนั้น ประการหนึ่งเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งทำให้ผนังเซลล์ของตัวอสุจิสูญเสียโครงสร้างและหน้าที่ ส่งผลให้ตัวอสุจิตายในที่สุด อย่างไรก็ตามการเกิดออกซิเดชั่นสามารถป้องกันหรือลดความรุนแรงได้โดยการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชั่น หรือ แอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidants) ฉะนั้นการวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดที่จะศึกษาถึงชนิดของสารต้านการเกิดออกซิเดชั่นจากธรรมชาติ ที่เหมาะสม ที่สามารถนำมาพัฒนาคุณภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของสุกร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามิน E วิตามิน C glutathione และสารสกัดจากชาเขียวโดยน้ำ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรที่เก็บที่อุณหภูมิ 17 °C ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อ

1. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และ
2. เปอร์เซนต์ของอสุจิที่มีชีวิต

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลเบื้องต้นของสารต้านการเกิดออกซิเดชั่นต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของสุกรแช่เย็น โดยเน้นผลต่อลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อเท่านั้น

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1) ได้ทราบผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชั่นต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น
2) ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประกอบการนำสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น
3) ได้สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรได้นานมากกว่าปกติ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

1. **การเตรียมสารต้านออกซิเดชั่น**

วิตามิน E วิตามิน C และ glutathione จาก Sigma ส่วนชาเขียวและดอกคำฝอย ทำการสุ่มซื้อใบ/ดอกแห้งสำเร็จรูป จากหลายๆแหล่งๆ และผสมรวมกันเป็นตัวอย่างกลุ่มเดียว การเตรียมสารสกัดจากชาเขียว และดอกคำฝอย จะใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

2. **สุกรทดลอง**

สุกรเพศผู้ อายุระหว่าง 1.5-2 ปี จำนวน 5 ตัว ให้วัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย อหิวาต์สุกร และโรคอื่นๆตามโปรแกรมการทำวัคซีนสำหรับสุกรพ่อพันธุ์ ที่กำหนดไว้เพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติ สำหรับผู้เลี้ยงสุกรทั่วไปโดยกรมปศุสัตว์

3. **ระยะเวลาในการทดลอง**

มีนาคม 2549 ถึง ตุลาคม 2550

4. **สถานที่ดำเนินการทดลอง**

ดำเนินการทดลองในส่วนของการรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรที่โครงการสุกร ฟาร์มมหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี ดำเนินการทดลองในส่วนของการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่อาคารปฏิบัติการเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

อุปกรณ์และวิธีการ

การรีดเก็บน้ำเชื้อและการเตรียมน้ำเชื้อ

สุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ มีอายุ 1-2 ปี สุกรพ่อพันธุ์ขังแยกในคอกขนาด 3x3 เมตร ($9m^2$) คอกละ 1 ตัว ภายในคอกมีจุ๊บน้ำให้กินน้ำและรางอาหาร

โรงเรือนมีละอองน้ำสเปรย์และพัดลมควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติ ให้อาหารที่มีโปรตีน 14% ให้กินวันละ 2 กก. แบ่งเป็น 2 เวลา เช้า-เย็น ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รีดเก็บน้ำเชื้อด้วยมือ (Glove hand method) ทำการเจือจางด้วยสารละลายให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 30 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 17 $^{\circ}$C และในที่มืด

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อที่รีดได้แบ่งออกเป็น 13 ส่วน เจือจางด้วยสารละลาย BTS ที่เสริมด้วยสารต้านการเกิดออกซิเดชัน คือ กลุ่มควบคุม วิตามินซี (0.25 mg/ml) วิตามินอี (400 µg/L) กลูตาไธโอน (1 mM) CLA (100 500 และ 1000 µg/L) ชาเขียว (0.10 0.25 และ 0.50 mg/ml) และสารสกัดดอกคำฝอย (0.10 0.25 และ 0.50 mg/ml) แล้วตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

การทดลองที่ 2 แบ่งน้ำเชื้อที่รีดได้ออกเป็น 15 ส่วน เจือจางด้วยสารละลายที่เสริมด้วยสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ถูกคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 โดยสารที่คัดเลือกทั้ง 3 ชนิด นี้มีผลที่มีแนวโน้มให้คุณภาพน้ำเชื้อที่ดี แบ่งออกเป็น 5 ระดับความเข้มข้น คือ กลุ่มควบคุม กลูตาไธโอน (0.25 0.50 1.00 1.50 และ 0.20 mM) วิตามินอี (100 200 400 600 และ 800 µg/L) และ สารสกัดดอกคำฝอย (0.025 0.05 0.10 และ 0.15 mg/ml) ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ วันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของวันที่ทำการเก็บรักษา

การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ โดยนำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นออกมาอุ่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วค่อย ๆ อุ่นน้ำเชื้อด้วย water bath ให้ได้อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C แล้วประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (40X)

การเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ด้วยสีย้อม eosin-nigrosin โดยการหยดน้ำเชื้อต่อสีย้อม 1:1 แล้วคนให้เข้ากันจากนั้นก็ทำเป็นแผ่นบาง ๆ รอจนแห้งหมาด แล้วประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า สีย้อม eosin จะติดสีแดงในเซลล์อสุจิที่ตายแต่ตัวที่มีชีวิตจะไม่ติดสีแดง จากนั้นนับตัวที่ไม่ติดสีแดงจากจำนวนอสุจิทั้งหมดที่พบอย่างน้อย 200 ตัว แล้วคำนวณร้อยละ(%)ของตัวอสุจิมีชีวิตต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่ม ทดสอบอิทธิพลเนื่องจากเวลา ด้วยวิธี multivariate ทดสอบแนวโน้มการตอบสนองเนื่องจากเวลา ด้วย

เทคนิค orthogonal polynomials และ Duncan's multiple range test แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย (means±SE)

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. ผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร

ผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ แสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 พบว่า กลุ่มสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ (กรดคอนจูเกเตทลิโนเลอิก ชาเขียว สารสกัดดอกคำฝอย) ไม่สามารถรักษาคุณภาพของตัวอสุจิได้ดี อย่างไรก็ตามพบว่า กลุ่มที่เสริมวิตามินอี สามารถยืดระยะเวลาและคุณภาพของตัวอสุจิได้ทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัว (43.52%) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (52.09%) ได้นานถึงวันที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (25.81% และ 53.37% ตามลำดับ) สารต้านการเกิดออกซิเดชันอีกชนิดที่ให้ผลดี คือ กลูตาไธโอน ซึ่งให้ผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรที่ดีน้อยกว่าวิตามินอี (35.81% และ 44.78% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามในการเสริมวิตามินอี กลูตาไธโอน และสารสกัดดอกคำฝอย (ความเข้มข้น 0.1 mg/ml) มีผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกนำสารเสริมทั้งสามชนิดนี้ มาศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ควรจะนำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อเพื่อรักษาคุณภาพของตัวอสุจิต่อไป

การทดลองที่ 2. ผลของชนิดและระดับของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เหมาะสม (กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย) ต่อคุณภาพและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

สารต้านการเกิดออกซิเดชัน กลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าสารต้านการเกิดออกซิเดชันอื่นๆ ซึ่งทั้งสองความเข้มข้น (0.25 และ 0.50 mM) ของกลูตาไธโอน สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรสดแช่เย็นได้นาน 5 วัน โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (แสดงดังตารางที่ 3.3) มีสูงกว่า 50% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 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 นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (แสดงดังตารางที่ 3.4) ให้ผลที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันใน กลูตาไธโอน ทั้งสองระดับความเข้มข้นคือที่ 0.25 และ 0.5 mM โดยมีค่าเท่ากับ 61.25±17.02 และ 62.29±15.50 %

ตามลำดับ และดีกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นสารละลายน้ำเชื้อที่เสริมกลูตาไธโอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mM ให้ผลในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆโดยสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 5 วัน

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ กลูตาไธโอน ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เป็นระดับที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้นาน 5 วัน ซึ่งนานกว่าสารละลายน้ำเชื้อ BTS ปกติที่สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้นานไม่เกิน 3 วัน

ตารางที่ 3.1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Antioxidants	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^{dc}	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 (100 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 ± SEM (n = 10), $^{a-e}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตารางที่ 3.2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิเมื่อเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Antioxidants	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^{ef}	44.78±25.16^{b}	39.74±23.44^{bc}	32.97±15.31^{bc}
CLA (100 µg/L)	36.99±18.91^{f}	21.66±22.02^{d}	19.12±19.59^{e}	16.90±21.30^{f}	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 ± SEM (n = 10), $^{a-h}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตารางที่ 3.3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ เมื่อเสริม กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Antioxidants	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 ± SEM, (n = 9), $^{a-d}$ อักษรที่กำกับบนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3.4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เมื่อเสริม กลูตาไธโอน วิตามินอี และสารสกัดดอกคำฝอย ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

Antioxidants	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 ± SEM (n = 9)

บทที่ 4

บทสรุป

ผลของการเสริมสารต้านการเกิดออกซิเดชันต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

1. ผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัว

การเสริมสารสกัดชาเขียวในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ทุกระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml ไม่มีผลดีต่อเปอร์เซ็นต์การการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิแต่กลับให้ผลไปในทางลบ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเลย แม้หลังจากที่ทำการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อตัวอสุจิยังมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการเจือจางด้วยการเสริมต้านการเกิดออกซิเดชันอื่น ๆ ($P<0.01$) ซึ่งจากตารางที่ 3.1 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) ได้รายงานว่าชาเขียวมีสารกลุ่มที่เรียกว่า 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) ในน้ำเชื้อสุกรได้รายงานว่า สารในกลุ่ม methyl xanthines (caffein, theobromine และ theophylline) จะไปยับยั้งการทำงานของ alkaline phosphatase และอาจจะมีผลต่อการขนส่งแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ alkaline phosphatase ในส่วนของ mitochondria จึงส่งผลให้ไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้นและในการเคลื่อนที่ต้องอาศัยการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในเซลล์ ด้วยเหตุผลนี้จึงอาจทำให้ตัวอสุจิไม่มีการเคลื่อนที่และจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า ตัวอสุจิมีการเคลื่อนรายตัวที่รวดเร็ว (hyperactivity) หลังเจือจางด้วยสารละลายเสริมชาเขียว แต่เป็นช่วงเวลาอันสั้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากกระบวนการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิที่สูงอย่างรวดเร็ว ทำให้ใช้พลังงานภายในเซลล์ (mitochondria) หมด หรือมีการใช้แคลเซียมอย่างรวดเร็ว

การเสริมกรดคอนจูเกเตดลิโนเลอิก (CLA) พบว่า การเสริม CLA ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิดีขึ้น เมื่อเก็บไว้นาน 3 วัน หลังจากเสริมมีผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.01$) จากการศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง พบรายงานว่า CLA มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ในร่างกาย โดย CLA เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ส่งผลต่อหน้าที่ของผนังเซลล์โดยอาจมีผลต่อเนื่องไปถึงการตอบสนองของเอ็นไซม์และฮอร์โมน การแทรกผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ การเคลื่อนไหวของผนังเซลล์ รวมทั้งผลต่อจำนวนและหน้าที่ของ receptor ที่ทำหน้าควบคุมการทำงานของเซลล์ (Ha, Storken, and Pariza, 1989) อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยในครั้งนี้ พบว่า การเสริม CLA ให้ผลในทางลบเมื่อเทียบกับการศึกษาจากเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ ซึ่งอาจเกิดจากผลจากองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสกัด CLA

การเสริมสารสกัดดอกคำฝอย (Safflower) พบว่า การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ทุกระดับความเข้มข้นทำให้เปอร์เซ็นต์การการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลงและต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงได้ชัดเจนตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บรักษา และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) (ตารางที่ 3.1 ,3.3) ซึ่งสารที่สำคัญในดอกคำฝอยได้แก่ 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 อย่างไรก็ตามเหตุผลที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลงยังไม่ทราบแน่ชัด

การเสริมวิตามินซีลงในสารละลายน้ำเชื้อ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลง 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) ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งมาจากการ

สลายตัวของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) วิตามินซีอาจจะทำปฏิกิริยาโดยทางอ้อมในการป้องกันการสลายตัวของไขมันในเยื่อบุเซลล์ โดยช่วยในการสังเคราะห์วิตามินอีที่ติดกับผนังเซลล์ ให้ขึ้นมาใหม่ (unpublished ascorbic, 2548) ด้วยเหตุผลนี้ วิตามินซี ไม่ได้ไปมีผลโดยตรงต่อตัวอสุจิ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิลดลง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน

การเสริมวิตามินอี มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงขึ้น ผลการศึกษาการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่เสริมวิตามินอี ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 100, 200, 400, 600 และ 800 μg/L ดังแสดงในตารางที่ 3.3 พบว่า การเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น 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 ($P<0.05$) และในวันที่ 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) มีค่าเท่ากับ 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 ($P<0.05$) การเสริมวิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 400 μg/L จากการศึกษาผลของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสดของสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นในการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 3.1) มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้ง 7 วันของการเก็บรักษาเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากว่า วิตามินอีจะไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอาศัยคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดออกซิไดส์ (วิตามินอี, 2551) ซึ่งสอดคล้องกับ Noguchi et al. (1973), อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo, 2000) ที่กล่าวว่า วิตามินอีมีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ โดย GSH-Px จะไม่เข้าทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะทำลายเซลล์ของผนังเซลล์ในขณะเดียวกัน วิตามินอีจะมีผลภายในเซลล์จะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน

การเสริมกลูตาไธโอน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิดีขึ้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิที่สูงกว่ากลุ่ม

ควบคุม เนื่องจากกลูตาไธโอน มีหน้าที่ป้องกันกลไกการเกิด oxidative stress โดยกลูตาไธโอน เป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้มีการทำงานของ glutathione peroxidase ลดลงซึ่งจะช่วยลดหรือทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ไปเป็นน้ำ (H_2O) และมีผลให้ lipid peroxidation (LPO) เปลี่ยนเป็น alkyl alcohols โดยจะมีการใช้ NADPH เป็น co-factor ร่วมด้วย (Stewart, 1996)ความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดของการใช้กลูตาไธโอนจากการทดลอง คือ ระดับความเข้มข้น 0.25 mM ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณ กลูตาไธโอน จากการศึกษาของ Luberda (2005) เท่ากับ 185.8±46.7 µM ที่พบในน้ำเชื้อ เมื่อเสริมกลูตาไธโอนจะมีผลทำให้ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่รายตัวที่ดีขึ้น ซึ่งจากการศึกษาของ Gadea, Selles, Marco, Coy, Matas, Romar, and Ruiz (2004) พบว่า ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง ปริมาณกลูตาไธโอนในสารละลายน้ำเชื้อจะลดลง ดังนั้นการรักษาปริมาณของ glutathione (GSH) ในน้ำเชื้อให้คงที่ไว้เสมอ เพื่อไม่ให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ LPO ที่ผนังเซลล์ของอสุจิจึงเป็นผลดี กลูตาไธโอนที่มีอยู่ภายในเซลล์จะถูกใช้ไปจากกระบวนการป้องกันตัวเองจาก oxidative stress ภายในเซลล์อสุจิ หลังจากที่รีดเก็บน้ำเชื้อจึงมีผลทำให้มีปริมาณของ GSH ลดลง และสอดคล้องกับการรายงานของ Johnson, Weitze, Fiser, and Maxwell (2000) ได้รายงานว่า ช่วงเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน จะเกิดการเสื่อมสภาพของตัวอสุจิ เพราะในระหว่างที่เก็บรักษาจะเกิดการสูญเสียพลังงาน มีผลให้การนำแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ลดลง เป็นผลทำให้การเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิ (motility) ลดลงและผนังเซลล์ก็ถูกทำลายด้วย ทั้งนี้เพราะ LPO ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก และส่วนของ unsaturated fatty acid ใน phospholipids ของผนังเซลล์ จึงเป็นเหตุให้ส่วนไขมันที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งมีผลเปลี่ยนความสมดุลของไขมันที่ผนังเซลล์ ดังนั้นจะถูกป้องกันด้วย superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase/reductase system ซึ่งจะไม่มีการสร้างเพิ่มเติมจาก Sertoli cell เหมือนกับตอนที่ยังอยู่ภายใน seminiferous tubule

2. **ผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ**

การเสริมชาเขียว ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ซึ่งจะเห็นว่ามีเปอร์เซ็นต์การชีวิตสูงตั้งแต่วันแรกที่ทำการเสริมจนกระทั่งวันที่ 7 ของการเก็บรักษา เนื่องจากสารชาเขียวมีวิตามิน ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี และวิตามินบีรวม เป็นสารประกอบ (Dulloo et al., 1999) จึงเป็นผลดีต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ

การเสริมวิตามินอีลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 400 µg/L พบว่า ไม่ได้มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่วันแรกหลังจากการเจือจางจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ดังเช่น ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 66.12±9.50 และ 69.73±9.30% (วิตามินอี และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) (ตารางที่ 3.4) เนื่องจากวิตามินอี มีหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ผนังเซลล์ โดย GSH-Px จะไม่ทำลายเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ก่อนที่จะมีการทำลายของผนังเซลล์ ในขณะที่วิตามินอีจะมีผลภายในผนังเซลล์โดยจะทำการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขึ้นในชั้นของผนังชั้นไขมัน (Noguchi et al., 1973 อ้างถึงใน Smith and Akinbamijo, 2000) และจากการศึกษาของ Breininger, Beorlegui, O'flaherty, and Beconi (2005) ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 500 µg/ml มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.15, 26.17 และ 28.16 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้วิตามินอียังมีผลร่วมกับซีลิเนียมเมื่อเสริมลงในอาหารของสุกรพ่อพันธุ์ ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อทั้งความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หมู่ (mass movement) ของตัวอสุจิดีขึ้น และสุกรพ่อพันธุ์มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง (Smith and Akinbamijo, 2000)

การเสริมกลูตาไธโอน ให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ มีค่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ดังเช่น ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ เท่ากับ 64.78±14.59 และ 67.78±5.75% (กลูตาไธโอน และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) เนื่องจากกลูตาไธโอนมีหน้าที่ป้องกันกลไกการเกิด oxidative stress เป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้มีการทำงานของ glutathione peroxidase ลดลงหรือช่วยทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 (hydrogen peroxide) ให้ได้น้ำ (H_2O) และลด lipid peroxidation (LPO) ในส่วนของผนังเซลล์ (Stewart, 1996)

การเสริมวิตามินซี ระดับความเข้มข้น 0.25 mg/ml ลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร พบว่า มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.01$) ตั้งแต่วันแรกที่ได้รับการเสริม (แสดงดังตารางที่ 3.2) ดังนั้นแล้วจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อสุกร โดย Dalvit, Cetica, and Beconi (1997) ได้ให้ความเห็นว่า วิตามินซี (ascorbic acid) จะมีผลต่อตัวออกซิไดส์ที่มีความเข้มข้นต่ำและมีตัวต้านออกซิเดชันที่สูง และจากคุณสมบัติของวิตามินซี เมื่อละลายน้ำอาจจะมีฤทธิ์เป็นกรด

การเสริมสารสกัดดอกคำฝอยในสารละลายน้ำเชื้อสุกร ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml พบว่า ในวันที่ 1, 3 และ 4 ของการเก็บรักษา มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิที่ต่ำ

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด

การเสริม CLA ในสารละลายน้ำเชื้อ มีผลทางลบต่อคุณภาพน้ำเชื้อในส่วนของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ จากเอกสารที่เกี่ยวข้องได้รายงานว่า CLA เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จะมีผลต่อหน้าที่ของผนังเซลล์และโครงสร้างของผนังเซลล์ (CLA, 2008) ผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ในการวิจัยในครั้งนี้อาจเกิดจากผลขององค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสกัด CLA ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ให้ผลในการเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่ให้ผลดีที่สุดคือ กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 0.25 mM เพราะเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด โดยสามารถช่วยให้สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้นานถึง 5 วัน ซึ่งนานกว่าสารละลายน้ำเชื้อ BTS ปกติที่สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้นานไม่เกิน 3 วัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและการพัฒนาการเลี้ยงสุกรของประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไป

บรรณานุกรม

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

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.

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.

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.

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

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

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

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

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

ประวัติผู้วิจัย

ผศ.น.สพ.ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์ ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกิดวันศุกร์ที่ 1 เดือนมกราคม พุทธศักราช 2514 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีพุทธศักราช 2538 จากนั้นเดินทางไปศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิตในสาขาสรีรวิทยาที่ มหาวิทยาลัยแมนเชสเตอร์ ประเทศอังกฤษ สำเร็จการศึกษาในปีพุทธศักราช 2546 ขณะกำลังศึกษา ณ สถานศึกษาดังกล่าว ได้รับทุน Oversea Research Student (ORS) Scholarship และ University Research Studentship จากมหาวิทยาลัยฯ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ปัจจุบันปฏิบัติงานที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ถนนมหาวิทยาลัย 1 ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000 มีประสบการณ์ในการวิจัยและผลงานทางวิชาการทางด้านสรีรวิทยาในสัตว์ที่ได้รับการตีพิมพ์ผลงานฉบับเต็มในวารสารนานาชาติ วารสารไทย และบทคัดย่อในวารสารนานาชาติจำนวนหลายเรื่อง