

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2567

SPERM CRYOPRESERVATION OF BOER GOAT



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2024

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


(ผศ. ดร. ยุพิน จาสุข)

ประธานกรรมการ


(ผศ. ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)


(ผศ. น.สพ. ดร. ภาณิจ คุปพิทยานันท์)

กรรมการ


(รศ. ดร. อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ


(รศ. ดร. ปราโมทย์ แพงคำ)

กรรมการ


(รศ. ดร. ยุพาพร รักสกุลพิวัฒน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและประกันคุณภาพ


(ศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

พาริดา สุวอ : การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง (SPERM
CRYOPRESERVATION OF BOER GOAT) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์, 82 หน้า.

คำสำคัญ: การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง/สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง/ไข่แดง/เลซิตินจากถั่ว
เหลือง/สารต้านอนุมูลอิสระ/ปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาสารป้องกันอันตรายจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อ และสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยแบ่งการศึกษา ออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้คอมบินชั่นของสารป้องกันอันตราย จากการแช่แข็ง จากแหล่งเลซิตินที่มาจากถั่วเหลืองและไข่แดง ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล ต่อคุณภาพ ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร ชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิ ด้วยเทคนิค Synchrotron-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (SR-FTIR) และ การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อ คุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง สำหรับการทดลองที่ 1 พบว่า การใช้ Tris-base extender ที่มีค่าออกซิโมลาลิตีใกล้เคียงกับออกซิโมลาลิตีของน้ำเชื้อแพะบอร์ ร่วมกับการใช้สารป้องกันอันตราย จากการแช่แข็ง กลีเซอรอล (5%) ร่วมกับไข่แดง (18%) มีอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไป ข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา แต่มีค่าต่ำกว่า สูตรทางการค้า ($P < 0.05$) เมื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ด้วยเทคนิค SR-FTIR พบว่า สามารถ บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะได้ โดยการใช้กลีเซอรอล (5%) ร่วมกับไข่แดง (18%) ส่งผลให้เซลล์อสุจิมีปริมาณของ ลิพิด เอสเทอร์ลิพิด และโปรตีนทุติยภูมิชนิด α -helix สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ($P < 0.05$) ซึ่งสามารถใช้โปรตีนทุติยภูมิชนิด α -helix เป็น ดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำเชื้อได้ โดยเปอร์เซ็นต์ของ α -helix ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์อสุจิรวมตัวกับ เซลล์ไข่ได้ง่ายขึ้น การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิดที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ กลูตาไธโอน ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, และ 5 มิลลิโมลาร์, ซีเอสเอ็ม ที่ระดับ ความเข้มข้น 6, 9, และ 12 มิลลิโมลาร์ และวิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, และ 3 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ และใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัว ควบคุม ผลการศึกษา พบว่า เมื่อใช้ กลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มความ สมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และความสมบูรณ์ของอะโครโซมได้ดีกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) นอกจากนี้ พบว่า การเสริมกลูตาไธโอน หรือวิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.01 และ 2.96 นาโนโมล/ มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า ($P > 0.05$) อีกทั้งการเสริมกลูตาไธโอน 1

มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เมื่อเทียบกับสูตรทางการค้าและน้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เมื่อนำไปผสมเทียม พบว่า กลูตาไธโอน 1 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผสมติด เท่ากับ 66.67% ซึ่งสูงกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีค่า เท่ากับ 37.50% ดังนั้น การเสริมกลูตาไธโอน 1 มิลลิโมลาร์ น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง เพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตแพะในอนาคต



สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา _____ ฟร้ง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____ รัตน์

FAREEDA SUWOR : SPERM CRYOPRESERVATION OF BOER GOAT. THESIS

ADVISOR : ASST. PROF. SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 82 PP.

Keyword: SPERM CRYOPRESERVATION/CRYOPROTECTANT/EGG YOLK/SOYBEAN LECITHIN/
ANTIOXIDANT/LIPID PEROXIDATION

The objective of this study was to examine the effects of cryoprotectants and antioxidants on sperm cryopreservation of the Boer goat. Two experiments were carried out. The first experiment was to evaluate the effects of cryoprotectant (glycerol) with the combinations of soybean lecithin and egg yolk on frozen semen quality and biomolecular changed in sperm cells of Boer goat using Synchrotron-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (SR-FTIR). The second experiment was to investigate the effects of different concentrations of antioxidants glutathione (GSH), cysteine, and vitamin E on the sperm cryopreservation of Boer goat. Experiment one found that a tris-base extender with an osmolality similar to Boer goat semen and the combination of glycerol (5%) + Egg yolk (18%) yielded a higher total motility, progressive motility, and viability compared to the other treatments ($P < 0.05$), but lower than that of the control group (Andromed). In addition, this study found that the combinations of glycerol (5%) and egg yolk (18%) yielded a higher lipid, ester lipid, and secondary protein (α -helix) compared to the other treatments ($P < 0.05$). An increase in α -helix content was correlated to sperm capacitation. Experiment two was conducted to investigate the effects of different concentrations of three antioxidants (GSH, cysteine, and vitamin E) on the sperm cryopreservation of Boer goat. The sperm was diluted with a tris-based extender and different concentrations of each antioxidant with respective concentrations (1, 3, and 5 mM for GSH), (6, 9, and 12 mM for cysteine) and (1, 2, and 3 mM for vitamin E) were supplemented, and mixed with combinations of glycerol (5%) and egg yolk (18%). The extender with no antioxidant supplementation was also tested, and Andromed was used as a control. The results showed that the addition of 1 mM GSH yielded a higher membrane integrity and acrosome integrity compared to the other treatments ($P < 0.05$). Furthermore, adding 1 mM of GSH or 1 mM of vitamin E decreased the lipid peroxidation of the frozen semen (3.01 and 2.96 nmol/mL,

respectively). These showed significantly better results than those of the other treatments $P < 0.05$, but did not show a significant difference to Andromed ($P > 0.05$). Nevertheless, supplementation with 1 mM of GSH did not show a significant difference in DNA methylation compared to those of Andromed and fresh sperm ($P > 0.05$). Artificial insemination was also tested and it was found that 1 mM of GSH yielded a fertilization rate of 66.67% compared to Andromed which was 37.50%. Thus, this study suggests that 1 mM of GSH can be considered as an alternative antioxidant for semen cryopreservation of Boer goat, which can lead to increased goat production in the future.



School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Fareeda
Academic Year 2024 Advisor's Signature Samorn S.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ โดยได้รับคำแนะนำ ช่วยเหลือ และตรวจแก้ไขของผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษาแนะนำ คอยช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และนอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพิน ผาสุข จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้เป็นประธานกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.ภคินิจ คุปพิทยานันท์ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมหี และรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ แพงคำ ผู้เป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ น.สพ.อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ การย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางช่อง จังหวัด นครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์น้ำเชื้อ ขอขอบพระคุณ คุณจิรภา ขาวสุข ที่ช่วยสอนเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กาญจนา ธรรมนุ ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์ และ ดร. ศิริวรรณ ณะวงษ์ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือในการศึกษา SR-FTIR ช่วยสอนและให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณธำรา วงศ์ดี คุณสรศักดิ์ ทองแพะ คุณวิฑูรย์ น้อยนันทะ คุณสุนัย พลายมี ที่ได้มีส่วนช่วยให้งานทดลองสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณการสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอขอบคุณการให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์และสถานที่ จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และฟาร์มแพะแกะ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขอขอบคุณ ฟาร์มเกษตรกรรมวัดเที่ยงฟาร์ม อำเภอนนไทย จังหวัดนครราชสีมา สหกรณ์การเกษตรด่านขุนทดจำกัด และฟาร์มเกษตรกร บ้านหนองกรด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์แม่พันธุ์แพะ สำหรับการทดสอบการผสมติด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา รวมถึงบุคคลในครอบครัวที่ให้การเลี้ยงดูอบรมดูแล ส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ฟารีดา สุวอ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานงานวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ระบบสืบพันธุ์ในแพะเพศผู้.....	5
2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของอสุจิ	5
2.3 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ	7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง	7
2.5 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะ แบบแช่แข็ง	11
2.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค SR-FTIR ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ.....	12
2.7 กลไกและบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง	14
2.8 ผลของสาร Antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1	การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	19
3.2	วิธีการศึกษา.....	20
3.2.1	การรีดน้ำเชื้อ.....	20
3.2.2	การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืช และสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง.....	20
3.2.2.1	การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง.....	22
	1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า.....	23
	2) การประเมินอัตราการมีชีวิต.....	24
	3) การประเมินน้ำเชื้อด้วยเทคนิค SR-FTIR.....	24
3.2.3	การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง.....	27
3.2.3.1	การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง.....	29
	1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า.....	29
	2) การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	29
	3) การประเมินระดับการเกิดปฏิกิริยา Lipid Peroxidation.....	30
	4) การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation.....	32
	5) การประเมินอัตราการผสมติด.....	35
4	ผลการศึกษาและอภิปรายผล.....	37
4.1	การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง.....	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1	ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดิน ที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อน และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง.....	37
4.1.2	ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดิน ที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเซลล์ อสุจิแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง.....	39
4.2	การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง.....	45
4.2.1	ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตรา การเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงาน ของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation.....	45
4.2.2	ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการเกิด DNA methylation และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ แซ่แข็ง.....	50
5	สรุปและข้อเสนอแนะ.....	53
5.1	บทสรุป.....	53
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	53
	รายการอ้างอิง.....	55
	ภาคผนวก.....	66
	ภาคผนวก ก อุปกรณ์ และสารเคมี.....	67
	ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลวิเคราะห์หาปริมาณ.....	74
	ประวัติผู้เขียน.....	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ส่วนประกอบไอออนในเลือด ค่า Osmolality และค่า pH ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์ต่างๆ9
2.2	บทบาทของสาร Antioxidant ในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะที่ทำการ เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 18
3.1	แผนการทดลองการศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่ง เลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง 22
3.2	ค่า Sperm setup ของน้ำเชื้อแพะ 23
3.3	แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการ เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 28
4.1	ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและ สัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง (Mean±SE)..... 37
4.2	ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืช และสัตว์ ต่อสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean+SE)..... 41
4.3	เปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของโปรตีนทุติยภูมิ Amide I ในช่วงสเปกตรัม 1700-1600 cm ⁻¹ ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง (Mean+SE)..... 43
4.4	ผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ 3 ระดับความ เข้มข้น ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง (Mean ± SE) 46
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตรา การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อ หุ้มเซลล์การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation) กับระดับของ DNA methylation 51

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	อวัยวะสืบพันธุ์ของแพะเพศผู้..... 5
2.2	โครงสร้างของเซลล์อสุจิ 6
2.3	สภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง ค่าออสโมลาลิตีเท่ากัน และค่าออสโมลาลิตีต่ำ..... 8
2.4	ลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง IR ของสารชีวโมเลกุล..... 13
2.5	กลไกของสาร Antioxidant ภายในเซลล์ 15
2.6	ผลของภาวะเครียดออกซิเดชันต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ โครงสร้างของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง..... 16
3.1	แผนภาพการทดลองที่ 1 22
3.2	อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin..... 24
3.3	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค SR-FTIR..... 25
3.4	แผนภาพการทดลองที่ 2 29
3.5	เซลล์อสุจิที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง H324, PI, FITC-PSA และ JC-1 ภายใต้กล้อง Confocal laser scanning microscope (กำลังขยาย 400 เท่า) 31
4.1	Average absorbance FTIR spectra ในช่วงสเปกตรัม 4000–900 cm^{-1} และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสองในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 40
4.2	การวิเคราะห์สัดส่วนโดยการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุลโปรตีน Amide I ในช่วงสเปกตรัม 1700-1600 cm^{-1} 42
4.3	PCA scores plot และภาพ Correlation loadings plot ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง 44
4.4	ผลของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์โครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และระดับของ MDA ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง 47
4.5	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ 5-mC และระดับ 5-mC ที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation..... 50

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	Analysis of variance
SOD	=	Superoxide dismutase
CAT	=	Catalase
CASA	=	Computer assisted semen analysis
CLC	=	Cholesterol-loaded cyclodextrin
GSH	=	Glutathione
GPx	=	Glutathione peroxidase
DMA	=	Dimethyl acetamide
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
IR	=	Infrared
MDA	=	Malondialdehyde
MeOH	=	Methanol
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
SR-FTIR	=	Synchrotron-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
ATP	=	Adenosine triphosphate
ROS	=	Reactive oxygen species
SR-FTIR	=	Synchrotron Fourier Transform Infrared spectroscopy
Na ⁺	=	Sodium cation
K ⁺	=	Potassium cation
Zn ²⁺	=	Zinc cation
Ca ²⁺	=	Calcium cation
Cl ⁻	=	Chlorine ion
Mn ²⁺	=	Manganous cation
Mg ²⁺	=	Magnesium cation
H ₂ O ₂	=	Hydrogen peroxides
PCPs	=	Poria cocos polysaccharides
NaCl	=	Sodium chloride

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PI	=	Propidium iodide
H342	=	Hoechst 33342
FITC-PSA	=	Fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin
JC-1	=	5,5', 6,6'-Tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide
DPBS	=	Dulbecco's phosphate-buffered saline
TBARs	=	Thiobarbituric acid reactive substant
TCA	=	Trichloroacetic acid
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
TBA	=	Thiobarbituric acid
DTT	=	Dithiothreitol
OD	=	Optical density
PGF2 α	=	Prostaglandin F2 alpha
PMSG	=	Pregnant mare serum gonadotrophin
PC	=	Phosphatidylcholine
PE	=	Phosphatidylethanolamine
SM	=	Sphingomyelin
PS	=	Phosphatidylserine
PI	=	Phosphatidylinositol
PA	=	Phosphatidic acid
LDL	=	Low-density lipoprotein
PCA	=	Principal component analysis
RNS	=	Reactive nitrogen species
GSSG	=	Oxidized glutathione
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในช่วงที่ผ่านมาประเทศไทย มีจำนวนแพะและคนประกอบอาชีพเลี้ยงแพะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับทุกปี ในปี 2560 มีจำนวนแพะประมาณ 650,000 ตัว และในปี 2566 มีจำนวนแพะประมาณ 1,568,000 ตัว ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 2.4 เท่า (นวรรตน์, 2566) แพะจึงจัดได้ว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจตัวใหม่ที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยแพะพันธุ์บอร์เล็อดร้อย มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว ให้เปอร์เซ็นต์ซาก และเปอร์เซ็นต์เนื้อแดงสูง นอกจากนี้ยังมีความทนทานต่อโรค และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตอากาศร้อนได้ดี (Naing *et al.*, 2010) จึงนิยมนำแพะพันธุ์บอร์มาผสมข้ามพันธุ์เพื่อผลิตเป็นแพะเนื้อลูกผสม (Anothaisinthawee *et al.*, 2010) แต่การขยายการผลิตยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากแพะส่วนหนึ่งมีการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยในระหว่างปี 2563-2565 มีการนำเข้าแพะ จำนวน 2,936 ตัว ส่วนใหญ่มาจากประเทศแอฟริกาใต้ สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย (คมสัน และ อินทอร, 2567) ส่งผลให้มีราคาสูง เกษตรกรส่วนใหญ่จึงอาศัยการปรับปรุงพันธุ์แพะ โดยใช้เทคนิคการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากแพะพันธุ์ดี เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต ปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์แพะให้ดีขึ้น แทนการใช้พ่อพันธุ์ที่มีมูลค่าสูง (Zuidema *et al.*, 2021) อีกทั้งยังสามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดจากการผสมพันธุ์ เช่น โรคบลูเซลโลซิส (Lone *et al.*, 2017) แต่อย่างไรก็ตามการผสมเทียมโดยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งยังพบปัญหาการผสมติดต่ำ เนื่องมาจากขาดการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพ

จากการตรวจสอบเอกสารการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งนั้น ส่วนใหญ่นิยมใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นสารเจือจาง และสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในแพะทุกพันธุ์ (พันธุ์เนื้อ พันธุ์นม และพันธุ์กึ่งนมกึ่งเนื้อ) ซึ่งพบปัญหาการผสมติดต่ำประมาณ 32-41% (Liang *et al.*, 2022; Nordstoga *et al.*, 2011) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในน้ำเชื้อแพะแต่ละพันธุ์มีค่าออสโมลาลิตีที่แตกต่างกันส่งผลให้องค์ประกอบของไอออนในน้ำเชื้อแตกต่างกัน (Purdy, 2006) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ต้องอาศัยการทำงานของสารเจือจาง (Extender) สำหรับเจือจางน้ำเชื้อ และเป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์อสุจิ โดยการเลือกใช้สารเจือจางนั้น ควรมีค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ใกล้เคียงกับเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา หากอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำจะทำให้เซลล์อสุจิบวม และในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูงจะทำให้เซลล์เหี่ยว ร่วมกับการใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant) ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันอันตรายของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย ส่วนใหญ่นิยมใช้ Egg yolk ที่เป็นแหล่งเลซิตินจากสัตว์ พบว่า

สามารถปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง เพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะ (Galián *et al.*, 2023; Shama *et al.*, 2020) นอกจากนี้ มีการศึกษาการใช้ Soybean lecithin ที่เป็นแหล่งเลซิตินจากพืช พบว่า สามารถทดแทนการใช้ Egg yolk ได้ และช่วยเพิ่มอัตราการผสมติด (Chelucci *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตาม การใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว หากใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปจะไม่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิได้ ในขณะที่การใช้สาร Cryoprotectant ร่วมกันทั้งสองชนิด (Combination cryoprotectant) สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์อสุจิ ซึ่งอาจจะช่วยลดความเป็นพิษกับเซลล์ได้ดีกว่าการใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว ด้วยเหตุนี้ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา Combination cryoprotectant โดยใช้ Glycerol ร่วมกับแหล่งเลซิตินที่มาจากสัตว์ (Egg yolk) และแหล่งเลซิตินที่มาจากพืช (Soybean lecithin) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิ โดยใช้เทคนิค Synchrotron-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (SR-FTIR) ร่วมกับการประเมินคุณภาพ น้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับเทคนิคอื่นๆ ทั้งนี้เพื่อช่วยในการคัดเลือกทรีตเมนต์ได้แม่นยำมากขึ้น

นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งนั้น เซลล์อสุจิอาจถูกทำลายเนื่องจากภาวะเครียดของเซลล์ ซึ่งได้แก่ ภาวะเครียดที่เกิดจากออสโมติก (Osmotic stress) การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) เป็นต้น (Shafiei *et al.*, 2015) ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการปฏิสนธิลดลง และลดความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยเซลล์อสุจิแพะมีส่วนส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในปริมาณสูง จึงมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ทำให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Gangwar *et al.*, 2015) โดยภายในเซลล์ของเซลล์อสุจิมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสาร Antioxidant เหล่านี้ จะลดลงในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Frau *et al.*, 2020) และการผลิตอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROS) เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การทำงานของเซลล์บกพร่อง สูญเสียความสามารถในการรักษาสภาวะสมดุลของปริมาตรและเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ มีผลต่อโมเลกุลของโปรตีน เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เปลี่ยนการทำหน้าที่ของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับโปรตีนภายในเซลล์ต่อโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนลำดับเบสของดีเอ็นเอ หรือสายดีเอ็นเอแตกหัก และเกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ได้ (Frau *et al.*, 2020; Ozer *et al.*, 2018) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมรวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางเอพิเจเนติกส์ (Epigenetics) ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ซึ่งสามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ที่เกิดขึ้นในเซลล์ของอสุจิ โดยกระบวนการ DNA methylation เป็นกระบวนการหลักที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน มีการรายงานพบว่า กระบวนการ DNA methylation ที่ผิดปกติในเซลล์อสุจิมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดต่ำ และการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลง (Capra *et al.*, 2019) ประกอบกับความไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้อัตราการมีชีวิต การเคลื่อนที่ การผสมติดลดลง และยับยั้งการเจริญของบลาสโตซิสต์ (Al-Mutary *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2019) งานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง พบว่า การเสริมสาร Antioxidant เช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione (GSH), Cysteine, Vitamin E, และ Vitamin C เป็นต้น สามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ อย่างไรก็ตาม ชนิดและความเข้มข้นของสาร Antioxidant ที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์แพะ ชนิดของสาร Extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่ใช้ (Adekunle *et al.*, 2022; Das *et al.*, 2021; Gadea *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2021)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 2 ข้อ คือ 1) เพื่อศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ร่วมกับการใช้ Glycerol ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิโดยใช้เทคนิค SR-FTIR และ 2) ศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ตลอดจนศึกษาการเกิด DNA methylation เพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกสุตรน้ำเชื้อแช่แข็ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ร่วมกับการใช้ Glycerol ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

1.3.1 การใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืช (Soybean lecithin) สามารถทดแทนการใช้แหล่งเลซิตินที่มาจากสัตว์ (Egg yolk) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็งได้

1.3.2 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็งในครั้งนี้ ใช้น้ำเชื้อจากแพะพ่อพันธุ์บอร์ที่มีอายุประมาณ 2-3 ปี มีระดับคะแนนร่างกายที่ 3.0 น้ำหนักอยู่ในช่วง 60-70 กิโลกรัม โดยมุ่งประเด็นการศึกษา แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ร่วมกับการใช้ Glycerol ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งจากอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ ด้วยเทคนิค SR-FTIR

การทดลองที่ 2 ทำการเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 มาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ และการเปลี่ยนแปลงของการเกิด DNA methylation ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

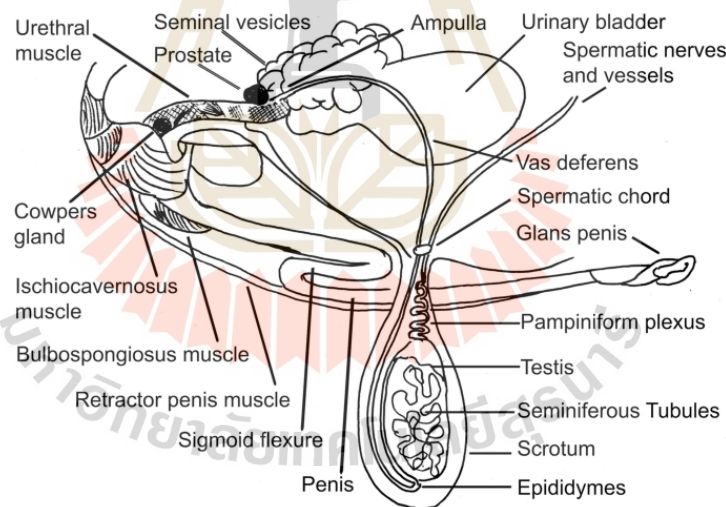
ทำให้ทราบ Combination ของสาร Cryoprotectant ชนิดและความเข้มข้นของสาร Antioxidant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง และได้สูตรวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็งที่เหมาะสมกับแพะพันธุ์บอร์ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิต และการปรับปรุงพันธุ์แพะ ด้วยวิธีการผสมเทียม ซึ่งหน่วยงานขององค์กรภาครัฐที่เกี่ยวข้อง หรือกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบสืบพันธุ์ในแพะเพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ของแพะเพศผู้มีรูปร่างคล้ายกับสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมชนิดอื่น 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

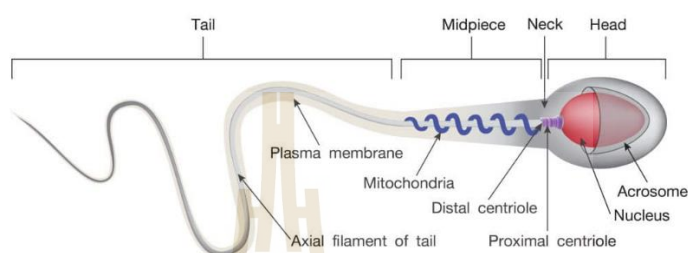
ที่มา : Das *et al.* (2023)

2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของอสุจิ

น้ำเชื้อของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมประกอบด้วย 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 และสารรักษาสภาพความเป็นกรดต่างให้เซลล์อสุจิ 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 รักษาระดับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์อสุจิ 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

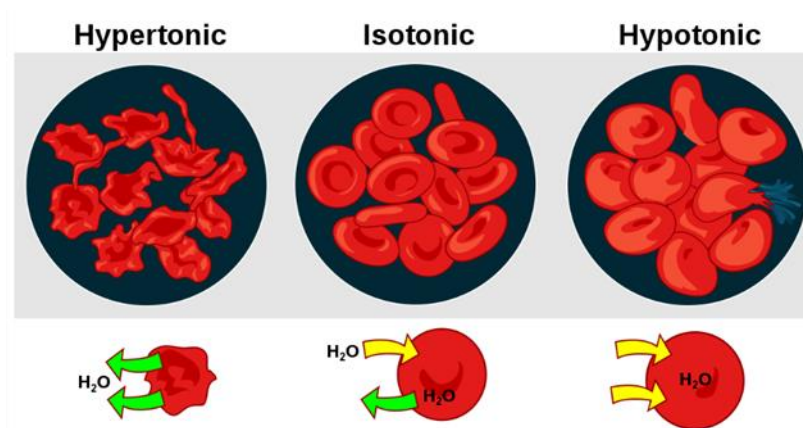
2.3 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

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 : สมร และคณะ (2563; 2564)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การเลือกใช้สาร Extender ควรคำนึงถึงค่า pH และค่า Osmolality ให้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษานั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้สาร 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 ที่เป็นแหล่งเลซิทีนจากสัตว์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง 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 ที่เป็นแหล่งเลซิทีนจากพืช 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 ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง 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 ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาการใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

2.5 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง

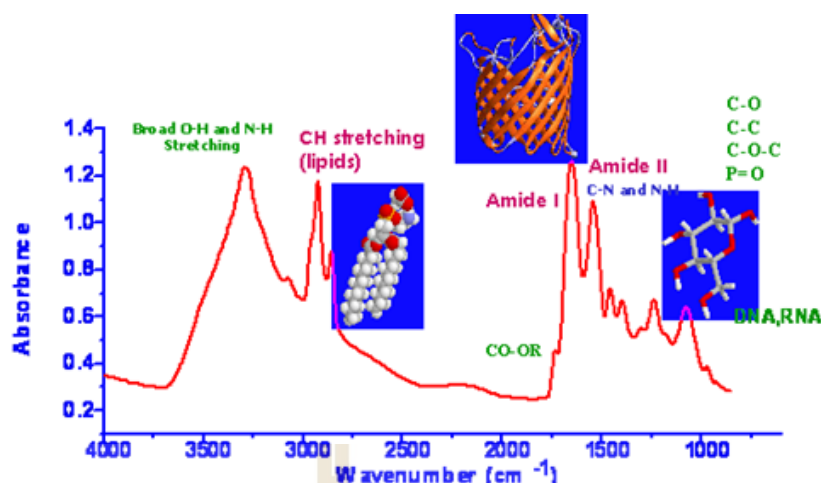
จากการรวบรวมเอกสารผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง การศึกษาของ Shama *et al.* (2020) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Gaddi พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 6% และ Egg yolk (5 และ 10%) สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และลดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติ 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 นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้มีแนวคิดในการใช้เทคนิค 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 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Capacitation ของเซลล์อสุจิมนุษย์ โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่าปริมาณ α -helix ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ 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 โดยการเติมสารไฮยาไนด์ลงในน้ำเชื้อของหนู ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.64, 1.2,

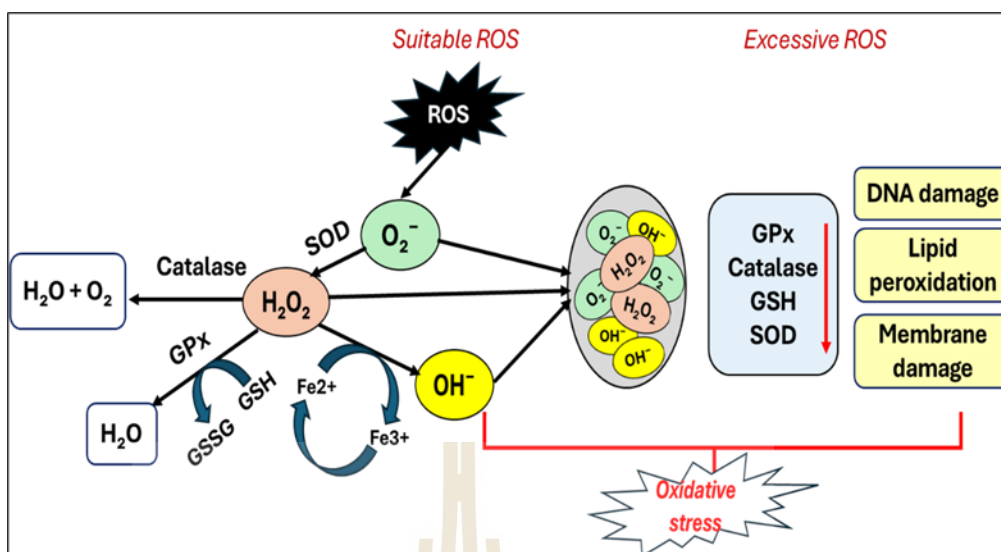
และ 3.2 mg/kg เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า การเสริมสารไซยาไนด์ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลของเซลล์สุจิหลุดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าในเซลล์สุจิที่เสริมสารไซยาไนด์ความเข้มข้นต่ำ (0.0 และ 0.64 mg/kg) มีปริมาณของ α -helix สูงและ β -sheet ต่ำกว่าเซลล์สุจิที่เสริมสารไซยาไนด์ความเข้มข้นสูง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

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

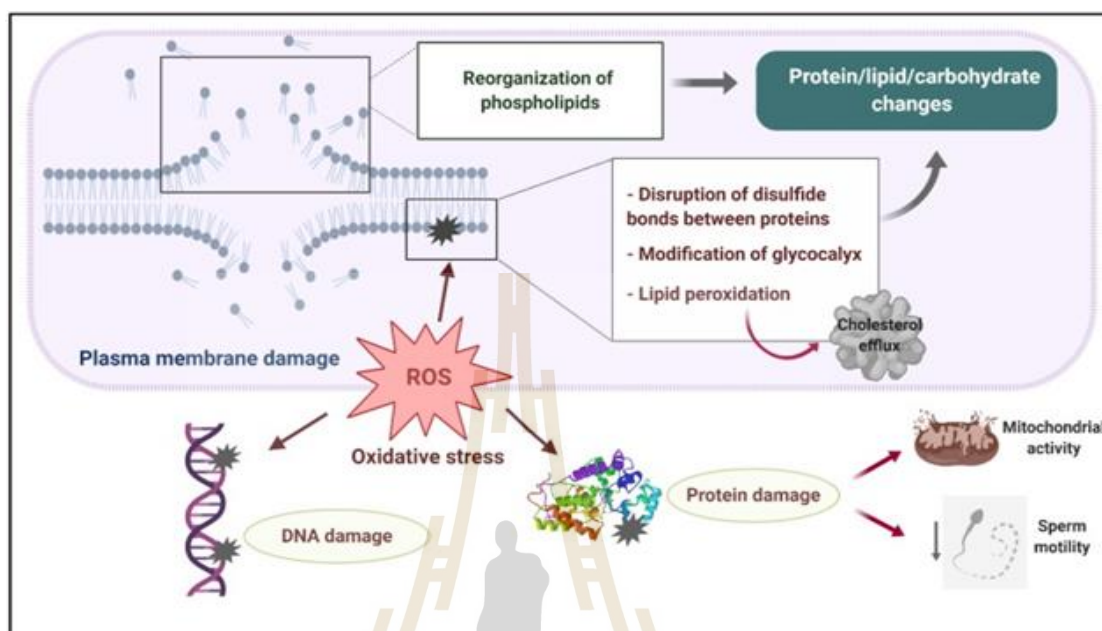


ภาพที่ 2.5 กลไกของสาร Antioxidant ภายในเซลล์
ที่มา : Lu *et al.* (2018)

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

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน 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 ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ 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_2O_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_2O_2	Das <i>et al.</i> (2021)
CAT	สาร Antioxidant ชนิดเอนไซม์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_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

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง มีการดำเนินการทดลองทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ สำหรับการดำเนินการในภาคสนามที่ฟาร์มแพะแกะ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ฟาร์มเกษตรกรรมวัดเที่ยงฟาร์ม อำเภอโนนไทย สหกรณ์การเกษตรด่านขุนทดจำกัด อำเภอด่านขุนทด และฟาร์มเกษตรกร บ้านหนองกรด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา และในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการกลางโรงเพาะฟัก AF2-2001 ฟาร์มมหาวิทยาลัย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัด นครราชสีมา และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination สาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะ โดยใช้เทคนิค SR-FTIR

การทดลองที่ 2 ทำการเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 มาศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง การเกิดกระบวนการ DNA methylation และอัตราการผสมติด โดยมีการเตรียมสัตว์ทดลอง พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

แพะพ่อพันธุ์บอร์ จำนวน 2 ตัว อายุประมาณ 2-3 ปี มีระดับคะแนนร่างกายที่ 3.0 น้ำหนักอยู่ในช่วง 60-70 กิโลกรัม เลี้ยงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการเลี้ยงแบบแยกคอกเป็นรายตัวให้อยู่ในสภาพแวดล้อม กินอาหารแบบเดียวกัน คือ อาหารข้นผสมสำเร็จรูปที่มีปริมาณโปรตีน 18% อาหารหยาบ (ข้าวโพดหมัก) โดยให้อาหาร 2.5% ของน้ำหนักตัว และให้กินน้ำแบบเต็มที่ ทำการถ่ายพยาธิ ฉีดยาบำรุงให้กับพ่อพันธุ์แพะทุกตัว โดยงานวิจัยนี้มีการขออนุญาตใช้สัตว์ดังหมายเลขคำขอคือ U1-02632-2559

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 การรีดน้ำเชื้อ

ขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- 1) คัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ จากนั้นเช็ดทำความสะอาดอวัยวะเพศด้วยน้ำสะอาดและแอลกอฮอล์ วัดอุณหภูมิร่างกายไม่เกิน 40°C และเตรียมอุปกรณ์สำหรับรีดน้ำเชื้อ
- 2) นำแพะตัวเมียที่เป็นสัตว์มาล่อไว้ในช่องบังคับเพื่อเป็นตัวล่อ ปลอຍให้พ่อพันธุ์ขึ้นทับตัวเมีย และสวมโยนีเทียม (Artificial vagina) ไว้ที่อวัยวะเพศของพ่อพันธุ์ จากนั้นพ่อพันธุ์จะปลอຍน้ำเชื้ออย่างรวดเร็ว เมื่อได้น้ำเชื้อแล้วถอด tube ออกจากช่องคลอดเทียม ปิดจุก และห่อด้วยพอยล์เพื่อป้องกันแสง และนำส่งห้องปฏิบัติการ
- 3) นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยประเมินจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ซึ่งจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 70% ขึ้นไป โดยใช้ Computer Assisted Semen Analysis (CASA) (HTT-CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)
- 4) วัดความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (sperm/mL) ด้วยเครื่อง Photometer SDM 1 (Minitube International AG, Germany) ซึ่งค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อแพะที่นำศึกษามาจะต้องอยู่ในช่วง 1,100-6,500 ล้านตัว/mL นำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 g เป็นเวลา 3 นาที และนำส่วนเซมินอลพลาสมา มาวัดค่าออสโมลาลิตีโดยใช้เครื่องออสโมมิเตอร์ โดยขณะตรวจวัดจะรักษาอุณหภูมิน้ำเชื้อโดยการแช่ในอ่างน้ำอุ่น 37°C จากนั้นนำน้ำเชื้อไปเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยมีขั้นตอน ดังแสดงในการทดลองที่ 1

3.2.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

การศึกษาคผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง เปรียบเทียบการใช้แหล่งเลซิดินที่มาจากพืช (Soybean lecithin) และแหล่งเลซิดินจากสัตว์ (Egg yolk) โดยใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) จำนวน 6 ซ้ำ/ทรีตเมนต์ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

- 1) เตรียมส่วนประกอบของสาร Tris-base extender (Tris 250 mM, Citric acid 88.5 mM, Fructose 69.38 mM และ Lincospecs 300 μ L) ที่มีค่า pH และ Osmolality เท่ากับ 6.08 ± 0.01 และ 321 ± 1.83 mOsm/kg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH และ Osmolality ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (6.18 ± 0.11 และ 321 ± 4.42 mOsm/kg) จากนั้นเติมสาร Cryoprotectant ที่ใช้ในแต่ละทรีตเมนต์ ดังนี้ T1: Glycerol 5% + Soybean lecithin 1%, T2:

Glycerol 5% + Soybean lecithin 3%, T3: Glycerol 5% + Egg yolk 10%, T4: Glycerol 5% + Egg yolk 18% และ T5: สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม รายละเอียดของทรีตเมนต์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

2) นำน้ำเชื้อสด และสาร Cryodiluent (สาร Extender + สาร Cryoprotectant) มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการตรวจวัดอัตราการเคลื่อนที่ โดยเจือจางน้ำเชื้อสดในสาร Extender (ใช้น้ำเชื้อสด 7 μ L และสาร Extender 500 μ L) ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง CASA หากอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 70% ทำการคัดทิ้ง

3) ตรวจวัดความเข้มข้น จำนวนอสุจิ/mL ด้วยเครื่อง Photometer (SDM 1, Minitab International AG, Germany) โดยหยดน้ำเชื้อปริมาตร 22 μ L ลงบนแผ่น Microcuvette SDM 1 และบันทึกความเข้มข้น โดยน้ำเชื้อที่นำมาใช้ต้องมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,100–6,500 ล้านตัว/mL

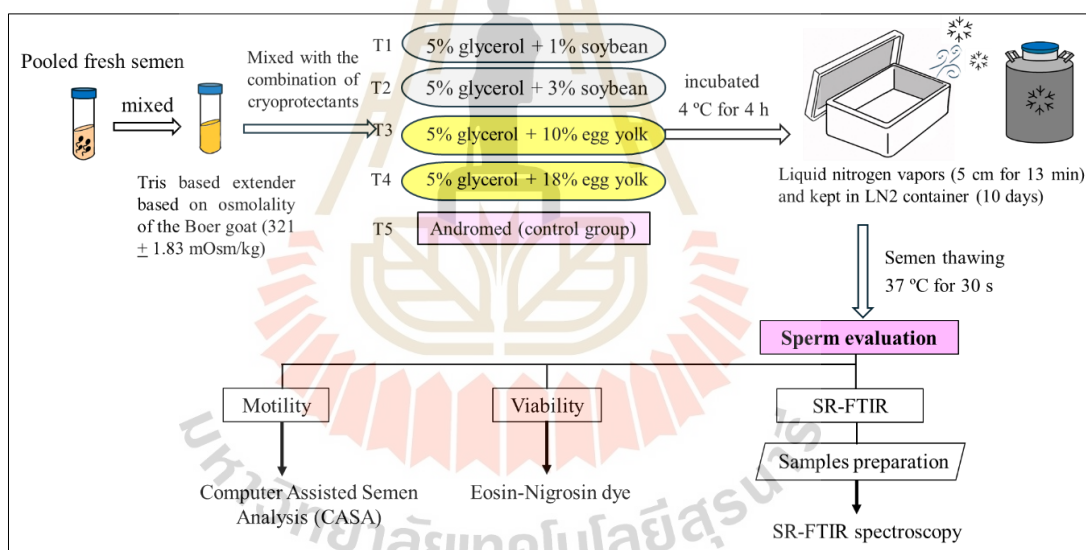
4) นำน้ำเชื้อมารวมกัน จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อไปล้างเซมินอลพลาสมาด้วย Lactated ringers โดยใช้น้ำเชื้อ 1 mL ต่อ Lactated ringers 9 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 g นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C และนำมาตรวจวัดความเข้มข้นหลังล้างเซมินอลพลาสมาอีกครั้งเพื่อนำไปใช้ศึกษาในทรีตเมนต์ที่มี Egg yolk เป็นสาร Cryoprotectant จากนั้นเติมสาร Cryodiluent และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5) บรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดฟางขนาด 0.25 mL โดยบรรจุหลอดละ 150 ล้านตัว/โดส ซึ่งจะบรรจุน้ำเชื้อปริมาตร 0.23 mL ต่อหลอด ปิดหลอดด้วยผงอุด (Sealing powder) และจุ่มบริเวณที่อุดในน้ำเป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงเช็ดให้แห้ง นำหลอดไปเรียงบนตะแกรงในกล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลว และทำการลดอุณหภูมิโดยใช้วิธีการอังไนโตรเจนเหลว วางตัวอย่างให้ห่างจากผิวไนโตรเจน 5 เซนติเมตร (อุณหภูมิ -120°C) เป็นเวลา 13 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 10 วัน

6) นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายในน้ำอุ่น 37°C นาน 30 วินาที ก่อนนำไปประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองการศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely random design (CRD) ซึ่งประกอบด้วยจำนวน 5 หรีตเมนต์ โดยใช้ Andromed ที่เป็นสูตรทางการค้าเป็นตัวควบคุม

Treatment	Cryoprotectant	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	SR-FTIR
T1	Glycerol 5% + Soybean lecithin 1%				
T2	Glycerol 5% + Soybean lecithin 3%				
T3	Glycerol 5% + Egg yolk 10%				
T4	Glycerol 5% + Egg yolk 18%				
T5	Andromed (control)				



ภาพที่ 3.1 แผนภาพการทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

3.2.2.1 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

จากรายงานที่ผ่านมาของ Mazur (1984) และ Gao and Critser (2000) พบว่า ระยะเวลาการเก็บส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ณ อุณหภูมิ -196°C แต่คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็ง เช่น สาร Extender สาร Cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เซลล์อาจมีผลกระทบมาจาก

รังสีชนิดก่อกำเนิดไอออนในไนโตรเจนเหลวได้ แต่เกิดได้น้อยมาก (Woods *et al.*, 2016) ดังนั้นในการศึกษานี้ ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ -196°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม (Total motility) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility)

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า โดยใช้เครื่อง CASA (HTT-CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) โดยการนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วยสาร Extender (อัตราส่วนน้ำเชื้อสด 7 μL ต่อสาร Extender 500 μL) และในส่วนของน้ำเชื้อแช่แข็ง นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาเจือจางด้วยสาร Extender (อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 1 μL ต่อสาร Extender 18 μL) โหลดตัวอย่างน้ำเชื้อ 3 μL ลงบน slide 2X-cell แล้วปิดด้วยแผ่น Cover glass จากนั้นประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA โดยมีการกำหนดค่า Sperm analysis setup สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแพะ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่า Sperm setup ของน้ำเชื้อแพะ

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	37.0
Apply sort	0
Frames Acquired	30
Frames rate (Hz)	60
Minimum contrast	25
Minimum Cell Size (pixels)	4
Minimum Static Contrast	15
Straightness (STR) Threshold (%)	80
VAP Cutoff ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	5
Prog. Min VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	20
VSL Cutoff ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	20
Cell Size (pixels)	4
Cell Intensity	50
Static Head Size	0.72-8.82
Static Head Intensity	0.14-1.84
Static Elongation	0-47
Slow Cell Motile	Yes
Magnification	1.92
Video Frequency	60
Bright Field	No
Chamber depth (μm)	20
Field Selection Mode	Auto

2) การประเมินอัตราการมีชีวิต (Viability)

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิต ดังนี้

2.1) วิธีการเตรียมสีย้อม มีขั้นตอนดังนี้

ชั่งสาร Eosin B 1 g, Nigrosin 5 g, และ Sodium citrate dehydrate 1.5 g ใส่ในบีกเกอร์ (Beaker) และเติมน้ำกลั่น 100 mL โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่เก็บได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.2) วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิต มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1) หยดสี Eosin – Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (ประมาณ 5 μL) แล้วหยดน้ำเชื้อสด 2 μL หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง 10 μL ของแต่ละทรีตเมนต์ ผสมน้ำเชื้อและสีย้อมให้เข้ากัน

2.2.2) ใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว รอนสไลด์แห้ง จากนั้นหยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด แล้วปิดด้วยแผ่น Cover glass แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.2.3) นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาว (ไม่ติดสีย้อม) ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin (ภายใต้กล้อง Compound microscope กำลังขยาย 400 เท่า)

3) การประเมินน้ำเชื้อด้วยเทคนิค SR-FTIR

นำเทคนิค SR-FTIR มาช่วยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำเขื่อน้อย และลดการวิเคราะห์ในการใช้สารเคมี อีกทั้งยัง

สามารถดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระดับชีวโมเลกุลได้ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 3.3 และมีขั้นตอนการประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR ดังนี้

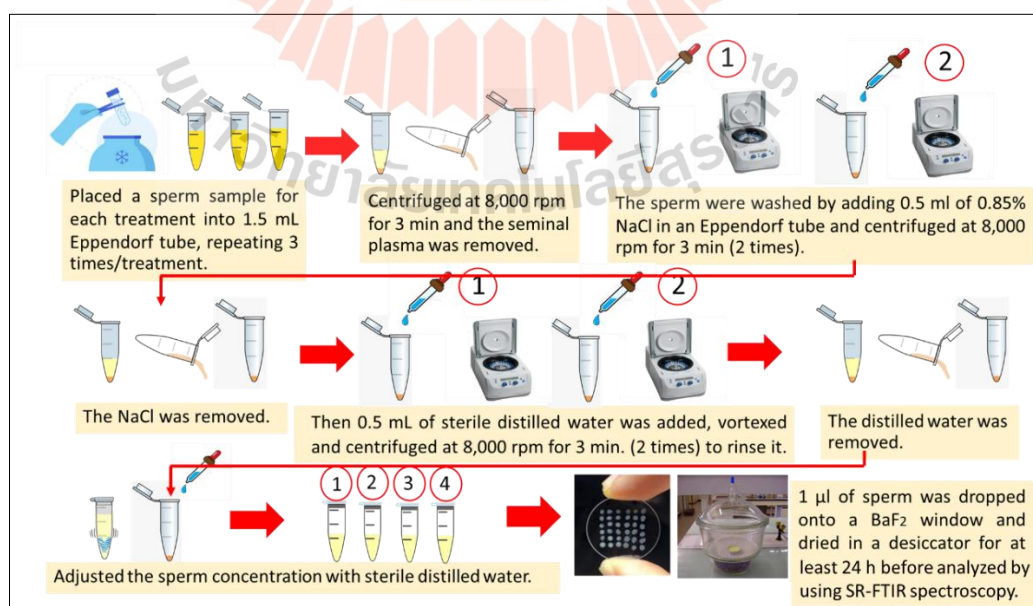
3.1) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค SR-FTIR มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1) นำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว -196°C มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละทรีตเมนต์ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที เพื่อตกตะกอนแยกตัวอสุจิออกจากเซมินอลพลาสมา และสาร Cryodiluent โดยทำ 3 ซ้ำต่อทรีตเมนต์

3.1.2) กำจัดเซมินอลพลาสมาส่วนบนทิ้ง ให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิที่ตกตะกอน จากนั้นนำไปล้างด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 0.5 mL ลงในหลอด Eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที โดยจะล้างเซลล์อสุจิด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง

3.1.3) เท 0.85% NaCl ทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิ ล้างเซลล์อสุจิด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 mL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง

3.1.4) เทน้ำกลั่นทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิ และปรับความเข้มข้นของเซลล์อสุจิโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 50 μL จากนั้นหยดตัวอย่างเซลล์อสุจิ ปริมาตร 1 μL ลงบน BaF₂ window ที่มีขนาดความหนา 0.5 mm และนำตัวอย่างไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้น (Desiccator) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค SR-FTIR

3.2) ขั้นตอนการประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR มีรายละเอียดดังนี้

3.2.1) ประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด Bruker Hyperion 2000-IR Microscope (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) ทำการวัดในโหมดการส่องผ่าน (Transmission) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd.) ในการบันทึกข้อมูล ทำการเก็บข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วง $4000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ และตั้งค่า Resolution เท่ากับ 6 cm^{-1} ค่า Scan time เท่ากับ 64 scan โดยวัดตัวอย่าง 200 สเปกตรัมต่อทรีตเมนต์

3.2.2) นำสเปกตรัมที่ได้ของแต่ละทรีตเมนต์ มาเฉลี่ยให้ได้ทรีตเมนต์ละ 100 สเปกตรัม จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The Unscrambler X Multivariate data analysis software (version 10.4, Camo Analytics, Oslo, Norway) ในการวิเคราะห์อนุพันธ์อันดับสอง (2^{nd} derivative) โดยใช้ Savitzky–Golay algorithm และ Vector normalize ที่ครอบคลุมพื้นที่ช่วงเลขคลื่น $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ และ $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ จากนั้นวิเคราะห์เพื่อดูความแตกต่างของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยการทำ Principal component analysis (PCA)

3.2.3) นำสเปกตรัมของแต่ละทรีตเมนต์มาเฉลี่ยให้ได้ทรีตเมนต์ละ 6 สเปกตรัม ในการหาพื้นที่ใต้กราฟ (Integral area) เพื่อเปรียบเทียบสารชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ได้แก่ $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ (CH_2/CH_3 ในกรดไขมัน), $1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (C=O Ester from lipid, Phospholipid), $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (Amide I), $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ (Amide II) และ $1250\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (Nucleic acid, Carbohydrate, Fingerprint region; DNA และ RNA) (Pachetti *et al.*, 2020; Pongsetkul *et al.*, 2023) นอกจากนี้ วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากสัดส่วนการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุล Amide I ในช่วงสเปกตรัม $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของ α -helix, β -sheet, β -turn, และ Antiparallel โดยใช้ Gaussian และ Lorentzian functions ในโปรแกรม OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd., Ettlingen, Germany)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะไป Transformed โดยใช้ Box-Cox และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ The proc univariate และ Shapiro-wilk tests จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

3.2.3 การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ทำการเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 คือ Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของ Glycerol 5% + Egg yolk 18% มาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation โดยใช้สาร Antioxidant 3 ชนิด ที่ระดับ 3 ความเข้มข้น ดังนี้ 1) GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, และ 5 mM 2) Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 6, 9, และ 12 mM และ 3) Vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, และ 3 mM เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมสาร Antioxidant และใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 ซ้ำ/ทรีตเมนต์ และมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 70% ขึ้นไป ตรวจวัดความเข้มข้น จำนวนอสุจิ/mL ด้วยเครื่อง Photometer (SDM 1, Minitab International AG, Germany) น้ำเชื้อที่นำมาศึกษาต้องมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,100–6,500 ล้านตัว/mL

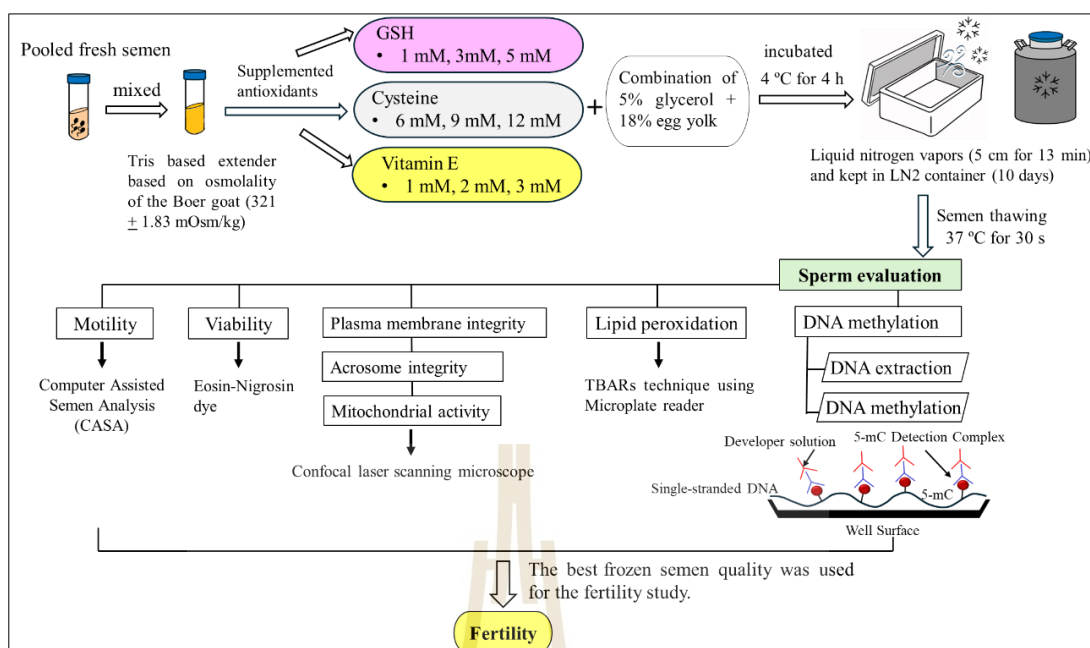
2) นำน้ำเชื้อแพะแต่ละตัวมาผสมรวมกัน ทำการเติมสาร Tris-base extender ตามการทดลองที่ 1 จากนั้นเติมสาร Antioxidant แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเติมสาร Cryoprotectant [Egg yolk (18%) + Glycerol (5%)] โดยให้ความเข้มข้นของอสุจิ 150 ล้านตัว/โดส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อไปบรรจุในหลอดฟาง ขนาด 0.25 mL ทำการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการอังไอน์โตรเจนเหลว โดยวางห่างจากผิวไนโตรเจน 5 เซนติเมตร (อุณหภูมิ -120°C) เป็นเวลา 13 นาที ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 10 วัน

3) นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายในน้ำอุ่น 37°C นาน 30 วินาที ก่อนนำไปประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation การเกิดกระบวนการ DNA methylation และนำทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุด ไปทดสอบอัตราการผสมติด ดังแสดงในภาพที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

Antioxidant	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	Acrosome integrity (%)	Membrane integrity (%)	Mitochondria activity (%)	MDA (nmol/mL)	DNA methylation
GSH 1 mM								
GSH 3 mM								
GSH 5 mM								
Cysteine 6 mM								
Cysteine 9 mM								
Cysteine 12 mM								
Vitamin E 1 mM								
Vitamin E 2 mM								
Vitamin E 3 mM								
No antioxidant								
Andromed (Control)								





ภาพที่ 3.4 แผนภาพการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง

3.2.3.1 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

หลังจากทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ -196°C นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต รายละเอียดขั้นตอนการศึกษา ดังแสดงในหัวข้อที่ 3.2.2.1 ในส่วนของการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และการประเมินอัตราการมีชีวิต

2) การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ (Membrane integrity) ความสมบูรณ์อะโครโซม (Acrosome integrity) และการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria activity)

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ประเมินโดยการบ่มเซลล์อสุจิด้วยสาร Propidium iodide (PI), Hoechst 33342 (H3 4 2), Fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) และ 5,5', 6,6'-Tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) โดยมีวิธีการเตรียมสาร ตามการศึกษาของ Celeghini *et al.* (2007) และเตรียมตัวอย่างตามการศึกษาของ Nguyen *et al.* (2019) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.1) นำตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 10 μL มาเจือจางกับสาร Extender ปริมาตร 180 μL ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL ที่อุ่นแล้ว และเติม H342 ปริมาตร 10 μL (40 $\mu\text{g/mL}$ H342 ใน Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS)

2.2) บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C หลังจากนั้นทำการเติม PI ปริมาตร 2 μL (0.5 mg/mL PI ใน DPBS), JC-1 ปริมาตร 15 μL (153 $\mu\text{mol/L}$ JC-1 ใน DMSO) และ FITC-PSA ปริมาตร 20 μL (100 $\mu\text{g/mL}$ FITC-PSA ใน DPBS) ลงในตัวอย่าง

2.3) บ่มตัวอย่างเป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C และเพื่อเป็นการลดการเรืองแสงของพื้นหลัง สาร H342, PI, FITC-PSA, และ JC-1 โดยการเติม DPBS ปริมาตร 200 μL และทำการล้างเซลล์อสุจิ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 g เป็นเวลา 2 นาที (Chelucci *et al.*, 2015)

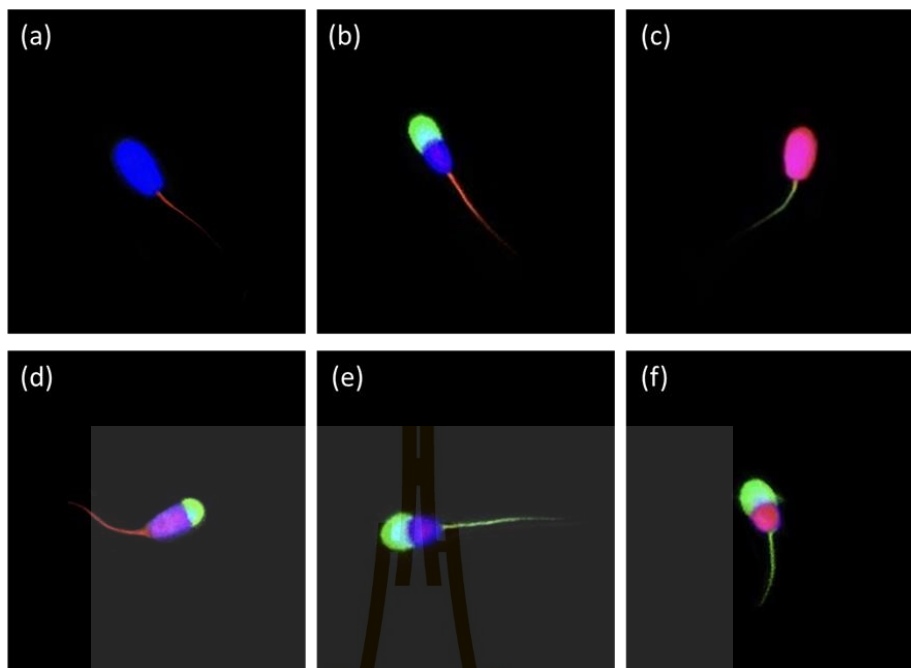
2.4) เอาส่วนใสออก และทำการละลายตะกอนอีกครั้งด้วย DPBS ปริมาตร 100 μL หลังจากนั้น ดูดตัวอย่างอสุจิที่ย้อมสี ปริมาตร 8 μL ลงบนสไลด์ และปิด Cover slipped

2.5) ประเมินความสมบูรณ์เซลล์อสุจิ อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยใช้กล้อง Confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon/Ni-E, Japan) ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า นับเซลล์อสุจิจำนวน 200 เซลล์/ตัวอย่าง โดยพบการติดสีของอสุจิบริเวณอะโครโซม เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ เยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีน้ำเงินหรือแดง บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีน้ำเงิน และบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียติดสีแดงอมส้ม ในส่วนของเซลล์อสุจิที่ไม่สมบูรณ์ หรือถูกทำลาย จะมีส่วนของเยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีเขียว บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีแดง และไมโทคอนเดรียที่ติดสีเขียว ดังแสดงในภาพที่ 3.5

3) การประเมินระดับการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation โดยประเมินจากปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARs)

การประเมินระดับการเกิด Lipid peroxidation โดยประเมินจากปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TBARs โดยมีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงตามวิธีการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) โดยมีขั้นตอนรายละเอียด ดังนี้

3.1) นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำน้ำเชื้อปริมาตร 100 μL ผสมกับ 20% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 125 μL เพื่อเป็นการตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเติม 0.05 M EDTA ปริมาตร 125 μL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 g เป็นเวลา 15 นาที



ภาพที่ 3.5 เซลล์อสุจิที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง H324, PI, FITC-PSA และ JC-1 ภายใต้กล้อง Confocal laser scanning microscope (กำลังขยาย 400 เท่า) โดย (a) เซลล์อสุจิที่มีเยื่อหุ้มอสุจิ อะโครโซมสมบูรณ์ และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (b) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (c) เยื่อหุ้มอสุจิถูกทำลาย อะโครโซมสมบูรณ์ และการทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ (d) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (e) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ (f) เยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมถูกทำลาย การทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ

3.2) ทำการดูดส่วนใส่ใส่ Eppendorf ปริมาตร 100 μL จากนั้นเติม 0.2% (w/v) Thiobarbituric acid (TBA) ปริมาตร 125 μL และบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10-15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และห่อด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสงก่อนนำไปวิเคราะห์

3.3) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Multiskan GO with Thermo Scientific SkanIt software (Thermo Fisher scientific, N.Y.R. Limited Partnership, Bangkok, Thailand) ที่ความยาวคลื่น 532 nm

4) การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

การศึกษาค้างนี้ได้ทำการศึกษาในส่วนของการกระบวนการ DNA methylation ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การสกัดดีเอ็นเอ และ 2) การวิเคราะห์ DNA methylation โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.1) การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Tissue genomic DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp, Ping-Tung, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1.1) นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้น 200 ล้านตัว (ปริมาตร 230 μ L) มาละลายที่อุณหภูมิ 4°C และในกรณีของน้ำเชื้อสดแพะพันธุ์บอร์ ที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 3,416-4,190 ล้านตัว/mL (ปริมาตร 60 μ L) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4.1.2) ดูดส่วนใสออก ให้เหลือแต่ตะกอนอสุจิ และเติมสาร 0.9% NaCl ปริมาตร 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที

4.1.3) ดูดส่วนใสออก ให้เหลือแต่ตะกอนอสุจิ ทำการเติมสารบัฟเฟอร์ FATG1 ปริมาตร 200 μ L จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 mg/mL ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

4.1.4) เติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 20 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที และนำไป Vortex ทุกๆ 10 นาทีในระหว่างที่ทำการบ่ม

4.1.5) เติมสารละลาย Dithiothreitol (DTT) ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30-60 นาที จนกว่าตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีใส และนำไป Vortex ทุกๆ 10 นาทีในระหว่างที่ทำการบ่ม

4.1.6) ทำการเติมบัฟเฟอร์ FATG2 ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Spin down ตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างที่เกาะบริเวณขอบหลอดมารวมกัน

4.1.7) เติม 99% Ethanol ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการวางคอลัมน์ FATG ลงในหลอด Collection tube ดูดส่วนผสมตัวอย่างทั้งหมดไปยังคอลัมน์ FATG อย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

4.1.8) ล้างคอลัมน์ FATG ด้วยสารบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 μ L นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

4.1.9) ล้างคอลัมน์ FATG ด้วยสารบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 750 μL นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำให้คอลัมน์ FATG แห้งโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

4.1.10) วางคอลัมน์ FATG ลงในหลอด Elution tube และเติม ddH₂O ปริมาตร 50 μL ลงบริเวณกึ่งกลางของคอลัมน์ FATG วางทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ ddH₂O ซะติเอ็นเอลงมายังหลอด Elution tube จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์คุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano drop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ควรอยู่ในช่วง 1.6-1.8 ng/ μL (Santella, 2006) และทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้วิเคราะห์ DNA methylation ต่อไปได้

4.2) การวิเคราะห์ DNA methylation

วิเคราะห์ DNA methylation โดยใช้ชุด Global DNA methylation assay kit (5 Methyl Cytosine, Colorimetric, Abcam) โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงใน Microplate spectrophotometer ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ DNA methylated นั้นแปรผันตามความเข้มของ Optical density (OD) ที่วัดได้ โดยมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

4.2.1) การจับดีเอ็นเอ (DNA Binding)

1) การเตรียม Negative control: โดยเติมสาร Binding solution ปริมาตร 100 μL และสารละลาย Negative control ปริมาตร 2 μL

2) การเตรียม Positive control: โดยเติมสาร Binding Solution ปริมาตร 100 μL และสารละลาย Positive control ปริมาตร 2 μL ที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.1%-5%) เพื่อสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน

3) การเตรียมตัวอย่าง: เติมสาร Binding solution ปริมาตร 100 μL และตัวอย่าง DNA ที่สกัด ความเข้มข้น 100 ng ปริมาตร 4 μL

4) ผสมตัวอย่างสารละลายโดยเขย่าเบาๆ เพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายทั้งหมดตกลงด้านล่างของ Wells จากนั้นปิดด้วย Parafilm M และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที

5) ในช่วง 10 นาทีสุดท้ายของการบ่มตัวอย่าง ให้เตรียมสารละลาย 5-mC Detection complex solution: 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้ว 1 mL ให้เติม

5-mC Antibody 1000X ปริมาตร 1 μL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Signal indicator ปริมาตร 1 μL , 1000X และ Enhancer solution, 1000X ปริมาตร 0.5 μL ผสมให้เข้ากัน

6) หลังจากการบ่ม 60 นาที ทำการกำจัดส่วนของสาร Binding solution ที่จากรีดล้างด้วย 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 150 μL เป็นจำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปศึกษาขั้นตอนการตรวจจับและวัดสัญญาณของดีเอ็นเอ

4.2.2) การตรวจจับและวัดสัญญาณของดีเอ็นเอ (Methylated DNA detection and signal measurement)

1) เติม สารละลาย 5-mC Detection complex solution ปริมาตร 50 μL จากนั้นปิดฝา และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาที

2) กำจัดสารละลาย 5-mC Detection complex solution ที่ และล้างด้วย 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 150 μL จำนวน 5 ครั้ง

3) เติม Developer solution ปริมาตร 100 μL ลงในแต่ละคอลัมน์ให้พร้อมกันโดยใช้ Multichannel pipette จากนั้นทำการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5-10 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 นาที สังเกตสีที่เปลี่ยนไป โดยสาร Developer solution จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอมน้ำเงินเมื่อมี DNA methylated เพียงพอ และในส่วนของ Negative control จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี

4) เมื่อสีในส่วน Positive control ความเข้มข้นสุดท้าย (5%) เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม ให้หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม Stop solution ปริมาตร 100 μL ลงในแต่ละคอลัมน์ให้พร้อมกันโดยใช้ Multichannel pipette เพื่อให้ปฏิกิริยาหยุดลงในเวลาเดียวกัน จากนั้นผสมสารละลายโดยเขย่าเบาๆ กับพื้นผิวเรียบ และรอประมาณ 1-2 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาสีหยุดสนิท สีจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังจากเติม Stop solution และอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายใน 2-15 นาที

4.2.3) การคำนวณ DNA methylation โดยหาเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC

คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ DNA methylation โดยการสร้างเส้นโค้งมาตรฐานและพล็อตค่า OD เทียบกับ Positive control เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน และกำหนดความชันของเส้นโค้งมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel
คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ Methylated DNA (5-mC) ใน DNA โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$5 - \text{mC}\% = \frac{\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}}{\text{Slope} \times S} \times 100\%$$

$$\text{Slope} \times S$$

โดย Sample OD คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่าง, Negative control OD คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก Negative control, Slope คือ ค่า b ที่ได้จากการถดถอยเชิงเส้น ($y = a[x] + b$) จากการสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน และ S คือปริมาณ DNA ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา มีหน่วยเป็น ng (โดยในการศึกษานี้ใช้ 100 ng)

5) การประเมินอัตราการผสมติด

ประเมินอัตราการผสมติดโดยคัดเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีจากพารามิเตอร์ต่างๆ ไปทดสอบอัตราการผสมติด เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า โดยใช้แพะเนื้อเพศเมียพันธุ์บอร์ อายุ 11 เดือน ระดับคะแนนร่างกาย 2.5-3.0 เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิดให้หญ้าสดเป็นแหล่งอาหารหยาบ และน้ำสะอาดให้กินอย่างเต็มที่ ใช้แม่แพะทั้งหมด 17 ตัว จากฟาร์มแพะของเกษตรกร บ้านหนองกรด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ใช้วิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ ด้วยวิธีการสอด CIDR เข้าไปภายในช่องคลอดเป็นระยะเวลา 13 วัน และฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน Prostaglandin F2: PGF2 α (Estrumate) 0.5 mL/ตัว และ Pregnant mare serum gonadotrophin: PMSG (Folligon) 200 IU/ตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ สังเกตการเป็นสัด และทำการผสมเทียมแพะโดยกำหนดเวลา ทำการผสมเทียม 2 ครั้ง โดยผสมเทียมครั้งที่ 36 ชั่วโมงหลังจากถอดฮอร์โมน และผสมเทียมครั้งที่ 2 ที่ 56 ชั่วโมงหลังจากถอดฮอร์โมน ในช่วงเดือน ธันวาคม 2566 – มกราคม 2567 หลังจากผสมเทียม 45 วัน ทำการตรวจการผสมติดโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (PL-3018I Digital ultrasound scanner, Xuzhou Palmary Electronics Co.,Ltd., China) และบันทึกผล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย ปริมาณ MDA และ DNA methylation ไป Transformed โดยใช้ Box-Cox และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ The proc univariate และ Shapiro-wilk tests จากนั้นวิเคราะห์ ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริม Antioxidant กับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริม Antioxidant กับสูตรทางการค้า โดยใช้ Orthogonal contrasts ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง DNA methylation กับอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และปริมาณ MDA ด้วยวิธี Pearson's correlation

นอกจากนี้ วิเคราะห์ข้อมูลผลการผสมติระหว่างน้ำเชื้อสูตร Tris-based extender + Glycerol (5%) + Egg yolk (18%) + GSH (1 mM) และสูตรทางการค้า (Andromed) โดยใช้ Descriptive statistics โดยรายงานข้อมูลในรูปของร้อยละ (Percentile)



บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์

4.1.1 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) ส่งผลให้มีอัตราการเคลื่อนที่รวมของเซลล์อสุจิ ($50.60 \pm 0.31\%$) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($30.75 \pm 0.77\%$) และอัตราการมีชีวิต ($62.00 \pm 0.77\%$) สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ต่ำกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต เท่ากับ $55.00 \pm 0.61\%$, $36.20 \pm 0.97\%$ และ $87.75 \pm 0.82\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Treatment	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
1	34.50 ± 0.95^e	19.55 ± 0.88^d	35.50 ± 0.92^d
2	39.20 ± 1.02^d	20.10 ± 1.01^d	47.00 ± 0.56^c
3	47.15 ± 0.44^c	26.35 ± 1.11^c	30.50 ± 0.99^e
4	50.60 ± 0.31^b	30.75 ± 0.77^b	62.00 ± 0.77^b
5	55.00 ± 0.61^a	36.20 ± 0.97^a	87.75 ± 0.82^a

หมายเหตุ : สาร Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้

T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk;

T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant ระหว่าง Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) สามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็งได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การใช้ Glycerol ที่เป็นสาร Cryoprotectant ชนิดซึมผ่านเซลล์ จะช่วยป้องกันการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิ รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ และ การใช้ Egg yolk ที่เป็นแหล่งเลซิธินจากสัตว์ เป็นสาร Cryoprotectant ชนิดไม่ซึมผ่านเซลล์ ช่วยป้องกันการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งรอบนอกเซลล์ นอกจากนี้ Egg yolk มีส่วนประกอบของ Phospholipid ชนิด Phosphatidylcholine (PC) 73%, Phosphatidylethanolamine (PE) 15%, Sphingomyelin (SM) 2.5%, Phosphatidylserine (PS) 0.9% และ Phosphatidylinositol (PI) 0.6% (Zhao *et al.*, 2023) ในขณะที่ Soybean lecithin ที่เป็นแหล่งเลซิธินที่มาจากพืช มี Phospholipid ชนิด PC 30.8%, PE 32.5%, PI 27.9% และ Phosphatidic acid (PA) 8.8% (Jala *et al.*, 2016) ซึ่ง Egg yolk มี Phospholipid ชนิด PC, SM, และ PS สูงกว่าใน Soybean lecithin โดย PC มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเข้าออกของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ควบคุมการซึมผ่านของน้ำตาลแลคโตส ช่วยในกระบวนการจัดเรียงโครงสร้างของโมเลกุลไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ป้องกันการถูกทำลายของอะโครโซม ช่วยรักษาความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และมีผลโดยตรงต่อกระบวนการการปฏิสนธิ (Shan *et al.*, 2021) PS และ SM มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ Sperm capacitation ช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ (Penalva *et al.*, 2013; Rival *et al.*, 2019; Whitlock and Chernomordik, 2021) อีกทั้งเซลล์อสุจิของแพะประกอบด้วยกลุ่มไขมันที่สำคัญคือ กลุ่มของ Phospholipid ชนิด PC 36%, PE 25%, SM 11%, และไขมันกลุ่มอื่นๆ (Rana *et al.*, 1991) ซึ่งกลุ่มของ Phospholipid เหล่านี้จะถูกทำลายจากภาวะเครียดออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง

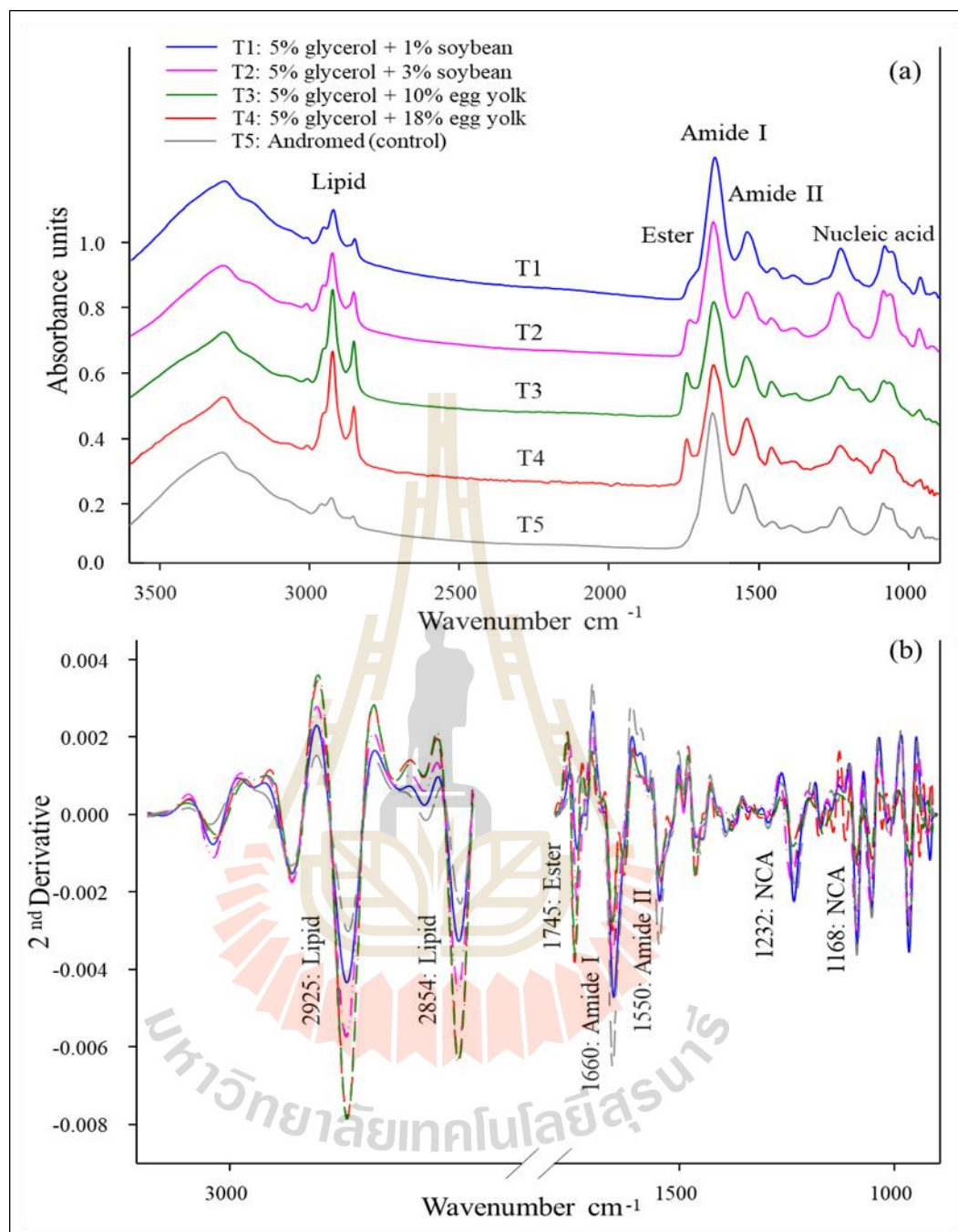
นอกจากนี้ พบว่า การใช้ Soybean lecithin 1% และ Egg yolk 10% ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Soybean lecithin 3% และ Egg yolk 18% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่ต่ำเกินไป อาจไม่เพียงพอต่อการปกป้องเซลล์อสุจิจากความเสียหายที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งได้ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์อสุจิ ส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ลดการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลง Forouzanfar *et al.* (2010) รายงานว่า ความเข้มข้นของ Soybean lecithin (2%) ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Soybean lecithin 1% ในขณะที่ความเข้มข้นของ Egg yolk (20%) ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การ

เคลื่อนที่ และการมีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Egg yolk 15% ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ชนิดและความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร Extender และพันธุ์ของสัตว์ที่ศึกษา

4.1.2 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง ที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงซินโครตรอน ร่วมกับเทคนิค FTIR โดยกำหนดช่วงสเปกตรัมที่ศึกษา $4000-900\text{ cm}^{-1}$ พบแบบแผนสเปกตรัมตามองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์อสุจิ ได้แก่ Lipid, Ester lipid, Amide I protein, Amide II protein และ Nucleic acid โดยแสดงพื้นที่ใต้กราฟที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (a) สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (b) และสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (Integral area) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในเซลล์อสุจิแพะแช่แข็ง ได้แก่ 1) Lipid (CH_2/CH_3 ใน fatty acid) ในช่วงสเปกตรัม $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 2) Ester lipid ($\text{C}=\text{O}$ stretching of lipid ester, phospholipid) ในช่วงสเปกตรัม $1750-1700\text{ cm}^{-1}$ 3) Amide I protein ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ 4) Amide II protein ในช่วงสเปกตรัม $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ และ 5) Nucleic acid (Carbohydrate, Sugar, Fingerprint region; DNA และ RNA) ในช่วงสเปกตรัม $1250-900\text{ cm}^{-1}$ (Pachetti *et al.*, 2020; Pongsetkul *et al.*, 2023) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากการศึกษา พบว่า ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง มีส่วนประกอบของโปรตีน Amide I และ Lipid เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% (T4) ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของ Lipid และ Ester lipid สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk เป็นแหล่งของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low-density lipoprotein; LDL) ช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมจากอันตรายที่เกิดจากการแช่แข็ง โดย Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลักที่ประกอบด้วย Triglycerides (62%), Phospholipids (33%), และ Cholesterol (5%) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่น มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ กระบวนการ Sperm capacitation ปฏิกริยาอะโครโซม (Acrosome reaction) และกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ (Swelum *et al.*, 2018) นอกจากนี้ พบว่าการใช้ Soybean lecithin และสูตรทางการค้า มีเปอร์เซ็นต์ของ Lipid และ Ester lipid ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร Egg yolk ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 4.2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โดยปกติใน Soybean lecithin มีปริมาณของ Lipid และ Cholesterol ซึ่งต่ำกว่า Egg yolk ประกอบกับปริมาณของ Lipid ที่ลดลงในเซลล์อสุจิ อาจทำให้ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมไปถึงเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณอะโครโซมลดลง ซึ่ง Simon *et al.* (2013) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ Lipid บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ส่งผลให้ความสำเร็จของเซลล์อสุจิ และอัตราการผสมติดลดลง



ภาพที่ 4.1 Average absorbance FTIR spectra ในช่วงสเปกตรัม 4000–900 cm^{-1} โดยแสดงพื้นที่ใต้กราฟที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ (a) และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง (b) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

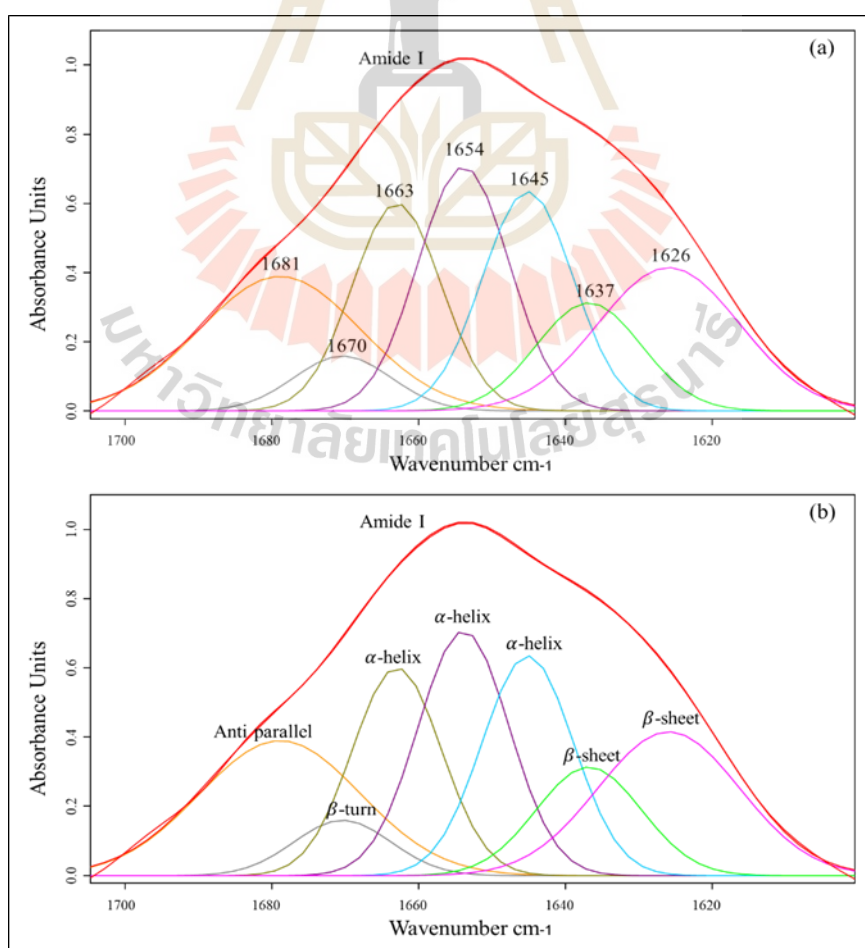
ตารางที่ 4.2 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Biomolecule (wavenumber cm ⁻¹)	Integral area (%)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Lipid (3000-2800)	23.20 $\pm$ 0.36 ^d	26.56 $\pm$ 0.53 ^c	39.00 $\pm$ 0.76 ^b	41.28 $\pm$ 0.73 ^a	10.32 $\pm$ 0.04 ^e
Ester (1750-1700)	1.54 $\pm$ 0.00 ^c	1.58 $\pm$ 0.06 ^c	4.71 $\pm$ 0.37 ^b	5.52 $\pm$ 0.20 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^d
Amide I (1700-1600)	40.91 $\pm$ 0.29 ^b	40.71 $\pm$ 0.13 ^b	30.83 $\pm$ 0.59 ^c	30.54 $\pm$ 0.71 ^c	57.83 $\pm$ 0.18 ^a
Amide II (1600-1500)	9.55 $\pm$ 0.29 ^b	7.81 $\pm$ 0.38 ^c	8.80 $\pm$ 0.16 ^b	9.49 $\pm$ 0.25 ^b	13.23 $\pm$ 0.01 ^a
Nucleic acid (1250-900)	24.81 $\pm$ 0.32 ^a	23.34 $\pm$ 0.20 ^b	16.67 $\pm$ 0.33 ^d	13.17 $\pm$ 0.49 ^e	18.62 $\pm$ 0.12 ^c

หมายเหตุ : สาร Tris-base extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้ T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk; T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์สัดส่วนโดยการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุลโปรตีน Amide I ในช่วงสเปกตรัม 1700-1600 cm⁻¹ โดยโปรตีนทุติยภูมิของ Amide I ประกอบด้วย β -sheet ในช่วงสเปกตรัม 1640-1620 cm⁻¹, α -helix ในช่วงสเปกตรัม 1670-1640 cm⁻¹, β -turn ในช่วงสเปกตรัม 1678-1670 cm⁻¹, และ β -antiparallel ในช่วงสเปกตรัม 1695-1680 cm⁻¹ (Pachetti *et al.*, 2020; Pongsetkul *et al.*, 2023) ที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่า กลุ่มที่ใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% (T4) มีเปอร์เซ็นต์ของ β -sheet (30.21 $\pm$ 1.00) ไม่แตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา (P>0.05) นอกจากนี้ยังพบว่า T4 มีเปอร์เซ็นต์ของ α -helix เท่ากับ 49.74 $\pm$ 1.29 ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในส่วนของ β -turn และ β -antiparallel พบว่า ไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk เป็นแหล่งของไลโปโปรตีนที่สำคัญ คือ Lipovitellin, Phosvitin, และ Vitellogenin (Vg) โดยเฉพาะ Vg ซึ่งมีความสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์ และมีบทบาทในการทำงานร่วมกันกับไขมัน นอกจากนี้ Havukainen *et al.* (2013) รายงานว่า Vg มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการจับ Phospholipid ชนิด PC และ PS บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถลด ROS ปกป้องเซลล์จากการเกิด H₂O₂ และช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ และพบว่า มีโครงสร้าง α -helix เป็นส่วนประกอบหลัก โดย Cheng *et al.* (2013) และ Cheignon *et al.* (2018) รายงานว่า โครงสร้าง α -helix จะช่วยเพิ่มความเสถียรให้แก่โปรตีน ส่งผลต่อ

โครงสร้างเซลล์อสุจิ และพบว่า โปรตีนบางชนิดที่มีโครงสร้าง α -helix เป็นส่วนประกอบ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์อสุจิ เช่น โปรตีนชนิด Tubulin และ Dynein ที่พบทั้งใน Egg yolk และเซลล์อสุจิ โดยโปรตีน Tubulin เป็นส่วนประกอบของ Microtubules ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนไหวของ Flagellum (Bhagwat *et al.*, 2014) และโปรตีน Dynein ซึ่งช่วยให้ Microtubules ภายใน Flagellum เคลื่อนที่ได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (Levkova *et al.*, 2022) นอกจากนี้ โปรตีน Phospholipase C zeta ที่พบในเซลล์อสุจิ ทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ไข่ และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการปฏิสนธิ (Parrella *et al.*, 2024) ในขณะเดียวกัน β -sheet เกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนที่ผิดปกติ ที่เกิดจากการออกซิเดชัน เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pachetti *et al.* (2020) และ Shivanoor and David (2015) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ของ α -helix ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกระบวนการ Sperm capacitation ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ β -sheet ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลดลง นอกจากนี้ β -turn และ β -antiparallel อาจช่วยรักษาสมดุลโครงสร้างของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ β -turn และ β -antiparallel ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์อสุจิ



ภาพที่ 4.2 การวิเคราะห์สัดส่วนโดยการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุลโปรตีน Amide I ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ โดยในช่วงสเปกตรัม $1640-1620\text{ cm}^{-1}$, $1670-1640\text{ cm}^{-1}$, $1678-1670\text{ cm}^{-1}$, และ $1695-1680\text{ cm}^{-1}$ (a) แสดงถึงโปรตีนทุติยภูมิของ Amide I ประกอบด้วย β -sheet, α -helix, β -turn และ β -antiparallel ตามลำดับ (b)

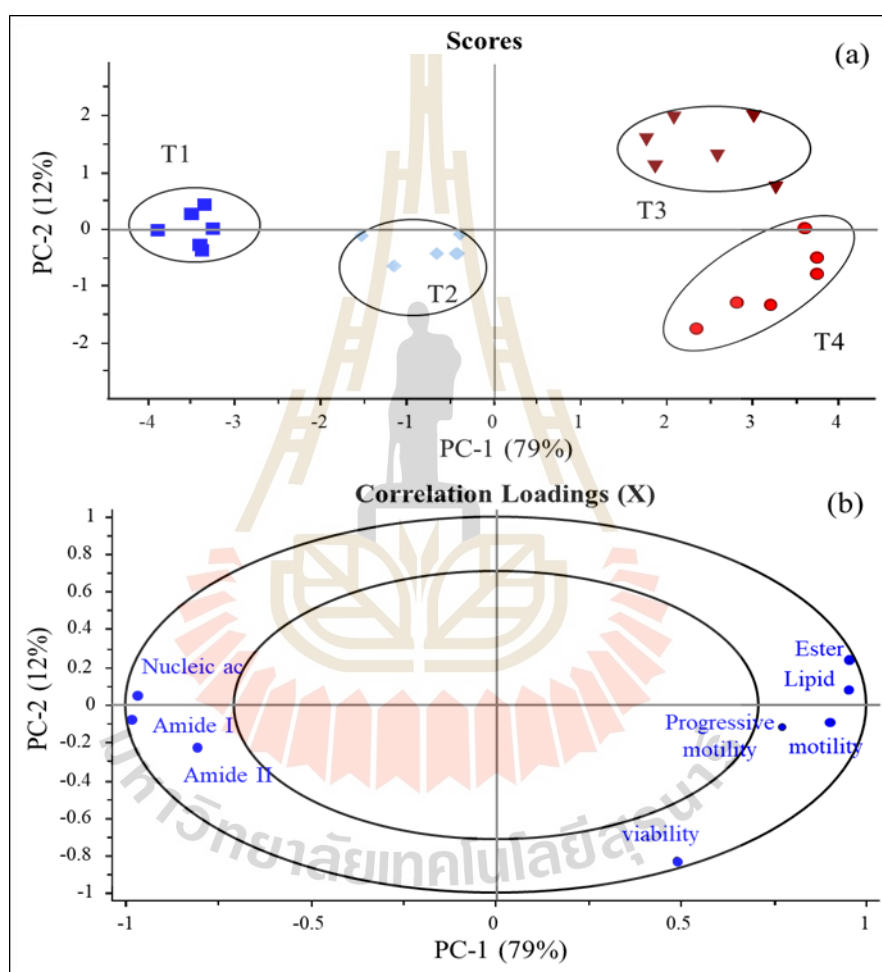
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของโปรตีนทุติยภูมิ Amide I ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง (Mean $\pm$ SE).

Biomolecule (wavenumber cm^{-1})	Curve fitting (%)				
	T1	T2	T3	T4	T5
β -sheet (1640-1620)	29.05 $\pm$ 0.54 ^a	30.72 $\pm$ 0.92 ^a	29.78 $\pm$ 1.00 ^a	30.21 $\pm$ 1.00 ^a	29.89 $\pm$ 0.97 ^a
α -helix (1670-1640)	42.73 $\pm$ 0.30 ^c	43.85 $\pm$ 0.39 ^{bc}	46.54 $\pm$ 0.90 ^b	49.74 $\pm$ 1.29 ^a	45.36 $\pm$ 1.20 ^{bc}
β -turn (1678-1670)	6.71 $\pm$ 0.72 ^a	6.09 $\pm$ 0.60 ^a	6.84 $\pm$ 0.64 ^a	3.72 $\pm$ 0.77 ^b	5.68 $\pm$ 0.42 ^{ab}
Antiparallel (1695-1680)	21.51 $\pm$ 0.98 ^a	19.34 $\pm$ 1.42 ^{ab}	16.84 $\pm$ 0.39 ^b	16.33 $\pm$ 0.44 ^b	19.07 $\pm$ 0.86 ^{ab}

หมายเหตุ : สาร Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้
 T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk;
 T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลความสัมพันธ์ของ PCA scores plot และ Correlation loading ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะบอร์ จากภาพ PCA scores plot ในภาพ 4.3 สามารถแบ่งกลุ่มของทรีตเมนต์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ Glycerol ร่วมกับ Soybean lecithin (T1 และ T2) และกลุ่มที่ใช้ Glycerol ร่วมกับ Egg yolk (T3 และ T4) เป็นสาร Cryoprotectant ซึ่งแยกออกจากกันด้วย PC-1 ที่ 79% และจากภาพ Correlation loading ในภาพ 4.3 พบว่ากลุ่มที่ใช้ Glycerol 5% ร่วมกับ Egg yolk 18% (T4) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ Lipid อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต นอกจากนี้กลุ่มที่ใช้ Glycerol 5% ร่วมกับ Soybean lecithin 1% (T1) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ Nucleic acid, Amide I, และ Amide II แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งสูงกว่าใน Soybean lecithin และมีปริมาณของ Phospholipid ชนิด PC, SM, และ PS ที่สูงกว่า ที่มีหน้าที่ช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้ม

เซลล์ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ (Penalva *et al.*, 2013; Rival *et al.*, 2019) ดังนั้น การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์โนในครั้งนี้ ทำให้ผู้วิจัยคัดเลือกทรีตเมนต์ที่ใช้ คือ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% เพื่อนำไปศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ในการทดลองที่ 2 ต่อไป



ภาพที่ 4.3 PCA scores plot (a) ที่ PC1 และ PC2 ของ 4 ทรีตเมนต์ที่แตกต่างกัน ดังนี้ T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk และภาพ Correlation loadings plot (b) ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์โนแบบแช่แข็ง

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

4.2.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

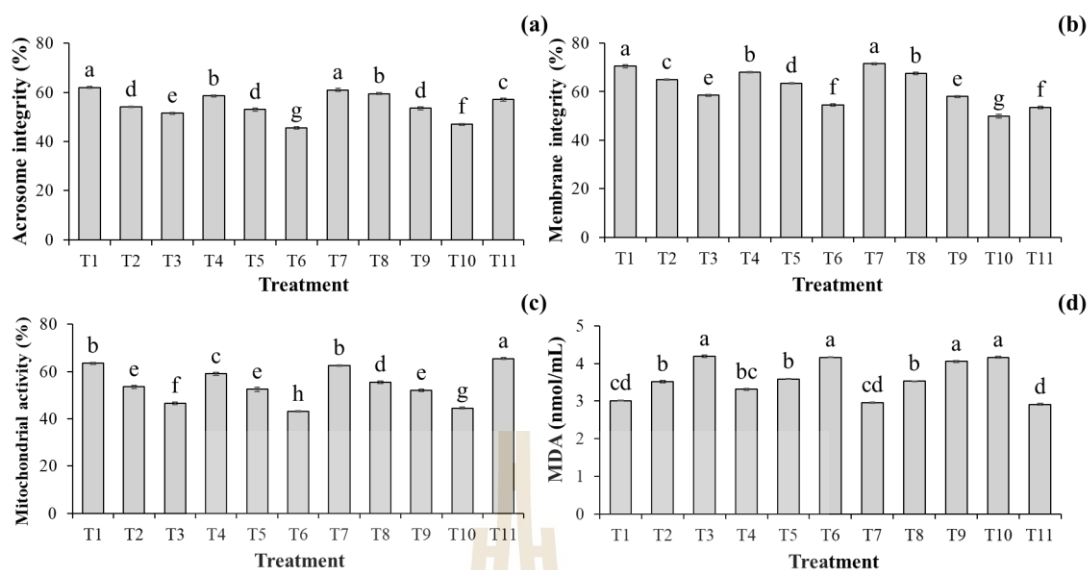
จากการศึกษาการใช้สาร Antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง พบว่า การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่รวม ($63.50 \pm 0.56\%$) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($41.15 \pm 1.02\%$) สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ต่ำกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รวม และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ $69.40 \pm 0.49\%$ และ $43.53 \pm 0.28\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนี้ การใช้ GSH 1 mM และ Vitamin E 1 mM สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิต ($65.50 \pm 0.92\%$, $65.00 \pm 0.37\%$) ความสมบูรณ์อะโครโซม ($62.00 \pm 0.37\%$, $61.00 \pm 0.58\%$) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ($70.50 \pm 0.56\%$, $71.50 \pm 0.43\%$) และกิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ($63.50 \pm 0.43\%$, $62.50 \pm 0.22\%$) อีกทั้งสามารถลดระดับของ MDA (3.01 nmol/mL , 2.96 nmol/mL) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์แบบ Orthogonal contrasts พบว่า การเสริมสาร Antioxidant สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง (ค่าอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ กิจกรรมของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลง) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกับสูตรทางการค้า พบว่า กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant สามารถเพิ่มความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น เมื่อใช้สารเจือจาง Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Antioxidant	Concentration (mM)	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
Glutathione	1.00	63.50 $\pm$ 0.56 ^b	41.15 $\pm$ 1.02 ^b	65.50 $\pm$ 0.92 ^{ab}
	3.00	55.85 $\pm$ 0.78 ^d	34.50 $\pm$ 0.78 ^d	56.00 $\pm$ 0.37 ^d
	5.00	52.10 $\pm$ 0.77 ^e	31.70 $\pm$ 0.82 ^e	53.50 $\pm$ 0.67 ^e
Cysteine	6.00	60.50 $\pm$ 0.56 ^c	38.50 $\pm$ 0.56 ^c	62.00 $\pm$ 0.82 ^c
	9.00	57.50 $\pm$ 0.76 ^d	37.57 $\pm$ 0.43 ^c	56.00 $\pm$ 0.37 ^d
	12.00	48.50 $\pm$ 1.16 ^f	28.38 $\pm$ 0.65 ^f	50.50 $\pm$ 0.43 ^f
Vitamin E	1.00	61.05 $\pm$ 1.02 ^c	38.52 $\pm$ 0.44 ^c	65.00 $\pm$ 0.37 ^b
	2.00	56.50 $\pm$ 0.43 ^d	35.05 $\pm$ 0.68 ^d	60.50 $\pm$ 0.56 ^c
	3.00	52.50 $\pm$ 1.12 ^e	30.77 $\pm$ 0.46 ^e	56.50 $\pm$ 0.43 ^d
No antioxidant		52.60 $\pm$ 0.24 ^e	31.18 $\pm$ 0.97 ^e	53.50 $\pm$ 0.22 ^e
Andromed		69.40 $\pm$ 0.49 ^a	43.53 $\pm$ 0.28 ^a	67.00 $\pm$ 0.58 ^a
Orthogonal contrasts				
1		<0.01	<0.01	<0.01
2		<0.01	<0.01	<0.01

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) Orthogonal contrasts 1 คือ กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม และ Contrasts 2 คือ กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า



ภาพที่ 4.4 ผลของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์อะโครโซม (a) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ (b) การทำงานของไมโทคอนเดรีย (c) และระดับของ MDA (d) ของทรีตเมนต์ที่เสริมสาร Antioxidant GSH: T1, T2, และ T3 (1, 3, และ 5 mM ตามลำดับ); Cysteine: T4, T5, และ T6 (6, 9, และ 12 mM); Vitamin E: T7, T8, และ T9 (1, 2, และ 3 mM); T10: ทรีตเมนต์ที่ไม่เสริมสาร Antioxidant; T11: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเสริมสาร GSH ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ ROS และอนุมูลอิสระชนิดไนโตรเจน (Reactive nitrogen species; RNS) โดย GSH จะถูกออกซิไดซ์เป็น Oxidized glutathione (GSSG) และจะถูกเปลี่ยนให้กลับมาอยู่ในรูป GSH อีกครั้ง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutathione reductase ร่วมกับ NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) และพร้อมที่จะจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ Lushchak (2012) พบว่า GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GPx ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ และเปลี่ยน Lipid peroxide (Lipid-OOH) ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ ทำให้การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ลดลง และลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์หลักในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณอะโครโซม ซึ่งทำหน้าที่บรรจุเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ (Gadella and Luna, 2014) นอกจากนี้ปริมาณ

ของ H_2O_2 ที่ลดลงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะโครซินที่บรรจุอยู่ในอะโครโซมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้บริเวณอะโครโซมมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Lin *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การใช้ GSH ที่ความเข้มข้นสูง (3 และ 5 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง และมีปริมาณการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ GSH 1 mM ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GSH ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้ความดันออกซิเดติกของเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลเสียต่อโครงสร้างของเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อแพะ โค และสุกร (Tuncer *et al.*, 2010; Estrada *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2021) ซึ่งรายงานว่าการใช้ความเข้มข้นของ GSH ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังจากละลายลดลง

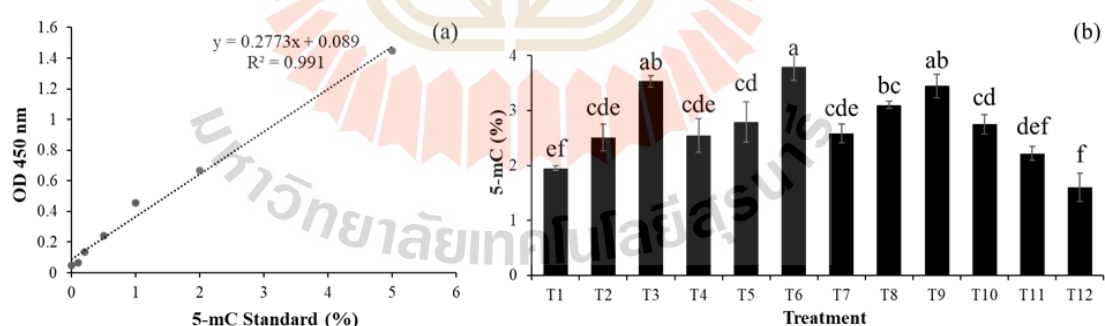
นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การเสริม Vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Vitamin E เป็นสาร Antioxidant ที่ละลายได้ดีในไขมัน มีบทบาทสำคัญในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain-breaking antioxidant) โดยการปลดปล่อยอะตอมของไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เพื่อที่จะหยุดหรือลดการเกิด Lipid peroxidation และป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) พบว่า การเสริม Vitamin E 1 mM ร่วมกับกรดอะมิโน 10 mM ลงในสาร Tris-base extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (5%) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น อีกทั้งสามารถลดการเกิด Lipid peroxidation ได้ดีกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การศึกษาของ Anghel *et al.* (2010) พบว่า การเสริม Vitamin E (1 mM) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Alpine สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม การใช้ Vitamin E ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (2 และ 3 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย) ในแพะพันธุ์บอร์ลดลง ($P < 0.05$) อีกทั้งมีปริมาณของ MDA เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ Vitamin E ที่สูงขึ้น ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันมากกว่าการเป็นสาร Antioxidant (Dewry *et al.*, 2015; Prastiyana *et al.*, 2021) อีกทั้งทำให้ความสามารถในการจับอนุมูล Peroxyl ลดลง ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (Cao and Cutler, 1993; Cerolini *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011) ซึ่ง Benhenia *et al.* (2018) รายงานว่า Vitamin E ความเข้มข้นสูง (4 และ 6 mM) ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$)

ในทำนองเดียวกัน การเสริม Cysteine ที่ความเข้มข้น 6 mM และ 9 mM ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต ดังตารางที่ 4.4) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังภาพที่ 4.4) สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมสาร Antioxidant ($P < 0.05$) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก Cysteine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ GSH โดย GSH ที่ผลิตจาก Cysteine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GPx และช่วยกำจัด H_2O_2 ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่ทำลายเสียหายต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ จากการศึกษาของ Anghel *et al.* (2010) พบว่าการเสริม Cysteine 10 mM ในน้ำเชื้อแพะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) และการศึกษาของ Adekunle *et al.* (2022) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะกระป๋อง West African พบว่า เมื่อเสริม Cysteine 8 mM ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต และกระบวนการ Sperm capacitation เพิ่มขึ้น และสามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 12 mM พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ ซึ่งส่งผลเสียต่อเซลล์ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง และปริมาณความเข้มข้นของ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Memon *et al.* (2011) พบว่า การเสริม Cysteine ความเข้มข้นสูงส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลงในน้ำเชื้อแพะ และน้ำเชื้อปลา (Da Costa *et al.*, 2020)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สูตรทางการค้า มีอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และกิจกรรมของไมโทคอนเดรียสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ($P < 0.05$) แต่มีค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ต่ำกว่ากลุ่มของทรีตเมนต์ที่ทำการเสริมสาร Antioxidant (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก อัตราการเคลื่อนที่สูงแสดงถึงประสิทธิภาพในการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ แต่อย่างไรก็ตาม ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และเยื่อหุ้มเซลล์อาจถูกทำลายเนื่องจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยอะโครโซมที่สมบูรณ์บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Paoli *et al.* (2011) รายงานว่า อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิขึ้นอยู่กับการทำงานของไมโทคอนเดรีย และการศึกษาของ Kommisrud *et al.* (2002) พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่ระยะเวลา 6, 30, และ 54 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ ($P > 0.05$) แต่ทำให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงในช่วงระยะเวลาการเก็บที่ 6, 30, 54, 72, และ 102 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.2.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการเกิด DNA methylation และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation พบว่า การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM, Cysteine 6 mM, และ Vitamin E 1 mM มีเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC เท่ากับ $1.95 \pm 0.05\%$, $2.51 \pm 0.25\%$, $2.54 \pm 0.31\%$, และ $2.58 \pm 0.17\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ($1.95 \pm 0.05\%$) ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของ 5-mC มีค่าไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า และน้ำเชื้อสด ที่มีเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC เท่ากับ $2.22 \pm 0.13\%$ และ $1.60 \pm 0.26\%$ ตามลำดับ ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 จากการศึกษาในครั้งนี้ การใช้ GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation อย่างไรก็ตาม การเสริมสาร Antioxidant ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (GSH 5 mM, Cysteine 9 mM และ 12 mM, Vitamin E 2 mM และ 3 mM) ส่งผลให้ค่า DNA methylation เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะทำให้การแสดงออกของยีนผิดปกติ จึงเห็นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Transcriptomic เพื่อดูการแสดงออกของยีน (Gene expression) เพิ่มเติม จากการศึกษาของ Khosravizadeh *et al.* (2022) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ของ Cytosine methylation ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อม้าแบบแช่แข็ง ทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Aurich *et al.*, 2016) ในขณะที่ปริมาณการเกิด DNA methylation ที่ลดลง ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้ตามปกติ (Maeder *et al.*, 2013)



ภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ 5-mC (a) และระดับ 5-mC ที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของทรีตเมนต์ที่เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (b) GSH: T1, T2, และ T3 (1, 3, และ 5 mM ตามลำดับ) Cysteine: T4, T5, และ T6 (6, 9, และ 12 mM) Vitamin E: T7, T8, และ T9 (1, 2, และ 3 mM) T10: ทรีตเมนต์ที่ไม่เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ T11: สูตรทางการค้า (Andromed) T12: น้ำเชื้อสด และตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

นอกจากนี้ พบความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของเซลล์อสุจิหลังการละลาย กับระดับ DNA methylation พบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับของ DNA methylation และความสมบูรณ์อะโครโซม ($R = -0.648$) ($P < 0.05$) อัตราการเคลื่อนที่รวม ($R = -0.848$) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($R = -0.863$) อัตราการมีชีวิต ($R = -0.773$) และกิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ($R = -0.786$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 อีกทั้งพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับของ DNA methylation และระดับของ MDA ($R = 0.831$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou *et al.* (2023) พบว่า Poria cocos polysaccharides (PCPs) ในเห็ดที่มีคุณสมบัติเป็นสาร Antioxidant เมื่อเสริมที่ความเข้มข้น 600–900 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการเกิด DNA methylation ของเซลล์อสุจิได้ และพบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง DNA methylation กับอัตราการมีชีวิต กิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์อะโครโซม ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation) กับระดับของ DNA methylation

Parameter	DNA methylation	P-value
Total motility	$r = -0.848^{**}$	0.001
Progressive motility	$r = -0.863^{**}$	0.001
Viability	$r = -0.773^{**}$	0.005
Acrosome integrity	$r = -0.648^*$	0.031
Membrane integrity	$r = -0.406$	0.215
Mitochondrial activity	$r = -0.786^{**}$	0.004
MDA	$r = 0.831^{**}$	0.002

หมายเหตุ : * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และ ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

นำฟริตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุด (GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM) ไปทดสอบอัตราการผสมติดเปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า (Andromed) โดยใช้เทคนิคการผสมเทียม พบว่า GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM มีอัตราการผสมติด เท่ากับ 66.67% ($n=6/9$) สูงกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการผสมติดเท่ากับ 37.50% ($n=3/8$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 321 ± 1.83 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อแพะบอร์ ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ

321±4.42 mOsm/kg สามารถรักษาความดันออสโมติกภายในเซลล์อสุจิ และการใช้ Combination ระหว่าง Glycerol (5%) ที่เป็นสาร Cryoprotectant แบบซึมผ่านเซลล์ ช่วยป้องกันการก่อตัวของ น้ำแข็งภายในเซลล์ และ Egg yolk (18%) ที่เป็นแหล่งเลซิทีนจากสัตว์ ทำหน้าที่เป็นสาร Cryoprotectant แบบไม่ซึมผ่านเซลล์ โดย Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลัก และมี Phospholipid ชนิด PC, PS, และ SM ซึ่งช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และไมโทคอนเดรีย ไม่ให้ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ Sperm capacitation การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ สอดคล้องกับผลจากการศึกษาในการ ทดลองที่ 1 ที่ใช้เทคนิค SR- FTIR พบว่า การใช้ Glycerol (5%) ร่วมกับ Egg yolk (18%) มีระดับ ของ Lipid และ Ester lipid สูง ซึ่งช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่น มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ เซลล์อสุจิ อีกทั้งพบระดับของโปรตีนทุติยภูมิชนิด α -helix สูง ซึ่ง α -helix ช่วยรักษาโครงสร้างของ เซลล์อสุจิ และมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ Sperm capacitation (Pachetti *et al.*, 2020) นอกจากนี้ เมื่อเสริม GSH 1 mM ลงในสูตรน้ำเชื้อดังกล่าว สามารถป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซม ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ แบบแช่แข็งได้



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

5.1.1 จากการศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ พบว่า การใช้สาร Tris-base extender ร่วมกับ Combination ของ Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) ที่เป็นแหล่งเลซิตินจากสัตว์ สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค SR-FTIR พบว่า สามารถบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะได้ ซึ่งประกอบด้วย Amide I, Lipid, Nucleic acid, Amide II, และ Ester lipid ตามลำดับ นอกจากนี้ สามารถใช้โปรตีนทุติยภูมิของ Amide I (α -helix และ β -sheet) เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำเชื้อได้ โดยเปอร์เซ็นต์ของ α -helix ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ Capacitation ของเซลล์อสุจิ

5.1.2 จากการศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง พบว่า การเสริมสาร GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิต ลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การถูกทำลายของอะโครโซม ลดการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation และสามารถลดปริมาณการเกิด DNA methylation ของน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะพันธุ์บอร์ได้ สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตแพะพันธุ์บอร์ด้วยวิธีการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งจะส่งผลดีต่อกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากการใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืช (Soybean lecithin) ร่วมกับ Glycerol ยังไม่สามารถทดแทนการใช้แหล่งเลซิตินจากสัตว์ (Egg yolk) ร่วมกับ Glycerol จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระดับความเข้มข้นของ Soybean lecithin ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ เพื่อให้สามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง และลดการใช้ Egg yolk ได้

5.2.2 จากการทดสอบการผสมติดในฟาร์มแพะของเกษตรกร มีข้อจำกัดในจำนวนแม่พันธุ์ที่มีความพร้อม (17 ตัว) ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มจำนวนแม่พันธุ์ในการทดสอบอัตราการผสมติด ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูลมากยิ่งขึ้น

5.2.3 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Transcriptomic เพื่อการแสดงออกของยีน (Gene expression) โดยสามารถระบุ Biomarker ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์อสุจิ เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ



เอกสารอ้างอิง

- คมสัน รุ่งเรือง, และอินทอร อีรานูวัฒน์. (2567). การวิเคราะห์ความเสี่ยงเชิงคุณภาพในการนำเข้าโรคบลูทังก์จากการนำเข้าโค กระบือ แพะ และแกะเข้ามาในราชอาณาจักรผ่านทางท่าอากาศยานสุวรรณภูมิระหว่างปี พ.ศ. 2563-2565. **สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. สืบค้นจาก <https://dcontrol.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu/2018-08-31-02-35-00/8887-2563-2565>.
- จิตศักดิ์ เมืองเขียว, ไชยวรรณ วัฒนจันทร์, และธัญจิรา เทพรัตน์. (2559). ผลของเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง. **วารสารแก่นเกษตร**. 44(2): 271-278.
- นวรรตน์ บุญทองเนียม. (2566). ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และปศุสัตว์. **ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. สืบค้นจาก <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/413-report-thailand-livestock/reportservey2566>.
- สมร พรชื่นชูวงศ์, ปราโมทย์ แผงคำ, ธารา วงศ์ดี, และสรศักดิ์ ทองแพะ. (2563). การวิจัยและพัฒนาด้านน้ำเชื้อแช่แข็ง และการผสมเทียมแพะเพื่อสนับสนุนเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สมร พรชื่นชูวงศ์, ปราโมทย์ แผงคำ, ธารา วงศ์ดี, และสรศักดิ์ ทองแพะ. (2564). การวิจัยและพัฒนาด้านน้ำเชื้อแช่แข็ง และการผสมเทียมแพะเพื่อสนับสนุนเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เสมอ ถาน้อย. (2561). สเปิร์ม โครงสร้างและความสามารถในการเจริญพันธุ์. (พิมพ์ครั้งที่ 1). พิษณุโลก:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- Adekunle, E.O., Iyanda, O.A., Majekodunmi, B.C., Akosile, O.A., Ojo, S.T., Odeyemi, A.J., Logunleko, M., Oderinwale, O.A., Sorongbe, T.A., and Daramola, J.O. (2022). Preservative effects of cysteine on sperm viability of West African dwarf goat bucks chilled at 4°C. **Nigerian Journal of Animal Production**. 49: 49-59.
- Al-Mutary, M.G., Al-Ghadi, M.Q., Ammari, A.A., Al-Himadi, A.R., Al-Jolimeed, A.H., Arafah, M.W., Amran, R.A., Aleissa, M.S., and Swelum, A.A. (2020). Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing

- ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. **Theriogenology**. 152: 139–146.
- Amaral, S., Da Costa, R., Wübbeling, F., Redmann, K., and Schlatt, S. (2018). Raman micro-spectroscopy analysis of different sperm regions: a species comparison. **Molecular Human Reproduction**. 24(4): 185–202.
- Anghel, A., Zamfirescu, S., Dragomir, C., Nadolu, D., Elena, S., and Florica, B. (2010). The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. **Romanian Biotechnological Letters**. 15: 26-32.
- Anothaisinthawee, S., Nomura, K., Oishi, T., and Amano, T. (2010). Goat genetic resources and breeding strategies in Thailand. **The Journal of Animal Genetics**. 38: 41–48.
- Aurich, C., Schreiner, B., Ille, N., Alvarenga, M., and Scarlet, D. (2016). Cytosine methylation of sperm DNA in horse semen after cryopreservation. **Theriogenology**. 86: 1347–1352.
- Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M.A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., and Iguer-Ouada, M. (2018). Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. **Animal Reproduction Science**. 195: 266–273.
- Bhagwat, S., Dalvi, V., Chandrasekhar, D., Matthew, T., Acharya, K., Gajbhiye, R., Kulkarni, V., Sonawane, S., Ghosalkar, M., and Parte, P. (2014). Acetylated α -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility. **Fertility and sterility**. 101(1): 95–104.
- Cao, G., and Cutler, R.G. (1993). High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. 17: 189–201.
- Capra, E., Lazzari, B., Turri, F., Cremonesi, P., Portela, A.M.R., Ajmone-Marsan, P., Stella, A., and Pizzi, F. (2019). Epigenetic analysis of high and low motile sperm populations reveals methylation variation in satellite regions within the pericentromeric position and in genes functionally related to sperm DNA organization and maintenance in *Bos taurus*. **BMC Genomics**. 20: 1-12.
- Celeghini, E.C.C., de Arruda, R.P., de Andrade, A.F.C., Nascimento, J., and Raphael, C.F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric

- assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**. 42: 479-488.
- Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., and Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Theriogenology**. 66: 877–886.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox Biology**. 14: 450–464.
- Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G.G., Manca, M.E., Naitana, S., and Berlinguer, F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**. 83: 1064–1074.
- Cheng, P.N., Pham, J.D., and Nowick, J.S. (2013). The supramolecular chemistry of β -sheets. **Journal of the American Chemical Society**. 135(15): 5477–5492.
- Da Costa, B.B., Marques, L.S., Lassen, P.G., Rodrigues, R.B., Silva, H.T.R., Moreira, J.C.F., and Streit, D.P. (2020). Effects of cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. **Aquaculture Research**. 51: 455–464.
- Das, P.K., Mukherjee, J., and Banerjee, D. (2023). Functional morphology of the male reproductive system. **Textbook of Veterinary Physiology**. Springer, Singapore.
- Das, S., Nandi, P.R., Sarkar, P., Tudu, K.C., Rai, S., Behera, R., Mandal, A., Mondal, M., and Karunakaran, M. (2021). Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase supplementation on cryopreservation of Black Bengal buck semen. **Tropical Animal Health and Production**. 53: 1-7.
- Dewry, R.K., Deka, B.C., Bhuyan, D., Biswas, R.K., Sinha, S., Hussain, Z., Das, A., Borah, P., and Hazarika, S.B. (2015). Effect of vitamin E on the quality of frozen buck semen. **The Indian Journal of Small Ruminants**. 21: 343-346.
- El-Khawagah, A.R.M., Rawash, Z.M., El-Badry, D.A., and Kandiel, M.M. (2020). Influence of butylated hydroxytoluene addition to cryodiluents on freezability and DNA integrity of Boer and Zaraibi buck spermatozoa. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. 9(2): 96-103.

- Estrada, E., Rodriguez-Gil, J.E., Rivera Del Alamo, M.M., Pena, A., and Yeste, M. (2017). Effects of reduced glutathione on acrosin activity in frozen-thawed boar spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**. 29: 283–293.
- Fathi, M., Zaher, R., Ragab, D., Gamal, I., Mohamed, A., Naga, E.A.E., and Badr, M. (2019). Soybean lecithin-based extender improves Damascus goat sperm cryopreservation and fertilizing potential following artificial insemination. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. 8(4): 174-180.
- Frau, P.P., Soler, A.J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D.A., Fernández-Santos, M.R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V., and Garde, J.J. (2020). Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. **International Journal of Molecular Sciences**. 21: 1-22.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R., and Nasr-Esfahani, M.H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**. 73(4): 480–487.
- Gadea, J., Gumbao, D., Gomez-Gimenez, B., and Carlos-Gardon, J. (2013). Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. **Reproductive Biology**. 13: 24-33.
- Gadella, B.M., and Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**. 81: 74–84.
- Galian, S., Peinado, B., Almela, L., Poto, A., and Ruiz, S. (2023). Post-thaw quality of spermatozoa frozen with three different extenders in the Murciano Granadina goat breed. **Animals**. 13(2): 1-14.
- Gangwar, C., Kharche, S.D., Ranjan, R., Kumar, S., Goel, A.K., Jindal, S.K., and Agarwal, S.K. (2015). Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. **Small Ruminant Research**. 129: 104-107.
- Gao, D., and Critser, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**. 41: 187-196.

- Goswami, M.K., Sinha, S., Deka, B.C., Bhuyan, M., and Biswas, R.K. (2021). Effect of addition of vitamin E and caffeine on quality of frozen goat semen. **The Pharma Innovation Journal**. 10: 1-4.
- Hassan, S.A., Khalil, W.A., Hassan, M.A.E., Yousif, A.I., Sabry, O.M., Wink, M., and Sobeh, M. (2021). Antioxidant and antiapoptotic effects of a *Turraea fischeri* leaf extract on cryopreserved goat sperm. **Animals**. 11: 1-13.
- Heidari, M., Qasemi-Panahi, B., Moghaddam, G., Daghigh-Kia, H., and Masoudi, R. (2022). L-carnitine improves quality parameters and epigenetic patterns of buck's frozen-thawed semen. **Animal reproduction science**. 247: 1-8.
- Hu, J.H., Zhao, X.L., Tian, W.Q., Zan, L.S., and Li, Q.W. (2011). Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. **Animal**. 5: 107–112.
- Intawicha, P., Moonmanee, T., Saengwong, S., Lumsangkul, C., Liao, Y.J., and Inyawilert, W. (2022). The replacement of fresh egg yolk by lyophilized egg yolk in Tris-base extender in cryopreserved Boer and Saanen semen. **Reproduction in Domestic Animals**. 57(8): 928–935.
- Jala, R.C.R., Chen, B., Li, H., Zhang, Y., Cheong, L-Z., Yang, T., and Xu, X. (2016). Enzymatic preparation and characterization of soybean lecithin-based emulsifiers. **Grasas Aceites**. 67(4): 1-8.
- Khosravizadeh, Z., Khodamoradi, K., Rashidi, Z., Jahromi, M., Shiri, E., Salehi, E., and Talebi, A. (2022). Sperm cryopreservation and DNA methylation: possible implications for ART success and the health of offspring. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. 39: 1815–1824.
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., and Grevle, I.S. (2002). Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 43: 49–55.
- Levkova, M., Radanova, M., and Angelova, L. (2022). Potential role of dynein-related genes in the etiology of male infertility: A systematic review and a meta-analysis. **Andrology**. 10(8): 1484–1499.
- Li, R., Zhao, H., Li, B., Wang, S., and Hua, S. (2023). Soybean lecithin and cholesterol-loaded cyclodextrin in combination to enhances the cryosurvival of dairy goat semen. **Cryobiology**. 112: 1-6.

- Liang, J., Larbi, A., Lv, C., Ali, S., Wu, G., and Quan, G. (2022). Fertility results after exocervical insemination using goat semen cryopreserved with extenders based on egg yolk, skim milk, or soybean lecithin. **Reproduction in Domestic Animals**. 58: 431-442.
- Lin, M., Ling, P., He, Q., Chen, D., Zheng, L., Tang, L., and Jiang, S.W. (2023). Low acrosin activity is associated with decreased Spam1/acrosin expression and GSH deficiency-caused premature acrosome release of human sperm cells. **Cell and Tissue Research**. 394: 529–545.
- Lone, S.A., Mohanty, T.K., Bhakat, M., Baithalu, R.K., and Kumar, R. (2017). Effect of dilution on cryosurvival of low sperm doses: A review. **Cryo letters**. 38: 471–476.
- Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y., and Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 16: 1-18.
- Lushchak, V.I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of Amino Acids**. 2012: 1-26.
- Maeder, M.L., Angstman, J.F., Richardson, M.E., Linder, S.J., Cascio, V.M., Tsai, S.Q., Ho, Q.H., Sander, J.D., Reyon, D., Bernstein, B.E., Costello, J.F., Wilkinson, M.F., and Joung, J.K. (2013). Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. **Nature Biotechnology**. 31: 1137–1142.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**. 247: 125-142.
- Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M., Nadia, F.M., and Audrey, G. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in tris egg yolk extender. **Animal Reproduction Science**. 129: 44-49.
- Merati, Z., and Farshad, A. (2021). Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. **Cryobiology**. 100: 151-157.
- Mosca, F., Madeddu, M., Sayed, A.A., Zaniboni, L., Iaffaldano, N., and Cerolini, S. (2016). Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. **Cryobiology**. 73(3): 343–347.
- Nguyen, V.V., Ponchunchoovong, S., Kupittayanant, S., and Kupittayanant, P. (2019). Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by

- computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. **Veterinary Medicine and Science**. 5: 345-360.
- Naing, S.W., Wahid, H., Azam, K.M., Rosnina, Y., Zuki, A.B., Kazhal, S., Bukar, M.M., Thein, M., Kyaw, T., and San, M.M. (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**. 122: 23–28.
- Nordstoga, A.B., Soderquist, L., Adnoy, T., and Paulenz, H. (2011). Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. **Reproduction in Domestic Animals**. 46: 82-86.
- Oldenhof, H., Schütze, S., Wolkers, W.F., and Sieme, H. (2016). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of sperm chromatin structure and DNA stability. **Andrology**. 4(3): 430–441.
- Ozer Kaya, S., Gur, S., and Kaya, E. (2018). Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen. **Andrologia**. 50: 1-5.
- Ozturk, A.E., Bodu, M., Bucak, M.N., Agir, V., Ozcan, A., Keskin, N., Ili, P., Topraggaleh, T.R., Sidal, H., Baspimar, N., and Dursun, S. (2020). The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. **Cryobiology**. 95: 157-163.
- Pachetti, M., Zupin, L., Venturin, I., Mitri, E., Boscolo, R., D’Amico, F., Vaccari, L., Crovella, S., Ricci, G., and Pascolo, L. (2020). FTIR spectroscopy to reveal lipid and protein changes induced on sperm by capacitation: Bases for an improvement of sample selection in ART. **International Journal of Molecular Sciences**. 21(22): 1-16.
- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F., and Gandini, L. (2011). Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility and Sterility**. 95: 2315–2319.
- Parrella, A., Medrano, L., Aizpurua, J., and Gómez-Torres, M.J. (2024). Phospholipase C zeta in human spermatozoa: A systematic review on current development and clinical application. **International Journal of Molecular Sciences**. 25(2): 1-24.

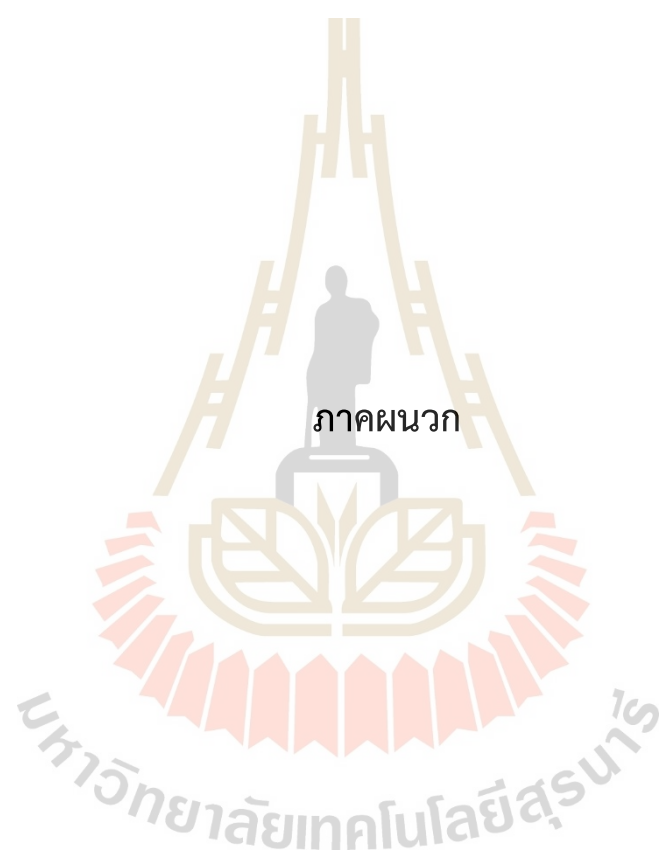
- Paul, R.K., Balaganur, K., Kumar, D., and Singh, R. (2019). Mimicking the cauda epididymal plasma-like osmolality in extender improves liquid preservation of ram semen at 3–5°C. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. 65: 474–482.
- Penalva, D.A., Furland, N.E., López, G.H., Aveldaño, M.I., and Antollini, S.S. (2013). Unique thermal behavior of sphingomyelin species with nonhydroxy and 2-hydroxy very-long-chain (C28–C32) PUFAs. **Journal of lipid research**. 54(8): 2225–2235.
- Pongsetkul, J., Siriwong, S., Thumanu, K., Boonanuntanasarn, S., and Yongsawatdigul, J. (2023). Investigating the effect of various sous-vide cooking conditions on protein structure and texture characteristics of Tilapia fillet using synchrotron radiation-based FTIR. **Foods**. 12(3): 1-14.
- Prastiya, R.A., Munir, M.M., and Nugroho, A.P. (2021). The protective impacts of α -tocopherol supplementation on the semen quality of Sapera goat preserved at 4°C. **Tropical Animal Science Journal**. 44: 261-266.
- Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**. 63: 215-225.
- Rana, A.P., Majumder, G.C., Misra, S., and Ghosh, A. (1991). Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1061(2): 185–196.
- Rawash, Z.M., Ebtihal-Ibrahim, A., and El-Raey, M. (2018). Effects of reduced glutathione on Boer goat semen freezability. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. 7(1): 33-38.
- Rival, C.M., Xu, W., Shankman, L.S., Morioka, S., Arandjelovic, S., Lee, C.S., Wheeler, K.M., Smith, R.P., Haney, L.B., Isakson, B.E., Purcell, S., Lysiak, J.J., and Ravichandran, K.S. (2019). Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. **Nature communications**. 10(1): 1-13.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., and Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk-based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**. 68: 276-280.

- Santella, R.M. (2006). Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. 15: 1585–1587.
- Shafiei, M., Forouzanfar, M., Hosseini, S.M., and Esfahani, M.H. (2015). The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of post thawed goat semen. **Theriogenology**. 83: 1321-1327.
- Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., and Brenig, B. (2021). Sperm lipid markers of male fertility in mammals. **International Journal of Molecular Sciences**. 22(16): 1-21.
- Sharma, A., Sood, P., and Chaudhary, J.K. (2020). Comparative efficacy of different concentrations of egg yolk for cryopreservation of goat semen. **Indian Journal of Animal Sciences**. 90(4): 560–563.
- Shivanoor, S.M., and David, M. (2015). Fourier transform infrared (FT-IR) study on cyanide induced biochemical and structural changes in rat sperm. **Toxicology Reports**. 2: 1347–1356.
- Simon, L., Emery, B.R., and Carrell, D.T. (2017). Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. 44: 38–56.
- Simon, A., Gounou, C., Tan, S., Tiefenauer, L., Di Berardino, M., and Brisson, A.R. (2013). Free-standing lipid films stabilized by Annexin-A5. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1828(11): 2739–2744.
- Souza, C.V., Brandão, F.Z., Santos, J.D.R., Alfradique, V.A.P., Santos, V., Morais, M., Rangel, P.S.C., Silva, A.A.D., and Souza-Fabjan, J.M.G. (2019). Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. **Cryobiology**. 89: 104–108.
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., and Zhang, D. (2020). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. **Cryobiology**. 92: 146–150.
- Swelum, A.A.A., Saadeldin, I.M., Alanazi, M.B., Awadh, H.B., Afifi, M., and Alowaimer, A.N. (2018). Effects of adding egg yolks of different avian species to tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. **Animal Reproduction Science**. 195: 345-354.

- Tuncer, P.B., Bucak, M.N., Buyukleblebici, S., Sariozkan, S., Yeni, D., Eken, A., Akalin, P.P., Kinet, H., Avdatek, F., Fidan, A.F., and Gundogan, M. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**. 61: 303–307.
- Ugur, M.R., Abdelrahman, A.S., Evans, H.C., Gilmore, A.A., Hitit, M., Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Kaya, A., and Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontiers in Veterinary Science**. 6: 1-15.
- Whitlock, J.M., and Chernomordik, L.V. (2021). Flagging fusion: Phosphatidylserine signaling in cell-cell fusion. **The Journal of Biological Chemistry**. 296: 1-16.
- Woods, E.J., Thirumala, S., Badhe-Buchanan, S.S., Clarke, D., and Mathew, A.J. (2016). Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. **Cytotherapy**. 18: 697-711.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**. 85(1): 47-64.
- Zhao, F., Li, R., Liu, Y., and Chen, H. (2023). Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. **Frontiers in Nutrition**. 9: 1-8.
- Zhao, J., Meng, P., Jin, M., Ma, X., Ma, H., Yang, H., Chen, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Luo, Y., and Liu, J. (2023). Combined addition of l-carnitine and l-proline improves cryopreservation of dairy goat semen. **Animal Reproduction Science**. 257: 1-11.
- Zhang, W., Min, L., Li, Y., Lang, Y., Hoque, S.A.M., Adetunji, A.O., and Zhu, Z. (2022). Beneficial effect of proline supplementation on goat spermatozoa quality during cryopreservation. **Animals**. 12(19): 2626.
- Zhou, J., Zhang, K., Gao, J., Xu, J., Wu, C., He, M., Zhang, S., Zhang, D., Dai, J., and Sun, L. (2023). Effect of *Poria cocos* mushroom polysaccharides (PCPs) on the quality and DNA methylation of cryopreserved Shanghai white pig spermatozoa. **Cells**. 12 (11): 1-14.
- Zou, J., Wei, L., Li, D., Zhang, Y., Wang, G., Zhang, L., Cao, P., and Li, G. (2022). Study on cryopreservation of Guanzhong dairy goat semen with bovine semen seminal plasma. **Theriogenology**. 189: 113–117.

- Zou, J., Wei, L., Li, D., Zhang, Y., Wang, G., Zhang, L., Cao, P., Yang, S., and Li, G. (2021). Effect of glutathione on sperm quality in Guanzhong dairy goat sperm during cryopreservation. **Frontiers in Veterinary Science**. 8: 1-6.
- Zuidema, D., Kerns, K., and Sutovsky, P. (2021). An exploration of current and perspective semen analysis and sperm selection for livestock artificial insemination. **Animals**. 11: 3563.





ภาคผนวก



ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล
อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 อุปกรณ์สำหรับการรีดน้ำเชื้อแพะ

- 1) โยนีเทียม (Artificial vagina)
- 2) ขอบังคับแพะตัวเมีย
- 3) กระจกน้ำร้อน
- 4) หลอด (Tube) ขนาด 15 mL
- 5) กระจกฟอยล์

1.2 อุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

- 1) หลอด microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) หลอด (Tube) ขนาด 15 mL
- 3) กระจกทึบ
- 4) กระจกน้ำกลั่น
- 5) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 6) กระจกชั่งสาร
- 7) ซ้อนตักสาร
- 8) ปีกเกอร์ (Beaker)
- 9) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 10) เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hotplate with stirrer)
- 11) เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
- 12) Micropipette
- 13) Pipettes tips
- 14) เครื่อง Water bath
- 15) เครื่อง Osmometer
- 16) เครื่อง pH meter
- 17) เครื่อง Photometer SDM 1 (Minitube International AG, Germany)
- 18) ตู้แช่ 4°C
- 19) หลอดฟาง (French straws) ขนาด 0.25 mL
- 20) ถังไนโตรเจนเหลว
- 21) กล่องโฟม
- 22) ตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อ
- 23) Cryocan และ Cryotube

1.3 อุปกรณ์สำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1.3.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต

- 1) เครื่อง Computer assisted semen analysis (CASA) version 10 HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)
- 2) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 3) Micropipette
- 4) Pipettes tips
- 5) เครื่อง Water bath
- 6) เครื่องอุ่น Slide (Slide warmers)
- 7) แผ่น Slide 2X-cell สำหรับเครื่อง CASA
- 8) แผ่น Cover glass
- 9) แผ่น Slide
- 10) กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope
- 11) ขวดสีชา

1.4 การประเมินด้วยเทคนิค SR-FTIR

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) แผ่น BaF2 window ความหนา 0.5 mm
- 5) โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 6) กล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด Bruker Hyperion 2000-IR Microscope (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany)
- 7) ซอฟต์แวร์ OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd.)
- 8) ซอฟต์แวร์ The Unscrambler X Multivariate data analysis software (version 10.4, Camo Analytics, Oslo, Norway)

1.5 การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) แผ่น Slide และ Cover glass
- 5) กล้อง Confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon/Ni-E, Japan)

13.4 การประเมินการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS)

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) ไมโครเพลท 96 ช่อง (96-well plate)
- 5) เครื่อง Multiskan GO with Thermo Scientific Skanlt software (Thermo Fisher scientific, N.Y.R. Limited Partnership, Bangkok, Thailand)

13.5 การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) กล่องโฟม และน้ำแข็ง
- 5) Racks
- 6) เครื่อง Vortex
- 7) หลอดคอลัมน์ FATG
- 8) หลอด Collection tube
- 9) หลอด Elution tube
- 10) เครื่อง Nano drop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- 11) ตู้แช่ -20°C
- 12) เครื่อง Microplate spectrophotometer
- 13) Strip well
- 14) Parafilm M
- 15) Micropipette และ Tips
- 16) Multichannel pipette

13.6 การประเมินอัตราการผสมติด

- 1) ซองบังคับแพะตัวเมีย
- 2) คีมปากเปิด (Vaginal speculum)
- 3) ไฟฉาย
- 4) ปืนผสมเทียม
- 5) กระจกน้ำร้อน

- 6) เทอร์โมมิเตอร์
- 7) Forceps และกรรไกร
- 8) กระดาษทิชชู
- 9) สำลีชุบแอลกอฮอล์
- 10) พลาสติกซีท
- 11) ถุงมือ
- 12) สมุดจดบันทึกการผสมเทียม

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสาร Extender สาร Cryoprotectant และสาร Antioxidant

- 1) Tris
- 2) Citric acid
- 3) Fructose
- 4) Lincospecs
- 5) น้ำกลั่น
- 6) Andromed[®]
- 7) Glycerol
- 8) Egg yolk
- 9) Soybean lecithin
- 10) Glutathione
- 11) Cysteine
- 12) Vitamin E
- 13) Lactated ringers

2.2 สารเคมีสำหรับการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

2.2.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต

- 1) Eosin B
- 2) Nigrosin
- 3) Sodium-citrate dehydrate
- 4) น้ำกลั่น

2.2.2 การประเมินด้วยเทคนิค SR-FTIR

- 1) NaCl 0.85%

- 2) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave

2.2.3 การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย

- 1) Propidium iodide (PI)
- 2) Hoechst 33342 (H342)
- 3) Fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA)
- 4) 5,5', 6,6'-tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1)
- 5) Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)
- 6) Dimethyl sulfoxide (DMSO)

2.2.4 การประเมินการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS)

- 1) Trichloroacetic acid (TCA)
- 2) Thiobarbituric acid (TBA)
- 3) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.2.5 การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

- 1) ชุดสกัด Tissue genomic DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp, Ping-Tung, Taiwan) ประกอบด้วย
 - FATG1 buffer
 - FATG2 buffer
 - Proteinase K
 - W1 buffer
 - Wash buffer
- 2) NaCl 0.9%
- 3) RNase A
- 4) Dithiothreitol (DTT)
- 5) Ethanol 99%
- 6) ddH₂O
- 7) ผง Agarose
- 8) ชุดวิเคราะห์ global DNA methylation assay kit (5 Methyl Cytosine, Colorimetric, Abcam) ประกอบด้วย

- Negative control
- Positive control
- Binding Solution
- 1X wash buffer
- 5-mC antibody, 1000X
- Signal indicator, 1000X
- Enhancer solution, 1000X
- Developer solution
- Stop solution

2.2.6 การประเมินอัตราการผสมติด

- 1) ฮอร์โมน Progesterone รูปแบบ CIDR®-G
- 2) ฮอร์โมน Prostaglandin F2: PGF2 α (Estrumate®)
- 3) ฮอร์โมน Pregnant mare serum gonadotrophin; PMSG (Folligon®)
- 4) เจลหล่อลื่น
- 5) แอลกอฮอล์
- 6) น้ำยาฆ่าเชื้อ



ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล

ตารางแสดงผลวิเคราะห์การเรียนรู้

1. การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิติน ที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข.1 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1676.712	4	419.178	172.204	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	60.855	25	2.434		
Total	1737.567	29			

ตารางที่ ข.2 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1208.382	4	302.096	55.311	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	136.545	25	5.462		
Total	1344.927	29			

ตารางที่ ข.3 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	12816.300	4	3204.075	719.209	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	111.375	25	4.455		
Total	12927.675	29			

ตารางที่ ข.4 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Lipid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3809.515	4	952.379	516.569	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	46.092	25	1.844		
Total	3855.607	29			

ตารางที่ ข.5 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Ester lipid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	131.040	4	32.760	152.490	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	5.371	25	0.215		
Total	136.411	29			

ตารางที่ ข.6 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Amide I) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	2956.078	4	739.020	646.540	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	28.576	25	1.143		
Total	2984.654	29			

ตารางที่ ข.7 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Amide II) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	101.298	4	25.325	67.496	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	9.380	25	0.375		
Total	110.678	29			

ตารางที่ ข.8 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Nucleic acid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	549.813	4	137.453	234.543	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	14.651	25	0.586		
Total	564.464	29			

ตารางที่ ข.9 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (β -sheet) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	4.503	4	1.126	0.458	0.765
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.573	10	2.457		
Total	29.076	14			

ตารางที่ ข.10 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (α -helix) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	88.112	4	22.028	8.813	0.003
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.994	10	2.499		
Total	113.105	14			

ตารางที่ ข.11 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (β -turn) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	19.003	4	4.751	3.858	0.038
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	12.315	10	1.232		
Total	31.318	14			

ตารางที่ ข.12 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (Antiparallel) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	52.456	4	13.114	5.395	0.014
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.309	10	2.431		
Total	76.765	14			

2. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข.13 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	2169.221	10	216.922	60.887	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	195.950	55	3.563		
Total	2365.171	65			

ตารางที่ ข.14 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1356.784	10	135.678	46.670	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	159.894	55	2.907		
Total	1516.678	65			

ตารางที่ ข.15 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1858.091	10	185.809	99.218	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	103.000	55	1.873		
Total	1961.091	65			

ตารางที่ ข.16 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์อะโครโซมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1768.091	10	176.809	125.477	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	77.500	55	1.409		
Total	1845.591	65			

ตารางที่ ข.17 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3243.273	10	324.327	246.041	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	72.500	55	1.318		
Total	3315.773	65			

ตารางที่ ข.18 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3567.273	10	356.727	213.261	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	92.000	55	1.673		
Total	3659.273	65			

ตารางที่ ข.19 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อระดับ MDA ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	15.027	10	1.503	17.103	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	4.832	55	0.088		
Total	19.859	65			

ตารางที่ ข.20 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	14.070	11	1.279	9.310	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3.297	24	0.137		
Total	17.367	35			

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพาริดา สุวอ เกิดเมื่อวันที่ 9 เมษายน พ.ศ. 2542 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เริ่มศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนอนุบาลนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา ศึกษาในระดับมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนสุนารีวิทยา จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ในปีการศึกษา 2564 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ภายใต้การดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์

