Effect of semen extenders on the quality of frozen-thawed jackass semen

Sasithorn Panasophonkul[1] Thienthada Pothipongsathorn[2] Anucha Sathanawongs[3] Siriwan Tangyeunyong[1*]

Abstract

The study of the effect of semen extenders on frozen-thawed semen quality was performed in 5 jackasses (*Equusasinus*). Semen was collected once a week by using Missouri model artificial vagina, for 2 consecutive weeks. Each ejaculate was divided into three groups, centrifuged and immediately diluted in 3 different freezing extenders with 4% glycerol: 1) Lactose-glucose EDTA and 20% egg yolk (LGEDTA-20Y/Gly); 2) UHT skimmed milk-glucose and 10% egg yolk (SMG-10Y/Gly); 3) Non-fat dried skimmed milk-glucose and 4% egg yolk (NFDSMG-4Y/Gly). All samples were frozen by programmable freezing machine. The quality of semen was evaluated at 10 min, 1h, 2h and 4h after thawing. The percentages of progressive sperm motility of samples diluted in LGEDTA-20Y/Gly and SMG-10Y/Gly were significantly higher than those diluted in NFDSMG-4Y/Gly ($p<0.05$). Moreover, we found that semen diluted in LGEDTA-20Y/Gly had a significant higher rate of alive sperm than those diluted in NFDSMG-4Y/Gly ($p<0.05$). In the aspect of sperm morphology and plasma membrane and acrosome integrities, no significant difference among the groups was found ($p>0.05$). We concluded that lactose glucose EDTA plus 20% egg yolk and 4% glycerol extender provides the best result for protecting the sperm from cold shock and improve the semen quality after thawing.

Keywords: semen extender, frozen semen, semen quality, jackass

[1]Equine Clinic, Department of Companian Animal and Wildlife Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100.

[2]Lampang Pony Welfare Foundation. Lampang 52000.

[3]Unit of Veterinary Preclinic, Department of Veterinary Preclinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100.

***Corresponding author** E-mail: makhaboocha11@hotmail.com

ผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อลาแช่แข็งหลังการทำละลาย

ศศิธร พนโสภณกุล[1] เทียนธาดา โพธิพงศธร[2] อนุชา สธนวงศ์[3] ศิริวรรณ ตั้งยืนยง[1*]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลายในพ่อลา จำนวน 5 ตัว ทำโดยรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อลาด้วยช่องคลอดเทียมชนิดมิสซูรี่ สัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 2 สัปดาห์ แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม และทำการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนน้ำเชื้อที่ได้ในแต่ละกลุ่มมาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ต่างกัน 3 ชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีกลีเซอรอลผสมอยู่ 4% ได้แก่ ชนิดที่ 1: แลคโตส กลูโคส อีดีทีเอ และ 20% ไข่แดง (lactose-glucose EDTA+20% egg yolk; LGEDTA-20Y/Gly) ชนิดที่ 2: นมขาดมันเนย ยูเอชที กลูโคส แล ะ 10% ไข่แดง (UHT skimmed milk+glucose+10%egg yolk; SMG-10Y/Gly) และชนิดที่ 3: นมผงขาดมันเนย กลูโคส และ 4% ไข่แดง (Non-fat dried skimmed milk+glucose+4% egg yolk; NFDSMG-4Y/Gly) ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลายในนาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 1 , 2 และ 4 ตามลำดับ หลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า กลุ่มที่เจือจางด้วย LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-10Y/Gly มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่เจือจางด้วย NFDSMG-4Y/Gly อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และพบว่ากลุ่มที่เจือจางด้วย LGEDTA-20Y/Gly มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่เจือจางด้วย NFDSMG-4Y/Gly ($p<0.05$) ในส่วนของการประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้ม และอะโครโซมของอสุจิ รวมถึงลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด ($p>0.05$) สรุปได้ว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งชนิดแลคโตส กลูโคส อีดีทีเอ ที่มี 20% ไข่แดง และ 4% กลีเซอรอลให้ผลดีที่สุดในการป้องกันอสุจิจากภาวะช็อคจากการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง และเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลายได้

คำสำคัญ: สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ น้ำเชื้อแช่แข็ง คุณภาพน้ำเชื้อ พ่อลา

[1]คลินิกม้า ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100

[2]มูลนิธิม้าลำปาง ต.เวียงเหนือ อ.เมือง จ.ลำปาง 52000

[3]หน่วยพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมล์**: makhaboocha11@hotmail.com

บทนำ

ลา (donkey: Equusasinus) เป็นสัตว์ในตระกูลม้าที่หลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทยมีการนำมาใช้ผสมพันธุ์กับม้าเพื่อผลิตลูกล่อสำหรับใช้เป็นพาหนะขนส่งและเดินทางบนที่ราบสูง โดยลูกล่อส่วนใหญ่ที่นิยมทำการผลิตมักมาจากการผสมข้ามสายพันธุ์ ระหว่างลาพ่อพันธุ์และแม่ม้ามากกว่าการใช้ม้าพ่อพันธุ์ผสมกับแม่ลา เนื่องจากให้อัตราการผสมติดสูงกว่าและลูกล่อที่เกิดมามีขนาดตัวใหญ่กว่าซึ่งเหมาะต่อการใช้งานในพื้นที่ราบสูง ในการผลิตลูกล่อให้ได้คุณลักษณะที่ดีจำเป็นต้องใช้พ่อพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีร่วมด้วย ซึ่งปัจจุบันสามารถนำเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์มาใช้เพื่อเก็บรักษาสายพันธุกรรมที่ดีของสัตว์พ่อพันธุ์ไว้ใช้ในอนาคตได้ โดยเทคนิคที่ง่าย ให้ผลดี และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากนัก คือการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปแบบของการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อ เป็นการเก็บรักษาคุณภาพของอสุจิให้มีชีวิตยาวนานขึ้นโดยการเจือจางตะกอนอสุจิในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง และทำการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสมก่อนทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ดีการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อโดยรวมลดลงเนื่องจากภาวะช็อคจากการลดอุณหภูมิ (cold shock) อันก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของเยื่อหุ้ม และทำให้อสุจิสูญเสียการทำหน้าที่ในที่สุด การเลือกใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในขั้นตอนของการแช่แข็งจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลาย ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับตัวอสุจิได้ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารสำหรับตัวอสุจิเป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมการเปลี่ยนแปลงแรงดัน และรักษาสมดุลของอิออนต่างๆ ช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่ปนมากับน้ำเชื้อ รวมถึงสามารถกำจัดสารพิษที่ตัวอสุจิผลิตออกมาได้ [1,2] สารละลายเจือจางน้ำเชื้อในขั้นตอนของการแช่แข็ง (freezing extender) ที่นิยมใช้สำหรับสัตว์ตระกูลม้าในปัจจุบันมักประกอบไปด้วย นม น้ำตาล และไข่แดงเป็นหลัก ได้แก่ สารละลายเจือจางที่มีหางนมเป็นส่วนประกอบหลัก (skimmed milk extender: SM) [3-6] สารละลายเจือจางที่มีน้ำตาลแลคโตสและกลูโคสเป็นส่วนประกอบหลัก (lactose-glucose EDTA extender; LGEDTA) [7-10] และสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีนมผงขาดมันเนย น้ำตาล และไข่แดงเป็นส่วนประกอบหลัก (non-fat dry skimmed milk with glucose and egg yolk extender; NFDSMGY) เป็นต้น [11,12] ซึ่งให้ผลในการรักษาคุณภาพของอสุจิหลังการทำละลายแตกต่างกัน ปัจจุบันการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในลา พบว่า ยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในม้า โดยการศึกษาที่ผ่านมาในม้ายังพบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละชนิดนั้น ให้ผลในการรักษาสภาพของอสุจิแตกต่างกันอีกด้วย ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาของ Cătaná และคณะ [9] และ Ecot และคณะ [12] พบว่าการใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด NFDSMGY ให้ผลในการป้องกันอสุจิจากการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งได้ดีกว่าสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งชนิด LGEDTA และ SM โดยไปช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Heitland และคณะ [11] พบว่าหลังการทำละลายน้ำเชื้อที่แช่แข็งในสารละลายเจือจางชนิด SM ให้ผลในการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิได้ดีกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งในสารละลายชนิด LGEDTA โดยน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อม้าที่เจือจางด้วยสารละลายเจือจาง SM และ LGEDTA มีอัตราการผสมติดท้องอยู่ที่ 42 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปัจจุบันหน่วยงานทางทหารในเขตตอนเหนือของประเทศไทย เป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีหน้าที่ในการผลิตล่อเพื่อสนับสนุนในภาระกิจต่างๆ ของกองทัพทำให้มีความจำเป็นต้องสั่งซื้อลาที่มีคุณลักษณะดีจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงมาเป็นพ่อและแม่พันธุ์ หากสามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อในลาให้มีประสิทธิภาพดี จะช่วยลดงบประมาณในการนำเข้าพ่อลาจากต่างประเทศได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 ชนิด ได้แก่ LGEDTA-20Y/Gly, SMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ต่อคุณภาพของอสุจิหลังการทำละลาย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ทำการคัดเลือกพ่อลาพันธุ์เติ้งโจ (Dezhou) และพันธุ์ออสเตรเลีย (Australian donkey) ทั้งหมดจำนวน 5 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ช่วงอายุตั้งแต่ 5-10 ปีและมีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 150-250 กิโลกรัม พ่อลาทุกตัวที่ผ่านการคัดเลือกเป็นพ่อลาที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติของโรคและปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ และถูกใช้ในการผสมพันธุ์เป็นประจำ พ่อลาจะได้รับอาหารข้นครั้งละ 1.5 กิโลกรัมวันละ 2 ครั้ง (เช้า-บ่าย) และหญ้าสดหรือหญ้าแห้งประมาณ 10 กิโลกรัม/ตัว/วัน โดยได้รับน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตลอดทั้งวัน และมีการปล่อยแปลงทุกวันตลอดช่วงเช้า

การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้งหมด ถูกเตรียมจากน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่แยกเอาประจุออก และสารเคมีส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ (analytical grade) จากบริษัทซิกม่าเคมิคอล จำกัด (St. Louis, MO, USA) โดยมีส่วนประกอบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าออสโมลาลิตี้ ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1. Compositions of semen extenders used in the study.

Compositions(g)	Types of Extender		
	LGEDTA-20Y/Gly*	SMG-10Y/Gly**	NFDMG-4Y/Gly***
Non-fat dried skimmed milk	-	-	2.7
UHT skimmed milk (ml)	-	43	-
Glucose monohydrate	-	-	4.9
11% Lactose (w/v) (ml)	50	-	-
Sodium bicarbonate	-	-	0.15
Penicillin (IU)	-	100,000	100,000
Streptomycin (µg)	-	100,000	100,000
Distilled water (ml)	-	-	92
Egg yolk (%)	20	10	4
Equex STM	0.5	-	-
87% Glycerol (%)	4	4	4
Glucose-EDTA solution (ml)	26	-	-
Salt and sugar solution (ml)	-	43	-
pH	7.0±0.1	7.0±0.1	7.3±0.1
Osmolarity (mOsmol/kg)	300±10	300±10	355±5

Compositions(g)	Glucose-EDTA solution *	Salt and sugar solution**
Glucose monohydrate	6.0	5
Lactose	-	0.6
Sodium citrate dihydrate	0.37	0.06
Sodium bicarbonate	0.37	0.08
Disodium EDTA	0.12	-
Penicillin (IU)	100,000	-
Streptomycin (µg)	100,000	-
Distilled water (ml)	100	100
pH	6.7±0.1	-
Osmolarity (mOsm/kg)	400±10	-

*Lactate-glucose EDTA+ 20% egg yolk + 4% glycerol(modified fromCochran et al., 1983)

**Skimmed milk and sugar + 10% egg yolk + 4%glycerol(modified fromPickett and Amann, 1993)

***Non-fat dried milk and glucose + 4% egg yolk + 4% glycerol(modified fromChandong et al., 2012)

การรีดและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อลาทุกตัวสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 2 สัปดาห์ ด้วยโยนีเทียมชนิดมิสซูรี่ (Missourie Model AV, Nasco, Ft. Atkinson, WI, USA) ที่หล่อด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 45–50°C ร่วมกับการปรับความดันให้เหมาะสม นำน้ำเชื้อที่รีดได้มากรองผ่านผ้าก๊อซที่สะอาดเพื่อแยกส่วนเจลและสิ่งสกปรกออก และทำการประเมินคุณภาพเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตร, สี , ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Scan WP2; Eutech Instruments, Malaysia), ความเข้มข้นของอสุจิ (SpermaCue®–Photometer; Minitube, USA) และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ (motility) ของอสุจิไม่น้อยกว่าร้อยละ 75

หลังการประเมินคุณภาพ ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายนมผงขาดมันเนย ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และ 4% ไข่แดงเป็นหลัก (Non-fat dried skimmed milk with glucose and 4% egg yolk; NFDSMG-4Y) [14] โดยให้มีความเข้มข้นของอสุจิอยู่ที่ $25x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นทำการขนส่งมายังห้องปฏิบัติการในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง ภายในเวลา 2 ชั่วโมงหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ

การแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อ

ทำการแบ่งน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย NFDSMG-4Y ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 400xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนของน้ำเลี้ยงอสุจิและสารละลายเจือจางด้านบนทิ้ง จากนั้นนำตะกอนอสุจิที่ได้ในแต่ละหลอดมาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่แตกต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ LGEDTA-20Y/GlySMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ที่อุณหภูมิห้องโดยให้มีความเข้มข้นของอสุจิอยู่ที่ $100x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร นำมาบรรจุลงในหลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร และทำการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (CryoLogic CL-863, Victoria, Australia) โดยเริ่มลดอุณหภูมิลง 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 4 องศาเซลเซียส จากนั้นลดอุณหภูมิลง 7.5 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง -20 องศาเซลเซียส ต่อมาลดอุณหภูมิลง 6.5 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง -40 องศาเซลเซียส แล้วจึงลดอุณหภูมิลง 4 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง -120 องศาเซลเซียส จากนั้นลดอุณหภูมิลงจนถึง -196 องศาเซลเซียสด้วยการนำหลอดน้ำเชื้อจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (รูปที่ 1) แล้วทำการเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวต่อไปเพื่อรอการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

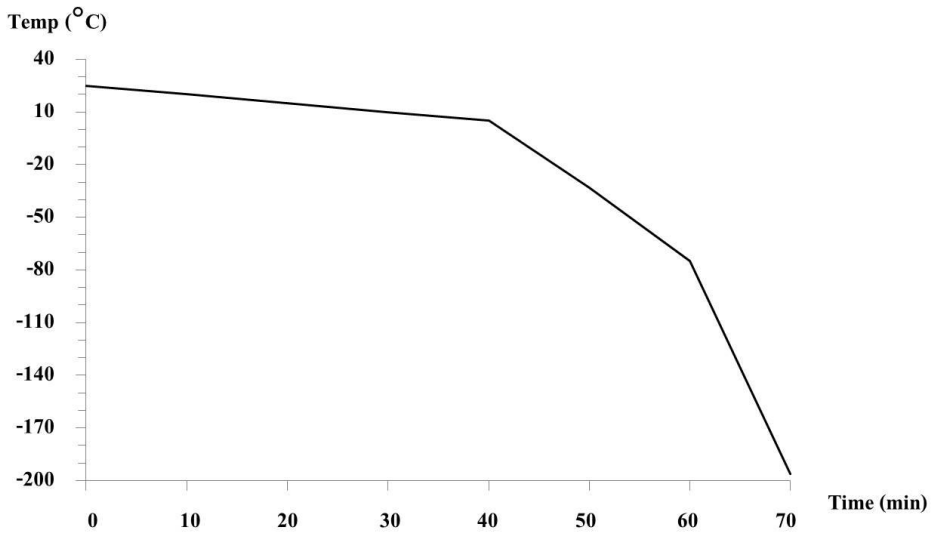

Figure 1. The freezing curve controlled by the Cryogenesis freezing program (Version 5). The initial temperature was set at 25°C, after which the temperature was reduced as follow: 4°C at a rate of 0.5°C/min, -20°C at a rate of 7.5°C/min, -40°C at a rate of 6.5°C/min, -120°C at a rate of 4°C/min, and then the straws were plunged into liquid nitrogen at -196°C.

การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยแช่หลอดน้ำเชื้อในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เจือจางน้ำเชื้อในอัตรา 1:1 ด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ NFDSMG-4Y และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวส่วนบนทิ้ง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ การมีชีวิตรอดของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมอสุจิหลังการรีดเก็บ และในนาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ หลังการทำละลาย

1) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motility) ทำโดยหยดน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย NFDSMG-4Y 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยแผ่นสลิป และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าบนแผ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ตำแหน่งต่างๆ กัน 5 ตำแหน่ง
2) อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ (viability) ทำโดยย้อมตัวอสุจิด้วยสีอีโอซินนิโกรซิน (eosin-nigrosin) นับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ชนิดตัดแสง (phase-contrast microscope) กำลังขยาย

1000 เท่า ตัวอสุจิที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีอีโอซิน (ตัวอสุจิใสไม่ติดสี) ส่วนตัวอสุจิที่ตายจะติดสีอีโอซิน (ตัวอสุจิมีสีม่วง-แดง) [15]

3) ความเข้มข้นของอสุจิ (sperm concentration) ทำการตรวจโดยใช้เครื่องนับความเข้มข้นของตัวอสุจิแบบอัตโนมัติ (SpermaCue®; Minitube of America, Inc., Verona, WI)

4) ความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ (Abnirmality of sperm morphology) ทำการตรวจความผิดปกติของหัวอสุจิ (head morphology) โดยการย้อมด้วยสีอีโอซินนิโกรซิน นับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า [16] ส่วนการตรวจความผิดปกติของหางอสุจิ (tail morphology) ทำโดยการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายฟอร์มอลซาไลน์ (formal saline) และตรวจนับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า [17]

5) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (sperm membrane integrity) ตรวจด้วยการทำ hypo-osmotic swelling test (HOST) โดยเจือจางน้ำเชื้อ 100 ไมโครลิตร กับสารละลายซูโคส (ค่าแรงดันสารละลายเท่ากับ 100 มิลลิออสโมล) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 400 เท่านับอสุจิที่มีลักษณะของหางบวม และม้วนงอ (coiled tail) จากอสุจิจำนวน 200 ตัว และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ

6) ความสมบูรณ์ของอะโครโซมอสุจิ (Sperm acrosomal integrity) ตรวจด้วยการย้อมสี fluorescein isothiocyanate–labeled peanut (*Arachishypogaea*) agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับสี propidium iodide (PI) กล่าวคือ ทำการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 10 µl ลงใน microcentrifuge tube ที่มี 10 µl ของ 340 µM PI นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นหยด 5 µl ของสารละลายลงบนสไลด์ ทำการป้ายและปล่อยให้แห้งในอากาศ และ fix ด้วย 96% ethanol นาน 30 วินาที จากนั้นทำการย้อมส่วนของอะโครโซมโดยหยด 50 µl ของ100 µM FITC-PNA ลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในกล่องที่ชื้นและทึบแสงนาน 30 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วย cooled PBS ก่อนนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการนับอสุจิทั้งหมดจำนวน 200 ตัว โดยอสุจิมีชีวิตที่อะโครโซมปกติจะพบการติดสีเขียวที่ส่วนของอะโครโซม และไม่ติดสีแดงบริเวณตัวอสุจิ ส่วนตัวอสุจิที่ตายและไม่มีอะโครโซมหรืออะโครโซมเกิดการเสียหายจะไม่พบหรือพบการติดสีเขียวที่ส่วนของอะโครโซมเพียงบางส่วน และติดสีแดงบริเวณตัวอสุจิ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละความสมบูรณ์ของอะโครโซมในอสุจิมีชีวิต

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±SEM) ของดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำเชื้อต่างๆ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ลักษณะความผิดปกติของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้ม และอะโครโซมของอสุจิ แล้วนำมาเปรียบเทียบหาค่าความ

แตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Analysis of Variance (ANOVA) หรือ Generalized linear model repeated measures in ANOVA ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 21 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

น้ำเชื้อที่รีดเก็บจากพ่อลาจำนวน 5 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ปกติที่ยอมรับได้ ทั้งในส่วนของปริมาตร ความเป็นกรด-ด่าง การเคลื่อนที่และมีชีวิตรอดของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ และรูปร่างอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากการศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ LGEDTA-20Y/Gly, SMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลาย ณ จุดเวลาที่แตกต่างกัน คือ นาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 4 พบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิดให้ผลในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลายในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันทั้งในส่วนของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และการมีชีวิตรอดของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างของร้อยละความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหัวและส่วนหาง และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมอสุจิ ($p>0.05$) ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 ชนิดหลังการทำละลาย (ตารางที่ 3 และ 4)

อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายแช่แข็งชนิด LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-10Y/Gly พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่า NFDSMG-4Y/Gly หลังการทำละลายในทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 2, $p<0.05$) แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่เจือจางด้วย LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-10Y/Gly ยกเว้นในชั่วโมงที่ 4 หลังการทำละลาย ($p<0.05$)

Table 2. Descriptive data (mean±SEM) of semen characteristics of fresh jackass semen. Data of each jackass was collected and pooled from 2 independent ejaculates.

Jackass	Volume (ml.)	pH	Osmolarity (mOsm/kg)	%Motility	%Viability	Concentration $x10^9$sperm/ml (range)	% normal morphology
1	55.0±5.0	7.6±0.0	235.0±10.0	82.5±7.5	87.5±6.5	10.9±3.7 (7.3-14.6)	84.0±2.0
2	40.0±10.0	7.2± 0.1	237.5±0.5	82.5±2.5	88.5±2.5	11.5±3.9 (7.6-15.4)	80.0±2.0
3	40.0±10.0	7.3±0.1	225.0±11.0	90.0±0.0	94.5±0.5	9.3±1.3 (8.0-10.6)	81.5±3.5
4	62.5±27.5	7.5± 0.0	241.0±9.0	90.0±0.0	90.0±4.0	18.6±8.5 (10.1-27.1)	88.0±2.0
5	50.0±10.0	7.7 ±0.0	233.0±3.0	87.5±2.5	92.0±1.0	21.8±3.4 (18.5-25.2)	89.5±1.5

Table 3. Means (±SEM) of motility, viability, plasma membrane and acrosome integrity of donkey sperm cryopreserved with three different freezing extenders for all time point.

Experimental group	Mean±SEM			
	% progressive motility	% sperm viability	% HOST	% Intact acrosome
10 min post thaw				
- LGEDTA-20Y/Gly	48.0±5.8[a]	59.3±6.0[a]	42.7±5.6[a]	52.5±4.3[a]
- SMG-10Y/Gly	44.5±6.4[a]	54.8±7.1[a]	39.5±5.6[a]	49.4±2.2[a]
- NFDSMG-4Y/Gly	34.5±6.4[b]	46.4±6.8[b]	38.6±4.6[a]	43.6±8.5[a]
1h. post thaw				
- LGEDTA-20Y/Gly	42.5±6.7[a]	53.3±9.7[a]	36.4±4.6 [a]	48.5±5.6[a]
- SMG-10Y/Gly	36.0±7.7[a]	48.1±6.0[a,b]	31.8±5.9 [a]	43.4±5.8[a]
- NFDSMG-4Y/Gly	22.0±10.5[b]	43.2±7.5[b]	31.2±5.6[a]	40.4±7.0[a]
2h. post thaw				
- LGEDTA-20Y/Gly	39.5±6.8[a]	48.9±8.3[a]	28.9±6.8 [a]	42.0±7.9[a]
- SMG-10Y/Gly	30.0±8.1[a]	45.3±7.2[a,b]	25.7±7.4 [a]	37.5±7.3[a,]
- NFDSMG-4Y/Gly	17.0±9.1[b]	38.8±4.7[b]	23.8±8.0[a]	34.6±8.1[a]
4h. post thaw				
- LGEDTA-20Y/Gly	37.5±5.8[a]	44.0±10.4[a]	21.6±6.8 [a]	37.5±5.6[a]
- SMG-10Y/Gly	24.0±11.2[b]	40.1±7.1[a,b]	19.8±6.4 [a]	36.6±6.2[a]
- NFDSMG-4Y/Gly	10.5±5.5[c]	33.4±6.0[b]	14.8±6.5 [a]	29.2±8.4[a]

[a, b,c]within a column, different superscripts denote values that differ significantly at each time point ($P<0.05$).

LGEDTA-20Y/Gly: Lactoseglucose-EDTA + 20% egg yolk + 4% glycerol, SMG-10Y/Gly: UHT skimmed-milk glucose + 10% egg yolk + 4% glycerol, NFDSMG-4Y/Gly: Non-fat dried skimmed milk + 4% egg yolk + 4% glycerol

Host = hypoosmotic swelling test to indicate the functional integrity of the sperm plasma membrane

Table 4. Means (±SEM) of sperm morphology of donkey sperm cryopreserved with three different freezing extenders at 10 min after thawing.

Experimental group	% Abnormality of sperm morphology (Mean±SEM)	
	Head abnormality	Tail abnormality
LGEDTA-20Y/Gly	4.5±4.1	11.2±5.1
SMG-10Y/Gly	5.1±4.5	15.5±9.2
NFDSMG-4Y/Gly	4.9±5.1	15.3±8.0

LGEDTA-20Y/Gly: Lactoseglucose-EDTA + 20% egg yolk + 4% glycerol, SMG-10Y/Gly: UHT skimmed-milk glucose + 10% egg yolk + 4% glycerol, NFDSMG-4Y/Gly: Non-fat dried skimmed milk + 4% egg yolk + 4% glycerol

อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ

หลังการทำละลายน้ำเชื้อในนาทีที่ 10 พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายแช่แข็งชนิด LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-4Y/Gly มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงกว่าในสารละลาย NFDSMG-4Y/Gly ($p<0.05$) อย่างไรก็ดี ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 4 หลังการทำละลาย พบว่า สารละลายแช่แข็งชนิด LGEDTA-20Y/Gly ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่สูงกว่าในสารละลาย NFDSMG-4Y/Gly อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่เจือจางด้วย LGEDTA-20YG กับ SMG-4Y/Gly ในทุกช่วงเวลาหลังการทำละลาย และ SMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 4 หลังการทำละลาย ($p>0.05$)

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มและอะโครโซมอสุจิ

หลังการทำละลายน้ำเชื้อในนาทีที่ 10, ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 4 ไม่พบว่ามีความแตกต่างของร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มและอะโครโซมอสุจิในทุกกลุ่มการทดลอง ($p>0.05$)

ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ

หลังการทำละลายน้ำเชื้อไม่พบว่ามีความแตกต่างของร้อยละความผิดปกติที่ส่วนหัวและส่วนหางของอสุจิในทุกกลุ่มการทดลอง ($p>0.05$)

วิจารณ์ และสรุป

จากผลการแช่แข็งน้ำเชื้อในลาครั้งนี้ พบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการทำละลาย โดยเฉพาะในส่วนของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีการรายงานในม้า (≥30%) [18-20] เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ LGEDTA-20Y/Gly, SMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งและทำละลายที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่า สารละลายเจือจางทั้ง 3 ชนิดให้ผลในการรักษาสภาพของ

น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลายได้แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อส่งผลอย่างมากต่อการทำหน้าที่ของอสุจิในระหว่างขบวนการแช่แข็ง สอดคล้องกับที่เคยมีการรายงานในม้า [6,9,21] และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น [22,23]

ในขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ พบว่า การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วส่งผลทำให้อสุจิเกิดสภาวะเครียดจากสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen specie; ROS) ที่เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากขบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์อสุจิเอง ทำให้การทำหน้าที่ของอสุจิหลังการทำละลายลดลงหรือเสียไป การเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของโปรตีนเป็นหลัก เช่น นมและไข่แดง พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นของสาร ROS ได้ [24,25] ในการศึกษาครั้งนี้ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เลือกใช้มีส่วนประกอบของน้ำตาล นมขาดมันเนย และไข่แดงเป็นหลัก ซึ่งจากผลที่ได้พบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-10Y/Gly ให้ผลในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งและทำละลายได้ดีกว่าสารละลายเจือจางชนิด NFDSMG-4Y/Gly โดยทำให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มสูงขึ้นและมีอัตราการมีชีวิตรอดยาวนานขึ้น (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสารละลาย LGEDTA-20Y/Gly มีปริมาณของไข่แดง ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ NFDSMG-4Y/Gly (20% vs. 4% ตามลำดับ) ปริมาณไข่แดงที่สูงนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารป้องกันอนุมูลอิสระ โดยพบว่าในไข่แดงมีโปรตีนที่ช่วยในขบวนการต้านอนุมูลอิสระอยู่ประมาณ 86 ชนิด [24] ในส่วนของสารละลายชนิด SMG-10Y/Gly แม้ว่าจะมีปริมาณของไข่แดงน้อยกว่าชนิด LGEDTA-20Y/Gly แต่ก็มีนมเป็นส่วนประกอบร่วมด้วย โดยพบว่านมขาดมันเนยมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ช่วยป้องกันเซลล์อสุจิจากสภาวะความเครียดในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง [26] การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาของ Ecot และคณะ [12] ที่ศึกษาถึงลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิในม้าหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในสารละลายเจือจางที่มีนมและไข่แดงเป็นส่วนประกอบ เทียบกับสารละลายเจือจางที่มีนมเป็นส่วนประกอบเพียงอย่างเดียว และพบว่าการเติมไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ของอสุจิได้

อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อพ่อลาหลังการทำละลายระหว่างสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด LGEDTA-20Y/Gly และ SMG-10Y/Gly ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย LGEDTA-20Y/Gly มีแนวโน้มในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสูงกว่า SMG-10Y/Gly โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 4 หลังการทำละลาย ผลดังกล่าวแตกต่างจากที่เคยมีการรายงานในม้าโดย Braun และคณะ [27] ที่พบว่าการใช้สารละลายนมขาดมันเนยที่มี 10% ไข่แดงเป็นส่วนประกอบให้ผลในการรักษาสภาพการเคลื่อนที่และเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิได้ดีกว่าสารละลาย lactose glucose-EDTA ที่มี 20% ไข่แดงเป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากการเติม Equex STM ลงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งพบว่าในการศึกษาของ Braun และคณะ มีการเติมสาร Equex STM ลงในสารละลายเจือจางทั้งสองชนิด แต่ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเติม Equex STM เฉพาะในสารละลายชนิด LGEDTA-20Y/Gly จึงทำให้คุณภาพของอสุจิหลังการทำ

ละลายดีกว่าในสารละลายชนิด SMG-10Y/Gly เนื่องจาก Equex STM เป็นสาร detergent ที่ช่วยลดการเกิดภาวะช็อคของอสุจิจากความเย็นในขณะเกิดผลึกน้ำแข็ง รวมถึงช่วยลดอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติคและความเข้มข้นของสารละลายภายในตัวอสุจิ นอกจากนี้ยังพบว่า Equex STM ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ lipoprotein ในไข่แดงซึ่งส่งผลดีต่อการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของอสุจิในระหว่างขบวนการแช่แข็ง [11,28,29]

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งให้พลังงานในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อก็พบว่าสารละลายเจือจางชนิด LGEDTA-20Y/Gly ซึ่งมีน้ำตาลแลคโตสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นส่วนประกอบให้ผลในการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในช่วงแช่แข็งได้ดีกว่าสารละลายชนิด SMG-10Y/Gly และ NFDSMG-4Y/Gly ที่มีน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นส่วนประกอบ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับที่มีการรายงานในม้า [7,30] และสุกร [22,31] อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มและอะโครโซมอสุจิในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด นอกจากปัจจัยของสารละลายน้ำเชื้อที่ส่งผลต่อคุณภาพของอสุจิหลังการแช่แข็งและทำละลาย ผลสำเร็จของการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของสารป้องกันการแช่แข็ง อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิและทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ชนิดของภาชนะและขนาดที่ใช้ในการบรรจุน้ำเชื้อ และปัจจัยจากตัวพ่อลา เช่นเดียวกับที่เคยมีการรายงานในโคและม้า [32-34]

ในการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดแลคโตส กลูโคส อีดีทีเอ และ 20% ไข่แดง เป็นส่วนประกอบ ให้ผลในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งและทำละลายได้ดีกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดนมขาดมันเนย ยูเอชที กลูโคสและ 10% ไข่แดง และชนิดนมผงขาดมันเนย กลูโคสและ 4% ไข่แดง เป็นส่วนประกอบ ซึ่งผลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีความเหมาะสมต่อการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในลา เพื่อต่อยอดองค์ความรู้ใหม่ๆและอาจนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผสมเทียมเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ลาต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองการสัตว์และเกษตรกรรมที่ 3 กรมการสัตว์ทหารบก ตลอดจนพลทหารทุกท่านที่ให้การสนับสนุนในการเข้าเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ และขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้จนทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Varner DD. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. *Proceeding of the Annual Meeting (1991) of the Society for Theriogenology*. 1991; 146-150. c

2. Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motile characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*.1992; 37: 1241-1252.
3. Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G. Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. *Cryobiology.* 1997; 34: 385–393.
4. Trimeche A, Renard P, Tainturier D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology.* 1998; 50: 793-806.
5. Vidament M, Yvon JM, Couty I, Arnuad G, Nguekam-Feugang J, Noue P, et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci.* 2001; 68(3-4): 201-218.
6. Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89: 115-136.
7. Martin JC, Klug E, Gunzel A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil (Suppl).* 1979; 27: 47-51.
8. Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.* 2005; 50: 239-49.
9. Cátaná R, Groza I, Morar I, Vlasiu T, Cátaná L. Assessment of stallion semen cryopreservation extenders. Bulletin UASVM, *Vet Med.* 2008; 65(2): 102-108.
10. Canisso IF, Carvalho GR, Morel MD, Ker PG, Rodriques AL, Silva EC, et al. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Vet J.* 2011; 43(2): 179-183.
11. Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 1996; 28: 47–53.
12. Ecot P, Arnaud G, Moy A, Daels P, Magistrini M, Vidament M. Comparison of fertility and post-thaw semen criteria of stallion semen frozen in two different extenders.Proceedings of the 3rd International Symposium on Stallion Reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2001; 68: 356–358.

13. Burns PJ, Reasner DS. Computerized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 1995; 9: 377-380.
14. Chandong R, Tangyuenyong S, Panasophonkul S. The effect of egg yolk in semen extender on sperm quality in cooled jackass semen. Proceedings of the 6th MUT Veterinary Annual Conference; 2012 Aug 23-24; Long Beach Cha-Am Hotel, Thailand; p. 23-24.
15. Hermenet M J, Sawyer HR, Pickett BW, Amann RP, Squires EL, Long PL. Effect of stain, technician, number of spermatozoa evaluated and slide preparation on assessment of spermatozoal viability by light microscopy. *J Equine Vet Sci.* 1993; 13: 449-455.
16. Hurtgen J P. Stallion genital abnormalities: Current Therapy in Equine Medicine (2nd ed.). Philadelphia; W.B. Saunders; 1987. p. 558-562.
17. Wells ME, Awa DA. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci.* 1970; *53*, 227–232.
18. Cochran JD, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. *Theriogenology*. 1983; 20: 735-741.
19. Boyle MS. Assessubg the potential fertility of frozen stallion semen. In: Havemeyer Foundation monograph series no. 1. UK; R & W Publication Ltd; 1999. p. 13-16.
20. Khlifaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A, Tainturier D. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*. 2005; 63(1): 138-149.
21. Candeias ML, Alvarenga MA, do Carmo MT, Ferreira HN, Maior MRS, Filho RAT, et al. Semen cryopreservation protocols of MangalargaMarchador stallions. *R Bras Zootec.* 2012; 41(9): 1989-1995.
22. De Mercado E, Rodriguez A, Gómez E, Sanz E. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thawed sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 2010; 118: 54-61.
23. Kulaksiz R, Çebi Ç, Akçay E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. Turk. *J Vet Anim Sci*. 2012; 36(2): 177-182.

24. Mann K, Mann K. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics.* 2008; 8: 178-191.
25. Taylor MJ, Richardson T. Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. *J Dairy Sci.* 1980; 63: 1783-1795.
26. Filho, I.C.B., Pederzolli, C.D., Sgaravatti, A.M., Gregory, R.M., Filho, C.S.D., Jobin, M.I.M. and Mattos, R.C. 2009. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod.* 6(2): 392-399.
27. Braun J, Hochi S, Oguru N, Sato K. Effect of protein supplement on motile and plasma integrity of froze-thawed stallion spermatiozoa. *Cryobiology.* 1995; 32: 487-492.
28. Jimenez CF. Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and post thaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology.* 1987; 28: 773-782.
29. Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell'Aqua JA, Papa FO. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim Reprod Sci*. 2006; 94: 82–84.
30. Phetudomsinsuk K, Sirinarumitr K, Choothesa A, Suthanmapinunt P, Kornkaewrat K, Laikul A, et al. Freezability of Thai native crossbred horse semen in different extenders. *Thai J Vet Med.* 2009; 39(2): 105-114.
31. Chanapiwat P, Kaeoket K,Tummaruk P. Cryopreservation of boar semen by egg yolk-based extenders containing lactose or fructose is better than sorbital. *J Vet Med Sci.* 2012; 74(3): 351-354.
32. Cooter PZ, Goolsby HA, Prien SD. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reprod Dom Animal*. 2005; 40:98-99.
33. Andrabi SMH. Fundamental principles of cryopreservation of Bostaurus and Bosindicus bull spermatozoa. Mini review. *Int J Agri Biol.* 2007; 9: 367-369.
34. Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G,Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*2008; 108(3-4): 298-308.