RESEARCH ARTICLE

Cryopreservation of Bull Semen by Using Egg Yolk Based Extender Compared With Soya Bean Extract Based Extender

Kobkaew Bumroongthai[1], Paweeranut Banmairuroy[1], Sirinun Pisamai[1], Jinda Singlor[2], Padet Tummaruk[2*]

Abstract

Objective—To compare the frozen-thawed (FT) sperm quality of bull semen after extended in egg yolk based extender and soya bean extract based extender.

Materials and Methods—A total of 51 ejaculates of semen from five Holstein Friesian bulls were included. Each ejaculates of semen was divided into two groups, i.e., control and treatment. The semen in the control group was extended in egg yolk tris extender and the semen in the treatment group was extended in a soya bean extract based extender. Semen was collected by using artificial vagina. The semen was held at 4 ºC for 4 h and was loaded into 0.25 ml French straws at a concentration of 20 x 10^6 sperm/ml and was placed at 4 cm above nitrogen vapor for 15 min before immersed into liquid nitrogen (-196 ºC) for storage. The frozen semen was thawed at 37 °C for 30 sec. The post-thawed subjective motility, sperm concentration, sperm viability, sperm mitochondrial function and DNA integrity were evaluated. The sperm viability was determined by eosin-nigrosin staining, DNA integrity was determined by Acridine orange staining and mitochondrial function was determined by JC-1 staining.

Results—It was found that the bull semen extended in the soya bean extract based extender tended to have a higher subjective motility (66.5% and 55.4%, P=0.083) and DNA integrity (89.4% and 86.6%, P=0.107) and less mitochondrial damage (11.7% and 24.3%, P=0.001) than the semen extended in egg yolk based extender. No significant difference between the two extenders on the sperm viability was found (59.9% and 58.1%, P=0.754).

Conclusions—The bull semen cryopreservation can be extended in soya bean extracted based extender without any deleterious effect on the post-thawed sperm quality compared to a conventional egg yolk tris extender.

KKU Vet J. 2012;22(1):51-61. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: Bull; Egg yolk; Cryopreservation; Soya bean, Sperm

[1]Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 ; [2]Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Bangkok, 10330

[*]**Corresponding author** E-mail: Padet.t@chula.ac.th

การแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคโดยใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง

กอบแก้ว บำรุงไทย[1], ปวีรนุช บานไม่รู้โรย[1], ศิรินันท์ พิสมัย[1],
จินดา สิงห์ลอ[2], เผด็จ ธรรมรักษ์[2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคโดยใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบกับสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บน้ำเชื้อจำนวน 51 ตัวอย่าง จากพ่อโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน จำนวน 5 ตัว แบ่งน้ำเชื้อออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยที่น้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ และน้ำเชื้อในกลุ่มทดลองใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง น้ำเชื้อพ่อโคถูกรีดเก็บด้วยช่องคลอดเทียมเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น บรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของอสุจิ 20 x 10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร และแช่แข็งน้ำเชื้อโดยวางหลอดฟางให้สูงจากไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร นาน 15 นาที จากนั้นจุ่มน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว (-196 ºC) ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 30 วินาที ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยตรวจการเคลื่อนไหวเฉพาะตัว ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ การมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรีย ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ การมีชีวิตของอสุจิตรวจโดยวิธีการย้อมสีอีโอซิน-นิโกรซิน ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอตรวจโดยย้อมสีอะคริดีนออเรนจ์ และความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรียตรวจโดยวิธีการย้อมสีเจซีวัน

ผลการศึกษา จากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อพ่อโคที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองมีแนวโน้มการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวสูงกว่า (66.5% และ 55.4%, P=0.083) และมีความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอสูงกว่า (89.4% และ 86.6%, P=0.107) และมีความเสียหายของไมโตคอนเดรียที่น้อยกว่า (11.7% และ 24.3%, P=0.001) อย่างไรก็ตามไม่พบว่าการมีชีวิตของอสุจิระหว่างน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (59.9% และ 58.1%, P=0.754)

ข้อสรุป การแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคสามารถใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่สกัดจากถั่วเหลืองได้โดยไม่มีอันตรายต่อคุณภาพของอสุจิหลังการทำละลายเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรเดิมที่ใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบ

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2555;22(1):51-61. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: พ่อโค ไข่แดง การแช่แข็ง ถั่วเหลือง อสุจิ

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[2]ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: Padet.t@chula.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันการผสมพันธุ์โคในเชิงอุตสาหกรรมทั่วโลกใช้การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งกันอย่างแพร่หลาย การผสมเทียมเปิดโอกาสให้เกิดการคัดเลือกพันธุ์และการพัฒนาผลผลิตให้มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การเก็บรักษาอสุจิแช่แข็งมีความสำคัญในการผสมพันธุ์ และการเก็บรักษาพันธุ์สัตว์ [1] การค้นพบคุณสมบัติในการป้องกันความเย็นของกลีเซอรอลเมื่อ ค.ศ. 1949 นำไปสู่ความสำเร็จในการแช่แข็งอสุจิ ซึ่งมีการพัฒนาจากการแช่แข็งแบบเป็นเพลเล็ท (pellet) และแอมพูล (ampule) มาเป็นเก็บในหลอดฟางขนาดเล็ก (mini straw) [2] มานานกว่า 30 ปี แล้ว นับจากนั้นมาน้ำเชื้อโคแช่แข็งถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมโคนมและโคเนื้ออย่างกว้างขวาง ในการผลิตน้ำเชื้อโคแช่แข็ง มีการใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ (extender) เพื่อช่วยให้อสุจิรอดจากการแช่แข็ง สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อโคมีหลายชนิด ส่วนใหญ่ผลิตจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น ชนิดไข่แดงทริส (egg yolk tris) ไข่แดงซิเตรท (egg yolk citrate) และ ชนิดน้ำนมพร่องไขมัน [3]

อสุจิส่วนใหญ่จะสูญเสียความแข็งแรงและหน้าที่ไปเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง การใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยปกป้องของส่วนต่างๆ ของเซลล์ระหว่างกระบวนการแช่เย็น แช่แข็ง และการทำละลาย [4] แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงสารป้องกันความเย็นจำนวนมาก เช่น ไดเมทธิลซัลฟ็อกซ์ไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) [5] และ โพรเพนไดออล (Propane-diol) [6] แต่กลีเซอรอลยังคงเป็นสารเคมีหลักที่ในการแช่แข็งอสุจิในโค ส่วนประกอบหลักของสารเจือจางในการแช่แข็งอสุจิ คือ สารไอออนิกและไม่ใช่ไอออนิกเพื่อรักษาระดับออสโมลาริตี้ และทำให้ความสามารถในการเป็นสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งของไลโปโปรตีน หรือวัตถุที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพื่อป้องกันการช็อคจากความเย็น เช่น ไข่แดง นม เลคตินจากถั่วเหลือง ซึ่งมีกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งพลังงาน [1]

โดยทั่วไปไข่แดงเป็นองค์ประกอบหลักในการป้องกันอสุจิจากความเย็น และมีผลเสริมกันระหว่างกลีเซอรอลกับไข่แดงในการทำให้การรอดชีวิตของเซลล์อสุจิสูงที่สุดหลังการทำละลาย [7] มีการศึกษาข้อเสียของไข่แดงและผลผลิตจากนม พบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และสารพิษจากแบคทีเรีย ที่ทำลายความสมบูรณ์ของอสุจิหลังการแช่แข็ง [8, 9] นอกจากนี้ประเทศต่างๆ

ทั่วโลกยังวิตกเกี่ยวกับการขนส่งผลิตภัณฑ์ที่มีนมหรือไข่แดงเป็นส่วนประกอบว่าอาจนำโรคแปลกถิ่นเข้ามา [10] ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดเชื้อโรคหรือไม่ได้มาจากสัตว์เข้ามาทดแทนจึงเป็นสิ่งที่ต้องการ โดยในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมามีการศึกษาการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้แทนไข่แดงในการทำเป็นสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนที่มาจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ [11] อย่างไรก็ดีการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองในการเป็นสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งในโคยังไม่แพร่หลายมากนักในประเทศไทย เนื่องจากยังขาดข้อมูลจากการวิจัย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อโคระหว่างการใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบและสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ทำในพ่อโคพันธุ์โฮสไตล์ฟรีเชี่ยน (Holstein Friesian) จำนวน 5 ตัว อายุเฉลี่ย 3.3±2.3 ปี (พิสัย 1-6 ปี) มีประวัติการให้น้ำเชื้อปกติ พ่อโคถูกเลี้ยงในโรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โรงเรือนเป็นโรงเรือนแบบเปิด อยู่ในคอกเดี่ยว ได้รับน้ำเต็มที่ และได้รับอาหารวันละ 2 มื้อ เช้าและเย็น โดยพ่อโคถูกใช้ในการรีดน้ำเชื้อปกติทุก 7-14 วัน

การรีดน้ำเชื้อ และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง

ทำการรีดน้ำเชื้อโคตัวผู้ทั้ง 5 ตัว ด้วยการใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) โดยมีโคตัวล่อ (teaser) เป็นโคเพศเมีย ทำการรีดน้ำเชื้อแต่ละตัว ตัวละ 2 ครั้ง หลังจากทำการรีดน้ำเชื้อโคทั้ง 5 ตัว แล้วทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตร สี ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) การเคลื่อนไหวหมู่ (mass activity) การเคลื่อนไหวเฉพาะตัว (individual motility) ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (semen concentration) การมีชีวิตของอสุจิ (sperm viability) และการตรวจกายสัณฐานวิทยาของอสุจิ (sperm morphology)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การเคลื่อนไหวหมู่ หยดน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์อุ่นบนแผ่นให้ความร้อน 1-2 นาที จากนั้นนำสไลด์ตรวจดูการเคลื่อนไหวของอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) กำลังขยาย 40 เท่า ให้คะแนนการเคลื่อนไหวหมู่เป็นสเกลอันดับ (0-5) โดย คะแนน 0 หมายถึงมีการเคลื่อนไหวหมู่น้อยที่สุด และ คะแนน 5 หมายถึงมีการเคลื่อนไหวหมู่มากที่สุด

การเคลื่อนไหวเฉพาะตัว หยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ที่อุ่นบนแผ่นให้ความร้อน แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) ที่อุ่นบนแผ่นให้ความร้อน ดูการเคลื่อนไหวของอสุจิ

รายตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast microscope) กำลังขยาย 400 เท่า ให้เกณฑ์การเคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยทำการประเมินโดยผู้ตรวจคนเดียวกันตลอดการทดลอง

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ เจือจางน้ำเชื้อ 200 เท่า ในสารละลายฟอร์มัลซาไลน์ ใส่ตัวอย่างลงในฮีโมซัยโตมิเตอร์ (hemocytometer) ปิดกระจกปิดสไลด์ นับจำนวนอสุจิในฮีโมซัยโตมิเตอร์ 5 ช่องใหญ่ แล้วคำนวณ จำนวนอสุจิในน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร โดยน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิเท่ากับ จำนวนอสุจิที่นับได้จากฮีโมซัยโตมิเตอร์ ทั้ง 5 ช่อง คูณด้วย 10^7

การตรวจการมีชีวิตของอสุจิ ทำการย้อมสีอีโอซิน-นิโกรซิน (eosin-nigrosin) เพื่อตรวจการมีชีวิตของอสุจิ ใช้น้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ ตามด้วยอีโอซิน 1 หยด และนิโกรซิน 1 หยด ผสมให้เข้ากัน อุ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงแล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนตัวที่ตายแล้วจะติดสี [12]

การตรวจกายสัณฐานวิทยาของอสุจิ ตรวจความผิดปกติส่วนหัวของอสุจิ (head abnormality) ใช้น้ำเชื้อเจือจางด้วยนอร์มัลซาไลน์ สเมียร์บนสไลด์ แล้วแช่สไลด์ลงในแอลกอฮอล์อิ่มตัว นาน 3-4 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรามีน 0.5% นาน 1-2 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 96% ย้อมสไลด์ด้วยสีคาร์บอนฟุคซินอีโอซิน (carbol-fuchsin-eosin) 6-8 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า ปล่อยให้สไลด์แห้ง นับจำนวนอสุจิ 500 ตัวภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า [13] ตรวจส่วนหางของอสุจิ เจือจางกับฟอร์มัลซาไลน์ นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงกำลังขยาย 400 เท่า [14]

การตรวจวัดความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ (DNA integrity) ทำการสเมียร์น้ำเชื้อที่ผ่านการละลายแล้ว 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ทิ้งให้แห้ง ใส่สารละลายคาร์นอย (Carnoy's solution) ซึ่งเตรียมจากเมทานอล:กรดอะซิติกเย็น อัตราส่วน 3:1 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ออกแล้วปล่อยให้แห้ง นำไปย้อมด้วยสีอะคริดีน ออเรนจ์ (Acridine orange) 1.0% นาน 5 นาที สารละลายสีอะคริดีนออเรนจ์ เตรียมโดยใช้หลอด 3 หลอด หลอดที่ 1 ใส่ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.335 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 กรดซิตริก 0.84 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 อะคริดีน ออเรนจ์ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแต่ละหลอดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเททั้ง 3 หลอดรวมกัน แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง ประเมินความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว ส่วนหัวของอสุจิที่มีดีเอ็นเอ สมบูรณ์หรือปกติจะมีสีเขียว ในขณะที่อสุจิที่มีดีเอ็นเอถูกทำลายหรือเสียสภาพไปจะมีเหลือง ส้ม หรือแดง [15]

การตรวจวัดความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial activity) ใช้น้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสาร เจซี-วัน (JC-1) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 15 ไมโครโมล ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำเชื้อหยดลงบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ประเมินการ

ทำงานของ ไมโตคอนเดรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว อสุจิที่มี เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียทำงานดีจะมีสีส้ม ในขณะที่อสุจิที่มีเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียถูกทำลายหรือเสียสภาพไปจะมีเขียว [16]

การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ

นำทริส 3.785 กรัม กรดซิตริก 2.125 กรัม น้ำตาลฟรุกโตส 1.562 กรัม เติมน้ำกลั่น 115 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรสารรวมทั้งหมด 156.25 มิลลิลิตร ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 6.5-6.7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดซิตริก สามารถเก็บสารละลายนี้ไว้ได้นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ºC ก่อนนำสารละลายมาใช้ ให้อุ่นสารละลายที่ 52 ºC และเติมไข่แดง 31.25 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร เพนนิซิลิน (penicillin) 1,000 ไอยู/มิลลิลิตร และ สเตรปโตไมซิน (streptomycin) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการคำนวณปริมาตรสารละลายน้ำเชื้อที่เติมทั้งสารละลายสำหรับน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบและสารละลาย Cryobos® (Magapor Co. Ltd., Zaragoza, Spain)

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อจากแต่ละครั้งของโคแต่ละตัวแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเติมสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ ส่วนที่เหลือเติมสารละลาย Cryobos® โดยใส่น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดที่เตรียมไว้แล้ว เติมสารละลายน้ำเชื้อลงไป จากนั้นนำไปเก็บที่ 4 ºC นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง นำน้ำเชื้อแต่ละขวดวัดการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวของอสุจิ หากน้ำเชื้อขวดใดมีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 60 % จะไม่ทำการแช่แข็ง หากน้ำเชื้อมีการเคลื่อนไหวของอสุจิมากกว่า 60% จะทำการแช่แข็ง โดยนำน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นวางหลอดฟางให้สูงจากไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร นาน 15 นาที จากนั้นนำหลอดฟางแช่ลงในไนโตรเจนเหลว (-196 ºC) [17]

การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำหลอดฟางขึ้นจากไนโตรเจนเหลวอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 30 วินาที แล้วนำไปตรวจวัดคุณภาพ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนไหวเป็นเฉพาะตัว การตรวจการมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และ การเสียหายของไมโตคอนเดรีย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.0 วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยวิธี Multiple analysis of variance (ANOVA) โดยใช้ General Linear Model Procedure (PROC GLM) ของโปรแกรม SAS ตัวแปรตาม (dependent variable) ที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนไหวเป็นเฉพาะตัว การมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และ การเสียหายของไมโตคอนเดรีย

โมเดลทางสถิติ ประกอบด้วย ตัวแปรอิสระ (independent variable) ได้แก่ ชนิดของสารละลาย (2 ชนิด) ครั้งที่หลั่งน้ำเชื้อ (2 ครั้ง) พ่อโค (5 ตัว) ครั้งที่หลั่งน้ำเชื้อถูกวิเคราะห์แบบซ้อน (nested) ในพ่อโคแต่ละตัว อันตรกิริยา (interaction) ระหว่างชนิดของสารละลายและครั้งที่หลั่งน้ำเชื้อ และอันตรกิริยาระหว่างชนิดของสารละลายและพ่อโค ทำการคำนวณค่า Least squares means ของแต่ละกลุ่ม และทำการเปรียบเทียบด้วยวิธี Least significant different (LSD) ค่า $P<0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษา

คุณภาพน้ำเชื้อพ่อโค

คุณภาพของน้ำเชื้อโคก่อนการแช่แข็งแสดงใน **Table 1** จากตารางพบว่าโดยเฉลี่ย จำนวนเซลล์อสุจิที่พ่อโคหลั่งน้ำเชื้อมีปริมาณครั้งละ 9,055 ล้านตัว โดยแต่ละครั้งมีความเข้มข้นเฉลี่ย 1,968 ล้านตัว/มิลลิลิตร และปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร น้ำเชื้อพ่อโคที่นำไปใช้ในการแช่แข็งมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวตัวเฉลี่ย 82.2% และการมีชีวิตของอสุจิ เฉลี่ย 77.8% (**Table 1**)

Table 1. Descriptive Statistics on the Semen Quality of Bull Before Cryopreservation

Parameter	N	Mean±SD	Range
Semen volume (ml)	51	4.7±2.1	1.0-9.5
pH	51	6.7±0.3	6.2-7.5
Mass activity	50	3.2±0.9	1-5
Total sperm output (x10^6 sperm)	51	9,055±6,036	1,780-33,000
Sperm concentration (x10^6 sperm/ml)	51	1,968±912	520-4,400
Sperm viability (%)	50	77.8±12.1	53-96
Individual motility (%)	51	82.2±11.3	50-95

ผลของสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโคหลังทำละลาย

คุณภาพของน้ำเชื้อโคหลังการแช่แข็งและทำละลายแสดงใน **Table 2** จากตารางพบว่า อัตราการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวและความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ ของน้ำเชื้อพ่อโคหลังการแช่แข็งในสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบสูงกว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางในสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ แต่มีการเสียหายของไมโตคอนเดรียน้อยกว่า ในขณะที่การมีชีวิตของอสุจิไม่แตกต่างกัน (**Table 2**) ส่วน **Figure 1** แสดงให้เห็นอัตราการรอดชีวิตของอสุจิหลังการแช่แข็งและทำละลายในพ่อโคแต่ละตัว ที่ใช้สารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับสารละลายที่ใช้ถั่วเหลือง จาก **Figure 1** พบว่าน้ำเชื้อพ่อโคที่แช่แข็งและทำละลายใน

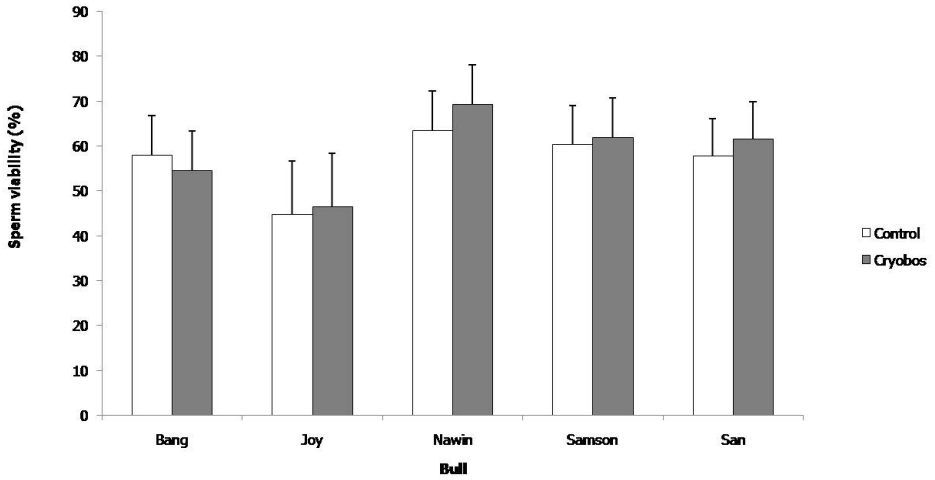
สารละลายที่ใช้ถั่วเหลืองมีแนวโน้มสูงกว่าสารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบในพ่อโค 4 ตัว จาก 5 ตัว ในขณะที่น้ำเชื้อพ่อโคที่แช่แข็งและทำละลายในสารละลายที่ใช้ถั่วเหลืองมีแนวโน้มต่ำกว่าสารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบในพ่อโค 1 ตัว จาก 5 ตัว (**Figure 1**) อย่างไรก็ดีผลการเปรียบเทียบทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในพ่อโคทุกตัว (P>0.05)

Table 2. Sperm Quality After Extended in Egg Yolk Tris (Control) Compared with Soybean Based Extender (Cryobos®)

Parameter	Control	Cryobos®	*P*-value
Sperm viability (%)	58.1±3.9[a]	59.9±3.8	0.754
Individual motility (%)	56.4±4.6	66.5±3.9	0.083
DNA integrity (%)	86.6±1.8	89.4±0.7	0.107
Mitochondrial damage (%)	24.3±3.0	11.7±2.2	0.001

[a](least-square means ±SEM (n=51)

Figure 1. Frozen-thawed Sperm Viability (%) in Five Bulls After Extended in Egg Yolk Tris (Control) Compared With Soybean Extracted Based Extender (Cryobos®)



วิจารณ์

สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงมีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างแพร่หลาย เป็นสารละลายน้ำเชื้อที่ทำให้น้ำเชื้อคงสภาพความสมบูรณ์ของอสุจิไว้ได้ดีแต่มีข้อเสียคือ ความเสี่ยงจากการปนเปื้อนจุลชีพอันเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และยากต่อการทำให้สารละลายนั้นมีมาตรฐานที่เท่ากันทุกครั้ง ดังนั้นการหาทางเลือกของการใช้

สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ซึ่งสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้มีการนำมาศึกษาการใช้เพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อโคโดยเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ จากการศึกษาที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 2002 พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบนั้นมีคุณภาพที่ดีกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางโดยใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ [12] ต่อมาได้มีความพยายามในการปรับปรุงคุณภาพของสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองให้ดีขึ้น และมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้สารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบอีกครั้ง ในปี ค.ศ. 2003 โดยทำการทดลองทั้งในห้องทดลองและจากการผสมเทียมในแม่โค ผลการวิจัยพบว่าการทดลองในห้องทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการประเมินการเคลื่อนไหวของอสุจิหลังจากทำการละลายที่พบว่า น้ำเชื้อที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองนั้นมีการเคลื่อนไหวที่ดีกว่าการใช้สารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ (58.1% และ 36.7% ตามลำดับ) และการประเมินอัตราการผสมติดพบว่าน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบมีความสำเร็จในการผสมติดมากกว่าน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ (70.5% และ 67.9% ตามลำดับ) [1] ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคโดยใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบกับสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อพ่อโคหลังการแช่แข็งที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา [1] และยังพบอีกว่าน้ำเชื้อพ่อโคที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบมีการเสียหายของไมโตคอนเดรียน้อยกว่า จากผลการทดลองนี้ สามารถกล่าวได้ว่าการใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบนั้น สามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโค เนื่องจากสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไว้ได้ดีกว่าน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลของการผสมติดในแม่โคที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ใช้สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบชนิดนี้เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากมีอีกหลายปัจจัยที่ทำให้การผสมติดในแม่โคนั้นประสบความสำเร็จ

เทคนิคที่นำมาใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคการประเมินความเสียหายของไมโตคอนเดรียของอสุจิ โดยวิธีการย้อมสีเจซี-วัน มาใช้ในการประเมิน เนื่องจากสถานะของไมโตคอนเดรียของอสุจินั้นมีความสำคัญ บ่งบอกถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ในการ

เคลื่อนไหวของอสุจิซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผสมติด โดยเทคนิคนี้ได้เคยมีการศึกษาการประเมินคุณภาพในน้ำเชื้อแกะ [16] อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้สามารถนำมามาประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโคในการศึกษาครั้งนี้ และจากผลการทดลองนั้นสามารถประเมินถึงความเสียหายของไมโตคอนเดรียของอสุจิหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งได้

นอกจากนี้ทางเลือกอื่นของสารละลายน้ำเชื้อนั้น เป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากประเด็นของการปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ การนำมาของโรคแปลกถิ่น และการรักษามาตรฐานของสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อนั้น เป็นสิ่งที่ยังเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ดังนั้นทางเลือกอื่น ที่นำมาใช้ทดแทนไข่แดงทริสได้ จึงเป็นประเด็นที่สมควรแก่การนำมาศึกษา เช่น การใช้ไข่แดงที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์มาเป็นสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนจุลชีพจากไข่แดง โดยเคยมีการทดลองนำมาใช้กับน้ำเชื้อโค และได้มีการนำไปศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่ผลิตจากไข่แดงที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต่อน้ำเชื้อม้าแช่แข็ง พบว่าสามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งได้ และได้มีการทดลองนำเอาสารสกัดจากถั่วเหลืองมาผสมกับไข่แดงที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เป็นสารละลายน้ำเชื้อม้าแช่แข็ง แต่อาจต้องทำการศึกษาถึงสัดส่วนที่พอเหมาะในการผสม เพื่อให้ได้ร้อยละการผสมติดที่ดีที่สุด [18]

โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อโคหลังการแช่แข็งไว้ได้ดีกว่าสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ สารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554

เอกสารอ้างอิง

1. Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders forcryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 2003; 60:269–279.
2. Miller H, Lock S, Busch D, Brace B. Semen storage and handling. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Joplin Press, MO, USA., 2011; pp. 227-229.
3. Uavechanichkul R, Thongsodsaeng S, Leelasiri C, Wirojwutthikul S. Comparison of bull deep frozen semen quality extended with different diluters and methods. *J Thai Vet Med Assoc*. 2010; 52: 47-55.
4. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62: 3-22.

5. El-Harairy MA, Laila N, Zeidan AEB, El-Salaam AM, El-Kishk MAM. Quality and fertility of the frozen-thawed bull semen as affected by the different cryoprotectants and glutathione levels. *J Amer Sci.* 2011; 7:791-801.
6. Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 2011;73:1267–1275.
7. Pace MM, Graham EF. Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*. 1974; 39:1144-1149.
8. Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, Schloesser FM. Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders. *Reprod Domest Anim.* 1997; 32:143-149.
9. Gonzalez-Marina C, Roy R, Lopez-Fernandeza C, Diez B, Carabaño MJ, Hancock JL. The morphology of boar spermatozoa. *J R Microsc Soc*. 1957; 76: 84-97.
10. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Gurin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology.* 1988; 50: 699-706.
11. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 2002; 57:1087-94.
12. Peris S, Dufour M, Bailey J. Sperm DNA integrity and cytosolic calcium levels are associated with the in vivo fertility of bovine semen. *Biol Reprod.* 2007; 77: 237.
13. Purwantara B, Arifiantini RI, Riyadhi M. Sperm morphological assessments of Friesian Holstein bull semen collected from three artificial insemination centers in Indonesia. J *lndonesian Trop Anim Agric.* 2010; 35: 90-94.
14. Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim Reprod Sci.* 2010; 118:176-181.
15. Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P. The sperm DNA damage after cryopreservation of boar semen in relation to post-thawed semen qualities, antioxidant supplementation and boars effects. *Thai J Vet Med*. 2010; 40:187-193.
16. Martinez-Pastor F, Johannisson A, Gilb J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodriguez-Martinez H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2004; 84:121–133.
17. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, Tekin N, Akcay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze thawing process. *Theriogenology.* 2007; 67:1060-1067.
18. Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, Vita BD, Trinque C. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci.* 2011; 129:73-77.