RESEARCH ARTICLE

Effect of Equex STM Paste on Frozen-Thawed Bull Sperm

Sarawuth Chaiprasat[1*] Phichitduang Joemplang[1] Apichart Chartchue[1]
Sujira Thammawung[2] and Saksiri Sirisathien[2]

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of supplementation of Equex STM Paste to semen extender on the quality of frozen-thawed bull sperm. Semen from 3 bulls was collected by artificial vagina (AV) technique. Semen was evaluated for concentration and diluted with Egg-Yolk Tris extender and divided into 4 groups: group 1 without Equex STM Paste (Control); group 2-4 supplemented with Equex STM Paste at 0.2%, 0.4% and 0.8%, respectively. Results showed no effect of Equex STM Paste on post-thawed sperm motility (0 h, 2 h and 4 h) ($P>0.05$). However, supplementation of Equex STM Paste (0.4% and 0.8%) in semen extender significantly ($P<0.05$) improved the post-thawed sperm viability at 2 and 4 h after thawing. The percentage of sperm membrane integrity in the Equex STM Paste supplemented groups (0.2%, 0.4% and 0.8%) were significantly ($P<0.05$) improved at 2 and 4 h after thawing. In conclusion, this study showed that supplementation of Equex STM Paste at 0.4% and 0.8% in the semen extender significantly improves the viability and membrane integrity of frozen-thawed bull sperm.

KKU Vet J. 2014;24(2):135-144. *http://vmj.kku.ac.th*

Keywords: Frozen-thawed bull sperm, Equex STM Paste

[1]Bull Semen Production Center (Inthanon Royal Project), Department of Livestock Development, Chiang Mai, 50300.

[2]Department of Surgery and Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.

[*]**Corresponding author** E-mail: inthanonbc@hotmail.com

ผลของการเสริม Equex STM Paste ที่มีต่อคุณภาพตัวอสุจิโคแช่แข็ง

สราวุธ ฉายประสาท[1*] พิชิตดวง เจิมปลั่ง[1] อภิชาติ ชาติเชื้อ[1] สุจิรา ธรรมวัง[2]
และ ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพตัวอสุจิโคแช่แข็ง ใช้น้ำเชื้อพ่อโคจำนวน 3 ตัว ทำการรีดเก็บโดยใช้ช่องคลอดเทียม (AV) ทำการตรวจนับความเข้มข้น ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Egg-Yolk Tris แล้วแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่ทำการเสริม Equex STM Paste (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2-4 เสริมด้วย Equex STM Paste ที่ความเข้มข้น 0.2% 0.4% และ 0.8% ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายในทุกกลุ่มการทดลอง (P>0.05) อย่างไรก็ตามการเสริม Equex STM Paste ที่ 0.4% และ 0.8% ในสารละลายน้ำเชื้อมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ต่ออัตราอสุจิมีชีวิตหลังการละลายที่ 2 และ 4 ชั่วโมง อัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ของกลุ่มที่เสริมด้วย Equex STM Paste (0.2%, 0.4% และ 0.8%) ในสารละลายน้ำเชื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) หลังจากการละลายน้ำเชื้อที่ 2 และ 4 ชั่วโมง การศึกษานี้สรุปได้ว่า การเสริม Equex STM Paste 0.4% และ 0.8% ในสารละลายน้ำเชื้อช่วยให้อัตราการรอดชีวิตและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหลังการแช่แข็งดีขึ้น

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2557;24(2):135-144. *http://vmj.kku.ac.th*

คำสำคัญ: น้ำเชื้อโคแช่แข็ง Equex STM Paste

[1]ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์โครงการหลวงอินทนนท์ ถ.ห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50300
[2]ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** อีเมล์: inthanonbc@hotmail.com

บทนำ

น้ำเชื้อโคแช่แข็งถูกใช้ในการผสมเทียมอย่างแพร่หลาย แต่ในกระบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ (freezing-thawing) นั้นจะเกิด reactive oxygen species (ROS) ที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ และการปฏิสนธิ [1] ในปัจจุบันจึงยังมีการศึกษาการเสริมสารต่างๆ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง Equex STM Paste เป็นสารซักฟอก (detergent) ชนิดหนึ่ง มีสารออกฤทธิ์คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ซึ่งพบว่าช่วยในการรักษาเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเป็น solubilization ที่ช่วยให้ไข่แดงที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแตกตัวได้ดีขึ้น ทำให้อสุจิมีการรอดชีวิตจากการแช่แข็งได้ดีขึ้น [2] Equex STM Paste มีความโดดเด่นและมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ แมว [3] สุนัข [4] แพะ [5] และสุกร [6-7] พบว่าให้ผลดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริมสารดังกล่าว ขณะที่ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อโคมีรายงานน้อยมาก มีการศึกษาในการเติมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อโคที่นำเข้าสู่กระบวนการ re-frozen หลังจากทำการคัดแยกเพศ ซึ่งพบว่าการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Egg-Yolk Tris ทำให้อสุจิโคที่ผ่านการ re-frozen มีคุณภาพดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม Equex STM Paste [8-9] สำหรับระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อของสัตว์ต่างชนิดกันค่อนข้างมีความหลากหลายแต่มักอยู่ในช่วงระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.5% (v/v) [3-7, 10] การเสริมในสารละลายน้ำเชื้อโคจากการศึกษาของ Underwood et al. (2009) [9] ใช้ระดับความเข้มข้นของการเสริม Equex STM Paste ที่ 0%, 0.25%, 0.375% และ 0.5% พบว่าการเสริมที่ระดับ 0.375% ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อโคที่ผ่านการ re-frozen มีคุณภาพดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม สอดคล้องกับ Chaveiro et al. (2006) [8] ทำการเสริม Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-0.7% ในสารละลายน้ำเชื้อโคพบว่าให้ผลดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม จากคุณสมบัติของ Equex STM Paste ที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็ง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

<u>แผนการดำเนินงานวิจัย</u>

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design; CRD โดยใช้พ่อโคพันธุ์ชาร์โรเลส์ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ จากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ จำนวน 3 ตัว เข้าทำการทดลองเพื่อใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อในการทดลองทั้งหมด 4 ครั้ง (replication) โดยแต่ละครั้งมีระยะเวลาห่างกันมากกว่า 2 วัน แยกน้ำเชื้อพ่อโครายตัวเพื่อเข้าการทดลอง เก็บข้อมูลจากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทั้งหมด 5 ครั้ง ดังนี้ หลังจากทำการเติมสารละลายน้ำเชื้อ (ก่อนลดอุณหภูมิ) และหลังจากการละลายน้ำเชื้อ ที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง โดยทำการประเมินจาก อัตราการเคลื่อนที่ (motility) อัตราอสุจิมีชีวิต (viability) และอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (membrane integrity) นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรม SPSS 19.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลอง โดย Duncan Multiple Range Test (DMRT)

วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อ

ทำการอาบน้ำทำความสะอาดพ่อโคที่จะนำเข้าการทดลอง ล้างทำความสะอาดลึงค์ของพ่อโคก่อนทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina; AV) จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ได้ ส่งห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

วิธีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อพ่อโคที่ได้จากการรีดเก็บน้ำเชื้อมาประเมินคุณภาพก่อนเข้าการทดลอง โดยน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ ต้องมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปนเมื่อมองด้วยตาเปล่า มีการเคลื่อนไหวหมู่มากกว่า +++ (จากคะแนนเต็ม ++++) และมีอัตราการเคลื่อนที่ (motility) มากกว่า 70% จึงจะนำเข้าการทดลอง และแยกน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์เป็นรายตัวในการทดลอง โดยแบ่งน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์แต่ละตัว ออกเป็น 4 กลุ่มเพื่อเข้าการทดลองโดยเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Egg-Yolk Tris (เตรียมจาก tris solution ที่มีส่วนประกอบของ citric acid 17.30 กรัม tris 30.28 กรัม glucose 12.50 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร จากนั้นทำการเติม glycerol 7% (v/v) และไข่แดง 20% (v/v)) ร่วมด้วย Equex STM Paste (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., MA, USA) โดยมีรายละเอียดของแต่ละกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เติมสารละลาย Egg-Yolk Tris ไม่เสริม Equex STM (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เติมสารละลาย Egg-Yolk Tris ร่วมด้วย Equex STM 0.2% (Treatment 1)

กลุ่มที่ 3 เติมสารละลาย Egg-Yolk Tris ร่วมด้วย Equex STM 0.4% (Treatment 2)

กลุ่มที่ 4 เติมสารละลาย Egg-Yolk Tris ร่วมด้วย Equex STM 0.8% (Treatment 3)

หลังจากเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแล้ว ให้อสุจิมีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 ล้านตัว/

มิลลิลิตร จากนั้นตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ จากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิมีชีวิต และอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์

ทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อให้อยู่ที่ 4˚C โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 0.5˚C /นาที จากนั้นบ่มน้ำเชื้อต่อจนครบระยะเวลาทั้งหมด 4 ชั่วโมง จึงทำการบรรจุลงในหลอดน้ำเชื้อ ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (IMV Technology Inc, France) ใช้อัตราการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 4˚C ถึง -10˚C ด้วยอัตราเร็ว 3˚C ต่อนาที จาก -10˚C ถึง -35˚C ด้วยอัตราเร็ว 5˚C ต่อนาที จาก -35˚C ถึง -43˚C ด้วยอัตราเร็ว 4˚C ต่อนาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิลงโดยไม่มีการควบคุมจนถึง -120˚C จากนั้นจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว และจัดเก็บในถังเก็บน้ำเชื้อองศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำมาประเมินคุณภาพของตัวอสุจิหลังจากการแช่แข็งต่อไป

การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ทำการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ หลังจากการเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและหลังจากการแช่แข็งแล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (ทำการละลายน้ำเชื้อที่ อุณหภูมิ 37˚C 30 วินาที) โดยประเมินคุณภาพหลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง จากตัวอสุจิเคลื่อนที่ ตัวอสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์โดยมีรายละเอียดของวิธีการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

- การประเมินตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ ทำการประเมินโดยเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญโดยหยดน้ำเชื้อ 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ที่วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ด้านบน นำไปตรวจประเมินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 100 เท่า ประเมิน 5 จุดบนแผ่นสไลด์และหาค่าเฉลี่ยที่ได้ โดยให้คะแนนการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเป็น 0-100%
- การประเมินตัวอสุจิที่มีชีวิต นำน้ำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางกับสี Eosin-Nigrosin ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ 30 วินาที ก่อนทำการ สเมียร์บนแผ่นสไลด์ จากนั้นตรวจนับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยตัวอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ตัวที่ตายส่วนหัว (ทั้งหมดหรือครึ่งหนึ่ง) จะติดสีแดง จากนั้นคำนวณคิดเป็นอัตราร้อยละ
- การประเมินอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ โดยการใช้สารที่มีความดันออสโมติกต่ำ (hypo-osmotic swelling test; HOS test) ดังนี้ นำน้ำเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายที่มีความดันออสโมติกต่ำประมาณ 100 mOsm ที่ประกอบด้วย fructose 9 กรัม sodium citrate 4.9 กรัม ละลายใน deionize water ปริมาตร 1 ลิตร [11] ใช้สารละลายที่มีความดันออสโมติกต่ำปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 38˚C นาน 45 นาที จากนั้นเติม 2% glutaraldehyde 300 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา หยดน้ำเชื้อ

1 หยดบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 1,000 เท่า นับจำนวนตัวอสุจิ 200 ตัวโดยตัวอสุจิที่มี หางงอ แบบพับ (bent tail) และม้วน (coil tail) คือ ตัวอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสมบูรณ์ และตัวอสุจิที่มีหางตรง คือตัวอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเสียหาย จากนั้นคำนวณคิดเป็นอัตราร้อยละ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการเสริม Equex STM Paste ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแยกตามดัชนีที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราตัวอสุจิมีชีวิต อัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ มีรายละเอียดดังนี้

ผลของการเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Table 1) จากการศึกษาพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนทำการแช่แข็งในทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในขณะที่หลังทำการแช่แข็ง ที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการละลาย พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม และกลุ่มที่ทำการเสริม Equex STM Paste ที่ระดับ 0.2%, 0.4% และ 0.8% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน (P>0.05)

Table 1. The percentages (mean±SE) of bull sperm motility before freezing and after thawed at 0, 2 and 4 h with and without supplementation of Equex STM Paste.

Equex STM Paste Supplementation (%)	Before Freezing	Time of after-thawing (h)		
		0	2	4
0 (control)	74.38±2.17	35.63±7.67	32.50±10.41	26.25±11.09
0.2%	74.06±2.77	35.31±8.50	41.25±6.29	26.25±12.50
0.4%	74.06±2.13	38.75±4.21	40.00±10.00	33.75±17.97
0.8%	75.00±1.77	36.88±6.81	38.75±8.54	27.50±5.00

ผลของการเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราอสุจิมีชีวิต

การเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราอสุจิมีชีวิตจากการย้อมสี Eosin-Nigrosin (Table 2) จากผลการศึกษา พบว่า เมื่อเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเสริม Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการแช่แข็ง ไม่มีความแตกต่างของอัตราอสุจิมีชีวิต (P>0.05) ในขณะที่หลังจากทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว พบว่า การเสริม Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้น 0.8% มีอัตราอสุจิมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม (กลุ่มควบคุม) หลังการละลายที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง (P<0.05)

Table 2. The percentages (mean±SE) of bull sperm viability before freezing and after thawed at 0, 2 and 4 h with and without supplementation of Equex STM Paste.

Equex STM Paste Supplementation (%)	Before Freezing	Time of after-thawing (h)		
		0	2	4
0 (control)	75.50±2.13	44.40±13.01[a]	45.50±2.03[a]	36.60±6.83[a]
0.2%	75.25±2.17	49.50±6.58[a, b]	49.20±8.25[a,b]	48.50±8.70[a,b]
0.4%	74.35±2.41	50.20±10.68[b]	41.40±7.44[a]	47.20±5.18[b]
0.8%	60.50±5.33	59.00±6.22[b]	60.10±9.32[b]	57.50±5.33[b]

[a, b]Values within column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

ผลของการเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์

ผลของการเสริม Equex STM Paste ต่ออัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (Table 3) จากการศึกษา พบว่า ก่อนทำการแช่แข็งอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์กลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทำการเสริม Equex STM Paste ที่ระดับ 0.2%, 0.4% และ 0.8% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เมื่อทำการตรวจประเมินหลังทำการแช่แข็ง พบว่า กลุ่มที่ทำการเสริมด้วย Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้น 0.2%, 0.4% และ 0.8% มีอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม (กลุ่มควบคุม) ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 หลังการละลาย (P<0.05)

Table 3. The percentages (mean±SE) of bull sperm membrane integrity before freezing and after thawed at 0, 2 and 4 h with and without supplementation of Equex STM Paste.

Equex STM Paste Supplementation (%)	Before Freezing	Time of after-thawing (h)		
		0	2	4
0 (control)	66.00±4.55	59.00±9.79	49.40±3.63[a]	47.00±3.06[a]
0.2%	63.30±3.60	62.40±7.71	61.10±5.84[b]	55.80±4.55[b]
0.4%	61.50±3.50	61.50±4.54	56.70±4.56[b]	51.40±3.60[b]
0.8%	62.40±5.05	63.70±6.78	58.60±2.41[b]	54.60±5.95[b]

[a, b]Values within column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

จากผลการศึกษา การเสริม Equex STM Paste ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อโค Egg-Yolk Tris พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ (motility) อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ (viability) และอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (membrane integrity) ก่อนทำการแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาผลของการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อแพะ [4] และในสารสารละลายน้ำเชื้อสุนัข [3] ที่ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ก่อนทำการแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่หลังจากนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้ว มาทำการละลายเพื่อตรวจคุณภาพ พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อสุนัข [4, 10] โค [8] แพะ [5] แมว [3] และสุกร [6-7] ที่พบว่าการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อหลังทำการแช่แข็งมีคุณภาพดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมด้วย Equex STM Paste แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า อัตราอสุจิมีชีวิต และอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ เมื่อทำการละลายน้ำเชื้อที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ของกลุ่มที่ทำการเสริมด้วย Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้น 0.8% สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม (กลุ่มควบคุม) สอดคล้องกับการรายงานของ Zambelli et al. (2010) [12] ที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อแมว พบว่า เมื่อบ่มน้ำเชื้อทิ้งไว้ที่ 3 และ 6 ชั่วโมง มีอัตราอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมด้วย Equex STM Paste ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของ Equex STM Paste ซึ่งเป็นสารซักฟอกชนิดหนึ่ง มีสารออกฤทธิ์คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) ที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ซึ่งพบว่าช่วยในการรักษาเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งได้ [3-7] และคุณสมบัติของการเป็น solubilization ที่ช่วยให้อสุจิมีอัตราการรอดชีวิต เนื่องจากช่วยในการแตกตัวของไข่แดงที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อได้ดีขึ้นอีกด้วย [2]

ระดับความเข้มข้นของการเสริม Equex STM Paste ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.4% และ 0.8% ส่งผลให้อัตราอสุจิมีชีวิตและอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม หลังจากทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งและบ่มทิ้งไว้ที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ให้ผลในทิศทางเดียวกับการรายงานของ Underwood et al. (2009) พบว่าการเสริม Equex STM Paste ที่ระดับความเข้มข้น 0.375% ให้ผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการ re-Frozen ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม [9] และ Klinc and Rath (2007) [13] ใช้ Equex STM Paste 0.75% ในสารละลายน้ำเชื้อโคเป็น standard protocol ของการแยกเพศอสุจิโค ข้อจำกัดของการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อโคหรือในสัตว์ชนิดอื่นๆ ยังไม่เด่นชัด แต่มีรายงานการใช้สารในกลุ่ม SDS ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของ Equex STM Paste ที่ได้กล่าวถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังเช่นการศึกษาของ Arriola and Foote (1987) [14] พบว่าการเสริมสารซักฟอกในสารละลายน้ำเชื้อโคที่มากกว่า 1% ส่งผล

ในการลดการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และส่งผลต่อความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2%

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการเสริม Equex STM Paste ในสารละลายน้ำเชื้อโคที่ระดับความเข้มข้น 0.8% ช่วยให้อัตราการเคลื่อนของอสุจิ อัตราอสุจิมีชีวิต และอัตราความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ของน้ำเชื้อโคแช่แข็งดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมด้วย Equex STM Paste หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว

เอกสารอ้างอิง

1. Chatterjee S., De Lamirande E. And Gagono C. Cryopreservation alters membrane slfhydryl cryopreservation alters membrane sulfhydryl oxidized glutathione. *Mole Reprod and Devel.* 2001; 60: 498-506.
2. Peturnkina, AM., GrÖpper, B., TÖpfer-PeTersen, E. and Günzel-Apel, A-R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of freezing extender. *Theriogenology.* 2005; 53: 1390-1406.
3. Axnér E., Hermansson U. and Linde-ForsbergC. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2004; 84: 179-191.
4. Ponglowhaphan S. and Chatdarong K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology.* 2008; 69: 666-672.
5. Anakkul N., Suwimonteerabutr1 J., Singlor1 J., Phutikanit N., Tharasanit T. and Techakumphu1 M. Effect of Equex STM Paste on the quality and motility characteristics of post thawed cryopreserved goat semen. *Thai J Vet Med.* 2011; 41(3): 345-351.
6. Rienprayoon C., Klangnak C., Onton S., Tretipskul C. and Tummaruk P. A comparative study on the efficacy of four semen extenders and thawing by seminal plasma on the quality of frozen-thawed boar semen. *Thai J Vet Med.* 2012; 42(2): 195-200.
7. Wu T-W., Cheng F-P., Chen I-H., Yang C-H., Tsai M-Y., Chang M-H., Wang J-H. and Wu J-T. The combinatorial effect of different Equex STM Paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reprod Dom Anim.* 2013; 48: 53-58.
8. Chaveiro A., Machado L., Frijters A., Engel B. and Woelders H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology.* 2006; 65: 1875-1890.
9. Underwood, SL., Bathgate, R., Maxwell, WMC. and Evans, G. Development of procedures for sex-sorting frozen–thawed bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44: 460-466.

10. Peña AI., LugildeLL., Barrio M., Herradón PG. and Quintela LA. Effect of Equex from different source on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca2+ concentration of sdog spermatozoa. *Theriogenology.* 2003; 59: 1725-1739.
11. Brito, LFC., Barth, AD., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, PL. and Kastelic, JP. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology.* 2003; 60: 1539-1551.
12. Zambelli D., Iacono E., Raccagni R. and Merlo B. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology.* 2010; 73: 886-892.
13. Klinc, P. and Rath, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometricsorting. *Reprod Dom Anim.* 2007; 42: 63-67.
14. Arriola, J., and R.H. Foote. Glycerolation and thawing effects on bull sperm frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 1664-1670.