



การศึกษาผลของการปั่นแยกเซมินอพลาสมาและแหล่งของเลซิทิน  
ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง  
**The Study on Effects of Seminal Plasma Removal and Sources of Lecithin  
Based-Extenders on the Quality of Frozen Goat Semen**

จิตศักดิ์ เมืองเขียว  
Jitthasak Maungkhiow

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
**A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Animal Science  
Prince of Songkla University**

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาผลของการปั่นแยกเซมินอพลาสมาและแหล่งของเลซิทิน  
ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง  
**The Study on Effects of Seminal Plasma Removal and Sources of Lecithin  
Based-Extenders on the Quality of Frozen Goat Semen**

จิตศักดิ์ เมืองเขียว  
**Jitthasak Maungkhiow**

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Animal Science  
Prince of Songkla University**

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาผลของการปั่นแยกเซมิโนลพลาสมาและแหล่งของเลซีติน

ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

ผู้เขียน นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

(รองศาสตราจารย์ สุธา วัฒนสิทธิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ)

.....

(ดร.ชญจิรา เทพรัตน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

.....กรรมการ

(ดร.ชญจิรา เทพรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
สำหรับการศึกษาตาม หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์)

ร่วม

ลงชื่อ

.....

(นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

.....

(นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว)

นักศึกษา

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การศึกษาผลของการปั่นแยกเซมิโนลพลาสมาและแหล่งของเลซีติน  
ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

**ผู้เขียน** นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว

**สาขาวิชา** สัตวศาสตร์

**ปีการศึกษา** 2559

### บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ผลของการปั่นแยกเซมิโนลพลาสมา และแหล่งของเลซีตินที่เหมาะสมในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของเลซีตินจากถั่วเหลืองและ เลซีตินจากเมล็ดทานตะวัน ระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง โดยใช้แผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำเพื่อทดสอบผลของการเติมเลซีตินจากถั่วเหลืองและ เลซีตินจากเมล็ดทานตะวันแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแพะที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดี นำมาเจือจางตามทริคเมนต์ที่กำหนด ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง หลังละลาย ( ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มน้ำเชื้อ ไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 โดยทำการทดลองซ้ำติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่เติมเลซีตินจาก ถั่วเหลือง ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และจำนวนอสุจิมีชีวิตสูงสุด สูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซีตินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) สำหรับกลุ่มที่เติมเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และจำนวนอสุจิมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) สูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 1.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ในชั่วโมงที่ 4 ของการบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการเติมเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงสุด จากการศึกษาสรุปได้ว่า การเติมเลซีตินจากถั่วเหลืองและเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการปั่นแยกเซมิโนลพลาสมาพร้อมกับแหล่งของเลซีตินจากถั่วเหลืองและ เลซีตินจากเมล็ดทานตะวัน ระดับที่เหมาะสม ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพ

น้ำเชื้อแพะแช่แข็ง โดยจัดการทดลองแบบ 2x2 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ ภายในบล็อกที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements 2x2 Factorial in RCBD) และเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม (ปิ่นแยกเซมินอลพลาสมา x ไข่แดง ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์) อิทธิพลของ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 การเตรียมน้ำเชื้อก่อนการทดลอง ได้แก่ การปั่นแยกและไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมา และ ปัจจัยที่ 2 แหล่งของเลซิดิน ได้แก่ เลซิดินจากถั่วเหลือง และเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3 .0 เปอร์เซ็นต์ ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 และประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซมหลังละลาย โดยทำการทดลองซ้ำติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ผลการทดลอง พบว่า การปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและการเติมเลซิดินทั้ง 2 แหล่ง ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และจำนวนตัวอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมสมบูรณ์ ( $p>0.05$ ) อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลือง ( $p<0.05$ ) จากการศึกษา นี้ กลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ( $p<0.05$ )

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า เลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน สามารถเติมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะสำหรับการแช่แข็งได้ในระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่จำเป็นต้องปั่นแยกเซมินอลพลาสมา อย่างไรก็ตาม เลซิดินจากเมล็ดทานตะวันสามารถป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิจากการแช่แข็งได้ดีกว่าเลซิดินจากถั่วเหลือง จึงแนะนำให้ใช้เลซิดินจากเมล็ดทานตะวันเป็นสารป้องกันการช็อกจากความเย็นในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ

<b>Thesis</b>	The Study on Effects of Seminal Plasma Removal and Sources of Lecithin Based-Extenders on the Quality of Frozen Goat Semen
<b>Author</b>	Mr. Jitthasak Maungkhiow
<b>Major Program</b>	Animal Science
<b>Academic Year</b>	2016

### **Abstract**

The objective of this study was to investigate the effects of seminal plasma removal and sources of lecithin based-extenders on the quality of frozen goat semen. The study was divided into 2 experiments as the following:

In experiment 1, the effect of soybean and sunflower lecithin levels in semen extender on frozen goat semen quality was determined using repeated measurements in randomized complete block design (RCBD). The semen samples, from good semen quality bucks, were collected and diluted with 4 different levels of soybean lecithin and sunflower lecithin (1.5, 3.0, 4.5 and 6%). The frozen-thawed sperm quality was examined at 0, 2 and 4 hr of incubation at 37°C. This experiment was repeated for 5 weeks consecutively. The results showed that total motility, progressive motility and viability of frozen-thawed sperm in 3.0% soybean lecithin level were higher than those in 1.5 and 6.0% ( $p<0.05$ ). For sunflower lecithin, the frozen-thawed sperm quality of 3.0 and 4.5% level were significantly higher than 1.5 and 6.0% ( $p<0.05$ ). However, the total motility and progressive motility of frozen-thawed sperm in 3.0% sunflower lecithin was the highest when incubated at 37°C for 4 hours. From this experiment, it could be concluded that 3.0% of soybean and sunflower lecithin were the suitable level to use as a cold shock protectants in frozen-semen extender.

In experiment 2, the effect of seminal plasma removal and sources of lecithin based-extender on frozen goat semen quality was studied using repeated measurements in a 2x2 factorial in randomized complete block design (RCBD). The treatment arrangement was 3.0% of soybean and sunflower lecithin based-extender with and without seminal plasma removal compared to egg yolk (20%) extender without seminal plasma removal. The semen samples, from good semen quality bucks, were collected and assigned to 5 different treatments.



The frozen-thawed sperm quality was examined at 0, 2 and 4 hr of incubation at 37°C. Then the membrane sperm and acrosome integrity (FITC-PNA/PI) were analyzed after thawing (0 h) at 37°C using flow cytometry. This experiment was repeated for 5 weeks consecutively. The results showed that there were no effect of seminal plasma removal and sources of lecithin based-extender on total motility, progressive motility, average path velocity, straight-line velocity, curve-line velocity, amplitude of lateral head displacement, beat cross frequency, straightness, linearity and acrosome and membrane sperm integrity percentage of frozen-thawed sperm ( $p>0.05$ ). However, the total motility, progressive motility and average path velocity of frozen-thawed sperm in 3.0% sunflower lecithin was higher than 3.0% soybean lecithin when incubated at 37°C for 4 hours. In addition, total motility and progressive motility of frozen-thawed sperm of four treatment groups were lower than control group.

Results from both experiments could be concluded that both of soybean and sunflower lecithin could be used in extender of goat semen without seminal plasma removal. Nevertheless, the sunflower lecithin showed a better result as a cold shock protectant in frozen-semen extender than the soybean lecithin. Thus, the sunflower lecithin is recommended to use in frozen-semen extender.

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาและ ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความ รั้และ ให้ คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอขอบคุณ รศ.สุธา วัฒนสิทธิ์ และ รศ.ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี กรมปศุสัตว์ ผู้อำนวยการ นส.พ.ชาญยุทธ กาพล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ทดลอง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ดูแลสัตว์ พ่อพันธุ์ ที่ช่วยเหลือใน การดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง พ่อพันธุ์นครราชสีมา ที่เอื้อเฟื้อเครื่องตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิ ( CASA) และ คุณจตุพร พงษ์เพ็ง นักวิชาการสัตวบาลชำนาญการพิเศษ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์ ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่อง Flow cytometry และ ผศ.ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยและการนำเสนอผลงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในที่นี้ ที่ให้การช่วยเหลือติชม จนทำให้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบ ให้ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อใช้เป็นแหล่ง ศึกษาค้นคว้าและเป็นข้อมูลอ้างอิงในโอกาสต่อไป

สุดท้ายข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดาและมารดา และขอขอบคุณครอบครัว ที่ให้การ สนับสนุนช่วยเหลือทั้งทุนการศึกษาและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คุณประโยชน์ใดๆ อันพึงจะเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดา มารดา และคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(10)
รายการตาราง.....	(12)
รายการตารางภาคผนวก.....	(17)
รายการภาพประกอบ.....	(18)
บทที่ 1	
บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
บทที่ 2	
การตรวจเอกสาร.....	4
บทที่ 3	
การทดลองที่ 1.....	21
บทนำ.....	21
วัตถุประสงค์ .....	21
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง .....	22
ผลการทดลอง .....	27
วิจารณ์ผลการทดลอง .....	54
สรุปผลการทดลอง .....	57
บทที่ 4	
การทดลองที่ 2.....	59
บทนำ.....	59
วัตถุประสงค์ .....	59
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง .....	60
ผลการทดลอง .....	64
วิจารณ์ผลการทดลอง .....	79
สรุปผลการทดลอง .....	81
บทที่ 5	
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	82

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
สรุป .....	82
ข้อเสนอแนะ .....	82
เอกสารอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	92
ตารางภาคผนวก .....	92
ประวัติผู้เขียน.....	93

**รายการตาราง**

<b>Table</b>		<b>หน้า</b>
1	Phospholipids composition of ruminant seminal plasma.....	12
2	Comparison of the main phospholipids isomers of lecithin from different sources.....	20
3	Descriptive statistics of fresh semen quality of experimental buck used in Experiment 1.1.....	27
4	Summary of analysis of variance for total motility (MOT), progressive motility (PMT), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curve-line velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN) and viability of frozen-thawed sperm in different levels of soybean lecithin-based extender and incubation time at 37 <sup>o</sup> C.....	29
5	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	30
6	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	31
7	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on average path velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	32
8	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straight-line velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	33
9	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on curve-line velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	34

**รายการตาราง (ต่อ)**

<b>Table</b>	<b>หน้า</b>
10	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 35
11	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 36
12	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straightness (%) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 37
13	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on linearity (%) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 38
14	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on viability (%) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 39
15	Descriptive statistics on semen quality of buck in fresh ejaculates used in Experiment 1.2..... 40
16	Summary of analysis of variance for total motility (MOT), progressive motility (PMT), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curve-line velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN) and viability of frozen-thawed sperm in different levels of sunflower lecithin-based extender and incubation time at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 43
17	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ ..... 44

รายการตาราง (ต่อ)

Table		หน้า
18	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	45
19	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on average path velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	46
20	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straight-line velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	47
21	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on curve-line velocity (µm/s) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	48
22	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement (µm) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C .....	49
23	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C .....	50
24	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straightness percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	51
25	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on linearity percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	52
26	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on viability percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37 <sup>o</sup> C.....	53

รายการตาราง (ต่อ)

Table		หน้า
27	Descriptive statistics of fresh semen quality of experimental buck used in Experiment 2.....	64
28	Summary of analysis of variance for total motility (MOT), progressive motility (PMT), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curve-line velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN) and viability of frozen-thawed sperm with and without seminal plasma remove and sources of lecithin based-extender compared to egg yolk extender and incubation time 37°C.....	67
29	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on total motility percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	68
30	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on progressive motility percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	69
31	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	70
32	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straight-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	71
33	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on curve-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	72



รายการตาราง (ต่อ)

Table		หน้า
34	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ .....	73
35	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ .....	74
36	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straightness percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ .....	75
37	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on linearity percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ .....	76
38	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on sperm membrane and acrosome integrity of frozen-thawed sperm after thawing .....	78

รายการตารางภาคผนวก

Appendix Table

หน้า

1	Composition, pH and osmotic pressure (mOsm/kg) of the different freezing media dissolved with Tris-base with 7% glycerol.....	92
---	---	----

## สารบัญญภาพ

Figure		หน้า
1	The reproductive tract of the buck..... (	5
2	Mammalian spermatogenesis..... (	8
3	Schematic presentation of spermatozoa..... (	9
4	Structure of the plasma membrane..... (	10
5	The model focuses the main content of seminal plasma and their functions on spermatozoa and the female genital tract.....	11
6	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender and incubation time on total motility percentage of frozen-thawed sperm.....	30
7	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender and incubation time on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm.....	31
8	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on average path velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	32
9	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straight-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	33
10	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on curve-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	34
11	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	35
12	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on beat cross frequency of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour incubation at 37°C.....	36

**สารบัญญภาพ (ต่อ)**

<b>Figure</b>		<b>หน้า</b>
13	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straightness of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	37
14	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on linearity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	38
15	Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on viability of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	39
16	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	44
17	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender and incubation time on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm .....	45
18	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on average path velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	46
19	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straight-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	47
20	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on curve-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	48
21	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	49

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

Figure		หน้า
22	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender and incubation time on beat cross frequency of frozen-thawed sperm.....	50
23	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straightness percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	51
24	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on linearity percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	52
25	Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on viability percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	53
26	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender and incubation time on total motility percentage of post-thawed sperm.....	68
27	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on progressive motility percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	69
28	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on average path velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	70
29	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straight-line velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	71
30	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on curve-line velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	72

**สารบัญญภาพ (ต่อ)**

<b>Figure</b>		<b>หน้า</b>
31	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	73
32	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on beat cross frequency of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C.....	74
33	Effects of sources of lecithin-based extender and incubation time on straightness percentage of post-thawed sperm.....	75
34	Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on linearity percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C .....	76
35	Dotplot (example) of flow cytometry analysis of membrane and membrane sperm integrity (FITC-PNA/PI) of frozen-thawed sperm after thawing at 37°C (A:RxSB, B:RxSF, C: NRxSB, D:NRxSF and E: control group) .....	77

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

การผสมเทียม (Artificial insemination) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์และกระจายพันธุกรรมของสัตว์พันธุ์ดี เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ความสำเร็จของการผสมเทียมขึ้นอยู่กับ การรีดเก็บน้ำเชื้อ การเก็บรักษาน้ำเชื้อ และการนำไปใช้ผสมเทียม (Leboeuf *et al.*, 2000) การเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (frozen semen) ไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถเก็บน้ำเชื้อของสัตว์พันธุ์ดีไว้ได้ยาวนานและสามารถให้บริการผสมเทียมในพื้นที่ห่างไกล ช่วยยกระดับพันธุกรรมสัตว์ของเกษตรกรให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีข้อดีหลายประการ แต่ขั้นตอนในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งก็มีจุดอ่อน ที่จะทำให้อสุจิเกิดความเสียหายจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และโครงสร้างภายในตัวอสุจิ ส่งผลให้จำนวนอสุจิมีชีวิตหลังละลาย (viability) และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) มีค่าลดลง เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้อัตราการผสมติดและอัตราการตั้งท้องจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง มักจะมีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแบบแช่เย็น (Purdy, 2006)

ดังนั้น ในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงมีความจำเป็นต้องเติมส่วนที่เรียกว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ซึ่งประกอบด้วย น้ำ สารรักษาความเป็นกรด-ด่าง สารรักษาระดับแรงดันออสโมติก สารที่เป็นแหล่งพลังงาน ยาปฏิชีวนะ และส่วนประกอบที่สำคัญคือ สารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็น (cold shock protectant) และสารป้องกัน ความเสียหาย จากการแช่แข็ง (cryoprotectant) ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจาก กระบวนการแช่แข็ง (Watson, 2000) จากความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อโค สารป้องกันการช็อกจากความเย็นที่นิยมใช้กันมานานในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อโดยทั่วไป คือ เลซิธินจากไข่แดง (egg yolk lecithin) อย่างไรก็ตาม สถานการณ์ปัจจุบันการใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีข้อจำกัดมาก ทั้งนี้ เพราะความเข้มงวดในการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนก (Avian influenza, bird flu) ซึ่งเป็นโรคระบาดที่สำคัญ โดยเฉพาะกลุ่มสหภาพยุโรป ส่งผลให้มีการพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ปราศจากไข่แดง (egg yolk free medium) เช่น สารละลายเจือจางน้ำเชื้อของบริษัทที่มีชื่อ

การค้าว่า Bioxcell® และ Andromed® โดยใช้สารป้องกันการซื้อจากความเสี่ยง จากแหล่งจากพืช แทนไข่แดง

นอกจากนี้ จากหลายรายงานผลการศึกษที่ผ่านมา พบว่าปริมาณของไข่แดงที่เติมใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ส่งผลให้ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและจำนวนตัวอสุจิมีชีวิตหลัง ละลายลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในแพะมีการผลิตเอนไซม์ มีชื่อว่า egg yolk coagulating enzyme (EYCE) หรือ phospholipase A ซึ่งหลังจากต่อมบัลโบยูเรทอลออกมาอยู่ในเซมินอล พลาสมา เอนไซม์นี้เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส (hydrolyses) เปลี่ยนเลซิธินจากไข่แดงให้เป็น กรดไลโซเลซิธิน (lysolecithin) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิและ อะอะโครโซม (Upreti *et al.*, 1999) จึงทำให้ไม่สามารถเติมไข่แดงในระดับสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ในสูตรสารละลาย เจือจางน้ำเชื้อแพะได้ หรือไม่ก็ต้องทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออกก่อนเติมสารละลายเจือจาง น้ำเชื้อที่มีไข่แดง (Roy, 1957; Sias *et al.*, 2005)

ในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักในการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งได้ ตระหนักถึงผลกระทบดังกล่าว จึงทำการค้นคว้าวิจัยเพื่อพัฒนาคุณภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เช่น พัฒนาสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปชนิดต่างๆ มาใช้แทนสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ (รพีพรรณ และคณะ , 2548) การศึกษาปริมาณไข่แดงในระดับต่างๆ ใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ (ณรงค์ และคณะ , 2550) และการศึกษาวิธีการปั่นแยกและไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมาออกก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบสที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ (อนนท์ และคณะ , 2551) จากผลการวิจัยและพัฒนาดังกล่าว สรุปได้ว่าการผลิต น้ำเชื้อแพะ แช่แข็งของกรมปศุสัตว์ จะต้องนำน้ำเชื้อมาปั่นแยกเซมินอลพลาสมาก่อนเติมสารละลายเจือจาง น้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ จึงจะนำน้ำเชื้อเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งตามปกติ แต่ปัญหาของการดำเนินการนี้ คือ มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการเตรียมสารละลาย และใช้ระยะเวลา นานขึ้นก่อนนำน้ำเชื้อเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้ ยังมีบางรายงานกล่าวว่า การปั่น แยกเซมินอลพลาสมา อาจส่งผลให้คุณภาพของตัวอสุจิลดลง (Ramukhithi *et al.*, 2011)

ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้สารป้องกัน การซื้อเนื่องจากความเสี่ยง หลายชนิดในสูตร สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ เพื่อลดปัญหาที่กล่าวมา โดยใช้แหล่งเลซิธินจากพืช เช่น เลซิธินจากถั่วเหลือง (soybean lecithin) เพื่อจะได้ไม่ต้องทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและทำให้น้ำ เชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย มีคุณภาพดีขึ้น (Salmani *et al.*, 2014) แหล่งเลซิธินจากพืชนั้น นอกจากจะพบได้ในถั่วเหลืองแล้ว ยังพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด เมล็ดฝ้าย และที่ น่าสนใจ คือ เลซิธินจากเมล็ดทานตะวัน (sunflower lecithin) เนื่องจากมีฟอสฟาติลโคลีน (Phosphatidyl choline) ใกล้เคียงกับเลซิธินจากถั่วเหลือง แต่เลซิธินจากเมล็ดทานตะวัน มีสารต้าน



อนุโมลิสระ เช่น โอเมกา 6 (linoleic acid) และ โอเมกา 9 (oleic acid) ซึ่งมีรายงานการนำมาเสริมใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ โค ส่งผลให้มีค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิและจำนวนตัวอสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมสมบูรณ์สูงขึ้น (Takahashi *et al.*, 2012)

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาระดับของเลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวันที่เหมาะสมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อร่วมกับการปั่นแยกและไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมา เปรียบเทียบกับวิธีการปัจจุบันที่ใช้ไข่แดงเป็นแหล่งเลซิดิน เพื่อหาแนวทางใน การพัฒนาสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะสำหรับการแช่แข็งที่เหมาะสมต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับของเลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่เหมาะสมใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาพร้อมกับผลของเลซิดินจาก ถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันระดับที่เหมาะสมใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพ น้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เปรียบเทียบกับสูตรที่ใช้ไข่แดงและปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

Girma (2009) กล่าวว่า กายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ของแพะเพศผู้ (Figure 1) ประกอบด้วย อัณฑะ ทำหน้าที่ผลิตอสุจิ สอรัโมนเพศ และส่วนประกอบอื่นๆ ระบบท่อทำหน้าที่ การลำเลียงอสุจิ ต่อมาทำหน้าที่ผลิตเซมิโนลพลาสมา และลิ่งค์ รยละเอียดดังนี้

1. อัณฑะ (testis) ลักษณะเป็นวงรีคล้ายรูปไข่ มีจำนวน 1 คู่ ภายในถุงหุ้มอัณฑะ ซึ่งอยู่นอกลำตัวห้อยลงมาจากช่องท้องด้านซ้าย มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร ทำหน้าที่ผลิต เซลล์อสุจิ (sperm) และสอรัโมนเพศ เช่น เทสโทสเทอโรน (testosterone) ซึ่งมีบทบาทต่อการผลิตอสุจิและการแสดงออกพฤติกรรมทางเพศ

2. ถุงหุ้มอัณฑะ (scrotum) ประกอบด้วยผิวหนังอยู่ทางด้านนอกและกล้ามเนื้ออยู่ทางด้านใน หุ้มอยู่รอบๆ อัณฑะ ทำหน้าที่ปกป้องอัณฑะและช่วยรักษาอุณหภูมิภายในอัณฑะให้ต่ำกว่า อุณหภูมิร่างกาย 3 ถึง 5 องศาเซลเซียส เพื่อความเหมาะสมในการผลิตอสุจิ

3. ท่อพักอสุจิ หรือ อีพิดิไดมิส (epididymis) มีลักษณะเป็นท่อยาวติดอยู่กับ ส่วนของ อัณฑะ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว เรียกว่า คาพิท อีพิดิไดมิส (caput epididymis) ส่วนกลาง เรียกว่า คอร์พ อีพิดิไดมิส (corpus epididymis) และส่วนหางเป็นจุดต่อเชื่อมกับท่อนำน้ำเชื้อ เรียกว่า กูดออีพิดิไดมิส (cauda epididymis) ทำหน้าที่ เป็น จุดพักให้ตัวอสุจิเพื่อพัฒนาต่อให้ สมบูรณ์เต็มที่และเก็บสะสมอสุจิไว้บริเวณส่วนหางของท่อพักอสุจิ

4. ท่อนำน้ำเชื้อ หรือ วาส เดเฟเรน (vas deferens) มีลักษณะเป็นท่อต่อมาจากท่อพัก อสุจิ เข้าไปในช่องท้องมีปลายเปิดสู่ท่อปัสสาวะ ส่วนนี้ ทำหน้าที่ขนส่งน้ำเชื้อออกจากท่อพักอสุจิ ไปยังท่อปัสสาวะ

5. ท่อปัสสาวะ (urethra) มีลักษณะเป็นท่อยาว ในแพะ มีส่วนปลายของท่อปัสสาวะ โผล่ ปลายแหลมออกมา (urethral process) ในท่อปัสสาวะมีลิ้นปิดเปิดไม่ให้น้ำเชื้อปนกับน้ำปัสสาวะ เป็นจุดที่มีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างอสุจิกับเซมิโนลพลาสมาที่มาจากต่อมร่วม บริเวณ ท่อนำปัสสาวะส่วน โพรงเชิงกรานในระหว่างการหลั่งน้ำเชื้อ

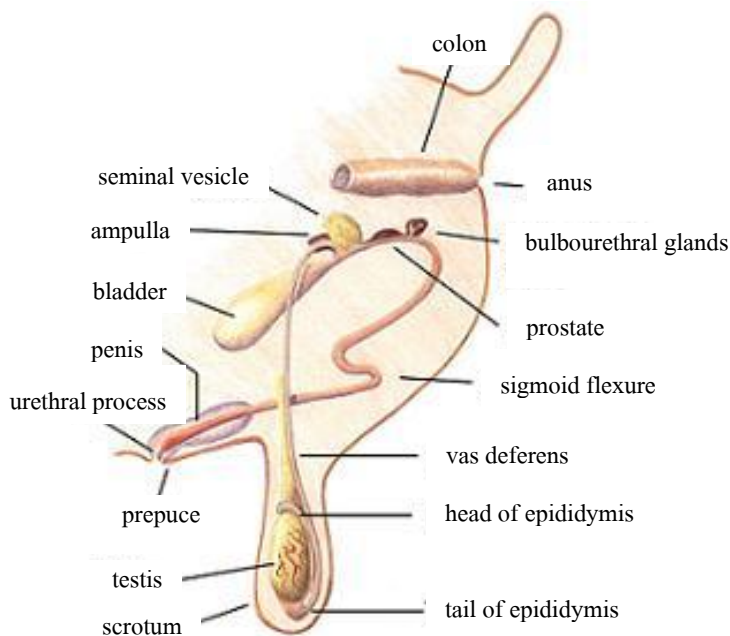
6. ต่อมร่วม (accessory sex glands) อยู่บริเวณรอบๆ ท่อปัสสาวะ ทำหน้าที่ ผลิตส่วนของ หลวในน้ำเชื้อ ต่อมร่วมมี 3 ต่อม ได้แก่

6.1 ต่อมเซมินัล เวสิเคิล (seminal vesicle glands) เป็นต่อมคู่ มีลักษณะคล้าย พวงองุ่น มีท่อเปิดต่อกับท่อปัสสาวะ ทำหน้าที่ผลิตเซมินอลพลาสมาที่เป็นสารอินทรีย์มากมาย หลายชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลฟรุกโทส (fructose)

6.2 ต่อมลูกหมาก (prostate gland) เป็นต่อมเดี่ยว อยู่รอบๆ ตามแนวยาวของ ท่อปัสสาวะใกล้กับท่อเปิดของต่อม เซมินัล เวสิเคิล ต่อมนี้ทำหน้าที่ผลิตเซมินอลพลาสมา ประกอบด้วยสารอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียม คลอไรด์ แคลเซียม และแมกนีเซียม

6.3 ต่อมบัลโบยูเรทรอล (bulbourethral glands) เป็นต่อมคู่ ที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ต่อมคาวเปอร์ (Cowper's gland) วางตัวตามยาวของท่อปัสสาวะ ทำหน้าที่ ผลิตน้ำเหนียวใสช่วย หล่อลื่นท่อปัสสาวะเพื่อเปิดทางแก่ตัวสุจิ และทำฤทธิ์กรดที่เกิดจากปัสสาวะในท่อปัสสาวะให้ เป็นกลาง และช่วยล้างปัสสาวะและสิ่งแปลกปลอมที่เหลืออยู่ออกไป (Azerêdo *et al.*, 2001)

7. ลिंगค์ (penis) เป็นส่วนปลายสุดของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ทำหน้าที่ในการนำน้ำเชื้อเข้าไปในช่องคลอดของตัวเมีย โดยลึงค์เกิดการแข็งตัวเพิ่มขนาดและความยาวขึ้นอีกเล็กน้อย เมื่อแพะตัวผู้ต้องการผสมพันธุ์



**Figure 1** The reproductive tract of the buck

Source: Girma (2009)

## กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (spermatogenesis)

การสร้างเซลล์อสุจิ เมื่อสัตว์เพศผู้เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ตัวอสุจิถูกผลิตขึ้นภายในอัณฑะ โดยภายในอัณฑะประกอบด้วยท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) บางๆ ขดแน่นอยู่จำนวนมาก อสุจิถูกพัฒนาขึ้นจากเซลล์เริ่มต้น เรียกว่า ไพรมอร์เดียลเจอร์ม (primordial germ cell) ที่ฝังตัวอยู่ตามแนวขอบท่อแทรกตัวรวมอยู่กับเซลล์เซอร์โตไล (sertoli cell) ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นในการผลิตของเหลวที่จำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอสุจิ และเซลล์เลย์ดีค (leydic cell) ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) เซลล์เริ่มต้นเหล่านี้จะอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส (interphase) รอเวลาเพื่อพัฒนาต่อเป็นตัวอสุจิ ภายใต้การควบคุมของ luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) จากต่อมใต้สมอง (hypothalamus) (Schulze, 1979) กระบวนการสร้างอสุจิ (Figure 2) สามารถแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

### 1. ระยะสเปอร์มาโตโกเนียล (spermatogonial stage)

การสร้างอสุจิในระยะแรกจากเซลล์ต้นแบบ (germ cells) โดยเริ่มมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนและเก็บสะสมไว้ในท่อเซมินิเฟอรัส เมื่อถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า จะพัฒนาต่อไปจนเปลี่ยนแปลงต่อกลายเป็น สเปอร์มาโตโกเนียล (spermatogonium) ที่มีโครโมโซมคู่ (2n, diploid) ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นสเปอร์มาโตโกเนียล ชนิด A0 จากนั้นส่วนหนึ่งจะถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์และพัฒนาต่อเนื่องจนกลายเป็น สเปอร์มาโตโกเนียล ชนิด A1, A2 และ A3 แต่อีกส่วนหนึ่งจะยังคงสภาพระยะพักไว้ทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นแบบและสามารถแบ่งตัวจนสมบูรณ์ได้ในภายหลัง ซึ่งเป็นกลไกที่ช่วยรักษาและควบคุมจำนวนสเปอร์มาโตโกเนียล ส่วนสเปอร์มาโตโกเนียลที่ถูกกระตุ้นพัฒนาต่อไปเป็น สเปอร์มาโตโกเนียล ชนิด B เมื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว และจะหยุดอยู่ที่ระยะโพรเฟส ที่หนึ่ง (prophase I) เรียกเซลล์สืบพันธุ์ระยะนี้ว่า สเปอร์มาโทไซต์ ระยะแรก (primary spermatocyte) (Sharma and Agarwal, 2014)

### 2. ระยะไมโอติก (meiotic stage)

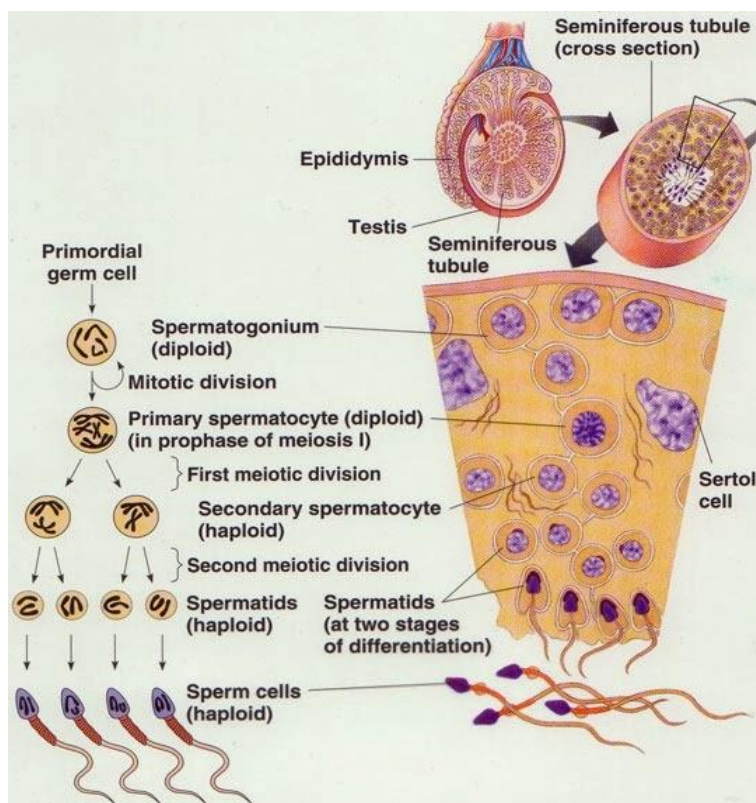
สเปอร์มาโตโกเนียล ชนิด B ที่เป็น สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก เริ่มเคลื่อนเข้าสู่ส่วนแอดลูมินัล (adluminal) ของเซลล์เซอร์โตไล ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อทำให้จำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสลดลงมาครึ่งหนึ่ง (1 n, haploid) โดยการแยกโครโมโซมที่เหมือนกันไปยังขั้วตรงข้ามกันของเซลล์ เมื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะแรกสิ้นสุดลง ได้เซลล์สืบพันธุ์ สเปอร์มาโทไซต์ ระยะที่สอง (secondary spermatocyte) จำนวน 2 เซลล์ แต่ละเซลล์มีชุดโครโมโซมครึ่งหนึ่งประกอบด้วยสองโครมาทิด (chromatid) และยึดกัน

ด้วยเซนโทรเมียร์ (centromere) จากนั้นสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว โดยการแยกโครมาทิดออกจากกันและอยู่ข้างตรงข้ามกัน เป็นการสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิส ระยะที่ 2 ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า สเปอร์มาทิด (spermatids) ระยะนี้เซลล์จะมีรูปร่างกลม ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ (Schulze, 1979; Sharma and Agarwal, 2014)

### 3. ระยะสเปอร์มาโทเจเนซิส (spermiogenesis stage)

ในระยะเวลาจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากสเปอร์มาทิดไปเป็นอสุจิ (sperm cell) ซึ่งเป็นกระบวนการสุดท้ายของการสร้างอสุจิและเกิดขึ้นทันทีเมื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสสิ้นสุดลง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ได้แก่ การยัดเยียดของส่วนหางเพื่อใช้สำหรับเคลื่อนที่ การจัดเรียงตัวของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ให้เป็นเกลียวหุ้มรอบส่วนต้นของหาง (midpiece) และบริเวณคอของอสุจิ การพัฒนาส่วนที่เรียกว่า อะโครโซม (acrosome) เพื่อหุ้มนิวเคลียสของส่วนหัวอสุจิ และภายในอะโครโซมมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเปลือกไข่ (zona pellucida) เพื่อให้อสุจิเจาะเข้าภายในไข่ได้ และการขับออกของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ซึ่งเป็นส่วนเกินจากอสุจิ ทำให้มีรูปร่างเพรียวคล่องตัวสามารถว่ายน้ำไปปฏิสนธิกับไข่ การเปลี่ยนแปลงจากสเปอร์มาทิดไปเป็นอสุจิเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมีเพียงจำนวนหนึ่งเท่านั้นที่เปลี่ยนแปลงเป็นอสุจิได้สมบูรณ์ (Schulze, 1979; Sharma and Agarwal, 2014)

การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเกิดขึ้นไปพร้อมกับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์อสุจิจะค่อยๆ เคลื่อนเข้าสู่ช่องว่างของท่อเซมินิเฟอรัส โดยไซโทพลาสซึมของเซลล์เซอโตไลต์ที่อยู่รอบๆ บีบตัวทำให้รอยต่อของเซลล์แยกออก อสุจิจึงสามารถออกมาตามรอยแยกดังกล่าวเข้าสู่ช่องว่างของท่อเซมินิเฟอรัส ถึงแม้ว่าการพัฒนาเป็นอสุจิยังไม่สมบูรณ์ อสุจิดังกล่าวจะถูกส่งผ่านโดยการไหลไปตามของเหลวที่สร้างจากเซลล์เซอโตไลต์และการบีบตัวของท่อเซมินิเฟอรัส ผ่านเข้าสู่ท่อพักอสุจิ ตามลำดับ อสุจิจะมีการพัฒนาความสามารถในการเคลื่อนที่ พร้อมกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทำให้สามารถใช้สารอาหารจากภายนอกได้ และเจริญเป็นอสุจิที่สมบูรณ์ที่บริเวณนี้ โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นในการส่งผ่านอสุจิอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนเพศ จากนั้นอสุจิจะถูกส่งมาพักไว้ที่ท่อพักอสุจิเพื่อให้อสุจิสมบูรณ์เต็มที่ (epididymal maturation) รอการหลั่งออกนอกร่างกาย (Schulze, 1979; Sharma and Agarwal, 2014)



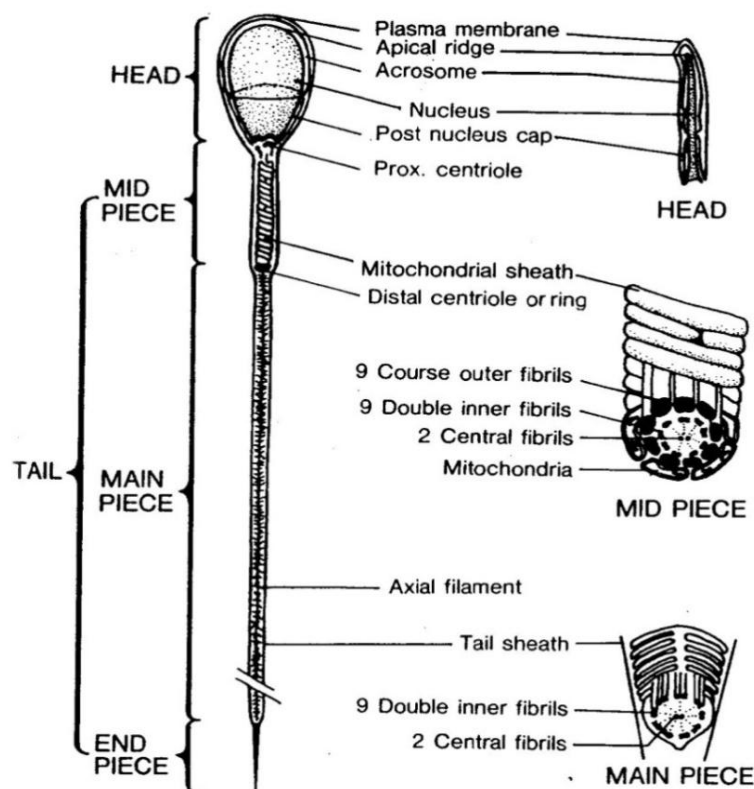
**Figure 2** Mammalian spermatogenesis

Source: Hafez (1993)

### องค์ประกอบของน้ำเชื้อ (composition of semen)

น้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน มีรายละเอียดดังนี้

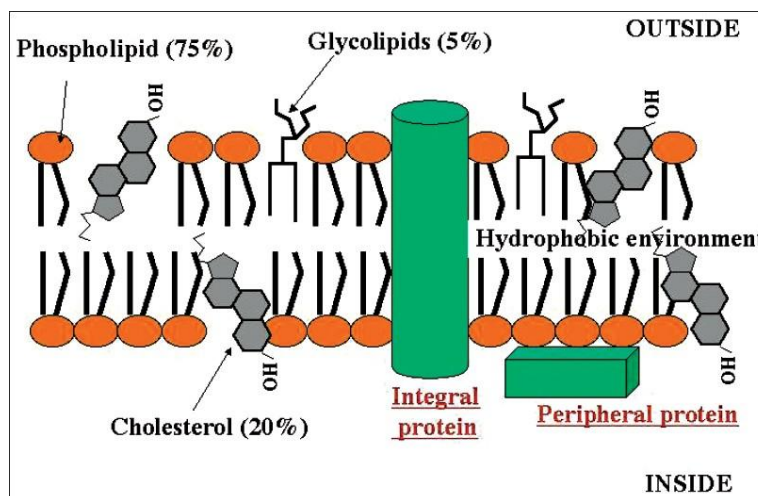
1. อสุจิ (sperm หรือ spermatozoa) เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะไม่เจริญเติบโตและไม่มี การแบ่งตัวเพิ่ม ประกอบด้วยส่วนต่างๆ (Figure 3) ได้แก่ ส่วนหัว (head) มีสารพันธุกรรมหรือดี เอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) โดยมีโพสนิวเคลียส แคป (post nuclear cap) ปกคลุมบริเวณ ส่วนหัวด้านล่าง และมีอะโครโซม (acrosome) ปกคลุมบริเวณหัวด้านบน ภายในอะโครโซม บรรจุเอนไซม์ช่วยในการเจาะผ่านเปลือกไข่เพื่อ การเข้าปฏิสนธิ กรณี ที่อะโครโซมผิดปกติหรือ ได้รับความเสียหายจะส่งผลทำให้การปฏิสนธิล้มเหลว และส่วนหาง ( tail) แบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อย คือ ส่วนต้น ( mid piece) เป็นส่วนที่ต่อมาจากส่วนหัว มีเกลียวของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ส่วนนี้มีเอนไซม์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลฟรุกโทสให้เป็น พลังงานแก่ตัวอสุจิ ส่วนกลาง (main piece) และส่วนปลาย (end piece) ส่วนนี้มีหน้าที่เกี่ยวกับการ เคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Sharma and Agarwal, 2014)



**Figure 3** Schematic presentation of spermatozoa

**Source:** Bearden and Fuquay (1997)

เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (sperm plasma membrane) ประกอบด้วยชั้นไขมันและชั้นโปรตีน (Figure 4) ส่วนของเยื่อหุ้ม ไขมัน (lipids) ประกอบด้วย ฟอสโฟไลปิด ( phospholipids) ไกลโคไลปิด ( glycolipids) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ส่วนของ ฟอสโฟไลปิด ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ส่วนใหญ่เป็น ชนิดฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidyl choline) และฟอสฟาติดีลเอทานอามีน (phosphatidyle thanolamine) และเยื่อหุ้มชั้นโปรตีน มีรูหรือช่อง สำหรับการเข้า-ออกของโมเลกุลต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์อสุจิช่วยลดแรงตึงผิว ควบคุมการไหลเข้า-ออกเซลล์ของสารต่างๆ (Flesch and Gadella, 2000) และมีบทบาทสำคัญต่อการปฏิสนธิกับไข่ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิมีความสัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ เมื่อใดก็ตามที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้รับความเสียหาย ก็จะทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ลดลงด้วย (Mocè *et al.*, 2010)



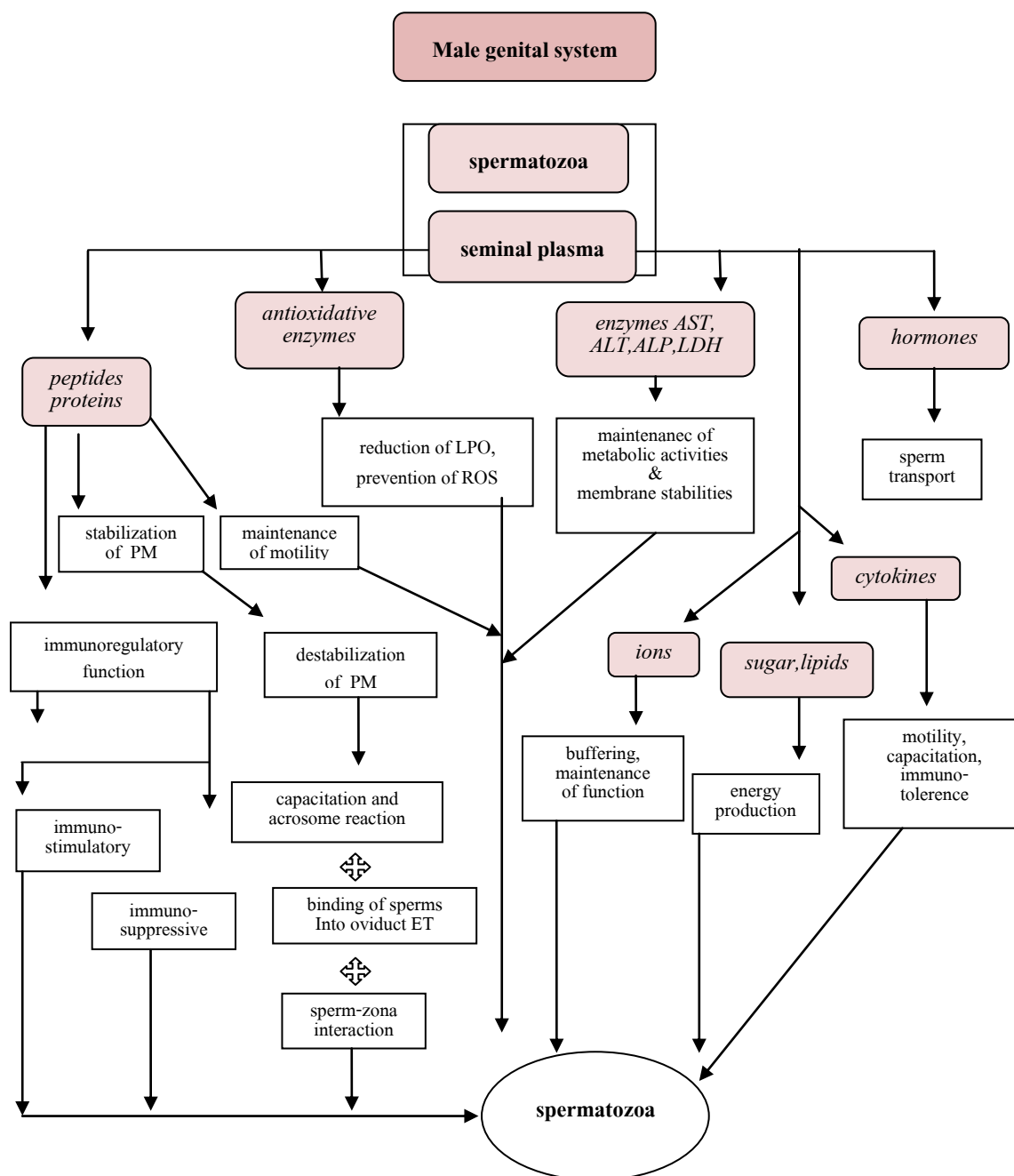
**Figure 4** Structure of the plasma membrane

**Source:** Sheriff and Ali (2010)

**2. เซมิโนลพลาสมา (seminal plasma)** เป็นส่วนประกอบหนึ่งในน้ำเชื้อที่พ่อแพะหลังออกมา ถูกผลิตมาจาก หลายส่วน ได้แก่ ต่อมเซมินัล เวสเคิล (65 เปอร์เซ็นต์) ต่อมลูกหมาก (30 เปอร์เซ็นต์) ที่เหลือถูกผลิตมาจากท่อภายในอวัยวะ ท่อพักอสุจิ และต่อมร่วมอื่นๆ เซมิโนลพลาสมาของแพะมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.0 ถึง 7.2 ประกอบด้วย (1) โปรตีน (proteins) ส่วนใหญ่ถูกผลิตมาจากท่อพักอสุจิและต่อมเซมินัล เวสเคิล มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพของอสุจิและ มีบทบาทต่อการปฏิสนธิกับไข่ (2) สารกลุ่มแร่ธาตุ ( ions) ได้แก่ โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) สังกะสี ( $\text{Zn}^{2+}$ ) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{++}$ ) คลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) และแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{++}$ ) ทำหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่าง ( buffer medium) ควบคุมการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก และปรับสภาพแวดล้อมสนับสนุนการมีชีวิตรอดแก่ตัวอสุจิ (3) สารให้พลังงาน ได้แก่ ฟรุคโทส (fructose) ซอร์บิทอล (sorbitol) และไกลเซอรอล ฟอสโฟลิล โคลีน (glyceryl phosphorylcholine) (4) เอนไซม์ และฮอร์โมน และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ กรดซิตริก ( citric acid) กรดอะมิโน (amino acid) มีบทบาทสำคัญต่อการ เมตาโบลิซึม (Metabolism) การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และการขนส่งตัวอสุจิผ่านท่อต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ รวมถึงนำพาตัวอสุจิเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย เอนไซม์บางตัวทำหน้าที่เป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) มีบทบาทในการกำจัดของเสียที่เกิดจากการเมตาโบลิซึม และ (5) ไขมัน มีสัดส่วนมากเป็นอันดับสองรองจากสารกลุ่มที่ให้พลังงาน ประกอบด้วย คอเลสเตอรอล ฟอสโฟไลปิด ไคลิเซอไรด์ (diglyceride) และ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) สัตว์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบและสัดส่วนของ ฟอสโฟไลปิด ที่แตกต่างกัน (Figure 5 และ Table 1) สัตว์ส่วนใหญ่ของฟอสโฟไลปิดในเซมิโนลพลาสมา มีความสัมพันธ์



กับสัดส่วนของฟอสโฟไลปิดที่เชื่อมหุ้มเซลล์อสุจิ ทำหน้าที่ รักษาโครงสร้างของเซลล์ ช่วยในการเมตาบอลิซึมและมีบทบาทต่อการปฏิสนธิกับไข่ (Juyena and Stelletta, 2012)



**Figure 5** The model focuses the main content of seminal plasma and their functions on spermatozoa and the female genital tract

**Source:** Juyena and Stelletta (2012)

**Table 1** Phospholipids composition of ruminant seminal plasma

Phospholipids	Percentage of total phospholipids		
	Bull	Buffalo	Goat
Phosphatidyl choline (choline plamogen)	17.6-32.9	17.3	15.7-22.4
Phosphatidyl choline	24.5-30.0	21.7-34.1	15.2-22.0
Phosphatidyl ethanolamine	5.4-10.3	10.8-11.7	1.1-15.6
Phosphatidyl ethanolamine	5.0-16.3	4.1-4.9	1.6-4.3
Sphingomylin	11.6-16.3	13.0-13.8	10.6-19.8
Phosphatidyl serine	1.3	2.8	1.1-5.9
Phosphatidyl inositol	0.8	2.9	1.5-6.0
Lysophosphatidyl ethanolamine	1.2-2.2	5.6-6.6	4.3-14.2
Lysophosphatidyl choline	1.2-2.2	3.1-3.9	3.2-9.8
Diphosphatidly glycerol	5.0-8.8	3.5-7.4	0.3-0.5
Phosphatidic acid	0.4	0.5	0.2-1.4

**Source:** Juyena and Stelletta (2012)

### การเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง

การศึกษาวิธีการทำน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง มีรายงานตั้งแต่ปี 1950 โดยทำให้น้ำเชื้อเย็นจนแข็งตัว และนำไปเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (solid carbon dioxide) อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส นับเป็นวิวัฒนาการของเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์แพะ ทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะไว้ใช้งานได้ยาวนานนับสิบๆ ปี และสามารถนำวิธีการผสมเทียมมาช่วยเพิ่มจำนวนและกระจายพันธุ์กรรมแพะพันธุ์ดีได้ในเวลาอันรวดเร็ว ในปัจจุบัน วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่นิยมกัน มี 2 รูปแบบ คือ รูปแบบของน้ำเชื้อแช่เย็น (liquid semen) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่วิธีการนี้ สามารถเก็บน้ำเชื้อได้นานเพียง 48 ถึง 72 ชั่วโมง และอีกรูปแบบ คือ น้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้หลายสิบปี (Barker, 1957 อ้างโดย Leboeuf *et al.*, 2000)

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งมีหลายขั้นตอน สำคัญ ที่ส่งผลต่อความสำเร็จ ในผลิต การแช่แข็งน้ำเชื้อ เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ ความเร็วในการแช่แข็ง และขั้นตอนการลดอุณหภูมิ จาก 25 ถึง 5 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนสำคัญ เนื่องจากตัวอสุจิมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลง

อุณหภูมิ อาจจะทำให้เกิดการช็อกเนื่องจากความเย็นได้ และยังสามารถส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่างๆ ของอสุจิ เช่น เยื่อหุ้มอสุจิ (Rodriguez and Martin, 1994) ไมโทคอนเดรีย (Watson, 1995) และอะโครโซม (Jones and Martin, 1973) เมื่อตัวอสุจิสูญเสียความสมบูรณ์ทางกายภาพทำให้ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เนื่องจากอะโครโซมเสียหาย เอนไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในจะสูญเสียคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้ไม่สามารถเจาะผ่านเซลล์ไข่ได้ ดังนั้น ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเติมสารป้องกันการช็อก เนื่องจากความเย็น เพื่อลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับตัวอสุจิ จึงจะส่งผลให้มีอัตราการเคลื่อนที่และความสามารถในการมีชีวิตรอดสูงขึ้น สามารถเคลื่อนที่ปฏิสนธิกับไข่ได้ (Purdy, 2006)

### ขั้นตอนกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

**1. การรีดเก็บน้ำเชื้อ** วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแพะโดยการกระตุ้นให้พ่อแพะหลังน้ำเชื้อออกมา มีหลายวิธี เช่น การบีบนวดให้พ่อพันธุ์หลังน้ำเชื้อออกมา การเก็บจากอวัยวะเพศของสัตว์เพศเมีย การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า แต่วิธีที่นิยมมากที่สุด คือ ให้พ่อแพะขึ้นแม่ตัวล่อเพื่อเก็บน้ำเชื้อด้วยช่องคลอดเทียม (artificial vagina) จากการศึกษาของ Ramukhithi และคณะ (2011) พบว่า การรีดน้ำเชื้อจากพ่อแพะพันธุ์บอร์ (Boer) ด้วยช่องคลอดเทียม มีปริมาณน้ำเชื้อสดที่รีดได้เฉลี่ย  $0.6 \pm 0.1$  มิลลิลิตรต่อครั้ง มีความเข้มข้นของจำนวนอสุจิ  $723.7 \pm 27.9 \times 10^6$  ตัวต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่าง  $6.6 \pm 0.2$  มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิทั้งหมด  $76.9 \pm 4.7$  เปอร์เซ็นต์

**2. การเจือจางน้ำเชื้อ** ด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีความ จำเป็นอย่างยิ่งในการเก็บรักษา น้ำเชื้อด้วยวิธีแช่แข็ง ทั้งนี้ เพื่อ เพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อ รักษาความสมดุลทางชีวเคมี เป็นแหล่งพลังงาน และที่สำคัญเพื่อป้องกันตัวอสุจิจากการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง เพื่อให้รักษาจำนวนตัวอสุจิให้มีชีวิตรอดมากที่สุดหลังละลาย (Purdy, 2006) องค์ประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กันในปัจจุบันมี ดังนี้

2.1 สารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์หรือตัวปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับตัวอสุจิ เช่น ซัลเฟต ฟอสเฟต ซิเตรท ทริส เป็นต้น สารเหล่านี้ทำหน้าที่ปรับสมดุลความเป็นกรด-ด่าง และปรับสมดุลแรงดันออสโมติกในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ประมาณ 6.75 ถึง 7.2 (Fukuhara and Nishikawa, 1973; Wahjuningsih, 2012) และค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อเมื่อเติมสารป้องกันการช็อกจากความเย็นและ สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง แล้ว มีค่าประมาณ 1,300 ถึง 1,500 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม (Joshi *et al.*, 2006; Choe *et al.*, 2006)

2.2 สารให้พลังงาน เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ฟรุคโตส กลูโคส แลคโตส อาราบิโนส เป็นต้น (Mann, 1954) อย่างไรก็ตาม ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะนิยมใช้ฟรุคโตสเป็นสารให้พลังงาน เนื่องจากเป็นน้ำตาลชนิดเดียวกันกับที่พบในเซมินอลพลาสมาของแพะ (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997)

2.3 สารป้องกันการซีดเนื่องจากความเย็นของตัวอสุจิมียหลายชนิด ได้แก่ ไข่แดงนมในรูปแบบต่างๆ เช่น นมสด นมแยกไขมัน (homogenized milk) นมผง และน้ำกะทิ โดยมีโมเลกุลของฟอสโฟไลปิดและไลเคนซิทีไลโปโปรตีน (low density lipoprotein) ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์เพื่อลดผลกระทบของความเย็น (Purdy, 2006)

2.4 ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เดิมเพื่อระงับหรือทำลายการเจริญเติบโตของจุลชีพ เช่น การใช้เพนิซิลลินร่วมกับสเตรปโตมัยซิน (Evans and Maxwell, 1987)

2.5 น้ำ เพื่อเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อ เป็นตัวทำลาย และปรับสมดุลของแรงดันออสโมติกและต้องเป็นน้ำกลั่นที่สะอาด บริสุทธิ์ ปราศจากแร่ธาตุและไอออนต่างๆ

2.6 สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) เช่น เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ที่นิยมใช้มาก คือ กลีเซอรอล (glycerol) เพื่อทำให้โมเลกุลของน้ำในและนอกเซลล์รวมตัวเป็น โมเลกุลใหญ่ขึ้น ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งเล็กๆ และทำหน้าที่ร่วมกับฟอสโฟไลปิดช่วยป้องกันการฉีกขาดเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและลดการไหลเข้า-ออกของสารต่างๆ (Tuli and Holtz, 1994; Kundu *et al.*, 2000)

**3. การแช่แข็งน้ำเชื้อ** เป็นขั้นตอนสำคัญในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (deep freezing of semen) วิธีลดอุณหภูมิที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ วิธีแช่แข็งแบบรวดเร็ว (Simple rapid freezing) โดยลดอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปลงในไนโตรเจนเหลว ประมาณ 4 ถึง 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส ถึง -120 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส การแช่แข็งน้ำเชื้อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพและทางเคมีภายในเซลล์อสุจิ มีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดผลเสียหายต่อองค์ประกอบต่างๆ ของตัวอสุจิ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ (Rodriguez and Martin, 1994) ไมโทคอนเดรีย (Watson, 1995) และอะโครโซม (Jones and Martin, 1973) เมื่อเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมเสียหาย เอนไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในจะสูญเสียคุณสมบัติทางชีวเคมี ส่งผลให้ไม่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ได้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเติมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง เพื่อลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับตัวอสุจิ ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายดีขึ้น (Purdy, 2006)

## ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

คุณภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็งเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยจากตัวพ่อแพะแต่ละตัว ฤดูกาล ความเร็วในการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง เทคนิคการปั่นล้างเซมินอลพลาสมา และชนิดของสารที่เติมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ มีรายละเอียดดังนี้

### 1. อิทธิพลของพ่อพันธุ์

Zamfirescu และ Nadolu (2009) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิระหว่างน้ำเชื้อสดกับน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อแพะพันธุ์ซาเนน ( Saanen) และอัลไพน์ (Alpine) จำนวน 38 ตัว ที่ทำการรีดเก็บในแต่ละครั้ง พบว่า มีอัตราการสูญเสียจากการแช่แข็ง ตั้งแต่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากอสุจิจากพ่อแพะแต่ละตัวทนต่อการแช่แข็งได้แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องทั้งภายในตัวสัตว์ เช่น พันธุกรรม สายพันธุ์ อายุและฮอร์โมน รวมทั้งปัจจัยภายนอก เช่น โภชนาการ อุณหภูมิและความชื้น การเลี้ยงการจัดการและสุขภาพ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายแตกต่างกัน จึงควรทำการคัดเลือกพ่อแพะสำหรับนำมารีดน้ำเชื้อเพื่อผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง

### 2. อิทธิพลของฤดูกาล

วนิดา (2552) ทำการศึกษอิทธิพลของฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์ลูกผสมแองโกลนูเบียนพื้นเมืองและพันธุ์พื้นเมือง พบว่า ปัจจัยของฤดูกาลมีผล ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์มีชีวิตของตัวอสุจิ และความเร็วในการเคลื่อนที่ลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิ ในน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บจากพ่อแพะ ในฤดูฝนดีกว่าฤดูหนาว และฤดูร้อน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายมีค่าแตกต่างกันด้วยสอดคล้องกับการศึกษาของ Tuli และ Holtz (1995) รายงานว่า ฤดูกาลมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะพันธุ์ลูกผสมบอร์ ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความสามารถในการมีชีวิตรอดของอสุจิหลังละลาย ในฤดูใบไม้ร่วง ( $45 \pm 3$  และ  $49 \pm 3$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) มีค่ามากที่สุดสูงกว่าในฤดูใบไม้ผลิ ( $29 \pm 2$  และ  $32 \pm 3$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับ ช่วงแสง อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

### 3. ผลของวิธีการลดอุณหภูมิแช่แข็ง

รพีพรรณ (2551) กล่าวว่า การลดอุณหภูมิเป็นขั้นตอนสำคัญในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (deep freezing of semen) ที่ทำให้โครงสร้างทางชีวโมเลกุลและชีวเคมีของสภาวะแวดล้อมโดยรอบและในตัวอสุจิเปลี่ยนแปลง สามารถทำให้เกิดความเสียหาย ต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้มาก ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และความสามารถในการ มีชีวิตรอดของอสุจิ จากการศึกษาของ

Mohammed และคณะ (2012) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะพันธุ์ซาอุดี อาราดี ( Saudi Aradi) และ ดามัสกัส (Damascus) เพื่อเปรียบเทียบ วิธีการลดอุณหภูมิ 2 แบบ คือ แบบ Simple rapid freezing และ Slow freezing พบว่า การลดอุณหภูมิแบบ Simple rapid freezing ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลาย ( $47.74 \pm 0.66$  เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการลดอุณหภูมิแบบ Slow freezing ( $34.15 \pm 1.04$  เปอร์เซ็นต์)

#### 4. ผลจากการปั่นล้างเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

จากหลายการศึกษา พบว่า องค์ประกอบทางชีวเคมีของเซมินอลพลาสมาแพะเป็นอุปสรรคต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อ แพะด้วยวิธีการแช่แข็ง ทั้งนี้ เนื่องจากพบเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกว่า egg yolk coagulating enzyme หรือ EYCE (Roy, 1957; Leboeuf *et al.*, 2000; Sias *et al.*, 2005) ต่อมาทราบว่าเอนไซม์ phospholipase A2 (Iritani *et al.*, 1961; Iritani and Nishikawa, 1963) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 ถึง 60 กิโลดาลตัน หลังมาจากต่อมบัลโบยูเรทรอลปนออกมา รวมอยู่ในเซมินอลพลาสมาของแพะ เอนไซม์นี้เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เปลี่ยนเลซิธินจากไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อให้กลายเป็นกรดไลโซเลซิธิน (lysolecithin) ระหว่างการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็ง กรดนี้เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม รีเอกชัน (acrosome reaction) เหนียวน้ำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเสียหาย ไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้และทำให้เกิดการตกตะกอนในน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย จากการศึกษาของ Iritani และ Nishikawa (1963) แสดงให้เห็นว่า ระดับไข่แดงที่เพิ่มในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะส่งผลให้ความหนืด (viscosity) เพิ่มขึ้น และมีความสัมพันธ์เชิงลบต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

Ritar และ Salamon (1982) ทำการศึกษาเพื่อลดผลกระทบดังกล่าว โดยนำน้ำเชื้อ สดที่รีดเก็บได้จากพ่อแพะ มาเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส -เบส (Tris-base) ที่ไม่มีไข่แดงแล้วทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ระดับความเร็ว  $900 \times g$  นาน 10 นาที เพื่อแยกเซมินอลพลาสมาออก ก่อนเติมสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส -เบส ที่เติมไข่แดง 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กลุ่มที่ทำการ ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา จำนวน 1 ครั้ง มีอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิแพะในชั่วโมงที่ 6 หลังละลาย มีค่าสูงสุด และสูงกว่ากลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา 2 ครั้ง และกลุ่มที่ไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (37.3, 36.4 และ 26.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

อนันท์ และคณะ (255 1) ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส -เบส ที่เติมไข่แดงที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง พบว่า กลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมามีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ( $62 .0$  เปอร์เซ็นต์) และจำนวนตัวอสุจิมิชีวิต ( $72.4$  เปอร์เซ็นต์) หลังละลาย

สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (36.0 และ 51.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาของ จตุพร และคณะ (2 557) ผลของการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแพะ จำนวน 3 ตัว นำน้ำเชื้อมาเทรวมกัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา กลุ่มที่ 2 และ 3 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาที่ความเร็ว 1,500 รอบเป็นเวลา 5 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ ก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ที่เติมไข่แดงที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กลุ่มที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิ จำนวนอสุจิมีชีวิตและเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิสมบูรณ์ ในน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

#### 5. ผลของสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็นต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

สารป้องกันการช็อก เนื่องจากความเย็นเป็นส่วนประกอบสำคัญในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ได้แก่ สารในกลุ่มฟอสโฟไลปิด หรือ เลซิติน และ โลเคนซิติลโกลิโพรตีน ทำหน้าที่เป็นเหมือนฟิล์มเคลือบผิวตัวอสุจิ หรือเข้าแทนที่ฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิตามธรรมชาติในระหว่างการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง แหล่งของเลซิตินที่นิยมเติมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมากที่สุด คือ ไข่แดง (egg yolk) เนื่องจากในองค์ประกอบของไข่แดง มีเลซิตินอยู่ในปริมาณมากและยังมีองค์ประกอบอื่นที่สนับสนุนการมีชีวิตรอดของอสุจิ รองลงมาคือ เลซิตินจากถั่วเหลือง (soybean lecithin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการช็อก เนื่องจากความเย็นใกล้เคียงกับไข่แดง มีการนำไปเติมในสารละลายเจือจางใน การแช่แข็ง น้ำเชื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น มนุษย์ (Reed *et al.*, 2009) โค (Crespilho *et al.*, 2012) แกะ (Salmin *et al.*, 2012) และแพะ (Phutikanit *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตาม แหล่งของเลซิตินและระดับที่ต่างกัน ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกันด้วย ดังผลการศึกษาต่อไปนี้

##### 5.1 ผลของไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

Manjunath (2012) กล่าวว่า ไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อนอกจากเป็นสารป้องกันการช็อกจากความเย็นแล้ว ยังช่วยจับยึดกับ โปรตีนในเซมินอลพลาสมาของโค ซึ่งเป็น โปรตีนที่ทำให้ห่อหุ้มโครโมโซมหลุดออกเพื่อปฏิสนธิกับไข่ เรียกว่า ไบเคอร์ สเปิร์ม (binder of sperm, BSP) ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในรูปแบบของ ของเหลวได้นานขึ้น จากการศึกษาของ Situmorang (2002) พบว่า การเติมไข่แดงระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ โค ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายดีที่สุด โดยมีจำนวนอสุจิมีชีวิตและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังละลายสูงสุด และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในรูปของของเหลวได้นานกว่า 7 วัน อย่างไรก็ตาม ระดับการเติมไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะแตกต่างจากในน้ำเชื้อโค เนื่องมาจากผลของ EYCE ตามรายงานดังต่อไปนี้

Eiman และ Terada (2004) ได้ทำการศึกษาผลการเติมไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่เติมไข่แดง (NY) กับกลุ่มที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ (Y) ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส -กูโคส (TCG) และ ทริส-เบส-ทริฮาโลส (TH) พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิหลังละลายกลุ่มที่เติมไข่แดง ( TCG-Y เท่ากับ 46.0 เปอร์เซ็นต์ และ TH-Y เท่ากับ 57.0 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมไข่แดง ( TCG-NY เท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ TH-NY เท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) จึงสรุปได้ว่าการเติมไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ สามารถป้องกันความเสียหายของเยื่อหุ้มตัวอสุจิจากการแช่แข็งได้ดี ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายสูงกว่าการไม่เติมไข่แดงอย่างชัดเจน

Ajadi และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดจากพ่อแพะพันธุ์พื้นเมืองแอฟริกา โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ที่เติมไข่แดง ที่ระดับ 5.0 , 10.0 , 15.0 และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในชั่วโมงที่ 0 , 1, 3 และ 5 หลังจากเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ และเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังละลาย ในกลุ่มที่เติมไข่แดง 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายของอสุจิต่ำที่สุด โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิในชั่วโมงที่ 5 เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายของอสุจิสูงสุด โดยอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิในชั่วโมงที่ 5 เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์

ในการทำงานเดียวกัน Priyadharsini และคณะ (2011) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการเติมไข่แดงที่ระดับ 10 กับ 20 เปอร์เซ็นต์ในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะพันธุ์จากหิราน่า พบว่า มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายไม่แตกต่างกัน ( $35.2 \pm 2.40$  และ  $30.1 \pm 3.18$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่มีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ ( $60.56 \pm 1.31$  และ  $52.7 \pm 1.87$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ( $48.0 \pm 1.06$  และ  $32.5 \pm 2.59$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในกลุ่มที่เติมไข่แดงที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องการศึกษาของ Bispo และคณะ (2011) ผลการเปรียบเทียบการเติมไข่แดง ที่ระดับสูงสุด (T1 เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์) กับที่ระดับต่ำสุด (T2 เท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะพันธุ์อัลไพน์ ( Alpine) และซานเนน (Saanen) พบว่า ความแข็งแรงของตัวอสุจิ และจำนวนตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติ ในกลุ่ม เติม ที่ไข่แดงที่ระดับสูงสุดมีค่าสูงกว่ากลุ่มเติมไข่แดงที่ระดับต่ำสุด จึงเห็นได้ว่า การใช้ไข่แดง ที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ โดยการไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมา ออกก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ อาจจะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งลดลง



## 5.2 ผลของเลซิดินจากพืชต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

เลซิดินจากพืชเป็นสารป้องกันอันตรายจากการช็อกเนื่องจากความเย็นอีกตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ทดแทนเลซิดินจากไข่แดง โดยเฉพาะเลซิดินจากถั่วเหลือง (soybean lecithin) ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาเพื่อหาระดับที่เหมาะสมในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ทั้งในการแช่แข็งน้ำเชื้อแกะและแพะ เนื่องจากการเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ต่างระดับกันมีผลต่อคุณภาพของอสุจิหลังละลาย จากการศึกษากายของ Salmin และคณะ (2012) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแกะ เปรียบเทียบผลการเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟาติลโคลีน สูงกว่าหรือเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส -บส พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลือง ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมียุคสูงสุด ( $63.18 \pm 3.61$  เปอร์เซ็นต์) ส่วนในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ Chelucci และคณะ (2015) จากศึกษาผลของเลซิดินจากถั่วเหลือง ชนิดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟาติลโคลีน สูงกว่าหรือเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับต่างๆ (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์) ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิและจำนวนอสุจิมียุคที่รอดในน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายมีค่าสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

Phutikanit และคณะ (2011) รายงานว่า ความเข้มข้นของฟอสฟาติลโคลีนใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแตกต่างกันด้วย โดยทำการศึกษเปรียบเทียบการเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟาติลโคลีน 20 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เติมที่ระดับ 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส -บส ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีฟอสฟาติลโคลีน 20 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ สูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีฟอสฟาติลโคลีน 95 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เลซิดินจากพืชนอกจากจะพบในถั่วเหลืองแล้ว ยังสามารถพบได้ในเมล็ดทานตะวัน ซึ่งมีปริมาณฟอสฟาติลโคลีนใกล้เคียง กัน แต่ในเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน มีกรดไขมันซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โอเมกา 6 และ โอเมกา 9 อยู่ในปริมาณสูง (Table 2) จากรายงานของ Yimer และคณะ (2016) พบว่า การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในกลุ่มกรดไขมัน โอเมกา 3, 6 และ 9 ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิ จำนวนอสุจิมียุค และจำนวนตัวอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**Table 2** Comparison of the main phospholipids isomers of lecithin from different sources

Components	Typical value (%)	
	Soybean	Sunflower
Phosphatidyl choline; PC	20	15
Phosphatidyl ethanolamine; PE	18	16
Phosphatidyl inositol; PI	11.5	7.2
Phosphatidic acid ; PA	4.3	5.2
Lyso PC	4.6	0
Linoleic Acid	0	44.3
Oleic Acid	0	11.6
<b>Sources</b>	Avanti Polar lipids, Inc., AL, USA	Lekithos, Inc., FL, USA

### บทที่ 3

#### การทดลองที่ 1

## การศึกษาผลของเลซิทินจากถั่วเหลืองและเลซิทินจากเมล็ดทานตะวันระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อมต่อคุณภาพน้ำเชื่อมพะแซ่แข็ง

### บทนำ

เลซิทิน (lecithin) เป็นไขมันชนิด ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ประกอบด้วยกรดไขมัน และฟอสฟอรัส มักพบโมเลกุลวิตามินบีรวมอยู่ด้วย เช่น โคลีน ( choline) เลซิทินเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์สิ่งมีชีวิต (Cooper and Hausman, 2004) จึงถูกนำมาเติมเป็นสารป้องกันการซ็อก เนื่องจากความเย็น ในการ เก็บรักษาน้ำเชื่อมด้วยวิธีแช่เย็นและแช่แข็ง เพื่อทดแทนฟอสโฟลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเสียหายจากการลดอุณหภูมิลงต่ำมาก (Watson, 1981) แหล่งเลซิทินที่นิยมนำมาเติมในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อมคือ ไข่แดง (egg yolk lecithin) อย่างไรก็ตาม การเติมไข่แดงในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื่อม นั้นก็มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อโรค นอกจากนี้ การเติมไข่แดงในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อมสำหรับแช่แข็งน้ำเชื่อมสัตว์หลายชนิด ส่งผลให้คุณภาพของตัวอสุจิหลังละลายลดลง (Upreti *et al.*, 1999) การเติมเลซิทินจากพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยเฉพาะเลซิทินจากถั่วเหลือง ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นสารป้องกันการซ็อก เนื่องจากความเย็นในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อม สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื่อมโคและ แกะ (กอบแก้ว และคณะ 2555; Salmin *et al.*, 2012) เลซิทินจากพืชนอกจาก พบในถั่วเหลือง ยังพบได้ในพืชหลายชนิด ที่น่าสนใจ คือ เลซิทินจากเมล็ดทานตะวัน เนื่องจากมีปริมาณฟอสฟาติดีลโคลีนใกล้เคียงกับเลซิทินจากถั่วเหลือง แต่มีส่วนประกอบฟอสโฟลิพิดแตกต่างกัน (The Solae Company, 2014) และยังไม่มียางานการใช้เป็น สารป้องกันการซ็อกเนื่องจากความเย็น ในการทำ น้ำเชื่อมพะแซ่แข็ง มาก่อน ดังนั้น จึงทำการศึกษาระดับเลซิทินจากถั่วเหลืองและเลซิทินจากเมล็ดทานตะวันที่เหมาะสมในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อมต่อคุณภาพน้ำเชื่อมพะแซ่แข็ง

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระดับของเลซิทินจากถั่วเหลืองและเลซิทินจากเมล็ดทานตะวันที่เหมาะสมในสารละลายเจือจางน้ำเชื่อมต่อคุณภาพน้ำเชื่อมพะแซ่แข็ง

## สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์บอร์ (Boer) ที่เลี้ยงภายในศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สุราษฎร์ธานี มีอายุระหว่าง 24 ถึง 36 เดือน น้ำหนัก 60 ถึง 90 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว มีประวัติการใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้คุณภาพดีในช่วงก่อนทำการทดลอง

การจัดการเลี้ยงดูพ่อพันธุ์ทั้ง 3 ตัว เลี้ยงอยู่ภายในโรงเรือนเลี้ยงแพะพ่อพันธุ์แบบยกสูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร ปูพื้นด้วยไม้ระแนงแบบเว้นช่อง 1 นิ้ว หลังคาจั่วสูงติดตั้งพัดลมดูดอากาศ พ่อพันธุ์แต่ละตัวถูกแยกขังเดี่ยว ในคอกขนาด 2x4 ตารางเมตร

การจัดการด้านอาหาร พ่อพันธุ์ได้รับหญ้าแพงโกล่าแห้งโดยให้กินเต็มที่ มีถังใส่น้ำสะอาด และก้อนเกลือแร่แขวนไว้ให้สามารถกินได้ตลอด เสริมด้วยอาหารชั้นชนิดเม็ดที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ วันละ 1 กิโลกรัมต่อตัว ในเวลา 09.00 นาฬิกา มีโปรแกรมตรวจสอบสุขภาพและทำวัคซีนตามข้อกำหนดมาตรฐานฟาร์มแพะของกรมปศุสัตว์

## วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

### 1. วัสดุ ประกอบด้วย

1.1 สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ชนิดทริส-เบส (Tris-base) ประกอบด้วย Tris (hydroxymethyl animomethane) (250 mM), citric acid (90 mM), fructose (70 mM), penicillin G (100 IU/ml) และ streptomycin (100 µg/ml) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 มีค่าแรงดันออสโมติกประมาณ 265 ถึง 320 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม

1.2 เลซิดินจากถั่วเหลือง (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine 20%) ชนิดเกล็ด (granules) (Avanti Polar lipids, Inc., AL, USA)

1.3 เลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน (phosphatidylcholine 15%) ชนิดผง (powder) (Lekithos, Inc., FL, USA)

1.4 สารละลาย eosin-nigrosin สำหรับใช้ย้อมตัวอสุจิ เพื่อตรวจจำนวนอสุจิมียังมีชีวิตและไม่มีชีวิต

### 2. อุปกรณ์ประกอบด้วย

2.1 อุปกรณ์ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ

2.1.1 ช่องคลอดเทียม (artificial vagina)

2.1.2 กระจกน้ำอุ่น

2.1.3 เทอร์โมมิเตอร์ ขนาด 0 ถึง 100 องศาเซลเซียส

2.2 อุปกรณ์สำหรับตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

- 2.2.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง( phase contrast microscope)  
 2.2.2 สไลด์ ( slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glasses)  
 2.2.3 เครื่องอุ่นสไลด์ ( slide warmer)  
 2.2.4 อ่างน้ำร้อน ( water bath)  
 2.2.5 ไปเปิดสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ ( diluting pipette)  
 2.2.6 สไลด์นับเม็ดเลือดแดง (hemocytometer)

### 2.3 อุปกรณ์เตรียมสารละลายเจือจางและแช่แข็งน้ำเชื้อ

- 2.3.1 เครื่องซังสารเคมี  
 2.3.2 เครื่องกวนสารเคมีชนิดควบคุมอุณหภูมิ  
 2.3.3 เครื่องวัดกรดด่าง (pH meter)  
 2.3.4 เครื่องวัดออสโมลาริตี (osmometer)  
 2.3.5 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ  
 2.3.6 กล้องโพรบสำหรับใส่ในโตรเจนเหลว  
 2.3. 7 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

### 2.4 อุปกรณ์ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

- 2.4.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อด้วยคอมพิวเตอร์ (Computer

Assisted Sperm Analyzer, CASA) โปรแกรม IVOS Motility Analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA)

## 3. วิธีการทดลอง

### 3.1 แผนการทดลอง

**การทดลองย่อยที่ 1** ศึกษาผลของเลซีตินจากถั่วเหลืองระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements in Randomized Completely Block Design) โดยกำหนดระดับต่างๆ ของเลซีตินจากถั่วเหลือง 4 ระดับ ได้แก่ 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นทริตเมนต์ น้ำเชื้อที่รีดเก็บจากพ่อแพะทุกตัวในแต่ละสัปดาห์ถูกนำมาเทรวมกัน เป็นหนึ่งชุดน้ำเชื้อ แต่ละชุดน้ำเชื้อคือ 1 บล็อก ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ แบ่งน้ำเชื้อแต่ละชุดออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ทำการเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อตามทริตเมนต์ที่กำหนด

**การทดลองย่อยที่ 2** ศึกษาผลของเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements in Randomized Completely Block Design) โดยกำหนด

ระดับต่างๆ ของเลซีตินจากเมล็ดทานตะวัน 4 ระดับ ได้แก่ 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นทรีตเมนต์ น้ำเชื้อ ที่รีดเก็บ จากพ่อแม่ ทุกตัว ในแต่ละสัปดาห์ถูก นำมาเทรวมกัน เป็นหนึ่งชุด น้ำเชื้อแต่ละชุดน้ำเชื้อ คือ 1 บล็อก ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ แบ่งน้ำเชื้อแต่ละชุดออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ทำการเจือจางด้วย สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ตามทรีตเมนต์ที่กำหนด

### 3.2 การทำน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง ตามวิธีการที่แนะนำโดย รพีพรรณ (2551) ดังนี้

**3.2.1 การรีดเก็บน้ำเชื้อ** เตรียมอุปกรณ์ในการรีดเก็บน้ำเชื้อและเตรียมความพร้อมของแพะพ่อพันธุ์ เริ่มทำการรีดเก็บน้ำเชื้อเวลาประมาณ 08.00 น. นำช่องคลอดเทียมมาเติมน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส นำแพะตัวเมียที่เป็นสัตว์เป็นสัตว์ล่อเข้าของบังกับ จากนั้นจึงพ่อแม่เข้ามาเพื่อป้อนทับตัวล่อ ใช้ช่องคลอดเทียมสวมถึงคัมชะพ่อแม่ป้อนทับตัวล่อ เพื่อกระตุ้นให้พ่อแม่หลั่งน้ำเชื้อลงในหลอดเก็บน้ำเชื้อ

**3.2.2 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น** น้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลอง ต้องมีปริมาณน้ำเชื้อสดที่เก็บได้ต่อครั้งไม่น้อยกว่า 0.7 มิลลิลิตร ตรวจคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิไม่น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้ hemocytometer มีจำนวนอสุจิมากกว่า  $2.5 \times 10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร

**3.2.3 การเจือจางและแช่แข็งน้ำเชื้อ** นำน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพของพ่อแม่แต่ละตัวมาเทรวมกัน แบ่งเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน สุ่มให้ได้รับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เติมเลซีตินจากถั่วเหลืองและเลซีตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับต่างๆ ตามทรีตเมนต์ เพื่อทำการเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 150 ล้านตัวต่อโด๊ส โดยใช้ปริมาตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ตามสูตรจากการคำนวณดังนี้

$$\text{จำนวนโด๊ส} = \frac{\text{การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (เปอร์เซ็นต์)} \times \text{ปริมาตร (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของอสุจิ (ตัวต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของอสุจิที่ต้องการ (150 x 10^6 ตัวต่อโด๊ส)}}$$

$$\text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังการเจือจาง (มิลลิลิตร)} = \text{จำนวนโด๊ส} \times \text{ปริมาตรน้ำเชื้อต่อโด๊ส (0.25 มิลลิลิตร)}$$

$$\text{ปริมาตรสารเจือจางที่ใช้ (มิลลิลิตร)} = \text{ปริมาตรน้ำเชื้อหลังเจือจาง} - \text{ปริมาตรน้ำเชื้อก่อนเจือจาง}$$

นำน้ำเชื้อที่เจือจาง เรียบร้อย แล้วบรรจุในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร

นำเข้าสู่ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อลดอุณหภูมิลงให้คงที่ที่ระดับ 4 ถึง 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมงก่อนนำไปอ้างในไอนิ่งเหนือระดับในโตรเจนเหลว ประมาณ 4 ถึง 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ -100 ถึง -120 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแช่แข็ง

### 3.3 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย

ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยทำการสุ่มหยิบน้ำเชื้อแช่แข็ง จำนวน 3 หลอดต่อชุดน้ำเชื้อในแต่ละทริตเมนต์ ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทันทีหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) ส่วนที่เหลือ บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุม (incubation) อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ซ้ำอีกครั้งในชั่วโมงที่ 2 และ 4 หลังละลาย (Deka and Rao, 1987) ตามตัวชี้วัด ดังนี้

**3.3.1 การเคลื่อนที่ ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ** ตรวจสอบด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (CASA) โดยการหยดน้ำเชื้อ ขนาด 5 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ กำหนดให้เครื่องตรวจนับและวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิ อย่างน้อย 800 ตัว ตามตัวชี้วัดดังนี้

- (1) การเคลื่อนที่ของอสุจิ
  - (1.1) การเคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility, MOT)
  - (1.2) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility, PMT)
- (2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ วัดค่าดังนี้
  - (2.1) ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (average path velocity, VAP)
  - (2.2) ความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (straight-line velocity, VSL)
  - (2.3) ความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีโค้ง (curve-line velocity, VCL)
- (3) ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ วัดค่าดังนี้
  - (3.1) ค่าความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัว (amplitude of lateral head displacement, ALH)
  - (3.2) ความถี่ในการส่ายส่วนหัว (beat cross frequency, BCF)
  - (3.3) อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (straightness, STR)
  - (3.4) อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีโค้ง (linearity, LIN)

**3.3.2 ตรวจสอบประเมินตัวอสุจิมิชีวิตทั้งหมด ( total viability) ด้วยวิธีการย้อมสี eosin-nigrosin** โดยนับจำนวนอสุจิมิชีวิตและคำนวณเป็นร้อยละของอสุจิมิชีวิตต่อจำนวนอสุจิทั้งหมด โดยอุ่นสไลด์และสีกี่จะใช้ย้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หยดน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร ผสมกับสี eosin-nigrosin ในปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนสไลด์ทำการสเมียร์ (smear) ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนแผ่นสไลด์ปล่อยให้แห้ง นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า อสุจิที่ใสไม่ติดสีแสดงว่า เป็นอสุจิที่มีชีวิต ส่วนอสุจิที่ติดสีแดงหรือส้มแดงแสดงว่า เป็นอสุจิที่ตาย นับจำนวนอสุจิทั้งหมด 300 ตัว และนำมาคำนวณเป็นร้อยละของอสุจิมิชีวิตต่ออสุจิทั้งหมด

#### 4. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังการทำละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ได้แก่ การเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ลักษณะการเคลื่อนที่ ของอสุจิ และจำนวนตัวอสุจิมิชีวิตมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ตามแผนการทดลอง แบบกลุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements in Randomized Completely Block Design) โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ (statistical model) คือ

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_k + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \varphi_{ijk}$$

เมื่อ

$Y_{ijk}$  คือ ค่าสังเกตจากปัจจัยของระดับของเลขชิติน ที่ ระดับ  $i$

และเวลาหลังละลาย ที่  $j$  ที่ชุดน้ำเชื้อ  $k$

$\mu$  คือ ค่าเฉลี่ย

$\alpha_i$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของระดับของเลขชิติน ที่  $i$  เมื่อ  $i = 1$  ถึง 4

$\delta_k$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของชุดน้ำเชื้อ ที่  $k$  เมื่อ  $k = 1$  ถึง 5

$\tau_j$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่  $j$  เมื่อ  $j = 1$  ถึง 3

$\alpha\tau_{ij}$  คือ อิทธิพลร่วมจากปัจจัยของระดับของเลขชิติน ที่  $i$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่  $j$

$\varphi_{ijk}$  คือ ค่าความคลาดเคลื่อน

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์รูปแบบ Linear, Quadratic และ Cubic ใช้วิธี Orthogonal polynomial (trend contrasts) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1999)



## ผลการทดลอง

**ผลการทดลองย่อยที่ 1** ผลของเลขชด้นจากถั่วเหลืองที่ระดับต่างๆในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำเข้าสู่การทดลองย่อยที่ 1 พบว่า ปริมาณน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้ต่อครั้งต่อตัวเฉลี่ย เท่ากับ  $1.3 \pm 0.4$  มิลลิลิตร เมื่อตรวจคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ย เท่ากับ  $77.7 \pm 1.8$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยใช้ hemocytometer พบว่า มีจำนวนตัวอสุจิเฉลี่ย เท่ากับ  $5.9 \pm 0.46 \times 10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร (Table 3)

**Table 3** Descriptive statistics of fresh semen quality of experimental buck used in Experiment 1.1 (mean  $\pm$  SD)

Lot no.	N	Semen volume (ml)	Progressive motility (%)	Sperm concentration ( $\times 10^9$ cells/ml)
1	3	$1.4 \pm 0.1$	$78.3 \pm 2.9$	$6.2 \pm 1.96$
2	3	$1.4 \pm 0.8$	$77.5 \pm 3.5$	$6.1 \pm 0.55$
3	3	$1.0 \pm 0.0$	$77.5 \pm 3.5$	$5.3 \pm 0.58$
4	3	$0.9 \pm 0.2$	$80.0 \pm 0.0$	$5.6 \pm 1.00$
5	3	$1.8 \pm 1.1$	$75.0 \pm 7.1$	$6.4 \pm 0.13$
Overall mean		$1.3 \pm 0.4$	$77.7 \pm 1.8$	$5.9 \pm 0.46$

ผลของเลขชด้นจากถั่วเหลืองระดับต่างๆในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

### 1. การเคลื่อนที่ของอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของ เลขชด้นจากถั่วเหลือง และชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลาย ส่งผลให้ การเคลื่อนที่ทั้งหมด (MOT) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (PMT) ของอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 4) โดยพบว่า ค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มน้ำเชื้อ ไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 ของกลุ่มที่เติมเลขชด้นจากถั่วเหลือง ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ (Table 5 และ 6 และ Figure 6

และ 7) จากการศึกษาพบว่า การเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้าง ของอสุจิหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic ต่อระดับเลขิตินจากถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น (Table 5 และ 6)

## 2. ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของ เลขิตินจากถั่วเหลือง ไม่มีผลต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) และความเร็วในการเคลื่อนที่ วิถีโค้งของอสุจิ (VCL) แต่ชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลาย ส่งผลต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรง และความเร็วในการเคลื่อนที่ วิถีโค้งของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 4)

## 3. ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของ เลขิตินจากถั่วเหลือง ไม่มีผลต่อ ความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัวของอสุจิ (ALH) อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (STR) และอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีโค้ง (LIN) แต่ส่งผลต่อความถี่ในการส่ายส่วนหัว (BCF) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 4) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลขิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความถี่ในการส่ายส่วนหัวของอสุจิ สูงกว่ากลุ่มที่เติมเลขิตินจากถั่วเหลืองระดับ 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาพบว่า ความถี่ในการส่ายส่วนหัวของอสุจิหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic และเมื่อบ่มน้ำเชื้อหลังละลายไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 4 มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นตรง Linear ต่อระดับของเลขิตินจากถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น (Table 11 และ Figure 12)

## 4. จำนวนตัวอสุจิมีชีวิต

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของ เลขิตินจากถั่วเหลือง ส่งผลให้จำนวนอสุจิมีชีวิตต่อจำนวนอสุจิทั้งหมด (viability) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 4) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลขิตินจากถั่วเหลืองระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ อสุจิมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic ต่อระดับของเลขิตินจากถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น (Table 14 และ Figure 15)



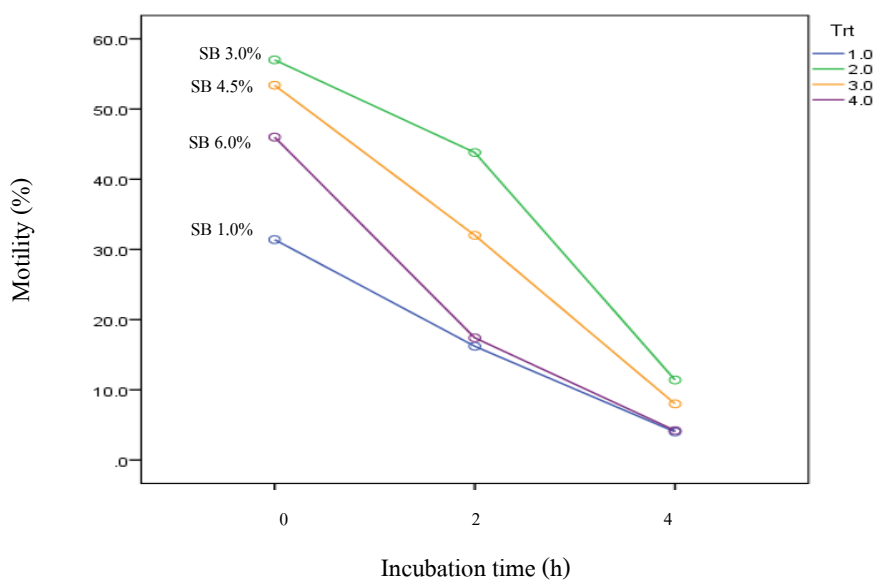
**Table 5** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) levels	Hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
1.5 %	31.4 <sup>b</sup>	16.2 <sup>c</sup>	4.0
3.0 %	57.0 <sup>a</sup>	43.8 <sup>a</sup>	11.4
4.5 %	53.4 <sup>a</sup>	32.0 <sup>b</sup>	8.0
6.0 %	46.0 <sup>a</sup>	17.1 <sup>c</sup>	4.2
<i>p</i> -value	<0.05	<0.05	>0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.94	3.11	1.17
Treatment contrast( <i>p</i> -value)			
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>Quadratic</i>	0.0028	0.0001	<i>ns</i>
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

<sup>a, b, c</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



**Figure 6** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender and incubation time on total motility percentage of frozen-thawed sperm

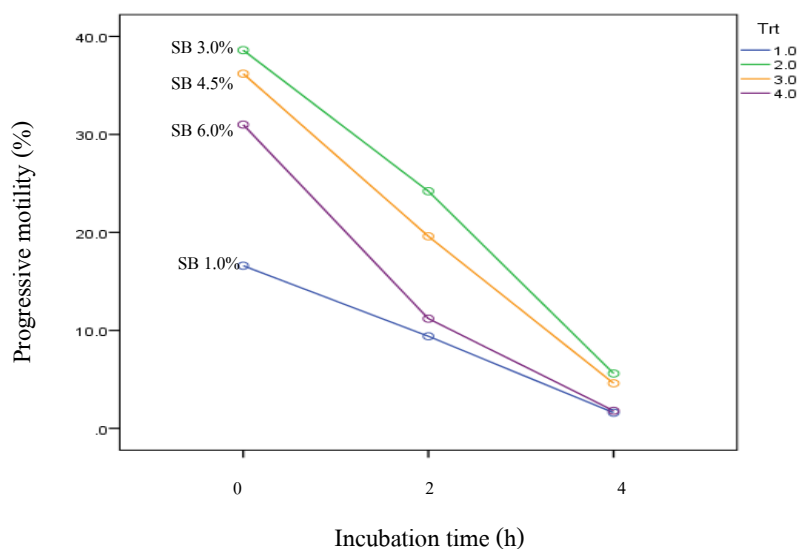
**Table 6** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) level	Hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
1.5 %	16.6 <sup>b</sup>	9.4 <sup>b</sup>	1.6
3.0 %	38.6 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>	5.6
4.5 %	36.2 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	4.6
6.0 %	31.0 <sup>a</sup>	11.8 <sup>b</sup>	1.8
<i>p</i> -value	<0.05	<0.05	>0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.49	1.79	0.64
Treatment contrast( <i>p</i> -value)			
<i>Linear</i>	0.0212	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>Quadratic</i>	0.0019	<0.0001	<i>ns</i>
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )

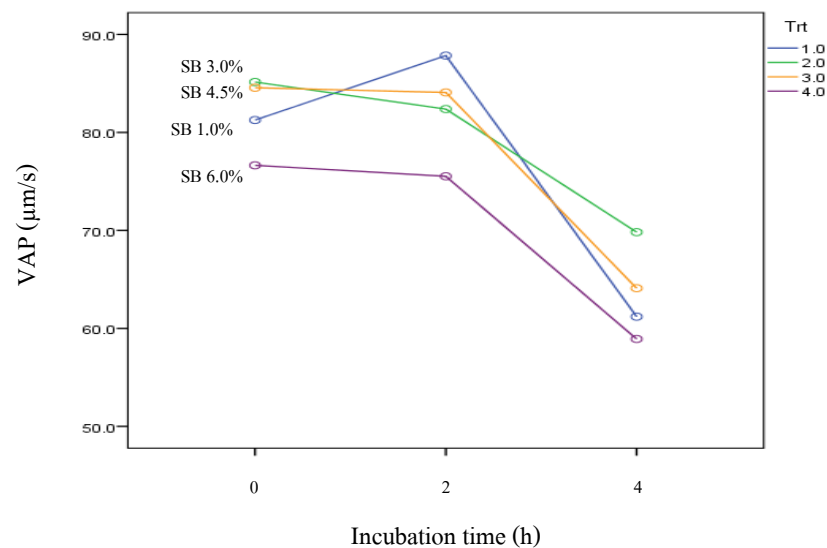


**Figure 7** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender and incubation time on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm

**Table 7** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

Soybean (SB) level	Hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)		
	0	2	4
1.5 %	81.26	87.84	61.20
3.0 %	85.14	82.30	69.82
4.5 %	84.56	84.08	64.10
6.0 %	76.64	75.26	58.92
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.14	2.02	2.80

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

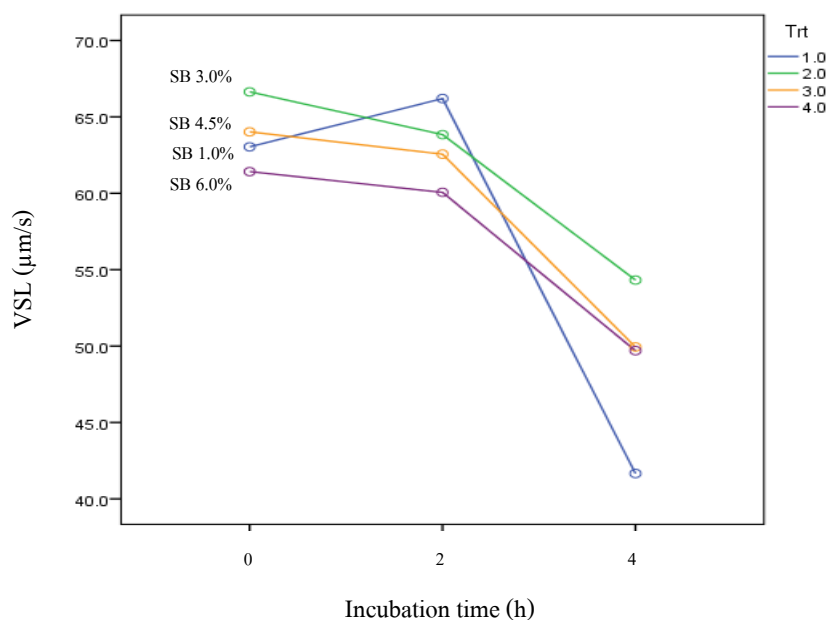


**Figure 8** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on average path velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 8** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straight-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

Soybean (SB) level	Hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)		
	0	2	4
1.5 %	63.04	66.20	41.66
3.0 %	66.64	63.84	54.32
4.5 %	64.02	62.56	49.94
6.0 %	61.42	60.06	49.70
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.38	1.72	2.32

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

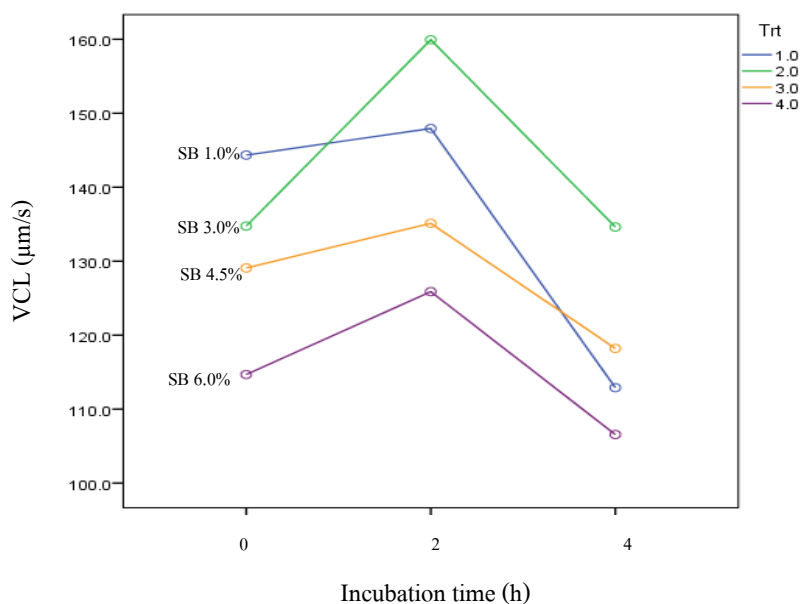


**Figure 9** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straight-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 9** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on curve-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

Soybean (SB) level	Hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)		
	0	2	4
1.5 %	144.34	147.94	112.90
3.0 %	134.74	159.94	134.62
4.5 %	129.08	135.12	118.20
6.0 %	114.68	125.88	106.56
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	4.50	5.19	5.86

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



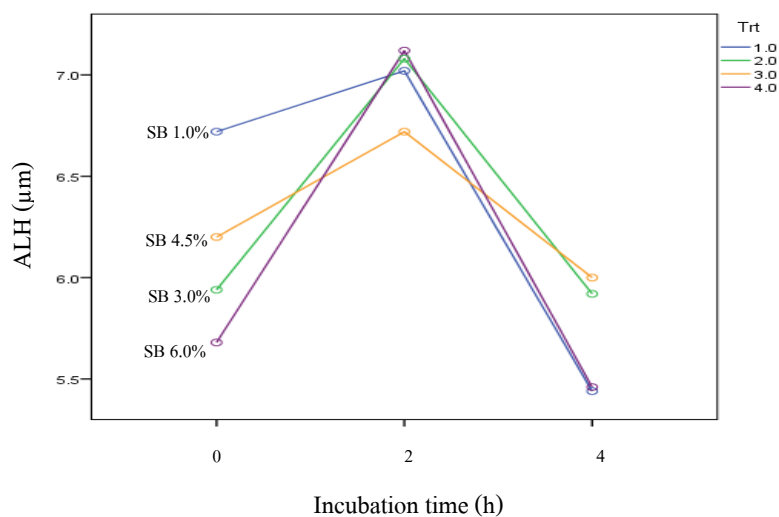
**Figure 10** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on curve-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$



**Table 10** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

Soybean (SB) level	Hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ (h)		
	0	2	4
1.5 %	6.72	7.02	5.44
3.0 %	5.94	7.08	5.92
4.5 %	6.20	6.72	6.00
6.0 %	5.68	7.12	5.46
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	0.18	0.20	0.29

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



**Figure 11** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

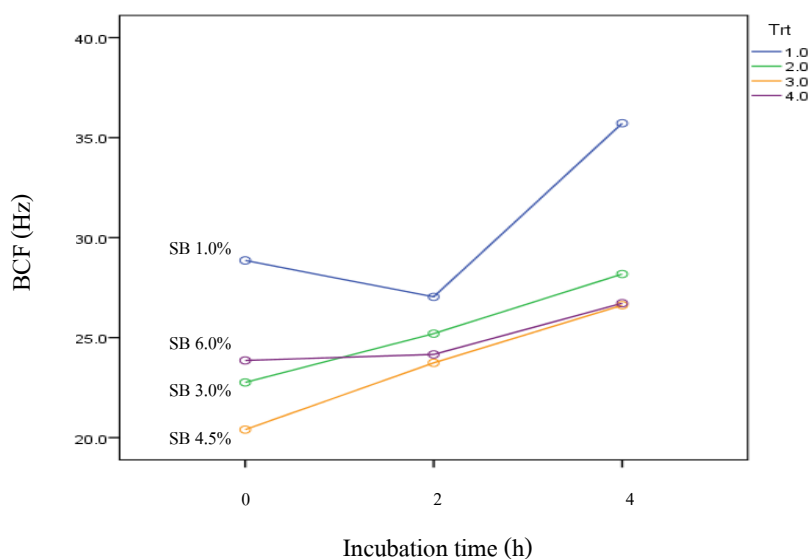
**Table 11** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	28.86	27.04	35.72	30.54 <sup>a</sup>
3.0 %	22.76	25.20	28.18	23.58 <sup>b</sup>
4.5 %	20.40	23.74	26.62	24.91 <sup>b</sup>
6.0 %	23.86	24.54	26.72	25.38 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----			<0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.10	1.01	1.44	
Treatment contrast ( <i>p</i> -value)				
<i>Linear</i>	0.0099	<i>ns</i>	0.0166	
<i>Quadratic</i>	0.0027	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )

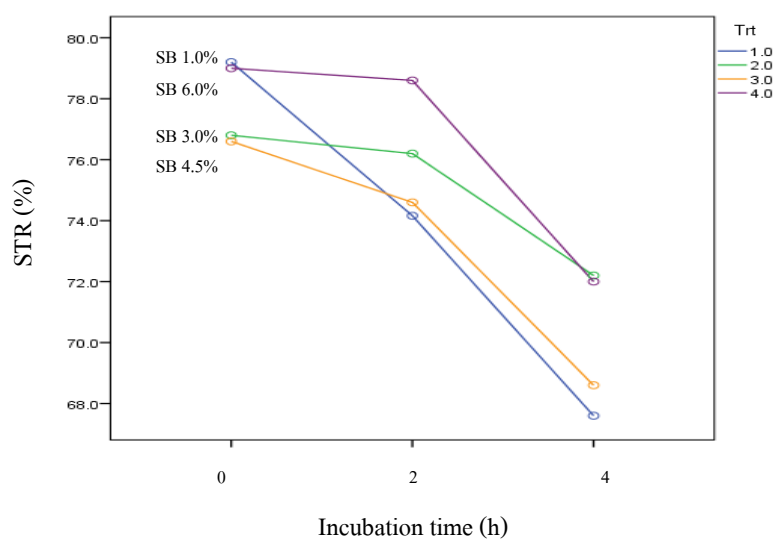


**Figure 12** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on beat cross frequency of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

**Table 12** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straightness percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) level	Hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
1.5 %	79.20	74.16	67.60
3.0 %	76.80	76.20	72.20
4.5 %	76.60	74.60	68.60
6.0 %	79.00	78.71	72.00
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.30	1.12	2.46

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

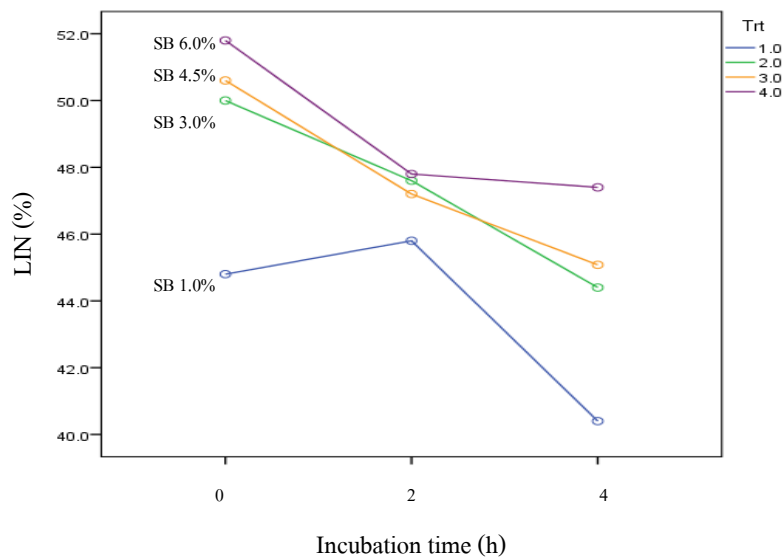


**Figure 13** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on straightness of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

**Table 13** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on linearity percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) level	Hour of incubation at 37°C(h)		
	0	2	4
1.5 %	44.80	45.80	40.40
3.0 %	50.00	47.60	44.40
4.5 %	50.60	47.20	45.08
6.0 %	51.80	46.62	47.40
<i>p</i> -value	----->0.05-----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.18	1.34	1.31

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



**Figure 14** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on linearity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

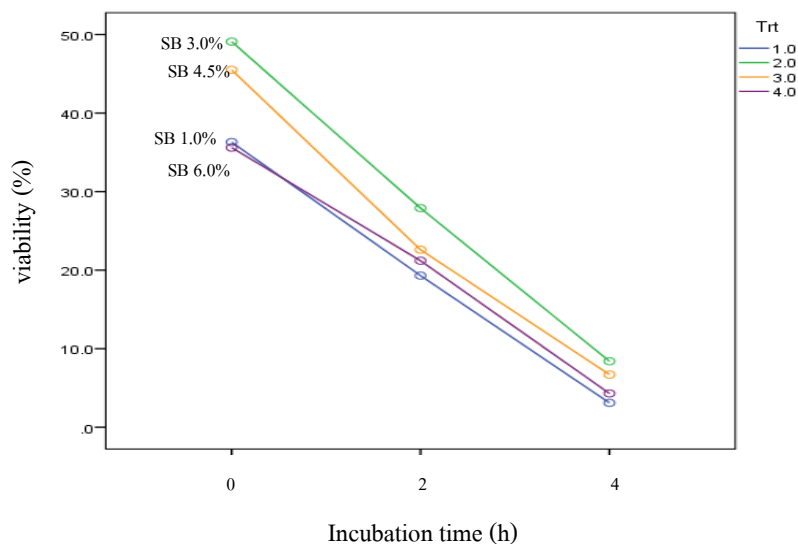
**Table 14** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on viability percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Soybean (SB) level	Hour of incubation at 37 °C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	36.3	19.3	3.1	19.5 <sup>b</sup>
3.0 %	49.1	27.9	8.4	28.46 <sup>a</sup>
4.5 %	45.5	22.6	6.7	24.93 <sup>a</sup>
6.0 %	35.6	21.2	4.3	20.36 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.75	1.49	0.78	
Treatment contrast ( <i>p</i> -value)				
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Quadratic</i>	0.0003	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



**Figure 15** Effect of different levels of soybean lecithin-based extender on viability of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

**ผลการทดลองย่อยที่ 2** ผลของเลขิตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับต่างๆ ในสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำเข้าสู่การทดลองย่อยที่ 2 พบว่า ปริมาณน้ำเชื้อสดที่เก็บได้ต่อครั้งต่อตัวเฉลี่ย เท่ากับ  $1.5 \pm 0.3$  มิลลิลิตร เมื่อนำไปตรวจคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ย เท่ากับ  $76.5 \pm 2.2$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยใช้ hemocytometer พบว่า จำนวนตัวอสุจิเฉลี่ย เท่ากับ  $6.5 \pm 0.87 \times 10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร (Table 15)

**Table 15** Descriptive statistics on semen quality of buck in fresh ejaculates used in Experiment 1.2 (mean  $\pm$  SD)

Lot no.	N	Semen volume (ml)	Progressive motility (%)	Sperm concentration ( $\times 10^9$ cells/ml)
1	3	$1.9 \pm 0.4$	$77.5 \pm 2.5$	$7.0 \pm 1.49$
2	3	$1.4 \pm 0.6$	$75.0 \pm 5.0$	$6.9 \pm 0.43$
3	3	$1.2 \pm 0.2$	$80.0 \pm 0.0$	$5.3 \pm 0.43$
4	3	$1.6 \pm 0.4$	$75.0 \pm 0.0$	$7.5 \pm 1.06$
5	3	$1.4 \pm 0.1$	$75.0 \pm 5.0$	$6.0 \pm 2.57$
Overall mean		$1.5 \pm 0.3$	$76.5 \pm 2.2$	$6.5 \pm 0.87$

**ผลของเลขิตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับต่างๆ ในสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะ แช่แข็ง**

### 1. การเคลื่อนที่ของอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับ ของเลขิตินจากเมล็ดทานตะวัน ส่งผลให้การเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิ (MOT) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลขิตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 17 และ Figure 16) และระดับเลขิตินจากเมล็ดทานตะวัน และชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลาย ส่งผลให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (PMT) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลขิตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่ม น้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 สูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 4 พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มี ค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ สูงสุด จากการศึกษา นี้ พบว่า การเคลื่อนที่ทั้งหมด และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังละลาย และเมื่อบ่มน้ำเชื้อ ไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสในชั่วโมงที่ 2 และ 4 มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic ต่อระดับของเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันที่เพิ่มขึ้น (Table 18 และ Figure 17)

## 2. ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับของเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ส่งผลให้การ ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) และความเร็วในการเคลื่อนที่ใน วิถีโค้ง (VCL) ของอสุจิ มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีความเร็ว เฉลี่ย ในการเคลื่อนที่ ของอสุจิสูงสุด สูงกว่า ในกลุ่มที่ เติมระดับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และกลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 1.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีความเร็วในการเคลื่อนที่ใน วิถีโค้งสูงกว่าในกลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 19, 20 และ 21 และ Figure 18, 19 และ 20)

## 3. ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ระดับ ของเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ส่งผลให้ความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัว (ALH) อัตราส่วนความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (STR) และอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีโค้ง (LIN) มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัวของอสุจิหลังละลายต่ำกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5, 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) (Table 22 และ Figure 21) แต่มีอัตราส่วนความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่และอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีโค้ง สูงกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5, 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) (Table 24 และ 25 และ Figure 23 และ 24)

นอกจากนี้ พบว่า ผลของระดับ เลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน และชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลาย ส่งผลให้ความถี่ในการส่ายส่วนหัวของอสุจิ (BCF) มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

ในช่วงโม่งที่ 4 กลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความถี่ในการส่าย ส่วนหัวของอสุจิสูงกว่าในกลุ่มที่เติมระดับ 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาพบว่า ความถี่ในการส่ายส่วนหัวของอสุจิ เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงโม่งที่ 4 มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic ต่อระดับของเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่เพิ่มขึ้น (Table 23 และ Figure 22)

#### 4. จำนวนตัวอสุจิมีชีวิต

จากผลการศึกษา พบว่า ผลของระดับเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต (viability) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 16) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนอสุจิมีชีวิตต่อจำนวนอสุจิทั้งหมดหลังละลาย สูงกว่ากลุ่มที่เติมระดับ 1.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาพบว่าจำนวนอสุจิมีชีวิตต่อจำนวนอสุจิทั้งหมดหลังละลาย และเมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงโม่งที่ 0 มีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic ต่อระดับของเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่เพิ่มขึ้น (Table 26 และ Figure 25)





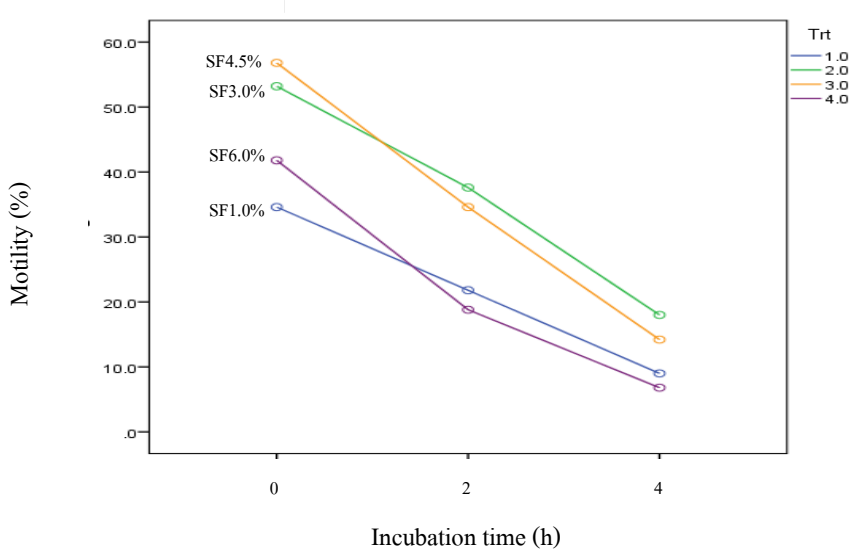
**Table 17** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	34.6	21.8	9.0	21.80 <sup>b</sup>
3.0 %	53.2	37.6	18.0	35.20 <sup>a</sup>
4.5 %	56.8	34.6	14.2	36.26 <sup>a</sup>
6.0 %	41.8	18.8	6.8	22.46 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	3.29	2.36	1.45	
Treatment contrast ( <i>p</i> -value)				
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Quadratic</i>	0.0034	0.0002	0.0024	
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



**Figure 16** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on total motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

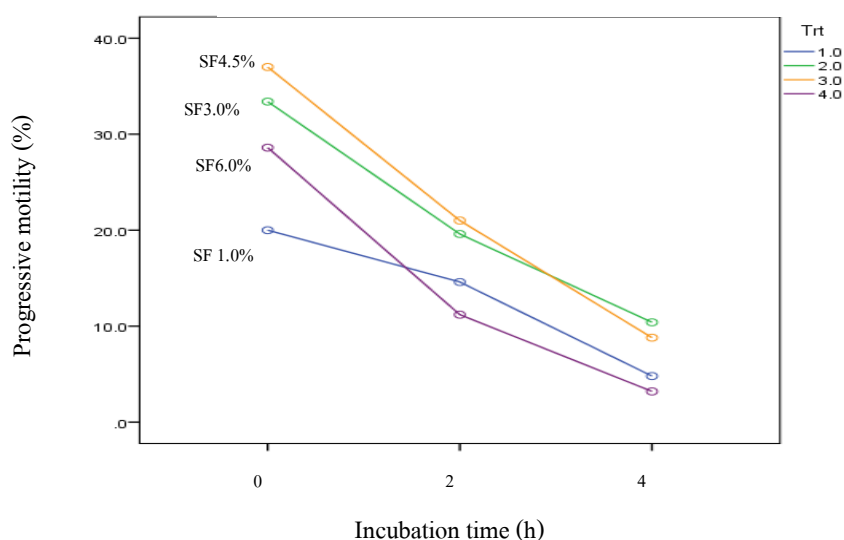
**Table 18** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
1.5 %	20.0 <sup>b</sup>	14.6 <sup>b</sup>	4.8 <sup>bc</sup>
3.0 %	33.4 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>
4.5 %	37.0 <sup>a</sup>	21.0 <sup>a</sup>	8.8 <sup>ab</sup>
6.0 %	28.6 <sup>ab</sup>	11.2 <sup>b</sup>	3.2 <sup>c</sup>
<i>p</i> -value	-----<0.05-----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.19	1.35	0.85
Treatment contrast( <i>p</i> -value)			
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>Quadratic</i>	0.0042	0.0002	0.0006
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

<sup>a, b, c</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



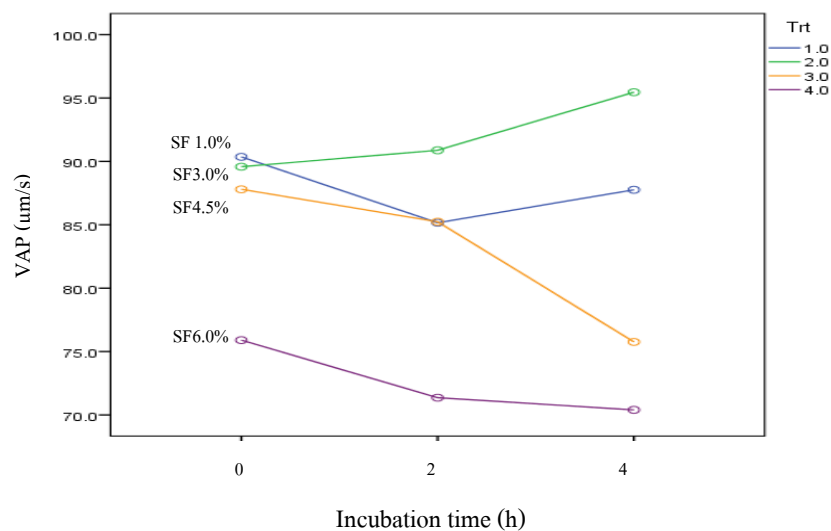
**Figure 17** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender and incubation time on progressive motility percentage of frozen-thawed sperm

**Table 19** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	90.36	85.16	87.76	87.76 <sup>a</sup>
3.0 %	89.58	90.88	95.46	91.97 <sup>a</sup>
4.5 %	87.80	85.24	75.76	82.93 <sup>ab</sup>
6.0 %	75.90	71.36	70.40	72.55 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.96	3.31	4.18	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

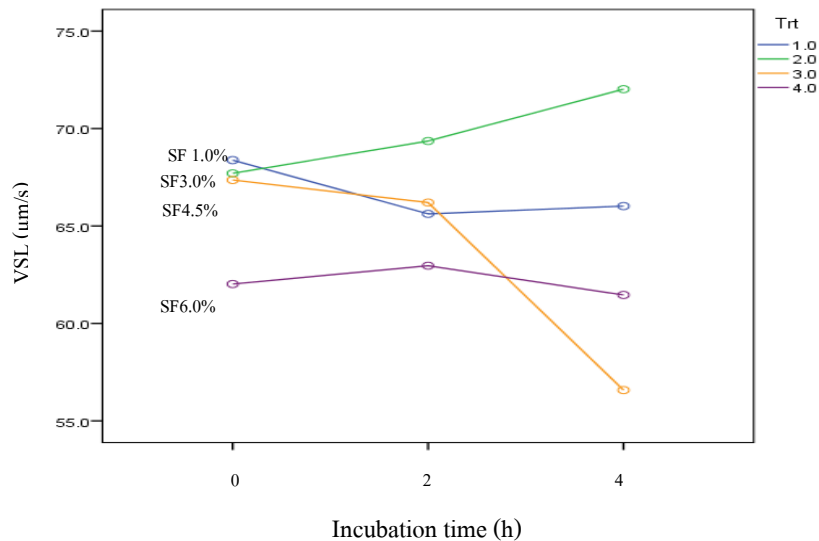


**Figure 18** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on average path velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

**Table 20** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straight-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

Sunflower (SF) level	storage at $37^{\circ}\text{C}$ (h)		
	0	2	4
1.5 %	68.38	65.62	66.02
3.0 %	67.70	69.36	72.02
4.5 %	67.36	66.20	56.58
6.0 %	62.02	62.96	61.46
<i>p</i> -value	----- >0.05 -----		
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	2.03	1.52	2.75

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



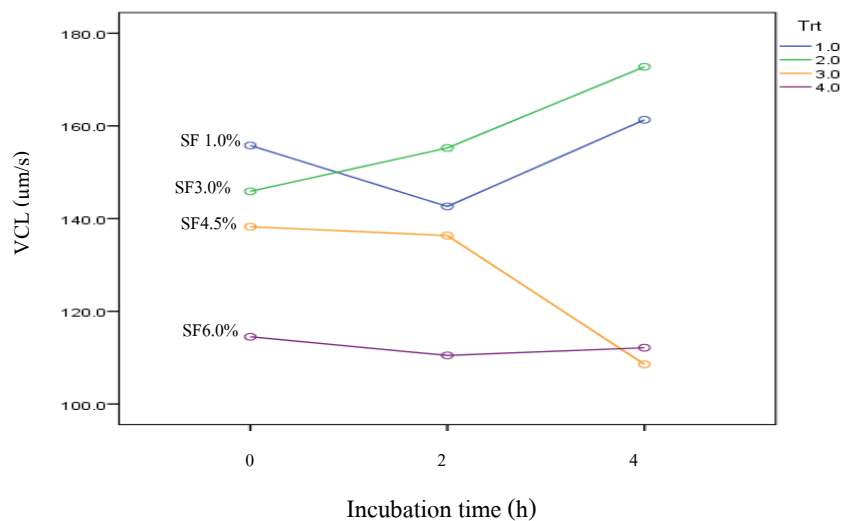
**Figure 19** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straight-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

**Table 21** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on curve-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	155.78	142.62	161.32	153.40 <sup>a</sup>
3.0 %	145.88	155.24	172.76	157.67 <sup>a</sup>
4.5 %	138.24	136.34	108.56	127.71 <sup>b</sup>
6.0 %	114.50	110.48	112.14	112.37 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	5.93	6.79	9.20	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



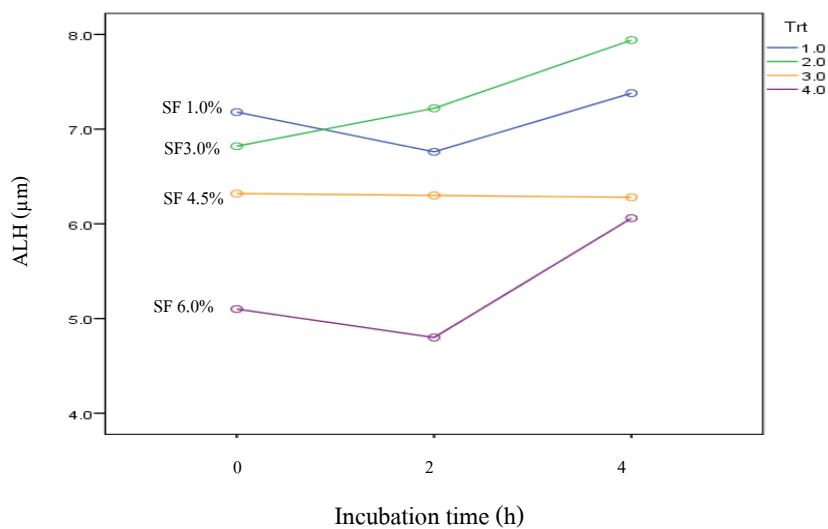
**Figure 20** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on curve-line velocity of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 22** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at $37^{\circ}\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	7.18	6.76	7.38	7.10 <sup>ab</sup>
3.0 %	6.82	7.22	7.94	7.32 <sup>a</sup>
4.5 %	6.32	6.30	6.28	6.30 <sup>b</sup>
6.0 %	5.10	4.80	6.06	5.32 <sup>c</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	0.26	0.30	0.35	

<sup>a, b, c</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



**Figure 21** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$

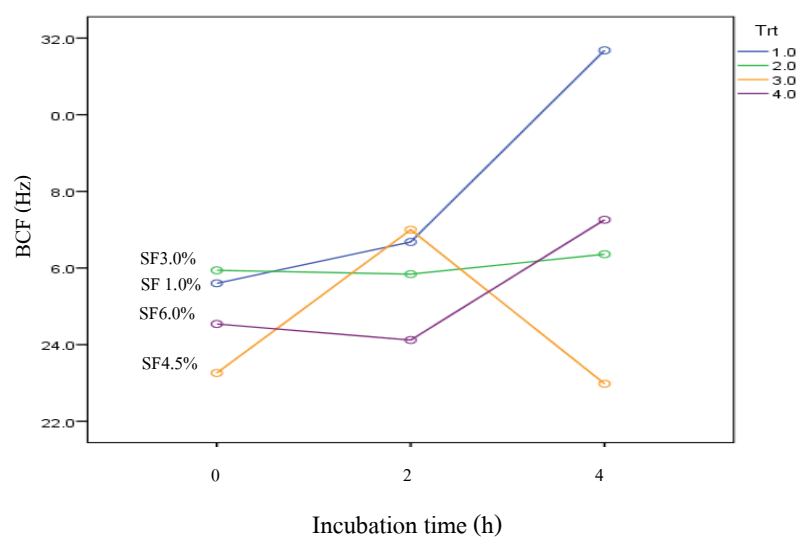
**Table 23** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	25.60	26.68	31.68	27.99 <sup>a</sup>
3.0 %	25.94	25.84	26.36	26.05 <sup>b</sup>
4.5 %	23.26	27.00	22.09	24.12 <sup>b</sup>
6.0 %	24.54	24.12	27.26	25.31 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	0.52	0.44	0.98	
Treatment contrast ( <i>p</i> -value)				
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.0212	
<i>Quadratic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0.0051	
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



**Figure 22** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender and incubation time on beat cross frequency of frozen-thawed sperm

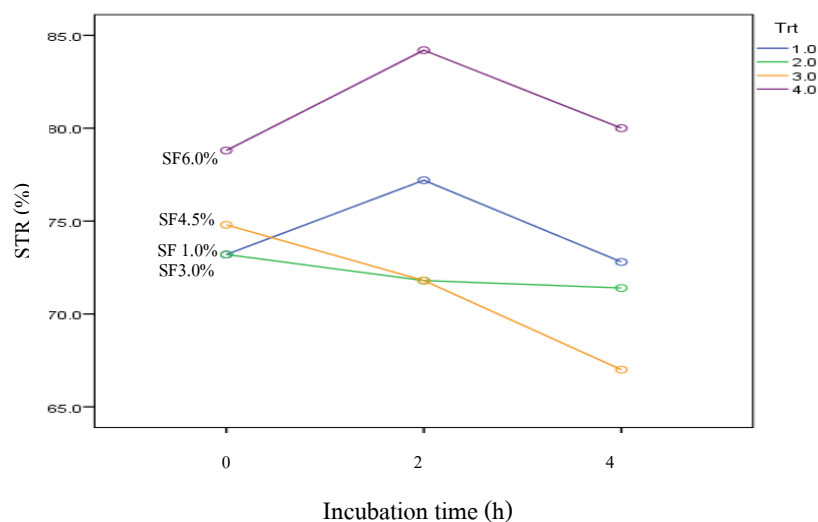


**Table 24** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straightness percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	73.20	77.20	72.80	74.40 <sup>b</sup>
3.0 %	73.20	71.80	71.40	72.15 <sup>b</sup>
4.5 %	74.80	71.80	67.00	71.20 <sup>b</sup>
6.0 %	78.80	84.20	80.00	81.00 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	0.87	1.44	1.78	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



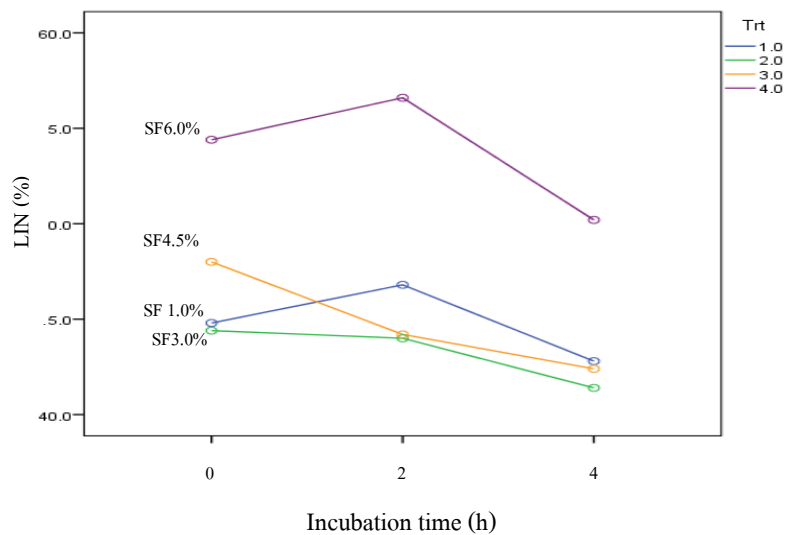
**Figure 23** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on straightness percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

**Table 25** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on linearity percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	44.80	46.80	42.80	44.80 <sup>b</sup>
3.0 %	44.40	44.00	41.40	43.26 <sup>b</sup>
4.5 %	48.00	44.20	42.40	44.86 <sup>b</sup>
6.0 %	54.40	56.60	50.20	53.73 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.20	1.49	1.75	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean



**Figure 24** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on linearity percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

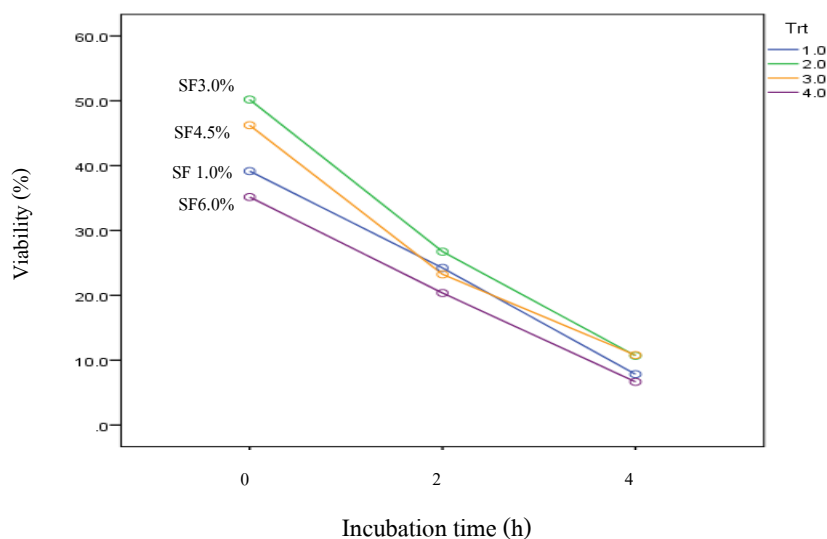
**Table 26** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on viability percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

Sunflower (SF) level	Hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
1.5 %	40.2	23.8	7.3	23.74 <sup>b</sup>
3.0 %	50.0	26.2	10.4	29.20 <sup>a</sup>
4.5 %	46.1	23.1	10.1	26.75 <sup>a</sup>
6.0 %	38.9	20.0	6.2	20.27 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----- > 0.05 -----			< 0.05
	-			
<i>SEM</i> <sup>1/</sup>	1.77	1.61	0.79	
Treatment contrast ( <i>p</i> -value)				
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Quadratic</i>	<0.0001	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
<i>Cubic</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

*SEM*<sup>1/</sup> standard error of mean

*ns* no significant difference ( $p > 0.05$ )



**Figure 25** Effect of different levels of sunflower lecithin-based extender on viability percentage of frozen-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

## วิจารณ์ผลการทดลอง

การเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง หลังละลายมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่ออัตราการผสมติดจากการผสมเทียมน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง หลังละลาย มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิอยู่ระหว่าง 30 ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ (Tuli et al, 1991; Tuli and Holtz, 1994; Whittier, 2000) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นได้ว่า เลซิติน หรือ ฟอสโฟลิปิด จากถั่วเหลืองในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะสามารถป้องกันความเสียหายแก่อสุจิ จากการแช่แข็งได้ ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ หลังละลายกลุ่มที่ การเติมเลซิติน จากถั่วเหลืองที่ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดสูงกว่ากลุ่มเติมเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจาก เมื่อตัวอสุจิได้รับผลกระทบจากการลดอุณหภูมิ ที่ต่ำมากจาก กระบวนการแช่แข็งอสุจิจะสูญเสียฟอสโฟลิปิด ที่เยื่อหุ้ม เซลล์โดยเฉพาะฟอสฟาทีดิลโคลีน การเติมฟอสโฟลิปิดในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ จะช่วยให้เกิดการเข้าจับแทนที่ ฟอสโฟลิปิดของ เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (bio-membrane of sperm) ส่งผลให้ตัวอสุจิสามารถทนต่อการลดอุณหภูมิที่ต่ำมาก และการแช่แข็งได้ดีขึ้น (Manjunath, 2012) อย่างไรก็ตาม หาก ปริมาณของ ฟอสโฟลิปิด ใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีปริมาณน้อยเกินไป ก็จะไม่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนใหญ่ไว้ได้ ทำให้ตัวอสุจิได้รับความเสียหาย จากการไหลเข้า-ออกของน้ำ และสารอื่นภายในเซลล์ระหว่างทำ การลดอุณหภูมิที่ต่ำลง ส่งผลให้ อัตราการเคลื่อนที่ ของอสุจิลดลง (Aboagla and Terada, 2004) ผลจากการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Salmin และคณะ (2012) ที่พบว่า การเติม เลซิตินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ส่งผลให้การเคลื่อนที่ ไปข้างหน้าของอสุจิ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิตินจากถั่วเหลือง 0 , 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน ทำนองเดียวกันผลการศึกษาของ Paz และคณะ (2010) พบว่า การเติมเลซิตินจากถั่วเหลืองที่มี ฟอสฟาทีดิลโคลีน 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ 3.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ มีผลให้ การเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในการ เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ในทำนองเดียวกัน การเติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ก็ สามารถป้องกันความเสียหายแก่อสุจิจากการแช่แข็งได้ โดยการเติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 3.0 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ หลังละลาย ใกล้เคียง กับผลการเติมเลซิตินจากถั่วเหลืองในการทดลองย่อยที่ 1 ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากมีองค์ประกอบ ของเลซิตินใกล้เคียงกัน ซึ่งเลซิตินที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้คือ เลซิตินจากถั่วเหลืองเป็นชนิดที่

มีฟอสฟาติลโคลีน 20 เปอร์เซนต์ และเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันเป็นชนิดที่มีฟอสฟาติลโคลีน 15 เปอร์เซนต์ (The Solae Company, 2014)

การบ่มน้ำเชื้อหลังละลายในอ่างน้ำอุ่น ควบคุม อุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายโดยจำลองสภาพแวดล้อมภายในมดลูกอย่างง่าย ( *in-vitro* ) และมีราคาถูก สามารถบอกถึงความสามารถในการมีชีวิตรอดของอสุจิในสารละลายที่เตรียมขึ้น (Mathur *et al.*, 2002) จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อบ่มน้ำเชื้อหลังละลายไว้ในอ่างน้ำอุ่น ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 กลุ่มที่เติมระดับของเลซิตินจากถั่วเหลืองและเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ที่ระดับ 1.5 เปอร์เซนต์ มีอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิต่ำกว่ากลุ่มที่เติมที่ระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซนต์ อย่างชัดเจน อาจจะเนื่องมาจากปริมาณของ เลซิติน ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะที่น้อยเกินไป ไม่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการลดอุณหภูมิต่ำมากและการแช่แข็งได้ อาจจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ บางส่วนเสื่อมสภาพลง ส่งผลให้อัตราการตายในระหว่างการเก็บรักษาในรูปของเหลว ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ ( reactive oxygen species; ROS) จึงเป็นสาเหตุให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เคลื่อนที่ช้าลงอย่างรวดเร็ว ( Love *et al.*, 2005) ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลงตามไปด้วย

อย่างไรก็ตาม จาก ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ระดับของเลซิตินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะที่ สูงถึง 6.0 เปอร์เซนต์ มีผลทำให้การเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมีค่าลดลง ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องมาจากปริมาณของเลซิตินที่สูงเกินไป ทำให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูงขึ้น อาจจะทำให้อัตราการตาย ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง ซึ่ง Forouzanfar และคณะ (2010) กล่าวว่า ความเข้มข้นของเลซิตินจากถั่วเหลืองที่สูงเกินไป อาจจะเป็นพิษต่ออสุจิ หรืออาจจะไปขัดขวางการหายใจของอสุจิ ส่งผลให้ความสามารถในการมีชีวิตรอดของอสุจิหลังละลายและเมื่อ บ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าลดลง จึง ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงตามไปด้วย สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Phutikanit และคณะ (2011) พบว่า การเติมเลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีความเข้มข้นของ ฟอสฟาติลโคลีนสูง (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine 95%) ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ ทั้งหมดของอสุจิมีค่าต่ำกว่า การเติมเลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดที่มีความเข้มข้นของ ฟอสฟาติลโคลีนต่ำ (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine 20%) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ( sperm velocity) ซึ่งให้เห็นถึงความแข็งแรงของอสุจิ เป็นดัชนีที่ใช้ในการพิจารณาทางอ้อมแสดงถึงการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์อสุจิ

(Graham and Aman, 1984) จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเลซิดินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ส่งผลต่อ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายโดยมีแนวโน้มว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะมีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิทุกดัชนีต่ำกว่ากลุ่มอื่น โดยเฉพาะความเร็วในการเคลื่อนที่ในวิถีโค้งของอสุจิที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากที่ระดับของเลซิดินจากถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อเกิดจากความหนืดเพิ่มขึ้น เป็นอุปสรรคในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จึงมีผลให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Watson, 1981)

เมื่อพิจารณา ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในทุกดัชนี จากผลของ เลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 1.5, 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองย่อยที่ 1 ผลของ เลซิดินจาก ถั่วเหลือง ทั้งนี้ อาจจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบของ เลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีส่วนประกอบของกรดไขมัน เช่น โอเมกา 6 (linoleic acid) และโอเมกา 9 (oleic acid) อยู่ค่อนข้างสูง จากการศึกษาของ Yimer และคณะ (2016) พบว่า การเสริมกรดไขมัน โอเมกา 3, 6 และ 9 ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อโค ส่งผลให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ทุกดัชนีมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม ทั้งนี้ อาจเกิดจากกรดไขมัน โอเมกามีคุณสมบัติ ช่วยให้โครงสร้างของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแข็งแรงขึ้น ยกเว้น กลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิในทุกดัชนีต่ำกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งก็น่าจะเกิดขึ้นจากระดับของเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวัน ที่เพิ่มขึ้น ทำให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อเกิดจากความหนืดเพิ่มขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตาม ระดับของเลซิดินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะที่ต่ำเกินไป ส่งผลต่อ ลักษณะในการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เช่นกัน จะเห็นได้ว่า ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของตัวอสุจิ ในกลุ่มที่เติมเลซิดินที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองการทดลอง มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินที่ระดับ 3.0, 4.5 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากปริมาณของ ฟอสโฟลิปิดในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีปริมาณน้อยเกินไป อาจจะไม่สามารถปกป้องตัวอสุจิได้ทั้งหมด ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซมบางส่วนเกิดความเสียหาย ทั้งจากกระบวนการแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อ (thawing) อาจจะไม่ทำให้ตัวอสุจิตายทันทีหลังละลาย แต่จะ ส่งผลต่อแรงดันออสโมติกภายในตัวอสุจิเสียสมดุล จึงทำให้ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิผิดปกติ ลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Rasul *et al.*, 2000) ในทางกลับกัน ระดับของเลซิดินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะที่สูงเกินไป คือการเติมเลซิดินที่ระดับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัวตัวอสุจิลดลงซึ่งเป็น ไปในทางองเดียวกับ

ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ จึงอาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเลซิดินทำให้ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าความกว้างของการเคลื่อนที่ส่วนหัวลดลง ระดับของเลซิดินมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ อสุจิมิชีวิต จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ อสุจิมิชีวิต หลังละลายในกลุ่มที่ เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ ระดับ 1.5 และ 6 .0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ เติมเลซิดินที่ ระดับ 3.0 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการที่มีปริมาณของ เลซิดิน ในสารละลาย เจือจางน้ำเชื้อที่มีน้อยเกินไป เมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ส่งผลให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมี แรงดันออสโมติกสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มอสุจิ เป็นสาเหตุ ให้ตัวอสุจิส่วนหนึ่งเกิดการช็อกตาย ( Watson, 1995) และอีกส่วนหนึ่งอาจจะ เกิดการเสื่อมของ เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการแช่แข็ง ( Thomas *et al.*, 1998) ส่วนในกลุ่มที่เติมเลซิดินใน สารละลาย เจือจางน้ำเชื้อ ในปริมาณ สูง ก็ส่งผลต่อ จำนวนอสุจิมิชีวิตต่อจำนวนอสุจิทั้งหมด หลังละลาย ได้ เช่นกัน เนื่องมาจากการเติมเลซิดิน ในปริมาณสูง ส่งผลให้ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ มีความเข้มข้น มาก อาจจะไปยับยั้งการหายใจของอสุจิด้วย (Amirat *et al.*, 2004) ส่งผลให้จำนวนอสุจิมิชีวิต หลัง ละลายมีค่าลดลง

อย่างไรก็ตาม การทดลองในครั้งนี้ให้ผลแตกต่างกับการศึกษาของ Chelucci และคณะ (2015) ที่รายงานว่า การเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองชนิดที่มี L- $\alpha$ -phosphatidilcholine สูงกว่าหรือ เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะ ส่งผลให้อัตราการ เคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิมิชีวิตหลังละลายสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจาก ถั่วเหลืองระดับ 0.5, 1.0, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากความเข้มข้นของ ฟอสฟาติดีลโคลีน ในองค์ประกอบของเลซิดินต่างกัน อาจจะทำให้สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างการ ลดอุณหภูมิได้ต่างกัน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดและจำนวนอสุจิมิชีวิตรอดหลังละลาย แตกต่างกัน (Watson, 1981; Phutikanit *et al.*, 2011)

### สรุปผลการทดลอง

ผลของเลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับต่างๆ ในสารละลาย เจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายสรุปผลได้ดังนี้

1. การเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 3 .0 เปอร์เซ็นต์ ส่งผล ให้คุณภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายและเมื่อ บ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 มีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ของอสุจิ และจำนวนอสุจิมิชีวิตมีค่าสูงสุด

2. การเติม เลชิตินจากเมล็ดทานตะวันในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 3.0 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อ แพะแช่แข็ง หลังละลายมีค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และจำนวนอสุจิมีชีวิตไม่แตกต่างกัน

3. การบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 กลุ่มที่เติมเลชิตินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงสุดจึงควรเติมเลชิตินระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์

4. ระดับเลชิติน จากถั่วเหลือง และเลชิตินจากเมล็ดทานตะวัน ที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้การเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และจำนวนอสุจิมีชีวิต ลดลงแบบเส้นโค้ง Quadratic



## บทที่ 4

### การทดลองที่ 2

#### การศึกษาผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาพร้อมกับแหล่งของเลซิดิน ระดับที่เหมาะสมในสารละลายเจ็องน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

##### บทนำ

ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นตอนการนำน้ำเชื้อสดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซมินอลพลาสมาของแพะออกก่อนเติมสารละลายเจ็องน้ำเชื้อใหม่ไข่แดงระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดปฏิกิริยาไฮโครไลซิสระหว่างเอนไซม์ EYCE ในเซมินอลพลาสมา กับเลซิดินในไข่แดง ผลจากปฏิกริยานี้ทำให้เกิดกรดไลโซเลซิดิน ซึ่งจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และจำนวนอสุจิมีชีวิตในน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายมีค่าสูงกว่าการไม่ปั่นแยก (อนนท์ และคณะ 2551) อย่างไรก็ตาม การปั่นแยกเซมินอลพลาสมามีความเสี่ยงที่จะทำให้คุณภาพของตัวอสุจิลดลง เนื่องจากต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนนำสู่กระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้ การแยกเอนไซม์ EYCE ในเซมินอลพลาสมาออกก็ได้แยกเอาส่วนประกอบอื่นที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิตรอด และการปฏิสนธิกับไข่ของอสุจิ เช่น โปรตีน สารพลังงานและฮอว์โมน ( Juyena and Stelletta, 2012) ออกไปด้วย ในขณะที่เดียวกัน การใช้ไข่แดงยังเป็นอุปสรรคในการพัฒนาสารละลายเจ็องน้ำเชื้อในเชิงการค้า เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ซึ่งอาจนำโรคต่างถิ่นเข้ามา (Bousseauet *al.*, 1998) การเลือกใช้เลซิดินจากพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ผลจากการทดลองที่ 1 ชี้ให้เห็นว่าเลซิดินจากถั่วเหลือง และเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ในระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้เป็นสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็นในน้ำเชื้อแพะแช่แข็งได้

##### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาพร้อมกับ การเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจ็องน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เปรียบเทียบ กับกลุ่มควบคุมการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาพร้อมกับเติมไข่แดงที่ระดับ 20 เปอร์เซ็นต์

## สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์บอร์ (Boer) ที่เลี้ยงภายในศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สุราษฎร์ธานี มีอายุระหว่าง 24 ถึง 36 เดือน น้ำหนัก 60 ถึง 90 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว มีประวัติการใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้คุณภาพดีในช่วงก่อนทำการทดลอง

การจัดการเลี้ยงดูพ่อพันธุ์ทั้ง 3 ตัว เลี้ยงอยู่ภายในโรงเรือนเลี้ยงแพะพ่อพันธุ์แบบยกสูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร ปูพื้นด้วยไม้ระแนงแบบเว้นช่อง 1 นิ้ว หลังคาจั่วสูงติดตั้งพัดลมดูดอากาศ พ่อพันธุ์แต่ละตัวถูกแยกขังเดี่ยว ในคอกขนาด 2x4 ตารางเมตร

การจัดการด้านอาหาร พ่อพันธุ์ได้รับหญ้าแห้ง โกล่าแห้ง โดยให้กินเต็มที่ มีถึงใส่น้ำสะอาด และก้อนเกลือแร่แวนไวให้สามารถกินได้ตลอด เสริมด้วยอาหารชั้นชนิดเม็ดที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ วันละ 1 กิโลกรัมต่อตัว ในเวลา 09.00 นาฬิกา มีโปรแกรมตรวจสุขภาพและทำวัคซีนตามข้อกำหนดมาตรฐานฟาร์มแพะของกรมปศุสัตว์

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

### 1. วัสดุเหมือนกับการทดลองที่ 1 เพิ่มเติม คือ

1.1 สารเคมีสำหรับตรวจความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์สุจิและอะโครโซม ด้วยเครื่อง flow cytometry

1.1.1 HEPES-buffered modified Tyrode medium (Sperm-TALP) (2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.1 mM KCL, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 100.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM HEPES, 6% (w/v) BSA in Milli-Qwater) มีค่าแรงดันออสโมติก 280 ถึง 300 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8-7.2

1.1.2 สีย้อมตัวสุจิ SYBR-14<sup>®</sup> dye propidium iodide, PI (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) และ สีย้อมอะโครโซม fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin, FITC-PNA (EY Laboratories, Inc. LA, USA)

1.2 แผ่นกรองไนลอน เมช (nylon mesh) ขนาด 41 ไมโครเมตร (Spectrum, Los Angeles, CA, USA)

1.3 สารละลายแลคเตทริงเกอร์ (lactate ringer's solution)

### 2. อุปกรณ์เหมือนกับการทดลองที่ 1 เพิ่มเติม คือ

2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.2 เครื่อง flow cytometry รุ่น FACS caliber (Becton Dickinson, NJ, USA)

### 3. วิธีการทดลอง

#### 3.1 การวางแผนการทดลอง

การศึกษาผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาพร้อมกับแหล่งของเลซิดินในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งเป็นการวิจัยเชิงทดลองจัดการทดลองแบบ 2x2 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements 2x2 Factorial in Randomized Completely Block Design) เพื่อศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 การเตรียมน้ำเชื้อก่อนการทดลอง ได้แก่ การปั่นแยก (seminal plasma removal, R) และไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (non removal of seminal plasma, NR) และปัจจัยที่ 2 แหล่งของเลซิดิน ได้แก่ เลซิดินจากถั่วเหลือง (soybean, SB) ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน (sunflower, SF) ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) คือ การปั่นแยก (seminal plasma removal, R) ร่วมกับไข่แดง (egg yolk, EY) ระดับ 20 เปอร์เซนต์ น้ำเชื้อที่รีดเก็บจากพ่อแพะทุกตัวในแต่ละสัปดาห์ถูกนำมาเทรวมกัน เป็นหนึ่งชุดน้ำเชื้อแต่ละชุดน้ำเชื้อ คือ 1 บล็อก โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์

#### 3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การรีดเก็บน้ำเชื้อ เหมือนกับการทดลองที่ 1

3.2.2 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น เหมือนกับการทดลองที่ 1

3.2.3 การเตรียมน้ำเชื้อก่อนการทดลอง นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บจากพ่อแพะแต่ละตัวที่ผ่านการตรวจคุณภาพเบื้องต้น มาเทรวมกัน แบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน ส่วน ที่ 1 พักไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 นำไปเติมสารละลายแลคเตทริงเกอร์ ตามสัดส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ สารละลาย 20 ส่วน ทำการ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับแรงหนีศูนย์กลางที่ ความเร็ว 900×g นาน 10 นาที ตามวิธีของอนันท์ และคณะ (2551)

3.2.4 การเจือจางน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อส่วน ที่ 1 ที่ไม่ปั่นแยกนำมาแบ่งย่อยอีกครั้งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน สุ่มเพื่อเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และส่วนที่ 2 ที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออกแล้วนำมา มาแบ่งย่อยเป็น 3 ส่วนเท่าๆกัน สุ่มเพื่อเจือจาง ด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันที่ระดับ 3 เปอร์เซนต์ และกลุ่มควบคุมเติมไข่แดง 20 เปอร์เซนต์ โดย ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 150 ล้านตัวต่อ ได้ส นำ น้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบรรจุในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตรนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อลดอุณหภูมิ ลงให้คงที่ ที่ระดับ 4 ถึง 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ก่อนนำไปอ้อมในไอน้ำนิ่งเหนือระดับในโตรเจนเหลว ประมาณ 4 ถึง 5 เซนติเมตร

ที่อุณหภูมิ -100 ถึง -120 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว-196 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแช่แข็ง

### 3.3 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลาย

3.3.1 อัตราการเคลื่อนที่ ความเร็ว และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตรวจสอบด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ CASA เหมือนกับการทดลองที่ 1

3.3.2 การตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซม ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยสุ่ม หยิบน้ำเชื้อจำนวน 3 หลอด ต่อชุดน้ำเชื้อในแต่ละ ทริตเมนต์ ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยจุ่มลงในน้ำอุ่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำน้ำเชื้อที่ละลายแล้วใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Sperm-TALP อัตราส่วน 1: 10 (น้ำเชื้อ : สารละลาย) แล้วทำการกรองผ่าน nylon mesh ขนาด 41 ไมโครเมตร ต่อจากนั้นย้อมด้วยสี FITC-PNA โดยใช้ น้ำเชื้อ 440 ไมโครลิตรผสมกับสี FITC-PNA 50 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วย้อมด้วยสี PI โดยใช้ น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตรต่อสี PI 10 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างไปตรวจด้วยเครื่อง flow cytometry

### 4. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) และเมื่อบ่มไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ได้แก่ การเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ ของอสุจิ จำนวนอสุจิ ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมความสมบูรณ์หลังละลาย นำมาวิเคราะห์ผลดังนี้

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อกที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements in Randomized Completely Block Design) โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ (statistical model) คือ

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_k + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \varphi_{ijk}$$

เมื่อ

- $Y_{ijk}$  คือ ค่าสังเกตจากปัจจัยของกลุ่มทดลองที่ระดับ  $i$  และเวลาหลังละลาย ที่  $j$  ที่ชุดน้ำเชื้อ  $k$
- $\mu$  คือ ค่าเฉลี่ย
- $\alpha_i$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของกลุ่มทดลอง ที่  $i$  เมื่อ  $i = 1$  ถึง 5
- $\delta_k$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของชุดน้ำเชื้อ ที่  $k$  เมื่อ  $k = 1$  ถึง 5

- $\tau_j$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่  $j$  เมื่อ  $j = 1$  ถึง 3
- $\alpha\tau_{ij}$  คือ อิทธิพลร่วมจากปัจจัยของกลุ่มทดลองที่  $i$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่  $j$
- $\varphi_{ijk}$  คือ ค่าความคลาดเคลื่อน

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1999)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลของกลุ่มทดลองตามการ จัดการทดลองแบบ 2x2 แฟคทอเรียล ในแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements 2x2 Factorial in Randomized Completely Block Design) โดยมีแบบหุ่นทางสถิติ (statistical model) คือ

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \delta_k + \tau_l + A\tau_{il} + B\tau_{jl} + AB\tau_{ijl} + \varphi_{ijkl}$$

เมื่อ

$Y_{ijkl}$  คือ ค่าสังเกตจากอิทธิพลร่วมของการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเจือจาง ที่  $i$  แห่งของเลขิติน ที่  $j$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่ 1 ที่ชุดน้ำเชื้อ  $k$

$\mu$  คือ ค่าเฉลี่ย

$A_i$  คือ อิทธิพลเนื่องจากการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเจือจาง ที่  $i$

$B_j$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยแหล่งของเลขิติน ที่  $j$

$AB_{ij}$  คือ อิทธิพลร่วมของการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเจือจางที่  $i$  แห่งของเลขิติน ที่  $j$

$\delta_k$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของชุดน้ำเชื้อ ที่  $k$  เมื่อ  $k = 1$  ถึง 5

$\tau_l$  คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยของเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่ 1 เมื่อ  $l = 1$  ถึง 3

$A\tau_{il}$  คือ อิทธิพลร่วมของการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเจือจาง ที่  $i$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่ 1

$B\tau_{jl}$  คือ อิทธิพลร่วมของแหล่งของเลขิติน ที่  $j$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่ 1

$AB\tau_{ijl}$  คือ อิทธิพลร่วมของการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเจือจางที่  $i$  แห่งของเลขิติน ที่  $j$  และเวลาในการบ่มน้ำเชื้อ ที่ 1

$\varphi_{ijkl}$  คือ ค่าความคลาดเคลื่อน

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1999)

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำเข้าสู่การทดลองที่ 2 พบว่า ปริมาณน้ำเชื้อสดที่เก็บได้ ต่อครั้งต่อตัวเฉลี่ย เท่ากับ  $1.7 \pm 0.4$  มิลลิลิตร เมื่อนำไปตรวจคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ย เท่ากับ  $76.6 \pm 1.6$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยใช้ hemocytometer พบว่า มีจำนวนตัวอสุจิเฉลี่ย เท่ากับ  $5.8 \pm 0.55 \times 10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร (Table 27)

**Table 27** Descriptive statistics of fresh semen quality of experimental buck used in Experiment 2 (mean  $\pm$  SD)

Lot no.	N	Semen volume (ml)	Progressive motility (%)	Sperm concentration ( $\times 10^9$ cells/ml)
1	3	$1.1 \pm 0.3$	$78.3 \pm 2.9$	$3.9 \pm 0.32$
2	3	$1.9 \pm 0.8$	$78.3 \pm 2.9$	$7.2 \pm 1.34$
3	3	$1.9 \pm 0.3$	$76.7 \pm 5.8$	$6.7 \pm 2.57$
4	3	$1.9 \pm 0.2$	$75.0 \pm 5.0$	$4.5 \pm 0.3$
5	3	$1.8 \pm 0.2$	$75.0 \pm 7.1$	$6.9 \pm 3.14$
Overall mean		$1.7 \pm 0.4$	$76.6 \pm 1.6$	$5.8 \pm 0.55$

ผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ร่วมกับการเติม เลชิตินจากถั่วเหลืองและ เลชิตินจากเมล็ดทานตะวันทีระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะ แะแข็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 1. การเคลื่อนที่ของอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า อิทธิพลของกลุ่มทดลองและชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลาย ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ทั้งหมด (MOT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า ค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมด ของอสุจิหลังละลาย (ชั่วโมงที่ 0) ของกลุ่มควบคุม มีค่าสูงสุด แต่เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสในชั่วโมงที่ 4 พบว่า ค่าการเคลื่อนที่ทั้งหมดของอสุจิของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ ปั่นแยกร่วมกับการเติมเลชิตินจากเมล็ดทานตะวันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่สูงกว่ากลุ่มที่ปั่นแยกร่วมกับการเติมเลชิตินจากถั่วเหลือง กลุ่มที่

ไม่ปั่นแยก ร่วมกับการเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองและกลุ่มที่ ไม่ปั่นแยก ร่วมกับการเติมเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 29 และ Figure 26)

จากผลการศึกษา ยังพบว่า อิทธิพลของแหล่งของเลซิดิน ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ของอสุจิ (PMT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า ค่า การเคลื่อนที่ ไป ข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจาก ถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 30 และ Figure 27)

## 2. ความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า อิทธิพลของกลุ่มทดลองส่งผลต่อ ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) และ ความเร็วการเคลื่อนที่ ในวิถีโค้ง (VCL) ของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า ค่าความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่และความเร็วการเคลื่อนที่ ในวิถีโค้งของอสุจิ ของกลุ่มที่ ปั่นแยก ร่วมกับการเติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน และกลุ่มที่ ไม่ปั่นแยก ร่วมกับ การเติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ ปั่นแยกและ ไม่ปั่นแยก ร่วมกับ การเติมเลซิดินจากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 31 และ 33 และ Figure 28 และ 30)

จากผลการศึกษา ยังพบว่า ผลของแหล่งเลซิดิน ส่งผลต่อ ความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีตรง ของอสุจิ (VSL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า ความเร็วการเคลื่อนที่ใน วิถีตรงของกลุ่มที่เติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 32 และ Figure 29)

## 3. ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

จากผลการศึกษา พบว่า ผลของแหล่งเลซิดินและชั่วโมงในการบ่มน้ำเชื้อหลังละลายส่งผล ต่ออัตราส่วนความเร็วการเคลื่อนที่วิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ของอสุจิ (STR) อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า ค่าอัตราส่วนความเร็วการเคลื่อนที่วิถีตรงต่อ ความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ของอสุจิ เมื่อบ่มน้ำเชื้อไว้ในอ่างน้ำอุ่นควบคุม อุณหภูมิ ที่ 37 องศา เซลเซียส ชั่วโมงที่ 2 และ 4 ของกลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 36 และ Figure 33)

จากผลการศึกษา ยังพบว่า ผลของแหล่งเลซิดิน ส่งผลต่อ อัตราส่วนความเร็วการเคลื่อนที่ วิถีตรงต่อความเร็วการเคลื่อนที่ในวิถีโค้งของอสุจิ (LIN) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 28) โดยพบว่า กลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) (Table 37 และ Figure 34)

#### 4. ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซม

จากผลการศึกษา พบว่า อิทธิพลของการเติมเลซิดินจากถั่วเหลือง และ เลซิดินจาก เมล็ดทานตะวันในระดับ 3 .0 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่ปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออก ไม่มีผล ต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้ม เซลล์ อสุจิและอะโครโซม และมีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $p>0.05$ ) (Table 38 และ Figure 35)



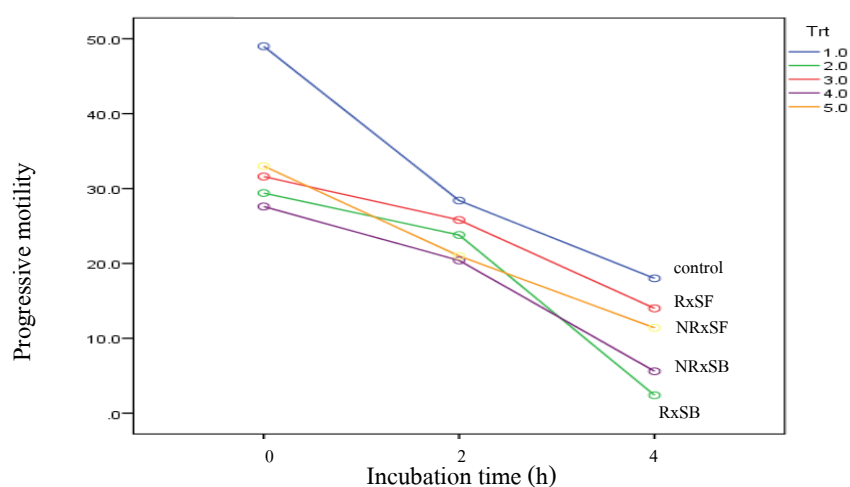




**Table 30** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on progressive motility percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

group	hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
Treatment combination				
Control	49.0	28.4	18.0	31.8 <sup>a</sup>
R x SB 3 %	29.4	23.8	3.8	18.53 <sup>b</sup>
R x SF 3 %	31.6	21.0	14.0	23.80 <sup>b</sup>
NR x SB 3 %	27.6	20.4	5.6	17.86 <sup>b</sup>
NR x SF 3 %	33.0	25.8	8.2	21.80 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
Seminal plasma removal				
R	30.5	24.8	8.9	-
NR	30.3	20.7	6.9	-
Sources of lecithin				
SB 3%	28.5	22.1	4.7	18.20 <sup>b</sup>
SF 3%	32.3	23.4	11.1	22.80 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
<i>Pooled S.E.</i>	1.39	2.01	1.22	-

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

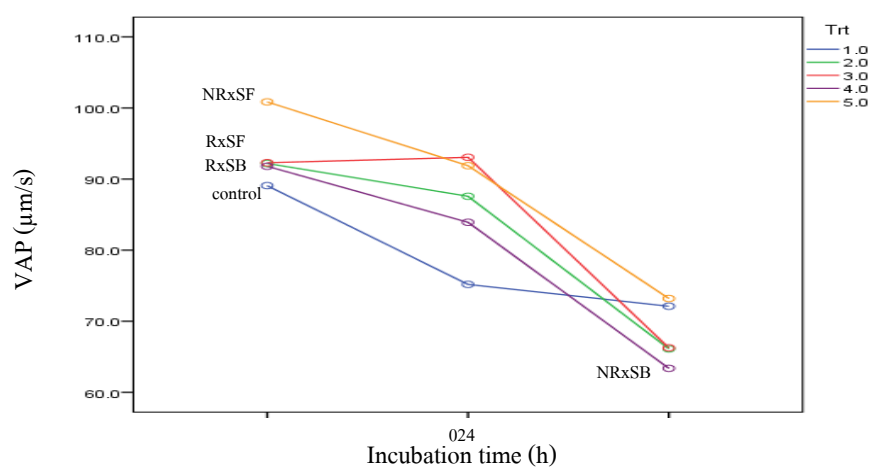


**Figure 27** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on progressive motility percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

**Table 31** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

group	hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
Treatment combination				
Control	89.08	75.18	62.06	75.44 <sup>b</sup>
R x SB 3 %	92.20	87.58	62.00	78.30 <sup>b</sup>
R x SF 3 %	92.30	91.88	81.98	89.11 <sup>a</sup>
NR x SB 3 %	91.80	83.92	59.10	78.30 <sup>b</sup>
NR x SF 3 %	100.86	93.06	71.28	90.32 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
Seminal plasma removal				
R	92.25	87.90	71.99	-
NR	96.33	90.32	65.19	-
Sources of lecithin				
SB 3%	92.00	85.75	60.55	-
SF 3%	96.58	92.47	76.63	-
<i>Pooled S.E.</i>	1.79	2.53	3.62	-

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

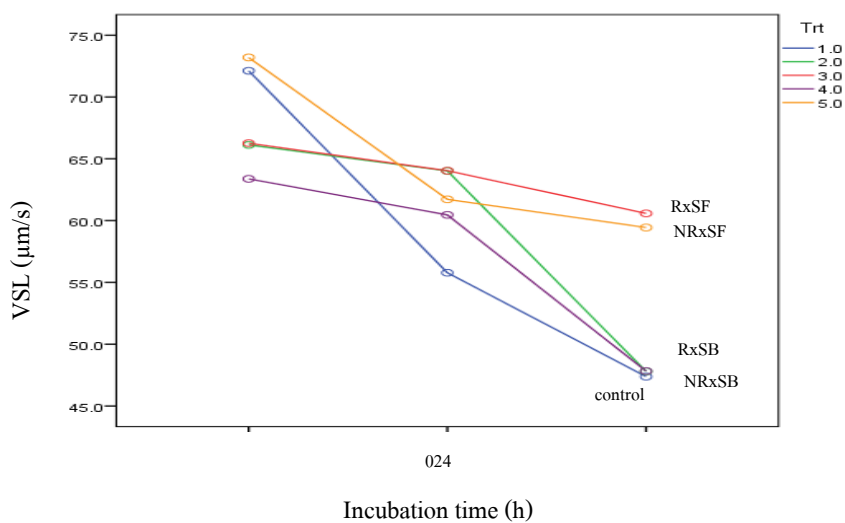


**Figure 28** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on average path velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 32** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straight-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

group	hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
Treatment combination				
Control	72.12	55.78	47.38	-
R x SB 3 %	66.12	60.46	49.72	-
R x SF 3 %	66.26	64.02	60.58	-
NR x SB 3 %	63.38	61.72	47.82	-
NR x SF 3 %	73.20	64.04	60.36	-
<i>p</i> -value	----->0.05-----			-
Seminal plasma removal				
R	66.19	64.03	54.19	-
NR	68.29	61.09	53.63	-
Sources of lecithin				
SB 3%	64.75	62.24	47.81	58.26 <sup>b</sup>
SF 3%	69.73	62.88	60.01	64.20 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
<i>Pooled S.E.</i>	1.74	1.92	2.67	-

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

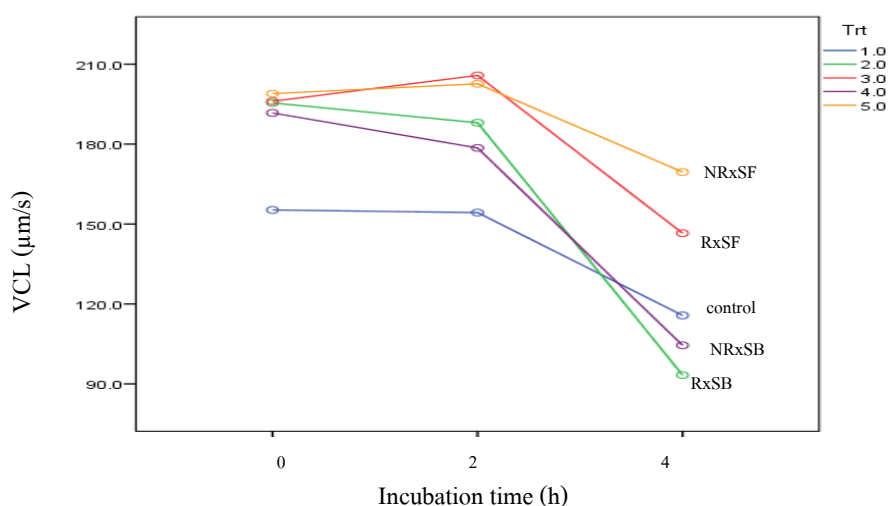


**Figure 29** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straight-line velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour) and 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 33** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on curve-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

group	hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)			Overall mean
	0	2	4	
Treatment combination				
Control	155.28	154.30	115.70	141.76 <sup>c</sup>
R x SB 3 %	195.44	188.04	120.24	158.93 <sup>b</sup>
R x SF 3 %	196.08	205.80	146.56	182.81 <sup>ab</sup>
NR x SB 3 %	191.70	178.56	104.48	158.27 <sup>b</sup>
NR x SF 3 %	198.94	202.64	124.84	190.37 <sup>a</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
Seminal plasma removal				
R	195.76	196.92	119.94	-
NR	195.32	190.60	137.00	-
Sources of lecithin				
SB 3%	193.57	183.30	98.90	-
SF 3%	197.51	204.22	158.04	-
<i>Pooled S.E.</i>	5.00	7.33	11.58	-

<sup>a, b, c</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

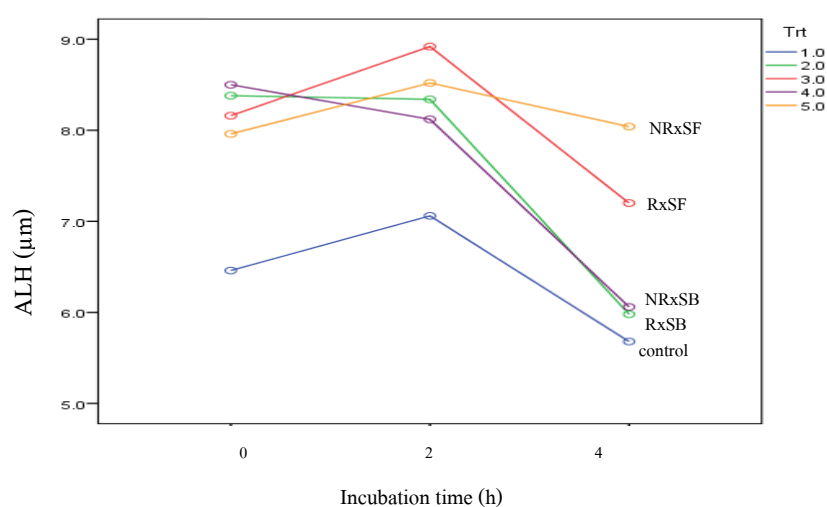


**Figure 30** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on curve-line velocity of post-thawed sperm after thawing (0 hour) and 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 34** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

group	hour of incubation at $37^\circ\text{C}$ (h)		
	0	2	4
Treatment combination			
Control	6.46	7.06	5.68
R x SB 3 %	8.38	8.34	6.64
R x SF 3 %	8.16	8.92	7.20
NR x SB 3 %	8.50	8.12	6.06
NR x SF 3 %	7.96	8.52	6.48
<i>p</i> -value	----->0.05-----		
Seminal plasma removal			
R	8.27	8.63	6.92
NR	8.23	8.32	6.27
Sources of lecithin			
SB 3%	8.44	8.23	6.35
SF 3%	8.06	8.72	6.84
<i>Pooled S.E.</i>	0.16	0.22	0.49

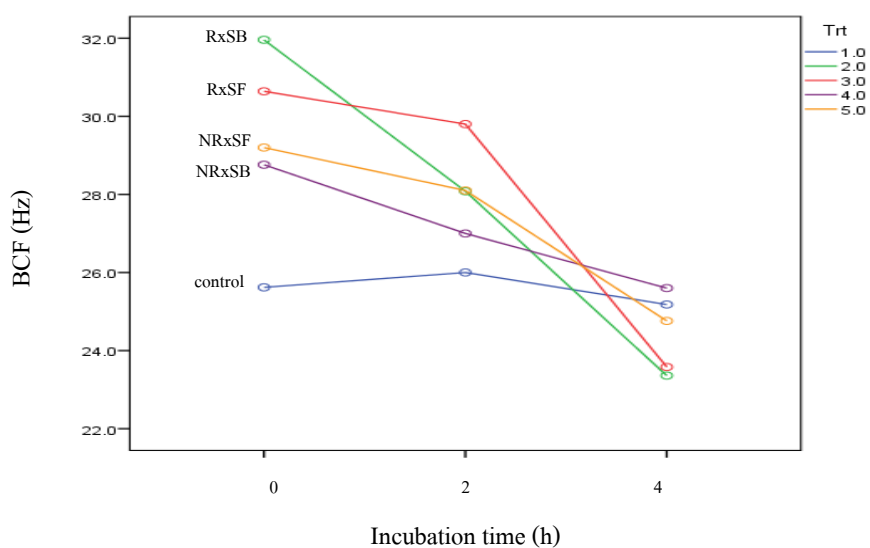
<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )



**Figure 31** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on amplitude of lateral head displacement of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at  $37^\circ\text{C}$

**Table 35** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on beat cross frequency (Hz) of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

group	hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
Treatment combination			
Control	25.62	26.00	25.18
R x SB 3 %	31.96	28.08	23.36
R x SF 3 %	30.64	29.80	23.58
NR x SB 3 %	28.76	27.00	25.60
NR x SF 3 %	29.20	28.10	24.76
<i>p</i> -value	----->0.05-----		
Seminal plasma removal			
R	31.30	28.94	24.04
NR	28.98	27.55	25.18
Sources of lecithin			
SB 3%	30.36	27.54	24.48
SF 3%	29.92	28.95	23.17
<i>Pooled S.E.</i>	1.21	1.29	1.7



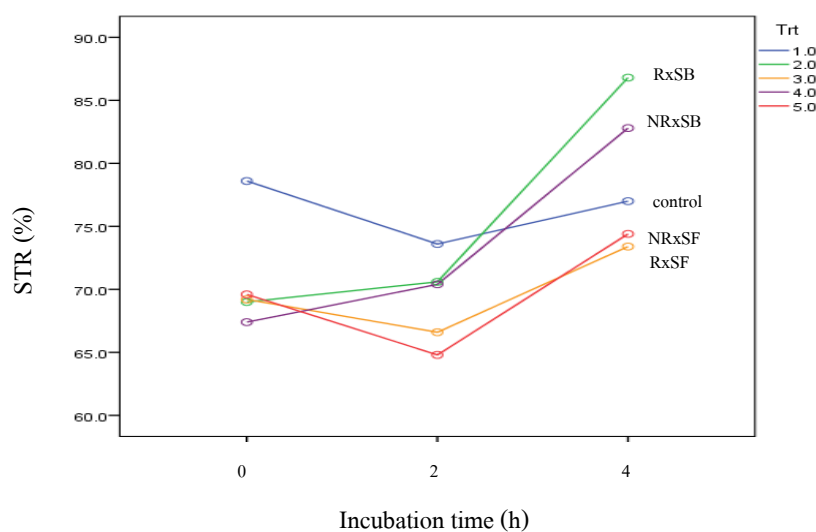
**Figure 32** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on beat cross frequency of post-thawed sperm after thawing (0 hour) , 2 and 4 hour of incubation at 37°C



**Table 36** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on straightness percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

group	hour of incubation at 37°C (h)		
	0	2	4
Treatment combination			
Control	78.60	73.60	77.00
R x SB 3 %	69.00	70.60	81.40
R x SF 3 %	69.20	66.60	73.40
NR x SB 3 %	67.40	70.40	82.80
NR x SF 3 %	69.60	64.80	84.20
<i>p</i> -value	----->0.05-----		
Seminal plasma removal			
R	69.10	68.60	77.40
NR	68.50	67.60	83.50
Sources of lecithin			
SB 3%	68.20	70.50 <sup>a</sup>	82.10 <sup>a</sup>
SF 3%	69.40	65.70 <sup>b</sup>	78.80 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	>0.05	<0.05	<0.05
<i>Pooled S.E.</i>	1.00	1.22	2.35

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

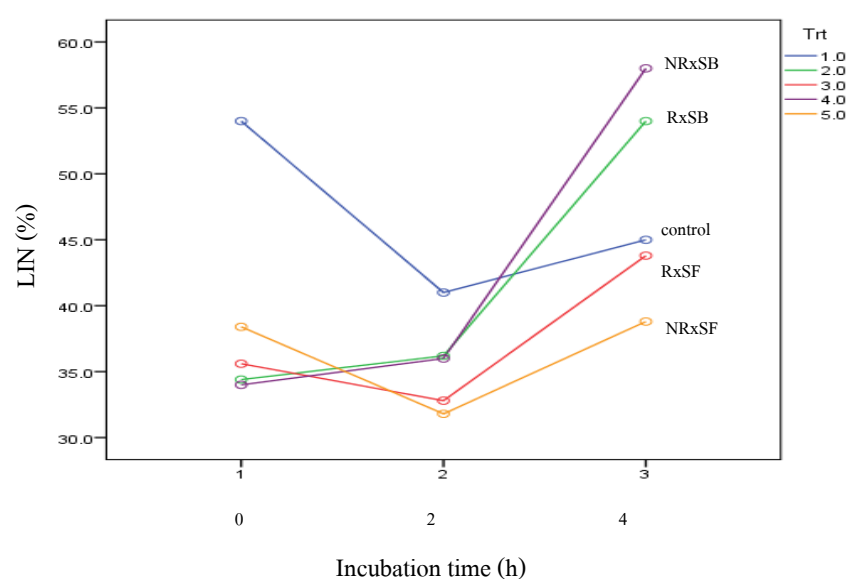


**Figure 33** Effects of sources of lecithin-based extender and incubation time on straightness percentage of post-thawed sperm

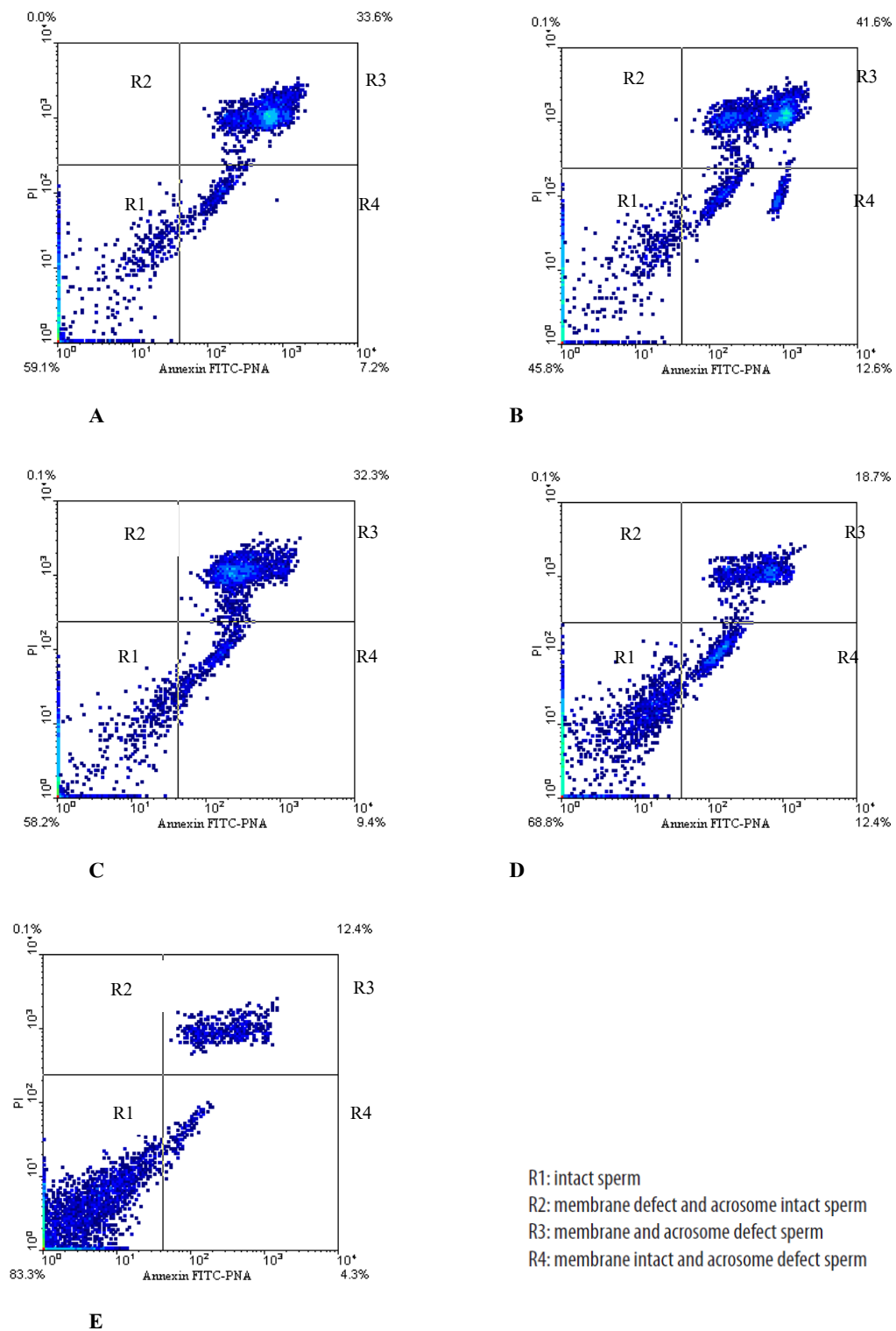
**Table 37** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on linearity percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C

group	hour of incubation at 37°C (h)			Overall mean
	0	2	4	
<b>Treatment combination</b>				
Control	54.00	41.00	45.00	-
R x SB 3 %	34.40	36.20	54.00	-
R x SF 3 %	35.60	32.80	43.80	-
NR x SB 3 %	34.00	36.00	58.00	-
NR x SF 3 %	38.40	31.80	38.80	-
<i>p</i> -value	----->0.05-----			-
<b>Seminal plasma removal</b>				
R	35.00	34.50	46.30	-
NR	36.20	33.90	54.50	-
<b>Sources of lecithin</b>				
SB 3%	34.20	36.10	53.40	42.10 <sup>a</sup>
SF 3%	37.00	32.30	47.40	36.86 <sup>b</sup>
<i>p</i> -value	----->0.05-----			<0.05
<i>Pooled S.E.</i>	1.58	1.54	3.55	-

<sup>a, b</sup> Different superscripts within column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )



**Figure 34** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on linearity percentage of post-thawed sperm after thawing (0 hour), 2 and 4 hour of incubation at 37°C



**Figure 35** Dotplot (example) of flow cytometry analysis of membrane sperm and acrosome integrity (FITC-PNA/PI) of frozen-thawed sperm after thawing at 37°C (**A**: RxSB, **B**: RxSF, **C**: NRxSB, **D**: NRxSF and **E**: control group)

**Table 38** Effects of seminal plasma removal and sources of lecithin-based extender on sperm membrane and acrosome integrity of frozen-thawed sperm after thawing

group	Parameters (%)			
	MAI	MDAI	MAD	MIAD
Treatment combination				
<i>Control</i>	56.82	0.12	37.22	9.60
R x SB 3 %	42.44	0.20	43.12	14.26
R x SF 3 %	40.42	0.10	45.68	13.78
NR x SB 3 %	36.68	0.34	51.94	11.18
NR x SF 3 %	47.70	0.12	41.20	11.00
<i>p</i> -Value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Seminal plasma removal				
R	41.43	0.15	44.40	14.02
NR	42.19	0.23	46.57	11.09
Sources of lecithin				
SB 3%	39.56	0.27	47.53	12.72
SF 3%	44.06	0.11	43.44	12.39
<i>Pooled S.E.</i>	0.35	2.47	2.60	0.78

MAI: membrane acrosome intact sperm, MDAI: membrane defect and acrosome intact sperm, MIAD: membrane intact and acrosome defect sperm, MAD: membrane and acrosome defect sperm

## วิจารณ์ผลการทดลอง

สารป้องกันการซ็อก เนื่องจากความเย็นเป็นส่วนประกอบสำคัญในสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อ ได้แก่ สารในกลุ่มฟอสโฟไลปิด หรือ เลซิติน ทำหน้าที่เป็นเหมือนฟิล์มเคลือบผิวตัวอสุจิ หรือเข้าแทนที่ฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิตามธรรมชาติในระหว่างการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง และช่วยจับยึดกับโปรตีนที่เรียกว่า บินเดอร์สเปิร์ม (binder of sperm, BSP) เพื่อยืดอายุการสูญเสียเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างการบ่มน้ำเชื้อไว้ในรูปแบบที่เป็นของเหลว (Manjunath, 2012) แหล่งของเลซิตินที่นิยมเติมในสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อมากที่สุด คือ ไข่แดง แต่การใช้ไข่แดงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของสัตว์ เป็นอุปสรรคในการพัฒนาสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อ (extender) ในเชิงการค้า ทำให้ยากต่อการพัฒนาต่อยอดให้ได้มาตรฐาน ดังนั้น การหาทางเลือกโดยใช้เลซินจากพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเติมเลซิตินจากถั่วเหลือง และ เลซิตินจากเมล็ดทานตะวันในระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่ปั่นแยกและไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมาออก ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็ว การเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซมหลังละลาย มีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า เลซิตินจากพืชทั้งสองแหล่งที่ศึกษาสามารถป้องกันความเสียหายแก่ ตัวอสุจิจากกระบวนการแช่แข็ง ได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาผลการบ่มน้ำเชื้อหลังละลายในอ่างน้ำอุ่น ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังละลายโดยจำลองสภาพแวดล้อมภายในมดลูกอย่างง่าย (*in-vitro*) พบว่า กลุ่มที่เติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวันในระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การเคลื่อนที่ทั้งหมด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในช่วงเวลาที่ 4 มีค่าสูงกว่าการเติมเลซิตินจากถั่วเหลือง ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจาก ในองค์ประกอบของ เลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โอมิกา 6 และโอมิกา 9 อาจจะช่วยลด หรือ ชะลอการเสื่อมของ เยื่อหุ้มเซลล์ อสุจิมีชีวิตที่เกิดจากการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในระหว่างการบ่มน้ำเชื้อในรูปของเหลว ทำให้เกิดของเสีย เรียกว่า สารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งไม่พบในแหล่งเลซิตินจากถั่วเหลืองที่นำมาศึกษาครั้งนี้ สนับสนุนโดยรายงานของ Takahashi และคณะ (2012) พบว่าการเสริมโอมิกา 6 ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเจี๊องงน้ำเชื้อโค สำหรับการแช่แข็ง ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมีค่าสูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า คุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายของกลุ่มที่เติมเลซิตินจากถั่วเหลืองและจากเมล็ดทานตะวันในระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

กลุ่มที่ใช้ไข่แดง 20 เฟอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาในการแช่แข็งน้ำเชื้อของ Burcu และ คณะ (2014) พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังละลาย ในกลุ่มที่เติมไข่แดง 20 เฟอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $p < 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 1.0 , 3.0 และ 6.0 เฟอร์เซ็นต์ ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดทริส-เบส ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากในองค์ประกอบของไข่แดงมีเลซิดินอยู่ในปริมาณมาก เมื่อทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา เพื่อแยกเอ็นไซม์ phospholipase A ซึ่งเป็นตัวการทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไข่แดงออกแล้ว จึงทำให้ฟอสโฟไลปิดในไข่แดงสามารถทำหน้าที่ได้ปกป้องเซลล์อสุจิได้ดีขึ้น และ ในไข่ ยังมีองค์ประกอบโคเลสเตอรอล โคลิโปรตีน รวมทั้ง วิตามินอี ที่สนับสนุนการมีชีวิตรอดของอสุจิ นอกจากนี้ เลซิดินจากไข่แดงมีคุณสมบัติ emulsion สามารถแตกตัวได้ดีกว่าเลซิดินจากพืช (Palacios and Wang, 2005) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Salmani และคณะ(2014) ซึ่งพบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลือง ( $L-\alpha$ -phosphatidylcholine  $\geq 30\%$ ) ที่ระดับ 1.5 เฟอร์เซ็นต์ สามารถปกป้องเซลล์อสุจิจากการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งได้ไม่แตกต่างกับการเติมไข่แดงที่ระดับ 15 เฟอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกันผลการศึกษาของ Forouzanfar และคณะ (2010) รายงานว่า ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแกะด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตรที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลือง ( $L-\alpha$ -phosphatidylcholine  $\geq 30\%$ ) ที่ระดับ 1.0 เฟอร์เซ็นต์ ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและจำนวนอสุจิมีชีวิต มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จากรายงานนี้ยังพบว่า ส่งผลให้อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* fertilization) มีค่าไม่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้ อาจจะ เนื่อง มาจากองค์ประกอบ ของเลซิดินจากงานทดลองดังกล่าวแตกต่างกับเลซิดินที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ( $L-\alpha$ -phosphatidylcholine 15-20 %)

การวัดคุณภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อด้วยการตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซม เป็นวิธีการวัดประสิทธิภาพของตัวอสุจิโดยตรง เนื่องจากถ้าเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซมเสียหาย จะส่งผลให้เอ็นไซม์จากภายในตัวอสุจิ และเอ็นไซม์ที่อยู่ในส่วนของโครโมโซมออกมา ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านั้น มีบทบาทสำคัญต่อตัวอสุจิ เช่น กระบวนการเมตาบอลิซึม และกระบวนการปฏิสนธิไข่ (fertilization) จะส่งผลให้อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมลดลง (Graham and Mocè, 2005) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเติมเลซิดินจากพืชทั้งสองชนิดที่ระดับ 3 เฟอร์เซ็นต์ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ทั้งปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา สามารถป้องกันความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซมจากการลดอุณหภูมิและการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะได้ ไม่แตกต่างกับว่าการเติมไข่แดง ที่ระดับ 20 เฟอร์เซ็นต์ ที่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา สอดคล้องกับการศึกษาของ Salmani และคณะ(2014) ซึ่งพบว่า การแช่แข็ง

น้ำเชื้อแพะด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เติมเลซิตินจากถั่วเหลือง ที่ระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้จำนวนอสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์ ไม่แตกต่างกับการเติมไข่แดง 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า การเติม ฟอสโฟลิปิด จากแหล่งของพืชทั้งสองชนิดและไข่แดง ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ช่วยให้เกิดการเข้าจับแทนที่ ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (bio-membrane of sperm) ส่งผลให้ตัวอสุจิสามารถทนต่อการลดอุณหภูมิอย่างมากและการแช่แข็งได้ ไม่แตกต่างกัน (Martinez-Pastor *et al.*, 2010)

### สรุปผลการทดลอง

1. การใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองและเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการช็อกจากความเย็น การปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ไม่ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งแตกต่างกัน
2. การใช้เลซิตินจากพืชทั้งสองชนิด ที่ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิจากการแช่แข็งได้ไม่แตกต่างกัน ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิและจำนวนอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์หลังละลายมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่การเติมเลซิตินจากเมล็ดทานตะวัน ซึ่งมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดความเสียหายของอสุจิระหว่างการบ่มในรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าเลซิตินจากถั่วเหลือง
3. การใช้เลซิตินจากพืชทั้งสองชนิด เป็นสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็น มีค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาก่อนเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### สรุป

การศึกษาผลของการปั่นแยกและไม่ปั่นแยก เซมินอลพลาสมา ร่วมกับแหล่งของเลซิดินที่ระดับเหมาะสมในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง สรุปผลได้ดังนี้ เลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน สามารถเติมลงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแพะสำหรับการแช่แข็งได้ที่ระดับ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่จำเป็นต้องปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ก่อนเติมสารละลายเจือจาง นอกจากนี้ ยังพบว่า การเติมเลซิดินจากเมล็ดทานตะวันซึ่งมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ โอเมกา 6 อยู่สูง อาจจะช่วยลดหรือชะลอความเสียหายของตัวอสุจิหลังละลายในระหว่างการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าการเติมเลซิดินจากถั่วเหลือง อย่างไรก็ตาม คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลายจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลืองและเลซิดินจากเมล็ดทานตะวัน เป็นสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็น ทั้งที่ปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา มีค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เติมไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ก่อนเติมสารละลายเจือจาง

#### ข้อเสนอแนะ

1. หากมีการศึกษาการใช้เลซิดินจากพืชทั้งสองชนิดในครั้งต่อไป ควรศึกษาร่วมกับระดับของกลีเซอรอล เนื่องจากเป็นส่วนประกอบอีกตัวหนึ่งที่มีสัมพันธ์กัน มีผลต่อความสามารถในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ
2. เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 2 และ 4 ชั่วโมงของกลุ่มควบคุม (ใช้ไข่แดงและปั่นแยกเซมินอลพลาสมา) มีค่าลดลงในสัดส่วนที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมเลซิดินจากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาในการบ่มน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น การใช้แหล่งเลซิดินจากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน เป็นสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็นได้ดีกว่าไข่แดง จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไป
3. เพื่อให้ผลการศึกษาที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ควรนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ไปทำการทดลองผสมเทียม เพื่อศึกษาอัตราการผสมติดในแพะต่อไป



### เอกสารอ้างอิง

- กอบแก้ว บำรุงไทย , ปวีรนุช บานไม่รู้โรย , ศิริพันธ์ พิสมัย และ เฟื่อง ธรรมรักษ์ . 2555. การ  
 แชน้ำเชื้อโคโคโดยใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับ  
 สารละลายน้ำเชื้อที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง. ว.สัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.  
 22(1): 51-61.
- จตุพร ป็องกัน , ชไมพร วรจักร และ วันประเสริฐ ทุมพะลา. 2557. การศึกษาผลของการปั่นแยก  
 เซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแชน้ำ . รายงานประชุมวิชาการ ครั้งที่ 10 ณ  
 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 11-12 กันยายน 2557 หน้า 436-441.
- ณรงค์ เลียงเจริญ, อนนท์ เทืองสันเทียะ, จตุพร พงษ์เพ็ง และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2550. การ  
 เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแชน้ำแพะจากการผลิตโดยใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีปริมาณ  
 ไข่แดง 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์. กรุงเทพฯ : สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์  
 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล . 2551. คู่มือการปฏิบัติงานการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียม.  
 กรุงเทพฯ : สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและ  
 สหกรณ์.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลียงเจริญ และ อนนท์ เทืองสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อ  
 แชน้ำแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus® Bioexcel® และ Egg Yolk  
 Tris. ว.เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 3: 51-61.
- วนิดา หมั่นถนอม . 2552. ผลของฤดูกาลและสายพันธุ์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะที่เลี้ยงภายใต้สภาวะ  
 แวดล้อมแบบร้อนชื้น.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนนท์ เทืองสันเทียะ, จตุพร พงษ์เพ็ง, บันลือ กล้าพูล และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2551. คุณภาพของ  
 น้ำเชื้อแพะแชน้ำจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา. รายงาน  
 ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 11-12 มิถุนายน  
 2551 หน้า 222-228.

- Aboagla, E. M. and T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step preservative on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62: 1160- 1172.
- Ajadi, T. A., M. O. Oyeyemi and R. A. Ajadi. 2012. Snail mucus enhances the motility of fresh goat semen preserved in egg yolk extender. *Israel J. Vet. Med.* 67(1): 60-66.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard., J. L. Courtens and M. Anton. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61: 895-907.
- Azerêdo, G. A., C. R. Esper and K. T. Resende. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin. Res.* 41: 257-263.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1997. *Applied Animal Reproduction*. 4<sup>th</sup> ed. Mississippi: Mississippi State University.
- Bispo, C. A. S., G. Pugliesi, P. Galvao, M. T. Rodrigues, P. G. Ker, B. Filgueiras, and G. R. Carvalho. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 100: 54-58.
- Bousseau, S., J. P. Brillard, L. Marquant, B. Guienne, B. Guerin, A. Camus and M. Lechat. 1998. 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*. 50: 699-706.
- Burcu, U., A. Selim, N. Zekeriya, S. Hakan and K. Soylu. 2014. Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *J. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 20(3): 393-398.

- Chelucci, S., V. Pasciu, S. Succu, D. Addis, G. G. Leoni, M. E. Manca and S. Naitana. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 83: 1064-1074
- Choe, C. Y., J. G. Kim, S. R. Cho, D. S. Son, Y. K. Kim, S. Balasubramanian, S.Y. Choe and G.J. Rho. 2006. Influence of season, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *J. Reprod. Dom. Anim.* 41: 55-60.
- Cooper, G. M. and R. E. Hausman. 2004. *The Cell A Molecular Approach*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press: United States of America.
- Crespilho, A. M., M. F. Sa' Filho, J. A. Dell'Aqua Jr, M. Nichi, G. A. Monteiro, B. R. Avanzi, A. Martins and O. F. Papa. 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen egg yolk or new lecithin based extenders. *J. Lives. Sci.* 149: 1-6.
- Deka, B. B. and A.R. Rao. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Ind. Vet. J.* 64: 591-594.
- Eiman, M. A. and T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62: 1160-1172.
- Evans, G. and W. M .C. Maxwell. 1987. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. 4<sup>th</sup> ed. New Zealand: Butterworths, Wellington.
- Flesch, F. M. and B. M. Gadella. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. acta.* 1469: 197-235.
- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S. M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, Nili, N. H. R. Rahmani and M. H. Nasr-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73: 480-487.

- Fukuhara, R. and Y. Nishikawa. 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 44: 266–270.
- Girma, A. 2009. Reproduction in Sheep and Goat. Available at:  
[http://www.esgpip.org/handbook/Handbook\\_PDF/production Sheep and Goats.pdf](http://www.esgpip.org/handbook/Handbook_PDF/production%20Sheep%20and%20Goats.pdf)  
(Accessed on May, 20, 2016).
- Graham, H. and P. Aman. 1984. A comparison between degradation *in vitro* and *in sacco* of constituents of untreated and ammoniated-treated barley straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10: 199-211.
- Graham, J. K. and E. Mocè. 2005. Fertility evaluation of frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 64: 492-504.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger. p. 405-439.
- Iritani, A., U. Nishikawa and R. Fukuhara. 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm: I. localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. *Proceedings for the Silver Jubilee: The Laboratory of Animal Husbandry, College of Agriculture, Kyoto University.* pp. 89–96.
- Iritani, A. and Y. Nishikawa. 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Japan J. Anim. Reprod.* 8(4): 113-117.
- Jones, R. C. and I. C. A. Martin. 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C in the ultrastructure to ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35: 311-320.
- Joshi, A., A. K. Mathur, S. M. K. Naqvi and J. P. Mittal. 2006. Influence of osmolality of complete semen extender on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 12: 1716-1721.

- Juyena, N. S. and C. Stelletta. 2012. Seminal plasma composition: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.* 33: 536-551.
- Kundu, C.N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh and G.C. Majumder. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology.* 40: 117-125.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Love A. J., B. W. Yun, V. Laval, G. J. Loake and J. L. Milner. 2005. Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 139: 935-948.
- Manjunath, P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *J. Anim. Reprod.* 9: 809-815.
- Mann, T. 1954. *The biochemistry of semen.* New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Martinez-Pastor, F., M. Mata-Campuzano, M. Alvarez-Rodriguez, M. Alvarez, L. Anel and P. Paz. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 67-78.
- Mathur, A. K., S. Tyagi and S. P. Singh. 2002. Frieswal bull - an experience of HF with Sahiwal. *J. Livest. Poultry Prod.* 18: 21-23.
- Mocè, E., E. Blanch, C. Toma and J. K. Graham. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *J. Reprod. Dom. Anim.* 45: 57-66.
- Mohammed, K. M., M. H. Khalil and A. M. Saef. 2012. Effect of genetic group, semen diluents and freezing regimens on sperm freezability and goat reproductivity. *Aust. J. Vet. Med.* 58:7-16.

- Palacios, L. E. and T. Wang. 2005. Egg-yolk lecithin fractionation and characterization. *J. Food Sci. Tech.* 44: 763-769.
- Paz, P., M. C. Estesoa, M. Alvareza, M. Matak, C.A. Chamorro and L. Anela. 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology.* 74: 663-671.
- Pellicer-Rubio, M.T., T. Magallon and Y. Combarous. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to bulbourethral 60 kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57(5): 1023-1031.
- Phutikanit, N., E. Sangkrachang, J. Suwimonteerabutr and J. Singlor. 2011. Effect of sources and concentrations of soybean phosphatidylcholine on diluted goat semen equilibrated at 4°C. *J. Agri. Sci. Tech.* 1: 1170-1173.
- Priyadharsini, R., S. K. Jindal, D. Sharma, N. Ramachandran, S. D. Karche and A. K. Goel. 2011. Effect of different egg yolk level on the cryopreservation capability of Jakhrana goat semen. *J. Anim. Sci. Adv.* 1: 28-37.
- Purdy, P. 2006. A review on goat cryopreservation. *Small Rumin Res.* 63: 215-225.
- Ramukhithi, F. V., T. Nedambale, B. Sutherland and K. C. Lehloenya. 2011. Cryopreservation of south african indigenous goat semen. *Afr. J. Biotech.* 77: 17898-17902.
- Rasul, Z., M. Anzar, S. Jalali and N. Ahmad. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 31-41.
- Reed M. L., P. C. Ezeh, A. Hamic, D. J. Thompson and C. L. Caperton. 2009. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting post thaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertil. Steril.* 92: 1787-90.

- Ritar, A. J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 305-312.
- Rodriguez, K. O. and H. Martin. 1994. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packed in plastic bags. *J. Vet. Med. Series A.* 41: 37-47.
- Roy, A. 1957. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's glands of the goat. *J. Natre.* 179: 318-319.
- Salmani, H., A. Towhidi, M. Zhandi, M. Bahreini and M. Shara. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology.* 68: 276-280.
- Salmin, H., I. Kustono and E. Baliarti. 2012. The effect of semen washing and soybean lecithin level on motility and viability of ram spermatozoa stored at 5 c. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 37: 244-249.
- SAS. 1999. SAS/STAT Procedure Guide Version 6.12 Edition. New York: SAS Institute, Inc.
- Schulze, C. 1979. Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man. *Cell Tissue Res.* 9: 191-198.
- Sharma, R. and A. Agarwal. 2014. Spermatogenesis: An Overview. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/Spermatogenesis\\_An\\_Overview.pdf](https://www.researchgate.net/publication/Spermatogenesis_An_Overview.pdf) (Accessed on May, 20, 2016).
- Sheriff, D. S. and E. F. Ali. 2010. Perspective on plasma membrane cholesterol efflux and spermatozoal function. *J. Hum. Reprod. Sci.* 3: 68-75.
- Sias, B., F. Ferrato, M. T. Pellicer-Rubio, Y. Forgerit, P. Guillouet and B. Leboeuf. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1686: 169-80.

- Situmorang, P. 2002. The effects of inclusion of exogenous phospholipid in tris-diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *JITV*. 7(3): 181-187
- Takahashi, T., R. Itoh, H. Nishinomiya, M. Katoh and N. Manabe. 2012. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Domest. Anim.* 47: 92-97.
- The Solae Company. 2014. Introduction to the use of lecithins. Available at: [http://www.lecitina.it/pdf/Introduction to use of lecithins.pdf](http://www.lecitina.it/pdf/Introduction%20to%20use%20of%20lecithins.pdf). (Accessed on January, 12, 2016).
- Thomas, C. A., D. L. Garner, J. M. DeJarnette and C. E. Marshall. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58: 786-793.
- Tuli, R. K. and W. Holtz. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT- release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*. 42: 547-555.
- Tuli, R. K. and W. Holtz. 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the Northern temperate zone. *Theriogenology*. 43:1359-1363.
- Tuli, R. K., R. Schmidt-Baulain and W. Holtz. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25: 125-131.
- Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J. E. Oliver and R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 107-121.



- Wahjuningsih, S. 2012. Study of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on quality of frozen semen of etawah crossbreed goat. Proceeding of The 14<sup>th</sup> animal science congress of the asian australasian association of animal production societies. pingtung, Taiwan 23-27 August 2010.
- Watson, P. F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °c by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62: 483-492.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *J. Reprod. Fertil. Dev.*7: 871-891.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 481-492.
- Whittier, W. D. 2000. Predicting Bull Fertility. Available at:  
<http://www.ext.vt.edu/pubs/beef/400-009.html> (Accessed on January, 12. 2016).
- Yimer, N., Kaka A., R. Yusoff and A. W. Haron. 2016. The roles of antioxidants and fatty acids in sperm cryopreservation. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/65571>
- Zamfirescu, S. and D. Nadolu. 2009. Results concerning the freezing protability of buck semen and fecundity after artificial insemination of goat. *J. Anim.Vet.* 52: 80-88.

## ตารางภาคผนวก

**Appendix Table 1** Composition, pH and osmotic pressure (mOsm/kg) of the different freezing media dissolved with Tris-base with 7% glycerol

Extender	pH	Osmotic pressure
SB 1.5%	7.0	1320
SB 3.0%	6.8	1349
SB 4.5%	6.8	1358
SB 6.0%	6.8	1410
SF 1.5%	6.9	1330
SF 3.0%	6.8	1336
SF 4.5%	6.7	1365
SF 6.0%	6.7	1386
EY 20%	6.7	1380





**Table 28** Summary of analysis of variance for total motility (MOT), progressive motility (PMT), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curve-line velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN) and viability of frozen-thawed sperm with and without seminal plasma remove and sources of lecithin based-extender compared to egg yolk extender and incubation time at 37°C

Source of variation	Level of significance (P-value)								
	MOT	PMT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Incubation time	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Treatment	<0.05	<0.05	<0.05	ns	<0.05	ns	ns	ns	ns
AB	<0.05	ns	<0.05	ns	<0.05	ns	ns	ns	ns
A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	ns	ns	<0.05	<0.05
Incubation time x treatment	<0.05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Incubation time x AB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Incubation time x A	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Incubation time x B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.05	ns

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายจิตศักดิ์ เมืองเขียว

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610620012

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
เทคโนโลยีการผลิตสัตว์ (โคนม-โคเนื้อ)	สถาบันเทคโนโลยี การเกษตรแม่โจ้	2537

## ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิชาการสัตวบาลชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี กรมปศุสัตว์

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

จิตศักดิ์ เมืองเขียว และชาญยุทธ กาพล . 2550. ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อช่วงห่าง การให้ลูกของโคพื้นเมืองและโคลูกผสมชาโรเลส์ในพื้นที่ภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย . วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2 (1): 57-65.

จิตศักดิ์ เมืองเขียว และชาญยุทธ กาพล . 2551. อิทธิพลของความสมบูรณ์ร่างกายก่อนคลอดต่อ ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์. [www.dld.go.th/biotech](http://www.dld.go.th/biotech)

จิตศักดิ์ เมืองเขียว และรัชชัย โพธิ์คำ . 2555. สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อพันธุ์ลูกผสม บราห์มันในพื้นที่ภาคใต้. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 7 (1): 52-55.

Maungkhiow, J., C. Kaphol and T. Thepparat. 2014. Efficacy of estrus synchronization methods with fixed-time artificial insemination in admixture bred goat. Proceeding in 16th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP) Congress, November 10-14, 2014, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.

จิตศักดิ์ เมืองเขียว, ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ และรัชจิรา เทพรรัตน์. 2559. ผลของเลซิดินจาก เมล็ดทานตะวันระดับต่างๆ ในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง. วารสาร แก่นเกษตร. 44 (2): 271-278.