

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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

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

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

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

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

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

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ร่วมกับการใช้ Glycerol ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

## 1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

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

1.3.2 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

#### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

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

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

การทดลองที่ 2 ทำการเลือกพรีทเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 มาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ และการเปลี่ยนแปลงของการเกิด DNA methylation ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

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