

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์

4.1.1 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) ส่งผลให้มีอัตราการเคลื่อนที่รวมของเซลล์อสุจิ ($50.60 \pm 0.31\%$) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($30.75 \pm 0.77\%$) และอัตราการมีชีวิต ($62.00 \pm 0.77\%$) สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ต่ำกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต เท่ากับ $55.00 \pm 0.61\%$, $36.20 \pm 0.97\%$ และ $87.75 \pm 0.82\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Treatment	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
1	34.50 ± 0.95^e	19.55 ± 0.88^d	35.50 ± 0.92^d
2	39.20 ± 1.02^d	20.10 ± 1.01^d	47.00 ± 0.56^c
3	47.15 ± 0.44^c	26.35 ± 1.11^c	30.50 ± 0.99^e
4	50.60 ± 0.31^b	30.75 ± 0.77^b	62.00 ± 0.77^b
5	55.00 ± 0.61^a	36.20 ± 0.97^a	87.75 ± 0.82^a

หมายเหตุ : สาร Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้

T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk;

T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การใช้ Combination ของสาร Cryoprotectant ระหว่าง Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) สามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็งได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การใช้ Glycerol ที่เป็นสาร Cryoprotectant ชนิดซึมผ่านเซลล์ จะช่วยป้องกันการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิ รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ และ การใช้ Egg yolk ที่เป็นแหล่งเลซิธินจากสัตว์ เป็นสาร Cryoprotectant ชนิดไม่ซึมผ่านเซลล์ ช่วยป้องกันการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งรอบนอกเซลล์ นอกจากนี้ Egg yolk มีส่วนประกอบของ Phospholipid ชนิด Phosphatidylcholine (PC) 73%, Phosphatidylethanolamine (PE) 15%, Sphingomyelin (SM) 2.5%, Phosphatidylserine (PS) 0.9% และ Phosphatidylinositol (PI) 0.6% (Zhao *et al.*, 2023) ในขณะที่ Soybean lecithin ที่เป็นแหล่งเลซิธินที่มาจากพืช มี Phospholipid ชนิด PC 30.8%, PE 32.5%, PI 27.9% และ Phosphatidic acid (PA) 8.8% (Jala *et al.*, 2016) ซึ่ง Egg yolk มี Phospholipid ชนิด PC, SM, และ PS สูงกว่าใน Soybean lecithin โดย PC มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเข้าออกของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ควบคุมการซึมผ่านของน้ำตาลแลคโตส ช่วยในกระบวนการจัดเรียงโครงสร้างของโมเลกุลไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ป้องกันการถูกทำลายของอะโครโซม ช่วยรักษาความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และมีผลโดยตรงต่อกระบวนการปฏิสนธิ (Shan *et al.*, 2021) PS และ SM มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ Sperm capacitation ช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ (Penalva *et al.*, 2013; Rival *et al.*, 2019; Whitlock and Chernomordik, 2021) อีกทั้งเซลล์อสุจิของแพะประกอบด้วยกลุ่มไขมันที่สำคัญคือ กลุ่มของ Phospholipid ชนิด PC 36%, PE 25%, SM 11%, และไขมันกลุ่มอื่นๆ (Rana *et al.*, 1991) ซึ่งกลุ่มของ Phospholipid เหล่านี้จะถูกทำลายจากภาวะเครียดออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง

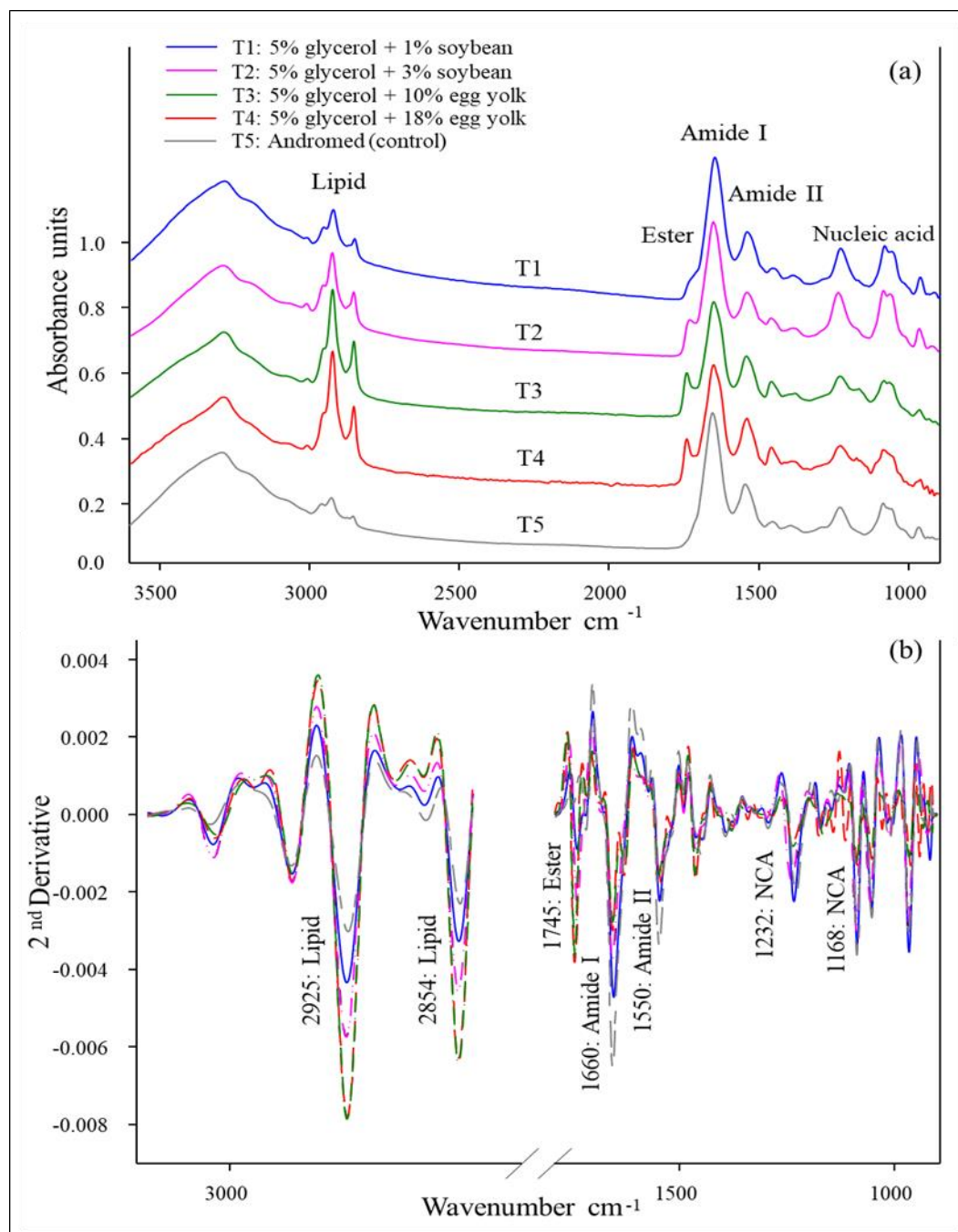
นอกจากนี้ พบว่า การใช้ Soybean lecithin 1% และ Egg yolk 10% ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Soybean lecithin 3% และ Egg yolk 18% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่ต่ำเกินไป อาจไม่เพียงพอต่อการปกป้องเซลล์อสุจิจากความเสียหายที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งได้ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์อสุจิ ส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ลดการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลง Forouzanfar *et al.* (2010) รายงานว่า ความเข้มข้นของ Soybean lecithin (2%) ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Soybean lecithin 1% ในขณะที่ความเข้มข้นของ Egg yolk (20%) ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การ

เคลื่อนที่ และการมีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Egg yolk 15% ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ชนิดและความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร Extender และพันธุ์ของสัตว์ที่ศึกษา

4.1.2 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง ที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงซินโครตรอน ร่วมกับเทคนิค FTIR โดยกำหนดช่วงสเปกตรัมที่ศึกษา $4000-900\text{ cm}^{-1}$ พบแบบแผนสเปกตรัมตามองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์อสุจิ ได้แก่ Lipid, Ester lipid, Amide I protein, Amide II protein และ Nucleic acid โดยแสดงพื้นที่ใต้กราฟที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (a) สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (b) และสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (Integral area) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในเซลล์อสุจิแพะแช่แข็ง ได้แก่ 1) Lipid (CH_2/CH_3 ใน fatty acid) ในช่วงสเปกตรัม $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 2) Ester lipid ($\text{C}=\text{O}$ stretching of lipid ester, phospholipid) ในช่วงสเปกตรัม $1750-1700\text{ cm}^{-1}$ 3) Amide I protein ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ 4) Amide II protein ในช่วงสเปกตรัม $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ และ 5) Nucleic acid (Carbohydrate, Sugar, Fingerprint region; DNA และ RNA) ในช่วงสเปกตรัม $1250-900\text{ cm}^{-1}$ (Pachetti *et al.*, 2020; Pongsetkul *et al.*, 2023) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากการศึกษา พบว่า ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง มีส่วนประกอบของโปรตีน Amide I และ Lipid เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ การใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% (T4) ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของ Lipid และ Ester lipid สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk เป็นแหล่งของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low-density lipoprotein; LDL) ช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซมจากอันตรายที่เกิดจากการแช่แข็ง โดย Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลักที่ประกอบด้วย Triglycerides (62%), Phospholipids (33%), และ Cholesterol (5%) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่น มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ กระบวนการ Sperm capacitation ปฏิกริยาอะโครโซม (Acrosome reaction) และกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ (Swelum *et al.*, 2018) นอกจากนี้ พบว่าการใช้ Soybean lecithin และสูตรทางการค้า มีเปอร์เซ็นต์ของ Lipid และ Ester lipid ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารเสริม Egg yolk ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 4.2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โดยปกติใน Soybean lecithin มีปริมาณของ Lipid และ Cholesterol ซึ่งต่ำกว่า Egg yolk ประกอบกับปริมาณของ Lipid ที่ลดลงในเซลล์อสุจิ อาจทำให้ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมไปถึงเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณอะโครโซมลดลง ซึ่ง Simon *et al.* (2013) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ Lipid บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ส่งผลให้ความสำเร็จของเซลล์อสุจิ และอัตราการผสมติดลดลง



ภาพที่ 4.1 Average absorbance FTIR spectra ในช่วงสเปกตรัม 4000–900 cm^{-1} โดยแสดงพื้นที่ใต้กราฟที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ (a) และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับสอง (b) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

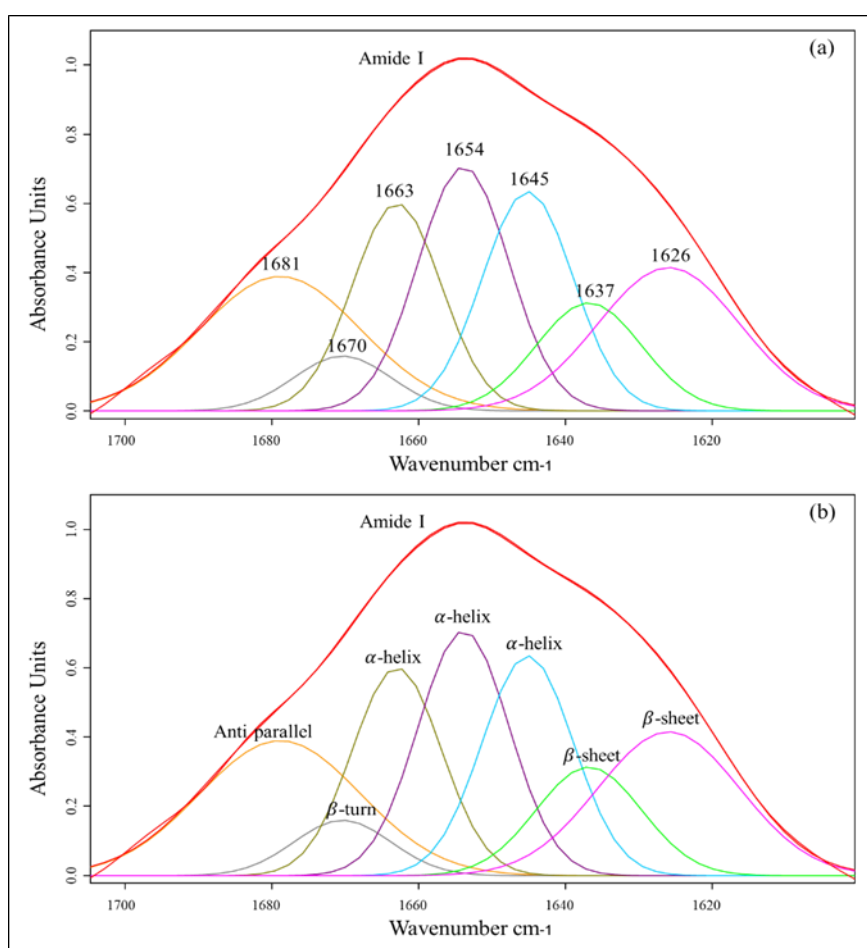
ตารางที่ 4.2 ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Biomolecule (wavenumber cm ⁻¹)	Integral area (%)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Lipid (3000-2800)	23.20 $\pm$ 0.36 ^d	26.56 $\pm$ 0.53 ^c	39.00 $\pm$ 0.76 ^b	41.28 $\pm$ 0.73 ^a	10.32 $\pm$ 0.04 ^e
Ester (1750-1700)	1.54 $\pm$ 0.00 ^c	1.58 $\pm$ 0.06 ^c	4.71 $\pm$ 0.37 ^b	5.52 $\pm$ 0.20 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^d
Amide I (1700-1600)	40.91 $\pm$ 0.29 ^b	40.71 $\pm$ 0.13 ^b	30.83 $\pm$ 0.59 ^c	30.54 $\pm$ 0.71 ^c	57.83 $\pm$ 0.18 ^a
Amide II (1600-1500)	9.55 $\pm$ 0.29 ^b	7.81 $\pm$ 0.38 ^c	8.80 $\pm$ 0.16 ^b	9.49 $\pm$ 0.25 ^b	13.23 $\pm$ 0.01 ^a
Nucleic acid (1250-900)	24.81 $\pm$ 0.32 ^a	23.34 $\pm$ 0.20 ^b	16.67 $\pm$ 0.33 ^d	13.17 $\pm$ 0.49 ^e	18.62 $\pm$ 0.12 ^c

หมายเหตุ : สาร Tris-base extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้ T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk; T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์สัดส่วนโดยการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุลโปรตีน Amide I ในช่วงสเปกตรัม 1700-1600 cm⁻¹ โดยโปรตีนทุติยภูมิของ Amide I ประกอบด้วย β -sheet ในช่วงสเปกตรัม 1640-1620 cm⁻¹, α -helix ในช่วงสเปกตรัม 1670-1640 cm⁻¹, β -turn ในช่วงสเปกตรัม 1678-1670 cm⁻¹, และ β -antiparallel ในช่วงสเปกตรัม 1695-1680 cm⁻¹ (Pachetti *et al.*, 2020; Pongsetkul *et al.*, 2023) ที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่า กลุ่มที่ใช้ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% (T4) มีเปอร์เซ็นต์ของ β -sheet (30.21 $\pm$ 1.00) ไม่แตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา (P>0.05) นอกจากนี้ยังพบว่า T4 มีเปอร์เซ็นต์ของ α -helix เท่ากับ 49.74 $\pm$ 1.29 ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในส่วนของ β -turn และ β -antiparallel พบว่า ไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk เป็นแหล่งของไลโปโปรตีนที่สำคัญ คือ Lipovitellin, Phosvitin, และ Vitellogenin (Vg) โดยเฉพาะ Vg ซึ่งมีความสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์ และมีบทบาทในการทำงานร่วมกันกับไขมัน นอกจากนี้ Havukainen *et al.* (2013) รายงานว่า Vg มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการจับ Phospholipid ชนิด PC และ PS บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถลด ROS ปกป้องเซลล์จากการเกิด H₂O₂ และช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ และพบว่า มีโครงสร้าง α -helix เป็นส่วนประกอบหลัก โดย Cheng *et al.* (2013) และ Cheignon *et al.* (2018) รายงานว่า โครงสร้าง α -helix จะช่วยเพิ่มความเสถียรให้แก่โปรตีน ส่งผลต่อ

โครงสร้างเซลล์อสุจิ และพบว่า โปรตีนบางชนิดที่มีโครงสร้าง α -helix เป็นส่วนประกอบ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์อสุจิ เช่น โปรตีนชนิด Tubulin และ Dynein ที่พบทั้งใน Egg yolk และเซลล์อสุจิ โดยโปรตีน Tubulin เป็นส่วนประกอบของ Microtubules ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนไหวของ Flagellum (Bhagwat *et al.*, 2014) และโปรตีน Dynein ซึ่งช่วยให้ Microtubules ภายใน Flagellum เคลื่อนที่ได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (Levkova *et al.*, 2022) นอกจากนี้ โปรตีน Phospholipase C zeta ที่พบในเซลล์อสุจิ ทำหน้าที่ที่กระตุ้นเซลล์ไข่ และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการปฏิสนธิ (Parrella *et al.*, 2024) ในขณะเดียวกัน β -sheet เกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนที่ผิดปกติ ที่เกิดจากการออกซิเดชัน เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pachetti *et al.* (2020) และ Shivanoor and David (2015) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ของ α -helix ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกระบวนการ Sperm capacitation ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ β -sheet ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิลดลง นอกจากนี้ β -turn และ β -antiparallel อาจช่วยรักษาสมดุลโครงสร้างของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ β -turn และ β -antiparallel ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์อสุจิ



ภาพที่ 4.2 การวิเคราะห์สัดส่วนโดยการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุลโปรตีน Amide I ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ โดยในช่วงสเปกตรัม $1640-1620\text{ cm}^{-1}$, $1670-1640\text{ cm}^{-1}$, $1678-1670\text{ cm}^{-1}$, และ $1695-1680\text{ cm}^{-1}$ (a) แสดงถึงโปรตีนทุติยภูมิของ Amide I ประกอบด้วย β -sheet, α -helix, β -turn และ β -antiparallel ตามลำดับ (b)

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซนต์ Curve fitting ของโปรตีนทุติยภูมิ Amide I ในช่วงสเปกตรัม $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง (Mean $\pm$ SE).

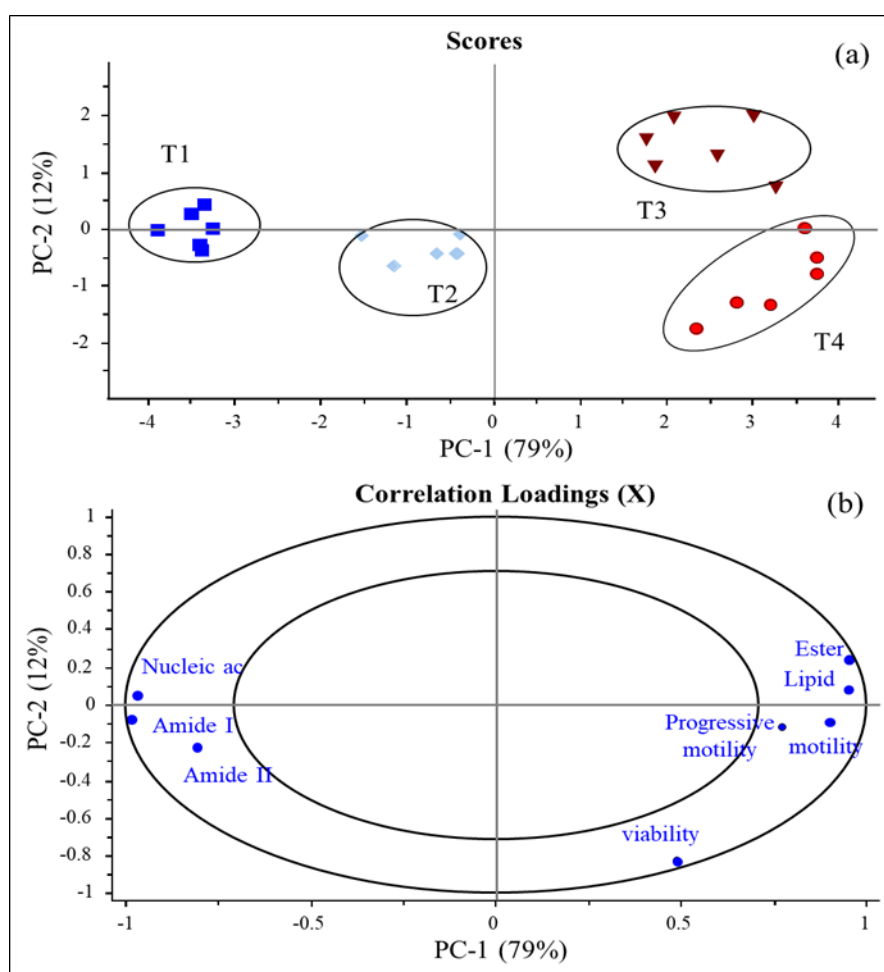
Biomolecule (wavenumber cm^{-1})	Curve fitting (%)				
	T1	T2	T3	T4	T5
β -sheet (1640-1620)	29.05 $\pm$ 0.54 ^a	30.72 $\pm$ 0.92 ^a	29.78 $\pm$ 1.00 ^a	30.21 $\pm$ 1.00 ^a	29.89 $\pm$ 0.97 ^a
α -helix (1670-1640)	42.73 $\pm$ 0.30 ^c	43.85 $\pm$ 0.39 ^{bc}	46.54 $\pm$ 0.90 ^b	49.74 $\pm$ 1.29 ^a	45.36 $\pm$ 1.20 ^{bc}
β -turn (1678-1670)	6.71 $\pm$ 0.72 ^a	6.09 $\pm$ 0.60 ^a	6.84 $\pm$ 0.64 ^a	3.72 $\pm$ 0.77 ^b	5.68 $\pm$ 0.42 ^{ab}
Antiparallel (1695-1680)	21.51 $\pm$ 0.98 ^a	19.34 $\pm$ 1.42 ^{ab}	16.84 $\pm$ 0.39 ^b	16.33 $\pm$ 0.44 ^b	19.07 $\pm$ 0.86 ^{ab}

หมายเหตุ : สาร Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของสาร Cryoprotectant ดังนี้

T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk; T5: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลความสัมพันธ์ของ PCA scores plot และ Correlation loading ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะบอร์ จากภาพ PCA scores plot ในภาพ 4.3 สามารถแบ่งกลุ่มของทรีตเมนต์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ Glycerol ร่วมกับ Soybean lecithin (T1 และ T2) และกลุ่มที่ใช้ Glycerol ร่วมกับ Egg yolk (T3 และ T4) เป็นสาร Cryoprotectant ซึ่งแยกออกจากกันด้วย PC-1 ที่ 79% และจากภาพ Correlation loading ในภาพ 4.3 พบว่ากลุ่มที่ใช้ Glycerol 5% ร่วมกับ Egg yolk 18% (T4) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ Lipid อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต นอกจากนี้กลุ่มที่ใช้ Glycerol 5% ร่วมกับ Soybean lecithin 1% (T1) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ Nucleic acid, Amide I, และ Amide II แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งสูงกว่าใน Soybean lecithin และมีปริมาณของ Phospholipid ชนิด PC, SM, และ PS ที่สูงกว่า ที่มีหน้าที่ช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้ม

เซลล์ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ (Penalva *et al.*, 2013; Rival *et al.*, 2019) ดังนั้น การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์โนในครั้งนี้ ทำให้ผู้วิจัยคัดเลือกทรีตเมนต์ที่ใช้ คือ Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol 5% และ Egg yolk 18% เพื่อนำไปศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ในการทดลองที่ 2 ต่อไป



ภาพที่ 4.3 PCA scores plot (a) ที่ PC1 และ PC2 ของ 4 ทรีตเมนต์ที่แตกต่างกัน ดังนี้ T1: 5% Glycerol + 1% Soybean lecithin; T2: 5% Glycerol + 3% Soybean lecithin; T3: 5% Glycerol + 10% Egg yolk; T4: 5% Glycerol + 18% Egg yolk และภาพ Correlation loadings plot (b) ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์โนแบบแช่แข็ง

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

4.2.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

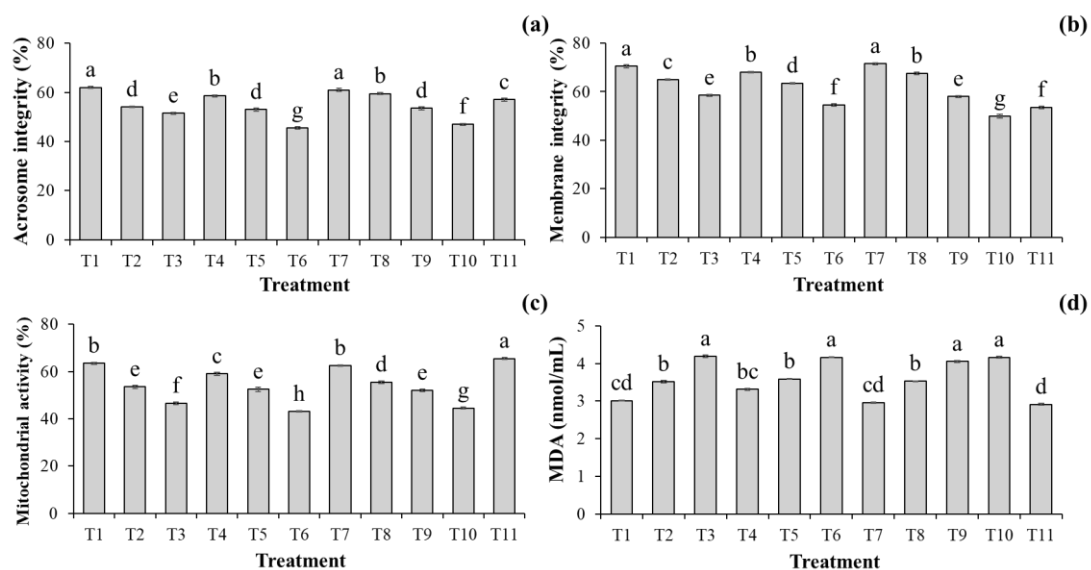
จากการศึกษาการใช้สาร Antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง พบว่า การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่รวม ($63.50 \pm 0.56\%$) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($41.15 \pm 1.02\%$) สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ต่ำกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รวม และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เท่ากับ $69.40 \pm 0.49\%$ และ $43.53 \pm 0.28\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนี้ การใช้ GSH 1 mM และ Vitamin E 1 mM สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิต ($65.50 \pm 0.92\%$, $65.00 \pm 0.37\%$) ความสมบูรณ์อะโครโซม ($62.00 \pm 0.37\%$, $61.00 \pm 0.58\%$) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ($70.50 \pm 0.56\%$, $71.50 \pm 0.43\%$) และกิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ($63.50 \pm 0.43\%$, $62.50 \pm 0.22\%$) อีกทั้งสามารถลดระดับของ MDA (3.01 nmol/mL , 2.96 nmol/mL) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์แบบ Orthogonal contrasts พบว่า การเสริมสาร Antioxidant สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง (ค่าอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ กิจกรรมของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลง) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกับสูตรทางการค้า พบว่า กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant สามารถเพิ่มความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น เมื่อใช้สารเจือจาง Tris-based extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (18%) ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แซ่แข็ง (Mean $\pm$ SE)

Antioxidant	Concentration (mM)	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
Glutathione	1.00	63.50 $\pm$ 0.56 ^b	41.15 $\pm$ 1.02 ^b	65.50 $\pm$ 0.92 ^{ab}
	3.00	55.85 $\pm$ 0.78 ^d	34.50 $\pm$ 0.78 ^d	56.00 $\pm$ 0.37 ^d
	5.00	52.10 $\pm$ 0.77 ^e	31.70 $\pm$ 0.82 ^e	53.50 $\pm$ 0.67 ^e
Cysteine	6.00	60.50 $\pm$ 0.56 ^c	38.50 $\pm$ 0.56 ^c	62.00 $\pm$ 0.82 ^c
	9.00	57.50 $\pm$ 0.76 ^d	37.57 $\pm$ 0.43 ^c	56.00 $\pm$ 0.37 ^d
	12.00	48.50 $\pm$ 1.16 ^f	28.38 $\pm$ 0.65 ^f	50.50 $\pm$ 0.43 ^f
Vitamin E	1.00	61.05 $\pm$ 1.02 ^c	38.52 $\pm$ 0.44 ^c	65.00 $\pm$ 0.37 ^b
	2.00	56.50 $\pm$ 0.43 ^d	35.05 $\pm$ 0.68 ^d	60.50 $\pm$ 0.56 ^c
	3.00	52.50 $\pm$ 1.12 ^e	30.77 $\pm$ 0.46 ^e	56.50 $\pm$ 0.43 ^d
No antioxidant		52.60 $\pm$ 0.24 ^e	31.18 $\pm$ 0.97 ^e	53.50 $\pm$ 0.22 ^e
Andromed		69.40 $\pm$ 0.49 ^a	43.53 $\pm$ 0.28 ^a	67.00 $\pm$ 0.58 ^a
Orthogonal contrasts				
1		<0.01	<0.01	<0.01
2		<0.01	<0.01	<0.01

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) Orthogonal contrasts 1 คือ กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม และ Contrasts 2 คือ กลุ่มที่เสริมสาร Antioxidant (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า



ภาพที่ 4.4 ผลของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์อะโครโซม (a) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ (b) การทำงานของไมโทคอนเดรีย (c) และระดับของ MDA (d) ของทรีตเมนต์ที่เสริมสาร Antioxidant GSH: T1, T2, และ T3 (1, 3, และ 5 mM ตามลำดับ); Cysteine: T4, T5, และ T6 (6, 9, และ 12 mM); Vitamin E: T7, T8, และ T9 (1, 2, และ 3 mM); T10: ทรีตเมนต์ที่ไม่เสริมสาร Antioxidant; T11: สูตรทางการค้า (Andromed) และตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเสริมสาร GSH ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องจาก GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ ROS และอนุมูลอิสระชนิดไนโตรเจน (Reactive nitrogen species; RNS) โดย GSH จะถูกออกซิไดซ์เป็น Oxidized glutathione (GSSG) และจะถูกเปลี่ยนให้กลับมาอยู่ในรูป GSH อีกครั้ง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glutathione reductase ร่วมกับ NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) และพร้อมที่จะจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ Lushchak (2012) พบว่า GSH สามารถทำปฏิกิริยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GPx ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ และเปลี่ยน Lipid peroxide (Lipid-OOH) ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ ทำให้การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ลดลง และลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์หลักในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณอะโครโซม ซึ่งทำหน้าที่บรรจุเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ (Gadella and Luna, 2014) นอกจากนี้ปริมาณ

ของ H_2O_2 ที่ลดลงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะโครซินที่บรรจุอยู่ในอะโครโซมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้บริเวณอะโครโซมมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Lin *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การใช้ GSH ที่ความเข้มข้นสูง (3 และ 5 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง และมีปริมาณการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ GSH 1 mM ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GSH ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้ความดันออกซิเดติกของเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลเสียต่อโครงสร้างของเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อแพะ โค และสุกร (Tuncer *et al.*, 2010; Estrada *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2021) ซึ่งรายงานว่าการใช้ความเข้มข้นของ GSH ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิหลังจากละลายลดลง

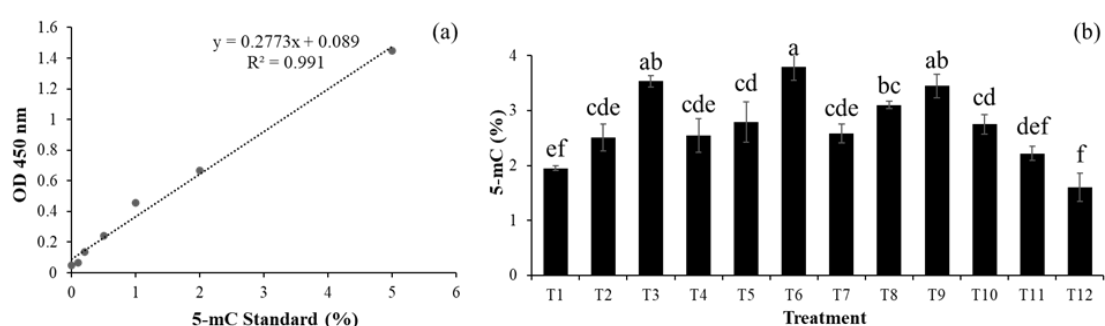
นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การเสริม Vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Vitamin E เป็นสาร Antioxidant ที่ละลายได้ดีในไขมัน มีบทบาทสำคัญในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain-breaking antioxidant) โดยการปลดปล่อยอะตอมของไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เพื่อที่จะหยุดหรือลดการเกิด Lipid peroxidation และป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) พบว่า การเสริม Vitamin E 1 mM ร่วมกับกรดอะมิโน 10 mM ลงในสาร Tris-base extender ร่วมกับ Glycerol (5%) และ Egg yolk (5%) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น อีกทั้งสามารถลดการเกิด Lipid peroxidation ได้ดีกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การศึกษาของ Anghel *et al.* (2010) พบว่า การเสริม Vitamin E (1 mM) ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะนมพันธุ์ Alpine สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม การใช้ Vitamin E ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (2 และ 3 mM) ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย) ในแพะพันธุ์บอร์ลดลง ($P < 0.05$) อีกทั้งมีปริมาณของ MDA เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ Vitamin E ที่สูงขึ้น ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันมากกว่าการเป็นสาร Antioxidant (Dewry *et al.*, 2015; Prastiya *et al.*, 2021) อีกทั้งทำให้ความสามารถในการจับอนุมูล Peroxyl ลดลง ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง (Cao and Cutler, 1993; Cerolini *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011) ซึ่ง Benhenia *et al.* (2018) รายงานว่า Vitamin E ความเข้มข้นสูง (4 และ 6 mM) ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$)

ในทำนองเดียวกัน การเสริม Cysteine ที่ความเข้มข้น 6 mM และ 9 mM ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต ดังตารางที่ 4.4) ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังภาพที่ 4.4) สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมสาร Antioxidant ($P < 0.05$) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก Cysteine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ GSH โดย GSH ที่ผลิตจาก Cysteine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GPx และช่วยกำจัด H_2O_2 ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่ทำลายเสียหายต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ จากการศึกษาของ Anghel *et al.* (2010) พบว่าการเสริม Cysteine 10 mM ในน้ำเชื้อแพะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($P < 0.05$) และการศึกษาของ Adekunle *et al.* (2022) ได้ทำการศึกษการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะกระพันธุ์ West African พบว่า เมื่อเสริม Cysteine 8 mM ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต และกระบวนการ Sperm capacitation เพิ่มขึ้น และสามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 12 mM พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ ซึ่งส่งผลเสียต่อเซลล์ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง และปริมาณความเข้มข้นของ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Memon *et al.* (2011) พบว่า การเสริม Cysteine ความเข้มข้นสูงส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลงในน้ำเชื้อแพะ และน้ำเชื้อปลา (Da Costa *et al.*, 2020)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สูตรทางการค้า มีอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และกิจกรรมของไมโทคอนเดรียสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ($P < 0.05$) แต่มีค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ต่ำกว่ากลุ่มของทรีตเมนต์ที่ทำการเสริมสาร Antioxidant (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก อัตราการเคลื่อนที่สูงแสดงถึงประสิทธิภาพในการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิต ATP ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ แต่อย่างไรก็ตาม ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และเยื่อหุ้มเซลล์อาจถูกทำลายเนื่องจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยอะโครโซมที่สมบูรณ์บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Paoli *et al.* (2011) รายงานว่า อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิขึ้นอยู่กับการทำงานของไมโทคอนเดรีย และการศึกษาของ Kommisrud *et al.* (2002) พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่ระยะเวลา 6, 30, และ 54 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ ($P > 0.05$) แต่ทำให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงในช่วงระยะเวลาการเก็บที่ 6, 30, 54, 72, และ 102 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.2.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการเกิด DNA methylation และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation พบว่า การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM, Cysteine 6 mM, และ Vitamin E 1 mM มีเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC เท่ากับ $1.95 \pm 0.05\%$, $2.51 \pm 0.25\%$, $2.54 \pm 0.31\%$, และ $2.58 \pm 0.17\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าต่ำกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การเสริม GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ($1.95 \pm 0.05\%$) ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของ 5-mC มีค่าไม่แตกต่างจากสูตรทางการค้า และน้ำเชื้อสด ที่มีเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC เท่ากับ $2.22 \pm 0.13\%$ และ $1.60 \pm 0.26\%$ ตามลำดับ ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 จากการศึกษาในครั้งนี้ การใช้ GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation อย่างไรก็ตาม การเสริมสาร Antioxidant ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (GSH 5 mM, Cysteine 9 mM และ 12 mM, Vitamin E 2 mM และ 3 mM) ส่งผลให้ค่า DNA methylation เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะทำให้การแสดงออกของยีนผิดปกติ จึงเห็นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Transcriptomic เพื่อดูการแสดงออกของยีน (Gene expression) เพิ่มเติม จากการศึกษาของ Khosravizadeh *et al.* (2022) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์ของ Cytosine methylation ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อม้าแบบแช่แข็ง ทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Aurich *et al.*, 2016) ในขณะที่ปริมาณการเกิด DNA methylation ที่ลดลง ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้ตามปกติ (Maeder *et al.*, 2013)



ภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ 5-mC (a) และระดับ 5-mC ที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของทรีตเมนต์ที่เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (b) GSH: T1, T2, และ T3 (1, 3, และ 5 mM ตามลำดับ) Cysteine: T4, T5, และ T6 (6, 9, และ 12 mM) Vitamin E: T7, T8, และ T9 (1, 2, และ 3 mM) T10: ทรีตเมนต์ที่ไม่เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ T11: สูตรทางการค้า (Andromed) T12: น้ำเชื้อสด และตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

นอกจากนี้ พบความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของเซลล์อสุจิหลังการละลาย กับระดับ DNA methylation พบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับของ DNA methylation และความสมบูรณ์อะโครโซม ($R = -0.648$) ($P < 0.05$) อัตราการเคลื่อนที่รวม ($R = -0.848$) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($R = -0.863$) อัตราการมีชีวิต ($R = -0.773$) และกิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ($R = -0.786$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 อีกทั้งพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับของ DNA methylation และระดับของ MDA ($R = 0.831$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou *et al.* (2023) พบว่า Poria cocos polysaccharides (PCPs) ในเห็ดที่มีคุณสมบัติเป็นสาร Antioxidant เมื่อเสริมที่ความเข้มข้น 600–900 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการเกิด DNA methylation ของเซลล์อสุจิได้ และพบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง DNA methylation กับอัตราการมีชีวิต กิจกรรมของไมโทคอนเดรีย ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ และความสมบูรณ์อะโครโซม ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation) กับระดับของ DNA methylation

Parameter	DNA methylation	P-value
Total motility	$r = -0.848^{**}$	0.001
Progressive motility	$r = -0.863^{**}$	0.001
Viability	$r = -0.773^{**}$	0.005
Acrosome integrity	$r = -0.648^*$	0.031
Membrane integrity	$r = -0.406$	0.215
Mitochondrial activity	$r = -0.786^{**}$	0.004
MDA	$r = 0.831^{**}$	0.002

หมายเหตุ : * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และ ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$)

นำฟริตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุด (GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM) ไปทดสอบอัตราการผสมติดเปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า (Andromed) โดยใช้เทคนิคการผสมเทียม พบว่า GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM มีอัตราการผสมติด เท่ากับ 66.67% ($n=6/9$) สูงกว่าสูตรทางการค้า ซึ่งมีอัตราการผสมติดเท่ากับ 37.50% ($n=3/8$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การใช้สาร Extender ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 321 ± 1.83 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อแพะบอร์ ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ

321±4.42 mOsm/kg สามารถรักษาความดันออสโมติกภายในเซลล์อสุจิ และการใช้ Combination ระหว่าง Glycerol (5%) ที่เป็นสาร Cryoprotectant แบบซึมผ่านเซลล์ ช่วยป้องกันการก่อตัวของ น้ำแข็งภายในเซลล์ และ Egg yolk (18%) ที่เป็นแหล่งเลซิตินจากสัตว์ ทำหน้าที่เป็นสาร Cryoprotectant แบบไม่ซึมผ่านเซลล์ โดย Egg yolk มี Lipid เป็นส่วนประกอบหลัก และมี Phospholipid ชนิด PC, PS, และ SM ซึ่งช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ อะโครโซม และไมโทคอนเดรีย ไม่ให้ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ Sperm capacitation การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ สอดคล้องกับผลจากการศึกษาในการ ทดลองที่ 1 ที่ใช้เทคนิค SR- FTIR พบว่า การใช้ Glycerol (5%) ร่วมกับ Egg yolk (18%) มีระดับ ของ Lipid และ Ester lipid สูง ซึ่งช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่น มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ เซลล์อสุจิ อีกทั้งพบระดับของโปรตีนทุติยภูมิชนิด α -helix สูง ซึ่ง α -helix ช่วยรักษาโครงสร้างของ เซลล์อสุจิ และมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ Sperm capacitation (Pachetti *et al.*, 2020) นอกจากนี้ เมื่อเสริม GSH 1 mM ลงในสูตรน้ำเชื้อดังกล่าว สามารถป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ และอะโครโซม ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ แบบแช่แข็งได้