ผลของการแช่เย็นก่อนการแช่แข็งต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์และคุณภาพอสุจิในสุนัข

นางสาวอรทัย ชัยเวชการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์-เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF COLD STORAGE PRIOR TO FREEZING ON GLUTATHIONE PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES, REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SPERM QUALITY IN DOGS

Miss Aurathai Chaivechakarn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการแช่เย็นก่อนการแช่แข็งต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์และคุณภาพอสุจิในสุนัข
โดย	นางสาว อรทัย ชัยเวชการ
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เกวลี ฉัตรดรงค์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. วิชัย ทันตศุภารักษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุดสรร ศิริไวทยพงศ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กัมพล แก้วเกษ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรทัย ชัยเวชการ: ผลของการแช่เย็นก่อนการแช่แข็งต่อการทำงานของเอนไซม์ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์และคุณภาพอสุจิในสุนัข. (EFFECTS OF COLD STORAGE PRIOR TO FREEZING ON GLUTATHIONE PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES, REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SPERM QUALITY IN DOGS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์, 51 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) ในน้ำเลี้ยงอสุจิ และอสุจิแช่เย็น และแช่แข็งในสุนัข และเปรียบเทียบผลของการเติม GPx ร่วมกับ SOD และ SOD เพียงชนิดเดียวในสารเจือจางน้ำเชื้อ การศึกษานี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง 1) รีดเก็บน้ำเชื้อสุนัขจำนวน 3 ตัว รวมน้ำเชื้อจนมีความเข้มข้น 1,200 × 10^6 ใน 1 มล. แล้วแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ทำการแช่เย็นอสุจิที่เวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่แข็ง ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง 2) รวมน้ำเชื้อจากสุนัข 2- 3 ตัว เพื่อให้มีความเข้มข้น 600 x 10^6 ใน 1 มล. จากนั้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เติม GPx (5 ยูนิต/มล.) และ SOD (100 ยูนิต/มล.) กลุ่มที่ 2 เติม SOD (100 ยูนิต/มล.) เท่านั้น กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง การประเมินคุณภาพอสุจิได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และอะโครโซม ในขณะที่การศึกษา tROS และการทำงานของ SOD และ GPx ถูกทดสอบในการทดลองที่ 1 เท่านั้น โดยพบว่าการแช่เย็นอสุจิที่เวลา 96 ชั่วโมง ทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงจาก 3 ชั่วโมง (p<0.05) การแช่แข็งอสุจิภายหลังการแช่เย็นที่เวลา 96 ชั่วโมง ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซมลดลงจาก 3 ชั่วโมง (p<0.05) การแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิในทั้ง 3 ช่วงเวลาไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ tROS และ GPx (p>0.05) ในขณะที่การแช่แข็งภายหลังการแช่เย็นตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป ทำให้ปริมาณ SOD ในน้ำเชื้อสุนัขลดลง (p<0.05) และพบว่ากลุ่มที่เติม SOD และ GPx ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อทำให้อสุจิแช่เย็น 96 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเฉพาะ SOD (p<0.05) และทำให้อัตราการมีชีวิตในอสุจิแช่แข็งที่ผ่านการทำละลายในชั่วโมงที่ 0 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (p<0.05) และมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่เติมเฉพาะ SOD (p=0.08) รวมทั้งทำให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ในอสุจิแช่แข็งที่ผ่านการทำละลายจนถึงชั่วโมงที่ 6 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (p<0.05) และมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่เติมเฉพาะ SOD (p=0.08) การศึกษานี้บ่งชี้ว่าควรขนส่งน้ำเชื้อแช่เย็นภายใน 24 ชั่วโมง แล้วทำการแช่แข็งเพื่อคงระดับคุณภาพน้ำเชื้อไว้ และการเติม GPx ร่วมกับ SOD ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสามารถป้องกันความเสียหายของการมีชีวิตของอสุจิและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ในสุนัขได้ทั้งในน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2552

5175584031 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEYWORDS : canine / antioxidative enzyme / spermatozoa / cryopreservation / ROS

AURATHAI CHAIVECHAKARN: EFFECTS OF COLD STORAGE PRIOR TO FREEZING ON GLUTATHIONE PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES, REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SPERM QUALITY IN DOGS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KAYWALEE CHATDARONG, PhD. 51 pp.

The objectives of the present study were to investigate activities of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in dog semen after chilled and frozen, and to compare effects of GPx combined with SOD and SOD alone added in the extender for chilling and freezing of dog semen. The study was divided into two experiments. Experiment 1, semen was collected from three dogs, pooled to obtain a final concentration of $1,200 \times 10^6$ /mL. The sample was divided into 3 aliquots: chilled for 3, 24 and 96 hours prior to freezing. The experiment 1 was performed with 7 repetitions. Experiment 2, semen was collected from two or three dogs and pooled to constitute 600×10^6 of total sperm. The sample was divided into 3 groups, chilled and cryopreserved in extenders supplementated with; 1) GPx (5 units/mL) combined with SOD (100 units/mL), 2) SOD (100 units/mL) alone, and 3) without antioxidative enzyme supplementation (controls). The experiment 2 was performed with 9 repetitions. All samples were evaluated for sperm quality including motility, progressive motility, viability, DNA and acrosome integrity. Total reactive oxygen species (tROS), SOD and GPx activity assays were examined in the experiment 1. The sperm chilled up to 96 hours had lower percentages of motility and progressive motility than that at 3 hours ($p < 0.05$). The frozen-thawed sperm after chilled for 96 hours had lower percentages of motility, viability and acrosome integrity than the frozen-thawed sperm after chilled for 3 hours ($p < 0.05$). The tROS and GPx activity did not change at all times after chilling and freezing ($p > 0.05$). The frozen-thawed sperm after chilled up to 24 hours had lower SOD activity than that frozen after chilled for 3 hours ($p < 0.05$). After 96 hours cold storage, sperm frozen in the extender containing GPx and SOD had higher viability than the control and the extender containing SOD alone ($p < 0.05$) whereas the other parameters were not different ($p > 0.05$). Chilled dog semen should be transported within 24 hours to a freezing centre to maintain sperm quality. Addition of GPx combined with SOD protected viability of frozen-thawed dog sperm up to 96 hours cold storage.

Department : Obstetrics Gynaecology and Reproduction Student's Signature .....

Field of Study : Theriogenology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2009

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม เลขที่สัญญา MRG-WI515S017 ปี 2551 ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีทางการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ และภาควิชาชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ขอบคุณ คุณมงคล วิภาตะศิลปิน เจ้าของฟาร์มสุนัขเอ็น วาย เคนเนล สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง และ น.สพ. วิกรม เจตนาวณิช ที่ช่วยเก็บตัวอย่าง ขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. วิชัย ทันตศุภารักษ์ หัวหน้าภาควิชา กับข้อเสนอแนะที่ดีต่าง ๆ ที่มีให้ ขอขอบคุณ รศ.สพ.ญ.ดร. เกวลี ฉัตรดรงค์ สำหรับการให้คำปรึกษา รวมทั้งความห่วงใยที่มีให้ด้วยดีเสมอมา ขอบคุณ สพ.ญ. ปวีณา ธุวะนุติ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิคในห้องปฏิบัติการ และคำแนะนำดี ๆ ในทุก ๆ เรื่องของชีวิต อุ้มรักพี่สาวคนนี้ที่สุดในโลก ขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ สำหรับข้อแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยสูติกรรม สำหรับการอำนวยความสะดวก และความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่ช่วยสร้างบรรยากาศ “ความเป็นภาคสูติ ฯ” ให้เป็นเช่นนี้ เรารู้สึกดีจริง ๆ ตลอดจนขอขอบคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวถึงซึ่งมีส่วนช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ขอบคุณพี่เอ็กซ์ สำหรับทุกความห่วงใยที่มีให้ ทุกกำลังใจ รวมทั้งการดูแลของพี่ ที่ทำให้อุ้มไม่เคยรู้สึกว่า “ขาด” เลยสักวัน สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ป๊า ม๊า ที่ทำให้อุ้มมีวันนี้ ความสำเร็จทุกอย่างในชีวิตจะเกิดขึ้นไม่ได้เลย ถ้าไม่มีป๊า และ ม๊าคอยอยู่เคียงข้างอุ้มตลอดเวลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญรูปภาพ.....ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ข้อตกลงเบื้องต้น..... 2

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

วิธีดำเนินการวิจัย..... 3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

แนวคิด และทฤษฎี.....4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

การเก็บรักษาอสุจิ.... 4

สาเหตุของความเสียหายของอสุจิ....6

ผลกระทบของ oxidative stress ต่อการทำงานของอสุจิ....7

สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อสุนัข....7

ผลของกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส ต่อการทำงานของอสุจิ....8

3. วิธีดำเนินการวิจัย....11

สัตว์ทดลอง....11

การคัดเลือกและแบ่งกลุ่มตัวอย่าง....11

การรีดเก็บน้ำเชื้อ....11

การประเมินคุณภาพอสุจิ....12

สารเจือจางน้ำเชื้อ....14

การแช่เย็นน้ำเชื้อ....15

การแช่แข็งน้ำเชื้อ....15

การละลายอสุจิแช่แข็ง....16

สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติมสาร GPx และ SOD....16

การสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์อสุจิ....16

การตรวจวัดปฏิกิริยาของกลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GPx).... 16

การตรวจวัดปฏิกิริยาของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD).... 17

การวัด รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์รวม (tROS)....18

บทที่ หน้า

แผนการทดลอง....18

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.... 21

4. ผลการทดลอง.... 23

การทำงานของ SOD และ GPx ในน้ำเลี้ยงอสุจิในน้ำเชื้อสดของสุนัข.... 23

ผลของระยะเวลาการแช่เย็นต่อคุณภาพอสุจิ.... 23

ผลของการแช่เย็นก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพอสุจิ....23

ผลของการเติมเอนไซม์ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็น....24

ผลของการเติมเอนไซม์ในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง.... 24

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.... 30

รายการอ้างอิง....34

ภาคผนวก....43

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1 แสดงส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 (EE-I) และ 2 (EE-II) สารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อทำละลาย.....15

ตารางที่ 2 ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส และกลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดสในน้ำเลี้ยงอสุจิในน้ำเชื้อสดของสุนัขแต่ละตัว.....25

ตารางที่ 3 คุณภาพอสุจิสุนัขภายหลังการแช่เย็นและแช่แข็งในแต่ละช่วงเวลา.....26

ตารางที่ 4 คุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็น โดยใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (กลุ่มควบคุม) มีการเติมกลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GPx) ร่วมกับ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) และเติม ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) ชนิดเดียว.....27

ตารางที่ 5 คุณภาพอสุจิสุนัขแช่แข็งภายหลังการแช่เย็น 3 ชั่วโมง ในสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแช่เย็นที่มีการเติมสาร GPx ร่วมกับ SOD และ SOD ชนิดเดียว และไม่เติมสารใด ๆ (กลุ่มควบคุม) ในชั่วโมงที่ 0 และ 6 ภายหลังการละลายอสุจิ 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	ระบบป้องกันของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx).....	10
รูปที่ 2	แผนภาพแสดงการทดลองที่ 1.....	19
รูปที่ 3	แผนภาพแสดงการทดลองที่ 2.....	20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความสนใจเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นก่อนนำไปแช่แข็งมีมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะในสถานที่หรือฟาร์มที่ตั้งอยู่ห่างไกลจากห้องปฏิบัติการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งต้องทำการแช่เย็นน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่ง ในระหว่างการแช่เย็น อสุจิที่มีชีวิตมีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ คือ รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ (reactive oxygen species-ROS) (Silva, 2006) การสะสม ROS ในระดับที่เกินสมดุล จะเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า ออกซิเดทิฟ สเตรส (oxidative stress) ทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย ทั้งอัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (Agarwal et al., 2003) รวมทั้งในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็งมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS เช่นกัน (England and Ponzio, 1996) การรักษาสมดุลของระดับ ROS ในธรรมชาติ เป็นผลจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) และภายในเซลล์อสุจิเอง (Storey, 1997) มีรายงานการเติมสารต้านอนุมูลอิสระประเภทที่ไม่ใช่เอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี (vitamin E) วิตามินบี 12 (vitamin B12) และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ เช่น คะตาเลส (catalase) ในสารเจือจางน้ำเชื้อสุนัข สามารถลดระดับ ROS ลงได้ (Michael et al., 2009) ในขณะที่บางรายงานพบว่า catalase ทำให้คุณภาพอสุจิแช่แข็งดีขึ้น แต่ไม่ลดการสร้าง ROS (Michael et al., 2007) กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione perxoidase-GPx) หรือซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase-SOD) ในสารเจือจางน้ำเชื้อแกะ ช่วยลดความสูญเสียอัตราการเคลื่อนที่ และความเสียหายของอะโครโซมของอสุจิ (Maxwell and Stojanov, 1996) นอกจากนี้ GPx ยังป้องกันการสูญเสียอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิโคได้ (Bilodeau et al., 2001) การศึกษาการใช้สารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน พบว่าการเติม SOD ร่วมกับ catalase ให้ผลดีกับคุณภาพอสุจิหลังการแช่แข็งของมนุษย์มากกว่าการใช้ SOD ชนิดเดียว (Rossi et al., 2001) ในสุนัขมีการศึกษาพบว่า GPx และ SOD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลเมตาบอลิซึมของอสุจิในน้ำ

เลี้ยงอสุจิและอสุจิ (Strzezek et al., 2009) แต่ยังไม่มีการตรวจวัดระดับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์สองชนิดนี้ในระหว่างการแช่แข็งภายหลังการแช่เย็นในสุนัข ในทางปฏิบัติทั่วไป ก่อนการแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิสุนัข มีการแยกน้ำเลี้ยงอสุจิออกก่อน (Rota et al., 1995) ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์เหล่านี้หมดไปด้วย การเติมเอนไซม์ดังกล่าวในสารเจือจางน้ำเชื้อจึงอาจช่วยเพิ่มคุณภาพอสุจิในระหว่างการเก็บรักษา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดปริมาณของ GPx และ SOD ในเซลล์อสุจิและน้ำเลี้ยงอสุจิของสุนัขในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง และตรวจวัดปริมาณ ROS ในน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็นและแช่แข็ง
2. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพอสุจิของสุนัขหลังการแช่เย็นและแช่แข็ง ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม GPx ร่วมกับ SOD

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณ GPx และ SOD และปริมาณของ ROS ที่เปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อสุจิและน้ำเลี้ยงอสุจิสุนัขในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคุณภาพอสุจิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ดังนี้ อัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และอะโครโซม
2. เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิของสุนัขหลังการแช่เย็นและแช่แข็ง ในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม GPx ร่วมกับ SOD กับสารเจือจางน้ำเชื้อที่เติม SOD ชนิดเดียว และสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

ข้อตกลงเบื้องต้น

คัดเลือกสุนัขที่ให้น้ำเชื้อมีอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 70% และอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าหรือเท่ากับ 70% จึงจะผ่านเกณฑ์และใช้ในการทดลองได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ROS หมายถึง Reactive oxygen species (สารอนุมูลอิสระ)

SOD หมายถึง สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ superoxide dismutase

GPx หมายถึง สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ glutathione peroxidase

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปริมาณ SOD และ GPx ในน้ำเชื้อสดของสุนัข
2. ทราบถึงปริมาณ SOD และ GPx การสะสมของ ROS และคุณภาพอสุจิในระหว่างการแช่เย็นและภายหลังการแช่แข็ง
3. ทราบถึงผลของการแช่เย็นน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพอสุจิของสุนัข
4. ทราบถึงผลของการเติม SOD และ GPx ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยเชิงวิเคราะห์ไปข้างหน้า (Prospective analytical research)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

1. กระบวนการแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของ ROS
2. สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ คือ SOD และ GPx ที่มีในอสุจิจะลดลงหลังการแช่เย็นและแช่แข็ง
3. การเติม SOD และ GPx ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิช่วยรักษาคุณภาพของอสุจิจากการถูกทำลายโดยการแช่เย็นและแช่แข็งได้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเก็บรักษาอสุจิ

โดยทั่วไปการแช่เย็นน้ำเชื้อสุนัขที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาอสุจิเป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อลดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์อสุจิ (Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995) การแช่เย็นน้ำเชื้อสุนัขตามอุณหภูมิข้างต้นจะสามารถรักษาคุณภาพอสุจิได้นานกว่า 3 สัปดาห์ และผสมติดได้เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อไว้นาน 10 วัน (Verstegen et al., 2005) England and Ponzio (1996) พบว่า ควรทำการแช่เย็นอสุจิก่อนแช่แข็ง และไม่ควรแช่เย็นนานกว่า 4.9 วัน หลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ เนื่องจากใน 2 วันแรก หลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ อสุจิที่แช่เย็นมีคุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าอสุจิแช่แข็ง สำหรับหน้าที่ของสารเจือจางสำหรับแช่เย็นน้ำเชื้อคือช่วยป้องกันอสุจิจากผลกระทบอันเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ลดการเคลื่อนที่ของอสุจิ เพิ่มอัตราการปฏิสนธิโดยลดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์อสุจิ ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง และออสโมลาลิตี้ รวมทั้งเป็นแหล่งพลังงานให้อสุจิ (Foote and Leonard, 1964) นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะในสารเจือจางน้ำเชื้อยังยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Salisbury et al., 1978) ดังนั้นส่วนประกอบต่างๆ ที่รวมอยู่ในสารเจือจางน้ำเชื้อ มีความสำคัญต่ออสุจิในระหว่างการขนส่งน้ำเชื้อไปยังสถานที่ต่างๆ ก่อนที่จะทำการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

สารละลายทริส ซิเตรต (tris-citrate buffer) ที่มีส่วนผสมของไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการเก็บรักษาอสุจิสุนัข ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสดีที่สุด เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ (Rota et al.,

1995) และในตัวสัตว์โดยวัดอัตราการตั้งท้อง (Linde-Forsberg et al., 1999) รวมทั้งยังมีการศึกษาการเติมสารต่างๆ ลงในสารเจือจางสำหรับแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อสุนัข เพื่อพัฒนาคุณภาพอสุจิ เช่น น้ำตาล สารลดแรงตึงผิว กรดอะมิโน และสารต้านอนุมูลอิสระ (Ponglowhapan et al., 2004; Luvoni, 2006)

น้ำตาล

น้ำตาลเติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแช่เย็นและแช่แข็ง เพื่อช่วยป้องกันปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ (Ponglowhapan et al., 2004) แบ่งออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และแมนโนส (mannose) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แลกโตส (lactose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) แรฟฟิโนส (raffinose) และอาราบีโนส (arabenose) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานให้อสุจิ และเป็นสารป้องกันการแข็งตัว (Seager, 1969; England, 1993; Aisen et al., 2002) เนื่องจากอสุจิมีความไวต่อการเกิด osmotic stress น้ำตาลที่ถูกเติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแช่เย็นและแช่แข็งอสุจิจะช่วยคงระดับของแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ไว้ (Songsasen et al., 2002)

สารลดแรงตึงผิว

สารเอส ดี เอส (SDS; Sodium dodecyl sulphate) เป็นองค์ประกอบหลักของสารอีเควก เอสทีเอ็ม เพสต์ (Equex STM paste) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ถูกเติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มคุณภาพอสุจิแช่แข็งภายหลังการละลาย (Axnér et al., 2004; Luvoni, 2006; Chatdarong et al., 2008; Ponglowhapan and Chatdarong, 2008) พบว่าการเติม Equex STM paste ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อจะช่วยรักษาสภาพความสมบูรณ์ของอะโครโซม และรักษาการมีชีวิตของอสุจิสุนัขได้ (Ponglowhapan and Chatdarong, 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด แต่คาดว่า สาร SDS จะช่วยปรับโครงสร้างของไลโปโปรตีนในไข่แดง จึงป้องกันผนังเซลล์จากการถูกทำลายด้วยความเย็นในขั้นตอนการแช่แข็งอสุจิ (Rota et al., 1997)

กรดอะมิโน

กรดอะมิโน เช่น ทอรีน (taurine) ไฮโปทอรีน (hypotaurine) โปรลีน (proline) ซิสทีอีน (cysteine) เอ็น อะเซ็สทิล ซิสทีอีน (N-acetyl cysteine; NAC) และกลูต้าไธโอน (glutathione) มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าการเติมโปรลีนในสารเจือจางน้ำเชื้อ ช่วยเพิ่มการ

เคลื่อนที่ของอสุจิสุนัข การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Peña et al., 1998) ในขณะที่การเติมสาร NAC ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อแช่เย็น สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของอสุจิในสุนัขได้ (Michael et al., 2008)

สารต้านอนุมูลอิสระ

หน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย ROS หรือสารอนุมูลอิสระอื่นๆ (Halliwell, 1997) สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามการทำงาน คือ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ เช่น คาตาเลส (catalase) กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) และชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopheral) วิตามินเอ (retinol) กรดยูริค (uric acid) และวิตามินซี (ascorbic acids) (Silva, 2006)

มีหลายการศึกษารายงานผลของการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในสารเจือจางน้ำเชื้อ เช่น กลูต้าไธโอน วิตามินอี และวิตามินซี ช่วยเพิ่มคุณภาพของอสุจิได้ในมนุษย์ (Askasi et al., 1994) สุกร (Peña et al., 2003; Funahashi and Sano, 2005) โค (Bilodeau et al., 2001) ม้า (Alemeida and Ball, 2005) และสุนัข (Michael et al., 2007)

สาเหตุของความเสียหายของอสุจิ

แม้ว่าจะมีการพัฒนาสารเจือจางน้ำเชื้ออย่างต่อเนื่อง เนื่องจากทำให้คุณภาพอสุจิหลังการแช่แข็งดีขึ้นได้ แต่กระบวนการเก็บรักษาอสุจิโดยใช้ความเย็นมีด้วยกันหลายขั้นตอน เช่น การปั่นการเจือจางอสุจิ การแช่เย็น การแช่แข็ง และการอุ่นละลาย (Luvoni, 2006) โดยในแต่ละขั้นตอนทำอันตรายต่ออสุจิ ทั้งในแง่การสูญเสียหน้าที่ของอสุจิ ไปจนถึงประสิทธิภาพในการปฏิสนธิลดลง โดยสาเหตุหลักที่การแช่แข็งทำอันตรายต่ออสุจิ คือ การช็อคเนื่องจากความเย็น (cold shock) osmotic stress (Watson, 2000) และ oxidative stress (Aitken and Krausz, 2001; Sikka, 2001; Agarwal et al., 2003) อย่างไรก็ตามสาเหตุในเรื่อง cold shock และ osmotic stress เป็นที่แน่นอนแล้วว่าทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย แต่บทบาทของ oxidative stress ยังไม่เป็นที่แน่ชัด มีหลายการศึกษากล่าวว่า oxidative stress โน้มนำให้เกิดความเสียหายที่ผนังเซลล์และดีเอ็นเอของอสุจิในมนุษย์ (Aitken, 1999; Agarwal et al., 2003) ม้า (Baumber et al., 2000, 2003) แกะ (Peris et al., 2007) และโค (Bilodeau et al., 2001, 2002; Nair et al., 2006)

ผลกระทบของ oxidative stress ต่อการทำงานของอสุจิ

Oxidative stress เกิดขึ้นจากความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้าง ROS กับการทำลาย ROS (Sikka, 2001; Agarwal et al., 2003) ROS หรือสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide radicals (O_2^-) และ hydroxyl radicals (OH^-) คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวซึ่งพยายามจู่โจมเข้าสู่เซลล์อื่นเพื่อจับคู่อิเล็กตรอนให้เข้าคู่กัน (Nogushi and Niki, 1999) โดยทั่วไปแล้ว ROS ในน้ำเชื้อถูกสร้างจากอสุจิและเม็ดเลือดขาวที่อยู่ในน้ำเชื้อ (Engel et al., 1999; Silva, 2006) การสร้างและการสะสมของ ROS ที่มากเกินไปส่งผลเสียต่ออสุจิ (Griveau and Le Lannou, 1997; Neild et al., 2002) มีหลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ROS ได้แก่ superoxide radicals (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ทำลายผนังเซลล์และดีเอ็นเอของอสุจิในโค (Chatterjee and Gagnon, 2001) มนุษย์ (Aitken and Krausz, 2001) และม้า (Baumber et al., 2000)

เนื่องจากผนังเซลล์อสุจิมี Polyunsaturated fatty acids (PUFA) เป็นส่วนประกอบหลัก (Alvarez and Storey, 1995) จึงถูกทำลายได้ง่ายด้วย ROS เช่น hydroxyl radicals (OH^-) กลไกนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาลิปิด เปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) (Agarwal et al., 2003) ปฏิกิริยา lipid peroxidation ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ initiation, propagation และ termination (Noguchi and Niki, 1999) โดยในขั้นตอนสุดท้ายนั้นสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Silva, 2006) นอกจากนี้ Storey (1997) พบว่า ปฏิกิริยา lipid peroxidation ส่งผลเสียต่อผนังเซลล์อสุจิทำให้อสุจิสูญเสียการเคลื่อนที่ รวมทั้งระดับ ROS จะถูกสร้างมากขึ้นจากการแช่แข็ง และอุ่นละลายน้ำเชื้อของมนุษย์ (Mazzilli et al., 1995) และโค (Chatterjee and Gagnon, 2001) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระที่มีตามธรรมชาติในน้ำเชื้อ ได้แก่ กลูต้าไธโอนและ SOD ลดลง (Alvarez and Storey, 1992; Bilodeau et al., 2000) ทำให้กล่าวได้ว่า ROS เป็นสาเหตุหลักของการทำให้อสุจิถูกทำลาย

สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อสุนัข

อสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ เพื่อช่วยป้องกันสภาวะ oxidative stress นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงอสุจิยังมีระบบที่ช่วยป้องกันผนังเซลล์ของอสุจิไม่ให้ถูกทำลายจากสภาวะ lipid peroxidation (Lenzi et al., 2002) การผสมพันธุตามธรรมชาติ อสุจิจะอยู่ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนซึ่งจะทำให้การสร้าง ROS ลดลง และยังพบว่าน้ำเลี้ยงท่อนำไข่ในสัตว์

เลี้ยงลูกด้วยนมมีทอรีนเป็นองค์ประกอบ (Miller and Shultz, 1987) ซึ่งเป็นสารที่ลดการสะสมของ ROS (Alvarez and Storey, 1983; Holmes et al., 1992) นอกจากนี้ SOD ที่พบอยู่ในน้ำเชื้อสุนัขยังป้องกันการเกิด oxidative stress ที่จะทำอันตรายต่ออสุจิได้ (Cassani et al., 2005; Hatamoto et al., 2006)

กระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS และ ROS ที่มีปริมาณมากเกินไปจะทำอันตรายต่ออสุจิ เช่น สูญเสียการเคลื่อนที่และทำลายดีเอ็นเอ (Aitken and Clarkson, 1988; Storey, 1997; Bilodeau et al., 2001) มีรายงานว่าการทำน้ำเชื้อแช่เย็น และการละลายในน้ำเชื้อโคจะส่งผลให้มีการสร้าง superoxide radicals (O_2^-) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็น ROS ชนิดหนึ่ง (Chatterjee and Gagnon, 2001) มีหลายรายงานชี้ให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระช่วยรักษาคุณภาพของอสุจิแช่แข็งในสุนัขได้ภายหลังการทำละลาย ด้วยเหตุนี้เองจึงมีความพยายามในการเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของอสุจิในสัตว์หลายๆ ชนิด การเติม catalase ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อให้ผลในการเพิ่มคุณภาพของอสุจิสุนัขมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ vitamin C, NAC, taurine, vitamin E และ B16 (Micheal et al., 2007) สอดคล้องกับการเติม cystein หรือ vitamin E ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อช่วยรักษาคุณภาพของอสุจิแช่แข็งในแมวได้ ซึ่งได้มาจากท่อพักน้ำเชื้อ (epididymal sperm) (Thuwanut et al., 2009)

ผลของกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) ต่อการทำงานของอสุจิ

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์หลักที่ช่วยต่อต้านการสะสมของ ROS (O_2^- และ H_2O_2) ในน้ำเชื้อสุนัขมีอยู่ด้วยกัน 2 ระบบคือ SOD และ glutathione peroxidase/reductase pair (GPx/GR) (Strzezek et al., 2009) และยังมีรายงานว่า GPx และ SOD ที่ถูกสร้างจากท่อนำน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดกับอสุจิ ในขณะที่ถูกสะสมในท่อพักน้ำเชื้อส่วนท้าย (cauda epididymis) (Perry et al., 1992)

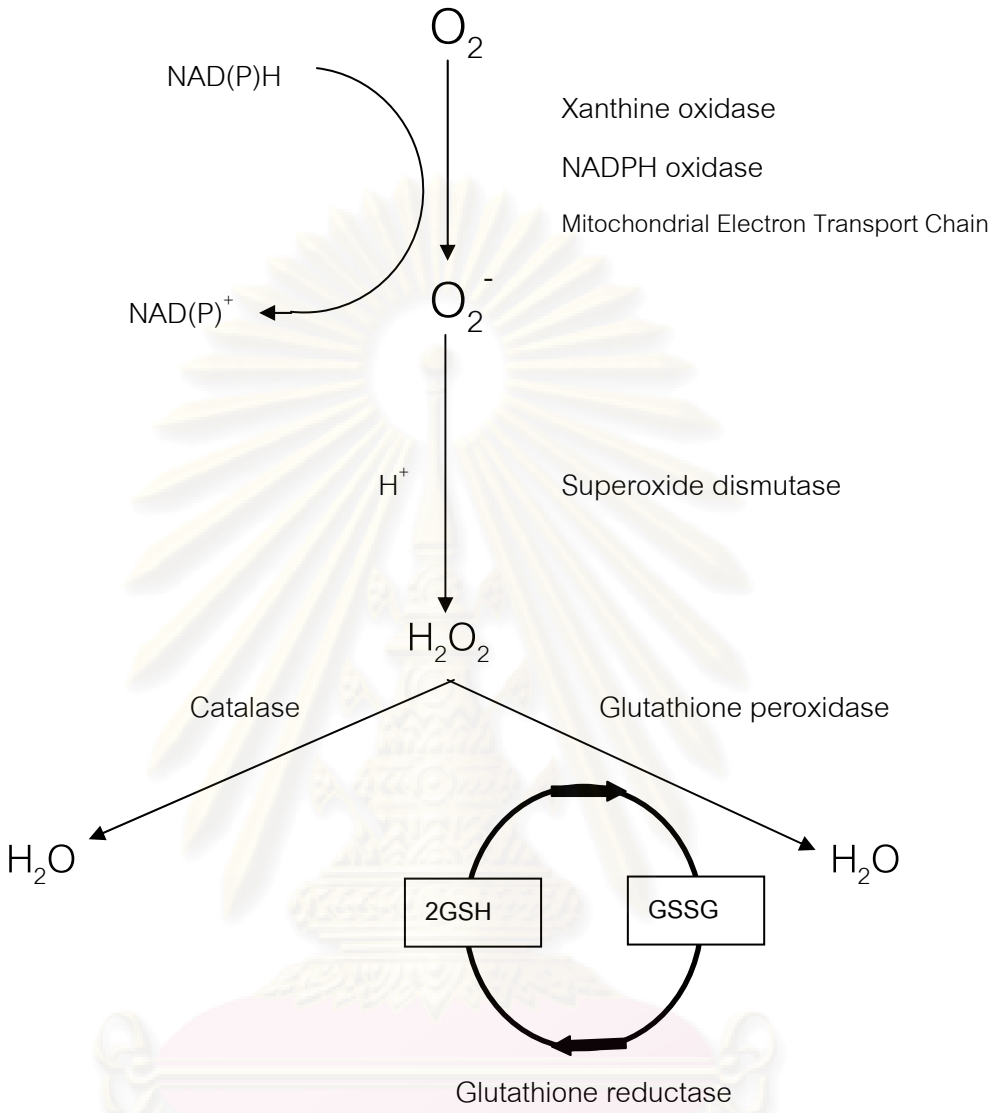
SOD พบได้ทั่วไปในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน (Fridovich, 1978) ซึ่งจะเป็นตัวเปลี่ยนสารพิษ คือ superoxide radical (O_2^-) ซึ่งได้จากกระบวนการสร้างพลังงาน ให้กลายเป็น H_2O_2 และ ออกซิเจนโมเลกุล ตามสมการข้างล่าง

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

ROS ที่ถูกสร้างขึ้นจะส่งผลเสียต่อหน้าที่ของอสุจิในสุนัข โดยพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ รูปร่างของอสุจิ และการทำงานของผนังเซลล์อสุจิ โดยการตรวจด้วยวิธี HOS test แย่ลง (Tselkas et al., 2000) และสามารถพบ SOD ในเซลล์อสุจิ น้ำเลี้ยงอสุจิ และใน post-spermatic fraction ซึ่งช่วยปกป้องอสุจิจากกระบวนการ lipid peroxidation ในระหว่างการหลั่งน้ำเชื้อ และในขณะที่อสุจิเดินทางอยู่ในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของสุนัข (Cassani et al., 2005) มีรายงานว่าพบ SOD ในอสุจิของสุนัขปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ GPx และไม่พบ catalase ในทุกๆ fraction ของน้ำเชื้อสุนัข (Strzezek et al., 2009)

กลูต้าไธโอน (Glutathione; L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) เป็น non-protein thiol ที่พบมากที่สุดในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม GSH ในเซลล์ทำหน้าที่หลักในกระบวนการสิ่งมีชีวิตมากมาย เช่น การสังเคราะห์โปรตีน และดีเอ็นเอ และกระบวนการขนส่งกรดอะมิโน รวมทั้งยังทำหน้าที่หลักในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ของเซลล์ (Meister and Anderson, 1983) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง ROS โดย GPx จะเป็นตัวเปลี่ยนสารพิษเหล่านี้ และจะถูกเปลี่ยนไปเป็น oxidized glutathione (GSSG) (Irvine, 1996)) (รูปที่ 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ระบบป้องกันของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

แม้ว่าจะพบ GSH มากในอัณฑะ น้ำเลี้ยงท่อทางเดินสืบพันธุ์ และ epididymal spermatozoa แต่พบน้อยใน ejaculated spermatozoa (Agrawal and Vanha-Perttula, 1988) และพบปริมาณที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ในขณะที่พบ GPx และ glutathione reductase (GR) มีปริมาณน้อยกว่า GSH มาก

GPx ถูกพบได้ในไซโตพลาสซึมของ epididymal duct epididymal lumen และ ผนังเซลล์อสุจิในสุนัข (Rejraji et al., 2002) หน้าที่หลักคือป้องกันการถูกทำลายของอสุจิ และเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้จากปฏิกิริยา lipid peroxidation

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

การทดลองที่ 1 ใช้สุนัขเพศผู้ พันธุ์ไซบีเรียน ฮัสกี้ จำนวน 3 ตัว อายุ 3 3.5 และ 4 ปี เลี้ยงที่ฟาร์มสุนัขเอ็น วาย (NY Kennel) อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม การทดลองที่ 2 ใช้สุนัขเพศผู้ พันธุ์ไซบีเรียน ฮัสกี้ จำนวน 5 ตัว จากฟาร์มสุนัขเอ็น วาย (NY Kennel) และสุนัขพันธุ์บีเกิ้ล จำนวน 3 ตัว เลี้ยงที่ ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม อายุเฉลี่ย 4.75 ± 1.54 ปี

สุนัขที่คัดเลือกเข้าศึกษาต้องมีประวัติเคยผ่านการผสมติดมาแล้ว ผ่านการฝึกรีดน้ำเชื้อมาแล้ว และน้ำเชื้อมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และตัวอสุจิที่มีรูปร่างที่ปกติมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

การคัดเลือกและแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากสุนัข 3 ตัว นำมารวมกัน ให้ได้จำนวนอสุจิทั้งหมด 1,200 x 10^6 ตัว แบ่งน้ำเชื้อ ออกเป็น 3 กลุ่มเท่า ๆ กัน กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อสุนัขที่ผ่านการแช่เย็นที่ 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อสุนัขที่ผ่านการแช่เย็นที่ 24 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อสุนัขที่ผ่านการแช่เย็นที่ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อทั้ง 3 กลุ่มไปแช่แข็ง ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง (รูปที่ 2)

การทดลองที่ 2 รวมน้ำเชื้อจากสุนัขครั้งละ 2-3 ตัว โดยการสุ่มเพื่อให้ได้จำนวนอสุจิทั้งหมด 600 x 10^6 ตัว จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อที่ได้ออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนที่ 1 ไม่เติมเอนไซม์ ในสารละลายสำหรับแช่เย็นและแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) ส่วนที่ 2 เติม กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase-GPx) และ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase-SOD) (กลุ่ม GPx + SOD) และส่วนที่ 3 เติม SOD (กลุ่ม SOD) ทำการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง (รูปที่ 3)

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

รีดเก็บน้ำเชื้อสุนัขด้วยมือ ตามวิธีการของ (Christiansen, 1984) สัปดาห์ละครั้ง โดยจะเลือกเก็บน้ำเชื้อเฉพาะส่วนต้นและกลาง (pre-spermatic and sperm rich fraction) ผ่านกรวยแก้วลงในหลอดพลาสติกสำหรับเก็บน้ำเชื้อชนิดมีขีดบอกปริมาตร

การประเมินคุณภาพอสุจิ

ทำการตรวจคุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น 3 24 และ 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1) และ 3 และ 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 2) และน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการแช่เย็น 3 24 และ 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1) และน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย 0 และ 6 ชั่วโมง (การทดลองที่ 2) ทำการประเมินคุณภาพอสุจิ ได้แก่ จำนวนอสุจิทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ และระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการมีชีวิต เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และอะโครโซม

จำนวนอสุจิทั้งหมด

นับจำนวนอสุจิจากฮีโมไซโตมิเตอร์ แชมเบอร์ (Hemocytometer chamber) (Boeco, Humburg, Germany) (Beardon and Fuquay, 1997) โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 1 ส่วน ต่อสารละลายฟอร์มัลซาลีน (formal saline) 40 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใส่ในฮีโมไซโตมิเตอร์ แชมเบอร์ แล้วนับจำนวนอสุจิ คำนวณความเข้มข้นของอสุจิต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และจำนวนอสุจิทั้งหมด

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ประเมินอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์แก้วอุ่น 37 องศาเซลเซียส ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตัดแสง (Olympus CX31, Japan) กำลังขยาย 400 เท่า คำนวณเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิ

ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

ประเมินอสุจิที่เคลื่อนที่เป็นเส้นตรง และวิ่งไปข้างหน้าด้วยความเร็ว เป็นคะแนน โดยระดับน้อยไปมาก คือ 0 ถึง 5 (0 = อสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ และ 5 = อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ด้วยความเร็วมาก) โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์อุ่น ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตัดแสง (Olympus CX31, Japan) กำลังขยาย 200 เท่า

อัตราการมีชีวิตของอสุจิ

ประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อสดที่ฟาร์มสุนัข โดยย้อมอสุจิด้วยสีอะนีลีน บลู (aniline blue) โดยหยดตัวอย่างอสุจิ และ aniline blue อย่างละ 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ส่วนปลายของปิเปต ทิป (pipette tip) ปาดให้ทั่วสไลด์ ประเมินจำนวนอสุจิทั้งหมด

200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตัดแสง (Olympus CX31, Japan) กำลังขยาย 1,000 เท่า อสุจิมีชีวิตไม่ติดสี อสุจิที่ตายแล้วติดสีแดง

ประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อแช่เย็น และแช่แข็งในห้องปฏิบัติการ โดยย้อมอสุจิด้วยสีฟลูออเรสซีน ไซเบอร์โบรไมด์ 14 (SyBr-14) (Fertilight®, Sperm viability kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) และโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide) (Fertilight®, Sperm viability kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล่าร์และ 0.03 มิลลิโมล่าร์ ตามลำดับ ประเมินจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซ้นส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า อสุจิมีชีวิตติดสีเขียว อสุจิที่ตายแล้วติดสีแดง (Garner and Johnson, 1995)

ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ

ประเมินความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีที่ประยุกต์มาจาก (Tejada et al., 1984; Lui and Baker, 1992) ป้ายน้ำเชื้อตัวอย่างลงบนสไลด์ปริมาณ 5 ไมโครลิตร รอให้แห้ง จุ่มสไลด์ในสารละลายคาร์นอย (Carnoy's solution, methanol-glacial acetic acid) นาน 24 ชั่วโมง ล้างออกแล้วจุ่มสไลด์ในสีย้อมอะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) 1 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที นับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว ส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซ้นส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า อสุจิติดสีเขียวมีดีเอ็นเอสมบูรณ์ อสุจิติดสีส้ม เหลืองหรือแดง มีดีเอ็นเอเสียหายบางส่วนหรือทั้งหมด การเตรียมสีย้อม acridine orange ทำได้โดยเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงใน 1 เปอร์เซ็นต์ ของ acridine orange เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงใน 0.1 โมล่าร์ ของกรดซิตริค (Merck, Darmstadt, Germany) และเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร ลงใน 0.3 โมล่าร์ ของ $Na_2HPO_4.7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Germany) หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน สีย้อมต้องถูกเตรียมใหม่ทุกวัน และเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้จริง

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ

ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ประเมินโดยใช้สีย้อม FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) และ PI (propidium iodide) (Molecular probes Inc., OR, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมในสารละลายพีบีเอส 1 มิลลิลิตร และ 18 ไมโครโมล่าร์ ตามลำดับ (Cheng et al., 1996; Axnér et al.,

2004) ป้ายตัวอย่างน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ รอให้แห้ง จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที ผสม FITC-PNA 90 ไมโครลิตร กับ PI 5 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดี จากนั้นดูดสีที่ผสมกันแล้ว 20 ไมโครลิตร เกลี่ยสีย้อมบนสไลด์ให้ทั่ว แล้วเก็บในกล่องทึบแสงในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส ประเมินอสุจิทั้งหมด 200 ตัว ด้วยกล้องฟลูออเรสเซ้นส์ (Olympus BX51, Japan) กำลังขยาย 1000 เท่า อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ติดสีเขียวจากสีย้อม FITC-PNA บริเวณส่วนหัวตำแหน่งอะโครโซม อสุจิที่มีอะโครโซมเสียหายบางส่วนติดสีเขียวเป็นจุด ๆ บริเวณส่วนหัว อสุจิที่มีอะโครโซมเสียหายติดสีเขียวจากสีย้อม FITC-PNA เฉพาะส่วนกลางของหัว หรือไม่ติดสีเขียวเลย

สารเจือจางน้ำเชื้อ (ตารางที่ 1)

สารเจือจางน้ำเชื้อแบ่งเป็น 2 ส่วน สารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 (สารเจือจางสำหรับแช่เย็นอสุจิ) ประกอบด้วย ทริส 2.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซิตริคแอซิด 1.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กลูโคส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กลีเซอรอล 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โซเดียมเบนซิลเพนนิซิลิน 0.06 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และไข่แดง 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในขณะที่สารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 2 (สารเจือจางสำหรับแช่แข็งอสุจิ) มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 แต่มีกลีเซอรอล 7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเพิ่มสารอีเควิก เอสทีเอ็ม เพสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) สารเจือจางน้ำเชื้อหลังการละลายคือ สารละลายทริส บัฟเฟอร์ มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 แต่ไม่มีไข่แดงและกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 (EE-I) และ 2 (EE-II) และสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อทำละลาย

สารเจือจางน้ำเชื้อ	EE-I	EE-II	ทริส
ทริส (กรัม)	2.4	2.4	2.4
กรดซิตริค (กรัม)	1.4	1.4	1.4
กลูโคส (กรัม)	0.8	0.8	0.8
กลีเซอรอล (มิลลิลิตร)	3	7	0
ไข่แดง (มิลลิลิตร)	20	20	0
โซเดียม เบนซิล เพนิซิลิล (กรัม)	0.06	0.06	0.06
สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (กรัม)	0.1	0.1	0.1
อีเควิกซ์ เอสทีเอ็ม เพส (มิลลิลิตร)	0	1	0
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ถึง 100	ถึง 100	ถึง 100
pH	6.4	6.5	6.5
Osmolarity (มิลลิออสโมล)	877	1374	256

การแช่เย็นน้ำเชื้อ

หลังจากปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อ ด้วยแรง 600 g เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนอสุจิโดยเติมสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร (การทดลองที่ 1) และ 3 มิลลิลิตร (การทดลองที่ 2) ปรับให้มีความเข้มข้นอสุจิ 200 × 10^6 ตัว/ มิลลิลิตร แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วน ทำการแช่เย็นอสุจิเป็นเวลา 3, 24 และ 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1) หรือแช่เย็นอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อ Uppsala Equex (กลุ่มควบคุม) สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม GPx และ SOD ร่วมกัน หรือสารเจือจางน้ำเชื้อ Uppsala Equex ที่มีการเติม SOD เพียงชนิดเดียว (การทดลองที่ 2)

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อแช่เย็นที่เวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (การทดลองที่ 1) เติมสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 2 ปริมาตรเท่ากับสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ 1 คนให้เข้ากัน บรรจุตัวอย่างอสุจิในหลอดพลาสติกสำหรับแช่แข็งขนาด 0.5 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิโดยใช้วิธีแช่แข็งตามรายงาน

ของ (Rota et al., 1997) โดยหย่อนหลอดบรรจุน้ำเชื้อในแนวตั้งในถังไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 7 13 และ 21 เซนติเมตร จากปากถัง เป็นเวลา 2 2 และ 1 นาที ตามลำดับ

การละลายอสุจิแช่แข็ง

ทำโดยจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในอ่างอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตัดปลายหลอดแล้วปล่อยน้ำเชื้อลงในหลอดบรรจุสารละลายทริส บัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คนให้เข้ากัน

สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติมสาร GPx และ SOD

ในการทดลองที่ 2 เติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์คือ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Maxwell and Stojanov, 1996) และ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Maxwell and Stojanov, 1996; Rossi et al., 2001) ตามลำดับ ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด tris egg yolk extender ส่วนที่ 1

การสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์อสุจิ

การสกัดแยกเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์อสุจิด้วยวิธี hyposmotical-thermical shock method (Cassani et al., 2005) โดยนำน้ำเชื้อมาปั่นที่ 600 g นาน 10 นาที ดูดเอาน้ำเลี้ยงอสุจิออก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ นำอสุจิที่ตกตะกอนมาผสมกับ น้ำเกลือ (normal saline) ไปปั่นที่ 600 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ดูดเอาส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นนำตะกอนอสุจิมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงรักษาอุณภูมิ (Eppendorf® รุ่น 5810 R, Hamburg, Germany) ที่รอบ 20,000×g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอาแต่ส่วนบนไปทำการวิเคราะห์หาเอนไซม์ GPx และ SOD

การตรวจวัดปฏิกิริยาของกลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GPx)

การตรวจวัดปฏิกิริยา GPx ใช้ชุดตรวจ RANSEL (Randox Laboratories, Antrim, UK) เจือจางน้ำเลี้ยงอสุจิ และอสุจิที่ผ่านการทำให้แตกตัว 10 เท่า ด้วยสารละลาย diluting agent ภายหลังการเติม cumene ปฏิกิริยาจะเริ่มทำงาน อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

(Sapphire 120®, Audit Diagnostics, Cork, Ireland) ซึ่งจะวัดการลดลงของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ได้ค่าปริมาณ GPx ในหน่วยเป็นยูนิต ชุดตรวจมีหลักการปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH$$

GSH = glutathione GR = glutathione reductase GSSG = oxidized glutathione GPx = glutathione peroxidase ROOH = cumene hydroperoxide

โดยทำการตรวจปฏิกิริยา GPx ในน้ำเลี้ยงอสุจิของสุนัขแต่ละตัว และอสุจิที่ผ่านการแช่เย็น และแช่แข็ง ที่เวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยอสุจิต้องผ่านการสกัดแยกเอนไซม์แล้วตามขั้นตอนข้างต้น

การตรวจวัดปฏิกิริยาของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD)

การตรวจวัดปฏิกิริยา SOD ใช้ชุดตรวจ RANSOD (Randox Laboratories, Antrim, UK) เจือจางน้ำเลี้ยงอสุจิ และอสุจิที่สกัดแยกเอนไซม์แล้ว 10 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ก่อนทำการตรวจ ภายหลังการเติม xanthine oxidase วัดปริมาณ SOD โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Sapphire 120®, Audit Diagnostics, Cork, Ireland) วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยทำการตรวจวัดตัวอย่างมาตรฐานก่อนเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน หลังจากนั้นวัดปฏิกิริยา SOD ของตัวอย่าง ชุดตรวจมีหลักการปฏิกิริยาทางเคมี ดังนี้

$$Xanthine \xrightarrow{XOD} Uric\ acid + O_2^-$$

$$I.N.T. + O_2^- \longrightarrow Formazan\ dye$$

$$O_2^- \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

SOD = superoxide dismutase XOD = xanthine oxidase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยทำการตรวจปฏิกิริยา SOD ในน้ำเลี้ยงอสุจิของสุนัขแต่ละตัว และอสุจิที่ผ่านการแช่เย็น และแช่แข็ง ที่เวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยอสุจิต้องผ่านการสกัดแยกเอนไซม์แล้วตามขั้นตอนข้างต้น

การวัด รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์รวม (tROS)

การวัดรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์รวม ตามเทคนิคของ (Michael et al., 2007) ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 890 ไมโครลิตร แล้วนำมารวมกับสารละลายลูมินัล 1 มิลลิโมล่าร์ (luminol: 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ หลายๆ ชนิดในตัวอย่าง ใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Spectronic®, Genesys 5, Wisconsin, USA) ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 380 นาโนเมตร คำนวณค่า tROS ตามสมการของ Lambert Beer's law ซึ่งแสดงตามสมการข้างล่าง ดังนี้

$$A = \varepsilon dc$$

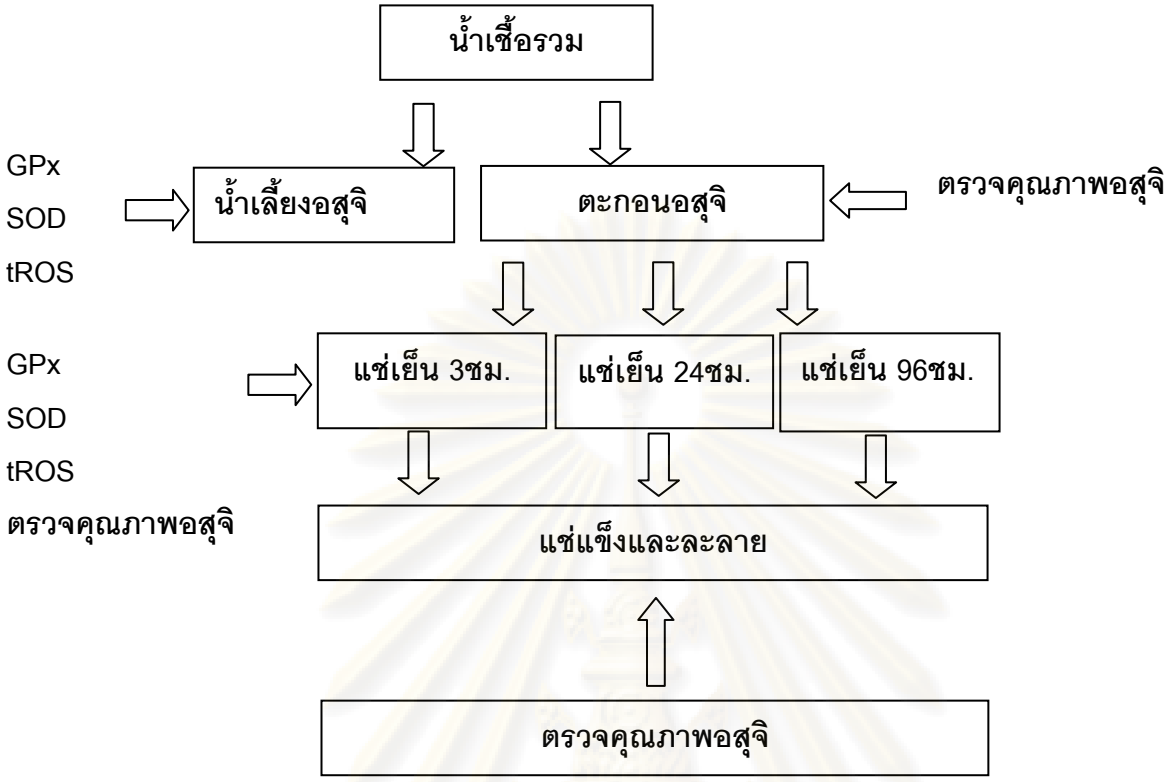
A = ค่าการดูดกลืนของแสงของตัวอย่างน้ำเชื้อ ε = molar extinction coefficient d = ความยาวของคิวเวท (หน่วยเป็นเซนติเมตร) และ c = molar concentration

โดยทำการตรวจวัด tROS ในน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่เย็น และแช่แข็ง ที่เวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเป็นการตรวจวัด tROS ที่อยู่ภายนอกเซลล์นั่นเอง

แผนการทดลอง

การทดลองที่ 1

ศึกษาผลของการแช่เย็นต่อคุณภาพอสุจิ ปริมาณ GPx SOD และ tROS ในน้ำเชื้อแช่เย็นเป็นเวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เย็นแต่ละช่วงเวลาไปทำการแช่แข็ง ประเมินคุณภาพอสุจิหลังการรีดเก็บ หลังการแช่เย็น 3, 24 และ 96 ชั่วโมง และหลังการแช่แข็ง ตรวจวัดปริมาณ GPx SOD และ tROS ในน้ำเลี้ยงอสุจิ และในเซลล์อสุจิ หลังการรีดเก็บ และหลังการแช่เย็น 3 24 และ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 2)

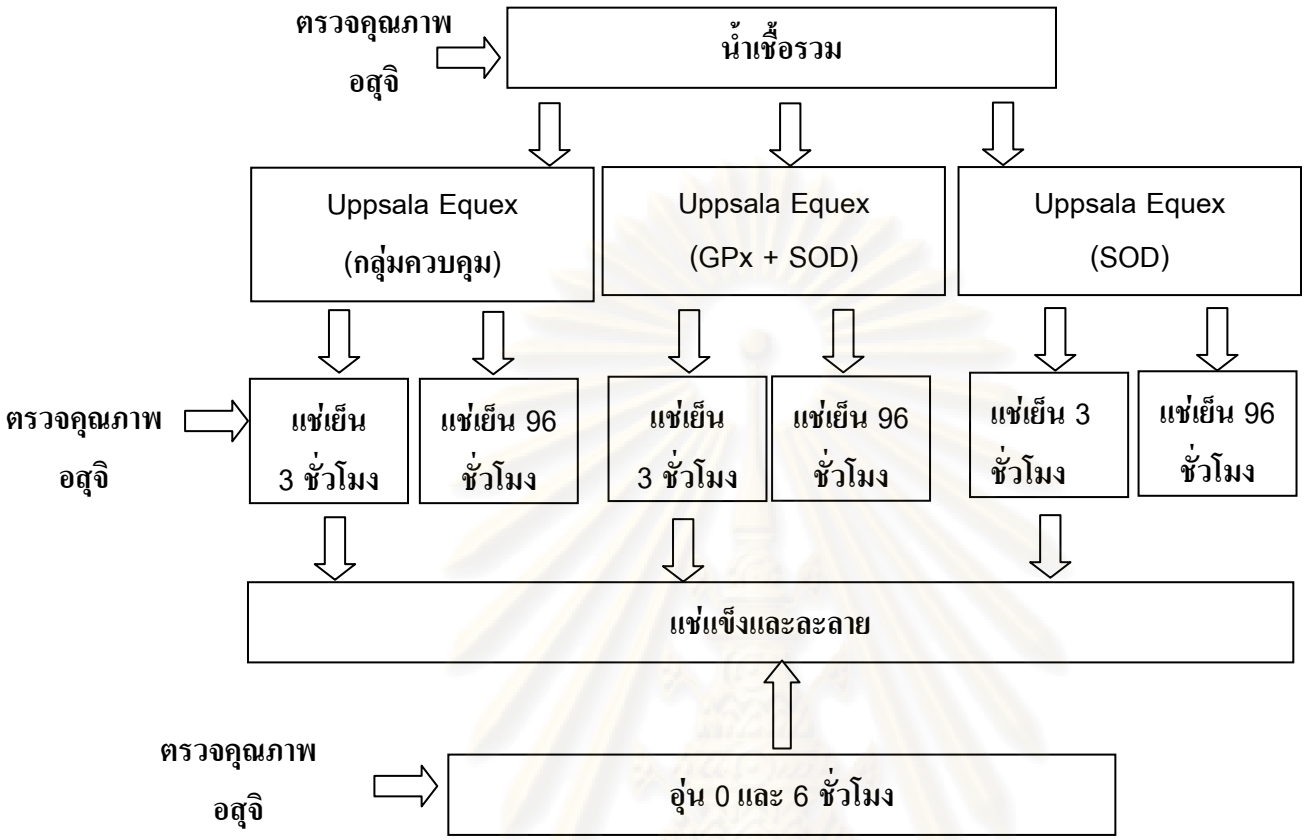


รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 2

ศึกษาผลของการเติมเอนไซม์ GPx ร่วมกับ SOD และ SOD ชนิดเดียว ในสารเจือจางน้ำเชื้อ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่เติมเอนไซม์ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 เติม GPx ร่วมกับ SOD กลุ่มที่ 3 เติม SOD ชนิดเดียว (รูปที่ 3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 1

ตัวแปรอิสระ

1. เวลาการแช่เย็นและแช่แข็ง (3 24 และ 96 ชั่วโมง)
2. การแช่เย็นก่อนการแช่แข็งที่ระยะเวลาเดียวกัน (3 24 และ 96 ชั่วโมง)

ตัวแปรตาม

1. อัตราการเคลื่อนที่ (%)
2. ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
3. อัตราการมีชีวิต (%)
4. เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ (%)
5. เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ปริมาณ tROS (10^{-7}/โมล่าร์)
7. ปริมาณ GPx (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)
8. ปริมาณ SOD (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)

การทดลองที่ 2

ตัวแปรอิสระ

1. กลุ่มตัวอย่าง (treatment group) คือ กลุ่มที่มีการเติม GPx ร่วมกับ SOD และ กลุ่มที่มีการเติม SOD เพียงชนิดเดียว ในสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแช่เย็น และแช่แข็งอสุจิ
2. ระยะเวลาในการแช่เย็นที่ 3 และ 96 ชั่วโมง และแช่แข็ง ภายหลังการแช่เย็น 3 ชั่วโมง โดยทำละลายในเวลา 0 และ 6 ชั่วโมง

ตัวแปรตาม

1. อัตราการเคลื่อนที่ (%)
2. ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า
3. อัตราการมีชีวิต (%)
4. เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ (%)
5. เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (%)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 1

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) (Int. Inc. Cary. N.C. USA) เวอร์ชั่น 9.0 ข้อมูลผลการทดลองแสดงผลด้วย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของตัวแปรอิสระโดยใช้ 2 model คือ one way ANOVA ด้วยวิธี General Linear Model และ student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ของตัวแปรดังต่อไปนี้ อัตราการเคลื่อนที่ (%) อัตราการมีชีวิต (%) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ (%) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (%) ปริมาณ GPx และ ปริมาณ SOD นอกจากนั้นแล้วยังใช้ NPAR one way procedure ด้วยวิธี Wilcoxon Rank Sums test โดยเปรียบเทียบที่ Normal Approximation และ Kruskal-Wallis Test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ของตัวแปรดังต่อไปนี้ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ ปริมาณ tROS

การทดลองที่ 2

ข้อมูลผลการทดลองแสดงผลด้วย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยมีตัวแปรอิสระ คือ กลุ่มตัวอย่าง (treatment group) และ ระยะเวลาในการแช่เย็นและแช่แข็ง และ ตัวแปรตาม คือ อัตราการเคลื่อนที่ ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ วิเคราะห์ความแตกต่างของตัวแปรอิสระในระหว่างกลุ่มโดยใช้ one way ANOVA ด้วยวิธี General Linear Model และ student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทำงานของ SOD และ GPx ในน้ำเลี้ยงอสุจิในน้ำเชื้อสดของสุนัข

สุนัขในการทดลองทั้ง 3 ตัว มีความแตกต่างของปริมาณ SOD และ GPx ใกล้เคียงกันในแต่ละตัว (ตารางที่ 2)

ผลของระยะเวลาการแช่เย็นต่อคุณภาพอสุจิ

หลังการแช่เย็นอสุจิสุนัข 96 ชั่วโมง อัตราการเคลื่อนที่ ($p < 0.05$) ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่แช่เย็น 3 ชั่วโมง ในขณะที่การแช่เย็นอสุจิจนถึง 96 ชั่วโมง ไม่ทำให้อัตราการมีชีวิต ($p > 0.05$) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ ($p > 0.05$) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ($p > 0.05$) ปริมาณ SOD ($p > 0.05$) และ ปริมาณ GPx ($p > 0.05$) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) เมื่อทำการคำนวนโดยใช้ one way ANOVA ด้วยวิธี General Linear Model และ student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ นอกจากนั้น พบว่าระยะเวลาของการแช่เย็นอสุจิที่นานขึ้น ส่งผลต่อระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ โดยการแช่เย็นอสุจิที่ 96 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่เย็นอสุจิที่เวลา 3 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) แต่ไม่พบว่าการแช่เย็นอสุจิที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง ทำให้ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และพบว่าระยะเวลาการแช่เย็นอสุจิที่นานขึ้น (3 24 และ 96 ชั่วโมง) ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณ tROS ($p > 0.05$) ที่เปลี่ยนแปลงไป การคำนวณโดยใช้ NPAR one way procedure ด้วยวิธี Wilcoxon Rank Sums test โดยเปรียบเทียบที่ Normal Approximation และ Kruskal-Wallis Test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลของการแช่เย็นก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพอสุจิ

การแช่แข็งอสุจิทำให้อัตราการเคลื่อนที่อสุจิ ($p < 0.05$) อัตราการมีชีวิต ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ($p < 0.05$) ลดลง หลังการแช่เย็นอสุจิเป็นเวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) เมื่อทำการคำนวนโดยใช้ one way ANOVA ด้วยวิธี General Linear Model และ student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และส่งผลให้ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) เมื่อทำการคำนวณโดยใช้ NPAR one

way procedure ด้วยวิธี Wilcoxon Rank Sums test โดยเปรียบเทียบที่ Normal Approximation และ Kruskal-Wallis Test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

การแช่แข็งอสุจิภายหลังการแช่เย็นเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำให้อสุจิหลังการละลาย มีอัตราการเคลื่อนที่ ($p < 0.05$) อัตราการมีชีวิต ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ($p < 0.05$) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่าการแช่เย็น 3 ชั่วโมง ก่อนการแช่แข็ง การแช่เย็นอสุจิ 3 24 และ 96 ชั่วโมง ไม่กระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของ tROS ($p > 0.05$) และ GPx ($p > 0.05$) แต่พบว่าการแช่แข็งอสุจิหลังการแช่เย็นเป็นเวลาตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป ทำให้ปริมาณ SOD ($p < 0.05$) ลดลง เมื่อเทียบกับการแช่แข็งอสุจิหลังการแช่เย็น 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ผลของการเติมเอนไซม์ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่เย็น

หลังการแช่เย็นอสุจิเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าการเติม SOD ชนิดเดียวในสารเจือจางน้ำเชื้อทำให้อัตราการเคลื่อนที่ ($p < 0.05$) อัตราการมีชีวิต ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ ($p < 0.05$) ต่ำกว่าอสุจิในสารเจือจางที่มีการเติม SOD ร่วมกับ GPx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามพบว่าการเติม SOD ร่วมกับ GPx ไม่ทำให้คุณภาพอสุจิแช่เย็น 3 ชั่วโมง ดีกว่ากลุ่มควบคุม ($p > 0.05$)

นอกจากนั้นพบว่าหลังการแช่เย็น 96 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิตของอสุจิในสารเจือจางที่มีการเติม SOD และ GPx ร่วมกัน มากกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และมากกว่ากลุ่มที่เติม SOD ชนิดเดียว ($p < 0.05$) ในขณะที่คุณภาพอสุจิอื่น ๆ ไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่ม

ผลของการเติมเอนไซม์ในสารเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

หลังการละลายอสุจิแช่แข็งพบว่า อัตราการมีชีวิตของอสุจิ ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD ร่วมกับ GPx มากกว่ากลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD ชนิดเดียว ($p = 0.08$ และ $p = 0.07$ ตามลำดับ) เช่นเดียวกับหลังการละลาย 6 ชั่วโมง อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD ร่วมกับ GPx มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์มากกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และมีแนวโน้มมากกว่ากลุ่มที่ใช้ SOD ชนิดเดียว ($p = 0.08$) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 2 ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) (ยูนิต/มิลลิลิตร) และ กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GPx) (ยูนิต/มิลลิลิตร) ในน้ำเลี้ยงอสุจิในน้ำเชื้อสดของสุนัขแต่ละตัว โดยทำการทดลองซ้ำทั้งสิ้น 7 ครั้ง (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ	***สุนัขตัวที่ 1***	***สุนัขตัวที่ 2***	***สุนัขตัวที่ 3***
ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD)	107.89 ± 7.19	105.27 ± 2.25	94.60 ± 7.82
กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)	320.04 ± 73.34	323.89 ± 46.9	277.84 ± 11.69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 คุณภาพอสุจิสุนัขภายหลังการแช่เย็นและแช่แข็งในแต่ละช่วงเวลา (จำนวนตัวอย่าง = 7) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ	ระยะเวลา(ชั่วโมง)		
	3 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
ตัวอสุจิแช่เย็น			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	72.9 ± 9.5 ^{a,A}	68.6 ± 10.7 ^{ab,A}	57.1 ± 9.5 ^{b,A}
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	3.7 ± 1.0 ^{a,A}	3.1 ± 0.7 ^{a}	2.0 ± 0.8 ^{b}
-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	85.0 ± 7.8 ^{A}	79.6 ± 5.0 ^{A}	74.6 ± 7.5 ^{A}
-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	90.5 ± 5.9	86.9 ± 12.1	84.0 ± 12.6
-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (%)	79.6 ± 8.9 ^{A}	76.4 ± 8.1 ^{A}	67.4 ± 5.8 ^{A}
-ปริมาณ tROS (10^{-7}/โมล่าร์)	237.2 ± 149.1	181.7 ± 70.6	259.9 ± 210.0
-ปริมาณ SOD (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)	110.7 ± 2.8	106.7 ± 2.2	106.8 ± 2.0
-ปริมาณ GPx (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)	215.3 ± 11.1	218.6 ± 7.0	221.8 ± 5.4
ตัวอสุจิแช่แข็ง			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	48.6 ± 6.9 ^{a,B}	42.9 ± 7.6 ^{abB}	30.0 ± 8.2 ^{b,B}
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	2.7 ± 0.8 ^{B}	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.4
-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	57.4 ± 10.5 ^{a,B}	53.0 ± 11.7 ^{a,B}	35.9 ± 13.9 ^{b,B}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	92.1 ± 7.7	87.4 ± 6.1	84.9 ± 9.4
-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (%)	57.9 ± 19.6 ^{a,B}	49.1 ± 19.5 ^{ab,B}	33.3 ± 15.7 ^{b,B}
-ปริมาณ tROS (10^{-7}/โมล่าร์)	326.4 ± 316.6	244.9 ± 176.9	370.7 ± 297.5
-ปริมาณ SOD (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)	109.9 ± 2.3 ^{a}	103.1 ± 2.4 ^{b}	103.5 ± 5.5 ^{b}
-ปริมาณ GPx (ยูนิต/50×10^{6} อสุจิ)	237.6 ± 18.4	216.8 ± 4.3	219.3 ± 4.9

ตัวอักษร (a,b) แทนความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$)

ตัวอักษร (A,B) แทนความแตกต่างในกลุ่มระหว่างลักษณะของคุณภาพน้ำเชื้อที่แตกต่างกันในช่วงเวลาเดียวกัน ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 คุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อสุนัขแช่เย็น โดยใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (กลุ่มควบคุม) มีการเติมกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ร่วมกับ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) และเติม ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (SOD) ชนิดเดียว (จำนวนตัวอย่าง = 9) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เวลาในการแช่เย็นตัวอสุจิ / ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ	**กลุ่มควบคุม**	GPx + SOD	SOD
น้ำเชื้อแช่เย็นที่เวลา 3 ชั่วโมง			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	78.9 ± 6.0 ^{a,b}	82.8 ± 6.7 ^{a}	73.3 ± 8.7 ^{b}
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.3 ± 0.9

-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	84.1 ± 6.7 [a]	86.7 ± 4.8 [a]	76.5 ± 6.7 [b]
-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	95.1 ± 5.1 [a,b]	96.2 ± 2.8 [a]	88.8 ± 10.3 [b]
-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมอสุจิ (%)	76.2 ± 13.1	82.6 ± 12.3	71.3 ± 16.4
น้ำเชื้อแช่เย็นที่เวลา 96 ชั่วโมง			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	60.6 ± 23.5	66.1 ± 20.0	55.0 ± 27.2
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	2.3 ± 1.2	3.0 ± 1.0	2.4 ± 1.2
-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	70.1 ± 6.2 [a,]	79.3 ± 8.3 [b]	66.2 ± 6.7 [a]
-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	91.6 ± 9.8	94.8 ± 6.3	86.1 ± 14.2
-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมอสุจิ (%)	60.6 ± 16.8	59.2 ± 24.0	58.4 ± 24.1

ตัวอักษร (a,b) ต่างกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 คุณภาพอสุจิสุนัขแช่แข็งภายหลังการแช่เย็น 3 ชั่วโมง ในสารเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแช่เย็นที่มีการเติมสาร GPx ร่วมกับ SOD และ SOD ชนิดเดียว และไม่เติมสารใด ๆ (กลุ่มควบคุม) ในชั่วโมงที่ 0 และ 6 ภายหลังการละลายตัวอสุจิ (จำนวนตัวอย่าง = 9)

อสุจิที่ถูกละลาย (จำนวนชั่วโมง)	**กลุ่มควบคุม**	GPx + SOD	SOD
0 ชั่วโมง			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	40.0 ± 18.0	52.2 ± 9.7	44.0 ± 21.8
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	2.8 ± 0.7	3.3 ± 0.7	3.3 ± 0.9
-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	34.1 ± 14.0 [a]	47.6 ± 12.0 [b]	37.9 ± 14.8 [a,b]
-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	80.3 ± 6.3 [a]	86.2 ± 6.5 [b]	80.9 ± 5.1 [a,b]

-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (%)	64.1 ± 20.8	65.2 ± 17.7	64.2 ± 15.1
6 ชั่วโมง			
-อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	28.3 ± 19.8	31.7 ± 17.0	20.0 ± 16.6
-ระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	2.0 ± 0.9	2.1 ± 0.6	1.7 ± 0.9
-อัตราการมีชีวิตของอสุจิ (%)	24.5 ± 13.1	36.1 ± 13.3	30.3 ± 15.5
-ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (%)	72.8 ± 12.0 [a]	84.5 ± 9.9 [b]	74.6 ± 12.7 [a,b]
-ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิ (%)	32.5 ± 15.4	36.2 ± 14.0	29.2 ± 16.2

ตัวอักษร (a,b) แทนความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ($p < 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ปริมาณ SOD และ GPx ที่ตรวจได้ในน้ำเลี้ยงอสุจิในการทดลองนี้ มีค่ามากกว่าในรายงานของ (Strzezek et al., 2009) ซึ่งทำการตรวจ SOD และ GPx ในน้ำเชื้อสุนัข แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ pre-spermatic spermatic และ post-spermatic fraction โดยมีปริมาณ SOD เฉลี่ย 22.3 54.8 และ 40.1 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบ GPx ใน pre-spermatic fraction ส่วนปริมาณ GPx ใน spermatic และ post-spermatic fraction คือ 4.6 และ 4.0 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดย (Strzezek et al., 2009) ทำการตรวจเอนไซม์โดยใช้วิธี acrylamide gel การศึกษานี้ใช้ชุดตรวจซึ่งใช้หลักการของการปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดความขุ่นและการดูดกลืนแสงของสารละลาย ซึ่งเป็นการศึกษาแรก ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบค่าที่ได้กับรายงานในสุนัขก่อนหน้านี้ได้ ทั้งนี้การทดลองในคนที่ใช้ชุดตรวจ RANSOD เดียวกันนี้ ในน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่ามีค่า SOD เฉลี่ย 0.34 ± 0.06 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน (Murawski et al., 2007) การทดลองนี้มีปฏิกิริยาของ GPx สูงกว่า SOD ทั้งในเซลล์อสุจิ และในน้ำเลี้ยงอสุจิ ซึ่งต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า SOD เป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในน้ำเชื้อสดของสุนัข (Strzezek et al., 2009)

จากการศึกษานี้ หลังการแช่เย็นน้ำเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบอัตราการเคลื่อนที่ และระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการแช่เย็นอสุจิจากท่อนำน้ำเชื้อ (epididymis) ของสุนัข (Ponglowhapan and Chatdarong, 2008) ในการผสมเทียมสุนัขโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็น จึงแนะนำให้ใช้อสุจิแช่เย็นภายในเวลา 5 วัน ซึ่งหากต้องการเก็บอสุจินานกว่านี้ ควรใช้การแช่แข็งแทน (England and Ponzio, 1996)

นอกจากนี้การทดลองนี้ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ tROS ในอสุจิแช่เย็น และอสุจิแช่แข็งหลังการแช่เย็น เป็นเวลา 3 24 และ 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Michael et al., 2009) ที่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ tROS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในอสุจิของสุนัขที่ผ่านการแช่เย็นตั้งแต่ 0 24 และ 72 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงใน

สารเจือจางน้ำเชื้อ ทั้งนี้น่าจะมาจากเทคนิคที่ดีในการเก็บรักษาอสุจิด้วยความเย็น รวมทั้งประสิทธิภาพที่ดีของสารเจือจางน้ำเชื้อ ที่ยังคงรักษาอสุจิจนไม่เกิดการสร้าง tROS ที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษานี้ ไม่พบการลดลงของ GPx และ SOD ในอสุจิหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อจนถึงเวลา 96 ชั่วโมง (การทดลองที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับ (Kankofer et al., 2005) ที่ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อจนถึง 24 ชั่วโมง ไม่พบมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ ซึ่งสาเหตุมาจากการที่ในช่วงเวลาที่ทำการแช่เย็นอสุจิจนถึง 24 ชั่วโมง ยังไม่มีการเกิดปฏิกิริยาลิปิด เปอร์ออกซิเดชั่น (Kankofer et al., 2005) จึงทำให้ไม่มีการลดลงของ GPx และ SOD ในอสุจิ นอกจากนี้พบว่าอสุจิแช่แข็งภายหลังการแช่เย็นตั้งแต่ 3 ชั่วโมง เป็นต้นไป ไม่ส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ และหลังการแช่เย็นตั้งแต่ 24 ชั่วโมง เป็นต้นไป ไม่ส่งผลกระทบต่อระดับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Crockett et al., 2001) ที่ทดลองในม้า พบว่าการแช่แข็งอสุจิภายหลังการแช่เย็น ที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 หรือ 12 ชั่วโมง จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิ เมื่อเทียบกับการแช่เย็นนาน 2 – 2.5 ชั่วโมง ก่อนการแช่แข็ง เนื่องจากมีการนำน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) ออกก่อนที่จะกระทำการแช่เย็น เพราะการคงเหลือของน้ำเลี้ยงอสุจิปริมาณมากในน้ำเชื้อแช่เย็นม้านั้น จะส่งผลทำให้เกิดผลเสียต่ออสุจิ โดยพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติดลดลง (Pickett et al., 1975; Jasko et al., 1992)

จากการศึกษายังพบอีกว่าการทำงานของ SOD ลดลงในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการแช่เย็นมาก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป (การทดลองที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Lasso et al., 1994) ที่พบว่าอสุจิแช่แข็งในมนุษย์จะมีการทำงานของ SOD ลดลงจากน้ำเชื้อสด และ (Marti et al., 2008) ที่พบว่ามีการทำงานของ SOD ในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่เย็นในแกะ ปริมาณเป็น 2 เท่าของในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการทำละลาย นั่นคือการแช่แข็งอสุจิส่งผลให้ระดับการทำงานของ SOD ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยจะพบว่า SOD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ที่มีผลกระทบมากที่สุดเมื่อทำการแช่แข็งอสุจิ โดยพบว่ามีปริมาณลดลงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการแช่แข็งและทำละลายอสุจิ (Marti et al., 2008) สาเหตุน่าจะมาจาก SOD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่มีหน้าที่ป้องกันอสุจิจากการถูกทำลายด้วย ROS (Cassani et al., 2005) ในขณะที่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของการทำงานของ GPx ในน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการแช่เย็น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ในแกะ (Marti et al., 2008) และใกล้เคียงกับผลการทดลอง

ของ (Bilodeau et al., 2000) ที่ทำการทดลองในอสุจิโค ซึ่งพบว่าหลังการแช่แข็งอสุจิ ระดับกลูตาไธโอน (GSH) ลดลง 78 เปอร์เซ็นต์

จากผลการศึกษาการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด ร่วมกัน (การทดลองที่ 2) คือ GPx และ SOD ในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด tris-egg yolk extender จะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ สูงกว่าการเติม SOD ชนิดเดียว ในอสุจิแช่เย็นที่ 3 ชั่วโมง รวมทั้งทำให้อัตราการมีชีวิตของอสุจิแช่เย็นที่ 96 ชั่วโมง สูงกว่ากล่มควบคุม และกลุ่มที่เติม SOD ชนิดเดียว นั่นคือการเติมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ร่วมกัน คือ GPx และ SOD ช่วยรักษาคุณภาพอสุจิแช่เย็นได้นานกว่า 96 ชั่วโมง โดยสอดคล้องกับการทดลองเติม SOD ร่วมกับ catalase ในการแช่แข็งน้ำเชื้อของมนุษย์ ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ SOD ชนิดเดียวเช่นกัน (Rossi et al., 2001) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก SOD เป็นเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยนสารซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) ซึ่งเป็น ROS ชนิดหนึ่ง ให้ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนอิออน (H^+) ได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็น ROS อีกชนิดหนึ่ง ถ้าในสารละลายมี catalase จะทำให้มีการเปลี่ยน H_2O_2 เป็นน้ำ (H_2O) การทำงานร่วมกันของ SOD และ catalase ในลักษณะนี้ ทำให้ไม่เกิด ROS ขึ้นอีก ซึ่งยืนยันจากการลดลงของระดับ ROS ในน้ำเชื้อสุกรที่แช่แข็งในสารละลายที่มี SOD และ catalase ร่วมกัน (Roca et al., 2005) การทำงานของ GPx เป็นไปในทางเดียวกันกับ catalase ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม GPx และ SOD ร่วมกัน ให้ผลดีกับอสุจิมากกว่าการเติม SOD เพียงชนิดเดียว นอกจากนั้นแล้วยังศึกษาพบว่าหลังการละลายอสุจิแช่แข็ง ทำให้อัตราการมีชีวิตของอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์ ในกลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD ร่วมกับ GPx มากกว่ากลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD ชนิดเดียว เช่นเดียวกับหลังการละลาย 6 ชั่วโมง อสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเติม SOD และ GPx มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีดีเอ็นเอสมบูรณ์มากกว่ากลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มมากกว่ากลุ่มที่ใช้ SOD ชนิดเดียวซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลเดียวกับข้างต้น

กล่าวโดยสรุปคือ ในน้ำเลี้ยงอสุจิ อสุจิแช่เย็น และอสุจิแช่แข็ง ของสุนัขมีการทำงานของ SOD และ GPx ทั้งนี้ระดับ tROS และการทำงานของ GPx ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการแช่เย็นและหลังการแช่แข็ง ในขณะที่การแช่แข็งอสุจิของสุนัข หลังการแช่เย็น 24 และ 96 ชั่วโมง ทำให้การทำงานของ SOD ลดลง นอกจากนี้การเติมสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน คือ GPx และ SOD ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อของสุนัข ป้องกันอสุจิจากการถูกทำลายโดยการแช่เย็นและแช่

แข็งได้ดีกว่าการเติม SOD ชนิดเดียว ดังนั้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสุนัขที่ต้องผ่านการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อ จึงควรเติม GPx และ SOD ในสารเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อรักษาชีวิตของอสุจิจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Agarwal, A., Ramadan, A. and Mohamed, A.B. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 79 (4):829-843.

Agarwal, Y.P. and Vanha-Perttula, T. 1988. Gamma-glutamyl transpeptidase, glutathione and L- glutamine acid in the rat epididymis during postnatal development. Biol Reprod. 38 (5):996-1000.

Aisen, E.G., Medina, V.H. and Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology. 57 (7):1801-1808.

Aitken, R.J. 1999. The Amoroso Lecture The human spermatozoon--a cell in crisis? J Reprod Fertil. 115 (1):1-7.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 9:367-376.

Aitken, R.J. and Krausz. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction. 122 (4):497-506.

Almeida, J. and Ball, B.A. 2005. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. Anim Reprod Sci. 87 (3-4):321-337.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol Reprod. 29 (3):548-555.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J Androl. 13 (3):232-241.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev. 42 (3):334-346.

Askasi, H.A., Check, J.H., Peymer, N. and Bollendorf, A. 1994. Effect of natural antioxidants tocopheral and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. Arch Androl. 33 (1):11-15.

Axnér, E., Hermansson, U. and Linde-Forsberg, C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim Reprod Sci. 84 (1-2):179-191.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and Davies-Morel, M.C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl. 21 (6):895-902.

Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J. and Meyers, S.A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl. 24 (4):621-628.

Bearden, H.J. and Fuquay, J.W. 1997. Lataction. In: Applied Animal Reproduction. 4th ed. H.J. Bearden and J.W. Fuquay (ed.). New Jersey: Prentice Hall. 158-169.

Bilodeau, J., Chatterjee, S., Sirard, M. and Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 55 (3): 282 –288.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A. 2001. Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56 (2):275-286.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N. and Sirard, M.A. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender:

protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57 (3):1105-1122.

Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D. and Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. Theriogenology. 34 (1):147-157.

Cassani, P., Beconi, M.T. and O'Flaherty, C. 2005. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. Anim Reprod Sci. 86 (1-2):163-73.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Manee-In, S., Lohachit, C. and Axnér, E. 2008. Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. Reprod Domest Anim. 45 (2):221-227.

Chatterjee, S. and Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Repro Dev. 59 (4):451-458.

Cheng, F.P., Fazeli, A., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona-pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. J Androl. 17 (6):674-682.

Christiansen. 1984. Reproduction in the dog and cat. Bailliere Tindall. 100:115-123.

Crockett, E.C., Graham, J.K., Bruemmer, J.E. and Squires, E.L. 2001. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. Theriogenology. 55(3):793-803.

Engel, S., Schreiner, T. and Petzoldt, R. 1999. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. Andrologia. 31 (1):17-22.

England, G.C.W. 1993. Cryopreservation of dog semen. J Reprod Fertil Suppl. 47:243-255.

England, G.C.W. and Ponzio, P. 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology. 46 (1):165-171.

Foote, R.H. and Leonard, E.P. 1964. The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. The Cornell Vet. 54:78-89.

Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science. 201:875-878.

Funahashi, H. and Sano, T. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 ºC. Theriogenology. 63 (6):1605-1616.

Garner, D. and Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol Reprod. 53:276-284.

Griveau, J.F. and Le Lannou, D. 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. J Androl. 20 (2):61-69.

Halliwell, B. 1997. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. Adv Pharmacol. 38:3-20.

Hatamoto, L.K., Sobrinho, B.C.A., Nichi, M., Barnabe, V.H., Barnabe, R.C. and Cortada, C.N.M. 2006. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. Theriogenology. 66 (6):1610-1644.

Holmes, R.P., Goodman, H.O., Shihabi, Z.K. and Jarow, J.P. 1992. The taurine and hypotaurine content of human semen. J Androl. 13 (3):289-292.

Irvine, D.S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. Rev Reprod. 1 (1):6-12.

Jasko, D. J., Hathaway, J. A., Schaltenbrand, V. L., Simper, W. D. and Squires, E. L. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology. 37 (6):1241–1252.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J. and Aurich, C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 ºC. Theriogenology. 63 (5):1354-1365.

Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G. and Storey, B.T. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. J Androl.15 (3):255-265.

Lenzi, A., Gandini, L., Lombardo, F., Picardo, M., Maresca, V. and Panfili, E. 2002. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. Contraception. 65 (4):301-4.

Linde-Forsberg, C., Ström Holst, B. and Govette, G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology. 52 (1):11-23.

Lui, D.Y. and Baker, H.W. 1992. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. Fertil Steril. 58 (6):1178-1184.

Luvoni, G.C. 2006. Gamete cryopreservation in the domestic cat. Theriogenology. 66 (1):101-111.

Marti, E., Marti, J.I., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. J Androl. 29 (4):459-67.

Maxwell, W.M. and Stojanov, T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reprod Fertil Dev. 8 (6):1013-1020.

Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F.M., Rapone, S., Dondero, F. and Gazzaniga, P.P. 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. Acta Eur Fertil. 26 (4):145-158.

Meister, A. and Anderson, M.F. 1983. Glutathione. Annu Rev Biochem. 52:711-760.

Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. and Boscos, C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology. 68 (2):204-212.

Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M. 2008. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Reprod Dom Anim. 45 (2):201-207.

Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim Reprod Sci. 112 (1-2):119-135.

Miller, J.G. and Shultz, G.A. 1987. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. Biol Repro. 36 (1):125-129.

Murawski, M., Saczko, J., Marcinkowska, A., Chwiłkowska, A., Gryboś, M. and Banaś, T. 2007. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. Folia Histochem Cytobiol. 45 (1):123-126.

Nair, S.J., Brar, A.S., Ahuja, C.S., Sangha, S.P. and Chaudhary, K.C. 2006. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci. 96 (1-2):21-29.

Neild, D.M., Gadella, B.M., Collenbrander, B., Agüero, A. and Brouwers, J.F.H.M. 2002. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. Theriogenology. 58 (2):295-298.

Noguchi, N. and Niki, E. 1999. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health. A.M. Papa (eds.). London: CRC Press LLC. 3-19.

Peña, A.I., Barrio, F., Quintela, L.A. and Herradón, P.G. 1998. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. Reprod Dom Anim. 33 (1):5-9.

Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodiguez Martinez, H. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim Reprod Sci. 78 (1-2):85-98.

Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M. and Bailey, J.L. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. Mol Reprod Dev. 74 (7):878-892.

Perry, A.C.F., Jones, R., Niang, L.S.P., Jackson, R.M. and Hall, L. 1992. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. Biochem J. 285:863-870.

Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Byers, W.W., Pace, M.M. and Remmenga, E.E. 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil. Steril. 26:167–174.

Ponglowhapan, S. and Chatdarong, K. 2008. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. Theriogenology. 69 (6):666-672.

Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B. and Linde Forsberg, C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. Theriogenology. 62 (8):1498-1517.

Rejraji, H., Vermet, P. and Drevet, J.R. 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymis lumen at three different locations. Mol Reprod Dev. 63:96-103.

Roca, J, Rodríguez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J Androl. 26 (1):15-24.

Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M. and Dondero, F. 2001. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. Cell Tissue Bank. 2 (1):9-13.

Rota, A., Ström, B. and Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4ºC. Theriogenology. 44 (6):885-900.

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 ºC. Theriogenology. 47 (5):1093-1101.

Salisbury, G.W., VanDemark, N.L. and Lodge, J.R. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. 1st ed. G.W. Salisbury, N.L. VanDemark, J.R. Lodge (eds.). San Francisco: W.H. Freeman and Company. 442-493.

Seager, S.W.J. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AI Digest. 17:6-16.

Sikka, S.C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem. 8 (7):851-862.

Silva, P.F.N. 2006. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD Thesis Faculty of Veterinary Medicine-with summary in Dutch and Portuguese. Utrech University.

Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E., Godke, R.A. and Leibo, S.P. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. Cryobiology. 44:79-90.

Storey, BT. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 3 (3):203-213.

Strzezek, R., Koziorowska-Gilun, M., Kowalówka, M., Strzezek, J. 2009. Characteristics of antioxidant system in dog semen. Pol J Vet Sci. 12 (1):55-60.

Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J. and Friedman, S. 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril. 42:87-91.

Thuwanut, P., Axnér, E., Johanisson, A. and Chatdarong, K. 2009. Detection of lipid peroxidation reaction in frozen- thawed epididymal cat spermatozoa using BODIPY581/589 C11. Reprod Domest Anim. 44. Suppl:373-376.

Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A. and Samouilidis, S. 2000. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. Deutsch Tierarztl Wochenschr. 107 (2):69-82.

Verstegen, J.P., Onclin, K. and Iguer-Ouada, M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. Theriogenology. 64 (3):720-733.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci. 2 (60-61):481-492.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. หลอดเก็บน้ำเชื้อชนิดมีขีดบอกปริมาตร
2. พาสเจอร์ไปเปตพลาสติค สำหรับดูดตัวอย่างน้ำเชื้อ
3. หลอดพลาสติกบรรจุน้ำเชื้อ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
4. ปิเปตทิป ขนาด 10, 20-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
5. สไลด์แก้วและแผ่นปิดสไลด์
6. ถังเก็บไนโตรเจนและไนโตรเจนเหลว
7. แร็ค สำหรับวางหลอดทดลอง
8. หลอดพลาสติคขนาดเล็ก (Eppendrof)
9. Globet สำหรับบรรจุหลอดพลาสติคแช่แข็ง
10. ถุงมือยาง
11. กรวยแก้วสำหรับรองรีดเก็บน้ำเชื้อ
12. กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์
13. ชุดตรวจเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (RANSEL) (Randox Laboratories, Antrim, UK)
14. ชุดตรวจเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ไดมูเตส (RANSOD) (Randox Laboratories, Antrim, UK)
15. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Sapphire 120, Audit Diagnostics, Ireland)
16. ตู้ควบคุมความเย็นอัตโนมัติ
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf รุ่น 5810 R, Hamburg, Germany)
18. อ่างอุ่น
19. สารเคมีสำหรับเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อ
20. แอนตี้ออกซิแดนท์เอนไซม์ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase-SOD)
21. แอนตี้ออกซิแดนท์เอนไซม์ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase-GPx)
22. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์สำหรับตรวจ tROS (Thermo Spectronic, Genesys 5, WI, USA)
23. สารเคมีสำหรับตรวจ tROS

การเก็บข้อมูลในการทดลอง เก็บข้อมูลโดยใช้ตารางรวบรวมข้อมูล (Dummy table) ดังนี้

การทดลองที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางเก็บข้อมูลลักษณะของตัวอสุจิ คุณภาพของตัวอสุจิ และ ปริมาณแอนตี้ออกซิเดทีฟ เอนไซม์ และ รีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ ในน้ำเชื้อสด แช่เย็น และแช่แข็งในช่วงเวลาที่ต่างกัน

Date_____ n = _____

Semen Profile

Fresh: (Dog A)

Name_____Age_____Breed_____

Volume_____Color_____pH_____Concentration_____

Total number of sperm count _____Viability_____

Motility_____ Acrosome integrity _____

DNA integrity_____

Seminal plasma: SOD_____ U mL^{-1} GP_____ U mL^{-1}

Morphology:

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____

Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____

Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____

Acrosome defect_____ Pouch form_____

Loose_____

Fresh: (Dog B)

Name_____Age_____Breed_____

Volume_____Color_____pH_____Concentration_____

Total number of sperm count _____Viability_____

Motility_____ Acrosome integrity _____

DNA integrity_____

Seminal plasma: SOD_____ U mL^{-1} GP_____ U mL^{-1}

Morphology:

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____

Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____

Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____

Acrosome defect_____ Pouch form_____

Loose_____

Fresh : (Dog C)

Name_____Age_____Breed_____

Volume_____Color_____pH_____Concentration_____

Total number of sperm count _____Viability_____

Motility_____ Acrosome integrity _____

DNA integrity_____

Seminal plasma: SOD_____ U mL^{-1} GP_____ U mL^{-1}

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____

Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____

Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____

Acrosome defect_____ Pouch form_____

Loose_____

Chilled :

Time	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome	SOD	GPx	tROS
3 hr							
24 hr							
96 hr							

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Post-thawed :

Time	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome	SOD	GPx	tROS
3 hr							
24 hr							
96 hr							

การทดลองที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางเก็บข้อมูลคุณภาพตัวอสุจิที่ผ่านการแช่เย็นและแช่แข็งภายหลังการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ชนิด GPx และ SOD

Date_____

Semen Profile

Fresh :

Name_____ Age_____Breed_____

Volume_____Concentration_____Total number of sperm count_____Viability_____Motility_____Acrosome integrity_____DNA Integrity_____

Morphology :

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____

Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____

Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____

Acrosome defect_____ Pouch form_____

Loose_____

Fresh :

Name_____ Age_____Breed_____

Volume_____Concentration_____Total number of sperm count_____Viability_____Motility_____Acrosome integrity_____DNA Integrity_____

Morphology :

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____ Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____ Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____ Acrosome defect_____ Pouch form_____ Loose_____

Fresh :

Name_____ Age_____Breed_____ Volume_____Concentration_____Total number of sperm count_____Viability_____Motility_____Acrosome integrity_____DNA Integrity_____

Morphology :

Head: Normal_____ Narrow_____ Narrow at the base _____ Pear-shape_____ Giant, broad, round_____ Abnormal contour_____Undeveloped_____Abaxial_____ Loose_____

Tail: Normal_____ Distal droplet _____Simple bent tail_____Coil tail_____ Abnormal Midpiece_____ Acrosome defect_____ Pouch form_____ Loose_____

Fresh pooled semen : n = _____

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Volume_____Concentration_____Total number of sperm count_____Viability_____Motility_____Acrosome integrity_____DNA Integrity_____

Chilled : (3hr)

Antioxidative enz. supplementation	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome
Control				
GPx + SOD				
SOD				

Chilled : (96hr)

Antioxidative enz. supplementation	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome
Control				
GPx + SOD				
SOD				

Post- thawed : (0hr)

Antioxidative enz. supplementation	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome
Control				
GPx + SOD				
SOD				

Post- thawed : (6hr)

Antioxidative enz. supplementation	Motility+Progressive	Viability	DNA	Acrosome
Control				
GPx + SOD				
SOD				

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรทัย ชัยเวชการ เกิดวันที่ 15 มิถุนายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย