ผลกระทบของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อม้าต่อคุณภาพอสุจิภายหลังการทำละลาย

ธนากร พจน์ประสาท ชัยณรงค์ โลหชิต และธีรวัฒน์ ธาราศานิต*

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ Email: theerawat.t@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การแช่แข็งน้ำเชื้อในม้ามีบทบาทสำคัญในการเก็บรักษาและกระจายพันธุกรรม เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้พ่อม้า อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อแช่แข็งม้ามีข้อจำกัดในด้านคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งและการทำละลายที่อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้า 2 วิธีคือ การแช่แข็งในกล่องโฟม (conventional freezing technique) และการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ (controlled rate freezer) ต่อคุณภาพอสุจิภายหลังการแช่แข็งและการทำละลาย โดยตรวจร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราอสุจิมีชีวิตในนาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ภายหลังการทำละลาย

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อม้า 3 ครั้งต่อตัว จำนวน 3 ตัว โดยน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิตและอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งมากกว่าร้อยละ 70 การแช่แข็งน้ำเชื้อทั้งแบบกล่องโฟมและเครื่องแช่แข็งควบคุมอุณหภูมิมีผลให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราอสุจิมีชีวิตในนาทีที่10 ภายหลังการทำละลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการแช่แข็ง (51.7+9.9% และ 61.3+7.4% เทียบกับ 67.8+4.4% และ 74.0+4.8% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงเวลาที่ 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังการทำละลาย อัตราอสุจิมีชีวิตของพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 ที่ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม (39.6+1.1% vs. 49.4+4.2% ในชั่วโมงที่ 2 และ 32.0+1.9% vs. 40.4+2.8% ในชั่วโมงที่ 4) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในพ่อม้าตัวที่ 3

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าวิธีการแช่แข็งทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้าได้ แต่วิธีการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิให้ผลที่ดีมากกว่าในส่วนของคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลาย อย่างไรก็ตามอัตราความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้ายังขึ้นกับอีกหลายปัจจัยเช่น ความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อพ่อม้าแต่ละตัว ขั้นตอนในการแช่แข็งและการทำละลาย ซึ่งควรที่จะมีการศึกษาต่อไปถึงวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อม้าแช่แข็ง

คำสำคัญ: พ่อม้า น้ำเชื้อ วิธีการแช่แข็ง

บทนำ

การผสมเทียมเป็นเทคโนโลยีทางชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญ ช่วยในการกระจายสายพันธุกรรมของสัตว์พันธุ์ดี ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำเชื้อ และช่วยลดความเสี่ยงต่อการบาดเจ็บขณะทำการขนส่งพ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์เพื่อทำการผสมพันธุ์ การผสมเทียมในม้าสามารถแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามชนิดของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียม ได้แก่ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยความเหมาะสมของการเลือกใช้น้ำเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ถึงแม้การใช้น้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็นเพื่อการผสมเทียมมีข้อดีคือ ให้อัตราการผสมติดและตั้งท้องที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (Samper *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992) แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นนานมากกว่า 48 ชั่วโมงมีผลในทางลบต่อคุณภาพอสุจิและอัตราการตั้งท้อง (Vidament *et al.*, 1997; Beckman *et al.*, 2004; Tharasanit *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีความต้องการของฟาร์มเพาะพันธุ์ม้าในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเนื่องจากง่ายต่อการเก็บรักษาและขนส่งน้ำเชื้อ แต่การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในทางคลินิกปฏิบัติกลับไม่ได้รับความนิยมมากเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งและการทำละลายอยู่ในเกณฑ์ต่ำ (Loomis and Graham, 2008) และยังมีความผันแปรในเรื่องความสามารถของอสุจิในการคงทนต่อสภาพการแช่แข็ง (cryopreservability) ที่แตกต่างกันในพ่อม้าแต่ละตัว (Amann and Pickett, 1987; Vidament, 2005; Metcalf , 2007; Loomis and Graham, 2008) ซึ่งจากรายงานของ Tischner (1979) ได้จำแนกกลุ่มพ่อม้าตามความสามารถของอสุจิในการคงทนต่อสภาพการแช่แข็งได้แก่ กลุ่มที่อสุจิคงทนต่อการแช่แข็งได้ดี (good freezers) กลุ่มที่อสุจิคงทนต่อการแช่แข็งได้ปานกลาง (fair freezers) และกลุ่มที่อสุจิคงทนต่อการแช่แข็งได้ต่ำ (poor freezers) โดยพิจารณาจากอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิภายหลังจากการทำละลายต้องมากกว่าร้อยละ 40 ระหว่างร้อยละ 20-40 และต่ำกว่าร้อยละ 20 ตามลำดับ ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง แต่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับผนังเซลล์และองค์ประกอบไขมันบนผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่แตกต่างกันในพ่อม้าแต่ละตัว (Parks and Graham, 1992; Kampschmidt *et al.*, 1993) วิธีการลดอุณหภูมิขณะทำการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยปัจจุบันพบมีการแช่แข็งน้ำเชื้อทั้งแบบในกล่องโฟม (conventional freezing technique) และการใช้เครื่องแช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled rate freezer) โดยทั้ง 2 วิธีนี้ให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังจากการทำละลายที่แตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ (Clulow *et al.*, 2007) ทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพอสุจิโดยเฉพาะอัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการทำละลายที่แตกต่างกันซึ่งสาเหตุหลักเนื่องจากการลดอุณหภูมิลงระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งที่ไม่เหมาะสม (Aurich, 2005; Moore *et al.*, 2006)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการแช่แข็ง 2 วิธีได้แก่ การแช่แข็งในกล่องโฟม (conventional freezing technique) และการใช้เครื่องแช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled rate freezer) ต่อคุณภาพอสุจิม้าภายหลังการทำละลาย

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

พ่อม้าที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ทั้งหมด 3 ตัว (สแตนดาร์ดเบรด เธอโรเบรดและวอร์มบลัด) อายุระหว่าง 6 ถึง 10 ปี จำนวน 3 ครั้งต่อตัว พ่อม้าทั้งหมดเป็นพ่อม้าที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ตามปกติของฟาร์ม ได้รับการเลี้ยงดูภายในคอกเดี่ยวขนาด 12 X 12 เมตรมีพื้นที่ออกกำลังกาย การจัดการน้ำและหญ้าแพงโกล่าแห้งตลอดเวลา

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อม้าแต่ละครั้งห่างกัน 1-2 สัปดาห์ ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม โดยการใช้โยนีเทียม (artificial vagina; Hannover, Germany) และตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตร สี ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของอสุจิ และร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ต้องมีร้อยละการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิต และจำนวนอสุจิที่ปกติมากกว่าร้อยละ 70 จากนั้นทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของนมผง (non-fat dry milk · semen extender, ความเป็นกรด-ด่าง 7.4, 350 มิลลิออสโมล) ในอัตราน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 3 ส่วน (Tharasanit *et al.*, 2007) และทำการขนส่งน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียสไปยังห้องปฏิบัติการ

การแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิตและจำนวนอสุจิปกติก่อนการแช่แข็งมากกว่าร้อยละ 70 นำน้ำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1600 รอบ นาน 10 นาที (Bedford *et al.*, 1995) เพื่อแยกน้ำเลี้ยงอสุจิและน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อออก ทำการเติมสารละลายกลูโคส อี ดี ที เอ (glucose EDTA) เพื่อปั่นล้างอสุจิ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1600 รอบ นาน 10 นาที เพื่อแยกสารละลายออกจากอสุจิ หลังจากนั้นเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของ 4% กลีเซอรอล (glycerol) (Squires *et al.*, 2004) และปรับความเข้มข้นของอสุจิให้ได้ 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร นำน้ำเชื้อไปปรับสมดุลภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และบรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Clulow *et al.*, 2006) ทำการแบ่งหลอดน้ำเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มเพื่อนำไปแช่แข็งด้วยวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟมและเครื่องแช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิ การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยกล่องโฟมขนาด 8x11x8 นิ้ว (กว้างxยาวxสูง) หนา 1 นิ้ว กระทำได้โดยการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อในแนวนอนเหนือระดับไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร นาน 10 นาที (Loomis *et al.*, 1983) ก่อนทำการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส ส่วนการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Cryologic system, Australia) นั้นกระทำโดยการลดอุณหภูมิจาก 4°C ลงไปกระทั่งถึง -8°C ด้วยอัตรา -6°C/นาที จากนั้น ลดอุณหภูมิลงไปยัง -50°C ด้วยอัตรา -4°C/นาที (ดัดแปลงจาก Moore *et al.*, 2006) ก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

เมื่อต้องการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Borg *et al.*, 1997) จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อในอัตราน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 4 ส่วน (Moore *et al.*, 2006) ก่อนทำการประเมินคุณภาพ ทั้งนี้ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจคุณภาพภายใน 1 เดือนหลังการแช่แข็ง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลาย

1.1 **การตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิ** (%motility) และอสุจิมีชีวิต (% viability) กระทำในนาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ภายหลังการทำละลาย การตรวจประเมินร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นสไลด์ และตรวจประเมินร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ตำแหน่งต่างๆ กันอย่างน้อย 5 ตำแหน่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า บนแผ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการตรวจอัตราอสุจิมีชีวิตนั้นทำได้โดยการย้อมอสุจิด้วยสี อนิลีน บลู อีโอซิน (aniline blue-eosin) นับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า อสุจิที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีอีโอซิน (อสุจิมีสีขาว) ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีอีโอซิน (ตัวอสุจิมีสีแดง)

1.2 **การตรวจรูปร่างและความผิดปกติของอสุจิ** ทำการตรวจความผิดปกติของหัวอสุจิ (head morphology) ด้วยการย้อมสี William's และตรวจวิเคราะห์อสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ส่วนการตรวจความผิดปกติของหางอสุจิ (tail morphology) ทำได้โดยการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายฟอร์มอล ซาไลน์ (formal saline) และตรวจนับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราการ มีชีวิตรอดของอสุจิ ทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการทำละลายในนาทีที่ 10 ชั่วโมงที่ 2 และ ชั่วโมงที่ 4 ตามลำดับ ด้วยวิธี Independent t-test และทำการเปรียบเทียบหาความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อม้าแต่ละตัว ด้วยวิธี one way ANOVA และ Bonferroni ด้วยโปรแกรม SPSS Version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA.) ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ผลการศึกษา

อสุจิพ่อม้าทั้ง 3 ตัวมีคุณภาพอสุจิอยู่ในเกณฑ์ที่ดี สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งได้ (ตารางที่ 1) และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 4-6 องศาเซลเซียสระหว่างขนส่งน้ำเชื้อไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิก่อนการแช่เย็น

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของคุณภาพน้ำเชื้อพ่อม้าภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ

พ่อม้า	ปริมาตร (มล.)	ความเป็นกรด-ด่าง	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	ความเข้มข้น ($x 10^6$/มล.)	รูปร่างอสุจิ	
					% อสุจิส่วนหัวปกติ	% อสุจิส่วนหางปกติ
ตัวที่ 1	59.0±27.1	7.8±0.3	81.7±2.9	88±13.5	79±2.4	73.2±2.7
ตัวที่ 2	37.3±12.5	7.7±0.3	81.7±2.9	117±28.9	84.5±3.9	75.8±3.7
ตัวที่ 3	38.3±18.9	7.8±0.3	83.3±2.9	113.3±15.8	78.1±2.7	75.6±3.8

เมื่อนำน้ำเชื้อมาแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลองตามวิธีการแช่แข็ง (กล่องโฟมและเครื่องควบคุมอุณหภูมิการแช่แข็ง) และทำการตรวจสอบคุณภาพอสุจิ (ร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราอสุจิมีชีวิต) ทั้งหลังการปรับสมดุลในสารป้องกันการแช่แข็งที่ 4 องศาเซลเซียส (post-equilibration) และหลังการทำละลาย (นาทีที่ 10, ชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4) จะพบว่าร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของอสุจิในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการทำละลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการทำละลายในพ่อม้าทุกตัว เมื่อเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งทั้ง 2 วิธี อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อจากพ่อม้าตัวที่ 3 มีร้อยละการเคลื่อนที่ในชั่วโมงที่ 2 ภายหลังการทำละลายสูงกว่าพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนในชั่วโมงที่ 4 ภายหลังจากทำละลายนั้นพบว่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิพ่อม้าทั้ง 3 ตัว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ยกเว้นน้ำเชื้อพ่อม้าในกลุ่มที่แช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนและภายหลังการแช่แข็ง (ข้อมูลจากการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 3 ครั้งต่อตัว)

ช่วงเวลา	วิธีการแช่แข็ง	ร้อยละการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ		
		พ่อม้าตัวที่ 1	พ่อม้าตัวที่ 2	พ่อม้าตัวที่ 3
หลังการปรับสมดุลในสารป้องกันการแช่แข็งที่ 4 °C	-	66.7±5.8	66.7±5.8	70
หลังทำละลาย 10 นาที	กล่องโฟม	40±10	43.3±11.5	60
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	53.3±5.8	56.7±5.8	60
หลังทำละลายชั่วโมงที่ 2	กล่องโฟม	16.7±5.8^{a}	16.7±5.8^{a}	40^{b}
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	33.3±11.5^{a}	33.3±11.5^{a}	43.3±5.8^{b}
หลังทำละลายชั่วโมงที่ 4	กล่องโฟม	5	5	13.3±5.8
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	8.3±2.9^{a}	11.7±7.6^{ab}	20^{b}

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในแนวนอนระหว่างร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิในพ่อม้าแต่ละตัว

เมื่อทำการตรวจอัตราอสุจิมีชีวิตภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อจะพบว่า ร้อยละของอสุจิมีชีวิตลดลงในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการทำละลาย การใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิในการแช่แข็งช่วยลดอัตราการตายของอสุจิภายหลังการทำละลาย โดยในส่วนของน้ำเชื้อจากพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 มีจำนวนอสุจิมีชีวิตในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ภายหลังการทำละลายสูงกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างนี้ในพ่อม้าตัวที่ 3 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละอสุจิที่มีชีวิต เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการแช่แข็งทั้ง 2 วิธี (ข้อมูลจากการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 3 ครั้งต่อตัว)

ช่วงเวลา	วิธีการแช่แข็ง	ร้อยละของอสุจิมีชีวิต		
		พ่อม้าตัวที่ 1	พ่อม้าตัวที่ 2	พ่อม้าตัวที่ 3
หลังการปรับสมดุลในสารป้องกันการแช่แข็งที่ 4 °C	-	70.4±6.6	75.4±4.5	76±3.5
หลังทำละลาย 10 นาที	กล่องโฟม	52.3±7.5	54.5±7.1	62.5±2.9
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	64.7±5.3	65.7±2.2	68.1±2.4
หลังทำละลายชั่วโมงที่ 2	กล่องโฟม	39.1±2.5[a]	40.2±2.2[a]	56.3±1.3
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	49.4±3.9[b]	49.4±2.3[b]	59.2±1.7
หลังทำละลายชั่วโมงที่ 4	กล่องโฟม	31.8±1.2[+]	32.2±2.7[+]	48.4±2.4
	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	40.2±3.2[‡]	40.7±3.1[‡]	52±1.9

[a,b]และ[+,‡] ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างวิธีการแช่แข็งด้วยกล่องโฟมกับการใช้เครื่องแช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิ ในพ่อม้าแต่ละตัวและแต่ละช่วงเวลาภายหลังการทำละลาย

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อมีผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพและความเสียหายที่เกิดขึ้นกับอสุจิ เช่น การเคลื่อนที่ของอสุจิ ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับส่วนของเยื่อหุ้มอสุจิ ความเสียหายของอะโครโซมที่ส่วนหัวของอสุจิ และการสูญเสียหน้าที่ของอสุจิ (Samper *et al.*, 1991; Crockett *et al.*, 2001) ซึ่งความเสียหายที่เกิดกับคุณภาพอสุจิดังกล่าว มีผลต่อการลดลงของทั้งร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิในพ่อม้าทั้ง 3 ตัวเมื่อเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อทั้ง 2 วิธี แต่พบว่าในชั่วโมงที่ 2 ภายหลังการทำละลาย ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิของพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 ต่างจากพ่อม้าตัวที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าในชั่วโมงที่ 2 และ 4 หลังทำละลายร้อยละของอสุจิมีชีวิตของพ่อม้าตัวที่ 1 และ 2 ต่างจากพ่อม้าตัวที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลดังกล่าว

แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อจากพ่อม้าแต่ละตัวมีคุณสมบัติในการคงทนต่อการแช่แข็งที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Loomis และคณะ (2008) โดยในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแปรผันของอสุจิในพ่อม้าแต่ละตัวต่อการคงทนต่อการแช่แข็ง ซึ่งเหตุผลหนึ่งเนื่องมาจากองค์ประกอบภายในของอสุจิที่มีความแตกต่างกัน อาทิเช่น สัดส่วนคอเรสเตอรอลต่อฟอสโฟลิปิดบนเยื่อหุ้มอสุจิของพ่อม้าและองค์ประกอบของน้ำเลี้ยงอสุจิ (Parks and Graham, 1992; Kampschmidt *et al*., 1993) จากรายงานของ Moran และคณะ (1992) พบว่าเมื่อนำน้ำเชื้อของพ่อม้ามาทำการทดลองโดยการแช่เย็นในช่วงอุณหภูมิที่ต่างๆ กันและตรวจดูอัตราอสุจิที่มีชีวิตพบว่าช่วงอุณหภูมิวิกฤติของอสุจิพ่อม้านั้นอยู่ระหว่าง 8 ถึง 19 องศาเซลเซียส จากรายงานดังกล่าวสรุปได้ว่า การลดอุณหภูมิลงขณะที่แช่เย็นในอัตราที่ไม่เหมาะสมนั้นจะส่งผลเสียต่อคุณภาพของอสุจิ นอกจากนี้ความแตกต่างกันในส่วนของอัตราเร็วและความคงที่ของการลดอุณหภูมิลงขณะทำการแช่แข็งนั้นส่งผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อคุณภาพอสุจิเช่นกัน (Amann and Pickett, 1987; Samper and Morris, 1998) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราอสุจิมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อนำน้ำเชื้อไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สาเหตุเนื่องมาจากขั้นตอนในการแช่แข็งน้ำเชื้อนั้นส่งผลกระทบต่อการกระตุ้นให้เกิดขบวนการต่างๆ ของอสุจิ เช่น ขบวนการคาปาซิเตชั่น (capacitation) (Watson, 2000; Vidament, 2005) ดังนั้นการตรวจความยาวนานของการมีชีวิตรอดของอสุจิ (Longevity test) จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญสำหรับการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้จริงในภาคสนามเนื่องจากแม่ม้าแต่ละตัวมีช่วงระยะการตกไข่ (ovulation time) ในระยะเวลาที่ไม่แน่นอน (ประมาณ 1-2 วันก่อนการหมดสัด) (Muller, 1987; Loomis and Squires, 2005) ดังนั้นการตรวจความยาวนานในการมีชีวิตของอสุจิจึงสามารถนำมาใช้ประเมินร่วมกับการวางแผนการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมให้ตรงกับช่วงเวลาในการตกไข่ให้มากที่สุดเพื่อเพิ่มอัตราการตั้งท้องภายหลังการผสมเทียม

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้าด้วยวิธีการใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิมีแนวโน้มไปในทิศทางที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม แต่อย่างไรก็ตามวิธีการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีให้ร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราอสุจิมีชีวิตภายหลังจากการทำละลายอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ (ร้อยละการเคลื่อนที่ภายหลังการทำละลายมากกว่า 30 และอัตราอสุจิมีชีวิตภายหลังการทำละลายมากกว่า 40) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 แต่ความยาวนานของการมีชีวิตรอดของอสุจิเมื่อทำการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิมีแนวโน้มที่ดีกว่าในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 หลังจากการทำละลาย ทั้งนี้เนื่องมาจากการแช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟมไม่สามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิและอาจมีความผันผวนของอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิเมื่อเทียบกับวิธีการแช่แข็งโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ นอกจากนี้การระเหยและการกระจายความเย็นภายในกล่องโฟมอาจขาดความแน่นอนในแต่ละครั้งของการแช่แข็ง ซึ่งส่งผลกระทบในทางลบต่อคุณภาพของอสุจิภายหลังจากการแช่แข็ง (Muller, 1982; Palmer and Magistrini, 1992; Clulow *et al*., 2007) รายงานของ Moore และคณะ (2006) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิลงที่คงที่ในช่วง -5 ถึง -45 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิที่สูง อย่างไรก็ตามการใช้กล่องโฟมในการแช่แข็งน้ำเชื้อมีข้อดีคือ ราคาถูก สามารถนำไปใช้ได้ง่าย ในทางตรงกันข้ามการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ จำเป็นต้องอาศัยเครื่องควบคุม

อุณหภูมิซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้โปรแกรมในการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการอาจส่งผลต่อคุณภาพของอสุจิภายหลังจากการแช่แข็งและการทำละลายที่แตกต่างกัน (Moran *et al.*, 1992; Neild *et al.*, 2003)

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าวิธีการแช่แข็งทั้งสองวิธีสามารถให้ผลสำเร็จต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้าได้ แต่วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลายมีแนวโน้มที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งด้วยกล่องโฟม อย่างไรก็ตามผลสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อม้ายังขึ้นกับอีกหลายปัจจัยเช่น ความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อพ่อม้าแต่ละตัว ขั้นตอนในการแช่แข็งและการทำละลาย ซึ่งควรที่จะมีการศึกษาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อม้าแช่แข็งและการนำมาใช้จริงในภาคสนามต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ในการสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ คุณจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร กองการสัตว์และเกษตรกรรมที่ 1 จังหวัดกาญจนบุรี ที่ให้การช่วยเหลือในการเตรียมพ่อม้า

เอกสารอ้างอิง

Amann, R.P. and Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7: 145-173.

Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 89: 65-75.

Beckman, T., Bruemmer, J.E., Graham, J.K. and Squires, E. L. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J. Anim. Sci.* 82: 690-694.

Bedford, S.J., Jasko, D.J. and Graham, J.K. 1995. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5 °C with and without seminal plasma. Theriogenology. 43: 939-953.

Borg, K., Colenbrander, B., Fazeli, A.R., Parlevliet, J. and Malmgren, L. 1997. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology. 48(4): 531-536.

Clulow, J.R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. and Morris, L.H.A. 2006. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. Aus. *Vet. J.* 85: 232-235.

Clulow, J.R., Mansfield, L.J., Morris, L.H.A., Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 2007. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 102: 129-139.

Crockett, 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: 793-803.

Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L., Amann, R.P. and Pickett, B.W. 1992. *In*: 38th Annual AAEP Convention Proceedings. Pregnancy rates utilizing fresh cooled and frozen-thawed stallion sperm. pp. 649-660.

Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T. and Herman, H.A. 1993. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36: 733-742.

Loomis, P.R., Amann, R.P., Squires, E.L. and Pickett, B.W. 1983. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.* 56: 687-693.

Loomis, P.R. and Squires, E.L. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. Theriogenology. 64: 480-491.

Loomis, P.R. and Graham, J.K. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. Anim. Reprod. Sci. 105: 119-128.

Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B. and Agero, A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology. 59: 1693-1705.

Metcalf, E.S. 2007. The efficient use of equine cryopreserved semen. Theriogenology. 71: 423-428.

Moore, A.I., Squires, E.L., Bruemmer, J.E. and Graham, J.K. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 26(5): 215-218.

Moran, D.M., Jasko, D.J., Squires, E.L. and Amann, R.P. 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. Theriogenology. 38(6): 999-1012.

Muller, Z. 1982. Fertility of frozen equine semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32: 47-51.

Muller, Z. 1987. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 121-125.

Palmer, E. and Magistrini, M. 1992. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. Acta.Vet. Stand. Suppl. 88: 137-152.

Parks, J.E. and Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology. 38: 209-222.

Samper, J.C., Hellander, J.C. and Crabo, B.G. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion sperm and sperm quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44: 107-114.

Samper, J.C. and Morris, C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. Theriogenology. 49: 895-903.

Squires, E.L., Keith, S.L. and Graham, J.K. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology. 62: 1056-1065.

Tharasanit, T., Manee-In, S., Khamenkhetwit, P., Sirivaidyapong, S. and Lohachit, C. 2007. The effect of cold storage on the quality of stallion semen and pregnancy rate after artificial insemination. *Thai J. Vet. Med.* 37 (4): 39-48.

Tischner, M., 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27: 53-59.

Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P. and Palmer, E. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. Theriogenology. 47: 907-917.

Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Anim. Reprod. Sci. 89: 115-136.

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

The Effect of Freezing Techniques on the Post-thawed Quality of Stallion Semen

Thanakorn Pojprasath, Chainarong Lohachit and Theerawat Tharasanit*

Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

* Corresponding author Email: theerawat.t@chula.ac.th

Abstract

The use of frozen-thawed semen has become increasingly important way for artificial insemination in equine stud farm because cryopreservation allows genetic preservation, "long-term" storage of semen and also is logistically acceptable. However, cryopreservation of stallion semen is often associated with poor viability post-thaw. The aim of this study was to compare the quality of stallion spermatozoa frozen with either conventional or controlled-rate freezing technique, in terms of sperm motility, viability and longevity at 10 min, 2 and 4 h post-thawing.

Semen quality of 3 stallions (3 ejaculates per stallion) used in this study was in acceptable ranges (>70% motility, viability and normal morphology). Cryopreservation reduced significantly the motility and plasma membrane integrity of stallion sperm to 51.7±9.9% and 61.3±7.4% compared unfavorably to post-equilibrated/non-frozen sperm (67.8±4.4% and 74.0±4.8%). However, sperm viability of stallion no.1 and no.2 frozen with controlled rate freezer was significantly greater than conventional method (p<0.05) when examined at 2 h (39.6±1.1% vs. 49.4±4.2%) and 4 h (32.0±1.9% vs. 40.4±2.8%) post-thawing. In contrast, there was no difference in sperm viability of stallion No.3 between the two freezing techniques.

We concluded that controlled rate and conventional freezing techniques can be successfully used to cryopreserve stallion spermatozoa. Although sperm from individual stallion demonstrate different freezability, controlled rate freezing technique appears to improve sperm motility and viability post-thawing. Further study is required to characterize factors associated with freezability of stallion semen, in order to improve sperm quality post-thawing.

Keywords: Stallion, Semen, Freezing techniques