บทที่ 5
อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น ด้วยสาร extender 5 ชนิด ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE, Lake's diluent, IGGKP และ EK โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น สาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิลดลง ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอสุจิมีการเผาผลาญสารอาหาร เช่น glucose, fructose และ inositol เพื่อใช้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ ส่งผลให้แหล่งของสารอาหารลดลง จึงมีสารอาหารไม่เพียงพอสำหรับการดำรงชีพของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษา ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดลดลง และสาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากการที่ตัวอสุจิมีการเผาผลาญพลังงานทั้งแบบใช้ออกซิเจน และแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยจากการรายงานของ Donoghue and Wishart (2000) พบว่าการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจนนี้ทำให้เกิดการผลิตกรดแลกติก ซึ่งมีผลทำให้ค่า pH ของน้ำเชื้อที่เจือจางอยู่ในสาร extender ลดลง และมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลงด้วย สำหรับการเผาผลาญพลังงานโดยใช้ออกซิเจนจะมีผลต่อเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิ เนื่องจากเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิประกอบไปด้วยกรดไขมันสายยาว (Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA) เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทั้งทางกายภาพและทางเคมีของเซลล์เมมเบรน โดยมีผลทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว โปรตีน และ DNA ถูกทำลาย ส่งผลให้อัตราการมีชีวิต และการผสมติดลดลง (Partyka et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าสาร extender ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) และยังพบว่าการใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300, 350 และ 400 mOsm/kg และ การใช้ BPSE ให้ผลอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากน้ำตาล fructose ซึ่งเป็นสารที่อาจจะเป็นส่วนประกอบสำคัญในสาร Modified extender ที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ นอกจากนี้ในสาร Modified extender ยังมีTES เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง TES มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่มีไอออนทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในตัวเอง จึงมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและเบสเพื่อควบคุมค่า pH ของสารละลายไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง และการที่จะทำให้ TES ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ค่า pH ของสาร extender จะต้องมีค่าใกล้เคียงกับค่า pKa ของ TES ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.4 จึงมีข้อสังเกตว่าสาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg มี TES เป็นส่วนประกอบมากกว่าสาร BPSE 5 เท่า และค่า pH ของสาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg มีค่าเท่ากับ 7.45±0.01 และ 7.42±0.03 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pKa ของ TES ขณะที่สาร BPSE มีค่า pH เท่ากับ 7.53±0.02 จึงทำให้ TES ที่ประกอบอยู่ในสาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg ทำงานได้มีประสิทธิภาพมากกว่า TES ที่ประกอบอยู่ใน

สาร BPSE สำหรับสูตรสาร extender ของ Lake's diluent, IGGKP, EK และ control ไม่มี TES เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นการใช้สาร extenders เหล่านี้จึงน่าจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อไก่ที่มีการเก็บแบบระยะสั้นในตู้เย็นมีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้นหากพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด การใช้ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300 mOsm/kg น่าจะเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300 mOsm/kg มีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับค่าออสโมลาริตี้ของน้ำเชื้อไก่ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 306±0.56 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น isoosmotic การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Iaffaldano et al., 2008 ได้ศึกษาการใช้ BPSE, Lake's diluent และ IGGKP ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่งวง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ BPSE ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนสูงกว่าการใช้ Lake's diluent และ IGGKP ($P<0.05$) เนื่องจากสาร BPSE มีค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ใกล้เคียงกับกับ seminal plasma ของไก่งวง และสอดคล้องกับการศึกษาของ Latif et al., 2005 ได้ศึกษาค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350, 375 และ 400 mOsm/kg ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่เนื้อสายพันธุ์ Hubbard ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง การใช้สาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 375 mOsm/kg ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg ($P>0.05$) เนื่องจากสาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 375 mOsm/kg มีคุณสมบัติเป็น isoosmotic การศึกษาในครั้งนี้จะแตกต่างกับรายงานของ Siudzinska and Lukaszewicz (2008) ที่พบว่าสาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น hyperosmotic เหมาะสมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ โดยจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอสุจิแบบคอโค้งงอต่ำกว่าสาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น isoosmotic และ hypoosmotic

5.2 ผลของชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร extender 3 ชนิด ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ 300 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ 6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol จากการศึกษาพบว่าชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant มีอิทธิพลร่วมกัน ดังนั้นการเลือกใช้สาร cryoprotectant จะต้องคำนึงถึงชนิดของสาร extender ด้วย เนื่องจากการทำงานร่วมกันระหว่างสาร extender และสาร cryoprotectant ต่างชนิดกันมีผลต่อการเพิ่มแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน ซึ่งแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลทำให้เซลล์อสุจิถูกทำลาย จากการศึกษาเมื่อพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่รวมและอัตราการมีชีวิตพบว่าการใช้ 11%Glycerol ร่วมกับ Lake's diluent มีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิต่ำกว่าการใช้สาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ชนิดอื่นๆที่ใช้ในการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ระยะเวลา (equilibration time) ที่เท่ากัน (10 นาที) ทำให้สาร cryoprotectant DMSO (78.13), DMA (87.12) และ DMF (73.09) ซึ่งมีมวลโมเลกุลน้อยกว่า glycerol ที่มีมวลโมเลกุล (92.09) มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เร็วกว่า glycerol เนื่องจาก equilibration time มีผลต่อการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์ จึงเป็นสาเหตุทำให้มีพิษกับเซลล์อสุจิของไก่ อีกทั้งโครงสร้างของเซลล์อสุจิของไก่ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจำนวนมากนั้นมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา Lipid

peroxidation จึงเกิดการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของตัวอสุจิ ทำให้ DNA ของตัวอสุจิถูกทำลาย ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง Gholami et al., 2010 นอกจากนี้ Safarinejad et al. (2010) และ Fang et al. (2002) พบว่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทำให้มีการผลิตสารอนุมูลอิสระ และสาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ และทำให้กลไกหรือหน้าที่ความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศผู้สูญเสียไป มีการรายงานว่า Glycerol มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิน้อยที่สุด รองลงมาคือ DMA และ DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิมากที่สุด (Tselutin et al., 1999) ซึ่งมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการใช้ Glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก เช่น Maeda et al. (1985) พบว่าในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ White Leghorn โดยใช้ 5.7%glucose เป็นสาร extender ร่วมกับ 10%Glycerol ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ Glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 15 และ 20% ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสาร Glycerol ที่ต่ำและสูงเกินไป ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการใช้ 5%Glycerol เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์อสุจิช้ากว่า 10%Glycerol ที่ equilibration time 2 ถึง 10 นาที จึงส่งผลให้มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะปกป้องเซลล์ และการใช้ 15 และ 20%Glycerol สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่า 10%Glycerol จึงส่งผลให้มีปริมาณของ Glycerol มากเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์ และจากการศึกษาของ Tselutin et al. (1999) ได้ศึกษาการใช้ Glycerol, DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 11% ร่วมกับ Lake's diluted ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า (type I99 roosters) พบว่าการใช้ Glycerol ให้ผลอัตราการมีชีวิตอยู่ในช่วง 72-76% ซึ่งสูงกว่าการใช้ DMA (62-68%) และการใช้ DMSO ให้ผลอัตราการมีชีวิตรอดต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 22-26% และยังพบว่าการใช้ 11%Glycerol (53.7±4.7%) ให้ผลอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้ 6%DMA (26.7±4.5%) แต่จากการศึกษาของ Chalah et al. (1999) พบว่าการใช้ 11%Glycerol ร่วมกับ Lake's diluent ให้ผลอัตราการผสมติด (76%) ไม่แตกต่างกับการใช้ 6.5%DMA (79%)

5.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ การลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 7°C/นาที จากอุณหภูมิ 5°C ถึง -35°C และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 20°C/นาที จากอุณหภูมิ -35°C ถึง -90°C และการลดอุณหภูมิโดยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว (LN_2 Vapour) ที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร (12 นาที) และ 3 เซนติเมตร (5 นาที) โดยใช้ 11% Glycerol ร่วมกับ Lake's diluent พบว่าการลดอุณหภูมิโดยการใช้ Freezer control ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยการอังไอไนโตรเจนเหลว ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ Freezer control มีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์เข้ามาควบคุมในการลดอุณหภูมิ จึงสามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิได้ดีกว่าการอังไอไนโตรเจนเหลว ขณะที่การลดอุณหภูมิด้วยการอังไอไนโตรเจนเหลวจะต้องอาศัยความเย็นที่เกิดจากการกระจายของไอไนโตรเจน หากมีการกระจายไอไนโตรเจนไม่สม่ำเสมอจะมีผลทำให้อุณหภูมิมีการผันแปรได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำเชื้อไก่แช่แข็งมีคุณภาพต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ehling et al. (2012) ได้ศึกษาการลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 3°C/นาที จากอุณหภูมิ 0°C ถึง -35°C และที่อัตราการลดอุณหภูมิ 50°C/นาที จากอุณหภูมิ -35°C ถึง -135°C เปรียบเทียบกับการลดอุณหภูมิโดยการอังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 4 ถึง 4.5 เซนติเมตร โดยใช้ 6.5%DMF+6.5%

Methyl acetamide (MA) ร่วมกับ HS-1 ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ White Leghorn พบว่าการลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control ให้ผลอัตราการผสมติด (49.3%) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง ($P<0.05$) จากการลดอุณหภูมิโดยการอังไอไนโตรเจนเหลว (11.5%) และจากผลการศึกษายังสอดคล้องกับการศึกษาของ Masindi et al. (2012) ที่พบว่าในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ Venda โดยใช้การลดอุณหภูมิแบบ Freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 1°C จากอุณหภูมิ 5°C ถึง -20°C ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม (43.0±7.9%) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (21.6±9.7%) สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยการอังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 4 ถึง 6 เซนติเมตร นาน 5 นาที (2.5±0.9% และ 2.3±1.2% ตามลำดับ) ($P<0.05$)

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สาร Modified extender ที่จัดเตรียมขึ้นสามารถใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นได้

2. ชนิดของสาร Cryoprotectant มีอิทธิพลร่วมกันกับชนิดของสาร extender จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ 11% Glycerol เป็นสาร Cryoprotectant มีแนวโน้มให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าสาร Cryoprotectant ชนิดอื่นๆ แต่เปอร์เซ็นต์ค่อนข้างต่ำ จึงยังไม่สามารถสรุปชนิดของสาร extenderและสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งได้

3. อัตราการลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control มีความเหมาะสมกว่าวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว แต่อาจต้องศึกษาอัตรา (rate) การลดอุณหภูมิที่เหมาะสมเพิ่มเติมทั้งนี้เพื่อเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

4. ในการทดสอบอัตราการผสมติด การส่องไข่ที่อายุไข่เข้าฟัก 7 วัน อาจมองเห็นเส้นเลือดที่เป็นร่างแหไม่ชัด อาจทำให้ประเมินอัตราการผสมติดผิดพลาดได้ ดังนั้นควรส่องไข่ที่อายุไข่เข้าฟัก 10 วัน เพื่อทำให้ มองเห็นฟองไข่มีลักษณะทึบครึ่งฟองได้ชัดเจนยิ่งขึ้น