



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลการเสริมสารแกมมาโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวต่อ
คุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งและความสัมพันธ์ของคุณภาพ
น้ำเชื้อกับการเกิดปฏิภักิริยาอิลิฟิดเปอร้ออกซิเดชัน

โดย ผศ.ดร.สพ.ญ. พนิดา ชนาภิวัฒน์

กุมภาพันธ์ 2561

สัญญาเลขที่ MRG5680130

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลการเสริมสารแกมมาโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวต่อ
คุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งและความสัมพันธ์ของคุณภาพ
น้ำเชื้อกับการเกิดปฏิภริยาติฟิตเปอร์ออกซิเดชัน

ผศ.ดร.สพ.ญ. พนิดา ชนาภิวัฒน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: MRG5680130

(รหัสโครงการ)

Project Title: The effect of gamma-oryzanol on post-thawed boar sperm quality and its relation with lipid peroxidation reaction

(ชื่อโครงการ) โครงการผลการเสริมสารแกมมาโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งและความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำเชื้อกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

Investigator : Panida Chanapiwat

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : panida.chn@mahidol.edu

Project Period : June 2013 to 2 June 2015

(ระยะเวลาโครงการ)

Abstract

The aim of the present study was to investigate the influence of boar breed on the optimal concentration of gamma-oryzanol on the qualities of cryopreserved boar semen and its relation with lipid peroxidation reaction. Semen was collected from 20 boars (10 Duroc, 5 Large white and 5 Landrace boars). The semen sample was divided into five groups (A-E) according to the concentration of gamma-oryzanol in extender II, i.e. 0, 0.08, 0.16, 0.24, and 0.32 mM, respectively. The semen was cryopreserved by nitrogen vapour and storage in nitrogen tank (-196 °C). After storage for a week, samples were thawed at 50°C for 12 seconds and evaluated for progressive motility, sperm viability, and acrosome integrity, lipid peroxidation test and total anti-oxidative capability test. The results demonstrated that gamma-oryzanol significantly improved progressive motility, viability and acrosome integrity of frozen-thawed boar semen. Considering the influence of breeds on the optimal concentration of gamma-oryzanol, for Duroc boar, gamma oryzanol at 0.16 (group C) yielded the highest percentage of progressive motility, sperm viability, and acrosome integrity. For Large white and Landrace boars, gamma oryzanol at 0.25 mg (group D) showed a significantly higher percentage of progressive motility, viability (not significant in Landrace) and acrosome integrity than other concentrations. However, measurement of MDA level and total anti-oxidative capability were not significantly different among groups. In conclusion, the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for boar semen cryopreservation in lactose-egg-yolk (LEY) freezing extender is not only depended on individual boar but also breed of boar, i.e. 0.16 mM for Duroc and 0.25 mM for Large white and Landrace.

Keywords : gamma-oryzanol, boar, semen cryopreservation, antioxidant

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการเสริมสารแกมมาโอริซานอลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งและการเกิดปฏิกริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อสุกรทั้งหมด 20 ตัว (พันธุ์คูร็อค 10 ตัว พันธุ์ลาร์จไวท์ 5 ตัวและพันธุ์แลนด์เรซ 5 ตัว) น้ำเชื้อพ่อสุกรที่รีดเก็บมาจะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (A-E) ตามความเข้มข้นของสารแกมมาโอริซานอลที่เสริมลงในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำเชื้อจะถูกแช่แข็งโดยการใช้วิธีอ้งบนไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาในถังลิกวิดไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 1 สัปดาห์ ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งจะถูกทำละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วินาที และจะนำมาตรวจประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การตรวจวัดระดับของปฏิกริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและการตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม จากผลการทดลองพบว่า การเสริมสารแกมมาโอริซานอลสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของอสุจิภายหลังจากการแช่แข็งได้ โดยสามารถทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิและความสมบูรณ์ของอะโครโซมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของพันธุ์พ่อสุกรกับความเข้มข้นของแกมมาโอริซานอลที่เหมาะสมจะพบว่าพ่อสุกรพันธุ์คูร็อคจะให้ผลของคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังจากการแช่แข็งดีที่สุด (การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิและความสมบูรณ์ของอะโครโซม) เมื่อเติมสารแกมมาโอริซานอลที่มีความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ (กลุ่ม C) ในส่วนของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซจะให้ผลของคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังจากการแช่แข็งที่ดีที่สุดเมื่อเติมสารแกมมาโอริซานอลที่มีความเข้มข้น 0.24 มิลลิโมลาร์ ในส่วนของการตรวจวัดระดับของปฏิกริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลมีแนวโน้มของปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการเสริมสารแกมมาโอริซานอลสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรภายหลังจากการแช่แข็งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการแช่แข็งของพ่อสุกรนั้นไม่เพียงมีความแตกต่างระหว่างตัวพ่อสุกรเท่านั้น ยังมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์สุกรอีกด้วย ซึ่งส่งผลต่อความต้องการระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันเช่นกัน

คำสำคัญ: แกมมาโอริซานอล, พ่อสุกร, น้ำเชื้อแช่แข็ง, สารต้านอนุมูลอิสระ

เนื้อหางานวิจัย

ผลการเสริมสารแกมมาโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง
และความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำเชื้อกับการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน
(The effect of gamma-oryzanol on post-thawed boar sperm quality and
its relation with lipid peroxidation reaction)

บทนำ

เทคโนโลยีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรยังมีข้อจำกัดในหลายด้าน ได้แก่ ความต้องการปริมาณตัวอสุจิที่มากในการผสมเทียมต่อ 1 ครั้งของการผสมและความยากของกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ เนื่องจากเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (plasma membrane) ของสุกรค่อนข้างไวต่อการแช่แข็ง และถูกทำลายระหว่างการแช่แข็ง ทำให้อัตราการอยู่รอด (survival rate) หลังการแช่แข็งของตัวอสุจิค่อนข้างต่ำและมีชีวิตอยู่ค่อนข้างสั้น (Larsson and Einarsson, 1976) ความเสียหายของอสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ, การเกิด cold shock ในช่วงที่มีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว รวมไปถึงการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (Aitken and Clarkson, 1988; Watson, 2000) อนุมูลอิสระในน้ำเชื้อนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติจากการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนโดยจะอยู่ในรูป Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิแดนท์สูง ประกอบด้วย ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2), เพอร์ออกซ์ซิดัล (peroxyl radicals) และ ไฮดรอกซ์ซิดัล (hydroxyl radicals, $HO^{\bullet}$) โดยในสภาวะปกติ นั้นการมีสารอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อจะสามารถพบได้ในปริมาณเล็กน้อยเนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Seminal plasma) มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดความสมดุลขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา capacitation ของตัวอสุจิ กระตุ้นการเกิดการยึดเกาะกันของตัวอสุจิกับชั้น zona pellucida ของไข่ และเป็นสารช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำให้ปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วยเช่นเดียวกัน ทำให้เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายกับตัวอสุจิได้ โดยพบว่าการมีระดับสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบหลักส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความชุ่มฉ่ำลดลง (decrease fluidity) และพบการแตกออกของสาย DNA (DNA fragmentation) การเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ที่มากเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดน้อยลงและลดความสามารถในการเกิดการรวมตัวกันของอสุจิและไข่ในการเกิดการปฏิสนธิ (Roca et al., 2005; Sheweita et al., 2005)

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยถึงผลของการเสริมสารเคมีชนิดต่างๆ ในสารละลายที่ใช้สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งเพิ่มมากขึ้นในสัตว์หลายชนิด เช่น สุกร สุนัข แมว และสัตว์ป่า เพื่อเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง และเพื่อให้มีอสุจิที่รอดชีวิตหลังการทำละลายเพิ่มสูงขึ้น โดยส่วนใหญ่องค์ประกอบหลักของสารละลายน้ำเชื่อนั้นจะประกอบไปด้วยน้ำตาลที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารหรือพลังงานของตัวอสุจิและสารที่ป้องกันการแช่แข็ง น้ำตาลที่ใช้ในสารละลายน้ำเชื้อมีมากมายหลากหลายชนิด ได้แก่ ฟรุคโตส กลูโคส แลคโตส เป็นต้น ในส่วนสารป้องกันการแช่แข็งที่นิยมใช้มากที่สุดคือ กลีเซอรอล ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับสุกรนั้นไม่ควรเกิน 3% ถึงจะสามารถทำให้ได้คุณภาพของน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งโดยการดัดแปลงเติมสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ลงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งโดยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี (Vitamin E) กลูตาไทโอน (Glutathione) ซิสเทอีน (Cysteine) พบว่าการเติมวิตามินอีช่วงก่อนทำการแช่แข็งจะสามารถเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการอยู่รอดของอสุจิได้ (Breininger et al., 2005; Gadea et al., 2005, 2008; Chanapiwat et al., 2009, Kaeoket et al., 2008, 2010) แกมมาโอริซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่พบได้ในน้ำมันรำข้าวซึ่งมีการรายงานว่ามีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้สูงกว่าวิตามินอีถึง 10 เท่า (Shin et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการเสริมน้ำมันรำข้าวให้กับพ่อม้าก็พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของตัวอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้สูงขึ้น (Arlas et al., 2008) และเมื่อไม่นานนี้ได้มีการศึกษาผลของการเสริมน้ำมันรำข้าวในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเพิ่มทั้งอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิและความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Kaeoket et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงความเข้มข้นของแกมมาโอริซานอลที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อสุกร ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของการเสริมสารแกมมาโอริซานอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งและความสัมพันธ์ของคุณภาพของน้ำเชื้อกับการเกิดปฏิกริยาอิลูติเนชัน

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณารับรองการใช้สัตว์จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (FVS-ACUC-Protocol No. MUVS-2012-43)

1. สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้สุกรพ่อพันธุ์ อายุระหว่าง 1-3 ปี จำนวน 20 ตัว ประกอบด้วยพันธุ์ดอร์ค 10 ตัว พันธุ์ลาร์จไวท์ 5 ตัว และพันธุ์แลนด์เรซ 5 ตัว พ่อสุกรเป็นพ่อพันธุ์ที่กำลังใช้งาน มีความสามารถในการผสมติดดี (proven sire) และมีสุขภาพสมบูรณ์ พ่อสุกรแต่ละตัวถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยว มีรางอาหาร และจิบน้ำอัตโนมัติ มีน้ำดื่มตลอด 24 ชั่วโมง และพ่อสุกรจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 3 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน

2. การรีดเก็บน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสด

ทำการเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อสุกรด้วยมือ (Hand gloved technique) ซึ่งจะรีดเก็บเอาเฉพาะน้ำเชื้อส่วนที่มีอสุจิมาก (sperm rich fraction) เท่านั้น และใช้ผ้าก๊อชกรองเอาส่วนเม็ดสาकु ออกก่อน หลังจากนั้นจะนำไปตรวจประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อโดยตรวจดูสี ปริมาตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจความเข้มข้นด้วย spectrophotometer (Spermacue®) และและการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และทำการแบ่งตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำมาตรวจอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ ความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ในการประเมิน น้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพที่จะสามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีรูปร่างอสุจิปกติมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

3. กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้จะนำมาทำการเจือจางด้วยสารละลาย Modena™ (Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ Modena™ 1-3 ส่วน (1:1-1:3) รักษาอุณหภูมิในตู้เย็นที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 800xg 15 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวด้านบนออก เจือจางส่วนที่เหลือด้วย freezing extender I (11% lactose solution 80 มล. + egg yolk 20 มล.) ผสมให้เข้ากัน ในขั้นตอนนี้น้ำเชื้อจะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มโดยจำแนกตามความเข้มข้นของสารแกมมาโอริซานอลที่เติมลงไป ใน freezing extender I ได้แก่ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชม. หลังจากนั้นทำการเจือจางเพิ่มด้วย freezing extender II (freezing extender I 89.5% กลีเซอรอล 3% และ Equex STM

1.5%) ในอัตราส่วน 2:1 โดยมีการปรับปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร หลังจากนั้นบรรจุตัวอย่างน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตรแล้วปิดผนึกหลอดอุณหภูมิน้ำเชื้อที่บรรจุแล้วโดยการวางหลอดฟางเหนือระดับผิวของไนโตรเจนเหลวที่ 4 เซนติเมตร (conventional liquid nitrogen method) นาน 20 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว และทำการเก็บหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งในถังลิกวิดไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปประเมินต่อไป

4. กระบวนการทำละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง

ทำละลายน้ำเชื้อในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วินาที โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย ModenaTM ในอัตราส่วน 1:4 (Chanapiwat et al., 2009) และอุ่นใน waterbath 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาทำการประเมินคุณภาพของตัวอสุจิภายหลังจากการแช่แข็ง

5. การประเมินคุณภาพของอสุจิภายหลังจากทำการละลาย

5.1 การประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิไปข้างหน้า (sperm progressive motility)

ทำการประเมินได้โดยนำน้ำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบหยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (Phase contrast microscope, Olympus CX31, NewYork, USA) ดูการเคลื่อนที่จากกำลังขยายต่ำ โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า (10 x 10) 200 เท่า (10 x 20) และเพิ่มกำลังขยายกล้องจุลทรรศน์เป็น 400 เท่า (10 x 40) เพื่อดูตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าแล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่

5.2 การประเมินอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ (sperm viability)

จำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตจะตรวจนับหลังจากด้วยการย้อมสี SYBR-14/PI (L-7011, Live/Dead[®] Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร มาเติมด้วย SYBR-14 2.7 ไมโครลิตร และ EthD-1 จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการตรวจนับตัวอสุจิ 200 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 400x (Carl Zeiss, Inc., Axioskop 40, Germany) โดยตัวอสุจิที่มีชีวิตหรือมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ (intact plasma membrane) จะย้อมติดสีเขียวของ SYBR-14 ขณะที่ตัวอสุจิที่ตายจะมีความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จะติดสีแดงของ EthD-1 (Chanapiwat et al., 2009)

5.3 การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity)

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมจะทำการตรวจโดยการย้อมสี fluoresceinisothiocyanate-labeled peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin (FITC-PNA) โดยผสมน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร กับสีย้อม EthD-1 จำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

15 นาที หลังจากนั้นทำการสเมียร์ตัวอย่างบนสไลด์แก้วจำนวน 2 แผ่นและทำการ fix ด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งให้แห้ง ขั้นตอนต่อไปนำสีย้อม FITC-PNA จำนวน 50 ไมโครลิตร (เจือจาง FITC-PNA ด้วย phosphate-buffered saline) หยดลงทั่วสไลด์ แล้วนำไปเก็บรักษาในกล่องที่มีความชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจนับตัวอสุจิ 200 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 1000x (Carl Zeiss, Inc., Axioskop 40, Germany) โดยสามารถแบ่งแยกคุณภาพของอะโครโซมได้ 2 แบบ คือ อะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) อะโครโซมที่เสียหาย (non-intact acrosome) (Chanapiwat et al., 2009)

6.การตรวจวัดระดับของ lipid peroxidation และ ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

6.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อ

ดูดตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งหลังปริมาตร 120 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1600xg (HeraeusTM MegaFugeTM 40R, Thermo Fisher Scientific, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย 1% TritonX-100 ปริมาตร 360 ไมโครลิตรและincubate นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 4,000xg นาน 30 นาที และทำการเก็บสารส่วนใสด้านบนใน Eppendorf tube และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันต่อไป (Hu et al., 2014)

6.2การตรวจวัดระดับของปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation test)

จะทำการตรวจวัดด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay โดยการดูดสารละลายตัวอย่างขนาด 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมสาร 1% orthophosphoric acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ 0.6% thiobarbituric acid ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและเติมสาร n-butanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm นาน 15 นาที หลังจากนั้นทำการดูดสารชั้นบนปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ลงใน microplate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์สีชมพูที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลายแบบลำแสงคู่ (Synergy HT, Biotek, USA) ที่ความยาวคลื่น 535 และ 520 นาโนเมตร ค่าความแตกต่างที่วัดได้จากทั้งสองความยาวคลื่นจะเป็นค่าของ MDA ที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างและจะแสดงในหน่วยของ nmol/ml (Uchiyama and Mihara, 1978)

6.3 การตรวจวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Anti-oxidative Capability)

ทำการตรวจวัดโดยใช้ Total Anti-oxidative Capability (T-AOC) Assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) โดยทำตามวิธีการตรวจของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งอาศัยหลักการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ให้เป็น

สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสาร phenanthrolin และจะได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยค่าที่วัดได้จะแสดงในหน่วยของ U/ml

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 19.0 (SPSS 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) การกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติจะประเมินโดยใช้ Shapiro-Wilk test ผลของการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังทำละลายในแต่ละกลุ่มทดลองโดยใช้ Two-ways ANOVA โดยการศึกษาตัวแปรตาม (dependent variable) ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตหลังทำละลาย เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีความผิดปกติของอะโครโซม เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีติเอ็นเอเสียหาย ระดับของการเกิดปฏิกิริยาอากิพิดเพอร์ออกซิเดชัน และความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และตัวแปรอิสระ (independent variable) ได้แก่ ความเข้มข้นของแกมมาโอริซานอลที่ต่างกัน (0, 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์) ตัวแปรสุ่ม (random factors) ได้แก่ พ่อสุกร ค่าเฉลี่ยของแต่ละพารามิเตอร์ในแต่ละตัวแปรจะถูกนำมาเปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test ค่า $P < 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อสด

ค่าเฉลี่ยของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซมมีค่าเท่ากับ 76.3 ± 4.3 , 67.1 ± 17.1 และ 66.8 ± 11.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาตรของน้ำเชื้อสดมีค่าอยู่ระหว่าง 168-436 มิลลิลิตร และความเข้มข้นของตัวอสุจิมีค่าอยู่ระหว่าง $395-460 \times 10^6$ ตัวต่อมิลลิลิตร

ผลการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำละลาย

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

ผลของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิในพ่อสุกรพันธุ์ดอร์ค ลาร์จไวท์และแลนด์เรซแสดงดังตารางที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ในพ่อสุกรพันธุ์ดอร์ค เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิสูงสุดในกลุ่ม C ($P < 0.01$) (ตารางที่ 1) ในพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่ม D สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) และในพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซกลุ่ม C และ D มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่า ความสามารถในการแช่แข็งของพ่อสุกร (sperm freezability) ที่มี

ความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ จากการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมของพ่อสุกรจำนวน 20 ตัว การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของพ่อสุกรพันธุ์ดอร์หรือคสูงที่สุด รองลงมาคือพันธุ์แลนด์เรซ และลาร์จไวท์ ตามลำดับ

อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

อัตราการรอดชีวิตของอสุจิในพ่อสุกรพันธุ์ดอร์หรือคและลาร์จไวท์มีค่าสูงที่สุดในกลุ่ม C และ D ตามลำดับ (ตารางที่1 และ 2) แต่ในพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ความสมบูรณ์ของอะโครโซม

ในพ่อสุกรพันธุ์ดอร์หรือค กลุ่ม C มีค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น (ตารางที่ 1) ในพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ ความสมบูรณ์ของอะโครโซมในกลุ่ม D มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ 3)

การตรวจวัดระดับปฏิกิริยา लिपिเดเพอร์ออกซิเดชันและความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

ผลการทดลองจากการตรวจวัดระดับของปฏิกิริยา लिपिเดเพอร์ออกซิเดชันจากการวัดระดับของมาลอนไดแอลดีไฮด์พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลมีแนวโน้มของปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยการใช้ชุดทดสอบพบว่ากลุ่มที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลมีแนวโน้มของระดับความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (Progressive motility) อัตราการรอดชีวิต (viability) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Acrosome integrity) ของตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งทั้งหมด 5 กลุ่ม (A คือกลุ่มควบคุม B ถึง E คือกลุ่มที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) (พ่อสุกรตัวเดียว, n=10 ejaculates)

Groups	Progressive motility (%)	Viability (%)		Acrosome integrity (%)	
		Viable	Non-viable	Intact	Non-intact
A	35.0 ± 9.1 ^c	29.2 ± 5.6 ^c	66.9 ± 14.1	35.9 ± 9.1 ^c	63.1 ± 8.9
B	44.0 ± 6.1 ^b	35.0 ± 4.7 ^b	65.1 ± 4.7	41.5 ± 10.4 ^{bc}	58.5 ± 10.4
C	50.0 ± 8.2 ^a	40.0 ± 6.4 ^a	60.5 ± 6.4	52.2 ± 9.6 ^a	47.8 ± 9.6
D	45.5 ± 7.2 ^{ab}	38.1 ± 5.2 ^{ab}	61.9 ± 5.2	47.4 ± 9.5 ^{ab}	52.6 ± 9.5
E	44.5 ± 8.6 ^b	36.1 ± 5.9 ^{ab}	64.0 ± 6.0	44.5 ± 13.1 ^b	55.5 ± 13.1
Significant differences	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	NA	<i>P</i> < 0.01	NA

Values in each column marked with different superscript letters differ significantly (*P* < 0.05).

NA=Not analyzed.

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (Progressive motility) อัตราการรอดชีวิต (viability) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Acrosome integrity) ของตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งทั้งหมด 5 กลุ่ม (A คือกลุ่มควบคุม B ถึง E คือกลุ่มที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) (พอสุกรลาร์จไวท์, n=5 ejaculates)

Groups	Progressive motility (%)	Viability (%)		Acrosome integrity (%)	
		Viable	Non-viable	Intact	Non-intact
A	26.0 ± 6.5 ^c	31.8 ± 5.5 ^b	62.8 ± 5.5	43.9 ± 13.2 ^c	56.1 ± 13.2
B	37.0 ± 12.0 ^b	37.1 ± 4.9 ^{ab}	62.9 ± 4.9	53.0 ± 17.6 ^b	47.0 ± 17.6
C	39.0 ± 8.2 ^b	36.0 ± 6.3 ^{ab}	64.0 ± 6.3	51.5 ± 18.6 ^b	48.5 ± 18.6
D	49.0 ± 6.5 ^a	42.2 ± 5.4 ^a	57.8 ± 5.4	60.3 ± 11.8 ^a	39.7 ± 11.8
E	36.0 ± 8.9 ^b	34.2 ± 5.2 ^b	65.8 ± 5.2	49.9 ± 13.8 ^b	50.1 ± 13.8
Significant differences	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.05	NA	<i>P</i> < 0.01	NA

Values in each column marked with different superscript letters differ significantly (*P*<0.05).

NA=Not analyzed.

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (Progressive motility) อัตราการรอดชีวิต (viability) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Acrosome integrity) ของตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งทั้งหมด 5 กลุ่ม (A คือกลุ่มควบคุม B ถึง E คือกลุ่มที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) (พ่อสุกรแลนด์เรซ, n=5 ejaculates).

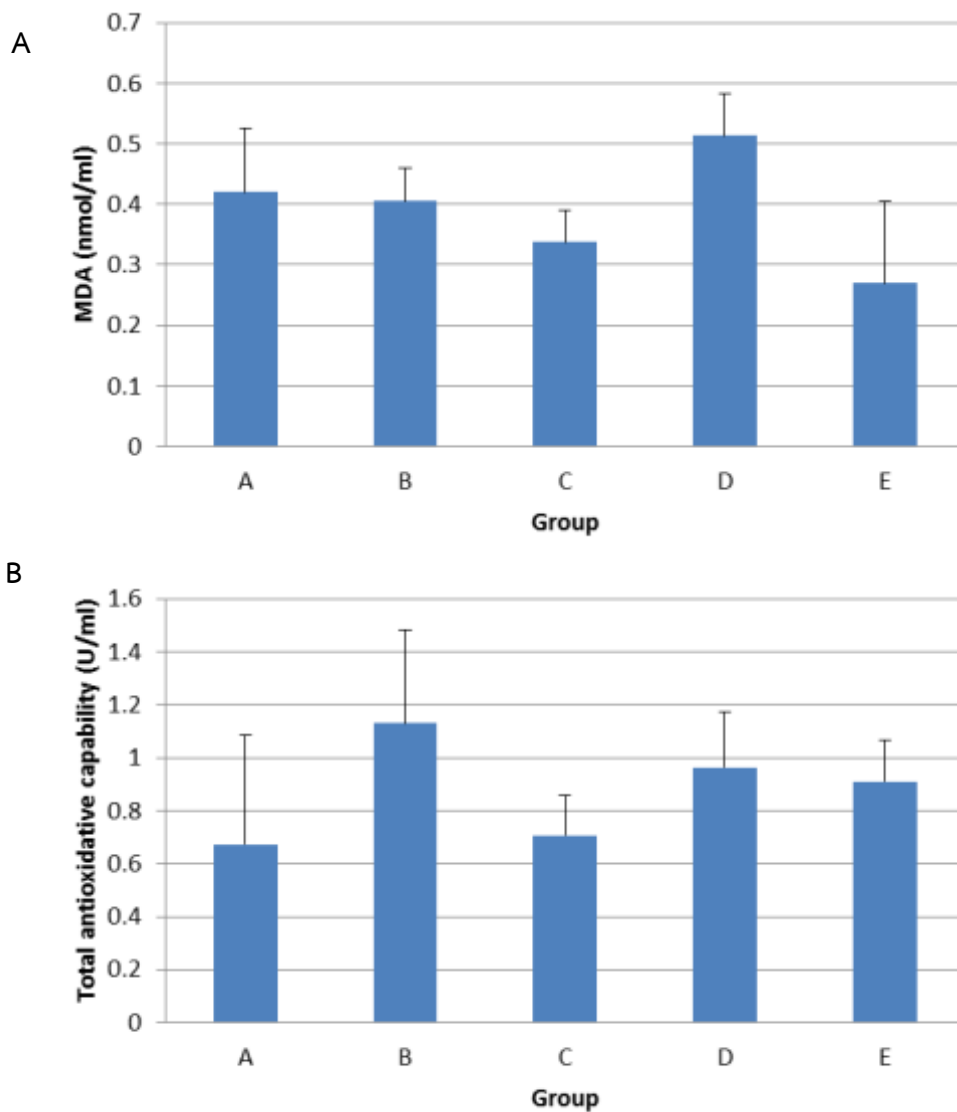
Groups	Progressive motility (%)	Viability (%)		Acrosome integrity (%)	
		Viable	Non-viable	Intact	Non-intact
A	33.0 ± 14.8 ^b	27.8 ± 9.3 ^a	72.2 ± 9.3	39.6 ± 13.7 ^b	60.4 ± 13.7
B	41.0 ± 13.9 ^{ab}	31.6 ± 7.4 ^a	68.4 ± 7.4	41.4 ± 9.4 ^b	58.6 ± 9.4
C	47.0 ± 12.0 ^a	35.9 ± 8.4 ^a	64.1 ± 8.4	42.0 ± 12.3 ^b	58.0 ± 12.3
D	48.0 ± 10.4 ^a	36.7 ± 7.9 ^a	63.3 ± 8.1	51.6 ± 15.4 ^a	48.4 ± 15.4
E	42.0 ± 14.0 ^{ab}	34.6 ± 5.9 ^a	65.4 ± 6.3	42.2 ± 12.6 ^b	57.8 ± 12.6
Significant differences	<i>P</i> < 0.05	NS	NA	<i>P</i> < 0.05	NA

Values in each column marked with different superscript letters differ significantly (*P* < 0.05).

NS=Not significant.

NA=Not analyzed.

รูปที่ 1 กราฟข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (means $\pm$ S.E.M) การวัดระดับปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันโดย การวัดระดับ malondialdehyde (MDA) (หน่วยวัด nmol/ml) (A) และความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Anti-oxidative Capability) (หน่วยวัด U/ml) ของตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรภาย หลังจากการแช่แข็งทั้งหมด 5 กลุ่ม (A คือกลุ่มควบคุม B ถึง E คือกลุ่มที่เสริมสารแกมมาโอริซานอลที่ ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ)



วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารแกมมาโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวมีผลทำให้เพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็ง ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของโครโมโซม จากข้อมูลที่เราทราบ การศึกษานี้เป็นรายงานฉบับแรกที่มีการศึกษาผลของแกมมาโอริซานอลที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งและระดับปฏิกิริยาของลิวติเปอร์ออกซิเดชันโดยเน้นความแตกต่างของสายพันธุ์ของพ่อสุกร (ดรู๊อค ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ) ในการศึกษาบ่งชี้ว่าพันธุ์ของพ่อสุกรไม่เพียงแต่ส่งผลต่อความสามารถในการแช่แข็งที่แตกต่างกันแล้ว ยังมีความแตกต่างในเรื่องของความต้องการความเข้มข้นของแกมมาโอริซานอลในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรอีกด้วย

ในพ่อสุกรพันธุ์ดรู๊อค การเสริมสารแกมมาโอริซานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์จะให้ผลของคุณภาพน้ำเชื้อสุกรหลังการแช่แข็งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ สำหรับพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ ระดับแกมมาโอริซานอลที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ จะให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและความสมบูรณ์ของโครโมโซมสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ที่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งแล้ว เรายังพบความแตกต่างระหว่างพ่อแต่ละตัวในพันธุ์เดียวกันอีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Waterhouse et al. 2006; Chanapiwat et al. 2009) ซึ่งเหตุผลของความแปรผันระหว่างพ่อสุกรแต่ละตัวในการทนต่อการแช่แข็งนั้นยังไม่มีกลไกที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามความแตกต่างทางพันธุกรรมและทางสรีรวิทยาของตัวอสุจิในพ่อสุกรแต่ละตัวอาจจะสามารถอธิบายผลที่เกิดขึ้นได้ รวมถึงความแตกต่างขององค์ประกอบไขมัน กรดไขมันแต่ละชนิด และระดับของสเตอรอลในพลาสมาเมมเบรนของตัวอสุจิก็ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรในการผ่านกระบวนการแช่แข็งได้ (White, 1993; Watson, 1995; Holt et al. 2005; Waterhouse et al. 2006) จากผลการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ของอสุจิ (Chen et al. 2012; De Canio et al. 2014) และมนุษย์ (Xu et al. 2012) พบว่าตัวอสุจิแต่ละตัวมีการแสดงออกของโปรตีนพลาสมาเมมเบรนที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่อธิบายถึงผลของความแตกต่างระหว่างพ่อสุกรและระหว่างพันธุ์ในการศึกษานี้ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่มีการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ในอสุจิของสุกร

ในการศึกษานี้คุณภาพของน้ำเชื้อสุกรหลังจากการแช่แข็งในกลุ่มที่การเสริมสารแกมมาโอริซานอลมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกกลุ่มทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของสารแกมมาโอริซานอลที่มีหมู่ hydroxyl และ phenoxy ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและเข้าจับอนุมูลอิสระส่งผลทำให้ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่อยู่บริเวณพลาสมาเมมเบรนของตัวอสุจิได้ (Masuda et al. 2006; Srinivasan et al. 2007) นอกจากสารแกมมาโอริซานอลแล้วน้ำมันรำข้าวยังประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้แก่ วิตามินอี ที่มีคุณสมบัติทำลายพันธะโควาเลนต์ของอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากการที่ไปจับกับสายของกรดไขมันไม่อิ่มตัวใน

พลาสมาเมมเบรนของตัวอสุจิส่งผลทำให้เกิดความเสียหายของพลาสมาเมมเบรนลดลง (Pena et al. 2003; Breininger et al. 2005; Jeong et al. 2009) และน้ำมันรำข้าวยังมีสารกลุ่มพวกรวม membrane stabilizer ได้แก่ phytosterols ที่ช่วยทำให้เกิดความเสถียรและแข็งแรงของพลาสมาเมมเบรนของตัวอสุจิส่งผลทำให้ป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Brufau et al. 2008)

กล่าวโดยสรุปความเข้มข้นของสารแกมมาโอริซานอลที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรนั้นไม่เพียงแต่ขึ้นกับความแตกต่างระหว่างตัวพ่อสุกร แต่รวมถึงพันธุ์สุกรด้วย โดยในการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของสารแกมมาโอริซานอลในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่เหมาะสมกับพ่อสุกรพันธุ์ดุหรืออยู่ในระดับความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ และพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรชอยู่ในระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์

เอกสารอ้างอิง

- Aitken RJ, Clarkson JS, 1998: Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9, 367-376.
- Arlas TR, Pederzolla CD, Terraciano PB, 2008: Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. *Anim Reprod Sci* 107, 306.
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT, 2005: Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63, 2126-2135.
- Brufau G, Canela MA, Rafecas M, 2008: Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr Res* 28, 217-225.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P, 2009: Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian J Androl* 11, 600-608.
- Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao Z, Du W, Qin T, Liu Y, Wang D, 2012: Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics* 77, 59-67.
- De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A, Roncada P, 2014: Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. *Mol Biosys* 10, 1264-1271.

- Gadea J, Garcia-Vazquez F, Matas C, Gardon JC, Canovas S, Gumbao D, 2005: Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl* 26, 396-404.
- Gadea J, Gumbao D, Canovas S, Garcia-Vazquez FA, Grullon, LA, Gardon JC, 2008: Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int J Androl* 31, 40-49.
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF, 2005: The significance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63, 370-382.
- Hu JH, Geng GX Effects of alginate on frozen-thawed boar spermatozoa quality, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities
- Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ, 2009: Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58, 181-189.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M, 2010: Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian J Androl* 12, 760-765.
- Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit P, Chanapiwat P, 2012: Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J Vet Med Sci* 74, 1149-1153.
- Kaeoket K, Tantiparinyakul K, Kladkaew W, Chanapiwat P, Techakumphu M, 2008: Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Thai J Agri Sci* 41, 1-9.
- Larsson K, Einarsson S, 1976: Influence of boar on the relationship between fertility and post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand* 17, 74-82.
- Masuda T, Yamada K, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H, 2006: Antioxidant mechanism studies on ferulic acid: identification of oxidative coupling products from methyl ferulate and linoleate. *J Agric Food Chem* 54, 6069-6074.
- Penã FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriquez-Martinez H, 2003: Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial

- membrane potential after cryopreservation of different fractions of ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78, 85-98.
- Roca J, Rodriguez JM, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA 2005: Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl.* 26:15-24.
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H, 2005: Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 6: 495-501.
- Shin T, Godber JS, Martin D, Wells J, 1997: Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. *J Food Sci* 62, 704-728.
- Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP, 2007: Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr* 40, 92-100.
- Uchiyama M, Mihara M, 1978: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86, 271-278.
- Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR, 2006: Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131, 887–894.
- Watson PF, 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-492.
- Watson PF, 1995: Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim* 31, 135-140.
- Xu W, Hu H, Wang Z, Chen X, Yang F, Zhu Z, Fang P, Dai J, Wang L, Shi S, Li Z, Qiao Z, 2012: Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patient with infertility. *J Proteomics* 75, 5426-5436.

Output (Publications)

1. **P chanapiwat and K Kaeoket** (2015) Breed of boar influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 50, 221-226.