

ผลของ cysteine และ glutathione ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ของไก่พื้นเมืองไทย

Effect of cysteine and glutathione on the quality of cryopreserved Thai native chicken semen.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1*}, พรจิต สอนสีดา¹ และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์¹

Thevin Vongpralub^{1*}, Pornjit Sonseeda¹ and Bunyat Loaphaibool¹

บทคัดย่อ: อัตราการรอดชีวิตที่ต่ำของอสุจิในน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เกิดจากการมีอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ซึ่งก่อให้เกิด lipid peroxidation ส่งผลเสียต่ออัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริม antioxidant ได้แก่ cysteine และ glutathione (Glu) ในน้ำยาเจือจางต่ออัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองไทย น้ำเชื้อได้จากพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองจำนวน 20 ตัววัดรวมกัน ในการทดลองที่ 1 แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 4 ส่วนเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่มี cysteine 0(กลุ่มควบคุม), 1, 5, และ 10 mM ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 4 ส่วน เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่มี Glu 0(กลุ่มควบคุม), 0.1, 0.5, และ 1 mM ตามลำดับ บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดฟางขนาดความจุ 0.5 มล. แช่แข็งโดยการอิงไอน์โตรเจนเหลว หลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อมาละลายและประเมินอัตราการเคลื่อนที่ ซึ่งพบว่าการเสริม cysteine มีผลดีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของอสุจิ ส่วนการเสริม glutathione มีผลเสียต่ออัตราการรอดชีวิต และจากการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการผสมเทียมให้กับแม่ไก่ไข่ พบว่าการเสริม cysteine ระดับ 1 mM ให้อัตราของไข่มีเชื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนการเสริม glutathione นั้น พบว่ามีผลเสียต่ออัตราของไข่มีเชื้อ ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการเสริม cysteine ระดับ 1 mM เป็นระดับที่เหมาะสมต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

คำสำคัญ : antioxidant, น้ำเชื้อไก่, การแช่แข็ง, cysteine, glutathione

ABSTRACT: Poor sperm viability post-thaw is associated with the excessive formation of reactive oxygen species, which results in lipid peroxidation and reduced sperm motility and subsequent fertility. The objective of this study was to determine the effects of addition of the antioxidants, cysteine and glutathione (Glu) to freezing media on post-thaw motility and fertility for cryopreservation of native chicken semen. Semen from twenty cocks was collected, pooled and used in two studies. In study I, pooled semen was divided into four aliquots: cysteine 0 (control), 1, 5, and 10 mM. In study II, pooled semen was divided into four aliquots: control, Glu 0.1, 0.5 and 1 mM. Semen suspensions were loaded in 0.5 ml straws and placed in nitrogen vapour. After cryopreservation, frozen semen samples were thawed and examined for sperm motility. Cysteine showed more positive effect on viability than control whereas Glu resulted negative effect on viability. The fertility of frozen semen was also evaluated by inseminating to layer hens. The fertility of 1 mM cysteine was higher than control and 10 mM groups. However, the 0.5 mM and 1.0 mM Glu had a negative impact in sperm fertility. In conclusion 1 mM cysteine was the optimum concentration to be added to freezing extender for improving the quality of frozen-thawed native chicken semen.

Key words: antioxidant, chicken semen, freezing, cysteine, glutathione

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

* Corresponding author. Tel : 66-4320-2362 ; fax : 66-4320-2362, E-mail : vthevi@kku.ac.th

บทนำ

องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์สุจิประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณที่สูงจึงไวต่อ Lipid peroxidation (Fujihara et al., 1978) seminal plasma จะมีสาร antioxidant ป้องกันเกิด peroxidation ได้ชั่วคราว ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายนอกร่างกาย ในระยะเวลาที่ยาวนานจึงไม่สามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation ได้ ทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Breque et al., 2003) สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ขั้นตอนหรือกระบวนการต่างๆ มีผลต่อการลดปริมาณ antioxidant และเพิ่มปริมาณกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) (Bilodeau et al., 2001) จึงเกิด lipid oxidation เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้คุณภาพของอสุจิของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งต่ำลง รวมถึงความสามารถในการปฏิสนธิ (Hammadeh et al., 2009) มีรายงานการศึกษาถึงผลดีในการเสริม antioxidant ในน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่นในมีการเสริม oxidizes glutathione, bovine serum albumin, cysteine และ lycopane ในน้ำเชื้อแพะ (Uysal and Bucak, 2007) การเติม cysteine ในน้ำเชื้อสุกร (Kacoket et al., 2010) และการเสริม glutathione ในน้ำเชื้อกระบือ (Ansari et al., 2011) สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่ซึ่งมีคุณภาพที่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด และให้อัตราไขมีเชื้อ หลังการผสมเทียมแม่ไก่ยังไม่เป็นที่น่าพอใจนั้น ยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงผลของการเสริม cysteine เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของการเสริม cysteine และ glutathione ต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลองใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ อายุ 1-2 ปี จำนวนรวม 20 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และในการทดลองทดสอบอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการแม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า

รวมทั้งสิ้นจำนวน 48 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 3 ตัว สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเติมที่ น้ำยาเจือจางที่ใช้คือสูตร Schramm โดยมีองค์ประกอบทางเคมี(ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Sigma,USA) ในน้ำ 1 ลิตรดังนี้ Magnesium acetate 0.70 กรัม, Sodium glutamate 28.50 กรัม, Glucose 5.00 กรัม, Inositol 2.50 กรัม, และ Potassium acetate 5.00 กรัม (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง เมื่อพ่อพันธุ์ตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาดขนาด 1.5 ml. โดยในหลอด 1.5 ml จะมีน้ำยาเจือจางอยู่ 200 µl และน้ำเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °ซ ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ bright microscope ตามที่อ้างโดย (เทวินทร์ และยุพิน, 2551) น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนและเคลื่อนที่ต่ำกว่าร้อยละ 80 จะไม่นำมาศึกษา สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง รวบรวมน้ำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในหลอดเดียวกัน (pooled semen) แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง คือการทดลองที่ 1 ศึกษาเปรียบเทียบผลของการเสริม cysteine(Sigma, C7352,USA) ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 1, 5, และ 10 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การทดลองที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบการเสริม glutathione (Sigma, G6013,USA) ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.1, 0.5, และ 1.0 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เติมน้ำยาเจือจางอีกให้ได้สัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ : น้ำยา) ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อนั้นลดอุณหภูมิเหลือ 5°ซ โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสม dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบเป็นร้อยละ 6 ในน้ำเชื้อเจือจางสุดท้าย 4 ส่วน (ส่วนเดิม 3 ส่วน ส่วนที่มี DMF 1 ส่วน) บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร บ่มหลอดน้ำเชื้อเจือจาง

ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที จากนั้นแช่หลอดบรรจุ น้ำเชื้อให้แห้ง นำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่อง โฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาถึงระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดฟางบรรจุ น้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว เป็นการสิ้นสุดขบวนการ ทำน้ำเชื้อแช่แข็งไถ่หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยจุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที แช่หลอดให้แห้งแล้วตัดปลายถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่จุ่มในน้ำเย็นนำไปตรวจคุณภาพหรือนำไปผสมเทียมแม่ไก่โดยทันที การผสมเทียมนั้นดำเนินการตามวิธีการผสมเทียมโดยการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดไถ่ตามวิธีการของ Quinn และ Burrows (1936) อ้างโดย (Lake and Stewart, 1978) ทำการผสมเทียมในช่วงเวลา 15.00 – 17.00 น. โดยใช้ไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ถอดปลายเข็มฉีดยาออกแล้ว ดูดบรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร ผสมเทียมโดยการสอดไซริงค์ความลึกประมาณ 4 ซม. ค่อยๆ ปล่อน้ำเชื้อเข้าสู่ช่องคลอดของไถ่ โดยใช้เวลาปล่อน้ำเชื้อประมาณ 5 วินาที ดำเนินการผสมเทียม 1 ครั้ง/สัปดาห์ ส่วนการประเมินอัตราการผสมติดนั้นทำการเก็บไข่ในวันที่ 2-8 หลังการผสมเทียม และส่องไข่ในวันที่ 7 หลังนำไข่เข้าฟัก ซึ่งอัตราผสมติดคิดจากร้อยละของไข่มีชีวิตต่อจำนวนไข่ที่เข้าฟักทั้งหมด การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS สำเร็จรูป (SAS, 1985) วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test

ผลและวิจารณ์

ผลของการเสริม cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจากการศึกษาพบว่า การเสริม cysteine ให้ผลต่อความแข็งแรงในการเคลื่อนที่แบบหมู่ และเปอร์เซ็นต์

ของการเคลื่อนที่แบบรายตัวไม่แตกต่างกัน แต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของอสุจิมีชีวิต โดยการเสริม cysteine ที่ระดับสูงเกินไปไม่เป็นผลดีต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และพบว่าการเสริม cysteine มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิหรืออัตราของไข่มีชีวิตภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยระดับที่เหมาะสมคือ 1mM ส่วนการเสริมที่ระดับสูงเกินไปมีผลเสียต่ออัตราการผสมติด (Table 1) การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Uysal and Bucak (2007) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบการเสริม cysteine ที่ระดับ 0, 5, 10, และ 20 mM ในน้ำเชื้อแพะ พบว่าในระดับ 10 mM ให้ผลดีที่สุดต่อน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง และการเสริมในปริมาณที่สูงเกินไปมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและสอดคล้องกับ Kaeoket et al., (2007) ซึ่งรายงานว่าการเสริม cysteine มีผลดีต่อน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสุกร โดยระดับที่เหมาะสมคือ 5 และ 10 mM ส่วนการเสริมในระดับสูงเกินไปเกิดผลเสียเช่นกัน

ผลของการเสริม glutathione ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ในน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจากการศึกษาพบว่าการเสริม glutathione ที่ระดับ 0.1-1.0 mM มีผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อไถ่พื้นเมือง (Table 1) โดยทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำลง โดยขัดแย้งกับรายงานอื่นซึ่งศึกษาในแพะ (Uysal and Bucak, 2007) ในแมว (Monteiro et al., 2009) และในกระบือ (Ansari et al., 2011) ซึ่งรายงานการเสริม glutathione ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการเสริมในระดับที่สูงเกินไปเกิดผลเสียต่ออสุจิในทุกรายงาน สำหรับในสัตว์ปีกมีรายงานถึงผลของการเสริมสารกลุ่ม antioxidant คือ E, C, butylated hydroxytoluene และ Tempo ในน้ำเชื้อไก่วง (Donoghue and Donoghue, 1997) และ Breque et al., (2003) ได้รายงานถึงผลดีของการเสริม antioxidant ต่ออสุจิทั้งในธรรมชาติ, ภายในร่างกายสัตว์, และในการเก็บรักษาภายนอกร่างกาย ในการศึกษานี้อาจเป็นไปได้ว่า ระดับ glutathione ที่ทำการศึกษาสูงเกินไปสำหรับ น้ำเชื้อไถ่พื้นเมือง จึงทำให้ผลจากการเสริมมีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป

Table 1 Effects of cysteine and glutathione on post thaw quality and fertility of cryopreserve Thai native chicken semen.

parameters						Antioxidants (mM)						
	cysteine					P-value	glutathione					P-value
	0	1	5	10	SEM		0	0.1	0.5	1	SEM	
Mass movement (0-5)	2.5	2.7	2.8	2.8	0.17	0.834	3.1	3.2	3.1	2.6	0.07	0.120
Viability (%)	54.4 ^a	52.2 ^a	50.5 ^{ab}	47.6 ^b	0.67	0.000	54.1 ^a	52.9 ^a	50.4 ^{ab}	47.6 ^b	0.71	0.048
Motility (%)	52.7	59.7	57.9	54.7	1.04	0.185	61.5	63.9	60.3	55.2	0.93	0.055
Fertility (%)	65.6 ^b	83.3 ^a	74.9 ^{ab}	48.7 ^c	1.76	0.001	75.2 ^a	58.1 ^b	44.0 ^c	30.4 ^d	1.68	0.000
(Total egg)	(194)	(177)	(188)	(183)			(185)	(186)	(185)	(167)		

^{a-d} within the same row indicate differences between antioxidant levels

สรุป

จากการศึกษาผลของการเสริม cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองไทย แสดงให้เห็นว่าการเสริม cysteine มีผลดีต่อน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง และระดับที่เหมาะสมคือ 1 mM สำหรับการเสริม glutathione ในระดับ 0.1-1.0 mM พบว่าเป็นพิษต่ออสุจิอย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง ขอขอบคุณโครงการศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์(ไก่พื้นเมือง) ที่ได้อนุเคราะห์ฟอสพันธุ์ไก่ และงบประมาณค่าอาหารสัตว์ จึงทำให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ ยุพิน ผาสุข. 2550. การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง และการผสมเทียมไก่พื้นเมือง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ชุดโครงการ การพัฒนาไก่พื้นเมือง สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- Ansari, M. S.; B. A. Rakha., N. Ullah, S. M. H. Andrabi and s. Akhter. 2011. Glutathione addition in tris-citric egg yolk extender improves the quality of cooled buffalo (*bubalus bubalis*) bull semen. Pakistan. J. Zoolo. 43: 49-55.
- Bilodeau, J.F., S. Blanchette, C. Gagnon, and M.A. Sirard. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56:275– 286.
- Breque,C., P. Surai, and J. P. Brillard. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Mol. Reprod. Dev. 66: 314–323
- Chalah, T., F.Seigneurin, E. Blesbois and J. P. Brillard. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. Cryobiology . 39: 185–191.
- Donoghue, M. and D. J. Donoghue. 1997. Effect of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane. Poult. Sci.76: 1440-1445
- Fujihara N., B. Howath Jr. 1978. Lipid peroxidation in fowl cytometer spermatozoa. Poult. Sci. 57: 1766-1768
- Kaeket, K., P. Chamapiwat, P. Tummaruk, M. Techakumphu. 2010. supplemental effect of varying L-cysteine concentration on the quality of cryopreserved boar semen. Asian. J. Androl. 12: 760-765.
- Lake, P. E. and J. M. Stewart. 1978. Artificial insemination in poultry. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. HMSO. Press: London
- Monteiro, J.C., J. S. Goncalve, J.A. Rodrigue, C. F. Lucio, L. C. Silva M. E. Assumpcao and C. I. Vannucchi. 2009. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. Reprod. Domest. Anim. 44: 359-362.
- Uysal, O., M. N. Bucak. 2007.. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. ACTA VET. BRNO 76: 383-390