

การเสริมกรดอะมิโนกลูตามีน ไกลซีน และอะลานีน เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อ แบบแช่แข็งของโคนม

Effect of Glutamine, Glycine and Alanine on Cryopreservation of Dairy Bulls Semen

กาญจน์ พงษ์เพ็ง^{1*} ศิริลักษณ์ วงศ์พิเชษฐ² และ มณฑิชา พุทษาคำ²
Panupan pongpeng^{1*} Sirilak wongpiched² and Monticha putsakum²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเสริมกรดอะมิโนกลูตามีน ไกลซีน และอะลานีน ที่ระดับ 25 และ 50 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในกลุ่ม (RCBD) ใช้พ่อโคนมพันธุ์โฮลสไตน์-ฟริเซียนจำนวน 4 ตัว (บล็อก) ทำการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (ซ้ำ) ในแต่ละสัปดาห์น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมถูกแบ่งออกเป็น 7 ส่วนเพื่อตามวิธีแผนผังการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม เสริม กลูตามีน ไกลซีน และ อะลานีน ที่ระดับ 25 และ 50 มิลลิโมล ประเมินคุณลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งด้วย Computer Assisted Semen Analysis (CASA) พบว่า น้ำเชื้อที่เสริมกรดอะมิโนทั้งสามชนิด คือ อะลานีน กลูตามีน และไกลซีน มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง 47.43 ± 2.81, 47.05 ± 2.68 และ 46.33 ± 2.68 ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เสริมกรดอะมิโนที่มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง 33.10 ± 3.52 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของอสุจิภายหลังการแช่แข็งด้วย flow cytometer พบว่า อสุจิก่อนที่เสริมอะลานีนมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม (LAI) (ร้อยละ 37.10 ± 2.11) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมกรดอะมิโน (ร้อยละ 27.04 ± 3.01) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนกลุ่มที่เสริมกลูตามีนและ ไกลซีน มีค่าร้อยละ 33.43 ± 2.09 และ 32.27 ± 2.36 ตามลำดับ สำหรับระดับการเสริมกรดอะมิโนทั้งสามชนิดที่ 25 และ 50 มิลลิโมล ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ผลจากการศึกษาแสดงว่าการเสริมกรดอะมิโนทั้งสามชนิดในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคนมภายหลังการแช่แข็ง โดยการเสริมกรดอะมิโนอะลานีนที่ระดับ 25 มิลลิโมล ให้อัตราการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของอสุจิมียุทธศาสตร์สูงสุด

คำสำคัญ : กลูตามีน, ไกลซีน, อะลานีน, โคนม, น้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

Abstract: This study was performed to evaluate the effects of glutamine, glycine and alanine added in Egg Yolk Tris (EYT) extender on cryopreservation of dairy bull semen. Semen was collected at five weekly intervals from four mature crossbreed Holstein-Friesian bulls. Each bull's semen sample (n=4) was divided to 7 aliquots: non-amino acid treated (control) and supplemented with 25 and 50 mM of glutamine, glycine and alanine. All amino acid treated groups, 25 and 50 mM glutamine, glycine and alanine, showed highly significant (P<0.01) post-thawing sperm motility (47.05 ± 2.68, 46.33 ± 2.68 and 47.43 ± 2.81% respectively), compared to the control group (33.10 ± 3.52%). Among the groups that received 25 and 50 mM of glutamine, glycine and alanine, there were no significant differences in post-thawing sperm motility (P>0.05). Additionally, the statistically significant sperm membrane and acrosome integrity as live-acrosome intact (LAI) was observed only in the alanine

¹ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง กรมปศุสัตว์ อ. ลำสนธิ จ. ลพบุรี 15190
Lamphayaklang AI bull center, DLD, Lumsonthi, Lopburi 15190

² สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช จ. นนทบุรี 11120

School of Agricultural Extension and Cooperative, Sukhothai Thammathirat Open University Nonthaburi 11120

* Corresponding author: pongpeng.pj@gmail.com

added group, as compare to the control (37.10 ± 2.11 vs $27.04 \pm 3.01\%$). The glutamine and glycine added showed intermediate response (33.43 ± 2.09 and $32.27 \pm 2.36\%$ respectively). The results from this study indicated that addition of glutamine, glycine and alanine in EYT extender enhanced post-thaw motility and improved membrane and acrosome integrity of dairy bull's frozen semen. Of all amino acids addition, the 25 mM of alanine showed the highest response.

Keywords: Alanine, glutamine, glycine, Cattle frozen semen

บทนำ

ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง มีผู้ค้นพบว่าเซลล์พืชและสัตว์มีการสะสมกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น โดยมีบทบาทช่วยลดความเสียหายจากอนุมูล (Kruuv and Glofcheski, 1992) ต่อมาการศึกษาผลของการใช้กรดอะมิโนเพื่อช่วยลดความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ในหลายชนิด El-sheshtawy et al. (2008) ทำการศึกษาในกระบือพบว่า การเติม กลูตามีน ไกลซีน อะลานีน และ ซิสเทอีน มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งแตกต่างกัน โดย ไกลซีน ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล สามารถรักษาความสมบูรณ์ของอโครโซมได้ดีที่สุดคือ 61.30 % จากน้ำยาเจือจางปกติที่ไม่ได้เสริมซึ่งมีความสมบูรณ์ของอโครโซม 50.30 % ในขณะที่ กลูตามีน ที่ ระดับ 25 มิลลิโมล สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็น 42.50% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางที่ไม่ได้เสริมมีอัตราการเคลื่อนที่ 32.50 % แต่เมื่อเพิ่มถึงระดับ 100 มิลลิโมลกลับลดอัตราการเคลื่อนที่ลง และ Khelifaoui et al. (2005) รายงานการใช้กลูตามีน 50 มิลลิโมลร่วมกับ กลีเซอรอล 2.5 % สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งมาให้อัตราสูงขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่ได้เสริม Kundu et al., 2001 พบว่าเมื่อใช้ อะลานีนขนาด 135 มิลลิโมลมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแพะ หรือการใช้กลูตามีนที่ 80 มิลลิโมล สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมนุษย์และอสุจิม้าภายหลังการแช่แข็ง (Renard et al., 1996; Scanchez-Partidata et al., 1992) แสดงว่าการเสริมกรดอะมิโนสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์หลังการแช่แข็งได้หลายชนิดแต่การเสริมอาจมีระดับที่จำกัดแตกต่างกัน

ดังนั้นการเสริมกรดอะมิโน กลูตามีน ไกลซีน และ อะลานีน ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคนมเพื่อทำหน้าที่เป็นสารเสริมร่วมกับไข่แดงและกลีเซอรอล อาจช่วยให้มีตัวอสุจิมีชีวิตรอดมากขึ้นและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันความเสียหายของอสุจิจากกระบวนการแช่แข็งได้ ทำให้สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

วิธีการศึกษา

ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ ความเร็ว ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความสมบูรณ์ของอโครโซมอสุจิหลังการแช่แข็ง โดยวัดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคนมลูกผสมไฮลด์ไทรน์-ฟรีเซียนอายุประมาณ 3-5 ปีจำนวน 4 ตัว ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญาलगกรมปศุสัตว์ จ.ลพบุรี ระยะเวลาในการศึกษา ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง สิงหาคม 2553 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในกลุ่ม (RCBD) โดยกำหนดให้ชนิดและขนาดของกรดอะมิโนเป็นทรีตเมนต์และพ่อพันธุ์โคเป็นบล็อก รีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ละครั้ง นำน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิอย่างน้อย 70 % ไปใช้ในงานวิจัย แบ่งน้ำเชื้อสดโคเป็น 7 ส่วน ปริมาตรเท่ากัน เติมน้ำยาเจือจางพื้นฐาน EYT ที่มีส่วนประกอบของไข่แดง 20 % และกลีเซอรอล 7 % ในน้ำเชื้อ ตามทรีตเมนต์ดังนี้ 1. กลุ่มควบคุมเติมน้ำยาเจือจาง EYT ไม่เสริมกรดอะมิโน 2.เสริม กลูตามีน 25 mM 3.เสริมกลูตามีน 50 mM 4.เสริม ไกลซีน 25 mM 5.เสริม ไกลซีน 50 mM 6.เสริม อะลานีน 25 mM และ 7.เสริมอะลานีน 50 mM

รวบรวมน้ำเชื้อที่เจือจางทุกฟริตเมนต์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บรรจุน้ำเชื้อในหลอดน้ำเชื้อ French ministraws 0.25 มล. ด้วยเครื่องบรรจุน้ำเชื้อ (Type machine MRS3, IMV, France) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Digitcool 5300, with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บไว้ที่ระดับไนโตรเจนเหลว ภายหลังแช่แข็ง 24 ชม. ทำการสุมน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายด้วยน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที ตรวจวิเคราะห์การเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง CASAโปรแกรมIVOS motility analyzer version 12.3 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA) ตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและอะโครโซม โดยการย้อมตัวอสุจิด้วยสี FITC-PNA/PI และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer รวบรวมข้อมูลค่าตัวชี้วัดต่างๆ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตัวชี้วัดด้วยวิธี DNMRT

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่เสริมกรดอะมิโนกลูตามีน ไกลซีน และอะลานีน ที่ 25 และ 50 มิลลิโมล ภายหลังการแช่แข็ง และนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้มาละลายด้วยน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เสริม กลูตามีน ไกลซีน และอะลานีน ที่ 25 และ 50 มิลลิโมล มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม ($P<0.01$) ส่วนลักษณะในการเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1)

เมื่อตรวจลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่เสริมอะ

Table 1 Post-thawing sperm quality parameter were examined by CASA.

Sperm quality parameter	control	Post-thawing semen in EYT supplement						SEM
		glutamine		glycine		alanine		
		25 mM	50 mM	25 mM	50 mM	25 mM	50 mM	
Motility (%)	33.10 ^a	47.15 ^b	46.90 ^b	45.70 ^b	46.95 ^b	48.95 ^b	45.90 ^b	3.15
Progressive motility (%)	24.11	27.55	26.74	27.32	28.37	28.90	26.05	1.86
<u>velocity</u>								
VAP (μm/s)	82.54	80.32	79.52	80.14	81.72	82.50	81.00	1.76
VSL (μm/s)	66.79	64.13	63.34	63.93	65.27	65.36	64.13	1.08
VCL (μm/s)	137.82	135.21	135.02	134.01	136.62	138.02	137.01	3.34
<u>Kinetic movement</u>								
ALH (μm)	6.23	6.38	6.49	6.39	6.29	6.50	6.47	0.11
BCF (HZ)	25.88	25.49	24.91	25.67	25.86	24.62	25.84	0.43
STR (%)	80.05	79.30	78.74	79.16	78.89	78.30	78.15	0.68
LIN (%)	49.58	48.65	47.89	48.79	48.74	48.35	47.70	0.61

^{ab} means with different alphabetical superscripts in row are significantly different ($P<0.01$)

Table 2 Post-thawing sperm quality parameter were examined by Flow Cytometer.

sperm membrane		Post-thawing semen in EYT supplement						
and	contro	glutamine		glycine		alanine		SME
acrosome integrity	I	25 mM	50 mM	25 mM	50 mM	25 mM	50 mM	
DAI (%)	30.33	29.35	29.85	29.24 ^a	33.46 ^b	28.98	28.74	1.05
DAD (%)	42.37	35.87	37.38	38.91	33.83	33.11	33.71	2.58
LAI (%)	27.04 ^a	34.63 ^{ab}	32.22 ^{ab}	32.03 ^{ab}	32.51 ^{ab}	37.73 ^b	36.47 ^b	2.3
LAD (%)	0.17	0.15	0.20	0.20	0.16	0.19	0.15	0.02

^{ab} means with different alphabetical superscripts in row are significantly different (P<0.05)

ลาโนที่ 25 มิลลิโมล อสุจิมียี่ห้อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์ (LAI) สูงที่สุด คือร้อยละ 37.73 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริมกรดอะมิโนและเสริมกรดอะมิโนในกลูตามีน 25 และ 50 มิลลิโมล ไกลซีน 25 และ 50 มิลลิโมล และ อะลาโนที่ 50 มิลลิโมล (27.04, 34.63, 32.22, 32.03, 32.51 และ 36.47 ตามลำดับ) ส่วนอสุจิมียี่ห้อหุ้มเซลล์และอะโครโซมเสียหาย (DAD) กลุ่มที่ไม่ได้เสริมกรดอะมิโนมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เสริมกรดอะมิโน (Table 2)

แม้ว่ากลไกในการช่วยป้องกันอสุจิจากการแช่แข็งของกรดอะมิโนจะยังไม่แน่ชัดแต่จากหลายรายงานอธิบายว่าอาจเนื่องจากโมเลกุลของกรดอะมิโนสามารถจับกับชั้น ฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก (Kundu et al., 2001) ลดการสะสมของ กรดแลคติก (Filpse and Almquist, 1956) ป้องกันการเกิดบาดแผลของเยื่อหุ้มอสุจิ (Rudolph and Crowe, 1985) และลดการเกิด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งทำให้อสุจิมียี่ห้ออัตราการเคลื่อนที่ต่ำ (Bilodeau et al., 2001)

ข้อเสนอแนะจากการศึกษานี้พบว่า การเสริมกรดอะมิโนทั้งสามชนิดในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคนมภายหลังการแช่แข็งได้ โดยการเสริมกรดอะมิโนอะลาโนที่ระดับ 25 มิลลิโมลซึ่งเป็นปริมาณที่น้อย เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาค่อนข้างสูง และเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดทั้งในส่วนของการอัตราการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซม

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- El-Shehtawy, R.I., G.A. El-Sisy and W.S. El-Nattat, 2008. Use of Selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria*, 2: 146-150.
- Filpse, R.J. and J.Q. Almquist, 1956. Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. *Journal series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station*, 1690-1696
- Khlifaoui, M., I. Battut, J.F. Bruyas., G. Chatagnon, A.Trimeche and D.Tainturier. 2005. Effect of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 63: 138-149.
- Kruuv, J., and D. J. Glofcheski, 1992. Protective effect of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology*, 29: 291-295
- Kundu, C.N., K. Das, And G.C. Majumder, 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 41: 21-27.
- Renard, P., G. Grizard, J.F.Griveau, B. Sion, D. Boucher and D. Le Lannou, 1996. Improvement of motility and fertility potential of post-thaw human sperm using amino acids. *Cryobiology* 33: 311-319.

Rudolph, A.S., and J.H. Crowe, 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377

Sanchez-Partidata, L.G., W.M.C. Maxwell, L.G. Paleg and B.P. Setchell, 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction and fertility Development* 4: 113-118.