

**การปรับปรุงคุณภาพอสุจิหลังการทำละลายและการลด Oxidative Stress
ในน้ำเชื้อโคแช่แข็งด้วยการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อสูตร Egg Yolk-Tris
Enhancement of Post-Thaw Sperm Quality and Reduction of Oxidative Stress
in Bull Frozen Semen through Melatonin Supplementation
in Egg Yolk-Tris Extender**

**เรณูภา สมศรีธนากร,¹ วิสูตร ไผ่ตรีจิตต์,¹ ชุติกานต์ จิรัตติติกุล,¹ ศราวุธ เจริญสูลง,¹ ทวีพร เรืองพริ้ม,¹
สุกัญญา รัตนทัตทิคมทอง¹ และสุธิษา มาเจริญ^{1*}**
**Reanuka Somsrithanakorn,¹ Wisut Maitreejet,¹ Chutikarn Jiratthitikul,¹ Sarawut Chareansalung,¹
Taweeporn Raungprim,¹ Sukanya Rattanatabtimtong¹ and Sutisa Majarune^{1*}**

Received 1 July 2025, Revised 22 July 2025, Accepted 29 July 2025

ABSTRACT

This study aimed to assess the impact of melatonin supplementation in egg yolk-tris extenders (ETG) on sperm quality and oxidative stress parameters in frozen semen of Kamphaeng Saen bulls. Semen samples were collected from 4 bulls. Each was sampled 4 times at one-week intervals. All collected semen samples were into 4 parts: a control group without melatonin supplementation and three treatment groups supplemented with melatonin in ETG at concentrations of 1, 2, and 3 mM. The findings demonstrated that melatonin supplementation at 1 and 2 mM significantly enhanced post-thawed sperm motility compared to both the control group and the 3 mM group (50.00, 51.51, 41.54, and 39.40%, respectively; $P=0.0208$). Additionally, the proportion of static sperm was significantly reduced in the 1 and 2 mM melatonin groups ($P=0.0178$). In terms of oxidative damage, assessed via malondialdehyde (MDA) levels, the 2 and 3 mM melatonin groups exhibited significantly lower MDA levels, compared to the control and 1 mM groups (1.0857, 1.1002, 2.8942, and 1.8061 μM , respectively; $P<0.001$). These findings suggest that melatonin supplementation at a concentration of 2 mM in ETG can enhance the quality of frozen-thawed bull semen by improving motility and reducing oxidative stress.

Keywords: Semen cryoprotectant, Melatonin, Sperm, Antioxidant, Cattle

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมเมลาโทนินในสารละลาย egg yolk-tris (ETG) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและระดับอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง โดยใช้ฟอโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน 4 ตัว รีดเก็บน้ำเชื้อตัวละ 4 ครั้ง (1 ครั้ง/สัปดาห์) แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 ส่วน เพื่อเจือจางใน ETG ที่มีระดับเมลาโทนินต่างกัน ได้แก่ กลุ่มไม่เสริม และกลุ่มที่เสริมเมลาโทนิน ที่ระดับ 1, 2 และ 3 mM โดยหลังทำละลายน้ำเชื้อพบว่า การเสริมเมลาโทนิน

^{1*} ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author: Tel.08-5185-1859, E-mail address: sutisa.ma@ku.th

1 และ 2 mM เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิตีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมและกลุ่มที่เสริมเมลาโทนิน 3 mM (50.00, 51.51, 41.54 และ 39.40% ตามลำดับ; $P=0.0208$) และพบว่าอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่มีเปอร์เซ็นต์ลดลงในกลุ่มที่เสริมเมลาโทนิน 1 และ 2 mM ($P=0.0178$) ระดับของ malondialdehyde (MDA) ในน้ำเชื้อโคที่เสริมเมลาโทนิน 2 และ 3 mM มีระดับ MDA ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม และกลุ่มที่เสริม 1 mM (1.0857, 1.1002, 2.8942 และ 1.8061 μM ตามลำดับ; $P<0.001$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมเมลาโทนินใน ETG 2 mM สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ในด้านการเคลื่อนที่ และลดระดับอนุมูลอิสระได้

คำสำคัญ: สารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เมลาโทนิน อสุจิ สารต้านอนุมูลอิสระ โค

บทนำ

การขยายพันธุ์สัตว์โดยใช้เทคนิคผสมเทียมได้รับความนิยมและมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์เป็นอย่างมาก ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้อง และความสำเร็จในการขยายพันธุ์สัตว์ ดังนั้นกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพที่ดีไว้ใช้ในระยะเวลา โดยอสุจิที่ผ่านการทำละลายแล้วต้องสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว มีอัตราการตาย และตัวอสุจิผิดปกติที่ต่ำ (Manjunath *et al.*, 2007)

กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อนั้นมีหลายขั้นตอนที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิ และอาจลดประสิทธิภาพในการปฏิสนธิ หนึ่งในปัญหาที่พบคือ ความเสียหายของเซลล์อสุจิ เนื่องจากการแช่แข็งและทำละลายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ การรั่วไหลของโปรตีน อีกปัญหาหลักคือ ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดจากการสะสมของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) ที่มากเกินไปจึงส่งผลเสียต่อตัวอสุจิ (Aitken *et al.*, 2014)

ปัจจัยที่ทำให้เกิด ROS คือ ความเครียดจากอนุมูลอิสระที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์เผชิญกับความเครียด การแช่แข็งน้ำเชื้อมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dysfunction) โดยทำลายโครงสร้างของไมโทคอนเดรียหรือการทำให้ศักย์ไฟฟ้าข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ไมโทคอนเดรียชั้นใน (mitochondrial membrane potential) เปลี่ยนแปลง (Guattieri *et al.*, 2021) เมื่อ electron

transport chain ทำงานผิดปกติจะเกิด electron leakage อาจทำให้ออกซิเจน (O_2) ถูกเปลี่ยนเป็นซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) ซึ่งอาจเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เป็น ROS สร้างความเสียหายต่อเซลล์ และระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ เซลล์อสุจิเผชิญกับอนุมูลอิสระที่ลดลงอย่างรวดเร็ว และการเปลี่ยนความดันออสโมติก สิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งที่กระตุ้นเอนไซม์ออกซิเดส (NOX) เกิดการสร้าง O_2^- และเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไวต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation (LPO) ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ ROS (Toor & Sikka, 2019; Yeste *et al.*, 2015) การเกิด ROS เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากในกระบวนการแช่แข็ง และสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำเชื้อที่ลดลงหลังการทำละลาย (Len *et al.*, 2019)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารเสริมในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีศักยภาพในการลดการเกิด LPO, ROS และเพิ่มความทนทานของอสุจิต่อการถูกทำลายจากการแช่แข็ง (cryodamage) (Amidi *et al.*, 2016; Bansal & Bilaspuri, 2011) มีรายงานการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็งและช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย ด้วย catalase ในสารละลาย egg yolk-tris ที่ระดับ 20 IU/ml (Arslan *et al.*, 2019) Coenzyme Q10 ในสารละลาย egg yolk-tris ที่ระดับ 30 μM (Saeed *et al.*, 2016) เมลาโทนิน (melatonin) ในสารละลาย egg yolk-citrate ที่ระดับ 0.3 mg/ml (Niu *et al.*, 2024)

จากการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่กล่าวมา เมลาโทนินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ในการปกป้องเซลล์อสุจิจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ซึ่งเมลานินมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อแช่แข็งของมนุษย์ (Najafi *et al.*, 2018) และเมลานินมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ (sperm viability) ในภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำเชื้อแกะแช่เย็น (Bhalothia *et al.*, 2022) และน้ำเชื้อโคแช่แข็ง (Ashrafi *et al.*, 2013) เมลาโนอินยังสามารถเพิ่มระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase ในน้ำเชื้อโคหลังทำละลาย (Niu *et al.*, 2024) การศึกษาคุณสมบัติและปริมาณของเมลานินในสารละลายน้ำเชื้อ เป็นแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อโคแช่แข็งในสารละลาย egg yolk-tris-fructose-glycerol โดยใช้ glycerol 8 % ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียางานเกี่ยวกับการเสริมเมลานินในสูตรสารละลายดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารเมลานินในสารละลายน้ำเชื้อสูตร egg yolk-tris-fructose-glycerol ในระดับที่แตกต่างกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย และการเกิดอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ใช้โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเพศผู้จำนวน 4 ตัว (อายุเฉลี่ย 3-5 ปี) ที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์และสุขภาพดี รีดน้ำเชื้อ โดยมีสัตว์เพศเมียเป็นตัวล่อ และใช้ช่องคลอดเทียมในการรีดเก็บน้ำเชื้อ โดยรีดเก็บน้ำเชื้อโคตัวละ 4 ครั้ง โดยห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ (16 ชั่วโมง) โดยน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาต้องผ่านเกณฑ์การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด ดังนี้ เป็นสีครีมหรือขาวขุ่น ปราศจากสิ่งปนเปื้อน มีปริมาณอสุจิ

มากกว่า 800 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 80%

น้ำเชื้อที่ผ่านเกณฑ์ดังกล่าวถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน เพื่อเจือจางตามสูตรสารละลาย ETG ที่มีระดับเมลานินแตกต่างกัน ดังนี้

สูตร M0: ไม่เสริมสารเมลานินใน ETG

สูตร M1: เสริมสารเมลานิน 1 mM ใน ETG

สูตร M2: เสริมสารเมลานิน 2 mM ใน ETG

สูตร M3: เสริมสารเมลานิน 3 mM ใน ETG

ในการศึกษาครั้งนี้สัตว์ทดลองได้รับการอนุเคราะห์เลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ตามเอกสารอนุญาตหมายเลข ACKU68-AGK-026

การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

สารละลายน้ำเชื้อสูตร ETG ที่มีการเสริมสารเมลานิน (EMD Millipore Corp., USA) ในระดับต่าง ๆ ตามสูตรสารละลายน้ำเชื้อ (Table 1)

โดยเตรียมสารละลายส่วนใส คือ fructose-tris-glycerol extender ที่มี glycerol 8% จากนั้นนำสารละลายส่วนนี้มาผสมกับไข่แดงสดของไข่ไก่ ในอัตราส่วน 80:20 (v/v) เพื่อให้ได้สารละลาย ETG โดยผสมบนเครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การเติมเมลานินในสารละลาย ETG ตามระดับที่กำหนดในแต่ละสูตร เมื่อเติมเมลานินแล้วผสมบนเครื่องผสมสารละลาย ผ่านการแช่ flask ของสารละลายลงในน้ำเย็นผสมน้ำแข็ง เพื่อเป็นการลดอุณหภูมิสารละลาย ETG ในระหว่างผสมกับเมลานินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บในตู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ส่วนสารละลาย ETG ที่ไม่เสริมเมลานิน เก็บในตู้ทำความเย็นทันที

Table 1 Chemical compositions in cryoprotectants for egg yolk-tris-fructose-glycerol extender (ETG)

Compositions	ETG 100 mL			
	M0	M1	M2	M3
Fructose-tris-glycerol extender				
Tris (hydroxymethyl) aminomethane, g	3.028	3.028	3.028	3.028
Citric acid, g	1.79	1.79	1.79	1.79
Fructose, g	1.25	1.25	1.25	1.25
Sterile water, mL (up to 92 mL)	92	92	92	92
Glycerol, mL	8	8	8	8
Egg yolk-tris-fructose-glycerol (ETG)				
Fructose-tris-glycerol extender, mL	80	80	80	80
Egg yolk, mL	20	20	20	20
Melatonin in ETG, mM	0	1	2	3

การผลิตน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

เมื่อรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ได้แล้ว นำน้ำเชื้อสดที่ได้ตรวจประเมินคุณภาพ โดยประเมินสีของน้ำเชื้อ ปริมาตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง และประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดด้วยเครื่อง Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA; HTCasa II Motility Analyzer version, Hamilton-Thorne, Bioscience, MA, USA)

น้ำเชื้อสดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินในแต่ละตัวอย่าง ถูกแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 4 ส่วน เพื่อผสมกับสารละลายน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ ตามระดับความเข้มข้นของเมลาโทนิน โดยเจือจางน้ำเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของอสุจิเท่ากับ 120×10^6 ตัว/มล. โดยใช้ค่าปริมาตรของน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ และความเข้มข้นของอสุจิ เพื่อคำนวณหาปริมาณสารละลายในการเจือจางน้ำเชื้อ

เมื่อผสมแล้วแช่ในตู้ทำความเย็น เพื่อให้อุณหภูมิลดลงจาก 37°C ไปอยู่ที่ 4°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วเตรียมหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร (The genuine CASSOU straw, IMV Technologies, France) โดยระบุชื่อ หมายเลข และระดับความเข้มข้นของระดับการเสริมเมลาโทนิน นำหลอดน้ำเชื้อมาเรียงในที่วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เก็บไว้ในตู้ทำความเย็น

บรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดเก็บน้ำเชื้อ โดยเครื่องบรรจุน้ำเชื้อ ซึ่งดูดน้ำเชื้อเข้าไปจนถึงส่วนกลางของจุดปิดผลึก จากนั้นฉีกหลอดน้ำเชื้อส่วนปลาย โดยขั้นตอนบรรจุและฉีกหลอดน้ำเชื้อทำผ่านเครื่อง straw filling and sealing machine (MRS1 Dual V2, IMV Technologies, France)

นำหลอดน้ำเชื้อที่บรรจุแล้วมาเรียงในชั้นเรียงน้ำเชื้อ นำหลอดน้ำเชื้อไปอังเหนือไอน้ำโตรเจนเหลวประมาณ 2 นิ้ว ที่อุณหภูมิ -120°C เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในไอน้ำโตรเจนเหลว ตามวิธีการของ วิสูตร และคณะ (2567) จากนั้นนำน้ำเชื้อเก็บไว้ในถังไอน้ำโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลาย

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ค่าเฉลี่ยจากหน่วยทดลองน้ำเชื้อตั้งต้นที่ผ่านเกณฑ์ เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง ด้วยการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยน้ำอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อ $3\ \mu\text{L}$ หยดลงสไลด์ (counting chamber slide, 20 micron – 4 chambers, Leja, Netherland) ที่อุ่นสไลด์บน warm plate ด้วยอุณหภูมิ 37°C นำสไลด์ที่มีตัวอย่างน้ำเชื้อเข้าเครื่อง CASA เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโค โดยประเมินค่าการ

เคลื่อนที่ได้ของอสุจิ (sperm motility) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive) รูปแบบการเคลื่อนที่ของอสุจิ (sperm kinetic movement) ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (sperm velocity) และความผิดปกติของอสุจิที่บริเวณหาง (sperm abnormality)

การประเมินระดับ malondialdehyde (MDA) ในน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลาย

เตรียมสาร thiobarbituric acid (TBA) 0.67% และเตรียม trichloroacetic acid (TCA) 10-15% ผสม TBA:TCA อัตราส่วน 1:1 และเตรียมสารละลาย NaOH 1 โมลาร์ หลังจากนั้นทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วดูดน้ำเชื้อที่ทำละลายแล้วใส่หลอดทดลองปริมาณ 300 µL จากนั้นเติม NaOH 300 µL ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วอุ่นเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C เติม TCA 15% 400 µL ปั่นเหวี่ยง 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ 400 µL แล้วเติม TBA 400 µL ผสมด้วยการ vortex อุ่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายใส่คิวเวท (cuvette) 1,500 µL โดยผสมตัวอย่างกับ butanol ในอัตราส่วน 750:750 µL (MDA-TBA complex) แล้วนำไปวิเคราะห์ MDA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีค่าความดูดกลืนแสงที่ 532 nm (Helios Zeta UV-Vis

Spectrophotometer, Thermo Scientific, United Kingdom) นำค่าความดูดกลืนแสงมาคำนวณจากค่า MDA มาตรฐาน เพื่อหาระดับ MDA ในตัวอย่างน้ำเชื้อ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้จากการประเมินด้วย CASA และระดับ MDA ของแต่ละสูตรสารละลายน้ำเชื้อ ถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS OnDemand for Academics (<https://welcome.oda.sas.com>)

ผล

จากการศึกษาการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อ ETG ที่ระดับแตกต่างกันในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิหลังทำละลายในกลุ่ม M1 และ M2 มีค่าสูงกว่ากลุ่ม M0 และ M3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0208$) แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0832$) (Table 2)

Table 2 Effect of melatonin in ETG on the motility and progressive post thawed cryopreserved bull semen

Parameters	M0	M1	M2	M3	SEM	P-value
Motility, %	41.54 ^B	50.00 ^A	51.51 ^A	39.40 ^B	1.74	0.0208
Progressive, %	14.37	16.35	17.90	13.34	0.69	0.0832

^{A,B} difference superscript letters within row are significantly different ($P<0.05$).

ผลของการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อที่ระดับแตกต่างกันต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของอสุจิ (curvilinear velocity: VCL), ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (average path velocity: VAP) และความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของอสุจิ (straight liner velocity: VCL) ของทั้ง 4 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และในด้านรูปแบบการเคลื่อนที่

ของอสุจิ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของอสุจิ (linearly motile spermatozoa: LIN) ความตรงในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (straightness: STR) และอสุจิเคลื่อนช้า (slow) ของทั้ง 4 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์อสุจิไม่เคลื่อนที่ (static) พบว่ากลุ่ม M1 และ M2 มีค่าอสุจิไม่เคลื่อนที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม M0 และ M3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0178$) (Table 3)

Table 3 Effect of melatonin in ETG on velocity and kinetic movement of post thawed cryopreserved bull semen

Parameters	M0	M1	M2	M3	SEM	P-value
Velocity of sperm						
VCL, $\mu\text{m/s}$	85.42	88.12	88.60	84.76	1.05	0.4901
VAP, $\mu\text{m/s}$	48.24	49.36	49.56	47.96	0.55	0.6825
VSL, $\mu\text{m/s}$	40.07	40.73	40.85	39.91	0.48	0.8826
Kinetic movement of sperm						
STR, %	83.05	82.50	82.40	83.19	0.58	0.9561
LIN, %	40.87	40.92	40.93	40.86	0.28	0.9997
Slow, %	16.94	21.23	21.32	18.27	0.77	0.1024
Static, %	59.29 ^A	50.65 ^B	51.27 ^B	56.85 ^{AB}	1.18	0.0178

^{A,B} difference superscript letters within row are significantly different ($P < 0.05$).

VCL: Curvilinear Velocity, VAP: Average Path Velocity, VSL: Straight Liner Velocity, STR: Straightness, LIN: linearly motile spermatozoa.

ผลของการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อที่ระดับแตกต่างกันต่อความผิดปกติของอสุจิบริเวณหาง พบว่าความผิดปกติของหางชนิดหางงอ (bent tail), ความผิดปกติของหางชนิดหางขดเป็นม้วน (coiled tail), ความผิดปกติของอสุจิที่มีหยดน้ำ

เกาะที่หาง (distal droplet) และอสุจิที่มีลำตัวคด (distal midpiece reflex: DMR) ของทั้ง 4 กลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 4)

Table 4 Effect of melatonin in ETG on sperm abnormalities of post thawed cryopreserved bull semen

Parameters	M0	M1	M2	M3	SEM	P-value
Bent tail, %	15.94	15.45	15.37	16.06	0.47	0.9452
Coiled tail, %	3.88	4.23	4.30	3.79	0.22	0.8324
Distal droplet, %	4.23	3.99	3.95	4.29	0.13	0.7469
DMR, %	2.75	2.78	2.79	2.74	0.267	0.9999

จากการศึกษาผลของการเสริมเมลาโทนินที่ระดับแตกต่างกันในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ETG ต่อระดับของ MDA (Figure 1) พบว่าระดับ MDA ของกลุ่ม M2 และ M3 มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม M0 และ M1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.0857,

1.1002, 2.8942 และ 1.8061 μM , ตามลำดับ; $P < 0.001$) และกลุ่ม M1 มีระดับ MDA ต่ำกว่ากลุ่ม M0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อ ETG สามารถลดระดับของ MDA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

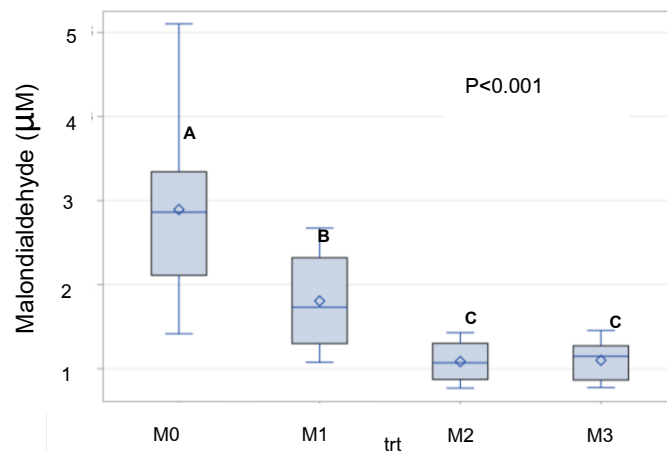


Figure 1 Effect of melatonin in ETG on malondialdehyde (MDA) levels in cryopreserved bull semen
A,B,C difference superscript letters within bar are significantly different ($P < 0.001$)

วิจารณ์

จากการศึกษาการเสริมเมลานโทนินในสารละลายน้ำเชื้อ ETG ที่แตกต่างกันในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง แสดงให้เห็นชัดเจนว่าการเสริมเมลานโทนินที่ระดับ 1, 2 และ 3 mM สามารถลดระดับ MDA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลของการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar *et al.* (2022) ที่มีการเสริมเมลานโทนินในสารละลาย tris-citric fructose egg yolk ที่ระดับ 1 และ 2 mM ในการทำน้ำเชื้อและ Magra สามารถลดระดับของ MDA ตลอดการเก็บรักษาด้วยการแช่เย็น และสอดคล้องกับการศึกษาของ Divar *et al.* (2022) ซึ่งมีการเสริมเมลานโทนินในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง tris-citric fructose egg yolk ที่ระดับ 1 และ 2 mM ในการทำน้ำเชื้อสุนัขแช่แข็ง เมลาโทนินสามารถลดระดับ MDA ในน้ำเชื้อสุนัขหลังทำลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเป็นที่ทราบดีว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์ไมโทคอนเดรีย ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Gualtieri *et al.*, 2021) เมื่อ electron transport chain ทำงานผิดปกติจะเกิด electron leakage ทำให้ O_2 ถูกเปลี่ยนเป็น O_2^- ซึ่งอาจเปลี่ยนเป็น H_2O_2 ที่เป็น ROS ซึ่งสร้างความเสียหายต่อเซลล์ และระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ และเมื่อเซลล์อสุจิเผชิญกับอุณหภูมิที่ลดลงอย่างรวดเร็วการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก สิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งที่กระตุ้นเอนไซม์ NOX เกิดการสร้าง O_2^- และเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไว

ต่อการเกิดปฏิกิริยา LPO ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ ROS (Yeste *et al.*, 2015; Toor & Sikka, 2019)

การก่อตัวของอนุมูลอิสระส่งผลให้ระดับของ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น end product ของ LPO โดย MDA ทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Jadoon & Malik, 2017) ซึ่งการเสริมเมลานโทนินในสารละลายน้ำเชื้อยังสามารถช่วยลด ROS ได้เช่นกัน (Lee & Lee, 2023; Su *et al.*, 2021) นอกจากนั้นแล้วการเสริมเมลานโทนินในน้ำเชื้อโคแช่แข็งสูตร egg yolk-citrate ที่ระดับ 0.3 mg/ml สามารถส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ CAT, SOD และ GSH-Peroxidase (Niu *et al.*, 2024) จากเหตุผลดังกล่าวจึงส่งผลให้น้ำเชื้อโคหลังทำลายที่เจือจางด้วยสารละลายที่มีการเสริมเมลานโทนิน มีระดับ MDA ลดลง จากคุณสมบัติของเมลานโทนินที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ (Niu *et al.*, 2024) จึงสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพและปกป้องเซลล์อสุจิจาก peroxidative agents ลดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Sönmez *et al.*, 2007)

ผลการเสริมเมลานโทนินในสารละลายน้ำเชื้อ ETG ที่ระดับแตกต่างกันในน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำลาย พบว่าเมลานโทนินสามารถปรับปรุงการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมเมลานโทนินในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง egg yolk-citrate

ที่ระดับ 0.3 mg/mL (Niu *et al.*, 2024) และการเสริมเมลาโทนินในน้ำเชื้อสุนัขแช่แข็ง ที่ระดับ 1 และ 2 mM (Divar *et al.*, 2022) การที่เมลาโทนินสามารถปรับปรุงการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหลังทำละลายอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการปกป้องตัวอสุจิจากอนุมูลอิสระ จึงลดความเสียหายของตัวอสุจิ ซึ่งยืนยันได้จากผลของระดับ MDA ที่ลดลงจากการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ประกอบกับการศึกษาของ Su *et al.* (2021) ที่รายงานว่า อสุจิของโคตอบสนองต่อการเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 2 mM ในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ส่งผลให้มิเปอร์เซ็นต์อสุจิไม่เคลื่อนที่น้อยที่สุด เนื่องจากเมลาโทนินช่วยปกป้องไมโทคอนเดรีย ซึ่งสามารถสร้างพลังงาน ATP ทำให้อสุจิเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น นอกจากนี้เมลาโทนินยังสามารถคงสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ซึ่งอสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์สามารถมีชีวิตรอดและเคลื่อนที่ได้ดี เช่นเดียวกับรายงานของ Lançoni *et al.* (2018) ที่รายงานว่าเมลาโทนินมีความสามารถในการปกป้องไมโทคอนเดรียของอสุจิ ซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการสร้างพลังงาน ATP ที่อสุจิใช้ในการเคลื่อนที่ เมื่อพลังงานลดลง การเคลื่อนที่ของอสุจิจะน้อยลงไปด้วย ดังนั้นเมลาโทนินสามารถช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถแสดงให้เห็นว่าเมลาโทนินมีผลในการปรับปรุงด้านความเร็ว รูปแบบในการเคลื่อนที่ และความผิดปกติที่ส่วนหางของอสุจิโคแช่แข็งหลังทำละลาย อาจเนื่องมาจากในกระบวนการทำสารละลายน้ำเชื้อนั้น มีการใช้ tris และมีการเติมไข่แดงเป็นส่วนประกอบของสารละลายที่เท่ากันทุกกลุ่ม ทำให้คุณสมบัติของสารละลายไม่แตกต่างกันในด้านแรงดันออสโมติก ความหนืด ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สามารถส่งผลต่อความเร็วและรูปแบบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Mofadel *et al.*, 2024)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเมลาโทนินที่เสริมในสารละลายสูตร ETG โดยเฉพาะการเสริมที่ระดับ 2 mM ซึ่งสามารถลด

ระดับของ MDA และปรับปรุงการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังทำละลายได้ดีที่สุด และเมื่อพิจารณาการเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 3 mM ซึ่งเป็นระดับสูงที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถปรับปรุงการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังทำละลายได้ ซึ่งการศึกษาของ Monteiro *et al.* (2022) ได้รายงานว่า การเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 4 mM ที่เป็นระดับสูงที่สุดในสารละลาย egg yolk-tris ส่งผลให้น้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังทำละลายมีการเคลื่อนที่ได้ลดลงเช่นกัน อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเมลาโทนินที่สูงในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งอาจมีผลในการกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันเกินปกติ และส่งผลกระทบต่อการทำงานของอสุจิ ดังนั้นการเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ต้องคำนึงถึงระดับที่เหมาะสม โดยไม่ส่งผลเสียต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ

สรุป

จากการศึกษาเสริมเมลาโทนินในสารละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ETG พบว่าน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลายที่มีการเสริมสารเมลาโทนินที่ระดับ 2 mM สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ลดลง อีกทั้งการเสริมเมลาโทนินที่ระดับ 2 mM สามารถลดระดับของ MDA ในน้ำเชื้อโคแช่แข็งหลังทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนในประสิทธิภาพของเมลาโทนินในการปกป้องอสุจิจากอนุมูลอิสระ ควรศึกษาเพิ่มเติมในด้านความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณฟาร์มโคเนื้อและกระบือภาคอีสานสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิสูตร ไมตรีจิตต์, ประเสริฐศักดิ์ ภักดีวงษ์, ทวี เหล่าดีม, ทวีพร เรืองพริ้ม, อาทิตย์ ปัญญาศักดิ์, สุกัญญา รัตนทับทิมทอง และสุริษา มาเจริญ. (2567). ผลของไข่แดงฝงต่อคุณภาพและลักษณะการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อโคหลังการแช่แข็ง. *วารสารเกษตรพระวรุณ*, 21(1), 238- 244. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.28>
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & De Iuliis, G. N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16(1) , 31- 38. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122203>
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*, 17,(4) 745-756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
- Arslan, H. O., Herrera, C., Malama, E., Siuda, M., Leiding, C., & Bollwein, H. (2019). Effect of the addition of different catalase concentrations to a TRIS-egg yolk extender on quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed bull sperm. *Cryobiology*, 91, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.200>
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011(1), 686137. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Bhalothia, S. K., Mehta, J. S., Kumar, T., Prakash, C., Talluri, T. R., Pal, R. S., & Kumar, A. (2022) . Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4°C. *Andrologia*, 54(1) , e14304. <https://doi.org/10.1111/and.14304>
- Divar, M. R., Azari, M., Mogheiseh, A., & Ghahramani, S. (2022). Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03186-8>
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Di Nardo, M., Adiga, S. K., & Talevi, R. (2021) . Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants*, 10(3), 337. <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>
- Jadoon, S., & Malik, A. (2017). A review article on the formation, mechanism and biochemistry of MDA and MDA as a biomarker of oxidative stress. *International Journal of Advanced Research*, 5,(12) 811-818. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/6024>

- Kumar, T., Kumar, P., Saini, N., Bhalothia, S. K., Prakash, C., Mahla, A. S., & Kumar, A. (2022). Shielding effect of melatonin improves seminal quality and oxidative stress indices during chilled storage of ram semen. *Tropical Animal Health and Production*, 54(3), 197. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03135-5>
- Lançonni, R., Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., M., L., Lemes, K. M., Gonella-Diaza, A. M., Oliveira, L. Z., & de Arruda, R. P. (2018). Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69, 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.06.006>
- Lee, S. H., & Lee, S. (2023). Effects of melatonin and silymarin on reactive oxygen species, nitric oxide production, and sperm viability and motility during sperm freezing in pigs. *Animals (Basel)*, 13(10), 1705. <https://doi.org/10.3390/ani13101705>
- Len, J. S., Koh, W. S. D., & Tan, S. X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, 39(8), BSR20191601. <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., & Fan, J. (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society Reproduction Fertility Supplement*, 65, 217-228. PMID17644964
- Mofadel, H. A., Hussein, H. A., Abd-Elhafee, H. H., & El-Sherry, T. M. (2024). Impact of various cryo-preservation steps on sperm rheotaxis and sperm kinematics in bull. *Scientific Reports*, 14(1), 11403. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61617-y>
- Monteiro, M. M., Silva, R. A. J. A., Arruda, L. C. P., de Oliveira, A. S., da Cunha Mergulhão, F. C., Júnior, P. L. J. M., Seal, D. C. D. M., Trevisan, M., Batista, A. M., & Guerra, M. M. P. (2022). Effect of melatonin in different extenders on the quality of frozen semen of goats. *Emerging Animal Species*, 5, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.eas.2022.100015>
- Najafi, A., Adutwum, E., Yari, A., Salehi, E., Mikaeili, S., Dashtestani, F., Abothassni, F., Rashki, L., Shiasl, S., & Asadi, E. (2018). Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. *Cell and Tissue Research*, 372, 149-159. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2743-4>
- Niu, P., Huang, F., Wang, J., Suo, J. J., Wang, J. R., Fang, D., Hen, C. M., & Gao, Q. H. (2024). Effects of melatonin on sperm quality, enzyme activity, antioxidant gene expression and fertility of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 226, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.06.002>

- Saeed, A. M., El-Nagar, H. A., Wafa, W. M., & Hussein, Y. S. (2016). Effect of coenzyme Q10 as an antioxidant added to semen extender during cryopreservation of buffalo and cattle semen. *Journal of Animal Poultry Production*, 7(11) , 403- 408. <https://doi.org/10.21608/jappmu.2016.48748>
- Sönmez, M., Yüce, A., & Türk, G. (2007). The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 23(2), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.003>
- Su, G., Wu, S., Wu, M., Wang, L., Yang, L., Du, M., Zhao, X., Su, X., Liu, X., Bai, C., Wei, Z., Cheng, L., & Li, G. (2021). Melatonin improves the quality of frozen bull semen and influences gene expression related to embryo genome activation. *Theriogenology*, 176, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.014>
- Toor, J. S., & Sikka, S. C. (2019). Human spermatozoa and interactions with oxidative stress. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 45- 53) . Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00006-7>
- Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2) , 395- 407. <https://doi.org/10.1111/andr.291>