

ผลของการเติมกลีเซอรอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็งในไก่ป่าอินเดีย
Effect of glycerol supplementation on semen quality after cryopreservation
in Indian red junglefowl

วรรณุช แสงท้าว

Woranut Saenghao

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

ไก่ป่าอินเดีย (*Gallus gallus murghi*) เป็นสัตว์ปีกที่มีความสำคัญทางพันธุกรรมแต่ในปัจจุบันกำลังเผชิญกับความเสี่ยงต่อการลดจำนวนและการสูญเสียนพันธุ์จากปัจจัยคุกคามหลายประการดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมโดยเฉพาะการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะยาวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง สัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมกลีเซอรอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็งในไก่ป่าอินเดีย โดยอ้างอิงข้อมูลจากงานวิจัยจำนวน 3 ฉบับระหว่างปี ค.ศ. 2017–2025 สารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้คือ Red fowl extender (RFE) ซึ่งประกอบด้วย potassium acetate, sodium glutamate, D-fructose, polyvinylpyrrolidone (PVP) และ glycine ในสภาวะ pH 7.0 และความเข้มข้น 380 mOsm/kg โดยมีการเติมกลีเซอรอลในระดับความเข้มข้น 20% เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อทำหน้าที่เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) ผลการศึกษาพบว่า การเติมกลีเซอรอลในสารละลาย RFE โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 20% ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในด้านความมีชีวิตของอสุจิ (viability) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane integrity) การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosomal integrity) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ ethylene glycol ในระดับความเข้มข้น 15% จึงสรุปได้ว่ากลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 20% แสดงคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์จากการแช่แข็งในแง่การควบคุมลักษณะจึงมีการแนะนำใช้เป็น Cryoprotectant ในอสุจิไก่ป่าแดงอินเดีย

คำสำคัญ : glycerol, cryopreservation, Indian red jungle fowl , semen quality

บทนำ

ไก่ป่าอินเดีย (*Gallus gallus murghi*) เป็นสัตว์ปีกที่มีความสำคัญทางพันธุกรรมอย่างยิ่งในปัจจุบันไก่ป่าอินเดียสายพันธุ์นี้กำลังเผชิญกับความเสี่ยงสูงต่อการลดจำนวนและสูญเสายพันธุ์ในถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติเนื่องจากปัจจัยคุกคามหลายประการเช่น การสูญเสียถิ่นที่อยู่ และการผสมข้ามสายพันธุ์กับไก่บ้าน ด้วยเหตุนี้การอนุรักษ์สายพันธุ์กรรมจึงมีความสำคัญอย่างมากเพื่อรักษาประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อของไก่ป่าอินเดียและเพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ในอนาคต (Allah Rakha et al., 2017) จึงมุ่งเน้นที่การใช้สารละลายเจือจางเนื้อเยื่อ Red fowl Extender (RFE) ที่มีส่วนประกอบของ Potassium acetate (0.5 กรัม), Sodium glutamate (2.1 กรัม), D-fructose (1.15 กรัม) Polyniylpyrrolidone (PVP) (0.6กรัม) และ glycine (0.2 กรัม) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถูกนำมาใช้เป็นสารเจือจาง pH 7.0 และ 380 millios moles per kilogram (mOsm/kg) ที่มีการสนับสนุนความมีชีวิตของเซลล์อสุจิ (Khursheed et al.,2025)

กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวที่สามารถซึมผ่านเซลล์ (permeable cryoprotectant) เนื่องจากมีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายของเซลล์อสุจิจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ซึ่งพอนำมาละลายจากการแช่แข็งจะทำให้เซลล์อสุจิเสียหาย (Allah Rakha et al., 2018)

ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการใช้ glycerol ต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการ cryopreservation ในไก่ป่าอินเดีย (*Gallus gallus murghi*)

ผลของการเติม glycerol ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็ง

Rakha et al. (2018) ได้ทำการศึกษาผลการเติมกลีเซอรอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็งที่ระดับ 11 15 และ 20% ความมีชีวิตของอสุจิหลังการละลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละช่วงเวลาการทดลองที่ 0,2 และ4 ชั่วโมงของการบ่ม(Figure1) สอดคล้องกับงาน (Figure 2) ซึ่งเป็นไปในทางทิศเดียวกันกับงาน Khursheed et al.(2025) การเติม ethylene glycol ต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็ง โดยกลุ่มควบคุมมีการเติม glycerol 20% และ ethylene glycol ที่ระดับ0, 5, 10, 15 และ 20% พบว่าความมีชีวิตของอสุจิเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ ethylene glycol พบว่า20% ethylene glycol มีค่าความมีชีวิตหลังการละลายโดยให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาเซลล์และมีผลแตกต่างจากกลุ่มความเข้มข้นต่ำที่ 5, 10และ 15 %อย่างมีนัยสำคัญ (Figure)

สรุปจากใน 2 งานวิจัย ของ Rakha et al. (2018) และ Khurshed et al.(2025) การเติมกลีเซอรอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ หลังกระบวนการแช่แข็งในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE พบว่าการเติม glycerol 20% ช่วยเพิ่มควมมีชีวิตของอสุจิ พบว่าสามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งของเซลล์อสุจิได้โดยมีการชี้ให้เห็นว่าการเติม glycerol ที่ระดับความเข้มข้นที่ 20% ให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงโดยกลไกการทำงานของกลีเซอรอลที่ปกป้องเซลล์อสุจิหลังการละลายกลีเซอรอลมีบทบาทหลักในการ Freezing ในการควบคุมการเกิดผลึกน้ำแข็งของเซลล์อสุจิและความเครียดจากออสโมซิส มีบทบาทรองในช่วงหลังการละลายโดยมีการลดการตกผลึกและความเครียดจากออสโมซิสในกลีเซอรอลที่ทำให้ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งใหม่กลีเซอรอลสามารถเพิ่มความหนืดทำให้สารละลายและลดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำชะลอการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อสุจิ

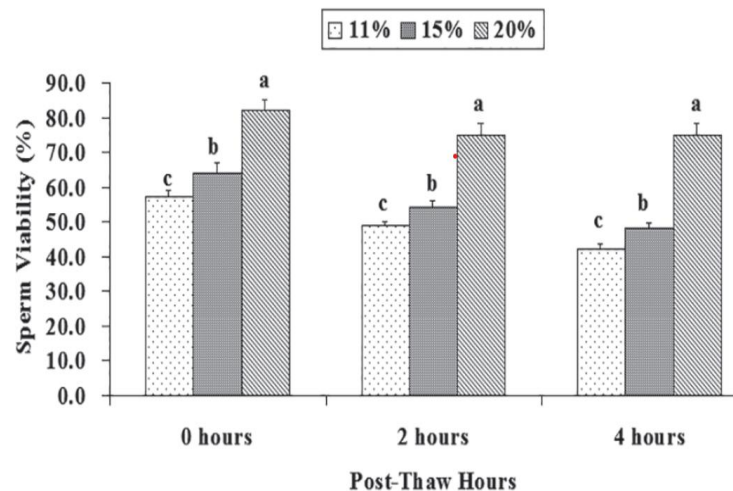


Figure 1. Effect of different concentrations of glycerol on Viability (%) of Indian Red jungle fowl spermatozoa post-thaw at 0, 2 and 4 h of incubation at 37 °C. the bars with different letters showed a significant difference ($p \geq 0.05$) at a given stage at 0,2 and 4 h of incubation.

Source : Rakha et al.,(2018)

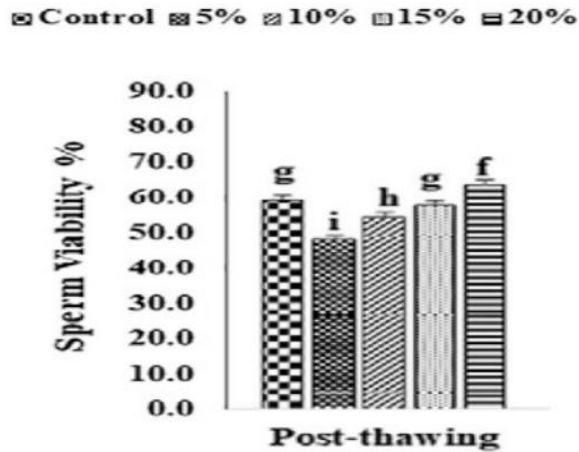


Figure 2. Effect of different concentrations of ethylene glycol (0%, 5%, 10%, 15%, and 20%) in extender on sperm Viability (%) of Indian red jungle fowl at the post- equilibration and post-thaw stages of cryopreservation. Different superscripts indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$)

Source : Khursheed et al., (2025)

ผลของการเติม glycerol ต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหลังกระบวนการแช่แข็ง

Rakha et al.(2018) จากการศึกษาผลการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 11%,15% และ 20%ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหลังการละลายแช่แข็งซึ่งจากการศึกษาพบว่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และการเสริมการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 20% พบว่าจากการเสริมให้การปกป้องความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการแช่แข็งที่ดีที่สุด (Figure 3) สอดคล้องกับ (Figure 4) ซึ่งไปในทิศทางเดียวกับงานของKhursheed et al. (2025) ทำการศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหลังการละลายแช่แข็งโดยมีการเสริม ethylene glycol 5%,10%,15% และ 20% และกลุ่มควบคุมที่มีการเสริม glycerol 20% พบว่าเมื่อใช้ ethylene glycol ในระยะหลังการละลาย ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มควบคุมเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญผลของการเติมกลีเซอรอลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและช่วยปกป้องเซลล์อสุจิ

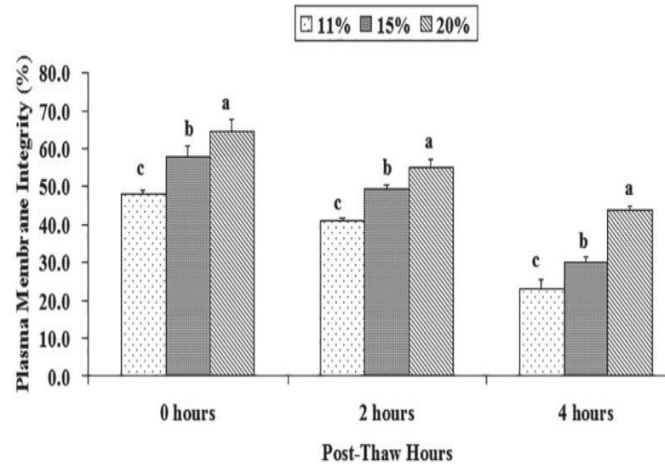


Figure 3. Effect of different concentrations of glycerol on plasma membrane integrity (%) of Indian Red jungle fowl spermatozoa post-thaw at 0,2 and 4 h of incubation at 37 °C. The bars with Different letters showed significant differences ($p \geq 0.05$) at a given stage at 0,2 and 4 h of incubation.

Source : Rakha et al.,(2018)

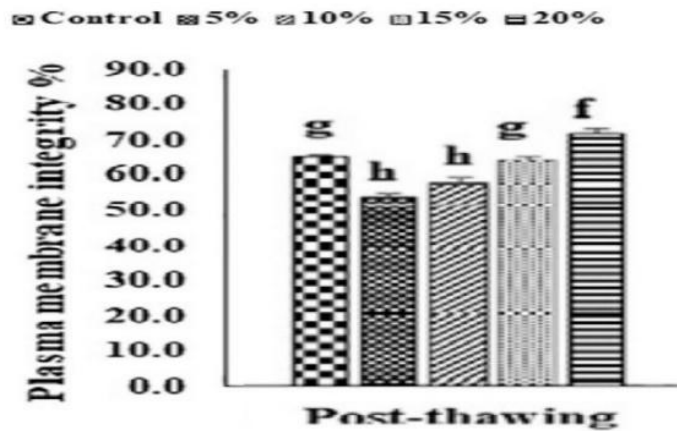


Figure 4. Effect of different concentrations of ethylene glycol (0%, 5%, 10%, 15%, and 20%) in extender on sperm plasma membrane integrity (%) of Indian red jungle fowl at post-equilibration and post-thaw stages of cryopreservation. Different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Source : Khursheed et al., (2025)

ผลของการเติม glycerol ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโมโซมของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็ง

Rakha et al. (2018) จากการศึกษาผลการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 11%,15% และ 20%ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของอะโครโมโซมของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็งซึ่งจากการศึกษาพบว่าความสมบูรณ์ของอะโครโมโซมของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และการเสริมการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 20% พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ระดับ 20%ให้การปกป้องที่ดีที่สุด (Figure 5) สอดคล้องกับ(Figure 6) ซึ่งไปในทิศทางเดียวกับงานของKhursheed et al. (2025) ทำการศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ของอะโครโมโซมของอสุจิหลังการละลายแช่แข็งโดยมีการเสริมethylene glycol 5%,10%,15% และ 20% และกลุ่มควบคุมที่มีการเสริม glycerol 20% พบว่าเมื่อใช้ ethylene glycol ในระยะหลังการละลายต่อความสมบูรณ์ของอะโครโมโซมของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในกลุ่มควบคุมเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ

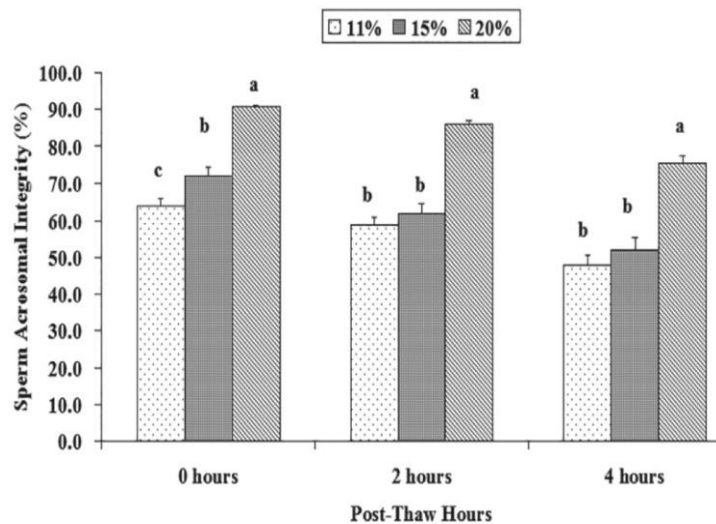


Figure 5. Effect of different concentrations of glycerol on acrosomal integrity (%) of Indian Red Jungle Fowl spermatozoa post-thaw at 0, 2 and 4 h of incubation at 37 °C. The bars with different letters showed significant differences ($P>0.05$) at a given stage at 0, 2 and 4 h of incubation.

Source : Rakha et al.,(2018)

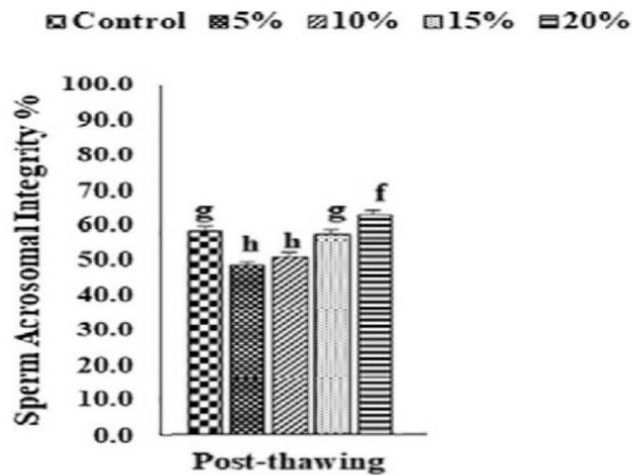


Figure 6. Effect of different concentrations of ethylene glycol (0%, 5%, 10%, 15%, and 20%) in extender on sperm acrosomal integrity (%) of Indian red jungle fowl at post-equilibration and post-thaw stages of cryopreservation. Different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Source : Khursheed et al., (2025)

ผลของการเติม glycerol ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็ง

Rakha et al. (2018) จากการศึกษาผลการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 11%,15% และ 20%ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็งซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และการเสริมการเสริม glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 20% พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ระดับ 20%ให้การผลของการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด (Figure7)สอดคล้องกับ(Figure 8) ซึ่งไปในทิศทางเดียวกับงานของKhursheed et al. (2025) ทำการศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ RFE ก่อนการแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายแช่แข็งโดยมีการเสริมethylene glycol 5%,10%,15% และ 20% และกลุ่มควบคุมที่มีการเสริม glycerol 20% พบว่าเมื่อใช้ ethylene glycol ในระยะหลังการละลายต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในกลุ่มควบคุมเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ

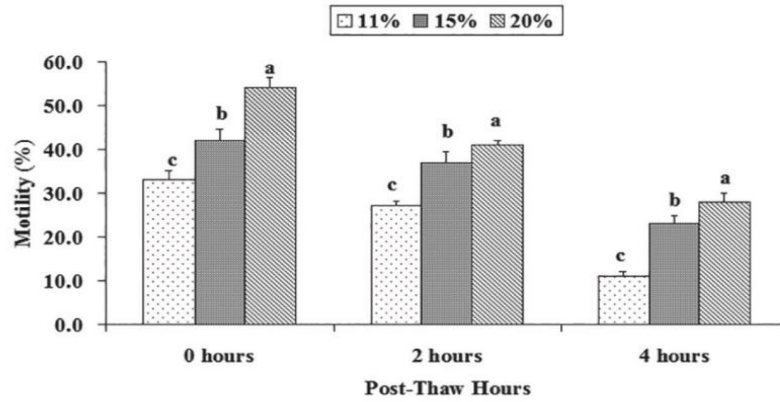


Figure 7. Effect of different concentrations of glycerol on motility (%) of Indian Red Jungle Fowl spermatozoa post-thaw at 0, 2 and 4 h of incubation at 37 °C. The bars with different letters showed significant differences ($P>0.05$) at a given stage at 0, 2 and 4 h of incubation.

Source : Rakha et al.,(2018)

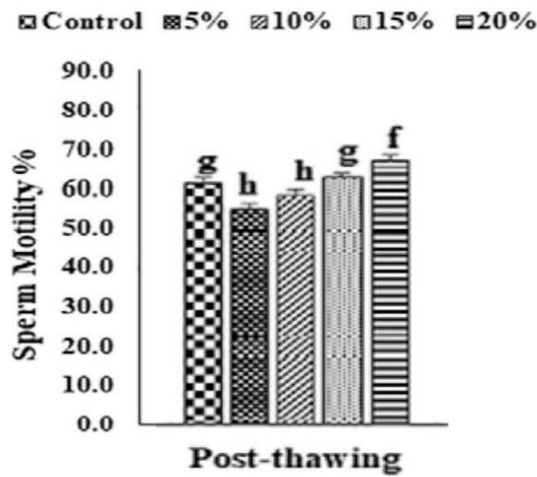


Figure 8. Effect of different concentrations of ethylene glycol (0%, 5%, 10%, 15%, and 20%) in extender on sperm motility (%) of Indian red jungle fowl at post- equilibration and post-thaw stages of cryopreservation. Different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Source : Khursheed et al., (2025)

สรุป

จากการศึกษาผลของการเติมกลีเซอรอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็งในไก่ป่าอินเดียลงไปในการละลายเชื้อจากน้ำเชื้อ RFE พบว่าการเติม glycerol 20% ส่งผลต่อความมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายที่ดีที่สุดโดยเฉพาะการเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 20% เมื่อเทียบกับ Ethylene glycol 15% เป็นระดับที่แนะนำในการใช้เป็น cryoprotectant ในไก่ป่าอินเดียซึ่งเป็นระดับที่ปลอดภัยและให้ผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

- Khursheed, F., Rakha, B. A., Zuha, S., Ansari, M. S., and Akhter, S. (2025). “Cryoprotective property of ethylene glycol in regard to the quality and mitochondrial status of frozen Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen.” *Biopreservation and Biobanking*, 00(00), 1–8.
- Lin, H.-L. H., Mermillod, P., Grasseau, I., Brillard, J.-P., Gérard, N., Reynaud, K., Chen, L.-R., Blesbois, E. and Vitorino Carvalho, A. (2023). “*Is glycerol a good cryoprotectant for sperm cells? New exploration of its toxicity using avian model.*” *Cryobiology*, **113**, 104529.
- Murugesan, S, and Mahapatra, R. (2025). “*Evaluation of semen cryopreservation protocols for Kadak Nath chicken.*” *Journal of Livestock Biodiversity*, **14**(1), 37–41.
- Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Hussain, I., and Blesbois, E. (2016). “Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen.” *Animal Reproduction Science* **174**, 45–55.