

ผลการเสริม Quercetin ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่หลังผ่านกระบวนการ Cryopreservation Effect of Quercetin Supplementation on Semen Quality of Large Ruminants after Cryopreserved

อรนภา แก้วคำสอน

Aonnapa Kaewkhamorn

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

Quercetin เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระต้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้งยังมีศักยภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระในรูปของ ROS ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่ต่างกันของ Quercetin ต่อजनพลศาสตร์ของอสุจิหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งในโคและกระบือ โดยศึกษาจากเอกสารงานวิจัยจำนวน 3 ฉบับ โดย 2 ฉบับ ศึกษาในน้ำเชื้อโค และ 1 ฉบับศึกษาในน้ำเชื้อกระบือ ตีพิมพ์ระหว่างปี ค.ศ. 2017 – 2023 ที่มีการเสริม Quercetin ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ระดับ 25 – 200 $\mu\text{g/ml}$ และ 2.5 – 80 μM พบว่า ในน้ำเชื้อโคที่เสริม Quercetin ในระดับ 25 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลดีต่อการเคลื่อนที่และความเร็วของอสุจิ แต่เสริมในระดับ 50 ถึง 200 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลกระทบต่อเซลล์อสุจิทำให้ค่า TM, PM, VCL, ALH และ LIN ลดต่ำลง เนื่องจากการเสริมในระดับสูงอาจส่งผลเสียต่อเซลล์อสุจิ และในน้ำเชื้อกระบือการเสริม Quercetin ที่ระดับ 10 μM ให้ประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่า TM และ PM สูงกว่ากลุ่มควบคุม รวมถึงส่งผลดีต่อค่า VCL และ ALH แต่การเสริม Quercetin ในระดับ 20 μM ขึ้นไปส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อทำให้ค่า TM, PM, VCL และ ALH ลดลง จึงสรุปได้ว่าการเสริม Quercetin ในระดับ 25 $\mu\text{g/ml}$ ในน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ และระดับ 10 μM ในน้ำเชื้อกระบือส่งผลดีต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการผสมเทียม ซึ่งการตอบสนองของอสุจิขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของ Quercetin

คำสำคัญ : जनพลศาสตร์อสุจิ น้ำเชื้อแช่แข็ง สัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่ CASA Quercetin

บทนำ

เทคนิคการทำน้ำเชื้อแช่แข็งมีการปฏิบัติอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวีเดน และในประเทศไทย (สุณิรัตน์, 2568) ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยปกติมีการเติมสารป้องกันอนุมูลอิสระจากการแช่แข็งที่เรียกว่า Cryoprotectant ที่นิยมใช้ในโค ได้แก่ Glycerol สามารถช่วยลดอันตรายต่อตัวอสุจิได้ (Forouzanfar et al., 2010) โดยทั่วไปมีการเติมลงไปใต้น้ำเชื้อ (Semen) ที่มีการเจือจางโดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (Extender) ซึ่ง Cryoprotectant จะมีหน้าที่เป็นตัวลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่สร้างความเสียหายแก่โครงสร้างอสุจิ (Almadaly et al., 2019) โดยกลไกหลักคือลดจุดเยือกแข็งของน้ำในเซลล์และทำให้เกิดสภาวะคล้ายแก้วแทนการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เป็นอันตรายทำให้เซลล์คงสภาพอยู่ได้หลังการละลายและยังช่วยรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกด้วยการควบคุมการเข้าออกของน้ำในเซลล์อสุจิ เพื่อป้องกันเซลล์บวมหรือหดตัวจนเสียหาย (El-Khawagah et al., 2020) อสุจิที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (Cryopreservation) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งเซลล์อสุจิ (Sperm Cryopreservation) มักจะเกิด Oxidative Stress ซึ่งนำไปสู่การสร้างอนุมูลอิสระในปริมาณสูง สร้างความเสียหายต่อ Macromolecules ภายในเซลล์ ได้แก่เยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรีย เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง (Agarwal et al., 2014)

ควอร์เซทิน (Quercetin) เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์ (Aitken et al., 1993) ทั้งยังมีศักยภาพสูงในการกำจัดอนุมูลในรูปของ ROS (Reactive Oxygen Species) (Boots et al., 2008) นอกจากนี้ Quercetin สามารถให้พารามิเตอร์ของอสุจิจึงคือ ปริมาณน้ำเชื้อ สีและลักษณะ ความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความมีชีวิตของอสุจิหลังแช่แข็ง (El-Khawagah et al., 2020) สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการปกป้องอสุจิจากการละลายแช่แข็งเนื่องจากอสุจิจะมีการผลิตอนุมูลอิสระผ่านกลไกการหายใจในระดับเซลล์เพื่อผลิตพลังงาน ATP ใน Mitochondria ดังนั้นการรักษาสมดุล (Cellular Redox) จะทำให้น้ำเชื้อโคหลังการละลายแช่แข็งคงคุณภาพที่ดีได้ (Ugur et al., 2019) นอกจากนี้เสริม Quercetin ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง ส่งผลให้ความอยู่รอดและการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังแช่แข็งดีที่สุด (Batool et al., 2024) ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่ต่างกันของ Quercetin ต่อจลนพลศาสตร์ของอสุจิหลังผ่านกระบวนการ Cryopreservation ในโคและกระบือ

การประเมินอสุจิ (Spermatic Evaluation) ด้วยระบบ CASA

Avdatek et al. (2017) ได้ศึกษาผลของการเสริม quercetin ต่อน้ำเชื้อโคพันธุ์โฮลสไตน์ โดยเสริมลงใน Tris extender เพื่อประเมินการเคลื่อนไหวแบบก้าวหน้า และการเคลื่อนไหวโดยรวมในน้ำเชื้อโคหลังจากการละลายแบบแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (ไม่เสริมสาร quercetin) และกลุ่มที่เสริมสาร quercetin ในปริมาณ 25, 50, 100 และ 200 µg/ml ตามลำดับ พบว่าการเสริม quercetin ในระดับ 25 µg/ml ค่า PM และ TM ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเนื่องจากการเสริมในปริมาณที่ต่ำไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ได้เพราะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการป้องกันอนุมูลอิสระและยังช่วยรักษาอัตราการเคลื่อนที่และความเร็วให้คงอยู่ได้ดีหลังการละลายน้ำเชื้อ

แต่การเสริมในระดับ 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลให้ค่า PM, TM, VCL, ALH และ LIN ลดลง โดยเฉพาะการเสริมที่ระดับ 200 $\mu\text{g/ml}$ อาจมีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหรือสภาวะที่ไม่สมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจาก quercetin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แปรผันตามความเข้มข้น (Dose-dependent) หากใส่มากเกินไปจะกลายเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ (Cytotoxic) ทำให้อสุจิสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ หรือรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทำให้การสร้างพลังงาน (ATP) สำหรับการว่ายน้ำลดลง (Table 1.)

Reis et al. (2023) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริม quercetin ต่อน้ำเชื้อโคพันธุ์ Nellore โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (ไม่เสริมสาร quercetin) กลุ่มที่เสริมสาร quercetin ในปริมาณ 25, 50, และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่า ค่า PM, TM, VCL, ALH และ LIN มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม แต่ในทางสถิติระบุว่าไม่มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากกลุ่มควบคุมมีคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายที่ค่อนข้างดี หรือควอซิทินช่วยรักษาคุณภาพดัชนีการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม (Table 2.)

El-Khawagah et al. (2020) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริม Quercetin ต่อน้ำเชื้อกระปืออียิปต์ โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (ไม่เสริมสาร Quercetin) กลุ่มที่เสริมสาร Quercetin ในปริมาณ 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 และ 80.0 μM ตามลำดับ พบว่าค่า Total Motility และ ค่า Progressive Motility มีลักษณะเป็นแบบ Biphasic response โดยค่าจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม (Control) และขึ้นสู่จุดสูงสุด (Peak) ที่ระดับความเข้มข้น 10 μM (TM = 71.82%, PM = 57.32%) ก่อนที่จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น ค่า Curvilinear Velocity : VCL ซึ่งบอถึงความแข็งแรงในการสับทิศทาง มีค่าสูงสุดที่ระดับ 10 μM (81.1 $\mu\text{m/s}$) และลดลงอย่างชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับความเข้มข้นสูง (40 และ 80 $\mu\text{m/s}$) ค่า Amplitude of Lateral Head Displacement เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 10 μM (4.69 $\mu\text{m/s}$) แสดงถึงการเคลื่อนที่ที่มีพลังงานสูง และค่า Linearity มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยที่จุดสูงสุด (10 μM) แต่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม 80 μM (57 %) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ค่า VCL ลดลงอย่างมาก ทำให้การเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงสูงขึ้นในอสุจิที่มีความเร็วต่ำ

Table 1 Mean (\pm SE) sperm motility values in frozen thawed bull semen.

Parameter	Quercetin ($\mu\text{g/ml}$)					P
	Control	25	50	100	200	
TM (%)	80.17 \pm 3.31 ^a	83.26 \pm 1.10 ^a	59.02 \pm 4.94 ^b	69.42 \pm 3.72 ^b	25.56 \pm 4.30 ^c	*
PM (%)	37.26 \pm 2.43 ^a	36.13 \pm 3.36 ^a	22.45 \pm 3.26 ^b	24.12 \pm 2.31 ^b	3.55 \pm 1.05 ^c	*
VCL ($\mu\text{m/s}$)	90.57 \pm 1.75 ^a	88.43 \pm 2.99 ^a	78.93 \pm 2.50 ^b	76.90 \pm 2.62 ^b	49.61 \pm 2.47 ^c	*
ALH ($\mu\text{m/s}$)	3.95 \pm 0.05 ^a	4.02 \pm 0.06 ^a	3.98 \pm 0.12 ^a	3.95 \pm 0.05 ^a	3.43 \pm 0.15 ^b	*
LIN (%)	47.98 \pm 1.13 ^a	46.50 \pm 1.68 ^{ab}	46.41 \pm 1.66 ^{ab}	42.73 \pm 1.28 ^b	31.66 \pm 1.51 ^c	*

PM: Progressive Motility TM: Total Motility VCL: Curvilinear Velocity ALH : Amplitude of Lateral Head Displacement LIN: Linearity

Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (* $p < 0.05$).

Source: Avdatek et al. (2017)

Table 2 Mean values (\pm standard error) of kinetic sperm variables at post-thaw moment (M0).

Parameter	Quercetin ($\mu\text{g/ml}$)				P
	Control	25	50	100	
TM (%)	55.56 \pm 26.45	59.34 \pm 22.61	58.69 \pm 19.79	62.44 \pm 24.27	NS
PM (%)	37.11 \pm 22.36	39.46 \pm 19.85	37.79 \pm 17.85	41.18 \pm 19.02	NS
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	52.16 \pm 10.53	54.18 \pm 12.31	53.98 \pm 11.93	54.76 \pm 10.72	NS
ALH (μm)	2.20 \pm 0.21	2.21 \pm 0.14	2.27 \pm 0.29	2.28 \pm 0.31	NS
LIN (%)	59.25 \pm 4.31	61.70 \pm 8.68	59.99 \pm 8.88	59.52 \pm 8.86	NS

PM: Progressive Motility TM: Total Motility VCL: Curvilinear Velocity ALH : Amplitude of Lateral Head Displacement LIN: linearity

Source: Reis et al. (2023)

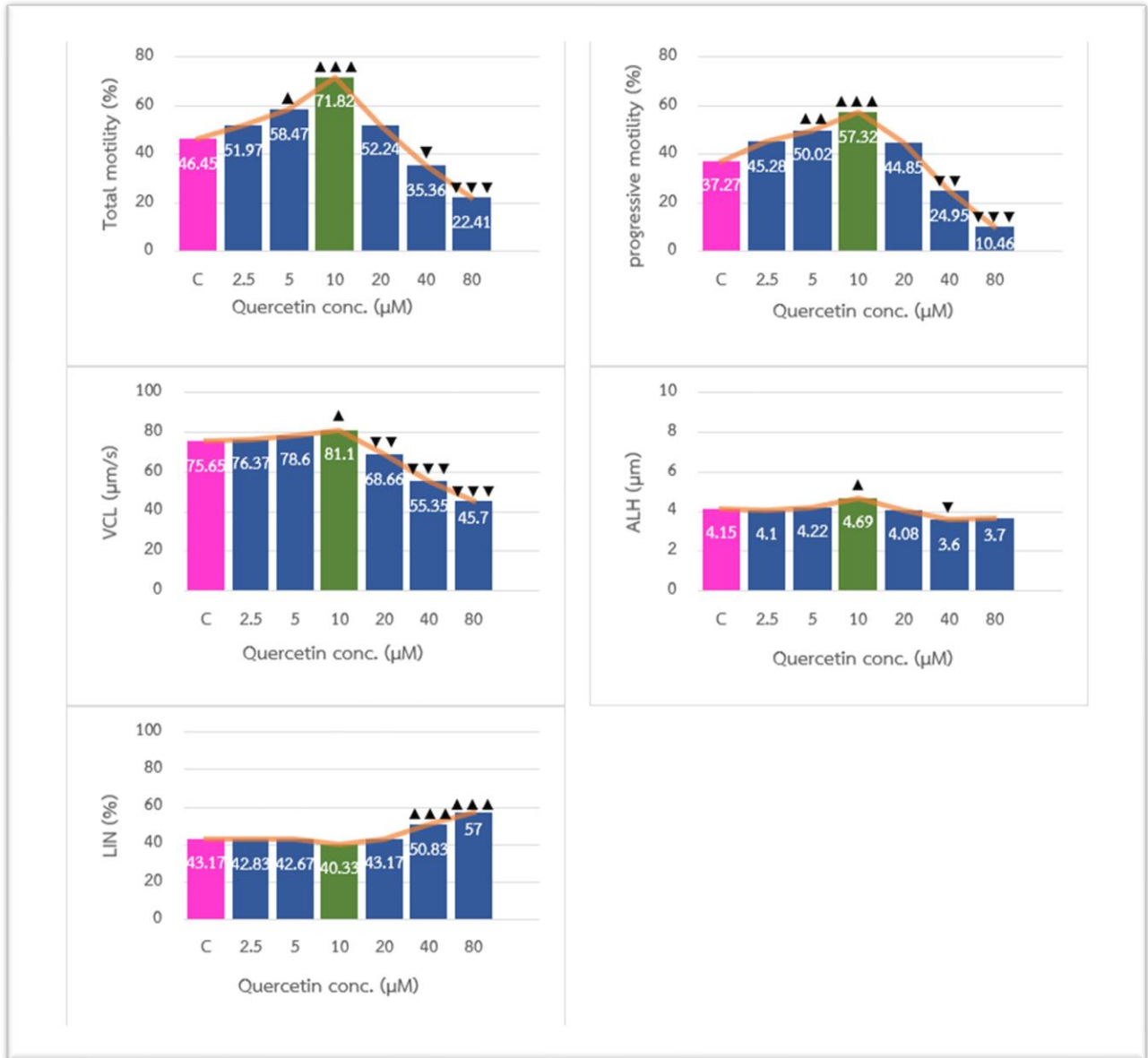


FIGURE1] The effect of different quercetin concentrations on post thawing spermkinematics of Egyptian buffalo spermatozoa as measured by the computer-assisted sperm analyzer (CASA). The horizontal dotted line delineates the average of the control group. The upper arrowhead (▲) indicated a positive impact. Low arrowhead (▼) indicated a negative impact. ▲, ▲▲, and ▲▲▲ referred to $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively

Source: EL-Khawagah et al. (2020)

สรุปผล

จากการทบทวนงานวิจัยทั้ง 3 ฉบับ พบว่า การเสริมควอซีทิน (Quercetin) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง แข็งแรงช่วยรักษาคุณภาพจลนพลศาสตร์ของสperm หลังการละลายได้ดีที่สุดที่ระดับ 10 μM ในกระป๋องอียิปต์ โดยเพิ่มค่าการเคลื่อนที่ (TM, PM) และความเร็ว (VCL) อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์มีความแปรผันตามระดับความเข้มข้น (Dose-dependent) ซึ่งการใช้ในปริมาณที่สูงเกินไป ($> 50 \mu\text{g/ml}$ หรือ $> 20 \mu\text{M}$) จะส่งผลเสียรุนแรงต่อการเคลื่อนที่ของสperm โดยเฉพาะที่ระดับ 200 $\mu\text{g/ml}$ ในโค เนื่องจากความเป็นพิษต่อเซลล์ สรุปได้ว่า Quercetin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบเชิงลบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนั้น ควรเสริมที่ระดับ 25 $\mu\text{g/ml}$ ในน้ำเชื้อโค และเสริมที่ระดับ 10 μM ในน้ำเชื้อกระป๋อง

เอกสารอ้างอิง

- สุนิรัตน์. 2568. “การผสมเทียมโค”. วารสารโคนม. ปีที่ 24. ฉบับที่ 2.
- Agarwal A., Tvrda E., and Sharma R., 2014. “Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility”. *Reprod Biol Endocrinol.* 12:45. doi: 10.1186/1477-7827-12-45
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, and Lullis GN. 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* ;16(1):31-8. <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682X.122203>. PMID:24369131.
- Aitken RJ., Harkiss D., and Buckingham DW., 1993. “Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa”. *Mol Reprod Dev.* 35:302–15. doi: 10.1002/mrd.1080350313
- Almadaly E., Tawfik F., El-Kon I., Heleil B., and Fattouh ES., 2019. “Effect of different cryoprotectants on the post-thaw sperm characteristics and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalus*) bull semen”. *Slovenian Veterinary Research* 56(Suppl 22): 541–551.
- Avdatek F., Taşdemir U., Yeni D., İnanç M.E., Çil B., Tuncer B.P., and Türkmen R. 2017. "Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation". *Andrologia.* DOI: 10.1111/and.12975.
- Batool I., Fayyaz MH., Hameed A., Andrabi SMH., Kausar R., Shahzad M., Mubashir Y., Omur AD., Murtaza G., Ditta A and Hussain T. 2024. “Quercetin in semen extender improves frozen-thawed spermatozoa quality and in-vivo fertility in crossbred Kamori goats”. *Front. Vet. Sci.* 11:1385642. DOI: 10.3389/fvets.2024.1385642

- Boots AV., Haenen GR., and Bast A., 2008. "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical". **Eur J Pharmacol.** 585:325–37. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008
- El-Khawagah ARM., Kandiel MMM., and Samir H. 2020. "Effect of Quercetin Supplementation in Extender on Sperm Kinematics, Extracellular Enzymes Release, and Oxidative Stress of Egyptian Buffalo Bulls Frozen–Thawed Semen". **Front. Vet. Sci.** 7:604460. DOI: 10.3389/fvets.2020.604460
- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S.M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini and M.H. Nasr-Esfahani. 2010. "In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen". **Theriogenology.** 73: 480-487.
- Reis WVA., Pereira RR., Vieira Junior M., Cunha CCT., Acácio BR., Macedo GG., Costa-e-Silva EV., and Sampaio BFB. 2023. "Impact of quercetin, carnosine, and ozone in the cryopreservation on Nellore (Bos indicus) semen". **Anim Reprod.** 20(1):e20220048.
- Tironi S.M.T., Martinez A.C., Seixas F.A.V., Stefanello T.F., Nakamura C.V. and Moraes G.V. 2019. "Effects of Treatment with Quercetin on the Quality of Cryopreserved Bovine Semen". **Acta Scientiae Veterinariae.** 47: 1635.
- Ugur MR., Saber Abdelrahman A., Evans HC., Gilmore AA., Hitit M., Arifiantini RI., Purwantara B., Kaya A., and Memili E., 2019. "Advances in Cryopreservation of Bull Sperm". **Front. Vet. Sci.** 6:268. doi: 10.3389/fvets.2019.00268