



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ตัวบ่งชี้ชีวมวลทางระบบสืบพันธุ์ในน้ำเลี้ยงตัวอสุจิในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์
(สมเสร็จมลายู; *Tapirus Indicus*)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.น.สพ.สฤณีวิชญ์ ปัญญาภิบาลป์

เมษายน พ.ศ.2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ตัวบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ในน้ำเลี้ยงตัวอสุจิในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (สมเสร็จมลายู; *Tapirus Indicus*)

ผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร.น.สพ.สฤณีวิชัย ปัญญาภิบาล	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. อ.ดร.สพ.ญ.มานิตา วิทยารัตน์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. สพ.ญ.ดร.วัลยา ทิพย์กันทา	องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
4. ศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. Dr.Budhan S. Pukazhenth	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
6. Dr.Nucharin Songsasen	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
7. น.สพ.ดร.บริพัตร ศิริอรุณรัตน์	ศูนย์สิ่งแวดล้อมศึกษาประเทศไทย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 6180045

ชื่อโครงการ: ตัวบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ในน้ำเลี้ยงตัวอสุจิในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (สมเสร็จจมาลายู;
Tapirus Indicus)

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน

ผศ.ดร.น.สพ.สุกัญญา ปัญญาภิบาลย์

อ.ดร.สพ.ญ.มานิตา วิทยารัตน์

สพ.ญ.ดร.วัลยา ทิพย์กันทา

ศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ

Dr.Budhan S. Pukazhenth

Dr.Nucharin Songsasen

น.สพ.ดร.บริพัตร ศิริอรุณรัตน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Smithsonian Conservation Biology Institute, USA

Smithsonian Conservation Biology Institute, USA

ศูนย์สิ่งแวดล้อมศึกษาประเทศไทย

อีเมล: Saritvich.p@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พฤษภาคม 2561 ถึง เมษายน 2563

บทคัดย่อ:

สมเสร็จจมาลายู (*Tapirus Indicus*) จัดเป็นสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์รายชื่อของ IUCN และพบว่ายังคงขาดองค์ความรู้ที่สำคัญในด้านระบบสืบพันธุ์ที่จำเป็นต่อสัตว์ชนิดนี้ วัตถุประสงค์สำคัญต่อโครงการวิจัยนี้คือการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์สองชนิด คือ CRISP2 และ CRISP3 ภายในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิและตะกอนตัวอสุจิต่อลักษณะทางระบบสืบพันธุ์ของสมเสร็จจมาลายู ตัวอย่างน้ำเชื้อถูกเก็บจากสมเสร็จจำนวน 9 ตัว ภายใต้การดูแลของสวนสัตว์ในองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จากสามสวนสัตว์ และทำการวิเคราะห์ลักษณะแสดงออกทางระบบสืบพันธุ์ประกอบด้วย ขนาดของอัณฑะ ปริมาณน้ำเชื้อ ความเป็นกรดต่าง การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มอะโครโซมของตัวอสุจิ สำหรับตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ และตะกอนตัวอสุจิถูกวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน CRISP2 และ CRISP3 โดยวิธี Immunoblotting technique หลังจากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับลักษณะทางระบบสืบพันธุ์ของสมเสร็จ ผลการทดสอบพบว่าโปรตีนทั้งสองตัวมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางระบบสืบพันธุ์ของสมเสร็จเพศผู้ ได้แก่ การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มอะโครโซม และจำนวนตัวอสุจิที่รีดได้ ความคาดหวังของโครงการวิจัยนี้ในอนาคตคือการนำไปใช้ประโยชน์ และสนับสนุนการจัดการการผสมพันธุ์ และพันธุกรรมของสมเสร็จ และสัตว์ป่าชนิดอื่นที่ใกล้สูญพันธุ์เพื่อผลิตลูกสัตว์ในการเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ป่า โดยเฉพาะสมเสร็จ และนำไปสู่การปล่อยกลับคืนสู่ธรรมชาติในอนาคต

คำหลัก: สมเสร็จจมาลายู ระบบสืบพันธุ์ น้ำเชื้อ ตัวอสุจิ โปรตีน

Abstract

Project Code: MRG 6180045

Project Title: Reproductive Biomarkers in Seminal Plasma of Endangered Malayan Tapirs
(*Tapirus Indicus*)

Investigator

Asst.Prof.Dr.Saritvich Panyaboriban	Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University
Dr.Manita Wittayarat	Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University
Dr.Wanlaya Tipkantha	Zoological Park Organization
Prof.Dr.Mongkol Techakumphu	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
Dr.Budhan S. Pukazhenthi	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr.Nucharin Songsasen	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr.Boripat Siriaronrat	Environmental Education Centre Thailand

E-mail Address: Saritvich.p@psu.ac.th

Project Period: May 2018 – April 2020

Abstract:

The Malayan tapir (*Tapirus Indicus*) is listed as Endangered by IUCN, and there is limited information on the fundamental reproductive biology of this species. The overall goal of this study is to determine the associations between reproductive protein biomarkers (CRISP2 and CRISP3) of seminal plasma, sperm pellet and reproductive characteristics in the endangered Malayan tapirs. Samples were collected from nine captive male Malayan tapirs in three zoos under the Zoological Park Organization (ZPO), and evaluated for reproductive traits (testicular assessment, semen volume, pH, sperm motility, sperm concentration, viability, and acrosome integrity). All samples (seminal plasma, and sperm pellet) were analyzed for protein expression (CRISP2 and CRISP3) by immunoblotting technique. These results indicate that the CRISP3 protein correlates with reproductive characteristics such as sperm motility, acrosome integrity and ejaculated sperm number in male Malayan tapirs. The expected values of this project will be to support and improve breeding and genetic management of endangered tapirs and other closely related species. Specifically, new knowledge generated will inform future breeding and re-introduction programs for the Malayan tapir.

Keywords: Malayan tapir, Reproduction, Semen, Sperm, Protein

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การเปลี่ยนแปลงสถานะแวดล้อม การทำลายป่าไม้และนิเวศวิทยาเป็นปัจจัยสำคัญสองสิ่งที่เป็นผลจากการถูกรบกวน และกิจกรรมของมนุษย์อันเป็นผลโน้มนำไปสู่การลดจำนวนประชากรสัตว์ป่า การอนุรักษ์สัตว์ป่า (Wildlife conservation) เป็นหนึ่งใน 15 ของกรอบเป้าหมายการพัฒนาความยั่งยืนแห่งสหประชาชาติ (Sustainable development goals, SDG 15) เพื่อช่วยในการคงอยู่มั่นคงของทรัพยากรธรรมชาติพร้อมกับการพัฒนาเจริญของสังคมเศรษฐกิจต่อไปได้ในอนาคต การอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าภายในกรงเลี้ยง (*ex situ* conservation) ยังคงเป็นวิธีที่นิยมใช้และเป็นประโยชน์มากที่สุดเพื่อการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ ด้วยการผสมพันธุ์ระหว่างสัตว์ป่าเพศผู้และเพศเมียที่อาศัยอยู่ในกรงเลี้ยงหรือสวนสัตว์ (Russello and Amato, 2004; Bowkett, 2009) จุดประสงค์หลักของวิธีการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าภายในกรงเลี้ยง คือการเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ป่าโดยการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างยั่งยืน เพื่อลดความสูญเสียของความหลากหลายทางพันธุกรรม ลดอัตราการผสมเลือดชิด และการปรับตัวต่อสถานะสิ่งแวดล้อมภายในกรงเลี้ยง (Frankham, 2008) วิธีการนี้มาจากทฤษฎีที่ว่าประชากรสัตว์ป่าที่นำมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงหรือสวนสัตว์ ควรจะเป็นตัวแทนที่ดีของประชากรสัตว์ป่าที่อยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งทั้งนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการอนุรักษ์และจำนวนประชากรสัตว์ป่า สำหรับเทคโนโลยีหนึ่งที่นิยมใช้ช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าที่สำคัญ คือ เทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ (Reproductive biotechnology) ตัวอย่างเช่น การผสมเทียม (Artificial insemination; AI) การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ตัวอ่อน (Embryo preservations) การย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer; ET) ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์สัตว์ป่า รวมทั้งช่วยในการขยายพันธุ์สัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ได้หลายชนิด เช่น เพอเรทเท้าดำ (Black-footed

ferret) (Wolf et al., 2000; Howard et al., 2006) เสือลายเมฆ (Clouded leopard) (Howard et al., 1996; Pukazhenthii et al., 2006)

สมเสร็จ หรือ ผสมเสร็จ (Tapir) จัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่กินพืชขนาดใหญ่ เป็นญาติใกล้ชิดกับสัตว์ กีบคี่ ได้แก่ ม้า และแรด สมเสร็จเป็นสัตว์ที่มีรูปร่างหน้าตาที่คล้ายกับสัตว์หลายๆชนิดรวมกัน เช่น จมูกที่ยื่นยาว ออกมคล้ายวงของช้าง ลำตัวคล้ายหมู หางสั้นคล้ายหมี และกีบเท้าลักษณะคล้ายแรด เนื่องจากรูปร่างผสมกัน ดังกล่าว จึงเรียกสัตว์ชนิดนี้ว่า ผสมเสร็จ หรือ สมเสร็จ ภายในระบบนิเวศในพื้นที่ป่าสมเสร็จมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มความหลากหลายของพันธุ์พืชในป่าถิ่นที่อยู่ เนื่องจากเป็นสัตว์กินพืชขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการกระจายเมล็ดพันธุ์ในถิ่นที่อยู่ (Janzen, 1981; Bodmer, 1990; Fragoso and Huffman, 2000; O'Farrill et al., 2013) ปัจจุบันสมเสร็จถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ Tapiridae และมีเพียงสกุลเดียวคือ *Tapirus* ซึ่งในปัจจุบันเหลือ ทั้งสิ้นเพียง 5 ชนิด ได้แก่ สมเสร็จอเมริกาใต้ (*Tapirus terrestris*), สมเสร็จอเมริกากลาง (*Tapirus bairdii*), สมเสร็จภูเขา (*Tapirus pinchaque*) และสมเสร็จมลายู (Malayan tapir)หรืออาจเรียกว่าสมเสร็จเอเชีย (*Tapirus indicus*) ก็ได้ (Patrícia, 2002; Pukazhenthii et al., 2011) และมีการแบ่งสมเสร็จชนิดใหม่ซึ่งมีความ ใกล้เคียงกับสมเสร็จอเมริกาใต้ คือ *Tapirus kabomani* (Cozzuol et al., 2013) สำหรับในเขตเอเชีย โดยเฉพาะ ในโซนใกล้เส้นศูนย์สูตร ในภาคใต้และภาคตะวันตกของไทย, ภาคใต้ของพม่า มาเลเซีย และแถบเกาะสุมาตรา จะ พบสมเสร็จมลายู ซึ่งปัจจุบันถูกจัดอยู่ในสัตว์กลุ่มที่ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered; EN) ในบัญชีแดงของสหภาพเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (IUCN Red List of Threatened Species หรือ IUCN Red List) และถูกจัดขึ้นเป็นสัตว์ป่า สงวน ขึ้นบัญชีไซเตส (CITES) ในประเภท Appendix I (Traeholt et al., 2016) มีรายงานว่าจำนวนประชากร ของสมเสร็จมลายูน้อยกว่า 2,500 ตัวในธรรมชาติ และมีการประมาณการว่าจะมีแนวโน้มจำนวนประชากรที่ลดลง มากกว่าร้อยละ 20 ในระยะเวลา 24 ปี ทั้งนี้การลดลงของประชากรเกิดขึ้นเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การถูกล่า จากมนุษย์ การบุกรุกพื้นที่อยู่อาศัย อีกทั้งอาจเกิดจากสาเหตุของอุบัติเหตุที่เกิดขึ้นบนท้องถนนที่ตัดผ่านพื้นที่

อาศัยของสมเสร็จ การถูกล่าโดยสัตว์อื่นที่ดุร้ายกว่า และการตายจากโรคต่าง ๆ เป็นต้น (da Silva et al., 2010; Traeholt et al., 2016) สำหรับในประเทศไทยพบเพียงสมเสร็จมลายูเพียงชนิดเดียว และพบว่าเป็นสมเสร็จชนิดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับสมเสร็จชนิดอื่น สำหรับในแถบเอเชียจะพบเพียงสมเสร็จมลายูเพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยมากจะพบการกระจายตัวในพื้นที่ป่าดิบชื้น โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทย และสาเหตุสำคัญในการลดประชากรลงของสมเสร็จในประเทศไทยเนื่องจากการรุกป่าถิ่นที่อยู่เพื่อใช้ในการปลูกปาล์มน้ำมัน ซึ่งไม่แตกต่างจากสาเหตุในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย จึงทำให้ประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซียมีการจัดทำแผนการอนุรักษ์สมเสร็จแห่งชาติ (National Tapir Conservation Action plan) ในปี ค.ศ.2013 และ 2014 ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีแผนการจัดการอนุรักษ์สมเสร็จแห่งชาติดังกล่าว (Traeholt et al., 2016) แม้กระทั่งการจำกัดขององค์ความรู้ทางด้านสรีรวิทยา ชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิทยาการสืบพันธุ์ในสมเสร็จมลายูซึ่งจัดเป็นสมเสร็จในกลุ่มโลกเก่า (Old world tapirs) (Tipkantha et al., 2011) เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ความรู้ที่มีการศึกษาวิจัยมากกว่าในกลุ่มโลกใหม่ (New world tapirs) ได้แก่ สมเสร็จอเมริกาใต้ สมเสร็จอเมริกากลาง และสมเสร็จภูเขา (Downer, 1996; Salas, 1996; Downer, 2001; Holden et al., 2003; Piper, 2009) จึงทำให้เกิดความจำกัดต่อการพัฒนาแผนการอนุรักษ์ที่ยั่งยืนของสมเสร็จมลายูเหล่านี้

สำหรับประชากรสมเสร็จมลายูที่อยู่ในกรงเลี้ยงทั่วโลกพบว่ามียู่ประมาณ 260 ตัวที่ถูกเลี้ยงและจัดการประชากรภายในสวนสัตว์ (Stancer, 2010) ส่วนประเทศไทยพบว่าอยู่ภายใต้การครอบครองขององค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์จำนวน 26 ตัว และมีอีกจำนวนหนึ่งในสวนสัตว์เอกชน ทั้งนี้ประชากรกลุ่มนี้มีเพื่อการศึกษาวิจัยและเพื่อการอนุรักษ์สัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ไม่ให้เข้าสู่ภาวะสูญพันธุ์ (Extinction) จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการจัดโปรแกรมแผนการเพาะขยายพันธุ์ และเป็นแหล่งผลิตสัตว์ป่าเพื่อการปล่อยกลับเข้าสู่ธรรมชาติ (Reintroduction) ซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่ดั้งเดิมของสัตว์ป่าชนิดนั้น ๆ ดังนั้นเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ (Assisted reproductive technologies; ARTs) ตัวอย่างเช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อ (Semen cryopreservation)

การผสมเทียม (Artificial insemination) ร่วมกับเทคนิคการจัดการคู่ผสมพันธุ์ การศึกษาพฤติกรรมผสมพันธุ์ รวมทั้งการจัดการด้านประชากรและพันธุกรรม (Population and genetic managements) จึงเป็นส่วนสำคัญในเรื่องการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ป่าดังกล่าว อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพและผลสัมฤทธิ์ของเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์มีความจำเป็นอย่างยิ่งในเรื่องพื้นฐานของความเข้าใจด้านสรีรวิทยาและชีววิทยาที่จำเพาะของสัตว์ในแต่ละชนิด (Pukazhenthi and Wildt, 2003; Swanson, 2006; Wildt et al., 2010; Panyaboriban et al., 2016) ซึ่งสำหรับสมเสร็จมลายูในปัจจุบันแล้วยังมีความเข้าใจในองค์ความรู้ทางระบบสืบพันธุ์ที่จำกัดและมีจำนวนผู้ศึกษาน้อย ทำให้เป็นผลกระทบต่อการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์สำหรับการเพาะขยายและการอนุรักษ์สมเสร็จมลายูซึ่งเป็นสัตว์ป่าพื้นถิ่นที่สำคัญและใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต่อการศึกษา และเป็นวัตถุประสงค์สำคัญของโครงการวิจัยในครั้งนี้ที่ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวบ่งชี้ชีวภาพทางการสืบพันธุ์ (Reproductive biomarkers) ที่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Seminal plasma) และตัวอสุจิ (Sperm) ต่อประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์ในสมเสร็จมลายูเพศผู้ ทั้งนี้เพื่อการใช้เป็นตัวบ่งชี้หลักในการช่วยวิเคราะห์ความสำคัญในการสืบพันธุ์ของสมเสร็จเพศผู้ในแต่ละตัวในอนาคต รวมทั้งใช้เป็นดัชนีสำคัญในการวางแผนการเพาะขยายพันธุ์ต่อไปในอนาคต

บททวนวรรณกรรม

สารบ่งชี้ชีวภาพเป็นสารสำคัญที่ร่างกายสร้างขึ้นและสามารถใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หรือตรวจหากระบวนการทำงานภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Barbosa Jr et al., 2005; Surinova et al., 2010; Gresle et al., 2011) ระบบสืบพันธุ์ก็นับเป็นอวัยวะหลักที่สำคัญของร่างกายที่มีการสร้างสารบ่งชี้ชีวภาพออกมาในระหว่างการทำงานหรือการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งประโยชน์ของสารบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ที่มีการรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์และพยากรณ์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ

อวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive patterns) กลไกการทำงาน (Reproductive functions) การวินิจฉัยการตั้งครรภ์ (Pregnancy diagnosis) และการวิเคราะห์ปัญหาการผสมไม่ติดทางระบบสืบพันธุ์ (Infertility test) (Ito et al., 2008; Ali et al., 2013; Kovac et al., 2013; Mizejewski, 2016) สำหรับสารบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ที่อุดมคติที่เหมาะสมต่อการเลือกนำมาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องตรวจวัดได้ง่าย รวดเร็ว จำเพาะเจาะจงต่อสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ และมีความคงตัวดี ซึ่งปัจจุบันมีการตรวจสอบสารบ่งชี้ชีวภาพเหล่านี้ทั้งในซีรัม (Serum) หรือน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Seminal plasma) ในการวิเคราะห์สถานะทางการสืบพันธุ์ของเพศผู้ ซึ่งอาจแบ่งได้เป็นผสมติดดี (Fertility) ผสมไม่ติดบ้าง (Sub-fertility) และผสมไม่ติด (Infertility) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพศผู้หลายชนิด เช่น ในพอม้า (Brandon et al., 1999; Giesecke et al., 2010; Novak et al., 2010) ในพ่โค (Aslam et al., 2014; Kumar et al., 2015) ในพ่แกะ (Castellanos et al., 2008; Goularte et al., 2014) และในพ่สุกร (Am-In et al., 2011; Dyck et al., 2011) รวมทั้งมีใช้ในการวิเคราะห์ปัญหาการมีบุตรยากจากสาเหตุของผู้ชายในมนุษย์ด้วย (Wu et al., 2012; Milardi et al., 2013)

สารบ่งชี้ชีวภาพที่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Seminal plasma biomarkers) โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเภทที่เป็นโปรตีน (Protein markers) มีส่วนสำคัญและทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทำงานภายในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ การควบคุมกลไกการปฏิสนธิ (Fertilization) ตั้งแต่ การเกิดคาปาซิเตชันของตัวอสุจิ (Sperm capacitation) การเก็บกักตัวอสุจีก่อนการปฏิสนธิ (Sperm storage) การเคลื่อนส่งตัวอสุจิในทางเดินสืบพันธุ์ (Sperm transportation) รวมไปถึงการตอบสนองต่อปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย (Modulation of the immune response in female reproductive tract) และการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเมีย (Gamete interaction) (Töpfer-Petersen et al., 2005) สารบ่งชี้ชีวภาพชนิดโปรตีนที่มีความน่าสนใจกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีส่วนควบคุมสำคัญในระบบสืบพันธุ์ภายในน้ำเชื้อ คือ กลุ่ม Cysteine-rich secretory proteins หรือเรียกชื่อย่อว่า CRISPs การรายงานก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนกลุ่ม CRISPs นี้มีบทบาทสำคัญต่อการ

ควบคุมระบบสืบพันธุ์หลายส่วน รวมทั้งระบบภูมิคุ้ม และพบได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด อาทิเช่น ม้า สุกร หนูเม้าส์ และหนูแรท รวมทั้งมนุษย์ (Magdaleno et al., 1997; Jalkanen et al., 2005; Töpfer-Petersen et al., 2005; Udby et al., 2005b; Vadnais et al., 2008; Koppers et al., 2011; Rodríguez-Martínez et al., 2011)

กลุ่มโปรตีน CRISPs นี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดความยาวของกรดอะมิโน (Amino acids) จำนวนระหว่าง 220 – 230 ตัว และมักพบกลุ่มกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 16 ตัว และมักพบว่าโปรตีนกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มากถึง 35 – 85 เปอร์เซ็นต์จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนที่คล้ายกัน คือส่วนที่เป็น N-terminal domain และอีกส่วนคือ Cysteine rich C-terminal domain (Eberspaecher et al., 1995; Krätzschar et al., 1996; Yamazaki et al., 2002) โปรตีนตัวที่สำคัญในกลุ่มนี้ที่มีการรายงานแล้วในปัจจุบันประกอบด้วย 4 ตัว ได้แก่ CRISP1, CRISP2, CRISP3 และ CRISP4 (Jalkanen et al., 2005; Koppers et al., 2011) สำหรับ CRISP1 มักพบในส่วนของอวัยวะไทมัสส่วนปลาย (Caudal epididymis) มีการรายงานถึงบทบาทว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเชื่อมกันของตัวอสุจิและไข่ (Sperm-oocyte fusion) ในระหว่างการปฏิสนธิ รวมทั้งมีบทบาทในช่วง Sperm capacitation ด้วย (Roberts et al., 2006) CRISP2 พบมากในส่วนของอะโครโซม (Acrosome region) ของตัวอสุจิ และส่วนประกอบของหางตัวอสุจิ (Outer dense fibers of sperm tail) และรายงานว่ามีส่วนสนับสนุนในช่วงการสร้างตัวอสุจิ (Spermatogenesis) ภายในอวัยวะและในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างยิ่งต่อการอัตราการผสมติดของสัตว์เพศผู้ (Jamsai et al., 2008a; Jamsai et al., 2008b; Arangasamy et al., 2011; Muñoz et al., 2012) CRISP3 หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า SGP28 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่พบในต่อมสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Male accessory sexual glands) ได้แก่ เซมินอล เวสสิเคิล (Seminal vesicle) ต่อมลูกหมาก (Prostate) แอมพูลลา (Ampulla) รวมไปถึงอวัยวะไทมัส และท่อนำน้ำเชื้อ (Vas deferens) ด้วย ในมนุษย์พบว่าโปรตีน CRISP3 นี้จะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์เยื่อบุ (Epithelium) ของอวัยวะไทมัสและพบว่ามีความ

เข้มข้นสูงสุดในอภิตไตมีสส่วนหาง (Cauda epididymis) (Udby et al., 2005a) ส่วนในน้ำพบว่าระดับของยีน CRISP3 นี้ความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการผสมติดในพอม้า และพบว่าโปรตีนนี้เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำเลี้ยงเชื้อของพอม้า (Hamann et al., 2007) นอกจากนี้โปรตีน CRISP3 ยังพบว่ามีผลเกี่ยวเนื่องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและสามารถตรวจพบโปรตีนนี้ในส่วนของแกรนูลของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophils) (Udby et al., 2002; Gibbs et al., 2008) ส่วน CRISP4 พบในส่วนของอภิตไตมีสเช่นกันพบว่ามีผลสัมพันธ์ต่อการเจริญพันธุ์โดยเฉพาะในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการ Spermatogenesis รวมทั้งพบว่ามีผลสัมพันธ์ร่วมกับการสร้างฮอร์โมนเพศผู้ (Androgens) และยังพบว่าในหนูเม้าส์หากขาด CRISP4 จะเกิดความล้มเหลวของการเกิดการจับกันของตัวอสุจิกับเปลือกไข่ (Zona pellucida) ในระหว่างกระบวนการปฏิสนธิ เป็นผลทำให้เกิดความล้มเหลวในการปฏิสนธิ (Turunen et al., 2012)

ในลำดับวงศ์วานและวิวัฒนาการของสมเสร็จแล้วนั้นมีความใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในกลุ่มม้า ตัวอย่างเช่น ระบบทางเดินอาหารที่มีการหมักบริเวณทางเดินอาหารส่วนปลาย (Hindgut fermenters) ทำให้งานวิจัยที่กระทำในสมเสร็จมักใช้องค์ความรู้พื้นฐานและลักษณะของม้าเป็นตัวเปรียบเทียบ (Matthew, 1926; Clauss et al., 2009) สำหรับในองค์ความรู้ด้านระบบสืบพันธุ์ของสมเสร็จที่มีอยู่จำกัด (Pukazhenthil et al., 2011) จึงอาจต้องใช้องค์ความรู้ที่เคยมีการศึกษาในม้าเป็นตัวเปรียบเทียบเช่นเดียวกัน เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัย CRISP3 ในม้า หรือในวงการม้ามักเรียกโปรตีนนี้ว่า Horse Seminal Protein-3 หรือ HSP-3 ซึ่งพบว่ามีผลเข้มข้นสูงในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิเมื่อเปรียบเทียบกับในน้ำลายหรือเซลล์ภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะตรงจากสัตว์ชนิดอื่น ๆ (Schambony et al., 1998) และพบว่าในคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยเฉพาะอัตราการรอดชีวิตภายหลังการละลายน้ำเชื้อ (Post-thawed sperm survival) อัตราการตั้งท้อง และอัตราการผสมติดที่สูงมีความสัมพันธ์ในเชิงบวก กับระดับของโปรตีน CRISP3 นี้อย่างมีนัยสำคัญ (Hamann et al., 2007; Novak et al., 2010; Jobim et al., 2011). Doty et al. (2011) และ Fedorka et al. (2016) ได้อธิบายว่าอัตราการผสมติดที่ดี

ของม้าน้ำซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับโปรตีน CRISP3 ในน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิเนื่องจากโปรตีนนี้ช่วยป้องกันการถูกกลืนกิน (Phagocytosis) จากกลุ่มเม็ดเลือดขาว Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) ในระหว่างที่น้ำเชื้อถูกผสมอยู่ในมดลูกของแม่สัตว์ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะเคยมีรายงานลักษณะที่แสดงออกทางระบบสืบพันธุ์เพศผู้ รวมทั้งการศึกษาในคุณภาพตัวอสุจิ (Pukazhenth et al., 2011) แต่ไม่เคยพบการศึกษาความสัมพันธ์ของสารบ่งชี้ชีวภาพกับการแสดงออกทางระบบสืบพันธุ์ของสมเสร็จจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทั้งนี้เพื่อการพัฒนาต่อยอดต่อไปและสามารถนำไปใช้ในการจัดการอนุรักษ์สัตว์ป่าได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับตัวบ่งชี้ชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์ในน้ำเชื้อกับคุณภาพตัวอสุจิและการผสมติดของสมเสร็จจมาลายูเพศผู้
2. เพื่อศึกษาองค์ความรู้ด้านระบบสืบพันธุ์ในสมเสร็จจมาลายู โดยเฉพาะความสำคัญขององค์ประกอบน้ำเชื้อหรือน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิต่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้
3. พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดโปรตีนและตัวบ่งชี้ชีวภาพในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิในสมเสร็จจมาลายู

วิธีทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองดำเนินการคัดเลือก สมเสร็จจมาลายู (*Tapirus indicus*) เพศผู้จากสวนสัตว์ภายใต้องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จำนวน 3 สวนสัตว์ ประกอบด้วย

- 1.) สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี
- 2.) สวนสัตว์สงขลา จังหวัดสงขลา
- 3.) สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

สมเสร็จจมนายที่จะใช้ในงานวิจัยต้องเจริญพันธุ์เต็มที่ อายุตั้งแต่ 3 – 20 ปี (น้ำหนัก 250 – 350 กิโลกรัม) สัตว์ทุกตัวจะถูกเลี้ยงภายใต้การดูแลตามมาตรฐานทางสุขภาพ ได้แก่ อาหาร การจัดการ สุวีตติภาพสัตว์ และโปรแกรมจัดการด้านสุขภาพในการควบคุมของสัตว์แพทย์ ในตลอดการดำเนินการทดลองวิจัย สมเสร็จจะต้องมีสภาพ สภาวะสุขภาพที่ดี ไม่เจ็บป่วย และการดำเนินการวิจัยจะต้องดำเนินการตามมาตรฐานที่ไม่เสี่ยงต่อการสร้างความบาดเจ็บ ความเครียดอย่างรุนแรง รวมทั้งไม่เสี่ยงจนถึงเสียชีวิตทั้งต่อตัวสัตว์ทดลองเอง และผู้ปฏิบัติงานด้วย และได้ผ่านการขออนุญาตการใช้สัตว์ทดลองผ่านมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตามเลขที่อนุญาต 2561-05-084 และผ่านการขออนุญาตข้อตกลงการใช้ตัวอย่างชีวภาพ จากองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตามเลขที่ ศธ.0521.1.27/123 ลงวันที่ 31 พฤษภาคม 2561 สำหรับข้อมูลการเลี้ยง อาหาร และประวัติของสมเสร็จแต่ละตัวถูกเก็บและเข้าคำนวณด้วยสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์

2. การวางยาสลบ (Anesthesia)

ก่อนการวางยาสลบสัตว์ทุกตัวถูกงดอาหารก่อนเป็นระยะเวลาจำนวน 24 ชั่วโมง และงดน้ำจำนวน 12 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการวางยาสลบตามวิธีการที่ Pukazhenth et al. (2011) และ Tipkantha et al. (2011) เคยรายงานไว้ โดยทำการเตรียมยารวมกันในลูกดอกยาสลบ (DanInject®, Denmark) ซึ่งประกอบด้วยยาผสมกันของ Medetomidine HCl (0.012 – 0.018 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) Butorphanoltartrate (0.012 – 0.018 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ Ketamine HCl (5 – 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) จากนั้นจึงทำการยิงหรือเป่าลูกดอกไปที่ตัวสัตว์ด้วยยางหรือปืนยิงยาสลบ และเฝ้าสังเกตอาการของสัตว์ตลอดช่วงจนกระทั่งล้มลง เมื่อสัตว์ล้มนอนลง ทำการสอดท่อช่วยหายใจ (Endothecal tube) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 16 ถึง 20

มิลลิเมตร (Bush, 1996) เพื่อช่วยหายใจในขณะที่สัตว์อยู่ในสภาวะสลบที่พร้อมจะได้รับการปฏิบัติงานต่อไป ในตลอดระหว่างที่สัตว์อยู่ในสภาวะสลบ สัตว์จะต้องได้รับการประเมินสภาพร่างกาย และสัญญาณชีพ อย่างรัดกุมจากวิสัญญีสัตวแพทย์และผู้ปฏิบัติงาน อันประกอบด้วย อัตราการเต้นของหัวใจ อัตราการหายใจ อุณหภูมิร่างกาย ค่าระดับออกซิเจนในกระแสเลือด ระดับของความลึกในสภาวะสลบ สัญญาณบ่งบอกการมีชีวิตรื้อฟื้นอื่น ๆ และในระหว่างการปฏิบัติงาน สัตว์ถูกรักษาสภาวะการสลบให้อยู่ในระดับที่สามารถปฏิบัติการได้อย่างราบรื่นด้วยการให้ยา Guaifenesine (GG; Vedco Inc., Saint Joseph, USA) หลังจากการสิ้นสุดการปฏิบัติงานบนตัวสัตว์ สัตว์ถูกให้ยาเพื่อช่วยการฟื้นตัวจากสภาวะสลบ ด้วยการฉีดยา Atipamezole (0.07 – 0.09 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ Naltrexone (0.36 – 0.47 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) เข้าทางกล้ามเนื้อ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การวางยาสลบสมเสร็จจมาอยู่
เพศผู้ภายในกรงเลี้ยง
(ที่มาภาพ: สวนสัตว์นครราชสีมา)

3. การรีดน้ำเชื้อสมเสร็จ (Semen collection)

การรีดน้ำเชื้อสมเสร็จใช้หลักการรีดด้วยการกระตุ้นไฟฟ้าผ่านทางทวารหนักที่เรียกว่า Electro-ejaculation technique หรือ EEJ โดยมีวิธีการพอสังเขปดังต่อไปนี้ การรีดน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นไฟฟ้า

ผ่านทางทวารหนัก ดำเนินการในสัตว์ภายใต้ที่อยู่ในสภาวะสลบ (Anesthesia) วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อใช้ปรับปรุงตามเทคนิคที่เคยรายงานไว้จาก Pukazhenthil et al. (2011) และ Tipkantha et al. (2011) โดยสมเสร็จถูกเตรียมตัวด้วยการล้างอูจระให้สะอาดผ่านรูเปิดทวารหนัก และล้างลึงค์ (Penis) ด้วยน้ำเกลือ Normal saline ชนิดปราศจากเชื้อ (Sterile) ก่อนจนสะอาดแล้วทำการซับให้แห้งด้วยผ้าก๊อช (Gauze) สะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นจึงทำการสอดหัวรีดไฟฟ้า (Probe) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.2 เซนติเมตรที่มีแถบจ่ายไฟฟ้า 3 แถบ ที่ผ่านการหล่อลื่นด้วยสารหล่อลื่นสะอาดเข้าผ่านทางทวารหนัก แล้วทำการกระตุ้นด้วยการส่งกระแสไฟฟ้าเป็นลำดับชุด จำนวน 3 ชุด ดังนี้ ชุดที่ 1 ขนาดแรงดันไฟฟ้า 2, 3 และ 4 โวลต์ (กระตุ้นแรงดันไฟฟ้าละ 2 – 10 ครั้ง) ชุดที่ 2 ขนาดแรงดันไฟฟ้า 3, 4 และ 5 โวลต์ (กระตุ้นแรงดันไฟฟ้าละ 10 – 20 ครั้ง) และชุดที่ 3 ขนาดแรงดันไฟฟ้า 4, 5 และ 6 โวลต์ (กระตุ้นแรงดันไฟฟ้าละ 10 – 20 ครั้ง) ตามลำดับ ในระหว่างตลอดการปล่อยแรงดันไฟฟ้าเพื่อกระตุ้นการหลั่งของน้ำเชื้อ จะใช้ถ้วยเก็บน้ำเชื้อ ชนิดโพลีพรอไพลีน (Polypropylene) ที่สะอาดปราศจากเชื้อ (Sterile) ขนาด 8 ออนซ์ เพื่อรองเก็บน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาจากลึงค์ของสัตว์อย่างระมัดระวัง เมื่อได้น้ำเชื้อในแต่ละระหว่างชุด (Fraction) การกระตุ้นไฟฟ้า ให้ทำการเก็บน้ำเชื้อทั้งหมดลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตรเก็บที่ Sterile แล้วเก็บใส่ในกล่องควบคุมอุณหภูมิและป้องกันการสัมผัสกับแสงแดด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การกระตุ้นไฟฟ้าเพื่อรีดเก็บน้ำเชื้อในสมเสร็จมลายูเพศผู้
(ที่มาภาพ: สวนสัตว์นครราชสีมา)

4. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (Semen evaluations)

ตัวอย่างน้ำเชื้อที่รีดได้จากการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทางทวารหนักถูกตรวจประเมินเบื้องต้นทันที ทั้งลักษณะทางกายภาพ (สี ปริมาตร สิ่งปลอมปน เป็นต้น) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยกระดาษวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH paper) ส่งตรวจการเคลื่อนไหวของตัวอสุจिरายตัว (Sperm motility) สภาพการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (Forward progressive status) โดยประเมินในช่วงค่า 0 ถึง 5 ซึ่งค่าเท่ากับ 5 หมายถึง การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีที่สุด (Howard, 1993) ผ่านการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Sperm concentration) ใช้การวัดด้วย Hemocytometer แล้วจึงคำนวณกลับเป็นจำนวนตัวอสุจิที่มีทั้งหมด (Total sperm per ejaculate) ตัวอย่างน้ำเชื้อบางส่วนถูกนำไปไลบรอนแผ่นสไลด์ และถูกย้อมสี Eosin-nigrosin staining เพื่อตรวจอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ (Sperm viability test) โดยทำการนับอสุจิจำนวน 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า อสุจิที่มีชีวิตย้อมไม่ติดสีอีโอซิน (อสุจิมีสีขาว) ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีอีโอซิน (ตัวอสุจิมีสีแดง)

นอกจากนี้ตัวอย่างน้ำเชื้อ 30 และ 50 ไมโครลิตร ถูกดองลงใน 0.3% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde (USB Corporation, Cleveland, Ohio) เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจรูปร่างของตัวอสุจิ (Sperm morphology assessment) และการตรวจความผิดปกติของเยื่อหุ้มอะโครโซมของตัวอสุจิ (Acrosomal membrane assessment) ตามลำดับ

สำหรับรูปร่างของตัวอสุจิ จัดจำแนกตาม Pukazhenth et al. (2011) ซึ่งสามารถจัดจำแนกออกเป็นรูปร่างปกติ และไม่ปกติซึ่งแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆดังนี้

(1) ความผิดปกติส่วนหัวอสุจิ (Head abnormalities) เช่น หัวโตผิดปกติ (Macrocephalic) หัวเล็กผิดปกติ (Microcephalic) ตัวอสุจิที่มีสองหัว (Bicephalic) สามหัว (Tricephalic) เป็นต้น

(2) ความผิดปกติของส่วนกลางของอสุจิ (Midpiece abnormalities) เช่น ไม่มีส่วนกลางตัวอสุจิ (Missing midpiece) ส่วนกลางงอ (Bent midpiece) ทั้งชนิดที่มี และไม่มีหยดน้ำติด (Cytoplasmic droplet) เป็นต้น

(3) ความผิดปกติของส่วนหางตัวอสุจิ (Tail abnormalities) เช่น ตัวอสุจิที่มีสองหาง (Biflagellate) ตัวอสุจิที่มีหางขดเป็นวง (Tightly coiled tail) หางงอ (Bent tail) ทั้งชนิดที่มี และไม่มีหยดน้ำติด (Cytoplasmic droplet) เป็นต้น

(4) ความผิดปกติของส่วนเยื่อหุ้มอะโครโซม (Acrosomal abnormalities) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น มีความเสียหายของส่วนเยื่อหุ้มอะโครโซม

(5) ความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิอื่นๆ (Miscellaneous abnormalities) เช่น สเปิร์มาทิด (Spermatid) หรือตัวอสุจิที่ส่วนคอหักงอ (Bent neck)

สำหรับการตรวจสอบสภาพของเยื่อหุ้มอะโครโซมของตัวอสุจิ ทำได้โดยการนำน้ำเชื้อที่ถูกต้องอยู่ใน 4% paraformaldehyde ในสภาวะอุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาทำการย้อมสี Coomassie blue ตามขั้นตอนของ Panyaboriban et al. (2016) ขั้นตอนพอสังเขปเป็นดังต่อไปนี้ นำน้ำเชื้อที่ตอกลงใน 4% paraformaldehyde ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 2000 x g เป็นเวลา 8 นาที แล้วจึงทำการดึงทิ้งส่วนใส จากนั้นทำการเติม 0.1 M ammonium acetate (pH 9.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อทำการละลายส่วนตะกอนน้ำเชื้อ จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ระดับเดิมอีกครั้ง ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง ส่วนสุดท้ายให้เหลือปริมาตรส่วนใสรวมกับตะกอนน้ำเชื้อในปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนรวมกับส่วนใส จากนั้นจึงนำส่วนทั้งหมดมาไถกับสไลด์ แล้วจึงปล่อยให้แห้ง แล้วนำสีย้อม 0.2% Coomassie Brilliant Blue-R250 (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey) ที่ผสมในสารละลาย 50% methanol และ 10% glacial acetic acid มาราดบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลาอย่างน้อย

90 วินาที แล้วจึงนำไปล้างสีย้อมทิ้งด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) จึงปล่อยให้แห้ง สไลด์ถูกนำไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย X1000 โดยทำการตรวจนับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว การแบ่งสภาพของตัวอสุจิสามารถแบ่งได้ดังนี้

- (1) อะโครโซมสภาพสมบูรณ์ (Intact acrosome) คือ ตัวอสุจิที่ติดสีฟ้าน้ำเงินเต็ม และเรียบในส่วน acrosomal region ที่หัวของตัวอสุจิ
- (2) อะโครโซมสภาพเสียหายบางส่วน (Damaged acrosome) คือ ตัวอสุจิที่ติดสีฟ้าน้ำเงินบางส่วน สลับกับส่วนซีดที่ไม่ติดสี ในส่วน acrosomal region ที่หัวของตัวอสุจิ
- (3) อะโครโซมสภาพเสียหาย (Non-intact acrosome) คือ ตัวอสุจิที่ไม่ติดสีฟ้าน้ำเงินในส่วน acrosomal region ที่หัวของตัวอสุจิเลย

เมื่อทำการตรวจนับครบ 200 ตัวหรือมากกว่านั้น ถูกนำมาคำนวณกลับเป็นอัตราสภาพของเยื่อหุ้มอะโครโซมในแต่ละประเภท

5. การตรวจอวัยวะและถุงหุ้มอัณฑะ (Testicular and scrotal assessments)

ขนาดของอัณฑะถูกวัดด้วยเครื่อง Scientific calipers แล้วจึงทำการคำนวณหาปริมาตรของอัณฑะ (Testicular volume) และจำนวนประมาณการผลิตตัวอสุจิต่อวัน (Daily sperm output) ด้วยการเข้าสู่สูตรคำนวณ ตามวิธีการของ Love (1992) และ Pukazhenth et al. (2011) ดังต่อไปนี้

$$\text{Testicular volume} = 0.5233 \times \text{length} \times \text{width} \times \text{height}$$

$$\text{Daily sperm output} = ((0.024 \times \text{testicular volume}) - 1.26) \times 10^9 / \text{day}$$

สำหรับขนาดเส้นรอบวงของถุงหุ้มอัณฑะ (Scrotal circumference) ถูกวัดด้วยสายวัดวิทยาศาสตร์ (Scientific measuring tape) ส่วนลักษณะเนื้อของอัณฑะแต่ละข้างถูกวัดด้วยเครื่อง อัลตราซาวด์ แบบเรียลไทม์ บีโหมด (Real time B-mode ultrasonography (HS-2200, Honda Electronics Co., Ltd., Japan)) ที่ระดับคลื่นความถี่เสียง 5 MHz

6. การเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิ และตัวอสุจิสำหรับการตรวจโปรตีน

ตัวอย่างน้ำเชื้อที่รีดได้จากสมเสร็จในแต่ละตัวถูกแยกปริมาตรไม่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของทุก Fraction ถูกเก็บแยกรวมกันในคุณภาพของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นน้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิรวมทั้งหมด (Total sperm number) ไม่ต่ำกว่า 3 ล้านตัวจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 800 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการแยกออกมาเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนบนใส (Supernatant) ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Seminal plasma) และส่วนตะกอนด้านล่างซึ่งเป็นตะกอนของตัวอสุจิ (Sperm pellet) ซึ่งสำหรับ Sperm pellet ถูกเติมด้วย Phosphate-buffered saline buffer (PBS) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 500 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วจึงดูดส่วนใสทิ้งเพื่อการล้างเป็นจำนวน 3 ครั้งซ้ำกัน (Magdaleno et al., 1997) แล้วจึงทำการนำ Seminal plasma และ Sperm pellet ที่ผ่านการล้างแล้วเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตรวจหาโปรตีน

7. การเตรียมตัวอย่าง และการตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี Immunoblotting

เซลล์สุจิที่อยู่ภายใน Sperm pellet ที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทำการแตกเซลล์ด้วยน้ำยา RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% NP-40, 150 mM Tris-HCl, pH 8.0) ที่ผสมด้วย Protein inhibitor (complete-Mini, Boehringer) สำหรับการวัดเพื่อปรับระดับความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดของทุกอย่างทั้ง Sperm pellet ที่แตกเซลล์แล้ว และ Seminal plasma ถูกวัดและปรับความเข้มข้นภายหลังการวัดด้วยเครื่อง NanoDrop 2000c spectrophotometer ที่ระดับ 595 nm จากนั้นจึงทำการต้มตัวอย่างใน Laemmli buffer ที่ผสมด้วย β -Mercaptoethanol ที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่มีการปรับปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ที่ระดับ 30 μ g โหลดลงแผ่นเจลที่มี 10 % acrylamide ในแต่ละช่องแล้วแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis) แล้วจึงย้ายโปรตีนบนแผ่นเจล (Transfer) ไปบนแผ่น PVDF membranes (immobilon-P, Millipore) แล้วจึงทำการ Blocking ด้วย สารละลาย TBS ที่ผสมด้วย 5% (w/v) nonfat dry milk และ 0.1% Tween20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สำหรับแผ่น Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวัสดุสำหรับการทำ Immunoblotting ใช้ตามระบบของ Bio-Rad systems

ภายหลังการ Protein blocking แล้วแผ่น PVDF membrane ถูกย้อมสีดู Total protein ด้วย สีย้อม Pierce Reversible Protein Stain Kit สำหรับ PVDF membrane (Thermo Fisher Scientific) แล้วจึงทำวัดระดับความเข้มของสีย้อมแล้วจึงการลบสีย้อมออก โดยขั้นตอนการย้อมและลบสีย้อมเป็นไปตามคำแนะนำของบริษัท (Ploypetch et al., 2019) จากนั้นแผ่น PVDF membrane เดิมจึงถูกนำมาบ่มร่วมกับน้ำยาที่มี Primary antibodies against CRISP2 หรือ CRISP3 (rabbit polyclonal antibody 1:500, Abcam) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการเขย่าเบา ๆ และทิ้งข้ามคืน หลังจากนั้นจึงทำ

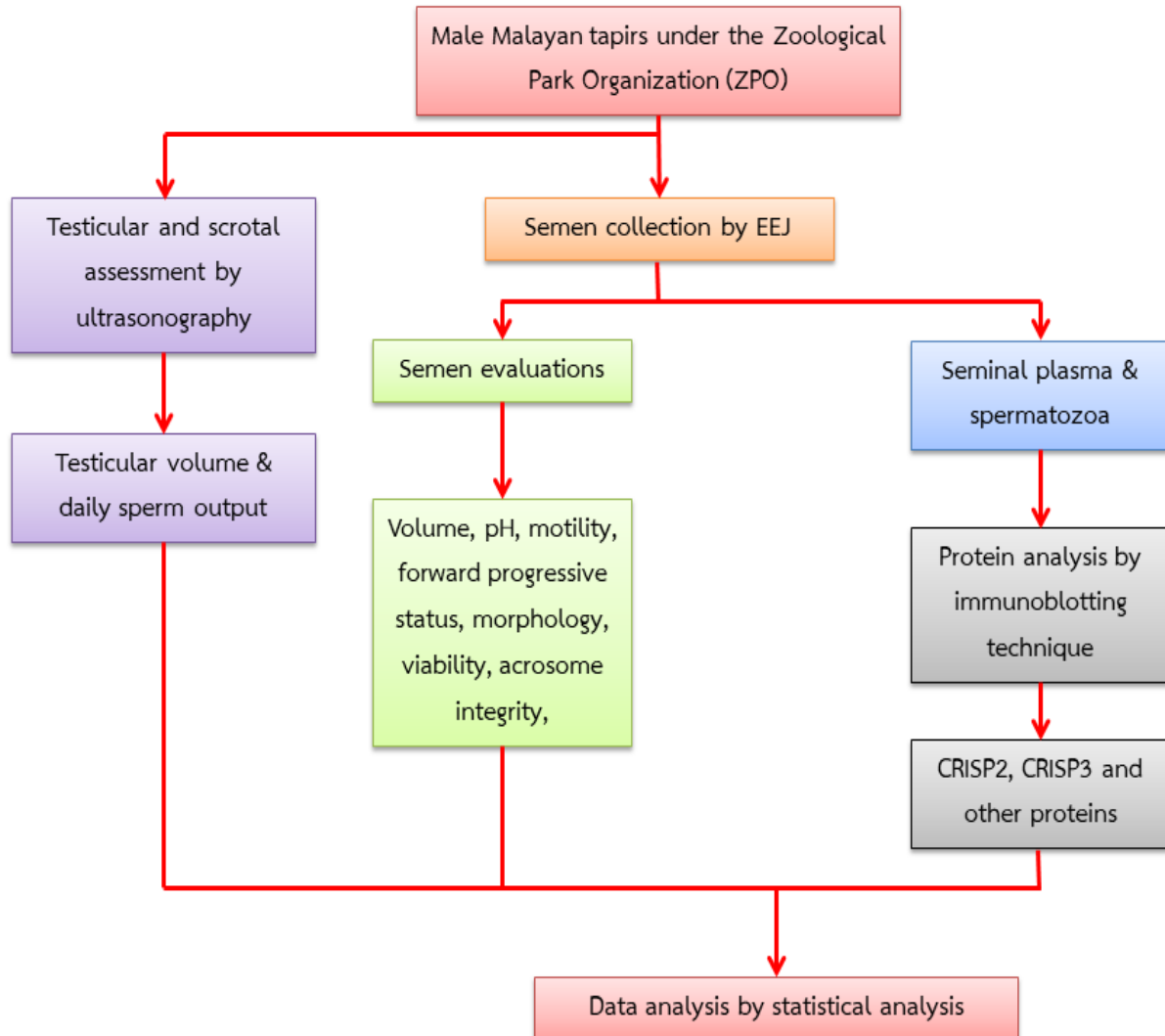
การล้างแล้วบ่มร่วมกับ Secondary antibody: alkaline phosphatase-conjugated goat anti rabbit (Calbiochem) ที่เจือจาง 1:4000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงทำการวัดระดับ Protein เป้าหมาย (CRISP2 หรือ CRISP3) ด้วยการกระตุ้นให้เรืองแสงด้วยสาร Chemiluminescence (ECL; Thermo Scientific) ในที่มืด แล้วจึงวัดและถ่ายรูปด้วยเครื่อง ChemiDoc™ XRS+ System สำหรับโปรตีนที่ใช้เป็นโปรตีนควบคุมบวก (Positive control) ถูกใช้เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิในน้ำที่มีประวัติการผสมติดดี

8. สถิติที่ใช้วิเคราะห์

สถิติทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R เวอร์ชัน 3.6.1

แผนการดำเนินงาน

ระยะเวลาการดำเนินการทดลองทั้งสิ้น 2 ปี โดยมีแผนการดำเนินงานดังแผนภูมิต่อไปนี้



ผลการทดลอง

1. การเลือกสมเสร็จเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

จากการเลือกสมเสร็จจมาลยูเพศผู้ที่อยู่ภายใต้การดูแลขององค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ อยู่ในวัยเจริญพันธุ์เต็มที่ อายุตั้งแต่ 3 – 20 ปี มีช่วงน้ำหนัก 250 – 350 กิโลกรัม และสุขภาพทั่วไปดี พบว่ามีจำนวน 9 ตัว ประกอบด้วย

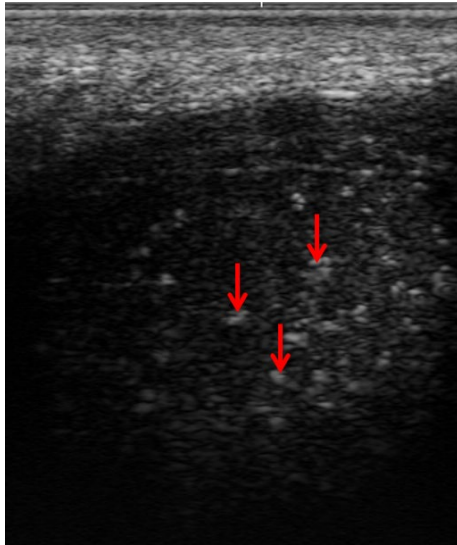
- 1) สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี (latitude 13.2150 Longitude 101.0565) จำนวน 5 ตัว (MT001, MT002, MT003, MT004 และ MT005)
- 2) สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา (latitude 14.8503 Longitude 102.0746) จำนวน 2 ตัว (MT006 และ MT007)
- 3) สวนสัตว์สงขลา จังหวัดสงขลา (latitude 7.1430 Longitude 100.6042) จำนวน 2 ตัว (MT008 และ MT009)

สำหรับประวัติของการผสมพันธุ์ พบว่าสมเสร็จจำนวน 7 ตัวจาก 9 ตัวเคยมีประวัติการให้กำเนิดลูก ยกเว้น 2 ตัว คือ MT002 และ MT009 ยังไม่เคยให้ลูกเนื่องจากเพิ่งเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และยังไม่เคยนำเข้าคู่กับสมเสร็จเพศเมีย

2. ลักษณะของอัณฑะ

จากผลการตรวจอัณฑะและต่อมสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Accessory sexual glands) พบว่ามีสมเสร็จเกือบทุกตัว (8 จาก 9 ตัว) พบว่ามีลักษณะตะกอนจุดกระจายภายในเนื้ออัณฑะ (Testicular calcification) ดังภาพที่ 3 และมีหนึ่งตัว (MT005) ที่พบลักษณะของพังผืด (Fibrosis) ภายในเนื้ออัณฑะ

ส่วน Accessory sexual glands ประกอบด้วย Bulbourethral gland Seminal vesicle gland Prostate gland และ Ampulla มีความปกติทั้งสิ้นทุกตัว



ภาพที่ 3 ภาพอัลตราซาวด์ของอัณฑะ
สมเสร็จเพศผู้ ลูกศรชี้ลักษณะของ
Testicular calcification ที่พบภายใน
เนื้ออัณฑะ



ภาพที่ 4 ภาพอัลตราซาวด์ของ Accessory sexual gland ของสมเสร็จมลายูเพศผู้ ได้แก่
ต่อม Bulbourethral gland (A) และต่อม Seminal vesicle (B)

3. การรีดน้ำเชื้อสมเสร็จและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

จากผลการรีดน้ำเชื้อ พบว่าสมเสร็จทุกตัว (9 ตัว) สามารถรีดน้ำเชื้อได้ทั้งหมดจากวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทางทวารหนัก ในปริมาณน้ำเชื้อรวมเฉลี่ย 27.11 ± 21.28 มิลลิลิตร (Mean $\pm$ SEM) ปริมาตร แต่เมื่อตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์พบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 พบว่าน้ำเชื้อ MT006 และ MT007 ไม่พบตัวอสุจิ (Azoospermia) รวมทั้ง MT007 ลักษณะสีของน้ำเชื้อมีลักษณะเหลืองข้นเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะปนของตะกอนสีเหลืองข้นจำนวนมากภายในน้ำเชื้อ

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำเชื้อของสมเสร็จเพศผู้รายตัวเบื้องต้น และจำนวนตัวอสุจิที่รีดได้

No	Semen color/ Opacity	pH	Volume (ml)	Sperm concentration ($\times 10^6$ spermatozoa /ml)	Total sperm number ($\times 10^6$ spermatozoa)
MT001	Opalescent	7.5	7.5	120	900
MT002	Opalescent	8	15.5	72.5	1,125
MT003	Milky	8	0.5	315	157.5
MT004	Milky	8.5	25	178	4,450
MT005	Milky	7	24	450	10,800
MT006	Milky	8	39.5	0	0
MT007	Yellow sticky	8	38.5	0	0
MT008	Milky	8.5	72.5	58.8	4,263
MT009	Milky	7.5	21	230	4,830

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์เคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิ (% Motility) จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่เคลื่อนไหวได้ (Total motile sperm number) และอัตราการมีชีวิต (Viability) ของสมเสร็จรายตัว

No	% Motility	Total motile sperm number ($\times 10^6$ spermatozoa)	% Viability
MT001	40 %	360	38.5 %
MT002	60 %	675	64.0 %
MT003	5 %	8	21.0 %
MT004	10 %	445	54.3 %
MT005	5 %	540	29.0 %
MT008	40 %	1,705	44.2 %
MT009	50 %	2,415	46.0 %

ตารางที่ 3 ลักษณะของอะโครโซมของตัวอสุจิในสมเสร็จรายตัว

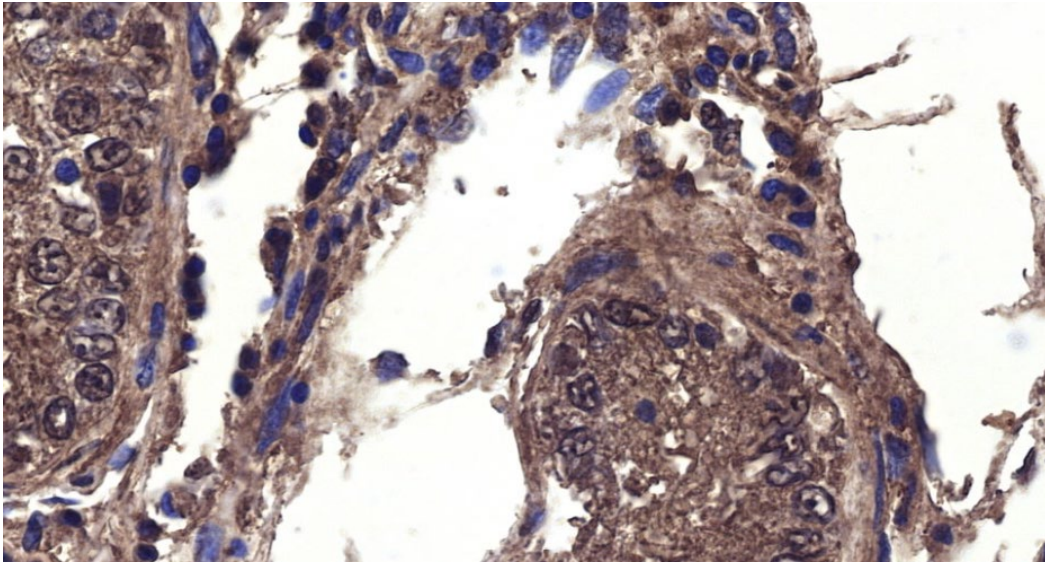
No	% Intact acrosome	% Damage acrosome	% Non-intact acrosome
MT001	24 %	48 %	28 %
MT002	21 %	49 %	30 %
MT003	11 %	45 %	44 %
MT004	43 %	28 %	29 %
MT005	29 %	36 %	35 %
MT008	55 %	25 %	20 %
MT009	55 %	31 %	14 %

4. การตรวจทางลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาค

เนื่องจากการเสียชีวิตของสมเสร็จเพศผู้หนึ่งตัวจากสาเหตุปัญหาทางเดินอาหารภายในสวนสัตว์ สงขลา ก่อนการเริ่มการศึกษาวิจัย (ไม่รวมอยู่ใน 9 ตัวที่เลือกมาทดสอบ) คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเพิ่มเติม จากการเก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ตั้งแต่อัณฑะและต่อมสร้างน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิภายหลังการผ่าซาก และทำการตรวจทางจุลกายวิภาค พร้อมทำ Immunohistochemical ต่อการกระจายตัวของ CRISP2 และ CRISP3 ภายในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มเติมนอกเหนือจากในโครงการวิจัย โดยแสดงดังภาพที่ 5 และ 6



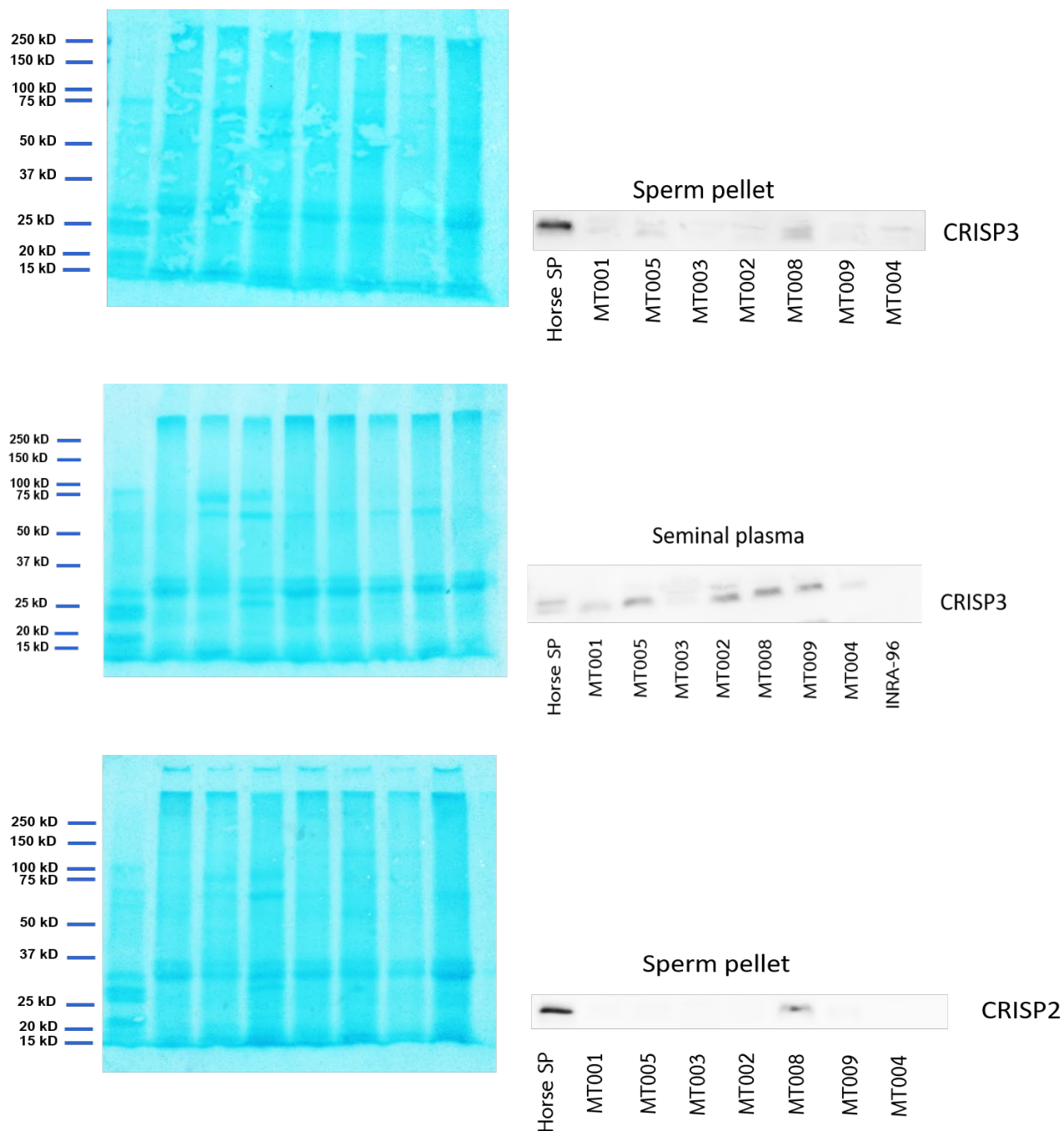
ภาพที่ 5 ลักษณะกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ และต่อมสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิของสมเสร็จ (P = Prostate, V = Seminal vesicle, B = Bulbourethral glands)



ภาพที่ 6 Immunohistochemical (IHC) ของ CRISP2 ภายในเนื้อเยื่ออัณฑะของสมเสร็จเพศผู้

5. ผลการตรวจ Immunoblotting ของ CRISP2 และ CRISP3

ผลการตรวจ ตัวอย่าง Seminal plasma และ Sperm pellet ของสมเสร็จจำนวน 7 ตัว ประกอบด้วย MT001, MT002, MT003, MT004, MT005, MT008 และ MT009 โดยใช้ Positive control เป็น Seminal plasma ของม้า (Horse SP) สำหรับ MT006 และ MT007 ไม่ได้ตรวจโปรตีน เนื่องจากไม่พบตัวอสุจิในน้ำเชื้อที่รีดได้เลย ผลพบว่ามีระดับการตรวจพบ CRISP3 ใน Seminal plasma และ Sperm pellet ที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับกับ CRISP2 ที่ตรวจพบใน Sperm pellet แต่ตรวจไม่พบ CRISP2 ใน Seminal plasma เลย ดังแสดงในภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 7 ผล Immunoblotting ต่อ CRISP3 และ CRISP2 ในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวสุมจิ (Seminal plasma) และ ตะกอนตัวสุมจิ (Sperm pellet) ของสมเสร็จมลายูเพศผู้ (Malayan tapir)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดลองพบว่าสมเสร็จทั้ง 9 ตัวจากสวนสัตว์ทั้งหมด 3 สวน อันได้แก่ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์นครราชสีมา และสวนสัตว์สงขลา ซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยพื้นที่ในเขตภาคตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ตามลำดับ ทำให้ลักษณะรูปแบบการแสดงออกของน้ำเชื้อ และตัวอสุจิที่แตกต่าง กันอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้พบว่าสมเสร็จที่อยู่ในสวนสัตว์สงขลาให้ลักษณะคุณภาพของตัวอสุจิที่ดีทั้ง 2 ตัว คือ MT008 และ MT009 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพของภูมิอากาศที่ตั้งของสวนสัตว์สงขลาอยู่ในสภาวะอากาศร้อน ขึ้นสูงเมื่อเทียบกับภูมิอากาศในอีกสองสวนสัตว์ ซึ่งมีสภาพใกล้เคียงกับถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติของสมเสร็จมลายูที่ อยู่ป่าดิบชื้น (Tropical rain forest) (Magintan et al., 2012; Simpson et al., 2013) อย่างไรก็ตามจากประวัติ การให้กำเนิดลูกสมเสร็จใหม่ภายในสวนสัตว์ในช่วงเวลา 5 ปีย้อนหลังที่ผ่านมาในระหว่างปี ค.ศ.2015 – 2020 พบว่ายังคงมีพบในสวนสัตว์สงขลา และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จึงทำให้คาดได้ว่านอกจากสภาพภูมิอากาศแล้ว อาจ มีปัจจัยอื่น ๆ ที่เป็นต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ได้ อาทิเช่น อาหาร การจัดการการเลี้ยง การจัดการสุขภาพ ความเครียด การจัดการกรงเลี้ยง และสุขภาพรายตัว (Giuliano et al., 1996; Tubbs and McDonough, 2018)

เมื่อเทียบคุณภาพของคุณภาพน้ำเชื้อในเรื่องของการตรวจความแข็งแรงของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (Acrosome integrity) พบว่าสมเสร็จ MT008 และ MT009 ให้คุณภาพของความแข็งแรงของเยื่อหุ้มตัวอสุจิในเกณฑ์ดี (% Intact acrosome มากกว่า 50%) เมื่อเทียบกับสมเสร็จอีก 5 ตัวที่เหลือ ซึ่งสอดคล้องเป็นตามการตรวจพบโปรตีน CRISP2 ที่ตรวจพบสูงสุดในสมเสร็จ MT008 และพบใน MT009 ตามลำดับ และพบน้อยในสมเสร็จ MT001 – MT005 และไม่พบการปรากฏของ CRISP2 ในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ (Seminal plasma) เลย เป็นการยืนยันได้ว่า CRISP2 ในสมเสร็จนั้นพบสะสมได้ในส่วนของอะโครโซมของตัวอสุจิ เช่นเดียวกันกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ รวมทั้งมนุษย์

ด้วย (Jamsai et al., 2008a; Jamsai et al., 2008b; Arangasamy et al., 2011; Muñoz et al., 2012) พบว่า CRISP2 นั้นพบว่ามีส่วนสัมพันธ์กับส่วน Equatorial segment ซึ่งเป็นที่อยู่ของอะโครโซมโดยเฉพาะในช่วงของการเชื่อมของตัวอสุจิกับไข่ (Sperm-egg fusion) ในระหว่างกลไกการปฏิสนธิ (Fertilization) ทั้งนี้กลไกการไปเชื่อมโยงและพบในส่วนของ Equatorial segment ยังไม่เป็นที่ชัดเจนในปัจจุบัน แต่เชื่อได้ว่า CRISP2 นี้มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการสนับสนุนการเชื่อมกันของตัวอสุจิและไข่ในระหว่างการปฏิสนธิ ซึ่งหากขาด CRISP2 เชื่อได้ว่ามีส่วนสัมพันธ์อย่างยิ่งต่อความล้มเหลวหรืออัตราการปฏิสนธิที่ลดลง (Nimlamool et al., 2013) ส่วนภายหลังปฏิกิริยา Acrosome reaction ในระหว่างการปฏิสนธิซึ่งเกิดขึ้นบนส่วนของ Equatorial segment ต้องอาศัยกลไกการทำงานของโปรตีนหลายตัว เช่น Acrosin, TSSK6, CD46, SPESP1 เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ช่วยให้เกิดการเชื่อมของตัวอสุจิและไข่ แต่โปรตีนอีกกลุ่มรวมทั้ง CRISP2 นี้ที่อยู่ภายใน Acrosomal matrix ก่อนที่จะปล่อยออกมาในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา Acrosome reaction แล้วจึงจับกับ Equatorial segment เพื่อทำหน้าที่ในการรวมตัวของอสุจิกับไข่ พบว่าหากระดับ CRISP2 ลดลงจะทำให้ตัวอสุจิที่สามารถจะเคลื่อนแทรกเข้าไปภายในเซลล์ไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Busso et al., 2005; Busso et al., 2007)

ส่วน CRISP3 พบทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิและตะกอนตัวอสุจิ แต่พบความเข้มข้นที่สูงในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิมากกว่า โดยพบว่าสามารถพบการขึ้นของโปรตีน CRISP3 ที่เกิดขึ้นในขนาดที่ใกล้เคียงกันใน 2 ขนาดในน้ำเลี้ยงเชื้อของตัวอสุจิในสมเสร็จและม้าในช่วงขนาดประมาณ 27 – 29 กิโลดัลตัน (kD) ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกันกับรายงานของ Udby et al., 2005b ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนในลักษณะเป็น Unglycosylated CRISP3 และ Glycosylated CRISP3 สำหรับในอวัยวะสืบพันธุ์สมเสร็จแล้วพบว่า CRISP3 กระจายตัวพบทั้งในส่วนของเนื้อเยื่ออัณฑะ อีพิดิไดมิส ท่อนำอสุจิ แต่พบว่าส่วนที่มีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในส่วนของ Tail of Epididymis เมื่อเทียบกับ Body of Epididymis และ Head of Epididymis อย่างมีนัยสำคัญ โดยดูจากค่า % Strong positive ของการติดสี Immunohistochemical (IHC) staining เฉลี่ยที่ 38.45, 35.60 และ 3.19% ตามลำดับ พบว่าความ

เข้มข้นสูงสุดที่ส่วนของ Tail of Epididymis เมื่อเปรียบเทียบระดับของ CRISP3 ที่พบในน้ำเลี้ยงอสุจิแล้วพบว่ามี ความสัมพันธ์กับคุณภาพของตัวอสุจิ โดยเฉพาะในสมเสร็จกลุ่มที่มีประวัติการผสมติดดี และกลุ่มที่ให้คุณภาพของ ตัวอสุจิสูง โดยเฉพาะจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่เคลื่อนไหวได้ และอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่สูง ซึ่งเป็นส่วน สนับสนุนได้ว่าโปรตีน CRISP3 ที่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิของสมเสร็จนี้ น่าจะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพที่สำคัญ ต่อการพยากรณ์ความสำเร็จในการผสมติดที่ดีในสมเสร็จได้ อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นในการวิจัยเพื่อพิสูจน์ สันนิษฐานนี้เพิ่มเติม และศึกษาเพิ่มเติมเชิงลึกในกลไกการเกิดการสนับสนุนการสืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์ของ CRISP3 นี้ในสมเสร็จต่อไป

นอกจากนี้ในน้ำเชื้อมนุษย์และสุกรพบว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอสุจิ มีโปรตีนบางชนิด เช่น β -Microseminoprotein ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่หลั่งจากต่อมลูกหมาก หรือเรียกว่ากลุ่ม Prostatic secretory protein ซึ่งในน้ำเชื้อสุกรพบว่าโปรตีนนี้มักจะเกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Sperm motility inhibitor) ทำให้ตัวอสุจิ (Jeng et al., 2001) และยังพบว่า β -Microseminoprotein สามารถจับกับโปรตีน CRISP3 ที่อยู่ใน น้ำเลี้ยงเชื้ออย่างจำเพาะเจาะจงเป็นแบบหนึ่งต่อหนึ่ง (Udby et al., 2005b) ซึ่งอาจเป็นผลทำให้พบระดับ CRISP3 ลดลงในน้ำเชื้อของสัตว์ที่ผสมติดต่ำ เนื่องจากถูกอยู่ในสภาพการจับกับ β -Microseminoprotein นี้ได้ ส่งผลให้การช่วยในการสนับสนุนตัวอสุจิในการปฏิสนธิลดลง รวมไปถึงลดการหน้าที่การป้องกันการถูกกลืนกินของ ตัวอสุจิจากเม็ดเลือดขาวที่อยู่ภายในมดลูกของ CRISP3 ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม β -Microseminoprotein นี้ยังไม่ มีการศึกษาใดยืนยันได้ว่าพบในน้ำเชื้อของสมเสร็จ และมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสมเสร็จมาก่อน อาจ ต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2561 (รหัสสัญญา MRG 6180045) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนสนับสนุนงานวิจัยโครงการ “การบูรณาการองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์สมเสร็จในในประเทศไทย” ประจำปีงบประมาณ 2562 ขององค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ (รหัสสัญญา NRMS60470) และขอขอบคุณนักวิจัย นายสัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่ และพนักงานทุกท่านของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์สงขลา และสวนสัตว์นครราชสีมาที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือในการอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างและปฏิบัติการงานวิจัยภายในสวนสัตว์ ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธาน Multi Mentoring System กลุ่มที่ 7 ภาคใต้ (MMS-7) ที่ให้คำแนะนำ การสร้างเครือข่ายวิจัยและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ศยามณ ศรีสุวรรณาสกุล ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและรองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.กรรณาภรณ์ สุริยผล หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำในการวิจัยและช่วยเหลือในกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ

ภาคผนวก

เอกสารอ้างอิง

- Ali, H.E.-S., Kitahara, G., Nibe, K., Yamaguchi, R., Horii, Y., Zaabel, S., Osawa, T., 2013. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology* 80, 940-949.
- Am-In, N., Kirkwood, R., Techakumphu, M., Tantasuparuk, W., 2011. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology* 75, 897-903.
- Arangasamy, A., Kasimanickam, V., DeJarnette, J., Kasimanickam, R., 2011. Association of CRISP2, CCT8, PEBP1 mRNA abundance in sperm and sire conception rate in Holstein bulls. *Theriogenology* 76, 570-577.
- Aslam, M.M., Kumaresan, A., Sharma, V.K., Tajmul, M., Chhillar, S., Chakravarty, A., Manimaran, A., Mohanty, T., Srinivasan, A., Yadav, S., 2014. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology* 82, 1254-1262. e1251.
- Barbosa Jr, F., Tanus-Santos, J.E., Gerlach, R.F., Parsons, P.J., 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environmental health perspectives* 113, 1669.
- Bodmer, R.E., 1990. Fruit patch size and frugivory in the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *Journal of Zoology* 222, 121-128.
- Bowkett, A.E., 2009. Recent Captive-Breeding Proposals and the Return of the Ark Concept to Global Species Conservation. *Conservation Biology* 23, 773-776.
- Brandon, C., Heusner, G., Caudle, A., Fayrer-Hosken, R., 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52, 863-873.

- Bush, M., 1996. A technique for endotracheal intubation of nondomestic bovids and cervids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 378-381.
- Busso, D., Cohen, D.J., Hayashi, M., Kasahara, M., Cuasnicu, P.S.J.M.h.r., 2005. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. 11, 299-305.
- Busso, D., Goldweic, N.M., Hayashi, M., Kasahara, M., Cuasnicú, P.S.J.B.o.r., 2007. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. 76, 701-708.
- Castellanos, P., Mateo, R., Reglero, M.M., Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., 2008. In vitro effects of lead on fatty acid composition, oxidative stress biomarkers and quality of ram spermatozoa. *Toxicological and Environ Chemistry* 90, 1163-1175.
- Clauss, M., Lang-Deuerling, S., Kienzle, E., Medici, E., Hummel, J.J.J.o.a.p., nutrition, a., 2009. Mineral absorption in tapirs (*Tapirus* spp.) as compared to the domestic horse. 93, 768-776.
- Cozzuol, M.A., Clozato, C.L., Holanda, E.C., Rodrigues, F.H., Nienow, S., de Thoisy, B., Redondo, R.A., Santos, F.R., 2013. A new species of tapir from the Amazon. *Journal of Mammalogy* 94, 1331-1345.
- da Silva, A.G., Lalonde, D.R., Quse, V., Shoemaker, A., Russello, M.A., 2010. Genetic approaches refine ex situ lowland tapir (*Tapirus terrestris*) conservation. *Journal of Heredity* 101, 581-590.
- Doty, A., Buhi, W.C., Benson, S., Scoggin, K.E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M., Troedsson, M.H., 2011. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biol Reprod* 85, 157-164.
- Downer, C.C., 1996. The mountain tapir, endangered 'flagship' species of the high Andes. *Oryx* 30, 45-58.
- Downer, C.C., 2001. Observations on the diet and habitat of the mountain tapir (*Tapirus pinchaque*). *Journal of Zoology* 254, 279-291.
- Dyck, M., Foxcroft, G., Novak, S., Ruiz-Sanchez, A., Patterson, J., Dixon, W., 2011. Biological markers of boar fertility. *Reproduction in domestic animals* 46, 55-58.
- Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschar, J., Haendler, B., Habenicht, U.F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W.D., Donner, P., 1995. Mouse androgen-dependent

- epididymal glycoprotein crisp-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Molecular reproduction and development* 42, 157-172.
- Fedorka, C.E., Woodward, E.M., Scoggin, K.E., Esteller-Vico, A., Squires, E.L., Ball, B.A., Troedsson, M.H., 2016. The Effect of Cysteine-Rich Secretory Protein-3 and Lactoferrin on Endometrial Cytokine mRNA Expression After Breeding in the Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*.
- Fragoso, J.M., Huffman, J.M., 2000. Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. *Journal of Tropical Ecology* 16, 369-385.
- Frankham, R., 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17, 325-333.
- Gibbs, G.M., Roelants, K., O'bryan, M.K., 2008. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine reviews* 29, 865-897.
- Giesecke, K., Hamann, H., Sieme, H., Distl, O., 2010. INHBA-Associated Markers as Candidates for Stallion Fertility. *Reproduction in domestic animals* 45, 342-347.
- Giuliano, W.M., Lutz, R.S., Patiño, R.J.T.J.o.w.m., 1996. Reproductive responses of adult female northern bobwhite and scaled quail to nutritional stress. 302-309.
- Goularte, K., Gastal, G., Schiavon, R., Gonçalves, A., Schneider, J., Corcini, C., Lucia, T., 2014. Association between the presence of protein bands in ram seminal plasma and sperm tolerance to freezing. *Animal reproduction science* 146, 165-169.
- Gresle, M.M., Butzkueven, H., Shaw, G., 2011. Neurofilament proteins as body fluid biomarkers of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis international* 2011.
- Hamann, H., Jude, R., Sieme, H., Mertens, U., Töpfer-Petersen, E., Distl, O., Leeb, T., 2007. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal genetics* 38, 259-264.
- Holden, J., Yanuar, A., Martyr, D.J., 2003. The Asian tapir in Kerinci Seblat National Park, Sumatra: evidence collected through photo-trapping. *Oryx* 37, 34-40.
- Howard, J., 1993. Semen collection and analysis in carnivores. *Zoo and Wildlife Medicine* 3, 390-398.

- Howard, J., Byers, A.P., Brown, J.L., Barrett, S.J., Evans, M.Z., Schwartz, R.J., Wildt, D.E.J.Z.B.P.i.a.w.t.A.Z., Association, A., 1996. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). 15, 55-69.
- Howard, J., Santymire, R.M., Marinari, P.E., Kreeger, J.S., Williamson, L., Wildt, D.E., 2006. Use of reproductive technology for black-footed ferret recovery, Symposium on the Status of the Black-footed Ferret and Its Habitat'. (Eds JE Roelle, BJ Miller, JL Godbey and DE Biggins), pp. 28-36.
- Ito, M., Muraki, M., Takahashi, Y., Imai, M., Tsukui, T., Yamakawa, N., Nakagawa, K., Ohgi, S., Horikawa, T., Iwasaki, W., 2008. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertility and sterility* 90, 1026-1035.
- Jalkanen, J., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., 2005. Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (CRISP4): A Member of the Crisp Family Exclusively Expressed in the Epididymis in an Androgen-Dependent Manner 1. *Biology of reproduction* 72, 1268-1274.
- Jamsai, D., Bianco, D.M., Smith, S.J., Merriner, D.J., Ly-Huynh, J.D., Herlihy, A., Niranjana, B., Gibbs, G.M., O'Bryan, M.K., 2008a. Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. *Reproduction* 135, 751-759.
- Jamsai, D., Reilly, A., Smith, S., Gibbs, G., Baker, H., McLachlan, R., de Kretser, D., O'Bryan, M., 2008b. Polymorphisms in the human cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) gene in Australian men. *Human reproduction* 23, 2151-2159.
- Janzen, D.H., 1981. Digestive seed predation by a Costa Rican Baird's tapir. *Biotropica*, 59-63.
- Jeng, H., Chu, H.H., Cheng, W.T., Chang, W.C., Su, S.J.J.M.r., development, 2001. Secretory origin and temporal appearance of the porcine β -microseminoprotein (sperm motility inhibitor) in the boar reproductive system. 58, 63-68.
- Jobim, M., Trein, C., Zirkler, H., Gregory, R., Sieme, H., Mattos, R., 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 76, 765-771.
- Koppers, A.J., Reddy, T., O'bryan, M.K., 2011. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian journal of andrology* 13, 111.

- Kovac, J.R., Pastuszak, A.W., Lamb, D.J., 2013. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertility and sterility* 99, 998-1007.
- Krätzschar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., Schleuning, W.D., 1996. The Human Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family. *European journal of biochemistry* 236, 827-836.
- Kumar, A., Kroetsch, T., Blondin, P., Anzar, M., 2015. Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1 H nuclear magnetic resonance analysis. *Molecular reproduction and development* 82, 123-131.
- Love, C., 1992. Semen collection techniques. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 8, 111-128.
- Magdaleno, L., Gasset, M.a., Varea, J., Schambony, A.M., Urbanke, C., Raida, M., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., 1997. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS letters* 420, 179-185.
- Magintan, D., Traeholt, C., Karuppanannan, K.V.J.J.o.P., 2012. Displacement of the Malayan Tapir (Tapirus indicus) in Peninsular Malaysia from 2006 to 2010. *27*, 713-745.
- Matthew, W.D.J.T.Q.R.o.B., 1926. The evolution of the horse: a record and its interpretation. *1*, 139-185.
- Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Castagnola, M., Marana, R., 2013. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Molecular reproduction and development* 80, 350-357.
- Mizejewski, G.J., 2016. Physiology of alpha-fetoprotein as a biomarker for perinatal distress: relevance to adverse pregnancy outcome. *Experimental biology and medicine*.
- Muñoz, M.W., Ernesto, J.I., Bluguermann, C., Busso, D., Battistone, M.A., Cohen, D.J., Cuasnicú, P.S., 2012. Evaluation of testicular sperm CRISP2 as a potential target for contraception. *Journal of andrology* 33, 1360-1370.
- Nimlamool, W., Bean, B.S., Lowe-Krentz, L.J.J.M.r., development, 2013. Human sperm CRISP2 is released from the acrosome during the acrosome reaction and re-associates at the equatorial segment. *80*, 488-502.

- Novak, S., Smith, T., Paradis, F., Burwash, L., Dyck, M., Foxcroft, G., Dixon, W., 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74, 956-967.
- O'Farrill, G., Galetti, M., Campos A, A., 2013. Frugivory and seed dispersal by tapirs: an insight on their ecological role. *Integrative zoology* 8, 4-17.
- Panyaboriban, S., Singh, R.P., Songsasen, N., Padilla, L., Brown, J., Reed, D., Techakumphu, M., Pukazhenth, B., 2016. Reproductive seasonality and sperm cryopreservation in the male tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). *Theriogenology* 86, 914-923.
- Patrícia, M., 2002. Tapir Conservation, In: Siân S, W., Seitz, S. (Eds.), *Tapir Conservation: The newsletter of the IUCN/SSC Tapir specialist group*, pp. 1-39.
- Piper, P., 2009. Borneo records of Malay tapir, *Tapirus indicus* Desmarest: a zooarchaeological and historical review. *International Journal of Osteoarchaeology* 19, 491-507.
- Ploypetch, S., Roytrakul, S., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Krobthong, S., Suriyaphol, G.J.P.o., 2019. Salivary proteomics of canine oral tumors using MALDI-TOF mass spectrometry and LC-tandem mass spectrometry. 14.
- Pukazhenth, B., Laroe, D., Crosier, A., Bush, L.M., Spindler, R., Pelican, K.M., Bush, M., Howard, J.G., Wildt, D.E.J.T., 2006. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. 66, 1790-1796.
- Pukazhenth, B.S., Togna, G.D., Padilla, L., Smith, D., Sanchez, C., Pelican, K., Sanjur, O.I., 2011. Ejaculate traits and sperm cryopreservation in the endangered Baird's tapir (*Tapirus bairdii*). *Journal of andrology* 32, 260-270.
- Pukazhenth, B.S., Wildt, D.E., 2003. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction, Fertility and Development* 16, 33-46.
- Roberts, K.P., Ensrud, K.M., Wooters, J.L., Nolan, M.A., Johnston, D.S., Hamilton, D.W., 2006. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and cellular endocrinology* 250, 122-127.
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J.J., 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology* 66, 11-22.

- Russello, M., Amato, G., 2004. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular ecology* 13, 2829-2840.
- Salas, L.A., 1996. Habitat use by lowland tapirs (*Tapirus terrestris* L.) in the Tabaro River valley, southern Venezuela. *Canadian Journal of Zoology* 74, 1452-1458.
- Schambony, A., Gentzel, M., Wolfes, H., Raida, M., Neumann, U., Töpfer-Petersen, E., 1998. Equine CRISP-3 : primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1387, 206-216.
- Simpson, B.K., Shukor, M., Magintan, D., 2013. Food selection of the Malayan tapir (*Tapirus indicus*) under semi-wild conditions, AIP Conference Proceedings, American Institute of Physics, pp. 317-324.
- Stancer, M., 2010. International Malayan tapir studbook San Diego zoological society, San Diego, CA, USA.
- Surinova, S., Schiess, R., Hüttenhain, R., Cerciello, F., Wollscheid, B., Aebersold, R., 2010. On the development of plasma protein biomarkers. *Journal of proteome research* 10, 5-16.
- Swanson, W.F., 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66, 49-58.
- Tipkantha, W., Pukazhenth, B., Siriaronrat, B., Thongphakdee, A., Maikaew, U., Thomas, W., Tongthainan, D., Thaeonon, J., Kamolnorranath, S., Bush, M., 2011. Ejaculate characteristics of captive Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 41, 499-508.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., Sieme, H., 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal reproduction science* 89, 159-170.
- Traeholt, C., Novarino, W., Saaban, S., Shwe, N.M., Lynam, A., Zainuddin, Z., Simpson, B., Mohd, S., 2016. *Tapirus indicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016.
- Tubbs, C.W., McDonough, C.E.J.A.r.o.a.b., 2018. Reproductive impacts of endocrine-disrupting chemicals on wildlife species: implications for conservation of endangered species. 6, 287-304.
- Turunen, H.T., Sipilä, P., Krutskikh, A., Toivanen, J., Mankonen, H., Hämäläinen, V., Björkgren, I., Huhtaniemi, I., Poutanen, M.J.B.o.r., 2012. Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. 86, 12, 11-18.

- Udby, L., Bjartell, A., Malm, J., Egesten, A., Lundwall, Å., Cowland, J.B., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2005a. Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract. *Journal of andrology* 26, 333-342.
- Udby, L., Calafat, J., Sørensen, O.E., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2002. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *Journal of leukocyte biology* 72, 462-469.
- Udby, L., Lundwall, Å., Johnsen, A.H., Fernlund, P., Valtonen-André, C., Blom, A.M., Lilja, H., Borregaard, N., Kjeldsen, L., Bjartell, A., 2005b. β -Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 555-561.
- Vadnais, M.L., Foster, D.N., Roberts, K.P., 2008. Molecular cloning and expression of the CRISP family of proteins in the boar. *Biology of reproduction* 79, 1129-1134.
- Wildt, D.E., Comizzoli, P., Pukazhenth, B., Songsasen, N., 2010. Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular reproduction and development* 77, 397-409.
- Wolf, K., Wildt, D.E., Vargas, A., Marinari, P.E., Kreeger, J., Ottinger, M., Howard, J.J.B.o.R., 2000. Age-dependent changes in sperm production, semen quality, and testicular volume in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). 63, 179-187.
- Wu, W., Hu, Z., Qin, Y., Dong, J., Dai, J., Lu, C., Zhang, W., Shen, H., Xia, Y., Wang, X., 2012. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Molecular human reproduction*, gas022.
- Yamazaki, Y., Koike, H., Sugiyama, Y., Motoyoshi, K., Wada, T., Hishinuma, S., Mita, M., Morita, T., 2002. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *The FEBS Journal* 269, 2708-2715.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Panyaboriban S, Tharasanit T, Chankitisakul V, Swangchan-Uthai T, and Techakumphu M
2018. Treatment with Chemical Delipidation Forskolin Prior to Cryopreservation
Improves the Survival Rates of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) and Bovine (*Bos
indicus*) In Vitro Produced Embryos. Cryobiology. 84: 46 – 51.

(ดัดแปลงเอกสารในท้ายเล่ม)

2. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์เพิ่มเติม

- CRISP2 and CRISP3 Reproductive Biomarkers in Male Malayan Tapirs