เอกสารวิชาการ

เรื่องที่ 1

ผลของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร

Effect of equilibration time and L-cysteine supplement to extender on frozen boar semen quality

โดย

<u>นลิน บุญสพ</u>

พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

เลขทะเบียนผลงานวิจัย	59(1)-0208-012
สถานที่ดำเนินการ	ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อสุกร จังหวัดราชบุรี
ระยะเวลาดำเนินการ	ตุลาคม 2558 - กันยายน 2559
การเผยแพร่	เว็บไซต์สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ผลของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร

นลิน บุญสพ[1/] พีระพงษ์ สำราญทรัพย์[2/]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาปรับสมดุลและผลของการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร จัดทรีทเมนต์แบบ 2x2 แฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ ใช้พ่อพันธุ์สุกรจำนวน 9 ตัว กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) สายพันธุ์ละ 3 ตัว ได้แก่ พันธุ์แลนด์เรซ ลาร์จไวท์ และดูร็อค อายุระหว่าง 2-3 ปี เลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อสุกร จังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึง เดือนกันยายน 2559 รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ การทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จะถูกแบ่งในขั้นตอนละ 2 ส่วนเท่าๆกัน ขั้นตอนแรกเพื่อศึกษาระยะเวลาปรับสมดุลโดยมี 2 วิธี (วิธีที่ 1: นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 60 นาที และ วิธีที่ 2: นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที) ขั้นตอนที่สองเพื่อศึกษาปัจจัยการเสริมและไม่เสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่อง CASA พบว่าระยะปรับสมดุลวิธีที่ 2 มีค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP (93.76±9.52 μm/s และ 90.64±8.58 μm/s) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง VCL (178.10±19.82 μm/s และ 172.94±20.57 μm/s) และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH (7.17±0.95 μm และ 6.91±0.86 μm) สูงกว่าระยะปรับสมดุลวิธีที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น 5 mM มีผลทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP (91.64±10.65 μm/s และ 88.96±9.78 μm/s) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง VCL (176.33±23.25 μm/s และ 166.92±22.99 μm/s) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ค่าอัตราการเคลื่อนที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ที่เหมาะสมนั้นจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนที่เกี่ยวข้องกับความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ระยะเวลาปรับสมดุล L-cysteine

เลขทะเบียนวิจัย : 59 (1) – 0208 - 012

[1/]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ต.บางกะดี อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

[2/]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี ต.หนองโพ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

Effect of equilibration time and L-cysteine supplement to extender on frozen boar semen quality

Nalin Boonsop[1/] Peerapong Sumransap[2/]

Abstract

The aim of this study the effect of equilibration time and L-cysteine supplement to extender on frozen boar semen quality. The 2x2 factorial experiments in Randomized Complete Block Design (RCBD) was used with nine boars (Landrace, Large white, Duroc) aged 2-3 years that were raised and fed under the same environment at Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Ratchaburi province during October 2015-September 2016. The semen was collected one time per week for 3 consecutive weeks. The experiment is divided into 2 steps with divided collected semen into 2 equal parts. The first step is to study the equilibration time with 2 methods (First method: bring the semen to freezing at 15°C for 120 min and 5°C for 60 min ; Second method: bring the semen to freezing at 15°C for 150 min and 5°C for 90 min.) The second step is to study the supplementation of L-cysteine in freezing extender III. The results of the frozen semen quality estimated by CASA showed that the second method of equilibration time had VAP movement velocity (93.76±9.52 μm/s and 90.64±8.58 μm/s), the VCL trajectory movement speed (178.10±19.82 μm/s and 172.94±20.57 μm/s) and the ALH kinetic movement characteristics (7.17±0.95 μm and 6.91±0.86 μm) were significantly higher than the first method of equilibration time ($P<0.05$). The supplementation of L-cysteine to the sperm dilution solution at a concentration of 5 mM resulted in the VAP movement velocity (91.64±10.65 μm/s and 88.96±9.78 μm/s), the VCL trajectory movement speed (176.33±23.25 μm/s and 166.92±22.99 μm/s) were significantly higher than the control group ($P<0.05$). While motility, progressive motility and acrosome integrity on quality of post-thaw sperm were not significantly different ($P>0.05$). These results indicated that the equilibration time and appropriate L-cysteine supplementation can affect the quality of swine frozen semen in relation to the velocity and kinetic movement of sperm.

Keywords: frozen boar semen, equilibration time, L-cysteine

Registered No: 59 (1) – 0208 - 012

[1/]Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Bang Kadi, Muang Pathum Thani, Pathum Thani, 12000

[2/]Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Nong Pho, Photharam, Ratchaburi, 70120

คำนำ

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศที่สร้างรายได้และมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์ของประเทศไทยซึ่งเป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก และมีการส่งออกประมาณ 4.6 % ของปริมาณการผลิตทั้งหมด (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ, 2562) ในอดีตที่ผ่านมาพบว่ามีต้นทุนพันธุ์สัตว์ที่ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ สุรัส (2549) ศึกษาพบว่าในการผลิตลูกสุกรขุนจากพ่อและแม่พันธุ์แท้ที่เป็นต้นทุนคงที่ ได้แก่ ค่าพ่อแม่พันธุ์ ค่าอุปกรณ์และโรงเรือน คิดเป็น 26 % ของต้นทุนรวม (ไม่รวมค่าอาหารสัตว์ ค่าเวชภัณฑ์ ค่าสาธารณูปโภค) การผสมเทียมสุกรปัจจุบันยังคงใช้น้ำเชื้อสดอยู่เนื่องจากค่าใช้จ่ายถูก แต่ข้อเสียคือสามารถเก็บไว้ได้เพียง 3-4 วันเท่านั้นซึ่งไม่สะดวกในขนส่งระยะทางไกล วิธีการน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งได้ถูกคิดค้นและพัฒนาเทคนิคขึ้นในประเทศไทย โดยรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรแล้วทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงและกลีเซอรอลก่อนนำไปแช่แข็งโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวหรือควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้นโดยไม่ต้องรีดบ่อยครั้ง สามารถไปผสมกับแม่พันธุ์ในที่ต่างๆที่มีระยะห่างกันได้ อย่างไรก็ตามอสุจิของสุกรภายหลังแช่แข็งและละลายแล้วจะมีอายุสั้นกว่าปกติ Taylor (1991) รายงานว่าหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวอสุจิจะตายไปประมาณ 40-60% และ Wagne and Tibier (2000) พบว่าจำนวนลูกเกิดต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดและมีความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งค่อนข้างสูง

น้ำเชื้อสุกรมีความแตกต่างจากน้ำเชื้อปศุสัตว์อื่นในส่วนของปริมาณที่มากกว่าและมีความเข้มข้นต่ำ อสุจิจะมีความไวต่อการเปลี่ยนของอุณหภูมิเกิด cold shock ได้ง่าย ปริมาณของโคเลสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Parks and Lynch, 1992) ดังนั้นในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลักที่จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง เช่น ระยะเวลาปรับสมดุลของอสุจิ (equilibration time) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C และน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อให้อสุจิปรับสภาพให้เข้ากับน้ำยาเจือจางและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงของกระบวนการแช่แข็ง ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจำเป็นต้องปรับสมดุลอุณหภูมิ 2 ระดับ คือที่ 15 °C และ 5 °C ซึ่งเป็นช่วงที่อสุจิเกิด cold shock ได้ง่าย โดย Kaeoket et al. (2008) รายงานว่าในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร มีการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที และที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที พบว่าน้ำเชื้อภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 17 –25 ส่วน Egerszeg et al. (2014) รายงานการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรพื้นเมืองของฮังการี โดยใช้การปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 180 นาที และที่ 5 °C นาน 120 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 30-35

ส่วนน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย โดยทั่วไปน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายบีทีเอส (BTS® , Beltsville Thawing Solution, Minitüb, Abfüll-und Labortechnik GmbH&Co. KG, Germany) สารละลายโมดิน่า (Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้สารละลายโมดิน่าที่มีองค์ประกอบหลักๆได้แก่ TRIS BSA และ cysteine ที่เป็นแหล่งพลังงานและมีสารป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีผลต่อการอยู่รอดของอสุจิ โดยเฉพาะการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation (LPO) ในขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อ

ซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ของตัวอสุจิลดลง (Stewart, 1996) จึงมีการศึกษาผลของการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเสริมในน้ำยาเจือจางเพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดจากกระบวนการดังกล่าว โดยเฉพาะที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์

L-cysteine เป็นกรดอะมิโนชนิด non-essential amino acid ซึ่งร่างกายสังเคราะห์เองได้ ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดผลกระทบจากปฏิกิริยา LPO และปฏิกิริยา reaction oxidative stress (ROS) ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ทำให้สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้สูงขึ้นได้

ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของระยะเวลาปรับสมดุล และการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้มีคุณภาพสูงขึ้นสามารถนำไปใช้ในการบริการผสมเทียมแก่เกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แลนด์เรซ ลาร์จไวท์ และดูร็อค สายพันธุ์ละ 3 ตัว จำนวน 9 ตัว อายุระหว่าง 2-3 ปี เลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อสุกร จังหวัดราชบุรี สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยน้ำเชื้อสดที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าความผิดปกติของอสุจิส่วนหัวและหางไม่เกิน 12% และ 15% ตามลำดับและมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% (เทวินทร์, 2542)

การวางแผนการทดลอง

น้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์สุกรทุกตัวจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนเพื่อศึกษาปัจจัย ดังนี้

ขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อศึกษาระยะเวลาปรับสมดุล 2 วิธี

<u>วิธีที่1</u> เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 (Extender I ; Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) สัดส่วน 1:1 นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับระยะสมดุล **<u>อุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที</u>** จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 g 15 °C นาน 10 นาที แยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้งและเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 2 (Extender II ; lactose-egg yolk) ประกอบด้วย 80% lactose + 20% egg yolk สัดส่วน 1:1 v/v ให้มีอสุจิเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษา**<u>อุณหภูมิที่ 5°C เป็นเวลา 60 นาที</u>**

<u>วิธีที่ 2</u> เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 (Extender I ; Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) สัดส่วน 1:1 นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับระยะสมดุล**<u>อุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที</u>** จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 g 15 °C นาน 10 นาที แยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้งและเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 2 (Extender II ; lactose-egg yolk) ประกอบด้วย 80% lactose + 20% egg yolk สัดส่วน 1:1 v/v ให้มีอสุจิเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษา**<u>อุณหภูมิที่ 5°C เป็นเวลา 90 นาที</u>**

ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อศึกษาปัจจัยการเสริมและไม่เสริม L-cysteine ดังนี้

แบ่งน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่เย็นด้วยวิธีที่ 1 และ 2 แยกออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน

<u>ส่วนที่ 1</u> เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 3 (Extender III) ; lactose-egg yolk ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM (เป็นกลุ่มควบคุม)

<u>ส่วนที่ 2</u> เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 3 (Extender III) ; lactose-egg yolk ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM เสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM

จากนั้นบรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำไปอังไว้เหนือไอไนโตรเจน 3-4 ซม. อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป (Figure 1)

Figure 1 The process of Semen Freezing

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ภายหลังการแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการสุ่มน้ำเชื้อแช่งแข็งจากทุกชุดการผลิตจากพ่อพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ๆละ 3 หลอด ทำการละลายโดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 38°C นาน 20 วินาที จากนั้นตรวจการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยการย้อมสี (FITC-PNA) ดังนี้

1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)

2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ได้แก่

- Average Path Velocity (VAP; μm/s) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที

- Straight Line Velocity (VSL; μm/s) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที

- Curvilinear Velocity (VCL; μm/s) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที

3) ลักษณะการเคลื่อนที่ (kinematic movement) ได้แก่

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

- Straightness (STR; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ย (VSL/VAP)

- Linearity (LIN; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VSL/VCL)

- Wobble (WOB; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VAP/VCL)

4) ความผิดปกติส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.)

5) อสุจิมีชีวิต (sperm viability; %) และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune Nxt, Thermo Fisher Scientific, USA)

การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial ใน Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้ General linear model procedure และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey 's procedure (Steel and Torrie, 1981) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ด้วยโมเดลดังนี้

$y_{ijk} = \mu + block + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$

เมื่อ y_{ijk} คือ ค่าสังเกตสำหรับอัตราในการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม

μ คือ ค่าเฉลี่ยโดยรวม

block คือ สายพันธุ์สุกร

A คือ ปัจจัยของระยะเวลาปรับสมดุล

B คือ ปัจจัยของการเสริม L-cysteine

AB คือ ปัจจัยร่วมของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine

e คือ ความคลาดเคลื่อน

i คือ จำนวนระดับของปัจจัย A (การปรับระยะสมดุลวิธีที่ 1 โดยปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 ℃ เป็นเวลา 120 นาทีและอุณหภูมิที่ 5 ℃ เป็นเวลา 60 นาที และการปรับระยะสมดุลวิธีที่ 2 โดยปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15° C เป็นเวลา 150 นาทีและอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที)

j คือ จำนวนระดับของปัจจัย B (1= กลุ่มควบคุม และ 2= กลุ่มเสริม L-cysteine)

k คือ จำนวนค่าสังเกตของแต่ละทรีทเมนต์ร่วม

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากผลการวิเคราะห์พบว่าระยะเวลาปรับสมดุล และการเสริม L-cysteine ไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($p>0.05$) ดังนั้นจึงทำการพิจารณาแยกทีละปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย ดังนี้

ปัจจัยระยะเวลาปรับสมดุล

ระยะเวลาปรับสมดุลจากผลการทดลองพบว่ามีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติในส่วนของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ($P>0.05$) (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะปรับสมดุลทั้ง 2 วิธีพบว่าการระยะเวลาปรับสมดุลวิธีที่ 2 ที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 150 นาทีและอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 90 นาที ให้ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP, VCL และ

ลักษณะการเคลื่อนที่ ALH มีค่าสูงกว่าระยะเวลาปรับสมดุล วิธีที่ 1 ที่อุณหภูมิ 15° เป็นเวลา 120 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 60 นาที

เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่จากการปรับสมดุลอุณหภูมิทั้ง 2 วิธีมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ระหว่าง 41.76 – 47.46 % ซึ่งสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมาในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ Kaeoket et al. (2008) รายงานว่าในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่ใช้การปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที และที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งประมาณร้อยละ 17 –25 ส่วน Egerszeg et al. (2014) รายงานว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรพื้นเมืองของฮังการีที่ใช้การปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 180 นาที และที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 120 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 30-35 ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างในแต่ละขั้นตอนของการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่มีรายละเอียดที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของ สุพาที และคณะ (2554) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ทำให้เกิดภาวะสมดุลภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 และบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 15°C เป็นระยะเวลา 120 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 30 นาทีและ 60 นาที พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรไม่แตกต่างกัน แต่ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ระยะเวลาการปรับสมดุลของอสุจิยังเป็นปัจจัยที่ต้องระวังโดยเฉพาะอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 15 °C และ 5 °C ซึ่งเป็นช่วงที่อสุจิเกิดสภาวะ cold shock ได้ง่ายและยังจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น วิธีการและขั้นตอนการเติมน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีแรงดันออสโมติกสูง รวมถึงคุณสมบัติของน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวที่อาจส่งผลต่อความสามารถทนต่อการแช่แข็งได้แตกต่างกัน และส่งผลถึงความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง (Thurston et al.,2002; Holt et al.,2005) อาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาปรับสมดุลมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวชี้วัดหลักในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีแสดงว่าระยะเวลาปรับสมดุลในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจึงสามารถกระทำได้ในช่วงเวลาหนึ่ง โดยการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C สามารถใช้เวลาได้ตั้งแต่ 120-150 นาที ในขณะที่การปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 5 °C ก็สามารถใช้ระยะเวลาได้ระหว่าง 60-90 นาที

Table 1 Parameters of frozen-thawed boar semen from equilibration time

Parameters	Equilibration time	
	Method 1	Method 2
Motility (%)	41.76 ± 15.05	47.46 ± 13.72
Progressive motility (%)	16.79 ± 6.99	19.28 ± 8.31
VAP (μm/s)	90.64^{b} ± 8.58	93.76^{a} ± 9.52
VSL (μm/s)	66.87 ± 8.82	68.66 ± 11.34
VCL (μm/s)	172.94^{b} ± 20.57	178.10^{a} ± 19.82
ALH (μm)	6.91^{b} ± 0.86	7.17^{a} ± 0.95
BCF (Hz)	33.96 ± 2.94	33.42 ± 2.51
STR (%)	73.82 ± 5.29	73.08 ± 5.46
LIN (%)	41.68 ± 5.56	41.18 ± 5.58
LIN (%)	41.68 ± 5.56	41.18 ± 5.58
WOB (%)	54.79 ± 4.51	54.70 ± 4.38
Bent tail (%)	15.56 ± 4.72	14.59 ± 5.50
Coiled tail (%)	1.42 ± 0.89	1.11 ± 0.64
Distal droplet (%)	10.45 ± 5.35	9.41 ± 6.03
Viability (%)	34.29 ± 4.91	33.60 ± 5.07
Acrosomal integrity (%)	44.28 ± 10.87	43.61 ± 11.72

[ab] Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P<0.05$)

ปัจจัยการเสริม L-cysteine

การเสริม L-cysteine มีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP และ VCL อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติในส่วนอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ($P>0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเสริมและไม่เสริม L-cysteine พบว่าการเสริม L-cysteine มีค่าความเร็วในการเคลื่อน VAP และ VCL สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เสริมสาร) (Table 2) สอดคล้องกับ Teinthai et al. (2012) ที่รายงานว่าการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 mM มีในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Lactose-egg yolk สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้สูงขึ้น และ Malo et al. (2010) ทำ

การทดลองการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM ในน้ำยาเจือจางพบว่าสามารถป้องกันความเสียหายของตัวอสุจิขณะทำการแช่แข็งและสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้

Table 2 Parameters of frozen-thawed boar semen from L-cysteine supplementation

Parameters	L-cysteine supplementation	
	Non L-cysteine (Control)	L-cysteine
Motility (%)	44.42 ± 15.13	43.66 ± 14.15
Progressive motility (%)	17.28 ± 7.66	18.33 ± 7.52
VAP (μm/s)	88.96^{b} ± 9.78	91.64^{a} ± 10.65
VSL (μm/s)	66.35 ± 9.74	66.83 ± 10.37
VCL (μm/s)	166.92^{b} ± 22.99	176.33^{a} ± 23.25
ALH (μm)	6.67^{b} ± 1.02	7.13^{a} ± 1.06
BCF (Hz)	33.95 ± 2.64	33.75 ± 2.74
STR (%)	74.59^{a} ± 5.08	73.05^{b} ± 5.84
LIN (%)	42.80^{a} ± 5.82	40.80^{b} ± 5.72
WOB (%)	55.70^{a} ± 4.90	54.16^{b} ± 4.21
Bent tail (%)	15.30 ± 5.00	15.63 ± 5.75
Coiled tail (%)	1.29 ± 0.84	1.29 ± 0.93
Distal droplet (%)	10.08 ± 5.36	9.95 ± 5.39
Viability (%)	33.99 ± 5.05	34.16 ± 5.10
Acrosomal integrity (%)	43.78 ± 10.91	44.95 ± 11.71

[ab] Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P<0.05$)

โดยทั่วไปน้ำเชื้อสุกรมีคุณลักษณะเฉพาะคือมีปริมาณในการหลั่งต่อครั้งมากแต่มีความเข้มข้นของอสุจิค่อนข้างต่ำ และมีปริมาณของโคเลสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Parks and Lynch, 1992) เมื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมักเกิดอนุมูลอิสระโดยเฉพาะที่อยู่ในกลุ่ม ROS ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดปฏิกิริยา LPO ได้ง่ายเนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายและมีการรั่วของไอออนต่างๆ นอกจากทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังทำให้การทำงานของไมโตคอนเดรียลดต่ำลง (Hu et al., 2009) ซึ่งไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการเคลื่อนที่ของอสุจิจึงส่งผลให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำลง Tuncer et al. (2010) รายงานว่าการ

เสริมสารต้านอนุมูลอิสระนั้นช่วยให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีอัตราการเคลื่อนที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิ โดย L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สามารถยังยั้งการเกิดปฏิกิริยา LPO ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งเป็นพิษกับอสุจิต่อต้านภาวะ oxidative stress ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงขึ้น (Kaeoket et al., 2008; Szczesniak-Fabianczyk et al., 2003) โมเลกุลของกรดอะมิโนสามารถจับกับชั้นฟอสโฟไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ดีและช่วยในการลดผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก (Kundu et al., 2001) ลดการสะสมของกรดแลคติก (Flipse and Almquist, 1956) ป้องกันการเกิดบาดแผลของเยื่อหุ้มอสุจิ (Rudolph and Crowe, 1985) จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการเสริม L-cysteine สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของความเร็ว VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH ของอสุจิดีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม L-cysteine ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการเดินทางของอสุจิเพื่อไปยังจุดที่สามารถปฏิสนธิกับไข่ในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Pizzari and Parker, 2009)

สรุปผลการทดลอง

การปรับระยะสมดุลวิธีที่ 2 โดยนำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที แล้วนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที กับการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของความเร็ว VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH ที่ดีที่สุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม

ข้อเสนอแนะ

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสามารถนำวิธีการมาปรับใช้เพื่อเป็นทางเลือกในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งซึ่งกระทำการได้ในช่วงเวลาหนึ่งโดยเฉพาะวิธีการปรับระยะสมดุลของอสุจิ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นในน้ำยาเจือจางที่มีคุณสมบัติช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรได้ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการนำไปผสมเทียมกับสุกรโดยตรงเพื่อศึกษาอัตราการผสมติด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาพันธุ์สุกร และ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนที่ให้การช่วยเหลือ สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ พร้อมคุณจตุพร พงษ์เพ็ง ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี และคุณสายันธ์ บัวบาน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพและการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการทดลองจนเสร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. 2562. สถานการณ์อุตสาหกรรมสุกรและแนวโน้ม ปี 2562. แหล่งที่มา : https://www.swinethailand.com. 20 มีนาคม 2563.

สุพาที กิจการค้า สุธี รัตนภิรมย์ ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์ กรไชย กรแก้วรัตน์ ปริวรรต พูลเพิ่ม และอนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์. 2554. ผลของการเติมน้ำตาลทรีฮาโลสในสารละลายระหว่างแช่แข็ง ระยะเวลาที่ทำให้เกิดสมดุลและความแตกต่างระหว่างพ่อสุกรต่อคุณภาพของอสุจิหลังอุ่นละลาย, วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 21 ฉบับที่ 2. หน้า 70-83.

สุรัส ป้อมเมือง. 2549. การวิเคราะห์ต้นทุนและจุดคุ้มทุนของโครงการผลิตลูกสุกของสหกรณ์ผู้เลี้ยงสุกรสระบุรี จำกัด. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

Egerszeg, I., B. Berger, J. Ratky and F. Fischerleitner. 2014. Improving liquid semen preservation and fertilizing ability of frozen-thawed Mangalica semen with antioxidant treatments. Available source : http://www.raumberg-gumpenstein.at/cm4/index.php/de/forschung/publikationen/downloadsveranstaltungen/finish/1814-3516-wt-mangalica-samenkonservierung-a-hu/16160-improving-liquid-semen-preservation-and-fertilizing-ability-of-frozen-thawed-mangalica-semen-with-antioxidant-treatments.html, March 17, 2020.

Flipse, R.J. and J.Q. Almquist. 1956. Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. Journal series of the pennsylvania agricultural experiment Station, 1690-1696.

Holt, W.V., A. Medrano, L.M. Thurston and P.F. Watson. 2005. The significance of cooling and animal variability for boar sperm cryopreservation. Cryomicroscope Theriogenology. 63: 370-382.

Hu, J.H., Q.W. Li, T. Zhang and Z.L. Jiang. 2009. Effect of Gynostemma Pentaphyllium Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. Cryobiology 59: 244-249.

Kaeoket, K., K. Tantiparinyakul, W. Kladkaew, P. Chanapiwat and M. Techakumphu. 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Thai Journal of Agricultural Science 41(1-2): 1-9.

Kundu, C.N., K. Das. and G.C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology 41: 21-27.

Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, F. Martinez, R. Cano, I. de Blas and E. Espinosa. 2010. Anti-oxidant supplementation improve boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis) Cryobiology. 61: 142-147.

Parks, J.E. and D.V. Lynch. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology. 29: 255-266.

Pizzari, T. and G.A. Parker. 2009. Sperm competition and sperm phenotype. Sperm biology an evolutionary perspective 6: 207-245.

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

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. Principles and Procedures of Statistics. A biometric Approach. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

Stewart, D.I. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. J. Reprod Fertil. 1: 6-12.

Szczesniak-Fabianczyk, B., M. Bochenek, Z. Smorag and F. Ryszka. 2003. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. Reproductive Biology 3(1): 81-87.

Taylor, J. 1991. Bovine Semen Collection and Processing Techniques. 2nd ed. Canadian Association of Animal Breeders. International Livestock Management Schools. pp. 132.

Teinthai, P., P. Chanapiwat, S. Manee-in, D. Gronsang and K. Kaeoket. 2012. Assessment of Appropriate L-cysteine Concentration for Boar Semen Cryopreservation by Using Flow Cytometry. Thai Vet Med. 42(4): 483-488.

Thurston, L.M., K. Siggins, A.J. Mileham, P.F. Watson and W.V. Holt. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes

controlling boar sperm viability following cryopreservation. Biol. Reprod. 66: 545-554.

Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Buyukleblebicity, S. Sariozkan, H. Kinet, D. Yeni, F. Avdatek, A.F. Fidan and M. Gundogan. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawes bull semen. Journal of Animal and Veterinary Advances 9(18): 2365-2370.

Wagne, H.G. and M. Tibier. 2000. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. Proceedings of the 14th International congress on animal reproduction: p. 77.