ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw และชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย

เริงวุฒิ วรวุฒิ[1/] จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์[2/] จุฬฉัตร ชาปัญญา[3/]

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw และชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลายในน้ำเชื้อสุกรสายพันธุ์ดูร็อค ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ สายพันธุ์ละ 3 ตัว รวม 9 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สุกร จังหวัดนครราชสีมา การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน คำนวณให้มีความเข้มข้นตามกลุ่มทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1ความเข้มข้นของอสุจิ 0.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 ความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ 3 ความเข้มข้นของอสุจิ 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร (medium straw) และเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง ภายหลังการแช่แข็งทำการละลายน้ำเชื้อและสุ่มตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ (33.31 ± 10.81, 31.42 ± 14.36 และ 26.47 ± 9.63 ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (11.36 ± 6.75, 10.86 ± 6.43 และ 6.38 ± 6.01 ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อในก่อนการผสมเทียมต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Duragen® BTS® และ Modena™ เจือจางน้ำเชื้อที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® มีคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในชั่วโมงที่ 2 สูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® และ Modena™ ในขณะที่อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม เมื่อละลายด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Duragen® และ Modena™ มีค่าสูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS®

คำสำคัญ: ความเข้มข้นอสุจิ น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร อสุจิมีชีวิต

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-(60:03)-0208-025

[1/]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

[2/]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

[3/]ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

Spermatozoa concentration in medium straw and extender for artificial insemination on survival time after thawed semen

Roengwut Worawut[1/] Janyaporn Rungruangsak[2/] Jullachat Chapanya[3/]

Abstract

The present experiments aimed to evaluate the effects of sperm concentration on medium-straw frozen-thawed boar semen quality and the effect of different semen extenders on survival time after thawing frozen semen. The semen samples that were used from nine mature boars (3 Duroc boars, 3 Landrace boars and 3 Large white boars) aged between 2 to 3 years old in Swine Research and Development Center in Nakonratchasima province. For the first experiment which aimed to evaluate the effects of sperm concentration on medium-straw frozen-thawed boar semen quality, the semen samples were collected at one-week interval over a 4-week period, and the diluted semen was divided equally into 3 groups before being loaded into 0.5 medium straws; group 1: the sperm concentration at 0.5 $\times 10^9$ sperm per dose, group 2: the sperm concentration at 1×10^9 sperm per dose, and group 3: the sperm concentration at 1.5×10^9 sperm per dose. The straws from each group were used to continue the process of frozen-thawed boar semen production. After frozen semen production, the frozen semen samples were sampled for quality evaluation using CASA. The results showed that frozen-thawed boar semen quality from group 1 was significantly higher than group 2 and 3 ($P<0.05$) including motility (33.31 ± 10.81, 31.42 ± 14.36 and 26.47 ± 9.63) and progressive motility (11.36 ± 6.75, 10.86 ± 6.43 and 6.38 ± 6.01), respectively. For the second experiment that aimed to evaluate the effect of different commercial semen extenders; namely Duragen®, BTS® and Modena™ on frozen-thawed semen quality. All frozen semen straws in the second experiment, were from group 1 in the first experiment that was significantly better than the other groups. The results showed that Duragen® provided better quality of frozen-thawed boar semen at 2 hours after thawing, than BTS® and Modena™ whereas Duragen® and Modena™ provided better sperm viability and acrosomal integrity than BTS®.

Keywords: Concentration, Boar frozen semen, living sperm

Registered No: 61(1)-(60:03)-0208-025

1/Ratchaburi Artificial Insemination and Biotechnology, Photaram district, Ratchaburi Province

2/ Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

3/ Lamphayaklang Frozen Semen Production and Research Center, Lamsonti district, Lopburi province

คำนำ

สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ให้ลูกเป็นครอก โดยจำนวนลูกต่อครอกเฉลี่ย 10-12 ตัว การผสมเทียมที่ผ่านมาจึงนิยมใช้น้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายปริมาณ 80-100 มิลลิลิตร และแต่ละครั้งต้องมีจำนวนอสุจิ $3x10^9$- $4x10^9$ ล้านตัว ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นนิยมผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งและใช้จำนวนอสุจิน้อยกว่า เช่น น้ำเชื้อแช่แข็งโคบรรจุในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จะมีจำนวนอสุจิประมาณ 20 ล้านตัว ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งแพะและแกะในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จะมีจำนวนอสุจิ 100-200 ล้านตัว ทั้งนี้การผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งก็ยังต้องการปริมาณสารละลายและจำนวนอสุจิสูงกว่าสัตว์อื่น (Buranaamnuay et al., 2010)

ดังนั้นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจึงนิยมบรรจุในภาชนะหลายรูปแบบ หรือใช้หลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร (medium straw) เพื่อให้แต่ละหลอดสามารถบรรจุจำนวนอสุจิมากที่สุด และใช้จำนวนหลอดน้ำเชื้อน้อยที่สุดในการเทียมแต่ละครั้ง เพื่อให้สะดวกในการใช้งาน และเป็นการประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บ จากรายงานของ Fernando et.al., (2005) พบว่าการบรรจุน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ $2x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร ภายหลังการละลายอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 37-46 และรายงานของ Tuempong et al., (2006) พบว่าการบรรจุน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร ภายหลังการละลายอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ถึงร้อยละ 42.8 และเมื่อนำไปใช้ในการผสมเทียม Kaeoket et al., (2005) พบว่าการผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิ $2x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร มีอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิ $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสำหรับการผสมเทียมต้องเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมสุกร เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอในการนำพาอสุจิเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และคงสภาพความสมบูรณ์และมีชีวิตอยู่ของอสุจินานพอ ในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ตัวเมีย (Vyt et al., 2007) ซึ่งน้ำยาเจือจางดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารที่จำเป็นเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้อสุจิ และที่สำคัญต้องมีแรงดันออสโมติกและค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่ผ่านการปรับสมดุลในขบวนการแช่แข็งมาแล้ว ซึ่งจะมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากน้ำเชื้อสด อีกทั้งต้องไม่เกิดปฏิกิริยาอันเป็นพิษกับของเหลวภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียและเกษตรกรสามารถหาได้ง่าย มีจำหน่ายโดยทั่วไป เช่น IVT® BTS® KIEV® Modena™ Androhep® เป็นต้น

ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ในระดับที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลายในชั่วโมงที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกรสายพันธุ์ดูร็อค ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ อายุระหว่าง 2-3 ปี สายพันธุ์ละ 3 ตัว จำนวน 9 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกร จังหวัดนครราชสีมา รีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้เทคนิคการใช้มือบีบนวดที่ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (gloved hand technique) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ติดต่อกัน โดยน้ำเชื้อสดที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าความผิดปกติของอสุจิในส่วนหัวและส่วนหางไม่เกิน 12% และ 25% ตามลำดับ และมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70%

การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) โดยนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรที่รีดเก็บได้เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® (Magapor, Spain) อัตราส่วน 1:1 (v/v) บรรจุในหลอดทดลอง และวางในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำให้มีระดับเดียวกันกับของเหลวภายในขวด บ่มที่อุณหภูมิ 15 °C นาน 120 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 x g อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 10 นาที และผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยดัดแปลงจากวิธีของ Buranaamnuay et al., (2009) ด้วยการแยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้ง เจือจางด้วย lactose-egg yolk (20% ไข่แดง ในสารละลาย 11% แลคโตส) ให้อสุจิมีความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และแช่เย็นที่ 4 °C นาน 120 นาที หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง LEY ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM ให้มีความเข้มข้นของอสุจิเพื่อนำไปบรรจุในหลอดน้ำเชื้อชนิด medium straw แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ความเข้มข้น 0.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ความเข้มข้น 1.0×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

การบรรจุและการแช่แข็ง

บรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอังไว้เหนือไอไนโตรเจน 3-4 เซนติเมตร อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลว เพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย ด้วยการตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) และความผิดปกติของอสุจิ (abnormal morphology) ด้วยเครื่อง CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer; IVOS II Motility Analyzer version, Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และความเข้มข้นของอสุจิด้วย hemocytometer โดยสุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิตๆ ละ 3 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 12 วินาที และตัวอย่างบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการตรวจคุณภาพ ดังต่อไปนี้

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

2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ 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 ได้แก่

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

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

- Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย

- Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย

- Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย

4) ความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA

5) อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific, USA) ดังนี้

- ความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยย้อมด้วยสี FITC-PNA (Lectin PNA From Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor™ 488, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, L21409.) และ PI (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit ,Molecular Probes) ตามวิธีการของ Nagy et al., (2003) นับจำนวนอสุจิทั้งสิ้น 10,000 ตัวอสุจิ

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบผลของชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม 3 ชนิด

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) โดยทำการสุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิต ชุดละ 5 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร โดยใช้หลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจากกลุ่มของความเข้มข้นอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำไปละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 12 วินาที จากนั้นเติมน้ำยาเจือจางในอัตราส่วน น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร 1 ส่วน ต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 10 ส่วน (1:10) โดยมีชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม 3 ชนิด ดังนี้

ชนิดที่ 1 คือ BTS®ชนิดที่ 2 คือ Duragen®ชนิดที่ 3 คือ Modena™

จากนั้นบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ตลอดการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบผลเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey’s multiple comparison test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์สุกร (block) มีอิทธิพลต่อกลุ่มทดลอง แต่ไม่มีอิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่าง สายพันธุ์สุกร กับ กลุ่มทดลอง (treatment) จึงทำให้พิจารณาผลของความเข้มข้นของอสุจิต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง ภายหลังการทดลองดังนี้

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

Table 1 Semen quality of frozen-thawed boar semen from three different sperm concentrations (mean ± SD)

Parameters (%)	Treatment		
	$0.5x10^9$ sperm/dose (N=36)	$1x10^9$ sperm/dose (N=36)	$1.5x10^9$ sperm/dose (N=36)
Total motility	33.31^a ± 10.81	31.42^b ± 14.36	26.47^b ± 9.63
Progressive motility	11.36^a ± 6.75	10.86^a ± 6.43	6.38^b ± 6.01
Velocity			
VAP (μm/s)	82.65 ± 12.90	80.64 ± 10.90	79.80 ± 13.55
VSL (μm/s)	57.53 ± 10.96	56.04 ± 9.97	51.98 ± 12.51
VCL (μm/s)	176.70 ± 25.08	163.12 ± 24.20	158.03 ± 31.67
Kinematic movement			
ALH (μm)	6.70^b ± 1.36	6.90^b ± 1.29	7.73^a ± 1.16
BCF (Hz)	32.14^b ± 3.31	34.38^a ± 3.27	34.16^a ± 3.56
STR (%)	72.83^a ± 6.29	70.66^a ± 5.20	65.54^b ± 9.00
LIN (%)	40.26^a ± 7.39	37.88^a ± 5.20	33.52^b ± 6.71
WOB (%)	53.29^a ± 5.35	51.91^b ± 4.23	49.34^b ± 3.39
Sperm with tail defects			
Bent tail	16.44 ± 5.38	19.48 ± 6.21	20.06 ± 4.63
Coiled tail	2.81 ± 1.25	2.75 ± 1.94	2.22 ± 1.09
Proximal droplet	9.22^b ± 4.11	10.18^b ± 4.17	11.71^a ± 4.36
Distal droplet	9.27^b ± 3.59	8.77^b ± 2.06	10.56^a ± 2.59

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P<0.05$)

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในกลุ่มความเข้มข้น $0.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร จาก Table 1 พบว่าอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่ม $1x10^9$ และ $1.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มความเข้มข้น $0.5x10^9$ และกลุ่ม $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร สูงกว่ากลุ่ม $1.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ ALH และ BCF ของกลุ่มความเข้มข้นของอสุจิ $0.5x10^9$ และ $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร พบว่าต่ำกว่ากลุ่ม $1.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR LIN และ WOB พบว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ $0.5x10^9$ และ $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร พบว่าสูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ

$1.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าความผิดปกติแบบ Proximal droplet และ Distal droplet ของกลุ่มความเข้มข้นอสุจิ $0.5x10^9$ และ $1x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร มีค่าต่ำกว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ $1.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนที่น้อยกว่ามีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนที่มากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจาก จำนวนอสุจิที่มากเกินไปในหลอดน้ำเชื้อที่มีสารละลายจำนวนจำกัดมีความต้องการใช้พลังงานที่มากกว่า ทำให้สารที่จำเป็นในการเคลื่อนที่หรือกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ไม่เพียงพอ รวมถึงการเกิดอนุมูลอิสระจากอสุจิในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งจะส่งผลกระทบด้านลบต่อเยื่อหุ้มอสุจิทั้งในระหว่างขั้นตอนการปรับสมดุลอสุจิ (equilibration) ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ และขั้นตอนการละลายน้ำเชื้อ ดังนั้นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิจำนวนมากต่อหลอดน้ำเชื้อ จึงส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย นอกจากนี้ การเติมสารป้องการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) ที่เป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยป้องกันอสุจิจากการแช่แข็ง จากการทดลองนี้มีการเติมสารป้องการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยใช้ glycerol ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้น เมื่อมีการเติมอสุจิในจำนวนที่มากกว่าลงในหลอดน้ำเชื้อ จะทำให้มีอัตราส่วนของปริมาณสาร glycerol ที่ทำหน้าที่ cryoprotection ให้แก่ตัวอสุจิเป็นอัตราส่วนต่อตัวอสุจิในปริมาณที่น้อยกว่า ทำให้เมื่อเข้าสู่ขบวนการแช่แข็งนั้น หลอดที่มีอสุจิจำนวนที่มากกว่า จึงเกิดความเสียหายต่อตัวอสุจิที่มากกว่า และส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ชนิดอื่น เช่น จากการศึกษาของ Alvarez et al., (2012) ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแกะมีจำนวนที่มาก จะส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและความสมบูรณ์พันธุ์ นอกจากนี้ Nascimento et al., (2008) ที่ทำการศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งม้าภายหลังการละลายที่มีความเข้มข้นของอสุจิในจำนวนที่แตกต่างกัน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ที่ความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 2×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อสูงกว่า น้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 4×10^6 และ 8×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอด โดยที่ความเข้มข้นของอสุจิที่ 8×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่น้อยที่สุด ส่วนการศึกษาน้ำเชื้อแช่แข็งในสุนัขของ Peña and Linde-Forsberg (2000) ที่ศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย พบว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุนัขที่ระดับความเข้มข้น 200×10^6 ตัวอสุจิ ต่อหลอดน้ำเชื้อ มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ดีกว่า น้ำเชื้อแช่แข็งสุนัขที่มีระดับความเข้มข้น 400×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อ

การเปรียบเทียบผลของชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด (Table 2) ได้แก่ BTS® Duragen® และ Modena™ โดยใช้หลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจากกลุ่มของความเข้มข้นอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือที่ความเข้มข้น $0.5x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร โดยผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Duragen® มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ BTS® และ Modena™ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Duragen® และ Modena มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ BTS® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ร้อยละของอสุจิมีชีวิตและอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ของกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® และ Modena™ สูงกว่ากลุ่มที่ใช้

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® (P<0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Modena™ และแบบ Duragen® (P>0.05)

Table 2 Sperm motility parameters of frozen-thawed boar semen from three different extenders at concentration of 0.5 x10^9 sperm per dose (mean ± SD)

Parameters (%)	Treatment		
	BTS® (N=36)	Duragen® (N=36)	Modena™ (N=36)
Total motility	28.61^b ± 10.05	39.20^a ± 7.02	33.95^b ± 11.86
Progressive motility	8.02^b ± 4.73	12.53^a ± 3.84	12.47^a ± 8.24
Velocity			
VAP (µm/s)	79.20 ± 10.26	80.59 ± 12.78	82.04 ± 10.58
VSL (µm/s)	52.95 ± 8.34	56.55 ± 9.06	58.63 ± 11.50
VCL (µm/s)	161.99 ± 25.34	156.87 ± 31.50	168.25 ± 16.76
Kinematic movement			
ALH (µm)	6.77 ± 1.52	6.57 ± 1.53	7.25 ± 0.73
BCF (Hz)	35.34 ± 3.38	35.00 ± 3.41	33.07 ± 2.74
STR (%)	69.30 ± 5.31	70.87 ± 4.77	71.81 ± 5.30
LIN (%)	37.14 ± 5.63	39.17 ± 4.63	37.76 ± 5.22
WOB (%)	51.79 ± 4.41	53.71 ± 4.38	50.86 ± 3.74
STR (%)	69.30 ± 5.31	70.87 ± 4.77	71.81 ± 5.30
Sperm with tail defects			
Bent	19.96 ± 7.52	20.18 ± 4.78	18.56 ± 5.85
coil	3.40 ± 2.53	2.03 ± 0.71	2.62 ± 1.71
proximal	10.24 ± 5.22	10.20 ± 2.99	10.11 ± 3.90
Distal droplet	8.57 ± 2.21	9.50 ± 1.69	8.49 ± 2.11
Sperm quality			
Sperm viability	43.14^b ± 10.35	59.36^a ± 10.31	56.56^a ± 11.92
Intact acrosome	39.59^b ± 8.60	52.32^a ± 8.06	50.05^a ± 9.74

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (P<0.05)

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการทดลองครั้งนี้เป็นน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ได้แก่ BTS® Modena™ และ Duragen® ซึ่งน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ถูกพัฒนาจาก Pursel and Johnson (1975) โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลกลูโคส โซเดียมซิเตรท โซเดียมและไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะสั้นคือประมาณ 3 วัน (short term semen extender) ในขณะที่สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena™

สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5-7 วัน (long term semen extender) สำหรับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 10-12 วัน โดยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena® มีองค์ประกอบที่แตกต่างจากสารละลาย BTS® ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) hydroxymethylaminomethane (TRIS) และ cysteine ซึ่งจากการศึกษาของ Sano (2005) พบว่าการเติม GSSG, BSA, Lcysteine และ lycopene ช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อในระช่วงระยะเวลาการแช่เย็นได้ (cold storage) โดย BSA มีหนาที่ช่วยในการคงแรงดันออสโมติกของสารละลาย และ cysteine มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิด capacitation ของอสุจิรวมทั้งช่วยรักษาความคงตัวของพลาสมาเมมเบรน (membrane stabilizer) ของตัวอสุจิด้วย (Johnson et al., 2000) รวมถึงองค์ประกอบของสารละลาย Tris ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena™ ยังช่วยในการควบคุม pH ของสารละลายไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป (Gadea, 2003) นอกจากนี้สารละลาย Modena™ ยังมีส่วนประกอบของ EDTA ที่สูงกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® ซึ่ง EDTA เปนสารที่มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียมในน้ำเชื้อ ช่วยในการปองกันระดับแคลเซียมภายในเซลลของอสุจิสูงขึ้นจากกระบวนการแช่แข็งซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการเกิดกระบวนการ capacitation และทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Luconi et al., 2006) จากองค์ประกอบที่มีความแตกตางกันจึงอาจเปนสาเหตุที่ทำให้อสุจิที่ทำละลายด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena™ มีร้อยละอสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของโครโมโซมที่สูงกว่าเมื่อทำละลายด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chanapiwat et al., (2008) ซึ่งศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแชแข็งระหวางกลุมที่ใชสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ BTS®และสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Modena™ ในขั้นตอนการลดอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบวาอัตราการเคลื่อนที่ไปข่างหนาและ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ในกลุมสารละลายโมดีนามีเปอรเซ็นตที่สูงกวาสารละลาย BTS® อยางมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของสารละลายเจือจางชนิด long term extender หลายชนิดไม่เปิดเผยองค์ประกอบอาจเพราะเหตุผลทางการค้าเช่น Duragen® นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Kaeoket et al. (2010) ที่ทำการศึกษาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนาน 6 ชนิด ได้แก่ Merck-III, Androstar® Plus, Modena™, NUTRIXcell ®, VITASEM LD, Duragen และ Dofu gold™ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งหลังจากเก็บน้ำเชื้อไว้นาน 8 วัน พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ของอสุจิที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนาน (long term semen extender) ได้แก่ Androstar® Plus Modena™ และ Duragen® สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมที่มีประสิทธิภาพได้ถึง ร้อยละ 70 แสดงให้เห็นว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนาน มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนและสามารถใช้รักษาคุณภาพของอสุจิได้ดีกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเก็บรักษาน้ำเชื้อสั้น

สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ในระดับที่ความเข้มข้น 500 สูงกว่า 1,000 และ 1,500 ล้านตัว/มิลลิลิตร โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ดีที่สุด ในขณะที่ชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมชนิดระยะยาว ยี่ห้อ Duragen® เป็นน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมเนื่องจากมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนการละลายที่สูงกว่าชนิด BTS® และ Modena™

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาพันธุ์สุกร และ ผู้อำนวยการ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

Alvarez, M., J. Tamayo-Canul, E. Anel, J. Boixo, C. Mata-Campuzano, M. Martinez-Pastor and P. de Paz. 2012. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. Theriogenology. *77*(6):1111-1118.

Buranaamnuay, K., P. Tummaruk, J. Singlor, H. Rodriguez-Martinez and M. Techakumphu. 2009. Effects of straw volume and Equex-STM® on boar sperm quality after cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals. 44(1):69-73.

Buranaamnuay, K., P. Tummaruk and M. Techakumphu. 2010. Intra-uterine insemination with Low numbers of frozen-thawed boar spermatozoa in spontaneous and induced ovulation sows under field conditions. Livestock Science. 131:115-118.

Chanapiwat, P., K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2008. Quality of crytopreserved boar semen after using BTS compared with MODENA extender during the holding time. 46. Kasetsart University annual conference. Thailand.

Fernando, S., M. Wallgren, S. Nagy, A. Johannisson and H. Rodriguez-Martinez. 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effect on sperm viability. Theriogenology. 63:1320-1333.

Funahashi, H. and T. Sano. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. Theriogenology. 63(6):1605-1616.

Johnson, L.A., J.G. Aalbers and H.J.G. Groote. 1988. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville Thawing Solution (BTS), modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. Zuchthyg. 23:49-55.

Kaeoket, K., T. Srisowanna, U. Wichaidit, P. Chanapiwat and S. Manee-in. 2010. Comparative study on six different long-term commercial extenders for fresh boar semen. The Thai Journal of Veterinary Medicine. *40*(3):257-263.

Luconi, M., G. Forti and E. Baldi. 2006. Pathophysiology of sperm motility. Front Biosci. 11: 1433-1447.

Nagy, S., J. Jansen, E.K. Topper and B.M. Gadella. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biology of Reproduction. 68(5):1828-1835.

Nascimento, J., C. Raphael, F. Andrade, A. Alonso, M. Celeghini and R.P. Arruda. 2008. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science. *28*(6):351-358.

Peña, A. and C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. Theriogenology. 54(5):703-718.

Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. Journal of animal science. *40*(1):99-102.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.

Tuempong, W., F. Saravia, M. Wallgren, I. Caballero and H. Rodriguez-Martinez. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. Theriogenology. 65:773-787.

Vyt, P. 2007. Examination and storage of liquid porcine semen. Thesis to obtain the academic degree of Doctor of Veterinary Science (PhD), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.