โครงการย่อยที่ 2

โครงการวิจัย (ภาษาไทย)การศึกษาหาความเข้มข้นของ L-cysteine ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร และผลของการใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) สำหรับเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งและเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของสุกรนาง

(ภาษาอังกฤษ) Study on the optimal concentration of L-cysteine for boar semen cryopreservation and the effect of using supernatant for post-thawingsolution and semen extender prior to insemination on sow reproductive performance

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2553 จำนวนเงิน 1,000,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่มิถุนายน ปี พ.ศ. 2553ถึงมิถุนายน ปี พ.ศ. 2554

รายนามคณะผู้วิจัยพร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด และหมายเลขโทรศัพท์

รศ.น.สพ.ดร. กัมพล แก้วเกษ

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พุทธมณฑล นครปฐม 73170

โทรศัพท์ 0-24415242 ต่อ 1526 โทรสาร 0-24410937E-mail:vskkk@mahidol.ac.th

รศ. น.สพ. ดร. ไพศาล เทียนไทย

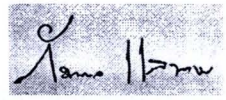
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9658 โทรสาร 0-2218-9657E-mail: Paisan.T@chula.ac.th

สพ. ญ. พนิดา ชนาภิวัตน์

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2189644-5 E-mail:vet011@hotmail.com

ลงชื่อ  หัวหน้าโครงการ

(รศ.น.สพ.ดร.กัมพลแก้วเกษ)

14/ ตุลาคม/2554

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองแรกมีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความเข้มข้นที่หมาะสมของcysteine ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร น้ำเชื้อจากพ่อสุกร 12 ตัว ซึ่งจะนำมาประเมิน การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า รูปร่างและลักษณะของตัวอสุจิน้ำเชื้อสดทั้งหมดจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ตัวอสุจิอัดแน่น จากนั้นเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ประกอบด้วยแลคโตส และไข่แดง ร่วมกับสารL-cysteine ดังนี้ ระดับL-cysteine0 mMol (กลุ่ม1; กลุ่มควบคุม), 5 mMol (กลุ่ม2), 10 mMol (กลุ่ม 3) และ 15 mMol (กลุ่ม4) สารละลายน้ำเชื้อจะถูกนำไปบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร น้ำเชื้อที่ถูกทำให้ละลายจะนำมาประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ، การรอดชีวิตของอสุจิซึ่งผ่านการย้อมตรวจด้วยสารSYBR-14/PIความสมบูรณ์ของหัวอะโครโซมซึ่งผ่านการย้อมตรวจด้วยสารFITC-PNA/EthD-1 การเกิดคาปาซิเตชันโดยใช้chlortetracycline (CTC) และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิด้วยการย้อม Annexin-V/PIการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังผ่านกระบวนการละลายน้ำเชื้อ พบว่า เปอร์เซนต์ของค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การรอดชีวิตของอะโครโซม ความสมบูรณ์ของหัวอะโครโซม การเกิดคาปาซิเตชันโดยในกลุ่มที่3มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สรุปผลการทดลองได้ว่าการเติมL-cysteine ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแลคโตส-ไข่แดง ที่ความเข้มข้น 5 หรือ 10 mMol ให้ผลในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการทดลองส่วนที่ 2 ต้องการศึกษาผลของการใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant ที่มี seminal plasma ร้อยละ 50 โดยปริมาตร) สำหรับเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งและเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของสุกรนาง ทำการศึกษาในสุกรนางทั้งหมด 20 ตัว โดยแบ่งสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่ม A เป็นกลุ่มควบคุมถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด ที่มีจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 2×10^9 ตัว ปริมาตรน้ำเชื้อ 60 มิลลิลิตร และทำการเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Modena™ กลุ่ม B ถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (เติม L-cysteine, 10 mMol) ที่เจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ Modena™ ที่มีจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 2×10^9 ตัว ปริมาตรน้ำเชื้อ 60 มิลลิลิตร กลุ่ม C ถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (เติม L-cysteine, 10 mMol) ที่เจือจางด้วยสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (Supernatant = Modena™ + seminal plasma ร้อยละ 50 โดยปริมาตร) ที่มีจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ เท่ากับ 2×10^9 ตัว ปริมาณน้ำเชื้อ 60 มิลลิลิตร และกลุ่ม D ถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (เติม L-cysteine, 10 mMol) ที่เจือจางด้วยสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (Supernatant = Modena™ + seminal plasma ร้อยละ 50 โดยปริมาตร) ที่มีจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ เท่ากับ 4×10^9

ตัว ปริมาณน้ำเชื้อ 60 มิลลิลิตร สุกรนางทุกกลุ่มจะถูกผสมด้วยวิธีการผสมเทียมแบบสอดท่อลึกเข้าไปภายในตัวมดลูก (Intrauterine insemination, IUI) จำนวน 2 ครั้ง ระยะเวลาการผสมขึ้นอยู่กับระยะเวลาจากหย่านมถึงเป็นสัด จากนั้นเก็บข้อมูล อัตราการการตั้งท้อง อัตราเข้าคลอด จำนวนลูกสุกรต่อครอกและจำนวนลูกสุกรมีชีวิตต่อครอกซึ่งพบว่าสุกรนางในกลุ่ม A มีอัตราการตั้งท้องและอัตราเข้าคลอด 100% ให้จำนวนลูกสุกรต่อครอกและจำนวนลูกสุกรมีชีวิต 7.8±3.9 และ 7±3.9 ตามลำดับ ในขณะที่สุกรนางในกลุ่มน้ำเชื้อแช่แข็ง กลุ่ม B ไม่มีสุกรนางผสมติด กลุ่ม C มีอัตราการตั้งท้อง อัตราเข้าคลอด จำนวนลูกสุกรต่อครอกและจำนวนลูกสุกรมีชีวิตมากกว่าสุกรนางในกลุ่ม D (100% เทียบกับ 60% , 60% เทียบกับ 0% ตามลำดับ; 6±2.7 ตัวเทียบกับ 0 ตัวและ 6±2.7 ตัวเทียบกับ 0 ตัวตามลำดับ) ถึงอย่างไรก็ตามเป็นสิ่งที่ไม่คาดคิดมาก่อนว่าสุกรนางในกลุ่ม D จะกลับสัดตรงรอบหลังจากผสม จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงสำหรับเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งและเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสำหรับการผสมเทียมในภาคสนามเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของสุกรนางได้

Abstract

The present study was separated into 2 experiments; the first experiment aimed to determine the optimal concentration of L-cysteine needed for cryopreservation of boar semen. Twelve boars provided semen of proven motility and morphology for this study. The semen was divided into four portions in which the lactose-egg yolk (LEY) extender used to resuspend the centrifuged sperm pellet was supplemented with various concentration of L-cysteine to reach 0 mMol (group I, control), 5 mMol (group II), 10 mMol (group III) and 15 mMol (group IV). Semen suspensions were loaded in straws (0.5 ml) and placed in a controlled-rate freezer. After cryopreservation, frozen semen samples were thawed and investigated for progressive motility, viability by SYBR-14/PI staining, acrosome integrity by FITC-PNA/EthD-1 staining, capacitation by CTC staining and the membranous structural changes by Annexin-V/PI. There was a significantly higher percentage of progressive motility, viability, acrosomal integrity and capacitation in the L-cysteine-supplemented groups than in the control. There was a biphasic effect of L-cysteine, with the highest percentage of progressive motility, viability and acrosomal integrity found in group III. In conclusion, addition of L-cysteine at a concentration of 5 or 10 mM to the LEY (Extender II) was the optimum concentration of L-cysteine for improving the quality of frozen-thawed boar semen. The objective of the second study was to determine the effects of using supernatant (seminal plasma: extender, 50:50 v/v) as post-thawing solution and semen extender on sow fertility. Twenty sows were allocated into the following experimental groups (5 in each group):Groups A (control), sows were inseminated with fresh semen, using a dose of 2×10^9 spermatozoa in 60 ml of Modena™ extender; Group B, sows were inseminated with frozen semen (supplemented with 10 mMol of L-cysteine), using a dose of 2×10^9 spermatozoa in 60 ml of Modena™ extender; Group C, sows were inseminated with frozen semen (supplemented with 10 mMol of L-cysteine), using a dose of 2×10^9 spermatozoa in 60 ml of supernatant (50% v/v of seminal plasma plus Modena™ extender); Group D, sows were inseminated with frozen semen (supplemented with 10 mMol of L-cysteine), using a dose of 4×10^9 spermatozoa in 60 ml of supernatant (50% v/v of seminal plasma plus Modena™ extender). All sows were inseminated twice using an intrauterine catheter depending on their weaning to oestrus interval (WOI). Pregnancy rate (PR), farrowing rate (FR), total number of piglet born (TNB) and number of piglet born alive (NBA) were recorded. In group A, the PR and FR were 100%, TNB and NBA were

7.8 ± 3.9 and 7 ± 3.9, respectively. For frozen semen, PR, FR, TNB and NBA in group C were higher than group D (100% versus 60%, 60% versus 0%, 6.0 ± 2.7 versus 0, 6.0 ± 2.7 versus 0, respectively). In group B, all the sows were not pregnant. However, in group D, all the sows were unexpectedly regular return to estrus. In conclusion, a tendency of increased PR and FR in sow is observed when using supernatant (50% V/V of seminal plasma plus Modena™) as post-thawing solution and semen extender for artificial insemination in field condition.