บทที่ 1
ความเป็นมาและวัตถุประสงค์ของโครงการ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

การผสมเทียมสุกรเป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากช่วยเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพการผสมติดในแม่สุกรแล้ว ยังสามารถตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อสุกรได้สะดวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย แต่มีข้อจำกัดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดซึ่งมีอายุการใช้งานเพียง 3 วัน สำหรับ shortterm extender หรือประมาณ 5-7 วัน สำหรับ longterm extender ดังนั้น ถ้าเกษตรกรต้องการเก็บรักษาลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีของสุกรพ่อพันธุ์ไว้นานเป็นปีหรือหลายปี การเก็บด้วยวิธีการแช่แข็งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ ในปัจจุบันนี้ ได้มีการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาลักษณะพันธุกรรมของสุกรพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะดี ไว้ใช้งานในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น แต่เซลล์อสุจิสุกรที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งจะค่อนข้างอ่อนแอ จากผลงานวิจัยการทำน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่ผ่านมา พบว่า คุณภาพของน้ำเชื้อจะลดลงหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งไม่ว่าจะเป็น การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์อสุจิ (sperm morphology) การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (sperm motility) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosomal efficiency) และอัตราการอยู่รอดของอสุจิ (survival rate) (Cerolini et al., 2001; Maldjian et al., 2005) ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมาจากหลายสาเหตุด้วยกัน ได้แก่ การเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ การเกิด cooling shock ในช่วงที่มีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้การเคลื่อนที่ไปทางด้านข้างของฟอสโฟไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ทำให้เกิดการแยกตัวของไขมัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับไม่ได้ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Barrios et al., 2000) และการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (free radicals หรือ reactive oxygenspecies) ชนิดต่างๆ (Aitken and Clarkson, 1988) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิทำให้ความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิลดลง (Barrios et al., 2000) และส่งผลกระทบต่ออัตราการผสมติดในแม่สุกรต่ำกว่าน้ำเชื้อสด 20-30% (Johnson et al., 2000) รวมทั้งอัตราการตั้งท้องและจำนวนลูกต่อครอกต่ำกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็น (Einarsson and Viring, 1973; Eriksson et al., 2002)

อนุมูลอิสระในน้ำเชื้อ เกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติจากการเมตาบอลิสมของออกซิเจน โดยอยู่ในรูป reactive oxygen species (ROS)ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิแดนซ์สูง ประกอบด้วย ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เพอร์รอกซ์ซิลล์ (peroxyl radicals) และไฮดรอกซ์ซิลล์ (hydroxyl radicals) ในสภาวะปกติ

นั้น จะพบสารอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อได้ในปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดความสมดุลขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยกระตุ้นการเกิดกระบวนการคาปาซิเตชั่น (capacitation) ของเซลล์อสุจิ กระตุ้นการยึดเกาะกันของเซลล์อสุจิกับ zona pellucida ของโอโอไซต์ และเป็นปัจจัยช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction อย่างไรก็ตาม เมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำให้ปริมาณน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วยเช่นเดียวกัน ทำให้อนุมูลอิสระในน้ำเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์อสุจิได้ พบว่า ระดับสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา ลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มี decrease fluidity ลดลงและพบการแตกตัวของสายดีเอนเอ(DNA fragmentation) การเกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอร์ออกซิเดชันที่มากเกินไป ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดน้อยลงและลดความสามารถในการรวมตัวกันของเซลล์อสุจิและโอโอไซต์ ระหว่างการปฏิสนธิ (Kim and Parthasarathy 1998; Shewita et al., 2005) การวิจัยของ Kaeoket และคณะ (2008) พบว่า การเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น water soluble vitamine E, glutathione, L-cysteine โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่ม L-cysteine ที่ความเข้มข้น 5mMol ลงไปใน freezing extender II ทำให้มีจำนวนเซลล์อสุจิที่เคลื่อนไหว จำนวนเซลล์อสุจิที่มีอะโครโซมปกติ และจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตมากกว่าการเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจาก cysteine มีคุณสมบัติสำคัญ ในการสังเคราะห์โปรตีน เป็นส่วนประกอบของกลูตาไทโอน และเป็นสารตั้งต้นของทอรีน(Stegink et al.,1986)และ cysteine มีความสามารถในการนำผ่านเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเซลล์สามารถนำไปผลิตทอรีนได้ พบว่า ทอรีนมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวเมื่อมีการเชื่อมต่อกับกรดไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Bucak et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของ L-cysteine ที่เหมาะสมหรือความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับใส่ใน freezing extender II ในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ดังนั้น การพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรโดยการใส่สารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ L-cysteine ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงไปใน freezing extender II จะช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง และส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งเพิ่มสูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระชนิด L-cysteine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการผ่านกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาผลของการนำ supernatant จากกระบวนการแช่แข็งกลับมาเป็น post-thaw solution และ semen extender ต่อประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของสุกรนางหลังจากผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง