บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

การผสมเทียมเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในปัจจุบัน โดยทั่วไปการผสมเทียมจะนิยมเจือจางน้ำเชื้อที่รีดได้จากพ่อสุกรด้วยสารละลายเจือจาง (extender) สามารถนำไปใช้ในการผสมเทียมได้ทันที หรือจะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 16-20องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ภายหลัง โดยจะสามารถเก็บได้เพียง 3-5 วัน ขึ้นกับชนิดของสารละลายเจือจางที่เลือกใช้ ข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาการเก็บรักษาที่สั้นนี้ ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อจากพ่อสุกรที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีให้คงสภาพไว้ก่อนถึงระยะเวลาการผสมที่ยาวนานได้ ดังนั้นเพื่อให้การเก็บน้ำเชื้อจากพ่อสุกรที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ดีทำได้ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ลดค่าใช้จ่ายจากการขนส่งพ่อสุกรหรือน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากต่างประเทศ ลดความเสี่ยงต่อการกระจายโรคติดต่อ เพิ่มระยะการใช้งานน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ให้มากกว่าการใช้งานพ่อสุกรจริง เนื่องจากพ่อพันธุ์มีอายุการใช้งานสั้น (ไม่เกิน 3 ปี) ตลอดจนเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สายพันธุ์แท้ (purebred) ให้ได้มากที่สุด เทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอสุจิ (frozen semen) จึงได้ถูกนำเข้ามาใช้ในการผลิตสุกร

เทคโนโลยีในอุตสาหกรรมการผลิตโค โดยใช้การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งได้รับความสำเร็จเป็นอย่างมาก แต่ในสุกรมีข้อจำกัดในหลายด้าน ได้แก่ ความต้องการปริมาณตัวอสุจิที่มากในการผสมเทียมต่อ 1 ครั้งของการผสมและความยากของกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Bathgate etal.,2008) เนื่องจากเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (plasma membrane) ของสุกรค่อนข้างไวต่อการแช่แข็ง และถูกทำลายระหว่างการแช่แข็ง ทำให้อัตราการอยู่รอด (survival rate) หลังการแช่แข็งของตัวอสุจิค่อนข้างต่ำและมีชีวิตอยู่ค่อนข้างสั้น (Einarsson and Viring, 1973) ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน ได้แก่ การเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ การเกิด cooling shock ในช่วงที่มีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้การเคลื่อนที่ไปทางด้านข้างของฟอสโฟไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง และทำให้เกิดการแยกตัวของไขมันซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับไม่ได้ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Barrios et al., 2000) และการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (Free radicals, Oxidants, Reactive OxygenSpeices) ชนิดต่างๆ (Aitken and Clarkson, 1988) ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความชุ่มฉ่ำลดลง (decrease fluidity)เกิดการแตกตัวของสายดีเอ็นเอ ลดความ่สามารถในการรวมตัวกันของอสุจิและไข่ในการเกิดการปฏิสนธิ เนื่องจากตัวอสุจิของสุกรมีโครงสร้างบริเวณผิวเซลล์เป็นชั้นไขมัน ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก (Nakatsukasaet al.,2001) เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิจะทำให้

ความสามารถในการมีชีวิตของตัวอสุจิลดลง (Barrios et al., 2000) และทำให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อสด 20-30% (Johnson et al., 2000) อัตราการตั้งท้อง และจำนวนลูกต่อครอก ที่ต่ำกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็นด้วย (Einarsson andViring, 1973; Eriksson et al., 2002)

อนุมูลอิสระในน้ำเชื้อนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติจากการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนโดยจะอยู่ในรูป Reactive oxygen species (ROS)ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิแดนซ์สูง ประกอบด้วย ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\bullet -}$), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2), เพอร์รอกซ์ซิลล์ (peroxyl radicals) และ ไฮดรอกซ์ซิลล์ (hydroxyl radicals, HO•) ในสภาวะปกติจะพบสารอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อได้ในปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดความสมดุลขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาคาปาซิเตชันของตัวอสุจิ กระตุ้นการเกิดการยึดเกาะกันของตัวอสุจิกับชั้น zona pellucida ของไข่ และเป็นสารช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำให้ปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วยเช่นเดียวกัน ทำให้เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายกับตัวอสุจิได้ โดยพบว่าการมีระดับสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบหลักส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความซุ่มฉ่ำลดลง (decrease fluidity)และพบการแตกออกของสายดีเอนเอ(DNA fragmentation) การเกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน ที่มากเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดน้อยลงและความสามารถในการเกิดการรวมตัวกันของอสุจิและไข่ในการเกิดการปฏิสนธิลดลง (Kim and Parthasarathy, 1998; Sheweita et al., 2005; Roca et al. 2004)

การวิจัยของ Kaeoket et al. (2008) พบว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น water soluble vitamine E, glutathione, L-cysteine โดยเฉพาะการใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 5mMol ลงใน Freezing extender II สามารถทำให้มีจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหว มีจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมปกติ และมีชีวิตมากกว่าการใส่สารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากcysteine มีคุณสมบัติที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน เป็นส่วนประกอบของกลูตาไทโอน และเป็นสารตั้งต้นของทอรีน(Stegink et al.,1986)และซิสเทอีนเองมีความสามารถในการถูกขนส่งเข้าเซลล์อย่างรวดเร็ว และเซลล์สามารถนำไปผลิตทอรีนได้ ซึ่งทอรีนมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวเมื่อมีการเชื่อมกับกรดไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของ L-cysteine ที่เหมาะสมสำหรับใส่ใน Freezing extender II ทั้งนี้เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งจะมีการนำไปปั่นเหวี่ยงและแยกส่วนใสซึ่งมีน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนประกอบ (supernatant =seminal plasma + semen extender) ออก ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจินี้จะมีผลต่อความสามารถของตัวอสุจิหรือไม่ โดยปกติแล้ว น้ำเลี้ยงเชื้อจะมีสารต่างๆ ที่เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นสำหรับตัวอสุจิ ตัวอสุจิมีความต้องการพลังงานสูงเพื่อที่จะเคลื่อนไหวอยู่ในระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียเป็นตัวกลางในการขนส่งตัวอสุจิซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิโดยทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิดีขึ้น (Garcia et al., 2007) ลดการเก็บกินตัวอสุจิจากเม็ดเลือดขาวในมดลูกทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดอยู่ในมดลูกได้นานขึ้น (Rozeboom et al., 1999)เพิ่มการบีบตัวของมดลูกช่วยขนส่งอสุจิไปยังจุดที่เกิดการปฏิสนธิ โดยการบีดรัดตัวของมดลูกทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิในท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัสสูงทำให้ท่อนำไข่ส่วนนี้มีการคลายตัวซึ่งจะทำให้ส่วนต่อระหว่างอิสธ์มัสกับปลายปีกมดลูกมีการขยายตัวทำให้น้ำเชื้อจากปีกมดลูกเข้าไปท่อนำไข่ได้มากขึ้น(Roberson, 2007) นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของสุกรในทางอ้อมอีกด้วย เชื่อกันว่าเอสโตรเจนที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิทำให้เกิดการหลั่งของสารโพรสตาแกลนดินจากเนื้อเยื่อบุโพรงมดลูกไปยังรังไข่ โดยผ่านทางระบบหมุนเวียนเลือดและระบบน้ำเหลืองที่เชื่อมโยงจากปีกมดลูกไปยังรังไข่ดังนั้นจะเห็นว่าการทำงานของเอสโตรเจนและสารโปรตีนที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิเป็นการทำงานแบบเฉพาะที่(Kaeoket and Tummaruk, 2002)

น้ำเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่รอดของตัวอสุจิและต่อการปฏิสนธิกับไข่น้ำเลี้ยงเชื้อจะเป็น neutral และ isotonic liquid ประกอบด้วยสารโปตัสเซียมแคลเซียมและแมกนีเซียมโดยจะไปรวมกับคลอไรด์และฟอสเฟตซึ่งจะมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ (cations) โปตัสเซียมและแมกนีเซียมจะช่วยเพิ่มการมีชีวิตของตัวอสุจิในขณะที่แคลเซียมและโลหะหนักจะเป็นตัวกำจัดหรือไม่ยอมให้มีชีวิตน้ำเลี้ยงเชื้อยังประกอบไปด้วยโปรตีนกรดอะมิโนกรดไขมันไวตามินและเอนไซม์ต่างๆความสำคัญทางชีวะเคมีของสารอนินทรีย์บางตัวในน้ำเลี้ยงเชื้อเช่นน้ำตาลฟรุกโตสกรดซิกตริกเออร์โกไธโอนีอินอิโซิตอลฟอสฟออรีลคลอลีนและไกลเซอร์โรฟอสอรีลคลอลีนสารต่างๆเหล่านี้ถูกสังเคราะห์มาจาก Accessory glands โดยการกระตุ้นของฮอร์โมน Testosterone จากอัณฑะ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาส่วนประกอบจะพบว่าส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันและในพ่อสุกรตัวเดียวกันในการหลั่งแต่ละครั้งก็มีความแตกต่างกันนอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลก็มีผลต่อความแตกต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย (Tetsumaet al.,2007) อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆอีกที่มีผลต่อส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการหลั่งน้ำเชื้อแล้ว เช่นปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ยังมีอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อและ metabolic activity ของตัวอสุจิเองโดยสารต่างๆในน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิมีประโยชน์ ดังนี้

เอสโตรเจน ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีประมาณ 11.5 ไมโครกรัมต่อการหลั่งน้ำเชื้อ1 ครั้งจะมีผลดีต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิในมดลูกและมีผลดีต่อการตกไข่ของตัวสุกร

พลอสตาแกลนดิน (Prostaglandins)เป็น derivative ของ unsaturated fatty acid ในสุกรจะมีต่ำกว่า100 ng/ml PGE และ PGF สร้างที่ต่อม seminal vesicle มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอสุจิในระบบสืบพันธุ์เพศเมียโดยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อเรียบ

กรดซิตริกไม่ใช่แหล่งพลังงานที่สำคัญของตัวอสุจิแต่อาจจะเป็นตัวที่ทำให้ตัวอสุจิเกิดการเกาะกลุ่มกันในสัตว์บางชนิดและอาจช่วยป้องกันพิษจากโลหะหนักที่จะมีผลต่อตัวอสุจิได้

ไกลเซอโรฟอสฟอริลคลอลีนเป็นตัวแทนของฟอสเฟอร์และคลอลีนเกือบจะทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อไกลเซอร์โรฟอริลคลอลีนพบมากในน้ำเชื้อของพ่อสุกรและเป็นตัวส่งเสริมการใช้พลังงานของตัวอสุจิภายหลังการผสมพันธุ์

น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับตัวอสุจิmetabolism ของน้ำตาลฟรุคโตสขึ้นอยู่กับจำนวนของตัวอสุจิมีชีวิตและการทดสอบ Fructolysis เป็นวิธีตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้ผลอีกวิธีหนึ่ง

โปรตีนและกรดอะมิโน เป็นตัวป้องกันปฏิกิริยาของตัวอสุจิจากโลหะหนักเป็นตัว neutralize การทำลายของโลหะหนักและป้องกันการรวมตัวของตัวอสุจิ บทบาทของสารประกอบอื่นๆ ยังไม่ชัดเจน เช่นคาร์นีทีน (Carnitine) ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

รีแลกซิน(Relaxin) ช่วยในการขนส่งตัวอสุจิในระบบสืบพันธุ์ของตัวเมียเนื่องจากไปกระตุ้นการบีบรัดของมดลูก

อิโนซิทอล(Inosital) เป็นสารอนินทรีย์ที่มีอยู่มากเช่นเดียวกับกรดซิตริกอิโนซิทอลจะถูก metabolized โดยตัวอสุจิ

ออร์โกไธโอนีอินเป็น base ซึ่งทำให้เกิดการลดและการเพิ่มกลุ่มซัลเฟอร์ซึ่งกลุ่มซัลเฟอร์จะแสดงบทบาทในการป้องกันกลุ่มซัลเฟอร์ใน intracellular ของตัวอสุจิซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

จากการทดลองของ Okazaki et al.(2009) พบว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำเชื้อแช่แข็ง 10% ใส่เข้าไปในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเพิ่มอัตราการผสมติดในแม่สุกรให้เป็น 70% ได้ เนื่องจากน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิทำให้เกิดกระบวนการ reverse capacitation และ acrosome reaction ทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น (Vadnaiset al.,2005) และ acrosome reaction และลดกระบวนการอักเสบในมดลูกในระบบสืบพันธุ์เพศเมียเปรียบเทียบกับกลุ่มแม่สุกรที่ไม่ได้มีการใช้น้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิซึ่งที่มีอัตราการคลอดเพียง 9% เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากมีการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ capacitation ในระหว่าง

การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (post-thawing processes) และทำให้มีจำนวน capacitated sperms มากกว่าในน้ำเชื้อสด ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานหลังจากละลาย (Vishwanath et al.,1997) และส่งผลให้ความสามารถในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิลดลง นอกจากนี้มีการรายงานว่าการนำน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิมาใช้สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิได้ (Tso and Lee., 1980) การใช้น้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิในกระบวนการแช่แข็งในช่วงก่อนเข้ากระบวนการแช่แข็งนั้นแม้ว่าจะสามารถลดความเสียหายที่เกิดจากกระบวนการแช่แข็ง (cryoinjury) ในระหว่างการลดอุณหภูมิและทำการแช่แข็งรวมทั้งกระบวนการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง(Rodriguez-Martinez et al.,2008) แต่ก็ยังเกิดความเสียหายจากขั้นตอนอื่นๆได้อีก เช่นกระบวนการปั่นแยกการแห้งน้ำ (dehydration) ในระหว่างการแช่แข็งหรือ rehydration ในระหว่างการทำละลาย ดังนั้นจุดประสงค์ของการใช้ supernatant เป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (post-thawing solution) และสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender) แทนเพื่อเพิ่มอัตราการผสมติดในแม่สุกรโดยการทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิดีขึ้นและลดกระบวนการ capacitation ที่จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการทำละลาย

อีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การผสมเทียมในสุกรประสบความสำเร็จก็คือเวลาในการผสมเทียม (timing of insemination) เป็นที่ยอมรับกันว่าการผสมเทียมที่จะให้ได้อัตราการปฏิสนธิสูงนั้นควรทำการผสมเทียมสุกรภายใน 24 ชั่วโมงก่อนการตกไข่สำหรับน้ำเชื้อสด (Soede et al., 1995; Nissen et al., 1997, Kaeoket et al., 2002, 2005) และภายใน 4 ชั่วโมงก่อนการตกไข่สำหรับน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง (Waberski et al., 1994) และโอโอไซต์ของสุกรมีความสามารถที่จะถูกปฏิสนธิได้ระหว่าง 8-12 ชั่วโมงหลังจากตกไข่เท่านั้น (Hunter, 1967; Hunter and Dziuk, 1968) ดังนั้นจะเห็นว่าความสำเร็จของการผสมเทียมจะเกิดขึ้นได้นั้นจำเป็นต้องประสานความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระยะเวลาในการผสม (timing of insemination) และเวลาในการตกไข่ (ovulation time) ของสุกรเข้าด้วยกัน แต่ในความเป็นจริงนั้นถ้าปราศจากเครื่องอัลตราซาวด์ที่ใช้ช่วยในการตรวจการตกไข่แล้วก็เป็นการยากที่จะทราบเวลาในการตกไข่ของสุกรโดยเฉพาะในภาคสนาม (field condition) ดังนั้น Kemp and Soede (1996) จึงได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ ระยะจากหย่านมจนถึงแสดงอาการเป็นสัด (weaning to oestrus interval, WOI) ระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่งเพื่อรับการผสม (duration of oestrus) และเวลาในการตกไข่ (ovulation time) พบว่าการตกไข่ของสุกรเกิดขึ้นประมาณ 2/3 ของระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่งเพื่อรับการผสม (duration of oestrus) และนักวิจัยกลุ่มนี้ยังพบว่าสุกรที่มีระยะจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัดสั้น (เช่น 3-4 วัน) สุกรจะแสดงอาการเป็นสัดนาน (long oestrus duration) ดังนั้นจะทำให้ เวลาในการตกไข่ยาวออกไปด้วย ในทางกลับกันสุกรที่มีระยะจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัดยาว (เช่น 5-7 วัน) สุกรจะแสดงอาการเป็นสัดสั้น (short oestrus duration) ดังนั้นจะ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ทำให้ เวลาในการตกไข่สั้นเข้ามา จากความสัมพันธ์ของทั้งสามปัจจัยนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวางโปรแกรมการผสมเทียมให้อยู่ภายใน 24 ชั่วโมงก่อนการตกไข่ กล่าวคือ ถ้าสุกรมีระยะ WOI ยาว ผู้ผสมต้องผสมเทียมสุกรให้เร็ว คือ ควรผสมทันทีที่สุกรแสดงอาการเป็นสัดสุกรและผสมซ้ำอีกครั้ง 12 ชั่วโมงต่อมา แต่ถ้าสุกรมีระยะ WOI สั้น ผู้ผสมไม่ต้องรีบผสมเทียมสุกร คือ ควรผสมสุกรหลังแสดงอาการเป็นสัดประมาณ 24 ชั่วโมง และผสมซ้ำอีกครั้งใน 12 ชั่วโมงต่อมา ซึ่งพบว่ามีอัตราการตั้งท้องและอัตราการเข้าคลอดเป็นที่น่าพอใจในน้ำเชื้อสด (Kaeoket et al., 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานถึงการอาศัยความสัมพันธ์ของระยะจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัด (weaning to oestrus interval, WOI) ระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่งเพื่อรับการผสม (duration of oestrus) และเวลาในการตกไข่ (ovulation time) มาประยุกต์ใช้ในการผสมเทียมสุกรโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในภาคสนาม (field condition)

จากการทบทวนวรรณกรรมและผลงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งและการนำไปใช้ผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร การเติมสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ L-cysteine เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งได้ แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใส่ลงไปใน freezing extender II ในขณะเดียวกันการนำน้ำเชื้อแช่แข็งของสุกรที่ได้ไปผสมเทียมก็ต้องการการพัฒนา การทบทวนผลงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าการนำ supernatant (seminal plasma + semen extender) จากกระบวนการแช่แข็งกลับมาใช้อีก ประกอบกับการนำความสัมพันธ์ของระยะจากหย่านมถึงแสดงอาการเป็นสัด (weaning to oestrus interval, WOI) ระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่งเพื่อรับการผสม (duration of oestrus) และเวลาในการตกไข่ (ovulation time) มาประยุกต์ใช้น่าจะช่วยให้การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของสุกรมีประสิทธิภาพมากขึ้น