บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1

การประเมินคุณภาพและสถานะของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสด

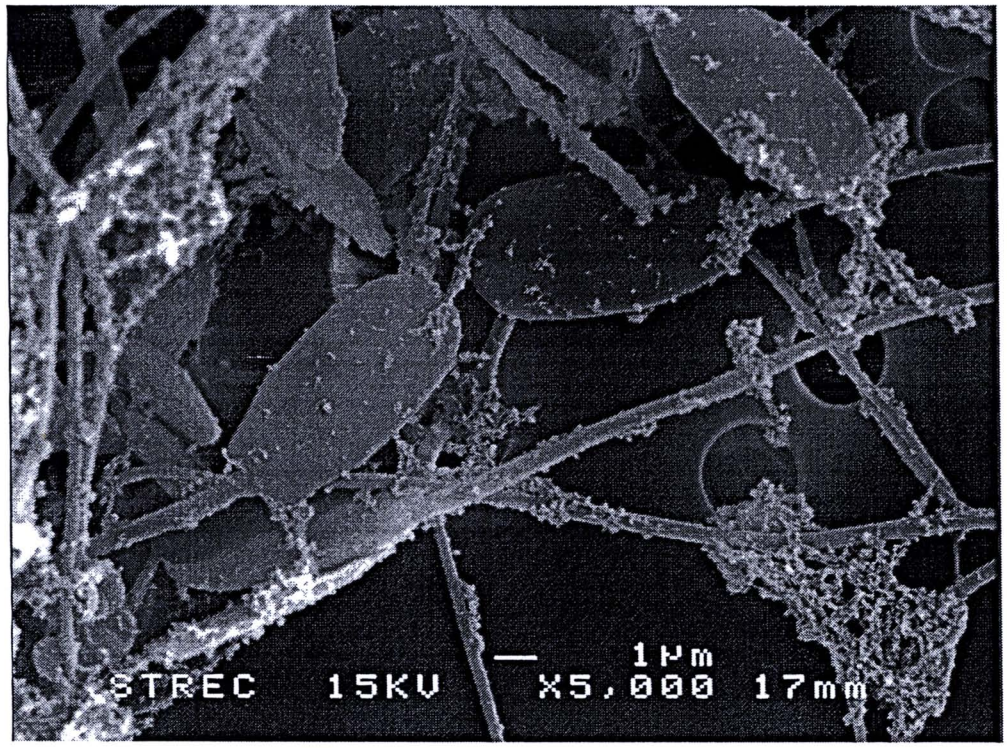
น้ำเชื้อสดที่รีดได้จากพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณภาพมาตรฐานตามที่กำหนด ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า >75% จำนวนเซลล์อสุจิมีชีวิต >75% โดยสุกรพันธุ์ดูร็อค จะมีแนวโน้มของเซลล์อสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวและจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตอยู่ในอัตราที่ดีกว่าสุกรพันธุ์แลนด์เลซและลาร์จไวท์ เมื่อตรวจสอบสถานะการเกิดคาปาซิเตชั่นและสภาพของ acrosome ของเซลล์อสุจิ พบว่า เซลล์อสุจิจากสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนเซลล์อสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ (F-pattern, intact spermatozoa) 78-80% และมีสภาพของ acrosome ที่สมบูรณ์อยู่ที่ 75-80% นอกจากนี้ สถานะของเซลล์อสุจิที่เกิดคาปาซิเตชั่นตามธรรมชาติจะอยู่ที่ 15-18% และเกิด acrosome reaction ที่ 4-5%

ตารางที่ 2.2ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) ของคุณภาพน้ำเชื้อสดและสถานะของเซลล์ในน้ำเชื้อสุกรสดก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งในพ่อสุกร 3 สายพันธุ์

Sperm Parameter	Duroc	Landrace	Large White
Volume (ml)	173.25±50.68	186.00±38.40	233.00±96.56
Concentration (x10^6/ml)	407.25±25.17	382.25±25.17	308.25±87.84
Progress motility (%)	81.25±2.50	78.75±4.68	75.50±5.00
Viability (%)	84.25±6.33	78.37±7.11	75.77±12.42
Capacitation status (%)			
F-pattern	79.87±5.10	80.25±5.73	78.25±3.30
B-pattern	15.37±1.70	14.75±5.61	18.25±3.77
AR-pattern	4.75±4.01	5.00±1.82	3.50±1.29
Acrosome integrity (%)			
Intact acrosome	80.75±11.80	81.50±4.91	74.75±8.30

ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

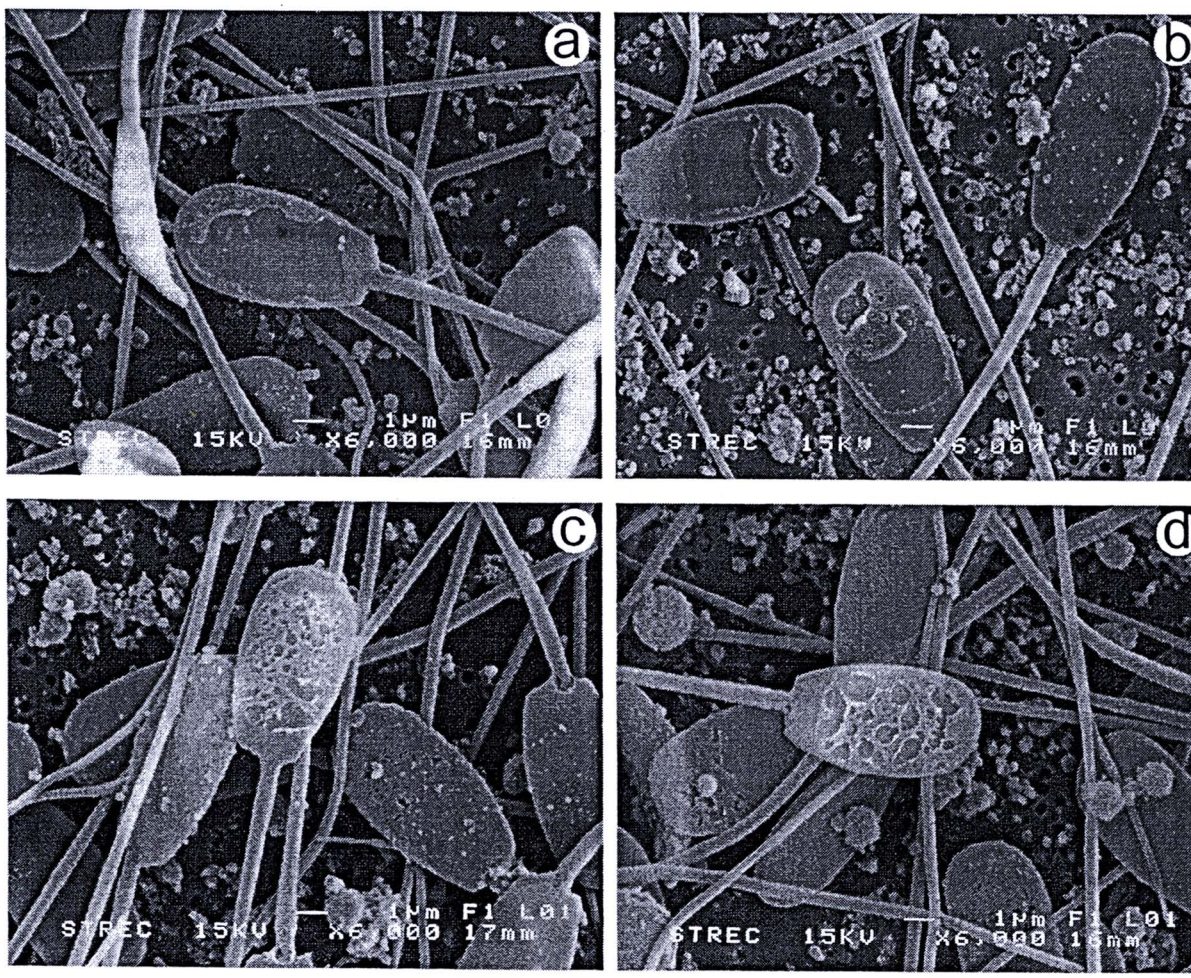
ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่พบในน้ำเชื้อสดของพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เซลล์อสุจิโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียบสมบูรณ์ ไม่พบร่องรอยความเสียหายหรือฉีกขาด อาจพบเศษของสารหรือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเชื้อเกาะอยู่บนพื้นผิวเล็กน้อย (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 เซลล์อสุจิที่กระจายอยู่ในน้ำเชื้อสดของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สังเกตลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่พบมีความสมบูรณ์ ไม่พบการฉีกขาดหรือความเสียหาย (กำลังขยาย x5000)

ในขณะที่ เซลล์อสุจิที่พบในน้ำเชื้อของพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง และเติมสารต้านอนุมูลอิสระ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 mMol (รูปที่ 2.6a-d) พบว่า ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถพบร่องรอยความเสียหายหรือฉีกขาดเกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิในลักษณะที่แตกต่างกันไป ตั้งแต่การพบรอย

ถลอกของเยื่อหุ้มเซลล์แต่เยื่อหุ้มไม่ลอกหลุด หรือลักษณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ลอกหลุดไปเกือบหมด โดยเซลล์อสุจิดังกล่าวนี้กระจายปะปนอยู่กับเซลล์อสุจิที่มีสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์



รูปที่ 2.6 เซลล์อสุจิในน้ำเชื้อของพ่อสุกรที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง ที่มีการเติม L-cysteine ที่ความเข้มข้น 0 mMol (a), 5 mMol (b), 10 mMol (c) และ 15 mMol (d) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สังเกตลักษณะความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่เกิดขึ้นในลักษณะที่แตกต่างกันและพบได้ในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เติมและไม่เติม L-cysteine(กำลังขยาย x6000)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การประเมินคุณภาพและสถานะของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง

ภายหลังกระบวนการแช่แข็ง ได้มีการประเมินคุณภาพและสถานะของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยในตารางที่ 2.3แสดงถึงอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ปริมาณเซลล์อสุจิที่มีชีวิตเมื่อตรวจสอบด้วยการย้อม SYBR-14/PI และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยการย้อม FITC-PNA ผลการตรวจสอบไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ดังกล่าวในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ดี เซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ผ่านการแช่แข็งซึ่งใส่ L-cysteine ในปริมาณ 10 mMol จะมีแนวโน้มของเซลล์อสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซมสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ใส่ L-cysteine และที่ใส่ L-cysteine ที่ 5 และ 15 mMol

ตารางที่ 2.3ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) ที่แสดงคุณภาพและสถานะของเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรซึ่งใช้ L-cysteine ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในพ่อสุกร 3 สายพันธุ์

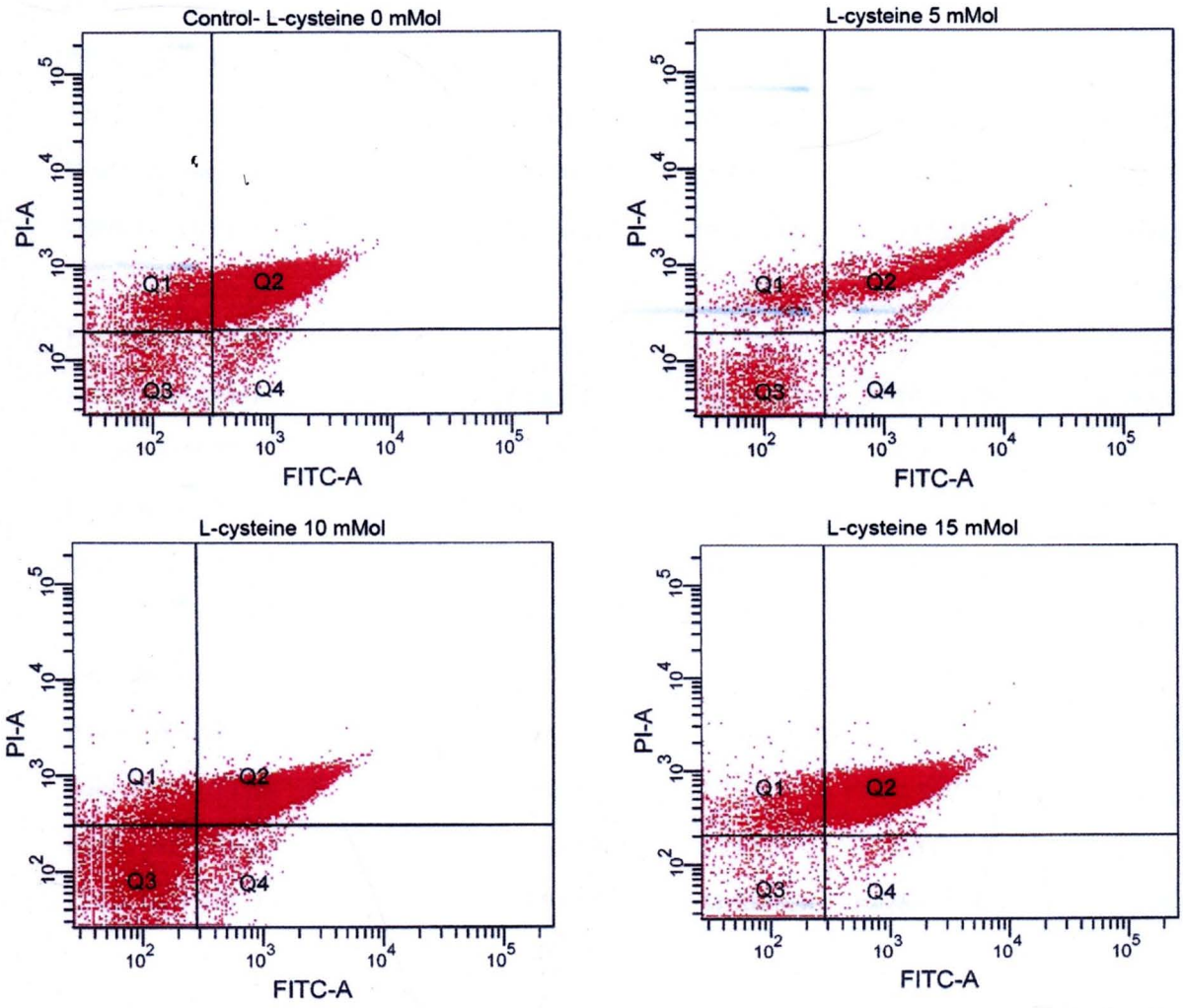
Sperm parameters (%)	Concentration of L-cysteine			
	0 mMol	5 mMol	10 mMol	15 mMol
Duroc (n=4)				
Progress motility	35.1±19.1	32.5±15.5	48.7±13.1	23.7±18.8
Sperm viability	39.6±11.1	50.5±15.8	59.0±13.6	37.1±14.9
Intact acrosome	45.1±11.2	48.2±8.4	50.4±12.4	35.7±4.8
Landrace (n=4)				
Progress motility	31.2±19.3	33.7±14.9	43.7±4.8	25.0±5.8
Sperm viability	32.3±18.1	25.1±8.3	41.8±24.5	23.6±9.0
Intact acrosome	42.0±3.6	49.7±5.5	53.8±3.6	43.2±4.7
Large White (n=4)				
Progress motility	23.7±12.5	17.5±9.2	33.7±4.8	17.5±9.6
Sperm viability	21.5±7.5	15.6±5.4	37.4±18.2	18.3±10.5
Intact acrosome	37.8±8.1	49.1±6.4	54.6±4.2	45.6±1.9

เมื่อตรวจสอบสถานะการเกิดคาปาซิเตชั่นของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการย้อมด้วยสี CTC (ตารางที่ 2.4) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งใน F-pattern, B-patternและ AR-pattern ของสุกรแต่ละสายพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาถึงลักษณะของ F-pattern ซึ่งบ่งชี้ถึงปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตโดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ พบว่า เซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งซึ่งใส่ L-cysteine ในปริมาณ 10 mMol มีแนวโน้มสูงขึ้นมากกว่าเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งอื่นๆ

ตารางที่ 2.4ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) แสดงสถานะของเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรซึ่งใช้ L-cysteine ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสุกร 3 สายพันธุ์โดยผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี CTCstaining

Capacitation status (%)	Concentration of L-cysteine			
	0 mMol	5 mMol	10 mMol	15 mMol
Duroc (n=4)				
F-pattern	33.7±15.7	35.2±7.5	45.0±7.5	30.2±8.6
B-pattern	23.7±9.6	25.0±6.2	28.7±8.4	27.2±16.4
AR-pattern	42.5±21.1	39.2±12.9	26.2±6.0	42.5±16.1
Landrace (n=4)				
F-pattern	15.25±5.9	21.5±6.2	29.7±8.5	19.0±5.7
B-pattern	54.0±23.1	51.0±23.6	50.3±14.1	54.0±23.1
AR-pattern	30.8±22.4	27.3±17.7	20.0±8.0	27.1±20.8
Large White (n=4)				
F-pattern	16.7±7.1	20.5±2.6	23.5±5.9	18.5±3.6
B-pattern	62.3±3.5	57.0±4.0	61.3±11.3	67.3±11.1
AR-pattern	21.0±6.3	22.5±6.5	15.3±7.9	14.7±3.7

ในการตรวจสอบสภาพการมีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ให้มีความถูกต้องแน่นอนมากยิ่งขึ้น จึงได้ย้อมเซลล์อสุจิด้วย Annexin-V/PI แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (รูปที่ 2.7) ถึงแม้ว่า ผลการทดลองที่ได้จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2.5) แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ แนวโน้มของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งซึ่งใส่ L-cysteine ในปริมาณ 10 mMol ที่อยู่ในสภาพมีชีวิตและมีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (AN-/PI-) มีอัตราสูงขึ้นมากกว่าเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งอื่นๆ



รูปที่ 2.7 FCS/SCC two-dimensional histogram แสดงผลการย้อมเซลล์อสุจิด้วย Annexin-V/PI จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เติม L-cysteine ใน extender ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 mMol สังเกตที่ช่อง Q3 ของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งที่ใส่ L-cysteine ที่ ระดับความเข้มข้น 10 mMol จะพบเซลล์อสุจิที่มีชีวิตและสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์มากกว่าน้ำเชื้อในกลุ่มความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 2.5ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) แสดงสถานะภาพของเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรซึ่งใช้ L-cysteine ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในสุกร 3 สายพันธุ์โดยผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี Annexin-V/PI assay และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

Sperm parameters (%)	Concentration of L-cysteine			
	0 mMol	5 mMol	10 mMol	15 mMol
Duroc (n=4)				
Alive: (AN–/PI–)	8.7±2.1	15.1±8.5	24.7±12.2	11.2±9.3
Alive: (AN+/PI-)	0.8±1.0	0.8±1.2	1.6±2.1	0.5±0.5
Dead: (AN–/PI+)	30.4±14.9	15.7±5.9	16.2±8.1	14.8±7.5
Dead: (AN+/PI+)	60.0±12.7	68.2±13.6	57.8±16.6	73.4±15.6
Landrace (n=4)				
Alive: (AN–/PI–)	8.8±5.8	16.3±6.6	19.1±7.7	6.9±4.8
Alive: (AN+/PI–)	2.8±2.0	4.5±3.6	4.8±2.4	4.3±3.9
Dead: (AN–/PI+)	16.3±12.4	8.2±2.0	15.0±12.3	6.3±2.2
Dead: (AN+/PI+)	71.9±18.5	70.9±9.0	60.9±14.7	82.6±7.4
Large White (n=4)				
Alive: (AN–/PI–)	8.6±3.9	11.4±8.2	17.2±9.4	11.0±6.3
Alive: (AN+/PI–)	3.2±2.9	2.7±3.0	4.3±2.5	3.1±3.2
Dead: (AN–/PI+)	10.3±5.6	8.2±3.6	10.6±6.1	10.2±1.6
Dead: (AN+/PI+)	77.9±5.8	77.7±10.9	67.9±16.2	75.8±10.8

เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้ในน้ำเชื้อของพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์มาวิเคราะห์ร่วมกันทั้งหมด และตรวจสอบค่าทางสถิติตามพารามิเตอร์ต่างๆ ของเซลล์อสุจิ (ตารางที่ 2.6) พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งซึ่งใส่ L-cysteine ที่ 10 mMol มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ใส่ L-cysteine ที่ 5 และ 15 mMol แต่ไม่พบความแตกต่างในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมที่สำคัญ พบว่า ปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีอะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) ปริมาณของเซลล์อสุจิมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (F-pattern) และปริมาณเซลล์อสุจิที่มีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ปกติที่ไม่ติดสี (AN-/PI-) ในน้ำเชื้อที่ใส่ L-cysteine ที่ 5 และ 10 mMol มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ใส่ L-cysteine 15 mMol และน้ำเชื้อกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ดี ปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตทั้ง 3 พารามิเตอร์ในน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ใส่ L-cysteine ที่ 10 mMol จะมีแนวโน้มสูงกว่าเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ใส่ L-cysteine ที่ 15 mMol

ตารางที่ 2.6ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) ของคุณภาพน้ำเชื้อและสถานะของเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรโดยวิเคราะห์รวมทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่งใช้ L-cysteine ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Sperm parameters (%)	Concentration of L-cysteine			
	0 mMol	5 mMol	10 mMol	15 mMol
Progress motility (n=12)	30.1±16.1^{ab}	25.9±14.5^{a}	42.1±10.1^{b}	22.1±11.9^{a}
Sperm viability (n=12)	39.6±11.1^{ab}	29.7±18.5^{a}	46.1±20.0^{b}	31.2±12.9^{a}
Intact acrosome (n=12)	42.7±9.2^{a}	48.0±7.6^{b}	52.9±7.3^{b}	40.7±6.8^{a}
F-pattern (n=12)	21.9±8.7^{a}	25.7±5.7^{b}	32.7±11.5^{b}	22.5±8.1^{a}
B-pattern (n=12)	46.6±19.6^{a}	44.5±17.5^{a}	46.8±24.3^{a}	49.5±19.4^{a}
AR-pattern (n=12)	31.4±12.1^{a}	29.6±14.03^{a}	20.5±8.1^{a}	27.0±8.2^{a}
Alive: (AN–/PI–) (n=12)	8.7±2.1^{a}	14.3±7.4^{b}	20.3±9.6^{b}	9.7±6.7^{a}
Alive: (AN+/PI-) (n=12)	2.3±2.0^{a}	2.7±2.9^{a}	3.5±2.6^{a}	2.5±3.1^{a}
Dead: (AN–/PI+) (n=12)	18.9±4.7^{a}	10.6±5.3^{a}	13.9±8.7^{a}	10.4±5.5^{a}
Dead: (AN+/PI+) (n=12)	69.9±13.7^{ab}	72.3±11.1^{ab}	62.2±15.1^{a}	77.2±11.3^{b}

*Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different ($P < 0.05$)

ผลการทดลองที่ 2

พบว่าสุกรนางในกลุ่ม A มีอัตราการตั้งท้องและอัตราเข้าคลอด 100% ให้จำนวนลูกสุกรต่อครอกและจำนวนลูกสุกรมีชีวิต 7.8±3.9 และ 7±3.9 ตามลำดับ ในขณะที่สุกรนางในกลุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งกลุ่ม C มีอัตราการตั้งท้อง อัตราเข้าคลอด จำนวนลูกสุกรต่อครอกและจำนวนลูกสุกรมีชีวิตที่มากกว่า (P>0.05) สุกรนางในกลุ่ม D (100% เทียบกับ 60%, 60% เทียบกับ 0% ตามลำดับ; 6±2.7 ตัวเทียบกับ 0 ตัวและ 6±2.7 ตัวเทียบกับ 0 ตัวตามลำดับ) ถึงอย่างไรก็ตามเป็นสิ่งที่ไม่คาดคิดมาก่อนว่าสุกรนางในกลุ่ม D จะกลับสัดตรงรอบหลังจากผสม (ตารางที่ 2.7) และสุกรนางในกลุ่ม B ผสมไม่ติดทั้งหมด

ตารางที่ 2.7 จำนวนลูกสุกรที่คลอดทั้งหมด จำนวนลูกสุกรที่คลอดและมีชีวิต อัตราการตั้งท้อง และอัตราการเข้าคลอด (Means ± S.D.) หลังจากผสมเทียมในกลุ่มต่างๆ (Group A=Fresh semen; Group B = Frozen semen +Modena™; Group C=Frozen semen + Supernatant (2 billion); Group D=Frozen semen + Supernatant (4 billion))

Parameters	Group A	Group B	Group C	Group D
Pregnancy rate (%)	100 (n=5)	0	100 (n=5)	60 (n=5)
Farrowing rate (%)	80 (n=4)*	-	60(n=3)**	0 (n=5)
Total number of piglet born	7.8±3.9 (n=4)	-	6.0 ±2.7 (n=3)	-
Piglet born alive	7.0±3.9 (n=4)	-	6.0 ±2.7 (n=3)	-

*One sow dead during experiment, **2 sows abortion at 24 days with 6 embryos and 34 days with 9 embryo after insemination