บทที่ 5
วิจารณ์

จากผลการศึกษาในการทดลองที่ 1พบว่า เซลล์อสุจิของพ่อสุกรที่ผ่านการกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย มีความเสียหายเกิดขึ้นได้ โดยเฉพาะส่วนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหลักประการหนึ่งที่ทำให้เซลล์อสุจิตายเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์อสุจิมีชีวิตที่ยังมีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ในน้ำเชื้อที่ผ่านแช่แข็งและทำละลายจากการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ กัน ก็ยังมีอยู่ในสัดส่วนที่ยอมรับได้คือ 20-50% โดยเฉพาะในน้ำเชื้อของพ่อสุกรที่ใส่สารต้านอนุมูลอิสระ L-cycteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 mMol

กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิด reactive oxidative substances (ROS) มากเกินไป ส่งผลกระทบต่อเซลล์อสุจิให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งเยื่อหุ้มของเซลล์อสุจิเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี (Watson, 2000) สิ่งที่เกิดขึ้นคือ คุณภาพและความสามารถของเซลล์อสุจิในลักษณะต่างๆ เช่น การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของโครงสร้างส่วนหัว และประสิทธิภาพในการเข้าปฏิสนธิ จะลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสด ซึ่งผลดังกล่าวเกิดขึ้นจากการที่มี ROS เพิ่มขึ้น (Roca et al., 2004, Jeong et al., 2009) การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของสุกร มีส่วนประกอบของ polyunsaturated fatty acids (PUFA) ในปริมาณสูง ส่งผลให้เกิดสภาวะ lipid peroxidation อันเนื่องมาจาก ROS ที่มากเกินไปได้ง่ายกว่าเซลล์อสุจิของสัตว์ชนิดอื่นๆ (Baumber et al., 2000; Roca et al., 2005) ซึ่งยืนยันได้จากการศึกษาที่ผ่านมาในน้ำเชื้อสุกร (Ortman and Rodriguez-Martinez, 1994) และสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสุกรในน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร มีความเสียหายเกิดขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ในขั้นตอนต่างๆ ของการแช่แข็งน้ำเชื้อ พบว่า สารประกอบต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ช่วยป้องกันการเสื่อมตายของเซลล์จะสูญเสียไป ทำให้สาร ROS เข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย ดังนั้น ในปัจจุบันนี้ จึงได้มีนักวิจัยจำนวนมากได้มุ่งเน้นศึกษาถึงการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปใน extender ในกระบวนการเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อทำหน้าที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) และช่วยปกป้องความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิ (Kaeoket et al., 2008; Moran et al., 2008, Jeong et al., 2009; Coyan et al., 2010)

เป็นที่ทราบดีว่า L-cysteine เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีผลทำให้ระดับของ glutathione ไม่สูญเสียไปในระหว่างการเกิดภาวะ oxidative stress (Wu et al., 2006) รวมถึง L-cysteine สามารถ

reactivate ROS และช่วยกระตุ้นให้เกิดการ detoxification ของ hydrogen peroxide และ superoxide ชนิดอื่นๆ (Meister, 1992) การเติม L-cysteine ลงในน้ำยา oocyte maturation media สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญสมบูรณ์ของโอโอไซต์ได้ดีขึ้น (Whitaker and Knight, 2009) การเติม L-cysteine ลงในน้ำเชื้อแช่แข็งของโค มีส่วนกระตุ้นให้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิสูงขึ้น (Bilodeau et al., 2001) ขณะที่ การเติม L-cysteine ในน้ำเชื้อแช่แข็งของแกะ มีผลทำให้ปริมาณเซลล์อสุจิที่มีชีวิต และปริมาณของอสุจิที่มีโครงสร้างของอะโครโซมที่สมบูรณ์เพิ่มมากขึ้น (Coyan et al., 2011) ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า เซลล์อสุจิของสุกรมีปริมาณของ PUFA ภายในเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้น ปริมาณการเติม L-cysteine ลงใน extender ของน้ำเชื้อแช่แข็งจึงจำเป็นต้องศึกษาในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากการศึกษาที่ผ่านมา Funahashi and Sano (2005) ได้ทดลองใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 5 mMol เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C ผลการทดลองปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 mMol มีประสิทธิภาพช่วยรักษาการมีชีวิตรอดและรักษาสภาพอะโครโซมให้สมบูรณ์ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5 mMol และต้องการเปรียบเทียบเพิ่มเติมในการใช้ L-cysteine ในระดับความเข้มข้นที่ 10 และ 15 mMol เนื่องจากการศึกษานี้มีความแตกต่าง เพราะเป็นการนำน้ำเชื้อผ่านเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่าที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำ L-cysteine เติมลงในสาร extender ในการเตรียมแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรคือความเข้มข้น 5 และ 10 mMol มีประสิทธิภาพในการรักษาการมีชีวิตและรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มน้ำเชื้ออื่นๆ อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น 10 mMol มีแนวโน้มในการทำหน้าที่ดังกล่าวได้ดีที่สุด ซึ่งจำเป็นต้องเพิ่มตัวอย่างในการศึกษาในอนาคตต่อไป

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากระบวนการแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อสุกร ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายอย่างชัดเจนเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด อย่างไรก็ตาม เซลล์อสุจิที่พบในน้ำเชื้อกลุ่มที่ใส่ L-cysteine ที่ 5 และ 10 mMol มีจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตรอดและมีเยื่อหุ้มที่สมบูรณ์มากกว่าน้ำเชื้อกลุ่มอื่น เป็นที่ทราบดีว่า ภาวะ lipid peroxidation เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์อสุจิในระหว่างการแช่แข็งและการทำละลาย (Bilodeau et al., 2000) ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารต่อต้านอนุมูลอิสระลงใน extender พบว่า การเติมวิตามินอี (Pena et al., 2003) หรือ seminal plasma (Hernandez et al., 2007) สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ดังนั้น การเติม L-cysteine อาจส่งผลที่จะช่วยลดการเกิดภาวะ lipid oxidation นอกจากนี้ การเติม L-cysteine ในระดับที่เหมาะสมยังมีส่วนช่วยทำให้ plasma membrane phospholipid เกิดภาวะ fluidity และ flexibility ได้ดีมากขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพที่ทนทานต่อความเสียหายในกระบวนการแช่แข็งและการทำละลายได้ดียิ่งขึ้น (Lenzi et al., 1996; Maldjian et al., 2005) นอกจากนั้นยังพบว่า

กระบวนการแช่แข็งและการทำละลายดังกล่าวส่งผลความเสียหายต่อ DNA ของเซลล์อสุจิเป็นอย่างมาก (Aitken et al., 1998) โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลง (destabilization) ในโครงสร้างของโครมาติน ส่งผลกระทบต่อเนื่องทำให้เกิดภาวะ DNA fragmentation (Fraser and Strzezek, 2007) การเติม L-cysteine ในปริมาณที่เหมาะสม อาจมีกลไกที่ช่วยลดความเสียหายของ DNA ได้ ตามผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าอัตราการตายของเซลล์อสุจิที่อยู่ในภาวะเสื่อมตาย (apoptosis) ซึ่งตรวจสอบด้วยผลการติดสีชนิด AN+/PI+ ในน้ำเชื้อสุกรที่เติม L-cysteine มีปริมาณต่ำที่สุด ประเด็นที่น่าสนใจคือ ทำไมเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อสุกรที่เติม L-cysteine 15 mMol จึงพบอัตราการตายของเซลล์อสุจิสูงมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์อสุจิมากขึ้น (Whitaker et al., 2008) รวมทั้ง การทำงานของ L-cysteine จะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่นั้นสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นที่เติมเข้าไปใน extender ตามที่ได้มีการศึกษาที่ผ่านมา (Nishikimi et al., 1999; Xu et al., 2005) ทั้งนี้ กลไกการทำงานของ L-cysteine เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะคือ ทำหน้าที่กำจัด ROS หรือ ทำหน้าที่เป็น precursor ของกลูตาไธโอน (GSH) เพื่อทำให้มีการสังเคราะห์ GSH ภายในเซลล์ได้ง่ายยิ่งขึ้น (Aruoma et al., 1989) แต่บางครั้ง ปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้การทำหน้าที่เป็น precursor ของ GSH ไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ (Xu et al., 2005) อย่างไรก็ตาม กลไกในระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นต่อเซลล์อสุจินั้นจำเป็นต้องมีการทดลองขั้นสูงต่อไป

จากการศึกษาในการทดลองที่ 2 พบว่าการใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อสุกร (supernatant) ประมาณ 50% โดยปริมาตร ของการผสมเทียม มีแนวโน้มที่จะช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องและอัตราการเข้าคลอดได้ดีกว่าการใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อเพียงอย่างเดียว ถึงแม้ว่าการทดสอบทางสถิติจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนสุกรที่ใช้ยังน้อยไปและทางฟาร์มเองก็มีปัญหาการกลับสัดและแท้งเกิดขึ้น การที่สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อสุกรเข้ามามีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องและอัตราการเข้าคลอดนั้น อาจเนื่องมาจากหลายเหตุผลด้วยกัน ตัวอย่างเช่น องค์ประกอบของ supernatant นั้น จะประกอบไปด้วยสารโปรตีนต่างๆ ที่จะป้องกันอะโครโซมของตัวอสุจิไม่ให้ถูกทำลาย ฮอร์โมนเอสโตรเจน พลอสตาแกลนดิน ซึ่งมีส่วนช่วยในเรื่องของการบีบตัวของมดลูกเพื่อขนส่งตัวอสุจิไปยังท่อนำไข่เพื่อเกิดการปฏิสนธิ(Claus, 1990; Weitze et al., 1990) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองในสุกร (Maxwell et al., 1998; Kirkwood et al., 2008; Garcia et al., 2009)และม้า (Alghamdi et al., 2005)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาครั้งนี้โดยพิจารณาจากการทดสอบในพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การประเมินการเคลื่อนไปข้างหน้า การประเมินการมีชีวิตและการประเมินเยื่อหุ้มตัวอสุจิโดยใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ การประเมินการเกิดคาซิเตชั่นโดยใช้แอนติบอดี Annexin-V และใช้เครื่อง flow cytometerช่วย รวมทั้งจากการศึกษารูปร่างและสัณฐานของตัวอสุจิโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดสามารถสรุปว่า การเติมสารต่อต้านอนุมูลอิสระ L-cysteine ในระดับความเข้มข้น 5 หรือ 10 mMol ใน freezing extender ก่อนผ่านกระบวนการแช่แข็ง จะส่งผลช่วยปรับปรุงคุณภาพของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการทำละลายให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า L-cysteine ในระดับที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ มีผลในการกำจัด ROS ช่วยลดภาวะ lipid oxidation และอาจช่วยลดการเกิด DNA fragmentation ได้

จากผลการทดลองจะเห็นว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการแช่แข็ง กล่าวคือทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ L-cysteine ในการที่จะใส่ลงไปใน freezing extender ทราบว่าสามารถผสมเทียมน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้ท่อผสมเทียมแบบ Intrauterine Insemination (IUI) และใช้จำนวนตัวอสุจิต่ำขนาด 2000 ล้านตัวต่อโด้ส ได้ และการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อเข้ามาช่วยในการผสมเทียมมีแนวโน้มที่จะให้อัตราการผสมติดที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้ แต่ทั้งนี้ถ้าพิจารณาถึงอัตราการผสมติดและจำนวนลูกสุกรที่ได้ ยังคงอยู่ในระดับที่ยังไม่พึงประสงค์ ยังคงต้องศึกษาถึงวิธีการผสมเทียมให้มีอัตราการผสมติดและจำวนวนลูกสุกรที่ดีกว่านี้

เอกสารอ้างอิง

Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z. and Irvine, D.S. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.Biol. Reprod. 59: 1037-1046.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. 2000.Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J. Androl. 9: 367-376.

Alghamdi, A.S., Madill, S. and Foster, D.N. 2005. Seminal plasma improves fertility of frozen equine semen. Anim. Reprod. Sci. 89:242-245.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radic. Biol. Med. 6: 593-597.

Barrios, B., Perez-Pe, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muino-Blanco, T. and Cebrain-Perez J.A. 2000. Seminal plasma proteins reverse the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biol. Reprod. 63: 1531-1537.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and Davies-Morel, M.C. 2000.The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation.J Androl. 21: 895-902.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A. 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology 56: 275-286.

Bucak, M.N., Atessahin, A., Varisli, O., Yuce, A., Tekin, N. and Akçay, A. 2007.The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology 67: 1060-1067.

Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F. and Gliozzi, T.M. 2001.Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.Reproduction. 121: 395-401.

Claus, R. 1990. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. J. Reprod. Fert. Suppl.40: 117-131.

Coyan, K., Baspinar, N., Bucak, M.N., Akalin, P.P., Ataman, M.B., Omur, A.D., Gungor, S., Kucukgunay, S., Ozkalp, B. and Sariozkan, S. 2010. Influence of methionine and

dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Res. Vet. Sci. 89: 426-431.

Coyan, K., Baspinar, N., Bucak, M.N. and Akalin, P.P. 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. Cryobiology 63: 1-6.

Einarsson, S. and Viring, S. 1973.Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. J. Reprod. Fertil.32: 117-120.

Eriksson, B.M., Petersson, H. and Rodriguez-Martinez, H. 2002.Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container.Theriogenology.58: 1065-1079.

Fraser, L. and Strzezek, J. 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? Theriogenology. 68: 248-257.

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

Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M.J., Habing, G.G. and Kirkwood, R.N. 2009.Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: effect on sperm quality and fertility.Anim. Reprod.Sci. In press

Jeong, J.B., Seo, E.W. and Jeong, H.J. 2009.Effect of extracts from pine needle against oxidative DNA damage and apoptosis induced by hydroxyl radical via antioxidant activity.Food Chem. Toxicol. 47: 2135-2141.

Johnson, L.A., Weitze K.F., Fiser P. and Maxwell, W.M.C. 2000.Storage of boar semen.Anim. Reprod. Sci. 62: 143-172.

Hernandez, M., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. J. Androl. 28: 689-697.

Kaeoket, K., Tantiparinyakul, K., Kladkaew, W., Chanapiwat, P. and Techakumphu, M. 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Thai J. Agric. Sci. 41: 1-9.

Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M. and Kato, S. 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immune-detection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins.Anim. Reprod. Sci. 73: 197-209.

Kim, J.G. and Parthasarathy, S. 1998. Oxidation and the spermatozoa.Semin. Reprod. Endocrinol. 16: 235-239.

Kirkwood, R.N., Vadnais, M.L. and Abad, M. 2008. Practical application of seminal plasma. Theriogenology 70: 1364-1367.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L. and Dondero, F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum. Reprod. Update 2: 246-256.

Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P. and Noble, R. 2005.Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology 63: 411-421.

Maxwell, W.M.C., Long, C.R., Johnson, L.A., Dobrinsky, J.R. and Welch, G.R. 1998.Therelationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa afterflow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. Reprod.Fertil. Dev. 10:433-440.

Meister, A. 1992.On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione.Biochem.Pharmacol. 44: 1905-1915.

Moran, J.M., Madejon, L., Ortega Ferrusola, C. and Pena, F.J. 2008. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. Theriogenology 70: 91-96.

Nishikimi, A., Mukai, J. and Yamada, M. 1999. Nuclear translocation of nuclear factor kappa B in early 1-cell mouse embryos.Biol. Reprod. 60: 1536-1541.

Ortman, K. and Rodriguez-Martinez, H. 1994.Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags.Zentralbl.Veterinarmed. A. 41: 37-47.

Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodriguez Martinez, H. 2003.Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane

potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim. Reprod. Sci. 78: 85-98.

Roca, J., Gil, M.A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. J. Androl. 25: 397-405.

Roca, J., Rodriguez, E.A., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J. Androl. 26: 15-24.

Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M. and Al-Sawaf, H. 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. Curr.Drug Metab. 6: 495-501.

Stegink, L.D., Bell, E.F., Filer, L.J.Jr., Ziegler, E.E., Andersen, D.W. and Seligson, F.H. 1986. Effects of equimolar doses of L-methionine, D-methionine and L-methionine-dl-sulfoxide on plasma and urinary amino acid levels in normal adult humans. J. Nutr. 116: 1185-1192.

Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-492.

Weitze, K.F., Rabeler, J., Willmen, T. and Waberski, D. 1990. Interaction between inseminate,uterine and ovarian function in the sow I. Influence of seminal plasma and oestrogens in the inseminate on intragenital sperm transport,time of ovulation and fertility results in gilts. Reprod. Dom. Anim. 25: 191-196.

Whitaker, B.D. and Knight, J.W. 2010.Effects of N-acetyl-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide supplementation on in vitro matured porcine oocytes.Reprod. Domest. Anim. 45: 755-759.

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

Wu, W., Goldstein, G., Adams, C., Matthews, R.H. and Ercal, N. 2006.Separation and quantification of N-acetyl-l-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection.Biomed.Chromatogr. 20: 415-422.

Xu, D.X., Chen, Y.H., Wang, H., Zhao, L., Wang, J.P. and Wei, W. 2005.Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice.Toxicol. Sci. 88: 525-33.