บทที่ 1
ความเป็นมาและวัตถุประสงค์ของโครงการ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การผสมเทียมเป็นวิธีการที่นิยมในการเพิ่มผลผลิตในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียม แต่การใช้น้ำเชื้อสดมีข้อจำกัดในด้านระยะเวลาการเก็บรักษา โดยน้ำเชื้อสดสามารถเก็บไว้ใช้ได้เพียง 3-7 วัน ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของพ่อสุกรไว้เป็นระยะเวลานานจึงจำเป็นต้องอาศัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็ง ในปัจจุบันน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งยังไม่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรเนื่องจากให้อัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกต่อครอกต่ำกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด 10-25 เปอร์เซ็นต์ (Waterhouse et al. 2006) สาเหตุของการที่น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งมีความสามารถในการปฏิสนธิลดลงเป็นผลมาจากกระบวนการแช่แข็ง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและเคมีต่อตัวอสุจิส่งผลให้น้ำเชื้อที่ผ่านการทำละลายหลังจากแช่แข็งมีคุณภาพต่ำลง ได้แก่ ลักษณะรูปร่างของอสุจิ (Sperm morphology) ที่เปลี่ยนแปลงไป การเคลื่อนที่ของอสุจิ (Sperm motility) ความสมบูรณ์อะโครโซมหลังกระบวนการแช่แข็งอัตราการอยู่รอดของอสุจิ (Survival rate)(Cerolini et al., 2001) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีสาเหตุมาจากกระบวนการแช่แข็งที่ทำให้เกิด cold shock ในช่วงที่มีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว การเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ มีการดึงน้ำเข้าสู่ตัวอสุจิอันมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายภายนอก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เปลี่ยนแปลงรูปร่างและการทำงานของตัวอสุจิ (Hammerstedt et al., 1990) และการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (Free radicals, Oxidants, Reactive OxygenSpeices) ชนิดต่างๆ (Aitken and Clarkson, 1988) ซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความชุ่มฉ่ำลดลง (decrease fluidity)เกิดการแตกตัวของสายดีเอ็นเอ ลดความสามารถในการรวมตัวกันของอสุจิและไข่ในการปฏิสนธิ เนื่องจากอสุจิของสุกรมีโครงสร้างบริเวณผิวเซลล์เป็นชั้นไขมัน ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก (Buhret al.,1994) ด้วยเหตุนี้ทำให้นักวิจัยจากทั่วโลกและรวมถึงนักวิจัยในประเทศไทยจึงพยายามพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรเพื่อให้มีคุณภาพที่ยอมรับได้ และนำไปสู่การใช้เพื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในฟาร์มสุกรให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อเร็วๆนี้Kaeoket et al.

(2008) พบว่าการใส่สารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ L-cysteine ลงไปใน freezing extender II ในกระบวนการแช่แข็งสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากผลการวิจัยต่างๆแสดงให้เห็นว่า น้ำเชื้อสุกรที่ผ่านการทำละลายภายหลังการแช่แข็งจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ capacitation ทำให้มี capacitated sperms มากกว่าในน้ำเชื้อสด ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานหลังจากละลาย (Maxwell and Johnson, 1997; Vishwanath et al.,1997)และส่งผลให้ความสามารถในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิลดลง การวิจัยน้ำเชื้อในคนพบว่า การเกิดกระบวนการ capacitation, hyperactivation และการเกิด acrosome reaction เป็นผลจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับฮอร์โมนที่อยู่บนผิวของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (Cǫntreras and Llanos, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าการมีอยู่ของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR) นั้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและ ตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (Meizel and Turner, 1991) โดยพบว่าตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวและรูปร่างปกติจะพบการมีอยู่ของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สำหรับบทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีต่อตัวอสุจิในคนพบว่าทำหน้าที่ลดการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียม และยับยั้งการเกิด acrosome reaction ที่ชักนำโดยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จากการศึกษาของ Rago และคณะ (2007) พบการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดอัลฟ่า (ERα) และเบต้า (ERβ) บนตัวอสุจิของสุกรในตำแหน่งที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนบนตัวอสุจิของสุกรยังมีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับคนและสัตว์อื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยังไม่มีการศึกษาตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดในตัวอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดอาจมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหว รูปร่างของตัวอสุจิ รวมไปถึงกระบวนการเกิด capacitation ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดบนตัวอสุจิของสุกรในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งที่จะนำมาใช้ในการผสมเทียมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนบนตัวอสุจิของสุกรในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง

2.เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิด กับกระบวนการ capacitation, acrosome reaction และคุณภาพของน้ำเชื้อสุกร

3.เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีผลต่อการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดบนตัวอสุจิสุกร

4.เพื่อศึกษาผลของ L-cysteine ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดบนตัวอสุจิสุกร