บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการผลิตและการผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งซึ่งพัฒนาขึ้นในประเทศไทย เพื่อประเมินผลดี และผลเสีย และปัญหาอุปสรรคของการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งกับอุตสาหกรรมสุกรต่อไปในอนาคต โดยเน้นปัจจัยจากการแช่แข็งน้ำเชื้อและสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลต่อการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน และคุณภาพน้ำเชื้อ

ทฤษฎีและหรือแนวคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

กระบวนการแช่แข็งสามารถทำให้เกิดกระบวนการ capacitation ของตัวอสุจิทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดหลังจากการละลายสั้นลง ซึ่งการเกิด capacitation มีความสัมพันธ์กับการมีอยู่ของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ดังนั้นการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระน่าจะมีความแตกต่างกัน และอาจบ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนทั้งสองชนิดต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงอิทธิพลของการแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีผลต่อการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนกับคุณภาพน้ำเชื้อสุกรในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง
3. มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยของการแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร
4. มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการผสมเทียมแนวใหม่เพื่อรองรับการพัฒนาด้าน biotechnology ได้แก่ น้ำเชื้อแช่แข็ง

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ซึ่งมีประวัติการเกิดและเบอร์หู อายุ 1 ปีขึ้นไป 3สายพันธุ์ ได้แก่ แลนด์เรซ ดูร็อกซ์ และลาร์จไวท์ โดยใช้สายพันธุ์ละ 4ตัว รวมทั้งสิ้น 12 ตัวโดยใช้ระบบการเลี้ยง การจัดการ อาหารและน้ำที่เหมือนกันทั้งหมด และมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเป็นประจำ

วิธีวิจัย

1. การเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อสุกร

ทำการเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อสุกรด้วยมือ (Hand glove technique) (Kaeoket et al., 2002)ซึ่งจะรีดเก็บเอาเฉพาะน้ำเชื้อส่วนที่มีอสุจิมาก (sperm rich fraction) เท่านั้น และใช้ผ้าก๊อซกรองเอาส่วนเม็ดสาคูออกก่อนนำออกจากฟาร์มเพื่อนำมาทำการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การเตรียมน้ำเชื้อสด

น้ำเชื้อสดที่ได้จากสุกรแต่ละสายพันธุ์รวมทั้งสิ้น 4สายพันธุ์จากการรีดด้วยมือแล้วจะต้องผ่านการตรวจสอบคุณภาพ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าใช้การส่องตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง, ปริมาณตัวเป็นตัวตายวัดด้วยการย้อมสี SYBR-14/Ethidium homodimer-1 แล้วทำการส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างและกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง ความผิดปกติของ Acrosome ย้อมด้วยสี Fit-C ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง ตรวจการเกิด capacitation ด้วยวิธีการ CTC staining(Maxwell and Johnson, 1997) ส่วนความผิดปกติของรูปร่างหัวของอสุจิวัดด้วยการย้อมสี William's stain แล้วทำการส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ส่วนความผิดปกติในส่วนหางของตัวอสุจิใช้การวิเคราะห์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง โดยให้ปริมาณอสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 75 % จากนั้นผสมกับสารเจือจางน้ำเชื้อ (Modena™) เพื่อการขนส่งต่อไป

3. การเตรียมน้ำเชื้อก่อนเข้ากระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

3.1 ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการขนส่ง โดยการตรวจสอบจะใช้มาตรฐานการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสด แต่ให้ปริมาณอสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 70%

3.2 เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Modena™ ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ Modena™ 1-3 ส่วน ที่อุณหภูมิ 32 °C

3.3 รักษาอุณหภูมิในตู้เย็นที่ 15 °C นาน 2 ชั่วโมง

3.4 ปั่นน้ำเชื้อที่ได้ด้วยเครื่อง cold centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 15 °C นาน 10 นาที

3.5 เทส่วนของเหลวด้านบน (supernatant) ออกเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือด้านล่างด้วย Extender II (11% lactose solution 80 มล. + egg yolk 20 มล.) ให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1.5 x 10^9 ตัว/มล.

3.6 แบ่งกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้ง 3สายพันธุ์สายพันธุ์ละ 4 ตัว จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลองตามความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุมไม่ใส่ L-cysteine)

กลุ่มที่ 2 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 5 mMol ลงใน freezing extender II

กลุ่มที่ 3 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 10 mMol ลงใน freezing extender II

กลุ่มที่ 4 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 15 mMol ลงใน freezing extender II

3.7 ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

3.8 ที่ 5 °C ให้ทำการเจือจางเพิ่มด้วย Extender III (Extender II 89.5 มล. + glycerol 9 มล. + Equex STM; Nova Chemical Sales, Inc., Scituate, MA. USA) ในอัตราส่วน 2:1 ร่วมกับการเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิด L-cysteine ที่ความเข้มข้นต่างๆ (5mMol, 10mMol และ 15 mMol) ลงในสารละลายน้ำเชื้อโดยมีการปรับปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิ 1 x 10^9 ตัว/มล.

3.9 บรรจุสารละลายน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อทั้ง 3สายพันธุ์ลงในหลอดฟางชนิด polyvinyl chloride medium-straw ขนาด 0.5 มล. แล้วปิดผนึกเพื่อเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง (Cryopreservation)

4. กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการบรรจุมาเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งโดยใช้ เครื่องควบคุมอุณหภูมิการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (controlled rate freezer) (Waterhouse et al., 2006, Wongtawan et al., 2006,Kaeoket et al., 2008)

5.กระบวนการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งและการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

สุ่มหลอดน้ำเชื้อหนึ่งหลอดมาทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 50°Cนาน 12 วินาที เจือจางด้วย thawing solution (Modena™ 9.5 ml + Extender II 0.5 ml) แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อทันทีโดยการตรวจสอบหาปริมาณอสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ และทำการสุ่มตัวอย่างหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งอีกหนึ่งหลอดมาทำการละลายเช่นเดียวกัน ก่อนทำการเจือจางด้วย thawing solution (Modena™ 9.5 ml + Extender II 0.5 ml) แล้วนำน้ำเชื้อที่ได้มา incubate ใน water bath ที่ 37 °C นาน 30 นาทีแล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณอสุจิมีชีวิต โดยย้อมสี SYBR-14/Propidium Iodide, plasma membrane และ acrosome status ของตัวอสุจิโดยย้อมสี Fit-C ตลอดจนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำเชื้อภายหลังผ่านการแช่แข็งต่อไป

6. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อทำการตรวจหาตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสุกรทุกตัวอย่างจากทุกกลุ่ม จากขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. ขั้นตอนที่ 1 น้ำเชื้อสด
2. ขั้นตอนที่ 3.3 หลังจากใส่สารละลาย Modena™ เก็บไว้ที่ 15°C นาน 2 ชั่วโมง
3. ขั้นตอนที่ 3.7 หลังจากใส่ extender II เก็บไว้ที่ 5 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
4. ขั้นตอนที่ 3.8 หลังจากใส่ extender III เก็บไว้ที่ 5 °C เป็นเวลา 30 นาที
5. ขั้นตอนที่ 5 หลังจากทำการละลายน้ำเชื้อ

7.กระบวนการอิมมูนโนฟลูออเรสเซนต์ เพื่อตรวจหาตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

- นำตัวอสุจิที่ผ่านการทำ Percoll separation แล้ว ล้างในสารละลาย 0.5 mM Tris-HCl, pH 7.5 3 ครั้ง

- นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 10 µl ใส่ลงในสารละลาย TBS อุณหภูมิ 37°Cปริมาตร 250 ml หยอดลงบนสไลด์ ทิ้งให้ตกตะกอนบนกล่องควบคุมความชื้น

- ดูดสารละลายส่วนเกินออก และหยดเมทานอลที่อุณหภูมิ -20°Cทิ้งไว้ 7 นาที หลังจากนั้นดูดเมทานอลออก ล้างตัวอสุจิในสารละลาย TBS พร้อมสำหรับกระบวนการอิมมูนโนฟลูออเรสเซนต์ต่อไป

- หยดแอนติบอดี้สำหรับ ERα (mouse monoclonal, 1:50, DAKO, Denmark), ERβ (rabbit polyclonal, 1:100, Santa Cruz biotechnology, USA) และPR (mouse monoclonal, 1:100, Immunotech, Germany) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°Cนานข้ามคืน

- หยด anti-mouse IgG Texas-red conjugated (1:100)(Abcam, UK)และ anti-rabbit IgG FITC conjugated (1:100) (Abcam, UK)ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

- ตัวอย่างอสุจิที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี้ คือกลุ่มควบคุมลบ

- นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จแล้วไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescence โดยนับตัวอสุจิ 200 ตัว ต่อสไลด์ ที่กำลังขยาย 100x objective และคำนวณเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน โดยตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดอัลฟ่าจะติดสีฟลูออเรสเซนต์บริเวณ mid-piece และหางของตัวอสุจิ ตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดเบต้าจะติดสีฟลูออเรสเซนต์บริเวณ acrosome ของตัวอสุจิ และตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะติดสีฟลูออเรสเซนต์บริเวณ mid-piece ของตัวอสุจิ

- ทุกๆตัวอย่างทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์และการประเมินผล

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Inst. V. 9.0, Cary, NC USA) เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังจากใส่ extender II ภายหลังจากใส่ extender III และภายหลังทำละลาย(post-thawed analysis) โดยประเมินจาก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่ยังมีชีวิตหลังทำละลาย เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีความผิดปกติของอะโครโซม ด้วยวิธี General linear mixed model (MIXED) โดยการศึกษาตัวแปรตาม (dependent variable) ได้แก่ ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ ร้อยละความสมบูรณ์ของ acrosome ร้อยละของตัวอสุจิที่ยังไม่เกิด capacitation และร้อยละของตัวอสุจิที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ตัวแปรอิสระ (independent variable) ได้แก่ ความเข้มข้นของ L-cysteineและเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบ ตัวแปรสุ่ม (random effect) ได้แก่ พ่อหมู ค่า $P<0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ