

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งต่อคุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิ
(Effect of temperature and incubation period for thawing frozen pig semen on sperm characteristics)

ไทรเทพ เพียรสมผล

Trithep piansomphon

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

สัมนานฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเตรียมน้ำเชื้อสุกรก่อนทำการแช่แข็งต่อคุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิหลังการละลาย โดยทำการศึกษาจากเอกสารทางวิชาการจำนวน 3 ฉบับ ที่ตีพิมพ์ในช่วงปีพ.ศ. 2556-2562 ซึ่งในการทดลองละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งชนิดหลอด (Straw) ที่อุณหภูมิ 15 และ 37 °C ระยะเวลา 30, 120, 150 นาที การใช้อุณหภูมิทำละลายที่ 15 และ 37 °C เป็นระยะเวลา 0 และ 120 นาที และวิธีการทำละลายน้ำเชื้อ 3 วิธี คือที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 8 วินาที, 42°C ระยะเวลา 25 วินาที; และ 5°C ระยะเวลา 5 นาที พบว่า การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งชนิดหลอด ที่อุณหภูมิ 5-15°C เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของอสุจิตีดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามถ้าระยะเวลาและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิส่งผลต่อตัวอสุจิในด้านการอยู่รอด การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและลักษณะต่างๆ ของอสุจิ ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากผลของเอกสารทั้ง 3 ฉบับ ไม่สอดคล้องกัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

คำสำคัญ: สุกร น้ำเชื้อแช่แข็ง คุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิ

บทนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งส่งผลดีในด้านอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นและยังสามารถกระจายพันธุ์กรรมได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ในด้านคุณภาพ พบว่า การใช้น้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งจะส่งผลกระทบต่อการมีอัตราการผสมติดต่ำและจำนวนลูกต่อครอกน้อย ด้วยเหตุนี้การใช้น้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งในระดับอุตสาหกรรมจึงมีเพียง 1% (Rodriguez-Gil and Estrada, 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำเชื้อแบบแช่เย็น โดยสาเหตุสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิโดยตรงมาจากความเสียหายในกระบวนการแช่แข็ง (Rodriguez-Martinez and Wallgren, 2011) โดยเซลล์อสุจิจะมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้การลดอุณหภูมิให้ต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ -196°C เป็นการหยุดกระบวนการเกิดเมตาบอลิซึม และช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน (Fraser et al., 2014) นอกจากกระบวนการแช่แข็งแล้ว ในกระบวนการทำละลายน้ำเชื้อ (Yeste, 2015) จากการแช่แข็งยังเป็นอีกกระบวนการที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อโดยหลังจากอสุจิถูกแช่แข็งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิเพื่อการทำละลาย การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เหมาะสมจะนำไปสู่ความสำเร็จในการทำละลายได้เช่นกันแม้ว่าที่ผ่านมามีรายงานวิจัยในสุกรซึ่งใช้วิธีการลดอุณหภูมิในขณะแช่แข็งโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้ออสังไอเย็นโดยห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตรหรือที่อุณหภูมิ -135°C เป็นเวลา 20 นาที (อัตราการลดอุณหภูมิ -7°C ต่อนาที) และทำละลายที่อุณหภูมิ $40-70^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 8-25 วินาที (Chanapiwat et al., 2010; Okazaki and Shimada, 2012; Tomas et al., 2014;)

แต่ผลลัพธ์ด้านคุณภาพน้ำเชื้อยังไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นสัมมนาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเตรียมน้ำเชื้อสุกรก่อนทำการแช่แข็งแต่คุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิหลังการละลาย

ผลของระยะเวลาการเตรียมน้ำเชื้อสุกรก่อนทำการแช่แข็งต่อคุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิหลังการละลาย

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของอสุจิ

จากผลการศึกษาโดย Tomás et al.(2013) ในตารางที่ 1 รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของอสุจิที่ 30, 150 และ 240 นาที ที่อุณหภูมิ 15 และ 37°C ตัวอย่างของน้ำเชื้อที่ทำละลายและบ่มที่อุณหภูมิ 15°C มีค่า VCL, VSL, VAP, ALH และ BCF และแสดงค่า LIN, STR และ WOB ที่น้อยกว่าโดยทั่วไปแล้วสำหรับตัวอย่างของอสุจิทั้งหมดหลังจากการละลายที่ 240 นาที ผลของการพักตัวหลังการละลายที่อุณหภูมิ 15°C จะมีค่ามากกว่าตัวอย่างเหล่านี้อุณหภูมิที่ 15°C ที่ 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 30°C ดังนั้นประสิทธิภาพโดยรวมของการละลายมีความคล้ายคลึงกันระหว่างอุณหภูมิทำละลายและบ่มน้ำเชื้อพักตัวหลังละลายที่ 30, 150 และ 240 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดหลังการละลายมากถ้าเก็บรักษาไว้ที่ 15°C ($P<0.05$) เนื่องจากน้ำเชื้อที่ทำละลายและบ่มที่อุณหภูมิที่ 15°C ช่วยให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของอสุจิมีชีวิตรอดหลังการละลายดีขึ้น ช่วยให้น้ำเชื้อพักตัวหลังการละลายสูงขึ้น (ตารางที่ 1)

Table 1 Effect of the post-thaw temperature incubation on sperm quality.

Item	30 min			150 min			240 min		
	15 °C	37 °C	SEM	15 °C	37 °C	SEM	15 °C	37 °C	SEM
%SIPM	59.4	52.9	1.5	57.2	55.7	1.7	57.4 ^a	52.9 ^b	1.4
%NAR	57.4 ^a	54 ^b	1.7	55.1 ^a	46.4 ^b	1.4	52.5 ^a	42.4 ^b	1.2
%TMS	53.2 ^a	57.4 ^b	2.5	50.2	46.8	2.7	45.8 ^a	42.1 ^b	2.0
%PMS	45.5 ^a	50.1 ^b	1.9	42.4	40.6	2.0	39.3 ^a	35.9 ^b	1.7
%RPMS	45.5	46.3	2.4	43.1 ^a	35.5 ^b	2.4	38.1 ^a	31.2 ^b	2.2
VCL	81.0	73.3 ^b	2.3	80.9 ^a	68.6 ^b	1.7	79.1 ^a	68.3 ^b	2.1
VSL	52.1	50.7	1.7	50.7	48.9	1.4	52 ^a	48.3 ^b	1.5
VAP	64.8	61.7 ^b	2.0	63.3 ^a	57.6 ^b	1.4	63.8 ^a	57.1 ^b	1.8
LIN	64.4	69.1 ^b	1.6	62.8 ^a	71.2 ^b	1.7	65.8 ^a	70.6 ^b	1.6
STR	80.4	82.2 ^b	1.1	80.1 ^a	84.8 ^b	1.2	81.5 ^a	84.5 ^b	1.1
WOB	80	84 ^b	0.9	78.3 ^a	83.9 ^b	0.9	80.6 ^a	83.5 ^b	0.9
ALH	2.8	2.4 ^b	0.06	2.9 ^a	2.3 ^b	0.06	2.7 ^a	2.3 ^b	0.07
BCF	8.1	7.9 ^b	0.07	8.2 ^a	8.1 ^b	0.08	8.2 ^a	8.1 ^b	0.07

Values within the same post-thaw incubation time in the same row with different letters (a and b) differed ($P < 0.05$). SIPM, spermatozoa with intact plasmatic membrane; NAR, normal acrosomal ridge intact; TMS, total motile spermatozoa; PMS, progressive motility spermatozoa; RPMS, rapid progressive motility spermatozoa; SEM, standard error of the mean

Source: Tomás et al.(2013)

ผลการศึกษาโดย Rocha et al. (2015) ในตารางที่ 2 พบว่าการเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในเวลา 0 และ 120 นาที โปรโตคอล Westendorf ในเวลา 0 นาที มีการอยู่รอดมากกว่า เวลา 120 นาที และมากกว่าโปรโตคอล Paquignon ทั้ง ในเวลาที่ 0 และ 120 นาที ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการละลายน้ำเชื้อในเวลา 0 และ 120 นาที และพบว่ามีค่าแตกต่าง $P > 0.05$ สำหรับความต้านทานแรงดันออสโมติก และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดไม่ต่างกับค่าเฉลี่ย Average ($P < 0.05$) เนื่องจากการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรและการละลายน้ำเชื้อ ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอาจขึ้นอยู่กับวิธีการทดลอง จึงมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการละลายไม่ต่างจากค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 2)

Table 2. Sperm viability (%), osmotic resistance (%) and total morphological abnormalities (%) of thawed boar semen using different freezing methodologies (n = 7 animals).

Parameters	Time (minutes)		Average
	0	120	
Sperm viability (%)			
Westendorf	69.3	47.93	58.6 ^a
Paquignon	60.4	32.6	46.5 ^b
Average	64.8 ^a	40.2 ^b	
CV* (%)	14.64		
Osmotic resistance (%)			
Westendorf	17.8	12.0	14.9
Paquignon	20.7	13.3	17.0
Average	19.2 ^a	12.6 ^b	
CV (%)	16.14		
Morphological alterations (%)			
Westendorf	16.3	20.4	18.3
Paquignon	15.7	22.3	19.0
Average	16.0 ^a	21.3 ^b	
CV (%)	1.36		

a,b Means followed by different lowercase letters in the row and capitals in the column differ by the F test ($P < 0.05$). *Coefficient of variation

Source: Rocha et al.(2015)

ฤทัยพร และคณะ (2019) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการอยู่รอดที่อุณหภูมิ 5, 42 และ 60 °C และเวลาที่ต่างกัน และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างวิธีการแช่แข็งและวิธีการทำลาย พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) พบว่า T1 มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการอยู่รอดของอสุจิสูงกว่า T2 ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในส่วนของความสมบูรณ์ของเยื่อเซลล์ ($P > 0.05$) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อุณหภูมิและเวลา ที่ 5 °C, 5 นาที มีการเคลื่อนที่มากกว่า 42 °C, 25 วินาที และ 60 °C, 8 sec มีค่า P-value 0.0017 และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิที่ 60 °C, 8 วินาที มีการเคลื่อนที่ดีกว่า 5 °C, 5 นาที และ 42 °C, 25 วินาที มีค่า P-value 0.0079 ดังนั้นสรุปได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่อุณหภูมิ 5 °C, 5 นาที เหมาะแก่การทำละลายเพราะมีการเคลื่อนที่ดีกว่าและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60 °C, 8 วินาทีและ 5 °C, 5 นาที ไม่มีความแตกต่างกันมาก จึงเหมาะแก่การทำละลายที่ 60

°C, 8 วินาที (P<0.05) เนื่องจากวิธีการแช่แข็งและวิธีการทำลาย T1 มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการอยู่รอดของอสุจิสูงกว่า T2 อาจขึ้นอยู่กับพันธุ์ของสุกร จึงทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการอยู่รอดของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันมากเมื่อเทียบระหว่างวิธีการแช่แข็งและวิธีการทำลาย (ตารางที่ 3)

Table 3 Effects of different freezing rates and thawing temperatures on sperm progressive motility, sperm viability and sperm plasma membrane integrity of frozen/thawed boar sperm

Parameters	Progressive Motility (%)	Viability (%)	Plasma membrane integrity (%)
Breeds (Block)			
Duroc (n=12)	14.22±0.79 ^b	16.92±0.85	27.22±2.11
Pietrain (n=12)	15.52±0.64 ^a	17.25±0.90	27.17±2.54
P-value	0.0402	0.6911	0.9865
Freezing methods (Factor A)			
Treatment 1	15.92±0.83 ^a	18.45±0.56 ^a	27.50±1.91
Treatment 2	13.83±0.47 ^b	15.72±0.93 ^b	26.89±2.70
P-value	0.0068	0.0186	0.9865
Thawing methods (Factor B)			
60 °C, 8 sec	14.83±0.32 ^b	18.96±0.29 ^a	28.58±0.77 ^a
42 °C, 25 sec	12.67±0.43 ^c	14.04±0.73 ^b	18.75±0.54 ^b
5 °C, 5 min	17.11±1.48 ^a	18.25±1.01 ^a	34.25±1.8 ^a
P-value	0.0017	0.0079	0.0227
Freezing*Thawing methods (Interaction between factor A x B)			
(Treatment1*60°C, 8sec)	15.33±0.33	19.59±0.23	29.50±0.81
(Treatment1*42°C, 25sec)	13.17±0.40	16.25±0.10	20.50±1.22
(Treatment1*5°C, 5min)	19.15±0.10	19.50±0.54	32.50±1.76
(Treatment2*60°C, 8sec)	14.34±0.34	18.33±0.61	27.67±2.37
(Treatment2*42°C, 25sec)	12.17±0.06	11.83±0.06	17.00±0.74
(Treatment2*5°C 5min)	14.98±0.53	17.00±0.27	36.00±0.20
P-value	0.0569	0.3426	0.6838

a,b,c,d Means±SE within column within parameter followed by the different letter are significantly at P<0.05 by DMRT (n=12)

อย่างไรก็ตาม พบว่าทั้ง 3 งานวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงผลอันเนื่องมาจากอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยงานทดลองของ Tomás et al.(2013) พบว่าอุณหภูมิต่ำในช่วง 15 °C ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการเคลื่อนที่ไปในทางที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ฤทัยพร และคณะ (2019) ที่อุณหภูมิ 5 °C ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดการเคลื่อนที่เพิ่มสูงขึ้น และเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของพลาสมาเมมเบรนดีขึ้น แต่ในงานของ Rocha et al. (2015) กับพบว่าในอุณหภูมิ 5 °C เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ควรพิจารณาปัจจัยด้านวิธีการทดลองร่วมด้วย และอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งจะทำให้ร่างกายในเซลล์ของอสุจิไหลออกจากเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิที่สามารถที่แทงเซลล์เสียหายให้ลดลงได้และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่แตกต่างกันจะมีผลต่อตัวอสุจิ และ seminal plasma โดยที่การลด อุณหภูมิจาก 15 °C ไปเป็น 5 °C หากอัตราการลดอุณหภูมิช้าจะ ทำให้น้ำภายในเซลล์เกิดการไหลออกจากเซลล์ได้ มากขึ้น และจะส่งผลทำให้ ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์มีปริมาณสูงขึ้นผลที่ตามมาจะเกิดภาวะการขาดน้ำ (Yeste, 2016) นอกจากนี้ ทั้งอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง จะมีผลต่อตัวอสุจิ และ seminal plasma โดยที่การทำละลายน้ำเชื้อที่ อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิตีขึ้นเนื่องจากมีรายงานว่า อัตราการทำละลายที่ต่อลงจะส่งผลทำให้การปรับ สมดุลความเข้มข้นของสารละลายและการจัดการ น้ำภายในเซลล์มีความสมดุลต่อระยะเวลาการทำละลายและเหมาะสมกับเซลล์อสุจิ (Wiest and Steponkus, 1979; Mazur and Cole, 1985) นำไป สู่คุณภาพภายหลังการทำละลายที่ดีขึ้น

สรุป

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งต่อคุณลักษณะต่างๆ ของตัวอสุจิ อุณหภูมิและระยะเวลาทำการแช่แข็งที่ 5 นาที และอุณหภูมิที่ทำการละลาย 5°C รวมถึงระยะเวลาการทำละลาย และบ่มน้ำเชื้อ 5 นาที ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อในด้านเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิตี ยังไม่อาจสรุปได้ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

- ฤทัยพร ราชสมัคร,เทวินทร์ วงษ์พระลับ,วุฒิไกร บุญคุ้ม และ วิบัณฑิตา จันทร์กิตติสกุล. 2019. “การเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งและการทำละลายต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง”.**แก่นเกษตร** 47. 159-168.
- Cristina tomas,jose Gomez-fernandez,Emilio Gomez-lzquierdo, Eduardo de Mercado.2013. “Effect of the holding time at 15 °C prior to cryopreservation,the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation”. **Animal Reproduction Science** 144. 115-121.
- L.G.P. Rocha¹, M.G. Zangeronimo^{1,3}, L.D.S. Murgas¹, G. Oberlender², L.J. Pereira¹, B.A. Pereira¹,B.R. Chaves¹, D.M. Silva¹.2015. “Evaluation of two different boar semen freezing protocols and their effects on semen quality after thawing”. **Anim. Reprod.** 871-875.
- Mazur, P., and K.W.Cole. 1985. “Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes”. **Cryobiology**. 22:509-536.
- Yeste, M. 2016. “ Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs”. **Theriogenology**. 85:47-56.