รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เงินทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. ๒๕๔๙

การศึกษาการผสมเทียมสุกรโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง

(The Study on Artificial Insemination by Frozen Boar Semen)

โดย

ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ (หัวหน้าโครงการ)

สพ.ญ. คคนางค์ บูรณะอำนวย

อ. น.สพ. ดร. เติมพงศ์ วงศ์ตะวัน

สพ.ญ. สุทธาทิพย์ พันธุ์เอี่ยม

ผศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กองสนับสนุนและขยายพันธุ์สัตว์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา

กองบัญชาการทหารสูงสุด อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

การผสมเทียมเป็นเทคนิคสำคัญทางระบบสืบพันธุ์ที่ช่วยป้องกันการติดต่อของโรคจากพ่อพันธุ์ไปยังแม่พันธุ์ และยังช่วยกระจายพันธุ์สัตว์ที่ดีอีกด้วย การผสมเทียมในสุกรเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในฟาร์มของประเทศไทย ได้มีการนำเอาน้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์ตัวหนึ่งไปผสมกับแม่พันธุ์ได้หลาย ๆ ตัว ทำให้ลูกที่เกิดมามีลักษณะดีเด่นตามพ่อพันธุ์ อย่างไรก็ตามการใช้น้ำเชื้อสดมีข้อเสียเปรียบเพราะไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการเก็บและการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ชั้นเยี่ยมจะเป็นวิธีรักษาพันธุกรรมและกระจายพันธุ์ได้เพิ่มขึ้น เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการนำเอาน้ำเชื้อแช่แข็งจากต่างประเทศเข้ามาผสมกับแม่พันธุ์ ประเทศไทยมีศักยภาพในการวิจัยค่อนข้างสูง จึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการค้นคว้าวิจัยเรื่องการผลิตน้ำเชื้อสุกรด้วยการผสมเทียมและนำไปวัดประสิทธิภาพจากการผสมพันธุ์ งานวิจัยนี้นับเป็นความก้าวหน้าทางวิทยาการสืบพันธุ์สุกรอีกก้าวหนึ่ง ที่จะนำไปสู่อุตสาหกรรมการผลิตสุกรของประเทศไทยในอนาคต

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ
หัวหน้าโครงการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 013843
วัน, เดือน, ปี 26 ก.ค. 51

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาการผสมเทียมสุกรโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ คคนางค์ บูรณะอำนวย เผด็จ ธรรมรักษ์ เติมพงศ์ วงศ์ตะวัน และ สุทธาทิพย์ พันธุ์เอี่ยม

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กุมภาพันธ์ 2550

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งตัวอสุจิสุกร และนำไปศึกษาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการตั้งท้อง อัตราการคลอด และจำนวนลูกเกิดหลังผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราการปฏิสนธิหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง และการทดลองที่ 2 การศึกษาอัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอด และขนาดครอกหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรและทำการแช่แข็งที่ -196°C แล้วนำตัวอสุจิผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (IUI) ขนาดความเข้มข้นของอสุจิ 2.0×10^9 ตัว/มล. และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูกในสุกร (DIUI) ขนาดความเข้มข้น 1×10^9 ตัว/ครั้ง จากการทดลองที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนตัวอ่อนที่พบภายในท่อนำไข่ซึ่งหมายถึงอัตราการปฏิสนธิในการทดลองนี้ด้านซ้ายและขวาของแม่สุกรแต่ละกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (74.2% และ 75.2%, p= 0.94 สำหรับแม่สุกรกลุ่ม IUI และ 17.82% และ 18.81%, p=0.76 สำหรับแม่สุกรกลุ่ม DIUI) จากการศึกษาพบว่าอัตราการผสมติดตั้งท้องของแม่สุกรกลุ่ม IUI มีค่าเท่ากับ 88.9% (8/9) ในขณะที่แม่สุกรกลุ่ม DIUI มีค่าเป็น 66.7% (6/9) โดยอัตราการผสมติดของแม่สุกรทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและยังไม่แตกต่างกับผลของแม่สุกรกลุ่มที่ถูกผสมจริงด้วยพ่อสุกรซึ่งถือเป็นกลุ่มควบคุม (80.9%; 59/73) (p=0.8) จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งที่ถูกผลิตขึ้นในประเทศไทยเมื่อนำไปใช้ผสมเทียมในแม่สุกรแบบการฉีดเข้าสู่มดลูกโดยตรง (DIUI และ IUI) นั้น สามารถลดจำนวนอสุจิที่ต้องใช้ต่อการผสมในแต่ละครั้งลงได้ โดยที่ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกอยู่ในระดับที่น่าพอใจหากทำการผสมในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับเวลาตกไข่มากที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งในเชิงพาณิชย์ขึ้นในประเทศไทย เพื่อใช้สำหรับการผสมเทียมหรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ ต่อไป ซึ่งในที่สุดแล้วเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรของประเทศไทยในอนาคต

Subject: The Study on Artificial Insemination by Frozen Boar Semen

Investigators: Mongkol Techakumphu, Kakanang Buranamnuay, Padet Tummaruk, Termpong Wongtawan and Sutthatip Punieam

Year: February 2007

Abstract

The objectives of the present study were to develop technique for cryopreservation of boar semen and to investigate fertilization rate, conception rate, farrowing rate and number of total piglets born/litter after artificial insemination with the frozen-thaw boar semen. Two experiments were conducted. Experimental I was performed to investigate the fertilization rate after artificial insemination with frozen-thaw boar semen and experimental II was performed to investigate the conception rate, the farrowing rate and the total number of piglets born/litter. The semen was collected from proven sires from swine commercial herds. Sperm-rich fraction ejaculates were cryopreserved at -196 $^{\circ}$C. The artificial insemination was performed using an intra-uterine insemination technique (IUI) with 2.0×10^9 spz/ml and a deep intra-uterine insemination technique (DIUI) with 1×10^9 spz/ml. Experimental I revealed that the proportion of embryo found in the oviducts, indicating the fertilization rate, did not differed significantly between the left and the right sides of the oviducts (74.2% vs 75.2%, p= 0.94 for IUI group and 17.82%vs 18.81%, p=0.76 for DIUI group). The conception rate of sows was 88.9% (8/9) in the IUI group and 66.7% (6/9) in the DIUI group (P>0.05). The conception rate between the IUI and the DIUI group was not significantly difference and it was not differ significantly from the natural mating within the same herd (80.9%, 59/73) (P=0.8). It could be concluded that using the new artificial insemination technique in pig i.e., IUI and DIUI with frozen boar semen, produced in Thailand, resulted in an acceptable level of fertilization and reproductive performance. However, an accurate insemination time in relation to ovulation should be aware. These results implied that the production of cryopreserved boar semen in Thailand might be applied to commercial scale for an advance artificial insemination as well as other biotechnological technique in the livestock animals. This technology could be used as a tool to improve the efficacy of pig industry in Thailand within a near future.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2549 สำนักงานกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองสนับสนุนและขยายพันธุ์สัตว์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา กองบัญชาการทหารสูงสุด อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา และศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย และโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุน สพ.ญ.คคนางค์ บูรณะอำนวย ในการศึกษาระดับปริญญาเอก และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ และนิสิตสัตวแพทย์ชั้นปีที่ 5 ที่ช่วยในการวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

คำนำ	ii
บทคัดย่อไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	vii
บทนำ	1
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน	6
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
เอกสารอ้างอิง	20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ผลของการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ณ 48 ชั่วโมง ในแม่สุกร	
ตารางที่ 2	ตารางที่ 2 อัตราการอุ้มท้อง อัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกสุกรแรกเกิดหลังทำการการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ด้วยอสุจิแช่แข็ง	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ 1	การเตรียมและเก็บน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง (ก) และการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนนำไปผสมเทียม (ข)	8
รูปที่ 2	การตรวจสัดโดยวิธีการกดหลัง (back pressure test) ร่วมกับการตรวจด้วยพ่อสุกร	9
รูปที่ 3	การติดตามการตกไข่ของแม่สุกร โดยใช้เครื่องอัลตราซาวน์ แบบตรวจผ่านทางทวาร	9
รูปที่ 4	การผสมเทียมแบบ IUI (ก, ข) และ DIUI (ค, ง)	10
รูปที่ 5	การชะล้างไข่และตัวอ่อนด้วยสารละลาย TCM 199 Hepes (ก) ออกจากท่อนำไข่และส่วนปลายของปีกมดลูก (ข)	11
รูปที่ 6	การตรวจการตั้งท้องในแม่สุกรหลังจากผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งแล้ว 1 เดือน เพื่อติดตามผลการผสม (ก) โดยอุปกรณ์อัลตราซาวน์แบบเรียลไทม์ บีโหมด (ข)	12
รูปที่ 7	การตรวจการตกไข่ในแม่สุกรที่ทำการผสมเทียม ก) ขนาดฟอลลิเคิลก่อนการตกไข่ประมาณ 2 วัน ข) ขนาดฟอลลิเคิลที่ใกล้ตกไข่มีขนาดประมาณ 1 ซม. สั	13
รูปที่ 8	ลักษณะของก้อนเหลือง (CL) ที่ปรากฏบนรังไข่ (วงกลม)	14
รูปที่ 9	โอโอไซต์และตัวอ่อนที่ได้จากการชะล้างท่อนำไข่และส่วนปลายของปีกมดลูก สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่กำลังขยาย 50 เท่า (ก) และ 30 เท่า (ข)	14
รูปที่ 10	ลูกสุกรที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก มีการพัฒนากระบวนการผลิตไปอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคและวิธีการผสมพันธุ์สุกรด้วยวิธีการผสมเทียม (artificial insemination) พบว่ามีจำนวนประชากรสุกรถึง 60 % ทั่วโลกที่ได้รับการทำการผสมเทียม (เติมพงศ์ และคณะ, 2005) และมีแนวโน้มจะมีการใช้ในการผลิตสุกรทั่วโลกเพิ่มขึ้นด้วย (Kemp et al., 2005) ในบางประเทศมีการทำการผสมเทียมสุกรสูงถึง 80% (Martinez et al., 2002) การผสมเทียมถือเป็นเทคนิคที่เก่าแก่ที่สุดของเทคโนโลยีการขยายพันธุ์สัตว์ ถูกนำมาใช้ในทางปฏิบัติจริงครั้งแรกที่ประเทศรัสเซียในช่วงปี ค.ศ. 1900 (Foote, 2002) และในปัจจุบันเทคโนโลยีการผสมเทียมก็ยังคงถูกใช้กันอย่างกว้างขวางในสัตว์หลายชนิด ซึ่งวัตถุประสงค์สำคัญของการใช้เทคนิคการผสมเทียมเพื่อการผลิตสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมก็คือ ต้องการให้การพัฒนาพันธุกรรมสัตว์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะพันธุกรรมดีจากพ่อพันธุ์ ในสุกรนั้นมีขึ้นครั้งแรกในช่วงต้นปี ค.ศ. 1930 แต่กว่าจะได้รับการพัฒนาอย่างจริงจังและใช้ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรนั้นก็อีก 50 ปีถัดมา ซึ่งปัจจุบันเทคโนโลยีนี้ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายและสัดส่วนของจำนวนสุกรที่ได้รับการผสมเทียมก็เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (Weitze, 2000) เช่นฟาร์มสุกรขนาดใหญ่ของบางประเทศในทวีปยุโรป เช่น ประเทศเบลเยี่ยม อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สเปน และทวีปอเมริกาเหนือ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดาและเม็กซิโก ที่พบว่ากว่า 75% ของสุกรในฟาร์มได้รับการผสมเทียม

การผสมเทียมมีข้อดีคือ ช่วยลดปัญหาการติดเชื้อจากการผสมพันธุ์ เนื่องจากมีการควบคุมคุณภาพของน้ำเชื้อก่อนนำไปผสมและมีการผสมยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตลอดจนสามารถรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรที่ผ่านการตรวจโรคเป็นประจำ ทำให้เกิดการกระจายพันธุกรรมที่ดีของพ่อสุกรไปได้อย่างรวดเร็ว นำน้ำเชื้อจากพ่อสุกรที่มีพันธุกรรมสูงไปผสมแม่สุกรด้วยปริมาตรของน้ำเชื้อและความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ต่ำกว่าการผสมจริง โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ 17-21°C เพื่อการผสมเทียม ซึ่งแต่ละครั้งมีปริมาตร 80-100 มล. และมีจำนวนตัวอสุจิมีชีวิต 2-3 พันล้านตัว ช่วยเพิ่มจำนวนแม่สุกรที่จะได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อที่รีดจากพ่อสุกรเพียงครั้งเดียวได้ จึงทำให้อัตราส่วนของจำนวนพ่อสุกรต่อแม่สุกรเพิ่มขึ้นได้ (Waberski et al., 1994)

สำหรับเทคนิคการผสมเทียมสุกรที่นิยมใช้กันในปัจจุบันนั้น คือเทคนิคการผสมเทียมที่คอมดลูก (cervical AI) ถูกคิดค้นขึ้นโดย Melrose และ O' Hagen ในช่วงปี ค.ศ. 1950 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ปล่อยน้ำเชื้อไว้บริเวณส่วนหลังของคอมดลูกโดยผ่านท่อผสมเทียมที่มีปลายลักษณะเป็นเกลียวคล้ายอวัยวะเพศของสุกรเพศผู้ ซึ่งน้ำเชื้อที่ใช้นั้นกว่าร้อยละ 99 อยู่ในรูปของน้ำเชื้อแช่เย็นที่ได้รับการเจือจางก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15-20°C เป็นเวลาไม่เกิน 3 วัน สำหรับน้ำเชื้อที่ใช้ในแต่ละครั้งนั้นจะมีจำนวนตัว

อสุจิมากกว่า 2500 ล้านตัวในสารละลาย 80-100 มล. และจะทำการผสม 2-3 ครั้งต่อระยะการเป็นสัด 1 ครั้ง (Johnson et al., 2000) โดยมีอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกที่ดีใกล้เคียงหรืออาจมากกว่าผลจากการผสมจริง (อัตราการเข้าคลอด 80-90%) ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 1 ของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมนั้นอยู่ในรูปของน้ำเชื้อแช่แข็งโดยจะใช้จำนวนอสุจิมากถึง 5-6 พันล้านตัว/ครั้ง ซึ่งแม้ว่าจะใช้จำนวนอสุจิมากแต่กลับได้อัตราการเข้าคลอดดีที่สุดประมาณ 70% เท่านั้น (Eriksson et al., 2002) อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมแบบ cervical AI ที่ปล่อยน้ำเชื้อที่คอมดลูกยังมีความจำเป็นต้องใช้จำนวนตัวอสุจิค่อนข้างมาก เพื่อให้มีตัวอสุจิเหลือเพียงพอสำหรับการปฏิสนธิกับไข่ที่ตกภายในท่อนำไข่และยังคงมีอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกไม่แตกต่างจากการผสมจริง ดังนั้นวิธีใดก็ตามที่จะสามารถลดจำนวนอสุจิที่ต้องใช้ต่อการผสมในแต่ละครั้งได้ ก็จะช่วยให้การใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้วิธีการผสมเทียมแบบ intrauterine insemination (IUI) และ deep intrauterine insemination (DIUI) จึงได้รับการพัฒนาขึ้น โดยวิธีการผสมข้างต้นจะสามารถลดจำนวนตัวอสุจิได้ถึง 3-60 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมเทียมแบบ cervical AI โดยไม่กระทบถึงผลของอัตราเข้าคลอดและจำนวนลูกต่อครอก (Watson and Behan, 2002; Martinez et al., 2002) นอกจากนี้ IUI และ DIUI ยังเป็นวิธีผสมเทียมที่สามารถลดความสูญเสียของตัวอสุจิจากการถูกเก็บกินโดยเม็ดเลือดขาวภายในมดลูกและลดปัญหาการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อขณะผสมเทียมได้ (Watson and Behan, 2002; Wongtawan et al., 2006)

การผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งถูกคิดค้นขึ้นด้วยวัตถุประสงค์เพื่อการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของพ่อสุกรไว้ให้นานขึ้นและการกระจายพันธุกรรมดีที่จะเป็นไปได้อย่างสะดวกรวดเร็วและกว้างขวางมากขึ้น ลดข้อจำกัดของการขนส่งน้ำเชื้อระหว่างประเทศ (Eriksson and Rodriguez-Martinez, 2000) อย่างไรก็ดีอสุจิของสุกรหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายจะค่อนข้างมีความอ่อนแอและมีอัตราการผสมติดต่ำ ซึ่งสาเหตุสำคัญเกิดจากการที่อสุจิสุกรมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากกว่าอสุจิของสัตว์ชนิดอื่น (Watson ,2000) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเทคโนโลยีการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI มาประยุกต์ใช้ร่วมกับน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งเพื่อลดจำนวนตัวอสุจิที่ใช้ในแต่ละครั้ง โดยยังคงมีอัตราเข้าคลอดและขนาดครอกไม่แตกต่างจากการผสมเทียมแบบ cervical AI ซึ่งจะเป็นการเพิ่มจำนวนแม่สุกรที่ได้รับการผสม ทำให้การถ่ายทอดพันธุกรรมเป็นไปได้อย่างกว้างขวางยิ่งขึ้น

สำหรับในประเทศไทย การศึกษาถึงการผสมเทียมแม่สุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นยังอยู่ในวงจำกัด ทำให้ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงผลที่จะได้รับภายหลังการผสม ไม่ว่าจะเป็นอัตราการปฏิสนธิ การตั้งท้อง การเข้าคลอดรวมถึงขนาดครอกของลูกสุกร ดังนั้นจึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้การศึกษาในครั้งนี้เกิดขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิภายในท่อนำไข่และปีกมดลูกทั้งสองข้างของแม่สุกร

หลังจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งแบบ IUI และ DIUI อีกทั้งเพื่อศึกษาถึงอัตราการตั้งท้อง เข้าคลอดและจำนวนลูกสุกรต่อครอกในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมด้วยวิธีดังกล่าว

แม้ว่าการผสมเทียมโดยปล่อยน้ำเชื้อไว้ที่คอมดลูกจะเป็นวิธีที่ง่าย ปฏิบัติได้เร็วและประหยัดก็ตาม แต่ด้วยข้อจำกัดของการที่ต้องใช้อสุจิจำนวนมากในการผสมแต่ละครั้งเพื่อจะให้ได้ผลการผสมที่อยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งไม่เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้กับอสุจิที่ผ่านกระบวนการบางอย่าง เช่น การคัดเลือกเพศ (sex-sorting) การแช่แข็งและละลาย (freezing-thawing) เป็นต้น เพราะอสุจิเหล่านี้จะอ่อนแอและมีจำนวนอสุจิมีชีวิตลดลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องคิดค้นและพัฒนาเทคนิคการผสมที่สามารถใช้ร่วมกับอสุจิจำนวนน้อยได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตที่ควรจะได้รับ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวคือ การผสมเทียมโดยปล่อยน้ำเชื้อที่ตัวมดลูก (IUI) และการผสมเทียมโดยปล่อยน้ำเชื้อที่ส่วนต้นของปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่ง (DIUI)

อุปกรณ์สำคัญที่ต้องใช้ในการผสมเทียมแบบ IUI นั้นก็คือ ท่อผสมเทียมพลาสติกที่มีลักษณะกึ่งแข็ง เส้นผ่านศูนย์กลางด้านนอก 4 ม.ม. ซึ่งสอดผ่านท่อผสมเทียมแบบ cervical AI ที่ล็อกอยู่บริเวณคอมดลูก โดยปลายของท่อผสมแบบ IUI นี้จะยื่นพ้นจากปลายของท่อผสมเทียมแบบ cervical AI เข้าสู่ตัวมดลูกประมาณ 15-20 ซ.ม. (Watson and Behan, 2002) มีรายงานการนำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นมาใช้ร่วมกับเทคนิคการผสมเทียมแบบ IUI ให้กับแม่สุกรที่เลี้ยงในฟาร์ม โดยในปี ค.ศ. 2002 Watson และ Behan ซึ่งทำการทดลองในแม่สุกรจำนวน 3240 ตัว พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกระหว่างกลุ่มแม่สุกรที่ผสมแบบ IUI ด้วยอสุจิจำนวน 1 พันล้านตัว และแม่สุกรที่ผสมแบบ cervical AI ด้วยจำนวนอสุจิจำนวน 3 พันล้านตัว ขณะที่ Roberts และ Bilkei (2005) ที่ทำการทดลองกับแม่สุกรจำนวน 1783 ตัว กลับพบว่าการใช้อสุจิแช่เย็นจำนวน 1 พันล้านตัวมาผสมเทียมแบบ IUI นั้น ให้จำนวนลูกสุกรต่อครอกน้อยกว่าแม่สุกรกลุ่มที่ผสมแบบ cervical AI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแม้ว่าจะมีอัตราการเข้าคลอดที่ใกล้เคียงกันก็ตาม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Rozeboom และคณะที่ทำการศึกษาในปี ค.ศ. 2004 โดยนักวิจัยกลุ่มนี้ยังพบอีกว่าหากลดจำนวนสำหรับผสมแบบ IUI ลงเหลือ 500 ล้านตัว จะทำให้อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกลดลงอย่างมาก ซึ่งจากผลการทดลองในอดีตชี้ให้เห็นว่าการใช้อสุจิแช่เย็นจำนวน 1 พันล้านตัวต่อการผสมแบบ IUI 1 ครั้ง จะให้อัตราการเข้าคลอดที่น่าพอใจ แต่กลับได้จำนวนลูกสุกรต่อครอกต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการผสมเทียมแบบ cervical AI ดังนั้นเพื่อให้ได้ทั้งอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกที่ดีจึงควรใช้อสุจิแช่เย็นจำนวนมากกว่า 1 พันล้านตัวเพื่อทำการผสมแบบ IUI ในแต่ละครั้ง

วิธีที่นิยมใช้ในการผสมเทียมแบบ DIUI นั้นคือ การสอดท่อขนาดเล็กที่มีความยืดหยุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.8 ม.ม. ความยาว 150-180 ซ.ม. (Martinez et al., 2001) ผ่านเข้าไปในท่อผสม

เทียมแบบ cervical AI ที่ล็อกอยู่บริเวณคอมดลูกอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งท่อผสมแบบ DIUI นี้จะถูกสอดผ่านตัวมดลูกเข้าไปสิ้นสุดบริเวณส่วนต้นของปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่งหรือประมาณ 8-55 ซ.ม. จากส่วนต่อระหว่างปีกมดลูกและท่อนำไข่ (Martinez et al. 2002) ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่รายงานถึงผลการผสมแม่สุกรที่เลี้ยงในระดับฟาร์มด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นโดยใช้วิธีการผสมเทียมนี้ Vazquez และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองที่ประเทศสเปนกับแม่สุกรจำนวน 329 ตัว โดยพวกเขาได้เปรียบเทียบผลการผสมเทียมแบบ DIUI ที่ใช้จำนวนอสุจิจำนวน 150 ล้านตัวต่อครั้ง กับการผสมเทียมแบบ cervical AI ที่ 3 พันล้านตัวต่อครั้ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกระหว่างการผสมทั้งสองแบบ อย่างไรก็ดีเขาสังเกตเห็นว่าขนาดครอกที่ได้หลังจากผสมเทียมแบบ DIUI มักจะน้อยกว่าเสมอ ในอีก 1 ปีถัดมา Day และคณะ (2002) ทำการทดลองในลักษณะที่คล้ายคลึงกันกับแม่สุกรจำนวน 105 ตัว โดยพบว่าการผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยอสุจิจำนวน 150 ล้านตัว ให้อัตราการเข้าคลอดไม่แตกต่างแต่ให้จำนวนลูกสุกรแรกคลอดน้อยกว่าการผสมเทียมแบบ cervical AI ด้วยอสุจิ 3 พันล้านตัว จึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานเบื้องต้นว่าขนาดครอกอาจเพิ่มขึ้นได้หากผสมแบบ DIUI ด้วยอสุจิจำนวนมากขึ้น โดยในปี ค.ศ. 2006 Martinez และคณะ ทำการทดลองเพื่อหาสาเหตุของจำนวนลูกแรกคลอดที่น้อยกว่าปกติหลังการผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยอสุจิจำนวน 150 ล้านตัว ซึ่งเขาสรุปว่าเป็นเพราะเกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียวของท่อนำไข่ (unilateral fertilization) และถ้าหากเพิ่มจำนวนอสุจิที่ใช้ในการผสมเป็น 600 ล้านตัว/ครั้ง ปัญหาดังกล่าวก็จะไม่เกิดขึ้น

สำหรับเหตุผลที่การผสมแบบ IUI และ DIUI ต้องการจำนวนอสุจิ/ครั้ง น้อยกว่าการผสมแบบ cervical AI โดยไม่ส่งผลกระทบถึงอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกนั้น เป็นเพราะวิธีการผสมแบบลึกทั้งสองวิธีข้างต้นสามารถลดความสูญเสียของตัวอสุจิจากปัญหาการไหลย้อนกลับหลังการผสม (semen backflow) ให้มีเหลือน้อยกว่า 20% (Mezalira et al., 2005) และปัญหาที่อสุจิถูกเก็บกินโดยเม็ดเลือดขาวในมดลูกก็น้อยลงด้วย อีกทั้งการสอดท่อผสมเทียมแบบลึกนั้นเป็นการกระตุ้นให้ท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียเกิดการหดตัวในลักษณะเดียวกับการถูกผสมด้วยน้ำเชื้อปริมาณมาก ส่งผลให้การเคลื่อนตัวของอสุจิเข้าสู่ตำแหน่งปฏิสนธิเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) อย่างไรก็ดีการผสมเทียมทั้งแบบ IUI และ DIUI นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้กับสุกรสาว เนื่องจากท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก ทำให้มักเกิดปัญหาขณะสอดท่อผสมที่ไม่สามารถทำได้หรือเป็นไปได้ด้วยความยากลำบากและอาจทำอันตรายต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของสุกร ซึ่งจะส่งผลกระทบถึงการให้ผลผลิตในภายหลังได้

ดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าในปัจจุบันการผสมเทียมแบบ cervical AI ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งยังคงถูกใช้อยู่ในวงจำกัดเนื่องด้วยเหตุผลสำคัญคืออัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกที่ต่ำ แม้ว่าจะใช้อสุจิ

จำนวนมากในแต่ละครั้งการผสมก็ตาม (Didion and Schoenbeck, 1996; Hofmo and Grevle, 2000; Eriksson et al., 2002) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอสุจิหลังผ่านการแช่แข็งและละลายมีสภาพอ่อนแอจนไม่สามารถเคลื่อนผ่านคอมดลูกและตัวมดลูกเพื่อไปยังตำแหน่งเก็บกักอสุจิ (sperm reservoir) ได้ในปริมาณที่มากพอจนทำให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคการผสมแบบลึกมาใช้ร่วมกับน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเพิ่มผลการผสมให้ดีขึ้น โดยในปี ค.ศ. 2003 Roca และคณะได้ทำการทดลองผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนอสุจิประมาณ 1 พันล้านตัว/ครั้งให้กับแม่สุกรหลังหย่านม 89 ตัว โดยส่วนหนึ่งเป็นสุกรที่ถูกเหนี่ยวนำการตกไข่ด้วยฮอร์โมนและอีกส่วนหนึ่งเป็นสุกรที่แสดงอาการเป็นสัดและตกไข่ตามธรรมชาติ พวกเขาพบว่าหลังทำการผสมให้กับแม่สุกรที่ถูกเหนี่ยวนำการตกไข่นั้นจะได้ผลการผสมทั้งอัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกอยู่ในเกณฑ์ดีไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยน้ำเชื้อแช่เย็น ในขณะที่แม่สุกรซึ่งตกไข่ตามธรรมชาตินั้นกลับให้ผลการผสมต่ำกว่ากลุ่มแรกและต่ำกว่าผลการผสมแบบ cervical AI ด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้สันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากสุกรที่ตกไข่ตามธรรมชาตินี้ได้รับการผสมเทียมในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมกับเวลาที่ไข่ตก ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีความสำคัญอย่างมากต่อความสำเร็จที่จะเกิดขึ้นภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง เนื่องจากอสุจิหลังผ่านการแช่แข็งและละลายจะมีอายุสั้นกว่าปกติ (Waberski et al., 1994) นอกจากนี้ Bolarin และคณะ (2006) ทำการผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิ 1 พันล้านตัว กับแม่สุกรที่ตกไข่ตามธรรมชาติจำนวน 407 ตัว และยังติดตามการเจริญของไข่ด้วยเครื่องอัลตราซาวน์ ซึ่งพบว่าหากทำการผสมเทียมในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับเวลาตกไข่แล้วจะได้อัตราการเข้าคลอดที่สูงถึง 80% และจำนวนลูกแรกคลอดเป็น 10 ตัว/ครอก โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นไม่ควรเกิน 4-8 ชม. ก่อนตกไข่ (Wongtawan et al., 2006)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าความสำเร็จหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นมีความเกี่ยวข้องกับช่วงเวลาผสมที่ต้องสัมพันธ์กับเวลาตกไข่อย่างมาก ซึ่งหากไม่มีการใช้เทคนิคอื่นใดเพื่อเหนี่ยวนำการตกไข่แล้ว การเอาใจใส่ในขั้นตอนการตรวจสัดจะมีความสำคัญและมีอิทธิพลอย่างมากต่ออัตราความสำเร็จที่จะเกิดขึ้น เนื่องจากตามทฤษฎีแล้วสุกรจะตกไข่ช่วงสองในสามของระยะเป็นสัดยืนนิ่งทั้งหมด (Soede and Kemp, 1997) ดังนั้นหากทำการผสมในช่วงเวลาดังกล่าวอัตราความสำเร็จที่ได้ก็ควรจะอยู่ในเกณฑ์ดี อย่างไรก็ตามในสภาพความเป็นจริงแล้วการตรวจสัดมักเป็นขั้นตอนที่ไม่ได้รับการเอาใจใส่จากเกษตรกรเท่าที่ควร ทำให้การผสมเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมผลลัพธ์ที่ได้จึงต่ำ โดย Bolarin และคณะ (2006) แนะนำว่าหากการผสมแบบ DIUI ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเกิดขึ้นนอกช่วงเวลาที่เหมาะสมแล้ว ควรเพิ่มจำนวนอสุจิเป็น 2 พันล้านตัว/ครั้ง ซึ่งจะให้อัตราการเข้าคลอดที่สูงขึ้นได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งตัวอสุจิสุกร และนำไปศึกษาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการตั้งท้อง อัตราการคลอด และจำนวนลูกเกิดหลังผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาอัตราการปฏิสนธิหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง แบบสอดท่อเข้าตัวมดลูกและแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูกในสุกร

การทดลองที่ 2 การศึกษาอัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง แบบสอดท่อเข้าตัวมดลูกและแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูกในสุกร

พ่อพันธุ์สุกร

พ่อสุกรพันธุ์แท้ลาร์จไวท์/ยอร์กเชียร์ (Yorkshire) แลนด์เรซ (Landrace) และดูรอค (Duroc) ที่โตเต็มที่อายุประมาณ 3 ปี ของฟาร์มสุกรพันธุ์แห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม มีสุขภาพแข็งแรงและผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์อยู่ในเกณฑ์ดี พันธุ์ละ 2 ตัว พ่อพันธุ์ดังกล่าวถูกใช้งานเป็นประจำเพื่อการผลิตลูกสุกรภายในฟาร์ม

การแช่แข็งน้ำเชื้อ (รูปที่ 1)

ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อสุกรด้วยวิธีการใส่ถุงมือ (gloved-hand technique) ซึ่งจะรีดเก็บเอาเฉพาะน้ำเชื้อส่วนที่มีอสุจิมาก (sperm rich fraction) และใช้ผ้าก๊อซกรองเอาส่วนเม็ดสาคูออก
2. ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตร เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรายตัว ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เป็นต้น ซึ่งน้ำเชื้อที่จะนำมาใช้ในกระบวนการแช่แข็งจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวรายตัวตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป
3. เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย BTS (Beltsville Thawing Solution) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ BTS 1-3 ส่วน (1:1 – 1:3)
4. รักษาอุณหภูมิในตู้เย็นที่ 15°C นาน 2 ชม.
5. ปั่น (centrifuge) ที่ 800 g 15°C นาน 10 นาที
6. เทส่วนของเหลวด้านบนออก

7. เจือจางส่วนที่เหลือด้วย Extender II (lactose solution และ egg yolk) ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1.5×10^9 ตัว/มล.

8. ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $5^{\circ}C$ เป็นเวลา 1.5 ชม.

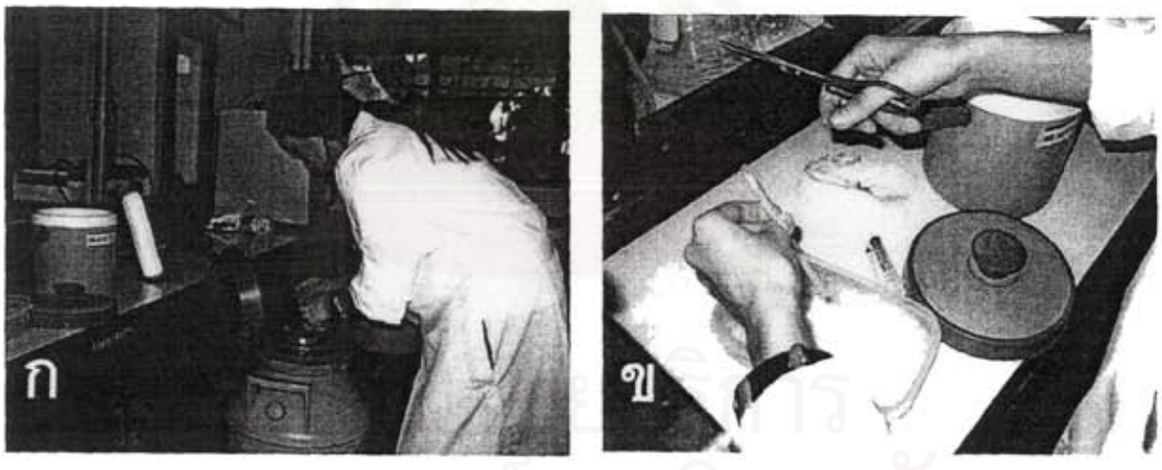
9. ที่ $5^{\circ}C$ ให้ทำการเจือจางเพิ่มด้วย Extender III (extender II, glycerol และ Equex STM) ในอัตราส่วน 2:1 ให้สารละลายสุดท้ายมีความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9 ตัว/มล.

10. บรรจุสารละลายน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.5 มล. แล้วปิดผนึก

11. ลดอุณหภูมิน้ำเชื้อที่บรรจุแล้ว ด้วยการวางหลอดฟางเหนือระดับผิวของไนโตรเจนเหลวที่ 3 ซม. นาน 20 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำเชื้อ

ละลายน้ำเชื้อในน้ำอุณหภูมิ $50^{\circ}C$ เป็นเวลา 12 วินาที เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย BTS ก่อนนำไปผสม

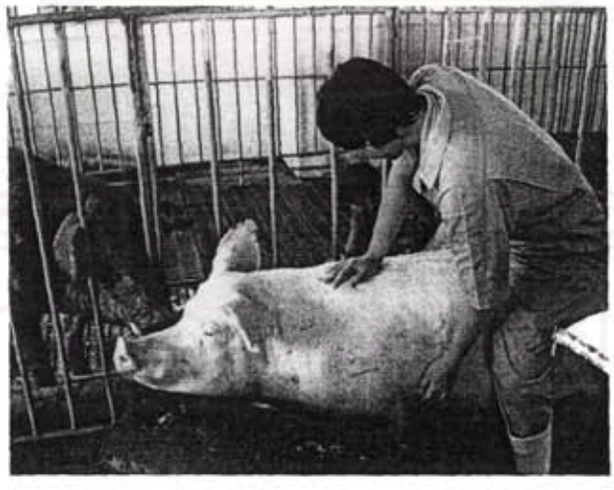


รูปที่ 1 การเตรียมและเก็บน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง (ก) และการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนนำไปผสมเทียม (ข)

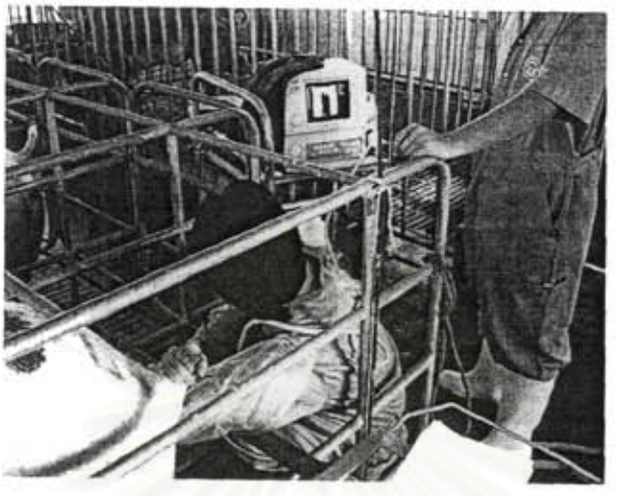
การผสมเทียม

<u>การทดลองที่ 1</u>

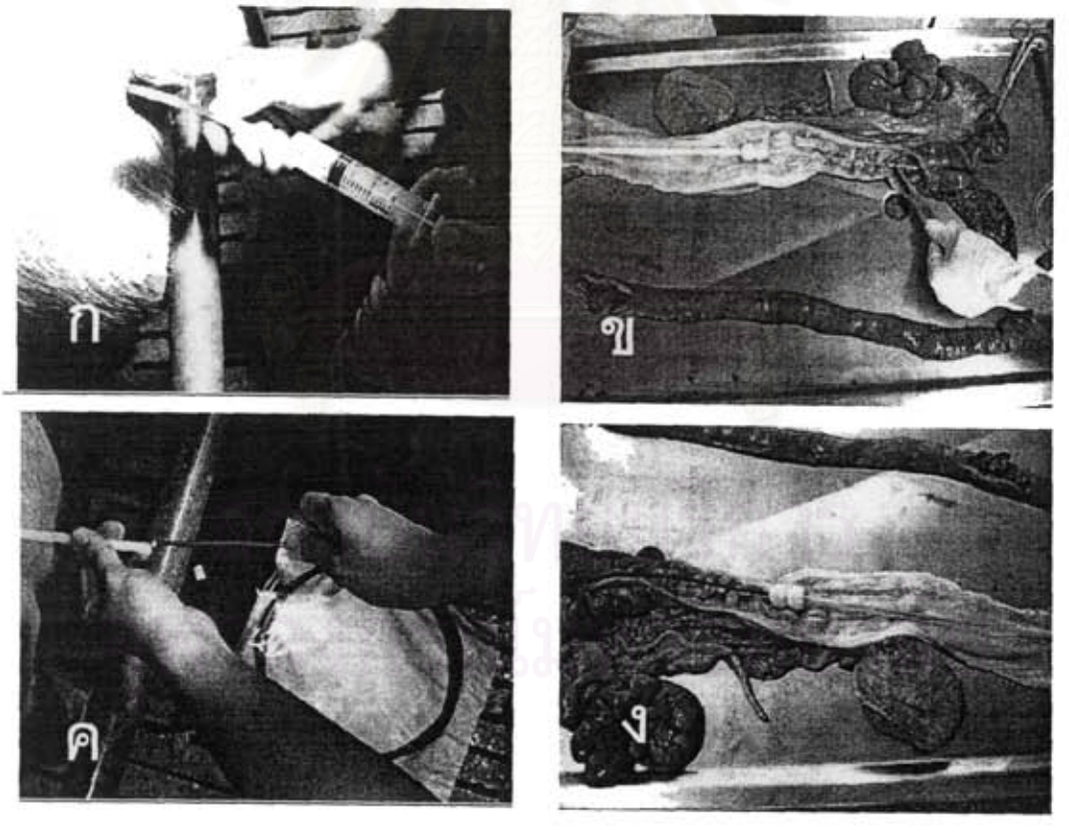
1. ทำการคัดเลือกแม่สุกรพันธุ์ผสมแลนด์เรซxยอร์กเชียร์ที่ผ่านการคลอดลูกมาแล้ว 10-13 ครอก จำนวน 10 ตัว โดยแม่สุกรทั้งหมดไม่มีประวัติของการผสมไม่ติดหรือมีปัญหาติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์
2. ทำการตรวจสัดโดยวิธีการกดหลัง (back pressure test) ร่วมกับการตรวจด้วยพ่อสุกร (รูปที่ 2)
3. แบ่งแม่สุกรออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละเท่าๆ กันด้วยวิธีสุ่ม เพื่อที่จะทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI โดยจะผสมครั้งแรกที่ 24 ชม. หลังจากเริ่มพบอาการเป็นสัดยืนนิ่งและจะผสมซ้ำทุกๆ 12 ชม. จนกระทั่งตกไข่ โดยในการผสมแบบ DIUI จะใช้อสุจิประมาณ $1x10^9$ ตัว/ครั้ง ใน BTS 10 มล. และ IUI จะใช้อสุจิประมาณ $2.0x10^9$ ตัว/ครั้ง ใน BTS 20 มล. (รูปที่ 4)
4. ในช่วงเวลาการผสม จะติดตามการตกไข่ของแม่สุกรแต่ละตัวทุกๆ 4 ชม. โดยใช้เครื่องอัลตรา-ซาวน์ แบบตรวจผ่านทางทวารหนัก (รูปที่ 3)
5. หลังจากตกไข่แล้ว 48 ชม. แม่สุกรจะถูกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ เพื่อทำการตัดเก็บมดลูก ปีกมดลูก ท่อนำไข่และรังไข่ เพื่อนำมาประเมินผลโดยการตรวจนับจำนวนก้อนเหลือง (Corpora Lutea: CL) บนรังไข่ทั้งสองข้าง จำนวนไข่และตัวอ่อนที่ได้จากการชะล้างท่อนำไข่และปลายปีกมดลูกทั้งสองข้าง



รูปที่ 2 การตรวจสัดโดยวิธีการกดหลัง (back pressure test) ร่วมกับการตรวจด้วยพ่อสุกร



รูปที่ 3 การติดตามการตกไข่ของแม่สุกร โดยใช้เครื่องอัลตราซาวน์ แบบตรวจผ่านทางทวารหนัก

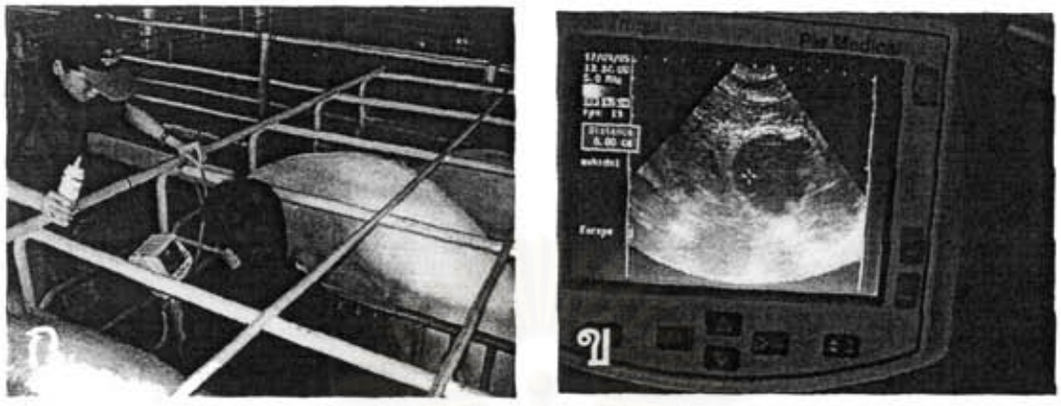


รูปที่ 4 การผสมเทียมแบบ IUI (ก, ข) และ DIUI (ค, ง)

รูปที่ 5 การชะล้างไข่และตัวอ่อนด้วยสารละลาย TCM 199 Hepes (ก) ออกจากท่อนำไข่และส่วนปลายของปีกมดลูก (ข)

<u>การทดลองที่ 2</u>

1. ทำการคัดเลือกแม่พันธุ์สุกรที่ผ่านการคลอดลูกมาแล้ว 2-8 ครอก จำนวน 18 ตัว โดยแม่สุกรทั้งหมดไม่มีประวัติของการผสมไม่ติดหรือมีปัญหาติดเชื้อทางระบบสืบพันธุ์
2. ทำการตรวจสัดโดยวิธีการกดหลัง (back pressure test) ร่วมกับการตรวจด้วยพ่อสุกร
3. แบ่งแม่สุกรออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละเท่าๆ กันด้วยวิธีสุ่ม เพื่อที่จะทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI โดยจะผสมเพียง 2 ครั้งคือ ที่ 24 และ 36 ชม. หลังจากเริ่มพบอาการเป็นสัดยืนนิ่ง ซึ่งจำนวนอสุจิและปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้ในแต่ละครั้งการผสมจะเท่ากันกับที่ใช้ในการทดลองที่ 1
4. ในช่วงเวลาการผสม จะติดตามการตกไข่ของแม่สุกรแต่ละตัวทุกๆ 12 ชม. โดยใช้เครื่องอัลตราซาวน์ แบบตรวจผ่านทางทวารหนัก
5. แม่สุกรที่ผ่านการผสมแล้วจะถูกตรวจการตั้งท้องด้วยวิธีสังเกตการกลับสัด ณ วันที่ 18-24 หลังเริ่มตรวจพบอาการเป็นสัด และ/หรือโดยการใช้เครื่องอัลตราซาวน์ ณ วันที่ 28-30 หลังเริ่มแสดงอาการเป็นสัด จดบันทึกอัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอก (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การตรวจการตั้งท้องในแม่สุกรหลังจากผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งแล้ว 1 เดือน เพื่อติดตามผลการผสม (ก) โดยอุปกรณ์อัลตราซาวน์แบบเรียลไทม์ บีโหมด (ข)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 6.12 (SAS Institute, Cary, NC, USA) ทำการเปรียบเทียบผลทางสถิติของค่าเฉลี่ยจำนวน corpus luteum (CL) ที่ตรวจนับได้จากรังไข่ด้านซ้ายและขวา รวมทั้งค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนตัวอ่อนที่พบภายในท่อนำไข่ด้านซ้ายและขวาของแม่สุกรแต่ละกลุ่ม ด้วยวิธี paired *t*-test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการตรวจพบไข่และตัวอ่อน รวมถึงค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนตัวอ่อนทั้งหมดที่พบภายหลังการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI โดยใช้ student's *t*-test เปรียบเทียบผลทางสถิติในส่วนของอัตราการตั้งท้องและอัตราการเข้าคลอดภายหลังการผสมด้วยวิธีต่างๆ โดยใช้ chi-square test และเปรียบเทียบจำนวนลูกสุกรแรกคลอดระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

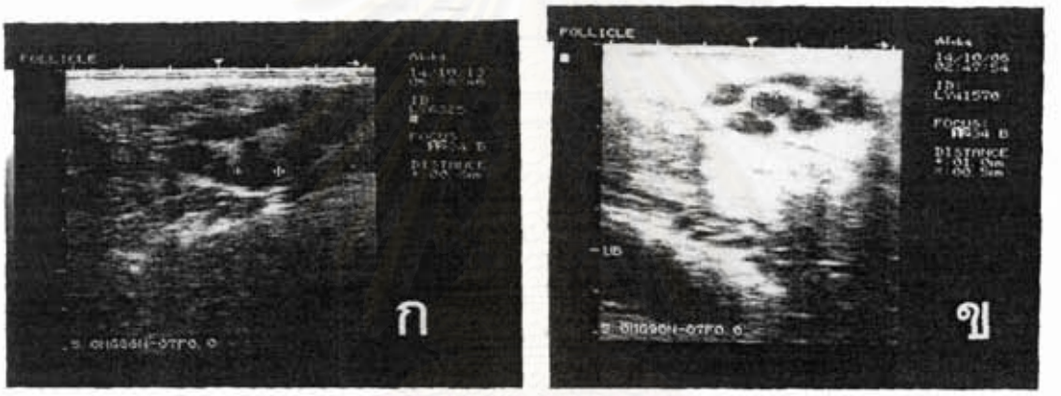
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลและวิจารณ์

ผลการทดลองทั้งหมดถูกแสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

การทดลองที่ 1

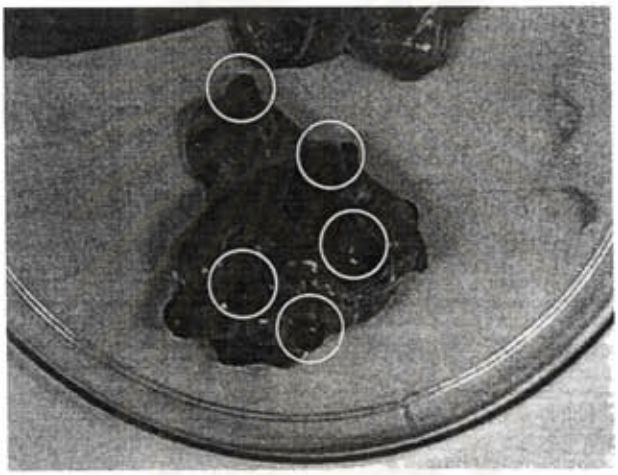
แม่สุกรทั้ง 10 ตัว ที่ใช้ในการทดลอง พบว่าหลังจากหย่านมแล้ว 2.9±0.32 วัน จึงเริ่มแสดงอาการเป็นสัดอีกครั้ง โดยมีระยะตั้งแต่เริ่มยืนนิ่งจนกระทั่งตกไข่อยู่ที่ 52.4±10.83 ช.ม. ซึ่งสามารถทราบได้จากการอัลตราซาวน์ผ่านทางทวารหนัก (รูปที่ 7) และยังพบว่าแม่สุกรแต่ละตัวจะได้รับการผสมเทียม 3.2±0.42 ครั้ง ก่อนตรวจพบการตกไข่



รูปที่ 7 การตรวจการตกไข่ในแม่สุกรที่ทำการผสมเทียม ก) ขนาดฟอลลิเคิลก่อนการตกไข่ประมาณ 2 วัน ข) ขนาดฟอลลิเคิลที่ใกล้ตกไข่มีขนาดประมาณ 1 ซม.

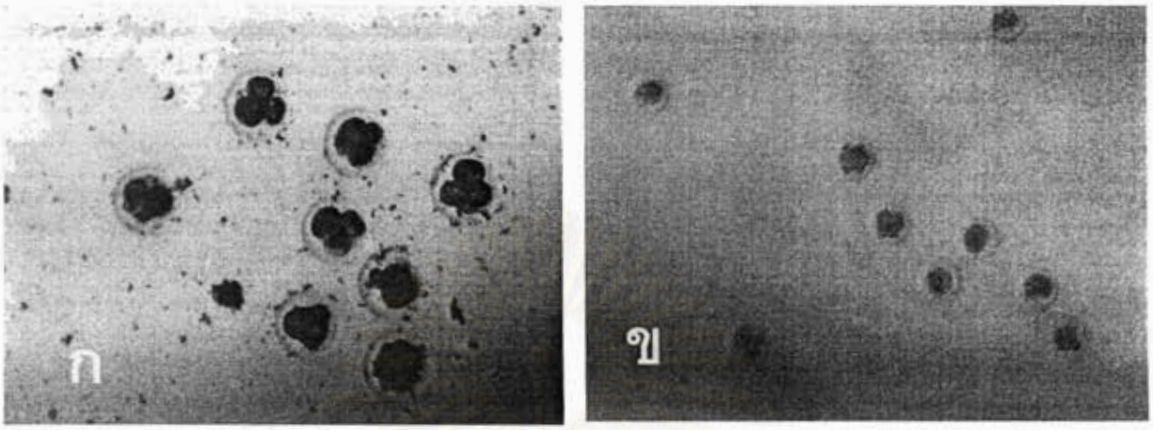
เมื่อทำการตรวจอวัยวะระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรทั้งหมด พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวน CL ที่ตรวจนับได้ (รูปที่ 8) จากรังไข่ด้านซ้ายและขวาของแม่สุกรแต่ละกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แม้ว่าจำนวน CL ที่ตรวจพบจากรังไข่ด้านขวาจะมีแนวโน้มมากกว่าด้านซ้ายก็ตาม (+2.4, p= 0.61 และ +3.4, p=0.06 สำหรับแม่สุกรกลุ่ม IUI และ DIUI ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งการพบในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับผลของ Tummaruk และคณะ (2005) ที่ตรวจพบว่าจำนวนไข่ที่ตกจากรังไข่ด้านซ้ายมีแนวโน้มมากกว่าด้านขวา (+1.8, p=0.08) โดยความแตกต่างที่ตรวจพบจากทั้งสองการทดลองนี้อาจมาจากลักษณะจำเพาะของแม่สุกรแต่ละตัว ภายหลังการชะล้างท่อนำไข่และส่วนปลายของปีกมดลูกด้วยสารละลาย TCM 199 Hepes พบว่าในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI นั้น มีอัตราการตรวจพบโอโอไซต์ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิและตัวอ่อนที่ได้รับการปฏิสนธิ (รูปที่ 9) โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 91.7±6.0% และ 75.3±33.6% ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตรวจพบของทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.3) อย่างไรก็ตีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการตรวจพบไข่และตัวอ่อนในแม่สุกรกลุ่ม DIUI มีค่า

ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เพราะแม่สุกร 1 ตัวที่อยู่ในกลุ่มดังกล่าวมีอัตราการตรวจพบไข่และตัวอ่อนเพียง 16.7% ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งอาจมาจากการที่แม่สุกรตัวนี้ถูกนำเข้าโรงฆ่าช้ากว่าแม่สุกรตัวอื่นๆ กล่าวคือหลังจากตกไข่แล้ว 58 ชม. แม่สุกรตัวนี้จึงถูกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์เพื่อเก็บอวัยวะระบบสืบพันธุ์มาตรวจ ซึ่งช้ากว่าค่าเฉลี่ยประมาณ 10 ช.ม. (ค่าเฉลี่ยคือ 47.8 ชม.) จึงอาจเป็นไปได้ว่าไข่และตัวอ่อนบางส่วนได้เคลื่อนลงมายังปีกมดลูกแล้ว (Almond, 1994) เป็นผลให้อัตราการตรวจพบไข่และตัวอ่อนจากท่อนำไข่และปลายปีกมดลูกในแม่สุกรตัวนี้ต่ำกว่าปกติ



รูปที่ 8 ลักษณะของก้อนเหลือง (CL) ที่ปรากฏบนรังไข่ (วงกลม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ไข่และตัวอ่อนที่ได้จากการชะล้างท่อนำไข่และส่วนปลายของปีกมดลูก สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่กำลังขยาย 50 เท่า (ก) และ 30 เท่า (ข)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ณ 48 ชั่วโมง ในแม่สุกร

วิธีผสม	เบอร์แม่สุกร	จำนวนครั้งที่ผสม	จำนวน CL บนรังไข่			จำนวนไข่และตัวอ่อนในท่อนำไข่และปีกมดลูก				ตัวอ่อนในท่อนำไข่และปีกมดลูก					
			ข้าย	ขวา	ทั้งหมด	ข้าย	ขวา	ทั้งหมด	ร้อยละ (%)	ข้าย		ขวา		ทั้งหมด	
										จำนวน	ร้อยละ (%)	จำนวน	ร้อยละ (%)	จำนวน	ร้อยละ (%)
IUI	2	3	12	14	26	12	13	25	96.15	9	75	12	92.31	21	84
	4	3	8	27	35	7	27	34	97.14	1	14.29	13	48.15	14	41.18
	6	3	11	11	22	10	9	19	86.36	9	90	5	55.56	14	73.68
	8	3	11	8	19	8	8	16	84.21	8	100	8	100	16	100
	10	3	12	6	18	12	5	17	94.44	11	91.67	4	80	15	88.24
	mean	3	10.8	13.2	24	9.8	12.4	22.2	91.66	7.6	74.2	8.4	75.2	16	77.42
	SD	0	1.64	8.29	6.9	2.28	8.65	7.46	5.95	3.85	34.68	4.04	22.36	2.92	22.35
DIUI	1	3	12	14	26	11	14	25	96.15	1	9.09	0	0	1	4
	3	4	9	13	22	5	12	17	77.27	0	0	1	8.33	1	5.88
	5	4	9	8	17	9	7	16	94.12	0	0	0	0	0	0
	7	3	6	12	18	0	3	3	16.67	0	0	0	0	0	0
	9	3	10	16	26	10	14	24	92.31	8	80	12	85.71	20	83.33
	mean	3.4	9.2	12.6	21.8	7	10	17	75.3	1.8	17.82	2.6	18.81	4.4	18.64
	SD	0.55	2.17	2.97	4.27	4.53	4.85	8.8	33.61	3.49	34.98	5.27	37.57	8.73	36.25

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนตัวอ่อนที่พบภายในท่อนำไข่ซึ่งหมายถึงอัตราการปฏิสนธิในการทดลองนี้ด้านซ้ายและขวาของแม่สุกรแต่ละกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (74.2% และ 75.2%, p= 0.94 สำหรับแม่สุกรกลุ่ม IUI และ 17.82% และ 18.81%, p=0.76 สำหรับแม่สุกรกลุ่ม DIUI) แสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI หรือ DIUI ล้วนมีโอกาสทำให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นภายในท่อนำไข่ทั้งสองข้าง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Martinez และคณะ (2002) ที่ตรวจพบตัวอ่อนในปีกมดลูกทั้งสองข้างในอัตราที่ใกล้เคียงกันภายหลังการผสมเทียมแบบ DIUI ให้กับแม่สุกรหลังหย่านมที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและตกไข่ด้วยฮอร์โมน นั่นหมายถึง ตัวอสุจิที่ถูกปล่อยภายในส่วนปลายของปีกมดลูกเพียงข้างใดข้างหนึ่งจากการผสมเทียมแบบ DIUI สามารถเคลื่อนผ่านทางช่องท้องและทางมดลูก (Martinez et al., 2002) เพื่อข้ามไปปฏิสนธิกับไข่ที่ตกภายในท่อนำไข่ฝั่งตรงข้ามได้ แต่ในบางกรณีการทำ DIUI ก็ทำให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นที่

เพียงข้างเดียวของท่อนำไข่ (unilateral fertilization) ดังเช่นการทดลองของ Martinez และคณะ (2006) ที่นำน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นมาผสมเทียมแบบ DIUI ให้กับแม่สุกรซึ่งตกไข่ตามธรรมชาติด้วยจำนวนอสุจิ 150 ล้านตัวในสารละลายน้ำเชื้อ 10 มล. โดยเขาได้สันนิษฐานถึงสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียวว่ามาจากจำนวนอสุจิและ/หรือปริมาตรของสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้สำหรับการผสมแต่ละครั้งนั้นมีไม่เพียงพอ เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นของเขาในอดีตแสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมแบบ DIUI ให้กับแม่สุกรที่ตกไข่ตามธรรมชาติโดยใช้จำนวนอสุจิ 600 ล้านตัวในสารละลายน้ำเชื้อ 20 มล.นั้น จะไม่พบการเกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียวหรือสองข้างแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete bilateral fertilization) ขึ้นเลย อย่างไรก็ดีเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการปฏิสนธิภายหลังการผสมเทียมพบว่า กลุ่มแม่สุกรที่ได้รับการผสมแบบ IUI มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่ม DIUI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (IUI=77.4±22.4% และ DIUI=18.6±36.3%, p=0.02) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการที่แม่สุกรกลุ่ม IUI ได้รับการผสมเทียมครั้งสุดท้ายในช่วงเวลาใกล้เคียงกับช่วงเวลาตกไข่ (3 ช.ม. ก่อนตกไข่ถึงช่วงเวลาตกไข่) ทำให้โอกาสที่อสุจิจะปฏิสนธิกับไข่ได้สำเร็จมีมากกว่ากลุ่ม DIUI ซึ่งแม่สุกร 3 จาก 5 ตัวได้รับการผสมครั้งสุดท้ายที่ 8 ถึง 12 ชม. ก่อนตกไข่โดยช่วงเวลาดังกล่าวไม่เหมาะสมนักสำหรับการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเนื่องจากอสุจิหลังผ่านการแช่แข็งจะมีชีวิตอยู่ภายในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมียโดยที่ยังคงความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้เพียง 4-8 ช.ม. หลังจากผสมเทียม (Wongtawan et al., 2006; Waberski et al., 1994) ทั้งนี้เป็นเพราะอสุจิที่ผ่านการแช่แข็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะที่คล้ายคลึงกับการเกิดคาปาซิเตชั่น (sperm capacitation) เป็นผลให้อสุจิมีอายุสั้นลง (Watson, 2000) สำหรับการผสมเทียมในช่วงเวลาไม่เหมาะสมที่เกิดขึ้นกับแม่สุกรกลุ่ม DIUI นั้น ถือเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญเนื่องจากการไม่ทราบเวลาตกไข่ที่แน่นอนทำให้ไม่สามารถทำนายเวลาผสมที่เหมาะสมที่สุดได้ ดังนั้นจึงเป็นการดีหากมีการนำฮอร์โมนมาใช้กับแม่สุกรเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ในช่วงเวลาที่ทราบแน่นอนก่อนจะทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดให้มากยิ่งขึ้น (Roca et al. 2003)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการตั้งท้องภายหลังการผสมซึ่งคำนวณจากจำนวนแม่สุกร ที่ตรวจพบตัวอ่อนพบว่า การผสมเทียมแบบ DIUI มีอัตราการตั้งท้องที่ 60% (3/5) ขณะที่กลุ่ม IUI นั้นสามารถตรวจพบตัวอ่อนได้จากแม่สุกรทุกตัว (100%; 5/5) ซึ่งอัตราการตั้งท้องของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.1) อย่างไรก็ตามตัวเลขข้างต้นอาจไม่สามารถใช้บ่งบอกถึงอัตราการตั้งท้องที่จะเกิดขึ้นจริง เนื่องจากตามทฤษฎีแล้วแม่สุกรจะไม่สามารถดำรงการตั้งท้องต่อไปได้ หากในระยะแรกของการตั้งท้องมีจำนวนตัวอ่อนภายในมดลูกน้อยกว่า 4-5 ตัว (Flowers, 2001; Polge et al., 1996) จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากว่าอัตราการตั้งท้องจริงในแม่สุกรกลุ่ม DIUI อาจต่ำเพียง 20% (1/5) ดังนั้นเพื่อให้

ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น อาจมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนแม่สุกรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลองให้มากยิ่งขึ้น

การทดลองที่ 2

จากการทดลองที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยนำเอาน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมกับแม่พันธุ์จำนวน 18 ตัว ด้วยวิธี IUI และ DIUI และสังเกตการกลับสัดของแม่สุกรที่ 18-24 วันหลังการผสมครั้งแรก จากการศึกษาพบว่าอัตราการผสมติดตั้งท้องของแม่สุกรกลุ่ม IUI มีค่าเท่ากับ 88.9% (8/9) ในขณะที่แม่สุกรกลุ่ม DIUI มีค่าเป็น 66.7% (6/9) โดยอัตราการผสมติดของแม่สุกรทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและยังไม่แตกต่างกับผลของแม่สุกรกลุ่มที่ถูกผสมจริงด้วยพ่อสุกรซึ่งถือเป็นกลุ่มควบคุม (80.9%; 59/73) (p=0.8) (ตารางที่ 2) สำหรับสาเหตุของความล้มเหลวของการตั้งท้องในแม่สุกรกลุ่มที่ได้รับการผสมเทียมนั้น คาดว่ามาจากช่วงเวลาผสมที่ไม่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาตกไข่และปัญหาการอุดตันหรือการรั่วของท่อผสมเทียมแบบ DIUI กล่าวคือ มีการตรวจพบว่าแม่สุกรบางตัวตกไข่ในช่วง 12 ชม. แรกหลังตรวจพบการเป็นสัดยืนนิ่ง ซึ่งตามทฤษฎีแล้วไข่ที่ตกจะมีอายุเพียง 8-10 ชม. ภายในทางเดินระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย (Belstra et al., 2001) ขณะที่การผสมเทียมเริ่มทำครั้งแรกที่ 24 ชม. หลังเริ่มตรวจพบการเป็นสัด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่อสุจิจะสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้สำเร็จ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 อัตราการผสมติด อัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกสุกรแรกเกิดหลังทำการการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ด้วยอสุจิแช่แข็ง

	วิธีผสม		
	IUI	DIUI	ผสมจริง
จำนวนแม่สุกรที่ผสม	9	9	73
จำนวนสุกรตั้งท้อง (%)	8/9 (88.9)	6/9 (66.7)	59/73 (80.8)
จำนวนสุกรเข้าคลอด (%)	7/9 (77.8)	6/9 (66.7)	57/73 (78.1)
จำนวนลูกสุกรแรกเกิด/ครอก (mean±SD)	68 (11.3±2.9)	46 (7.7±3.0)	512 (8.9±3.0)
จำนวนลูกสุกรแรกเกิดมีชีวิต/ครอก (mean±SD)	59 (9.8±3.6)	44 (7.3±2.9)	457(8.0±2.8)

สำหรับปัญหาการอุดตันและการรั่วของท่อผสมแบบ DIUI นั้น ถูกตรวจพบขณะทำการผสมแม่สุกรบางตัว ซึ่งปัญหาข้างต้นอาจเป็นสาเหตุให้จำนวนอสุจิมีชีวิตที่จะเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำไข่ของแม่สุกรมีไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความสำเร็จของการปฏิสนธิและตั้งท้อง ดังนั้นการชะล้างท่อผสมเทียมด้วยน้ำยาละลายน้ำเชื้อก่อนทำการผสมทุกครั้ง จึงอาจเป็นหนทางหนึ่งที่ช่วยในการลืบทราบถึงปัญหาได้

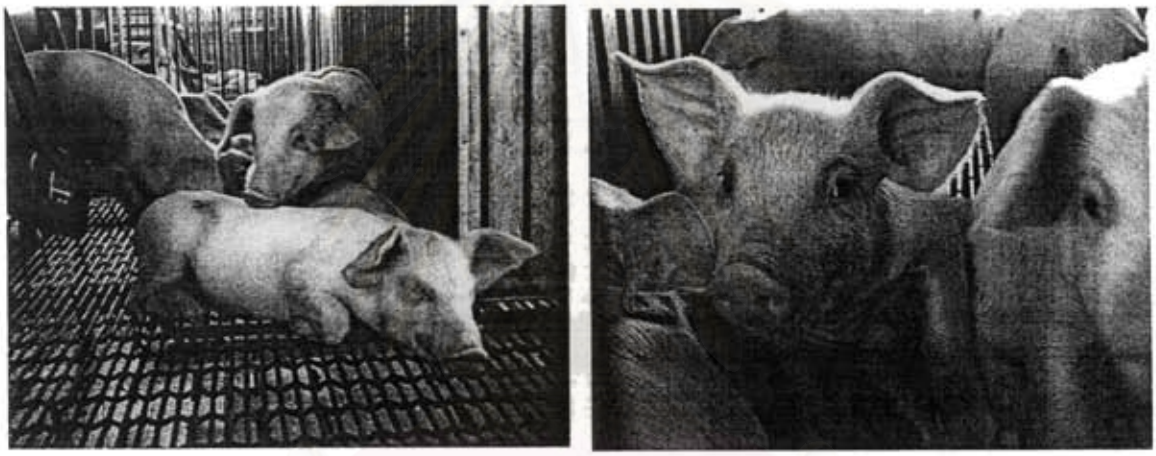
การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการผสมเทียมแม่สุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยการผสมแบบ IUI และ DIUI พบว่ามีจำนวนแม่สุกรตั้งท้องภายหลังการผสมเทียมถึง 13 ตัวที่เข้าคลอด โดยเป็นแม่สุกรกลุ่ม IUI 7 ตัว (77.8%; 7/9) และเป็นแม่สุกรกลุ่ม DIUI จำนวน 6 ตัว (66.7%; 6/9) ซึ่งอัตราการเข้าคลอดของแม่สุกรทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งไม่แตกต่างกับอัตราการเข้าคลอดของแม่สุกรกลุ่มควบคุมอีกด้วย (78.1%; 57/73) (p=0.9) แสดงว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งให้ผลสำเร็จที่ใกล้เคียงและเทียบเท่ากับการผสมธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ไม่มีกลุ่มควบคุมที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรที่ไม่แช่แข็ง ซึ่งน่าจะเป็นงานวิจัยที่น่าจะศึกษาต่อไปเพื่อทำการเปรียบเทียบ สำหรับแม่สุกร 1 ตัวจากกลุ่ม IUI ที่ไม่เข้าคลอดนั้น เริ่มแสดงอาการเป็นสัดอีกครั้งในวันที่ 26 หลังได้รับการผสมเทียมซึ่งถือว่าเป็นการกลับสัดไม่ตรงรอบ จึงสันนิษฐานเบื้องต้นว่าอาจมีการตายของตัวอ่อนในช่วงหลังสัปดาห์ที่ 2 ของการตั้งท้องเกิดขึ้น (early embryonic death) (Flowers, 2002) เป็นที่น่าสังเกตว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งไม่จำต้องทำการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI เสมอไป ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการวิจัยในการทดลองที่ 1 และมีแนวโน้มของอัตราความสำเร็จที่สูงกว่าเมื่อทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI

ในส่วนของจำนวนลูกสุกรแรกคลอดต่อครอกที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 11.3±2.9 (7-16) และ 7.7±3.0 (3-11) สำหรับแม่สุกรกลุ่ม IUI และ DIUI ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p

>0.05) ซึ่งจำนวนลูกสุกรดังกล่าวมีค่าที่ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Roca และคณะ (2003) ที่พบว่าแม่สุกรหลังได้รับการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดประมาณ $1x10^9$ ตัว/ครั้ง นั้นมีจำนวนลูกสุกรแรกคลอดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 9.25 ตัว/ครอก แต่จะเห็นว่าในการศึกษาครั้งนี้ค่าเฉลี่ยจำนวนลูกสุกรต่อครอกของแม่สุกรกลุ่ม DIUI มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม IUI ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 1 ที่พบว่าอัตราการปฏิสนธิภายหลังการผสมเทียมแบบ DIUI มีค่าต่ำกว่าแบบ IUI ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสาเหตุที่ทำให้ขนาดครอกของกลุ่ม DIUI น้อยกว่ากลุ่ม IUI นั้นมาจากความล้มเหลวในการปฏิสนธิทำให้มีอัตราปฏิสนธิในกลุ่ม DIUI ที่ต่ำกว่า โดยเป็นไปได้ว่าตัวอสุจิในการผสมแบบ DIUI อาจเข้าไปเพียงปีกมดลูกด้านเดียว ในขณะที่การผสมเทียมแบบ IUI ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่จากจุดที่วางน้ำเชื้อไปยังจุดปฏิสนธิส่วนของแอมพูล่าของท่อนำไข่ส่วนต้นได้ทั้งสองข้าง ทั้งนี้สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงคือในปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรคือ ช่วงเวลาของการผสมเทียมนั้นจะต้องให้ใกล้เคียงกับช่วงเวลาตกไข่มากที่สุด (Wongtawan et al., 2006) เนื่องจากตัวอสุจิที่แช่แข็งจะมีอายุที่ค่อนข้างสั้น ดังนั้นจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในการพัฒนาเทคนิคการการเหนี่ยวนำให้แม่สุกรตกไข่ในช่วงเวลาที่แน่นอน โดยอาจใช้ฮอร์โมนฮิวแมนโครีโอนิกโกนาโดโทรปิน (hCG) (Dziuk and Baker, 1962; Hunter, 1967) หรือฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสชิ่ง (GnRH-analog) (Brussow et al., 1996) ฉีดในแม่สุกรในช่วงเป็นสัด แล้วจึงทำการผสมเทียมในช่วงเวลาที่เหมาะสม ซึ่งอาจช่วยแก้ปัญหาในกรณีที่แม่พันธุ์แต่ละตัวจะมีเวลาที่ตกไข่ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อาจใช้วิธีการปรับให้ระยะห่างของการผสมเทียมแต่ละครั้งไม่เกิน 6-8 ช.ม. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่อสุจิหลังผ่านการแช่แข็งแล้วจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในทางเดินระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย (Waberski et al. 1994; Bertani et al. 1997) แต่การเพิ่มจำนวนหรือความถี่ในการผสมเทียมนี้เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติ เนื่องจากต้องสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่ายอีกทั้งยังทำให้การแพร่กระจายพันธุกรรมดีของพ่อสุกรเป็นไปได้ช้าลงจากการที่ต้องใช้จำนวนอสุจิทั้งหมดต่อการผสมแม่สุกร 1 ตัวเพิ่มมากขึ้น

นอกจากช่วงเวลาของการผสมเทียมที่ต้องมีความเหมาะสมกับช่วงเวลาตกไข่แล้ว จำนวนอสุจิและปริมาตรของสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมแต่ละครั้งก็มีความสำคัญต่อความสำเร็จภายหลังการผสมเช่นเดียวกัน (Martinez et al., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI เพราะวิธีดังกล่าวเป็นการผสมเทียมที่ปล่อยตัวอสุจิไว้ที่ปีกมดลูกเพียงข้างใดข้างหนึ่ง ซึ่งถ้าหากจำนวนตัวอสุจิมีชีวิตและ/หรือปริมาตรของสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้ผสมมีไม่เพียงพอแล้ว มีโอกาสเป็นไปได้อย่างมากที่จะเกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียวของท่อนำไข่หรือการปฏิสนธิสองข้างแบบไม่สมบูรณ์ขึ้น เป็นผลให้อัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอดและ/หรือจำนวนลูกสุกรแรกคลอดต่อครอกลดลงได้ โดยทั้งสองปัจจัยนี้จะมีความสำคัญมากยิ่งขึ้นหากใช้น้ำเชื้อแช่แข็งทำการผสมแบบ DIUI ให้กับแม่สุกรที่ตกไข่ตาม

ธรรมชาติซึ่งไม่สามารถทำนายเวลาตกไข่ที่แน่นอนได้ เพราะการเพิ่มจำนวนตัวอสุจิและ/หรือปริมาตรสารละลายน้ำเชื้อในแต่ละครั้งการผสมให้อยู่ในระดับพอเหมาะจะเป็นการเพิ่มโอกาสที่อสุจิจะเคลื่อนเข้าสู่ตำแหน่งเก็บอสุจิภายในท่อนำไข่ (sperm reservoir) ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะทำให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นในท่อนำไข่ทั้งสองข้างได้ (Martinez et al., 2006) อย่างไรก็ดีในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลยืนยันถึงจำนวนอสุจิแข่แข็งที่น้อยที่สุดที่ต้องใช้แต่ละครั้งในการผสมแบบ DIUI ให้กับสุกรที่ตกไข่ตามธรรมชาติเพื่อให้ได้ผลการผสม (อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอก) ในระดับที่น่าพอใจและไม่มีความแตกต่างจากผลการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่เย็น



รูปที่ 10 ลูกสุกรที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งที่ถูกผลิตขึ้นในประเทศไทยเมื่อนำไปใช้ผสมเทียมในแม่สุกรแบบการฉีดเข้าสู่มดลูกโดยตรง (DIUI และ IUI) นั้น สามารถลดจำนวนอสุจิที่ต้องใช้ต่อการผสมในแต่ละครั้งลงได้ โดยที่ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเข้าคลอดและขนาดครอกอยู่ในระดับที่น่าพอใจหากทำการผสมในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับเวลาตกไข่มากที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งในเชิงพาณิชย์ขึ้นในประเทศไทย เพื่อใช้สำหรับการผสมเทียมหรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ ต่อไป ซึ่งในที่สุดแล้วเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรของประเทศไทยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

เติมพงศ์ วงศ์ตะวัน, พีระพงษ์ สำราญทรัพย์ และเผด็จ ธรรมรักษ์. 2005 (2548). การผสมเทียมแบบปล่อยน้ำเชื้อเข้ามดลูกในสุกร: เทคนิค การนำไปใช้ และข้อจำกัด. เวชสารสัตวแพทย์. 35 (3): 11-20.

Almond, G.W. 1994. When (not) to move your sows. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar.

Belstra, B.A., Flowers, W.L., Rozeboom, K.J. and See, M.T. 2001. Factors contributing to variation of duration of estrus and time of ovulation in a commercial sow herd. Annual Swine Report. NC State University.

Bertani, G.R., Scheid, I.R., Fialho, F.B., Rubin, M.I.B., Wentz, I. and Goncalves, P.B.D. 1997. Effect of the time of artificial insemination with frozen-thawed or fresh semen on embryo viability and early pregnancy rate in gilts. Theriogenology 48: 933-945.

Bolarin, A., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Hernandez, M, Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2006. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. Theriogenology 65: 669-680.

Brussow, K.P., Jochle, W. and Huhn. U. 1996. Control of ovulation with a GnRH analog in gilts and sows. Theriogenology 46: 925-934.

Didion, B.A. and Schoenbeck, R.A. 1996. Fertility of frozen boar semen used for AI in commercial farm with newly developed device. Theriogenology 59: 213 (Abst).

Dziuk, P.J. and Baker, R.D. 1962. Induction and control of ovulation in swine. J Anim Sci 21: 697-699.

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.

Eriksson , B.M. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. Anim. Reprod. Sci. 63: 205-220.

Flowers, B. 2002. Using reproductive physiology to troubleshoot fertility problems (part II) in Swine News 25 (8). NCSU Extension Swine Husbandry.

Polge, C., Rowson, L.E.A. and Chang, M.C. 1996. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. J. Reprod. Fert. 12: 395-397.

Roberts, P.K. and Bilkei, G. 2005. Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sows. Reprod. Dom. Anim. 40: 489-491.

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology 60: 77-87.

Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J.M., Martinez, E., Roca, J., Sanz, L. And Calvete, J.J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. Theriogenology 63: 514-535.

Rozeboom, K.J., Reicks, D.L. and Wilson, M.E. 2004. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. J. Anim. Sci. 82: 2164-2168.

Soede, N.M. and Kemp. B. 1997. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. J. Reprod. Fertil. 52 (Suppl), 91-103.

Tummaruk, P., Samransarp, P., Techakumphu, M. and Kunavongkrit, A. 2005. Sperm transport after deep intrauterine insemination compared with conventional artificial insemination in pig. Proc. 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress, Sept 19-21, 2005 EDSA Shangri-La, Pasig City, Philippines: 89-91.

Vazquez, J.M., Martinez, E., Parrilla, I. Cuello, C. Gil, M.A., Lucas, X., Roca, J., Vazquez, J.M., Didion, B.A. and Day, B.N. 2001. Deep intrauterine insemination in natural post-weaning oestrus sows. Proc 6th Int Con Pig Reprod, Columbia, MO, p. 134.

Waberski, D., K.F. Weitze, T. Gleumes, M. Schwarz, T. Willmen and R. Petzoldt.1994. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. Theriogenology 42: 831-40.

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

Watson, P.F. and Behan, J.R. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. Theriogenology 57: 1683-1693.

Weitze, K.F. 2000. Update on the worldwide application of swine AI. In: Johnson, L.A., Guthrie, H.D. (eds), Boar Semen Preservation IV. Allen Press, Lawrence, KS, pp. 141-146.

Westendorf, P.L., Richter, L. and Treu, H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Laborund Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-verfahren. Dtsch Tierarztl Wschr. 82: 261-267.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย