รายงานผลการวิจัย

(ฉบับสมบูรณ์)

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีงบประมาณ 2546

เรื่อง

การศึกษาการกระจายตัวของอสุจิหลังการผสมเทียมแบบการสอดท่อเข้ามดลูกหรือเข้าปีกมดลูกสุกร

โดย

ผศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์	หัวหน้าโครงการ
น.สพ. พีระพงศ์ สำราญทรัพย์	ผู้ร่วมวิจัย
นาง วันเพ็ญ อดุลยภาพ	ผู้ร่วมวิจัย
นาย จินดา สิงห์ลอ	ผู้ร่วมวิจัย
ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ	ที่ปรึกษาโครงการ
ศ. น.สพ. ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต	ที่ปรึกษาโครงการ

กันยายน 2548

การศึกษาการกระจายตัวของอสุจิหลังการผสมเทียม แบบการสอดท่อเข้ามดลูกหรือเข้าปีกมดลูกสุกร

เผด็จ ธรรมรักษ์ * พีระพงศ์ สำราญทรัพย์ วันเพ็ญ อดุลยภาพ จินดา สิงห์ลอ
มงคล เตชะกำพุ อรรณพ คุณาวงษ์กฤต

ภาควิชา สูติศาสตร์เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
* ผู้รับผิดชอบบทความ e-mail address: Padet.T@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของตัวอสุจิในส่วนต่างๆ ของมดลูกและท่อนำไข่ 24 ชั่วโมง หลังผสมเทียมด้วยวิธีผสมเทียมแบบปกติ (AI) เปรียบเทียบกับการผสมเทียมด้วยวิธีสอดท่อเข้ามดลูก (intra-uterine insemination, IUI) และ วิธีสอดท่อเข้าปีกมดลูก (deep intra uterine insemination, DIUI) ในแม่สุกรนาง การทดลองนี้ใช้แม่สุกรนางพันธุ์ผสม แลนด์เรซxยอร์กเชีย หลังหย่านมจำนวน 17 ตัว ทำการเช็คสัดแม่สุกรโดยใช้พ่อพันธุ์ร่วมกับการกดหลัง และตรวจการตกไข่ด้วยอัลตราซาวด์แบบเรียลไทม์ บี โหมดผ่านทางทวารหนักทุก 4 ชั่วโมง แม่สุกรถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้รับการผสมเทียม ต่างกัน 3 วิธี กลุ่มที่ 1 (6 ตัว) ได้รับการผสมเทียมแบบปกติ (AI) โดยใช้น้ำเชื้อสดเจือจางมีจำนวนอสุจิ 3,000 ล้านตัว ในปริมาตร 100 มล. กลุ่มที่ 2 (6 ตัว) ได้รับการผสมเทียมด้วยวิธีสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) ด้วยน้ำเชื้อสดเจือจางที่มีจำนวนอสุจิ 1,000 ล้านตัว ในปริมาตร 50 มล. และ กลุ่มที่ 3 (5 ตัว) ได้รับการผสมเทียมด้วยวิธีสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI) ด้วยน้ำเชื้อสดเจือจางที่มีจำนวนอสุจิ 150 ล้านตัว ในปริมาตร 7.5 มล. แม่สุกรทุกตัวได้รับการผสมเทียม 1 ครั้ง เมื่อแสดงการเป็นสัดครั้งที่ 2 หลังหย่านม ก่อนเวลาไข่ตกประมาณ 6-8 ชั่วโมง โดยใช้พ่อสุกรตัวเดียวกัน หลังผสมเทียม 24 ชั่วโมงทำการผ่าตัดเพื่อตัดส่วนของมดลูกและรังไข่ออก มดลูกและท่อนำไข่ถูกแบ่งเป็น 7 ส่วน ได้แก่ ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่า ท่อนำไข่อิสมัสส่วนต้น ท่อนำไข่อิสมัสส่วนท้าย ช่วงต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก (UTJ) ปีกมดลูกส่วนต้น ปีกมดลูกส่วนกลาง และปีกมดลูกส่วนท้าย อสุจิที่อยู่ภายในอวัยวะแต่ละส่วนถูกชะล้างออกมาแล้วตรวจนับด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองพบว่าอสุจิถูกพบทั้งสองข้างของปีกมดลูกและท่อนำไข่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ในขณะที่กลุ่มที่ 3 พบเพียงข้างเดียว อสุจิถูกพบมากที่สุดในส่วน UTJ (P<0.05) จำนวนอสุจิที่พบที่ส่วน UTJ ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 142,500 131,167 และ 23,500 เซลล์ ตามลำดับ จำนวนอสุจิที่พบที่ท่อนำไข่อิสมัสส่วนท้ายในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 1,411 1,280 and 284 เซลล์ ตามลำดับ สัดส่วนของอสุจิในแต่ละส่วนต่อจำนวนอสุจิทั้งหมดที่พบ ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (P>0.05) การศึกษาครั้งนี้สรุปว่า การผสมเทียมด้วยวิธี IUI ด้วยปริมาณน้ำเชื้อที่ลดลง 3 เท่าตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมเทียมแบบปกติ สามารถพบอสุจิที่บริเวณที่พักอสุจิในท่อนำไข่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากการผสมเทียมแบบปกติ หลังการผสมเทียมแบบ DIUI ด้วยอสุจิเพียง 150 ล้านตัว อสุจิจำนวนหนึ่งสามารถตรวจพบได้ในมดลูกและท่อนำไข่ของสุกรทุกตัว แต่จะถูกตรวจพบเพียงด้านใดด้านหนึ่งของท่อนำไข่และมดลูกเท่านั้น

คำสำคัญ แม่สุกร การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก อสุจิ ท่อทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์

Abstract

The purpose of the present study was to compare the number of spermatozoa obtained from the different parts of the oviducts and the uterine horns at about 24 h after insemination after conventional artificial insemination (AI) compared with intrauterine insemination (IUI) or deep intrauterine insemination (DIUI). Seventeen crossbred (Landrace x Yorkshire) multiparous sows were used in the experiment. The sows were examined for standing estrus using back pressure test and the time of ovulation were examined every 4 h after standing oestrus by real time B-mode ultrasonography. The sows were allocated to 3 groups i.e., group I sows (n=6) were inseminated by the conventional AI technique with $3x10^9$ motile spermatozoa in 100 ml extended semen, group II sows (n=6) were inseminated by IUI technique with $1x10^9$ motile spermatozoa in 50 ml extended semen and group III sows (n=5) were inseminated by DIUI technique with $0.15x10^9$ motile spermatozoa in 7.5 ml extended semen. A single dose of insemination was performed using the same boar at about 6-8 h before the expected time of ovulation during the second oestrus after weaning. Twenty four hour after insemination, the sows were ovario-hysterectomized. The oviducts and the uterine horns were removed and divided into 7 parts i.e., cranial, middle and caudal uterine horn, UTJ, cranial and caudal isthmus and ampulla. All parts of the reproductive tract were flushed and the number of spermatozoa were counted using haemocytometer. The results revealed that the spermatozoa were found in both side of the oviducts and the uterine horns in groups I and II and were found only in one side in group III. The spermatozoa were found most in the UTJ ($P<0.05$). The numbers of flushed spermatozoa in the UTJ in group I, II and III were 142,500, 131,167 and 23,500, respectively. In the caudal isthmus, number of flushed spermatozoa were 1,411, 1,280 and 284, respectively. The proportion of spermatozoa in the different parts of the reproductive tract in relation to total number of spermatozoa within the tract were not significantly different between group I, II and III in all parts ($P>0.05$). It could be concluded that IUI with a 3-times reduction in number of spermatozoa resulted in the same amount of spermatozoa deposited in the sperm reservoir around the ovulation time. After DIUI, a certain amount of spermatozoa were found in the uterine horn and oviduct in all inseminated sows but only in one side of the reproductive organs.

***Keywords**:* sow; intrauterine insemination; spermatozoa; reproductive tract

บทนำ

การผสมเทียมเป็นการปรับปรุงพันธุ์ที่ดีและเร็วกว่าการผสมตามธรรมชาติ สามารถลดค่าใช้จ่ายที่จะต้องใช้เลี้ยงดูพ่อพันธุ์ นอกจากนี้ยังลดช่วยลดอัตราเสี่ยงในการแพร่ระบาดของโรคของระบบสืบพันธุ์ที่จะถ่ายทอดผ่านทางการผสมพันธุ์ ในการผสมเทียมสุกร คุณภาพของน้ำเชื้อ และเทคนิคหรือวิธีที่ใช้ในการผสมเทียมจะมีผลอย่างมากต่ออัตราการผสมติด รวมทั้งจำนวนลูกต่อครอกด้วย ในการผสมเทียมด้วยเทคนิคที่ใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบัน (conventional artificial insemination) จะต้องใช้น้ำเชื้อสดเจือจางที่มีตัวอสุจิมีชีวิต 2–3 พันล้านตัว ในปริมาตรระหว่าง 80 – 100 มิลลิลิตร และจะทำการปล่อยน้ำเชื้อภายในคอมดลูก (intra-cervix insemination) ปัจจุบันมีการศึกษาด้านการผสมเทียมในสุกรพยามลดจำนวนตัวอสุจิต่อการผสมแต่ละครั้ง โดยที่ไม่ส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ วิธีการหนึ่งคือ การลดจำนวนตัวอสุจิต่อโด๊สการ

ผสมโดยปล่อยน้ำเชื้อภายในมดลูก Kruger et al. (1999) ได้ทำการทำการผสมเทียมสุกรสาว โดยทำการผ่าตัดและทำการปล่อยน้ำเชื้อ ที่บริเวณใกล้กับช่วงต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) พบว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิ 10 ล้านตัวในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ก็เพียงพอเมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ เช่นเดียวกันกับในสุกรนาง (Kruger and Rath, 2000) อุปกรณ์ในการผสมเทียมต่างๆได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อที่จะใช้สอดผ่านคอมดลูกในการนำน้ำเชื้อไปปล่อยที่ในตัวมดลูก (intrauterine insemination, IUI) หรือส่วนต้นของปีกมดลูก (deep intrauterine insemination, DIUI) แต่วิธีการนี้ก็มีโอกาสเสี่ยงที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อคอมดลูกและมดลูก หรือชักนำการติดเชื้อภายในมดลูกได้ง่ายขึ้น Watson and Behan (2002) ศึกษาการใช้ท่อผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (Deep goldenpig™) เป็นอุปกรณ์ในการผสมเทียมสุกร พบว่าสามารถที่จะลดจำนวนตัวอสุจิลงเหลือ 1 พันล้านตัวต่อโด๊ส โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด และเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และมีประสิทธิภาพ Martinez et al. (2001) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมสุกร โดยฉีดน้ำเชื้อเข้าไปในปีกมดลูก (Deep intrauterine insemination, DIUI) โดยวิธีไม่ผ่าตัดและไม่ต้องวางยา โดยใช้ ท่อ endoscope สอดผ่านเดือยผสมเทียม ผ่านคอมดลูก และปล่อยน้ำเชื้อที่ปีกข้างใดข้างหนึ่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการเข้าคลอด ขนาดครอกเมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ ต่อมา Martinez et al. (2002) ได้พัฒนาวิธีการผสมเทียม DIUI โดยนำท่อที่สามารถโค้งงอได้ (flexible catheter) มาใช้แทนท่อ endoscope ที่มีราคาแพง และแตกหักได้ง่าย ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคสนาม จากทดลองพบว่าสามารถที่จะลดความเข้มของน้ำเชื้อลงได้ 20 – 60 เท่า รวมทั้งสามารถลดปริมาตรของน้ำเชื้อที่ใช้ลง 8 – 10 เท่า เมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ โดยที่ไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ และบริเวณที่ปล่อยน้ำเชื้อคือ 1 ใน 3 ของปีกมดลูกทางส่วนต้น

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของตัวอสุจิในส่วนต่างๆ ของมดลูกและท่อนำไข่ 24 ชั่วโมงหลังผสมเทียมด้วยวิธีผสมเทียมแบบปกติ (AI) เปรียบเทียบกับการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUIในสุกร

วิธีดำเนินงาน/ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง เวลา และ สถานที่วิจัย

การทดลองนี้ใช้แม่สุกรนางหลังหย่านมจำนวน 17 ตัว โดยซื้อมาจากฟาร์ม และนำมาเลี้ยงที่สถานีวิจัย ของโรงพยาบาลปศุสัตว์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ระหว่าง เดือน ตุลาคม 2546 ถึง กันยายน 2547 สุกรนางถูกนำเข้าสถานี 3 ชุดๆ ละ 6 ตัว แต่ละชุดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มทดลอง 1 – 3 (AI IUI DIUI) ตามเบอร์หูเรียงจากมากไปหาน้อย ทำการเช็คสัดสุกรวันละ 2 ครั้ง หลังหย่านม โดยใช้พ่อสุกรร่วมกับการกดหลัง (back pressure test) และเมื่อสุกรเริ่มแสดงอาการใกล้ระยะเป็นสัดทำการเช็คทุก 8 ชั่วโมงเพื่อหาระยะเวลาที่แม่สุกรเริ่มยืนนิ่ง เวลาของการเริ่มยืนนิ่ง คือ 4 ชั่วโมงก่อน ที่จะพบว่าแม่สุกรยืนนิ่งเมื่อกดหลังต่อหน้าพ่อสุกร เมื่อพบแม่สุกรเริ่มยืนนิ่งทำการตรวจหาเวลาตกไข่เพื่อกำหนดเวลาผสมเทียมในรอบต่อไป

แผนการทดลอง

เมื่อพบสุกรเป็นสัดยืนนิ่งทำการผสมเทียมโดยวิธี AI IUI และ DIUI โดยคัดเลือกสุกรด้วยวิธีการสุ่ม และทำการผ่าตัดมดลูกและรังไข่ออกมา (ovariohysterectomy) ที่เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังผสม และทำการหาจำนวนตัวอสุจิที่ส่วนต่างๆ ของ ท่อนำไข่ และมดลูก (ดูรายละเอียดด้านล่าง และ รูปที่ 3)

การตรวจการตกไข่

แม่สุกรถูกตรวจการตกไข่โดยใช้อัลตราซาวด์แบบเรียลไทม์ บีโหมด ตรวจผ่านทางทวารหนัก (transrectal realtime B-mode ultrasound) ทุก 4 ชั่วโมงหลังแม่สุกรเริ่มยืนนิ่ง ทำการตรวจจนพบว่าฟอลลิเคิลหายไป แล้วทำการประมาณเวลาตั้งแต่แม่สุกรเริ่มยืนนิ่งจนถึงตกไข่ โดยเวลาของการตกไข่ คือ 2 ชั่วโมงหลังจากพบว่าฟอลลิเคิลหายไปหรือลดขนาดลงอย่างชัดเจน

การรีดเก็บน้ำเชื้อและการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียม

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกร โดยวิธี gloved hand method หลังจากนั้น ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยตรวจดูสี ปริมาตร การเคลื่อนไหว และ ตรวจความเข้มข้นด้วย photometer (spermacue®) น้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพนำมาผสมด้วยสารละลาย Beltsville Thawing Solution (BTS) ให้ได้ปริมาตรและความเข้มข้นที่ต้องการ (ดูรายละเอียดด้านล่าง) น้ำเชื้อสดที่เตรียมไว้ถูกเก็บรักษาในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 18 °C น้ำเชื้อที่นำไปใช้ในการทดลองต้องมีอายุในการเก็บรักษาไม่เกิน 48 ชม. ก่อนที่จะนำไปผสมเทียมต้องทำการอุ่นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิระหว่าง 35 °C เป็นเวลา 15 นาที และมีอัตราการเคลื่อนไหวไม่ต่ำกว่า 60 %

การผสมเทียม

เมื่อพบสุกรนางเป็นสัดยืนนิ่งในรอบที่ 2 หลังหย่านม ทำการผสมเทียม 1 ครั้ง ประมาณ 6-8 ชั่วโมงก่อนเวลาที่คาดว่าจะตกไข่ วิธีการผสมเทียม และปริมาณน้ำเชื้อแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธีการผสมเทียมแบบปกติ (conventional AI)

แม่สุกรนางจำนวน 6 ตัว ที่ได้รับการเช็คสัดและครบกำหนดเวลาที่จะผสมเทียมจะได้รับการทำความสะอาด และเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้แห้ง จะถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดที่อยู่ในถุงพลาสติก (cochete) ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า 3 พันล้านตัว สอดเดือยผสมเทียม (Goldenpig®) (รูปที่ 1 และ 2) ให้เข้าไปล็อกในคอมดลูก แล้วทำการปล่อยน้ำเชื้อ หลังจากน้ำเชื้อถูกดูดเข้าไปในมดลูกหมดแล้ว ให้ปล่อยเดือยผสมเทียมค้างไว้ในคอมดลูกประมาณ 1 นาที เพื่อป้องกันน้ำเชื้อไหลย้อนกลับ

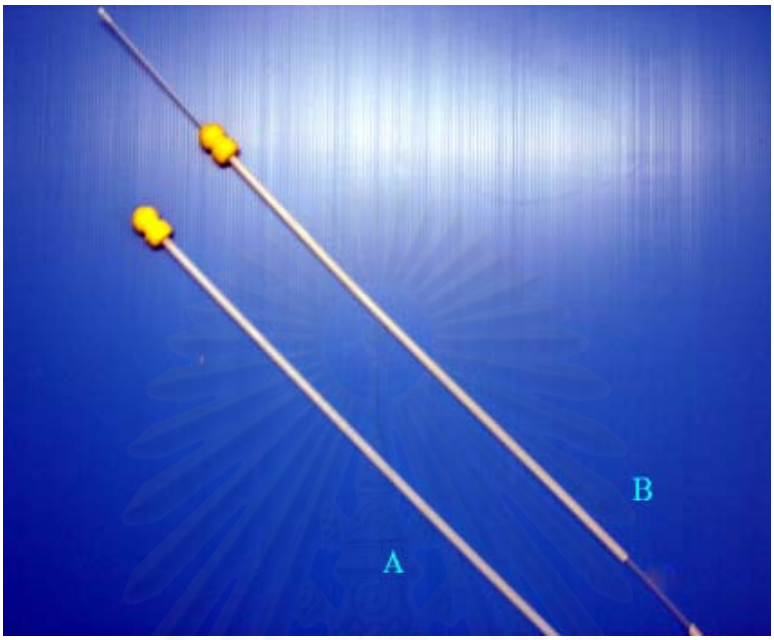
กลุ่มที่ 2 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธีผสมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (intrauterine insemination, IUI)

แม่สุกรนางจำนวน 6 ตัว ที่ได้รับการเช็คสัดและครบกำหนดเวลาที่จะผสมเทียมจะได้รับการทำความสะอาด และเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้แห้ง หลังจากนั้นทำการสอดเดือยผสมเทียมแบบ Deep goldenpig™ (ยาว 60 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.8 มม.) (รูปที่ 1 และ 2) สอดเดือยผสมเทียมให้เข้าไปล็อกอยู่ในคอมดลูก แล้วค่อยๆ สอดท่อขนาดเล็กที่อยู่ด้านในเดือยผสมเทียมให้ผ่านคอมดลูกจนกระทั่งปลายไปอยู่ในตัวมดลูก ก่อนที่จะทำการผสมเทียมจะล้างท่อด้านในด้วยสารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเข้าไปในท่อ และทำการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิ 1 พันล้านตัว ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยต่อเข้ากับท่อขนาดเล็กที่อยู่ด้านในเดือยผสมเทียม หลังจากนั้นจะใช้สารละลายจำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อดันน้ำเชื้อที่ค้างเหลืออยู่ในท่อให้เข้าไปในมดลูก

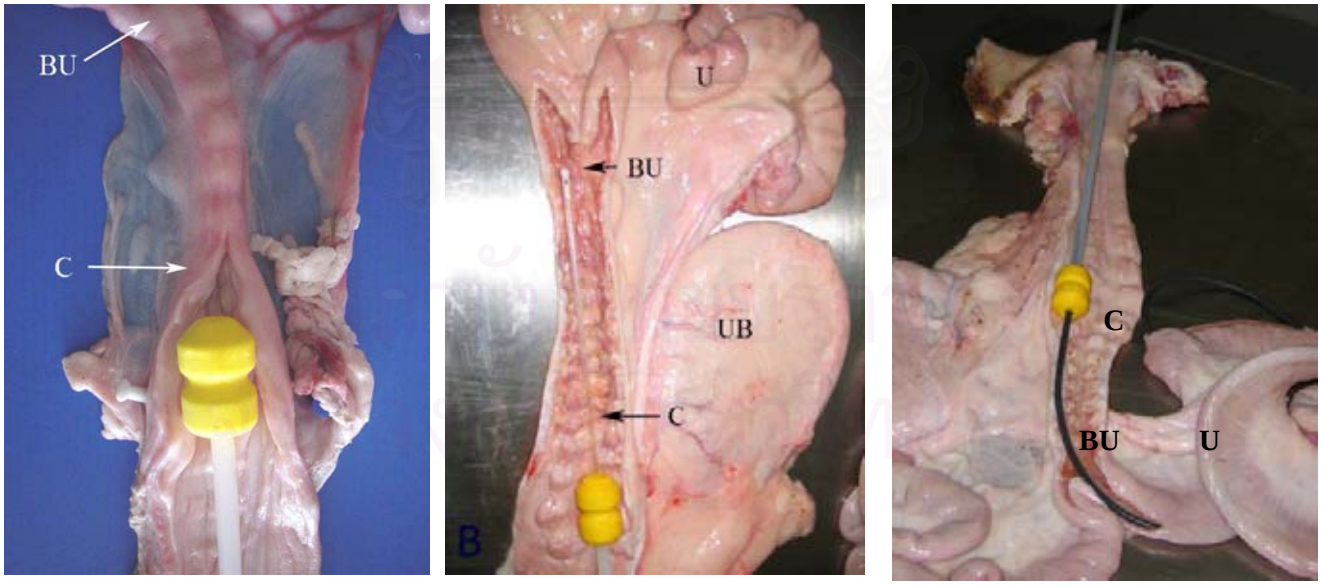
กลุ่มที่ 3 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธีผสมแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่ง (Deep intrauterine insemination, DIUI)

ทำการผสมเทียมจำนวน 5 ตัว โดยการทำความสะอาดและเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้แห้ง ทำการสอดเดือยผสมเทียมผ่านช่องคลอด ให้เข้าไปอยู่ในคอมดลูกและใช้ท่อขนาดเล็กที่ออกแบบเป็นพิเศษ (รูปที่ 2) ซึ่งจะสอดท่อนี้ผ่านเดือยผสมเทียม ให้ผ่านคอมดลูกไปอยู่ในปีกมดลูกข้างใดข้าหนึ่งจนกระทั่งสุดความยาวของท่อ ก่อนที่จะทำการผสมเทียมจะล้างท่อด้านในด้วยสารละลาย และใส่สารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเข้าไปในท่อ และทำการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่มี

จำนวนตัวอสุจิ 150 ล้านตัว ในปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ใส่ไปในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรและต่อเข้ากับท่อที่ใช้การผสมเทียม หลังจากนั้นจะใช้สารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อดันน้ำเชื้อที่ค้างเหลืออยู่ในท่อให้เข้าไปในมดลูก



รูปที่ 1 ท่อผสมเทียมชนิดสอดเข้าคอมดลูก (Coventional AI; Goldenpig®) (A) และท่อผสมเทียมชนิดสอดเข้าคอมดลูก (intrauterine insemination; Deepgoldenpig®) (B)

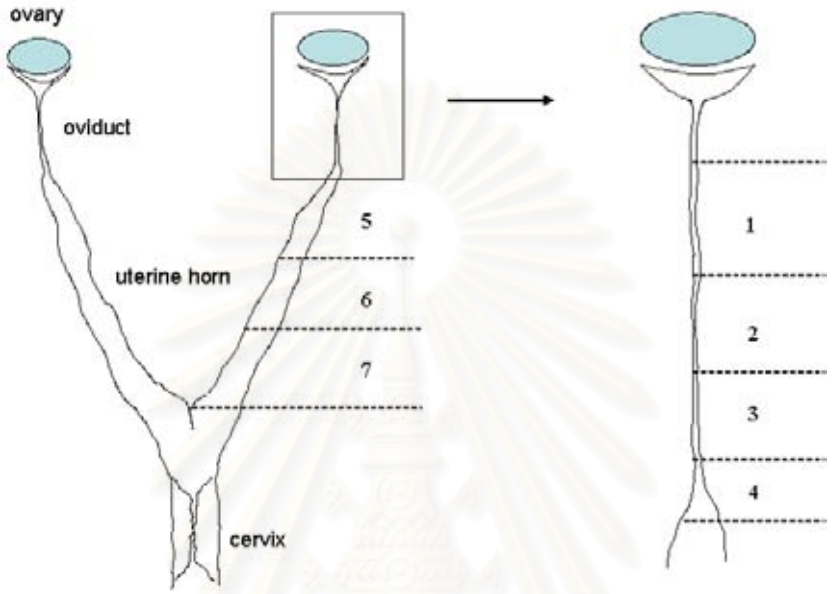


AI **IUI** **DIUI**

รูปที่ 2 อวัยวะสืบพันธุ์แม่สุกรและตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อขณะทำการผสมเทียมโดยเทคนิคการผสมเทียมตามปกติ (AI) และการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (IUI) และ การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI) (C = คอมดลูก; BU = ตัวมดลูก; U = ปีกมดลูก; UB = กระเพาะปัสสาวะ)

วิธีการชะล้างและการหาจำนวนตัวอสุจิ

แม่สุกรนางถูกวางยาสลบ และเปิดผ่าช่องท้องบริเวณ ventral midline ยาวประมาณ 15 ซม. ที่เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหลังผสม ทำการวางยาสลบโดย ชักนำการสลบด้วย azaperone ขนาด 2 มก./กก หลังจากนั้นวางยาสลบด้วย thio-pental sodium ขนาด 10 มก./กก. หลังจากเปิดผ่าช่องท้องทำการผ่าตัดเพื่อนำรังไข่และมดลูกของแม่สุกรออก



รูปที่ 3 การแบ่งส่วนต่างๆ ของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (1= แอมพูลล่า; 2= อิสทมัสส่วนต้น; 3= อิสทมัสส่วนปลาย; 4= ยูทีเจ; 5= ปีกมดลูกส่วนต้น; 6= ปีกมดลูกส่วนกลาง; 7= ปีกมดลูกส่วนปลาย)

วิธีการชะล้างและนับจำนวนอสุจิในมดลูกประยุกต์มาจากการศึกษาของ Kunavongkrit et al. (2003) โดยมีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้ หลังจากนำอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรออกมา ทำการผูกที่ส่วนปลายสุดของท่อนำไข่ ทำการผูกและแบ่งท่อนำไข่กับส่วนปีกมดลูกแต่ละข้างออกเป็น 7 ส่วน ได้แก่ ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่า ท่อนำไข่อิสมัสส่วนต้น ท่อนำไข่อิสมัสส่วนท้าย ช่วงต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก (UTJ) ปีกมดลูกส่วนต้น ปีกมดลูกส่วนกลาง และปีกมดลูกส่วนท้าย (รูปที่ 3) ในการหาตัวอสุจิในส่วนของท่อนำไข่ส่วน แอมพูลล่า ชะล้าง (flush) ด้วย BTS จำนวน 1 มิลลิลิตร ในส่วนของอิสมัส และ UTJ ชะล้างด้วยสารละลาย BTS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และในส่วนของปีกมดลูกชะล้างด้วย BTS จำนวน 20 มิลลิลิตร แต่ละส่วนถูกชะล้างจำนวน 2 ครั้ง หลังจากชะล้างเสร็จแล้วทำให้ตัวอสุจิมีความเข้มข้นขึ้นโดยนำของเหลวที่ชะล้างมาจากส่วนต่างๆ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่น ด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Inst. V. 6.1.2, Cary, NC USA) โดยทำการหาค่าความถี่และค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบสัดส่วนของตัวอสุจิที่ส่วนต่างๆ ในท่อทางเดินสืบพันธุ์ ได้แก่ ส่วนต้นของปีกมดลูก รอยต่อของมดลูกและปีกมดลูก ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้ายของอิสมัส ทั้งสองด้าน โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ค่า $P<0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

แม่สุกร 2 ตัว ตรวจพบปัญหาหนองปริมาณค่อนข้างมากจากช่องคลอดหลังหย่านม จึงทำการคัดทิ้งก่อนเริ่มทำการทดลอง แม่สุกรจำนวน 3 ตัว ตรวจพบการเกิดถุงน้ำที่รังไข่โดยอัลตราซาวด์ หลังพบการเป็นสัดในรอบแรก จึงทำการคัดทิ้ง แม่สุกร 1 ตัว ไม่แสดงการเป็นสัดภายใน 10 วัน หลังหย่านม จึงทำการคัดทิ้ง รวมแม่สุกรที่คัดทิ้งก่อนเริ่มทำการทดลองทั้งสิ้น 6 ตัว แม่สุกร 2 ตัว ตรวจพบว่าไม่ตกไข่ภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำการผสมพันธุ์ จึงทำการคัดทิ้ง รวมแม่สุกรที่คัดทิ้งทั้งหมด 8 ตัว

แม่สุกรที่แสดงการเป็นสัดภายใน 10 วันหลังหย่านม ไม่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ และ ตกไข่ปกติ ถูกใช้ในการศึกษาทั้งสิ้น 17 ตัว โดยมีลำดับครอกเฉลี่ย 6.6±2.5 (พิสัย 3-10) น้ำหนักเฉลี่ย 219.8±34.7 กิโลกรัม (พิสัย 140-260 กิโลกรัม) และ มีระยะหย่านมถึงเป็นสัดเฉลี่ย 5.1±1.7 วัน (พิสัย 3-9 วัน)

ในรอบการเป็นสัดที่สองหลังหย่านม แม่สุกรทุกตัวได้รับการผ่าตัดเพื่อตัดรังไข่และมดลูกโดยเฉลี่ยที่เวลา 25.9±2.6 ชั่วโมง (พิสัย 23-32 ชั่วโมง) หลังผสมเทียม แม่สุกรที่ยังไม่ตกไข่ 2 ตัวถูกคัดทิ้งจากการทดลอง (ด้านบน)

การเป็นสัด และเวลาตกไข่

ผลการตรวจการเป็นสัด และเวลาตกไข่พบว่า โดยเฉลี่ย แม่สุกรแสดงอาการเป็นสัดนาน 55.8±14.8 ชั่วโมง (พิสัย 22-74 ชั่วโมง) ระยะตั้งแต่เริ่มเป็นสัดถึงตกไข่นาน 36.4±12.3 ชั่วโมง (พิสัย 17-62 ชั่วโมง) ระยะเวลาเป็นสัดและเวลาตกไข่ในสุกรแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมทั้ง 3 แบบ (P>0.05)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย (means) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของลำดับครอก ระยะหย่านมถึงเป็นสัด ระยะเป็นสัดถึงตกไข่ และ ระยะเวลาเป็นสัดของแม่สุกรในกลุ่มที่ได้รับการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)

กลุ่ม	จำนวน	ลำดับครอก	ระยะหย่านมถึงเป็นสัด (วัน)	ระยะเป็นสัดถึงตกไข่ (ชม.)	ระยะเวลาเป็นสัด (ชม.)
AI	6	8.6 ± 1.1	5.8 ± 2.1	32.3 ± 9.6	55.1 ± 22.5
IUI	6	5.4± 3.0	4.2 ± 0.7	34.5 ± 13.8	53.0 ± 11.7
DIUI	5	6.8 ± 1.9	5.3±1.5	43.5±12.6	60.0±12.2

ความยาวของท่อนำไข่ มดลูก และจำนวนคอร์โปร่า ลูเตีย

ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ และจำนวน คอร์โปร่า ลูเทีย (CL) ทั้งหมดของรอบการเป็นสัดปัจจุบันและในรอบการเป็นสัดที่ผ่านมา แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย (means) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความยาวท่อนำไข่ (1 ข้าง) ปีกมดลูก (1 ข้าง) และ จำนวนคอร์โปร่าลูเตีย (2 ข้าง) ในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)

กลุ่ม	จำนวน	ท่อนำไข่ (ซม.)	ปีกมดลูก (ซม.)	คอร์โปร่าลูเตีย	คอร์โปร่า ลูเตีย ของรอบเป็นสัดที่แล้ว
AI	6	27.7±1.9	114.3±9.5	18.3±5.1	16.8±4.1
IUI	6	26.3±2.8	125.6±14.1	20.3±3.3	16.0±6.3
DIUI	5	29.5±4.1	128.6±12.7	17.2±1.6	15.8±3.8

การกระจายของตัวอสุจิในปีกมดลูกและท่อนำไข่ข้างซ้ายและขวาหลังผสมเทียม

สุกรกลุ่มที่ 1 (AI) ได้รับการผ่าตัดที่เวลา 25.8 ± 3.1 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม ตรวจพบตัวอสุจิในทั้ง 2 ด้านของปีกมดลูกและท่อนำไข่ โดยพบจำนวนอสุจิมากที่สุดในส่วน ยูทีเจ (ตารางที่ 3)

สุกรกลุ่มที่ 2 (IUI) ได้รับการผ่าตัดที่เวลา 26.9 ± 2.5 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม ตรวจพบตัวอสุจิในทั้ง 2 ด้านของปีกมดลูกและท่อนำไข่ โดยพบจำนวนอสุจิมากที่สุดในส่วน ยูทีเจ เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4)

สุกรกลุ่มที่ 3 (DIUI) ได้รับการผ่าตัดที่เวลา 24.8 ± 1.9 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม ตรวจพบอสุจิเพียงด้านใดด้านหนึ่งของปีกมดลูกและท่อนำไข่ โดยสุกร 3 ตัวตรวจพบอสุจิทางด้านซ้ายของปีกมดลูกและท่อนำไข่ทุกส่วน ในขณะที่สุกร 2 ตัว ตรวจพบอสุจิทางด้านขวา ส่วนที่พบจำนวนอสุจิมากที่สุด ได้แก่ ส่วนยูทีเจ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (means) ของจำนวนตัวอสุจิที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมแบบปกติ (conventional AI)

	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
ซ้าย	6	48 ^{a}	216 ^{ab}	776 ^{b}	85,000 ^{c}	54,116 ^{cd}	35,833 ^{d}	24,833 ^{d}
ขวา	6	38 ^{a}	126 ^{ab}	634 ^{b}	57,500 ^{c}	35,333 ^{cd}	33,333 ^{d}	20,166 ^{d}

* ส่วนที่ 1 แอมพูล่า 2 อิสมัสส่วนต้น 3 อิสมัสส่วนปลาย 4 ยูทีเจ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7:ปีกมดลูกส่วนปลาย ^{abcd} อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ย (means) ของจำนวนตัวอสุจิที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมโดยการสอดท่อเข้าตัวมดลูก (IUI)

	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
ซ้าย	6	40 ^{a}	143 ^{ab}	677 ^{b}	75,000 ^{c}	50,833 ^{cd}	37,500 ^{d}	15,916 ^{d}
ขวา	6	44 ^{a}	153 ^{ab}	603 ^{b}	56,166 ^{c}	39,167 ^{cd}	28,167 ^{d}	21,333 ^{d}

* ส่วนที่ 1 แอมพูล่า 2 อิสมัสส่วนต้น 3 อิสมัสส่วนปลาย 4 ยูทีเจ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7:ปีกมดลูกส่วนปลาย ^{abcd} อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย (means) ของจำนวนตัวอสุจิที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียมโดยการสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)

	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
พบอสุจิ	5	25[a]	76[a]	284[a]	23,500[b]	15,400[c]	9,000[d]	7,000[d]
ไม่พบอสุจิ	5	0	0	0	0	0	0	0

* ส่วนที่ 1 แอมพูล่า 2 อิสมัสส่วนต้น 3 อิสมัสส่วนปลาย 4 ยูทีเจ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7 ปีกมดลูกส่วนปลาย [abcd] อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดในส่วนต่าง ๆ ของมดลูกและท่อนำไข่หลังผสมเทียม

ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมด (รวมทั้ง 2 ข้างของท่อทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์) ที่เวลา 25.9±2.5 ชั่วโมง หลังผสมเทียม ในสุกรกลุ่มที่ 1 2 และ 3 แสดงในตารางที่ 6 ผลการทดลองพบว่าทั้งจำนวนและสัดส่วนของตัวอสุจิพบมากที่สุดในส่วน ยูทีเจ ในแม่สุกรทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)

กลุ่ม	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
AI	6	87[a]	343[a]	1,411[a]	142,500[b]	90,000[c]	69,167[cd]	45,000[d]
IUI	6	85[a]	296[a]	1,280[a]	131,167[b]	90,000[c]	66,167[cd]	37,250[ad]
DIUI	5	25[a]	76[a]	284[a]	23,500[b]	15,400[c]	9,000[d]	7,000[d]

* ส่วนที่ 1 แอมพูล่า 2 อิสมัสส่วนต้น 3 อิสมัสส่วนปลาย 4 ยูทีเจ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7 ปีกมดลูกส่วนปลาย [abcd] อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 7 แสดงสัดส่วน (proportion) ของจำนวนตัวอสุจิที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรต่อจำนวนตัวอสุจิที่ตรวจพบทั้งหมด หลังผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)

กลุ่ม	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
AI	6	0.03[a]	0.10[a]	0.44[a]	41.51[b]	24.98[c]	20.19[d]	12.74[e]
IUI	6	0.04[a]	0.12[a]	0.47[a]	41.73[b]	27.36[c]	19.31[d]	10.98[e]
DIUI	5	0.05[a]	0.14[a]	0.52[a]	44.12[b]	27.93[c]	15.57[d]	11.68[d]

* ส่วนที่ 1 แอมพูล่า 2 อิสมัสส่วนต้น 3 อิสมัสส่วนปลาย 4 ยูทีเจ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7 ปีกมดลูกส่วนปลาย [abcde] อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ แม่สุกรแต่ละชุดถูกนำเข้ามาและจะถูกแบ่งกลุ่มทดลองโดยการสุ่มในแต่ละชุด ทำให้ผลของระยะเวลาในการทดลองถูกกำหนดให้เป็น Block (randomized block design) จึงทำให้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มมีความใกล้เคียงกันมากขึ้น ผลการศึกษาพบว่า ก่อนเริ่มผสมเทียม ระยะหย่านมถึงเป็นสัด ระยะยืนนิ่งถึงตกไข่ ระยะเวลาเป็นสัด

ยืนนิ่ง มีค่าใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) และอยู่ในช่วงปกติ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในแม่สุกร (Mburu et al.,1995; Soede et al., 1995; Steverink et al.,1997) โดยเฉลี่ยระยะเป็นสัดถึงตกไข่ในแม่สุกรนางจะเกิดขึ้นประมาณ 2 ใน 3 ของระยะแสดงการเป็นสัดยืนนิ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ เวลาตกไข่ก็เกิดขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว ดังนั้นข้อมูลจาการเป็นสัดในรอบแรกจึงสามารถใช้ในการคำนวณเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมในรอบการเป็นสัดครั้งที่สองได้

ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวนตัวอสุจิที่ส่วนต่างๆ ของมดลูกและท่อนำไข่เป็นตัวแปรสำคัญที่ต้องการเปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิในส่วนต่างๆ ของมดลูกและท่อนำไข่สัมพันธ์กับการไหลกลับของน้ำเชื้อ โดยจำนวนตัวอสุจิส่วนหนึ่งจะสูญเสียไปกับการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อ การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูกหรือเข้าปีกมดลูกพบว่าไม่พบการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อระหว่างทำการผสมเทียมเลย สอดคล้องกับ การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Watson and Behan (2002) ในแม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI ปกติ พบว่ามีการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อ ระหว่างทำการผสม ในขณะที่แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI ซึ่งใช้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ และปริมาตรน้อยลง ไม่พบการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อในขณะทำการผสมเลย เหตุผลอาจเกิดจากการปล่อยน้ำเชื้อโดยตรงเข้าไปในมดลูกในปริมาตรที่น้อยกว่า ทำให้การกระจายของตัวอสุจิในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ดีและเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการผสมเทียมแบบปกติ ทำให้ไม่เกิดการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อในขณะทำการผสม Steverink et al. (1998) พบว่า 98% ของสุกรที่ได้รับการผสมเทียมแบบปกติโดยใช้ปริมาตรในการผสม 80 มิลลิลิตร มีการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อ ภายใน 30 นาที และพบว่ามีจำนวนของตัวอสุจิมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเชื้อที่ไหลย้อนกลับระหว่างทำการผสม Mezalira et al. (2005) พบว่าในการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูกนั้นก็สามารถพบการไหลกลับของน้ำเชื้อภายหลังทำการผสมเทียมบ้างแต่ไม่พบระหว่างผสม การไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อมีปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ การบีบตัวของมดลูกจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในช่วงระยะเป็นสัด อุณหภูมิของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสม และอาจเกิดจากขณะผสมเทียมมีการบีบไล่น้ำเชื้อเข้าสู่มดลูกแรงเกินไปหรือใช้เวลาในการผสมเทียมน้อยเกินไปทำให้มีโอกาสที่จะพบการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อมากขึ้น ในการผสมเทียมโดยใช้จำนวนตัวอสุจิในการต่ำ ร่วมกับมีการสูญเสียจำนวนตัวอสุจิระหว่างทำการผสมเทียมอาจเป็นผลทำให้อัตราปฏิสนธิต่ำกว่าที่ควรจะเป็น (Stevernk et al., 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (กลุ่มที่ 2) สามารถที่จะทำการสอดท่อผสมเทียมผ่านคอมดลูกได้ในแม่สุกรทุกตัว และไม่พบเลือดที่ปลายท่อผสมเทียม หลังจากทำการผสมเทียมเสร็จแล้ว สอดคล้องกับการศึกษาของ Roca et al. (2003) ที่สามารถสอดท่อผ่านคอมดลูกแม่สุกรจำนวน 94.0 เปอร์เซ็นต์ และพบเลือดที่ปลายท่อจำนวน 1.7 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาของ Dallanora et al. (2004) พบว่าแม่สุกรจำนวน 94.7 เปอร์เซ็นต์สามารถที่จะสอดท่อได้และพบเลือดที่ปลายท่อจำนวน 1.7 เปอร์เซ็นต์

หลังการผสมเทียม นอกจากตัวอสุจิจะสูญเสียจากการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อแล้ว ตัวอสุจิส่วนหนึ่งโดยเฉพาะที่อยู่ในมดลูก จะถูกเม็ดเลือดขาวและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาเก็บกิน (Matthijs et al., 2003) Mburu et al. (1996) พบว่า ก่อนไข่ตกตัวอสุจิส่วนใหญ่จะเข้าไปอยู่ตรงบริเวณส่วนต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก และส่วนล่างของอิสมัส แต่หลังไข่ตกตัวอสุจิจะเข้าไปอยู่ในส่วนของอิสมัสส่วนบนมากขึ้น ส่วนรอยต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก จะเป็นบริเวณที่สะสมของตัวอสุจิ โดยบริเวณนี้มีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิและยังทำหน้าที่ช่วยกรองตัวอสุจิที่จะผ่านเข้าไปในท่อนำไข่ด้วย (Rigby, 1966; Tienthai, 2003)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าจำนวนตัวอสุจิทางด้านซ้ายของท่อนำไข่และปีกมดลูกมีแนวโน้มมากกว่าทางด้านขวาเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่พบแนวโน้มที่จำนวนตัวอสุจิทางด้านซ้ายมากกว่าทางด้านขวาอาจเป็นผลมาจากรังไข่ด้านซ้ายมีการทำงานมากกว่าด้านขวา Kunavongkrit and Larsson (1982) พบว่ารังไข่ด้านซ้ายมีขนาดและน้ำหนักมากกว่าด้านขวา ซึ่งแสดงถึงการทำงานที่มากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิที่อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ระหว่างแม่สุกรทั้ง 3 กลุ่มพบว่า จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดในท่อนำไข่และปีกมดลูกส่วนต่างๆ ภายหลังการผสมเทียม 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยเฉพาะอสุจิใน

ส่วนท้ายของท่อนำไข่ และส่วนรอยต่อของท่อมดลูกและท่อนำไข่ (UTJ) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิดการปฏิสนธิ (Hunter, 1981, 1984; Langendijk et al., 2002) ถึงแม้ความเข้มข้นและปริมาตรของน้ำเชื้อแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Watson and Behan (2002) ที่พบว่าอัตราการผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการผสมเทียมแบบ IUI และ แบบ AI

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก ช่วยลดความเข้มข้นและปริมาตรของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมได้ ทำให้สามารถใช้น้ำเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้การใช้พ่อพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยสามารถทำการผสมเทียมแม่สุกรได้จำนวนตัวเพิ่มมากขึ้นจากการรีดเก็บน้ำเชื้อในแต่ละครั้ง

การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูกในแม่สุกร โดยใช้จำนวนตัวอสุจิเพียง 150 ล้านตัว ในปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร สามารถตรวจพบตัวอสุจิในอวัยวะสืบพันธุ์แม่สุกรในปริมาณที่มากพอต่อการปฏิสนธิ อย่างไรก็ดีมีการตรวจพบเพียงด้านเดียว ซึ่งอาจมีผลต่ออัตราการผสมติด และขนาดครอกได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับกระบวนการปฏิสนธิจากการผสมด้วยวิธีนี้และประเมินขนาดครอกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Dallanora, D., Mezalira, A., Katzer, L.H., Bernardi, M.L., Bortolozzo, F.P. and Wentz, I., 2004. Volume and sperm number in the sperm backflow after intra uterine or intra cervical insemination in sows. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, Abstract vol. 2, pp. 387.

Hunter, R.H.F. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. J. Reprod. Fertil. 63:109–117.

Hunter, R.H.F. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. J. Reprod. Fertil. 72:203-211.

Krueger, C. and Rath, D. 2000. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. Reprod. Fertil. Dev. 17:113-117.

Krueger, C., Rath, D. and Johnson, L.A. 1999. Low dose insemination in synchronized gilts. Theriogenology. 52:1363-1373.

Kunavongkrit, A. And Larsson, K., 1982. Ovulation rate and embryonic migration in crossbred gilts. Nord. Vet. Med. 34: 20-24.

Kunavongkrit, A., Sang-Gasanee, K., Phumratanaprapin, C., Tantasuparuk, W. and Einarsson, S. 2003. A study on the number of recovered spermatozoa in the uterine horns and oviducts of gilts, after fractionated or non-fractionated insemination. J Vet Med Sci. 65:63-67.

Langendijk, P., Bouwman, E.G., Kidson, A., Kirkwood, R.N., Soede, N.M. and Kemp, B. 2002. Role of myometrial activity in sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows. Reproduction. 123:683-690.

Martinez, E. A., Vasquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A. Parriilla, I., 2002. Minimum sperm number for normal fertility after deep intrauterine insemination in sedated sows. Reproduction. 123: 167-170.

Matthijs, A., Engel, B. and Woelders, H. 2003. Neutrophil recruitment and phagocyosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. Reproduction. 125:357-367.

Mburu, J. N., Einarsson, S., Dalin, A. M. and Rodigrez-Martinez, H. 1995. Ovulation as determined by transrectal ultrasonography in multiparous sows: Relationships with oestrous symptoms and hormonal profiles. J. Vet. Med.42: 285-292.

Mburu, J. N., Einarsson, S., Lundeheim, N. and Rodigrez-Martinez, H. 1996. Distribution, number and membrane intregity of spermatozoa in pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. Anim. Reprod. Sci. 45: 109-121.

Mezalira,A., Dallanora, D., Bernardi, M.L., Wentz, I. and Bortolozzo, F.P. 2005. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. Reprod. Dom. Anim. 40: 1-5.

Rigby, J.P. 1966. The persistence of spermatozoa at the utero-tubal junction of the sow. J. Reprod. Ferti. 11:153-155.

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vasquez, 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: 77-78.

Soede, N.M., Wetzels, C.C.H., Zondag, W., Koning, M.A.I. and Kemp, B., 1995. Effect of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. J. Reprod. Ferti. 104:99-106.

Steverink, D.W., Soede, N.M., Bouwman, E.G. and Kemp, B., 1997. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. J. Reprod. Ferti. 111:165-171.

Steverink, D.W.B., Soede, N.M., Bouwman, E.G. and Kemp, B., 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization in sows. Anim. Reprod. Sci. 54: 109-119.

Tienthai, P., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Sperm capacitation in porcine oviduct. Theriogenology. 80: 131-146.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

(เอกสารเผยแพร่งานวิจัย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Submitted to 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress, Manila, Philippine, 19-21 Sep 2005 (oral presentation)

SPERM TRANSPORT AFTER DEEP INTRA UTERINE INSEMINATION COMPARED WITH CONVENTIONAL ARTIFICIAL INSEMINATION IN PIG

Padet Tummaruk[1] Peerapong Samransarp[1] Mongkol Techakumphu[1] Annop Kunavongkrit[1]

[1] Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

Keywords: Pig, Reproduction, Artificial insemination, Spermatozoa

Introduction

Artificial insemination (AI) in pig has been developed since 1926 and nowadays it is widely used in the pig industry all over the world (Johnson *et al*., 2000; Tummaruk *et al*., 2000; Tummaruk *et al*., 2004). Practically, about $3x10^9$ motile spermatozoa in 80-100 mL of volume are inseminated to the sow for 2-4 times during the standing oestrus. The AI catheter is inserted through the vagina and deposit in the cervix of the sows, and the semen is released at the distal part of cervix. The fertilization takes place at the ampullatory-isthmic junction in the oviduct of the sows soon after ovulation. Less than 5% of sperm are discovered at the fertilization site during peri-and post-ovulation period (Mburu *et al*., 1996). Krueger *et al.* (1999) found that 10 million spermatozoa per insemination are sufficient for successful surgically insemination into the tip of the uterine horns in gilts. Researchers are then moving forward to investigate more advance technology to increase the efficacy of AI technique in pig. Deep intra-uterine insemination (DIUI) has recently been developed for non-surgical insemination using a special designed catheter (Vazquez *et al.*, 2005). The catheter could be inserted through the proximal third of the uterine horn where the semen was deposited. Using this technique a 20-fold reduction in the number of spermatozoa per insemination could be used without any significant effect on farrowing rate and litter size (Martinez *et al.*, 2002). The success of DIUI technique under farm conditions would allow a more efficient use of semen from superior genetic boar. The technique is also applicable for some advance biotechnology such as frozen-thaw semen, sex sorted sperm and embryo transfer (Roca *et al*., 2003; Vazquez *et al.*, 2003; Martinez *et al*., 2004). Investigation on sperm distribution and fertilization after DIUI technique are important to be investigated to know more about the mechanism on the successful of DIUI in pig.

Objectives

The present study was performed to investigate number of spermatozoa in the female reproductive tract at 24 h after insemination using DIUI with a low number of spermatozoa per dose compared with conventional AI.

Materials and Methods

Twelve multiparous sows were used in the experiment. The sows were randomly assigned into 2 groups, Group I and II. The sows in both groups were detected for standing oestrus twice a day after weaning. Transrectal ultrasonography was used for detection of ovulation. Sows returned to oestrus within 6 day after weaning and ovulated normally were included in the experiment. During the second oestrus after weaning, the sows were inseminated once at about 6-8 h before expected ovulation using diluted fresh semen from one proven sire with an individual motility of ≥70%. Group I (n=6) sows were inseminated using conventional AI with $3x10^9$ motile sperm in 80 mL of volume and group II (n=5) sows were inseminated using DIUI with $0.15x10^9$ motile sperm in 7.5 mL of volume. The sows were generally anesthetized and the ovario-hysterectomy was performed at about 24 h after insemination. Sows that did not ovulate were excluded from the study. The reproductive organs were removed and divided into 7 parts on each side: ampulla, cranial isthmus, caudal isthmus, utero-tubal junction (UTJ), cranial uterine horn, middle uterine horn and caudal uterine horn. The spermatozoa within each part of the reproductive tracts were flushed using phosphate buffer saline (PBS) solution and the number of spermatozoa were counted using hemocytometer. Number of spermatozoa in all parts of the uterine horns was pooled for the statistical analyses. The number of spermatozoa and number of ovulation on the left and right side of the reproductive tract within animal were compared using paired *t*-test. The distribution of the spermatozoa in different part of the reproductive tracts was compared using analysis of variance (ANOVA). Due to the lack of normality, the number of spermatozoa was log transformed before being analyzed. The least-square means were obtained from each class of the variables and were compared using student's *t*-test. The differences with $P<0.05$ were regarded as statistical significance.

Results and Discussion

The number of ovulation of the sows in AI-group and DIUI-group did not differ significantly (18.3 versus 17.2, $P=0.63$). Ovulation occurred on the left side more than the right side of the ovaries in both group (+1.8, $P=0.08$). For the conventional AI-group, the spermatozoa were found in both side of the reproductive

tract in all sows (6/6) (Table 1). The number of spermatozoa between the left and the right side in the conventional AI-group were not differ significantly (P>0.05). The spermatozoa were found in only one side of the reproductive tract in the DIUI-group (3/5 in the left and 2/5 in the right side) (Table 2). On average, number of spermatozoa in AI-group were higher than DIUI-group (P<0.001). In both groups, the number of spermatozoa in the UTJ and the uterine horns were higher than those in the ampulla, cranial isthmus and caudal isthmus (P<0.001). Sperm number in the ampulla, cranial isthmus, caudal isthmus, UTJ and uterine horns in the AI-group were significantly higher than those in the DIUI-group (P<0.001).

The present study demonstrated that using DIUI, the spermatozoa distributed to only one side of the uterine horn during the first 24 h after insemination. One side of the sperm reservoir (caudal isthmus) was free of spermatozoa in all sows. Martinez *et al.* (2002) demonstrated that the embryo was found in both side of the uterine horn on day 2 after insemination. Therefore, there is likelihood that the spermatozoa were transported from one to another horn of the uterus sometime between 24-48 h after insemination. These spermatozoa were likely to distribute from another side of the sperm reservoir. The mechanism for the sperm transport may need further investigation. Transperitoneal migration of the spermatozoa has also been report in heifer (Larsson, 1986).

In conclusions, DIUI in multiparous sows resulted in a significantly lower number of spermatozoa in the female's reproductive tract during a 24 after insemination compared with conventional AI and the spermatozoa were found in only one side of the sperm reservoir.

Acknowledgement

This study is granted by the Research and Development Center for Livestock Production Technology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The authors greatly appreciated Prof. Juan M. Vazquez for providing DIUI catheter for the experiment.

References

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

Krueger, C., Rath, D., Johnson, L.A. 1999. Theriogenology. 52: 1363-1373.

Larsson, B. 1986. Zentralbl Veterinarmed A 33: 714-718.

Martinez, E. A., Vasquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A. Parriilla, I., 2002. Reproduction. 123: 167-170.

Martinez, E.A., Caamano, J.N., Gil, M.A., Rieke, A., McCauley, T.C., Cantley, T.C., Vazquez, J.M., Roca, J., Vazquez, J.L., Didion, B.A., Murphy, C.N., Prather, R.S., Day, B.N. 2004. Theriogenology. 61: 137-146.

Mburu, J. N., Einarsson, S., Lundeheim, N. and Rodigrez-Martinez, H. 1996. Anim. Reprod. Sci. 45: 109-121.

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vasquez, J. M., and Martinez, E. A., 2003. Theriogenology. 60: 77-78.

Tummaruk, P., Lundeheim, N., Einarsson, S. and Dalin, A.-M., 2000. Acta Agri. Scand., sect. A, Animal Sci. 50: 217-224.

Tummaruk, P., Tantasuparuk, W., Techakumphu, M. and Kunavongkrit, A. 2004. J. Vet. Med. Sci. 66: 477-482.

Vasquez, J. M., Martinez, E. A., Parriilla, I., Roca, J., Gil, M.A. and Vasquez, J. L,. 2003 Theriogenology. 59: 1605-1614.

Vazquez, J..M., Martinez, E.A., Roca, J., Gil, M.A., Parrilla, I., Cuello, C., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.L., 2005. Theriogenology 63: 536-547.

Table 1 Number of sperm counted at different part of reproductive tract at 24 h after conventional artificial insemination with $3x10^9$ motile spermatozoa in 6 multiparous sows

Reproductive	1		2		3		4		5		6	
tract	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Ampulla	12	28	50	70	35	18	100	50	14	51	80	15
Cr. isthmus	50	120	110	150	50	68	120	150	750	150	220	123
Ca. isthmus	710	520	390	420	610	525	1000	800	1600	1000	350	542
UTJ ($x10^3$)	55	50	130	70	80	70	60	40	145	60	40	55
Uterus ($x10^3$)	110	105	200	130	110	75	60	56	149	115	60	55

L=Left; R=Right; Cr.=Cranial; Ca.=Caudal; UTJ=Uterotubal junction

Table 2 Number of sperm counted at different part of reproductive tract at 24 h after deep intra-uterine insemination with $0.15x10^9$ motile spermatozoa in 6 multiparous sows

Reproductive	1		2		3		4		5	
tract	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Ampulla	22	0	35	0	0	44	0	15	11	0
Cr. isthmus	150	0	60	0	0	80	0	60	30	0
Ca. isthmus	420	0	250	0	0	250	0	360	140	0
UTJ ($x10^3$)	22	0	15.5	0	0	25	0	35	20	0
Uterus ($x10^3$)	29	0	46	0	0	28	0	41	13	0

L=Left; R=Right; Cr.=Cranial; Ca.=Caudal; UTJ=Uterotubal junction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Submitted to 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress, Manila, Philippine, 19-21 Sep 2005 (oral presentation)

DISTRIBUTION OF SPERMATOZOA IN THE FEMALE REPRODUCTIVE TRACT AFTER INTRAUTERINE INSEMINATION IN PIG

Peerapong Samransarp[1] Padet Tummaruk[1] Annop Kunavongkrit[1]

[1] Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

Keywords: Pig, Reproduction, Artificial insemination, Intra-uterine insemination

Introduction

Artificial insemination (AI) in pig improved genetics faster than natural mating. The present technique for conventional AI (intra-cervix insemination) required 2-5 billion spermatozoa per insemination. Studies demonstrated that over 90% of the sperm loss before approaching the fertilization area in the oviduct by semen backflow and phagocytosis in the uterus (Mburu *et al.*, 1996; Steverink *et al.*, 1998). Recently, a new procedure for intrauterine insemination (IUI) in sows has been developed (Martinez *et al*., 2002). The procedure consists of a specially designed flexible catheter that allows passage through the cervix and deposit semen in the body of the uterus. Using this technique in sows, the number of spermatozoa per insemination could be reduced up to 1 billion spermatozoa in 50 mL. Studies have shown that, under farm conditions, farrowing rate and litter size after IUI were not significantly difference from conventional AI (Watson and Behan, 2002; Rozeboom *et al.*, 2004). To apply IUI technique under farm condition, more studies on the sperm transport around ovulation times using IUI technique compared with conventional AI still need to be investigated.

Objectives

The purpose of the present study was to compare the number of spermatozoa obtained from the different part of the female reproductive tract at about 24 h after intrauterine insemination (IUI) and conventional AI.

Materials and Methods

Twelve crossbred (Landrace x Yorkshire) multiparous sows were used. All sows were examined for estrus every 6 h using back pressure test with the present of a mature boar. Transrectal ultrasonography were used to detect the time of ovulation. The sows that showed oestrus symptoms within 6 days after weaning and ovulated normally were included in the experiment. During the second estrus after weaning, the sows were inseminated once at 6-8 h before the expected ovulation using diluted fresh semen from a mature boar. The sows were divided into two groups: group I (n=6) sows were inseminated using conventional AI method with $3x10^9$ spermatozoa in 100 mL and group II (n=6) sows were inseminated using IUI method with $1x10^9$ spermatozoa in 50 mL. All sows were ovario-hysterectomized at about 24 h after insemination and the female reproductive tracts were removed and divided into 7 parts: ampulla, cranial isthmus, caudal isthmus, utero-tubal junction (UTJ), cranial uterine horns, middle uterine horn and caudal uterine horn. The spermatozoa within each part of the reproductive tracts were flushed using phosphate buffer saline (PBS) solution and the number of spermatozoa were counted using hemocytometer. Number of spermatozoa in all parts of the uterine horns was pooled for the statistical analyses. The number of spermatozoa and number of ovulation on the left and right side of the reproductive tract within animal were compared using paired *t*-test. The distribution of the spermatozoa in different part of the reproductive tracts was compared using analysis of variance (ANOVA). Due to the lack of normality, the number of spermatozoa was log transformed before being analyzed. The least-square means were obtained from each class of the variables and were compared using student's *t*-test. Number of spermatozoa in each part of the reproductive tracts between groups was compared using student *t*-test. The differences with $P<0.05$ were regarded as statistical significance.

Results and Discussion

The number of ovulation of the sows in AI-group and IUI-group did not differ significantly (18.3 versus 20.3, $P=0.44$). Ovulation took place on the left side more than the right side of the ovaries in both group (10.6 versus 8.8; $P=0.02$). In both groups, the number of spermatozoa was found in both sides of the reproductive tracts. Sperm counted on the left and right side of the reproductive tracts was not differ significantly in both groups ($P>0.05$). The numbers of spermatozoa in each part of the reproductive tracts were not differ significantly between conventional AI and IUI-group ($P=0.49$). The numbers of flushed spermatozoa in each part of the reproductive tracts are presented in Table 1. In both groups, the number of spermatozoa in the UTJ and the uterine horns were higher than those in the ampulla, cranial isthmus and caudal isthmus ($P<0.001$).

The present study demonstrated that the number of spermatozoa in all parts of the female reproductive

tracts after IUI with 3-fold reduction in the number of spermatozoa and 2-fold reduction in the volume were not differ significantly from those inseminated with conventional AI. These data support the previous field studies that farrowing rate and litter size after IUI did not differ significantly from conventional AI (Watson and Behan, 2002; Rozeboom *et al.*, 2004). Application of IUI technique under farm conditions would allow a more efficient use of semen from superior genetic boar. Further studies on environmental factors affecting the fertility rate and the difficulty of the insemination in gilts and young sows should be considered.

Acknowledgement

This study is granted by the Research and Development Center for Livestock Production Technology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The authors wishes to thanks Phillips International Co. Ltd. for providing IUI catheter (Deep-golden pig®) for the experiment.

References

Martinez, E. A., Vasquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, and M.A. Parriilla, I., 2002. Reproduction. 123: 167-170.

Mburu, J. N., Einarsson, S., Lundeheim, N. and Rodigrez-Martinez, H. 1996. Anim. Reprod. Sci. 45: 109-121.

Rozeboom, K.J., Reicks, D.L. and Wilson, M.E. 2004. J. Anim. Sci. 82:2164-2168.

Steverink, D.W.B., Soede, N.M., Bouwman, E.G. and Kemp, B., 1998. Anim. Reprod. Sci. 54: 109-119.

Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., Gil, M.A., Parrilla, I., Cuello, C., Carvajal, G., Lucas, X. and Vazquez, J.L., 2005. Theriogenology 63: 536-547.

Watson, P.F. and Behan, J.R. 2002. Theriogenology. 57: 1683-1693.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 1 Number of sperm counted in different parts of reproductive tracts in sows after intra-uterine insemination (IUI) compared with conventional artificial insemination (AI)

Reproductive tract	N	Conventional AI		IUI		*P*-value
		Mean ± SEM	Range	Mean ± SEM	Range	
Ampullae	6	87.2 ± 17.3[a]	40-150	85.3±24.3[a]	32-195	0.95
Cr. isthmus	6	343.5±115.9[b]	118-900	296.8±68.9[a]	90-594	0.74
Ca. isthmus	6	1411.2±277.2[c]	810-2600	1280.3±211.4[a]	800-2200	0.72
UTJ ($x10^3$)	6	142.5±20.6[d]	95-205	131.2±22.3[d]	70-185	0.72
Uterus ($x10^3$)	6	204.2±34.5[d]	115-330	193.4±48.7[d]	103-395	0.86

[abcd] means with different letters within column differ significantly ($P<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย