



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของแหล่ง
กักเก็บบอสุจิในสุกรภายหลังการผสมเทียมแบบสอดท่อ
เข้ามดลูกด้วยน้ำเชื้อสด

โดย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เผด็จ ธรรมรักษ์
ไพศาล เทียนไทย

กุมภาพันธ์ 2552



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของแหล่ง
กักเก็บบอสุจิในสุกรภายหลังการผสมเทียมแบบสอดท่อ
เข้ามดลูกด้วยน้ำเชื้อสด

โดย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เผด็จ ธรรมรักษ์
ไพศาล เทียนไทย

กุมภาพันธ์ 2552

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2550



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของแหล่งกักเก็บอสุจิในสุกรภายหลังการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูกด้วยน้ำเชื้อสด
ชื่อผู้วิจัย	ผด็จ ธรรมรักษ์ และ ไพศาล เทียนไทย
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	กุมภาพันธ์ 2552

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อตรวจหาจำนวนอสุจิใน crypts ของ uterotubal junction (UTJ) และท่อหน้าไข่ในแม่สุกร ที่ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังทำการผสมเทียมด้วยวิธี intrauterine (IUI) และ deep intrauterine (DIUI) และทำการเปรียบเทียบจำนวนตัวอสุจิเมื่อใช้วิธีการผสมเทียมแบบปกติ การทดลองใช้แม่สุกรพันธุ์ผสม Landrace x Yorkshire (LY) จำนวน 15 ตัว หาเวลาที่เกิดการตกไข่ที่สัมพันธ์กับพฤติกรรมการเป็นสัดโดยทำการอัลตราซาวนด์ผ่านทางทวารหนักทุก 4 ชั่วโมง ผสมเทียมแม่สุกรด้วยน้ำเชื้อสดเจือจางเพียงครั้งเดียวที่เวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมงก่อนเวลาที่คาดว่าจะมีการตกไข่ด้วยวิธี AI (n=5) IUI (n=5) และ DIUI (n=5) โดยทำการผสมเมื่อสุกรเป็นสัดครั้งที่สองหลังจากหย่านม วิธี AI ใช้สุมจิ 3,000 ล้านตัวในปริมาตร 100 มิลลิลิตร วิธี IUI ใช้สุมจิ 1,000 ล้านตัวในปริมาตร 50 มิลลิลิตร และวิธี DIUI ใช้สุมจิ 150 ล้านตัวในปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากผสมเทียมประมาณ 24 ชั่วโมง ทำการวางยาแม่สุกรเพื่อตัดรังไข่และมดลูกออก เก็บท่อหน้าไข่และปีกมดลูกส่วนต้น (1 เซนติเมตร) ทั้งสองข้าง แบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่ UTJ ส่วนท้ายของ isthmus ส่วนต้นของ isthmus และ ampulla ทะลวงตัวอสุจิที่อยู่ในท่อของแต่ละส่วนด้วยสารละลาย phosphate buffer หลายๆ ครั้ง หลังจากทำการชะล้างแล้ว นำส่วน UTJ และท่อหน้าไข่ทุกส่วนไปแช่ในสารละลาย 10% neutral buffered formalin จากนั้นนำ UTJ และส่วนต่างๆ ของท่อหน้าไข่ไปตัดแบ่งเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กันและนำไปใส่ใน paraffin block ทำการตัดขวางเนื้อเยื่อที่ความหนา 5 ไมครอน ชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ทุกๆ 5 ชิ้นจะนำไปย้อมสีด้วยสีย้อม haematoxylin และ eosin นับจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดจาก 32 ชิ้นในแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อ (16 ชิ้นจากด้านซ้ายและอีก 16 ชิ้นจากด้านขวา) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาพบว่าตัวอสุจิส่วนใหญ่จะอยู่กันเป็นกลุ่มบริเวณ epithelial crypt ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิ (UTJ และส่วนท้ายของ isthmus) เป็น 2296 729 และ 22 ตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI IUI และ DIUI ตามลำดับ ($P < 0.01$) แม่สุกรทุกตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI และ IUI จะพบตัวอสุจิในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิได้ทั้งสองข้าง แต่แม่สุกรในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี DIUI จำนวน 3 ตัวจาก 5 ตัวไม่พบตัวอสุจิในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิทั้งสองข้าง แม่สุกร 1 ตัวพบตัวอสุจิในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิเพียงข้างเดียว และแม่สุกรอีก 1 ตัวพบตัวอสุจิได้ทั้งสองข้าง ไม่พบตัวอสุจิในส่วนต้นของ isthmus ขณะที่พบตัวอสุจิเพียง 1 ตัวในส่วน ampulla ในแม่สุกร 1 ตัวจากกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยสรุปการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI จะพบจำนวนตัวอสุจิในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิที่ 24 ชั่วโมงหลังทำการผสมเทียมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธี AI และ IUI อย่างมีนัยสำคัญ ตัวอสุจิสามารถไปอยู่ในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิได้ทั้งสองข้างหลังทำการผสมเทียมด้วยวิธี AI และ IUI แต่ในแม่สุกรกลุ่มที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI พบได้เพียง 1 ตัวจาก 5 ตัว

Project title	A histological study on the sperm reservoir of the sow after an intrauterine artificial insemination with extended fresh semen
Name of the investigators	Padet Tummaruk and Paisan Tienthai
Year	February 2009

Abstract

The aim of this study was to investigate the number of spermatozoa in the crypts of the uterotubal junction (UTJ) and the oviduct of sows approximately 24 h after intrauterine insemination (IUI) and deep intrauterine insemination (DIUI) and compared with that of conventional artificial insemination (AI). Fifteen crossbred Landrace x Yorkshire (LY) multiparous sows were used in the experiment. Transrectal ultrasonography was performed every 4 h to examine the time of ovulation in relation to oestrous behaviour. The sows were inseminated with a single dose of diluted fresh semen by the AI (n = 5), IUI (n = 5) and DIUI (n = 5) at approximately 6–8 h prior to the expected time of ovulation, during the second oestrus after weaning. The sperm dose contained 3000×10^6 spermatozoa in 100 ml for AI, $1,000 \times 10^6$ spermatozoa in 50 ml for IUI and 150×10^6 spermatozoa in 5 ml for DIUI. The sows were anaesthetized and ovario-hysterectomized approximately 24 h after insemination. The oviducts and the proximal part of the uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tracts were collected. The section was divided into four parts, i.e. UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus and ampulla. The spermatozoa in the lumen in each part were flushed several times with phosphate buffer solution. After flushing, the UTJ and all parts of the oviducts were immersed in a 10% neutral buffered formalin solution. The UTJ and each part of the oviducts were cut into four equal parts and embedded in a paraffin block. The tissue sections were transversely sectioned to a thickness of 5 μ m. Every fifth serial section was mounted and stained with haematoxylin and eosin. The total number of spermatozoa from 32 sections in each parts of the tissue (16 sections from the left side and 16 sections from the right side) was determined under light microscope. The results reveal that most of the spermatozoa in the histological section were located in groups in the epithelial crypts. The means of the total number of spermatozoa in the sperm reservoir (UTJ and caudal isthmus) were 2296, 729 and 22 cells in AI, IUI and DIUI groups, respectively ($p < 0.01$). The spermatozoa were found on both sides of the sperm reservoir in all sows in the AI and the IUI groups. For the DIUI group, spermatozoa were not found on any side of the sperm reservoir in three out of five sows, found in unilateral side of the sperm reservoir in one sow and found in both sides of the sperm reservoir in one sow. No spermatozoa were found in the cranial isthmus, while only one spermatozoon was found in the ampulla part of a sow in the IUI group. In conclusion, DIUI resulted in a significantly lower number of spermatozoa in the sperm reservoir approximately 24 h after insemination compared with AI and IUI. Spermatozoa could be obtained from both sides of the sperm reservoir after AI and IUI but in one out of five sows inseminated by DIUI.

Keywords: Pig, Reproduction, Artificial insemination, Spermatozoa, Sperm reservoir

สารบัญ

ส่วนหน้า	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
ภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
รายการตารางประกอบ	IIII
รายการภาพประกอบ	IV
ส่วนเนื้อความ	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	11
บทที่ 5 การอภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ	17
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ (List of Table)

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 ผลผลิตของสุกรหลังการใช้ท่อผสมเทียมชนิดสอดลึกไปยังปีกมดลูก (deep intrauterine insemination) ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ในสุกรที่เกิดการตกไข่ตามธรรมชาติ	5
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean) ของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI) (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007)	6
ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (means) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของลำดับครอก ระยะหย่านมถึงเป็นสัด ระยะเป็นสัดถึงตกไข่ และ ระยะเวลาเป็นสัดของแม่สุกรในกลุ่มที่ได้รับการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI)	8
ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ทางระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI ปกติ IUI และ DIUI	11
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยและพิสัยของจำนวนตัวอสุจิใน UTJ และส่วนท้ายของ isthmus ของแม่สุกรหลังผสมเทียมด้วยวิธี AI, IUI และ DIUI ประมาณ 24 ชั่วโมง	13
ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ ที่อยู่ในชั้นเยื่อบุบริเวณส่วนท้ายของ isthmus ในแม่สุกรหลังการทำ AI, IUI และ DIUI	13
ตารางที่ 7 ลักษณะการย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR) โดยการให้คะแนน (ความเข้ม/สัดส่วนของเซลล์ที่ติดสี) ในท่อนำไข่แม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบ AI, IUI และ DIUI	15
ตารางที่ 8 ลักษณะการย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR) โดยการให้คะแนน (ความเข้ม/สัดส่วนของเซลล์ที่ติดสี) ในมดลูกแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบ AI, IUI และ DIUI	16

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

รูปที่	หน้า
<p>รูปที่ 1 รูปแสดงอวัยวะสืบพันธุ์สุกรเพศเมียที่ได้รับการผสมเทียม 3 แบบ 1 =แบบดั้งเดิม (conventional artificial insemination, AI) 2=แบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (intra uterine insemination, IUI) และ 3=แบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (deep intra uterine insemination, DIUI) (ที่มา: Belstra, 2002)</p>	5
<p>รูปที่ 1 การกระจายตัวของอสุจิในผนังเยื่อบุท่อในในแม่สุกรที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังผสมเทียม SP=Spermatozoa, RBC=Red blood cell, E=Epithelium, S=Subepithelium (a) 100x magnification (b) 400x magnification. H&E stained.</p>	12
<p>รูปที่ 2 เซลล์ลิมโฟไซต์ที่แทรกตัวในชั้นเยื่อบุ (ลูกศรสีดำ) และเซลล์นิวโทรฟิล (หัวลูกศรสีดำ) ที่ส่วนท้ายของ isthmus ย้อมด้วยสีย้อม H&E (ความยาวแห่ง=10 ไมโครเมตร)</p>	14
<p>รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมโครฟาจ ในชั้นเยื่อบุที่ตำแหน่งยูที่เจ ของแม่สุกรภายหลังการผสมเทียมแบบ AI IUI และ DIUI ตัวอักษร a, b, c ที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์แสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)</p>	15
<p>รูปที่ 4 การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในท่อ UTJ ของสุกร (a) megative control, (b) positive control, (c) AI, (d) IUI, (e) DIUI</p>	16

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบัน การผสมเทียม (Artificial Insemination, AI) เข้ามามีบทบาทอย่างสูงในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ในปัจจุบันการผสมเทียมสุกรใช้น้ำเชื้อสดที่รีดได้จากพ่อสุกรนำมาเจือจาง (extended fresh semen) และผสมผ่านท่อผสมเทียมโดยการปล่อยน้ำเชื้อบริเวณคอมดลูก การผสมเทียมแต่ละครั้งใช้น้ำเชื้อสดที่เจือจางลงประมาณ 5-10 เท่าตัว ในปริมาตร 80-100 มิลลิลิตร และมีจำนวนตัวอสุจิทั้งหมด 2-3 พันล้านตัว วิธีนี้สามารถลดจำนวนพ่อสุกรลงได้ถึง 4-5 เท่าตัว เปรียบเทียบกับการผสมธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการวิจัยพบว่าการผสมเทียมสุกรแบบปัจจุบัน $\geq 90\%$ ของตัวอสุจิสูญเสียชีวิตก่อนที่จะเข้าถึงบริเวณที่มีการปฏิสนธิภายในท่อไข่ (Sumransap et al., 2007) โดยสูญเสียชีวิตจากการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อ (Stervink et al., 1998) และจากกระบวนการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกิดภายในมดลูกเอง (Kaeket et al., 2002, 2003) ด้วยเหตุนี้การพัฒนาปรับปรุงวิธีการผสมเทียมสุกรให้มีศักยภาพสูงขึ้นจึงเป็นที่สนใจ

ปัจจุบัน มีการพัฒนาประสิทธิภาพของการผสมเทียมในสุกร ด้วยการพยายามลดจำนวนตัวอสุจิต่อการผสมแต่ละครั้งลง โดยที่ไม่ส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำเชื้อ และเตรียมพร้อมสำหรับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรที่ผ่านการแช่แข็ง และ คัดแยกเพศ (Roca et al. 2003; Roca et al., 2006) การลดจำนวนตัวอสุจิได้มีการเริ่มทดลองมามากกว่า 10 ปี แล้ว โดย Krueger et al. (1999) ได้ทำการทำการผสมเทียมสุกร โดยทำการผ่าตัดและทำการปล่อยน้ำเชื้อ ที่บริเวณใกล้กับช่วงต่อของปีกมดลูกกับท่อไข่ (uterotubal junction, UTJ) ซึ่งเป็นแหล่งกักเก็บอสุจิเพื่อรอการตกไข่ (sperm reservoir) จากการทดลองพบว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิเพียง 10 ล้านตัว ก็เพียงพอเมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ (ผสมเทียมปกติใช้น้ำเชื้อ 3,000 ล้านตัว) ลดลง 300 เท่าตัว แสดงว่าสุกรมีความต้องการอสุจิเพียง 0.3% ของปริมาณที่ใช้ในปัจจุบัน การศึกษานี้ยืนยันว่าจำนวนอสุจิที่อยู่ภายในแหล่งกักเก็บอสุจินี้มีความสำคัญต่ออัตราการผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกในสุกร

ผลการวิจัยต่างๆ ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการผสมเทียมสุกรแบบปกติที่ใช้ในปัจจุบันนับว่ายังไม่เหมาะสมที่จะใช้กับเชื้ออสุจิสุกรที่มีมูลค่าสูงและมีความอ่อนแอ เช่น น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง และน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพศ การผสมเทียมแบบใหม่จึงได้ถูกขึ้น โดยใช้วิธีการสอดท่อผ่านคอมดลูกเพื่อนำน้ำเชื้อไปปล่อยที่ในตัวมดลูก เรียกว่า "intrauterine insemination" (IUI) หรือสอดผ่านไปถึงส่วนต้นของปีกมดลูก เรียกว่า "deep intrauterine insemination" (DIUI) โดยไม่ต้องทำการผ่าตัด ปัจจุบันเทคโนโลยีการผสมเทียมสุกรทั้ง 2 วิธี ได้เริ่มมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และเริ่มนำมาใช้อุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทยแล้ว การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคในการผสมเทียมแบบใหม่นี้ยังมีน้อยมากในประเทศไทย (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007) และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรต้องพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพการผสมเทียมสุกร และรองรับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง ซึ่งในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา การผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีการพัฒนาและใช้งานในอุตสาหกรรมผลิตสุกรอย่างรวดเร็วในสหรัฐอเมริกา และยุโรป (Roca et al., 2006) ในเชิงอุตสาหกรรมผลิตสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ในประเทศไทยยังล้าหลังมากเนื่องจากขาดข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตทั้งหมด ทั้งขั้นตอนและเทคนิคการผลิต จนถึงเทคนิคการผสมพันธุ์ ทำให้ต้องพึ่งพาการนำเข้าเทคโนโลยีเหล่านี้จากต่างประเทศทั้งหมด เนื่องจากเกษตรกรต้องการนำเข้าน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรจากต่างประเทศเพื่อใช้พัฒนาพันธุ์กรรมของสุกรในประเทศไทยให้มีศักยภาพการผลิตที่ดีเยี่ยมและสามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้

ในประเทศอังกฤษ Watson and Behan (2002) ศึกษาการใช้ท่อผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI, Deep Goldenpig™) เป็นอุปกรณ์ในการผสมเทียมสุกร พบว่าสามารถที่จะลดจำนวนตัวอสุจิลงเหลือ 1 พันล้านตัวต่อโด้ส โดยไม่กระทบต่ออัตราการผสมติด ในประเทศสเปน Martinez et al. (2001, 2002) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมสุกร โดยนำน้ำเชื้อเข้าไปในปีกมดลูกแม่สุกรได้โดยพัฒนาวิธีการผสมเทียมแบบ DIUI ขึ้น จากทดลองพบว่าสามารถที่จะลดความเข้มข้นของน้ำเชื้อลงได้ถึง 60 เท่าตัว เมื่อเทียบกับการผสมเทียมแบบเดิม วิธีการผสมเทียมสุกรแบบ DIUI ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้กับน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเพศแล้ว (Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2003) เนื่องจากตัวอสุจิมืออยู่ในน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเพศไม่แข็งแรง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปล่อยน้ำเชื้อให้ใกล้กับบริเวณที่จะเกิดการปฏิสนธิให้มากที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิเกิดการตายก่อนในระหว่างที่เคลื่อนที่จากคอมดลูกมายังท่อไข่ จากการวิจัยพบว่าเทคนิค DIUI สามารถใช้ได้ในการผสมเทียมสุกรและให้จำนวนลูกต่อครอกสูงถึง 8-10 ตัว ต่อครอก ในระดับฟาร์ม (Martinez et al., 2002 ; Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2003)

ในตัวแม่สุกร ภายหลังจากการผสมเทียม อสุจิจะถูกขนส่งผ่านทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมียไปยังส่วนกักเก็บอสุจิซึ่งอยู่บริเวณส่วนรอยต่อระหว่างมดลูกและท่อไข่ บริเวณนี้ เรียกว่า "sperm reservoir" อสุจิจะใช้เวลาเดินทางเพียงไม่กี่นาทีไม่เกินชั่วโมงเพื่อไปยัง sperm reservoir จำนวนอสุจิที่พบที่ sperm reservoir ขึ้นกับจำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียม sperm reservoir มีหน้าที่ในการรักษาสภาพอสุจิให้มีชีวิต คงความสามารถในการปฏิสนธิ และเป็นที่ยลจากการถูกเก็บกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในมดลูกในช่วงเวลาที่ยังไม่มีการตกไข่ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) หลังจากนั้นอสุจิจะค่อยๆ ถูกปล่อยจากบริเวณ sperm reservoir ช้าๆ เพื่อไปยังบริเวณท่อไข่ส่วนกลางเพื่อปฏิสนธิกับไข่ การปล่อยอสุจิออกมาจาก sperm reservoir เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยสารเคมีที่หลั่งมาจากท่อไข่ส่วนแอมพูลล่าในเวลาใกล้ตกไข่ การปลดปล่อยอสุจิออกมาจาก sperm reservoir จะเกิดขึ้นสอดคล้องกับเวลาในการตกไข่ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการผสมเทียมด้วยเทคนิค IUI และ DIUI โดยใช้จำนวนอสุจิลดลง 3 และ 20 เท่าตัว จะสามารถตรวจพบอสุจิภายใน sperm reservoir ได้ไม่แตกต่างจากการผสมเทียมแบบเดิมที่ใช้อสุจิมากกว่า (Sumransap et al. 2007; Tummaruk et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังไม่ได้ตรวจเช็คจำนวนอสุจิในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ ซึ่งอสุจิเหล่านี้จะหลบอยู่ภายในหลีบของ sperm reservoir ไม่สามารถชะล้างออกมาได้ การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ในแมวพบว่าจำนวนอสุจิที่หลบอยู่ในซอกหลีบของ sperm reservoir ซึ่งจะสามารถตรวจเช็คได้จากการทำการตรวจระดับจุลกายวิภาคศาสตร์เท่านั้น มีจำนวนมากกว่าอสุจิที่อยู่บนผิวของ sperm reservoir (Chatdarong et al., 2004) การตรวจเช็คจำนวนอสุจิภายใน sperm reservoir ด้วยวิธีนี้ ยังไม่เคยศึกษามาก่อนในสุกร การประมาณการจำนวนอสุจิภายใน sperm reservoir ที่แม่นยำจะช่วยให้คำนวณจำนวนอสุจิที่ควรใช้เพื่อการผสมเทียมสุกรได้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยโดยคณะผู้วิจัย (Tummaruk et al., 2007) พบว่าการผสมเทียมสุกรด้วยวิธี DIUI สามารถผสมติดสูงถึง 5/8 ตัว โดยใช้อสุจิเพียง 150 ล้านตัว และพบตัวอ่อนทั้งสองข้างของมดลูกโดยเฉลี่ย 11.4 ตัว ซึ่งอยู่ในระดับที่น่าพอใจ แสดงให้เห็นว่า เทคนิคการผสมเทียมแบบ DIUI น่าจะสามารถพัฒนาต่อไปเพื่อใช้กับน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง น้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเพศ และ การย้ายฝากตัวอ่อนได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาตรวจพบอสุจิบนผิวของ sperm reservoir เพียงด้านใดด้านหนึ่งของมดลูก ในขณะที่พบตัวอ่อนทั้งสองด้าน ภายใต้นเวลาไม่ถึง 3 วันหลังผสมพันธุ์ ซึ่งการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนภายในมดลูกไม่น่าจะเป็นสาเหตุ จึงเกิดคำถามการวิจัยต่อเนื่องว่าอสุจิลูกเคลื่อนที่ไปหาไข่ได้อย่างไร โดยมีความเป็นไปได้ 2 แนวทางคือ การเคลื่อนที่ผ่านช่องท้องไปยังอีกด้านของท่อไข่ขณะมีการตกไข่ หรือ การซ่อนตัวอยู่ภายใน sperm reservoir ทั้งสองด้านของ sperm reservoir สมมุติฐานเหล่านี้ยังคงต้องการการวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องโครงสร้างของ sperm reservoir ในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อหาคำตอบ

การศึกษาการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณเยื่อผนังมดลูก มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยความผิดปกติของมดลูกในสัปดาห์ที่ถูกต้องเนื่องจากปัญหาความล้มเหลวในระบบสืบพันธุ์ (Dalin et al., 1997) อย่างไรก็ตามก่อนที่จะสามารถทำการการแยกแยะลักษณะทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้นั้น ลักษณะปกติของเซลล์เหล่านี้ที่เกิดจากวงจรการเป็นสัดตามปกติต้องศึกษาก่อน (Dalin et al., 2004) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณเยื่อผนังมดลูกมดลูกเป็นส่วนหนึ่งของ mucosal immune system แบ่งการทำงานออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ non-specific และ specific immune response เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้สร้างมาจากไขกระดูกแบ่งตามเซลล์ต้นกำเนิดได้ 2 กลุ่ม คือ lymphoid และ myeloid lineage lymphoid lineage สร้าง lymphocyte ซึ่งประกอบด้วย B T และ NK cell ในขณะที่ myeloid lineage สร้าง macrophages neutrophils eosinophils และ basophils การศึกษาค้นนี้จะทำการตรวจสอบภาวะปกติของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณ sperm reservoir ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังตกไข่ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการผสมแบบเดิมและแบบใหม่ซึ่งมีการสอดท่อผ่านคอมดลูก และมีการกระทบผนังมดลูกมากกว่าการผสมแบบเดิม การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณเยื่อผนังมดลูกมีการศึกษาแล้วทั้งในแม่สุกรที่มีวงรอบการเป็นสัดปกติ และภายหลังการผสมเทียม (Kaeoket et al., 2002; 2003) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่พบมากบริเวณเยื่อผนังมดลูก ได้แก่ lymphocyte neutrophil eosinophil และ macrophage โดยปริมาณที่พบขึ้นกับระยะของวงจรการเป็นสัดและมีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน เช่น neutrophil เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในช่วง Prooestrus และ Oestrus และ ลดปริมาณลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสุกรเริ่มเข้าสู่ระยะ early dioestrus (70 ชั่วโมงหลังตกไข่) (Kaeoket et al., 2002) เซลล์ชนิด eosinophil พบสูงขึ้นในสัปดาห์ที่อุ้มท้องระยะต้น (Kaeoket et al., 2003) เมื่อไม่นานนี้ มีการศึกษาพบว่า lymphocyte และ neutrophil สามารถพบได้บริเวณท่อหน้าไข่ส่วนต่างๆ เช่นกัน โดยพบมากในส่วน infundibulum แต่มีการเปลี่ยนแปลงตามวงรอบการเป็นสัดน้อยกว่าเซลล์บริเวณมดลูก (Jiwakanon et al., 2005; 2006) ในสัปดาห์ sperm reservoir อยู่บริเวณตำแหน่งรอยต่อระหว่างปีกมดลูกและท่อหน้าไข่ และส่วนท่อหน้าไข่ส่วนisthmusส่วนท้าย ปริมาณของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณนี้ในสัปดาห์ปกติภายหลังการผสมเทียมทั้ง 3 แบบ ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลส่วนนี้เป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการวินิจฉัยพยาธิสภาพ และอธิบายลักษณะการเปลี่ยนแปลงในระดับจุลกายวิภาคปกติของ sperm reservoir มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์โครงการ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อ

1. ศึกษาปริมาณและตำแหน่งที่พบอสุจิใน sperm reservoir ในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ หลังการผสมเทียม แบบ IUI และ แบบ DIUI เปรียบเทียบกับการผสมแบบเดิม (conventional AI)
2. ศึกษาปริมาณและการกระจายตัวของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณ sperm reservoir ในแม่สุกรที่เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหลังผสมเทียม แบบ IUI และ แบบ DIUI เปรียบเทียบกับการผสมแบบเดิม (conventional AI)

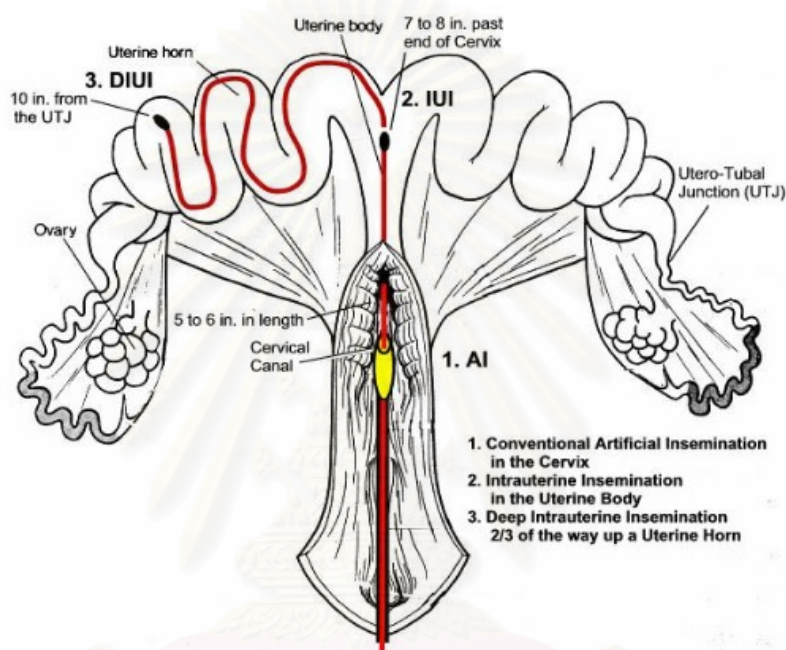
บทที่ 2

ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการผสมเทียมได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก เนื่องจากการผสมเทียมทำให้เกิดการถ่ายทอดพันธุกรรมไปได้อย่างรวดเร็ว และมีสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ดีกว่าหรือเท่าเทียมกับการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติ (Flowers and Esbenschade, 1993; Almond, 1998; Weitze, 2000; Singleton, 2001) ปัจจัยที่มีผลทำให้การผสมเทียมในสุกรมีประสิทธิภาพ ประกอบด้วย คุณภาพของน้ำอสุจิ คุณภาพของสุกรเพศเมีย เวลาในการผสมเทียม และ เทคนิคการผสมเทียม (Soede et al., 1995; Nissen et al., 1997; Tummaruk et al., 2000) โดยปกติการผสมเทียมสุกรแต่ละครั้งจะใช้น้ำเชื้อสดเจือจางที่มีตัวอสุจิ 2,000–5,000 ล้านตัว ในปริมาตร 80–100 มิลลิลิตร และปล่อยน้ำเชื้อภายในคอมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 15-20 ซม. หลังจากนั้นตัวอสุจิก็ก็นเดินทางต่อไปยังตัวมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 5 ซม. และต่อไปยังปีกมดลูกซ้าย และขวา ซึ่งแต่ละข้างมีความยาวประมาณ 90-140 ซม. ตัวอสุจิก็ก็นเดินทางไปจนถึง บริเวณรอยต่อระหว่างปีกมดลูกกับท่อหน้าไข่ (uterine tubal junction, UTJ) ภายในเวลาไม่กี่นาที บริเวณนี้เรียกว่า sperm reservoir (Hunter, 1990; Rodriguez-Martinez et al., 2001) หน้าที่ของ sperm reservoir คือ เป็นที่คัดกรองอสุจิที่วิ่งผ่านเข้าไปยังท่อหน้าไข่ ให้มีปริมาณน้อยลง เพื่อป้องกัน การเกิดภาวะ ไข่ถูกผสมโดยอสุจิมากกว่าสองตัว (polyspermia) ช่วยในการทำให้อสุจิลูกอยู่ในระยะพร้อมปฏิสนธิ (capacitation) และ ช่วยให้อสุจิ มีชีวิตยาวนานขึ้น และป้องกันเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันมิให้ทำลายอสุจิ อสุจิก็ก็นรออยู่ที่บริเวณ UTJ จนกระทั่งเกิดการตกไข่ (Hunter, 1990; Rodriguez-Martinez et al., 2005) หลังจากนั้นอสุจิก็ก็นถูกปล่อยให้เข้าไปยังท่อหน้าไข่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามอสุจิก็ก็นสามารถเดินทางผ่านท่อหน้าไข่เพื่อเข้าไปผสมกับไข่ได้นั้นมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนที่ผสมเข้าไปมาก Mburu et al. (1996) พบว่า มีจำนวนอสุจิก็ก็นที่บริเวณ UTJ เพียงประมาณ 10,000 ถึง 20,000 ตัว และที่บริเวณ ท่อหน้าไข่ส่วนล่างพบอสุจิก็ก็นน้อยกว่า 1,000 ตัว ในขณะที่แม่สุกรตกไข่และมีอสุจิก็ก็นเพียงหนึ่งตัวเท่านั้นจะมีโอกาสได้ผสมกับไข่หนึ่งใบ ในการผสมเทียมแบบดั้งเดิม (conventional AI) นั้น อสุจิก็ก็นประมาณ 3,000 ล้านถูกผสม แต่พบว่าประมาณ 25-40% ถูกมดลูกบีบตัวออกมารอกร่างกายหลังจากผสมภายใน 2 ชั่วโมงครึ่ง (Steverink et al., 1998; Matthijs et al., 2003) อสุจิก็ก็นมากกว่า 50% จะถูกเก็บกินโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายภายในมดลูกหลังการผสมเทียมประมาณ 1 ชั่วโมง (Woelders and Matthijs, 2001; Matthijs et al., 2003) และอสุจิก็ก็นที่เหลือ จะหลบอยู่ตามซอกหลืบของคอมดลูกหรือตัวมดลูก (Matthijs et al., 2003) และบางส่วนจะหลุดเข้าไปในช่องท้อง ดังนั้นจะเหลืออสุจิก็ก็นเพียงไม่ถึง 5% ที่มีความสามารถที่จะผสมได้อยู่ บริเวณ UTJ (Mburu et al., 1996; Rodriguez-Martinez et al., 2005)

งานวิจัยในด้านการผสมเทียมในสุกร มุ่งที่จะลดจำนวนตัวอสุจิก็ก็นต่อการผสม โดยที่ไม่ส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ วิธีการหนึ่งคือ การลดจำนวนตัวอสุจิก็ก็นต่อได้สการผสมโดยปล่อยน้ำเชื้อภายในมดลูก Krueger และคณะ (1999) ได้ทำการทำการผสมเทียมสุกรสาว โดยทำการผ่าตัดและทำการปล่อยน้ำเชื้อ ที่บริเวณใกล้เคียงกับช่วงต่อของปีกมดลูกกับท่อหน้าไข่ (uterotubal junction, UTJ) พบว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิก็ก็น 10 ล้านตัวในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ก็เพียงพอเมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ เช่นเดียวกันกับในสุกรนาง (Krueger and Rath, 2000) อุปกรณ์ในการผสมเทียมต่าง ๆ ได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการนำน้ำเชื้อไปปล่อยที่ในตัวมดลูก (intrauterine insemination, IUI) หรือส่วนต้นของปีกมดลูก (deep intrauterine insemination, DIUI) (รูปที่ 1) Watson and Behan (2002) ศึกษาการใช้ท่อผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) เป็นอุปกรณ์ในการผสมเทียมสุกร พบว่าสามารถที่จะลดจำนวนตัวอสุจิก็ก็นเหลือ 1,000 ล้านตัวต่อได้ส โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด และเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และมีประสิทธิภาพ Martinez et al. (2001) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมสุกร โดยฉีด

น้ำเชื้อเข้าไปในปีกมดลูก (deep intrauterine insemination, DIUI) โดยวิธีไม่ผ่าตัดและไม่ต้องวางยา โดยใช้ท่อ endoscope สอดผ่านท่อผสมเทียม ผ่านคอมดลูก และปล่อยน้ำเชื้อที่ปีกข้างใดข้างหนึ่ง และพบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการเข้าคลอด ขนาดครอก เมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ ต่อมา Martinez et al. (2002) ได้พัฒนาวิธีการผสมเทียม DIUI โดยนำท่อที่สามารถโค้งงอได้ (flexible catheter) มาใช้แทนท่อ endoscope ที่มีราคาแพง และแตกหักได้ง่าย ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคสนาม จากทดลองพบว่าสามารถที่จะลดความเข้มข้นของน้ำเชื้อลงได้ 20–60 เท่า เมื่อเทียบกับการผสมเทียมแบบเดิม บริเวณที่ปล่อยน้ำเชื้อคือ 1 ใน 3 ของปีกมดลูก ทางส่วนต้น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 รูปแสดงอวัยวะสืบพันธุ์สุกรเพศเมียที่ได้รับการผสมเทียม 3 แบบ 1=แบบดั้งเดิม (conventional artificial insemination, AI) 2=แบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (intra uterine insemination, IUI) และ 3=แบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (deep intra uterine insemination, DIUI) (ที่มา: Belstra, 2002)

ตารางที่ 1 ผลผลิตของสุกรหลังการใช้ท่อผสมเทียมชนิดสอดลึกไปยังปีกมดลูก (deep intrauterine insemination) ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ในสุกรที่เกิดการตกไข่ตามธรรมชาติ

ปริมาณตัวสุจิ (ล้านตัว)	ปริมาตรน้ำเชื้อ (มล.)	จำนวนสุกร	อัตราการเข้าคลอด %	จำนวนลูกทั้งหมด/ครอก	เอกสารอ้างอิง
1,000	5	40	70.0	9.25	(Roca et al., 2003)
250	5	NA	42.9	7.2	(Bathgate et al., 2003)
1,000	0.5	20	65.0*	6*	(Wongtawan, 2004)

*ตัวเลขที่แสดงเป็นอัตรา การตั้งท้อง และจำนวนตัวอ่อนที่นับได้ในมดลูก; NA=ไม่มีข้อมูล

โดยทั่วไปหลังการผสมเทียมระบบภูมิคุ้มกันจะตอบสนองต่อน้ำเชื้อโดยการเพิ่มจำนวน และเกิดการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล (neutrophils) ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และ แมคโครฟาจ

(macrophages) ไปยังเยื่อโพรงมดลูก (Bischof et al., 1994; Engelhardt et al., 1997; Kaeoket et al., 2003) นอกจากนี้ มดลูกยังตอบสนองต่อน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการขับสารคัดหลั่งสารจากเนื้อเยื่อโพรงมดลูกหลังการถูกกระตุ้นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อและตัวอสุจิ (Lovell and Getty, 1968; Pursel et al., 1978) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อน้ำเลี้ยงเชื้อและตัวอสุจินี้เป็นการทำความสะอาดเนื้อเยื่อโพรงมดลูก เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์กับตัวอ่อนที่กำลังเดินทางมาฝังตัว (Engelhardt et al., 1997; Rozeboom et al., 1998, 1999; Kaeoket et al., 2003) Rozeboom et al. (1999, 2000, 2001) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิมีผลในการลดและยับยั้งหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผลต่อเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล เมื่อโตสที่ใช้ในการผสมเทียมที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนประกอบ 8-12% โดยปริมาตร จึงแนะนำให้ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อทุกส่วน (entire ejaculation) ยกเว้นน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิที่หลั่งออกมาส่วนแรกของการหลั่งน้ำเชื้อ ด้วยวิธีนี้จะทำให้น้ำเชื้ออสุจิที่เก็บได้นั้นมีน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิ เป็นส่วนประกอบในปริมาณที่พอเพียง นอกจากผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ Kaeoket et al. (2002) พบว่าการตอบสนองของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในมดลูกยังสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน อย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al. 2007) พบว่าการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (IUI) สามารถที่จะทำการสอดท่อผสมเทียมผ่านคอมมดลูกได้ในแม่สุกรทุกตัว และไม่พบเลือดที่ปลายท่อผสมเทียม หลังจากทำการผสมเทียมเสร็จแล้ว สอดคล้องกับการศึกษาของ Roca et al. (2003) ที่สามารถสอดท่อผ่านคอมมดลูกแม่สุกรจำนวน 94.0 เปอร์เซ็นต์ และพบเลือดที่ปลายท่อจำนวน 1.7 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาของ Dallanora et al. (2004) พบว่าแม่สุกรจำนวน 94.7 เปอร์เซ็นต์สามารถที่จะสอดท่อได้และพบเลือดที่ปลายท่อจำนวน 1.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า หลังการผสมเทียมอสุจิจะสูญเสียจากการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อแล้ว และจะถูกเม็ดเลือดขาวและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาเก็บกิน (Matthijs et al., 2003) Mburu et al. (1996) พบว่า ก่อนไข่ตกตัวอสุจิส่วนใหญ่จะเข้าไปอยู่ตรงบริเวณส่วนต่อของท่อไข่และปีกมดลูก และส่วนล่างของ isthmus แต่หลังไข่ตกตัวอสุจิจะเข้าไปอยู่ในส่วนของ isthmus ส่วนบนมากขึ้น ส่วนรอยต่อของท่อไข่และปีกมดลูก จะเป็นบริเวณที่สะสมของตัวอสุจิ โดยบริเวณนี้มีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิและยังทำหน้าที่ช่วยกรองตัวอสุจิที่จะผ่านเข้าไปในท่อไข่ด้วย (Rigby, 1966; Tienthai, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของคณะผู้วิจัย ซึ่งพบว่า หลังผสมเทียม 24 ชั่วโมง อสุจิส่วนใหญ่จะพบที่ส่วนของรอยต่อระหว่างท่อไข่และมดลูก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean) ของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่ตรวจพบในท่อไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI) (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007)

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 ampullae 2 isthmus ส่วนต้น 3 isthmus ส่วนท้าย 4 UTJ 5 ปีกมดลูกส่วนต้น 6 ปีกมดลูกส่วนกลาง 7 ปีกมดลูกส่วนท้าย^{abcd} อักษรต่างกันแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษากการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณเยื่อผนังมดลูก มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยความผิดปกติของมดลูกในสุกรที่ถูกตัดทิ้งเนื่องจากปัญหาความล้มเหลวในระบบสืบพันธุ์ (Dalin et al., 1997) อย่างไรก็ตามก่อนที่จะสามารถทำการการแยกแยะลักษณะทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้นั้น ลักษณะปกติของเซลล์

เหล่านี้ที่เกิดจากวงจรการเป็นสัตว์ตามปกติต้องศึกษาก่อน (Dalin et al., 2004) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่บริเวณเยื่อผนังมดลูกมดลูกเป็นส่วนหนึ่งของ mucosal immune system แบ่งการทำงานออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ non-specific และ specific immune response เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้สร้างมาจากไขกระดูกแบ่งตามเซลล์ต้นกำเนิดได้ 2 กลุ่ม คือ lymphoid และ myeloid lineage lymphoid lineage สร้าง lymphocyte ซึ่งประกอบด้วย B T และ NK cell ในขณะที่ myeloid lineage สร้าง macrophages neutrophils eosinophils และ basophils การศึกษาค้นนี้จะทำการตรวจสอบภาวะปกติของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณ sperm reservoir ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังตกไข่ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการผสมแบบเดิมและแบบใหม่ซึ่งมีการสอดท่อผ่านคอมดลูก และมีการกระทบผนังมดลูกมากกว่าการผสมเทียมแบบเดิม การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อผนังมดลูกมีการศึกษาแล้วทั้งในแม่สุกรที่มีวงรอบการเป็นสัตว์ปกติ และภายหลังการผสมเทียม (Kaeoket et al., 2002, 2003) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่พบมากบริเวณเยื่อผนังมดลูก ได้แก่ lymphocyte, neutrophil, eosinophil และ macrophage โดยปริมาณที่พบขึ้นกับระยะของวงจรการเป็นสัตว์และมีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน เช่น neutrophil เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในช่วง Pro-oestrus และ Oestrus และ ลดปริมาณลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสุกรเริ่มเข้าสู่ระยะ early dioestrus (70 ชั่วโมงหลังตกไข่) (Kaeoket et al., 2002) เซลล์ชนิด eosinophil พบสูงขึ้นในสุกรที่อุ้มท้องระยะต้น (Kaeoket et al., 2003) เมื่อไม่นานนี้ มีการศึกษาพบว่า lymphocyte และ neutrophil สามารถพบได้บริเวณท่อหน้าไข่ส่วนต่างๆ เช่นกัน โดยพบมากในส่วน infundibulum แต่มีการเปลี่ยนแปลงตามวงรอบการเป็นสัตว์น้อยกว่าเซลล์บริเวณมดลูก (Jiwakanon et al., 2005, 2006) ในสุกร sperm reservoir อยู่บริเวณตำแหน่งรอยต่อระหว่างปีกมดลูกและท่อหน้าไข่ และส่วนท่อหน้าไข่ส่วน isthmus ส่วนท้าย ปริมาณของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณนี้ในสุกรปกติภายหลังการผสมเทียมทั้ง 3 แบบ ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลส่วนนี้เป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการวินิจฉัยพยาธิสภาพ และอธิบายลักษณะการเปลี่ยนแปลงในระดับจุลกายวิภาคปกติของ sperm reservoir มากยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นสถานที่สำหรับปฏิบัติการทางจุลกายวิภาคศาสตร์

จริยธรรมของการวิจัยในคนและสัตว์

ตัวอย่างของอวัยวะสืบพันธุ์ที่ได้มาจากแม่สุกรที่ถูกคัตทิ้ง และผู้วิจัยทำการซื้อมาเพื่อการทดลองเป็นเวลา 2 เดือน โดยสุกรได้รับการเลี้ยงดูอย่างดี ที่โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นครปฐม สุกรได้รับน้ำดื่มตลอด 24 ชั่วโมง และอาหารสำเร็จรูปวันละ 2 มื้อ คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าการศึกษานี้ไม่มีปัญหาทางด้านจริยธรรมต่อสัตว์

สัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ใช้ส่วนของชิ้นเนื้อของท่อนำไข่และส่วนต้นของมดลูกจากแม่สุกรนางจำนวน 15 ตัว จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Sumransarp et al., 2007; Tummaruk et al., 2007) โดยเป็นแม่สุกรที่ได้รับการผสมเทียม 3 แบบ ได้แก่ แบบ AI 5 ตัว แบบ IUI 5 ตัว และ แบบ DIUI 5 ตัว ก่อนทำการผสมเทียม แม่สุกรทุกตัวได้รับการตรวจการเป็นสัด และเวลาตกไข่ด้วยอัลตราซาวด์แบบ เรียลไทม์ บี โหมด ผ่านทางทวารหนัก ทุก 4 ชั่วโมง ข้อมูลการเป็นสัดและการตกไข่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 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

การผสมเทียม

ชิ้นเนื้อของท่อนำไข่และมดลูก ได้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มตามวิธีการผสมเทียม 3 แบบ ได้แก่

กลุ่มที่ 1 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธี intracervical insemination (AI) แม่สุกรนางจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับการเช็คสัดและครบกำหนดเวลาที่จะผสมเทียมจะได้รับการทำความสะอาด และเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้

แห้ง จะถูกผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดที่อยู่ในถุงพลาสติก cochete ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีจำนวนตัวอสุจิ 3 พันล้านตัว สอดท่อผสมเทียม Goldenpig® ให้เข้าไปลึกในคอมดลูก แล้วทำการปล่อยน้ำเชื้อ หลังจากน้ำเชื้อถูกดูดเข้าไปในมดลูกหมดแล้ว ให้ปล่อยท่อผสมเทียมค้างไว้ในคอมดลูกประมาณ 1 นาที เพื่อป้องกันน้ำเชื้อไหลย้อนกลับ

กลุ่มที่ 2 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธี intrauterine insemination (IUI) แม่สุกรนางจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับการเช็ดสัดและครบกำหนดเวลาที่จะผสมเทียมจะได้รับการทำความสะอาด และเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้แห้ง หลังจากนั้นทำการสอดท่อผสมเทียม Deep Goldenpig™ (ยาว 60 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.8 มม.) สอดท่อผสมเทียมให้เข้าไปลึกอยู่ในคอมดลูก แล้วค่อยๆสอดท่อขนาดเล็กที่อยู่ด้านในเพื่อผสมเทียมให้ผ่านคอมดลูกจนกระทั่งปลายไปอยู่ในตัวมดลูก ก่อนที่จะทำการผสมเทียมจะล้างท่อด้านในด้วยสารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเข้าไปในท่อ และทำการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิ 1 พันล้านตัว ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยต่อเข้ากับท่อขนาดเล็กที่อยู่ด้านในท่อผสมเทียม หลังจากนั้นจะใช้สารละลายจำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อดันน้ำเชื้อที่ค้างเหลืออยู่ในท่อให้เข้าไปในมดลูก

กลุ่มที่ 3 แม่สุกรได้รับการผสมเทียมโดยวิธี Deep intrauterine insemination (DIUI) ทำการผสมเทียมจำนวน 5 ตัว โดยการทำความสะอาดและเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้แห้ง ทำการสอดท่อผสมเทียมผ่านช่องคลอด ให้เข้าไปอยู่ในคอมดลูกและใช้ท่อขนาดเล็กที่ออกแบบเป็นพิเศษ ซึ่งจะสอดท่อนี้ผ่านท่อผสมเทียม ให้ผ่านคอมดลูกไปอยู่ในปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่งจนกระทั่งสุดความยาวของท่อ ก่อนที่จะทำการผสมเทียมจะล้างท่อด้านในด้วยสารละลาย และจะใส่สารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเข้าไปในท่อ และทำการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิ 150 ล้านตัว ในปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ใส่ไปในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรและต่อเข้ากับท่อที่ใช้การผสมเทียม หลังจากนั้นจะใช้สารละลาย BTS จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อดันน้ำเชื้อที่ค้างเหลืออยู่ในท่อให้เข้าไปในมดลูก

การเก็บตัวอย่างท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์

แม่สุกรนางถูกวางยาสลบ และเปิดผ่าช่องท้องหลังตกไข่ทำการผ่าตัดเพื่อนำรังไข่และมดลูกของแม่สุกรออก หลังจากนำอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรออกมา ทำการผูกที่ที่ส่วนปลายสุดของท่อนำไข่ ทำการผูกและแบ่งท่อนำไข่กับส่วนปีกมดลูกแต่ละข้างออกเป็น 6 ส่วน ได้แก่ ท่อนำไข่ส่วน ampullae ท่อนำไข่ isthmus ส่วนต้นท่อนำไข่ isthmus ส่วนท้าย ช่วงต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก ปีกมดลูกส่วนต้น และปีกมดลูกส่วนท้าย ส่วนต้นของปีกมดลูกในการหาตัวอสุจิในส่วนของท่อนำไข่ส่วน ampullae จะล้างด้วย BTS ที่อุ่น จำนวน 1 มิลลิลิตร ในส่วนของ isthmus และ UTJ จะชะล้างด้วยสารละลาย BTS ที่อุ่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และในส่วนของปีกมดลูกจะล้างด้วย BTS ที่อุ่น จำนวน 20 มิลลิลิตร แต่ละส่วนจะถูกชะล้างจำนวน 2 ครั้ง หลังจากชะล้างเสร็จแล้วทำให้ตัวอสุจิมีความเข้มข้นขึ้นโดยนำของเหลวที่ชะล้างมาจากส่วนต่างๆ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุ่น ด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที ท่อนำไข่และมดลูกที่ทำการชะล้างตัวอสุจิออกแล้วจะนำมาดองใน 10% natural buffer formalin

การตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (LM)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์จากแม่สุกรทั้ง 4 ส่วน ทั้งซ้ายและขวา นำมาตัดให้ได้ลักษณะที่ต้องการ แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยให้ตัวอย่างแต่ละส่วนมีความหนา 5-7 ไมครอน ท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ด้านซ้ายและขวาจะแยกออกจากกันเพื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของ

อสุจิ นับส่วนละ 4 ชิ้น ด้านซ้ายเปรียบเทียบกับด้านขวา ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จะนำไปย้อมด้วยสี Hematoxyline and Eosin (H&E) ทำการตรวจสอบชิ้นเนื้อของท่อนำไข่แต่ละส่วน (UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus และ ampulla)

เนื้อเยื่อส่วน UTJ และ caudal isthmus นำมาย้อมด้วยวิธีทาง immunohistochemistry เพื่อตรวจจำนวนตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน ในกลุ่มที่ย้อมด้วยสี H&E ด้วยการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนที่ขึ้นมาจากชั้น lamina propria เข้ามาที่ชั้นเยื่อบุผิว (number of intraepithelial leukocytes) โดยการสุ่มนับแต่ละพื้นที่ของเยื่อบุผิวด้วย eyepiece micrometer จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนที่ขึ้นมาที่เยื่อบุผิว จะนับจำนวนทั้งหมดโดยการสุ่มจำนวน 50 พื้นที่ โดยการใช้ eyepiece micrometer (ที่มีตารางเล็กๆ 25 ตาราง) โดยใช้กำลังขยายเดียวกัน ผลที่ได้จะเป็น number of cells/ocular field area ค่าที่ได้นำมาประมวลผลทางสถิติและเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มสุกรในกลุ่มควบคุม ทำการตรวจสอบชิ้นเนื้อของท่อนำไข่แต่ละส่วน (UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus และ ampulla) ค่าที่ได้จะนำมาประมวลผลทางสถิติและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม นับจำนวนอสุจิที่พบทั้งหมดในทุกชิ้นเนื้อแล้วนำมาหาค่ารวมเพื่อเปรียบเทียบจำนวนอสุจิในส่วนต่างๆ ภายในกลุ่มเดียวกัน และระหว่างกลุ่ม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Inst. V. 9.0, Cary, NC USA) โดยทำการหาค่าความถี่ และค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบสัดส่วนของตัวอสุจิที่ส่วนต่างๆ ในท่อทางเดินสืบพันธุ์ ได้แก่ ส่วน รอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ ส่วนต้น และส่วนท้ายของ isthmus และแอมพูลล่า ทั้งสองด้าน โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) การเปรียบเทียบระหว่างด้านซ้ายและขวาภายในสัตว์ตัวเดียวกัน ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Pair *t*-test ค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ปริมาณและตำแหน่งที่พบอสุจิใน sperm reservoir ในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

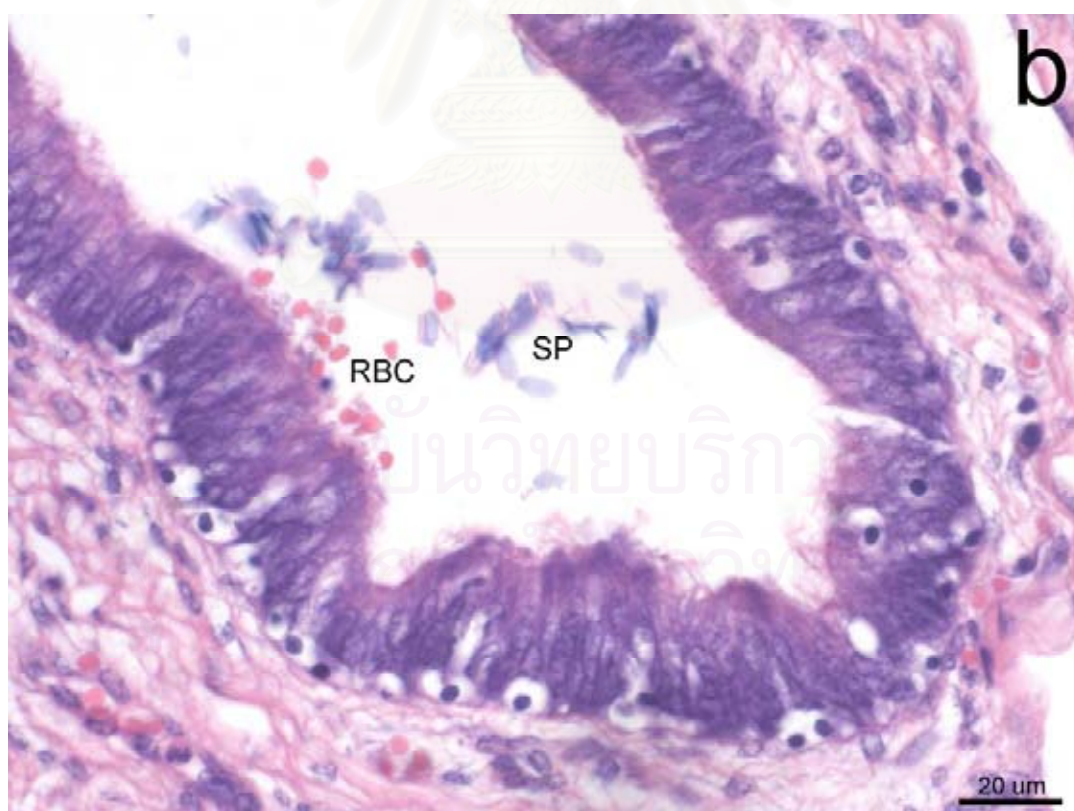
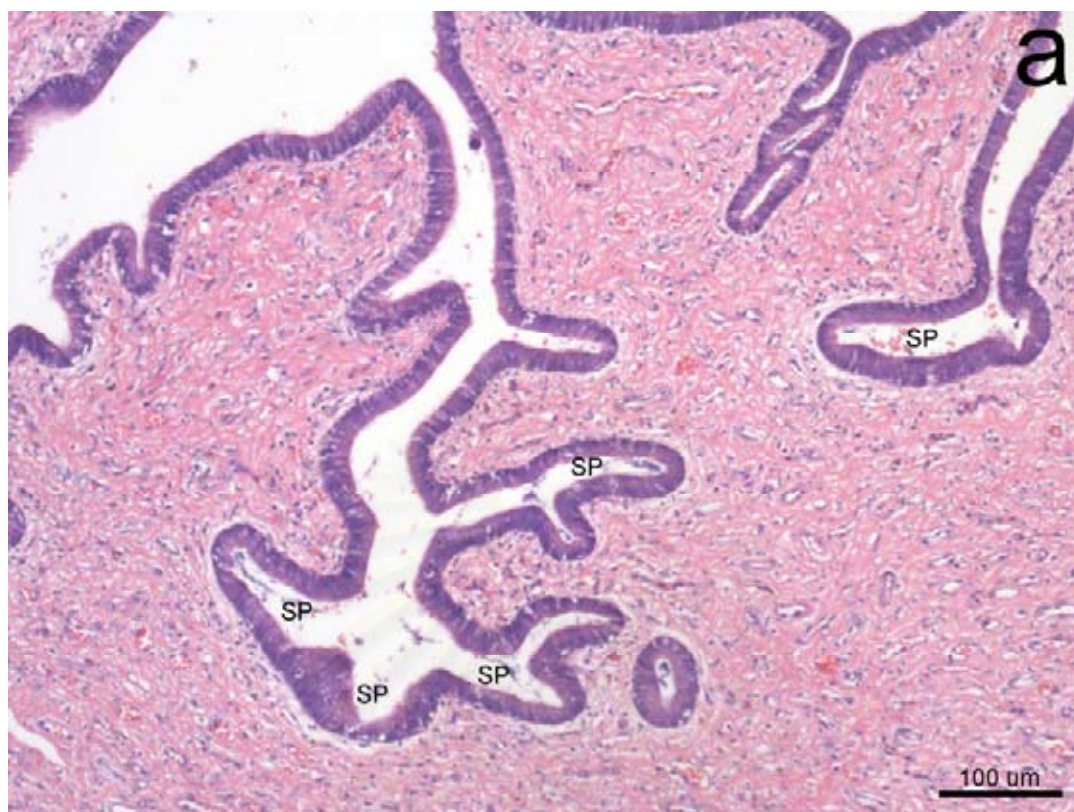
พารามิเตอร์ทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ระยะหย่านมถึงเป็นสัด ระยะเป็นสัดถึงตกไข่ ระยะเวลาการเป็นสัด จำนวนไข่ที่ตก และความยาวของปีกมดลูก แสดงไว้ดังตารางที่ 1 พารามิเตอร์เหล่านี้ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ช่วงเวลาตั้งแต่ทำการผสมเทียมถึงการผ่าตัดเอามดลูก และรังไข่ออกมีความแปรปรวนระหว่าง 24.6 ถึง 26.1 ชั่วโมงระหว่างกลุ่ม ($P>0.05$)

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ทางระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI ปกติ IUI และ DIUI

พารามิเตอร์	กลุ่ม			P-value
	AI	IUI	DIUI	
ลำดับท้อง	9.0±1.4	6.0±3.2	6.8±1.9	0.42
น้ำหนักตัว (กก)	198±50	208±34	234±19	0.40
เป็นสัดครั้งแรก				
ระยะหย่านมถึงเป็นสัด (วัน)	5.2±1.6	4.2±0.8	5.3±1.5	0.42
ระยะเป็นสัดถึงตกไข่ (ชม)	34.2±9.3	38.0±12.1	43.5±12.6	0.46
ระยะเวลาการเป็นสัด (ชม)	55.1±22.5	53.0±11.7	60.0±12.2	0.80
เป็นสัดครั้งที่สอง				
ระยะเวลาตั้งแต่ผสมถึงตั้งครรภ์ไข่และมดลูก (ชม)	24.6±0.8	26.1±1.6	24.8±1.9	0.27
จำนวนไข่ที่ตก	15.3±2.1	17.7±1.5	17.2±1.6	0.19
ความยาวของปีกมดลูก (ชม)	248±33	263±28	256±44	0.85

AI, artificial insemination; IUI, intra-uterine insemination; DIUI, deep intra-uterine insemination

ลักษณะของอสุจิส่วนใหญ่ที่ตรวจพบในทางจุลกายวิภาคจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณ epithelial crypt (รูปที่ 1) จำนวนตัวอสุจิที่พบในเนื้อเยื่อแสดงในตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิที่ศึกษา (ยูที่เจ และส่วนท้ายของ isthmus) เป็น 2,296 729 และ 22 ตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI IUI และ DIUI ตามลำดับ ($P<0.05$) จำนวนตัวอสุจิมีความแตกต่างกันระหว่างแม่สุกรตั้งแต่ 36 ถึง 3,927 ตัวในกลุ่มที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธี AI ตั้งแต่ 141 ถึง 2,260 ตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI และตั้งแต่ 0 ถึง 56 ตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี DIUI (ตารางที่ 2) แม่สุกรทุกตัวไม่พบตัวอสุจิในส่วนต้นของ isthmus และมีแม่สุกรในกลุ่มที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI เพียงตัวเดียวที่พบตัวอสุจิ 1 ตัวในส่วนแอมพูลล่า



รูปที่ 1 การกระจายตัวของอสุจิในผนังเยื่อบุต่อหน้าไข่ในแม่สุกรที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังผสมเทียม SP=Spermatozoa, RBC=Red blood cell, E=Epithelium, S=Subepithelium (a) 100x magnification (b) 400x magnification. H&E stained.

ในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI และ IUI สามารถพบตัวสุงิในแหล่งกักเก็บตัวสุงิได้ทั้งสองข้าง ส่วนในกลุ่มที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI แม่สุงิจำนวน 3 ตัวจาก 5 ตัวไม่พบตัวสุงิในส่วนยูที่เจ หรือส่วนอื่นๆ ของท่อนำไข่ แม่สุงิ 1 ตัวพบตัวสุงิในยูที่เจ เพียงข้างเดียว และแม่สุงิ 1 ตัวพบตัวสุงิในยูที่เจ ทั้งสองข้าง

คำนวณค่าประมาณของจำนวนตัวสุงิที่ซ่อนอยู่ใน crypt ของยูที่เจ และส่วนท้ายของ isthmus ต่อพื้นที่ (32 ชั้น x 5 ไมครอน = 160 ไมครอน) ตัวอย่างเช่น จำนวนตัวสุงิใน UTJ หลังผสมเทียมด้วยวิธี AI เป็น $2,276/160 = 14.2$ ตัวต่อไมครอน หรือ 142,000 ตัวต่อเซนติเมตรของยูที่เจ

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและพิสัยของจำนวนตัวสุงิใน UTJ และส่วนท้ายของ isthmus ของแม่สุงิหลังผสมเทียมด้วยวิธี AI, IUI และ DIUI ประมาณ 24 ชั่วโมง

กลุ่ม	จำนวน	UTJ	ส่วนท้ายของ isthmus	จำนวนทั้งหมด
AI	5	2276 ^a (36-3829)	20 ^a (0-98)	2296 ^a (36-3927)
IUI	5	716 ^a (141-2260)	13 ^a (0-59)	729 ^a (141-2260)
DIUI	5	22 ^b (0-56)	0 ^a	22 ^b (0-56)

ยูที่เจ (UTJ), utero-tubal junction; AI, artificial insemination; IUI, intrauterine insemination ; DIUI, deep intrauterine insemination ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

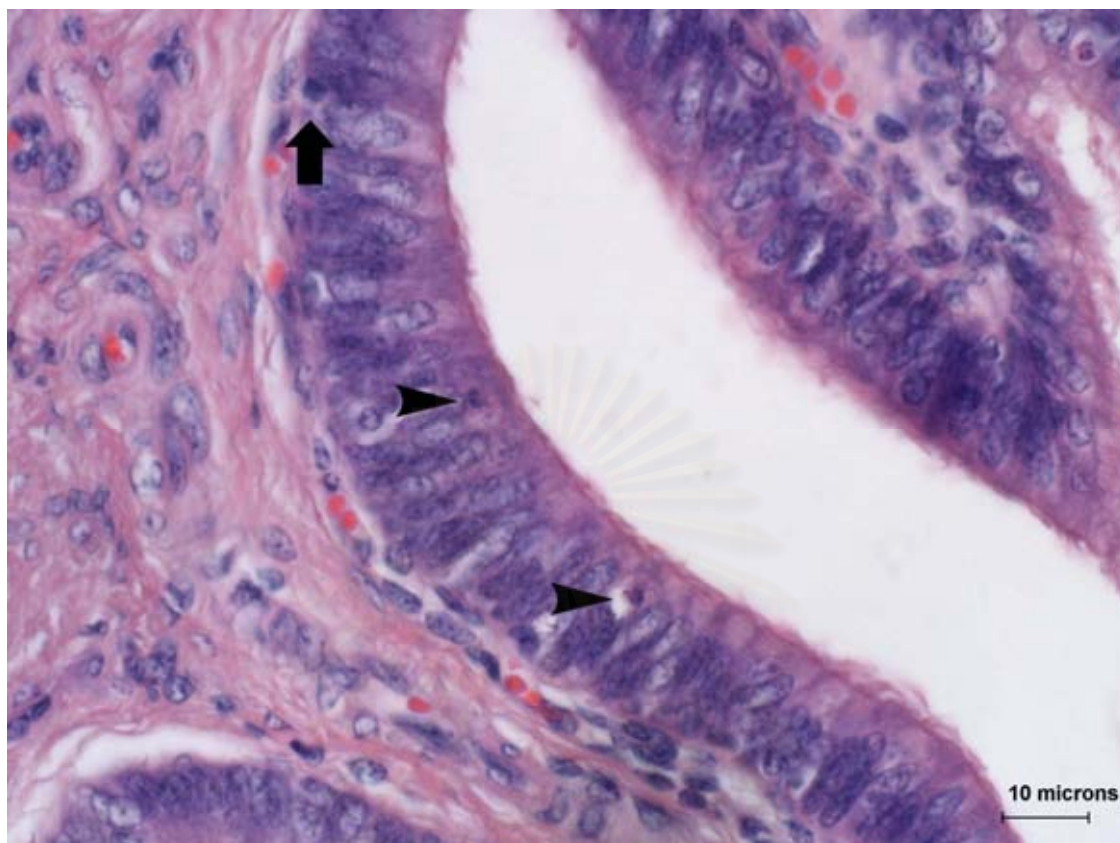
การกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในท่อนำไข่

การแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในชั้นเยื่อบุมดลูกของเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจที่ตำแหน่งยูที่เจ และส่วนท้ายของ isthmus ในแม่สุงิแสดงไว้ดังรูปที่ 2 และ 3 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในชั้นเยื่อบุมดลูกของเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจที่ตำแหน่งยูที่เจ ของแม่สุงิหลังการผสมเทียม (AI) การผสมเทียมแบบ IUI และการผสมเทียมแบบ DIUI ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.1$) (รูปที่ 3) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในชั้นเยื่อบุมที่ตำแหน่งกักเก็บตัวสุงิภายหลังการผสมเทียมที่ 24 ชั่วโมงส่วนใหญ่มักเป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ เซลล์นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจพบในแหล่งกักเก็บตัวสุงิได้ในจำนวนไม่มากในแม่สุงิส่วนใหญ่ (รูปที่ 2 และ 3) จำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจที่แทรกตัวในชั้นเยื่อบุมที่ตำแหน่งส่วนท้ายของ isthmus ในแม่สุงิหลังการผสมเทียมแบบ AI IUI และ DIUI แสดงไว้ดังตารางที่ 3 เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันที่พบในส่วนท้ายของ isthmus ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ ขณะที่เซลล์นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจก็สามารถพบได้บ้าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ ที่อยู่ในชั้นเยื่อบุบริเวณส่วนท้ายของ isthmus ในแม่สุงิหลังการทำ AI, IUI และ DIUI

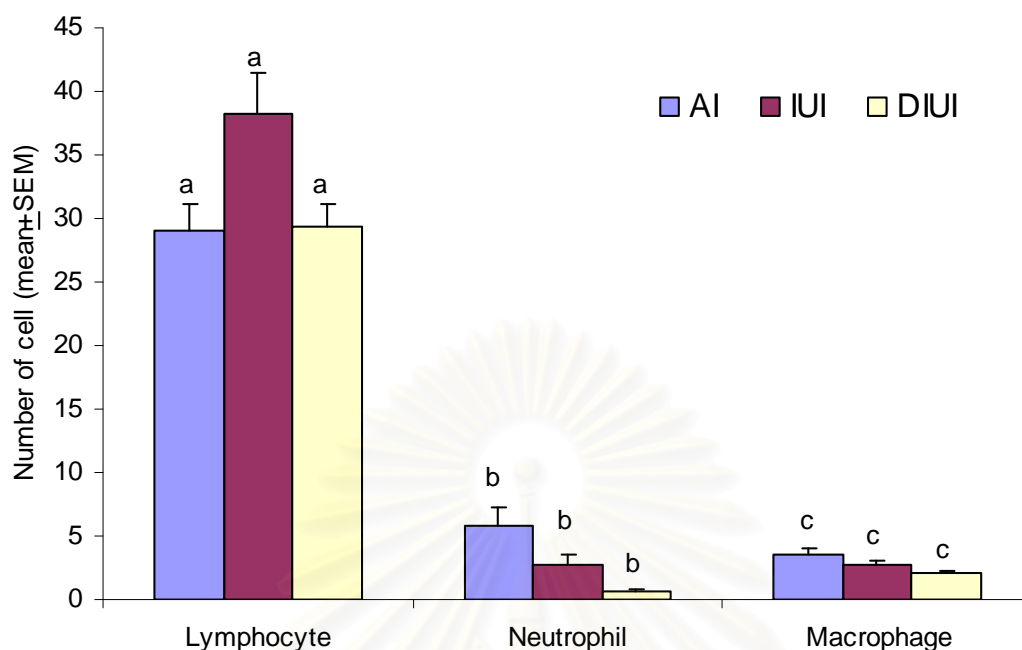
เซลล์	AI	IUI	DIUI
ลิมโฟไซต์	18.6±2.0 ^a	22.1±2.0 ^a	11.8±0.7 ^a
นิวโทรฟิล	0.1±0.04 ^a	1.5±0.8 ^a	0.3±0.1 ^a
แมคโครฟาจ	0.8±0.2 ^a	1.6±0.4 ^a	0.6±0.1 ^a

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)



รูปที่ 2 เซลล์ลิมโฟไซต์ที่แทรกตัวในชั้นเยื่อ (ลูกครสีดำ) และเซลล์นิวโทรฟิล (หัวลูกครสีดำ) ที่ส่วนท้ายของ isthmus ย้อมด้วยสีย้อม H&E (ความยาวแท่ง=10 ไมโครเมตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเซลล์ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจในชั้นเยื่อที่ตำแหน่งยูเทอริของแม่สุกรภายหลังการผสมเทียมแบบ AI IUI และ DIUI ตัวอักษร a, b, c ที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์แสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในท่อนำไข่

ผลการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (oestrogen receptor, ER) และตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor, PR) พบว่า เซลล์บริเวณท่อนำไข่และมดลูกไม่พบการแสดงออกของ ER แต่พบการแสดงออกของ PR (รูปที่ 4) การแสดงออกของ PR ในท่อนำไข่และมดลูกส่วน UTJ แสดงในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ในท่อนำไข่ ความเข้มของ PR ในชั้นกล้ามเนื้อ และสัดส่วนของการติดสี PR ในชั้นเยื่อผิวในกลุ่ม DIUI มีระดับต่ำกว่ากลุ่ม AI อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในส่วนของมดลูกการแสดงออกของ PR ในสุกรทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นในชั้นกล้ามเนื้อที่พบว่าความเข้มของ PR ในกลุ่ม AI สูงกว่ากลุ่ม DIUI ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 ลักษณะการย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR) โดยการให้คะแนน (ความเข้ม/สัดส่วนของเซลล์ที่ติดสี) ในท่อนำไข่แม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบ AI, IUI และ DIUI

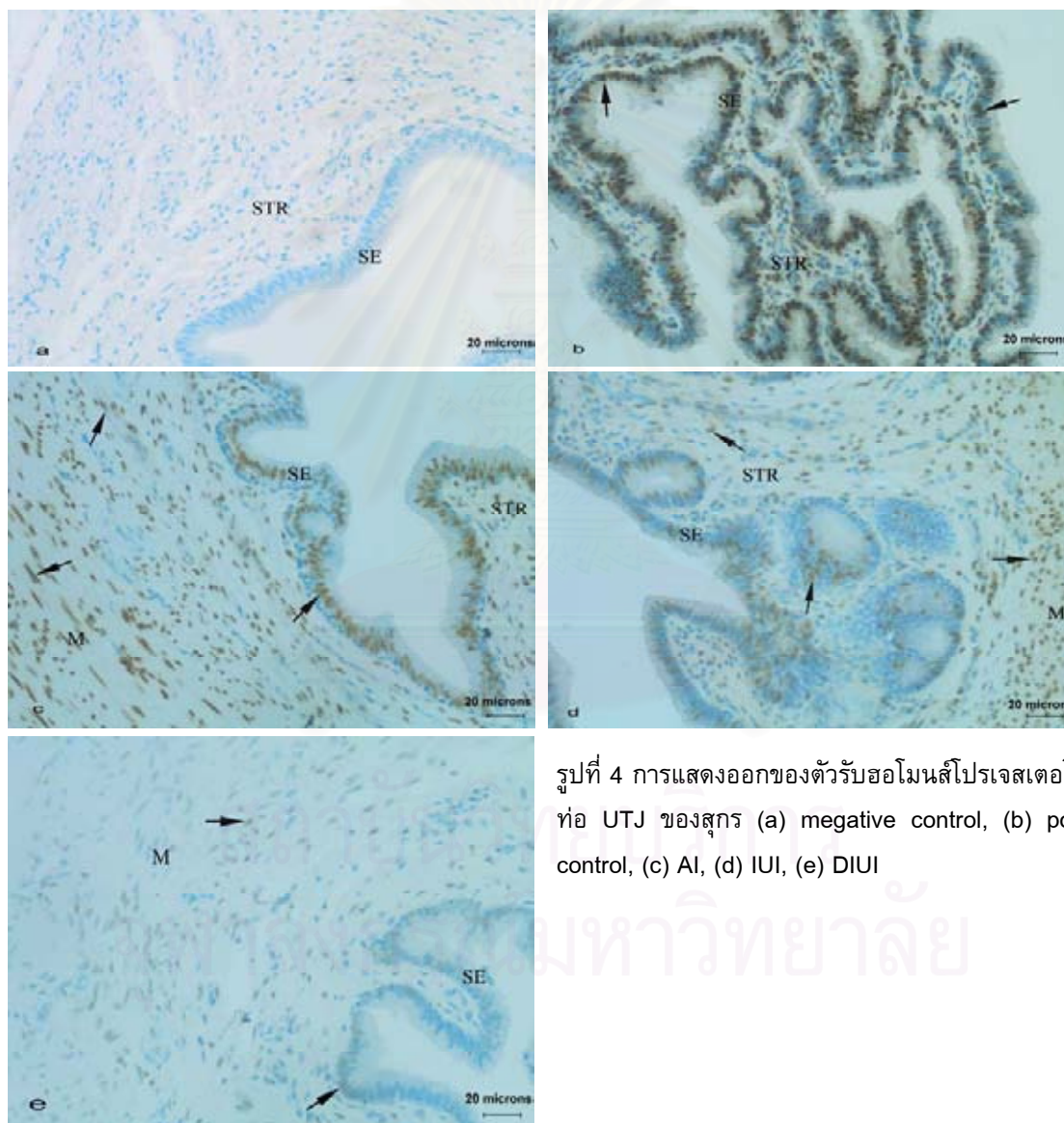
กลุ่ม	Surface epithelium	Stroma	Tunica muscularis
AI	1.8 ^a /2.7 ^A	1.6 ^a /1923 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
IUI	1.4 ^a /2.5 ^A	2.4 ^a /2370 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
DIUI	1.3 ^a /1.8 ^B	1.7 ^a /1475 ^A	2.2 ^b /3.7 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 ลักษณะการย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR) โดยการให้คะแนน (ความเข้ม/สัดส่วนของเซลล์ที่ติดสี) ในมดลูกแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบ AI, IUI และ DIUI

กลุ่ม	Surface epithelium	Superficial gland	Deep gland	Stroma	Myometrium
AI	1.6 ^a /2.7 ^A	1.4 ^a /2.4 ^A	1.4 ^a /2.4 ^A	1.8 ^a /1990 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
IUI	1.4 ^a /2.7 ^A	1.3 ^a /2.4 ^A	1.4 ^a /2.5 ^A	2.4 ^a /2370 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
DIUI	1.6 ^a /2.7 ^A	1.2 ^a /1.8 ^A	1.2 ^a /1.9 ^A	1.8 ^a /1933 ^A	2.2 ^b /3.8 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($P < 0.05$)



รูปที่ 4 การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในท่อ UTJ ของสุกร (a) negative control, (b) positive control, (c) AI, (d) IUI, (e) DIUI

บทที่ 5

การอภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

ปริมาณและตำแหน่งที่พบอสุจิใน sperm reservoir ในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

การผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI ซึ่งใช้จำนวนตัวอสุจิต่อโด้สจำนวนน้อยได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยให้สามารถใช้พ่อสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด และเพื่อเป็นการนำไปสู่การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเกี่ยวกับการผสมเทียมด้วยอสุจิที่มีความอ่อนแอ เช่น น้ำเชื้อแช่แข็ง และ อสุจิที่ผ่านการคัดแยกเพศ (Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2005; Sumransap et al., 2007) การศึกษาในครั้งนี้นับเป็นครั้งแรกที่ได้แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของตัวอสุจิใน UTJ ส่วนท้ายของ isthmus ส่วนต้นของ isthmus และส่วนแอมพูลล่า ของท่อนำไข่ในแม่สุกรหลังทำการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI ซึ่งใช้ปริมาณโด้สต่ำเปรียบเทียบกับวิธีการผสมเทียมด้วยวิธีปกติ การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้เทคนิคการตรวจทางจุลกายวิภาค ซึ่งเทคนิคนี้เคยมีการใช้ในสัตว์หลายชนิด เช่น แมว สุกร โค และแฮมสเตอร์ (Larsson and Larsson, 1985; Smith and Yanagimachi, 1990; Mburu et al., 1997; Chatdarong et al., 2004) การกระจายตัวของตัวอสุจิภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี AI IUI และ DIUI ที่พบในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ให้ผลตรงกับการศึกษาค้นคว้าก่อนๆ ซึ่งทำการศึกษาโดยการชะล้างตัวอสุจิจากท่อในระบบสืบพันธุ์ (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007) ผลจากการศึกษาพบว่า ในช่วงระยะเวลาหลังการตกไข่ การกระจายตัวของตัวอสุจิภายในช่องว่างและภายใน crypt ของแหล่งกักเก็บตัวอสุจิมีความใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอสุจิที่ประเมินโดยวิธีการชะล้างจะมีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง (Smith and Yanagimachi, 1990; Chatdarong et al., 2004) นอกจากนี้ ตัวอสุจิที่อยู่บริเวณตรงกลางของท่อในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิมักเป็นตัวอสุจิที่ตายแล้ว (Rodriguez-Martinez et al., 2005) จากการศึกษาในตัวสัตว์พบว่า ตัวอสุจิที่มีชีวิตส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณร่องที่อยู่ลึกๆ ในช่วงก่อนและขณะที่มีการตกไข่ซึ่งเป็นระยะที่มีการเป็นสตัยีนหนึ่ง และตัวอสุจิเหล่านี้จะยังไม่เกิดกระบวนการ capacitation จนกระทั่งจะมีการตกไข่ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่า จำนวนตัวอสุจิที่อยู่บริเวณ UTJ และส่วนท้ายของ isthmus ที่นับได้จากชิ้นเนื้อ (32 ชิ้น) มีความสัมพันธ์กันอย่างมากเมื่อเทียบกับการศึกษาค้นคว้าก่อนๆ ที่ใช้เทคนิคการชะล้างในการศึกษา

ในการศึกษาค้นคว้านี้สามารถยืนยันได้ว่า การผสมเทียมด้วยวิธี DIUI จะมีจำนวนตัวอสุจิที่พบได้ในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิภายหลังการผสมเทียม 24 ชั่วโมงน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการผสมเทียมด้วยวิธี AI และ IUI การศึกษาค้นคว้าก่อนๆ มีการแสดงให้เห็นว่า การผสมเทียมด้วยวิธี DIUI โดยลดจำนวนตัวอสุจิลง 20 เท่า ได้จำนวนลูกสุกรแรกคลอดต่อครอกน้อยกว่าวิธีการผสมเทียมปกติอย่างมีนัยสำคัญ (Vazquez et al., 2001; Martinez et al., 2006) จำนวนตัวอสุจิในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิที่น้อยนี้อาจอธิบายได้ถึงอัตราการผสมติดที่ต่ำภายหลังจากทำการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI ในการนำไปใช้จริงซึ่งได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Martinez et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อตัวอ่อนและไข่ถูกชะล้างออกในวันที่ 6 หลังจากผสมพันธุ์ แม่สุกรที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI จะพบการปฏิสนธิที่เกิดเพียงบางส่วนและเกิดเพียงข้างเดียวได้มากกว่าแม่สุกรที่ทำการผสมเทียมด้วยวิธีผสมเทียมปกติ (Martinez et al., 2006) การศึกษาค้นคว้านี้พบว่าอัตราการผสมติดที่ต่ำและการเกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียวภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI อาจเกิดจากมีการสร้างแหล่งกักเก็บตัวอสุจิเพียงข้างเดียวในแม่สุกรบางตัว Rodriguez-Martinez และคณะ (2005) พบว่าทั้งตัวอสุจิและน้ำเลี้ยงตัวอสุจิ (รวมทั้งส่วนประกอบโปรตีนในน้ำเลี้ยงตัวอสุจิ) เป็นสิ่งสำคัญในการสร้างแหล่งกักเก็บตัวอสุจิ จำนวนตัวอสุจิส่วนหนึ่งและโปรตีนบางส่วนในน้ำเลี้ยงตัวอสุจิที่ถูกส่งไปตามช่องว่างในมดลูกและรอดจากการถูกเก็บกินจะเข้าไปอยู่ในแหล่ง

กักเก็บตัวอสุจิ นอกจากนี้ ตัวอสุจิส่วนที่อยู่ใน 10 มิลลิลิตรแรกของน้ำเชื้อส่วนที่มีตัวอสุจิเข้มข้นจะสามารถไปอยู่ในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิได้มากกว่าตัวอสุจิที่อยู่ในน้ำเชื้อส่วนที่เหลือ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมในด้านเดียวด้วยจำนวนตัวอสุจิและน้ำเลี้ยงตัวอสุจิที่น้อยอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการสร้างแหล่งกักเก็บตัวอสุจิได้ทั้งสองข้าง ซึ่งจะทำให้อัตราการผสมติดต่ำและเกิดการปฏิสนธิเพียงด้านเดียวภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI

ในการศึกษาครั้งนี้ แม่สุกร 1 ตัวจาก 5 ตัวในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี DIUI มีตัวอสุจิอยู่ใน UTJ เพียงข้างเดียว ในขณะที่แม่สุกรตัวอื่นในกลุ่มมีตัวอสุจิทั้งสองข้างของ UTJ ผลการศึกษานี้พบว่าไม่สอดคล้องกับผลจากการศึกษาในครั้งก่อน (Tummaruk et al., 2007) ซึ่งบ่งชี้ว่าตัวอสุจิบางตัวมีการซ่อนอยู่ใน crypt ของแหล่งกักเก็บตัวอสุจิในขณะที่มีการตกไข่ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้จากวิธีการชะล้าง (Chatdarong et al., 2004) การศึกษาก่อนหน้านี้เคยแสดงให้เห็นแล้วว่า การเกิดการปฏิสนธิเพียงข้างเดียว และการปฏิสนธิเพียงบางส่วน สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากการผสมด้วยวิธี AI หรือ DIUI (Hunter, 1967; Waberski et al., 1994; Soede et al., 1995; Martinez et al., 2006) สาเหตุที่คาดว่าจะทำให้เกิดการปฏิสนธิเพียงด้านเดียว และการปฏิสนธิเพียงบางส่วน อาจเกิดจากระยะเวลาตั้งแต่ผสมจนกระทั่งตกไข่ที่ใช้เวลานาน จำนวนตัวอสุจิต่อครั้งที่ผสมน้อย และปัจจัยจากแม่สุกรเอง (Waberski et al., 1994; Soede et al., 1995; Martinez et al., 2006) Martinez และคณะ (2006) เสนอแนะว่า ถ้าจำนวนตัวอสุจิเพิ่มขึ้นจาก 150 ล้านตัวต่อโด้สเป็น 600 ล้านตัวต่อโด้สจะไม่พบการปฏิสนธิเพียงด้านเดียว สำหรับการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI Martinez และคณะ (2005) ศึกษาพบว่าจำนวนตัวอ่อนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการผสมเทียมด้วยตัวอสุจิ 250 ล้านตัว จำนวนตัวอสุจิต่อโด้สที่แนะนำให้ใช้ในการผสมเทียมด้วยวิธี IUI คือ 500 ล้านตัว (Mezalira et al., 2005) Bennemann และคณะ (2004) แสดงให้เห็นว่าจำนวนตัวอ่อนทั้งหมดที่ 32 วันหลังผสมเทียมด้วยวิธี IUI จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อระยะห่างตั้งแต่ผสมเทียมถึงตกไข่มากเกิน 24 ชั่วโมง แม้ว่าอัตราการผสมติดจะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า จำนวนอสุจิต่อโด้สในการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI ควรเพิ่มขึ้น และช่วงเวลาตั้งแต่ผสมถึงตกไข่ควรมีความเหมาะสมเพื่อชดเชยผลกระทบจากปัจจัยอื่น เช่น ปัจจัยจากแม่สุกร เพื่อให้มีจำนวนตัวอสุจิที่แหล่งกักเก็บตัวอสุจิเพียงพอเมื่อเกิดการตกไข่ ถ้าปัจจัยต่างๆ นี้มีความเหมาะสมแล้ว การสร้างแหล่งกักเก็บตัวอสุจิทั้งสองข้างภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI อาจเกิดขึ้น อย่างน้อยก็อาจเกิดในแม่สุกรบางตัว

เทคนิคการผสมเทียมด้วยวิธี IUI ในสุกรมีรายงานครั้งแรกในปี 2002 (Watson and Behan, 2002) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงเทคนิคในการผสมเทียมสุกรด้วยการลดจำนวนตัวอสุจิต่อโด้ส แม้ว่าเทคนิคการผสมแบบ IUI มีการนำมาใช้ในฟาร์มแล้วก็ตาม แต่หลายคนยังไม่มั่นใจในการลดจำนวนอสุจิต่อโด้ส ในบางกรณีอาจพบจำนวนลูกสุกรแรกเกิดทั้งหมดต่อครอกลดลงภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยใช้จำนวนตัวอสุจิน้อยกว่า 1,000 ล้านตัวต่อโด้ส (Rozeboom et al., 2004; Roberts and Bilkei, 2005) ถ้าผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยใช้ตัวอสุจิ 1,000 ล้านตัวต่อโด้สทำให้ขนาดครอกเมื่อคลอดลดลงแล้ว อาจคาดได้ว่าเกิดจากการปฏิสนธิเพียงบางส่วน อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าจำนวนตัวอสุจิใน crypt ของ UTJ และส่วนท้ายของ isthmus ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI และวิธี AI ปกติ ซึ่งให้ผลไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งเก็บตัวอสุจิที่อยู่ตรงกลางของท่อโดยวิธีการชะล้าง (Sumransap et al., 2007) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า จำนวนตัวอสุจิใน crypt ของ UTJ ในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI จะมีน้อยกว่ากลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI ประมาณ 3 เท่า UTJ เป็นด่านกั้นทางกายภาพชั้นแรกในท่อนำไข่ที่จะยอมให้ตัวอสุจิจำนวนจำกัดผ่านเข้าไปยังจุดที่จะเกิดการปฏิสนธิได้ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) ในช่วงก่อนระยะเวลาดังกล่าว ตัวอสุจิส่วนใหญ่จะอยู่ในชอกส่วนลึกของแหล่งกักเก็บตัวอสุจิ การชะล้างจะนำตัวอสุจิออกมาได้ยากเนื่องจากช่องว่างของท่อที่ปิดและเมือกที่พบภายในท่อ (Tienthai et al., 2004) ตัวอสุจิจะกลับมาอยู่ในท่อนำไข่อีกครั้งภายหลังจากไข่ตก (Mburu et al., 1996)

Sumransap และคณะ (2007) พบว่าตัวอสุจิส่วนใหญ่ (ประมาณ 47%) ที่รอดชีวิตในทางเดินระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียจะพบที่ UTJ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอสุจิที่อยู่ใน UTJ มีจำนวนน้อยกว่าประมาณ 3 เท่าในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยลดจำนวนตัวอสุจิต่อโด๊ส 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี AI ปกติ ซึ่งผลการศึกษาที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ในการศึกษาครั้งก่อนๆ พบว่า จำนวนตัวอสุจิที่อยู่ใน UTJ ที่ได้จากวิธีการชะล้างในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ AI มีความใกล้เคียงกัน (Sumransap et al., 2007) และจำนวนตัวอสุจิใน isthmus ของกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ AI ก็มีความใกล้เคียงกัน ซึ่งผลเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Sumransap et al., 2007) จากผลการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ได้ว่า ถ้าท่อนำไข่ทำงานเป็นปกติแล้ว การผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยลดจำนวนตัวอสุจิลง 3 เท่าน่าจะไม่มีผลกระทบต่ออัตราการผสมติดและขนาดครอก

โดยสรุป การผสมเทียมด้วยวิธี IUI โดยการลดจำนวนตัวอสุจิลง 3 เท่ามีแนวโน้มที่จะมีจำนวนตัวอสุจิที่อยู่บริเวณ crypt ของ UTJ น้อยลง แต่ไม่มีผลในบริเวณส่วนท้ายของ isthmus ซึ่งอาจไม่มีผลรบกวนกระบวนการปฏิสนธิเนื่องจากตัวอสุจิในบริเวณที่จะเกิดการปฏิสนธิมีจำนวนเพียงพอ ในการผสมเทียมเพียงครั้งเดียว การผสมเทียมด้วยวิธี DIUI โดยใช้จำนวนตัวอสุจิต่อโด๊สลดลง 20 เท่าอาจทำให้จำนวนตัวอสุจิที่อยู่ใน crypt ของแหล่งกักเก็บตัวอสุจีก่อนเกิดการปฏิสนธิน้อย ตัวอสุจิสามารถพบได้ในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิทั้งสองข้างภายหลังการผสมเทียมด้วยวิธี AI และ IUI แต่การผสมเทียมด้วยวิธี DIUI พบได้ในแม่สุกรเพียง 1 ตัวจาก 5 ตัว

การกระจายตัวของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันในท่อนำไข่

ในการศึกษาครั้งนี้ ลิ้มโพไซค์เป็นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันหลักที่พบได้ในสุกรทุกกลุ่มหลังการผสมเทียมประมาณ 24 ชั่วโมง ในขณะที่นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจพบได้น้อยในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิ ลักษณะการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในมดลูกแม่สุกรใกล้เคียงกับช่วงแรกของระยะ dioestrus (ประมาณ 70 ชั่วโมงหลังตกไข่) (Kaeoket et al., 2003) นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจซึ่งพบได้น้อยบ่งชี้ว่า การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะหรือการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมในแหล่งกักเก็บตัวอสุจิถูกจำกัด โดยทั่วไป จำนวนตัวอสุจิที่ใช้ในการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI จะน้อยกว่าการผสมเทียมด้วยวิธีปกติ 3 และ 20 เท่า (Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007) จากการศึกษาครั้งหนึ่งบ่งชี้ได้ว่า การลดจำนวนตัวอสุจิที่ใช้ในการทำ IUI และ DIUI ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิ้มโพไซค์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจในตำแหน่ง UTJ และส่วนท้ายของ isthmus แตกต่างจากกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยวิธีปกติ (AI) การศึกษานี้พบว่า การผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI สามารถนำมาใช้ในการผสมเทียมสุกรได้โดยปราศจากผลกระทบเกี่ยวกับการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในแหล่งกักเก็บตัวอสุจีก่อนเกิดการปฏิสนธิ

โดยสรุป การศึกษานี้สามารถพิสูจน์ได้ว่าการผสมเทียมด้วยวิธี IUI และ DIUI ซึ่งเป็นวิธีใหม่ในการผสมเทียมสุกรไม่มีผลกระทบต่อแทรกตัวของเซลล์ลิ้มโพไซค์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจในชั้นเยื่อมดลูกที่แหล่งกักเก็บตัวอสุจีก่อนเกิดการปฏิสนธิ

การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในท่อนำไข่

การศึกษานี้แสดงให้เห็นการแสดงออกของ PR หลังการผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ในสุกรเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผสมเทียมแบบปกติ เป็นครั้งแรก การผสมเทียมแบบ IUI และ DIUI ในสุกรเป็นการผสมเทียมแบบใหม่ ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการแสดงออกของ PR มาก่อน เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของมดลูกทั้งในวงจรการเป็นสัดปกติของสุกรและภายหลังการปฏิสนธิ การ

แสดงออกของ PR ที่บริเวณมดลูกเคยมีรายงานแล้วทั้งในสุกรและในสัตว์ชนิดอื่นๆ (Hartt et al., 2005; Peralta et al., 2005; Sukjumlong et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มของการติดสีและสัดส่วนของเซลล์ที่ติดสีค่อนข้างสูงในช่วง 24 ชั่วโมงหลังตกไข่ สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในสุกรปกติ (Sukjumlong et al., 2005) ก่อนหน้านี้เคยมีการศึกษาบ่งชี้ว่าการแสดงออกของ PR ในมดลูกของสุกรจะสูงระหว่าง 5-70 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม (Sukjumlong et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่ม DIUI พบการแสดงออกของ PR ต่ำกว่ากลุ่ม AI ปกติในบางส่วนของท่อไข่ สาเหตุอาจเกิดจากจำนวนอสุจิที่ใช้ในการผสมเทียมในกลุ่ม DIUI ต่ำกว่ากลุ่ม AI 20 เท่าตัว เคยมีการศึกษาพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ PR สูงขึ้น (Sukjumlong et al., 2005) เนื่องจากน้ำเชื้อพ่อสุกรมีฮอร์โมนเอสโตรเจน การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อปริมาณน้อยจึงทำให้การแสดงออกของ PR ต่ำลง อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ PR ในกลุ่ม IUI ไม่แตกต่างจากกลุ่ม AI

โดยสรุปการผสมเทียมด้วยวิธี DIUI โดยใช้น้ำเชื้อลดต่ำลง 20 เท่าตัว ทำให้การแสดงออกของ PR ในบางส่วนของท่อไข่ลดต่ำลง ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อกระบวนการขนส่งอสุจิและการปฏิสนธิได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Almond G, 1998: The swine AI book: A field and laboratory technicians' guide to artificial insemination in swine. second edition. p. 176.
- Bathgate R, Eriksson B, Maxwell WM, Evans G, 2003: Low dose deep intrauterine insemination of sows with fresh and frozen-thawed spermatozoa. In: 5th International Conference on Boar semen Preservation Doorwerth, Netherland.
- Belstra BA, 2002: Review: Intrauterine (intra cervical) and fixed time artificial insemination in swine. Department of animal science, colleague of agriculture and life science, North Carolina State University, North Carolina.
- Bennemann PE, Milbradt E, Diehl GN, Weber D, Schmidt ACT, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, 2004: Reproductive performance of sows submitted to intra uterine insemination at different pre-ovulatory intervals. *Anim. Reprod.* 1 106-110.
- Bischof RJ, Lee C-S, Brandon MR, Meeusen E, 1994: Inflammatory response in the pig uterus induce by seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 26 131-146.
- Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C, 2004: Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Therigenology.* 62 1027-1041.
- Dalin A-M, Gidlund K, Eliasson-Selling L, 1997: Post-mortem examination of genital organs from sows with reproductive disturbances in a sow-pool. *Acta Vet Scand.* 38 253-262.
- Dalin A-M, Kaeoket K, Persson E, 2004: Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83 401-413.
- Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Bernardi ML, Bortolozzo FP, 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.
- Engelhardt H, Croy BA, King GJ, 1997: Role of uterine immune cells in early pregnancy. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 52 115-131.
- Flowers WL Esbenshade KL, 1993: Optimizing management of natural and artificial mating in swine. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 48 217-228.
- Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. 2005: Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mare. *Reproduction.* 130 241-250.
- Hunter RH, 1990: Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 40 211-226.
- Hunter RHF, 1967: The effect of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *J Reprod Fertil* 13 133-147.
- Jiwakanon J, Persson E, Dalin A-M, 2006: The influence of pre- and post ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cell of the immune system in the sow oviduct. *Reprod. Dom. Anim.* 41 455-466.

- Jiwakanon J, Persson E, Kaeoket K, Dalin A-M, 2005: The sow endosalpinx at different stages of the oestrus cycle and at anoestrus: Studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Reprod. Dom. Anim.* 40 28-39.
- Kaeoket K, Persson E, Dalin A-M 2002: The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim Reprod Sci.* 73 89-107.
- Kaeoket K, Persson E, Dalin A-M, 2003: Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim. Reprod. Sci.* 75 55-71.
- Krueger C, Rath D, 2000: Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod. Fertil. Dev.* 17 113-117.
- Krueger C, Rath D, Johnson LA, 1999: Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology.* 52 1363-1373.
- Larsson B, Larsson K, 1985: Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. *Acta Vet Scand* 26 385–395.
- Lovell JE, Getty R, 1968: Fate of semen in the uterus of the sow: Histological study of endometrium during the 27 hours after natural services. *Am. J.Vet. Res.* 29 609-625.
- Martinez EA, Vasquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, 2002: Minimum sperm number for normal fertility after deep intrauterine insemination in sedated sows. *Reproduction.* 123 167-170.
- Martinez EA, Vasquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vasquez JL, 2006: Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reprod Dom Anim* 41 41–47.
- Martinez EA, Vasquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vasquez JL, Day BN, 2001: Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reprod.* 122 289-296.
- Matthijs A., Engel B., Woelders H. 2003: Neutrophil recruitment and phagocytosis 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 JN, Einarsson S, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1996: Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 45 109-121.
- Mburu JN, Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, 1997: Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim Reprod Sci* 47 137–148.
- Mezalira A, Dallanora D, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, 2005: Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reprod Dom Anim* 40 1–5.
- Nissen AK, Soede NM, Hyttel P, Schmidt M, D'Hoore L 1997: The influence of time of insemination in relation to time of ovulation on farrowing rate and litter size in sows, investigated by ultrasonography. *Theriogenology* 47 1571-1583.

- Peralta LE, Roldán Olarte M, Arganaraz M, Ciocca D, Miceli DC. 2005: Progesterone receptors: their localization, binding activity and expression in the pig oviduct during follicular and luteal phases. *Dom. Anim. Edocrinol.* 28 74-84.
- Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA, 1978: Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after insemination. *Biol. Reprod.* 19 69-76.
- Rigby JP. 1966: The persistence of spermatozoa at the utero-tubal junction of the sow. *J. Reprod. Ferti.* 11 153-155.
- Roberts PK, Bilkei G, 2005: Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sow. *Reprod Dom Anim* 40 489-491.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA 2003: Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 60 77-87.
- Roca J., Vazquez, JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Dom Anim* 41 (Suppl. 2), 43-53.
- Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ, 2005: Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology.* 63 514-535.
- Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A, 2001: Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl* 58 129-145.
- Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME, 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.
- Rozeboom KJ, Rocha-Chavez G, Troedsson MHT, 2001: Inhibition of neutrophils chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. *Reproduction* 121 576-572.
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Crabo BG, 1998: Characterisation of the post-mating uterine inflammatory response in the gilt. *J. Reprod. Fert.* 114 195-199.
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG 2000: The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J. Anim. Sci.* 78 443-448.
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Molitor TW, Crabo BG 1999: The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J. Anim. Sci.* 77 2201-2206.
- SAS Institute Inc., 1996: SAS User's Guide. Statistics version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Singleton WL, 2001: State of the art in artificial insemination in the United States. *Theriogenology.* 56 1305-1310.
- Smith TT, Yanagimachi R, 1990: The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* 42 450-457.
- Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, de Koning MAI, Kemp B, 1995: Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilisation rate and accessory spermatozoa count in sows. *J. Reprod. Fert.* 104 99-106.

- Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B, 1998: Semen backflow after insemination and its effect on fertilization in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 54 109-119.
- Sukjumlong S, Dalin AM, Sahlin L, Persson E, 2005: Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction* 129: 349-359.
- Sumransap P, Tummaruk P, Kunavongkrit A, 2007: Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reprod Dom Anim* 42 113-117.
- Tienthai P, Yokoo M, Kimura N, Heldin P, Sato E, Rodriguez-Martinez H. 2003. Immunohistochemical localization and expression of the hyaluronan receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. *Reproduction.* 125 119-132.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2004: Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Theriogenology.* 80 131-146.
- Tummaruk P, Lundeheim N, Einarsson S, Dalin A-M, 2000: Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II. Influence of mating type, weaning-to-first-service interval and lactation length. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 50 217-224.
- Tummaruk P, Sumransap P, Techakumphu M, Kunavongkrit A, 2007: Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intra uterine insemination in the pig. *Reprod. Dom. Anim.* 42 603-609.
- Vasquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vasquez JL, 2003: Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* 59 1605-1614.
- Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Lucas X, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Day BN, 2001: Deep intrauterine insemination in natural post-weaning oestrus sows. 6th International Conference on Pig Reproduction, Columbia, Missouri, USA, 132 pp.
- Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL, 2005: Improving the efficacy of sperm technologies in pig: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 63 536-547.
- Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwarz M, Willen T, Petzoldt R, 1994: Effects of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology* 42 831-840.
- Watson PF, Behan JR, 2002: Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of commercially based trial. *Theriogenology* 57 1683–1693.
- Woelders H, Matthijs JJ. 2001. Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo. *Reproduction Supplement* 58 113–127.
- Wongtawan T, 2004: Fertility after deep intra-uterine AI of concentrated low-volume boar semen dose. MSc. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

ภาคผนวก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number of Spermatozoa in the Crypts of the Sperm Reservoir at About 24 h After a Low-Dose Intrauterine and Deep Intrauterine Insemination in Sows

P Tummaruk¹ and P Tienthai²

Departments of ¹Obstetrics, Gynaecology and Reproduction; and ²Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Contents

The aim of this study was to investigate the number of spermatozoa in the crypts of the utero-tubal junction (UTJ) and the oviduct of sows approximately 24 h after intrauterine insemination (IUI) and deep intrauterine insemination (DIUI) and compared with that of conventional artificial insemination (AI). Fifteen crossbred Landrace × Yorkshire (LY) multiparous sows were used in the experiment. Transrectal ultrasonography was performed every 4 h to examine the time of ovulation in relation to oestrous behaviour. The sows were inseminated with a single dose of diluted fresh semen by the AI (n = 5), IUI (n = 5) and DIUI (n = 5) at approximately 6–8 h prior to the expected time of ovulation, during the second oestrus after weaning. The sperm dose contained 3000×10^6 spermatozoa in 100 ml for AI, $1,000 \times 10^6$ spermatozoa in 50 ml for IUI and 150×10^6 spermatozoa in 5 ml for DIUI. The sows were anaesthetized and ovario-hysterectomized approximately 24 h after insemination. The oviducts and the proximal part of the uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tracts were collected. The section was divided into four parts, i.e. UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus and ampulla. The spermatozoa in the lumen in each part were flushed several times with phosphate buffer solution. After flushing, the UTJ and all parts of the oviducts were immersed in a 10% neutral buffered formalin solution. The UTJ and each part of the oviducts were cut into four equal parts and embedded in a paraffin block. The tissue sections were transversely sectioned to a thickness of 5 µm. Every fifth serial section was mounted and stained with haematoxylin and eosin. The total number of spermatozoa from 32 sections in each parts of the tissue (16 sections from the left side and 16 sections from the right side) was determined under light microscope. The results reveal that most of the spermatozoa in the histological section were located in groups in the epithelial crypts. The means of the total number of spermatozoa in the sperm reservoir (UTJ and caudal isthmus) were 2296, 729 and 22 cells in AI, IUI and DIUI groups, respectively ($p < 0.01$). The spermatozoa were found on both sides of the sperm reservoir in all sows in the AI and the IUI groups. For the DIUI group, spermatozoa were not found on any side of the sperm reservoir in three out of five sows, found in unilateral side of the sperm reservoir in one sow and found in both sides of the sperm reservoir in one sow. No spermatozoa were found in the cranial isthmus, while only one spermatozoon was found in the ampulla part of a sow in the IUI group. In conclusion, DIUI resulted in a significantly lower number of spermatozoa in the sperm reservoir approximately 24 h after insemination compared with AI and IUI. Spermatozoa could be obtained from both sides of the sperm reservoir after AI and IUI but in one out of five sows inseminated by DIUI.

Introduction

Recently, new procedures for artificial insemination (AI) in pigs such as intrauterine insemination (IUI) and deep

intrauterine insemination (DIUI) have been established (Martinez et al. 2002; Watson and Behan 2002; Sumransap et al. 2007; Tummaruk et al. 2007). The procedures consist of a specially designed catheter that can be passed through the cervix allowing the deposition of sperm into the uterine body (in the case of IUI) or the proximal third of the uterine horn (in the case of DIUI). Using these techniques, the number of spermatozoa per dose can be reduced to one billion spermatozoa for IUI (Watson and Behan 2002) and 150 million spermatozoa for DIUI (Martinez et al. 2002). It has been demonstrated that the IUI technique with a three-time reduction in sperm numbers per dose results in the same conception rate and litter size, under farm conditions when compared with conventional AI (Watson and Behan 2002). However, Rozeboom et al. (2004) found that IUI with $\leq 1 \times 10^9$ spermatozoa per dose resulted in a smaller litter size compared with conventional AI with 4×10^9 spermatozoa per dose. Sperm distribution within the female reproductive tract following conventional AI is well established in pigs (Hunter 1981; Mburu et al. 1996; Langendijk et al. 2002; Rodriguez-Martinez et al. 2005). Yet, only a few studies on the distribution of spermatozoa in the female reproductive tract for both IUI and DIUI have been conducted (Sumransap et al. 2007; Tummaruk et al. 2007). Using a low number of spermatozoa per dose, DIUI results in a significantly lower number of spermatozoa in the female reproductive tract at 24 h after insemination (Tummaruk et al. 2007), while the spermatozoa flushed from the utero-tubal junction (UTJ) and oviducts do not differ significantly between IUI and conventional AI (Sumransap et al. 2007). Furthermore, the spermatozoa could be obtained from only one side of the reproductive tracts after DIUI and therefore a unilateral colonization of spermatozoa in the sperm reservoir was suspected (Tummaruk et al. 2007). On the other hand, it was demonstrated that four- to eight-cell embryos were found in both sides of the reproductive tract at 48 h after DIUI in other groups of sows (Tummaruk et al. 2007). In cats, it has been reported that the number of spermatozoa in the crypts of the sperm reservoir after mating was found to be greater than in the lumen (Chatdarong et al. 2004). The number of spermatozoa in the crypts of the sperm reservoir after IUI and DIUI in pigs with a reduced number of spermatozoa has not been reported. The present study was performed to investigate the number of spermatozoa in the UTJ and each part of the oviducts of sows approximately 24 h after IUI or DIUI and compared with that of conventional AI.

Materials and Methods

Animals and the detection of oestrus and ovulation

Fifteen crossbred Landrace × Yorkshire (LY) multiparous sows were used in the experiment. On the day of weaning, they were brought from commercial farms to the Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and were allocated to individual pens adjacent to adult boars. The sows were fed 3 kg/day (twice a day) with a commercial feed (Starfeed176®; BP Feed Co. Ltd, Saraburi, Thailand) containing 15% protein, 2% fat and 10% fibre. Water was provided *ad libitum*. The sows were observed for pro-oestrus twice a day (a.m./p.m.). The sows were randomly assigned to three groups according to ear tag, i.e. AI (n = 5), IUI (n = 5) and DIUI (n = 5) groups. The sows were examined for the onset of standing oestrus every 6 h using a back pressure test in the presence of a mature boar. Transrectal ultrasonography (Echo camera SSD-550; Aloka Co. Ltd, Tokyo, Japan) was performed in all sows every 4 h, starting from approximately 10 to 12 h after the onset of oestrus, using a 5 MHz probe to examine the time of ovulation (Tummaruk et al. 2007).

The collection and dilution of semen and insemination

The semen was collected from an adult Duroc boar with proven fertility. Semen with a motility of ≥70%, a concentration of ≥150 spermatozoa/ml and sperm with normal morphology ≥85%, was diluted, using a Beltsville thawing solution diluent (BTS, Minitüb; Abfüllund Labortechnik GmbH & Co. KG, Tiefenbach, Germany). The sperm dose contained 3000×10^6 spermatozoa in 100 ml for conventional AI, 1000×10^6 spermatozoa in 50 ml for IUI (Deep goldenpig™ catheter; IMV Technologies, L'Aigle, France) and 150×10^6 spermatozoa in 5 ml for DIUI (Martinez et al., 2002). The sows were inseminated with a single dose of the diluted semen during the second oestrus after weaning. The time of ovulation during the first oestrus was used to determine the timing of insemination, which was carried out at 6–8 h prior to the expected time of ovulation. The sows were inseminated by conventional AI, IUI and DIUI techniques. The DIUI technique was modified after Martinez et al. (2000). Intrauterine insemination and DIUI techniques have been described by Sumransap et al. (2007) and Tummaruk et al. (2007).

Sampling procedures

The sows were anaesthetized at 25.2 ± 1.6 h after insemination (Table 1). General anaesthesia was induced by i.m. injection of 2 mg/kg azaperone (Stressnil®; Janssen Animal Health, Beerse, Belgium), and 30 min later, 10 mg/kg of thiopental sodium was given intravenously. Ovario-hysterectomy was performed by laparotomy. The reproductive organs were removed and immediately transferred to the laboratory. The number of corpus haemorrhagicum was counted and regarded as the number of ovulations. The total length of the uterine horn was measured. The oviducts and the proximal part

Table 1. Reproductive parameters of sows inseminated by conventional AI, IUI and DIUI

Parameters	Groups			p-value
	AI	IUI	DIUI	
Parity	9.0 ± 1.4	6.0 ± 3.2	6.8 ± 1.9	0.42
Body weight (kg)	198 ± 50	208 ± 34	234 ± 19	0.40
First oestrus				
Weaning-to-oestrus (days)	5.2 ± 1.6	4.2 ± 0.8	5.3 ± 1.5	0.42
Oestrus-to-ovulation (h)	34.2 ± 9.3	38.0 ± 12.1	43.5 ± 12.6	0.46
Oestrus duration (h)	55.1 ± 22.5	53.0 ± 11.7	60.0 ± 12.2	0.80
Second oestrus				
Insemination to ovario-hysterectomy (h)	24.6 ± 0.8	26.1 ± 1.6	24.8 ± 1.9	0.27
Number of ovulation	15.3 ± 2.1	17.7 ± 1.5	17.2 ± 1.6	0.19
Length of uterine horns (cm)	248 ± 33	263 ± 28	256 ± 44	0.85

AI, artificial insemination; IUI, intra-uterine insemination; DIUI, deep intra-uterine insemination.

of uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tract were collected. The section was divided into four parts, i.e. UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus and ampulla (Tummaruk et al. 2007). The lumen of each segment was flushed with phosphate buffer solution several times. The numbers of spermatozoa obtained via the flushing technique have been reported previously (Sumransap et al. 2007; Tummaruk et al. 2007). After flushing, the UTJ and all parts of the oviducts were immersed in a 10% neutral buffered formalin solution for further processing.

Tissue sections

The UTJ and each part of the oviducts were cut into four equal parts and embedded in a paraffin block. The tissue sections were transversely sectioned to a thickness of 5 µm. Every fifth serial section was mounted and stained with haematoxylin and eosin. The number of spermatozoa in defined sections was determined under light microscope with a magnification of 200–400×. The defined sections represent the total number of spermatozoa from 32 sections in each part of the tissue (16 sections from the left and 16 sections from the right sides).

Statistical analysis

Data were analysed using SAS software (SAS Institute Inc 1996). Descriptive statistics including the mean and the standard deviations (SD) of all parameters were calculated. Parameters including parity number, body weight, weaning-to-oestrus interval, oestrus-to-ovulation interval, oestrus duration, insemination-to-ovario-hysterectomy interval, number of ovulations and length of the uterine horns were compared among groups using a one-way ANOVA. The number of spermatozoa in the UTJ and each part of the oviducts was presented as the means of the groups and the range of the means of each sow. The normality of the data was tested using residual plot under the UNIVARIATE procedure of SAS. Skewness, kurtosis and Shapiro–Wilk statistical methods were used to evaluate the normality of the data. As a result of the skew of the data, a natural log

transformation was applied to the number of spermatozoa before being included in the statistical models. The numbers of spermatozoa (log transformation) in each part of the reproductive tract were compared among groups using a general linear model procedure. Least-squared means were obtained from each group and were compared using Tukey–Kramer adjustment for multiple comparison. Differences with $p < 0.05$ were regarded as having statistical significance.

Results

Reproductive parameters including weaning-to-oestrus interval, oestrus-to-ovulation interval, oestrus duration, number of ovulation and length of the uterine horns are presented in Table 1. All of these parameters display no significant differences between groups (Table 1). The interval from insemination to ovario-hysterectomy operation varied from 24.6 to 26.1 h among groups ($p > 0.05$).

Most of the spermatozoa in the histological section were located in groups in the epithelial crypts (Fig. 1).

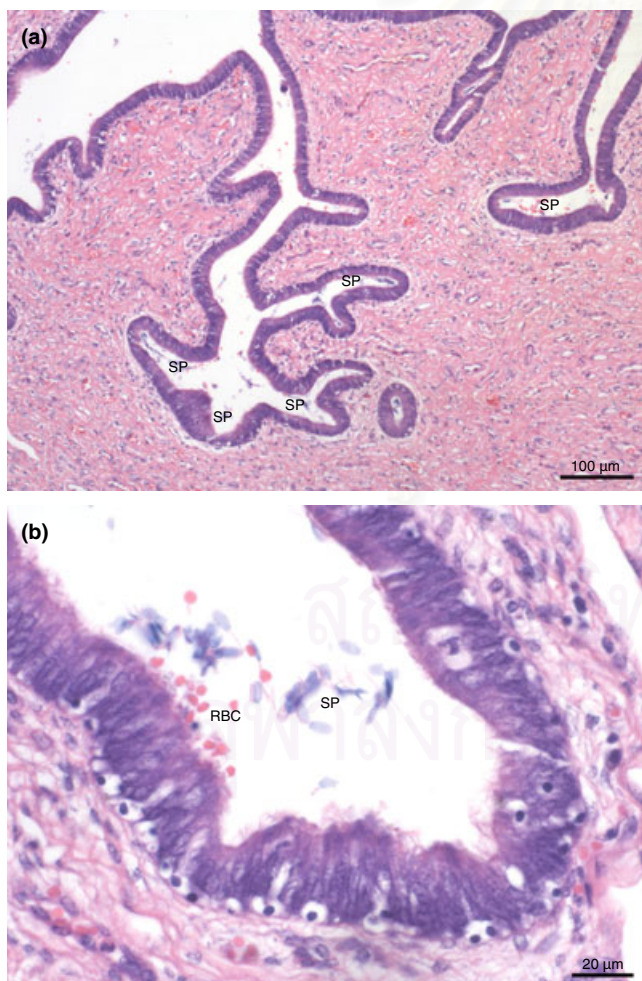


Fig. 1. Distribution of spermatozoa in epithelial crypts of the uterotubal junction of a sow approximately 24 h after insemination. SP, spermatozoa; RBC, red blood cell; E, epithelium; S, subepithelium (a) 100 \times magnification (b) 400 \times magnification. Haematoxylin and eosin stained

The numbers of spermatozoa in the tissue sections are presented in Table 2. The means of the total number of spermatozoa in defined sections of the sperm reservoir (UTJ and caudal isthmus) were 2296, 729 and 22 cells in AI, IUI and DIUI groups respectively ($p < 0.05$). The number of spermatozoa in the defined sections of the sperm reservoir varied between sows from 36 to 3927 cells in the AI group, 141–2260 cells in the IUI group and 0–56 cells in the DIUI group (Table 1). No spermatozoa were found in the cranial isthmus in any sows, while only one spermatozoon was found in the ampulla part of a sow in the IUI group.

Spermatozoa were found on both sides of the sperm reservoir in all sows in the AI and the IUI groups. For the DIUI group, no spermatozoa were found in the UTJ and all parts of the oviducts in three out of five sows, but spermatozoa were found on the unilateral side of the UTJ in one sow and found on both sides of the UTJ in one sow.

The estimated number of spermatozoa hiding in the crypts of the UTJ and the caudal isthmus per area (32 section \times 5 microns = 160 microns) could be calculated. As for instance, in the UTJ after AI, it was $2276/160 = 14.2$ spermatozoa per micron or 142 000 spermatozoa/cm of the UTJ.

Discussion

Intrauterine insemination and DIUI techniques using a low sperm number per dose of insemination are developed to maximize the use of superior boar sperm and to apply for some new sperm technology, such as frozen-thawed semen and sex-sorted sperm (Roca et al. 2003; Vazquez et al. 2005; Sumransap et al. 2007). The present study is the first to demonstrate the distribution of spermatozoa in the UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus and ampulla parts of the oviduct in sows after low-dose IUI and DIUI compared with conventional AI by using the histological examination technique. This technique has been performed on many species such as cats, pigs, heifers and hamsters (Larsson and Larsson 1985; Smith and Yanagimachi 1990; Mburu et al. 1997; Chatdarong et al. 2004). The distribution of spermatozoa after AI, IUI and DIUI observed in the present study is in agreement with our previous findings, in which spermatozoa were flushed from the lumen of the reproductive tract (Sumransap et al. 2007; Tummaruk et al. 2007). This indicated that during the post-ovulation period, the distribution of spermatozoa in the lumen and in the crypts of the sperm reservoir is quite

Table 2. Mean number of spermatozoa (cells) and range in the UTJ and the caudal isthmus of sows approximately 24 h after conventional AI, IUI and DIUI

Group	n	UTJ	Caudal isthmus	Total
AI	5	2276 ^a (36–3829)	20 ^a (0–98)	2296 ^a (36–3927)
IUI	5	716 ^a (141–2260)	13 ^a (0–59)	729 ^a (141–2260)
DIUI	5	22 ^b (0–56)	0 ^a	22 ^b (0–56)

UTJ, utero-tubal junction; AI, artificial insemination; IUI, intrauterine insemination; DIUI, deep intra uterine insemination.

Values with similar superscript letters within a column do not differ significantly ($p > 0.05$).

similar. However, it was suggested that the sperm number estimated by a flushing technique was likely to be an under estimate (Smith and Yanagimachi 1990; Chatdarong et al. 2004). Furthermore, the spermatozoa localized in the central lumen of the sperm reservoir are likely to be dead spermatozoa (Rodriguez-Martinez et al. 2005). For *in vivo* study, most of the viable spermatozoa are usually harboured in deep furrows in the pre- and peri-ovulatory period during standing oestrus and these spermatozoa remained uncapacitated until ovulation took place (Rodriguez-Martinez et al. 2005). In the present study, the number of spermatozoa in defined section (32 sections) hiding in the crypts of the UTJ and the caudal isthmus was relatively high compared with earlier reports when flushing technique had been used.

In the present study, it is confirmed that DIUI resulted in a significantly lower number of spermatozoa in the sperm reservoir approximately 24 h after insemination compared with AI and IUI. Earlier studies have shown that DIUI with a 20-fold reduction in number of spermatozoa resulted in a significantly lower litter size compared with conventional AI (Vazquez et al. 2001; Martinez et al. 2006). The low number of spermatozoa in the sperm reservoir might explain the poor fertilization rate after DIUI in pigs under field conditions, which was reported earlier (Martinez et al. 2006). In addition, it was found that when the embryos and oocyte were flushed at 6 days after insemination, partial and unilateral fertilization was higher in sows inseminated with DIUI compared with conventional AI (Martinez et al. 2006). The present study indicates that low fertilization rate and unilateral fertilization after DIUI might be caused by a unilateral sperm reservoir formation in some sows. Rodriguez-Martinez et al. (2005) demonstrated that both spermatozoa and seminal plasma (as well as protein components in the seminal plasma) are important for the formation of the sperm reservoir. A certain number of spermatozoa and some proteins in the seminal plasma have to be transported through the uterine lumen and escape from phagocytosis to enter the sperm reservoir. Furthermore, the spermatozoa subpopulation in the first 10 ml of the sperm-rich fraction seems to be more effective to a colonized sperm reservoir than the rest of the sperm-rich fraction to colonize sperm (Rodriguez-Martinez et al. 2005). These findings suggest that unilateral insemination with a small number of spermatozoa and seminal plasma may not be enough to enhance the formation of bilateral sperm reservoir. These events may cause low fertilization and unilateral fertilization after DIUI.

In the present study, one out of five sows in the DIUI group had spermatozoa on only one side of the UTJ, while another sow in the same group had spermatozoa on both sides of the UTJ. The later finding was not in accordance with our previous study (Tummaruk et al. 2007). This therefore indicates that some spermatozoa were hiding deep in the crypts of the sperm reservoir during ovulation, which may not have been removed via flushing (Chatdarong et al. 2004). Earlier studies have shown that unilateral fertilization and partial fertilization can occur in either conventional AI or DIUI (Hunter 1967; Waberski et al. 1994; Soede et al. 1995;

Martinez et al. 2006). It has been suspected that the causes of unilateral fertilization and partial fertilization might be the prolonged interval from insemination to ovulation, the low number of spermatozoa per insemination and the variation among sows (Waberski et al. 1994; Soede et al. 1995; Martinez et al. 2006). Martinez et al. (2006) proposed that if the number of spermatozoa was increased from 150×10^6 spermatozoa/dose to 600×10^6 spermatozoa per dose, unilateral fertilization did not occur. For IUI, Mezalira et al. (2005) found that the number of embryos was significantly decreased after 250×10^6 spermatozoa were used for insemination. The minimum number of spermatozoa per dose recommended for IUI was 500×10^6 spermatozoa (Mezalira et al. 2005). Bennemann et al. (2004) demonstrated that the total number of embryos at 32 days after IUI significantly decreased when the interval from insemination to ovulation exceeded 24 h, although the conception rate did not differ significantly. In the present study, we suggest that the number of spermatozoa per insemination dose for DIUI should be increased and the interval from insemination to ovulation should be optimized to compensate for the influences of other factors, such as sow factors, to obtain the optimal number of spermatozoa in the sperm reservoir during ovulation. If these factors have been optimized, bilateral formation of the sperm reservoir after DIUI might have occurred, at least in some sows.

The IUI technique in pigs was reported for the first time in 2002 (Watson and Behan 2002). It has been demonstrated as a practical technique for AI in pigs with a reduced number of spermatozoa per dose. Although the IUI technique has been used under farm conditions, many practitioners are not yet confident enough to reduce the number of spermatozoa per dose. In some cases, a reduced number of total piglets born per litter after IUI with $\leq 1000 \times 10^6$ spermatozoa per dose have been observed (Rozeboom et al. 2004; Roberts and Bilkei 2005). If IUI with 1000×10^6 spermatozoa per dose causes a reduction in litter size at farrowing, a partial fertilization can be expected. The present study indicates that the number of spermatozoa in the crypts of the UTJ and the caudal isthmus was, however, not significantly different between IUI and conventional AI. This is in agreement with our previous finding, in which spermatozoa in the central lumen were obtained by a flushing technique (Sumransap et al. 2007). In the present study, the number of spermatozoa in the crypts of the UTJ in the IUI group was approximately three times less than in the AI group. The UTJ is known as the primary physical barrier to the oviduct and restricts sperm access to the fertilization site (Rodriguez-Martinez et al. 2005). During the pre-ovulation period, most spermatozoa are hidden in the deep lateral furrows of the sperm reservoir, flushing of which are difficult to achieve because of the closed lumen and the presence of intraluminal mucus in the lumen (Tienthai et al. 2004). The spermatozoa were relocated again after ovulation (Mburu et al. 1996). Sumransap et al. (2007) demonstrated that the majority (approximately 41%) of the spermatozoa recovered from the female genital tract were found in the UTJ. The present study demonstrates that the sub-population of

spermatozoa in the UTJ is approximately three times lower in the IUI with a three times reduction in number of spermatozoa per dose compared with that of conventional AI. This has never been reported before. In our previous study, the number of spermatozoa in the UTJ obtained via flushing technique was quite similar between IUI and AI (Sumransap et al. 2007). Yet, the number of spermatozoa in the isthmus was quite similar between IUI and AI. This is in agreement with our previous findings (Sumransap et al. 2007). These indicated that if the oviducts function normally, IUI with a three time reduction in the number of spermatozoa may not have an unfavourable effect on fertilization rate and litter size.

In conclusion, IUI with a three times reduction in the number of spermatozoa tended to have a lower number of spermatozoa hiding in the crypts of the UTJ but not in the caudal isthmus. This may not interfere with the fertilization process because of the sufficient number of spermatozoa heading to the fertilization site. For single insemination, the DIUI with a 20-fold reduction in the number of spermatozoa per dose might be too low to obtain a sufficient number of spermatozoa in the crypts of the sperm reservoir prior to fertilization. The spermatozoa could be obtained from both sides of the sperm reservoir after AI and IUI, but in only one out of five sows inseminated by DIUI.

Acknowledgements

This study was funded by the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund 2007, Chulalongkorn University. We would also like to thank Assistant Prof. Simon Wright for checking the language of the article.

Author contributions

P.Tummaruk is responsible for the study design, data analysis and drafting of the paper. P.Tienthai provided technical support and read the paper.

References

- Bennemann PE, Milbradt E, Diehl GN, Weber D, Schimidt ACT, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, 2004: Reproductive performance of sows submitted to intra uterine insemination at different pre-ovulatory intervals. *Anim Reprod* **1**, 106–110.
- Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C, 2004: Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology* **62**, 1027–1041.
- Hunter RHF, 1967: The effect of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *J Reprod Fertil* **13**, 133–147.
- Hunter RHF, 1981: Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* **63**, 109–117.
- Langendijk P, Bouwman EG, Kidson A, Kirkwood RN, Soede NM, Kemp B, 2002: Role of myometrial activity in sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows. *Reproduction* **123**, 683–690.
- Larsson B, Larsson K, 1985: Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. *Acta Vet Scand* **26**, 385–395.
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN, 2002: Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* **123**, 163–170.
- Martinez EA, Vazquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez JL, 2006: Incidence of unilateral fertilizations alter low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reprod Dom Anim* **41**, 41–47.
- Mburu JN, Einarsson S, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, 1996: Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim Reprod Sci* **45**, 109–121.
- Mburu JN, Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, 1997: Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim Reprod Sci* **47**, 137–148.
- Mezalira A, Dallanora D, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, 2005: Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reprod Dom Anim* **40**, 1–5.
- Roberts PK, Bilkei G, 2005: Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sow. *Reprod Dom Anim* **40**, 489–491.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA, 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 JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ, 2005: Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**, 514–535.
- Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME, 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.
- SAS Institute Inc., 1996: SAS User's Guide. Statistics version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smith TT, Yanagimachi R, 1990: The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* **42**, 450–457.
- Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, Koning MAI, 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 Fertil* **104**, 99–106.
- Sumransap P, Tummaruk P, Kunavongkrit A, 2007: Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reprod Dom Anim* **42**, 113–117.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2004: Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Theriogenology* **80**, 131–146.
- Tummaruk P, Sumransap P, Techakumphu M, Kunavongkrit A, 2007: Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intrauterine insemination in the pig. *Reprod Dom Anim* **42**, 603–609.
- Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Lucas X, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Day BN, 2001: Deep Intrauterine Insemination in Natural Post-Weaning Oestrus Sows. 6th International Conference on Pig Reproduction. Columbia, MO, pp. 132.
- Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL, 2005: Improving the efficacy of sperm technologies in pig: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* **63**, 536–547.

- Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwartz M, Willmen T, Petzoldt R, 1994: Effects of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen semen. *Theriogenology* **42**, 831–840.
- Watson PF, Behan JR, 2002: Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of commercially based trial. *Theriogenology* **57**, 1683–1693.

Submitted: 29 May 2008

Author's address (for correspondence): Padet Tummaruk, Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: padet.t@chula.ac.th



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of Transcervical Insemination on Intraepithelial Leukocyte Infiltration in the Sperm Reservoir of Sows

P. Tummaruk^{1*}, P. Kunkitti¹, P. Tienthai²

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

²Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author

Keywords: Artificial insemination, Lymphocyte, Macrophage, Neutrophil, Pigs

Introduction

The mechanism of sperm transport from the insemination site to the fertilization area is regulated by many factors involving both the female genital tract and the spermatozoa (1). The utero-tubal junction (UTJ) is the primary physical barrier to the oviduct. The caudal isthmus and the UTJ act as a sperm reservoir to restrict sperm access to the fertilization site (2). Ovulation affects sperm transport by initiating the redistribution of spermatozoa from the sperm reservoirs (3). Recently, new devices for artificial insemination (AI) in pig have been developed i.e., intrauterine insemination (IUI) and deep intrauterine insemination (DIUI) (4-7). Using these techniques, the number of spermatozoa per dose can be reduced (4-7). It has been shown that DIUI resulted in a significantly lower number of spermatozoa in the female reproductive tracts at 24 h after insemination (5), while the spermatozoa in the UTJ and oviducts do not differ significantly between IUI and conventional AI (4). After insemination, the excessive spermatozoa were eliminated by the local immune system of the sow's uterus (8, 9). These immune cells are produced from lymphoid (e.g., lymphocyte, plasma cell) and myeloid lineage (e.g., neutrophil, macrophage and eosinophil) in the bone marrow (9). Lymphocyte is mainly function for specific immune response, while neutrophil is function for the non-specific immune response, phagocytosis (9). The infiltration of leukocyte subpopulation in the sow's uterus and oviduct after conventional AI has been reported (8-10). However, infiltration of leukocyte after IUI and DIUI has never been reported. The present study was performed to investigate the infiltration of intraepithelial lymphocyte (IEL), neutrophil (IEN) and macrophage (IEM) in the UTJ and each part of the oviducts at about 24 h after IUI and DIUI compared to AI in sows.

Material and Methods

Animals and the detection of oestrus and ovulation: Fifteen crossbred Landrace x Yorkshire (LY) multiparous sows were used in the experiment. On the day of weaning, they were allocated to individual pens adjacent to adult boars. The sows were observed for pro-oestrus twice a day (am/pm). The

sows were randomly assigned to 3 groups, i.e., AI (n=5), IUI (n=5) and DIUI (n=5). Transrectal ultrasonography (Echo camera SSD-550, Aloka co. Ltd., Japan) was performed every 4 h using a 5 MHz probe to examine the ovulation time in all sows (5).

Collection and dilution of semen and insemination: The semen was collected from an adult proven Duroc boar. Semen with a motility of $\geq 70\%$ was diluted, using Beltsville thawing solution (BTS) diluent. The sperm dose contained $3,000 \times 10^6$ motile spermatozoa in 100 ml for conventional AI, $1,000 \times 10^6$ motile spermatozoa in 50 ml for IUI (Deep golden pig[®], Minitube, Germany) and 150×10^6 motile spermatozoa in 5 ml for DIUI (7). The sows were inseminated with a single dose of the diluted semen during the second oestrus after weaning at 6 to 8 h prior to the expected time of ovulation. The sows were inseminated by the conventional AI, IUI and DIUI techniques (4, 5).

Sampling procedures: The sows were general anesthetized at 25.2 ± 1.6 h after insemination. The ovario-hysterectomy was performed by laparotomy. The reproductive organs were removed and immediately transferred to the laboratory. The oviducts and the proximal part of uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tracts were collected. The section was divided into 4 parts, i.e., UTJ, caudal isthmus, cranial isthmus and ampulla (5). The spermatozoa in the lumen in each part were flushed with Phosphate buffer solution (PBS) for several times. After flushing, the UTJ and all parts of the oviducts were immersed in 10% neutral buffer formalin solution for further processing.

Tissue sections: The UTJ and each part of the oviducts were cut into four equal parts and embedded in paraffin block. The tissue sections were transversely section to a thickness of 5 μm . Every fifth serial section was mounted and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Histological examination: The total number of IEL, IEN and IEM in each parts of the tissue was determined under light microscope using 400x mag. The leukocyte cells were counted in $15,625 \mu\text{m}^2$ for 20 areas per tissue section. A total of 32 sections per organ (left and right sides) in each sow were determined.

Statistical analysis: Data were analyzed using SAS software (11). The total number of IEL, IEN and IEM counted in the UTJ and the caudal isthmus

were presented as means±SEM. Due to the skew of the data, a natural log transformation was applied to the data before included in the statistical models. The numbers of IEL, IEN and IEM in each part of the sperm reservoir were compared among groups using General linear mixed model (MIXED) procedure. The model included groups, sides and organs as fixed effect and included animal and section nested within animal as random effects. Least-squared means were compared using Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons. Differences with $p < 0.05$ were regarded to have statistical significance.

Results and Discussion

Infiltration of IEL, IEN and IEM in the UTJ and the caudal isthmus of sow are demonstrated in Fig. 1 & 2. The number of IEL, IEN and IEM in the UTJ of sow after AI, IUI and DIUI were not significantly difference ($p > 0.1$) (Fig. 2). Lymphocyte was the most common leukocyte found in the epithelium of the sperm reservoir at 24 h after insemination. A small number of neutrophil and macrophage were also found in the sperm reservoir in most sows (Fig. 1&2). Number of IEL, IEN and IEM in the caudal isthmus of sow after AI, IUI and DIUI are demonstrated in Table 1. Lymphocyte was the most common immune cells in the caudal isthmus, while few IEN and IEM were also found (Table 1).

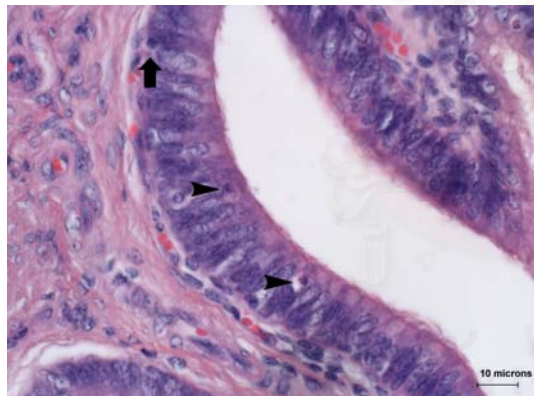


Fig. 1 Intraepithelial lymphocyte (black arrow) and neutrophil, (black arrowheads) in the caudal isthmus, H&E stained (bar: 10 μ m).

Table 1 Mean±SEM of intra epithelial lymphocyte, neutrophil and macrophage in the caudal isthmus of sow after AI, IUI and DIUI

Cells	AI	IUI	DIUI
Lymphocyte	18.6±2.0 ^a	22.1±2.0 ^a	11.8±0.7 ^a
Neutrophil	0.1±0.04 ^a	1.5±0.8 ^a	0.3±0.1 ^a
Macrophage	0.8±0.2 ^a	1.6±0.4 ^a	0.6±0.1 ^a

Values with the same superscript within row do not differ significantly ($p > 0.05$).

In the present study, lymphocyte was the most common immune cell found in all groups at about 24 h after insemination, while very rare neutrophil and macrophage were found in the sperm reservoir. The pattern of leukocyte infiltration was similar to the early diestrus stage (~70 h after ovulation) in the sow's uterus (8). The low number of neutrophil and macrophage indicated that the function of non-specific immune system or phagocytosis is limited in the sperm reservoir. In general, the number of spermatozoa used for IUI and DIUI was 3 and 20 times less than conventional AI (4, 5). The present study indicated that the reduction in the number of spermatozoa for IUI and DIUI did not alter the infiltration of IEL, IEN and IEM in the UTJ and caudal isthmus. The present study suggests that both IUI and DIUI could be used for insemination in pig without any unfavorable effect on the leukocyte infiltration in the sperm reservoir prior to fertilization.

In conclusion, the present study has proved that IUI and DIUI, new devices for AI in pig, do not influence the infiltration of IEL, IEN and IEM in the sperm reservoir prior to fertilization.

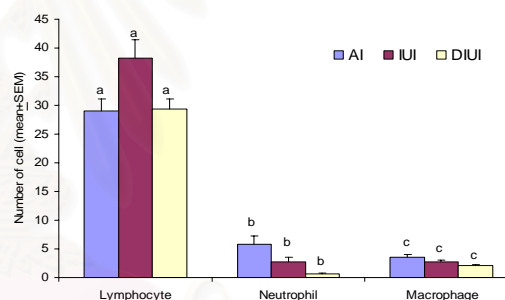


Fig. 2 Mean±SEM of intra epithelial lymphocyte, neutrophil and macrophage in the UTJ of sow after AI, IUI and DIUI. a,b,c Values with the same letters in each cell type do not differ significantly ($p > 0.05$).

Acknowledgement

This study was funded by the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University.

References

- Rodriguez-Martinez et al., 2005. *Theriogenology*. 63: 514-535.
- Hunter RHF, 1981. *J. Reprod. Fertil.* 63: 109-117.
- Mburu et al., 1996. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 109-121.
- Sumransap et al., 2007. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 113-117.
- Tummaruk et al., 2007. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 603-609.
- Watson and Behan, 2002. *Theriogenology*. 57: 1683-1693.
- Martinez et al., 2001. *Reproduction*. 122: 289-296.
- Kaeoket et al., 2003. *Anim. Reprod. Sci.* 75: 55-71.
- Dalin et al., 2004. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 401-413.
- Jiwakanon et al., 2006. *Reprod. Domest. Anim.* 41: 455-466.
- SAS, 1996: SAS User's guide. Cary, NC. USA.

Expression of Progesterone Receptor in the Utero-tubal Junction after Intra-uterine Insemination in Sows

P. Tummaruk^{1*}, S. Manee-In¹, P. Tienthai², S. Sukjumlong²

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

²Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author

Keywords : Artificial insemination, Pigs, Progesterone receptor, Sperm reservoir

Introduction

Recently, a new procedure for intrauterine insemination (IUI) in sows has been established (1,2). The procedure consists of a specially designed catheter that can be passed through the cervix allowing the deposition of sperm in the uterus. Using this technique, the number of spermatozoa per dose can be reduced by up to 1 billion spermatozoa. It has been demonstrated that the IUI technique with a 3-times reduction in the sperm number per dose resulted in the same conception rate and litter size, under farm conditions, as conventional artificial insemination (AI) (1). However, Rozeboom et al. (3) found that IUI with $\leq 1 \times 10^9$ spermatozoa per dose resulted in a smaller litter size compared to a conventional AI with 4×10^9 spermatozoa per dose. The mechanism of sperm transport from the insemination site to the fertilization area is complex and is regulated by many factors involving both the female genital tract and the spermatozoa (4). Additionally, ovulation has been postulated to affect sperm transport by initiating the redistribution of spermatozoa from the sperm reservoirs. This redistribution may be regulated by a change in the hormonal profile that occurs during ovulation (4, 5). Sperm distribution and fertilization after IUI with a reduced number of spermatozoa have been demonstrated (2). Progesterone (P_4) significantly increased soon after ovulation in pig and influences the transportation of spermatozoa and embryos (5). The mechanism of P_4 on sperm transportation in the female reproductive tracts is related to the expression of progesterone receptor (PR) in the uterine horn and the oviduct of pig (6). It is well established that estrogen (E_2) up-regulated PR and P_4 down-regulates PR (6). PR was higher in inseminated sows compared to cyclic sows (6). The immunostaining of PR in the uterus was high during 5-6 h to 70 h after insemination (6). The expression of PR after IUI in pig has never been investigated. The present study was performed to investigate the expression of PR in the utero-tubal junction of sows at 24 h after IUI compared with conventional AI.

Material and Method

Animals: Ten crossbred (Landrace x Yorkshire) multiparous sows (LY) were used in the experiment. The sows were randomly assigned to 2 groups according to ear tag, control (conventional AI, n=5)

and IUI groups (n=5). The sows were examined for the onset of standing oestrus every 6 h by using a back pressure test in the presence of a mature boar. Transrectal ultrasonography (Echo camera SSD-550, Aloka co. Ltd., Japan) was performed every 4 h, starting from about 10-12 h after the onset of oestrus, using a 5 MHz probe to examine the time when ovulation took place in all sows (2). The semen was collected from an adult proven Duroc boar and was diluted, using Beltsville thawing solution (BTS) diluent. The sperm dose contained $3,000 \times 10^6$ spermatozoa in 100 ml for conventional AI and $1,000 \times 10^6$ spermatozoa in 50 ml for IUI. The sows were inseminated with a single dose of the diluted semen during the second oestrus after weaning. The time of ovulation during the first oestrus was used to determine the timing of insemination, which was carried out at 6-8 h prior to the expected time of ovulation. The sows were inseminated by the conventional AI or the IUI. The IUI technique has been described by Sumransarp et al. (2).

Tissue collection: The sows were general anesthetized at about 24 h after insemination. General anesthesia was induced by azaperone (Stressnil[®]), 2 mg/kg, intramuscularly and 30 min later thio-pental sodium, 10 mg/kg, was given intravenously. The ovario-hysterectomy was performed by laparotomy. The reproductive organs were removed and immediately transferred to the laboratory. The oviducts and the proximal part of uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tracts were collected. The utero-tubal junction and all parts of the oviduct were fixed in 10% neutral buffer formalin. The samples were embedded in paraffin blocks, cut in 4 μ m thick sections and placed on Superfrost Plus glass slides (Menzel-Glaser, Freiburg, Germany).

Immunohistochemistry: The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. The immunohistochemical protocol was modified after Sukjumlong et al. (6). Briefly, antigen retrieval technique was used in order to enhance the reaction between antigen and antibody by boiling in 0.01 M citrate buffer pH 6.0, 2x5 min in a microwave at 750 watt. A standard avidin-biotin immunoperoxidase technique was applied to detect the PR proteins. The primary antibodies used were mouse monoclonal antibody to PR (Immunotech,

clone 10A9) at the dilution of 1:200 in a humidified chamber for 2 h at room temperature. Normal sow oviduct known to express PR was served as positive controls. In the final step, the color of the bound enzyme (brown color) was obtained using 3,3'-diaminobenzidine (DAB). All sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted with glycerine gelatin for investigation under a light microscope.

Classification of positively stained cells: The UTJ was classified into 2 parts, the oviduct and the uterine parts. The oviduct part consisted of 3 compartments: surface epithelium, subepithelial layer of the stroma and muscular layer. The uterine part was classified into 4 compartments: surface epithelium, glandular epithelium, subepithelial layer of the stroma and myometrium. The results of the immunostaining were evaluated by a manual scoring method. The scoring of PR positive cells was done by classification into three different levels of intensity: weak, 1; moderate, 2 and strong, 3. Since not all cells stained positively in some compartments of the tissue, the proportion of positive to negative cells was also included for these tissues. The proportions were estimated into four different levels (marked 1-4): low proportion (<30% of positive cells, 1); moderate proportion (30-60% of positive cells, 2); high proportion (>60-90% of positive cells, 3) and almost all cells positive (more than 90%, 4) [6]. In connective tissue stroma of the uterus and the oviduct, not all cells were positively stained. Therefore, the number of PR positive cells per mm² in the subepithelial layer was identified in each section. Five arbitrarily chosen microscopic fields were counted. The counting was performed at x400 mag. by using an ocular reticule (ocular micrometer, 0.13x0.13 mm, with 25 squares) placed in the eyepieces of the light microscope and move the ocular micrometer along the subepithelial layer of the stroma (7).

Statistical analysis: Data were analysed using SAS software [8]. Descriptive statistics including the mean and the standard deviations (SD) of all parameters were calculated. The score of intensities and score of positive cell were compared between groups using NPAR1WAY procedure of SAS (Wilcoxon rank sum test). Differences with $p < 0.05$ were regarded to have statistical significance.

Results and Discussion

Immunohistochemical staining of PR after AI and IUI in the oviductal and the uterine parts of the UTJ are presented in Table 1 and 2 and Fig. 1. The intensity and the proportion of PR positive cell after AI and IUI in all compartments of the UTJ were not significantly difference ($p > 0.05$). For both AI and IUI, high intensities and high proportion of PR positive cell were observed in myometrium compartments of both the oviductal and uterine parts of the UTJ (Table 1 and 2).

Table 1 Immunohistochemical staining of progesterone receptors (PR) presented as manual scoring (intensity and proportion) in oviductal part of uterotubal junction

Group of sows	Surface epithelium	Stroma	Myometrium
AI	1.8 ^a /2.7 ^A	1.6 ^a /1923 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
IUI	1.4 ^a /2.5 ^A	2.4 ^a /2370 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2 Immunohistochemical staining of progesterone receptors (PR) presented as manual scoring (intensity and proportion) in uterine part of uterotubal junction

Group of sows	Surface epithelium	Connective tissue stroma	Myometrium
AI	1.6 ^a /2.7 ^A	1.8 ^a /1990 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
IUI	1.4 ^a /2.7 ^A	2.4 ^a /2370 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($p < 0.05$)

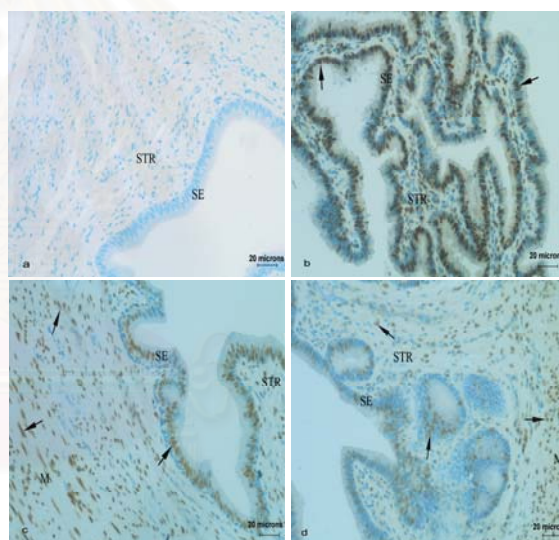


Fig. 1 Expression of PR in the UTJ of sows: (a) negative control, (b) positive control, (c) AI, (d) IUI

The present study demonstrated the expression of PR after AI as well as IUI in pig. IUI is a new technique for insemination in pig and the expression of PR after IUI has never been reported before. In general, the number of spermatozoa recommended to be used for IUI was 3 time less than AI. The results indicated that the reduction in the number of spermatozoa per insemination by IUI technique dose not alter the expression of PR in the UTJ. The present study suggests that IUI could be used without any different effect on PR in the sperm reservoir prior to fertilization. Wu et al. [9] found that the activation of PR was also associated with the capacitating process and responsible for physiological sperm acrosome reaction induction.

The sperm acrosome reaction is required for mammalian fertilization. It has been suggest that P₄ is a physiological inducer for sperm acrosome reaction (9). In conclusion, the present study proved that IUI, a new AI technique in pig, does not influence the expression of PR in the UTJ prior to fertilization.

Acknowledgement

The present study was funded by the Ratchadaphi-seksomphot Endowment Fund 2007, Chulalongkorn University.

References

- 1 Watson and Behan, 2002. Theriogenology. 57: 1683-93.
- 2 Sumransap et al., 2007. Reprod. Dom. Anim. 42: 113-117.
- 3 Rozeboom et al., 2004. J. Anim. Sci. 82: 2164-68.
- 4 Hunter, 1981. J. Reprod. Fertil. 63: 109-117.
- 5 Mburu et al., 1996. Anim. Reprod. Sci. 45: 109-121.
- 6 Sukjumlong et al., 2005. Reproduction 129: 349-359.
- 7 Sukjumlong et al., 2003. Reprod Domest Anim 38: 5-12.
- 8 SAS, 1996. SAS User's guide. Statistics version 9.1 Cary, NC. USA.
- 9 Wu et al., 2006. Anim. Reprod. Sci. 93: 34-45.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Expression of Progesterone Receptor in the Utero-tubal Junction after Deep Intra-Uterine Insemination in Sows

P. Tummaruk^{1*}, S. Manee-In¹, P. Tienthai², S. Sukjumlong²

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

²Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author

Keywords: DIUI, Pigs, Progesterone receptor, Sperm

Introduction

Recently, a special designed catheter for artificial insemination (AI) in pig has been developed for non-surgical deep intra-uterine insemination (DIUI) with a 20 folds reduction in the number of spermatozoa (1). The DIUI catheter is inserted through the uterine horn and deposited semen in one horn close to the sperm reservoir. Earlier studies have shown that a flexible catheter could be passed through the cervix completely in 90-95% of multiparous sows taking about 4 min/insemination (1, 2). The technique is also applicable for advanced biotechnology procedures such as frozen-thawed semen, sex sorted sperm and embryo transfer (3-5). The number of spermatozoa in the sperm reservoir after DIUI with a reduced number of spermatozoa was significantly lower than AI (6). Furthermore, poor litter size and low fertilization rate has also been observed for DIUI (7). It has been demonstrated that progesterone (P₄) significantly increased soon after ovulation in pig and influenced the transportation of spermatozoa and embryos (8). The physiological mechanism of P₄ on sperm transportation in the female reproductive tracts is related to the expression of the P₄ receptor (PR) in the uterine horn and the oviduct of pig (9). It has been demonstrated that the PR in the pig oviduct (ampulla and isthmus) was more intense during luteal phase compared with follicular phase (10) and the PR was higher in inseminated sows compared to cyclic sows (9). The expression of the PR after DIUI in pig has never been investigated. The present study was performed to investigate the expression of the PR in the utero-tubal junction (UTJ) of sows at 24 h after DIUI compared with conventional AI.

Materials and Methods

Animals: Ten crossbred (Landrace x Yorkshire) multiparous sows were used in the experiment. On the day of weaning and were observed for pro-oestrus twice a day. The sows were randomly assigned to 2 groups, a control group (conventional AI, n=5) and a DIUI group (n=5). Transrectal ultrasonography was performed every 4 h, starting from about 10-12 h after the onset of oestrus, using a 5 MHz probe to examine the time when ovulation took place in all sows (9). The semen was collected from an adult proven Duroc boar. Semen was diluted

using Beltsville thawing solution (BTS) diluent. The sperm dose contained 3,000x10⁶ spermatozoa in 100 ml for conventional AI and 150x10⁶ spermatozoa in 5 ml for DIUI. The sows were inseminated with a single dose of the diluted semen during the second oestrus after weaning. The sows were inseminated by the conventional AI (n=5) or the DIUI (n=5).

Tissue collection: The sows were general anesthetized at about 24 h after insemination. The ovario-hysterectomy was performed by laparotomy. The reproductive organs were removed and transferred to the laboratory. The oviducts and the proximal part of uterine horns (1 cm) on each side of the reproductive tracts were collected. The utero-tubal junction and the oviduct were fixed in 10% neutral buffer formalin. The samples were embedded in paraffin blocks, cut in 4 μm thick sections and placed on Superfrost Plus glass slides.

Immunohistochemistry: The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. The immunohistochemical protocol was performed (12). Briefly, antigen retrieval technique was used in order to enhance the reaction between antigen and antibody by boiling in 0.01 M citrate buffer pH 6.0, 2x5 min in a microwave at 750 watt. A standard avidin-biotin immunoperoxidase technique (Vectastain® ABC kit, Vector Laboratories, Inc., USA) was applied to detect the PR proteins. The primary antibodies used were mouse monoclonal antibody to PR (Immunotech, clone 10A9) at the dilution of 1:200 in a humidified chamber for 2 h at room temp. Normal sow oviduct known to express PR was served as positive controls. The color of the bound enzyme (brown color) was obtained using 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector Lab., Inc., USA). All sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted with glycerine gelatin for investigation under a light microscope.

Classification of positively stained cells: The UTJ was classified into 2 parts, the oviduct and the uterine parts. The oviduct part consisted of 3 compartments: surface epithelium, subepithelial layer of the stroma and myometrium. The uterine part consisted of 4 compartments: surface epithelium, glandular epithelium, subepithelial layer of the stroma and myometrium.

The results of the immunostaining were evaluated by a manual scoring method. The scoring of PR positive cells was done by classification into three different levels of intensity: weak, 1; moderate, 2 and strong, 3. Since not all cells stained positively in some compartments of the tissue, the proportion of positive to negative cells was also included for these tissues. The proportions were estimated into four different levels (marked 1-4): low (<30% of positive cells, 1); moderate (30-60% of positive cells, 2); high (>60-90% of positive cells, 3) and almost all cells positive (>90%, 4) (12). In connective tissue stroma of the uterus and the oviduct, not all cells were positively stained. Therefore, the number of PR positive cells per mm² in the subepithelial layer was identified in each section. Five arbitrarily chosen microscopic fields were counted. The counting was performed at x400 mag. by using an ocular reticule (ocular micrometer, 0.13x0.13 mm, with 25 squares) placed in the eyepieces of the light microscope and move the ocular micrometer along the subepithelial layer of the stroma.

Statistical analysis: Data were analysed using SAS (11). Descriptive statistics including the mean and the standard deviations of all parameters were calculated. The score of intensities and score of positive cell were compared between groups using NPAR1WAY procedure (Wilcoxon rank sum test). Differences with $p < 0.05$ were regarded to have statistical significance.

Results and Discussion

Immunohistochemical staining of PR after AI and DIUI in the oviductal and the uterine parts of the UTJ are presented in Table 1 and 2. In the oviductal part of the UTJ, the intensity of PR in the myometrium and the proportion of PR positive cell in the surface epithelium after DIUI was significantly lower than AI ($p < 0.05$). In the uterine part of the UTJ, both intensity and proportion of PR positive cell in all tissue compartment were not significantly different except for the myometrium in which higher intensity was found for AI ($p < 0.05$). When comparing between tissue compartments, the prominent staining was observed in the muscular layer of the UTJ for both AI and DIUI.

Table 1 Immunohistochemical staining of progesterone receptors (PR) presented as manual scoring (intensity and proportion) in oviductal tissue compartments

Group of sows	Surface epithelium	Stroma	Tunica muscularis
AI	1.8 ^a /2.7 ^A	1.6 ^a /1923 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
DIUI	1.3 ^a /1.8 ^B	1.7 ^a /1475 ^A	2.2 ^b /3.7 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2 Immunohistochemical staining of progesterone receptors (PR) presented as manual scoring (intensity and proportion) in uterine tissue compartments

Group of sows	Surface epithelium	Stroma	Myometrium
AI	1.6 ^a /2.7 ^A	1.8 ^a /1990 ^A	3.0 ^a /4.0 ^A
DIUI	1.6 ^a /2.7 ^A	1.8 ^a /1933 ^A	2.2 ^b /3.8 ^A

The different superscript letters between rows are significantly different ($p < 0.05$)

Progesterone mediates changes in pig reproductive tissue during oestrus cycle and important for the fertilization process. During recent years, the expression of PR in pig as well as in other species has been investigated intensively (9, 10). The intensity and the proportion of PR in the UTJ during post-ovulation period after insemination were relatively high, which is in agreement with a previous report in the sow uterus (9). It has been demonstrated that the immunostaining of PR in the uterus was high during 5-6 h to 70 h after insemination (9). The present study is the first, who report the expression of PR after DIUI in pig. The expression of PR in some compartments of the UTJ was significantly lower in the DIUI groups compared to AI. The number of spermatozoa as well as the volume of semen used for DIUI was 20 time less than AI. It is known that the boar semen contain a certain amount of estradiol (E₂). It has been demonstrated that E₂ up-regulate PR in the pig uterus (9). Low volume of semen used for DIUI might also influence the expression of PR due to the lack of E₂. Furthermore, Tummaruk et al. (6) found that the number of spermatozoa recovered from the UTJ of sows after DIUI was significantly lower than AI. This indicates that the reduction in the number of spermatozoa in the UTJ around ovulation might alter the expression of PR. In clinical research, low fertilization rate and poor quality of embryos after DIUI with a small number of spermatozoa have also been observed (7). Although DIUI with a 20-fold reduction in number of spermatozoa resulted in similar pregnancy rate compared to AI, a higher number of partial fertilization, unilateral fertilization and lower litter size were observed (9). The present study indicated that number of spermatozoa and/or volume of semen used for insemination may also play a role on the expression of PR.

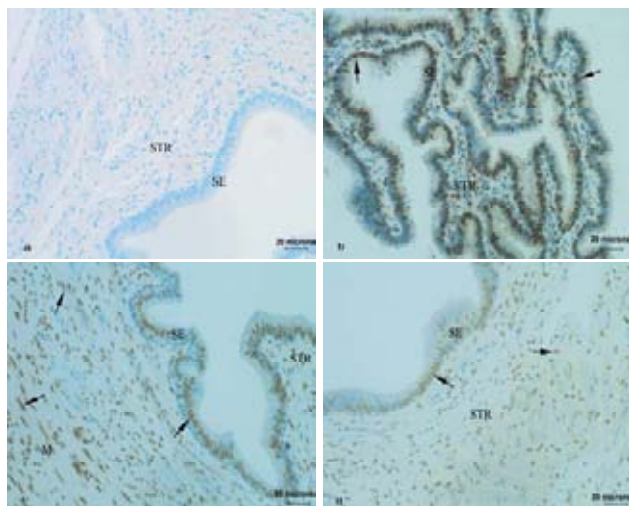


Fig. 1 Expression of PR in the UTJ of sows: (a) negative control, (b) positive control, (c) AI, (d) DIUI

Acknowledgement

This study was funded by the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund 2007, Chulalongkorn University.

References

- 1 Vazquez et al., 2005. *Theriogenology* 63: 536-547.
- 2 Martinez et al., 2001. *Reproduction*. 122: 289-296.
- 3 Martinez et al., 2004. *Theriogenology*. 61: 137-146.
- 4 Vazquez et al., 2003. *Theriogenology*. 59: 1605- 1614.
- 5 Roca et al., 2003. *Theriogenology*. 60: 77-87.
- 6 Tummaruk et al., 2007. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 603-609.
- 7 Martinez et al., 2006. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 41- 47.
- 8 Mburu et al., 1996. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 109-121.
- 9 Sukjumlong et al., 2005. *Reproduction* 129: 349- 359.
- 10 Peralta et al., 2005. *Dom. Anim. Edocrinol.* 28: 74-84.
- 11 SAS, 1996. *Statistics version 9.0* Cary, NC USA.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย