

คุณภาพน้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลี ของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ Semen Quality after Percoll Density Gradient Centrifugation of Large White and Landrace Boars

กรวิการ์ อินทร์ฤทธิ¹ ภัฏญา จิระเจริญรัตน์¹ และ รณชัย สิทธิไกรพงษ์¹

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ โดยจัดกลุ่มการทดลองแบบ 2x6 factorial arrangement in randomized complete block design (RCBD) มี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์สุกร (สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ) และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลี 6 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลี 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% นำน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในแต่ละระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลลี ตรวจวัดลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าพันธุ์พ่อสุกรมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$) ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลีมีผลต่อ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลี ($P<0.01$) ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลีพบมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$)

คำสำคัญ: น้ำเชื้อสุกร เพอร์คอลลี คุณภาพน้ำเชื้อ

Abstract

The research was aimed to evaluate the semen quality after percoll density gradient centrifugation of Large White and Landrace boars. Four boars of each Large White and Landrace breeds were allotted in a randomized complete block design with a 2 x 6 factorial arrangement of treatment. Two factor of treatments were breeds (Large White and Landrace) and percoll density gradient levels (0% or fresh semen, 20%, 35%, 50%, 65%, and 80%). After centrifugation, breed was highly significant effect ($P<0.01$) on progressive motility sperm and living sperm percentages. Percoll density gradient levels were highly significant differences ($P<0.01$) in sperm concentration, pH, progressive motility sperm, abnormality sperm and living sperm percentages. Furthermore, highly significant interaction effect ($P<0.01$) between breed and Percoll density gradient levels were found in progressive motility sperm and living sperm percentages.

Keyword: semen, percoll density gradient, semen quality

คำนำ

การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลลีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อเพศชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ตัว เช่น การมีความเข้มข้นของตัวอสุจิต่ำ หรือการมีน้ำเชื้อที่

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ.ฉลองกรุง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

¹Department of Animal Production Technology and Fisheries, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok, 10520

ตัวอสุจิเคลื่อนไหวได้ต่ำ น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายของเพอร์คอลลอสุจิจะมีการเคลื่อนที่ที่ดีขึ้น ตัวอสุจิผิดปรกติลดลง ทำให้ประสิทธิภาพอสุจิสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้เพิ่มขึ้น (Hyne *et al.*, 1986) เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.*, 1994) อสุจิที่ตายแบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาตัวอสุจิออกจากน้ำเชื้อ โดยอาศัยการเคลื่อนไหวของอสุจิ และลักษณะรูปร่างพรรณสัณฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปรกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.*, 1983; Kaneko *et al.*, 1986; Pickering *et al.*, 1989) เพอร์คอลล เป็นอนุภาคซิลิกาที่อยู่ในลักษณะคอลลอยด์เคลือบด้วยสาร polyvinyl pyrrolidone (Iwasaki *et al.*, 1988) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15-34 นาโนเมตร (Pickering *et al.*, 1989) มีความหนาแน่นสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.30 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (Wilson and Walker, 1994) มีแรงดันออสโมซิส เท่ากับ 275-285 มิลลิออสโมลต่อลิตรกรัม มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.123±0.003 (Avery and Greve, 1995) สารละลายเพอร์คอลลที่เหมาะสมที่จะใช้ในการปั่นเหวี่ยงแยกชั้นน้ำเชื้อ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มความหนาแน่น แต่ไม่มีการเพิ่มแรงดันออสโมซิส และไม่เป็นอันตรายต่ออสุจิ (Mohri *et al.*, 1987) ผลของเพอร์คอลลที่อาจก่อให้เกิดการอักเสบในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย จากการทดลองในหนู พบว่าไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ เนื่องจากเพอร์คอลลมี polyvinyl pyrrolidone ที่ห่อหุ้มอนุภาคซิลิกาเป็นตัวป้องกันการอักเสบได้ (Pickering *et al.*, 1989) จากรายงานการศึกษาของ Grant *et al.* (1994) พบว่าอสุจิสุกรที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นสารละลายเพอร์คอลล ($P < 0.001$) แต่การศึกษาของ Avery and Greve (1995) ศึกษาอัตราการเกิดของตัวอ่อนในระยะเริ่มต้นจากการผสมภายนอกตัวสัตว์ของไข่ที่ผสมโดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการอุ่น เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล และน้ำเชื้อที่ผ่านการล้างโดยไม่ผ่านสารละลายเพอร์คอลล พบว่าตัวอ่อนระยะ cleavage (อายุ 2 วัน) ของน้ำเชื้อที่ผ่านการล้างแบบธรรมดา มีอัตราการเกิดตัวอ่อนเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล มีอัตราการเกิดตัวอ่อนเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) อัตราการเจาะไข่ที่ลดลงไม่ได้มีสาเหตุมาจากสารละลายเพอร์คอลล เพราะการทดลองเติมสารละลายเพอร์คอลลลงใน fertilization medium ที่ระดับต่างๆ กัน พบว่าไม่ได้ทำให้อัตราการเจาะไข่ของอสุจิลดลง (Parrish *et al.*, 1995) แต่อาจจะเกิดจากสาร polyvinyl pyrrolidone ที่ไม่มีการเคลือบอนุภาคซิลิกาในสารละลายเพอร์คอลล 1-2 เปอร์เซ็นต์ polyvinyl pyrrolidone จะไปเคลือบตัวอสุจิไม่มีผลกระทบต่อเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่จะทำให้ความสามารถในการเจาะไข่ลดน้อยลง อย่างไรก็ตามการลดลงของความสามารถในการเจาะไข่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มจำนวนอสุจิที่ใช้ในการปฏิสนธิ (Parrish *et al.*, 1995) นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ Resende *et al.* (2009) นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยง พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 70 และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 73 ($p < 0.05$) สอดคล้องกับ กรรณก (2552) ศึกษา น้ำเชื้อพอน์โคที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล พบว่า อสุจิจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบไปข้างหน้าสูงกว่าก่อนการปั่นเหวี่ยง ($P < 0.01$) Mehmood *et al.* (2009) รายงานการนำน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 38.5 และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่สูงขึ้นคือ ร้อยละ 63.1 ($p < 0.05$) และจากรายงานการศึกษาของ Li *et al.* (2010) นำน้ำเชื้อปลาดูว์ที่ผ่านการแช่แข็งมาผ่านการอุ่นและปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 23.36 และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 65.81 ($p < 0.05$) จากรายงานดังกล่าว จะเห็นว่าเพอร์คอลลไม่มีผลเสียต่อตัวอสุจิในน้ำเชื้อของสัตว์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพอน์ดาร์จไวท์ และแลนด์เรซก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสุกรโดยใช้เพอร์คอลลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ พันธุ์ละ 4 ตัว โดยสุกรพ่อพันธุ์อายุ 1.5 ปี เลี้ยงในโรงเรือนระบบ Evaporative cooling system ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรในช่วงเวลาประมาณ 7.00 น. ตามวิธีการรีดน้ำเชื้อที่แนะนำโดย ศรีสุวรรณ (2542) มีระยะห่างการรีดน้ำเชื้อพ่อสุกรแต่ละตัว 5 วัน ณ. ฟาร์มสุกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

2. กระบวนการการปั่นเหวี่ยงแยกสกัดส่วนน้ำเชื้อตามสารละลายเพอร์คอลลี่ที่ต่างระดับความเข้มข้น

1) การเตรียมชั้นของสารละลายต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลลี่ โดยสารเพอร์คอลลี่ (GE Healthcare Bio-Sciences AB ผลิตจากประเทศสวีเดน) จะถูกเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ NSRTC4 (National Swine Research and Training Center 4) (ศรีสุวรรณ, 2542) เพื่อให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0% (น้ำเชื้อสดที่ไม่ได้ปั่นเหวี่ยง), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% ดังแสดงใน Table 1 จากนั้นสารละลายเพอร์คอลลี่ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ถูกนำมาวางเรียงเป็นชั้นในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยส่วนล่างจะมีความเข้มข้นสูงที่สุด เรียงตามลำดับความเข้มข้นมากไปน้อยระดับความเข้มข้นชั้นละ 5 มิลลิลิตร และวางน้ำเชื้อสดไว้ชั้นบนสุดปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) นำน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในสารละลายเพอร์คอลลี่แต่ละระดับชั้นความเข้มข้นไปตรวจวัดคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ ความเข้มข้นน้ำเชื้อโดยใช้ Haemocytometer กรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะผิดปกติโดยการนับจำนวนอสุจิตายจากน้ำเชื้อที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีย้อมนิโกรซิน-อีโอซิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X ทำการนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นจึงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ (ศรีสุวรรณ, 2542)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จัดกลุ่มการทดลองแบบ 2 x 6 factorial arrangement in randomized complete block design มี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์สุกร (สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ) และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลี่ 6 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลี่ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เพื่อศึกษาข้อมูลด้าน ความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติในแต่ละระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลี่ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธี General Linear Model (GLM) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least square mean ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

Table 1 Volume of Percoll and NSRTC4 solutions used for dilute difference levels of percoll density gradient

percoll density gradient (%)	Percoll solution (ml.)	NSRTC4 solution (ml.)	Total volume (ml.)
80	4.00	1.00	5
65	3.25	1.75	5
50	2.50	2.50	5
35	1.75	3.25	5
20	1.00	4.00	5
0 (fresh semen)	0.00	0.00	5
Total volume (ml.)			30

ผลการทดลองและวิจารณ์

พันธุ์พ่อสุกรไม่มีผลต่อลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อในลักษณะของความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ต่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ($P>0.05$) แต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$) แสดงใน Table 2 สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ต่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติใกล้เคียงกัน คือ 315.25 และ 300.81 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร, 7.03, 7.04, 8.42 และ 8.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล (Table 2) พบว่า ความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ต่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ความเข้มข้นของตัวอสุจิจากการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะพบที่ระดับชั้น 80% มีความเข้มข้นตัวอสุจิมากที่สุด คือ 539.05 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล 50% คือ 431.24 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และพบน้อยที่สุดคือระดับชั้น 20% คือ 92.40 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

ค่ากรด-ต่างของน้ำเชื้อจากการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เนื่องจากต้องใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง และเวลาในการดูน้ำเชื้อแต่ละระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลลเพื่อนำไปตรวจวัดค่ากรด-ต่าง โดยช่วงเวลาดังกล่าวตัวอสุจิจะใช้องค์ประกอบพวก กลูโคส ฟรุคโตส และซออลบิตอล เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งสุดท้ายจะได้กรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งทำให้น้ำเชื้อมีความเป็นกรดมากขึ้น (Brooks, 1990)

Table 2 Semen quality after difference percoll density gradient centrifugation of Large White and Landrace boars (LSMean)

Parameter	Breed (B)		Percoll density gradient (C)						Overall SEM	P-value		
	LW	LR	0%	20%	35%	50%	65%	80%		B	C	B*C
Sperm Concentration ($10^6/ml$)	315.25	300.81	308.03 ^a	92.40 ^e	123.21 ^e	431.24 ^b	354.24 ^c	539.05 ^d	23.70	0.135	<.001	0.986
pH	7.03	7.04	7.19 ^a	7.10 ^b	7.05 ^c	7.01 ^d	6.96 ^e	6.93 ^f	0.01	0.336	0.004	0.991
Progressive motility (%)	63.96	68.96	81.25 ^b	29.06 ^e	45.31 ^d	74.84 ^c	83.28 ^{ab}	85.00 ^a	3.20	<.001	<.001	<.001
living sperm (%)	65.63	71.35	83.50 ^b	31.72 ^e	46.65 ^d	76.87 ^c	84.59 ^{ab}	87.62 ^a	3.19	<.001	<.001	<.001
Abnormality sperm (%)	8.42	8.23	11.21 ^a	8.46 ^b	8.08 ^{bc}	7.65 ^{cd}	7.33 ^d	7.24 ^d	0.21	0.286	<.001	0.782

a,b,c,d,e,f LSMean within the same row with different superscripts differ significantly ($P<0.01$)

0% = fresh semen

น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงต้องใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง และเวลาในการศึกษาแต่ละส่วนของน้ำเชื้อต้องใช้เวลาดูน้ำเชื้อส่วนบนออก และนำน้ำเชื้อส่วนชั้นที่ต้องการไปตรวจวิเคราะห์ ช่วงเวลาที่ใช้ไปนั้นทำให้อสุจิในน้ำเชื้อมีการเผาผลาญอาหารมีการหายใจเพิ่มขึ้น มีการผลิตกรดแลคติก (Bearden and Fuquay, 1997) แต่การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล จะแยกอสุจิออกจากน้ำกาม (McClure *et al.*, 1989; Grant *et al.*, 1994) เมื่อน้ำกามลดลงทำให้อสุจิตกตะกอนที่ก้นหลอดมีความเข้มข้นสูงมาก ทำให้ระดับ potassium ion เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การเผาผลาญ และการหายใจลดลง อสุจิสว่างกรดแลคติกลดลงค่าความเป็นกรด-ต่าง ของน้ำเชื้อพ่อสุกรจะอยู่

ระหว่าง 6.8-7.8 ถ้าหากน้ำเชื้อมีความเป็นกรดเป็นด่างต่ำจะทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิช้าลง (Bearden and Fuquay, 1997) และจากการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 6.93 ถึง 7.19 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เป็นอันตรายต่ออสุจิ

จำนวนอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติจากการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จากข้อมูลพบว่าชั้นที่มีความเข้มข้นมากที่สุดจะพบลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติในน้อยที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaneko *et al.* (1986) ซึ่งรายงานการปั่นเหวี่ยงอสุจิของผู้ชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยได้ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล 4 ระดับ ตั้งแต่ 40-80 เปอร์เซ็นต์ บันที่ 600 รอบต่อนาที นาน 30 นาที พบว่าอสุจิมียเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้นจาก 64 เป็น 93 เปอร์เซ็นต์ อสุจิมียชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 70 ± 1.2 เป็น 92 ± 3.2 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิผิดปกติลดลงจาก 24 เป็น 5.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ พบว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะได้สวจิส่วนล่างของหลอดมีคุณภาพสูงขึ้น (Mohri *et al.*, 1987; Kaneko *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1989) เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.*, 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาตัวอสุจิออกจากน้ำเชื้อ โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลักษณะรูปร่างมาตรฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.*, 1983 ; Kaneko *et al.*, 1986 ; Pickering *et al.*, 1989)

อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล ไม่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ($P > 0.05$) แต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมียชีวิต ($P < 0.01$)

อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ แสดงใน Table 3 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล 80% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิในน้ำเชื้อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ มีค่าสูงที่สุด คือ ร้อยละ 85.00 เท่ากัน ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมิมีความสำคัญ เพราะจะสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ของตัวสัตว์ (Bearden and Fuquay, 1997) ทั้งนี้เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันอสุจิจะถูกกรองลงสู่ส่วนล่างของหลอดทดลอง จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยส่วนหนึ่ง นอกเหนือจากความแรงของการปั่นเหวี่ยง (Pousette *et al.*, 1986)

Table 3 Interaction effect between breed and percoll density gradient on progressive motility sperm (LSMean \pm SE)

Breed	Percoll density gradient						
	0%	20%	35%	50%	65%	80%	Average
Large White	80.93 \pm 1.19 ^a	24.06 \pm 2.13 ^f	38.43 \pm 8.31 ^d	73.12 \pm 4.14 ^b	82.18 \pm 1.87 ^a	85.00 \pm 0.00 ^a	63.96 \pm 24.53
Landrace	81.56 \pm 1.57 ^a	34.06 \pm 2.57 ^e	52.18 \pm 0.62 ^c	76.56 \pm 2.57 ^b	84.37 \pm 0.72 ^a	85.00 \pm 0.00 ^a	68.96 \pm 19.66
Average	81.25 \pm 1.33	29.06 \pm 5.77	45.31 \pm 9.15	74.84 \pm 3.68	83.28 \pm 1.75	85.00 \pm 0.00	66.46 \pm 22.14

a,b,c,d,e,f LSMeans within the same row and column with different superscripts differ significantly ($P < 0.01$)

0% = fresh semen

อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลด์ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต แสดงใน Table 4 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลด์ 80% ของสุกรพันธุ์แลนด์เรซ มีความสูงที่สุด คือ ร้อยละ 88.00 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลด์ 80% คือ ร้อยละ 87.25 แสดงว่าการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ไม่มีผลทำให้่อสุจิมีชีวิต มีรายงานการทดลองหลาย ๆ การทดลอง ที่รายงานตรงกันว่า อสุจิที่ส่วนกลางของหลอดทดลอง หลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลลด์ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้น ทั้งในอสุจิมนุษย์ (Mohri *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1989) สุกร (Grant *et al.*, 1994) และโค (Parrish *et al.*, 1995) เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.*, 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาตัวอสุจิออกจากน้ำเชื้อ โดยอาศัยการเคลื่อนไหวของอสุจิ และลักษณะรูปร่างพื้นฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนกลางของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.*, 1983 ; Kaneko *et al.*, 1986 ; Pickering *et al.*, 1989)

Table 4 Interaction effect between breed and percoll density gradient on living sperm percentages (LSMean \pm SE)

Breed	Percoll density gradient						Average
	0%	20%	35%	50%	65%	80%	
Large White	82.43 \pm 1.91 ^{bc}	25.87 \pm 2.65 ^g	39.81 \pm 8.90 ^f	74.50 \pm 3.94 ^d	83.93 \pm 1.40 ^{ab}	87.25 \pm 0.79 ^a	65.63 \pm 24.64
Landrace	84.56 \pm 1.29 ^{ab}	37.56 \pm 2.24 ^f	53.50 \pm 1.65 ^e	79.25 \pm 2.85 ^c	85.25 \pm 0.88 ^{ab}	88.00 \pm 0.86 ^a	71.35 \pm 19.48
Average	83.50 \pm 1.89	31.72 \pm 6.64	46.65 \pm 9.41	76.87 \pm 4.07	84.59 \pm 1.29	87.62 \pm 0.86	68.49 \pm 21.16

a,b,c,d,e,f,g LSMeans within the same row and column with different superscripts differ significantly ($P<0.01$)

0% = fresh semen

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลลด์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ พบว่าพันธุ์พ่อสุกรไม่มีผลต่อลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ ($P>0.05$) ในลักษณะความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ แต่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$) ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลด์ พบว่า ความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลด์ คือระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลลด์ ไม่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นน้ำเชื้อ กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ($P>0.05$) แต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเครือข่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรกนก พรหมเทพ. 2552. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิโคที่ผ่านการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของ เพอร์คอลลล์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542. คู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สัตว์เศรษฐกิจแมกกาซีน.
- Arcidiacono, A., A.C. Wait and M. Balerna. 1983. The use of percoll gradient for the prepatation of subpopulations of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 6 : 433-445.
- Avery, B. and T. Greve. 1995. Impact of percoll on Bovine spermatozoa Used for *in vitro* insemination. *Theriogenology.* 44 : 871-878.
- Bearden, H. J. and J.W.Fuquay.1997. *Applied Animal Reproduction.* 4th ed. Prentice Hall, Inc, New Jersey.
- Bollendorf, A., J.H. Check, D. Katsoff and D. Lurie. 1994. Comparision of direct swim-up, mini – percoll, and sephadex G10 separation procedures. *Arch. Androl.* 32 : 157-162.
- Brook, D.E. 1990. Biochemistry of male accessory gland, pp. 291-303. In G.E. Lammin. *Marshall's Physiology of Reproduction.* Vol.2, 4th ed. Churchill Livingstone, London.
- Grant, S.A., S.E. Long and T.J. Parkinson. 1994. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation. *J. Reprod. Fertil.* 100 : 477-483.
- Hyne, R.V., A. Stojanoff, G.N. Clarke, A. Lopata and W.I.H. Johnston. 1986. Pregnancy from *in vitro* fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by gradient centrifugation. *Fertil. Steril.* 45 (1) : 93-96.
- Iwasaki, S., Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara. 1988. Sex ratio of early embryo fertilizd *in vitro* with spermatozoa separated by percoll. *Theriogenology.* 30 (6) : 1191-1198.
- Kaneko, S., S. Oshio, K. Kobanawa, T. Kobayashi, H. Mohri and R. Iizuka. 1986. Purification of human sperm by a discontinuous percoll density gradient with an innercolum. *Bio. Reprod.* 35 : 1059-1063.
- Kaneko, S., H. Sato, K. Kobanawa, S. Oshio, T. Kobayashi and R. Iizuka. 1987. Continuous-step density gradient discontinuous for the selective contration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. *Arch. Androl.* 19 : 75-84.
- Li, P., B. Dzyuba, M. Hulak, M. Rodina, S. Boryshpolets, Z.H. Li and O. Linhart, 2010. Percoll gradient separation of cryopreserved common carp spermatozoa to obtain a fraction with higher motility velocity and membrane integrity. *Theriogenology.* 74 : 1356-1361.
- McCluer, R.D., L. Nunes and R. Tom. 1989. Semen manipulation : improve sperm recovery and function with a two layer percoll gradient. *Fertil. Steril.* 51(5) : 874-877.
- Mehmood, A., M. Anwar and S.M. Saqlan Naqvi. 2009. Motility acrosome integrity membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.* 111 : 141-148.
- Mohri, H., S. Oshio, S. Kaneko, T. Kobayawshi, and R. Iizuka. 1987. Separation characterization of mammalian X- and Y-bearing sperm, pp. 469-481. In H. Mohri, *New Horizon in sperm cell research.* Gordon and Breach Sci. Publ, Boston.
- Parrish, J.J., A. Krogenaes and J.L.S. Parrish. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 44 : 859-869.
- Pickering, S.J., T.P. Braude, V.N. Bolton and G.A.G. Gresham. 1989. Are human spermstozoa separated on percoll density gradient safe for therapeutic use. *Fertil. Steril.* 51 : 1024-1029.
- Pousette, A., E. Akerlof, L. Rosenborg and B. Fredricsson. 1986. Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int. J. Androl.* 9 : 1-13.
- Resende, M.V., M.B. Bezerra, F. Perecin, A.O. Almeida, A.C. Lucio and V.F.M.H. Lima. 2009. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optipper density gradient : Effect in sperm viability and *in vitro* embryo production. *Anim. Brasileira.* 10 : 581-587.
- Wilson, K. and J.M. Walker. 1994. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry.* Cambridge University, London.