



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปฏิสนธิภายในและภายนอกร่างกายของน้ำเชื้อช้างแะแข็งหลังการอุณหละลาย

โดย อ.น.สพ.ดร.สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปฏิสนธิภายในและภายนอกร่างกายของน้ำเชื้อช้างแข็งหลังการอุณหสลาย

โดย

อ.น.สพ.ดร.สิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นักวิจัยที่ปรึกษา

ผศ.ดร.กุลณสรณ์ สายขุน

โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5280087

Project Title : การปฏิสนธิภายในและภายนอกร่างกายของน้ำเชื้อช้างแช่แข็งหลังการอุณหละลาย
(In vivo and in vitro fertilization of frozen-thawed elephant spermatozoa)

Investigator : อ.น.สพ.ดร. สิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : fvetnit@ku.ac.th, nthongtip@yahoo.com

Project Period : 2 ปี (16 มีนาคม 2552 ถึง 15 มีนาคม 2554)

บทคัดย่อ

เป็นเวลากว่าสองทศวรรษที่การผสมเทียมช้างไม่ประสบความสำเร็จ จนกระทั่งในปี 1999 Hildebrandt และคณะ ได้ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นสำเร็จทั้งในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา จากนั้นเป็นต้นมาก็มีรายงานความสำเร็จตามมาเรื่อยๆ แต่ก็ยังไม่รายงานความสำเร็จของการผสมเทียมช้างเอเชียหรือช้างแอฟริกาด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเลย ซึ่งต่อมาในปี 2009 Thongtip และคณะ ก็ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมช้างเอเชียด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นครั้งแรกในโลก แต่อย่างไรก็ตามการผสมเทียมช้างด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งก็ยังมีอัตราความสำเร็จที่ต่ำมาก ทั้งนี้สาเหตุสำคัญเนื่องมาจากคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุณหละลายยังไม่ดีพอ จึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งให้ดีขึ้น ในรายงานนี้เป็นการพยายามทำการผสมเทียมช้างด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเพิ่มเติม แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่ประสบความสำเร็จเลย ทั้งนี้สาเหตุหลักน่าจะมาจากการที่น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุณหละลายมีคุณภาพที่ไม่ดีพอ ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุณหละลายมีคุณภาพไม่ดีพอ อาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้มีคุณภาพไม่ดีพอต่อการนำไปเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง ดังนั้นในรายงานนี้จึงศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสด โดยทำการตรวจวัดปัจจัยสองอย่างในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิ ได้แก่ ปริมาณของแคลเซียมและระดับของการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ ผลที่ได้พบว่าปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ ($P < 0.05$) และพบว่าเซลล์อสุจิในกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำสุด (0-5%) จะมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ตายและปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิ

สูงสุด และพบว่าปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ ($P < 0.05$) เช่นกัน นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งกลุ่มน้ำเชื้อออกเป็นกลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่ต่ำ ($<40\%$) กับกลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่สูง ($>40\%$) พบว่ากลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่สูงมีระดับของ MDA ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยสรุปแล้ว แม้ว่าจะไม่ประสบความสำเร็จในการผสมเทียม แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษานี้ทำให้เราเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ของช้างมากขึ้น

คำสำคัญ: ช้าง, การผสมเทียม, น้ำเชื้อ, แคลเซียม, มาลอนไดอัลดีไฮด์

Abstract

More than two decades, the artificial insemination (AI) in both elephant species; African and Asian were not success. Until Hidebrandt *et al* (1999) reported the success of AI with chilled semen in both species, the series of the accomplishment of AI with chilled semen were shown. However, the AI with frozen-thawed semen was never success. Until the year 2009, Thongtip *et al* (2009) reported the first successful AI with frozen-thawed semen in Asian elephant in the world. However, the rate of fertilization is very low. The main reason may be due to the low quality of fresh semen and subsequent to the low quality of frozen-thawed semen. Then, the factors that might be involved with poor fresh semen quality i. e. seminal plasma calcium and the lipid peroxidation product; malondialdehyde (MDA) were studied. Calcium in seminal plasma was measured and analyzed by using Linear Regression. The results revealed that amount of calcium in seminal plasma was negative correlated with percentage of progressive motility ($p < 0.05$). Percentage of dead sperm and seminal calcium concentration was highest in low-motile group ($p < 0.05$). MDA levels were also negatively correlated with the percentages of progressive motility. Furthermore, when ejaculates were grouped according to motility scores into two groups; low- ($<40\%$) and high- percentage of progressive motility ($>40\%$), a significant difference was detected between the MDA means ($\pm$ SD) of the low- and high-percentages of progressive motility groups. In conclusion, eventhough the AI attempts were not success, the obtained datas about their semen quality provide beneficial information to better understanding of elephant reproduction in captivity.

Keywords : Elephant, artificial insemination, semen, calcium, malondialdehyde

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์สุจิข้างแช่แข็งภายหลังการอุ่นละลายด้วยการผสมเทียมร่วมกับการทดสอบประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์สุจิข้างแช่แข็งหลังการอุ่นละลายในห้องทดลอง
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อข้าง

วิธีทดลอง

1. ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อและการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากข้างพ่อพันธุ์จำนวน 10 เขือก เดือนละ 2 ครั้ง แล้วนำมาประเมินคุณภาพ เกณฑ์ในการคัดเลือกน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการแช่แข็งต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่าหรือเท่ากับ 80 % และมีความเข้มข้นของเซลล์สุจียน้อย 50×10^6 ตัว/มล. การแช่แข็งจะใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและสารเจือจางน้ำเชื้อสูตร TEST ที่ผสม Glycerol ลงไปสุดท้ายความเข้มข้นสุดท้าย 5 % การแช่แข็งใช้เทคนิคเดียวกับ Thongtip *et al* (2004) โดยสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรจะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนที่ 1 จะเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (0% cryoprotectants หรือ CPA) และส่วนที่ 2 จะเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งอยู่ 10 % (10% CPA) เมื่อได้น้ำเชื้อนำมาเติมสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1 ลงในน้ำเชื้ออย่างช้าๆ ที่ละหยดในอัตราส่วนที่ทำการคำนวณในการเจือจางน้ำเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (คำนวณให้สุดท้ายในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งขนาด 0.5 มล.จะมีเซลล์สุจิเท่ากับ 50×10^6 ตัว/มล.) จากนั้นนำสารเจือจางน้ำเชื้อในส่วนที่ 2 (10% CPA) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายผสมมาแบ่งเป็นสี่ส่วน แล้วเติมลงไปในสารละลายผสมอย่างช้าๆ ที่ละส่วนทุกๆ 15 นาทีจนหมด หลังจากนั้นเก็บสารละลายทั้งหมดที่เติมทุกอย่างสมบูรณ์แล้วไว้ในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสอีก 15 นาทีให้เกิดการปรับสมดุล เมื่อครบ 15 นาทีนำสารละลายทั้งหมดมาบรรจุลงในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งพลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Kruuse Ltd., Leeds, UK) ที่ทำเครื่องหมายของสารแต่ละชนิดแล้วอุดหลอดด้วย sealing powder (ARSTM, Chino, CA) เมื่อได้หลอดน้ำเชื้อครบตามจำนวนก็นำไปเรียงบนตะแกรงสำหรับอังหลอดน้ำเชื้อในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลวอยู่ โดยที่หลอดน้ำเชื้อจะอยู่สูงจากระดับไนโตรเจนเหลว 2.5 เซนติเมตร ทำการอังไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาทีแล้วคว่ำตะแกรงให้หลอดตกลงไปในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บหลอดใส่ในกระบอกเก็บน้ำเชื้อแล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวและทำการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างน้อย 7 วันก่อนนำมาอุ่นละลาย โดยการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) จะทำในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เช็ดให้แห้ง ทำการตัดหลอดน้ำเชื้อแล้วใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แบ่งน้ำเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิดทับด้วย cover slip แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไป

ข้างหน้าของเซลล์สุจิภายหลังการอ่อนละลายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope โดยทำการประเมินด้วยผู้วิจัยสองคนแล้วบันทึกเป็นค่าเฉลี่ย

2. การทดสอบประสิทธิภาพการปฏิสนธิน้ำเชื้อข้างแช่แข็งด้วยวิธีการผสมเทียม

2.1 คัดเลือกข้างเพศเมียในช่วงอายุ 15-45 ปีที่มีสุขภาพแข็งแรงและมีความสมบูรณ์พันธุ์ ไม่ตั้งท้องจำนวน 10 เชือก จากนั้นทำการอุตตร้าซาวด์ตรวจระบบสืบพันธุ์ในส่วนช่องคลอดมดลูก รังไข่ (ถ้าทำได้) เพื่อตรวจหาความผิดปกติต่างๆ ข้างที่ตรวจพบความผิดปกติจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง

2.2 การตรวจหาวงรอบการเป็นสัดและวันตกไข่ โดยทำการตรวจหาวงรอบการเป็นสัดและวันตกไข่ในข้างเพศเมียตามวิธีของ Brown *et al* (2000) โดยเจาะเลือดผ่าน ear vein ครั้งละ 15 มิลลิตร ทุกสัปดาห์ ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว ณ อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกและเก็บซีรัมใน Aliquot 1.5 มิลลิตร เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำซีรัมส่งตรวจวัดระดับฮอร์โมน Progesterone (P_4) ทุกสัปดาห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay (EIA) (Thitaram *et al.* 2008) เมื่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดลง จะบอกถึงการเริ่มเป็นสัดของข้าง จากนั้นทำการเก็บเลือดทุกวันตั้งแต่สัปดาห์ที่สองภายหลังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเริ่มลดลง (ระยะ interfollicular phase) เพื่อส่งซีรัมตรวจหาระดับของฮอร์โมน LH ทุกวันด้วยวิธี EIA ตามเทคนิคของ Thitaram *et al* (2008) เป็นเวลาประมาณ 30 วัน (ระยะ follicular phase) ในข้างจะมีการเกิดการขึ้นสูงของฮอร์โมนที่ชักนำให้เกิดการตกไข่หรือฮอร์โมน LH (LH peak) ต่างจากสัตว์ชนิดอื่น คือจะมีการเกิด LH peak 2 ครั้ง ห่างกันเฉลี่ย 21 วัน โดย LH peak ที่ 1 จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการลดต่ำลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ภายใน 1-2 สัปดาห์ ซึ่งในช่วง LH peak ที่ 1 นี้จะไม่มีการตกไข่ แต่จะต้องทำการเจาะเลือดเก็บซีรัมส่งตรวจทุกวันเพื่อใช้ในการคำนวณวันที่จะเกิด LH peak ที่ 2 ซึ่งจะเป็นช่วงที่ข้างตกไข่และกำหนดผสมเทียม เมื่อเกิดการตกไข่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งซึ่งจะแสดงการเริ่มหมดสัดของข้าง จากนั้นจะทำการเก็บเลือดทุกอาทิตย์เพื่อตรวจการตั้งท้องหลังการผสมเทียมต่อไป

2.3 ทำการผสมเทียม โดยการผสมข้างด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยผสมครั้งละ 3 วัน (วันก่อนเกิด LH peak 1 วัน, วันที่เกิด LH peak และหลังจากนั้น 1 วัน) ในการผสมแต่ละครั้งจะใช้สุจิที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังการอ่อนละลายไม่ต่ำกว่า 40% ความเข้มข้นของเซลล์สุจิไม่ต่ำกว่า 100×10^6 ตัว/มล. และใช้ปริมาตร อย่างน้อย 10 มล. (20 หลอด, 0.5 มล.) ทำการผสมเทียมโดยการใส่กล้องส่องตรวจลำไส้ใหญ่มนุษย์ขนาดความยาว 1.7 เมตร (endoscope) ทำการสอดผ่านทางช่องคลอดร่วมกับการกำหนดตำแหน่งโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonography) ผ่านทางทวารหนักโดยใช้ probe ขนาด 3.5 MHz ช่วยกำหนดตำแหน่งในการปล่อยน้ำเชื้อ การฉีดน้ำเชื้อใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มล. เป็นตัวฉีดน้ำเชื้อเข้าท่อผสมเทียมชนิดพิเศษที่สอดผ่าน working channel ของกล้อง endoscope การปล่อยน้ำเชื้อจะปล่อยที่ช่องเปิดที่ปากมดลูกแล้วใช้แรงดันจาก

กระบอกฉีดยาดันน้ำเชื้อเข้าไปในตัวมดลูก (Hildebrandt et al., 2000; Brown et al., 2004; Thongtip et al., 2006)

2.4 ทำการตรวจการตั้งท้อง ซึ่งในช่วงที่ตั้งท้องในระยะแรกจะไม่สามารถตรวจการตั้งท้องจากการสังเกตภายนอกได้ ดังนั้นจึงใช้วิธีการตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด โดยในช่วงปกติพบว่าค่าเฉลี่ยวงรอบการเป็นสัดอยู่ที่ 4 เดือน โดยแบ่งเป็นสองช่วงคือ ช่วง luteal phase ซึ่งกินเวลาประมาณสามเดือนและ follicular phase ซึ่งกินเวลาประมาณหนึ่งเดือน ในช่วง luteal phase ระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะคงอยู่ในระดับสูงที่ 1-2 ng/ml แต่เมื่อช่วงเข้าสู่ระยะการเป็นสัด (follicular phase) ระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะลดต่ำลงจนถึง 0.1 ng/ml และจะอยู่ในระดับต่ำนี้เป็นเวลาประมาณหนึ่งเดือน ซึ่งในช่วงนี้ช่วงเพศเมียจะยอมรับการผสมจากช่วงเพศผู้ การผสมพันธุ์จะสามารถเกิดขึ้นได้ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลาประมาณ 3-4 อาทิตย์ ช่วงเพศเมียจะมีการตกไข่ในช่วงท้ายของการเป็นสัด ระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการสร้างของ corpus luteum ในกรณีที่ช่วงเกิดการตั้งท้อง ระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะคงอยู่ในระดับ 2-8 ng/ml (ข้อมูลส่วนตัว) และไม่ลดลงสู่ระดับต่ำ ดังนั้นการตรวจระดับของระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดติดต่อกันเป็นเวลา 20 สัปดาห์ จะสามารถใช้ในการยืนยันการตั้งท้องในช่วงนี้ได้ นอกจากนี้การตรวจยืนยันโดยการใช้อัลตราซาวด์ผ่านทางทวารหนัก โดยใช้ probe ขนาด 3.5 MHz หลังการผสมเทียม 2-5 เดือน ก็สามารถใช้ในการช่วยยืนยันการตั้งท้องได้

3. การทดสอบประสิทธิภาพการปฏิสนธิน้ำเชื้อช่วงแช่แข็งด้วยวิธีการการปฏิสนธิภายนอก ร่างกาย ด้วยวิธี zona-free hamster eggs penetration assay ซึ่งรายงานนี้ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากไม่สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อช่วงได้

4. ทำการศึกษาปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสด จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิกับคุณภาพของน้ำเชื้อสดของช่วง โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิที่ต่างกัน

5. ทำการศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของช่วงเพิ่มเติมคือ การประเมินความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะ lipid peroxidation กับคุณภาพน้ำเชื้อของช่วงเอเชีย โดยทำการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ หรือ MDA ในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิที่แยกได้จากน้ำเชื้อของช่วงที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิที่แตกต่างกันด้วยวิธี Thiobarbituric Acid method

ผลการทดลอง

วัตถุประสงค์ของโครงการการปฏิสนธิภายในและภายนอกร่างกายของน้ำเชื้อข้างแช่แข็งหลังการอุณหละลายนี้เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิข้างแช่แข็งภายหลังการอุณหละลายด้วยการผสมเทียมร่วมกับการทดสอบประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิข้างแช่แข็งหลังการอุณหละลายในห้องทดลอง แต่เนื่องจากข้างที่ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อในโครงการจำนวน 9 เชือกของศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย สถาบันคชบาลแห่งชาติ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง มีคุณภาพน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่จะนำไปทำการแช่แข็งได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่ต่ำกว่า 60% ทำให้ไม่สามารถนำมาทำการแช่แข็งได้ มีเพียงน้ำเชื้อของสึดอใจใจเท่านั้นที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์ สามารถนำไปแช่แข็งได้จำนวน 150 หลอดในช่วงต้นของโครงการ และได้นำไปใช้ในการผสมเทียมให้กับพังงูมี อายุ 40 ปี เมื่อวันที่ 21 – 25 พฤษภาคม 2552 แต่ผลการตรวจท้องไม่พบการตั้งท้อง และในเดือนต่อมา น้ำเชื้อสึดอใจใจรีดเก็บได้จากสึดอใจใจก็มีคุณภาพลดต่ำลงจนไม่สามารถนำมาทำการแช่แข็งได้อีกเลย จึงทำให้โครงการต้องทำการสำรวจคุณภาพน้ำเชื้อในช้างจากแหล่งอื่นๆ โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากปลายมวงคลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี ซึ่งพบว่าช้างปลายมวงคลมีคุณภาพน้ำเชื้อเริ่มต้นที่ดีมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิสูงกว่า 60% ทุกครั้งที่ทำการรีดเก็บ จึงได้ทำการรีดเก็บไป 4 ครั้งในรอบหนึ่งปีที่ผ่านมา จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาทำการแช่แข็ง แต่ผลที่ได้พบว่ายังไม่สามารถทำการแช่แข็งแล้วได้คุณภาพหลังการอุณหละลายที่ดีเลย น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุณหละลายของปลายมวงคลมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่ต่ำมาก อยู่ในระดับที่น้อยกว่า 5% ทำให้ในช่วงหกเดือนหลังของโครงการยังไม่มีน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการผสมเทียมและนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ดังนั้นจึงได้ปรับโครงการบางส่วนโดยทำการศึกษาเพิ่มเติมในการหาปัจจัยที่นำจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสด จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิกับคุณภาพของน้ำเชื้อสดของช้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่ต่างกัน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเซลล์อสุจิในกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำสุด (0-5%) จะมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ตายและปริมาณแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิสูงสุด

ต่อมาในปี 2553 สถานการณ์ของคุณภาพน้ำเชื้อข้างก็ยังไม่ดีขึ้น น้ำเชื้อของช้างส่วนใหญ่ในโครงการมีคุณภาพต่ำมากจนไม่สามารถนำไปแช่แข็งได้ หรือในบางครั้งข้างบางเชือกมีคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดีพอที่จะนำไปแช่แข็ง แต่เมื่อทำการเจือจางและนำเข้าสู่ขบวนการแช่แข็งแล้วกลับมีคุณภาพลดลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถแช่แข็งต่อได้ หรือทำการแช่แข็งไปแล้วแต่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิภายหลังการอุณหละลายนั้นต่ำมาก จนไม่สามารถนำไปใช้ผสมเทียมหรือนำไปทดสอบการเจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (zona-free hamster eggs)

penetration assay) นอกจากนี้ น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บได้ในปี 2552 นั้นถูกนำไปใช้ในการผสมเทียมจนหมด ทำให้ไม่มีน้ำเชื้อแช่แข็งใช้งานเลย ด้วยความคาดหวังว่าจะได้น้ำเชื้อแช่แข็งเพิ่มในปี 2553 กลับไม่ได้ น้ำเชื้อแช่แข็งจากช่วงเชือกใดๆเลย แม้กระทั่งช่วงปลายมวงคลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวที่ทำการรีดเก็บเพิ่มอีกสองครั้ง แต่ก็พบกับปัญหาเช่นเดิมคือคุณภาพน้ำเชื้อเริ่มต้นดีแต่มื่อนำเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งแล้วคุณภาพลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่เซลล์สุมิจจะมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำลงจนเกือบเป็นศูนย์ภายในระยะเวลาเพียงสี่ชั่วโมงหลังการเจือจางและการลดอุณหภูมิไปที่ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นทางโครงการจึงได้ปรับการทำงานมาเป็นการศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดของช้างเพิ่มเติมคือ การประเมินความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะ lipid peroxidation กับคุณภาพน้ำเชื้อของช้างเอเชีย โดยทำการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ หรือ MDA ในน้ำเลี้ยงเซลล์สุมิจที่แยกได้จากน้ำเชื้อของช้างที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุมิจที่แตกต่างกันด้วยวิธี Thiobarbituric Acid method จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ MDA กับค่าคุณภาพน้ำเชื้อสองค่าคือ ร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุมิจและร้อยละของเซลล์สุมิจที่มีรูปร่างปกติ ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับของ MDA มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับค่าทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ($R = 0.2131$ และ 0.1685 ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งกลุ่มน้ำเชื้อออกเป็นกลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุมิจที่ต่ำ ($<40\%$) กับกลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุมิจที่สูง ($>40\%$) พบว่ากลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุมิจที่สูงมีระดับของ MDA ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ผลที่ได้รับแสดงให้เห็นว่า MDA สามารถใช้ในการช่วยตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อช้างที่มีคุณภาพต่ำที่มีสาเหตุมาจากการเกิด lipid peroxidation ได้ ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษานี้ทำให้เราเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ของช้างมากขึ้น

สำหรับในการผสมเทียมนั้น ในปี 2553 มีการผสมเทียมครั้งเดียวในช่วงเดือนพฤษภาคม ในช้างพังพุ่มพวงของสถาบันคชบาลแห่งชาติ โยไม่ได้ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม แต่ใช้น้ำเชื้อสดของปลายพะเหมของสถาบันคชบาลแห่งชาติ เช่นกัน แต่ผลที่ได้พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ ช้างพังพุ่มพวงไม่เกิดการตั้งท้อง

ตารางที่ 1 สรุปการผสมเทียมช้างในปี 2552 และ 2553

วันที่	แม่ช้าง	น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อช้าง	ผลตรวจการตั้งท้อง	สถานที่
19 – 24 มกราคม 2552	พังขอด (28 ปี)	สีดอตแดง (35 ปี) (post-thaw progressive motility ~ 40%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง
5 – 9 พฤษภาคม 2552	พังขอด (28 ปี)	สีดอตแดง (35 ปี) (post-thaw progressive motility ~ 40%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง
10 – 14 สิงหาคม 2552	พังขอด (28 ปี)	พลายทราย (post-thaw progressive motility ~ 35%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง
21 – 25 พฤษภาคม 2552	พังบุญมี (40 ปี)	สิดอใจใจ (20 ปี) (post-thaw progressive motility ~ 35%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง
26 – 30 สิงหาคม 2552	พังพุ่มพวง (28 ปี)	สีดอตแดง (35 ปี) (post-thaw progressive motility ~ 40%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง

ตารางที่ 2 สรุปการผสมเทียมช้างในปี 2553

วันที่	แม่ช้าง	น้ำเชื้อของพ่อช้าง	ผลตรวจการตั้งท้อง	สถานที่
25-28 พฤษภาคม 2552	พังพุ่มพวง (28 ปี)	พลายพะเหม่ (45 ปี) (Chilled semen, progressive motility ~ 40%)	ไม่ท้อง	สถาบันคชบาลแห่งชาติ จ.ลำปาง

ตารางที่ 3 แสดงค่าคุณภาพน้ำเชื้อของช้างเพศผู้ของสถาบันคชบาลแห่งชาติในปี 2552

Parameters	Mean $\pm$ SD
Progressive motility (%)	21.59 $\pm$ 24.61
Volume (ml)	7.48 $\pm$ 8.08
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	1,327.85 $\pm$ 643.04
Semen pH	7.15 $\pm$ 0.79
Abnormal morphology (%)	33.71 $\pm$ 22.13
Dead sperm (%)	59.15 $\pm$ 22.12

ตารางที่ 4 ค่าคุณภาพน้ำเชื้อของช้างเพศผู้ของสถาบันคชบาลแห่งชาติในปี 2553

Parameters	Mean $\pm$ SD
Progressive motility (%)	33.4 $\pm$ 27.10
Volume (ml)	24.2 $\pm$ 17.60
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	1,201.1 $\pm$ 619.9
Semen pH	7.18 $\pm$ 0.70
Normal morphology (%)	81.4 $\pm$ 15.90
Live sperm (%)	52.6 $\pm$ 26.70

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อของช้างที่รีดเก็บได้ด้วยวิธี manual collection นั้นมีคุณภาพเฉลี่ยต่ำและไม่สามารถคาดหมายถึงคุณภาพได้ คุณภาพของน้ำเชื้อช้างนั้นนอกจากจะแตกต่างกันไปในช้างแต่ละเชือกแล้วยังแตกต่างกันไปในน้ำเชื้อของช้างเชือกเดียวกันที่รีดเก็บได้ในแต่ละครั้งด้วย สิ่งหนึ่งที่น่าจะมีผลต่อคุณภาพที่ต่ำของน้ำเชื้อของช้างในโครงการก็คือ การจัดการที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยทางสถาบันคชบาลแห่งชาติได้เปลี่ยนวิธีการเลี้ยงช้าง โดยการให้ฝูงช้างให้อยู่ภายในสถาบันตลอดเวลา ไม่ได้มีการปล่อยให้น้ำช้างไปผูกไว้ในป่าธรรมชาติภายนอกสถาบัน เพื่อป้องกันการลักลอบตัดจากมิจนาชีฟ แต่การผูกช้างในป่านั้น ช้างจะได้โอกาสในการหากินพืชและสมุนไพรตามธรรมชาติ ซึ่งสมุนไพรบางอย่างอาจเป็นพืชที่บำรุงกำลังให้กับช้าง นอกจากนี้การที่ช้างได้ออกไปอยู่ในป่าจะทำให้เกิดการผ่อนคลายและอาจทำให้ช้างมีความเครียดลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระน้อยลง ซึ่งอาจส่งผลต่อเนื้อทำให้ระดับอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อลดลงได้ นอกจากนี้มีรายงานการศึกษา โดย กนกวรรณ และคณะ (2553) ที่นำน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิและซีรัมที่ได้จากกลุ่มเดียวกันไปทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสด้วยวิธี ELISA และตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องตรวจวัดปริมาณกลูโคส Reflotron จากนั้นจะนำเอาข้อมูลทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์กันโดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีสร้างเมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างคู่ของตัวแปรทุกตัว (Correlation Matrix) ผลการวิเคราะห์พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิสัมพันธ์กับระดับกลูโคสในซีรัมและ $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของเซลล์สุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r^2 = 0.4344$ และ 0.4636 ตามลำดับ) นอกจากนี้ระดับน้ำตาลกลูโคสในซีรัมสัมพันธ์กับค่า $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของเซลล์สุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r^2 = 0.3425$) และเมื่อนำมาหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิ โดยแบ่งออกเป็นสามกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่หนึ่งคือกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิต่ำ (0-10%) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิปานกลาง (11-50%) และกลุ่มที่สามคือกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิสูง (>50%) เทียบกับระดับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสทั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิและในซีรัมโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ผลที่ได้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$) ระหว่าง $\log_{10}$ ความเข้มข้นของเซลล์สุจิกับระดับน้ำตาลกลูโคสในซีรัม โดยช้างกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์สุจิสูงจะมีระดับน้ำตาลกลูโคสในซีรัมและมีความเข้มข้นของเซลล์สุจิสูงกว่า ซึ่งจากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าช้างที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดที่มากกว่าอาจเป็นผลมาจากการที่ช้างได้รับอาหารที่มากกว่าหรือมีปริมาณของสารอาหารที่นำไปสร้างเป็นกลูโคสในกระแสเลือดมากกว่า ทำให้มีสารให้พลังงานไปกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สุจิได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามในรายงานดังกล่าว ทางคณะผู้ทำการศึกษาไม่ได้ควบคุมปัจจัยเรื่องการกินอาหารของช้างก่อนทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมเลย ปัจจัยหนึ่งน่าจะมาจากคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุณหภูมิละลายนั้นมีคุณภาพต่ำเกิน ในการผสมเทียมแต่ละครั้งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิไม่เกิน 40% ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการประสบความสำเร็จในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิสูงถึง 60% (Thongtip *et al.*, 2009) ดังนั้นหากมีน้ำเชื้อแช่แข็งที่คุณภาพน้ำเชื้อต่ำกว่า 60% ก็ไม่ควรที่จะพิจารณานำมาใช้ในการผสมเทียม นอกจากนี้แม้ว่าจะใช้สารละลายน้ำเชื้อ สารเคมีและเทคนิคในการแช่แข็งแบบเดียวกับที่เคยใช้ได้ผลเป็นอย่างดีได้แก่ สูตร TEST + Glycerol 5% (Thongtip *et al.*, 2004; Sa-ardrit *et al.*, 2006) แต่กลับไม่สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อของช้างบางเชือกได้ โดยเฉพาะช้างพลายมงคลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ปัจจัยที่เกี่ยวข้องอาจจะเกิดจากปัจจัยของตัวช้างเองที่ไม่สามารถทนต่อกระบวนการแช่แข็งได้ ซึ่งเคยมีรายงานการเกิดขึ้นในสุกรที่มีลักษณะการที่ไม่สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อได้ และพบว่ามีปัจจัยภายในในระดับพันธุกรรมที่อาจเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ดังกล่าว (Holt *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาในระดับพันธุกรรมของช้างต่อไป แต่ที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งก็คือช้างที่เคยแช่แข็งน้ำเชื้อได้ แม้ว่าตอนเริ่มต้นจะมีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดีพอเพียงพอต่อการนำไปเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง แต่เมื่อเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งแล้วกลับมีการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถแช่แข็งได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยเห็นว่าการที่ช้างได้รับสารอาหารที่ไม่สมบูรณ์อาจทำให้ขาดโมเลกุลหรือสารเคมีบางอย่างที่ช่วยในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นสารกลุ่มใด ซึ่งต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ควรมีการศึกษาถึงโภชนาการของช้างอย่างละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งช้างที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ ควรได้รับสารอาหารที่ต้องการอย่างเต็มที่
2. ควรหาวิธีให้ช้างได้ผ่อนคลายความเครียด โดยอาจนำช้างไปผูกไว้ในป่าธรรมชาติบ้าง และจัดระบบเวรยามในการดูแลการลักลอกลักตัดงา
3. ควรมีการศึกษาในระดับพันธุกรรมของช้างเกี่ยวกับพันธุกรรมของการทนต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อ
4. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลหรือสารเคมีบางอย่างที่ช่วยในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ เกิดวุฒิ, จรรยาพร กาวิชัย, ปิยธิดา อาจอ่ำ, พิจิกา สุกใส, วรณิศา มีภู, สิทธิเดช มหาสวังกุล, ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์ และสิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช. 2553” การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของกลูโคสและฟรุกโตสในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิและสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ใน รายงานปัญหาพิเศษของนิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2553.
- นิกร ทองทิพย์, ศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช, ทวีโชค อังควาณิช, สิทธิเดช มหาสวังกุล, ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์, วุฒิวงศ์ ธีระพันธ์, มังกร ดำยั้ง, พรชัย สัญจิตติเสรี, อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์. 2544. การศึกษาเบื้องต้นถึงลักษณะน้ำเชื้อของช้างเลี้ยงในประเทศไทย, น. 312-315. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิกร ทองทิพย์, อภิเชก คงศิลา, ดารกา ทองไทยนนท์, รติกร บุตรชา, วรุฒ วงศ์กภาพสิน, ศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช, ทวีโชค อังควาณิช, สิทธิเดช มหาสวังกุล, ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์, มังกร ดำยั้ง, มาโนชญ์ ยินดี. 2545. อุณหภูมิและสารละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อช้างจากการรีดเก็บด้วยวิธี manual collection, น. 305-311. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สิทธิเดช, 2542 . เอกสารเผยแพร่ “สถานการณ์ของช้างในประเทศไทย” ศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ ลำปาง
- Brahmkshtri, B.P., Edwin, M.J., John, M.C., Nainar, A.M. and Krishnan, A.R. 1999. Anim. Reprod. Sci. 54. 159-168.
- Brown, J. L, Goritz, F., Pratt-Hawkes, N., Hermes, R., Galloway, M., Graham, L. H, Gray, C., Walker, S. L, Gomez, A., Moreland, S., Murray, S., Schmitt, D. L, Howard, J., Lehnhardt, J., Beck, B., Bellem, A., Montali, R. and Hildebrandt, T. B. 2004. Successful artificial insemination of an Asian elephant at the National Zoological Park. Zoo Biology. 23 [1]. 45-63.
- Brown, J. L. 2000. Reproductive Endocrine Monitoring of Elephants: An Essential Tool for Assisting Captive Management. Zoo Biology .19:347-367.
- Comstock, K.E., Wasser, S. K. and Ostrander, E. A. 2000. Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the African elephant (*Loxodonta africana*). Mol. Ecol. 9: 993 – 1011.
- Christensen, C.L., Schmidt, M.J., Hess, D.L. and Alak, B.M. 1993. Oocyte nuclear maturation in vitro in the African (*Loxodonta africana*) and Asian elephant (*Elephas maximus*). Biol Reprod. 48 (suppl.1): 80. Abstract.

- Detkanlaya, O., Thanathattagram, K., Sriussadaporn, S., Kittinoraset, S., Putrasreni, A., Likitchaikul, A., Saikhun, J., Sa-ardrit, M., Kasemsuwan, Mahasawangkul, S., Angkawanish, T., Jansitthiwate, S., Kornkaewrat, K. and Thongtip, N. 2004. Evaluation of Post-thaw Asian Elephant Spermatozoa: The Effect of Equilibration Time on Viability, Acrosome Integrity and Mitochondrial Activity. Programme and abstracts of case study annual conference of six year student, Faculty of Veterinary Medicine, Kasesart university, Bangkok, Thailand.
- Eggert, L. S., Ramakrishnan, U., Mundy, N. I. and Woodruff, D. S. 2000. Polymorphic microsatellite DNA markers in the African elephant (*Loxodonta africana*) and their use in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Molecular Ecology*, 9, 2223–2225.
- Fernando, P., Vidya, T. N. C. and Melnick, D. J. 2000. Isolation and characterisation of tri- and tetranucleotide microsatellite loci in the Asian elephant, *Elephas maximus*. *Mol Ecol Notes* 1: 232–233
- Gadea, J. 2004. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*.
- Graham, L. H., Bandob, J., Gray, C. and Buhr, M. M. Liquid storage of Asian elephant (*Elephas maximus*) sperm at 4 °C. 2004. *Animal Reproduction Science*. 80. 329–340.
- Heath, E., Jeyendran, R.S. and Graham, E.F. 1983. Ultrastructure of spermatozoa of the Asiatic elephant (*Elephas maximus*). *Zbl Vet Med C Anat Histol Embryol*. 12: 245-252.
- Hildebrandt, T.B. 2000. Artificial Insemination (AI) of an Asian Elephant (*Elephas maximus*). In, Assessment and Management of Reproductive System in Asian Elephant. Proceeding of the Workshop, Lectures and Survey in Reproduction Biology of Asian Elephant May 3-16, 2000 Thailand, Mahidol University, Nakornprathom, pp. 125.
- Holt, W.V., Medranob, A., Thurston, L.M. and Watson, P.F. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*. 63 .370–382
- Howard J.G., M. Bush, V. de Vos and D.E. Wildt. 1984. Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging African elephant (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fertil*. 72: 187-195.
- Howard J.G., M. Bush, V. de Vos and D.E. Wildt. 1986. Influence of cryoprotective diluent on post-thaw viability and acrosomal integrity of spermatozoa of the African elephant (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fertil*. 78: 295-306.
- Jainudeen, M.R., J.F. Eisenberg and J.B. Jayasinghe. 1971. Semen of the Ceylon elephant, *Elaphas maximus*. *J. Reprod. Fertil*. 24: 213-217.

- Jones, R.C. 1973. Collection, motility, and storage of spermatozoa from the African elephant, *Loxodonta africana*. Nature. 243: 38-39.
- Kitiyinant, Y., Schmidt, M.J. and Pavasuthipaisit K. 2000. Evaluation of sperm acrosome reaction in the Asiatic elephant. Theriogenology 53:887-896.
- Nyakaana, S. and Arctander, P. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the African elephant, *Loxodonta africana*. Mol. Ecol. 7: 1431–1439
- Opaskornkul, P., Wongkalasin, W., Boontong, P., Kornkaewrat, K., Thongtip, N., Saikhun, J. and Pongsopawijit, P. 2005. Effect of vitamin E and C on preservation of motility, membrane and acrosome integrity of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa during storage at 4 °C. Programme and abstracts of 6th case study conference of six year student, Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University.
- Price, P., Bradford, J. and Schmitt, D. 1986. Collection and semen analysis in Asian elephant. Proceeding of Am.Assoc.Zool.Parks Aquar.pp.310-311.
- Rogers, B.J., Perrault, S.D., Bentwood, B.J., Maclarville, C., Hale, R.W., Soderdahl, D.W. 1983. Variability in human-hamster in vitro assay for fertility evaluation. Fert. Steril. 39: 204-211.
- Schmidt, 1986. Proboscidae. In Zoo and Wildlife Medicine. Fowler (eds.). Philadelphia.
- Schmitt, D.L. and Hildebrandt, T.B., 1998. Manual collection and Characterization of semen from Asian elephant (*Elyshas maximurs*), J. Animal Reproduction Science Vol.53. 309-314
- Schmitt, D.L., Hildebrant, T.B., Hermes, R. And Goritz, F. 2001. Assisted reproductive technology in elephants. In: Proc 1st Int Symp Assisted Reprod Technol Conservation Genet Manage Wildlife, Omaha's Henry Doorly Zoo;15-17.
- Schmitt, D., Krywko, R., Reichard, T. A., Shellabarger, W., Bailey, K., and Short, J. 2001. Surgical approach to artificial insemination in elephants. Proceedings American Association of Zoo Veterinarians, American Association of Wildlife Veterinarians, Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, and the National Association of Zoo and Wildlife Veterinarians Joint Conference. USA. 1. 338.
- Takahashi, Y., Nihayah, M., Hishinuma, M., Jainudeen, M.R., Mazni, O.A., Mori, Y., Kanagawa, H. 1989. Preliminary study of buffalo sperm penetration into zona free hamster eggs after treatment with calcium ionophore A₂₃₁₈₇. Jpn. J. Vet. Res. 37: 161-166.

- Tateno, H., Akaike, M., Fukui, Y., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. 1990. A method for chromosome analysis of ram spermatozoa using zona-free hamster oocytes. *Theriogenology*. 34: 845-852.
- Thitaram C, Thongtip N, Somgird C, Colenbrander B, van Bortel D. C. J., van Steenbeek F. and Lenstra J. A. Evaluation and selection of microsatellite markers for an identification and parentage test of Asian elephants (*Elephas maximus*). *Conserv Genet*; 2007: DOI 10.1007/s10592-007-9406-z.
- Thitaram, C., J. L. Brown, et al. 2008. Seasonal effects on the endocrine pattern of semi-captive female Asian elephants (*Elephas maximus*): timing of the anovulatory luteinizing hormone surge determines the length of the estrous cycle. *Theriogenology*. 69 (2): 237-44.
- Thongtip, N., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Kongsila, A., Angkawanich, T., Jansittiwate, Thitaram, C. and Phongsopavijit, P. 2003. Frozen semen artificial insemination in an Asian elephants (*Elephas maximus*) using endoscope and ultrasound guide. The 41th Kasetsart University Animal Conference, Bangkok, Thailand
- Thongtip N.; Kornkaewrut K.; Mahasawangkul S.; Thitaram C.; Saikhun J.; Kalamapichitr A.; Songsasen N.; Pinyopumintra T. and Pinyopumintra A. 2004. The importance of semen cryopreservation for Asian elephant breeding programmes in Thailand. Programme and Abstracts 15th symposium on Tropical Animal Health and Production. Oct 29, 2004. Utrecht University, The Netherlands. pp. 32-36.
- Thongtip N, Saikhun J, Damyang M, Mahasawangkul S, Suthunmapinata P, Yindee M, Kongsila A, Angkawanish T, Jansittiwate S, Wongkalasin W, Waijwalkul W, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, Pinyopummin A. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometry: the effects of extender and cryoprotectant. *Theriogenology*. 62 (3-4): 748-60.
- Thongtip, N., Mahasawangkul, S., Thitaram, C., Pongsopavijitr, P., Kornkaewrat, K., Saikhun, J., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Rungsri, R., Boonprasert, K., Somkird, C., Songsasen, N., Waijwalkul, W. and Pinyopummin, A. 2006. First report of pregnancy by artificial insemination of an Asian elephant in Thailand. In 2nd Symposium on Animal Reproduction: Trend of Biotechnology for Animal Reproduction: From Basic to Advance, Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University. March, 27-28, Bangkok, Thailand.
- Thongtip, N., Mahasawangkul, S., Thitaram, C., Pongsopavijitr, P., Kornkaewrat, K., Saikhun, J., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Rungsri, R., Boonprasert, K., Somkird, C.,

Songsasen, N., Wajjwulku, W. and Pinyopummin, A. 2006. First report of pregnancy by artificial insemination of an Asian elephant in Thailand. In 2nd Symposium on Animal Reproduction: Trend of Biotechnology for Animal Reproduction: From Basic to Advance, Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University. March, 27-28, Bangkok, Thailand.

Yanagimachi, R. 1984. Zona free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 10: 187-232.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

- 1.1 Somsajee Sivilaikul, Amornrat Jitprom, Ajaree Kularb, Kornchai Kornkaewrut, Piyawan Suthanmaphinuth, Sittidet Mahasawangkul, Kulnasan Saikhun, Worawidh Wajjwalku, Sitthawee Thongtipsiridech. 2010. Relationship between Seminal and Serum Calcium Concentration with Semen Quality in the Asian Elephant (*Elephas maximus*). Thai J. Vet. Med. 2010. 40(3): 251-255.
- 1.2 Podjana Imrat, Thanida Srihawong, Sittidet Mahasawangkul, Piyawan Suthanmapinanth, Chanintr Tirawattanawanich, Kulnasan Saikhun, Anuchai Pinyopummin¹ and Sitthawee Thongtipsiridech. Seminal plasma MDA concentrations correlate negatively with semen quality in Asian elephants. Submitted to Thai J. Vet. Med. 2010.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
ไม่มี
- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
ไม่มี
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
ทำให้เกิดความตื่นตัวของประชาชนในการอนุรักษ์ช้าง
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
มีการพัฒนาการเรียนการสอนและการสร้างนักวิจัยใหม่

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

- 3.1 กนกวรรณ เกิดวุฒิ, จรรยาพร กาวิชัย, ปิยธิดา อาจอ่ำ, พิจิกา สุกใส, วรณิศา มีภู, สิทธิเดช มหาสางกุล, ปิยวรรณ สุธรรมมาภินันท์ และสิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช.

2553” การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของกลูโคสและฟรุกโตสในน้ำเลี้ยง
เซลล์สุจิและชีรั่มกับคุณภาพน้ำเชื้อช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ใน รายงาน
ปัญหาพิเศษของนิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประจำปี 2553.

Relationship between Seminal and Serum Calcium Concentration with Semen Quality in the Asian Elephant (*Elephas maximus*)

Somsajee Sivilaikul¹ Amornrat Jitprom¹ Ajaree Kularb¹ Kornchai Kornkaewrut¹

Piyawan Suthanmaphinuth¹ Sittidet Mahasawangkul² Kulnasan Saikhun⁵

Worawidh Wajjwalku¹ Sitthawee Thongtipsiridech^{1, 3, 4*}

Abstract

The purpose of this study is to identify the relationship of calcium concentration in seminal plasma on elephant semen quality including of volume, concentration, pH and percentage of progressive motility, dead sperm and abnormal morphology, respectively. Semen collection and evaluation were done in 9 elephants of Thai Elephant Conservation Centre, National Elephant Institute, Forest Industry Organization at Lampang. Calcium in seminal plasma was measured by using colorimetric method. Data were analyzed by using Linear Regression. The results revealed that amount of calcium in seminal plasma was negative correlated with only percentage of progressive motility ($p < 0.05$). Ejaculates were separated into three groups based on their progressive motility percentage including of low, moderate and high-motile semen (0-5%, >5-40% and >50%, respectively) and analyzed by using Repeated measure ANOVA. The results revealed that percentage of dead sperm and abnormal morphology and concentration of calcium in seminal plasma of all groups were significantly difference ($p < 0.05$). Percentage of dead sperm and seminal calcium concentration was highest in low-motile group ($p < 0.05$). The highest percentage of abnormal morphology was also found in the low-motile group ($p < 0.05$). However, serum calciums were not different among each group. Thus, calcium in seminal plasma may be effected to semen quality; i.e. progressive motility of Asian elephant. However, there are other factors that can influence elephant semen quality, thus, more information are needed to improve the better knowledge in male elephant reproductive biology.

Keywords: Asian elephant (*Elephas maximus*), calcium, semen quality

¹Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus Nakhonpathom, 73140, Thailand.

²Thai Elephant Conservation Centre, National Elephant Institute, Forest Industry Organization, Hang Chart, Lampang, 52000, Thailand.

³Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus Nakhonpathom 73140, Thailand.

⁴Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand.

⁵Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhonpathom, 73140, Thailand.

Corresponding author E-mail: fvetnit@ku.ac.th, nthongtip@yahoo.com

บทคัดย่อ

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิและซีรัมกับคุณภาพของน้ำเชื้อช้างเอเชีย

โสมศจี ศิวลิกุล¹ อมรรรัตน์ จิตรพรหม¹ อาจารย์ กุหลาบ¹ กรไชย กรแก้วรัตน์¹

ปิยวรรณ สุธรรมานันท์¹ สิทธิเดช มหาสว่างกุล² กุลณสรณ์ สายขุน⁴ วรวิทย์ วัชชวัลคุ¹ สิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช^{1, 3, 4*}

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิกับค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่แสดงถึงคุณภาพของน้ำเชื้อช้างได้แก่ ปริมาตร (Volume) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% Progressive motility) ร้อยละตัวตาย (% Dead sperm) ร้อยละความผิดปกติของเซลล์สุจิ (% Abnormal morphology) และความเข้มข้นของเซลล์สุจิ (Concentration) ของศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ จังหวัดลำปาง จำนวน 9 เชือก วัดระดับแคลเซียมโดย Colorimetric method แล้วนำค่าที่ได้มาทดสอบหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Linear Regression พบว่ามีเพียงร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่มีความสัมพันธ์กับระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ($R^2 = 0.1721$) โดยเป็นความสัมพันธ์แบบแปรผกผัน จากนั้นเมื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 3 กลุ่ม คือ ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำ (0-5%) ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าปานกลาง (>5-40%) และ ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูง (>50%) แล้วนำค่าที่ได้มาทดสอบหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Repeated measure ANOVA พบว่าค่าเฉลี่ยของร้อยละตัวตาย และระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิในกลุ่มร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าเซลล์สุจิในกลุ่มร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำสุดจะมีค่าเฉลี่ยของร้อยละตัวตาย และระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิสูงสุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละความผิดปกติของเซลล์สุจิ พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกับกลุ่มที่มีร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าแคลเซียมในซีรัมของช้างทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ดังนั้นแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์สุจิน่าจะมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของน้ำเชื้อช้างอีกหลายปัจจัย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: ช้างเอเชีย แคลเซียม คุณภาพของน้ำเชื้อ

¹ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

² ศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย สถาบันคชบาลแห่งชาติ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ จ. ลำปาง

³ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

⁴ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักงาน

คณะกรรมการอุดมศึกษา

⁵ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: fvetnit@ku.ac.th, nthongtip@yahoo.com

Introduction

The Asian elephant is an important animal of Thailand. Although it risks to extinct has been listed as appendix I of Convention International Trade in Endangered Species (CITES) since 1972, however, their populations were progressively declined. The major causes for the decreasing of wild elephants are habitat loss and poaching. Therefore, it is an important for breeding captive elephants either by natural or artificial insemination (AI) to maintain or increase the populations as well as genetic

management. Due to the difficulties in transporting elephant bull for natural breeding, AI which routinely used in other mammalian species is interested.

It has been reported that elephant calves were successfully produced following AI with either fresh or chilled semen (Schmitt et al., 2001). We have reported the success of semen cryopreservation in the Asian elephant (Thongtip et al., 2004; Sa-ardrit et al., 2006), however, no elephant calf was born after AI with frozen-thawed semen. Recently, we have reported that pregnancy was established following AI with frozen-thawed semen (Thongtip et al., 2009), unfortunately, the embryo did not develop to term. It

is indicated the need of the improvement of cryopreservation technique. However, the core problem for establishment of semen bank for AI is low semen quality in fresh ejaculate. The underlying causes of poor sperm motility and non-motile sperm are still unclear (Thongtip et al, 2008). Seminal plasma is composed of secretions releasing from testicular, epididymis and accessory sex glands. It provides a nutrient medium in which essential for stimulating capacity and motility of spermatozoa (Mann, 1964; Elzanaty et al., 2002). It has been reported that semen of several mammalian species contained a high level of calcium (Ca), magnesium (Mg), zinc (Zn) and copper (Cu) (Mann, 1964; Abou-Shakra et al., 1989). Aberrant levels of Ca, Mg and other elements may influence semen quality thus affecting motility and fertilizing capacity (Hong et al., 1984; Sørensen et al., 1999; Wong et al., 2001). High concentration of Ca has been found in the prostatic and seminal vesicles secretions (Mann, 1964). It is an activator for the acrosome reaction in mammalian spermatozoa and cooperates in sperm motility (Hong et al., 1984). However, a relationship between Asian elephant semen quality with seminal calcium concentration have not been examined. The objective of this study was to investigate the relationship between calcium level in seminal plasma and semen quality of Asian elephant.

Materials and Methods

Chemicals: All chemicals in the present study were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma, St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

Animals: Nine elephant bulls (age range, 15-to 45-years-old) housed at the Thai Elephant Conservation Center (TECC), Forest Industry Organization (FIO), Lampang, Thailand were used in this study. The elephants were fed with grass, banana, sugar cane and free access to water. The experimental procedures were approved by Ethic Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand.

Semen collection and evaluation: Semen samples were collected twice monthly during May to July 2008 manual rectal stimulation as previously described (Schmitt and Hildebrandt, 1998). Ejaculates without urine contamination were analyzed for volume, sperm concentration, progressive motility, sperm viability and pH (Kidd et al., 2001). Semen samples contaminated with urine were excluded from this study. Sperm concentration was assessed using a hemocytometer. Progressive motility was visually assessed under a phase-contrast microscopy by two experienced investigators. Sperm morphology was assessed using a phase contrast microscope. Sperm viability (live/dead) was assessed following an eosin-nigrosin staining and at least 200 spermatozoa were counted per slide (Björndahl et al., 2003).

Seminal plasma and serum collection: Seminal plasma was collected from all elephant bulls. Semen

was centrifuged at 1,000 g for 10 min and the supernatant fluid was collected and stored at -20°C until analysis. For serum collection, blood sample was collected from an ear vein using a vacuum tube (Venoject®, Terumo, Tokyo, Japan). After blood clot for 1 to 2 hr, it was centrifuged at 1,000 g for 10 min and supernatant serum was collected, and stored at -20°C until analysis.

Calcium measurement: Calcium concentration both in serum and seminal plasma were analyzed using colorimetric method. The method is based on the metallochromogen Arsenazo III (Thermo Fisher Scientific Inc, Middletown, VA, USA). Arsenazo III was combined with calcium ions at pH 6.75 to form a highly colored chromophore and the absorbance was measured at 650 nm (Microlab 300, Vital Scientific NV, The Netherlands). Arsenazo III has high affinity ($K^o = 1 \times 10^{-7}$) for calcium ions (Bauer, 1981) without interference with other cations present in serum, plasma or urine. The sensitivity of the assay is 0.26 ΔA per mmol/l (0.065 ΔA per mg/dl).

Statistical analysis: The data were expressed as mean $\pm$ SE and were analyzed using SPSS 13.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The correlation between semen characteristics and seminal calcium level was analyzed using Linear Regression. The comparison of mean $\pm$ SE of seminal and serum calcium and semen characteristics among low-, moderate- and high motile were done using Repeated measure ANOVA. Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

A total of 54 attempts of semen collection were performed (Figures 1 and 2). Forty one ejaculates (75.92%) without urine contamination were obtained and 13 ejaculates (24.08%) contaminated with urine were discarded. The level of seminal calcium concentration was 9.21 ± 0.85 . The results showed that calcium level in seminal plasma was negative correlated with progressive motility ($R^2 = 0.1721$) ($p < 0.05$). Seminal calcium was not significantly correlated with sperm concentration, volume, pH and percentages of abnormal morphology and dead sperm ($R^2 = 0.0037, 0.0125, 0.0267, 0.1110$ and 0.0442 , respectively) (Table 1).



Figure 1. Semen collection by manual rectal stimulation in Asian elephant (*Elephas maximus*).

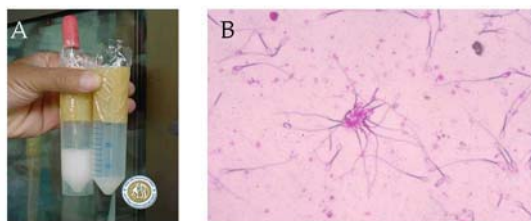


Figure 2. (A) Asian elephant (*Elephas maximus*) fresh semen collected by manual rectal stimulation (B) Asian elephant spermatozoa stained with Eosin-Nigrosin dye.

We have divided ejaculates obtained from each bull into 3 groups according to their progressive motility to examine the relationship between seminal parameters and serum and seminal calcium levels. Semen samples contained spermatozoa with 0-5%, >5-40% and >50% progressive motility were classified as low-, moderate- and high-motile groups, respectively. Percentage of sperm with abnormal morphology in low-motile group was significantly higher ($p<0.05$)

than of the high-motile group. The percentage of dead sperm was highest in low-motile group ($p<0.05$) and lowest in high-motile group ($p<0.05$). Similarly, seminal calcium was highest ($p<0.05$) in low-motile group and lowest ($p<0.05$) in high-motile group (Table 2). The serum calcium was not different among each group.

Table 1. Linear regression and Correlation reports of seminal calcium on semen qualities.

Parameters	Mean $\pm$ SD	R-squared	Correlation
Progressive motility (%)	21.59 $\pm$ 24.61	0.1721	-0.4149
Volume (ml)	7.48 $\pm$ 8.08	0.0125	0.1116
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	1,327.85 $\pm$ 643.04	0.0037	-0.0610
Semen pH	7.15 $\pm$ 0.79	0.0267	0.1634
Abnormal morphology (%)	33.71 $\pm$ 22.13	0.1110	0.3332
Dead sperm (%)	59.15 $\pm$ 22.12	0.0442	0.2103

Table 2. Mean $\pm$ SE of seminal and serum parameters of samples obtained during May through July 2008 in Low, Moderate and High-motile groups.

Parameters	Progressive motility		
	Low-motile (15 ejaculates)	Moderate-motile (15 ejaculates)	High-motile (11 ejaculates)
Volume (ml)	5.73 $\pm$ 1.50	10.33 $\pm$ 2.91	5.95 $\pm$ 1.21
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	1,306.80 $\pm$ 183.73	1,469.67 $\pm$ 167.84	1,163.18 $\pm$ 163.16
Semen pH	7.43 $\pm$ 0.24	6.94 $\pm$ 0.17	7.06 $\pm$ 0.22
Abnormal morphology (%)	44.67 $\pm$ 6.81 ^a	28.23 $\pm$ 4.53 ^{a,b}	26.23 $\pm$ 4.92 ^b
Dead sperm (%)	72.87 $\pm$ 5.21 ^a	54.90 $\pm$ 4.44 ^b	46.23 $\pm$ 6.60 ^c
Seminal calcium (mg%)	11.17 $\pm$ 1.62 ^a	9.67 $\pm$ 1.41 ^b	5.91 $\pm$ 0.50 ^c
Serum calcium (mg%)	10.14 $\pm$ 0.25	10.47 $\pm$ 0.28	10.51 $\pm$ 0.23

Discussion

Due to the problem of poor semen quality attributed from manual collection of Asian elephant remains unclear. The contributions for solving this problem are going on. In the present study, the non-urine contaminated ejaculates were successfully obtained similar to our previous study (75.92%) (Thongtip et al., 2008). An average of percentage of progressive motility (21.59 $\pm$ 24.61) and over all semen characteristics revealed the same trend as previously reported (Thongtip et al., 2008). Even though, from Linear Regression analysis showed the weak relationship between seminal plasma calcium and semen parameters. However, in this study we found the interesting results, the low-motile group had a significantly higher level of seminal calcium than moderate-motile and high-motile groups. Furthermore, moderate-motile sperm had a significant higher level of seminal calcium than high-motile sperm. It seems that calcium may be utilized by the elephant sperm during their movement and subsequently leads to the lowest level seminal calcium in the high-motile group. In contrast, the low-motile group had a significant highest of seminal calcium level. It might indicate that seminal calcium

was not used for sperm movement in this group. The reason may come from the percentage of dead sperm that was significantly highest in the low-motile group. Viable sperm has an ability to use both extracellular and intracellular calcium for stimulating the producing of the signaling of movement via 2 reactions including of cAMP/protein kinase A signaling pathway and calcium signaling pathway (Meseguer et al., 2004; Turner, 2006). Thus, it might be assumed that the non-viable sperm in low-motile group cannot use calcium in seminal plasma for movement leading to the higher level accumulated in seminal plasma. Furthermore, the leakage of intracellular calcium of dead sperm may be increased the extracellular concentration. Of these, seminal calcium level may be important factor for sperm movement in Asian elephant. In human, calcium has been shown to involve in sperm motility with apparently paradoxical effect as reported by Hong et al. (1984). Those authors suggested that during in the epididymis, calcium ions stimulated developing sperm, whereas, calcium ions inhibited sperm motility in ejaculated semen, contrary, a lower level of seminal calcium was found in the spinal cord injury men who had a lower motility than the neurological intact men (Salsabili et al., 2009). In the present study, in the low-motile, seminal calcium level was higher than serum

calcium. Our finding was in agreement with that reported in human semen (Salsabili et al., 2009). However, the serum calciums were not different among each group. The maintenance of serum calcium has been reported in the orphan elephant (Yartbantoong et al., 2000). However, more studies are needed for investigating the role of both serum and seminal calcium on semen parameters. In conclusion, calcium in seminal plasma may influence the semen quality; i.e. progressive motility of Asian elephant. However, there are other factors that can be affected to elephant semen quality, thus, more information were needed to improve the better knowledge in male elephant reproductive biology.

Acknowledgement

We thank Dr. Wah Wah Thein-Han and Asst. Prof. Dr. Naris Thengchaisri for critical reading and editing the manuscript. This project was funded by Thailand Research Fund (MRG5280087) and Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University. This research is supported by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO), Commission on Higher Education, Ministry of Education.

References

- Abou-Shakra, F.R., Ward, N.I. and Everand, D.M. 1989. The role of trace elements in male fertility. *Fertil. Steril.* 52: 307-310.
- Bauer, P.J. 1981. Affinity and stoichiometry of calcium binding by arsenazo III. *Anal Biochem.* 110(1): 61-72.
- Björndahl, L., Söderlund, I. and Kvist, U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod.* 18: 813-816.
- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J. and Giwercman, A. 2002. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* 17: 2904-2911.
- Hong, C.Y., Chiang, B.N. and Turner, P. 1984. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet.* 2: 1449-1451.
- Kidd, S.A., Eskenazi, B., Wyrobek, A.J. 2001. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* 75: 237-248.
- Mann, T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Methuen and Co. London, 493.
- Meseguer, M., Garrido, N., Pellicer, A., Simon, C., and Remohi, J. 2004. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J. Assisted Reproduction and Genetics.* 21: 445-451.
- Sa-Ardrit, M., Saikhun, J., Thongtip, N., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Faisaikarm, T., Kitiyanant, Y., Pavasuthipaisit, K. and Pinyopummin, A. 2006. Ultrastructure alteration of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int. J. Androl.* 29: 346-352.
- Salsabili, N., Mehraei, A. R. and Jalaie, S. 2009. Concentration of blood and seminal plasma elements and their relationships with semen parameters in men with spinal cord injury. *Andrologia.* 41: 24-28.
- Schmitt, D.L., and Hildebrandt, T.B. 1998. Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Anim. Reprod. Sci.* 53: 309-314.
- Schmitt, D.L., Hildebrandt, T.B., Hermes, R., Goritz, F. 2001. Assisted reproductive technology in elephants. *Proc 1st Int Symp Assisted Reproductive Technology for Conservation Genetic Management of Wildlife, Omaha's Henry Doorly Zoo.* 15-17.
- Sørensen, M.B., Bergdahl, I.A., Hjøllund, N.H., Bonde, J.P.E., Stoltenberg, M. and Ernst, E. 1999. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 331-337.
- Thongtip, N., Saikhun, J., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Suthunmapinate, P., Yindee, M., Kongsila, A., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Wongkalasin, W., Wajjwalkul, W., Kitiyanant, Y., Pavasuthipaisit, K. and Pinyopummin, A. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometer: the effect of extender and cryoprotectant. *Theriogenology.* 62: 748-760.
- Thongtip, N., Saikhun, J., Mahasawangkul, S., Kornkaewrat, K., Pongsopavijit, P., Songsasen, N. and Pinyopummin, A. 2008. Potential factors affecting semen quality in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17(6): 9.
- Turner, R.M. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fert. Dev.* 18: 25-38.
- Wong, P.Y.D., Lee, W.M. and Tsang, A.Y.F. 1981. The effects of sodium and amiloride on the motility of the caudal epididymal spermatozoa of the rat. *Cell. Mol. Life Sci.* 37: 69-71.
- Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M.W., Swinkels, D.W., Thomas, C.M.G., Copius- Peereboom, J.H.J., Merkus, H.M.W. M and Steegers-Theunissen, R.P.M. 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Toxicol.* 15: 131-136.
- Yartbantoong, N., Thongtip, N., Sanyathitiseree, P., Kasemsuwan, S. and Viriyarumpa, J. 2000. Diet formulary and feeding in orphan elephants. *Kasetsart Veterinarians J.* 10(2): 22-27.

**Seminal plasma MDA concentrations correlate negatively with
semen quality in Asian elephants**

P. Imrat², T. Srihawong^{4,5}, S. Mahasawangkul³, P. Suthanmapinanth¹, C. Tirawattanawanich¹,
K. Saikhun⁶, A. Pinyopummin¹ and S. Thongtipsiridech^{1,4,5*}

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhonpathom, Thailand.

² Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

³ National Elephant Institute, Forest Industry Organization, Lampang, Thailand

⁴ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakhonpathom, Thailand.

⁵ Center of excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok,
Thailand

⁶ Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhonpathom, Thailand.

*Corresponding author E-mail: fvetnit@ku.ac.th, [nthongtip@yahoo.com](mailto: nthongtip@yahoo.com)

Tel. (034-351901-3 Ext. 2101-3)

Fax: (034) 351405

Abstract

The aim of this study was to determine whether lipid peroxidation is correlated with semen quality in Asian elephant bulls. Malodialdehyde (MDA) in seminal plasma from ejaculates with varying percentages of progressive motility was measured using Thiobarbituric Acid method. Correlation between the MDA levels and percentages of progressive motility and normal morphology were performed. Results revealed that the MDA levels were negatively correlated with the percentages of progressive motility and normal morphology ($R = 0.2131$ and 0.1685 , respectively). Furthermore, when ejaculates were grouped according to motility scores into two groups; low- ($<40\%$) and high-percentage of progressive motility ($>40\%$), A significant difference was detected between the MDA means ($\pm$ SD) of the low- (20.7 ± 11.4 nmol/l) and high-percentages of progressive motility (14.4 ± 7.8 nmol/l) groups. The results obtained from this study suggested that MDA could be a potential parameter applicable for the assessment of elephant semen quality. It could as well be deduced from this study that oxidative stress might play a key role in low fertility due to poor semen quality in captive male elephants. This data provides beneficial information to better understanding of elephant reproduction in captivity.

Key words: Elephant, semen, oxidative stress, malondialdehyde

38

39

บทคัดย่อ

40

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อประเมินความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะ lipid peroxidation กับคุณภาพน้ำเชื้อ

41

ของช้างเอเชีย โดยทำการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ หรือ MDA ในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิที่แยกได้จากน้ำเชื้อ

42

ของช้างที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่แตกต่างกันด้วยวิธี Thiobarbituric Acid method จากนั้นทำ

43

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ MDA กับค่าคุณภาพน้ำเชื้อสองค่าคือ ร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์

44

อสุจิและร้อยละของเซลล์อสุจิที่มีรูปร่างปกติ ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับของ MDA มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับ

45

ค่าทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ($R = 0.2131$ และ 0.1685 ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งกลุ่มน้ำเชื้อออกเป็นกลุ่มที่มี

46

ร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่ต่ำ ($<40\%$) กับกลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์

47

อสุจิที่สูง ($>40\%$) พบว่ากลุ่มที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิที่สูงมีระดับของ MDA ที่ต่ำกว่าอย่างมี

48

นัยสำคัญ ผลที่ได้รับแสดงให้เห็นว่า MDA สามารถใช้ในการช่วยตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อช้างที่มีคุณภาพต่ำที่มี

49

สาเหตุมาจากการเกิด lipid peroxidation ได้ ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษานี้ทำให้เราเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์

50

ของช้างมากขึ้น

51

คำสำคัญ: ช้าง, น้ำเชื้อ, lipid peroxidation, มาลอนไดอัลดีไฮด์

52

53

54

Introduction

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

The risk of extinction of Asian elephant is critical and has increasingly gained a social concern. Their populations in the wild are threatened by habitat loss and fragmentation, decreased food sources and poaching. Self-sustained genetic diversity in avoidance of the inbreeding opportunity has become limited. Although, a reasonable number of elephants has been maintained in captivity, the breeding programs are currently poorly developed. The small number of bulls used in the breeding program raises the awareness of inbreeding risk in the captive population. To establish a countermeasure to such problem, assisted reproductive techniques, such as artificial insemination (AI) has been pursued to allow breeding between geographically distant animals. This is considered an indispensable element of a successful captive breeding program for the conservation of genetic diversity in this species (Schmitt et al., 2001). However, poor sperm motility is a common finding in domesticated Asian elephant bulls, which may restrict their suitability for AI and semen preservation. While the causes of poor sperm motility in Asian elephant remain unclear, in other species, lipid peroxidation has been proposed to play an important role in compromised sperm quality, primarily because the plasma membrane of mammalian sperm contains abundant polyunsaturated fatty acids susceptible to the attack by free radicals (Alvarez et al., 1987; Aitken et al., 1993; Sikka, 1996). On the other hand, sperm cells can be protected from oxidative damage by antioxidants such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, ascorbate, urate, α -tocopherol, pyruvate, glutathione, taurine and hypotaurine, which may be present in the seminal plasma (Saleh and Agarwal, 2002). Malondialdehyde (MDA) is a stable lipid peroxidation product of which elevated concentrations in the seminal plasma have been associated with reduced semen quality in other species such as human (Das

et al., 2009; Aitken et al., 1989), dog (Cassani et al., 2005) and ram (Andreea and Stela, 2010). The relationships between Asian elephant semen quality and MDA have however not yet been reported. The aim of this study was to determine whether lipid peroxidation is likely to contribute to poor semen quality in Asian elephant bulls by measuring MDA in seminal plasma from ejaculates with varying percentages of progressive motility.

Material and methods

Chemicals: All chemicals in the present study were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma, St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

Animals: Six elephant bulls (age range, 15 to 45 years old) housed at National Elephant Institute (NEI), Forest Industry Organization (FIO), Lampang, Thailand were recruited in this study. The elephants were fed with grass, banana and sugar cane and were allowed a free approach to water. The selection of the bulls used in this study was based on their previous history of semen quality. The bulls that gave more than eighty percent of collection success with the percentage of progressive motility of higher than 40% were selected.

Semen collection and evaluation: Semen samples were monthly collected from April – December, 2010 except November, by manual collection using the protocol previously described by Schmitt and Hildebrandt (1998). Ejaculates were immediately analyzed for volume, sperm concentration, progressive motility, sperm viability and pH (Kidd et al., 2001). Sperm concentration was determined using a hemocytometer. Progressive motility was visually estimated under a phase-contrast microscopy by two independent investigators. Sperm morphology was examined under a phase contrast microscope. Sperm viability (live/dead ratio) was counted by using an eosin-nigrosin staining. Two hundred spermatozoa were counted per slide (Björndahl et al., 2003). Due to the two day series of semen

collection, the semen quality data from the date that had a higher progressive motility were chosen in this study.

Seminal plasma and serum collection: Seminal plasma was collected from all ejaculates by centrifugation at 1,000 g for 10 min, then collected the supernatant. The obtained seminal plasma samples were frozen in Dry Shipper (CX 100 Cryo Express Taylor-Wharton, HCI Cryogenics B.V., Postbus, AC, HEDEL) and transported to the laboratory where they were stored at -20°C until analysis.

Seminal plasma MDA: MDA in the seminal plasma or seminal MDA was determined by using Thiobarbituric Acid (TBA) assay described by Yagi (1984). The reaction of MDA with TBA has been used to estimate the lipid peroxidation in biological material. The reaction reveals a red MDA-TBA adduct, the product of 2 mol of TBA plus 1 mol of MDA. The colored complex can be evaluated spectrophotometrically from its visible absorbance at the 532 nm. The values of MDA reactive material were shown as MDA quantities for plasma volume (nmol/ml).

Statistical analysis: Statistical analysis was performed by using SPSS 13.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The correlation between seminal MDA concentrations and percentage of progressive motility and normal morphology were analyzed by using Linear Regression. The comparison of mean $\pm$ SD of seminal MDA between low- and high-percentage of progressive motility groups were done by using t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

A total of forty eight attempts of semen collection were done in six bulls during eight months by which 40 ejaculates (90.91%) without urine contamination were obtained. The rest four attempts (9.01%) were un-ejaculates and ejaculates with urine contamination and therefore were excluded from this study. Mean $\pm$ SD of semen characteristics were shown in Table 1. The average of percentages of progressive motility, sperm concentrations, volumes, pH, percentages of live sperm, percentages of normal morphology and seminal MDA levels were $33.4 \pm 27.1\%$, $1201.1 \pm 619.9 \times 10^6$ sperms/ml, 24.2 ± 17.6 ml, 7.2 ± 0.7 , $52.6 \pm 29.7\%$, $81.4 \pm 15.9\%$ and 18.0 ± 10.3 nmol/l, respectively. The correlation between seminal MDA level and percentage of progressive motility and normal morphology showed the significant negative correlation between MDA concentrations and percentage of progressive motility and normal morphology ($R = 0.2131$ and 0.1685 , $P < 0.05$) (Table 2, Figure 1 and 2). Furthermore, when ejaculates were grouped according to motility score into two groups; low- ($<40\%$) and high-percentages of progressive motility ($>40\%$), the mean $\pm$ SD of MDA concentrations were significantly difference between the groups having low- (20.7 ± 11.4 nmol/l) and high-percentages of progressive motility (14.4 ± 7.8 nmol/l) (Table 3).

144 Table 1. The means $\pm$ SD of semen characteristics and seminal MDA levels of Asian elephant
 145 semen.

Semen parameters	Mean $\pm$ SD
Progressive motility (%)	33.4 $\pm$ 27.1
Sperm concentration ($\times 10^6$ sperms/ml)	1201.1 $\pm$ 619.9
Volume (ml)	24.2 $\pm$ 17.6
Semen pH	7.2 $\pm$ 0.7
Live sperm (%)	52.6 $\pm$ 29.7
Normal morphology (%)	81.4 $\pm$ 15.9
Seminal MDA (nmol/l)	18.0 $\pm$ 10.3

146

147

148 Table 2. Correlation of seminal MDA level and percentage of progressive motility and
 149 normal morphology of Asian elephant semen.

Semen parameters	R-squared	Correlation	P value ¹⁵⁰
Progressive motility (%)	0.2131	-0.4616	0.003 ¹⁵¹
Normal morphology (%)	0.1685	-0.4105	0.027 ¹⁵²

153

Table 3. The comparison of means $\pm$ SD of seminal MDA levels in low- and high- percentages of progressive motility group.

Motility groups	MDA (nmol/l)
Low-percentage of progressive motility (progressive motility <40%)	20.7 ± 11.4^a
High-percentage of progressive motility (progressive motility >40%)	14.4 ± 7.8^b

Values with difference superscripts (a and b) differ significantly within column.

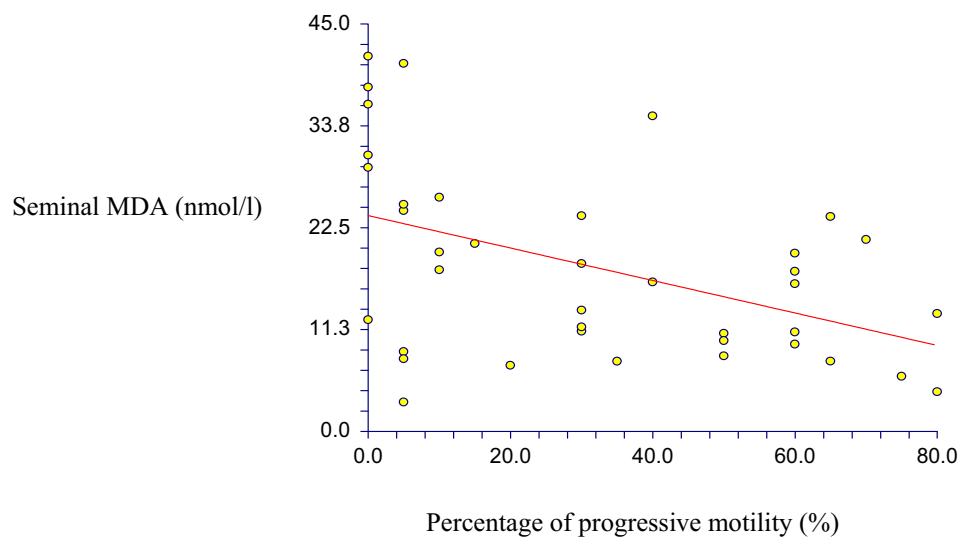


Figure 1. Correlation of seminal MDA and percentage of progressive motility of Asian elephant semen.

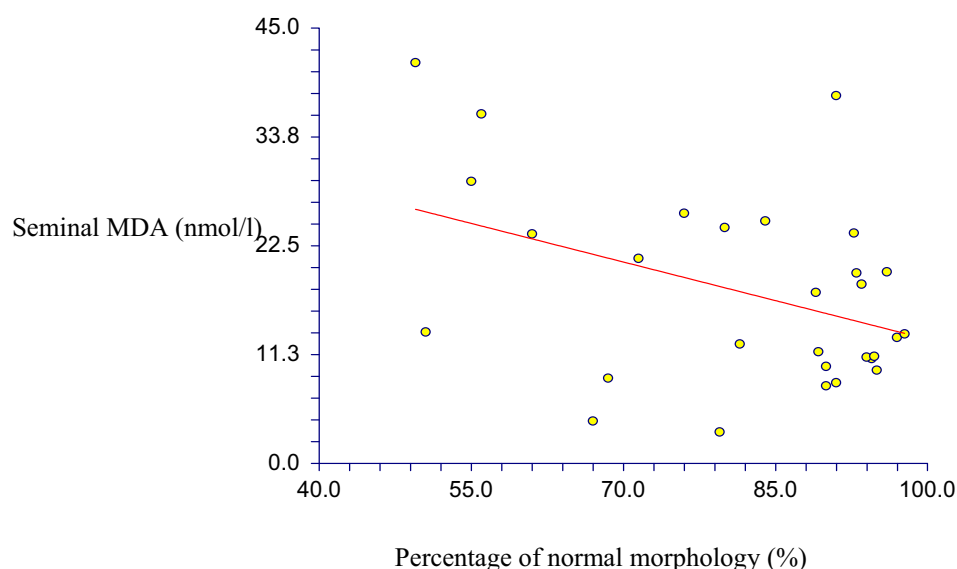


Figure 2. Correlation of seminal MDA level and percentage of normal morphology of Asian elephant semen.

Discussion

In this study, although we focused on the bulls anticipated to have a better semen qualities than others according their previous history of semen quality, the same scenario including sub-fertility and male to male variability remains as compared to our previous reports, only slightly improvement in some semen parameters were detected (Thongtip et al., 2008; Sivilaikul et al., 2010). Regarding the semen collection in the present study, 40 ejaculates (90.91%) without urine contamination were obtained and only 4 attempts (9.01%) were of un-ejaculates and ejaculates with urine contamination, which was a considerably good result. This suggests that the bull elephants in this study were highly responsive to our semen collection stimulation. The average of percentages of progressive motility as reported herein was higher than those being reported (Schmitt and Hildebrandt, 1998; Thongtip et al., 2008; Sivilaikul et al., 2010). The ages of the elephants in this study (15 - 45 years of age)

might be the factor involving in the better semen quality. We have previously reported the age effect on elephant semen quality in which the better semen quality were indicated in elephant bulls of 23 - 43 years of age (Thongtip et al., 2008). A significant negative correlation between seminal MDA concentrations and the percentages of progressive motility and normal morphology were revealed in this study. Furthermore, the seminal MDA comparison between the two groups, low- (<40%) and high-percentages of progressive motility(>40%), were significantly different. Thus, MDA, the end product of lipid peroxidation, may play a role in the poor semen quality found in Asian elephants. MDA has been indicated of their effect on semen quality in some species such as human (Aitken et al., 1989; Nouri et al., 2008; Das et al., 2009) and ram (Andreea and Stela, 2010). MDA concentration in spermatozoa has been revealed to be significantly related to the number of immotile spermatozoa. The increase of incubation period in a condition without seminal plasma resulted in the decrease of the sperm motility meanwhile increased MDA concentration (Kobayashi et al, 1991).

The negative correlation between MDA concentrations and the percentages of progressive motility and normal sperm morphology in Asian elephant semen could help us to indicate the effect of oxidative stress on elephant semen quality. However, other parameters such as membrane integrity and mitochondrial activity which might also be affected by oxidative stress were not tested and remain to be scrutinized. Other functions of the antioxidant system such as total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase activity and glutathione system should be pursued. The data obtained in this study are useful for our better understanding about male elephant reproduction.

Acknowledgement

The authors are grateful for the National Elephant Institute, Forest Industry Organization for their permission of sample collection and the Faculty of Veterinary Medicine at Kasetsart University, for providing facilities. We thank Mr. Kornchai Kornkaewrat for a technical assistance. This research is supported by Thailand Research Fund, the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office and the Commission on Higher Education, Ministry of Education. (AG-BIO/PERDO-CHE)

References

- Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 40; 183–187.
- Aitken, R.J., Harkiss, D. and Buckingham, D. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev* 35; 302–315.
- Alvarez, J.G., Touchtone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of superoxide and hydrogen peroxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major protectant against oxygen toxicity. *J. Androl* 8; 338–348.
- Andreea, A. and Stela, Z. 2010. Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Romanian Biotechnological Letters*. 15. 3. Supplement.

238

239 Bjořndahl, L., Sořderlund, I. and Kvist, U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-
240 nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod. 18: 813-
241 816.

242

243 Cassani, P., Beconi, M.T. and O'Flaherty, C. 2005. Relationship between total superoxide
244 dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in
245 canine semen. Anim Reprod Sci 86; 163-173.

246

247 Das, P., Choudhrari, A. R., Singh, A. K. and Singh, R. 2009. Correlation among routine
248 semen semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects
249 with different fertility potential. Indian J Physiol Pharmacol. 53 (3) : 253–258

250 Kidd, S. A., Eskenazi, B. and Wyrobek, A. J. 2001. Effects of male age on semen quality
251 and fertility: a review of the literature. Fertil Steril. 75: 237-248.

252

253 Kobayashi, T., Miyazaki, T., Natori, M. and Nozawa, S. 1991. Protective role of superoxide
254 dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in
255 human seminal plasma and spermatozoa. Hum Reprod. 6. 7. 987-991.

256

257 Nouri, M., Ghasemzadeh, A., Farzadi, L., Shahnazi, V. and Ghaffari Novin, M. 2008.
258 Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of
259 asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. Iranian Journal of Reproductive
260 Medicine. 6. 1. 1-5.

261

262 Saleh, R.A. and Agarwal, A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research
 263 bench to clinical practice. J. Androl. 23. 737-752.
 264
 265 Schmitt, D.L., Hildebrandt, T.B., Hermes, R. and Goritz, F. 2001. Assisted reproductive
 266 technology in elephants. Proc 1st Int Symp Assisted Reproductive Technology for
 267 Conservation Genetic Management of Wildlife, Omaha's Henry Doorly Zoo; 15-17.
 268
 269 Schmitt, D.L., Hildebrandt, T.B., 1998. Manual collection and characterization of semen from
 270 Asian elephants (*Elephas maximus*). Anim. Reprod. Sci. 53, 309–314.
 271
 272 Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm
 273 function. Front Biosci; 78-86.
 274
 275 Sivilaikul, S., Jitprom, A., Kularb, A., Kornkaewrut, K., Suthanmaphinuth, P.,
 276 Mahasawangkul, S., Saikhun, K., Wajjwalku, W. and Thongtipsiridech, S. 2010.
 277 Relationship between Seminal and Serum Calcium Concentration with Semen Quality in
 278 the Asian Elephant (*Elephas maximus*). Thai J. Vet. Med. 40(3): 251-255.
 279
 280 Thongtip, N., Saikhun, J., Mahasawangkul, S., Kornkaewrat, K., Pongsopavijitr, P.,
 281 Songsasen, N. and Pinyopummin. A. 2008. Potential factors affecting semen quality in
 282 the Asian elephant (*Elephas maximus*). Reproductive Biology and Endocrinology . 6: 9.
 283
 284 Yagi, K. 1984. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol. 105. 328-331.
 285