



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกร โดยการเติมเพนนิซิลามีน:

จากห้องปฏิบัติการสู่อุตสาหกรรมการผลิตสุกร

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์ กัมพล แก้วเกษ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มีนาคม 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกรโดยการเติมเพนนิซิลามีน:

จากห้องปฏิบัติการสู่อุตสาหกรรมการผลิตสุกร

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. นายสัตวแพทย์ กัมพล แก้วเกษ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้สนับสนุนทุนพัฒนานักวิจัยประจำปี 2557-2559 สำหรับการทำวิจัยในโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกรโดยการเติมเพนนิซิลามีน: จากห้องปฏิบัติการสูดอุตสาหกรรมการผลิตสุกร (RSA5780049)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : **RSA5780049**

ชื่อโครงการ : การพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกรโดยการเติมเพนนิซิลามีน: จาก
ห้องปฏิบัติการสู่อุตสาหกรรมการผลิตสุกร

ชื่อนักวิจัย : รศ. น.สพ. ดร. กัมพล แก้วเกษ

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : vskkk@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2557 ถึง 15 มิถุนายน 2559

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเพนนิซิลามีน (PEN) ที่เติมลงไปในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรหลังจากเจือจาง โดยทำการวัดผลจากค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) และรูปแบบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (kinetic parameter ตามแบบของ องค์การอนามัยโลก) อัตราการรอดชีวิต (viability) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) ความปกติของพลาสมาเมมเบรน (HOST) วัดการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเพนนิซิลามีน โดยตรวจวัด SOD activity, Glutathione peroxidase activity และการเกิด lipid peroxidation (วัด MDA) โดยใช้ ELISA kit โดยทำการตรวจวัดในวันที่ 0 และวันที่ 1, 3, 5, 7 หลังจากเจือจางน้ำเชื้อและเก็บไว้ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 18 องศาเซลเซียส โดยมีกลุ่มทดลองทั้งหมด 8 กลุ่มประกอบด้วย กลุ่มสารละลายที่มีขายในประเทศไทยจำนวน 3 กลุ่มโดยเป็นตัวแทนของสารละลายระยะสั้น ชนิด BTS, ระยะกลางชนิด Merck III และระยะยาวชนิด Androstar® Plus และกลุ่มสารละลายที่ผู้วิจัยคิดขึ้นอีก 5 กลุ่มคือ BTS+PEN 0.125 mM, BTS+PEN 0.25 mM, BTS+PEN 0.5 mM, BTS+PEN 1.0 mM และ BTS+PEN 2.0 mM โดยผู้วิจัยทำการเก็บน้ำเชื้อสดมาจากฟาร์มสุกรภาคเอกชนในจังหวัดราชบุรีโดยมาจากฟาร์มเดียวกันทั้งหมด 10 ตัวและนำมาทำการทดลองในห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า การเติมสารเพนนิซิลามีนลงไปในสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ปริมาณ 0.125 ถึง 0.50 mM สามารถทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อ สุกรมีคุณภาพเทียบเคียงกับสารละลายเจือจางระยะยาว (อยู่ได้นานถึง 7 วัน) ที่มีขายในประเทศไทยได้ ซึ่งผู้วิจัยจะได้นำไปทดลองผสมเทียมในฟาร์มสุกรแล้วพบว่าผลการผสมเทียมไม่ต่างจากสารละลายที่มีขายในท้องตลาด สำหรับผลการตรวจวัดการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเพนนิซิลามีนโดยตรวจวัด SOD activity, Glutathione peroxidase activity และการเกิด lipid peroxidation (วัด MDA) โดยใช้ ELISA kit พบว่าระดับมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ PEN ที่ใช้

Keywords : สุกร (Pig) สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การผสมเทียม (artificial insemination)

Abstract

Project Code : RSA5780049

Project Title : Development of fresh boar semen extender by supplementation of penicillamine: from a laboratory to pig industry

Investigator : Assoc. Prof. Dr. Kampon Kaeoket, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University

E-mail Address : vskkk@mahidol.ac.th

Project Period : 16 June 2014 until 15 June 2016

The aim of this study was to investigate the optimal concentration of Penicillamine (PEN) for supplementation in boar semen extender. The measuring parameters were as follows: progressive motility, viability, acrosome integrity and plasma membrane integrity (HOST). In addition, the antioxidant capacity of extender was also evaluated by SOD activity, Glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation (MDA) by using ELISA kit on days 0 and days 1, 3, 5, 7 after storage at 18 °C. The experimental groups consisted of 8 groups: commercially available extenders as a control groups (i.e., BTS-as a short term extender, Merck III- as a medium term extender and Androstar® Plus- as a long term extender) and a group of varying concentrations of PEN (i.e., BTS+PEN 0.125 mM, BTS+PEN 0.25 mM, BTS+PEN 0.5 mM, BTS+PEN 1.0 mM and BTS+PEN 2.0 mM). Ten semen sample (n=10 boars) were diluted with different extenders as mention above and the results showed that supplementation of PEN at concentration between 0.125 and 0.50 mM maintain diluted semen qualities as long as 7 days after cold storage at 18 °C which comparable to commercially available semen extender in Thailand. For the fertility test in pig farm, there is no significant different in farrowing rate and litter size between our extender and a commercial extender. For the antioxidant activity, the levels of SOD activity, Glutathione

peroxidase activity and lipid peroxidation (MDA) varied depend on the supplemented concentration of PEN in each semen extender.

Keywords : Antioxidant, Artificial insemination, Pig, Semen extender

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

ปัจจุบันการผสมเทียมได้มีการนำไปใช้ในฟาร์มสุกรอย่างกว้างขวางทั้งในทวีปยุโรปและทวีปอเมริกา รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีการใช้การผสมเทียมมากกว่า 90% (Gadea, 2003) โดยวิธีการผสมเทียมนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมากในระบบการผสมพันธุ์สุกร เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกต่อการจัดการและช่วยให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคติดต่อในฟาร์มสุกร ในขั้นตอนการเตรียมน้ำเชื้อจะใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender) เพื่อเก็บรักษาตัวอสุจิซึ่งมีทั้งเก็บในระยะสั้น (3 วัน) ระยะกลาง (5 วัน) และในระยะยาว (7 วัน) โดยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อจะไปลดกระบวนการ metabolic activity ของตัวอสุจิ ด้วยการเจือจางตัวอสุจิในสารละลายที่มีความเหมาะสม ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-20 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถรักษาประสิทธิภาพการทำงานของตัวอสุจิ เช่น ความสามารถในการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่ โดยส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อนั้นประกอบไปด้วยสารที่เป็นแหล่งพลังงานของตัวอสุจิ สารที่ควบคุมสมดุลแรงดันออสโมติก สารที่ช่วยรักษาสมดุลความเป็นกรด-เบสจากของเสียที่เกิดจากกระบวนการสันดาปของตัวอสุจิ มีไออนอนต่างๆ ที่สามารถคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ และมียาปฏิชีวนะที่ช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อโรคได้ (Gadea, 2003; Mapeka et al., 2012) โดยทั่วไประหว่างที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ จะมีการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidants) ที่มากเกินไปที่สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่มีอยู่ในน้ำเชื้อจะกำจัดได้ จะทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้น ซึ่งภาวะ oxidative stress เป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและการทำงานของตัวอสุจิ เพราะในน้ำเชื้อจะมีปริมาณ antioxidant enzyme อย่างจำกัด ทำให้ antioxidant enzyme ที่มีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการทำลายโครงสร้าง DNA มีไม่เพียงพอ ซึ่งปกติแล้ว ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้จะมี antioxidant enzyme ซึ่งจะถูกหลั่งออกมาอยู่ในน้ำเชื้อ เช่น glutathione peroxidase 5 และ superoxide dismutase นอกจากนี้ยังมีสารดักจับอนุมูลอิสระ เช่น acetylcarnitine ซึ่งสารเหล่านี้จะพบได้ใน seminal plasma ซึ่งจะช่วยทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress ได้ (Aitken et al., 2012) ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการลดผลเสียที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระดังกล่าวในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ (chilled semen) โดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ลงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ เช่น วิตามินอี (Vitamin E) กลูตาไธโอน (Glutathione) และ ซิสเทอีน (Cysteine) เป็นต้น (Breininger et al., 2005)

Penicillamine (PEN) เป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอยู่ในรูปผลผลิตของยาปฏิชีวนะ penicillin โดย penicillamine สามารถพบได้ 2 รูป คือ D-penicillamine และ L-penicillamine (ซึ่งเป็นรูปแบบที่เป็นพิษต่อร่างกาย) ในทางการแพทย์มีการใช้ D-penicillamine เป็น

ยารักษาโรค เช่น Wilson's disease, rheumatoid arthritis, cystinuria, progressive systemic sclerosis (Wang et al., 2014) นอกจากนี้ PEN ยังเป็นตัวจับโลหะหนัก (chelating agent) ที่ดี โดยเฉพาะการจับกับทองแดง ทำให้ปริมาณทองแดงที่สูงเกินไปในร่างกายของมนุษย์ลดลง โดย PEN จะการจับกับทองแดง แล้วทำให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ จากนั้นจึงขับทิ้งผ่านทางปัสสาวะ (Durand et al., 2001) โดยมีการศึกษาโดยการเติมสาร PEN และเปรียบเทียบกับ N-acetyl cysteine ในน้ำเชื้อของ มนุษย์ ม้า และหนู พบว่า PEN สามารถทำให้ตัวอสุจิโดยเฉพาะตัวอสุจิของม้ามีชีวิตอยู่ได้นานถึง 8 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C (Aitken et al., 2012) เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการอยู่รอดของตัวอสุจิ โดยทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเป็นตัวจับโลหะหนัก โดยเป็นตัวจ่ายอิเล็กตรอนเพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์อสุจิที่อาจเกิดจากสารอนุมูลอิสระได้ จากข้อมูลของการทดลองข้างต้นใน มนุษย์ หนู และม้า บ่งชี้ว่า PEN มีคุณสมบัติ ในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพ ในการเป็น antioxidant ได้ดีกว่า N-acetyl cysteine แต่ยังไม่มีการรายงานถึงผลของการใช้ PEN ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อของสุกร การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของการเติม PEN ในสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อสุกรระยะสั้นซึ่งเก็บน้ำเชื้อได้ประมาณ 3 วัน (ชนิด BTS) โดยมีสมมุติฐานว่าสาร PEN จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกร (อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม) ได้ยาวนานกว่า 3 วัน

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อสุกรพันธุ์ร็อกซ์ อายุระหว่าง 1-3 ปี จำนวน 10 ตัว โดยใช้พ่อสุกรหมูฟาร์มเดียวกัน ภายใต้ระบบการเลี้ยง การจัดการ อาหารและน้ำที่เหมือนกันทั้งหมด ซึ่งพ่อพันธุ์ทุกตัวจะผ่านการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้ออย่างสม่ำเสมอทุก 3 - 4 เดือน และทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งก่อนจะทำการเก็บตัวอย่างทดลอง

สารต้านอนุมูลอิสระ เพนิซิลลามีน (Penicillamine)

1. สาร Penicillamine จากบริษัท Sigma-Aldrich

การเตรียมน้ำเชื้อสดและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

1. การเก็บรีดเก็บและการเตรียมน้ำเชื้อ

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรแต่ละตัวด้วยวิธี Hand-glove technique ระหว่างการรีดเก็บน้ำเชื้อมีการกรอง Gel fraction ของ Ejaculate ออก นำน้ำเชื้อสดที่ได้มาทำละลายในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิด ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^9 spermatozoa/100ml และเก็บน้ำเชื้อใน Plastic artificial insemination bottles ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน(วันที่รีดเก็บน้ำเชื้อเป็นวันที่ 0) ในวันที่ 0 วันที่ 1 วันที่ 3 วันที่ 5 และ วันที่ 7 มีการนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บเอาไว้ออกมาอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 นาที นำตัวอย่างน้ำเชื้อสดมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การเตรียมสารละลายในการทดลอง: สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะสั้น 1 ชนิด สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะกลาง 1 ชนิด และสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาว 1 ชนิด รายละเอียดตามข้างล่างนี้

1. สารละลายที่ทางคณะผู้วิจัยผลิตขึ้นเอง ซึ่งส่วนประกอบหลักจะคล้ายกับ BTS คือมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน มีการใส่สารเพื่อควบคุมความสมดุลของกรดและด่าง แต่มีการเติม PEN ที่ละลายน้ำได้ลงไปเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยการเติม PEN ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 mM เติมลงในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสุกรชนิดระยะสั้น

2. ชนิดของสารละลายที่เป็นควบคุม: BTS (สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะสั้น), Merck III (สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะกลาง) และ Androstar® Plus (สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาว)

3. ปริมาณสาร: ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิดผสมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สามารถสรุปกลุ่มการทดลองได้ 7 กลุ่มดังนี้

กลุ่มควบคุมที่ 1 สารละลายเจือจางชนิดระยะสั้น BTS

กลุ่มควบคุมที่ 2 สารละลายเจือจางชนิดระยะกลาง Merck-III

กลุ่มควบคุมที่ 3 สารละลายเจือจางชนิดระยะยาว Androstar® Plus

กลุ่มทดลองที่ 4 เติม PEN ที่มีความเข้มข้น 0.5 mM

กลุ่มทดลองที่ 5 เติม PEN ที่มีความเข้มข้น 1.0 mM

กลุ่มทดลองที่ 6 เติม PEN ที่มีความเข้มข้น 2.0 mM

กลุ่มทดลองที่ 7 เติม PEN ที่มีความเข้มข้น 4.0 mM

วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อจางน้ำเชื้อ

1. ควรเตรียมน้ำยาเชื้อจางประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนที่จะใช้งาน
2. เตรียมน้ำกลั่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน
3. คำนวณว่าจะใช้สารละลายเชื้อจางน้ำเชื้อว่ามีปริมาณเท่าใด
4. วางภาชนะใส่สารละลายเชื้อจางน้ำเชื้อใน water bath อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อพร้อมที่จะใช้งาน

2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสด โดยประเมินได้จาก

2.1. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า (macroscopic examination) ได้แก่

- 2.1.1. ปริมาตรของน้ำเชื้อ วัดโดยการชั่งน้ำหนักหรือการตวง
- 2.1.2. ความเป็นกรด – ด่าง โดย pH meter และแรงดันออสโมติกโดยใช้ Osmometer
- 2.1.3. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ วัดโดยใช้เครื่อง spermacue TM (หน่วย $\times 10^6$ sperm/ml)

2.2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) ได้แก่

2.2.1. การเคลื่อนที่เฉพาะตัว (individual motility) หรือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) สามารถตรวจสอบได้โดย นำน้ำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบหยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 37 °C แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (Phase contrast microscope) ดูการเคลื่อนที่จากกำลังขยายต่ำ โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า (10 x 10) 200 เท่า (10 x 20) และเพิ่มกำลังขยายกล้องจุลทรรศน์เป็น 400 เท่า (10 x 40) เพื่อดูตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าแล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีควรมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ระหว่าง 70-90% (โดยให้ปริมาณอสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 80 %) สำหรับการตรวจสอบรูปแบบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่เป็น kinetic motility pattern ทำการตรวจโดยใช้ CASA system (SCA[®], Spain) และรายงานผลตามพารามิเตอร์ต่างๆของ WHO (2010)

2.2.2. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ทำการประเมินโดยการใช้นิวบาวเออร์ haemocytometer โดยผสมน้ำเชื้อเข้ากันก่อน แล้วจึงเจือจางน้ำเชื้อด้วย dilution pipette โดยเจือจางกับ formal saline ในอัตราส่วน 1:100 หรือประมาณ 1:50 ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง นับจำนวนแล้วคำนวณออกมาเป็น จำนวนตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร

2.2.3 ความสมบูรณ์ของอะโครโซม โดยใช้สีย้อม fluorescein isothiocyanate-labeled peanut (Arachis hypogaea) agglutinin (FITC-PNA) โดยผสมสารละลายน้ำเชื้อเจี๊ยะจางปริมาณ 10 μ L เข้ากับ Ethidiumhomodimer-1 ปริมาณ 10 μ L และ incubated ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อเจี๊ยะจางที่ผสมแล้วหยดลงบนสไลด์ปริมาณ 5 μ L แล้ว Fix ด้วยเอทานอล 96% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้แห้ง ขั้นตอนต่อไปกระจายสารละลาย Fit C-PNA ปริมาณ 50 μ L ลงบนสไลด์ แล้วนำไป incubate ในตู้ที่เย็นและชื้นเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปส่องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า นับ 200 ตัวนับเป็น ตัวที่อะโครโซมปกติ (intact) และอะโครโซมผิดปกติ (non-intact) จากนั้นนำมาคิดเป็นร้อยละ

2.2.4 กระบวนการตรวจการรอดชีวิตของสเปิร์ม (Viability) ทำโดยผสมน้ำเชื้อสด 10 ul ต่อผสมกับ SYBR-14 2.7 ul จากนั้น ดูดจากมา 10 ul ผสมกับ Ethidium homodimer (EthD) 10 ul และ Incubation 37 °C 15 นาที ดูด้วยกล้อง Fluorescence 40x นับ 200 ตัว ตัวที่ติดสีเขียวคือมีชีวิต (viable) ส่วนตัวที่ติดสีแดงคือตายแล้ว (non-viable) จากนั้นนำมาคิดเป็นร้อยละ

3. การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ

ทำการปั่นเก็บ supernatant ของสารละลายเจี๊ยะจางน้ำเชื้อสุกรในกลุ่มทดลองต่างๆ หลังจากเก็บในตู้เย็น ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA). จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 °C และนำมาวัดระดับของเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ดังนี้ T-AOC, SOD activity, Glutathione peroxidase activity (GSH-Px) and lipid peroxidation (MDA) โดยใช้ ELISA kit จากบริษัทเอกชน(Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China)(Hu et al., 2014)

4.การนำสารละลายไปใช้ผสมเทียมในฟาร์มเอกชน

โดยแม่สุกรทุกตัวจะถูกผสม 2 ครั้งต่อการเป็นสัดตามวิธีการของฟาร์มที่เข้าไปทำการทดลอง ด้วยไค้ส

ที่ทางฟาร์มใช้ ซึ่งอยู่ระหว่าง 3-5 พันล้านตัวต่อไค้ส ปริมาตร 80 มิลลิตรและใช้ท่อผสมเทียมแบบ

ธรรมดา (traditional AI) ทำการผสมเทียมด้วยสูตรสารละลายที่มี PEN-0.25 เปรียบเทียบกับสารละลาย

ที่ใช้ในฟาร์ม (Merck III) จำนวนแม่สุกรกลุ่มละ 30 ตัว และเก็บข้อมูล อัตราการตั้งท้อง (ใช้เครื่องอัล

ตราชาวด์) อัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกแรกคลอด ในแต่ละกลุ่ม

การวิเคราะห์และการประเมินผล

ผู้วิจัยจะทำการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรจากพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซม และก่อนที่จะนำข้อมูลเหล่านี้มาวิเคราะห์ ข้อมูลทั้งหมดจะถูกตรวจสอบโดยดูการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) ด้วย Shapiro-wilk test จากนั้นข้อมูลจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย one way ANOVA ใน Completely Randomized Design (CRD) โดยกลุ่มทดลองทั้งหมดจะเป็นตัวแปรควบคุมและพารามิเตอร์ที่วัดเป็นตัวแปรอิสระ และพ่อสุกรเป็นตัวแปรสุ่ม (random block factor) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละพารามิเตอร์จะทดสอบโดย Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS (SPSS 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) โดยแต่ละพารามิเตอร์จะแสดงอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์ของ Mean $\pm$ SD เมื่อค่า $P < 0.05$ แสดงว่าแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังหาความสัมพันธ์ของข้อมูลพารามิเตอร์ต่างๆ ของคุณภาพน้ำเชื้อกับค่าของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระด้วย Pearson's correlation

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับ progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity และ pH ในกลุ่มต่างๆ ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1-5 (Tables 1-5) โดยที่ในช่วง 3 วันแรกนั้นคุณภาพของน้ำเชื้อในพารามิเตอร์ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะทางสถิติ แต่ในวันที่ 5 และ 7 นั้น เริ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ โดยที่ กลุ่มที่เติม PEN-0.25 และกลุ่ม Androstar®Plus นั้น ยังมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ได้สูงกว่า 70%

Table 1 The mean percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 0 (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	36.74	66.56	77.62	52.69	24.32	77.52	19.51	58.91
Viability	76	80	50	64	61	48.5	25	50
Acrosome integrity	89.5	89	82	63	80.5	60	48	56.5
HOST	42	29	34	34	28	25	21	19
Osmolarity	340	360	300	336	344	340	342	348
pH	8.03	8.35	8.04	8.2	8.09	8.09	8.18	8.3

Table 2 The mean percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 1 (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	51.07	55.44	82.74	70	67.66	53.61	71.33	62.73
Viability	66.5	59	68	65	71.5	65	72	69.5
Acrosome integrity	93	87	90.5	92	90	96	80	82
HOST	26	36	19	18	24	17	22	17
Osmolarity	338	354	297	340	352	354	348	345
pH	8.29	8.16	8.15	8.04	7.96	8.17	7.96	7.96

Table 3 The mean percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 3 (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	64.57	52.65	72.62	72.56	62.27	82.04	57.69	61.05
Viability	76.5	72.5	69	77	70.5	64	65	66
Acrosome integrity	89	91.5	90.5	92	86	85	90	88
HOST	20	16	28	28	24	23	24	21
Osmolarity	340	358	302	342	340	355	352	345
pH	8.28	8.27	7.94	7.84	8.04	7.91	7.97	7.6

Table 4 The mean percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 5 (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	53.0 ± 11.5 ^c	47.0 ± 12.0 ^c	76.0 ± 4.2 ^a	63.0 ± 14.8 ^{abc}	70.0 ± 12.2 ^{ab}	63.0 ± 11.0 ^{abc}	59.0 ± 8.9 ^{bc}	48.0 ± 14.8 ^c
Viability	74.3 ± 6.6	71.6 ± 8.5	75.5 ± 4.8	73.0 ± 7.7	76.5 ± 8.8	72.1 ± 8.2	69.0 ± 5.5	69.6 ± 4.9
Acrosome integrity	87.3 ± 4.7	88.4 ± 5.1	90.3 ± 2.9	89.25 ± 1.4	88.8 ± 3.6	89.0 ± 8.8	88.8 ± 2.0	87.5 ± 2.9
Osmolarity	323.8 ± 3.9	358.0 ± 4.2	302.0 ± 3.1	329.8 ± 5.4	322.4 ± 1.8	322.8 ± 3.4	323.8 ± 3.6	323.0 ± 2.6
pH	7.9 ± 0.2	8.0 ± 0.1	7.73 ± 0.1	7.86 ± 0.1	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.4	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.2

Table 5 The mean percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, HOST, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 7 (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
	Plus							
Progressive motility	46.0 ± 8.9 ^{bc}	44.0 ± 16.7 ^c	73.0 ± 6.7 ^a	63.0 ± 14.4 ^{ab}	70.0 ± 13.7 ^a	57.0 ± 14.8 ^{abc}	50.0 ± 10.6 ^{bc}	49.0 ± 12.9 ^{bc}
Viability	72.1 ± 5.1	69.5 ± 3.0	73.1 ± 5.1	68.3 ± 6.5	68.6 ± 7.5	67.3 ± 6.2	64.2 ± 5.5	61.3 ± 7.4
Acrosome integrity	78.7 ± 2.9 ^c	78.9 ± 2.3 ^c	85.7 ± 2.0 ^a	81.6 ± 3.0 ^{bc}	85.7 ± 2.9 ^a	81.6 ± 3.3 ^{bc}	83.7 ± 2.4 ^{ab}	78.8 ± 2.3 ^c
Osmolarity	321.8 ± 1.9	356.0 ± 3.5	297.2 ± 0.5	320.4 ± 5.4	318.6 ± 4.0	322.8 ± 4.6	321.2 ± 5.0	325.0 ± 5.3
pH	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.62 ± 0.2	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.2	7.72 ± 0.2	7.7 ± 0.1	7.73 ± 0.2

สำหรับผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่แบบต่างๆของตัวอสุจิ (kinetic parameters) ซึ่งวัดด้วยเครื่อง CASA system (SCA[®], Spain) ของสารละลายทั้ง 8 กลุ่มเรียงตามวันตั้งแต่วันที่ 0 (วันที่รีดน้ำเชื้อ) และวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากเจือจางแล้ว (จำนวนพ่อสุกร=10) ถูกนำเสนอในตารางที่ 6-10 (Tables 6-10) ตามลำดับ

Table 6 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters of 8 extenders on day 0 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	36.74	66.56	77.62	52.69	24.32	77.52	19.51	58.91
VCL(µm/s)	25.1	24.15	37.54	30.26	18.44	32.16	17.66	30.4
VSL(µm/s)	8.8	15.36	26.84	19.56	3.75	23.5	2.31	20.01
VAP(µm/s)	12.3	18.78	31.11	23.22	6.42	27.6	5.85	23.65
ALH(µm)	1.42	1.39	1.51	1.59	2.19	1.33	2.18	1.5
LIN(%)	35.08	63.62	71.48	64.62	20.34	73.08	13.07	65.82
STR(%)	71.54	81.82	86.28	84.23	58.4	86.84	39.46	84.59
WOB(%)	49.03	77.76	82.85	76.71	34.84	84.16	33.14	77.8
BCF(Hz)	8.2	5.95	7.65	6.46	2.73	6.68	1.65	6.63

Table 7 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters of 8 extenders on day 1 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	51.07	55.44	82.74	70	67.66	53.61	71.33	62.73
VCL(µm/s)	24.78	25.33	31.45	37.72	30.52	20.43	36.47	29.57
VSL(µm/s)	16.89	16.49	23.64	29.37	23.07	7.71	26.86	18.57
VAP(µm/s)	19.76	19.52	27.36	32.87	26.2	11.28	30.64	21.59
ALH(µm)	1.26	1.33	1.34	1.4	1.33	1.84	1.47	1.43
LIN(%)	68.16	65.09	75.16	77.85	75.58	37.73	73.65	62.8
STR(%)	85.45	84.46	86.39	89.34	88.05	68.31	87.65	84.61
WOB(%)	79.76	77.07	87	87.14	85.84	55.24	84.02	74.23
BCF(Hz)	6.24	6.72	6.41	6.91	6.62	6.63	6.85	7.3

Table 8 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters of 8 extenders on day 3 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	64.57	52.65	72.62	72.56	62.27	82.04	57.69	61.05
VCL(µm/s)	26.37	18.06	33.36	24.73	33.92	38.29	31.28	35.64
VSL(µm/s)	15.92	9.78	26.16	18.42	27.37	31.01	23.66	26.93
VAP(µm/s)	19.09	12.86	29.62	21.53	30.4	34.25	26.96	30.75
ALH(µm)	1.42	1.47	1.28	1.26	1.26	1.35	1.41	1.44
LIN(%)	60.39	54.17	78.42	74.51	80.7	80.98	75.63	75.56
STR(%)	83.39	76.05	88.34	85.56	90.05	90.53	87.76	87.59
WOB(%)	72.41	71.23	88.77	87.08	89.61	89.45	86.18	86.27
BCF(Hz)	7.11	7.15	6.33	5.94	6.88	6.73	6.22	6.8

Table 9 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters of 8 extenders on day 5 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	77.42	30.31	75.14	63.23	77	67.91	42.48	53.08
VCL(µm/s)	33.91	21.05	29.55	26.59	34	38.27	33.56	29.03
VSL(µm/s)	24.7	9.83	22.02	12.89	24.15	28.14	23.29	19.17
VAP(µm/s)	28.72	12.93	25.08	17.2	27.78	32.21	26.71	22.78
ALH(µm)	1.42	1.37	1.3	1.78	1.47	1.56	1.62	1.5
LIN(%)	72.85	46.67	74.54	48.48	71.02	73.53	69.38	66.03
STR(%)	86.01	76	87.81	74.93	86.92	87.38	87.19	84.12
WOB(%)	84.7	61.41	84.88	64.71	81.71	84.15	79.58	78.49
BCF(Hz)	6.58	7.3	6.89	6.36	7.13	6.85	7.15	6.35

Table 10 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters of 8 extenders on day 7 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Motility	65.96	45.77	70.9	67.95	70.97	61.19	64.32	53.86
VCL(μm/s)	34.26	23.81	36.57	37.7	32.99	29.1	24.49	29.28
VSL(μm/s)	25.14	10.22	26.08	27.85	23.6	18.04	14.46	19.47
VAP(μm/s)	28.27	14.29	30.29	31.67	27.08	21.96	18.07	22.87
ALH(μm)	1.45	1.98	1.53	1.62	1.5	1.51	1.39	1.36
LIN(%)	73.4	42.93	71.31	73.86	71.53	62	59.02	66.52
STR(%)	88.96	71.55	86.1	87.93	87.14	82.15	80	85.16
WOB(%)	82.52	60	82.82	83.99	82.09	75.47	73.78	78.11
BCF(Hz)	7.09	6.22	6.88	6.81	6.71	6.15	6.86	6.74

การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ

ระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง และเนื่องจากทำการเก็บไว้ที่-20 C เป็นเวลาถึง 1 ปี ก่อนที่จะตรวจทำให้เอนไซม์บางตัวเช่น SOD, Glutathione peroxidase activity (GSH-Px) อยู่ในระดับต่ำในบางตัวอย่าง ส่วนระดับของ T-AOC และ lipid peroxidation (MDA) สามารถตรวจได้ในตัวอย่างเกือบทั้งหมด สำหรับตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดระดับได้ มีระดับดังแสดงตามรูปที่ 1 (Fig. 1)

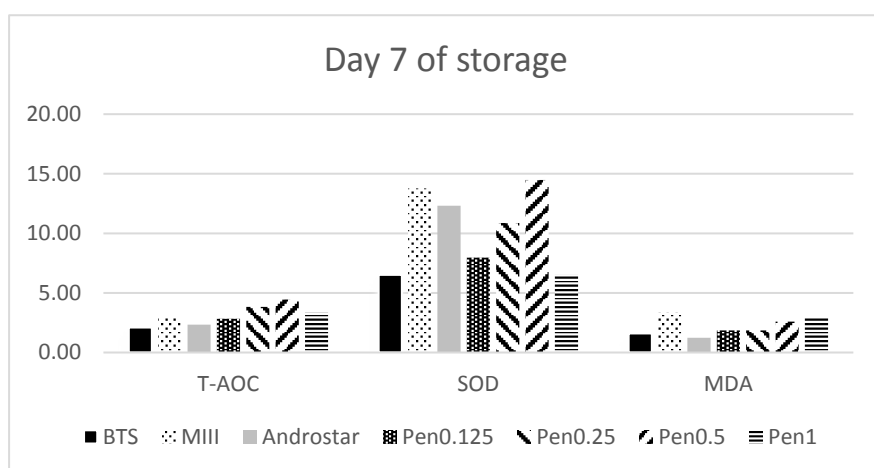


Figure 1 The levels of T-AOC (unit/ml), SOD (unit/ml) and MDA (nmol/ml) in different types of semen extenders on day 7 of storage at 18°C.

นอกจากนี้นักวิจัยยังได้หาความสัมพันธ์ของข้อมูลระดับเอนไซม์ต่าง ๆ กับพารามิเตอร์ต่างของคุณภาพน้ำเชื้อพบว่ามีความสัมพันธ์กันดังตารางที่ 12 (Table 12)

Table 12 Pearson's correlation among semen qualities, T-AOC and MDA levels (P value)

Parameters	T-AOC day 3	T-AOC day 5	T-AOC day 7
Motility day 5		-40.7(0.09)	
Motility day 7			-53.0(0.02)
Viability day 3	0.58(0.01)		
Acrosome integrity day 5		-0.51(0.03)	
Acrosome integrity day 7			0.40(0.1)
MDA day 7			0.51(0.03)

Table 13 Pearson's correlation between viability and MDA levels (P value)

Parameters	MDA day 5	MDA day 7
Viability day 5	-0.38(0.1)	
Viability day 7		-0.35 (0.1)

ผลการนำไปใช้ในฟาร์ม

นำสารละลายที่ได้จากงานวิจัยไปทดลองผสมเทียมในฟาร์มสุกรภาคเอกชนในจังหวัดชลบุรี ซึ่งผู้วิจัยได้ติดต่อไว้เรียบร้อยแล้ว โดยแบ่งกลุ่มสุกรตามตารางข้างล่างนี้ โดยแม่สุกรทุกตัวจะถูกผสม 2 ครั้งต่อการเป็นสัดตามวิธีการของฟาร์มที่เข้าไปทำการทดลอง ด้วยไคสที่ทางฟาร์มใช้ ซึ่งอยู่ระหว่าง 3-5 พันล้านตัวต่อไคส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ได้ผลอัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอด จำนวนลูกแรกคลอด ตามตารางที่ 11 (Table 11)

Table 11 Comparison between pregnancy rate (% PR), farrowing rate (% FR), total number of piglet born (TB) of different extenders (BTS, Merck III, Androstar®Plus, PEN-0.25)

Groups (sow =30)	% PR	% FR	TB
Gr. 1 (BTS)	96.7	83.3	12.3
Gr. 2 (Merck III)	93.7	84.4	12.6
Gr. 3 (Androstar®Plus)	90.0	80.0	12.4
Gr. 4 (PEN-0.25)	93.3	86.7	11.6
Statistics (χ^2)	NS	NS	NS

NS = not significant

บทวิจารณ์

จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรของสารละลายทั้ง 8 สูตร โดยที่ สูตรที่เติม PEN ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันนั้น เป็นของผู้วิจัยเอง และจากผลการทดลองเห็นได้อย่างชัดเจนว่า สูตรของผู้วิจัยที่มีการเติม PEN ลงไปในสารละลายนั้น สามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรได้ยาวนาน ถึง 7 วันหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยเฉพาะอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและอัตราการรอดชีวิต ซึ่งต่างจากสูตรที่มีขายอยู่ในตลาดอย่างชัดเจน โดยสูตรที่คิดขึ้นนี้สามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้ยาวนานเทียบได้กับสารละลายแบบระยะยาว (long term extender) ที่ผลิตจากประเทศเยอรมนี (Androstar® plus) ทั้งนี้เนื่องมาจาก PEN ที่ใส่ลงไปนั้นจะถูกดูดซึมผ่านเข้าไปทางเยื่อหุ้มตัวอสุจิและทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คอยควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระ (oxidants) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ และยังลดการเกิดปริมาณสาร MDA ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นทำให้เซลล์ของตัวอสุจิถูกทำลายน้อยกว่าสูตรอื่นๆ เช่น BTS (short term extender) หรือ Merck III (medium term extender) ในส่วนของสารละลายแบบระยะยาวที่ใช้ในการทดลองนี้ (Androstar® plus) องค์ประกอบต่างๆในสูตรนั้นยังไม่เป็นที่เปิดเผย แต่ทราบกันดีว่ามีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระและสารที่ทำหน้าที่เป็นระบบบัฟเฟอร์คอยควบคุมการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อที่ผ่านการเจือจางแล้ว ด้วยเหตุผลนี้จะทำให้ต้นทุนของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ มีราคาแพงไม่เป็นที่นิยมของตลาด ดังนั้น ในอนาคตสารละลายที่ผู้วิจัยผลิตขึ้นด้วยการเติม PEN ซึ่งใส่เฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสมซึ่งในการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้น 0.25mM (โดยพิจารณาจากผลการทดลองต่างๆ ในวันที่ 5 และ 7 หลังจากเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 18 °C) จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อในสุกร ผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมานี้ไม่ได้เป็นเพียงผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการที่ดีอย่างเดียวเท่านั้น เพราะถ้าหากพิจารณาจากผลการทดลองในการนำไปใช้ในภาคสนาม (ฟาร์มสุกรของเกษตรกร) ก็ได้ผลการทดลอง ไม่ว่าจะเป็นอัตราการตั้งท้อง อัตราการเข้าคลอด และจำนวนลูกที่ได้ ไม่ต่างจากสารละลายชนิดอื่นๆ ที่มีใช้ในประเทศไทย

บรรณานุกรม

- Aitken RJ, Curry BJ, 2011: Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 14, 367–381.
- Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, De Iuliis GN, 2012: Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod* 87, 1–11.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, 1987: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8, 338–348.
- Bluestone R, Grahame R, Holloway V, Holt PJL, 1970: Treatment of systemic sclerosis with D-penicillamine. *Ann. Rheum Dis* 29, 153-158.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P, 2009: Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology* 11, 600-608.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, 2015: Breed of boars influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reprod Domest. Anim* 50, 221-226.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C, 1997: Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2, 48-54.
- Diezel W, Engel S, Soñnichsen N, Hoñhne WE, 1980: Lipid peroxidation products in human spermatozoa: detection and pathogenic significance. *Andrologia* 12, 167–171.
- Funahashi H, Sano T, 2005: Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology* 63, 1605-1616.

- Gadea J, 2003: Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish J Agri Res 1, 17-27.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK, 2002: Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. Biol Reprod 67, 1811-1816.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ, 1979: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. Fertil Steril 31, 531–537.
- Junker P, 1986: D-penicillamine in rheumatoid arthritis. Indian J Pediatr 53, 625-628.
- Kaeoket K, Sang-urai P, Thamniyom A, Chanapiwat P, Techakumphu M, 2010a: Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Reprod Domest Anim 45, 458-463.
- Kaeoket K, Srisowanna T, Wichaidit U, Chanapiwat P, Manee-in S, 2010b: Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. Thai J Vet Med 40, 257-263.
- Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, Chanapiwat P, 2012: Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. J Vet Med Sci 74, 1149-1153.
- Kazemi K, Geramizadeh B, Nikeghbalian S, Salahi H, Bahador A, Reza Nejatollahi SM, 2008: Effect of D-penicillamine on liver fibrosis and inflammation in Wilson disease. Exp Clin Transplant 6, 261-263.
- Knox R. Levis D. Safranski T. Singleton W, 2008: An update on North American boar stud practices. Theriogenology 70, 1202-1208.

- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K.M., Bardoloi R.K., Anubrata, D., Kumar, S. and Naskar, S, 2009: Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci* 110, 162-171.
- Mapeka MH, Lehloenya KC, Nedambale TL, 2012: Comparison of different extenders and storage temperature on the sperm motility characteristics of Kolbroek pig semen. *S Afr J Anim Sci* 42, 530-534.
- Person CN, Lester TD, Person MD, Rorie RW, 2007: Effects of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) on post-thaw bovine sperm parameters, as measured by computer-assisted sperm analysis. *Ark Agr Exp Stat Res* 553, 47-50.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG, 1995: Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.* 16, 464–468.
- Wang P, Li BL, Li NB, Luo HQ, 2015: A fluorescence detection of D-penicillamine based on Cu²⁺-induced fluorescence quenching system of protein-stabilized gold nanoclusters. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 135, 198-202.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

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

ผลงานตีพิมพ์จำนวน 6 เรื่อง

Chanapiwat P. and **Kaeoket K.** 2019. Computer assisted sperm analysis (CASA) for boar semen evaluation. Thai J. Vet. Med. 49, S119-124.

Chanapiwat P., Buranasinsup S., and **Kaeoket K.** 2019. The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): comparing antioxidant activities with commercial semen extenders. Thai J. Vet. Med. 49, 113-115.

Chanapiwat P. and **Kaeoket K.** 2019. The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): comparing semen qualities with a commercial short term semen extender. Thai J. Vet. Med. 49, 116-117.

Chanapiwat P. and **Kaeoket K.** 2019. The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): comparing semen qualities with a commercial long term semen extender. Thai J. Vet. Med. 49, 118-119.

Chanapiwat P., Buranasinsup S., and **Kaeoket K.** 2019. The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): Pearson's correlation among levels of T-AOC, MDA and semen qualities. Thai J. Vet. Med. 49, 120-121.

Chanapiwat P. and **Kaeoket K.** 2019. Development of Long Term Boar Semen Extender by using Penicillin Metabolite Product. J. Vet. Med. Sci. **Submitted.**

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

-นำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยไปบรรยายเผยแพร่ให้กับพนักงานและนักวิชาการ

บริษัทเอกชน Phillips International Ltd., เรื่องการตรวจคุณภาพของสารละลายและการพัฒนาสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อสุกร

-สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ (ผศ.สพ.ญ. ดร. พนิดา ชนาภิวัดน์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.มหิดล) และฝึกนักศึกษาปริญญาตรีให้ทำวิจัยในรายวิชา โครงการวิจัย (senior project)

ภาคผนวก

Computer assisted sperm analysis (CASA) for boar semen evaluation

Panida Chanapiwat, Kampon Kaeoket**

Semen Laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Phuttamonthon, Nakhon-pathom, 73170, Thailand

*corresponding authors: panida.chn@mahidol.edu, kampon.kae@mahidol.edu

Keywords: Artificial insemination, Boar, Intrauterine insemination, Penicillamine, Spermatozoa

Introduction

Boar semen evaluation is the first step in semen processing and artificial insemination (AI) dose production. Effective methods for semen analysis are necessary for improving on reproductive performance. Generally, there are four parameters that are assessed boar semen quality including concentration, motility, viability and morphology. (1). Of these, concentration and sperm motility are most routinely used to select boar ejaculates and calculate semen doses prior to semen process of storage or cryopreservation. It is generally accepted that sperm motility reflects the viability of a sperm and a positive correlation between motility and fertilizing capacity has been shown in many species (2, 3). In practice, the motility of boar sperm is manually assessed with phase contrast microscopy by well-trained technicians. Visual assessment is cheap and not time-consuming but its accuracy depends on variation between and within technician experience (4). Moreover, it only allows discrete motility score (increment of 5-10%).

To improve the methodology of measuring sperm motility, several different methods have been developed for objective assessment including frame-by-frame video micrography, spectrophotometry and computer assisted sperm analyzer. The first commercial computer assisted sperm analysis (CASA) system was Cellsoft™ system which used for evaluation of sperm movement in human, mouse and rat sperm (5). In 1986, the next commercial CASA system, HTM-2000; was developed by Hamilton-Thorn research which include the optical system, video camera, keyboard, monitor and automatic positioning of semen sample in the box. Hamilton-Thorne introduced the IVOS integrated system in 1992,

and the CEROS for use with an available visible light/ phase-contrast microscope and computer. These innovations provide sharp images, accurate and precise image digitization and automated classification of sperm motility. Currently, there are many company produce CASA for boar semen analysis, and commercially available in Thailand for example, ISAS (Spain), SCA® (Spain) and AndroVision® (Germany).

Using CASA for semen evaluation

Nowadays, there are more than 12 CASA systems are commercially available, for use in animal sperm (6). Mostly, the basic principle of CASA systems is to view and capture successive image of 500-2000 sperm in multiple field, at 50-60 frames/second, and provide accurate and precise summary data for each sperm and population. CASA systems at lower frequency (<50 frames/second) may conceal data on sperm motility because of a sperm trajectory likely different than the real one (7). Based on centroid trajectory, a large number of sperm is assessed for sperm motility according to the proportion of sperm cells with strong progressive movement, non-progressive movement and no movement (rapid, slow and immotile sperm). The various kinematic sperm parameters or motility pattern included velocity average path (VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$), defined as average velocity along the smoothed cell path; curvilinear velocity in (VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), defined as average velocity along the entire trajectory;

Table 1 The mean percentages of sperm progressive motility and their kinetic parameters (using CASA, SCA®) of 7 extenders (i.e. two commercial extenders and Sperm-B-Fit^{Plus} with different concentrations of Penicillamine, PEN) on day 7 by using CASA (n=10)

Parameters	BTS	Androstar®Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.50	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	65.96	70.9	67.95	70.97	61.19	64.32	53.86
VCL(μm/s)	34.26	36.57	37.7	32.99	29.1	24.49	29.28
VSL(μm/s)	25.14	26.08	27.85	23.6	18.04	14.46	19.47
VAP(μm/s)	28.27	30.29	31.67	27.08	21.96	18.07	22.87
ALH(μm)	1.45	1.53	1.62	1.5	1.51	1.39	1.36
LIN(%)	73.4	71.31	73.86	71.53	62	59.02	66.52
STR(%)	88.96	86.1	87.93	87.14	82.15	80	85.16
WOB(%)	82.52	82.82	83.99	82.09	75.47	73.78	78.11
BCF(Hz)	7.09	6.88	6.81	6.71	6.15	6.86	6.74

straight linear velocity in micrometers per second (VSL, μm/sec), defined as average velocity of straight line path from first to last position of sperm head; amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), defined as mean lateral sperm displacement along the smoothed cell path; beat-cross frequency (BCF, Hz), Frequency of sperm head cross the smoothed cell path; straightness (STR), defined as ratio VSL:VAP which express the linearity of average path; linearity of the curvilinear path (LIN), defined as ratio VSL:VCL (8, 9). Velocity of any sperm is determined by VCL, VSL and VAP parameters (10) (Table 1). Hyperactivated motility is characterized by energetic, non-linear, non-progressive movement. This special type of movement is responsible for prevention of sperm entrapment and assistance of zona pellucida penetration before acrosome reaction. The kinematics characteristics of hyperactivated sperm are high VCL and ALH values with a decrease in LIN (10). In addition to sperm motion parameters, a few systems have been developed the different hardware and software to detect the abnormality of sperm such as cytoplasmic droplets (i.e. AndroVision®, Fig. 1), bent and coiled tail in wet and dry preparation.

Besides, total numbers of sperm in chamber were counted for use in AI dose calculation.

Furthermore, CASA systems could evaluate sperm function including the plasma membrane integrity, acrosome integrity, DNA fragmentation and mitochondrial activity, after staining sperm with specific-fluorescent probe. For motion characteristics and sperm concentration, values are not normally distributed and varied in among samples and individual animal (9).

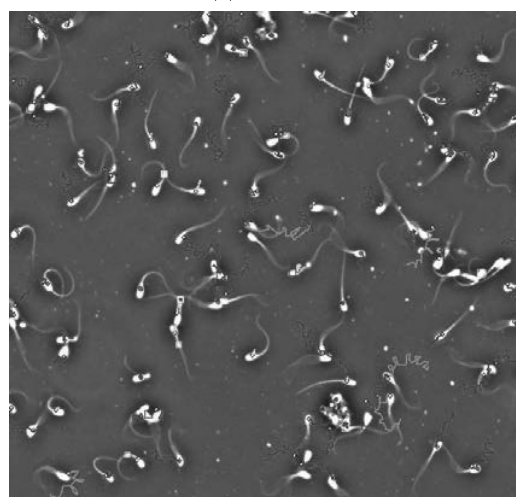


Figure 1 Picture show different motility patterns (green and orange) and proximal cytoplasmic droplet (yellow square) using AndroVision®.

The variation in accuracy and precision of each output parameters also depends on species,

type of extender, chamber type (Figs. 2 and 3), sample preparation, temperature (stage warmer should be set at 37°C, Fig. 4), time of sample analysis and instrument settings. More importantly, laboratory room with air condition, a set of CASA should be avoiding against cool air which resulted in under estimated of progressive motility during analysis.

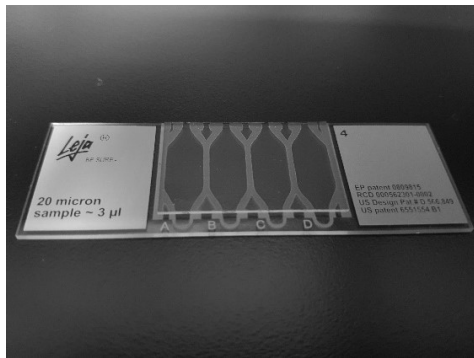


Figure 2 Leja® chamber (disposable chamber with 4 chambers).

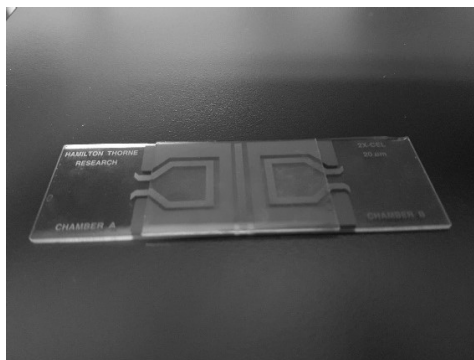


Figure 3 Hamilton Thorne Research (Reusable chamber with 2 chambers).

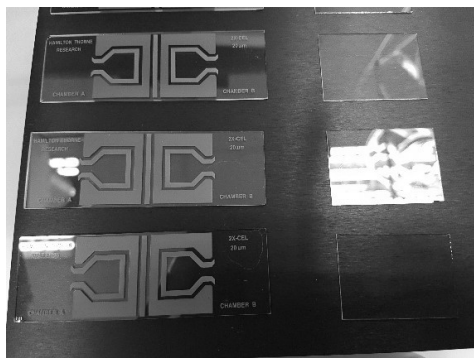


Figure 4 Warming Chamber and Coverslip at 37°C.

Factors affecting using CASA for semen evaluation

During CASA analysis performance, many factors can influence the precision and accuracy of output values of motion parameters or concentration including sample temperature, dilution factor, sample preparation, time of analysis, difference in chamber depth, validation of instrument setting and expertise of operators. Ejaculate sample temperature causes variation in CASA results. It is demonstrated that too low temperature result in the underestimation of progressive motility and leading to discard the ejaculates or less production of AI dose (11, 12). Based on sperm cell density in the chamber, a CASA system needs to optimal density because higher sperm density sample showed more collisions of sperm which affect the overestimated the number of motile sperms. The optimal dilution factor resulted in an increased number of analyzed samples and improved time speed of analysis which is quite important for running a CASA system in the field. Therefore, the dilution factor should be considered for varied concentration of ejaculate, different species or individual CASA systems (12, 13, 14). In semen preparation, mixing method also impact the CASA results. The mechanical mixing method for 3 sec showed significantly higher concentration and percentage of progressive motility when compared to manual mixing (tube upside down 5 times for 2-3 sec) (12). In counting chamber, it is indicated that chamber depth and starting position of measurement is also affecting the motility and concentration assessment due to the irregular distribution of sperm cells in the chamber (12, 15, 16). Lenz et al. (17) determined sex sorted frozen bull semen and revealed that total and progressive motility in Makler chamber or glass slides with coverslips were higher than Leja chamber approximately 25%. Nevertheless, no significant difference between Markler chamber and glass slide with coverslips was found. Therefore, the validation of other types of chamber in laboratory should be performed. Time of semen sample analysis after loading significantly influenced the motility results. Then, it is highly recommended to analyze immediately after chamber filling or loading

(12). To avoid meaningless data, the technician or operator must be well-trained and all hardware and software settings must be validated and checked regularly (12, 13). Finally, optimal temperature, dilution factor, mixing method, chamber depth, time of analysis and together with suitable training of technician is beneficial for standardized output values of CASA assessments.

The application of CASA in AI practice

Nowadays, the artificial insemination is generally extensively used in intensive pig farm worldwide. In practice, AI protocol refers to the intra-cervical deposition of a large number of sperm (generally more than 3 billion) in a dose of 80-100 ml using cervical catheter (Cervical Artificial Insemination, CAI). The number of inseminations was done 2-3 times/estrus cycle. In Thailand, current practices of using excessive number of sperm (probably over 5 billion sperm) has been routinely used for AI (19). In Thailand, during the past ten years, pig farmers have been implemented post cervical artificial insemination (PCAI) or intrauterine insemination (IUI) with a lower number of spermatozoa per dose of $1.5-2.0 \times 10^9$ with a less volume of 50 ml. When using this PCAI or IUI, a more accurate for measurement of sperm concentration is needed in order to minimize number of boar use per farm and also to spread superior genetic boar to each particular farm. Therefore, CASA technology is selected to fulfill this mission.

Normally, subjective motility is routinely assessed for selecting the good or poor boar ejaculates. However, this technician-based variation in sperm motility results make it difficult to predict the boar fertility. Hence, CASA systems is introduced to boar AI centers especially centers with a large number of boars. CASA systems are the valuable tools for semen evaluation because they provide simultaneously objective assessment of sperm motility, morphology and concentration within a few minutes. Total sperm motility and morphology are used to identify the useable ejaculates, whereas sperm concentration is measured to calculating the number of AI

doses from each ejaculate. Correct estimation of total sperm number in each ejaculate is an important economic parameter in boar AI centers (18). The more accurate calculation of total sperm number in an ejaculate contribute to a reduction in total sperm number per AI dose. Then, less number of boars will be necessary to produce the semen doses which leading to reducing cost of feed, facilities, labor and operating (18).

Besides, optimizing semen dose production, CASA is a tool for AI centers to predict the fertilizing capacity of ejaculates. Many studies showed that significant correlations between motility and fertility in cattle, horse, human and rabbit (20). In boar, several studies to determine the relationship between sperm motility parameters by CASA assessment and fertility have been reported (2, 20, 21, 22). The relationship between motility pattern (VAP, VSL, VCL, ALH and BCF) and fertility was found (2). In addition, Vyt et al. (22) revealed that the percentage of motile sperm was significantly associated with litter size as well as with total born alive piglets. The litter size increased by 0.14 piglet per 1% increase of the percentage of motile sperm (22). On the other hand, Didion (21) did not find any significant association of semen motility with in vivo fertility in boars. In 2012, it was found that farrowing rate and litter size was significantly affected by progressive motility and VAP, respectively. On the contrary, it was found that a negative correlation between CASA parameters (VSL, ALH) and litter size (20). Currently, the relatively high sperm numbers per dose used in commercial AI practice and the pooling of semen from boars that may masks the reduced fertility that can be demonstrated in some of these boars when lower numbers of sperm are used for AI.

In addition to liquid stored semen, computer-assisted sperm analysis (CASA) was also introduced to reduce subjective bias on the motility and morphology assessment and to discriminate sperm kinematic parameters in frozen-thawed semen. During cryopreservation, the sperm was injured by many factors and resulting in a reduction in

motility and low survival rate of sperm. There are several studies of post-thawed sperm quality evaluation using CASA systems in bull, buffalo, goat, fish and boar (23, 24, 25, 26, 27, 28). In boar, CASA system assessment can be used to improve the cryosurvival of sperm by comparing types of cryoprotectant, freezing and thawing procedures, equilibration time, supplementation of antioxidant in extender (19, 24). It is suggested that hyperactivated motility occur after freezing-thawing process. The post thawed sperm is characterized by an increase in LIN and a decrease in VCL and ALH. However, VSL and VAP do not increase after freezing- thawing procedures (24). Identification of hyperactivated motility is the prediction of the feasibility of sperm to fail to fertilize both *in vivo* or *in vitro* oocytes (10, 24). Therefore, the motility patterns of several hundred spermatozoa must be assessed, which is only practical using CASA.

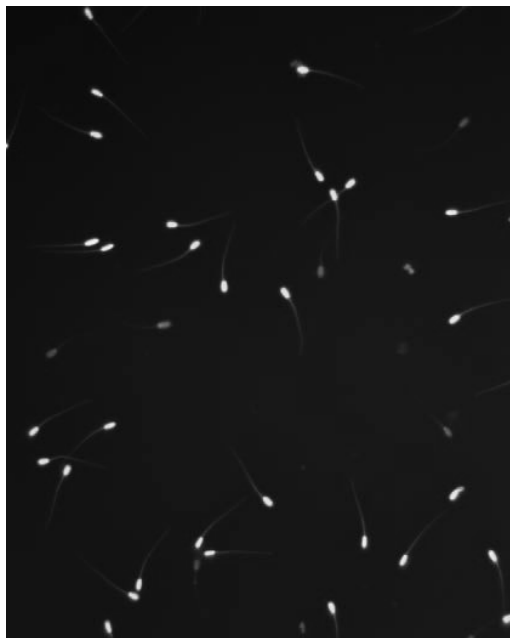


Figure 5 Spermatozoa stained green (SYBR-14, live and red (PI, dead) fluorescent using CASA, SQS® Pro.

Recently, there is a new CASA (SQS® Pro, Spain) that did not use the motility of spermatozoa for evaluation of semen quality, instead this CASA use viability of spermatozoa in which stained by using fluorescent SYBR-14 (green) and PI (red) (Fig. 5), the green represent live spermatozoa and red represent the dead

one. Besides, this CASA is able to detect plasma droplet and tail abnormality, taken the results of viability, plasma droplet and tail abnormality together and then calculate “useful spermatozoa” for semen doses (29).

In conclusion, CASA systems can play an extensively useful role in boar AI centers by identifying the useful sperm in each ejaculate and optimizing the production of AI dose during semen processing. Moreover, the relation between the semen qualities assessment using CASA and fertility can be very helpful in evaluating fertilizing capacity of boar ejaculate. However, the effect of individual boar and the breed of boar should be concerned for decisions regarding ejaculate rejection.

Acknowledgements

The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA5780049) and Mahidol University.

References

1. Singh et al., 2000. Anim Reprod Sci. 60-61: 693-604.
2. Holt et al., 1997. J Androl. 18: 312-323.
3. Gadea, 2005. Theriogenology. 63: 431-444.
4. Verstegen et al., 2002. Theriogenology. 57: 149-179.
5. Amann & Hammerstedt, 2002. J Androl. 23:317-325.
6. Amann & Waberski, 2014. Theriogenology. 81: 5-17.
7. Amann & Katz, 2004. J Androl. 25: 317-325.
8. Boyers et al., 1989. Curr. Probl. Ob-stet. Gynecol. Fertil. 65: 1292-1301.
9. Holt et al., 2007. Reprod Ferti Dev. 19: 709-718.
10. Mortimer, 2000. J Androl. 21: 515-524.
11. Kraemer et al., 1998. Hum Reprod. 13: 611-619.
12. Broekhuijse et al., 2011. Theriogenology. 76: 1473-1486.
13. Farrell et al., 1996. J Androl. 17: 293-300.
14. Rijsselaere et al., 2003. Theriogenology. 60: 1553-1568.
15. Spiropoulos, 2001. Arch Androl. 46: 37-42.
16. Douglas-Haminton et al., 2005. J Androl. 26: 107-114.

17. Lenz et al., 2011. J Anim Sci. 89: 383-388.
18. Ehlers et al., 2011. Theriogenology. 76: 448-454.
19. Johnson et al., 2000. Anim Reprod Sci. 62: 143-172.
20. Broekhuijse et al., 2012. J Anim Sci. 90: 779-789.
21. Didion, 2008. Theriogenology. 70: 1374-1376.
22. Vyt et al., 2008. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 77: 291-298.
23. Kime et al., 2001. Comp Biochem Physiol C. 130: 425-433.
24. Pena et al., 2003. Anim Reprod Sci. 78: 85-98.
25. Patel & Dhami, 2016. Indian J Anim Res. 50: 8-13.
26. Vazquez et al., 2015. Anim Reprod Sci. 154: 29-38.
27. Muino et al., 2008. Anim Reprod Sci. 109: 50-64.
28. Tretipskul et al., 2010. Thai J Vet Med. 40:25-30.
29. Chanapiwat and Kaeoket, 2017. Thai J Vet Med. 47, 45-46.

The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): Comparing antioxidant activities with commercial semen extenders

Panida Chanapiwat¹, Shutipen Buranasinsup², Kampon Kaeoket^{1,*}

¹Semen Laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, ²Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Phutthamonthon, Nakhon-pathom 73170, Thailand

*Corresponding author: vskkk@mahidol.ac.th

Keywords: antioxidant, boar, GSH-Px, MDA, semen, SOD

Introduction

Nowadays, most of pig farm worldwide, including Thailand use diluted fresh semen with $3\text{-}5 \times 10^9$ spermatozoa per 80-100 ml by using cervical artificial insemination technique. A major advantage of using fresh or chilled semen is about the stability of sperm fertility which is maintained even with low numbers ($1.5\text{-}2.0 \times 10^9$) of spermatozoa in the AI dose when using intrauterine insemination. However, if the planned storage time is shorter than 72 hours, it would be preferable to use short term extenders because this type of extender is inferior cost and the reproductive outcomes within 3 days are similar to long term extender. For long distance transportation, long or medium term semen extenders were considered for semen preservation. Farmer sometime reluctance to select which extender is suited with their need. Penicillamine (PEN) is a derivative of Penicillin; its D-isomer is a useful form (1). PEN has been used as antioxidant in the chilled storage of hamster, mice, stallion and human semen in which can maintained progressive motility after storage at room temperature (2). Therefore, the aim of this study was to test the antioxidant activities of short-, medium-, long-term commercial semen extenders that using by the pig farmer in Thailand and a new semen extender, containing PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}).

Materials and Methods

A Duroc boar provided semen of proven motility and morphology for this study. After collection, fresh semen samples were extended with 4 extenders, i.e. BTS, M III, Androstar[®] Plus (Phillips International Ltd., distributor of Minitube products in Thailand) and Sperm-B-Fit^{Plus} (formulated by Dr. Kampon Kaeoket) at a

dose of 3×10^9 sperm/100 ml, kept at 18°C (3) and investigated for antioxidant activities such as T-AOC, SOD, GSH-Px and MDA on day 7 after storage (semen collection day=day 0). The supernatant of diluted semen was collected by centrifugation of diluted semen at 2,000 rpm for 10 min, and kept in -20°C until analysis. The enzymatic activities of T-AOC, SOD, GSH-Px and the MDA were determined with a spectrophotometric method using T-AOC assay kit, SOD kit, GSH-Px kit and MDA kit (Nanjing Jiancheng Biological Engineering Research Institute, Jiangsu, China) (4) as follows;

Total anti-oxidative capability (T-AOC): T-AOC was measured using T-AOC assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. In principle, organism contains various antioxidative compounds which can reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , Fe^{2+} can react with phenanthroline to produce stable complex. It was able to calculate T-AOC by measuring OD values. The T-AOC activity was measured at 520 nm on the spectrophotometer (SPECTRONIC[®] 20 GENESYSTM, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA). Total T-AOC activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

Superoxide dismutase (SOD): The SOD activity was measured using an SOD assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. The SOD activity was measured at 560 nm on the spectrophotometer (Spectronic[®] 20 GenesysTM, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA). Total SOD activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

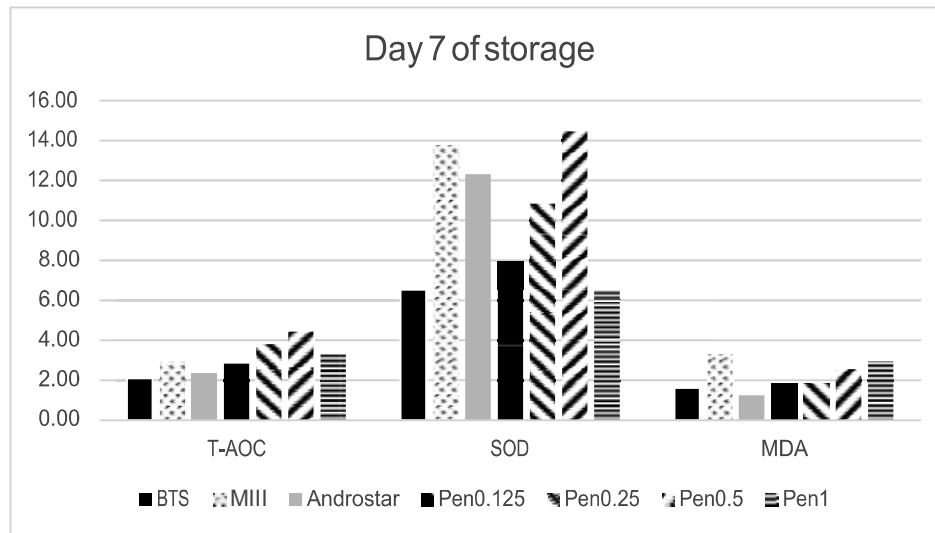


Figure 1 The levels of T-AOC (unit/ml), SOD (unit/ml) and MDA (nmol/ml) in different types of semen extenders on day 7 of storage at 18°C.

Glutathione peroxidase (GSH-Px): The GSH-Px activity was determined using GSH-Px assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. The GSH-Px activity was measured at 412 nm on the spectrophotometer. Total GSH-Px activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

Lipid peroxidation: Lipid peroxidation was estimated by the end point generation of malondialdehyde (MDA), the MDA content was analyzed with 2-thiobarbituric acid, monitoring the change of absorbance at 532 nm with the spectrophotometer according to the instructions of the MDA test kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China). The spermatozoa samples MDA levels were expressed as nmol/ml of supernatant.

Results and Discussion

The levels of T-AOC, SOD and MDA in different types of semen extenders are presented in Figure 1. However, the level of GSH-Px is not presented due to the level is under detectable limit.

The present results confirmed that during cold storage of fresh diluted boar semen even at 18°C, the oxidation is still occurred which can be seen from the level of MDA in different extenders. However, these levels differ among extenders. This might be due to the fact that the

differences in composition of each extender. For example, M III is medium term extender that showed a higher level of MDA than the other groups, while Androstar® plus showed a lowest levels of MDA. This is due to the fact that BSA and L-cysteine were added as lipid peroxidation inhibitor and antioxidant, respectively. For the enzymatic antioxidant activities, the levels of TOAC and SOD are also different among extenders which are depended on the different antioxidant and lipid peroxidation inhibitor used in each extender. The highest levels of T-AOC and SODs were found in Sperm-B-Fit^{Plus} when PEN0.5 was added. The lowest level of those enzymes was found in BTS group. This is to confirm that BTS (without antioxidant and lipid peroxidation inhibitor), a short term-extender in which can storage semen only for 3 days could not control the oxidation during cold storage. However, Sperm-B-Fit^{Plus}, contained PEN at different concentrations provided different levels of T-AOC and SOD, indicating a dose respond manner. Comparing the present results and our results on semen qualities (presented elsewhere), especially the progressive motility outcome, it has been shown that the progressive motility of higher than 70% on day 7 of storage at 18°C only found in Androstar® plus and Sperm-B-Fit^{Plus} groups. This implied that a new product, Sperm-B-Fit^{Plus} has its ability to prolong boar semen qualities as long as 7 days during storage at 18°C. This is in agreement with Aitken (2) in which PEN can

diminish lipid peroxidation and improves the qualities of semen during cold storage.

In conclusion, from the present results, Sperm-B-FitPlus is able to diminish lipid peroxidation and shows enzymatic antioxidant activities comparable to those of long term extender, Androstar® plus.

Acknowledgements

The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA5780049) and Mahidol University.

References

1. Wang et al., 2015. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 135: 198-202.
2. Aitken et al., 2012. Biol Reprod. 87: 1-11.
3. Kaeoket et al., 2010. Thai J Vet Med. 40: 257-263.
4. Hu et al., 2014. Anim Reprod Sci. 147: 112-118.

The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): Comparing semen qualities with a commercial short term semen extender

Panida Chanapiwat, Kampon Kaeoket*

Semen Laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Phutthamonthon, Nakhon-pathom 73170, Thailand
Corresponding author: vskkk@mahidol.ac.th

Keywords: antioxidant, boar, semen, spermatozoa

Introduction

Nowadays, most of pig farm in Thailand use fresh semen with a dose $3.0\text{-}5.0 \times 10^9$ spermatozoa per 80-100 ml together with traditional cervical catheter. A major advantage of using fresh or chilled semen is about the stability of fertility outcome which is maintained even with low numbers ($1.5\text{-}2.0 \times 10^9$) of spermatozoa in the AI dose when using with intrauterine insemination (IUI). However, if the planned storage time is shorter than 72 hours, it would be preferable to use short term extender because this type of extender is less expensive and the reproductive outcomes within 3 days are similar to long term extender. For long distance transportation, long or medium term semen extenders were considered for maintaining the qualities of semen during preservation. Pig farmer sometime reluctance to select which extender is suited with their need. Therefore, the aim of this study was to test the quality of a commercial short semen extender (BTS) that using by the pig farmer in Thailand and a new product, Sperm-B-Fit^{Plus}, which is formulated at Faculty of Veterinary Science, Mahidol University by adding Penicillamine (PEN) at a particular concentration.

Materials and Methods

Six Duroc boars provided semen of proven motility (progressive >70%) and morphology (normal >80%) for this study. After collection, fresh semen samples were extended with 2 extenders, i.e. BTS (Phillips International Ltd., distributor of Minitube products in Thailand) and Sperm-B-Fit^{Plus} (formulated by Dr. Kampon Kaeoket) at a dose of 3.0×10^9 sperm/100 ml, kept at 18°C (1) and investigated for progressive motility (under

phase contrast microscope), viability (SYBR-14/EthD-1, under fluorescence microscope), acrosome integrity (FITC-PNA), Osmolarity (Osmometer, Fiske® Micro-Osmometer model 210, Advance Instrument Inc., Massachusetts, USA) and pH (ConsortC830, Consort, Turnhout, Belgium) on days 3, 5 and 7 after storage (semen collection day = day 0). All the data are presented as Means±SD.

Results and Discussion

The semen qualities are presented in Tables 1-3.

Table 1 Semen qualities on day 3.

Parameters	BTS	Sperm-B-Fit ^{Plus}
Motility	62.0±11.5	68.0±13.0
Viability	76.2±8.5	70.8±6.8
Acrosome integrity	89.3±2.0	90.6±2.2
Osmolarity	323.8±1.9	318.0±3.5
pH	7.8±0.2	7.9±0.2

Table 2 Semen qualities on day 5.

Parameters	BTS	Sperm-B-Fit ^{Plus}
Motility	53.0±11.5	70.0±12.2
Viability	74.3±6.6	76.5±8.8
Acrosome integrity	87.3±4.7	88.8±3.6
Osmolarity	323.8±3.9	322.4±1.8
pH	7.9±0.2	7.8±0.2

Table 3 Semen qualities on day 7.

Parameters	BTS	Sperm-B-Fit ^{Plus}
Motility	46.0±8.9	70.0±13.7
Viability	72.1±5.1	68.6±7.5
Acrosome integrity	78.7±2.9	85.7±2.9
Osmolarity	321.8±1.9	318.6±4.0
pH	7.9±0.1	7.7±0.2

The present results, especially the progressive motility, confirmed that BTS is a medium term extender which is able to preserve the semen qualities only for 3 days. Considering the semen qualities (progressive motility, viability and acrosome integrity) on days 5 and 7 of Sperm-B-Fit^{Plus}, this new extender is considered as medium or long term extender. Sperm-B-Fit^{Plus}, a short term based extender, comprises of constituents (i.e. Penicillamine, PEN) which is able to maintain semen qualities as long as 8 days (semen collection day = day 0). This might be due to the direct effect of its constituents in term of inhibiting the lipid peroxidation (2, 3) and diminishing the quantity of ROS during the cold storage at 18°C (4).

In conclusion, BTS that was tested in this study show its ability to preserve boar semen qualities as declaration by the company. In addition, a new product, containing PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}) is considered as medium or long term extender.

Acknowledgements

The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA5780049) and Mahidol University.

References

1. Kaeoket et al., 2010. Thai J Vet Med. 40: 257-263.
2. Aitken et al., 2012. Biol Reprod. 87: 1-11.
3. Wang et al., 2015. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 135: 198-202.
4. Funahashi & Sano, 2005. Theriogenology. 63, 1605-1616.

The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-FitPlus): Comparing semen qualities with a commercial long term semen extender

Panida Chanapiwat, Kampon Kaeoket*

Semen Laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Phutthamonthon, Nakhon-pathom 73170, Thailand

Corresponding author: vskkk@mahidol.ac.th

Keywords: antioxidant, chelating agent, boar, lipid peroxidation, semen

Introduction

Nowadays, most of pig farm in Thailand use fresh semen with a dose $3.0\text{-}5.0 \times 10^9$ spermatozoa per 80-100 ml together with traditional AI. A major advantage of using fresh diluted semen is about the constancy of fertility (i.e. pregnancy rate and farrowing rate) which is maintained even with low numbers ($1.5\text{-}2.0 \times 10^9$) of spermatozoa in the AI dose when using with post-cervical artificial insemination (PCAI). However, if the designed storage time is shorter than 3 days, an extender of choice should be a short term extender because this type of extender is not expensive (approximately 2 US\$ per a small bag in Thai market) and the reproductive outcomes after storage for 3 days are similar to long term extender. However, if the pig farmer needs extender for long distance transportation, long term semen extenders was considered in order to maintain the qualities of semen during preservation at 18°C or lower temperature (1). Pig farmer sometime reluctance to select which extender is met with their need. Penicillamine (PEN) is a derivative of Penicillin, its D-isomer is a beneficial form (2). It has been used as antioxidant, chelating agent and lipid peroxidation inhibitor in the chilled storage of hamster, mice, stallion and human semen in which can maintained progressive motility after storage at room temperature (3). Therefore, the aim of this study was to test the quality of a commercial long semen extender (Androstar® Plus) that using by the pig farmer in Thailand and a new product, Sperm-B-FitPlus, which is formulated at Faculty of Veterinary Science, Mahidol University by adding Penicillamine (PEN) at a particular concentration.

Materials and Methods

Six Duroc boars provided semen of proven motility (progressive $>70\%$) and morphology (normal $>80\%$) for this study. After collection, fresh semen samples were extended with 2 extenders, i.e. Androstar® Plus (Phillips International Ltd., distributor of Minitube products in Thailand) and Sperm-B-FitPlus (formulated by Dr. Kampon Kaeoket) at a dose of 3.0×10^9 sperm per 100 ml, kept at 18°C (4) and investigated for progressive motility (under phase contrast microscope), viability (SYBR-14/EthD-1, under fluorescence microscope), acrosome integrity (FITC-PNA), Osmolarity (Osmometer, Fiske® Micro-Osmometer model 210, Advance Instrument Inc., Massachusetts, USA) and pH (ConsortC830, Consort, Turnhout, Belgium) on days 3, 5 and 7 after storage (semen collection day = day 0). All the data are presented as Means $\pm$ SD.

Results and Discussion

The results of semen qualities diluted with Androstar® Plus and Sperm-B-FitPlus are presented in Tables 1-3.

Table 1 Semen qualities on day 3.

Parameters	Androstar® Plus	Sperm-B-FitPlus
Motility	69.0 $\pm$ 14.3	68.0 $\pm$ 13.0
Viability	74.6 $\pm$ 9.2	70.8 $\pm$ 6.8
Acrosome integrity	91.0 $\pm$ 3.7	90.6 $\pm$ 2.2
Osmolarity	303.0 $\pm$ 7.8	318.0 $\pm$ 3.5
pH	7.8 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2

Table 2 Semen qualities on day 5.

Parameters	Androstar® Plus	Sperm-B-Fit ^{Plus}
Motility	76.0±4.2	70.0±12.2
Viability	75.5±4.8	76.5±8.8
Acrosome integrity	90.3±2.9	88.8±3.6
Osmolarity	302.0±3.1	322.4±1.8
pH	7.7±0.1	7.8±0.2

Table 3 Semen qualities on day 7.

Parameters	Androstar® Plus	Sperm-B-Fit ^{Plus}
Motility	73.0±6.7	70.0±13.7
Viability	73.1±5.1	68.6±7.5
Acrosome integrity	85.7±2.0	85.7±2.9
Osmolarity	297.2±0.5	318.6±4.0
pH	7.6±0.2	7.7±0.2

The present results confirmed that Androstar® plus is a long term boar semen extender, and Sperm-B-FitPlus is also considered as a long term boar semen extender. This was supported by its ability to maintain semen qualities such as progressive motility, viability and acrosome integrity as long as 8 days (semen collection day = day 0) of storage at 18°C. In agreement with Aitken (3), semen extender that contained PEN can diminish lipid peroxidation and improve the qualities of semen during cold storage. This might be due to the direct effect of its constituents (i.e. PEN) in term of inhibiting the lipid peroxidation and diminishing the quantity of ROS during the cold storage as can be confirm by the level of MDA, T-AOC and SOD in the supernatant of extender (presented elsewhere). The semen qualities result of Sperm-B-Fit^{Plus} is comparable with that result of Androstar® plus, even though the latter semen extender contained BSA (lipid peroxidation inhibitor) and L-cysteine (active antioxidant). With this regards, for commercial purpose, Sperm-B-Fit^{Plus} has a lower cost for production (approximately 1.5 US\$ per a small bag).

In conclusion, Sperm-B-Fit^{Plus}, a new product, containing PEN at a particular concentration is

able to preserve boar semen qualities as long as 8 days of storage, which comparable to a commercial long term boar semen extender, Androstar® plus.

Acknowledgements

The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA5780049) and Mahidol University.

References

1. Funahashi & Sano, 2005. Theriogenology. 63: 1605-1616.
2. Wang et al., 2015. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 135: 198-202.
3. Aitken et al., 2012. Biol Reprod. 87: 1-11.
4. Kaeoket et al., 2010. Thai J Vet Med. 40: 257-263.

The development of fresh boar semen extender by adding PEN (Sperm-B-Fit^{Plus}): Pearson's correlation among levels of T-AOC, MDA and semen qualities

Panida Chanapiwat¹, Shutipen Buranasinsup², Kampon Kaeoket^{1,*}

¹Semen Laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, ²Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon-pathom 73170, Thailand

*Corresponding author: vskkk@mahidol.ac.th

Keywords: antioxidant, boar, GSH-Px, lipid peroxidation, MDA, semen, SOD

Introduction

Nowadays, most of pig farm use the fresh semen with 3-5x10⁹ spermatozoa per 80-100 ml. A major advantage of using fresh or chilled semen is about the stability of sperm fertility which is maintained even with low numbers of spermatozoa in the AI dose. However, if the planned storage time is shorter than 72 hours, it would be preferable to use short term extenders because this type of extender is less expensive and the reproductive outcomes within 3 days are similar to long term extender. For long distance transportation, long or medium term semen extenders were considered for semen preservation. Farmer sometime reluctance to select which extender is suited with their need. Boar spermatozoa, its plasma membrane comprises of rather high levels of polyunsaturated fatty acid (PUFAs) which decreased dramatically when the spermatozoa are attacked by reactive oxygen species (ROS) due to lipid peroxidation during cold storage and after freezing (1, 2). Penicillamine (PEN) is a derivative of Penicillin; its D-isomer is a beneficial form (3). It has been used as antioxidant, chelating agent and lipid peroxidation inhibitor in the chilled storage of stallion and human semen in which can maintained progressive motility after storage at room temperature (Aitken). Therefore, the aim of this study was to test the quality of a new product Sperm-B-Fit^{Plus}, which contained PEN as a lipid inhibitor by using antioxidant activities as a measure parameter.

Materials and Methods

Six boars provided semen of proven motility and morphology for this study. After collection, fresh semen samples were extended

with a medium/long term semen extender, Sperm-B- Fit^{Plus} (formulated by Dr. Kampon Kaeoket) at a dose of 3x10⁹ sperm/100 ml, kept at 18°C (4) and investigated for progressive motility (under phase contrast microscope), viability (SYBR-14/EthD-1, under fluorescence microscope), acrosome integrity (FITC-PNA) as well as antioxidant activities such as the levels of T-AOC and MDA (5) on days 0, 3, 5, 7 after storage (semen collection day = day 0). The supernatant of diluted semen was collected by centrifugation at 2,000 rpm for 10 min, and kept in -20°C until enzyme analyses. The enzymatic activities of T-AOC and MDA were determined with a spectrophotometric method using T-AOC assay kit and MDA kit (Nanjing Jiancheng Biological Engineering Research Institute, Jiangsu, China) as follows;

Total anti-oxidative capability (T-AOC): TOAC was measured using TAOC assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. Organism contains various antioxidative compounds which can reduce Fe³⁺ to Fe²⁺, Fe²⁺ can react with phenanthroline to produce stable complex. It was able to calculate T-AOC by measuring OD values. The T-AOC activity was measured at 520 nm on the spectrophotometer (Shanghai Spectrophotometer Co. Ltd., China). Total T-AOC activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

Membrane lipid peroxidation: Membrane lipid peroxidation was estimated by the end point generation of malondialdehyde (MDA), the MDA content was analyzed with 2-thiobarbituric acid, monitoring the change of absorbance at 532 nm with the spectrophoto-

meter according to the instructions of the MDA test kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China). The spermatozoa samples MDA levels were expressed as nmol per ml of supernatant (nmol/ml).

Superoxide dismutase (SOD): The SOD activity was measured using an SOD assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. The SOD activity was measured at 560 nm on the spectrophotometer (SPECTRONIC® 20 GENESYSTEM, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA). Total SOD activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

Glutathione peroxidase (GSH-Px): The GSH-Px activity was determined using GSH-Px assay kit (Biology Institute of Nanjing Jianchen, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instruction. The GSH-Px activity was measured at 412 nm on the spectrophotometer. Total GSH-Px activity of each sample was converted into units per ml of supernatant (U/ml).

Statistical analysis: Pearson's correlation among semen qualities (i.e. progressive motility, viability and acrosome integrity), MDA levels and T-AOC

Results and Discussion

The selected results of Pearson's correlation among levels of T-AOC, MDA and semen qualities are presented in Tables 1 and 2. A negative correlation between PEN concentration and viability was found on day 5 ($r=0.49$, $P=0.04$) and 7 ($r=0.48$, $P=0.4$). A positive correlation between PEN concentration and MDA was found on day 7 ($r=0.56$, $P=0.01$). In addition, a tendency ($r=0.44$, $P=0.06$) of positive correlation between progressive motility on day 5 and viability on the same day was also found.

The present results confirmed that there are negative and positive correlation among semen qualities and antioxidant activities (i.e. T-AOC). This might be due to the fact that its constituents, PEN, with its function as antioxidant and lipid peroxidation inhibitor (1, 3), and may be in part, diminishing the quantity of ROS during the cold storage. The results of Pearson's correlation, particular a tendency of negative correlation between MDA

levels and viability (i.e. a lower level of MDA in the diluted semen resulted in a higher viability of spermatozoa), confirm that the semen qualities such as viability is also depended on the concentration of PEN used in the study. This means that the particular amount of PEN is needed to achieve an optimal viability and also progressive motility during cold storage of boar semen.

Table 1 Correlation among semen qualities, T-AOC and MDA levels (P -value).

Parameters	T-AOC day 3	T-AOC day 5	T-AOC day 7
Motility day 5		-40.7(0.09)	
Motility day 7			-53.0(0.02)
Viability day 3	0.58(0.01)		
Acrosome integrity day 5		-0.51(0.03)	
Acrosome integrity day 7			0.40(0.1)
MDA day 7			0.51(0.03)

In conclusion, the present results show that there is a correlation among semen qualities and the level of MDA and T-AOC, particularly, the level of MDA and the viability of spermatozoa during storage.

Acknowledgements

The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA578004) and Mahidol University.

References

1. Sikka et al., 1995. J Androl. 16: 464-468.
2. Funahashi & Sano, 2005. Theriogenology. 63: 1605-1616.
3. Aitken et al., 2012. Biol Reprod. 87: 1-11.
4. Kaeoket et al., 2010. Thai J Vet Med. 40: 257-263.
5. Hu et al., 2014. Anim Reprod Sci. 147: 112-118.

Short running title: Penicillamine prolonged fresh boar semen qualities

Development of Long Term Boar Semen Extender by using Penicillin Metabolite Product

P Chanapiwat and K Kaeoket

Semen laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon-pathom 73170, Thailand

Authors' address (for correspondence): K Kaeoket, Semen laboratory, Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon-pathom 73170, Thailand. E-mail: vskkk@mahidol.ac.th

Content

The present study aimed to develop long term fresh boar semen extender by adding Penicillamine (PEN) into BTS based extender. Semen were collected from 6 boars, diluted at a concentration 3×10^9 spermatozoa/100 ml and allocated into 8 groups as follows: BTS, Merck III, Androstar[®] plus, PEN 0.125, PEN 0.25, PEN 0.5, PEN 1.0, PEN 2.0 mM. All extended semen samples were stored under 18°C, and were evaluated for progressive motility, viability, acrosome integrity, pH and osmolality on days 0, 1, 3, 5 and 7. On days 0, 1 and 3 of storage, there were no statistically significant differences in all parameters among extenders. On day 5, semen diluted with PEN at a concentration of 0.25 mM and Androstar[®]Plus were able to maintain progressive motility up to 70.0% and 76.0%, respectively ($P < 0.01$). On day 7, semen diluted with PEN at a concentration of 0.25 mM maintained progressive motility (70.0%) and acrosome integrity (85.7%) which comparable to long term semen extenders (Androstar[®]Plus) ($P < 0.01$). In conclusion, adding PEN at a concentration of 0.25 mM in BTS based extender is the optimal concentration for preservation of fresh boar semen for 7 days at 18 °C.

Keywords: Antioxidant, boar, Penicillamine, semen extender

Introduction

Artificial insemination (AI) in pig industry is widely performed throughout the world (Gadea, 2003). This technique is low cost, easily management and diminish transmission of many venereal diseases in pig farm. One of the importance processes of AI include a dilution of fresh boar semen in semen extender. The commercially available semen extenders can be divided into three major groups such as short-term (less than 3 days), medium-term (less than 5 days) and long term (less than 7 days) extenders. After dilution, the diluted semen can be stored at 15-20°C, which can reduce sperm metabolic activity. Semen extender also provide nutrients needed for the metabolic maintenance of sperm, controlling osmotic pressure, pH buffering, ion for membrane and cell balance and also antibiotics to prevent bacterial growth (Gadea, 2003; Knox et al, 2008; Mapeka et al, 2012). Boar sperm plasma membrane consists of high levels of polyunsaturated fatty acid (PUFAs) in which decrease dramatically when the spermatozoa are attacked by reactive oxygen species (ROS) due to lipid peroxidation during cold storage (Sikka et al, 1995). It is well known that antioxidants had beneficial effects on sperm quality during cold storage including decreasing detrimental effect of ROS on sperm plasma membrane leading to increased sperm survival rate and acceptable sperm qualities after preservation (Funahashi and Sano, 2005).

Penicillanmine (PEN) is a derivative of Penicillin; its D-isomer is a useful form (Wang et al. 2015). In human medicine, PEN is an anti-rheumatic drug for treating rheumatoid arthritis which can reduce level of some heavy metal agent in such as Copper (Cu), Iron (Fe), Lead (Pb), Zinc (Zn) and many free radical (Kazemi et al, 2008). Recently, it has been used as antioxidant in the chilled storage of hamster, mice, stallion and human semen in which can maintained progressive motility of stallion semen up to 50% after storage for 8 days at room temperature (Aitken et al, 2012). In addition, it has also been reported that adding PEN in the freezing extender during cryopreservation of bull semen yielded a higher percentage of progressive motility in the treatment than that of control (Person et al, 2007). Aitken et al. (2012) proposed that PEN may act as antioxidant by binding with 4-HNE, end product of lipid peroxidation that able to activate ROS generation, before they bind with sperm protein, thereby neutralizing their

ability to disrupt motility. Consequently, PEN can significantly enhance sperm motility and viability. These can be hypothesized that PEN with its antioxidant activity as described by Aitken et al. (2012) can be used as an antioxidant in semen extender and may improve the quality of cold storage boar semen. However, no study has been reported about the effect of PEN on the quality of cold storage boar semen. Therefore, the aim of this study was to investigate the optimal concentration of PEN for adding into BTS based extender for storage of boar semen at 18 °C.

Materials and Methods

This research project was approved by the Faculty of Veterinary Science-Animal Care and Use Committee (FVS-ACUC-Protocol No. MUVS-2015-09)

Animals

Altogether 6 boars (two Pietrain boars, two Pietrain x hampshire boars, two Pietrain x duroc) varied in age (between 2-7 years). The boars were housed in the closed house system with individual pens. Each boar has been used for artificial insemination routine every 3-4 months and fed with commercial diet twice daily along with *ad libitum* water via water nipple.

Semen collection

Semen from each boar was collected by using gloved-handed method. During collection method, semen was filtered by gauze (only sperm rich fractions was collected), after collection, semen volume, pH, sperm motility and concentration were determined. Only ejaculates with motility of $\geq 70\%$ and morphology $\geq 80\%$ were used. Semen was diluted with each Extender (3×10^9 spermatozoas/100ml). Then storage it in Plastic artificial insemination bottles at a temperature of 18 °C for 8 days and evaluated this semen at 0, 1, 3, 5 and 7 days

Extenders

Each semen sample was diluted with different extenders as earlier described by Kaeoket et al. (2010) and was further divided into 8 groups as follows: first 3 groups served as control commercial extenders consist of BTS (short term extender, Minitübe GmbH & CO. KG, Tiefenach, Germany), Merck-III® (medium term extender, Minitübe GmbH & CO. KG,

Tiefenach, Germany), Androstar®Plus (long term extender, Minitübe GmbH & CO. KG, Tiefenach, Germany). Other 5 groups served as treatment groups in which were diluted with BTS based extender and supplemented with different concentrations of PEN at 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mM.

Sperm Evaluation

Preparation of distilled water and dilute solution at 37 ° C about one hour before used. Then, place the container of diluted semen in a water bath for heated a temperature to 37°C about 30 minutes before used.

Sperm progressive motility

The percentage progressive motility of spermatozoa was evaluated by the same person throughout experiment under phase contrast microscope at 100x 200x and 400x magnification (Chanapiwat and Kaeoket 2015).

Osmolarity and pH measurement

The pH parameter was assessed by using pH meter (ConsortC830, Consort, Turnhout, Belgium). A range should be not lower than 6.5 (Newth et al., 1999). Osmolarity of this semen was evaluated by using a single-sample osmometer (Fiske® Micro-Osmometer model 210, Advance Instrument Inc., Massachusetts, USA) (Kaeoket et al. 2010b).

Sperm viability (Sperm plasma membrane integrity)

The assessment of sperm viability was evaluated by using SYBR-14/Ethidiumhomodimer-1 and the ten microliters of diluted spermatozoa were mixing with 2.7 µl of the SYBR-14 solution and 10 µl of EthD-1 to estimate the viability after the 15 minutes of incubation at 37°C. A 200 spermatozoa were assessed under fluorescence 400x microscope. Spermatozoa were separated into 2 types as lived sperm (stained green) and dead sperm (stained red). The results were expressed by the percentage of lived sperm accordingly (Kaeoket et al. 2012).

Sperm acrosome integrity

Using 10 µl of the diluted semen solution mixed with 10 µl of Ethidium- homodimer-1 and fluorescein isothiocyanate-labeled peanut (*Arachishypogaea*) agglutinin (FITC- PNA) and

incubated at 37°C for 15 minutes then dropping the semen amount 5µl of the mixture and smeared on a glass slide, fixed with 95% ethanol for 30 second. Then incubation in 4°C moist chamber 30 minutes after spreading over the slide by 50 µl FitC-PNA (dilute Fit C-PNA with PBS 1:10 v/v) (Kaeoket et al. 2010a; Chanapiwat et al. 2009). Next process were rinsed with cold PBS and air dried before evaluation. Two hundred spermatozoa were assessed under fluorescent microscope at 1000x magnification and classified as intact acrosome and non-intact acrosome. The results were scored as the percentage of intact acrosome of spermatozoa.

Statistical analyses

The statistical analysis was made using the Statistical Analysis System software package. Data from the evaluation of sperm qualities were analyzed by using the general linear model (SPSS 22.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and expressed as mean $\pm$ SD. The treatment groups and the day were modeled according to the Factorial Experiments in Complete Randomized Design (CRD). The effects of treatments on parameters were analyzed by using the Analysis of variance (ANOVA) in GLM. When the difference of value parameter were significant it was defined as $P < 0.05$.

Results

The percentage of progressive motility, viability and acrosome integrity on days 0, 1, 3, 5 and 7 are presented in Tables 1-5. The means of osmolality and pH are also presented in Tables 1-5. Most semen qualities on days 0 and 1 are in a normal range (Tables 1 and 2).

On day 3 (Table 3), comparing all treatment groups, there were no statistically significant differences in all parameters among extenders.

On day 5 (Table 4), comparing all treatment groups, PEN 0.25 mM treated group had a significant higher percentage of progressive motility (70.0%) than the other groups, but not differ from long term extender (Androstar®Plus) ($P < 0.05$).

On day 7 (Table 5), there were only 2 extenders that showed a progressive motility of more than 70%, i.e. PEN 0.25 mM (70.0%) and Androstar®Plus (73.0%) which had statistically significant differences from the other groups. These 2 extenders also had a higher percentage

of acrosome integrity than other groups (Androstar®Plus= 85.7% and Pennicillamine 0.25 mM treated group = 85.7%) ($P<0.05$).

For the percentage of viability, there was no significant difference among groups (Tables 1-5)

Discussion

In this study, we compare eight extenders with parameter such as progressive motility, viability and acrosome integrity of boar sperm during storage for 7 days at 18 °C. The present results clearly show that the supplement of PEN at a concentration of 0.25 mM was able to maintain sperm motility and acrosome integrity up to 7 days with comparable to long term extender (i.e. Androstar®Plus). This is in agreement with earlier reported by Aitken et al. (2012) in that PEN can maintained progressive motility of stallion semen up to 50% after storage for 8 days at room temperature. Reasonably, BTS and Merck-III maintained the semen qualities up to 3 days as claimed by a manufacturer. It has long been known that excessive ROS formation by sperm metabolism during cold storage has been associated with damaging plasma membrane and consequently reducing sperm motility (de Lamirande et al, 1997; Guthrie et al, 2002; Kumaresan et al, 2009). In addition, ROS induce lipid peroxidation is related with the generation of electrophilic cytotoxic aldehydes such as 4-hydroxynonenal (4HNE) (Jones et al, 1979; Diezel et al, 1980; Aitken et al, 2012). Electrophilic cytotoxic aldehydes are binding protein thiols that regulate sperm movement so the sperm are loss motility and positive feedback of ROS generation (Alvarez et al, 1987; Aitken and Curry, 2011). Aitken et al. (2012) proposed that PEN may act as antioxidant by binding with 4-HNE, end product of lipid peroxidation that able to activate ROS generation, before they bind with sperm protein, thereby neutralizing their ability to disrupt motility. This may explained the significantly enhance boar sperm progressive motility and viability during cold storage at 18 °C for 7 days in the present study. In conclusion, adding PEN at a concentration of 0.25 mM in BTS based extender is the optimal concentration for preservation of fresh boar semen for 7 days at 18 °C.

Acknowledgement

The authors are grateful to Dr. Surasak Jittakhot, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University for advice in statistical analysis. The research grant was provided by The Thailand Research Fund (TRF, RSA5780049) and Mahidol University.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Author contribution

The experiment was conducted, analysed and interpreted by P Chanapiwat and K Kaeoket, and the manuscript was drafted by P Chanapiwat and K Kaeoket.

Reference

- Aitken RJ, Curry BJ, 2011: Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* **14**, 367-381.
- Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, De Iuliis GN, 2012: Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod* **87**, 1-11.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, 1987: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* **8**, 338-348.
- Bluestone R, Grahame R, Holloway V, Holt PJL, 1970: Treatment of systemic sclerosis with D-penicillamine. *Ann. Rheum Dis* **29**, 153-158.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P, 2009: Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology* **11**, 600-608.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, 2015: Breed of boars influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reprod Domest. Anim* **50**, 221-226.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C, 1997: Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* **2**, 48-54.
- Diezel W, Engel S, Soñnichsen N, Höhne WE, 1980: Lipid peroxidation products in human

- spermatozoa: detection and pathogenic significance. *Andrologia* **12**, 167-171.
- Funahashi H, Sano T, 2005: Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology* **63**, 1605-1616.
- Gadea J, 2003: Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish J Agri Res* **1**, 17-27.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK, 2002: Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **67**, 1811-1816.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ, 1979: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* **31**, 531-537.
- Junker P, 1986: D-penicillamine in rheumatoid arthritis. *Indian J Pediatr* **53**, 625-628.
- Kaeoket K, Sang-urai P, Thamniyom A, Chanapiwat P, Techakumphu M, 2010a: Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reprod Domest Anim* **45**, 458-463.
- Kaeoket K, Srisowanna T, Wichaidit U, Chanapiwat P, Manee-in S, 2010b: Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. *Thai J Vet Med* **40**, 257-263.
- Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, Chanapiwat P, 2012: Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J. Vet. Med. Sci* **74**, 1149-1153.
- Kazemi K, Geramizadeh B, Nikeghbalian S, Salahi H, Bahador A, Reza Nejatollahi SM, 2008: Effect of D-penicillamine on liver fibrosis and inflammation in Wilson disease. *Exp Clin Transplant* **6**, 261-263.
- Knox R, Levis D, Safranski T, Singleton W, 2008: An update on North American boar stud practices. *Theriogenology* **70**, 1202-1208.
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K.M., Bardoloi R.K., Anubrata, D., Kumar, S. and Naskar, S, 2009: Preservation of boar semen at 18 degrees C induces

- 1 lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Anim. Reprod.
2 Sci **110**, 162-171.
- 3 Mapeka MH, Lehloenya KC, Nedambale TL, 2012: Comparison of different extenders and
4 storage temperature on the sperm motility characteristics of Kolbroek pig semen. S Afr J
5 Anim Sci **42**, 530-534.
- 6 Person CN, Lester TD, Person MD, Rorie RW, 2007: Effects of penicillamine, hypotaurine
7 and epinephrine (PHE) on post-thaw bovine sperm parameters, as measured by
8 computer-assisted sperm analysis. Ark Agr Exp Stat Res **553**, 47-50.
- 9 Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG, 1995: Role of oxidative stress and antioxidants in
10 male infertility. J Androl. **16**, 464-468.
- 11 Wang P, Li BL, Li NB, Luo HQ, 2015: A fluorescence detection of D-penicillamine based on
12 Cu²⁺-induced fluorescence quenching system of protein-stabilized gold nanoclusters.
13 Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **135**, 198-202.

14

Table 1. The mean ($\pm$ SD) percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 0 (n=6)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	72.0 $\pm$ 26.1	64.0 $\pm$ 25.3	76.0 $\pm$ 24.8	70.0 $\pm$ 19.0	70.0 $\pm$ 18.7	63.0 $\pm$ 23.4	65.0 $\pm$ 21.8	54.0 $\pm$ 21.9
Viability	76.9 $\pm$ 4.7	67.6 $\pm$ 9.3	72.0 $\pm$ 4.6	70.5 $\pm$ 10.2	75.4 $\pm$ 5.5	67.8 $\pm$ 14.5	70.6 $\pm$ 9.8	63.4 $\pm$ 12.7
Acrosome integrity	93.2 $\pm$ 2.3	89.2 $\pm$ 7.8	91.1 $\pm$ 2.9	91.1 $\pm$ 0.6	89.8 $\pm$ 3.4	92.4 $\pm$ 2.7	91.3 $\pm$ 1.7	92.3 $\pm$ 2.7
Osmolarity	323.0 $\pm$ 3.0	363.4 $\pm$ 15.2	302.8 $\pm$ 6.3	323.6 $\pm$ 4.5	336.6 $\pm$ 18.2	328.0 $\pm$ 8.0	327.0 $\pm$ 7.2	333.6 $\pm$ 15.6
pH	8.0 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 1.8	7.8 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1

Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different (P<0.01)

Table 2. The mean ($\pm$ SD) percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 1 (n=6)

Parameters	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	73.0 $\pm$ 9.1	71.0 $\pm$ 19.2	84.0 $\pm$ 8.9	72.0 $\pm$ 18.2	73.0 $\pm$ 19.9	73.0 $\pm$ 18.6	67.0 $\pm$ 7.6	64.0 $\pm$ 19.2
Viability	68.8 $\pm$ 10.8	63.9 $\pm$ 6.3	67.1 $\pm$ 9.4	71.1 $\pm$ 6.4	65.6 $\pm$ 6.7	62.5 $\pm$ 5.3	66.3 $\pm$ 4.0	65.7 $\pm$ 9.6
Acrosome integrity	91.0 $\pm$ 2.7	89.1 $\pm$ 4.1	87.0 $\pm$ 2.2	91.5 $\pm$ 3.7	92.5 $\pm$ 2.4	91.8 $\pm$ 2.2	90.2 $\pm$ 2.8	87.4 $\pm$ 3.3
Osmolarity	326.4 $\pm$ 4.4	360.4 $\pm$ 2.6	309.6 $\pm$ 7.8	326.4 $\pm$ 4.4	325.0 $\pm$ 8.0	321.0 $\pm$ 2.6	327.2 $\pm$ 4.3	324.6 $\pm$ 6.5
pH	8.0 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.2	7.84 $\pm$ 0.2

Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different (P<0.01)

1
2
3

Table 3. The mean ($\pm$ SD) percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 3 (n=6)

5

Parameter	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	62.0 $\pm$ 11.5	55.0 $\pm$ 15.4	69.0 $\pm$ 14.3	69.0 $\pm$ 12.4	68.0 $\pm$ 13.0	67.0 $\pm$ 14.4	63.0 $\pm$ 12.0	56.0 $\pm$ 15.6
Viability	76.2 $\pm$ 8.5	70.7 $\pm$ 6.0	74.6 $\pm$ 9.2	74.1 $\pm$ 8.4	70.8 $\pm$ 6.8	70.2 $\pm$ 5.0	70.9 $\pm$ 4.6	72.5 $\pm$ 9.1
Acrosome integrity	89.3 $\pm$ 2.0	89.3 $\pm$ 4.2	91.0 $\pm$ 3.7	90.5 $\pm$ 2.7	90.6 $\pm$ 2.2	92.2 $\pm$ 2.1	89.8 $\pm$ 2.4	88.2 $\pm$ 4.2
Osmolarity	323.8 $\pm$ 1.9	358.0 $\pm$ 7.5	303.0 $\pm$ 7.8	320.0 $\pm$ 5.8	318.0 $\pm$ 3.5	320.6 $\pm$ 5.7	321.0 $\pm$ 2.6	324.6 $\pm$ 1.8
pH	7.8 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.2

6

Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different (P<0.01)

8
9

Table 4. The mean ($\pm$ SD) percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 5 (n=6)

Parameter	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	53.0 $\pm$ 11.5 ^c	47.0 $\pm$ 12.0 ^c	76.0 $\pm$ 4.2 ^a	63.0 $\pm$ 14.8 ^{abc}	70.0 $\pm$ 12.2 ^{ab}	63.0 $\pm$ 11.0 ^{abc}	59.0 $\pm$ 8.9 ^{bc}	48.0 $\pm$ 14.8 ^c
Viability	74.3 $\pm$ 6.6	71.6 $\pm$ 8.5	75.5 $\pm$ 4.8	73.0 $\pm$ 7.7	76.5 $\pm$ 8.8	72.1 $\pm$ 8.2	69.0 $\pm$ 5.5	69.6 $\pm$ 4.9
Acrosome integrity	87.3 $\pm$ 4.7	88.4 $\pm$ 5.1	90.3 $\pm$ 2.9	89.25 $\pm$ 1.4	88.8 $\pm$ 3.6	89.0 $\pm$ 8.8	88.8 $\pm$ 2.0	87.5 $\pm$ 2.9

Osmolarity	323.8 ± 3.9	358.0 ± 4.2	302.0 ± 3.1	329.8 ± 5.4	322.4 ± 1.8	322.8 ± 3.4	323.8 ± 3.6	323.0 ± 2.6
pH	7.9 ± 0.2	8.0 ± 0.1	7.73 ± 0.1	7.86 ± 0.1	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.4	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.2

Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different (P<0.01)

Table 5. The mean (±SD) percentages of progressive motility, viability, acrosome integrity, osmolarity and pH and of 8 extenders on day 7 (n=6)

Parameter	BTS	Merck-III	Androstar® Plus	PEN 0.125	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1.0	PEN 2.0
Progressive motility	46.0 ± 8.9 ^{bc}	44.0 ± 16.7 ^c	73.0 ± 6.7 ^a	63.0 ± 14.4 ^{ab}	70.0 ± 13.7 ^a	57.0 ± 14.8 ^{abc}	50.0 ± 10.6 ^{bc}	49.0 ± 12.9 ^{bc}
Viability	72.1 ± 5.1	69.5 ± 3.0	73.1 ± 5.1	68.3 ± 6.5	68.6 ± 7.5	67.3 ± 6.2	64.2 ± 5.5	61.3 ± 7.4
Acrosome integrity	78.7 ± 2.9 ^c	78.9 ± 2.3 ^c	85.7 ± 2.0 ^a	81.6 ± 3.0 ^{bc}	85.7 ± 2.9 ^a	81.6 ± 3.3 ^{bc}	83.7 ± 2.4 ^{ab}	78.8 ± 2.3 ^c
Osmolarity	321.8 ± 1.9	356.0 ± 3.5	297.2 ± 0.5	320.4 ± 5.4	318.6 ± 4.0	322.8 ± 4.6	321.2 ± 5.0	325.0 ± 5.3
pH	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.62 ± 0.2	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.2	7.72 ± 0.2	7.7 ± 0.1	7.73 ± 0.2

Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different (P<0.01)