บทที่ 5

ผลกระทบจากกรรมวิธีในการแช่เยือกแข็ง และการละลายที่มีต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เยือกแข็งนั้นการลดและเพิ่มอุณหภูมินับเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดของอสุจิเป็นอย่างยิ่ง ในการลดอุณหภูมิปกติแล้วจะเกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ เกล็ดน้ำแข็งนี้จะทำให้ความเข้มข้นของน้ำภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกันส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ นอกจากนี้เกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ยังอาจบาดเยื่อหุ้มเซลล์จนฉีกขาดได้เช่นกัน ส่วนในด้านของการเพิ่มอุณหภูมิก็จะส่งผลเช่นเดียวกันแต่อยู่ในทิศทางตรงกันข้าม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ดังนั้นกรรมวิธีในการลดอุณหภูมิจึงมีความสำคัญอย่างมากในการแช่เยือกแข็งเซลล์ Stoss (1983) อ้างตาม Billard (1978b) ถึงอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในปลากะพงขาวว่าอยู่ในช่วงประมาณ 10-20 $^{\circ}$C/min แต่ในการทดลองนี้ไม่มีอุปกรณ์ที่สามารถจะจับอัตราเร็วที่แน่นอนของการลดอุณหภูมิได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองลดอุณหภูมิด้วยกรรมวิธีต่างๆ ซึ่งรายงานไว้โดย Scott และ Byanes (1980) รายละเอียดดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

1.วิธีการเตรียมตัวอย่างทดลอง

ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองใน บทที่ 4 โดยเลือกเฉพาะสูตรน้ำยาเจือจางที่ให้ผลดีที่สุดพิจารณาจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต 3 สูตรมาใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่

1.1) Modified Cortland Solution + 10% DMSO

1.2) Alsever's Solution + 10% DMSO

1.3) Glucose-Normal Saline Solution + 10% DMSO

2.วิธีการลดอุณหภูมิ

2.1) ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่เตรียมได้บรรจุลงในหลอด polypropylene vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 0-4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลวทันที

2.2) ลดอุณหภูมิด้วยการนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่เตรียมได้บรรจุลงในหลอด polypropylene vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 0-4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ลงในลังน้ำแข็งแห้ง เป็นเวลา 15 นาที และผ่านไอไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 15 นาที จึงเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลว

2.3) ลดอุณหภูมิด้วยวิธีการทำให้เป็นเกล็ดโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 0-4 °C เป็นเวลา 30 นาที ลงบนก้อนน้ำแข็งแห้ง เกล็ดน้ำเชื้อแต่ละเกล็ดจะมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร บรรจุลงในหลอด polypropylene vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 10 เกล็ด ต่อหลอด นำไปผ่านไอไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 15 นาที จึงทำการเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลว

น้ำเชื้อที่เก็บด้วยวิธีการต่างๆ ข้างต้นจะถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 90 วัน จึงนำขึ้นมาละลายด้วยวิธีการต่างๆ

3.วิธีการละลาย

3.1) เพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ ด้วยการบ่มตัวอย่างน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง(ประมาณ 23-25 °C)

3.2) เพิ่มอุณหภูมิโดยการปล่อยให้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

3.3) เพิ่มอุณหภูมิโดยการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมาอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิประมาณ 60°C

4. การตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ

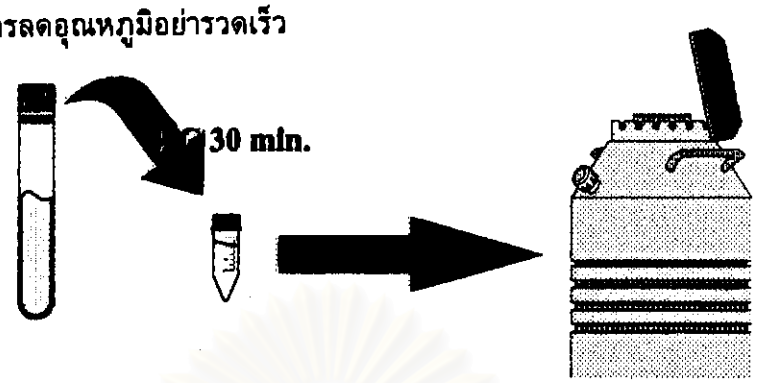
ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการลดและเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ โดยการตรวจปริมาณอสุจิที่เคลื่อนไหว ประเมินระดับการเคลื่อนที่ และนับตัวอสุจิที่เป็น และตายด้วยการย้อมสี (Live-Dead Stain)

5.การวิเคราะห์ผลการทดลอง

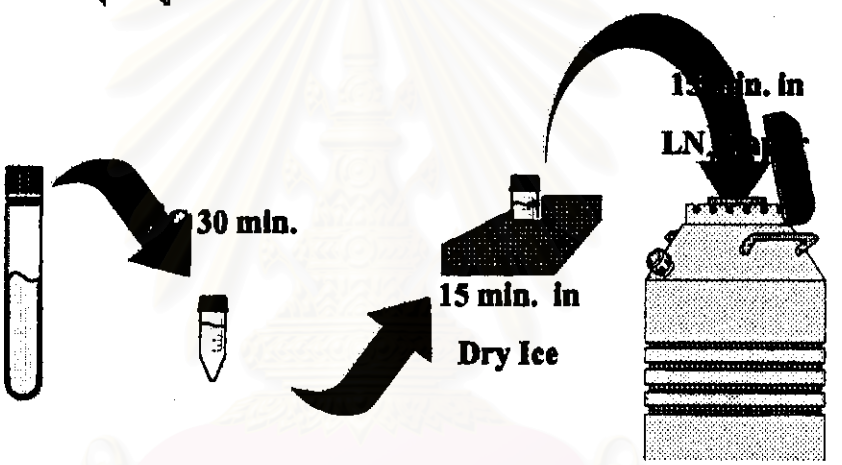
ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Systat (Wilkinsen, 1986) ในการวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อที่ลด และเพิ่มอุณภูมิด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อหากรรมวิธีในการแช่เยือกแข็ง และละลายที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อน้อยที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

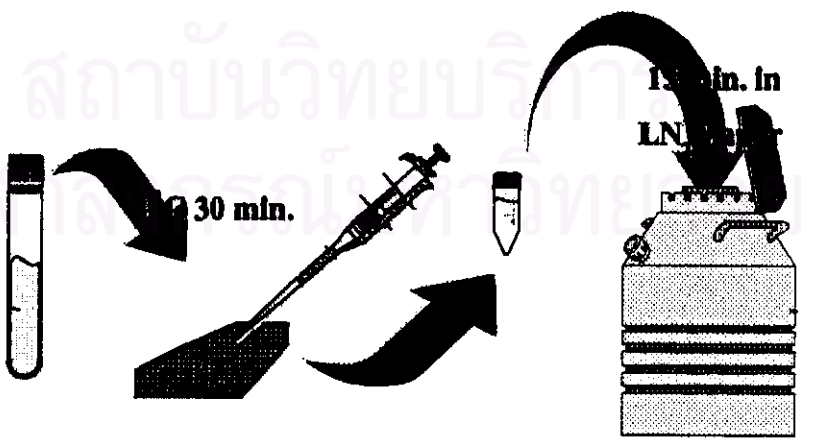
1.) การลดอุณหภูมิอย่ารวดเร็ว



2.) การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ

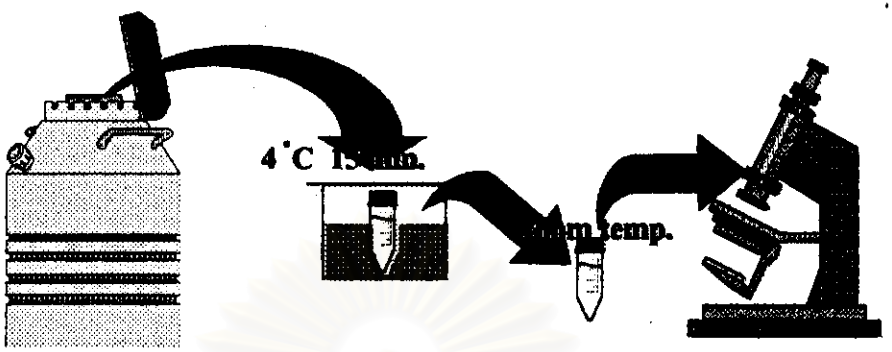


3.) การลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด

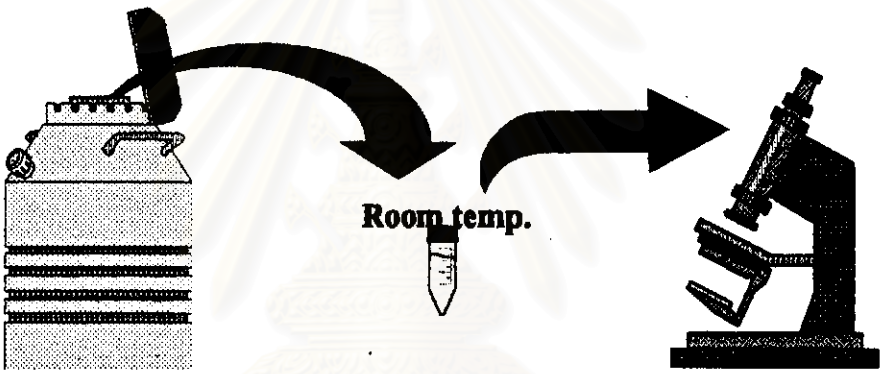


รูปที่ 10 แสดงแผนภาพกรรมวิธีในการลดอุณหภูมิแบบต่างๆ

1.) การเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ



2.) การเพิ่มอุณหภูมิโดยปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง



3.) การเพิ่มอุณหภูมิโดยการอุ่นที่อุณหภูมิ 60°C

รูปที่ 11 แสดงแผนภาพกรรมวิธีในการอุณหภูมิแบบต่างๆ

ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ระยะเวลาในการลดอุ ณหภูมิไม่สามารถที่จะวัดได้ เนื่องจากไม่สามารถจับเวลาในการลดอุณหภูมิในช่วงของการเก็บลงสู่ไนโตรเจนเหลว แต่ในการเพิ่มอุณหภูมิพบว่าในการเพิ่มอุณหภูมิด้วยกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มอุณหภูมิโดยเฉลี่ยเท่ากับ 23.85 ± 1.45, 13.42 ± 2.89 และ 1.86 ± 0.35 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อที่ตรวจสอบได้โดยการลดและเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่างๆ เมื่อทดสอบผลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละซ้ำการทดลอง ($P = 0.635$) และในแต่ละกรรมวิธีในการละลาย ($P = 0.215$) แต่มีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรน้ำยาที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง ($P = 0.004$) นอกจากนี้ยังแตกต่างกันในแต่กรรมวิธีในการลดอุณหภูมิอีกด้วย ($P < 0.001$)

ผลของคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่เยือกแข็งที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ คือ สารละลายของ Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO ลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และทำการละลายโดยการอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C ให้เปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิที่สูงโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิเท่ากับ 75.67 ± 10.89 % มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ย 40 ± 10 % และระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 8 ± 0.57 นอกจากนี้ Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO ลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยการบ่มที่ -70 °C เป็นเวลา 15 นาที และผ่านไอไนโตรเจนเหลวอีก 15 นาที จึงทำการเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นทำการละลายอย่างช้าๆ ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จึงปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายที่ดีอีกวิธีหนึ่ง พบว่าอัตรารอดของอสุจิอยู่ที่ 65.94 ± 4.66 % อัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 70 ± 5.77 % และมีระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 8 ± 0 และในขณะเดียวกันสูตรของน้ำยาที่ให้ผลของคุณภาพน้ำเชื้อต่ำที่สุดคือ Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO ที่ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว แต่ทำการละลายอย่างช้าๆ พบว่ามีอัตราการรอดของอสุจิเท่ากับ 49.092 ± 4.894 % มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 0% และระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 0

ตารางที่ 8 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		54.48
CDQLT	2	25.57	44.93
	3		47.85
	Mean		47.85
	S.D.		4.89
	1		61.11
CDQRT	2	12.08	44.69
	3		57.91
	Mean		57.91
	S.D.		8.70
	1		52.63
CDQHT	2	1.55	46.59
	3		49.07
	Mean		49.07
	S.D.		3.03

CD = Modified Cortland Solution + 10% DMSO

Q = การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลวทันที

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 9 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		73.07
CDSLT	2	25.12	59.68
	3		61.07
	Mean		61.07
	S.D.		7.36
	1		67.5
CDSRT	2	14.1	69.90
	3		67.04
	Mean		67.5
	S.D.		1.53
	1		60.62
CDSHT	2	1.49	57.22
	3		59.03
	Mean		59.03
	S.D.		1.70

CD = Modified Cortland Solution + 10% DMSO

S = การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้น

LT = การละลายโดยนำที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 10 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่าง ๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		62.85
CDPLT	2	24.2	62.42
	3		70.76
	Mean		62.85
	S.D.		4.69
	1		55.39
CDPRT	2	15.08	57.62
	3		54.22
	Mean		55.39
	S.D.		1.72
	1		65.63
CDPHT	2	2.16	67.71
	3		65.40
	Mean		65.63
	S.D.		1.27

CD = Modified Cortland Solution + 10% DMSO

P = การลดอุณหภูมิโดยการทำให้เป็นเกล็ด

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 11 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		45.88
ADQLT	2	25.29	61.36
	3		43.75
	Mean		45.88
	S.D.		9.61
	1		62.17
ADQRT	2	12.08	62.38
	3		58.55
	Mean		62.17
	S.D.		2.15
	1		64.17
ADQHT	2	2.27	65.27
	3		51.86
	Mean		64.17
	S.D.		7.44

AD = Alsever's Solution + 10% DMSO

Q = การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลวทันที

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60 °C

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 12 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		81.45
ADSLT	2	24.56	70.37
	3		74.62
	Mean		74.62
	S.D.		5.59
	1		69.81
ADSRT	2	17	66.38
	3		65.84
	Mean		66.38
	S.D.		2.15
	1		66.46
ADSHT	2	1.44	52.88
	3		55.51
	Mean		55.51
	S.D.		7.20

AD = Alsever's Solution + 10% DMSO

S = การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้น

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 13 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		81.15
ADPLT	2	23.08	62.09
	3		65.49
	Mean		65.49
	S.D.		10.17
	1		79.16
ADPRT	2	8.58	70.83
	3		71.92
	Mean		71.92
	S.D.		4.52
	1		62.5
ADPHT	2	2.08	75.67
	3		84.11
	Mean		75.67
	S.D.		10.89

AD = Alsever's Solution + 10% DMSO

P = การลดอุณหภูมิโดยการทำให้เป็นเกล็ด

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 14 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่าง ๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		58.67
NDQLT	2	22.15	55.28
	3		55.49
	Mean		55.49
	S.D.		1.90
	1		63.18
NDQRT	2	15.3	58.36
	3		61.71
	Mean		61.71
	S.D.		2.46
	1		55.43
NDQHT	2	1.49	57.26
	3		58.82
	Mean		57.26
	S.D.		1.69

ND = Glucose-Normal Saline Solution + 10% DMSO

Q = การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลวทันที

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60 °C

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 15 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		56.11
NDSLT	2	23.25	65.53
	3		76.68
	Mean		65.53
	S.D.		10.29
	1		67.75
NDSRT	2	16.45	78.04
	3		68.06
	Mean		68.06
	S.D.		5.85
	1		63.79
NDSHT	2	2.09	64.83
	3		72.8
	Mean		64.83
	S.D.		4.92

ND = Glucose-Normal Saline Solution + 10% DMSO

S = การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้น

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain

ตารางที่ 16 แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่าง ๆ

Sample	Rep.	thawing time (min)	LDS (%)
	1		63.38
NDPLT	2	21.45	66.94
	3		71.07
	Mean		66.94
	S.D.		3.84
	1		59
NDPRT	2	10.1	70.16
	3		64.17
	Mean		64.17
	S.D.		5.58
	1		60.36
NDPHT	2	2.15	50.87
	3		56.71
	Mean		56.71
	S.D.		4.78

ND = Glucose-Normal Saline Solution + 10% DMSO

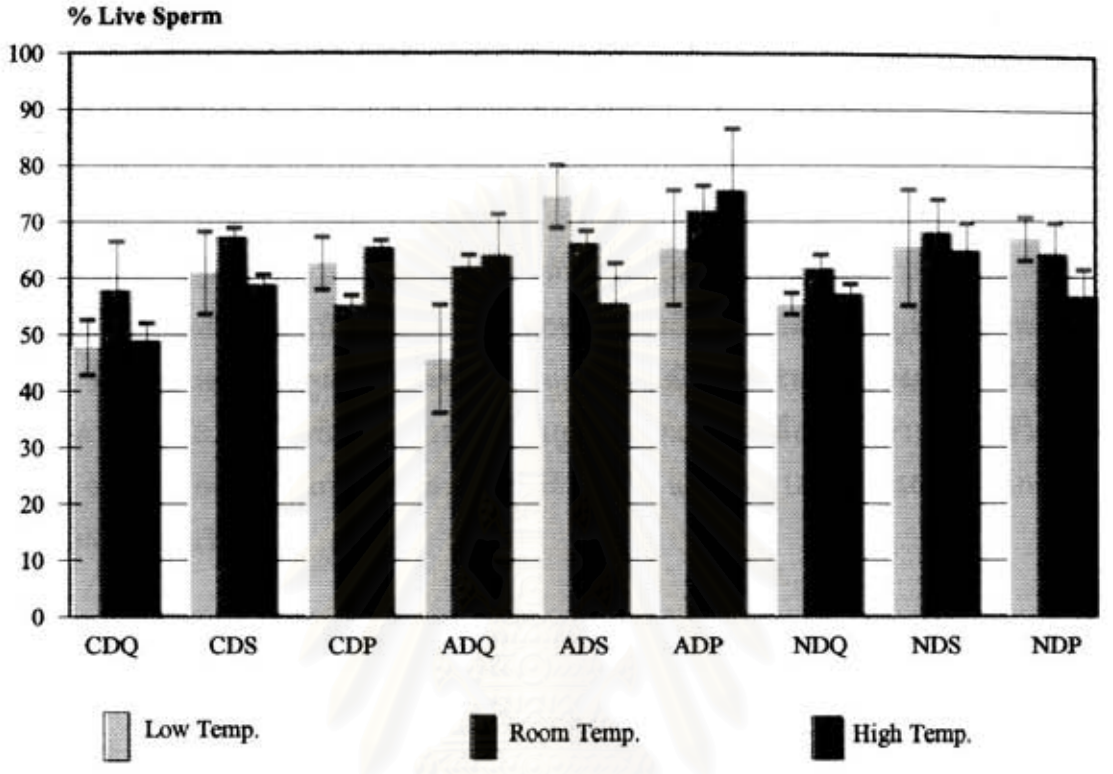
P = การลดอุณหภูมิโดยการทำให้เป็นเกล็ด

LT = การละลายโดยบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

RT = การละลายโดยปล่อยในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

HT = การละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 60

LDS = เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin Stain



รูปที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตภายหลังการลด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองโดยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้น และการทำให้เป็นเกล็ด พบว่าอัตราการลดของอุณหภูมิในการทดลองนี้มีค่าเฉลี่ยประมาณ 23.73 ± 3.97, 14.10 ± 2.89 และ 2.08 ± 0.35 นาที ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางค่าสถิติ พบว่าในการทดลองแต่ละวิธีมีอัตรารอดของอสุจิในน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งแตกต่างกัน โดยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว กับการลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การลดอุณหภูมิโดยการทำเป็นเกล็ดมีความแตกต่างทางสถิติกับการลดอุณหภูมิในแบบทั้งสองข้างต้น ซึ่งในการลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ดนั้นให้ผลของค่าเฉลี่ยของอสุจิที่มีชีวิตเท่ากับ 64.41 ± 4.83 % เมื่อเทียบกับการลดอุณหภูมิทั้งสองแบบที่เหลือที่มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตเท่ากับ 65.94 ± 4.66 % ในการลดอุณหภูมิเป็นลำดับขั้น และ 56.18 ± 3.46 % ในการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว

จากผลของการลดอุณหภูมิ พบว่าในการลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ดมีแนวโน้มที่จะให้อัตราการรอดของอสุจิในน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งสูงที่สุด ขณะที่การทดลองนี้ไม่สามารถที่จะวัดอัตราเร็วของการลดอุณหภูมิได้ แต่จากรายงานของ Scott และ Baynes (1980) ได้รายงานถึงค่าซึ่งอาจจะทำให้พอประมาณอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิได้ คือ อัตราเร็วของการลดอุณหภูมิด้วยการทำให้น้ำเชื้อเป็นเกล็ดจากการหยดลงน้ำเชื้อบนน้ำแข็งแห้งเท่ากับ 30 °C ต่อนาที จากอุณหภูมิ 0°จนถึง -50°C ในขณะที่อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิของหลอด polypropylene vial (NUNC disposable serum tube; N1 76-1) ให้อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิเมื่อแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันทีเท่ากับ 170°C ต่อนาที จากอุณหภูมิ 0°C จนถึง -70°C และให้อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิเมื่อแช่ในสารผสมของ acetone/dry ice slush เท่ากับ 50°C ต่อนาที จากอุณหภูมิ 0°C จนถึง -50°C เมื่อนำผลที่ได้เทียบกับรายงานของ Billard (1978b) ซึ่งรายงานค่าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลา sea bass และ sea bream ว่าเท่ากับ 10°-20°C ต่อนาที และ Leung (1987) ซึ่งทำการลดอุณหภูมิในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcalifer*) ด้วยอัตราเร็ว 31 °C ต่อนาที พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ดในการทดลองครั้งนี้

ผลของการลดอุณหภูมิได้ถูกรายงานไว้โดย Morris (1981) และ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ไว้ว่าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิจะมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ โดยการลดอุณหภูมิที่ช้า หรือเร็วเกินไปจะมีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายโดยเกล็ดน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ หรือการขาดน้ำเนื่องจากการแพร่ของน้ำออกสู่ภายนอกเซลล์ด้วยแรงดันออสโมติก พบว่าเมื่อ

อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์เป็นผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจนฉีกขาดได้ ในขณะที่หากมีการลดอุณหภูมิไปอย่างช้าๆ จะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในสารละลายโดยรอบเซลล์ทำให้สารละลายรอบนอกเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นผลให้น้ำในเซลล์มีการแพร่ออกมาสู่ภายนอกมากทำให้เซลล์เสียสภาพจากการสูญเสียน้ำมากเกินไป จากรายงานของ Morris (1981) กล่าวถึงอัตราการเร็วในการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมว่าขึ้นอยู่กับ ชนิด และขนาดของเซลล์ หรืออวัยวะที่ทำการลดอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการให้สารรักษาสภาพที่จะแพร่เข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตาม Scott และ Baynes (1980) ได้แนะนำอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อปลาแซลมอนว่าควรอยู่ที่ระดับ 1°C ต่อนาที ซึ่งน่าที่จะปรับมาใช้กับการลดอุณหภูมิในปลากะพงแดงได้เนื่องจากอสุจิของปลาทั้งสองชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน (~33 μm ในปลากะพงแดง และ ~30 μm ในปลาแซลมอน)

ในการทดลองเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่างๆ คือ การเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ ด้วยการบ่มน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 0-4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง, การเพิ่มอุณหภูมิด้วยการปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง (23-25°C) และการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 60°C จนน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งละลายจนหมด พบว่าในแต่ละวิธีการละลายนั้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม Morris (1981) และกฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้รายงานถึงผลของการเพิ่มอุณหภูมิไว้ว่าสามารถที่จะทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ได้เช่นเดียวกับการลดอุณหภูมิ แต่จะเป็นไปในลักษณะทิศทางตรงข้ามกับการลดอุณหภูมิ นอกจากนี้ Morris (1981) ยังได้กล่าวถึงการเสียสภาพของโปรตีนและสารจำพวก phospholipid ที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลทำให้เซลล์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมีขนาด และรูปร่างผิดไปจากเดิม ซึ่งโดยส่วนมากจะมีขนาดเล็กกว่าเดิม และมีรูปร่างที่บิดเบี้ยวผิดปกติ ในส่วนของอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นได้ถูกรายงานไว้โดย Scott และ Baynes (1980) ว่าอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมในปลาแซลมอนนั้นโดยปกติแล้วจะมีอัตราเร็วประมาณ 10-40°C ต่อนาที

นอกจากการลดอุณหภูมิจะมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลากะพงแดงแล้วยังพบว่าในการทดลองนี้ชนิดของน้ำยาเจือจางก็มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเช่นกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบน้ำยาทั้งสามชนิดในการทดลองพบว่ามีความแตกต่างกันในทางสถิติของน้ำยาเจือจางในสูตร Modified Cortland Solution และ Glucose-Normal Saline Solution โดยในสูตร Glucose-Normal Saline Solution ให้คุณภาพของน้ำเชื้อหลังการแช่เยือกแข็งที่ดีกว่า Modifed Cortland Solution ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่ Normal Saline มีความเข้มข้นของน้ำใน

สารไกลัเดียงกับความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์ของอสุจิปลากะพงแดง จึงทำให้การลด และเพิ่มอุณหภูมิมีผลกระทบน้อยกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา Modified Cortland Solution อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้สูตรน้ำยาเจือจางที่ให้ผลในการักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่ดีที่สุดคือสารละลายของ Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO ลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และทำการละลายโดยการอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C ให้เปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิที่สูงโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิเท่ากับ 75.67 ± 10.89 % มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ย 40 ± 10 % และระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 8 ± 0.57 นอกจากนี้ Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO ลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยการบ่มที่ -70 °C เป็นเวลา 15 นาที และผ่านไอไนโตรเจนเหลวอีก 15 นาที จึงทำการเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นทำการละลายอย่างช้าๆ ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จึงปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายที่ดีอีกวิธีหนึ่ง พบว่าอัตรารอดของอสุจิอยู่ที่ 65.94 ± 4.66 % อัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 70 ± 5.77 % และมีระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 8 ± 0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย