บทที่ 5
อภิปรายผล

5.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

โดยปกติตัวอสุจิปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal plasma หรือในอัณฑะ แต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยน้ำในขณะการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ถ้าจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสาร extender ใด ๆ ก็ตาม สาร extender ชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงควรมีส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี้ และ pH ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของปลาชนิดนั้น ๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูป และมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (Kang, Shao, Kho and Zhang, 2004) ซึ่งจากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นด้วยสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extenderแต่ละชนิดมีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเก้า (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานทั้งแบบใช้ก๊าซออกซิเจน และไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน ซึ่งการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนนี้เองทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner, Berger and Weismann, 1999) กรดแลคติกที่เกิดขึ้นนี้เองจะทำให้ pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นทำให้มีปริมาณของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีค่า pH ลดลง ทำให้เมแทบอลิซึม และการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง นอกจากนี้ขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ ซึ่งได้แก่ glucose หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น galactose, fructose, ribose และ trehalose ลดลง หรืออาจมีการใช้แหล่งพลังงานเหล่านี้หมดไปเมื่อทำการเก็บที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นน้อย ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ยังมีปริมาณเพียงพอ จึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ ดังนั้นหากมีความต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพียง

24 ชั่วโมง สาร extender ที่ควรเลือกใช้ คือ 0.9% NaCl เพราะเป็นสาร extender ที่เตรียมง่าย และมีส่วนประกอบเพียงอย่างเดียว ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, HBSS และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ถึง 100% และให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ 0.9% NaCl, MFR และ glucose (350 mM) (P>0.05) นอกจากนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการใช้MC และ IM มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อพิจารณาผลของอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 84 และ 96 ชั่วโมง เช่นเดียวกันพบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ KU, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR และ HBSS แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิดมาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้นหากพิจารณาทั้งผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ แล้วพบว่าถ้าต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 48 ชั่วโมง สามารถเลือกใช้ KU, MC และ HBSS เป็นสารextender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ 280 mOsmol/kg และ pH 8 ส่วน KU มีค่าออสโมลาลิตี้ 250 mOsmol/kg และ pH 8.11 และ MC ซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี้ 285 mOsmol/kg และ pH 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ seminal plasmaของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี้ 255 mOsmol/kg และค่า pH 7.15 ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ในปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่เป็น hypotonic คือ สารละลายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยพบว่าสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนที่ และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) ในทางตรงข้ามสารละลายที่เป็น hypertonic คือ สารละลายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์) ทำให้มีการสูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ซึ่งอสุจิของปลาน้ำจืดในปลากลุ่ม carp สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาลิตี้ได้อยู่ในช่วง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and cosson, 2006) แต่จากการศึกษาค่าออสโมลาลิตี้ของ IM พบว่ามีค่าออสโมลาลิตี้ 369 mOsmol/kg ซึ่งสูงกว่าค่าออสโมลาตี้ของ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (255 mOsmol/kg) ค่อนข้างมาก โดยค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับนี้อาจมีผลต่อส่วนหัวของตัวอสุจิ ทำให้มีการ

สูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิต่ำ แต่ไม่มีผลทำลายในส่วนหาง ทั้งนี้เนื่องจากส่วนหัวเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ และมีส่วนประกอบที่ซับซ้อนกว่าส่วนหางซึ่งง่ายต่อการถูกทำลายได้เร็วกว่า ทำให้ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้อยู่เนื่องจากส่วนหางไม่ถูกทำลาย แต่เมื่อพิจารณาเพิ่มเติมจากผลของการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่การเก็บ 72 ชั่วโมง โดยการนำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมหลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ 28.39±3.44% ซึ่งสูงกว่าการใช้ KU (2.30±0.67%) และ MC (18.70±2.89%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจาก HBSS มีน้ำตาล glucose เป็นองค์ประกอบ จึงสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของอสุจิปลาได้ ทั้งนี้เป็นเพราะอสุจิของปลาสามารถใช้สารภายนอกเซลล์ในขบวนการเผาผลาญพลังงานได้ (De W. Kruger, Smit, Van vuren and Ferreira, 1984; Yao, Richardson and Crim, 1999) ในกรณีที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ในระยะยาวซึ่งอาจทำให้แหล่งพลังงานภายในตัวอสุจิหมดไป จึงทำให้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่า KU และ MC ซึ่งไม่มี glucose เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ 72 ชั่วโมง ควรเลือกใช้ HBSS เนื่องจากให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด และจากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า HBSS เป็นสาร extender ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดีที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นมีหลายรายงานที่ประสบผลสำเร็จ ได้แก่ การศึกษาของ Jing, Huang, Bai, Tanguay and Dong (2009) ซึ่งได้ใช้ HBSS และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Zebrafish, *Danio rerio* พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ BSMIS เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tiersch, Figiel and And (2004) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Colorado pikeminnow, *Ptychocheilus lucius* แบบระยะสั้นโดยใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ (77±22%) สูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่มีการเจือจางด้วย HBSS (12±30%) และในปีเดียวกัน Tiersch, Wayman, Skapura, Neidig and Grier (2004) ได้ศึกษาผลของสาร extender 2 ชนิด ได้แก่ HBSS และ 0.6% NaCl ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วย HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้ 0.6% NaCl

5.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็น

ประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย (0:2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว) แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงถึง $1.65\pm0.25\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ โดยเลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุด คือ HBSS มาศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ที่ 4 อัตราส่วน ได้แก่ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ในระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (กลุ่มควบคุม, $P>0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง ทั้งนี้ในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner et al., 1999) ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่า pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ซึ่งถ้าค่า pH เปลี่ยนแปลงมาก ๆ จะทำให้ตัวอสุจิตายได้ และในขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่ในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นไม่มาก ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ก็ยังคงไม่ลดลงมาก จึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา walking catfish, *Clarias macrocephalus* พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 9 และ 1: 19 ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Vuthiphandchai, Thadsri and Nimrat, 2009) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 48 ชั่วโมง และใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนสูง (1: 10 และ 1: 15) ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่ำ (1: 3 และ 1: 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และสำหรับการเก็บที่ 72 ชั่วโมง ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของ dilution factor ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 30 และ 1: 40 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Yao et al., 1999) และจากการศึกษาในปลา Atlantic halibut, *Hippoglossu hippoglossus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือ1: 9, 1: 19, 1: 49 และ 1: 99 (Babiak, Ottesen, Rudolfsen and Johnsen, 2006) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1 และ 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ 49±0.24 และ 51±0.6% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 และ 1: 10 (43±0.3 และ 39±5.9% ตามลำดับ) (DeGraaf, King, Benton and Berlinsky, 2004) และจากการศึกษาในปลาชนิดเดียวกันพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน การใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ (74±0.3%) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง $P<0.05$ จากการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 5 และ 1: 10 ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 42-66% (DeGraaf and Berlinsky, 2004)

5.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

5.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ HBSS เป็นสาร extender พบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิ 64.97±1.82% ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ glycerol ช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอิเล็คโทรไลท์ในขณะทำการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่า glycerol ที่เติมลงไปจะเป็นตัวการที่ช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์ด้วยการส่งถ่ายโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื่องจากโซเดียมไอออนมีความสามารถจับกับน้ำ ทำให้มีการส่งถ่ายน้ำเข้าสู่เซลล์ เป็นการช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างขบวนการแช่แข็ง (Rall, Mazur and Souzur, 1978) นอกจากนี้การใช้ glycerol ยังช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก glycerol เมื่อรวมกับน้ำจะทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายนั้นลดต่ำลง ทำให้ของเหลวนั้น "เย็นจัดยิ่ง" ก่อนจะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง หรืออีกนัยหนึ่งคือส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าปกติ และทำให้ในเซลล์มีปริมาณน้ำน้อยลง การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย (ปริมาณน้ำในเซลล์มากเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์) ซึ่งมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการใช้ glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง เช่น จากการศึกษาในปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* (Huan, Dong and Tiersch, 2004) และจากการศึกษาในปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* (Huang, Dong, Walter and Tiersch, 2004) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้ 5% glycerol ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 10 และ 15% ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ glycerol ที่สูงเกินไป ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ความเข้าข้น 10 และ 15% ทำให้มีการแพร่ของ glycerol เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 5% ที่ equilibration time 10 นาทีเท่ากันซึ่งส่งผลให้มีปริมาณของglycerol สูงเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิได้ อย่างไรก็ตามสาร cryoprotectant ยังมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปลา โดยการใช้ 5% glycerol นั้นแม้ว่าจะใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดี แต่กลับไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบางชนิด ได้แก่ น้ำเชื้อปลา Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* โดยพบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% DMSO (Alvarez et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่า

เคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 5%, 10% DMSO และ 5% MeOH (Tiersch,Wayman et al., 2004) และจากการศึกษาในปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% MeOH (Muchlisin, Hashim and Chong, 2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะและขนาดของตัวอสุจิที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน ซึ่งได้แก่ ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณแตกต่างกัน จึงอาจส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา และจากการศึกษายังพบว่าถึงแม้การใช้ 5% glycerol จะให้ผลอัตราการปฏิสนธิและอัตราการมีชีวิตสูง แต่กลับให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ (25.0±0.0%) ซึ่งในการทดลองพบว่าน้ำเชื้อที่ใช้ 5% glycerol มีลักษณะเป็นเจลซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้อสุจิไม่สามารถเคลื่อนที่ได้สะดวก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบอัตราการปฏิสนธิแล้วพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิสูงนั้นอาจเป็นเพราะปัจจัยบางอย่างซึ่งได้แก่ไข่ หรือ ovarian fluid ซึ่งเป็นตัวที่สามารถกระตุ้นให้อสุจิมีการเคลื่อนที่เข้าไปผสมกับไข่ได้ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิสูงซึ่งจากการศึกษาของ Yanagimachi, Chrr, Pillai and Baldwin (1992) พบว่ามี sperm-activating factor ในไข่ของปลา rainbow trout และ ปลา cohosalmon,*Oncorhynchus kisutch* เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Pacific herring, *Clupea pallasi* (Morisawa, Tanimoto and Ohtake, 1992) และจากการศึกษาในปลา muskellunge, *Esox masquinongy* (Ciereszko, Dabrowski, Lin, Christ and Toth, 1999) และในปลา striped bass (Kerby, 1983) พบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แต่กลับให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง ซึ่งในกรณีดังกล่าวสอดคล้องกับการใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็งในครั้งนี้ คือมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ แต่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง และเมื่อทดสอบดูค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิพบว่าอยู่ในระดับปานกลาง ($r=0.52$, $P<0.05$)

5.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย ซึ่งจากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $20^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$), Two-steps ($4^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $3^{\circ}C$ ถึง $-4^{\circ}C$ และ $11^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-4^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) และ Three-steps freezing rate ($5^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $2^{\circ}C$ ถึง $-7^{\circ}C$, $3^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-7^{\circ}C$ ถึง $-30^{\circ}C$ และ $2^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-30^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว คือ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการ

ลดอุณหภูมิอย่างช้า (Three-steps) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาสวาย (Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ($10^{\circ}C\ min^{-1}$) และแบบ Two-steps ($4^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $3^{\circ}C$ ถึง $-4^{\circ}C$, $11^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-4^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (Kwantong and Bart, 2003) และจากการศึกษาในปลา Zebrafish, *Danio rerio* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $5^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$ มีอัตราการเคลื่อนที่ 35% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $20^{\circ}C\ min^{-1}$ ที่พบอัตราการเคลื่อนที่เพียง 1% เท่านั้น เมื่อใช้ 8% MeOH เป็นสาร cryoprotectant (Yang et al., 2007) และยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Medaka, *Oryzias latipes* เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $5^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$ โดยใช้ 10% MeOH เป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการเคลื่อนที่ (50±10%) ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 15, 20 และ $25^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $5^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$ (Yang, Norris, Winn and Tiersch, 2010) และในการศึกษาของ Codcharat, Nimrat and Vuthiphandchai (2005) ทำการศึกษาในปลา Black ear catfish, *Pangasius larnaudii* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $25^{\circ}C$ ถึง $-20^{\circ}C$ พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}C\ min^{-1}$ มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 และ $5^{\circ}C\ min^{-1}$ และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $25^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$ มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $12^{\circ}C\ min^{-1}$ เมื่อใช้10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Vuthiphandchai, Chomphuthawach and Nimrat, 2009) และจากการศึกษาของ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด (52±9% และ 50±18% ตามลำดับ) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ Two-steps freezing rates ($4^{\circ}C\ min^{-1}$จาก $4^{\circ}C$ ถึง $-9^{\circ}C$ และ $11^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-9^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) จะเห็นได้ว่าในขบวนการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิมีส่วนสำคัญต่อเซลล์ หากช้าหรือเร็วเกินไปต่างก็ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า Three-steps ใช้เวลาในการลดอุณหภูมิถึง 37 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว One-step และ Two-steps ซึ่งใช้เวลาเพียง 10 และ 11 นาที ตามลำดับ ซึ่งการลดอุณหภูมิอย่างช้าจะส่งผลให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์เหี่ยว และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงเกินไป จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้มีอัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิต่ำ เนื่องจากตัวอสุจิเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้

5.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

5.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) และด้วยเหตุนี้จึงควรทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสด ที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบ (sperm: egg ratio) เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยเฉพาะปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งพบว่ามีน้ำเชื้อน้อย จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่หนึ่งใบ จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 0.5×10^{6}: 1, 1×10^{6}: 1, 1.5×10^{6}: 1, 0.5×10^{7}: 1, 0.75×10^{7}: 1, 1×10^{7}: 1 และ 0.25×10^{8}: 1 พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^{6}: 1 และ 1.5×10^{6}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (69.62±9.31% และ 56.65±5.75% ตามลำดับ) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อลดลงถึง 0.50×10^{6}: 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ (51.86±9.79%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดในปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงถึง 3×10^{3}: 1 และ 6×10^{3}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้จำนวน sperm: egg ratio 2×10^{4}: 1 (Dreanno et al., 1997) และจากการศึกษาในปลา Sea lamprey, *Petromyzon marinus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio 1.0×10^{5}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (97%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า 5×10^{4}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำกว่า 80% (Ciereszko, Glogowski and Dabrowski, 2000) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1.5×10^{4}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า 3×10^{3}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (45%) (Rurangwa et al., 1998) ในขณะเดียวกันจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อมีการใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.50×10^{7}-0.25×10^{8}: 1 พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1.89×10^{5}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 44.56±11.48% แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นถึง 1.89×10^{8}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงเหลือเพียง 2.90±0.36% (Kwantong and Bart, 2009) และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1.5×10^{4}: 1 มีอัตราการ

ปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นเป็น 3.75×10^5: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (71%) (Rurangwa et al., 1998)

5.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ในการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่ออัตราการปฏิสนธิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งพบว่าจะต้องใช้จำนวนอสุจิมากกว่าการใช้น้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีอัตราการตายและความผิดปกติของอสุจิมากกว่าในน้ำเชื้อสด (Dreanno et al., 1997; Lahnsteiner, Weismann and Patzner, 1997; Ding et al., 2008; Lahnsteiner, Berger and Weismann, 2003; Lahnsteiner, Mansour and Weismann, 2002) เนื่องจากในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะเกิดอันตรายกับเซลล์อสุจิ เช่น อันตรายจากผลของ pH, solute, อันตรายที่เกิดจากความเป็นพิษของสาร cryoprotectantและอันตรายที่เกิดจากการสูญเสียน้ำ และการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และนอกเซลล์ (Leung in Jamieson, 1991; Muchlisin and Azizah, 2009; Ji et al., 2004) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1.3×10^6: 1, 1.95×10^6: 1, 2.6×10^6: 1, 3.25×10^6: 1 และ 3.9×10^6: 1 โดยใช้น้ำเชื้อสด 1.00×10^6: 1 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1.95×10^6: 1, 1.30×10^6: 1 และ2.60×10^6: 1 มีอัตราการปฏิสนธิ (40.61±2.22%, 32.77±2.40 และ34.25±2.05% ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 3.9×10^6: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำสุด (26.77±2.96%) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีจำนวน sperm: egg ratio ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง ซึ่งเกิดจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 6.94×10^6: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 53.75±1.62% แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นจาก 3.47×10^7: 1-6.94×10^8: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงจาก 26.07±0.59% เหลือเพียง1.50±0.68% (Kwantong and Bart, 2009) และในบางกรณีพบว่าเมื่อมีการใช้จำนวน sperm: egg ratio น้อยเกินไปส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีจำนวนอสุจิไม่เพียงพอที่จะผสมกับไข่ (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) ได้แก่ ปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* (Dreanno et al., 1997; Chen, Jia and Yua, 2004, Mandarin fish, *Sinipeca chuatsi* (Ding et al., 2008), *Chalcalbumus chalcalburnus*, *Chondrostoma nasus*, *Rutilus* meidingerii, *Barbus barbatus* และ *Cyprinus carpio* (Lahnsteiner et al., 2003) และ Sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Fauvel, Suquet, Dreanno, Zonno and Menu, 1998)