บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

2. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีความเป็นพิษและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งแตกต่างกัน กล่าวคือ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ Sucrose < DMSO < Methanol < Trehalose < Propylene glycol < Formamide < Glycerol < Acetamide < Ethanol < Ethylene glycol ตามลำดับ โดยที่การใช้ Sucrose 5% และ 10 % และการใช้ DMSO 5% และ 10 % มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ 5%, 10%, 15%, 20% ตามลำดับ และเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ จากการทดลองเห็นได้ว่า Sucrose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยต่ำ แสดงให้เห็นว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อไป

3. การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยพบว่า การเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายที่เหมาะสมต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที มีความเหมาะสมในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย เนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุดอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับการละลายที่อุณหภูมิอื่นและไม่แตกต่างน้ำเชื้อสดกุ้งแชบ๊วย

5. จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งสามารถสรุปได้ว่าวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อถุงแชบ๊วยในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

อภิปรายผลการทดลอง

Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย แบบแช่แข็ง โดยปกติแล้วสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นมีความสำคัญที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จในการเก็บรักษา เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมีคุณสมบัติดังนี้ 1) เป็นน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น 2) มีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม 3) มีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานของสเปิร์ม และ 4) มีความสามารถในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มของสัตว์น้ำแบบแช่แข็งแตกต่างกันออกไป เช่น Ca-free saline สำหรับถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon* (Vuthiphandchai et al., 2007) และน้ำทะเลสำหรับถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวอินเดีย, *Penaeus indicus* (Diwan and Joseph, 1999) เป็นต้น

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 10 ชนิด เห็นได้ว่า Sucrose, DMSO, Methanol และ Trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยต่ำ แสดงให้เห็นว่า Sucrose และ DMSO เหมาะสมที่จะใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย สอดคล้องกับการศึกษาของไชยทัต (2545) ที่รายงานความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงสเปิร์มกุ้งกุลาดำ พบว่า Sucrose, Trehalose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อถุงสเปิร์มน้อยเมื่อเปรียบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษา จากการรายงานของ Lezcano et al. (2004) ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ผสมในน้ำทะเลที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ พบว่าสาร Ethylene glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก โดย DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งขาวน้อยที่สุด รวมทั้ง Vuthiphandchai et al. (2007) ศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในไนโตรเจนเหลวโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ DMSO, Ethylene glycol, 1,2-Propylene glycol, Formamide และ Methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เติมลงใน Ca-free saline ที่ใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า 5% DMSO มีผลกระทบต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำน้อยที่สุด ซึ่งสามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อได้กว่า 210 วัน นอกจากนั้นพลชาติและพนม (2546) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่เติมในสารละลายบัฟเฟอร์Modified Cortland พบว่า Glucose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด รองลงมา คือ DMSO, Methanol และ Glycerol ตามลำดับ ซึ่ง ณ ความเข้มข้น 5%, 8% และ 10 % ของสารเหล่านี้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน และที่ระยะเวลา Equilibrium time ที่ 0, 15 และ 30 นาที ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความเป็นพิษของสาร DMSO ที่มีผลต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน แต่ระยะเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายที่เวลา 0 นาที ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มแตกต่างกับที่เวลา 10, 15, 20 และ 30 นาที ความแตกต่างของผลการทดลองที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความไวต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่แตกต่างกันของสเปิร์มสัตว์น้ำแต่ละชนิด (Vuthiphandchai et al., 2005) Conget et al. (1996) รายงานว่าการเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมระหว่าง DMSO และ Sucrose ร่วมกัน ทำให้การแช่แข็ง

สเปิร์มปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) มีประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตามปกติแล้วการแช่แข็งเป็นการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่ภายในและล้อมรอบเซลล์ ทำให้น้ำกลายสภาพจากของเหลวเป็นผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นนี้มีผลทำให้เซลล์สเปิร์มได้รับบาดเจ็บและตายได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จึงเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีนั้นต้องละลายน้ำได้ดีเพื่อเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำและต้องมีความเป็นพิษต่ำ (Tiersch and Mazik, 2000) การศึกษาในครั้งนี้พบว่า DMSO มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยเมื่อเปรียบเทียบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากกลไกที่แตกต่างกันของสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดย DMSO สามารถแทรกเข้าไปภายในเซลล์สเปิร์มทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์ทำให้ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สเปิร์มได้รับอันตรายจากการแช่แข็งลดลง โดยปกติแล้วสเปิร์มของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความไวและตอบสนองต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่แตกต่างกัน เช่น DMSO เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (Vuthiphanchai et al., 2007) รวมทั้งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009) และปลาตะเพียน เป็นต้น (Routray et al., 2008) นอกจากนั้น Glycerol เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (Chow et al., 1985; Akarasanon et al., 2004) และ Methanol เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอ่อนกุ้งขาวญี่ปุ่น, *Penaeus japonicas* (Gwo and Lin, 1998)

การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ คือ Ca-Free saline และเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Vuthiphandchai et al. (2007) พบว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็งประสบความสำเร็จเมื่อเก็บรักษาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส

การแช่แข็งน้ำเชื้อทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์และล้อมรอบเซลล์กลายสภาพจากของเหลวเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งขนาดและการเรียงตัวของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นนี้ขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิ การลดอุณหภูมิช้าทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก แต่ก็จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไป ส่วนอัตราการลดอุณหภูมิสูงพอเหมาะจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ขึ้นและลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ได้ รวมทั้งยังลดระยะเวลาที่ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียด ส่งผลให้เซลล์สเปิร์มรอดชีวิตสูงขึ้น (Andrabi, 2009) โดยน้ำเชื้อของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป (Suquet et al., 2000; Gwo, 2000) เช่น 3.5-5 ^{o}C/min จาก 2 ^{o}C ถึง -14 ^{o}C แล้วเพิ่มเป็น 15-20 ^{o}C/min จนถึงอุณหภูมิ -70 ^{o}C สำหรับน้ำเชื้อปลาสเตอร์เจี้ยน (Billard et al., 2004) 5 ^{o}C/min จาก 4 ^{o}C ถึง -120 ^{o}C สำหรับน้ำเชื้อปลา Atlantic cod (Butts et al., 2011)

10 °C/min จาก 25 °C ถึง -80 °C สำหรับน้ำเชื้อปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009) 16 °C/min จาก 4 °C ถึง -80 °C สำหรับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Routray et al., 2008) เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อและถุงน้ำเชื้อของสัตว์น้ำกลุ่ม Decapod หลายชนิด เช่น กุ้งขาวแวนนาไม (Lezcano et al., 2004), ปูทะเล, *Scylla serrata* (Billard et al., 1995), กุ้งทะเล, *Sicyonia ingentis* (Anchordoguy et al., 1988), horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. (Behlmer and Brown, 1984) และกุ้งก้ามกราม (Chow et al., 1985; Akarasanon et al., 2004)

อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการแช่แข็งในการทดลองครั้งนี้มีค่าที่เหมาะสมเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปัจจัยที่อาจทำให้การละลายถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ดีส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับขนาดของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ใหญ่ (ขนาดกว้างประมาณ 0.4-0.6 เซนติเมตร) ทำให้การละลายเนื้อเยื่อขนาดใหญ่จากอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ให้กลับสู่สภาพของเหลว ต้องใช้อุณหภูมิการละลายที่ต่ำ เพื่อทำให้สเปิร์มทั้งหมดที่อยู่ภายในถุง (Sperm mass) ได้กลับเข้าสู่สภาวะเหลว โดยไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งซ้ำอีกครั้ง (Recrystalization) เพราะสภาวะ Recrystalization ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (Intracellular ice crystal) และเซลล์ได้รับบาดเจ็บและรอดชีวิตน้อยลงขณะละลาย (Denniston et al., 2000) โดยทั่วไปถ้าระหว่างการแช่แข็งเซลล์ แล้วเซลล์ยังคงมีน้ำเหลือเล็กน้อยภายในเซลล์ (Intracellular water) ก่อนที่เซลล์จะถูกแช่ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้เกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก (Ice crystal) เกิดภายในเซลล์ได้ขณะแช่แข็ง ซึ่งในสภาวะนี้เมื่อนำเซลล์นี้มาละลายที่อุณหภูมิต่ำ จะยิ่งเพิ่มโอกาสในการที่น้ำภายในเซลล์แข็งตัว (Intracellular ice formation) ขณะละลายที่อุณหภูมิต่ำ (Slow thawing) เพราะการละลายที่อุณหภูมิต่ำจะมีเวลาในการทำให้เกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก (Small ice crystal) พัฒนาเป็นเกล็ดน้ำแข็งขนาดใหญ่ และทำอันตรายเซลล์ได้ (Fabbri et al., 2000) ในทางตรงกันข้ามขนาดของถุงน้ำเชื้อที่ใหญ่ของกุ้งแชบ๊วยในการทดลองนี้ เมื่อละลายด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้น แม้ว่าน้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว แต่สภาวะการละลายที่ใช้อุณหภูมิสูง อาจมีผลทำให้สเปิร์มทั้งหมดที่อยู่ภายในถุง (Sperm mass) ทนไม่ได้กับอุณหภูมิสูง อีกทั้งขนาดของถุงน้ำเชื้อที่มีขนาดใหญ่ต้องใช้เวลานานขึ้นในการละลายถุงน้ำเชื้อทั้งถุง ทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าต่ำลง อย่างไรก็ตามการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยของการศึกษาครั้งนี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ยังมีความเหมาะสม เพราะทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ ผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานโดย Vuthiphandchai et al. (2007) ที่ได้ทำการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยการใช้ Ca-F saline และ 5% DMSO และแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการแช่แข็งต่าง ๆ กัน โดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว พบว่าการแช่แข็งดังกล่าวได้ผลดีเมื่อแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าสูงสุด หลังจากการละลาย (Thawing) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที