บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hiemstra et al. (2005) กล่าวไว้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาเริ่มครั้งแรกในปี 1963 โดย Blaxter ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาทะเล Atlantic Herring โดยการฝานถุงน้ำเชื้อเป็นแว่นๆ แล้วใช้สารกลีเซอรอล เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์วางไว้บนน้ำแข็งแห้ง เมื่อนำไปผสมกับไข่ปลาพบว่าในบางครั้งมีอัตราการปฏิสนธิถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้ได้นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายแล้วไปผสมสลับระหว่างปลา Atlantic Herring ที่วางไข่ในฤดูกาลที่ต่างกัน จากนั้นเป็นต้นมาจึงได้มีการนำปลากว่า 200 ชนิดมาทำการเก็บรักษาในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง ส่วนการเก็บน้ำเชื้อปลาดุกเทศเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นทำครั้งแรกโดย Steyn et al. (1987) จากการวิจัยของ Labbe และ Maisse (2001) ในปลากลุ่มแซลมอนพบว่า น้ำเชื้อในปลาทะเลมีความทนทานต่อสารเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดีที่สุด ซึ่งสารที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นจะมีออสโมลาริตี้สูง ในการเก็บน้ำเชื้อในปลาทั่วๆ ไปมักกระทำโดยวิธีรีดเก็บ (stripping) ในขณะที่วางยาสลบปลา ซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของปัสสาวะปลาในสารละลายน้ำเชื้อ นอกจากนี้ในปลาบางชนิดไม่สามารถใช้วิธีรีดเก็บน้ำเชื้อได้ เช่น ปลาดุก จึงต้องใช้การผ่าตัดเก็บถุงน้ำเชื้อจากในช่องท้อง Viveiros et al. (2003) ได้ศึกษาถึงฮอร์โมนที่ควบคุมการหลั่งน้ำเชื้อในปลาดุกเทศพบว่าออกซีโตซินในระดับ 1 และ 10 ไอยู (international unit, IU) ช่วยเพิ่มปริมาณตัวอสุจิในอัณฑะปลาได้ (in vitro) และเมื่อใช้ต่อมใต้สมองปลาคาร์พ โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 โดสในขนาด 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับการให้ฮอร์โมนออกซีโตซินเข้าทางเส้นเลือด 5 ไอยูต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าสามารถทำการรีดน้ำเชื้อได้แต่มีปริมาณน้อยมากในปลาทดลองทั้ง 2 กลุ่ม แต่พบว่าในปลาดุกเพศผู้ที่ได้รับ 17 แอลฟาเมทิลเทสโทสเตอโรน (17 α-methyltestosterone) ทำให้ได้ปลาเพศผู้ที่ไม่มีการพัฒนาของเซมินอลเวสิเคิล (seminal vesicle) นั้นรีดน้ำเชื้อได้ 87 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ปลาเพศผู้ปกติรีดได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเพาะฟักในปลาเพศผู้ที่ได้รับ 17 แอลฟาเมทิลเทสโทสเตอโรน สูงถึง 63.1 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.01$) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาเพศผู้ปกติ 2.1 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติทั่วๆ ไปในปลาดุกไม่เก็บน้ำเชื้อโดยวิธีการรีด แต่จะนิยมใช้การเก็บน้ำเชื้อจากถุงน้ำเชื้อ ภายหลังจากฆ่าหรือชำแหละจากโรงงานแปรรูปซึ่งพบว่ามีคุณภาพน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการนำมาทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ (Mansour et al., 2004 และHiemstra et al., 2005) น้ำเชื้อของปลาจำเป็นต้องเก็บไว้ในหลอดที่มีความจุสูงเพื่อความเหมาะสมเมื่อจะนำมาละลายผสมกับไข่ปลาที่มีปริมาณมากดังนั้นจึงควรใช้หลอดที่มี

ความจุอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร ขึ้นไป โดยแนะนำให้ใช้หลอดพลาสติกที่เป็นอุปกรณ์การผสมเทียม โคเรียกว่า artificial insemination catheter (artificial insemination sheath) นำมาตัดให้มีความยาวตามความสูงของกระบอกสำหรับบรรจุหลอดน้ำเชื้อ ตามปกติหลอดนี้จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และมีความยาว 22 นิ้ว ดังนั้น ถ้าตัดออกเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนจะมีความจุประมาณ 1 มิลลิลิตร สามารถนำมาใช้เก็บน้ำเชื้อปลาได้แต่ก็มีข้อเสียคือ แตกง่าย Lahnsteiner et al. (2000) ได้เปรียบเทียบการใช้หลอดเก็บน้ำเชื้อในปลาขนาดต่างๆ พบว่าหลอดเก็บน้ำเชื้อที่มีความจุประมาณ 0.5 มิลลิลิตร สามารถนำมาใช้เก็บน้ำเชื้อปลาได้และที่ดีควรเป็นหลอดขนาด 1.2 มิลลิลิตร

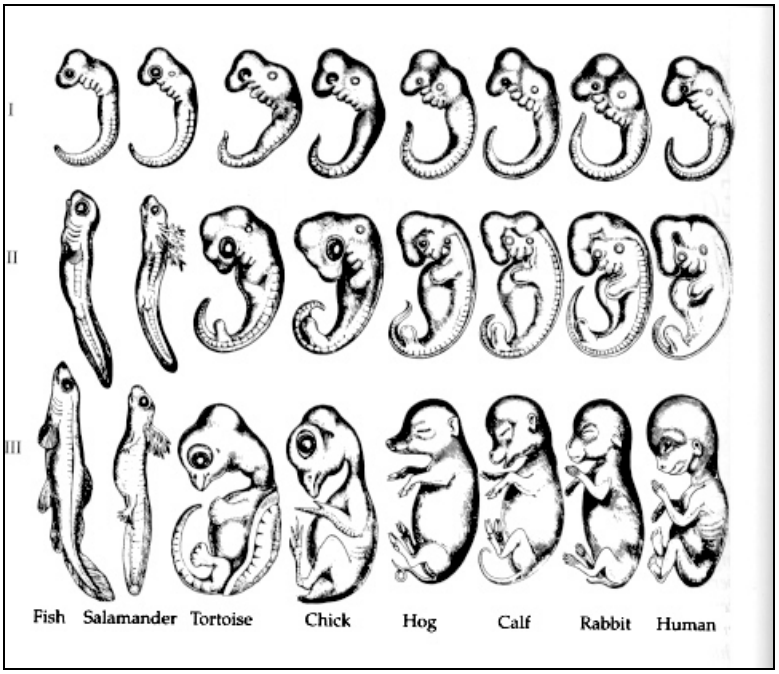
1. การพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะต่างๆของปลาดุกเทศ *(Clarias gariepinus)*

ปลาดุกเทศเป็นปลาน้ำจืดที่มีการปฏิสนธิภายนอกตัว การพัฒนาของตัวอ่อนเกิดอยู่ภายในฟองไข่ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2536 และ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2544) มีเปลือกไข่ที่บางใส ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบพัฒนาการต่างๆ ได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำได้ดังนี้

1) บลาสโตเดอร์มเริ่มสูงขึ้น (protuberant blastoderm)
2) ระยะ 2 เซลล์
3) ระยะ 4 เซลล์
4) ระยะ 8 เซลล์
5) ระยะ 16 เซลล์
6) ระยะ 32 เซลล์
7) ระยะ 64 เซลล์
8) ระยะ มอลูล่า (morula stage)
9) ระยะ บลาสตุลา (blastula stage)
10) ระยะ แกสตรูลาระยะแรก (early gastrula)
11) ระยะ แกสตรูลาระยะหลัง (late gastrula)
12) ระยะ บลาสโตพอร์ปิด (blastopore closing stage)
13) ระยะ ลำตัวเกิดปล้อง (body segment appearance stage)
14) ระยะ เกิดโอลแฟคทอรี เพลท (olfactory plate appearance stage)
15) ระยะเกิดปุ่มหาง (caudal bud appearance stage)
16) ระยะเกิด ออดิทอรี เวสสิเคิล (auditory vesicle appearance stage)
17) ระยะเริ่มเกิด คอร์ดัล เวสสิเคิล (caudal vesicle appearance stage)
18) ระยะ เริ่มเกิด เลนส์ตา (eye lenses formation stage)

19) ระยะกล้ามเนื้อเริ่มทำงาน (muscle functioning stage)
20) ระยะฟักออกจากไข่ (hatching)
21) ระยะเริ่มเกิดครีบหู (pectoral fin stage)
22) ระยะเริ่มเกิด กิล อาร์ค (gill arch appearance stage)
23) ระยะเกิด รงควัตถุที่ตา (eye yellow pigment stage)
24) ระยะเริ่มเกิดถุงลม (air bladder formation stage)
25) ระยะถุงไข่แดงยุบ (egg complete absorption stage)

สำหรับรูปร่างและลักษณะของการพัฒนาตัวอ่อนของปลาและสัตว์อื่นๆ ดังภาพที่ 1 แถวบนแสดงการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรก แถวที่ 2 แสดงการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะกลาง และแถวล่างแสดงการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะสุดท้ายของตัวอ่อนตามลำดับจาก ซ้ายไป ขวาคือ: fish, salamander, turtle, chicken, pig, cow, rabbit, and human.



ภาพที่ 1 การพัฒนาตัวอ่อนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดย Haeckel's 1874
ที่มา: Gilbert (1997)

อย่างไรก็ตามปัญหาอย่างหนึ่งที่มักจะเกิดอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาก็คือ ช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งอาจเกิดจากพ่อพันธุ์ปลาถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งหรือเกิดจากความแปรปรวนของพ่อพันธุ์ปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้ยุ่งยากในการจัดการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นมีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันทีไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมไม่ติด ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (ศิริพรดชรัตน์ และคณะ, 2548) ในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาพบปัญหาที่สำคัญ คือ ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (ตารางที่ 1) ดังนั้นจะพบว่ามีการปรับปรุงเทคนิคหรือวิธีการผสมระหว่างไข่กับน้ำเชื้อปลาด้วยสารเคมีบางชนิดเพื่อเพิ่มอัตราการปฏิสนธิให้สูงขึ้นเทียบเท่าน้ำเชื้อสด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) เช่น พยายามเพิ่มอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเรนโบว์เทราวท์ (*Oncorhynchus mykiss*) โดยผสมไข่กับน้ำเชื้อแช่แข็งเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด ในน้ำยาที่มีส่วนผสม 5 มิลลิโมลของไธโอฟิลไลน์ (thyophylline) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มคาเฟอิน (caffeine) (Scheerer and Thorgaard, 1989) นอกจากนั้น Van Der Velden et al. (1991) พบว่าไข่ของปลาไนที่ได้รับการผสมแล้วจะมีอัตราการเจริญผิดปกติสูงเมื่อเพาะฟักในน้ำที่มีแมกนีเซียมน้อยกว่า 0.01 มิลลิโมลต่อลิตร และมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ถ้าน้ำที่ใช้เพาะฟักมีแมกนีเซียม 0.001 มิลลิโมลต่อลิตร แต่จะเจริญพัฒนาได้ปกติและมีอัตราการมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะฟักในน้ำที่มีแมกนีเซียมระหว่าง 0.02–0.10 มิลลิโมลต่อลิตร

2. การศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลาในประเทศไทย

ในปี พ. ศ. 2519 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติได้ร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์จากประเทศแคนาดาชื่อ Fred Wither ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาหลายชนิดในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งเป็นเวลานานประมาณ 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าน้ำเชื้อปลาสวายชนิดเดียวเท่านั้นสามารถผสมกับไข่ได้ (สถาบันประมงน้ำจืด, 2519) ต่อมา อุทัยรัตน์ ณ นคร (2525) ได้เก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำยา Ringer's แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้นานถึง 72 ชั่วโมง ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิกับไข่สดถึง 38.68 เปอร์เซ็นต์ นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*B. gonionotus*) แบบแช่แข็งในสารละลาย glycerol หรือ DMSO ที่มีความเข้มข้น 2-8เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -196 °C นาน 48 ชั่วโมง พบว่า glycerol หรือ DMSO ระดับ 4เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดี

มีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต 54 และ 63เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเฉพาะ DMSO ทุกระดับความเข้มข้น (2, 4, และ 8เปอร์เซ็นต์) ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่เปอร์เซ็นต์อสุจิตายสูงมากถึงประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการปฏิสนธิมีค่าต่ำ ได้มีนักวิจัยนำเอาวิธีการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไปปรับใช้ เช่น ศิริพร คชรัตน์ และคณะ (2549) ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำยาสูตร calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และสารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20เปอร์เซ็นต์ ด้วยการใช้ programmable freezer โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10°C/นาที), ระดับการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5°C/นาที) และระดับการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3°C/นาที) พบว่าการใช้สารละลาย DMSO 10เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10°C/นาที) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุดเท่ากับ 73.3เปอร์เซ็นต์ การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็ง พบว่า ระยะเวลาเก็บขณะแช่แข็งเมื่อเริ่มทดลอง 1 วัน ไม่มีความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่แช่แข็งที่เก็บไว้นานถึง 12 วัน การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งมีรายงานในปลาน้ำจืดอีกหลายชนิด เช่น ปลาสวาย ปลาเทพา และ ปลาบึก เป็นต้น (ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์ และคณะ, 2528; 2532) ปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเหล่านี้แบบแช่แข็งได้ประสบผลสำเร็จในระดับหนึ่ง

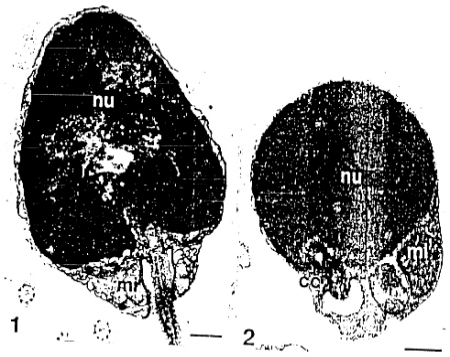
ตารางที่ 1 อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาบางชนิด

ชนิดปลา	อัตราการผสม (เปอร์เซ็นต์)			เอกสารอ้างอิง
	เฉลี่ย	SE	พิสัย	
Striped bass (*Morone saxatillis*)	23.6	2.8	0-88	Kerby (1983)
Rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)	37.9	7.8	30.9-46.4	Scheerer and Thorgaard (1989)
Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*)	67.7	7.1	53-77	Mongkonpunya (1983)

ที่มา :กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536)

3. รูปร่างลักษณะของอสุจิปลา

อสุจิของปลาประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง เช่นเดียวกับตัวอสุจิของสัตว์ทั่วไป แต่ส่วนหัวของตัวอสุจิปลากระดูกแข็งไม่มี อโครโซม (acrosome) (Norman and Greenwood, 1975) ทั้งนี้เชื่อกันว่าเพราะไข่ปลามีรูเปิด (micropyle) ซึ่งเป็นตัวดูดเอาน้ำเชื้อตัวผู้เข้าไปผสมกับไข่ อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่ามีอโครโซมที่หัวของตัวอสุจิของปลาบางชนิด เช่น Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*) และปลาปากกลม (*Lampetra planeri*) (Stanley, 1967) ตัวอสุจิของปลาที่มีการผสมภายนอกตัว (external fertilization) จะมีโครงสร้างและรูปร่างจำเพาะเป็นแบบที่ “ ยังไม่พัฒนา ” (primitive spermatozoa) ซึ่ง Franzen (1970) ได้อธิบายว่า มีส่วนหัวสั้น รูปลักษณะอาจกลม (round dish) หรือปลายแหลม (conical) ในส่วนกลาง เป็นที่รวมตัวกันของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และส่วนหางเป็นเส้นยาว (flagellum) อาศัยหลักดังกล่าวนี้เป็นเกณฑ์ในการบ่งบอกถึงการพัฒนาจะพบว่า ตัวอสุจิของปลาตะเพียน ปลาดุก ปลาบึก ปลาสวาย และปลาทอง จัดว่าเป็นตัวอสุจิที่ไม่พัฒนาแต่การศึกษารายละเอียดอื่นๆมีไม่มาก แสดงตัวอย่างรูปร่างและขนาดของอสุจิปลา brook trout *(Salveinus fontinalis)*และ ปลา bleak (*Alburnus alburnus*) ซึ่งไม่มีอะโครโซม ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะอสุจิปลา brook trout *(Salveinus fontinalis*) (1) และปลา bleak (*Alburnus alburnus*) (2)

ที่มา: Lahnsteiner and Patzner, (1997)

4. การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิปลา

ลักษณะของตัวอสุจิปลาที่สรุปว่าเป็นลักษณะที่ไม่พัฒนา คือ เมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัวอสุจิของปลาทั่วไปจะไม่มีการเคลื่อนไหว (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำขณะที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติหรือเมื่อนำเอาหยดของน้ำเชื้อปลาผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวอย่างรุนแรง แต่การเคลื่อนไหวดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาที (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้อัตราการเคลื่อนไหวเป็นหลักจึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์ และเมื่อจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยาเจือจาง (extender or diluents) ใดๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเก็บรักษาตัวอสุจิให้มีชีวิตและมีความสามารถในการผสมกับไข่ได้ผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด

เมื่อมีการเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำในแหล่งผสมพันธุ์ (spawning ground) ซึ่งอาจเป็นน้ำทะเลสำหรับปลาน้ำเค็มหรือน้ำจืดสำหรับปลาแม่น้ำ การเจือจางดังกล่าวเป็นการกระตุ้นให้ตัวอสุจิเคลื่อนไหวและสามารถผสมกับไข่ ปรากฏการณ์นี้ก่อให้เกิดมีข้อสันนิษฐานถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อปลา (Morisawa และ Suzuki (1980)) เช่น

1) ในน้ำมีปริมาณออกซิเจนสูงขึ้น หรือ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำมีต่ำกว่าน้ำเชื้อขณะอยู่ในท่อวาสเดฟเฟอร์เรนส์ (vas deferens)

2) ความเป็นกรด–ด่างของน้ำเป็นตัวกระตุ้น

3) สำหรับกรณีของน้ำทะเล จะมีอนุมูลของสังกะสีและทองแดงซึ่งอาจเป็นตัวกระตุ้น

4) อาจเป็นเพราะการเจือจางทำให้ตัวอสุจิเป็นอิสระจากสารเคมีหรือปัจจัยที่เป็นตัวยับยั้งการเคลื่อนไหวที่มีอยู่ในของเหลวในน้ำเชื้อนั้นเช่น ออสโมลาริตี้ของของเหลวในน้ำเชื้ออาจเป็นตัวยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิก่อนที่จะมีการเจือจางด้วยน้ำ

ความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยที่กระตุ้นให้ตัวอสุจิในน้ำเชื้อปลามีการเคลื่อนไหวเริ่มมีการทดลองโดย Morisawa และ Suzuki (1980) พบว่า ในน้ำเชื้อสดของปลาทอง ตัวอสุจิจะไม่เคลื่อนไหวเมื่อถูกเจือจางด้วยน้ำยาที่มีคุณสมบัติเป็น ไอโซโทนิค (isotonic solution) คือมีความเข้มข้นของอนุมูลต่างๆเทียบเท่ากับภายในเซลล์อสุจิ แต่เมื่อนำน้ำเชื้อปลาทองไปผสมกับน้ำยาที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโปโทนิค (hypotonic solution) คือมีความเข้มข้นของอนุมูลต่างๆต่ำกว่าภายในเซลล์อสุจิ พบว่าตัวอสุจิของปลาทองจะเริ่มมีการเคลื่อนไหวทันที ซึ่งแสดงถึงปัจจัยที่ทำให้น้ำเชื้อปลาทองเริ่มมีการเคลื่อนไหวคือการลดออสโมลาริตี้ในของเหลว Morisawa et al. (1983) ยังรายงานอีกว่าโพแตสเซียมอิออนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิของปลาทองและ

ปลาในกลุ่มปลาไซปรินิดส์น้ำจืด (perch) อีกบางชนิด อย่างไรก็ตาม Morisawa et al. (1983) กลับพบสิ่งตรงกันข้ามเมื่อเขาทดลองกับน้ำเชื้อปลากลุ่มซัลโมนิดส์ คือพบว่าการลดออสโมลาริตี้ไม่ใช่ปัจจัยที่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิของปลากลุ่มนี้ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าโพแตสเซี่ยมอิออนที่มีความเข้มข้นสูงพอเหมาะเป็นปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิในน้ำเชื้อปลากลุ่มซัลโมนิดส์ นอกจากนั้น Morisawa et al. (1983) ยังได้ศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิปลาทั้ง 2 กลุ่มที่กล่าวมา เช่น โซเดียมคลอไรด์ แมนนิทอล แคลเซียม แมกนีเซียม และเกลือของธาตุ กลุ่มโลหะอัลคาไลน์ (alkaline metal) เช่น รูบิเดียมคลอไรด์ (rubidium chloride) และ ลิเธียมคลอไรด์ (lithium chloride) เป็นต้น ผลการทดลองเจือจางน้ำเชื้อปลาเรนโบว์เทราท์ ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 100 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่า ตัวอสุจิจะมีการเคลื่อนไหวอย่างรุนแรงได้นานถึงประมาณ 20 วินาที แต่เมื่อเติมรูบิเดียมคลอไรด์ หรือโพแตสเซียมคลอไรด์ ให้มีระดับความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลต่อลิตร ในน้ำเกลือดังกล่าวแล้วนำไปเจือจางน้ำเชื้อปลาเรนโบว์ เทราน์ พบว่ารูบิเดียมและโพแตสเซียม สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ลิเธียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นถึง 25 มิลลิโมลต่อลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของอสุจิได้

ดังนั้นความแตกต่างของการเคลื่อนไหวของอสุจิของปลากลุ่มไซปรินิดส์น้ำจืดกับปลาซัลโมนิดส์พบว่าเกี่ยวข้องกับ

1) สารโพแตสเซียมจะกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาไซปรินิดส์น้ำจืด แต่ยับยั้งการเคลื่อนไหวอสุจิของปลาซัลโมนิดส์

2) อสุจิปลาทั้งสองกลุ่มมีความทนทานต่อน้ำยาไฮโปโทนิคต่างกันคือ อสุจิปลาไซปรินิดส์น้ำจืด เช่น ปลาไน จะมีการเคลื่อนไหว เพราะการเจือจางด้วยน้ำหรือน้ำยาไฮโปโทนิคและต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหวและเซลล์อาจแตกเนื่องจากถูกทำลายซึ่งตรงกันข้ามกับตัวอสุจิของปลาซัลโมนิดส์คือ น้ำยาไฮโปโทนิค หรือ การลดออสโมลาริตี้โดยการเจือจาง ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นการเคลื่อนไหว และเซลล์อสุจิจะยังคงรูปร่างได้แม้เจือจางด้วยน้ำ ดังนั้นตัวอสุจิจะเคลื่อนไหวได้นานเท่ากันทั้งในน้ำหรือน้ำยาไอโซโทนิค

Morisawa et al. (1983) อธิบายเรื่องนี้ว่า ปลากลุ่มซัลโมนิดส์อาจเป็นกลุ่มปลากระดูกแข็งที่ยังไม่พัฒนา (primitive teleost) มีการเคลื่อนย้ายไปอยู่ในน้ำเค็มและกลับเข้ามาสู่น้ำจืดเพื่อการผสมพันธุ์ ส่วนปลากลุ่มไซปรินิดส์น้ำจืดนั้นอาศัยอยู่ในน้ำจืดตลอดเวลา ดังนั้นความแตกต่างทั้งสองประการอาจมีความสัมพันธ์กับการปรับตัว (adaptation) และการวิวัฒนาการ (evolution) ของปลากระดูกแข็ง

5. ชีววิทยาการแช่แข็ง

ชีววิทยาการแช่แข็งมีความสำคัญและประโยชน์สำหรับการรักษาเซลล์สืบพันธุ์จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการวิทยาการสืบพันธุ์ในอนาคต ทั้งนี้เพราะนักชีววิทยาเริ่มมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการแช่แข็งดีขึ้น ทั้งในระดับเซลล์และตัวอ่อน (Niemann, 1984) และความสามารถของปลาทะเลบางชนิด (winter flounder) ที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ในแถบขั้วโลกเพราะปลาดังกล่าวสามารถสังเคราะห์โปรตีน (antifreeze glycoprotein) หรือเป็ปไทด์ (antifreeze polypeptide) เพื่อชะลอการแข็งตัวของน้ำในร่างกาย (Hew et al., 1988)

6. การเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และออร์แกเนลล์

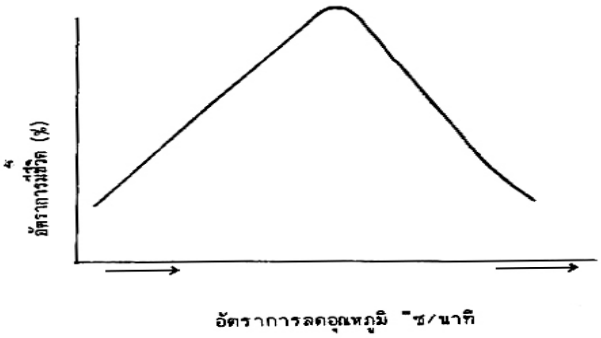
การแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง ส่วนการละลายเป็นปรากฏการณ์ที่สวนทางกันเมื่อมีการลดอุณหภูมิลงต่ำถึง 0 องศาเซลเซียส ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้นของเหลวรอบเซลล์และเซลล์จะอยู่ในสภาพที่เย็นจัด ผลต่อเนื่องจากปรากฏการณ์นี้ก็คือ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

1) ตัวถูกละลายในของเหลวรอบๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในภายนอกเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำเพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก

2) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้าๆ เซลล์ก็จะสูญเสียน้ำเพียงพอที่จะทำให้แรงดันออสโมติกมีความสมดุลได้ และเซลล์จะมีขนาดเล็กลง ถ้าต้องใช้เวลานานเกินจะเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เพราะการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงเกินสมดุล

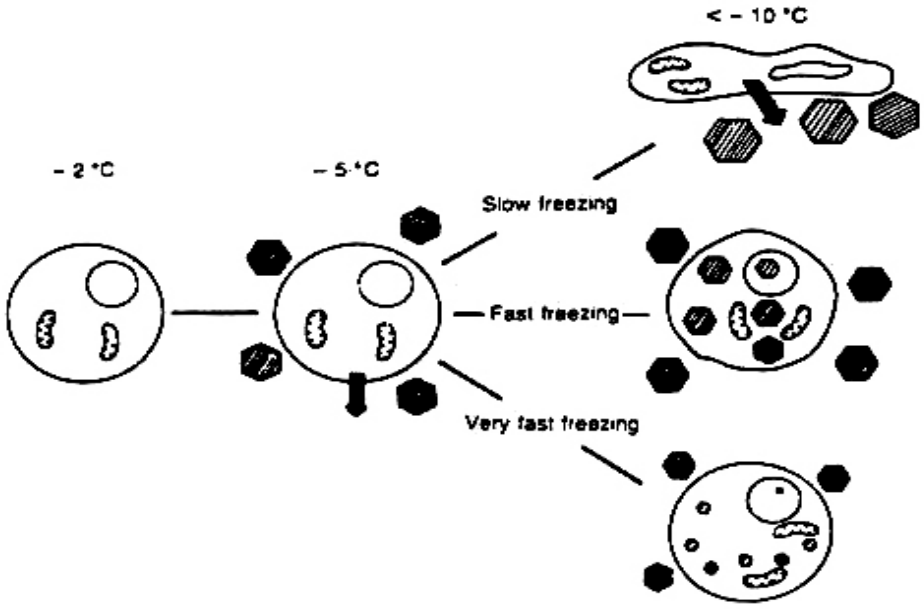
3) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว ความสมดุลของแรงดันออสโมติกก็เกิดขึ้นได้ เพราะการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์สามารถทำลายเซลล์ได้

การลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วในกระบวนการแช่แข็งต่างก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ ดังนั้น อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้เซลล์แช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นได้ ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมดังกล่าวนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์หรือตามชนิดของสัตว์ นอกจากนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต้องเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วพอที่จะไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตรายเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำและการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ ดังแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็งในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง เมื่ออัตราการลดอุณหภูมิต่างๆ กัน
ที่มา : Maurer (1978)

ขณะที่ทำการลดอุณหภูมิเพื่อทำการแช่แข็งเซลล์อันตรายที่เกิดขึ้นกับเซลล์การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และเพราะการสูญเสียน้ำนั้น น่าจะเกิดขึ้นเมื่อมีการลดอุณหภูมิจาก -15 องศาเซลเซียส ถึง -50 องศาเซลเซียส เพราะหลังจากอุณหภูมิดังกล่าวจะสามารถเก็บตัวอย่างในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้ทันที ในทำนองเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อการละลายตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นย่อมจะเกิดขึ้นแต่จะเป็นไปในทางตรงกันข้าม เช่น ขณะทำการละลายเกล็ดน้ำแข็งที่อยู่ภายเซลล์จะละลายก่อน น้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมจะแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น เป็นต้น นอกจากนั้นหากอัตราการละลายเป็นไปอย่างช้าๆ เกล็ดน้ำแข็งเล็กๆ ภายในเซลล์จะมีโอกาสเกาะรวมตัวกันเป็นก้อนใหญ่ขึ้น การเปลี่ยนแปลงต่างๆ เหล่านี้ย่อมมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งทั้งสิ้น การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็ง รูปหกเหลี่ยม แสดงขนาดและจำนวนเกล็ดน้ำแข็ง ที่เกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็งดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงขนาดและจำนวนเกล็ดน้ำแข็ง ที่เกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็ง
ที่มา : Niemann (1984)

ปัญหาการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และอันตรายที่เกิดเนื่องจากเซลล์สูญเสียน้ำซึ่งทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูง ถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ สามารถแก้ไขได้ด้วยการเติมสารเคมีบางประการลงไปในน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ (extender หรือ diluents) สารเคมีดังกล่าวมีหลายชนิดแต่เรียกโดยรวม ว่า “ไครโอโพรเทคแทนท์” (cryoprotectant)(Christensen and Tiersch, 1997)

7. ไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant)

ไครโอโพรเทคแทนท์มีหลายชนิดแต่ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) และกลีเซอรอล (glycerol) สารเคมีเหล่านี้จำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิในน้ำเชื้อปลาที่เก็บแช่แข็ง(He and Woods, 2004)

8. การจำแนกประเภทไครโอโพรเทดแทนท์

สารไครโอโพรเทดแทนท์สามารถจำแนกประเภทออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์และออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Hiemstra et al., 2005)

1) ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ คือ สารไครโอโพรเทดแทนท์เหล่านี้ต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็งและละลาย ได้แก่ กลีเซอรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และสารพวกอัลกอฮอล์ เช่น เมธานอล (methanol) เอธานอล (ethanol) และโพรเพนไดออล (propanediol) เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 โมล) เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์พบว่า อัลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุดรองลงมาได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล ตามลำดับ สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง พบว่าใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ในระดับ 8 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดีที่สุด และดีกว่าการใช้กลีเซอรอล (นลินี, 2527) อย่างไรก็ตามเมธานอลระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ก็ใช้ได้ผลดีพอสมควร อสุจิมีอัตราการเคลื่อนไหวหลังการละลาย ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (Harvey and Kelley, 1988)

การใช้แอลกอฮอล์เป็นสาร ไครโอโพรเทดแทนท์ มีข้อดีคือเป็นสารเคมีที่หาง่ายและราคาถูก นอกจากนั้น Harvey and Kelley (1988) ใช้แอลกอฮอล์ ร่วมกับนมผง (15 เปอร์เซ็นต์) เพียงอย่างเดียวยังคงให้ผลดี

2) ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ กล่าวคือ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01 – 0.2 โมล) และเป็นพิษน้อยกว่า ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีไวนิลเพียร์โรลิโดน (polyvinylpyrolidone, pvp) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และ แมนนิทอล (mannitol) เป็นต้น สารไครโอโพรเทดแทนท์ในกลุ่มนี้พบว่าซูโครสเป็นน้ำตาลที่นิยมใช้เพราะหาง่ายและราคาถูก ในการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (นลินี,2527) และของปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1992) ด้วยการ แช่แข็ง (-196 องศาเซลเซียส) ในน้ำยาที่ประกอบด้วยซูโครส 250 มิลลิโมล ร่วมกับไดเมธิลซัลฟอกไซด์ เป็นไครโอโพรเทดแทนท์ ช่วยให้อัตราการเคลื่อนไหวและความสามารถในการผสมกับไข่ดีที่สุด นอกจากนั้นในขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนของสัตว์นั้น ขณะทำการละลายเพื่อนำไปถ่ายฝาก จำเป็นต้องล้างหรือเจือจางด้วยสารละลายซูโครส เพื่อกำจัดพิษของไครโอโพเทดแทนท์ที่ใช้ในการแช่แข็ง อนึ่ง สำหรับกลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงแพร่เข้าออกเซลล์ได้จึงอาจจัดน้ำตาลกลูโคสเป็นไครโอโพรเทดแทนท์ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ด้วย (Storey, 1987) นอกจากนั้นเขายังพบว่ากบ (wood frog) มีชีวิตรอดจากการแช่แข็งในฤดูหนาว

ก็ด้วยอาศัยน้ำตาลกลูโคสเป็นไครโอโพรเทคแทนท์ ทำหน้าที่จำกัดการลดขนาดเซลล์อันเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำและเป็นพลังงานสำรองขณะที่ไม่มีโลหิตไปหล่อเลี้ยง ตลอดจนช่วยปกป้องโครงสร้างที่สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ด้วย

9. กลไกการออกฤทธิ์ของไครโอโพรเทคแทนท์

เนื่องจากสารดังกล่าวมีมากมายหลายชนิดดังได้กล่าวมาแล้ว กลไกการทำงานของสารเหล่านี้จึงเข้าใจได้ยาก เพราะสารเคมีเหล่านั้นมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน เช่น กลีเซอรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายและระเหยได้ ส่วนน้ำตาลซูโครสเป็นผลึกแข็ง ละลายได้ดีในน้ำ อนึ่งหากพิจารณาถึงอัตราการแพร่ของสารเหล่านี้ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จะพบว่ามีความแตกต่างกัน น้ำตาลซูโครสไม่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่น้ำตาลกลูโคสแพร่ผ่านได้ ส่วนแอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เร็วกว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอลมีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์อย่างไรก็ตามสารไครโอโพรเทคแทนท์ เหล่านี้จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งอธิบายได้ว่า เมื่อเติมสารเหล่านี้ลงในน้ำยาเก็บรักษาเซลล์จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของน้ำยาและของเหลวภายในเซลล์ซึ่งได้แก่ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536; Lahnsteiner et al., 2000)

1) มีผลกระทบต่อ “ แรงดันไอ ” (vapor pressure) ของของเหลว หรือ ทำให้แรงดันไอเปลี่ยนแปลงไป

2) มีผลกระทบต่อ “จุดเดือด” (boiling point) แต่ในที่นี้ไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของเซลล์แช่แข็ง

3) มีผลกระทบต่อ “จุดเยือกแข็ง” (freezing point) คือทำให้ จุดเยือกแข็งลดลง ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้มีความสำคัญมาก คือเป็นที่ทราบกันดีว่าตัวทำละลายในธรรมชาติคือน้ำ ซึ่งปกติที่แรงดัน 1 บรรยากาศ น้ำจะแข็งตัวที่ 0 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามธรรมชาติของของเหลวในร่างกาย และในเซลล์มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าของน้ำ และถ้ามีการเติมสาร ไครโอโพรเทคแทนท์จะยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลงจะทำให้ของเหลวนั้น “ เย็นจัดยิ่ง ” ก่อนจะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง

4) สารเคมี “ไครโอโพรเทคแทนท์” จะช่วยเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในหรือภายนอกเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากน้อยหรืออาจไม่ได้เลย ด้วยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลวสองประการหลังนี้ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะ

(1) ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

(2) ป้องกันการลดขนาดของเซลล์

(3) ป้องกันอันตรายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็คโทรไลท์

(4) ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลส์

ในประเด็นแรก เกี่ยวกับการป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์นั้นเป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทำให้ของเหลวภายในเซลล์เซลล์แข็งตัวช้ากว่าหรือที่อุณหภูมิต่ำกว่าของเหลวที่ไม่มีการเติมสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างการแช่แข็งไข่ของหนูขาว (Leibo et al., 1978) ในน้ำยาที่มีสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ จะมีเกล็ดน้ำแข็งเกิดขึ้นภายในเซลล์ที่อุณหภูมิระหว่าง -35 ถึง -45 องศาเซลเซียส หากปราศจากการเติมสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ ในน้ำยาที่ใช้เก็บรักษา ของเหลวภายในเซลล์ไข่จะเริ่มมีเกล็ดน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ -15 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ เซลล์จะสูญเสียน้ำไปสู่นอกเซลล์ซึ่งน้ำก็ย่อมเหลืออยู่ในเซลล์น้อย การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย จึงเห็นได้ว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ 2 วิธีคือ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536; Lahnsteiner et al., 2000)

1) ทำให้ของเหลวแข็งตัวช้า

2) ทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

ประเด็นต่อมาที่เกี่ยวกับการลดขนาดของเซลล์และอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอิเล็คโตรไลท์นั้น มีรายงานกว่ากลีเซอรอลที่เติมลงไปในน้ำยาจะช่วยลดความเข้มข้นของโซเดียมในน้ำยาที่อยู่รอบๆ เซลล์ (Rall et al., 1978) ซึ่งมีความหมายว่า กลีเซอรอลเป็นตัวการที่ช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์ด้วยการส่งถ่ายโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ และเพราะโซเดียมอิออนมีความสามารถจับกับน้ำดังนั้นจึงเป็นการส่งถ่ายน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วย ย่อมช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิได้วิธีหนึ่ง ส่วนอีกวิธีหนึ่งที่สารไครโอโพรเทคแทนท์ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างการแช่แข็งคือ การแพร่ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ เข้าสู่เซลล์เป็นการไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์ เพราะความแตกต่างขอแรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนไป เนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอก เซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัวในประเด็นสุดท้ายเกี่ยวกับการที่สารไครโอโพรเทคแทนท์ช่วยคงได้ ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์กาเนลส์นั้น ยังไม่มีคำอธิบายถึงกลไกการทำงานของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อย่างไรก็ตามการควบคุมปริมาณและขนาดของเกล็ดน้ำแข็งที่เกิดขึ้น ย่อมจะเป็นกลไกอันหนึ่งที่ช่วยคงสภาพมีชีวิตของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์กาเนลส์ต่างๆ(Morisawa and Suzuki, 1980)

10. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังแช่แข็ง

ปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์หรืออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีหลายประการ เพราะการปฏิบัติงานทุกขั้นตอน นับตั้งแต่วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์การปฏิบัติต่อตัวอย่างเซลล์ในขั้นต่อมาตลอดจนสูตรน้ำยา และการเตรียมน้ำยาสำหรับเจือจางเซลล์นั้นๆ นอกจากนั้นพบอีกว่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังแช่แข็งและการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับ(Morisawa and Suzuki, 1980)

1) ขนาดของเซลล์
2) อัตราการลดอุณหภูมิ
3) อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์

ปัจจัยทั้งสามจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำภายในเซลล์กล่าวคือจะสามารถคำนวณหาปริมาณน้ำในเซลล์ได้ เพราะมีความผันแปรได้ตามอุณหภูมิ ความผันแปรของอัตราการแพร่ของน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ กันความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้เสนอไว้โดย Muzur (1963) และเป็นที่ยอมรับและยึดถือเป็นหลักปฏิบัติทั่วไป คือ เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ หรืออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์มีค่าน้อย เมื่อนำมาแช่แข็งจะต้องลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอในขณะทำการแช่แข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เซลล์ถูกทำลาย ถ้าธรรมชาติของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้การแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ได้ยากอัตราการลดอุณหภูมิก็จำเป็นต้องช้าลง เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำในเซลล์แพร่เข้าออกนอกเซลล์ได้มากพอ สำหรับการเก็บรักษาแบบแช่แข็งตัวอสุจิของปลาหรือของสัตว์อื่นๆ นั้นไม่มีปัญหาเรื่องขนาดเซลล์ และอัตราการแพร่ของน้ำผ่านเข้าออกเซลล์ ทั้งนี้เพราะอสุจิมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอนในคน (Makler, 1978) ส่วนของปลามีขนาดเล็กกว่าของคน

11. การตรวจหาอัตราการผสมกับไข่สด

การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนั้นเป็นการประมาณหรือการคาดคะเน ความสามารถของน้ำเชื้อว่าจะผสมกับไข่ได้ดีหรือไม่ไม่ได้หมายความว่าน้ำเชื้อนั้นจะให้การปฏิสนธิที่ดีดังนั้นควรสรุปคุณภาพน้ำเชื้อว่าดีหรือไม่โดยศึกษาอัตราการผสมกับไข่สด ทั้งนี้เพราะยังมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การเก็บรักษาทั้งแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะสั้นและการดูแลตัวอย่างน้ำเชื้อก่อนการวิเคราะห์ ทดลอง เป็นต้น ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดและเชื่อมั่นได้ที่สุดสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านขบวนการแช่แข็งและละลายหรือขบวนการอื่นๆ แล้ว คือนำไปทดสอบความสามารถที่จะผสมกับไข่สดโดยเปรียบเทียบน้ำเชื้อสดรีดไข่จากแม่พันธุ์ปลาแล้วแบ่งใส่ภาชนะที่จะใช้ในการผสมเทียม โดยใช้ไข่จำนวนประมาณ 300-350 ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง กรณีที่ในการทดลองมีหลายหน่วยการทดลอง ควรจะใช้ไข่จากปลาแม่เดียวกันหรือรีดจากปลาหลายๆ แม่รวมกัน แล้ว

คลุกด้วยไม้พันสำลีให้เข้ากันดีก่อนจะแบ่งมาใช้ในการทดลองจำนวนไข่ที่ใช้ไม่ควรจะน้อยกว่า 300 ฟอง ทั้งนี้เพื่อจะได้ตัวเลขที่มีความแม่นยำ และไม่ควรมากเกินไปเพราะจะเสียเวลาในการนับไข่ที่ปฏิสนธิและไข่ที่ไม่ปฏิสนธิและอาจเป็นเหตุให้น้ำในภาชนะที่ใช้ในการเพาะฟักเน่าเสียได้เร็ว เกินไปขนาดภาชนะที่ใช้สำหรับไข่จำนวนดังกล่าวควรมีความจุประมาณ 1 ลิตร เป็นอย่างน้อย

เทน้ำเชื้อปลาที่รู้ปริมาตรและความเข้มข้นของตัวอสุจิลงไปผสมกับไข่หรือถ้าใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจะต้องละลายแล้ว เทผสมกับไข่ทันทีโดยทั่วไปนิยมใช้ไม้พันสำลี คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากันแล้วจึงจะเติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไปเพื่อเป็นการกระตุ้นให้อสุจิมีการเคลื่อนไหวและผสมกับไข่ ปริมาตรน้ำที่ใช้ครั้งแรกนี้และสำหรับไข่ปริมาตรน้อยเช่นนี้ไม่ควรใช้น้ำเกิน 100 มิลลิลิตร แล้วคงยังคนเบาๆ ด้วยไม้พันสำลี ต่อไปนานประมาณ 1-2 นาที แล้วจึงล้างเอาน้ำเชื้อส่วนเกินออกถ้าไข่ปลาเป็นชนิดไข่เหนียวหรือไข่ติด ต้องล้างด้วยน้ำผสมโคลนละเอียด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)ป้องกันไข่ติดกับภาชนะและจับเกาะกันเป็นก้อนซึ่งจะทำให้การนับตรวจไข่ที่ปฏิสนธิและไข่ที่ไม่ปฏิสนธิได้ยากไข่ที่ล้างดีแล้วจะหลุดกระจาย อาจจะมีจับเกาะกันเป็นกลุ่มเล็กๆ เพียง 2-4 ฟองต่อกลุ่ม แล้วจึงนำไปเพาะฟักต่อไป (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

สำหรับการเพาะฟัก ควรจะมีการเติมอากาศ ลงไปในน้ำในภาชนะเพาะฟักนั้นตลอดเวลาและเปลี่ยนน้ำบ่อยครั้งเท่าที่จะทำได้วิธีการเพาะฟักอาจมีการพัฒนาไปหลายรูปแบบ เช่น ใช้กระชังผ้าไนล่อนตาถี่ ลอยในถังใหญ่ที่มีการเติมอากาศตลอดเวลา การนับไข่ที่ปฏิสนธิและไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ จะนับแยกไม่ได้ในระยะต้นของการฟัก ทั้งนี้เพาะไข่ปลาอาจมีการเจริญพัฒนาระยะแรกๆ ได้เองโดยไม่ต้องได้รับการผสมกับอสุจิ (pathenogenesis) ส่วนไข่ที่ปฏิสนธิจะพัฒนาต่อไปและฟักออกเป็นต้น อนึ่งไข่ปลาที่ไม่ได้รับการผสมนั้นจะมีขบวนการ pathenogenesis ได้ยาวนานแค่ไหน ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา โดยนำไข่ที่ไม่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อไปเพาะฟักแบบเดียวกับไข่ทดลองหลังจากนั้นให้นำมาตรวจสอบทุกๆ ชั่วโมง ก็จะทราบระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะตรวจแยกไข่ดีออกจากไข่เสียได้เพราะเมื่อถึงระยะเวลาหนึ่ง (6-12 ชั่วโมง) ไข่เสียจะขาวขุ่น ส่วนไข่ดีที่ได้รับการผสมจะยังใส แต่ถ้ารอต่อไป แล้วนับแยกไข่ดี-ไข่เสีย เมื่อเพาะฟักผ่านไปแล้ว 12, 18 และ 24 ชั่วโมงจากตารางที่ 2 พบว่า การตรวจไข่ดี-ไข่เสียของปลาเทพาได้ภายในช่วงเวลา 10-13 ชั่วโมง เป็นต้นไปจนถึงฟักออกเป็นตัว ในปลาตะเพียนขาว อาจตรวจแยกไข่ดี-ไข่เสียได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4-6 หลังการเพาะฟัก (นลินี,2527) ส่วนการเจริญพัฒนาของไข่ปลาบึกที่ได้รับการผสมแล้วใกล้เคียงกับของปลาเทพา อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Steyn et al. (1989) ซึ่งทดลองในปลาเทราท์ (*Salmo gairdneri*) โดยเริ่มแยกไข่เสียในวันที่ 29 หลังจากการผสมส่วนในปลา striped bass ซึ่งรายงานโดย Kerby and Bodolus (1988) เขาอ้างว่าสามารถแยกไข่ที่ปฏิสนธิและไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ ในชั่วโมงที่ 4 หลังจากการเริ่มเพาะฟักไข่ดีจะอยู่ในระยะ blastula ซึ่งใช้ชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “ fertilization cap

” จะเห็นได้ว่าการพัฒนาของไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว มีความแตกต่างกันตามชนิดปลา นอกจากนั้น อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เพาะฟักก็จะมีผลต่อการเจริญพัฒนาของไข่ด้วย ในการเพาะฟักไข่ปลาสวายและไข่ปลาลูกผสมสลายและปลาบึกนั้นพบว่าการเพาะฟักในถังใหญ่ประมาณ 1000 ลิตร ซึ่งออกแบบโดยกรมประมงนั้นมีอุณหภูมิของน้ำสูงกว่าในขันเพาะฟัก (ขนาด 1 ลิตร) ที่ใช้ทดลองประมาณ 1-2 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาจะทำให้ไข่ปลาที่เพาะฟักในถังใหญ่ฟักออกเป็นตัวเร็วกว่าประมาณ 4-6 ชั่วโมง ซึ่งความสามารถในการพัฒนาค้นหาวิธีการตรวจไข่ดี-ไข่เสีย สำหรับไข่ปลาได้กำหนดให้มีกลุ่มเปรียบเทียบที่เหมาะสม 2 กลุ่ม คือ หนึ่งใช้น้ำเชื้อสดผสมกับไข่ และสองใช้ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมเพาะฟักร่วมไปในการทดลองเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

ตารางที่ 2 การเจริญพัฒนาของไข่ที่ได้รับการผสมแล้วของปลาเทพา (*Pangasius snithwongsei)* ที่อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 25-27 องศาเซลเซียส

เวลาหลังจากการผสม (ชั่วโมง)	ระยะของการพัฒนา
10-11	late gastrula
12-13	somite
18-19	optic bud
30<	hatched

ที่มา: กฤษณ์ มงคลปัญญา(2536)

ตัวอสุจิของปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่ใน seminal fluid แต่การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจะถูกกระตุ้นโดยน้ำ (water) คือสารภายในตัวอสุจิบางชนิดจะช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Kopeika et al., 2003)ดังนั้นสารดังกล่าวต้องไม่ถูกทำลายในขั้นตอนต่างๆของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง Muchlisin และคณะ(2004)ได้ศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อ extender และสารไครโอโปรเทคเตนท์ในปลาดุก bagrid catfish (*Mystus nemurus*)โดยตรวจสอบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในการเก็บรักษาช่วงสั้นๆ พบว่าสารละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสม คือ สารละลาย Ringer ที่อัตราส่วน 1:20 และไครโอโปรเทคเตนท์ที่เหมาะสมคือเมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ -4 องศาเซลเซียส ให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิ 39-71 เปอร์เซ็นต์และเมื่อนำมาทำการแช่แข็งให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงที่สุด อย่างไรก็ตามยังไม่ได้ทำการผสมกับไข่เพื่อตรวจสอบไปถึงอัตราการปฏิสนธิหรืออัตราการฟักออก Michael และTerrence (2005) ทดลองเปรียบเทียบผลของการแช่แข็ง (freezing) และ การอุ่นละลาย (thawing) ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) โดยพบว่าการใช้

เมธานอล 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร ไครโอโพรเทคเตนท์จะให้ผลที่ดีกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการลดอุณหภูมิลงช้าๆเป็น 3 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการอุ่นละลาย (thawing) ควรจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียสใช้เวลาในการการอุ่นละลาย 5 วินาทีดีกว่า 10 วินาที He และคณะ (2004) ได้ศึกษาผลของ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ร่วมกับ glycine เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา striped bass (*Morone saxatilis*) พบว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และ glycine 75 มิลลิโมล ให้ผลดีที่สุดในการปกป้อง plasma membranes และคงสภาพการทำงานของไมโตครอนเดีย (mitochondria) และปริมาณ ATP ในตัวอสุจิ Viveiros et al. (2000)ได้รายงานว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) ที่ใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และเมธานอลในระดับ 5-25 เปอร์เซ็นต์ เก็บน้ำเชื้อแช่แข็งใน cryovials ที่มีขนาดบรรจุ 1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องแช่แข็งที่สามารถตั้งโปรแกรมได้ ทำการละลายน้ำเชื้อปลาใน Ginzburg fish ringer เพื่อให้อัตราส่วนของตัวอสุจิไม่มากเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนของไข่ และภายหลังจากการนำออกจากการแช่แข็งยังได้ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสัดส่วนต่างๆ ก่อนที่จะนำไปผสมเทียม ดังนี้ 1:20 1:200 และ 1:2,000 ได้ผลดีโดยเฉพาะเมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ และการเจือจางน้ำเชื้อภายหลังจากการนำออกจากการแช่แข็งในอัตราส่วน 1:200 แต่เป็นวิธีการที่ต้องใช้เครื่องแช่แข็งที่สามารถตั้งโปรแกรมเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและเครื่องมือมีราคาแพง Viveiros และคณะ (2001) ยังได้รายงานวิธีการที่เหมาะสมในแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศโดยเครื่องแช่แข็งที่สามารถตั้งโปรแกรมพบว่าเมื่อลดอุณหภูมิลงช้าๆจาก -2 ถึง -5 องศาเซลเซียสต่อนาที อัตราการฟักออกสูงที่สุดเมื่ออุณหภูมิของน้ำเชื้อเท่ากับ -38 องศาเซลเซียสต่อนาที และเวลาที่ใช้ลดอุณหภูมิ ควรจะเร็วขึ้น ดังนั้นวิธีที่แนะนำก็คือ ลดอุณหภูมิให้เร็วขึ้นเป็นช่วง -5 ถึง -10องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วจึงรักษาระดับให้น้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ที่-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) อย่างง่ายโดย ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง และคณะ (2550) ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ได้เป็นระยะเวลานาน และยังได้กล่าวถึงข้อได้เปรียบของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งโดยมีข้อดี คือ ทำให้สามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่างๆ ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมสามารถทำได้สะดวกกว่าลำเลียงพ่อพันธุ์ และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งอย่างง่ายมีราคาถูกและมีคุณภาพ ซึ่งเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถนำเอาไปประยุกต์ใช้ในการประกอบอาชีพต่อไปได้จริง