บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) แบบแช่แข็งได้ผลการทดลองดังนี้

การเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง

หอยตะโกรมกรามขาวที่นำมาทำการทดลอง (N=68) มีน้ำหนัก ความกว้าง และความยาวของหอยทั้งเปลือกเฉลี่ยเท่ากับ 328.78±19.57 กรัม 8.9±0.73 เซนติเมตร และ 11.2±0.63 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำหนักของตัวหอยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.35±3.57 กรัม

น้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวมีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ย 2.27±0.06 $x10^{10}$ ตัวต่อมิลลิลิตร และมีค่า Osmolality เท่ากับ 655±6.55 mOsm/ kg ซึ่งน้ำเชื้อสดของหอยตะโกรมกรามขาวแต่ละชุดการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิตเฉลี่ยเท่ากับ 98.89±2.98% และ 96.26±0.98% ก่อนการทดลอง (ตารางที่ 4-1)

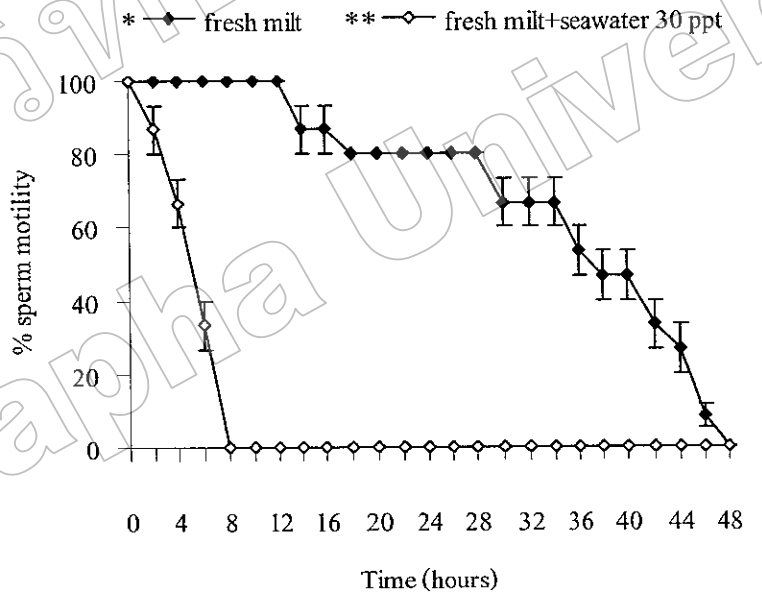
ตารางที่ 4-1 ข้อมูลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยตะโกรมกรามขาวก่อนการทดลอง

การเก็บข้อมูลครั้งที่	จำนวนหอย (ตัว)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม ($x10^{10}$ ตัว/ มิลลิลิตร)	ค่า Osmolality (mOsm/ kg)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Motility)	สเปิร์มที่มีชีวิต (% Viability)
1	3	2.27±0.38	665±12.34	100±0	96.74±3.40
2	3	2.07±0.31	653±10.68	100±0	96.67±5.77
3	3	2.30±0.26	642±11.57	100±0	98.66±3.36
4	3	2.23±0.32	669±5.86	96.67±5.77	94.89±4.73
5	3	2.27±0.31	643±22.05	100±0	96.07±5.17
6	3	2.47±0.21	659±9.87	96.67±5.77	96.33±4.04
ค่าเฉลี่ย (mean±SE)	N=18	2.27±0.06	655±6.55	98.89±2.98	96.26±0.98

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว

จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 น้ำเชื้อสด (Fresh Milt) และส่วนที่ 2 น้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเล 30 ppt (Fresh Milt + Seawater 30 ppt) แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในถังน้ำแข็ง (2-4°C) พบว่า น้ำเชื้อสดที่เก็บไว้ในถังน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 2-4°C มีระยะเวลาในการเก็บได้นาน 48 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีกว่าน้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเล สามารถเก็บรักษาได้เพียง 8 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล โดยน้ำเชื้อสดที่แช่ในถังน้ำแข็งจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ดีอยู่ในช่วงเวลา 28 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 80-100% และน้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเลมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีภายในเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวที่ระยะเวลาต่าง ๆ
(*, ** แสดงว่าชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05))

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

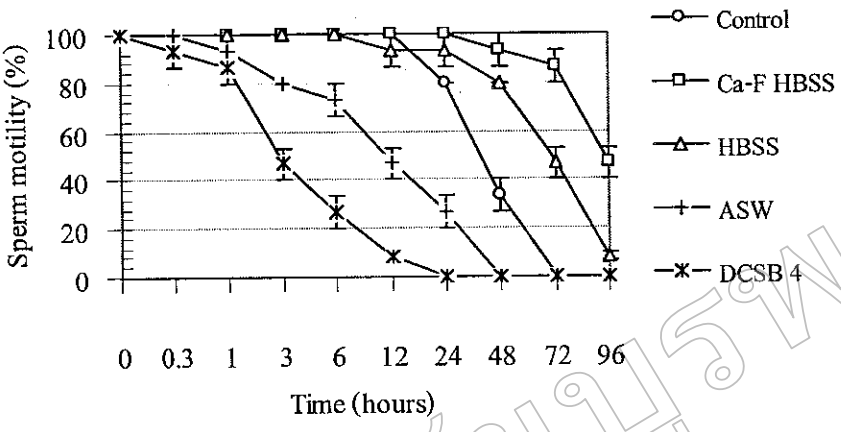
การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ทั้ง 4 สูตร คือ Ca-F HBSS, HBSS, ASW และ DCSB4 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา คือ 1: 2 และ 1: 4 ให้ผลการทดลองดังนี้

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า สเปิร์มที่เจือจางในน้ำยา Ca-F HBSS ที่อัตราส่วน 1: 2 และ 1: 4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 72 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 86.67±6.67% และ 86.67±6.67% ตามลำดับ รองลงมาคือน้ำยาสูตร HBSS ในอัตราส่วน 1:2 และ 1:4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีเท่ากับ 80±0% และ 73.33±6.67% ตามลำดับ และน้ำยาสูตร ASW เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีเท่ากับ 80±0% และ 73.33±6.67% ตามลำดับ ส่วนน้ำยาสูตร DCSB4 ในอัตราส่วน 1:2 และ 1:4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 1 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีเท่ากับ 86.67±6.67% และ 80±0% ตามลำดับ และสเปิร์มสดที่ไม่ผสมน้ำยา (Control) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 80-100% จากการวิเคราะห์สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยา Ca-F HBSS และ HBSS ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำยาสูตร ASW, DCSB4 และ Control ($P<0.05$) และอัตราส่วนในการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1: 2 และ 1: 4 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 4-2, 4-3 และตารางที่ 4-2, 4-3)

ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกน้ำยาบัฟเฟอร์สูตร Calcium Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจาก Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 72 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน 1: 2 กับ 1: 4 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มสูงเฉลี่ยเท่ากับ 86.67±6.67% และอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง 1: 2 และ 1: 4 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เพื่อให้สะดวกต่อการทดลองตอนต่อไป จึงเลือกอัตราส่วน 1: 2 มาทำการทดลอง ซึ่งสันนิษฐานว่าอัตราส่วนดังกล่าวจะไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-2 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่อัตราส่วน 1: 2

ตารางที่ 4-2 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่อัตราส่วน 1: 2

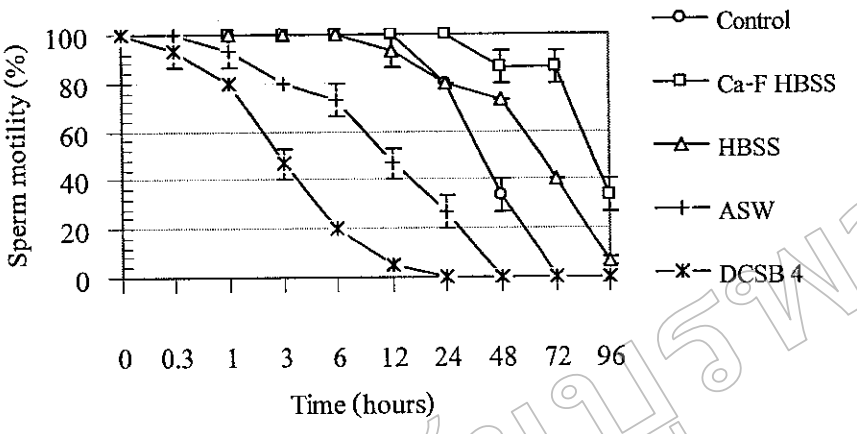
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำยาบัฟเฟอร์				
	น้ำเชื้อสด	Ca-F HBSS	HBSS	ASW	DCSB4
0.1	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
0.3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$
3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,2}$	$46.67\pm6.67^{c,3}$
6	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,2}$	$26.67\pm6.67^{c,4}$
12	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$53.33\pm6.67^{b,3}$	$8.33\pm1.67^{c,5}$
24	$80\pm0^{b,2}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$26.67\pm6.67^{c,4}$	$0^{d,5}$
48	$33.33\pm6.67^{c,3}$	$93.33\pm6.67^{a,12}$	$80\pm0^{b,2}$	$0^{d,5}$	$0^{d,5}$
72	$0^{c,4}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$46.67\pm6.67^{b,3}$	$0^{c,5}$	$0^{c,5}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-3 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่อัตราส่วน 1: 4

ตารางที่ 4-3 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่อัตราส่วน 1: 4

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำยาบัฟเฟอร์				
	น้ำเชื้อสด	Ca-F HBSS	HBSS	ASW	DCSB4
0.1	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
0.3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$
1	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$80\pm0^{a,2}$
3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,2}$	$46.67\pm6.67^{c,3}$
6	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$73.33\pm6.67^{b,2}$	$20\pm0^{c,4}$
12	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$46.67\pm6.67^{b,3}$	$5\pm0^{c,5}$
24	$80\pm0^{b,2}$	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,2}$	$26.67\pm6.67^{c,4}$	$0^{d,5}$
48	$33.33\pm6.67^{b,3}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$73.33\pm6.67^{a,2}$	$0^{d,5}$	$0^{c,5}$
72	$0^{c,4}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$40\pm0^{b,3}$	$0^{c,5}$	$0^{c,5}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาว

จากการทดลองการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 9 ชนิดคือ DMSO, Methanol, Propylene Glycol, Ethylene Glycol, Glycerol, Trehalose, Ethanol, Sucrose และ Acetamide ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

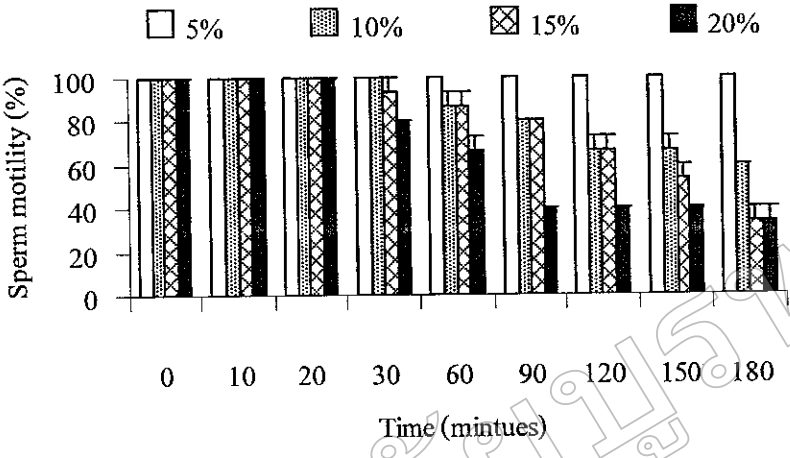
1. DMSO

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นทุกระดับ มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเวลาที่ 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10 และ 20 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-4)

2. Methanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้น 5% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับ 10%, 15% และ 20% ($P<0.05$) แต่ความเข้มข้น 10% กับ 15% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และที่เวลา 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-4 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-4 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

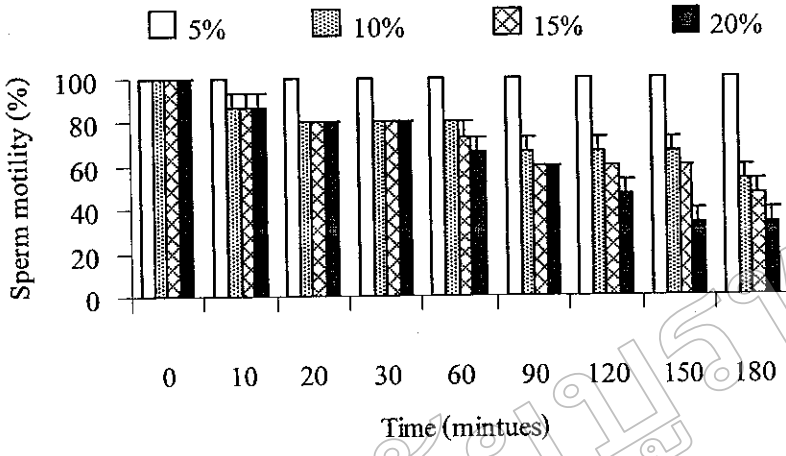
เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
10	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
20	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
30	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,12}$	$80\pm0^{b,2}$
60	$100\pm0^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$66.67\pm6.67^{b,3}$
90	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,2}$	$80\pm0^{b,23}$	$40\pm0^{c,4}$
120	$100\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,3}$	$66.67\pm6.67^{b,34}$	$40\pm0^{c,4}$
150	$100\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,3}$	$53.33\pm6.67^{bc,4}$	$40\pm0^{c,4}$
180	$100\pm0^{a,1}$	$60\pm0^{b,3}$	$33.33\pm6.67^{c,5}$	$33.33\pm6.67^{c,4}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-5 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-5 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
10	$100\pm0^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$86.67\pm6.67^{a,23}$
20	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,23}$	$80\pm0^{b,23}$	$80\pm0^{b,3}$
30	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,23}$	$80\pm0^{b,23}$	$80\pm0^{b,3}$
60	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,23}$	$73.33\pm6.67^{b,3}$	$66.67\pm6.67^{b,4}$
90	$100\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,34}$	$60\pm0^{b,4}$	$60\pm0^{b,4}$
120	$100\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,34}$	$60\pm0^{bc,4}$	$46.67\pm6.67^{c,5}$
150	$100\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,34}$	$60\pm0^{b,4}$	$33.33\pm6.67^{c,5}$
180	$100\pm0^{a,1}$	$53.33\pm6.67^{b,4}$	$46.67\pm6.67^{bc,5}$	$33.33\pm6.67^{c,5}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Propylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Propylene Glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้น 5% กับ 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 15% และ 20% ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10, 20 และ 30 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-6)

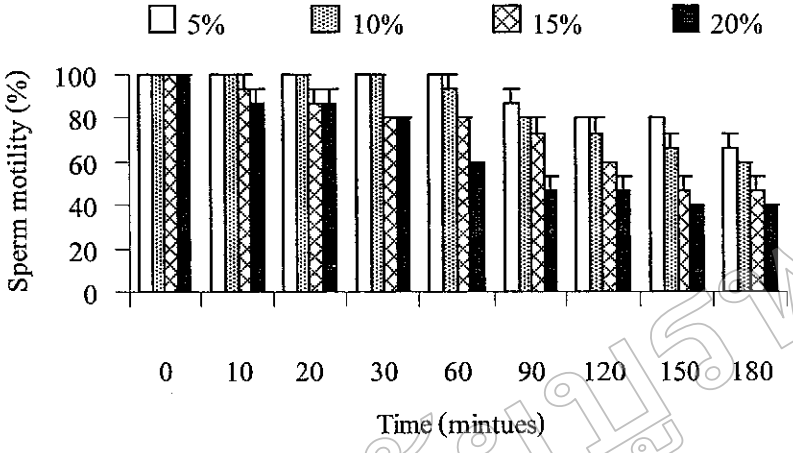
4. Ethylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Ethylene Glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้น 5% กับ 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 15% และ 20% ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาที มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-7 และตารางที่ 4-7)

5. Glycerol

ก่อนการทดลองสเปิร์มสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 96.22±5.77% เมื่อนำสเปิร์มมาผสมในสาร Glycerol ที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ส่วนความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 30 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้น 5% กับ 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 15% และ 20% ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาที มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-8 และตารางที่ 4-8)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-6 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-6 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

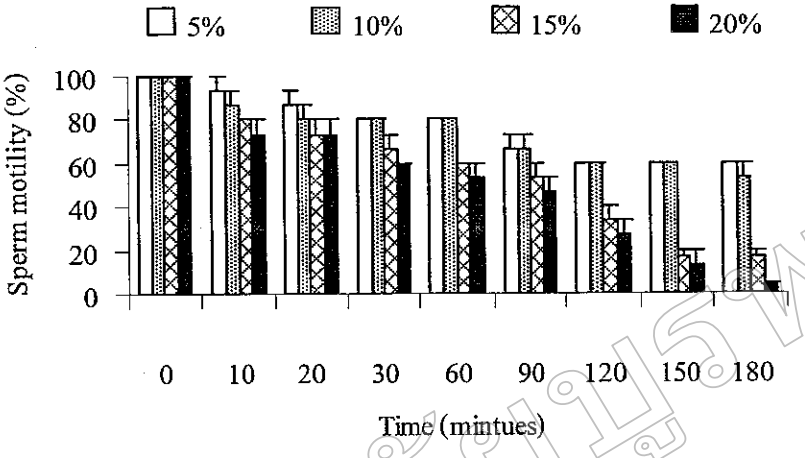
เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Propylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
10	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,12}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$
20	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$
30	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,23}$	$80\pm0^{b,2}$
60	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$80\pm0^{b,23}$	$60\pm0^{c,3}$
90	$86.67\pm6.67^{a,2}$	$80\pm0^{a,2}$	$73.33\pm6.67^{a,34}$	$46.67\pm6.67^{b,34}$
120	$80\pm0^{a,2}$	$73.33\pm6.67^{a,2}$	$60\pm0^{b,45}$	$46.67\pm6.67^{c,34}$
150	$80\pm0^{a,2}$	$66.67\pm6.67^{a,3}$	$46.67\pm6.67^{b,5}$	$40\pm0^{b,4}$
180	$66.67\pm6.67^{a,3}$	$60\pm0^{ab,3}$	$46.67\pm6.67^{bc,5}$	$40\pm0^{c,4}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-7 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-7 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

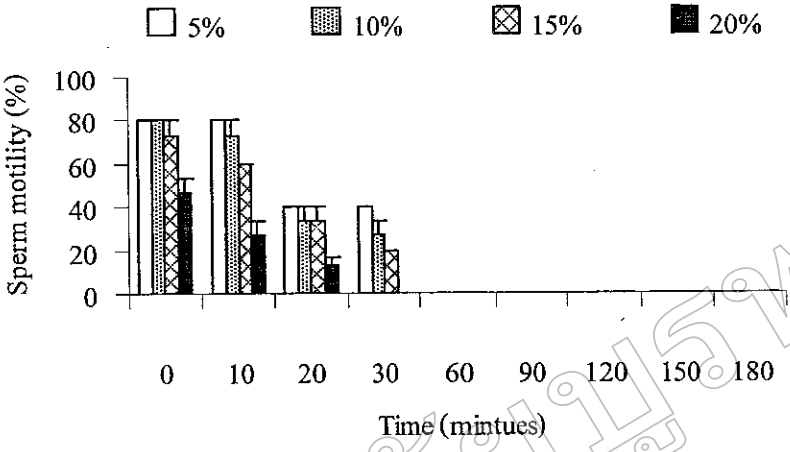
เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
10	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$80\pm0^{ab,2}$	$73.33\pm6.67^{b,2}$
20	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$80\pm0^{ab,2}$	$73.33\pm6.67^{b,23}$	$73.33\pm6.67^{b,2}$
30	$80\pm0^{a,2}$	$80\pm0^{a,2}$	$66.67\pm6.67^{b,3}$	$60\pm0^{b,3}$
60	$80\pm0^{a,2}$	$80\pm0^{a,2}$	$60\pm0^{b,34}$	$53.33\pm6.67^{b,34}$
90	$66.67\pm6.67^{a,3}$	$66.67\pm6.67^{a,3}$	$53.33\pm6.67^{b,4}$	$46.67\pm6.67^{b,4}$
120	$60\pm0^{a,3}$	$60\pm0^{a,34}$	$33.33\pm6.67^{b,5}$	$26.67\pm6.67^{c,5}$
150	$60\pm0^{a,3}$	$60\pm0^{a,34}$	$16.67\pm3.33^{b,6}$	$13.33\pm6.67^{b,56}$
180	$60\pm0^{a,3}$	$53.33\pm6.67^{b,4}$	$16.67\pm3.33^{c,6}$	$3.33\pm6.67^{c,6}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-8 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-8 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Glycerol			
	5%	10%	15%	20%
0	$80\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{a,1}$	$73.33\pm6.67^{a,1}$	$46.67\pm6.67^{b,1}$
10	$80\pm0^{a,1}$	$73.33\pm6.67^{ab,1}$	$60\pm0^{b,2}$	$26.67\pm6.67^{c,2}$
20	$40\pm0^{a,2}$	$33.33\pm6.67^{a,2}$	$33.33\pm6.67^{a,3}$	$13.33\pm3.33^{b,3}$
30	$40\pm0^{a,2}$	$26.67\pm6.67^{b,2}$	$20\pm0^{b,3}$	$0^{c,3}$
60	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,3}$
90	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,3}$
120	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,3}$
150	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,3}$
180	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,3}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Trehalose

ก่อนการทดลองสเปิร์มสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 96.22±5.77% เมื่อนำสเปิร์มมาผสมในสาร Trehalose ที่ความเข้มข้น 5% กับ 10% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ส่วนความเข้มข้น 15% กับ 20% ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเวลา 0 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้น 5% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10, 15% และ 20% ($P<0.05$) แต่ความเข้มข้น 15% และ 20% มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และที่เวลา 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-9 และตารางที่ 4-9)

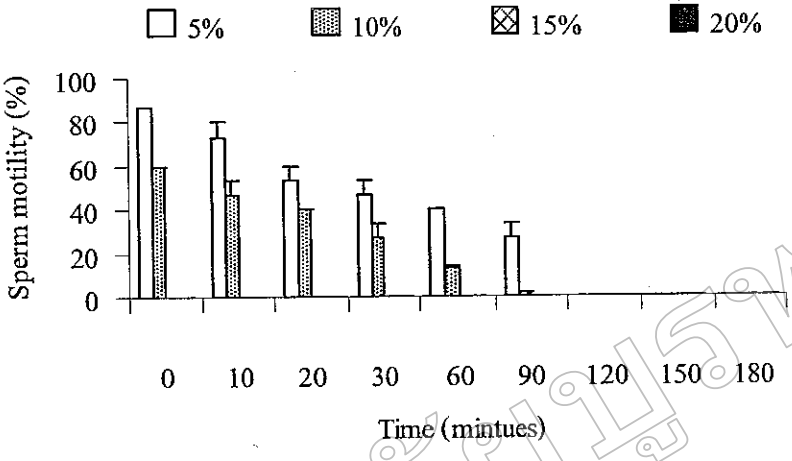
7. Ethanol

ก่อนการทดลองสเปิร์มสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% เมื่อนำสเปิร์มมาผสมในสาร Ethanol ที่ความเข้มข้น 5% ยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที ส่วนความเข้มข้น 10% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 15% และ 20% หยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ทุกระดับความเข้มข้น มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาที มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-10 และตารางที่ 4-10)

8. Sucrose

ก่อนการทดสองสเปิร์มสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% เมื่อนำสเปิร์มมาผสมในสาร Sucrose ที่ความเข้มข้น 5% ยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที ส่วนความเข้มข้น 10% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 15% กับ 20% หยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ทุกระดับความเข้มข้น มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-11 และตารางที่ 4-11)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-9 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Trehalose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-9 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Trehalose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

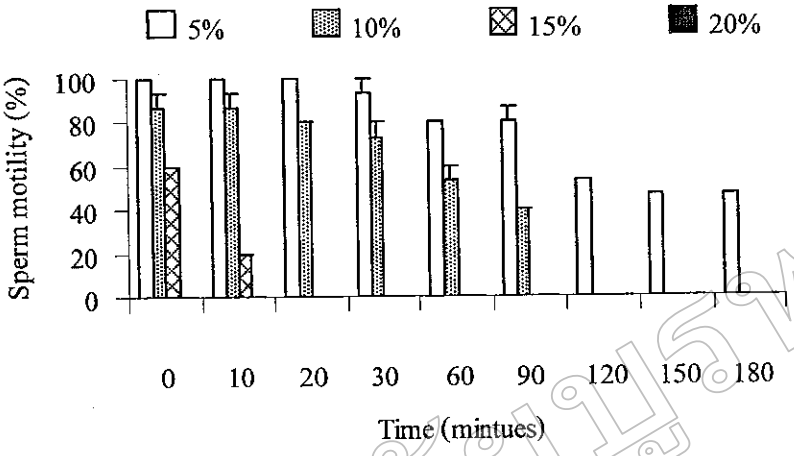
เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Trehalose			
	5%	10%	15%	20%
0	$86.67\pm6.67^{a,1}$	$60\pm0^{b,1}$	$0^{c,1}$	$0^{c,1}$
10	$73.33\pm6.67^{a,1}$	$46.67\pm6.67^{b,2}$	$0^{c,1}$	$0^{c,1}$
20	$53.33\pm6.67^{a,2}$	$40\pm0^{a,2}$	$0^{b,1}$	$0^{b,1}$
30	$46.67\pm6.67^{a,2}$	$26.67\pm6.67^{b,3}$	$0^{c,1}$	$0^{c,1}$
60	$40\pm0^{a,23}$	$13.33\pm3.33^{b,4}$	$0^{c,1}$	$0^{c,1}$
90	$26.67\pm6.67^{a,3}$	$1.67\pm0.33^{b,5}$	$0^{c,1}$	$0^{c,1}$
120	$0^{a,4}$	$0^{a,5}$	$0^{a,1}$	$0^{a,1}$
150	$0^{a,4}$	$0^{a,5}$	$0^{a,1}$	$0^{a,1}$
180	$0^{a,4}$	$0^{a,5}$	$0^{a,1}$	$0^{a,1}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-10 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-10 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

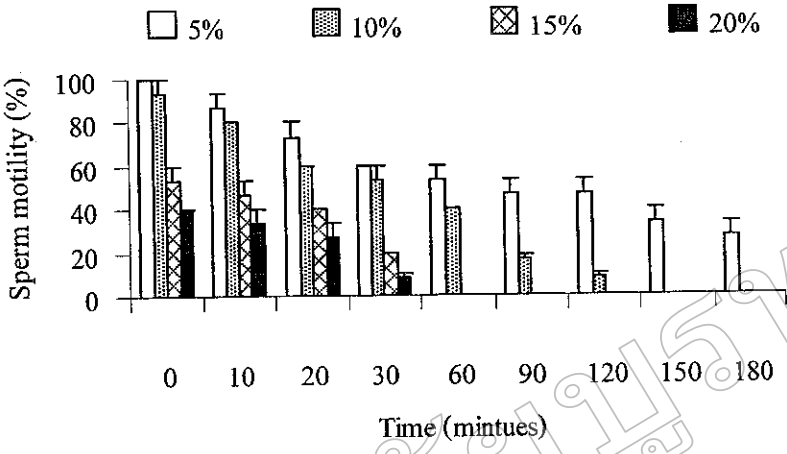
เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{b,1}$	$60\pm0^{c,1}$	$0^{d,1}$
10	$100\pm0^{a,1}$	$86.67\pm6.67^{b,1}$	$20\pm0^{c,2}$	$0^{d,1}$
20	$100\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{b,1}$	$0^{c,3}$	$0^{c,1}$
30	$93.33\pm6.67^{a,12}$	$73.33\pm6.67^{b,1}$	$0^{c,3}$	$0^{c,1}$
60	$80\pm0^{a,2}$	$53.33\pm6.67^{b,2}$	$0^{c,3}$	$0^{c,1}$
90	$80\pm0^{a,2}$	$40\pm0^{b,3}$	$0^{c,3}$	$0^{c,1}$
120	$53.33\pm6.67^{a,3}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$	$0^{b,1}$
150	$46.67\pm6.67^{a,3}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$	$0^{b,1}$
180	$46.67\pm6.67^{a,3}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$	$0^{b,1}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-11 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4-11 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Sucrose			
	5%	10%	15%	20%
0	$100\pm0^{a,1}$	$93.33\pm6.67^{a,1}$	$53.33\pm6.67^{b,1}$	$40\pm0^{b,1}$
10	$86.67\pm6.67^{a,12}$	$80\pm0^{a,2}$	$46.67\pm6.67^{b,12}$	$33.33\pm6.67^{b,1}$
20	$73.33\pm6.67^{a,23}$	$60\pm0^{ab,3}$	$40\pm0^{b,2}$	$26.67\pm6.67^{c,2}$
30	$60\pm0^{a,34}$	$53.33\pm6.67^{ab,3}$	$20\pm0^{c,3}$	$8.33\pm1.67^{d,3}$
60	$53.33\pm6.67^{a,4}$	$40\pm0^{b,4}$	$0^{c,4}$	$0^{c,3}$
90	$46.67\pm6.67^{a,45}$	$16.67\pm6.67^{b,5}$	$0^{c,4}$	$0^{c,3}$
120	$46.67\pm6.67^{a,45}$	$8.33\pm3.33^{b,56}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$
150	$33.33\pm6.67^{a,56}$	$0^{b,6}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$
180	$26.67\pm6.67^{a,6}$	$0^{b,6}$	$0^{b,4}$	$0^{b,3}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

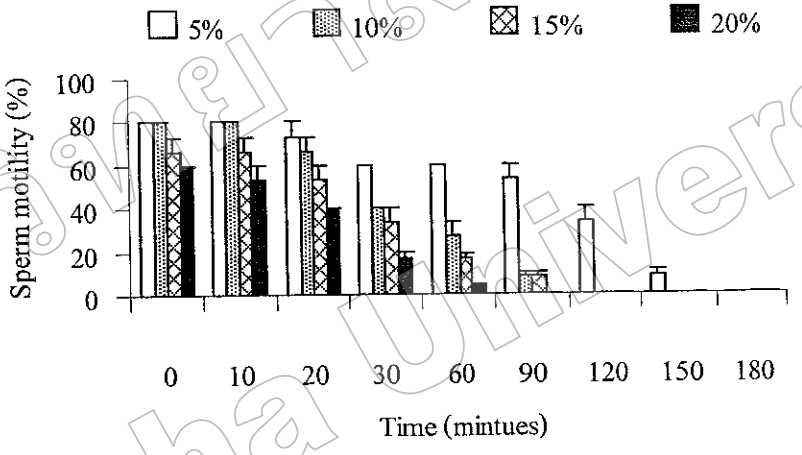
ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9. Acetamide

ก่อนการทดลองสเปิร์มสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 96.22±5.77% เมื่อนำสเปิร์มมาผสมในสาร Acetamide ความเข้มข้น 5% หยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที ส่วนความเข้มข้น 10% กับ 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 20% หยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 90 นาที จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ทุกระดับความเข้มข้น มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่เวลา 0 นาทีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ 10 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเวลา 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-12 และตารางที่ 4-12)



ภาพที่ 4-12 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-12 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวหลังจากเจือจางใน Acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide			
	5%	10%	15%	20%
0	$80\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,1}$	$60\pm0^{b,1}$
10	$80\pm0^{a,1}$	$80\pm0^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{b,1}$	$53.33\pm6.67^{b,1}$
20	$73.33\pm6.67^{a,1}$	$66.67\pm6.67^{ab,2}$	$53.33\pm6.67^{bc,1}$	$40\pm0^{c,2}$
30	$60\pm0^{a,2}$	$40\pm0^{b,3}$	$33.33\pm6.67^{b,12}$	$16.67\pm6.67^{c,3}$
60	$60\pm0^{a,2}$	$26.67\pm6.67^{b,4}$	$80\pm0^{b,23}$	$5\pm0^{c,4}$
90	$53.33\pm6.67^{a,2}$	$8.33\pm3.33^{b,5}$	$8.33\pm3.33^{b,34}$	$0^{b,4}$
120	$33.33\pm6.67^{a,3}$	$0^{b,5}$	$0^{b,4}$	$0^{b,4}$
150	$8.33\pm1.67^{a,4}$	$0^{b,5}$	$0^{b,4}$	$0^{b,4}$
180	$0^{a,4}$	$0^{a,5}$	$0^{b,4}$	$0^{b,4}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P\geq0.05$) รองลงมาคือ Ethylene Glycol มีความเป็นพิษในระดับปานกลาง ขณะที่สารละลาย Sucrose, Ethanol, Acetamide, Glycerol และ Trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด และที่เวลา 10-20 นาที มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 80-100% ดังนั้นการกำหนดระยะเวลาตั้งแต่ผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์จนกระทั่งเข้าสู่ขั้นตอนการลดอุณหภูมิ (Equilibration Time) ให้มีความเหมาะสมก่อนที่เซลล์จะถูกทำลายจากความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ จึงควรอยู่ในช่วง 20 นาทีแรกของการผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์

จากการทดลองนี้จึงเลือกสารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Methanol ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) และกำหนดให้มี Equilibration Time เป็น 10 นาที ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วไม่ทำอันตรายต่อเซลล์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง

1. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) และอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ กัน (-30°C และ -80°C) เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C)

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ DMSO, Methanol และ Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% ในอัตราส่วน 1: 1 เริ่มทำการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ กัน (-30°C และ -80°C) พัก 5 นาที แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที ได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) เมื่อทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -30°C พัก 5 นาที แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C)

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67±5.77% ก่อนการแช่แข็ง และผลของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากทำการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย DMSO และ Methanol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และสารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% พบว่า ภายหลังการละลาย ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ น้ำเชื้อจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป คือ มีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสกับส่วนที่เป็นสีขาวข้น (ลักษณะเป็นวุ้น) ไม่สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ แต่ที่ความเข้มข้น 15% และ 20% ทุกอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0 %

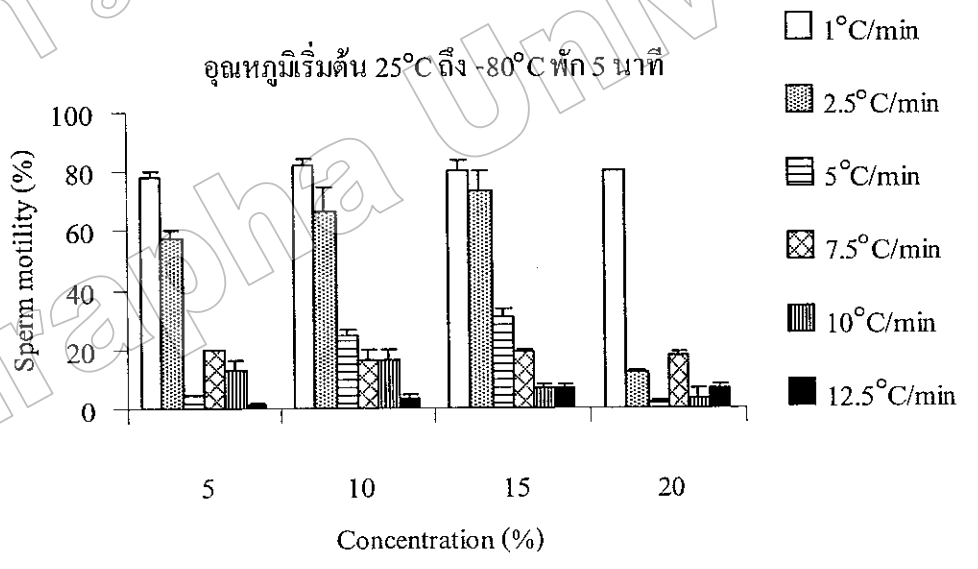
1.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) เมื่อทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C พัก 5 นาที แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C)

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากทำการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอยู่ระหว่าง 77.77±2.22% ถึง 82.23±2.22%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

รองลงมาคืออัตราการลดอุณหภูมิ -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที ซึ่งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 20% และที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที ($P<0.05$) แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5, -7.5 และ -10°C/ นาที ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 4-13 และตารางที่ 4-13)

ในขณะที่สารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายหลังการละลาย และสารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ภายหลังการละลาย ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ น้ำเชื้อจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป คือ มีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสกับส่วนที่เป็นสีขาวข้น (ลักษณะเป็นวุ้น) ไม่สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้



ภาพที่ 4-13 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-80°C) ในอัตราส่วน 1: 1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-13 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวในการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-80°C) ในอัตราส่วน 1: 1

อัตราการลด	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
อุณหภูมิ	5%	10%	15%	20%
-1°C/ นาที	77.77±2.22^{a,1}	82.22±2.22^{a,1}	80±3.85^{a,1}	80±0^{a,1}
-2.5°C/ นาที	57.77±2.22^{a,1}	73.33±2.22^{a,12}	73.33±6.67^{a,2}	12.22±1.11^{a,23}
-5°C/ นาที	5±0^{a,1}	24.45±2.22^{b,23}	31.11±2.22^{b,23}	2.22±0.55^{b,3}
-7.5°C/ นาที	20±0^{a,1}	16.67±4.44^{b,23}	18.89±1.11^{b,23}	17.78±1.11^{b,3}
-10°C/ นาที	13.33±3.33^{a,1}	16.67±3.33^{b,23}	6.67±1.67^{b,3}	3.33±1.67^{b,4}
-12.5°C/ นาที	1.67±0.33^{a,1}	3.33±1.67^{b,34}	6.67±1.67^{b,4}	6.67±1.67^{b,4}

หมายเหตุ แสดงค่า mean± SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

จากผลการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) และอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ (-30°C และ -80°C) ที่ใช้ในขั้นตอนการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที และอุณหภูมิสุดท้าย (-80°C) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอยู่ระหว่าง 77.77±2.22% ถึง 82.23±2.22% ในขณะที่สารละลาย Methanol และ Propylene Glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายหลังการละลาย

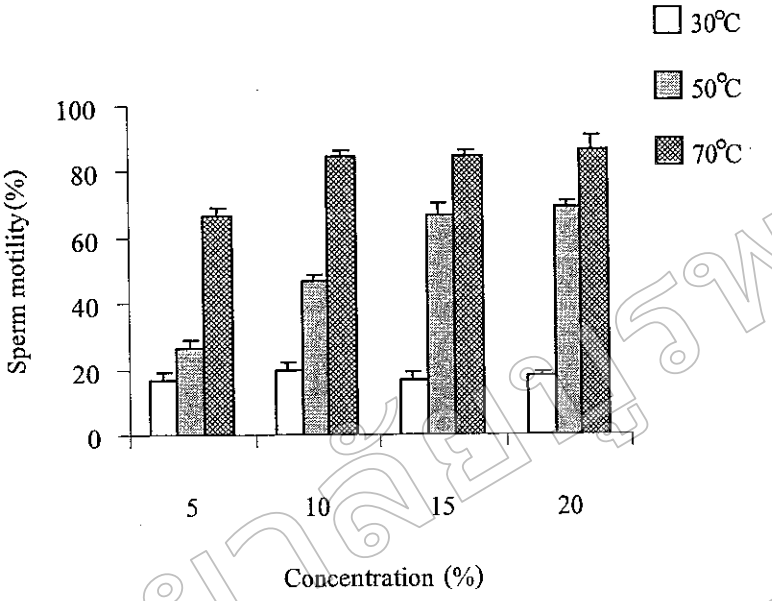
ดังนั้นจากการทดลองนี้เลือกสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที โดยทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนการศึกษาอัตราการเพิ่มอุณหภูมิและการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง แล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การศึกษาอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 96.67±5.77% ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามแบบแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1: 1 โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C และนำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่าง ๆ (30°C, 50°C และ 70°C) นาน 5 วินาที พบว่า DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70°C มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอยู่ระหว่าง 66.67±2.22% ถึง 86.67±3.84% รองลงมาคืออัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 50°C และ 30°C ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 26.67±2.22% ถึง 68.89±2.22% และ 16.67±2.22% ถึง 20±2.22% ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ที่ความเข้มข้น 5% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% ($P<0.05$) ส่วนความเข้มข้น 15% และ 20% ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 30°C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 50°C และ 70°C ($P<0.05$) (ภาพที่ 4-14 และตารางที่ 4-14)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-14 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาวที่นำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่าง ๆ (30°C, 50°C และ 70°C) นาน 5 วินาที ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C

ตารางที่ 4-14 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยตะโกรมกรามขาว ที่นำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่าง ๆ (30°C, 50°C และ 70°C) นาน 5 วินาที ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C

การเพิ่มอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
(°C/ 5 วินาที)	5%	10%	15%	20%
30	$16.67\pm2.22^{a,1}$	$20\pm2.22^{a,1}$	$16.67\pm2.22^{a,1}$	$17.78\pm1.11^{a,1}$
50	$26.67\pm2.22^{a,1}$	$46.67\pm2.22^{a,12}$	$66.67\pm3.84^{a,2}$	$68.89\pm2.22^{a,23}$
70	$66.67\pm2.22^{a,1}$	$84.44\pm2.22^{b,23}$	$84.44\pm2.22^{b,23}$	$86.67\pm3.84^{b,3}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean±SE (n=3)

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

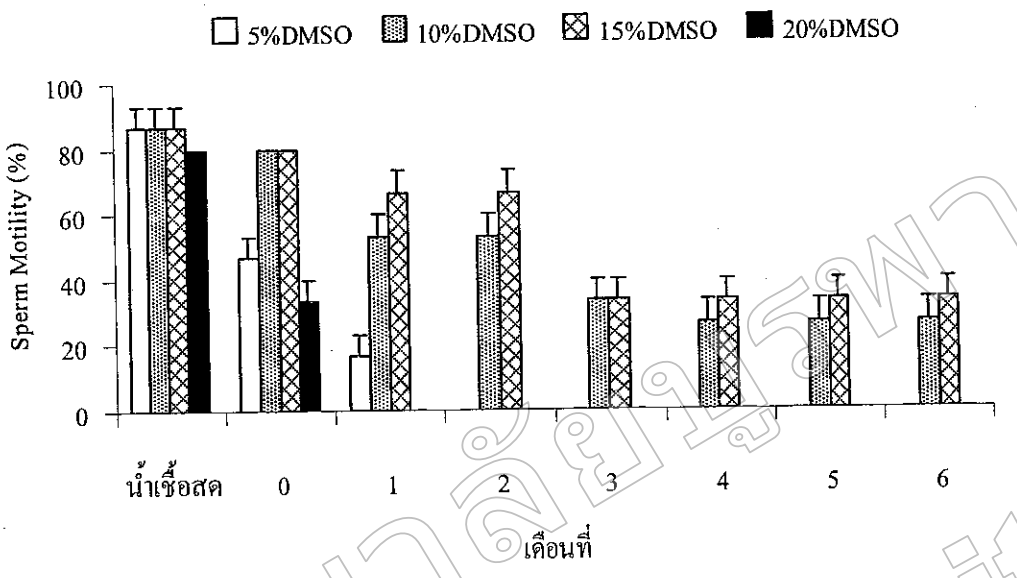
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเสปิร์มระหว่าง 96.67±5.77% และเปอร์เซ็นต์เสปิร์มที่มีชีวิต 96.33±4.04% ก่อนการแช่แข็ง ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็งด้วยน้ำยาสูตร Ca-F HBSS โดยใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5-20%) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C พัก 5 นาที ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที แล้วนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 6 เดือน เมื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทุก ๆ 1 เดือน พบว่า 5% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 0% ในเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ 10% DMSO และ 15% DMSO ในเดือนที่ 6 มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 26.67±6.67% และ 33.33±6.67% ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต เท่ากับ 18.73±1.45% และ 30.95±2.51% ตามลำดับ ส่วน 20% DMSO หลังการแช่แข็ง (เดือนที่ 0) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต เท่ากับ 33.33±6.67% และ 26.64±7.04% ตามลำดับ เมื่อนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า สเปิร์มไม่มีชีวิต (0%) ตามลำดับ

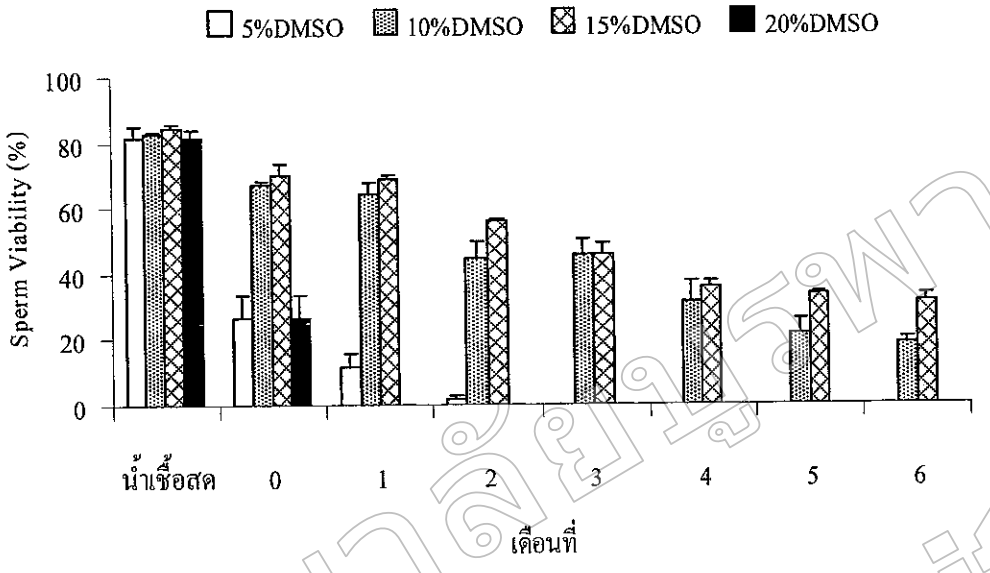
จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า 5% DMSO ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ 10% DMSO, 15% DMSO และ 20% DMSO ($P<0.05$) ในขณะที่ 10% DMSO กับ 15% DMSO ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 4-15 และ 4-16)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-15 ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาว ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 6 เดือน และนำมาละลายน้ำอุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-16 ร้อยละสเปิร์มที่มีชีวิตของหอยตะโกรมกรามขาว ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5-20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1 °C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 °C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 °C แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 6 เดือน และนำมาละลายน้ำอุณหภูมิ 70 °C นาน 5 วินาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University