

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชุกเทศ (*Labeo rohita*) แบบแช่แข็ง ได้ผลการทดลองดังนี้

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของปลาชุกเทศ

จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาชุกเทศ ในช่วงเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม 2551 ทำการทดลอง (N=13) พบว่า มีน้ำหนักรวมเฉลี่ยเท่ากับ 800 ± 12.47 กรัม มีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ย $27.86 \pm 0.12 \times 10^8$ ตัว/มิลลิลิตร และพบว่าน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) มีระดับออสโมลาริตีเฉลี่ย 274.33 ± 2.2 mOsm/kg

1. ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาชุกเทศในสารละลายกลุ่มมีประจุ และสารละลายกลุ่มไม่มีประจุ ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายที่แตกต่างกัน

จากการทดลองการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาชุกเทศในสารละลาย 2 กลุ่ม คือกลุ่มมีประจุ ได้แก่ NaCl, KCl และ CaCl_2 และกลุ่มไม่มีประจุ ได้แก่ Glucose และ Mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM พบว่า เมื่อนำสารละลาย 2 กลุ่ม มาวัดค่าออสโมลาริตีที่ความเข้มข้นไปหามาก พบว่า ระดับค่าออสโมลาริตีเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4-1) และเมื่อนำมาทดลองประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า ที่ระดับค่าออสโมลาริตีต่ำมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่จะลดลงเมื่อระดับค่าออสโมลาริตีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4-2) โดยที่สารละลายกลุ่มมีประจุ ได้แก่ NaCl, KCl และ CaCl_2 เมื่อนำมาเปรียบเทียบ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25 และ 50 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100 ± 0.0 ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) มีระดับค่าออสโมลาริตีอยู่ระหว่าง 69.00-149.33 mOsm/kg แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้น 75, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM และสารละลาย NaCl และ KCl พบว่า สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ที่ระดับความเข้มข้น 150 mM ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับสารละลาย CaCl_2 พบว่า สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ที่ระดับความเข้มข้น 125 mM (ตาราง 4-2)

ตารางที่ 4-1 ระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มมีประจุและไม่มีประจุ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น (mM)	Osmolality (mOsm/kg)				
	CaCl ₂	KCl	NaCl	Glucose	Mannitol
0	69.00±2.61 ^{a,1}	69.00±2.61 ^{a,1}	69.00±2.61 ^{a,1}	69.00±2.61 ^{a,1}	69.00±2.61 ^{a,1}
25	100.67±2.61 ^{b,1}	123.67±2.61 ^{b,2}	101.00±2.61 ^{b,1}	97.00±2.61 ^{b,3}	80.33±2.61 ^{b,4}
50	123.67±2.61 ^{b,1}	149.33±2.61 ^{c,2}	119.33±2.61 ^{c,3}	112.00±2.61 ^{c,4}	88.33±2.61 ^{c,5}
75	202.67±2.61 ^{d,1}	207.33±2.61 ^{d,2}	190.67±2.61 ^{d,3}	125.00±2.61 ^{d,4}	104.33±2.61 ^{d,5}
100	208.00±2.61 ^{e,1}	239.33±2.61 ^{e,1}	227.67±2.61 ^{e,1}	145.00±2.61 ^{e,2}	128.67±2.61 ^{e,2}
125	282.33±2.61 ^{d,1}	266.00±2.61 ^{f,2}	253.33±2.61 ^{f,3}	193.67±2.61 ^{f,4}	149.33±2.61 ^{f,5}
150	323.33±2.61 ^{e,1}	309.00±2.61 ^{g,2}	290.33±2.61 ^{g,3}	213.67±2.61 ^{g,4}	180.33±2.61 ^{g,5}
175	376.33±2.61 ^{f,1}	338.67±2.61 ^{h,2}	327.67±2.61 ^{h,3}	231.67±2.61 ^{h,4}	224.33±2.61 ^{h,5}
200	423.67±2.61 ^{g,1}	376.33±2.61 ^{i,2}	369.00±2.61 ^{i,3}	251.33±2.61 ^{i,4}	234.33±2.61 ^{i,5}
225	470.67±2.61 ^{h,1}	426.33±2.61 ^{j,2}	460.33±2.61 ^{j,3}	272.00±2.61 ^{j,4}	251.33±2.61 ^{j,5}
250	536.67±2.61 ^{i,1}	456.33±2.61 ^{k,2}	497.67±2.61 ^{k,3}	287.00±2.61 ^{k,4}	281.33±2.61 ^{k,5}
275	607.33±2.61 ^{j,1}	512.67±2.61 ^{l,2}	497.67±2.61 ^{l,3}	331.33±2.61 ^{l,4}	305.67±2.61 ^{l,5}
300	656.67±2.61 ^{k,1}	554.67±2.61 ^{m,2}	551.67±2.61 ^{m,3}	343.00±2.61 ^{m,4}	316.33±2.61 ^{m,5}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ในขณะที่สารละลายกลุ่มไม่มีประจุ ได้แก่ Glucose และ Mannitol เมื่อนำมาเปรียบเทียบพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากันที่ 100±0.0 ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) มีระดับค่าออสโมลาริตีอยู่ระหว่าง 69.00-125.00 mOsm/kg แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ที่ระดับความเข้มข้น 75, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM

และสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ที่ระดับความเข้มข้น 200 mM ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) มีระดับค่าออสโมลาริตีอยู่ระหว่าง 234.33-251.33 mOsm/kg และเมื่อเปรียบเทียบระดับออสโมลาริตีของสารละลาย 2 กลุ่ม คือกลุ่มมีประจุ และกลุ่มไม่มีประจุ พบว่าสารละลายกลุ่มมีประจุมีระดับค่าออสโมลาริตีสูงกว่าสารละลายกลุ่มไม่มีประจุ (ตารางที่ 4-1 และ 4-2)

ตารางที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาชุกเทศ ในสารละลายกลุ่มมีประจุและไม่มีประจุ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น (mM)	Sperm Motility (%)				
	CaCl ₂	KCl	NaCl	Glucose	Mannitol
0	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}
25	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}
50	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}	100.00±0.0 ^{a,1}
75	82.22±3.85 ^{b,1}	80.00±0.0 ^{b,1}	91.11±3.85 ^{b,2}	100.00±0.0 ^{a,3}	100.00±0.0 ^{a,3}
100	20.00±0.0 ^{c,1}	60.00±3.85 ^{c,2}	51.11±3.85 ^{c,3}	88.88±3.85 ^{b,4}	80.00±0.0 ^{b,5}
125	0 ^{d,1}	20±0.0 ^{d,2}	20±0.0 ^{d,2}	80.00±3.85 ^{b,3}	62.22±3.85 ^{c,4}
150	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	62.22±0.0 ^{c,2}	60.00±0.0 ^{c,2}
175	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	20±0.0 ^{d,2}	20.00±0.0 ^{d,2}
200	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}
225	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}
250	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}
275	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}
300	0 ^{d,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}	0 ^{e,1}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 โดยศึกษาสารโครีโอโพรเทคแทนต์ 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในแบบต่าง ๆ

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีระดับออสโมลาริตีกับ 322 ± 2.6 และ 313 ± 2.6 mOsm/kg ตามลำดับ ผสมสารโครีโอโพรเทคแทนต์ คือ DMSO, Propylene Glycol, Ethylene Glycol, Methanol, Ethanol และ Glycerol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% โดยผสมน้ำเชื้อกับสารละลายบัฟเฟอร์ และสารโครีโอโพรเทคแทนต์ ในอัตราส่วน 1:5:1 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -40°C โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน (-3 , -5 และ -10°C/min) แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลว นาน 7 วัน และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1.1 DMSO

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่าสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 84.44 ± 2.2 (ตารางที่ 4-3) รองลงมาคือสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ -3°C/min ($P > 0.05$) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ที่ 75.55 ± 2.2 และ 71.44 ± 2.2 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 และ -10°C/min ที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 15% และอัตราการลดอุณหภูมิ -3°C/min มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ -5 และ -10°C/min ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-3)

2.1.2 Propylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 และ -5°C/min ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 15.55 ± 2.2 ถึง 24.44 ± 2.2 ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4-4) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 24.44 ± 0 ถึง 42.22 ± 2.2 ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4-4)

2.1.3 Ethylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย Ethylene Glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 , -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ความเข้มข้น 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอยู่ระหว่าง 67.33 ± 0.3 - 62.22 ± 2.2 (ตารางที่ 4-5) รองลงมา คือ สารละลาย Ethylene Glycol ความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ที่ 48.90 ± 2.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 , -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ที่ความเข้มข้น 5%, 15% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 10% ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-5)

2.1.4 Methanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งของสารละลาย Methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 42.22 ± 2.2 (ตารางที่ 4-6) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 37.78 ± 2.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 , -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ที่ความเข้มข้น 15% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 5% และ 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4-3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	35.55±4.4 ^{a,1}	33.33±2.2 ^{a,1}	71.44±2.2 ^{a,2}	48.88±2.2 ^{a,3}
-5°C/min	55.55±2.2 ^{b,1}	57.77±1.9 ^{b,1}	75.55±2.2 ^{a,2}	55.55±2.2 ^{a,b,1}
-10°C/min	57.77±2.2 ^{b,1}	68.87±2.2 ^{b,2}	84.44±2.2 ^{b,3}	57.78±1.7 ^{b,1}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Propylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	17.77±4.4 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	15.55±2.2 ^{a,1}	15.55±2.2 ^{a,1}
-5°C/min	24.44±2.2 ^{a,1}	20.00±2.2 ^{a,1}	20.00±2.2 ^{a,b,1}	20.00±0.0 ^{a,1}
-10°C/min	35.55±2.2 ^{b,1}	35.55±0.0 ^{b,1}	24.44±0.0 ^{b,2}	42.22±2.2 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	11.11±2.2 ^{a,1}	37.78±2.2 ^{a,2}	24.44±4.4 ^{a,3}	62.22±2.2 ^{a,4}
-5°C/min	11.11±2.2 ^{a,1}	42.23±1.9 ^{a,b,2}	31.11±4.4 ^{a,3}	64.45±2.2 ^{a,4}
-10°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	48.90±2.2 ^{b,2}	31.11±2.2 ^{a,3}	67.33±0.3 ^{a,4}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	28.89±2.2 ^{a,1}	28.89±2.2 ^{a,1}	24.44±4.4 ^{a,1,2}	15.55±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	11.11±2.2 ^{b,1}	35.55±1.9 ^{a,b,2}	28.89±4.4 ^{a,2}	17.78±2.2 ^{a,1}
-10°C/min	15.55±2.2 ^{b,1}	42.22±2.2 ^{b,2}	37.78±2.2 ^{a,2}	22.22±2.2 ^{a,1}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.1.5 Ethanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 , -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้น 5% อยู่ระหว่าง 24.44 ± 4.4 ถึง 35.55 ± 2.2 (ตารางที่ 4-7) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้น 10% อยู่ 13.33 ± 0 ถึง 15.55 ± 2.2 และที่ความเข้มข้น 15% และ 20% พบว่า ภายหลังการละลายทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

2.1.6 Glycerol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งของสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 5 %, 10%, 15% และ 20% พบว่า ทุกอัตราการลดอุณหภูมิ (-3 , -5 , และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 0

ตารางที่ 4-7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเพศในการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol			
	5%	10%	15%	20%
$-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$24.44 \pm 4.4^{a,1}$	$13.33 \pm 0.0^{a,2}$	$0 \pm 0^{a,3}$	$0 \pm 0^{a,3}$
$-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$28.87 \pm 4.4^{a,1}$	$13.33 \pm 0.0^{a,2}$	$0 \pm 0^{a,3}$	$0 \pm 0^{a,3}$
$-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$35.55 \pm 2.2^{a,1}$	$15.55 \pm 2.2^{a,2}$	$0 \pm 0^{a,3}$	$0 \pm 0^{a,3}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยศึกษาสารไอโพรเทคแทน 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้น และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในแบบต่าง ๆ (-3, -5 และ -10 °C/min)

2.2.1 DMSO

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ของสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5 %, 10%, 15% และ 20% พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10 °C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 78.90 ± 1.1 (ตารางที่ 4-8) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอัตราการลดอุณหภูมิ และทุกความเข้มข้น รองลงมาเป็น DMSO อัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 °C/min ที่ความเข้มข้น 15% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 66.67 ± 2.2 (ตารางที่ 4-8)

2.2.2 Propylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 °C/min ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 15.55 ± 2.2 ถึง 20.00 ± 0.0 ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4-9)

2.2.3 Ethylene Glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ของสารละลาย Ethylene Glycol พบว่า ที่ความเข้มข้น 20% อัตราการลดอุณหภูมิ -10 °C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 62.56 ± 2.2 (ตารางที่ 4-10) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 °C/min ที่ความเข้มข้น 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 55.55 ± 2.2 ($P > 0.05$) รองลงมาเป็น Ethylene Glycol ความเข้มข้น 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 °C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 51.11 ± 2.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับความเข้มข้น 5% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 °C/min และที่ระดับความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 °C/min และ -5 °C/min ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 °C/min และ -10 °C/min ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-10)

ตารางที่ 4-8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	26.67±2.2 ^{a,1,3}	17.77±2.2 ^{a,1}	57.78±2.2 ^{a,2}	35.55±2.2 ^{a,3}
-5°C/min	28.89±4.4 ^{a,1}	55.55±0.0 ^{b,2}	66.67±2.2 ^{b,3}	46.67±2.2 ^{b,4}
-10°C/min	44.45±2.2 ^{b,1}	60.00±1.6 ^{c,2}	78.90±1.1 ^{c,3}	55.55±2.2 ^{c,2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Propylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	17.78±4.4 ^{a,1}
-5°C/min	20.00±2.2 ^{a,1}	15.55±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}
-10°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	20.00±2.2 ^{a,1}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene Glycol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	15.55±2.2 ^{a,1}	51.11±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	15.55±2.2 ^{a,1}	31.11±2.2 ^{b,2}	17.78±2.2 ^{a,1}	55.55±2.2 ^{a,b,3}
-10°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	35.55±2.2 ^{b,2}	28.88±2.2 ^{b,2}	62.56±2.2 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.2.4 Methanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67±3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งของสารละลาย Methanol ความเข้มข้น 5 %, 10%, 15% และ 20% พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min ที่ความเข้มข้น 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่สุด 51.10±0.0 (ตารางที่ 4-11) รองลงมาเป็นอัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min ความเข้มข้น 10% ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 35.55±2.2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความอัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min ที่ความเข้มข้น 15% (P>0.05) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้น ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 3°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 8.89±2.2 ถึง 11.11±0.0 (P>0.05) (ตารางที่ 4-11)

2.2.5 Ethanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67±3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งของสารละลาย Ethanol พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min ที่ความเข้มข้น 15% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่สุด 35.54±0.0 (ตารางที่ 4-12) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3°C/min ทุกระดับความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง

8.89±2.2-11.11±0.0 ($P>0.05$) แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 20% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 15% ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-12)

2.2.6 Glycerol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67 ± 3.85 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งของสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 5 %, 10%, 15% และ 20% พบว่า ทุกอัตราการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 0

ตารางที่ 4-11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol			
	5%	10%	15%	20%
$-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$8.89\pm2.2^{a,1}$	$11.11\pm0.0^{a,1}$	$11.11\pm0.0^{a,1}$	$11.11\pm4.4^{a,1}$
$-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$20.00\pm2.2^{b,1}$	$35.55\pm2.2^{b,2}$	$11.11\pm2.2^{a,3}$	$17.78\pm0.0^{b,1}$
$-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$15.54\pm2.2^{b,1}$	$51.10\pm0.0^{c,2}$	$35.54\pm0.0^{b,3}$	$22.22\pm2.2^{b,1}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4-12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	8.89±2.2 ^{a,1}	11.11±0.0 ^{a,1}	11.11±0.0 ^{a,1}	11.11±4.4 ^{a,1}
-5°C/min	20.00±2.2 ^{b,1}	15.55±2.2 ^{a,1,2}	11.11±2.2 ^{a,2}	17.78±0.0 ^{b,1}
-10°C/min	15.54±2.2 ^{b,1}	15.10±0.0 ^{a,1}	35.54±0.0 ^{b,2}	22.22±2.2 ^{b,1}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายีสกเทศแบบแช่แข็งในผลการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่เจือจางในสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO, Ethylene Glycol กับ Methanol ให้ผลการทดลองที่ดี จึงนำมาทำการทดลองในการทดลอง 2.3 และ 2.4 อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งทำการทดลองในเดือนที่แตกต่างกัน โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS และสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% และ Ethylene Glycol กับ Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% (เนื่องจาก Ethylene Glycol กับ Methanol ที่ความเข้มข้น 5% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำจึงไม่นำมาทดลอง) และอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10°C/min

2.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายีสกเทศแบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, Ethylene Glycol และ Methanol) ที่ความเข้มข้นต่างกัน และอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน (-3, -5 และ -10°C/min)

จากศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% และ Ethylene Glycol กับ Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% โดยผสมน้ำเชื้อกับสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในอัตราส่วน 1:5:1 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -40°C โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 วินาที ได้ผลการทดลองดังนี้

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100 ± 0.0 ก่อนการแช่แข็ง และผลกาเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 80.00 ± 0.0 (ตารางที่ 4-13) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับความเข้มข้น 5% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% ในทุกอัตราการลดอุณหภูมิ ($P < 0.05$) และที่ระดับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ยกเว้นความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (ตารางที่ 4-13)

ในส่วนของสารละลาย Ethylene Glycol ความเข้มข้น 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 64.44 ± 2.2 (ตารางที่ 4-14) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 62.22 ± 2.2 ($P > 0.05$) รองลงมาเป็นอัตราการลดอุณหภูมิ $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ความเข้มข้น 20% ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 57.77 ± 2.2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($P > 0.05$) และที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 17.78 ± 2.2 - 22.22 ± 2.2 (ตารางที่ 4-14)

ในขณะที่สารละลาย Methanol ความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 42.22 ± 2.2 (ตารางที่ 4-15) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 37.77 ± 2.2 ($P > 0.05$) และที่ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-15)

ตารางที่ 4-13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%
และ 20%

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	28.89±2.2 ^{a,1}	57.77±2.2 ^{a,2}	62.22±2.2 ^{a,2}	60.00±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	31.11±2.2 ^{a,1}	62.22±2.2 ^{a,2}	64.45±2.2 ^{a,2}	62.22±2.2 ^{a,2}
-10°C/min	13.33±0.0 ^{b,1}	60.00±2.2 ^{a,2}	80.00±0.0 ^{b,3}	68.89±2.2 ^{a,2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้น 10%, 15%
และ 20%

อัตราการลด อุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene Glycol		
	10%	15%	20%
-3°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	57.77±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	11.15±2.2 ^{a,1}	62.22±2.2 ^{a,b,2}
-10°C/min	22.22±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	64.44±2.2 ^{b,2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-15 เปอร์เซ็นต์ร้อยละการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 เจือจางสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20%

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol		
	10%	15%	20%
-3°C/min	22.22±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	8.89±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	37.77±2.2 ^{b,1}	24.45±2.2 ^{b,2}	8.89±2.2 ^{a,3}
-10°C/min	42.22±2.2 ^{b,1}	31.11±2.2 ^{b,2}	20.00±0.0 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.4 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายีสกเทศแบบแช่แข็งโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, Ethylene Glycol และ Methanol) ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน (-3, -5 และ -10°C/min))

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 96.67±3.38 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งพบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 80.00±0.0 (ตารางที่ 4-16) รองลงมาเป็น DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ 75.55±2.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นที่ 5% และ 20% อัตราการลดอุณหภูมิไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และที่ความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 และ -5°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min (P<0.05) (ตารางที่ 4-16)

ในขณะที่สารละลาย Ethylene Glycol ความเข้มข้น 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min หลังการละลาย พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มคืออยู่ที่ 62.22±2.2 2 (ตารางที่ 4-17) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 62.22±2.2 (P>0.05) และที่ความเข้มข้น 10%

และ 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ระหว่าง 15.55 ± 2.2 ถึง 20.00 ± 2.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นที่ 10% และ 15% อัตราการลดอุณหภูมิไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (ตารางที่ 4-17)

ในส่วนของการละลาย Methanol พบว่า ความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 55.55 ± 2.2 (ตารางที่ 4-18) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 51.11 ± 2.2 ($P > 0.05$) และที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ระหว่าง 11.11 ± 2.2 - 28.87 ± 2.2 (ตารางที่ 4-18)

ตารางที่ 4-16 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO			
	5%	10%	15%	20%
-3°C/min	$15.55 \pm 2.2^{a,1}$	$55.55 \pm 2.2^{a,2}$	$62.22 \pm 2.2^{a,2}$	$57.78 \pm 2.2^{a,2}$
-5°C/min	$17.78 \pm 2.2^{a,1}$	$62.22 \pm 2.2^{a,2}$	$75.55 \pm 2.2^{b,3}$	$64.45 \pm 2.2^{a,2}$
-10°C/min	$17.78 \pm 2.2^{a,1}$	$68.89 \pm 2.2^{b,2}$	$80.00 \pm 0.0^{c,3}$	$64.45 \pm 2.2^{a,2}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-17 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้น 10%,
15% และ 20%

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene Glycol		
	10%	15%	20%
-3°C/min	17.78±0.0 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	31.11±0.0 ^{a,2}
-5°C/min	17.78±0.0 ^{a,1}	20.00±2.2 ^{a,1}	60.00±0.0 ^{b,2}
-10°C/min	15.55±2.2 ^{a,1}	17.78±2.2 ^{a,1}	62.22±2.2 ^{b,2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-18 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15%
และ 20%

อัตราการลดอุณหภูมิ	ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol		
	10%	15%	20%
-3°C/min	17.78±2.2 ^{a,1}	20.00±0.0 ^{a,1}	11.11±2.2 ^{a,2}
-5°C/min	51.11±2.2 ^{b,1}	24.45±2.2 ^{a,b,2}	15.55±2.2 ^{a,b,3}
-10°C/min	55.55±2.2 ^{b,1}	28.87±2.2 ^{b,2}	22.22±2.2 ^{b,2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ดังนั้นจากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ พบว่า ถึงแม้จะทำการทดลองการแช่แข็งในช่วงวันเวลาที่ต่างกัน แต่น้ำเชื้อก็มีคุณภาพที่ใกล้เคียงกันสามารถที่จะนำมาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ และจากการทดลองนี้ได้เลือกสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS โดยใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 80.00 ± 0.0 (ตารางที่ 4-19) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแช่แข็งและการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม

ตารางที่ 4-19 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเปรียบเทียบระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS

สารละลาย บัฟเฟอร์	อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที			
	5%	10%	15%	20%
Extender 7	$13.33 \pm 2.2^{a,1}$	$60.00 \pm 0.0^{a,2}$	$80.00 \pm 2.2^{a,3}$	$68.89 \pm 2.2^{a,2}$
Ca-F HBSS	$17.78 \pm 2.2^{a,1}$	$68.89 \pm 2.2^{a,2}$	$80.00 \pm 2.2^{a,3}$	$64.45 \pm 2.2^{a,2}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

3. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว

ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS โดยใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และทำการลดอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึงอุณหภูมิต่ำสุด -40°C แล้วนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 เดือน เมื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทุก ๆ 1 เดือน จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 93.33 ± 4.4 ก่อนการแช่แข็ง และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ในเดือนที่ 1 ถึง เดือนที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 80 ± 0.0 ยกเว้นสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ของเดือนที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 77.78 ± 2.2 ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเดือนที่ 1 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 80 ± 0.0 ถึง 75.55 ± 2.2 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเดือน 9 ในเดือนที่ 9 พบว่า น้ำเชื้อมีลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไป คือ มีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสกับส่วนที่เป็นสีขาวขุ่น (ลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน) เมื่อนำมาขยี้ให้แตก และทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS พบว่า สูตรสารละลายบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (ตารางที่ 4-20)

จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด พบว่า เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต 96.67 ± 2.2 ก่อนการแช่แข็ง และผลของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็ง พบว่า เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อสดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งสเปิร์ม 7 วัน ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเดือนที่ 1 ถึง 9 ($P < 0.05$) ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตของเดือนที่ 1 ถึง 8 มีเปอร์เซ็นต์ที่มีชีวิตของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 95.22 ± 0.79 ถึง 81.11 ± 1.17 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเดือน 9 พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 0 และเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS พบว่า บัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (ตารางที่ 4-21)

ตารางที่ 4-20 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของปลายกระดูกเพศ ภายหลังจากแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -40°C แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 9 เดือน นำมาละลายน้ำอุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที

ระยะเวลา การแช่แข็งน้ำเชื้อ (เดือน)	สารละลายบัฟเฟอร์	
	Extender 7	Ca-F HBSS
น้ำเชื้อสด	$93.33 \pm 4.4^{a,i}$	$93.33 \pm 4.4^{a,i}$
7 วัน	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
1	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
2	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
3	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
4	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
5	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$
6	$80.00 \pm 0.0^{b,i}$	$77.78 \pm 2.2^{b,i}$
7	$77.78 \pm 2.2^{b,i}$	$77.78 \pm 2.2^{b,i}$
8	$77.78 \pm 2.2^{b,i}$	$75.55 \pm 2.2^{b,i}$
9	0	0

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4-21 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาชี่สกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ จาก อุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -40°C แล้วนำไปเก็บไว้ในถัง ไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 9 เดือน นำมาละลายน้ำอุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที

ระยะเวลา การแช่แข็งน้ำเชื้อ (เดือน)	สารละลายบัฟเฟอร์	
	Extender 7	Ca-F HBSS
น้ำเชื้อสด	$96.67 \pm 2.2^{a,1}$	$96.67 \pm 2.2^{a,1}$
7 วัน	$94.89 \pm 0.86^{a,1}$	$95.22 \pm 0.79^{a,1}$
1	$82.67 \pm 1.26^{b,1}$	$85.11 \pm 1.23^{b,1}$
2	$83.89 \pm 1.17^{b,1}$	$83.56 \pm 1.54^{b,1}$
3	$84.11 \pm 0.96^{b,1}$	$86.78 \pm 0.58^{b,1}$
4	$83.00 \pm 0.98^{b,1}$	$86.67 \pm 0.77^{b,1}$
5	$83.67 \pm 0.38^{b,1}$	$85.56 \pm 0.94^{b,1}$
6	$82.78 \pm 0.39^{b,1}$	$81.89 \pm 0.98^{b,1}$
7	$83.22 \pm 0.39^{b,1}$	$81.56 \pm 0.94^{b,1}$
8	$81.89 \pm 1.12^{b,1}$	$81.11 \pm 1.17^{b,1}$
9	0	0

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวนอง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

4. ศึกษาการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ แบบแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 15% โดยผสมน้ำเชื้อกับบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ในอัตราส่วน 1:5:1 แล้วดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.50 ml ใส่หลอด cryotube และปล่อยให้อยู่ในภาวะสมดุลนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาด 17 × 32 × 20 เซนติเมตร ที่บรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 3 เซนติเมตร โดยเทไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ 5 นาที พร้อมทั้งปิดฝากล่องโฟมเพื่อปรับอุณหภูมิโฟม เมื่อครบ 5 นาที จึงนำหลอด cryotube ใส่ลงในกล่องโฟมสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาการลดอุณหภูมิในกล่องโฟม 3 ระยะ ได้แก่ 5, 10 และ 15 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 7 วัน และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 50 วินาที จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ผลการทดลองดังนี้

ผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 100 ± 0.0 และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 60.00 ± 2.2 ถึง 62.22 ± 2.2 ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4-22) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 4 และ 6 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 20.00 ± 2.2 ถึง 24.44 ± 2.2 ($P < 0.05$) ในขณะที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวที่ 4 และ 6 เซนติเมตร ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิที่ 5, 10 และ 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4-22) และจากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด พบว่า เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต 96.66 ± 2.2 ก่อนการแช่แข็ง และผลของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็ง พบว่า เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งสเปิร์ม 7 วัน ($P > 0.05$) ของระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งอยู่ที่ 74.78 ± 0.0 , 73.34 ± 2.2 และ 74.55 ± 2.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-23) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 4 และ 6 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 34.96 ± 0.0 ถึง 39.11 ± 0.0 ($P < 0.05$) และที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวที่

4 และ 6 เซนติเมตร ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิที่ 5, 10 และ 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4-24)

ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาช่อนเพศผู้โดยการแช่แข็งในกล่องโฟม โดยใช้สารละลาย บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 100 ± 0.0 และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ที่ 80.00 ± 2.2 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) รองลงมาเป็น ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 60.00 ± 2.2 (ตารางที่ 4-24) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 4 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 40.00 ± 2.2 ถึง 44.44 ± 2.2 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวที่ 6 เซนติเมตร (ตารางที่ 4-25) และจากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด พบว่า เปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต 96.66 ± 2.2 ก่อนการแช่แข็ง และผลของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็ง พบว่า เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งสเปิร์ม 7 วัน ของระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งอยู่ที่ 82.22 ± 2.2 และ 86.11 ± 2.2 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) รองลงมาเป็นระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต 75.22 ± 2.2 และที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวที่ 4 และ 6 เซนติเมตร ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิที่ 5, 10 และ 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-25)

ตารางที่ 4-22 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มของปลายี่สกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 โดยใช้เทคนิคการแช่แข็งน้ำแข็งปลายี่สกเทศในกล่องโฟม ที่สูง
เหนือผิวหน้าไนโตรเจนระดับต่าง ๆ กัน และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (ซม.)		
	2	4	6
5	60.00±0.0 ^{a.1}	20.00±0.0 ^{a.2}	22.22±2.2 ^{a.2}
10	60.00±0.0 ^{a.1}	20.00±0.0 ^{a.2}	22.22±0.0 ^{a.2}
15	62.22±2.2 ^{a.1}	20.00±2.2 ^{a.2}	24.44 ±2.2 ^{a.2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-23 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลายี่สกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 โดยใช้เทคนิคการแช่แข็งน้ำแข็งปลายี่สกเทศในกล่องโฟม ที่สูง
เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวระดับต่าง ๆ กัน และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ

เวลา (นาที)	ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (ซม.)		
	2	4	6
5	74.78±0.0 ^{a.1}	34.96±0.0 ^{a.2}	35.55±0.0 ^{a.2}
10	73.34±2.2 ^{a.1}	36.67±2.2 ^{a.2}	38.44±0.0 ^{a.2}
15	74.55±2.2 ^{a.1}	38.56±2.2 ^{a.2}	39.11±0.0 ^{a.2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-24 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายีสกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยใช้เทคนิคการแช่แข็งน้ำแข็งปลายีสกเทศในกล่องโฟม ที่สูงเหนือผิวหน้าในโครเจนระดับต่าง ๆ กัน และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

เวลา (นาทีก)	ความสูงเหนือผิวหน้าในโครเจนเหลว (ซม.)		
	2	4	6
5	60.00±2.2 ^{a,1}	42.22±2.2 ^{a,2}	31.11±2.2 ^{a,3}
10	80.00±2.2 ^{b,1}	40.00±2.2 ^{a,2}	22.22±2.2 ^{b,3}
15	80.00±2.2 ^{b,1}	44.44±2.2 ^{a,2}	20.00±2.2 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-25 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลายีสกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยใช้เทคนิคการแช่แข็งน้ำแข็งปลายีสกเทศในกล่องโฟม ที่สูงเหนือผิวหน้าในโครเจนเหลวระดับต่าง ๆ กัน และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

เวลา (นาทีก)	ความสูงเหนือผิวหน้าในโครเจนเหลว (ซม.)		
	2	4	6
5	75.22±2.2 ^{a,1}	44.44±2.2 ^{a,2}	34.44±2.2 ^{a,3}
10	82.22±2.2 ^{a,b,1}	47.89±2.2 ^{a,2}	37.11±2.2 ^{a,3}
15	86.11±2.2 ^{b,1}	50.56±2.2 ^{a,2}	34.44±2.2 ^{a,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

จากการทดลองการใช้เทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศในกล่องโฟม พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5, 10 และ 15 นาที ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดี จึงนำ สารละลายบัฟเฟอร์ 2 สูตร ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5 นาที สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า Ca-F HBSS ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดี ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 60.00 ± 0.0 - 80.00 ± 0.0 (ตารางที่ 4-26)

ในขณะที่ผลของสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็ง ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 5 นาที สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า Ca-F HBSS ที่วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจน 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตดี ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 75.22 ± 0.94 ถึง 86.11 ± 0.59 (ตารางที่ 4-27)

ตารางที่ 4-26 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มของปลายี่สกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโครเจนเหลว
2 เซนติเมตร และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ

สารละลาย บัฟเฟอร์	ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ (นาที)		
	5	10	15
Extender 7	60.00±0.0 ^{a,1}	60.00±0.0 ^{a,1}	62.22±2.2 ^{a,2}
Ca-F HBSS	60.00±0.0 ^{b,1}	80.00±0.0 ^{b,2}	80.00±0.0 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4-27 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของปลายี่สกเทศ ภายหลังการแช่แข็งด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโครเจนเหลว
2 เซนติเมตร และอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ

สารละลาย บัฟเฟอร์	ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ (นาที)		
	5	10	15
Extender 7	74.78±1.89 ^{a,1}	73.34±1.20 ^{a,1}	74.55±1.39 ^{a,2}
Ca-F HBSS	75.22±0.94 ^{b,1}	82.22±1.35 ^{b,2}	86.11±0.59 ^{b,3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ±SE (n=3)

ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวดิ่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขเหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)