บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

จากการทดลองศึกษาของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่ เป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เพื่อความเข้าใจที่ง่ายขึ้น จึงแบ่งช่วงระยะเวลาของฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ออกเป็น 3 ช่วงระยะเวลาคือ ช่วงต้นฤดูกาล (เดือนมีนาคม-พฤษภาคม), ช่วงกลางฤดูกาล (เดือนมิถุนายน-สิงหาคม) และช่วงปลายฤดูกาล (เดือนกันยายน-ตุลาคม) ปลาตะเพียนขาวมีช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ตั้งแต่เดือน เมษายนถึงพฤศจิกายน (ช่วงฤดูฝน) (Hoque and Ahmed, 1990) ซึ่งผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในเรื่องของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตนั้นทุกช่วงระยะเวลาให้ผลที่ดีไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งพบได้ในปลา common barbell (Alavi et al., 2007) ที่เป็นปลาในกลุ่ม cyprinidae เหมือนกันรวมถึงค่า pH ที่ไม่พบความแตกต่างในทุกช่วงระยะเวลา

อย่างไรก็ตามค่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่, ค่าออสโมลาริตี้และค่าความหนาแน่นของสเปิร์มจะพบความแตกต่างกัน โดยในช่วงต้นฤดูกาลจะมีค่าต่ำกว่าช่วงกลางฤดูกาลและปลายฤดูกาล และช่วงกลางฤดูกาลจะมีค่าสูงกว่าปลายฤดูกาลเล็กน้อย พบว่า เมื่อค่าออสโมลาริตี้สูงขึ้นความหนาแน่นของสเปิร์มจะมีค่าสูงขึ้น และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะนานขึ้นตามไปด้วย ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับผลการทดลองในปลาหลายชนิดเช่น European perch (Alavi et al., 2010), walking catfish (Vuthiphandchai, Thadsri & Nimrat, 2009), atlantic cod (Rouxel et al., 2008), red- spotted grouper (Li, Liu, & Lin, 2009) เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางฮอร์โมน โดยระดับของฮอร์โมน Testosterone (T) และ 11-KT จะเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของฤดูกาล และลดลงช่วงปลายฤดูกาล(Alavi et al., 2010)

ซึ่งฮอร์โมน T และ 11-KT จะมีบทบาทในการควบคุม spermatogenesis และจะลดลงเมื่อสเปิร์มพัฒนาถึงระยะ spermiation (Zohar, 1989) ซึ่งระยะ spermiation จะเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของน้ำเชื้อและ sperm hydration ของปลา (Mylonas, Gissis, Magnus, & Zohar, 1977; Alavi, Psenicka , Rodina, Policar, & Linhart, 2008) โดยระดับของฮอร์โมน T และ11-KT มีการลดระดับลงโดย GTH II จากต่อมใต้สมองหลั่งออกมาและไปกระตุ้นอัณฑะของปลาให้เปลี่ยนไปผลิตฮอร์โมน 17α, 20β-DP แทนที่เพื่อทำให้เกิดกระบวนการ sperm maturation ซึ่งกระบวนการ

sperm maturation จะมีผลให้spermatozoa มีความสมบูรณ์มากขึ้นเนื่องจาก ค่า pH ของ seminal plasma ในท่อนำน้ำเชื้อ (Vas deferens) สูงขึ้นจึงไป ควบคุมปริมาณอิออนที่เป็นองค์ประกอบน้ำของ seminal -plasma ในตัวปลาอีกทั้งยังเพิ่มระดับ intracellular cAMP ที่จะส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในภายหลัง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2546) ยกตัวอย่างการศึกษาในปลา European perch (Alavi et al., 2010) ระดับฮอร์โมน T และ 11-KT จะเริ่มเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของฤดูกาล และลดลงในช่วงปลายฤดูกาล ค่าออสโมลาริตี้ที่ต่ำในช่วงต้นฤดูกาล และปลายฤดูกาลทำให้ปริมาณน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นจากกระบวนการ hydration ที่ทำให้ความหนาแน่นสเปิร์มลดลงแต่จำนวนสเปิร์มจะเพิ่มมากขึ้น โดยช่วงกลางฤดูกาลระดับของ Ca^{2+} ในseminal plasma เพิ่มมากขึ้นจึงมีผลให้ค่าออสโมลาริตี้เพิ่มขึ้น และความความหนาแน่นสเปิร์มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และผลที่ได้ยังคล้ายกันในปลาAtlantic cod (Rouxel et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามในปลา Common barbel (Alavi et al., 2007) ที่เป็นปลาในกลุ่ม cyprinidae เหมือนกันกลับได้ผลที่แตกต่างกันโดยค่าออสโมลาริตี้ และเปอร์เซ็นต์อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำเชื้อ และความหนาแน่นของสเปิร์มจะสูงเมื่อต้นฤดูกาลจากนั้นค่อย ๆ ลดลงจนต่ำสุดในช่วงปลายฤดูกาลอีกทั้งในปลา Atlantic halibut กลับพบความหนาแน่นของสเปิร์มสูงเมื่อสิ้นสุดฤดูกาลผสมพันธุ์ (Babiak, Ottesen, Rudolfsen, & Johnsen. 2006) จึงเห็นได้ว่าในปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในเรื่องคุณภาพของสเปิร์มในแต่ละช่วงเวลาของฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งนอกจากปัจจัยภายในตัวปลาเองยังมีปัจจัยภายนอกจากสภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาเช่น photoperiods, สภาพอากาศ, อาหารที่ให้, ลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีของน้ำ เป็นต้น (Vizziano, Fostier, Loir, & Lefac, 2008)

จากผลการทดลอง พบว่าในเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงกลางของฤดูผสมพันธุ์น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวจะมีความสมบูรณ์ที่สุด ซึ่งเหมือนกับการรายงานของ Hoque and Ahmed (1991) ที่ทำการทดลองในปลาตะเพียนที่ประเทศบังคลาเทศ รายงานว่าเดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวอันเป็นผลมาจากปัจจัยของอุณหภูมิ, ปริมาณของน้ำฝน และphotoperiods ส่วนในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งไม่อยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้ปลาไม่มีน้ำเชื้อในช่วงระยะเวลาดังกล่าว

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

จากการศึกษาต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า hypo-osmotic และ hyperosmotic จากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้นให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่ โดยเฉพาะปลาน้ำจืดสเปิร์มจะเริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อทำการเจือจางด้วยสาร hypotonic solution และ หยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกเจือจางด้วยสาร Isotonic

solution ทั้งกลุ่มที่มีประจุ (electrolytes) และกลุ่มที่ไม่มีประจุ (nonelectrolytes) (Morisawa & Suzuki, 1980; Morisawa, Suzuki, & Shimizu, 1983; Billard, Cosson, Perchec, & Linhart, 1995)

จากการทดลองที่ 1 พบว่าปลาตะเพียนขาว มีค่าออสโมลาริตี้อยู่ในช่วง 250-300 mOsm/kg (ตารางที่ 1) ซึ่งการศึกษาของ Routray et al. (2008) ค่าออสโมลาริตี้ของปลาตะเพียนขาวจะอยู่ในช่วง 260-270 mOsm/kg จะเห็นได้ว่าอยู่ในช่วงของค่าออสโมลาริตี้เดียวกัน การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในสารละลาย 2กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีประจุ ได้แก่ $CaCl_2$, KCl และ NaCl และกลุ่มที่ไม่มีประจุ ได้แก่ sucrose และ mannital ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันโดยนำสารละลาย 2 กลุ่ม มาวัดค่าออสโมลาริตี้ที่ความเข้มข้นของสารละลายจากน้อยไปหามาก ระดับค่าออสโมลาริตี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2 ถึง 6) จากนั้นทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลาย พบว่าสารละลายที่มีระดับค่าออสโมลาริตี้ต่ำกว่า 200 mOsm/kg มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง และในระดับที่มีค่าออสโมลาริตี้เพิ่มขึ้นมากกว่า 300 mOsm/kg สเปิร์มจะหยุดการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองที่ 1ในเดือนสิงหาคมค่า Osmolality ในseminal plasma ของปลาตะเพียนขาวสูงที่สุดเท่ากับ 293.11±2.52 mOsm/kg (ตารางที่ 1)

สเปิร์มของปลาในกลุ่ม Cyprinids (ปลาทอง, ปลาไน, ปลาคราฟ, ฯลฯ) จะหยุดการเคลื่อนที่โดยการเจือจางด้วย NaCl, KCl, sucrose และmannital เมื่อสารละลายแต่ละชนิดมีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับseminal plasma (300 $mOsm/kg^{-1}$) และจะเคลื่อนที่เมื่อเจือจางด้วยสารละลายแต่ละชนิดที่มีค่าออสโมลาริตี้ต่ำกว่า seminal plasma (<200 mOsm/kg) (Islam & Akhter, 2011) ดังนั้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะถูกหยุดยั้งโดยค่าออสโมลาริตี้ของ seminal plasma ภายในท่อนำสเปิร์มและจะเริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อค่าออสโมลาริตี้ลดลงจากการถูกปล่อยลงสู่น้ำจืดเพื่อทำการผสมกับไข่ (Morisawa et al., 1983) จึงเป็นเหตุผลว่าที่ค่าออสโมลาริตี้ของสารละลายเท่ากับหรือมากกว่า 300 mOsm/kgมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวโดยสเปิร์มจะถูกหยุดยั้งโดยค่าออสโมลาริตี้ของสารละลายทั้ง 5 ชนิด และเริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อค่าออสโมลาริตี้ต่ำกว่า 200 mOsm/kg

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถเกิดขึ้นได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Ca^{2+} ไอออนในหลายๆ สายพันธุ์เช่นปลาในกลุ่ม Cyprinids (Islam & Akhter, 2011) จากการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่, ระยะเวลาการเคลื่อนที่ และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Alavi & Cosson, 2006;Cosson, 2004; Islam &Akhter, 2011;Alavi et al., 2007) จากการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย CaCl ที่ 50 mM โดยมีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 138.11±7.32 mOsm/kg เป็นเพียงความเข้มข้นระดับเดียวที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง จากนั้นเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นที่ 100 mM โดย

มีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 227.22±4.35 mOsm/kg เป็นต้นไป จะไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีการทดลองในปลาดุกอุย (Tan-Fermin, Miura, Adachi, & Yamauchi, 1999) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย $CaCl_2$ ที่ค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 200 mOsm/kg จะพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดแต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย $CaCl_2$ ซึ่งมีผลทำให้ค่าออสโมลาริตี้สูงขึ้นเรื่อยๆ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ก็จะลดลงตามไปด้วย และหยุดการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์เมื่อค่าออสโมลาริตี้สูงถึง 400 mOsm/kg และในปลา European perch (Alavi et al., 2007) ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mM จะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แต่ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 mM จะลดเปอร์เซ็นต์และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มให้ต่ำลง แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของCa^{2+} เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจะกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเมื่อ Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้นจนค่าออสโมลาริตี้สูงขึ้นจนถึงระดับมากกว่า 200 mOsm/kg เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสปิร์มจะเริ่มลดลงเรื่อย ๆ และหยุดการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์ที่ค่าออสโมลาริตี้ 400 mOsm/kgอีกทั้งมีการทดลองใช้สารยับยั้งการทำงานของ Ca^{2+} channel (verapamil, flunarizine and the conotoxin family) ร่วมกับ physiological solution สามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของ intracellular Ca^{2+} ในปลาไนทำให้สามารถยับยั้งการเกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ (Krasznai et al., 2003)

ในปลากลุ่ม cyprinids ความเข้มข้นของ K^+ ใน seminal plasma (82.4 mM; Morisawa et al., 1983) จะมากกว่าใน spermatozoa (60.5 mM; Balkay, Marian, Emri, Krasznai, & Tron, 1997) ซึ่งความเข้มข้นที่สูงของ K^+ ใน seminal plasma เป็นปัจจัยหลักที่หยุดยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในท่อนำน้ำเชื้อ แต่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาริตี้จากภายนอก จะเป็นสิ่งแรกที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม คือทำให้K^+ ซึมออกจากเซลล์(Alavi & Cosson, 2006) จากการทดลองของ Krasznai et al. (2000, 2003) พบว่า potassium channels จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และทำให้เกิด osmotic shock อีกทั้งยังทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง หรือหยุดการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์ในปลาไนส่วน Na^+ มีผลต่อค่า intracellular alkalization ที่สามารถเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดย Na^+/H^+ ซึ่งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะถูกกระตุ้นด้วยalkalization ของ intracellular medium ในปลา Carp (Billard, 1988;Krasznai Krasznai, Marian, Balkay, Gasper, & Tron, 1995;Alavi & Cosson, 2006) อีกทั้งมีการศึกษาในเรื่องของ ion channel และ membrane potential ที่ทำให้สเปิร์มปลา Carp เกิดการเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อเซลล์สเปิร์มหยุดนิ่งใน seminal plasma ตัว spermatozoa จะเกิด depolarization state เมื่อสเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่จาก hypotonic shock สาร K^+ และNa^+ ภายในตัวสเปิร์มจะมีค่าลดลงและเมื่อวัดค่าmembrane potential พบว่าเกิด hyperpolarizes อย่างรวดเร็ว แต่ค่าCa^{2+} กลับมีเพิ่มมากขึ้น (Krasznai et al., 2003) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า membrane

hyperpolarization เป็นสิ่งแรกที่เกิดขึ้นโดยจะทำให้ Ca^{2+} ไหลเข้าสู่เซลล์และทำให้สเปิร์มเริ่มเกิดการเคลื่อนที่(Krasznai et al., 2000)

จากข้อมูลที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นได้ว่า Na^{-}, Ca^{2+} และ K^{+} เป็นสารที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยเฉพาะสาร Ca^{2+} ที่จะเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มการเพิ่มขึ้นของสารCa^{2+} จะทำให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่หากมีการหยุดการทำงานของ Ca^{2+}channelสเปิร์มจะไม่เกิดการเคลื่อนที่ และจากข้อมูลการทดลองนี้สาร Ca^{2+}จะเป็นสารที่มีค่าออสโมลาริตี้สูงแม้จะใช้ในปริมาณน้อยจึงได้อิทธิพลจากค่าออสโมลาริตี้ที่ทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เช่นกัน ดังนั้นการประยุกต์ใช้เป็นสาร extenders โดยเฉพาะสาร Ca-F HBSS ที่ไม่มีCa^{2+} จึงได้ผลดีในปลาหลายชนิดเช่น ปลาเทโพ (ศิริพร คชรัตน์, 2545) ปลาดุกอุย(Vuthiphandchai et al., 2009) ปลาบึก (Mongkonpunya, Chairak, Pupipat, & Tiersch, 1995) ฯลฯ รวมทั้งในปลาตะเพียนขาว (ศิริพร คชรัตน์, กมลวรรณ ศุภวิญญู, วีรพงศ์ ปฐมวรชาติ, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2549) หรือหากนำมาประยุกต์ใช้ควรใช้สาร $CaCl_2$ ในระดับความเข้มข้น 100 mM ขึ้นไป ส่วนสาร NaCl และ KCl ควรจะนำมาใช้ในระดับความเข้มข้น 200 mM ขึ้นไปจึงจะมั่นใจได้ว่าสามารถหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ ส่วนสารsucrose และ mannital เป็นสารในกลุ่มน้ำตาล (Mandumpal, 2011) ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก็ต่อเมื่อใช้ในปริมาณมากเท่านั้น เนื่องจากสารไม่มีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาแต่จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวก็ต่อเมื่อค่าออสโมลาริตี้สูงพอที่จะหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวคือมากกว่า 293.11+2.52 mOsm/kg หรือความเข้มข้นของสารที่ 300 mM ขึ้นไป

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO, methanol, Ethylene Glycol (EG) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่างกันโดยผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ด้วยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบสามระดับ (-1, -5 และ -8°C/min) พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -8°C/min และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ 10% DMSO ทำให้สเปิร์มหลังการแช่แข็งมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 91.85±2.20 % ซึ่งสาร DMSO เป็นสารในกลุ่ม sulfoxid family และเป็นสารที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารไครโพรเทคแทนท์ (Hubalek, 2003) ซึ่งสามารถใช้ได้ผลดีในปลาหลายชนิด เช่น ปลาเทโพ (ศิริพร คชรัตน์, 2545) ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai, Chomphuthawach, & Nimrat, 2009) ฯลฯ สาร DMSO เป็นสารที่มีลักษณะเป็นทั้งกลุ่ม hydrophobic (methyl group) และกลุ่ม hydrophilic (sulfoxides group) และมีความสามารถในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสูงแต่สาร DMSO จะมีความเป็นพิษ

เมื่อมีความเข้มข้นและมีอุณหภูมิที่สูง (Spindlere, Wolkers, & Glasmarcher, 2009) และยังมีผลต่อเนื้อเยื่อซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อบางลง, เกิดรูให้น้ำผ่าน หรือทำลายโครงสร้าง bilayer ของเซลล์ (Gurtovenko & Anwar, 2007) แต่หากสาร DMSO มีความเข้มข้นต่ำจะสามารถรวมกับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าไอออนอื่นๆ (Glasel, 1970) จากการทดลองนี้เป็นไปได้ที่สาร DMSO ในระดับความเข้มข้นน้อยเกินไปอาจทำให้การแช่แข็งไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากไม่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในขณะที่ทำการแช่แข็งเซลล์ และระดับที่ความเข้มข้นมากเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวได้เนื่องจากสารไครโอโพรเทคแทนท์เมื่อใส่ลงไปรวมกับเซลล์สเปิร์มจะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์อย่างรวดเร็วเพื่อลดความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์หากความเข้มข้นมากเกินไป ของสารไครโอโพรเทคแทนท์จะทำให้เซลล์เหี่ยวจากการสูญเสียน้ำที่มากเกินไปซึ่งจะเกิดขึ้นก่อนการแช่แข็ง ซึ่งผลหลังการแช่แข็งจะทำให้น้ำไหลเข้าสู่เซลล์เร็วกว่าสารไครโอ-โพรเทคแทนท์จึงมีผลทำให้เซลล์บวมน้ำที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ (Denniston et al., 2000) อีกทั้งผลกระทบของสาร DMSO อาจทำลาย hydrogen bonding network หากมีความเข้มข้นสูงที่จะทำให้โมเลกุลของน้ำกับน้ำมีจำนวนมากจึงอาจทำให้ hydrogen bond เกิดการแตกหักได้ (Vaisman & Berkovitz, 1992) จึงเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อไม่ประสบความสำเร็จเมื่อใช้สาร DMSO ที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไปดังนั้นสาร DMSO ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม 10% จึงได้ผลดีกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เนื่องจากผลจากการจับตัวของสาร DMSO กับน้ำที่ทำให้เป็นลักษณะ three dimensions complexes ขนาดใหญ่สามารถป้องกันการเกิด nucleation ของน้ำที่จะนำไปสู่การเกิดผลึกน้ำแข็งในขณะที่ทำการแช่แข็งเซลล์ (Mandumpal, 2011)

สาร methanol เป็นสารจำพวก monohydric alcohol โดยสารMethanol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา yellow catfish (Pan et al., 2008), African catfish (Viveiros, So, & Koman, 2000), Channel catfish (Christensen & Tiersch, 2005) และ salmonid (Lahnsteiner, Weismann, & Patzner, 1997) แต่ได้ผลไม่ดีในปลา baramundi (Leung, 1987) ซึ่งสาร methanol มีข้อดีในเรื่องของการทำปฏิกิริยากับน้ำอย่างแข็งแรงจาก hydrogen bonds ที่จะลดการจับตัวของโมเลกุลของน้ำจนเกิด nucleation ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ในทางตรงกันข้ามสาร methanol ที่มีจำนวนของ hydrogen bonds กับน้ำมากกว่าของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่โดดเด่นเช่น DMSO จึงเป็นไปได้ที่จะเกิดความสัมพันธ์กับพฤติกรรมที่อาจปฏิเสธคุณสมบัติของ hydrogen bonds อันนำไปสู่ความสูญเสียคุณสมบัติในการจับตัวกับโมเลกุลของน้ำทำให้ไม่สามารถป้องกันการเกิด nucleation และผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กได้ (Mandumpal, 2011) แต่สาร methanol เป็นสารที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในตระกูล catfish ซึ่งจะพบในการศึกษาเป็นจำนวนมาก ได้แก่

Christensen et al., 2005ส่วน Ethylene Glycol เป็นสาร dihydric alcohol(Mandumpal, 2011) Ethylene glycol แต่มีความเป็นพิษสูงในปลา African catfish (Horvath & Urbanyi, 2000) และ European catfish (Linhart, Billard, & Proteau, 1993) ก่อนการแช่แข็ง แต่มีความเป็นพิษต่ำเมื่อนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาsea bass (Sansone et al., 2002)เนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะ และขนาดของตัวอสุจิที่แตกต่างกันซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนซึ่งได้แก่ฟอสโฟลิปิด,โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจะมีปริมาณแตกต่างกันจึงอาจส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายใน และภายนอกเซลล์แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา (สมพร ชื่นชูวงศ์, 2011)ทำให้การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิมีความหลากหลายและเหมาะสมต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลา ซึ่งการใช้สาร 10% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8°C/min เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยเครื่องมืออัตโนมัติจึงเลือกที่จะนำมาปรับใช้ในการทดลองต่อไป

จากการทดลองศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้หลอด cryovial ขนาด 1.5ml ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS อัตราการลดอุณหภูมิที่-1,-5 และ -8°C/min. หลังจากการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 1 วัน จึงนำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 30°C,50°C,70°C และ 90°C พร้อมทั้งจับเวลาตั้งแต่นำน้ำเชื้อไปละลายจนกระทั่งน้ำเชื้อละลายหมด พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 87.40 ± 3.22 คือ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/min ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70 °C นาน 70 วินาที การแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากที่ใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งขนาดใหญ่ส่วนมากนิยมทำการทดลองโดยใช้วิธีวางเหนือไอไนโตรเจนเหลว ส่วนวิธีการลดอุณหภูมิแบบใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Programmable freezing control) พบในการทดลองเช่นกันในปลา European catfish (*Silurusglanis*) (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, & Kocour, 2005) และblue catfish (*Ictalurusfurcatus*) (Hu, Yang & Tiersch, 2011)ในปลา European catfish ซึ่งใช้อัตราการลดการลดอุณหภูมิ -4°C min ตั้งแต่อุณหภูมิ 4°C จนถึงอุณหภูมิ -9°C และ step ต่อมาใช้อัตราการลดการลดอุณหภูมิ -11°C min ตั้งแต่อุณหภูมิ -9°C จนถึงอุณหภูมิ -80°C โดยที่ปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 1, 2 และ 4 ml ไม่พบความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (46.7, 36.5 และ 51.1% ตามลำดับ) แต่ในปลา blue catfish ใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 และ -40°C/ min กับหลอดขนาด 0.5 ml. ปรากฏว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ -5°C/ min ได้ผลดีกว่า -40°C/ min โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 24 และ 4% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะไม่ต่างกันมากกับการใช้อัตราลดอุณหภูมิที่ -5 และ -8°C/ min

แต่จะมีอัตราการเคลื่อนที่ต่างจากอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ min (87.40 ±3.22%) ของการทดลองนี้ ซึ่งเป็นไปได้ว่ามาจากอิทธิพลของขนาดของหลอด จากการทดลองที่แล้วแสดงให้เห็นว่าการใช้หลอดขนาดเล็กจะได้ผลดีที่อัตราลดอุณหภูมิ 8°C/ min เมื่อเปรียบเทียบกันการใช้หลอดขนาดเล็กจากทฤษฎีการแช่แข็งในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิของเหลวภายนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล (Denniston et al., 2000) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วเกินไป จะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์เร็วอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ จะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) แต่เนื่องจากขนาดของหลอดที่เล็กและสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้น้ำเชื้อเปลี่ยนสภาพจากของเหลวเป็นของแข็งเร็ว ดังนั้นผลจากการลดอุณหภูมิที่รวดเร็วจึงทำให้สูญเสียน้ำจึงมีไม่มาก และสามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ จากการทดลองนี้ขนาดของหลอดที่ใหญ่ขึ้น และหนาขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้น้ำจะไหลออกจากเซลล์เร็ว และเป็นระยะเวลานานมากขึ้นทำให้เซลล์เกิดผลกระทบจากการสูญเสียน้ำ และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ ดังนั้นการใช้หลอดขนาดใหญ่อาจต้องใช้การลดอุณหภูมิแบบช้าๆ ที่จะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์ช้าลง (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) จะสามารถลดผลกระทบจากแรงดันออสโมติก และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ได้ สามารถทำให้สรุปได้ว่าการลดอุณหภูมิ -1°C/ min เหมาะสมที่จะใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml. ส่วนอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเมื่อใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70 °C นาน 70 วินาที จะได้ผลดีที่สุดซึ่งการละลายน้ำเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 70°C ในการละลายน้ำเชื้อมีความเหมาะสมกับปลาเขตร้อนที่สามารถพบในการศึกษาเป็นจำนวนมากเช่น การศึกษาในปลา Channal catfish (Christensen & Tiersch, 2005) และในปลาตะเพียนขาวเอง ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง (2551) เป็นต้น ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (>1000°C ต่อนาที) กระบวนการที่น้ำซึมกลับเข้าสู่เซลล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเป็นเวลาสั้น ๆ จะทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูง (Denniston et al., 2000)

การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม

การทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์คือ 10% DMSO ใส่หลอดฟาง 0.25 ml, 0.5 ml และใส่หลอด cryotube ขนาด 1.5 ml นำไปลดอุณหภูมิภายในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้เวลาการลดอุณหภูมิภายในกล่องโฟม 2 ระยะ คือ 10 min และ15 min ผลปรากฏ

ว่าการใช้หลอดขนาด 0.25 ml ที่ความสูง 6 ซม. เหนือไอไนโตรเจนเหลวนาน 10 min ได้ผลดีที่สุด ซึ่งมีการทดลองแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟมของปฏิญญา อ้นขวัญเมือง (2551) ที่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยใช้กล่องโฟมโดยเป็นการทดลองในหลอดฟางขนาดเล็กที่ขนาด 0.25 ml ผลที่ได้จะเหมือนกันกับการทดลองนี้การใช้วิธีลดอุณหภูมิโดยวิธีวางเหนือไอไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิจะลดลงอย่างรวดเร็ว และอุณหภูมิสุดท้ายจะต่ำกว่าการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Ji et al., 2004) เมื่อดูจากผลการทดลองโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่ผ่านมาให้ยืนยันได้ว่าหลอดขนาดเล็กที่ 0.25 และ 0.5 ml. จะได้ผลดีเมื่อลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมากกว่าการใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ 1.5 ml. ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวซึ่งมาจากอิทธิพลของความหนาของภาชนะบรรจุน้ำเชื้ออย่างไรก็ตามในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งขนาดใหญ่ส่วนมากนิยมทำการทดลองโดยใช้วิธีวางเหนือไอไนโตรเจนเหลว เช่นในปลา common carp (Horvath et al., 2007), turbot (Chen, Ji, Yu, Tian, & Sha, 2004), rainbow trout (Cabrita et al., 2001), yellow catfish (Pan et al., 2008) sea perch (Ji et al., 2004) เป็นต้นซึ่งมีการใช้สารเคมี, ระดับการลดอุณหภูมิและเพิ่มอุณหภูมิที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลาแม้ว่าจะมีวิธีการที่แตกต่างกันแต่มีจุดมุ่งหมายเดียวกันคือการพัฒนาไปสู่ในระดับที่สามารถเป็นอุตสาหกรรมการแช่แข็งน้ำเชื้อ และรักษาสายพันธุ์ของปลา เนื่องจากประโยชน์จากขนาดของหลอดที่มีขนาดใหญ่ และจำนวนของหลอดบรรจุที่มากจะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (Hu, Yang & Tiersch, 2011) อีกทั้งวิธีการใช้กล่องโฟมทำการลดอุณหภูมิจะช่วยลดต้นทุนในเรื่องของเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่มีราคาแพง และเป็นวิธีการที่ง่ายไม่ยุ่งยากใช้ระยะเวลาไม่นานก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังไม่ต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆอีกด้วย (ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, 2551) แต่ผลที่ได้ยังไม่ดีเท่าที่ควรดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อไป

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติและกล่องโฟมโดยใช้ วิธีการที่ได้จากการทดลองที่ 3 และ 4 จากนั้นนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำการประเมินการเคลื่อนที่ทุก ๆ 1 เดือน พบว่าหลังจากทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 3 เดือน เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจากการใช้เครื่องมืออัตโนมัติมีแนวโน้มลดลงแต่การใช้กล่องโฟมกลับไม่พาความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ อีกทั้งในเดือนแรก และเดือนที่สองเปอร์เซ็นต์การ

เคลื่อนที่ของสเปิร์มจากการใช้เครื่องมืออัตโนมัติสูงกว่าการลดอุณหภูมิโดยกล่องโฟมแต่ในเดือนที่สามกลับไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การศึกษาเรื่องผลของระยะเวลาในปลาชนิดต่างๆสามารถพบทั้งที่ให้ผลดีไม่แตกต่างกันเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานในสารไนโตรเจนเหลว เช่นในปลา sea perch (Ji et al., 2004), ปลาไน (กมลวรรณ เสวีภณ, 2550; จัยวุฒิ ถ่ายย้วน, 2552) อย่างไรก็ตามกลับพบการศึกษาที่ผลของระยะเวลาที่เก็บรักษากลับทำให้น้ำเชื้อปลามีคุณภาพลดลงเช่นการศึกษาในปลาดุกอุย (ธรรมศักดิ์ ถาพรพันธุ์, 2548), ปลาสวาย (อัญชลี สุขีรัตน์, 2548; มารุต เครือภู่, 2551) ปลาดุกอัฟฟีกัน (สุขปพัฒน์ ศรีคง, 2550) ซึ่งมีทั้งการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติและกล่องโฟมแต่ในปลาไนได้ผลดีไม่แตกต่างกันส่วนในปลาสวายกลับมีคุณภาพลดลง Wolf and Bryant (2001) กล่าวว่าการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อไว้ในสารไนโตรเจนเหลว (-196°C) สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ไม่ทำให้เซลล์สเปิร์มเกิดอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, สภาพทางชีวเคมีและทางกายภาพโดยการทำงานของเซลล์มีอัตราเป็นศูนย์ จึงเป็นเหตุผลว่าทำไมจึงเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน แต่ในเรื่องของความแปรปรวนของอุณหภูมิจากการดึงตัวอย่างออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวเพื่อนำตัวอย่างมาประเมินหลาย ๆ ครั้ง (ธรรมศักดิ์ ถาพรพันธุ์, 2548) ที่อาจทำให้น้ำเชื้อปลามีคุณภาพลดลงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการทดลองนี้เนื่องจากน้ำเชื้อทำการเก็บรักษาอยู่ในช่องเดียวกันแต่กลับไม่มีผลกับตัวอย่างที่ลดอุณหภูมิโดยใช้กล่องโฟม อีกสิ่งที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตได้เมื่อเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวอาจเพราะเกิดการสะสมรังสีเอ็กซ์ (Ionizing x-radiation) แต่จากรายงานของ Ashwood-Smith and Friedmann (1979) แสดงให้เห็นว่าต้องใช้เวลาสะสมนาน 3,000 - 10,000 ปี จึงจะสามารถทำให้ครึ่งหนึ่งของเซลล์ที่เก็บไว้เป็นอันตราย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุถึงสาเหตุที่แน่นอนที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติมีลดอุณหภูมิมีแนวโน้มลดลง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองก็ยังเป็นที่ยอมรับได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าเดือนสิงหาคม (ช่วงฤดูฝน) เป็นช่วงที่น้ำเชื้อมีความสมบูรณ์ที่สุด การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟมโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ 1.5 ml พบว่าที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 min และลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 70 วินาที ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีสุด การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยขนาดบรรจุที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เก็บน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้นมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการพัฒนาอุตสาหกรรมภาคการผลิตเชิงพาณิชย์ในการเพาะพันธุ์ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง