

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

จากการทดลองการรวบรวมน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบทุกเดือนเป็นระยะเวลา 1 ปี และทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยนางรมปากจีบ พบว่าสเปิร์มมีความหนาแน่นสูงในช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน และ กันยายน-พฤศจิกายน ซึ่งมีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 25.7×10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร และ 21.4×10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สเปิร์มมีการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดเฉลี่ย 97.23% และ 94.43% ตามลำดับ มีค่า Osmolality เฉลี่ยทั้งปีเท่ากับ 666 mOsm/kg และปริมาณน้ำเชื้อระหว่าง 0.1-1.0 ml (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ข้อมูลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยนางรมปากจีบเป็นระยะเวลา 1 ปี

เดือน	ความหนาแน่น ของสเปิร์ม ($\times 10^9$ ตัว/ มิลลิลิตร)	Osmolality (mOsm/kg)	การเคลื่อนที่ ของสเปิร์ม (% Sperm motility)	การมีชีวิตของ สเปิร์ม (% Sperm viability)	ปริมาณ น้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)
มกราคม	5.7 ± 16.48^b	673 ± 10.81^1	95.56 ± 2.22^1	92.78 ± 1.39^{23}	0.1
กุมภาพันธ์	5.3 ± 5.21^b	665 ± 7.06^1	97.78 ± 2.22^1	93.07 ± 0.39^{23}	0.1
มีนาคม	13.2 ± 9.63^c	657 ± 20.28^1	93.33 ± 3.85^1	92.15 ± 1.50^1	0.4
เมษายน	23.7 ± 12.01^{123}	681 ± 6.81^1	100 ± 0.00^1	96.52 ± 0.44^1	0.8
พฤษภาคม	25.5 ± 23.58^{12}	666 ± 4.58^1	97.78 ± 2.22^1	95.11 ± 1.37^{123}	0.8
มิถุนายน	27.8 ± 24.96^1	656 ± 21.28^1	95.56 ± 2.22^1	94.22 ± 1.11^{123}	1.0
กรกฎาคม	18.6 ± 11.61^{345}	652 ± 8.67^1	97.78 ± 2.22^1	95.22 ± 1.03^{12}	0.6
สิงหาคม	16.3 ± 27.62^{45}	665 ± 12.99^1	93.33 ± 3.85^1	93.81 ± 0.29^{123}	0.6
กันยายน	21.9 ± 17.73^{123}	684 ± 6.56^1	100 ± 0.00^1	95.11 ± 0.45^{123}	0.8
ตุลาคม	20.4 ± 12.07^{234}	667 ± 10.98^1	100 ± 0.00^1	95.78 ± 1.86^{12}	0.7
พฤศจิกายน	22.0 ± 16.84^{123}	679 ± 7.17^1	100 ± 0.00^1	95.63 ± 1.35^{12}	0.8
ธันวาคม	16.8 ± 11.57^{45}	649 ± 8.09^1	95.56 ± 2.22^1	93.81 ± 0.70^{123}	0.5

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n = 3)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแถวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจื๊บ

2.1 ศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยนางรมปากจื๊บ

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจื๊บบนแบบแช่เย็นด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ Ca-F HBSS และ Ca-F saline ได้ผลการทดลองดังนี้

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าสเปิร์มที่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 72 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $17.78 \pm 9.03\%$ ส่วนน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 12 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $13.33 \pm 5.77\%$ และน้ำเชื้อสดที่ไม่ผสมน้ำยาบัฟเฟอร์มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพียงแค่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และ Ca-F saline มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุด

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจื๊บที่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และ Ca-F saline

เวลา (ชั่วโมง)	Fresh milt	Ca-F HBSS	Ca-F Saline
0	93.33 ± 5.77^{a1}	80.00 ± 5.77^{b1}	93.33 ± 5.77^{a1}
0.3	91.11 ± 6.09^{a1}	71.11 ± 6.09^{b1}	91.11 ± 6.09^{a1}
1	86.67 ± 5.77^{a1}	53.33 ± 5.77^{b2}	89.89 ± 6.09^{a1}
3	80.00 ± 5.77^{a2}	40.00 ± 8.17^{b3}	84.44 ± 5.09^{a12}
6	62.22 ± 9.03^{b3}	26.67 ± 5.77^{c4}	80.00 ± 5.77^{a23}
12	48.89 ± 8.39^{b4}	13.33 ± 5.77^{c5}	75.56 ± 5.09^{a3}
24	17.78 ± 6.94^{b5}	0^{b6}	60.00 ± 5.77^{a4}
48	0^{b6}	0^{b6}	46.67 ± 8.17^{a5}
72	0^{b6}	0^{b6}	17.78 ± 9.03^{a6}

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n = 3)

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแบบแช่แข็งในน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline และสารโครีโอโพรเทคแทนท์ คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Propylene glycol (PG) และ Ethylene glycol (EG) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15% ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (3, 5 และ 7°C / min) โดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง 0°C พัก 0.5 นาที จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย 0°C ถึง -40°C พัก 0.5 นาที หลังจากลดอุณหภูมิเสร็จแล้ว นำตัวอย่างทั้งหมดมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 1 วัน นำมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ -3°C / min โดยใช้ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15%

จากผลการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งพบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย 5%, 10%, 15% DMSO มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการใช้ Propylene glycol พบว่าการใช้ 5%, 10%, 15% ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย Ethylene glycol 5%, 10% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ 15% (ตารางที่ 5)

จากการทดลองสารโครีโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าการใช้ 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 77.78 ± 3.39

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ

-3°C / min ที่แช่แข็งด้วย DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นต่างกัน

สารโครีโอโพร- เทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย		
	5%	10%	15%
DMSO	$55.56 \pm 2.57^{a,1}$	$77.78 \pm 3.39^{a,1}$	$34.81 \pm 2.67^{a,2}$
PG	$59.26 \pm 1.96^{a,1}$	$57.78 \pm 3.85^{a,2}$	$45.93 \pm 0.74^{a,1}$
EG	$54.07 \pm 2.96^{a,1}$	$59.26 \pm 1.48^{a,2}$	$37.04 \pm 2.96^{b,2}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในบรรทัด แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ $-5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ โดยใช้ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15%

จากผลการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งพบว่าการใช้ 10% DMSO มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ 5%, 15% DMSO ส่วน Propylene glycol พบว่า การใช้ 5% และ 10% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ 15% และพบว่า การใช้ Ethylene glycol 5%, 10% และ 15 % มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 6)

จากการทดลองสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า การใช้ 10% Ethylene glycol มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 52.59 ± 0.74 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับ การใช้ 10% DMSO

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ

$-5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ที่แช่แข็งด้วย DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นต่างกัน

สารไครโอโพร- เทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย		
	5%	10%	15%
DMSO	$22.22 \pm 1.96^{b,1}$	$46.67 \pm 2.22^{a,1}$	$19.26 \pm 2.67^{b,1}$
PG	$25.93 \pm 3.23^{a,1}$	$28.89 \pm 2.67^{a,2}$	$8.15 \pm 0.74^{b,2}$
EG	$28.15 \pm 1.48^{b,1}$	$52.59 \pm 0.74^{a,1}$	$3.70 \pm 0.74^{c,2}$

หมายเหตุ (แสดงค่า) mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

3. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ $-7^{\circ}\text{C} / \text{min}$ โดยใช้ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15%

จากผลการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งพบว่า การใช้ 5%, 10%, 15% DMSO ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน Propylene glycol พบว่า การใช้ 5%, 10%, 15% ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความ

แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และพบว่าการใช้ Ethylene glycol 5%, 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ 15% (ตารางที่ 7)

จากการทดลองสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า การใช้ 5% Ethylene glycol มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 29.63 ± 1.48 และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ความเข้มข้น 5% และ 10%

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจับที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ

$-7^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ที่แช่แข็งด้วย DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นต่างกัน

สารไครโอโพร- เทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย		
	5%	10%	15%
DMSO	$27.41 \pm 1.48^{a,1}$	$20.74 \pm 0.74^{b,1}$	$5.19 \pm 0.74^{c,2}$
PG	$23.70 \pm 1.96^{a,1}$	$24.44 \pm 3.39^{a,1}$	$22.96 \pm 1.48^{a,1}$
EG	$29.63 \pm 1.48^{a,1}$	$26.67 \pm 0.00^{a,1}$	$21.48 \pm 1.96^{b,1}$

หมายเหตุ แสดงค่า $\pm$ mean $\pm$ SE (n=3)

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)