บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาสูตรต่าง ๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

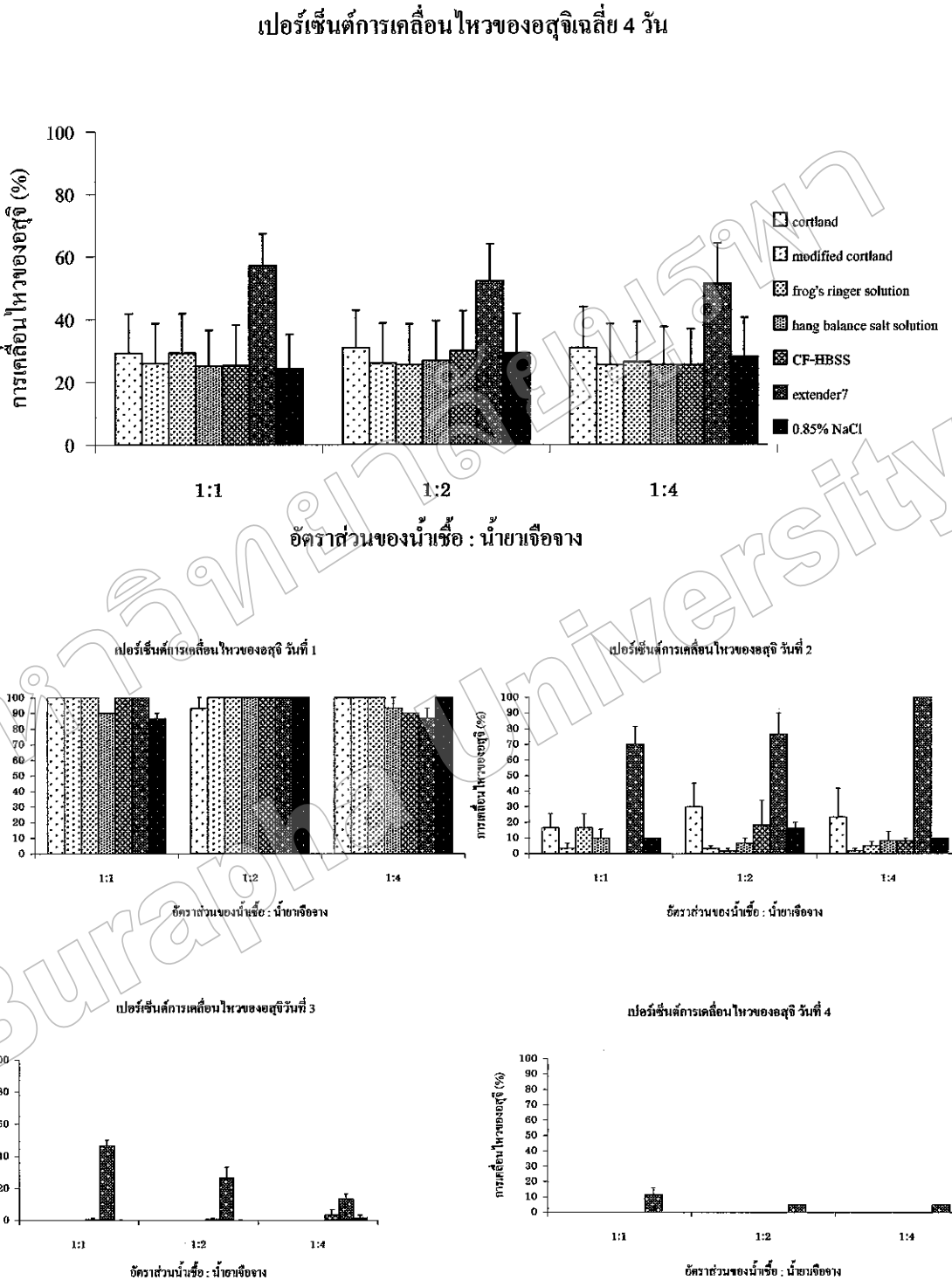
การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นด้วยน้ำยาเจือจางทั้ง 7 สูตร เมื่อนำมาตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของแต่ละวันและค่าเฉลี่ยรวมทั้ง 4 วัน (ภาพที่ 6) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น (ภาพที่ 7)โดยน้ำยาสูตร extender 7 ของทุกการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ย (Mean±SE) เท่ากับ 53.47±6.57 ซึ่งสูงกว่าน้ำยาสูตร CSS (30.28 ± 7.04), MC (25.69 ± 7.26), FRS (26.94 ± 7.20), HBSS (25.69 ± 6.97), CF-HBSS (26.78 ± 6.98) และ 0.85% NaCl (27.08 ± 6.77) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05) (ตารางที่ 7 และ 8)

และจากผลการศึกษาอสุจิมีชีวิตด้วยการย้อมสี eosin-nigrosin ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการเคลื่อนไหวของอสุจิ (ภาพที่ 8 และ 9)โดยที่น้ำยาสูตร extender 7 ของทุกการทดลองมีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตเท่ากับ 94.22 ±0.5 ซึ่งสูงกว่าอีก 6 สูตรที่เหลือประมาณ 90-92% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05 ตารางที่ 9 และ 10)

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในน้ำยาเจือจางที่อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1, 1:2 และ 1:4 ของทุกการทดลองเท่ากับ 30.80 ± 4.53 , 31.39 ± 4.68 และ 30.36 ± 4.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p<.05) (ตารางที่ 7 และ 11) และอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่มีผลต่อตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ยของทุกการทดลองเท่ากับ 92.50, 90.55 และ 91.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ (p=.05 ตารางที่ 3 และ 6) และปัจจัยร่วมของน้ำยากับอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาของทุกการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>.05 ตารางที่ 7 และ 9)

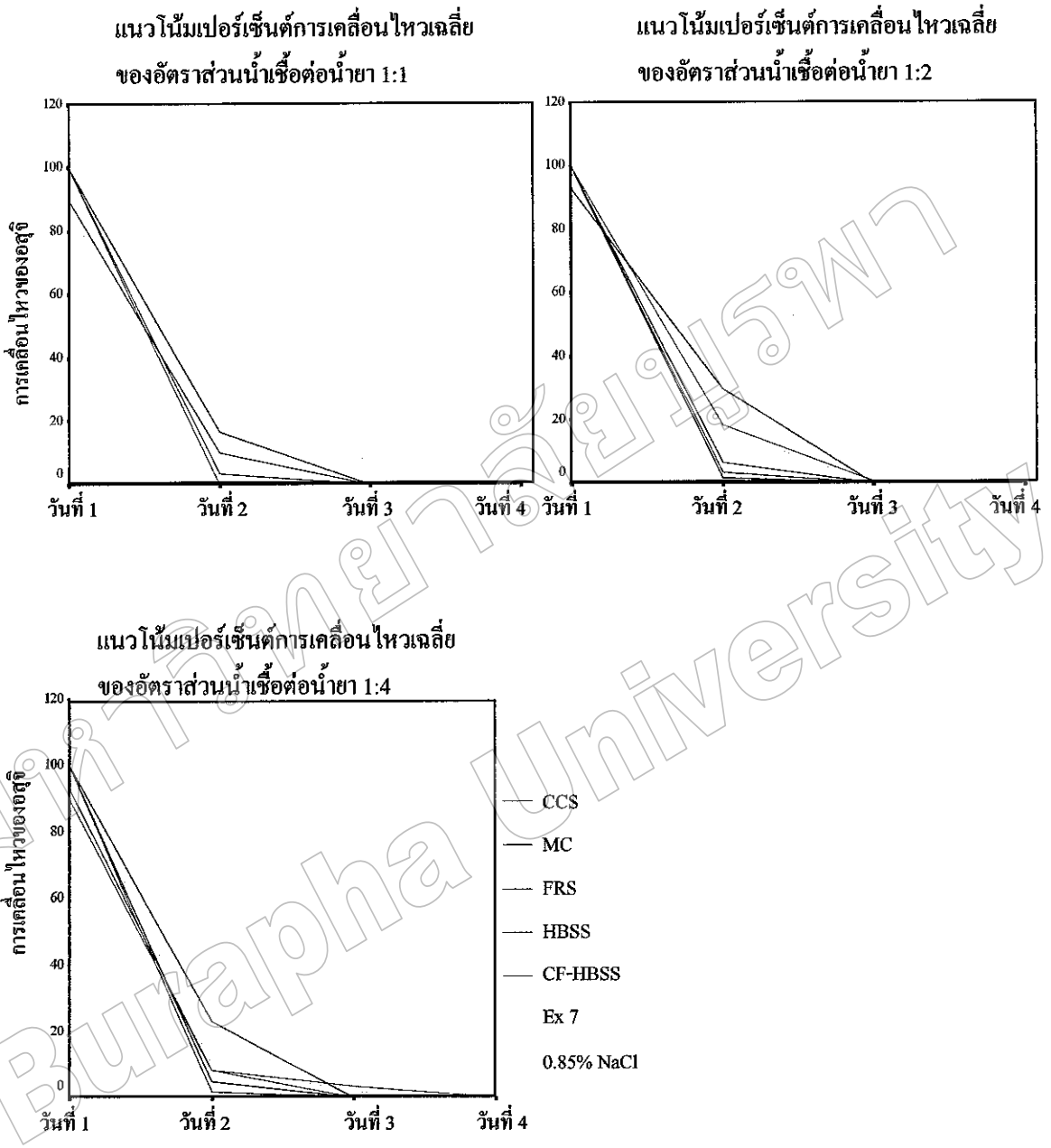
สำหรับน้ำเชื้อสดเข้มข้นซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (control) สามารถตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวได้เพียงชั่วโมงที่ 0 ซึ่งสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และลดลงจนเหลือศูนย์เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 24 ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยาสูตรต่าง ๆ สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าน้ำเชื้อสดในทุกกรณี แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



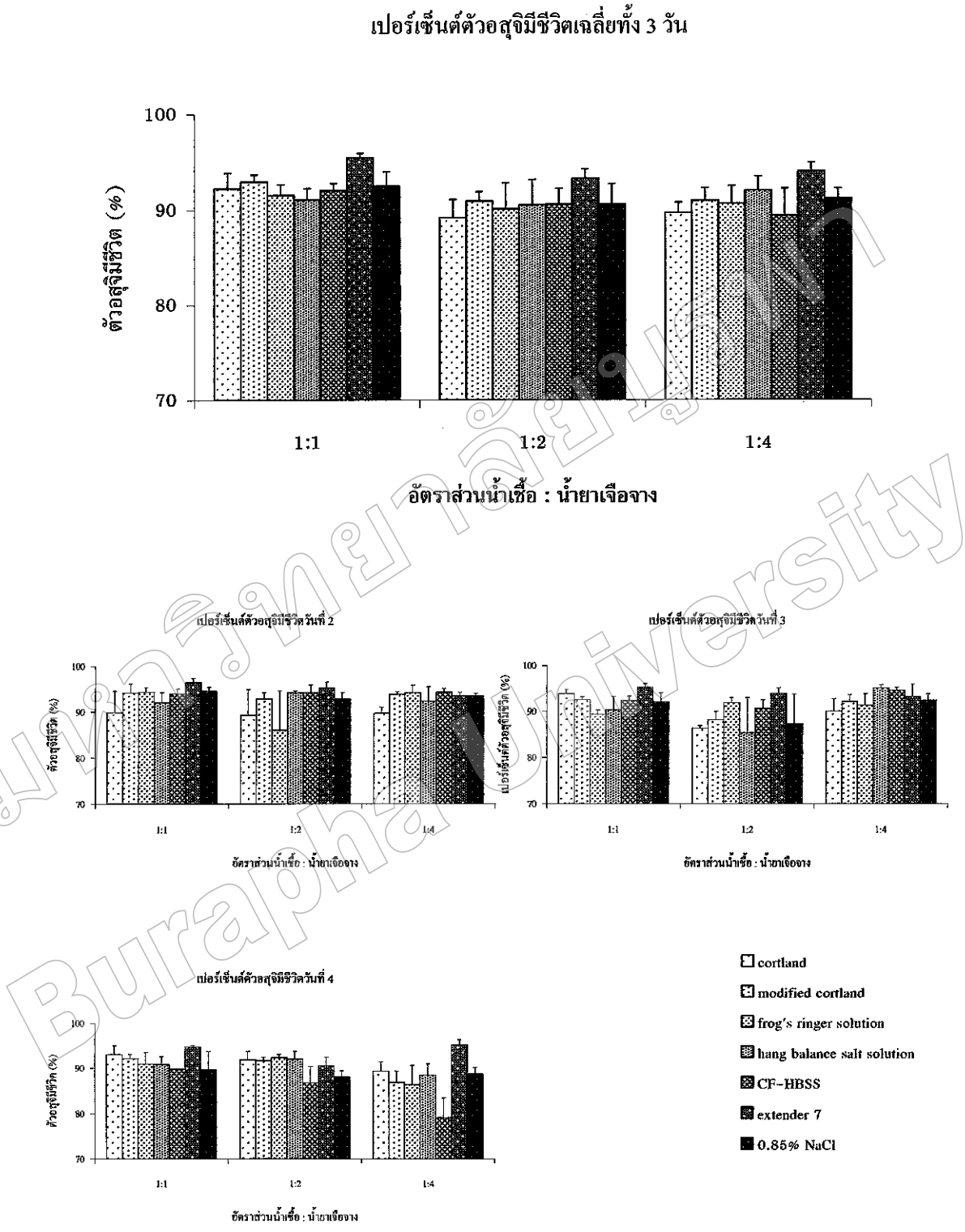
ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยา 7 สูตร ที่อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1, 1:2 หรือ 1:4 ที่อุณหภูมิน้ำแข็ง 0-4 องศาเซลเซียส เฉลี่ย 4 วัน วันที่ 1, 2, 3 และ 4 ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



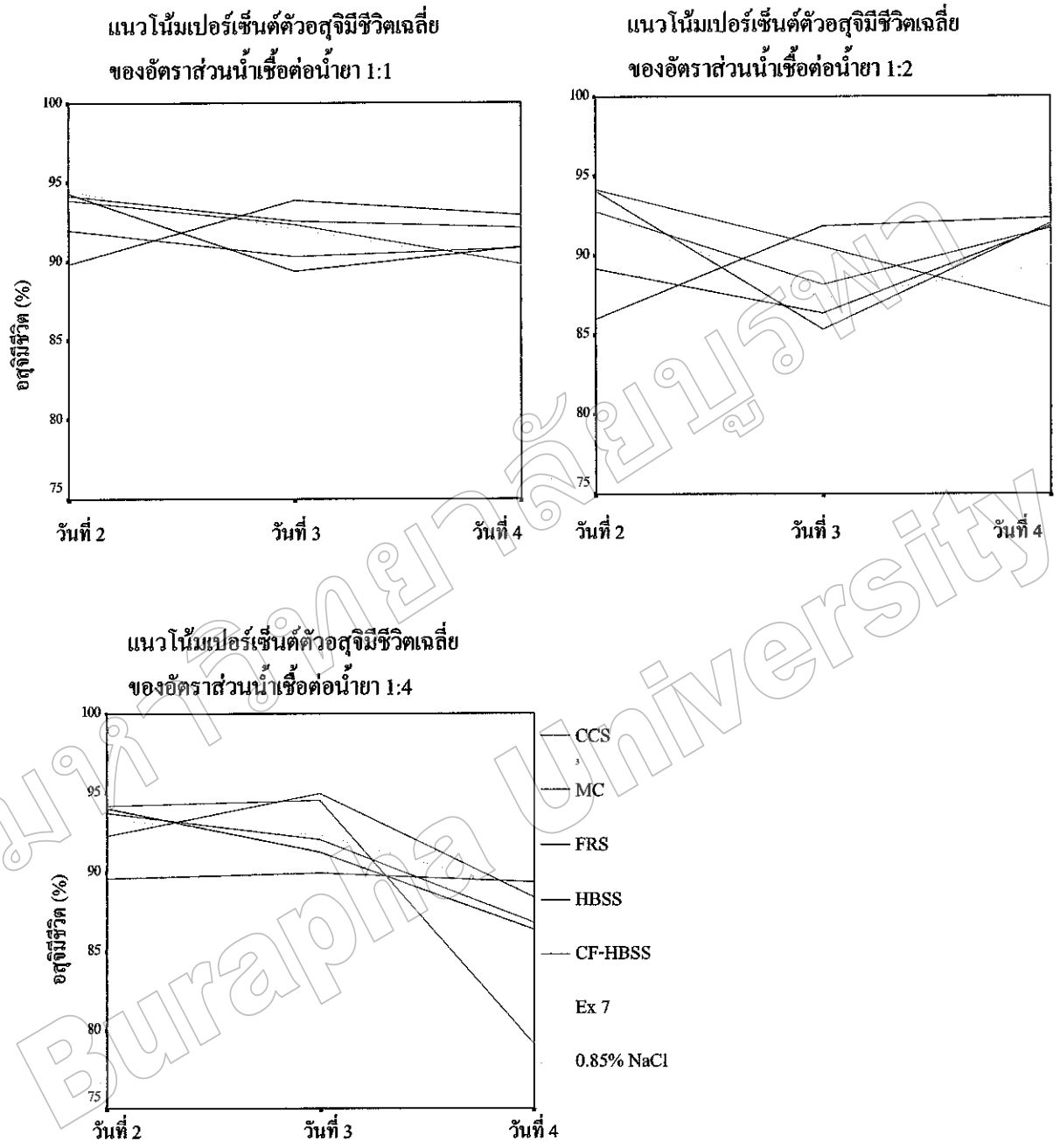
ภาพที่ 7 แนวโน้มเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยา 7 สูตร ที่อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1, 1:2 หรือ 1:4 ที่อุณหภูมิน้ำแข็ง 0-4 องศาเซลเซียส วันที่ 1, 2, 3 และ 4 ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ยจากการย้อมสี ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยา 7 สูตร ที่อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1, 1:2 หรือ 1:4 ที่ อุณหภูมิน้ำแข็ง 0-4 องศาเซลเซียส เฉลี่ยทั้ง 3 วัน วันที่ 2, 3 และ 4 ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 9 แนวโน้มเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ยจากการย้อมสี ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยา 7 สูตร ที่อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1, 1:2 หรือ 1:4 ที่ อุณหภูมิน้ำแข็ง 0-4 องศาเซลเซียส วันที่ 2, 3 และ 4 ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

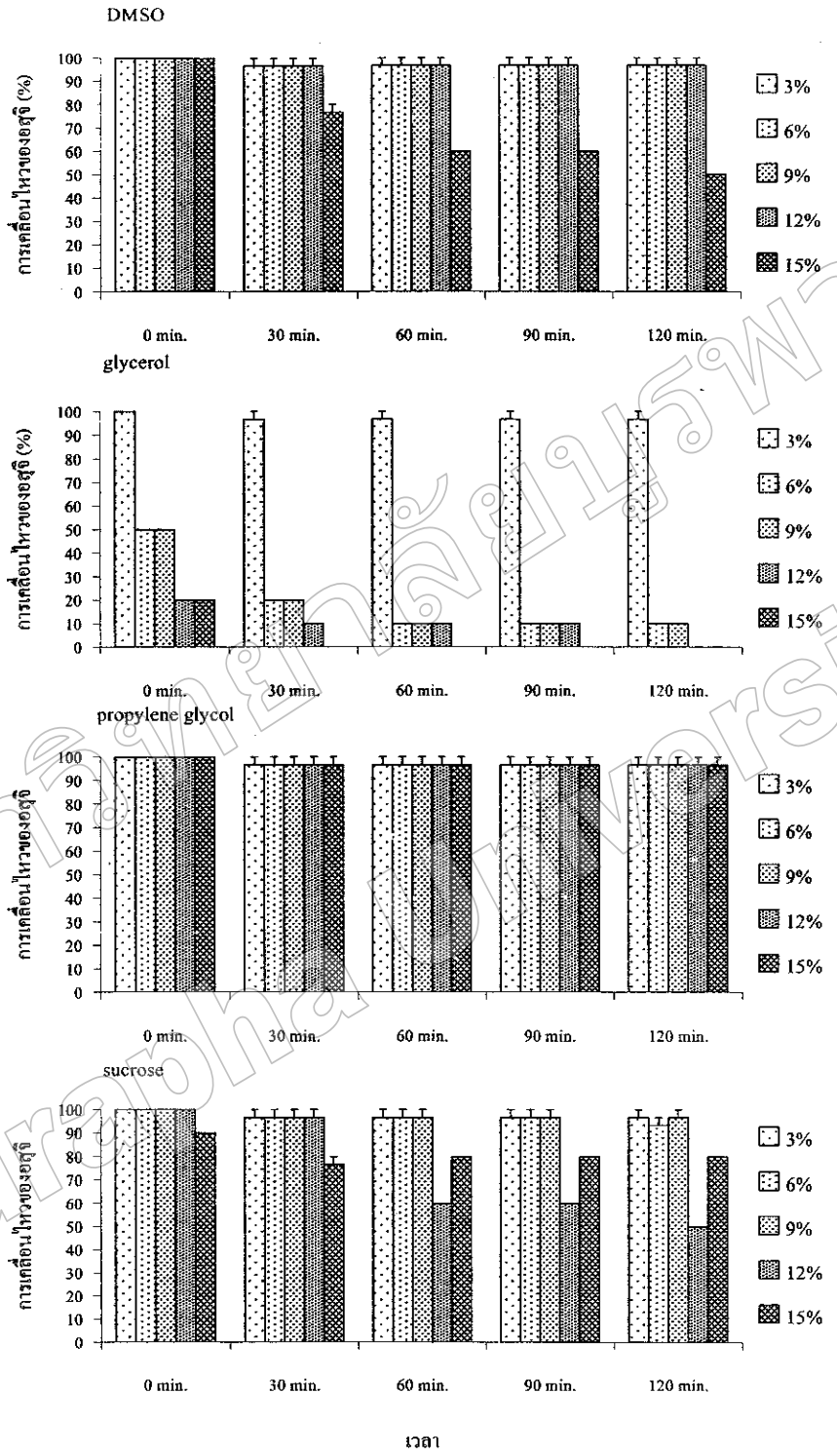
ดังนั้นจึงเลือกน้ำยาสูตร extender 7 มาใช้ในการทดลองที่ 2 และเนื่องจากอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่ใช้ทดสอบ ระหว่าง 1:1, 1:2 หรือ 1:4 ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 7 และ 9) เพื่อให้สะดวกต่อการทดลองในตอนต่อไป ซึ่งจะประกอบด้วยน้ำเชื้อในน้ำยา และน้ำยาในสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมกันเป็น 4 ส่วน คือมีอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายทั้งหมดเป็น 1:3 จึงเลือกอัตราส่วน 1:3 มาทำการทดสอบ ซึ่งสันนิษฐานว่าอัตราส่วนดังกล่าวจะไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อ

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ 5 ระดับความเข้มข้นคือ 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำยา extender 7 ทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนาทีที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 10 และตารางที่ 4 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติของทุกปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7) และพบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ทุกระดับความเข้มข้น ที่เวลา 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวตั้งแต่ 10-100 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 0-30 นาที (ยกเว้น glycerol ที่ความเข้มข้น 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเป็น 80-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการกำหนดระยะเวลาตั้งแต่ผสมน้ำเชื้อกับไครโอโพรเทคแทนท์จนกระทั่งเข้าสู่ขั้นตอนการลดอุณหภูมิ (equilibration time) ให้มีความเหมาะสมก่อนที่เซลล์จะถูกทำลายจากความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์จึงควรอยู่ในช่วง 30 นาทีแรกของการผสมน้ำเชื้อกับไครโอโพรเทคแทนท์ สำหรับการทดลองนี้กำหนดให้มี equilibration time เป็น 10 นาที ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์แล้ว และไม่ทำอันตรายต่อเซลล์

จากผลการศึกษาความเป็นพิษไม่สามารถสรุปได้ว่าไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดและความเข้มข้นใดมีความเหมาะสมที่สุด (ตารางที่ 13, 14, 15 และ16) และเพื่อหลีกเลี่ยงความแปรปรวนที่อาจเกิดจากปัจจัยร่วมของทั้งสองปัจจัยดังกล่าว ในการทดลองที่ 3 จึงทำการทดสอบสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด และทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยภายหลังการผสมน้ำเชื้อในน้ำยา extender 7 ด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจวัดนาทีที่ 0,30, 60, 90 และ 120

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ เมื่อทำการตรวจที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที หลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา extender 7 ที่มีส่วนผสมของไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์

ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	ระดับความเข้มข้นสารไครโอโพรเทคแทนท์	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ				
		0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที
glycerol	3	100	100	100	100	100
	6	50	20	10	10	10
	9	50	20	10	10	10
	12	20	10	10	10	0
	15	100	0	0	0	0
DMSO	3	100	100	100	100	100
	6	100	100	100	100	100
	9	100	100	100	100	100
	12	100	100	100	100	100
	15	100	80	60	100	50
propylene glycol	3	100	100	100	100	100
	6	100	100	100	100	100
	9	100	100	100	100	100
	12	100	100	100	100	100
	15	100	100	100	100	100
sucrose	3	100	100	100	100	100
	6	100	100	100	100	100
	9	100	100	100	100	100
	12	100	100	60	60	50
	15	90	80	80	80	80

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งและการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อใช้ในการผสมเทียม

แบ่งอธิบายผลการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

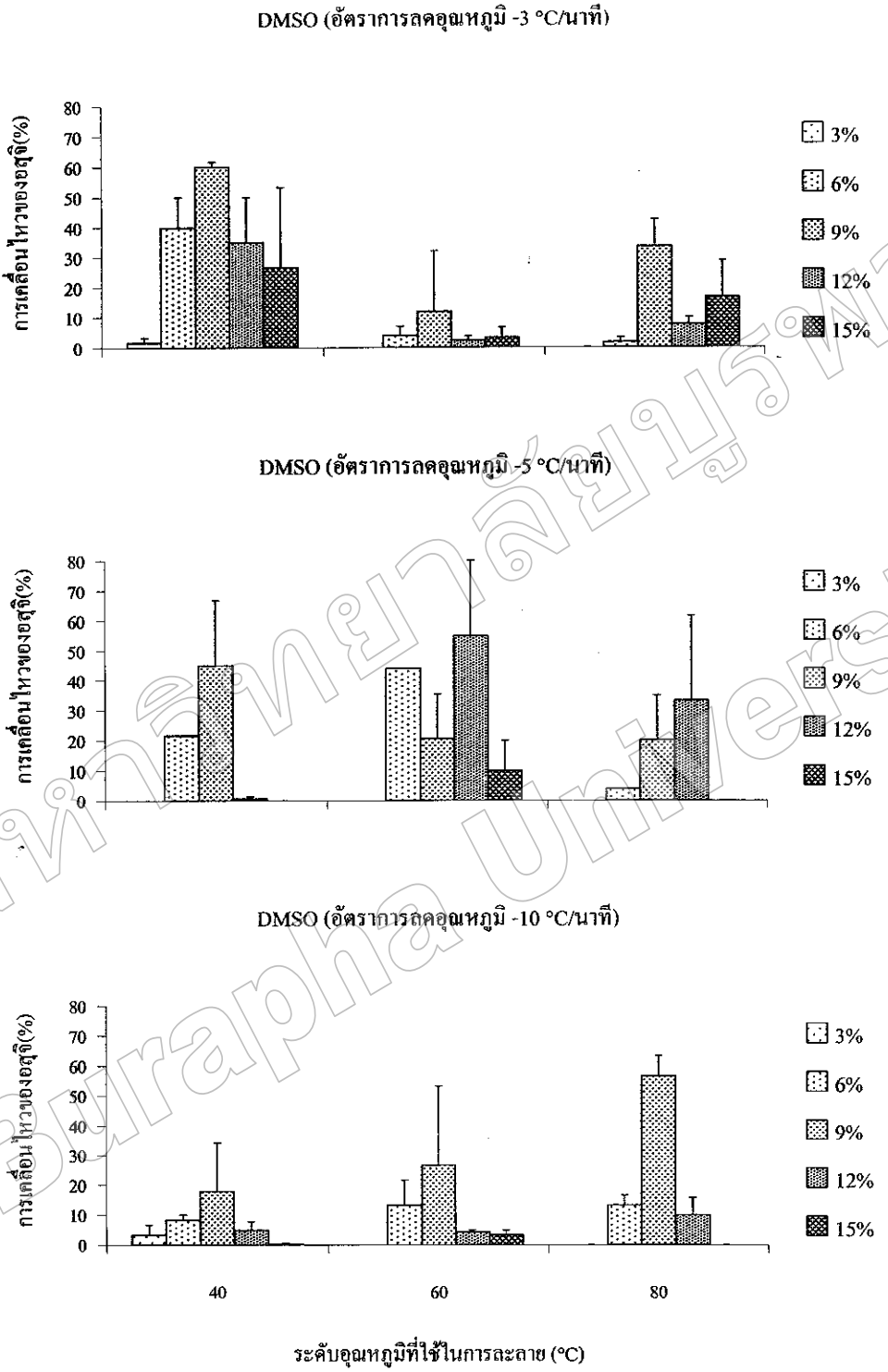
1. การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ทำการลดอุณหภูมิด้วย freeze control เป็นอุปกรณ์ในการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose. ความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เจือจางในน้ำยาสูตร extender 7 ภายหลังเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนาน 7 วัน นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อขึ้นมาทำการละลายในน้ำที่ 3 ระดับอุณหภูมิคือ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวดังภาพที่ 11 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$ ตารางที่ 17) ผลของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิที่มี DMSO และ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 14.27 ± 2.05 และ10.92 ± 1.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า glycerol (.07 ± .04) และ sucrose (.24 ±.11) อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 18 และ 19

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของอสุจิแช่แข็งที่ผ่านการลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที เท่ากับ 7.89 ± 1.82, 5.95 ± 1.45 และ 5.01 ±1.32เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>.05$ ตารางที่ 17 และ 20)

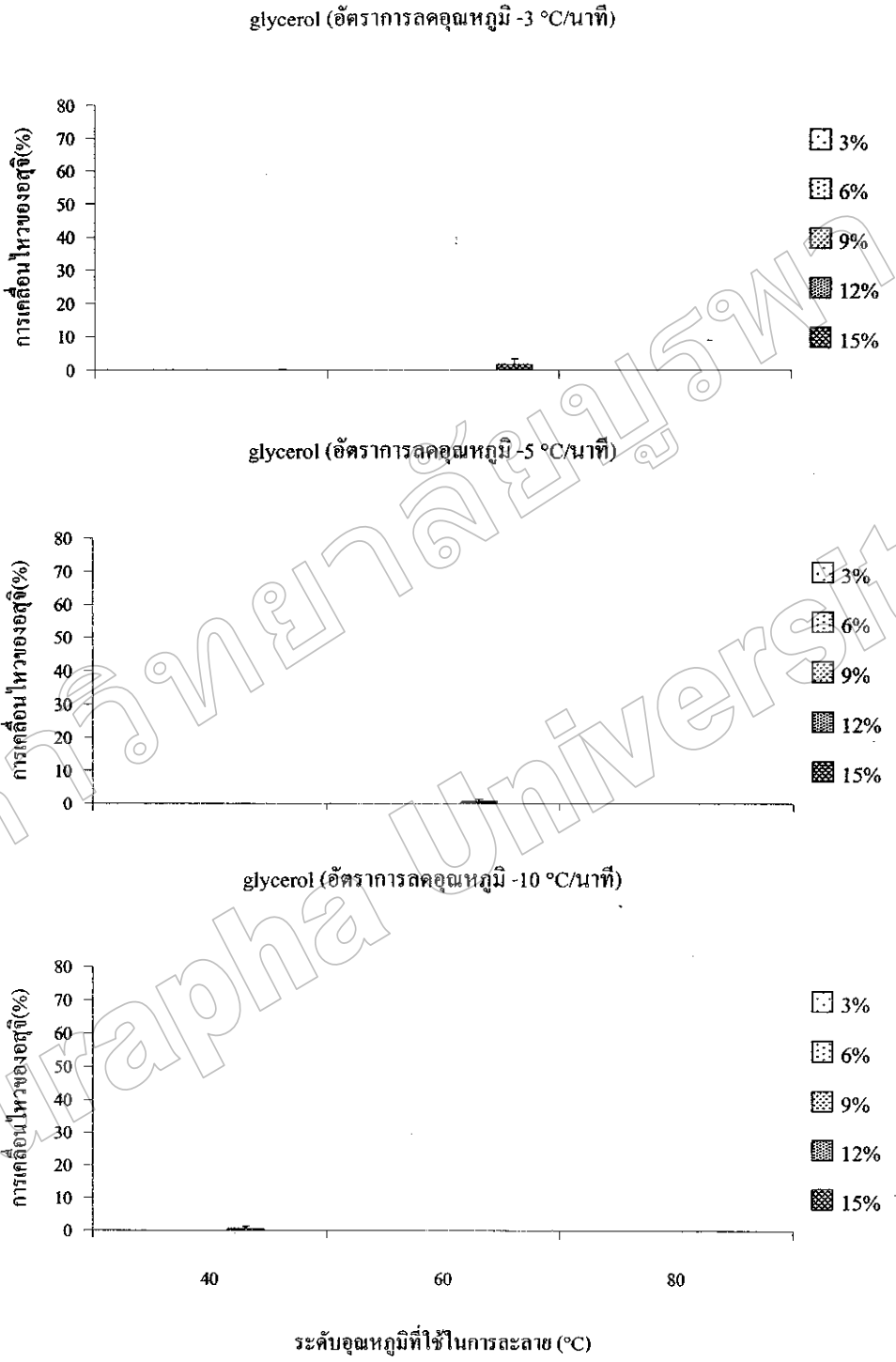
จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของอสุจิแช่แข็งภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ 5.83 ± 1.45, 6.13 ± 1.50 และ 6.84 ± 1.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>.05$ ตารางที่ 17 และ 21)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



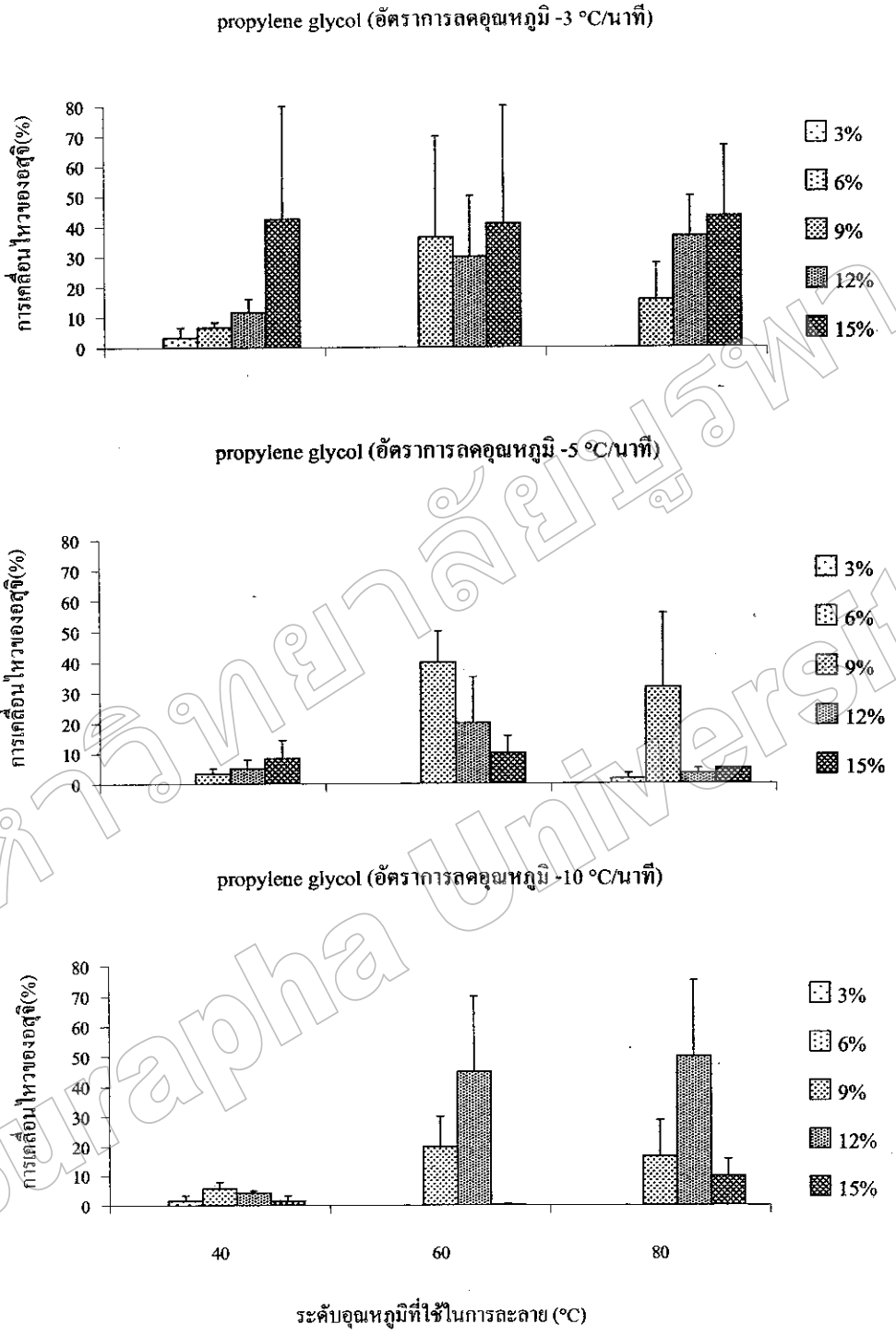
ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



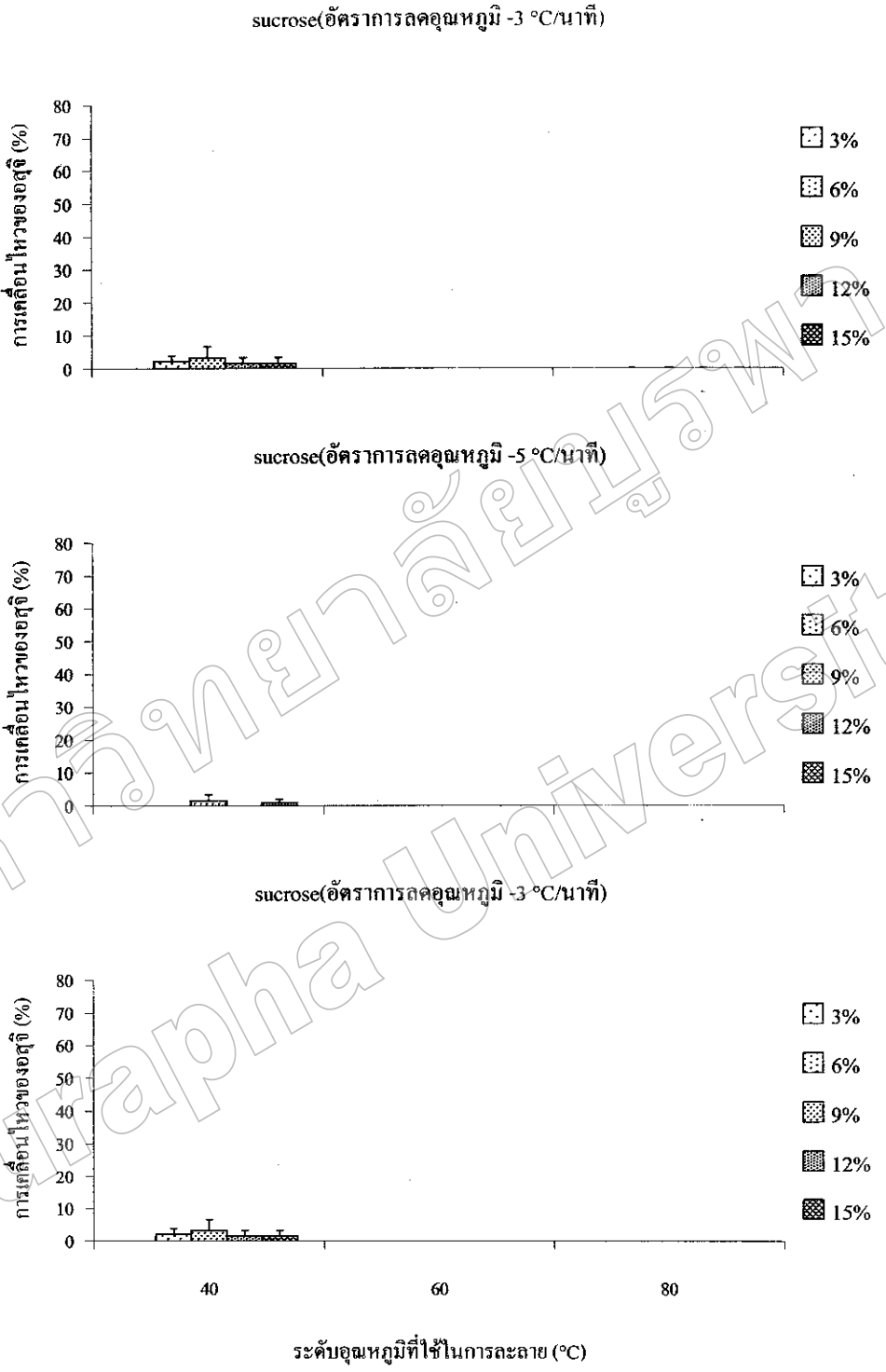
ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การทดสอบการปฏิสนธิ

การลดอุณหภูมิก่อนแช่แข็ง ด้วยเครื่อง freeze control ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งใน water bath ที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกันจึงเลือกอุณหภูมิที่ระดับ 60 องศาเซลเซียส แช่นาน 10 วินาที และน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านมาทั้ง DMSO และ propylene glycol ให้ผลการทดลองที่ดีจึงเลือกมาใช้ในการทดสอบการปฏิสนธิ ส่วนสูตรที่ใช้ glycerol และ sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ทุกระดับความเข้มข้นในการทดลองตอนที่ 1 พบว่าภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในทุกการทดลอง น้ำเชื้อจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป คือมีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่เป็นน้ำใสกับที่เป็นสีขาวข้นเหนียวคล้ายกาวไม่สามารถตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิได้

การทดสอบการปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในน้ำยา extender 7 ที่มี DMSO หรือ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ อัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 องศาเซลเซียส/นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย 60 องศาเซลเซียส ผสมกับไข่ปลาสวายสดจำนวนประมาณ 250 ฟอง เปรียบเทียบกับการผสมด้วยน้ำเชื้อสดเข้มข้น จากผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<.05$ ตารางที่ 23 และ 24) โดยที่ 3% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 86.67 ± 3.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ 6 และ 9% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 70.00 ± 11.55และ 76.67 ± 6.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และมีการปฏิสนธิเพียงที่ 3% DMSO เท่ากับ 38.67 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 3 %และ 6% propylene glycol น้ำเชื้อภายหลังการละลายมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คือมีลักษณะเป็นวุ้น ไม่สามารถตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวได้ ส่วนที่ 9, 12 และ 15% propylene glycol มีเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนไหว 8.33 ± 1.67, 6.67 ± 6.67 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไม่มีการปฏิสนธิกับไข่เลยในทุกการทดลอง (ตารางที่ 6) สำหรับการปฏิสนธิของไข่สดกับน้ำเชื้อสด (control) มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

cryoprotectant	concentration	Mean	Std. Error	N
DMSO	3%	86.67	3.33	3
	6%	70.00	11.55	3
	9%	76.67	6.67	3
	12%	.00	0.00	3
	15%	1.67	1.67	3
	Total	47.00	10.44	15
propylene glycol	3%	.00	0.00	3
	6%	.00	0.00	3
	9%	8.33	1.67	3
	12%	6.67	6.67	3
	15%	.00	0.00	3
	Total	3.00	1.53	15

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสด ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

cryoprotectant	concentration	Mean	Std. Error	N
DMSO	3%	38.67	0.69	3
	6%	.00	0.00	3
	9%	.00	0.00	3
	12%	.00	0.00	3
	15%	.00	0.00	3
	Total	7.73	1.07	15
propylene glycol	3%	.00	0.00	3
	6%	.00	0.00	3
	9%	.00	0.00	3
	12%	.00	0.00	3
	15%	.00	0.00	3
	Total	.00	0.00	15

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University