สารไครโอโพรเทคแทนท์กับความเป็นพิษต่ออสุจิปลาดุกอุย

Toxicity Test of Cryoprotectants on *Clarias macrocephalus* Gunther Sperm

นิศา ไชยรักษ์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา[1]

Nisa Chairak and Krit Mongkonpunya[1]

บทคัดย่อ

เพื่อประโยชน์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง จึงทำการศึกษาหาระดับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol และ glycerol) ระดับความเข้มข้น 0, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16% ในน้ำยาเจือจาง (1 : 6, น้ำเชื้อ : น้ำยา) สูตร potassium-free modified Cortland's buffer #1 (K-F MC#1) แล้วเก็บในตู้เย็นนาน 30, 60 และ 120 นาที จึงตรวจเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว พบว่าภายใน 30 นาที glycerol ในทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ เป็นพิษอย่างรุนแรงต่ออสุจิปลาดุกอุยทำให้อัตราการเคลื่อนไหวลดลงจาก 77% เป็น 0-2% ส่วน DMSO และ methanol เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวลดลงเป็นลำดับตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลาที่เก็บรักษาไว้ กล่าวคือ ภายใน 30 นาที DMSO ที่ระดับ 10% ขึ้นไป มีอสุจิเคลื่อนไหว <50% ของหลอดเปรียบเทียบ (77%) ในขณะที่ methanol ยังมีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว >50% ในทุกระดับความเข้มข้น ส่วนที่เวลา 60 นาที DMSO ที่ระดับ 8% ขึ้นไปทำให้เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว <50% ของหลอดเปรียบเทียบ (70%) แต่ methanol ยังมีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว >50% ในทุกระดับความเข้มข้น และที่เวลา 120 นาที DMSO ทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว <50% ของหลอดเปรียบเทียบ (70%) ในขณะที่ต้องใช้ methanol 14% ขึ้นไป จึงจะมีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว <50%

คำนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่อุณหภูมิต่ำกว่า -80°C หรือในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการปรับปรุงพันธุกรรมของสัตว์น้ำทั้งในปัจจุบันและอนาคต การแช่แข็งเป็นการลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ดังนั้นของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จึงกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นเป็นการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือถ้าเกิดขึ้นก็ให้มีน้อยที่สุด เท่าที่จะเป็นไปได้ แต่ขณะเดียวกันอัตราการลดอุณหภูมินั้นก็ควรจะเร็วพอที่จะไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตรายเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำของเซลล์ด้วย (Maurer, 1978) ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และปัญหาเกี่ยวกับอันตรายอันเนื่องจากเซลล์สูญเสียน้ำจนทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูง จะเป็นอันตรายต่อเซลล์นั้นสามารถแก้ไขได้โดยเติมสารเคมีบางอย่างลงไปในของเหลวที่อยู่นอกเซลล์ หรือน้ำยาที่ใช้เจือจางเซลล์ (extender หรือ diluent) สารเคมีดังกล่าวมีหลายชนิด แต่เรียกรวม ๆ ว่า "ไครโอโพรเทค

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม 10900

[1] Department of General Science, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Motility of Clarias macrocephalus sperm was used to estimate toxicity of cryoprotectants [dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol or glycerol] at final concentratios of 0, 6, 8, 10, 12, 14 and 16% in potassium-free modified Cortland's buffer #1 (K-F MC#1). Sperm was suspended in the extender (1:6, sperm: extender) and equilibrated at 0-6°C for 30, 60 or 120 min before motility was estimated. Glycerol at all levels was more toxic than DMSO and methanol, reducing the sperm motility from an initial value of 77% to a final value of 0-2% within 30 min. Increased DMSO or methanol with increased equilibration time resulted in decreased sperm motility when DMSO was 10% or above, motility was reduced to less than 50% of the control (77%) within 30 min. In methanol, motility of sperm was remained greater than 50% of the control at 30 min. at all concentrations. At 60 min., motility of sperm was lower than 50% of the control (70%) when DMSO was 8% or higher. But the motility of sperm suspended in methanol at any levels remained above 50% of control. Exposure to DMSO at as low as 6% did not maintain motility above 50% of control for 120 min. Thus, methanol was the least toxic cryoprotectant.

แทนท์" (cryoprotectant)

กฤษณ์ (2536) เรียบเรียงไว้ว่า ไครโอโพรเทคแทนท์สามารถจำแนกประเภทออกเป็น 2 พวก คือพวกที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้จำต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดในขณะแช่แข็งและละลาย ตัวอย่างได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และalcohol หลายตัว เช่น methanol, ethanol เป็นต้น ซึ่งสารเคมีพวกนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดี เมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) แต่ก็มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่งคือ จะเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนอีกพวกคือ พวกที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่ภายนอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย ตัวอย่างได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose, glucose เป็นต้น สำหรับ glucose นั้น เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กจึงแพร่เข้าออกเซลล์ได้ บางคนจึงจัดน้ำตาลกูลโครสเป็นไครโอโพรเทคแทนท์ ประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ด้วย

จากสาเหตุที่ไครโอโพรเทคแทนท์ มีสมบัติเฉพาะตัวดังกล่าว (เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นสูงเกินไป แต่ถ้าใช้ระดับต่ำเกินไปก็ไม่มีผล) ดังนั้นในการเลือกใช้ก็ต้องศึกษาหาระดับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อแต่ละชนิด ในการเก็บแช่แข็ง

Stoss and Holtz (1983) ศึกษาผลของ DMSO และระยะเวลา equilibration time ต่ออัตรารอด ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) โดยใช้ระดับความเข้มข้น ของ DMSO ที่ 5, 10, 13.8, 15 และ 20% ซึ่งเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็นอัตราส่วน 1:3 และ equilibration time ที่เวลา 0, 1, 2, 5 และ 60 นาที แล้วนำมาละลายทดสอบอัตราการผสมติด พบว่าที่ 10%DMSO จะให้อัตราการผสมติดเฉลี่ยสูงสุด (71%) ในขณะที่ความเข้มข้นระดับอื่น ๆ มีอัตราการผสมติดอยู่ในช่วง 51.1-66.9% สำหรับที่

ระดับ 5-20%DMSO ที่ equilibration time น้อยกว่า 1 นาที จะให้อัตราการผสมติด 73.7% ซึ่งมากกว่า (P<0.01) ที่ equilibration time ระหว่าง 1-60 นาที (66.2-50.0%) ส่วนที่ระดับ 10-20%DMSO ที่ equilibration time น้อยกว่า 1 นาที จะให้อัตราการผสมติด 76.2-77.7% และที่ 5%DMSO equilibration time 5 นาที จะให้อัตราการผสมติด (56.6-67.1%) สูงกว่า ที่เวลา 60 นาที ซึ่งมีอัตราการผสมเพียง 49.2% ซึ่งดูจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ DMSO กับเวลา พบว่าถ้าความเข้มข้นของ DMSO เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลามากขึ้นจะทำให้อัตราการผสมติดลดน้อยลง

Rana and McAndrew (1989) ก่อนทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ได้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบความเป็นพิษของ methanol และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30 และ 40% ในน้ำยา modified fish Ringers หลังจากการเจือจาง 15 นาที ให้คะแนนการเคลื่อนไหวของอสุจิ (motility score) โดยให้คะแนน 0-10 (ให้ 0 สำหรับอสุจิที่ไม่เคลื่อนไหว, 10 สำหรับอสุจิที่เคลื่อนไหวทั้งหมด) ผลจากการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้นข้น 30 และ 40% ของ methanol และ DMSO ไม่มีอสุจิเคลื่อนไหว อสุจิจะมีแต้มคะแนนการเคลื่อนไหว 4-5 และ 2-3 ที่ระดับความเข้มข้น 20% ของ methanol และ DMSO ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 15% ทั้ง methanol และ DMSO อสุจิจะมีคะแนนการเคลื่อนไหวเท่ากัน (5-6) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% อสุจิมีคะแนนการเคลื่อนไหว เป็น 8-9 สำหรับ methanol และ 7-8 สำหรับ DMSO

Mongkonpunya และคณะ (1995) เจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey) ในน้ำยา calcium-free Hanks' balanced salt solution ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าที่ 5%DMSO อสุจิปลาบึกคงมีความเคลื่อนไหว ≥50% ได้นาน 72 ชั่วโมง ขณะที่ 5%methanol อสุจิปลาบึกจะมีอัตราการเคลื่อนไหวลดลงเร็วกว่า คือคงอัตราการเคลื่อนไหว ≥50% ได้นานเพียง 48 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 14% ทั้ง DMSO และ methanol อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% ภายใน 20 นาที

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาระดับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0, 6, 8, 10, 12, 14, และ 16%) ในน้ำยาสูตร potassium-free modified Cortland's buffer #1 (K-F MC#1) เพื่อเป็นเกณฑ์อย่างหนึ่งในการเลือกระยะเวลา equilibration time ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาดุกอุยที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำเชื้อ (เตรียม น้ำเชื้อ+น้ำยาเจือจาง)

เลือกใช้น้ำเชื้อที่ได้จากพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยที่แข็งแรงสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค มีอายุประมาณ 8 เดือนขึ้นไป ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิในอัณฑะโดยใช้ฮอร์โมน Luteinizing hormone Releasing hormone analogue (LHRHa) มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect ในอัตรา 5 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone มีชื่อทางการค้าว่า Motilium ซึ่งมีฤทธิ์เป็น dopamine antagonist ปริมาณ 3-5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมน 5-8 ชั่วโมง ก็ผ่าท้องปลาตัดเอาอัณฑะออกมา นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วใส่ถุงพลาสติกทำการเจือจาง อัณฑะต่อน้ำยาสูตร K-F MC#1(ส่วนประกอบดังตารางที่ 1) ในอัตราส่วน 1:1 (กรัม : มิลลิลิตร) บดบี้อัณฑะให้แตกในถุงพลาสติกแล้วดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวใส่ใน graduated centrifuge tube เพื่ออ่านปริมาณน้ำเชื้อที่ได้ แล้วแบ่งใส่ centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวนเท่า ๆ กัน 21 หลอด (สำหรับ 7 ระดับเปอร์เซ็นต์และ 3 ชนิดไครโอโพรเทคแทนท์) แล้วเจือจางน้ำเชื้อต่อไป ด้วยน้ำยาให้มีอัตราส่วนเป็น 1:6 ซึ่งในขั้นนี้ในน้ำยามีส่วนผสมของ ไครโอโพรเทคแทนท์ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

ไครโอโพรเทคแทนท์ (เตรียม ไครโอโพรเทคแทนท์ + น้ำยาเจือจาง)

ใช้ไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, methanol และ glycerol) แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น (final concentration) ทั้งหมด 7 ระดับเปอร์เซ็นต์ คือ 0, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16% ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะเตรียม น้ำเชื้อ+น้ำยา+ไครโอโพรเทคแทนท์ ในหลอด centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ดังอธิบายแล้วข้างต้น

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเป็นการตรวจดูเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวตามวิธีการของ Mongkonpunya และคณะ (in preparation) หลังจากที่เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาและไครโอโพรเทคแทนท์ แล้วที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที ในระหว่างช่วงเวลาการตรวจตัวอย่างต้องเก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็น (0-6°C) เมื่อจะตรวจจึงนำออกมาจากตู้เย็น ใส่ในกระติกน้ำแข็ง และมีวิธีตรวจ คือ หยดน้ำบนสไลด์ (15 ไมโครลิตร) แล้วใช้เข็มเขี่ย หรือปลายไม้จิ้มฟันพลาสติกแตะตัวอย่างน้ำเชื้อ (~1ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ แล้วลากน้ำมาสัมผัสน้ำเชื้อในขณะมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100X) แล้วประเมินอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดลองชุดนี้จะดูผลการทดลองจาก 3 ซ้ำ (แต่ละซ้ำใช้น้ำเชื้อปลาดุกอุย 2 ตัว)

ผลและวิจารณ์

การนำอัณฑะมาทำการบดบี้เอาน้ำเชื้อนั้น จากการศึกษาทำโดยเอาอัณฑะมาใส่ถุงพลาสติก และใส่น้ำยาเจือจาง (อัตราส่วน 1:1) จากการศึกษาพบว่า การบี้หรือบดให้อัณฑะแตกในน้ำยานั้น ถ้าบี้ละเอียดเกินไป จนอัณฑะแตกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกับน้ำยา จะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อด้อยลง คือจะมีอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่าอัณฑะที่บี้แต่พอแตกในน้ำยา ทั้งนี้อาจเนื่องจากอัณฑะที่บี้ละเอียดเกินไปจะมีพวกเลือด เศษเซลล์ และเนื้อเยื่ออัณฑะตลอดจน immature sperm มาปะปนในน้ำเชื้อ ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อที่จะนำไปทดสอบหาระดับความเป็นพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมนั้นด้อยลง (ทนต่อความเป็นพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ได้ไม่ดีเท่าที่ควร)

เพื่อเป็นเกณฑ์อย่างหนึ่งในการเลือกระยะเวลา equilibration time ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลาดุกอุย จึงศึกษาหาระดับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ผลจากการทดลองพบว่าชนิดของไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO, methanol, glycerol) และระดับเปอร์เซ็นต์ของไครโอโพรเทคแทนท์ (0, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16%) มีผลต่ออสุจิเคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 2 และ 3 ซึ่งเมื่อพิจารณาแต่ละชนิดไครโอโพรเทคแทนท์ จะพบว่า glycerol เป็นพิษอย่างรุนแรงต่ออสุจิปลาดุกอุยในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดลอง (6,

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสูตรน้ำยา potassium-free modified Cortland's buffer #1 (K-F MC#1)

สูตรน้ำยา	ส่วนประกอบ (กรัม)	
K-F MC#1	NaCl	8.5
(292 mOsm/kg, pH 7.0)	$CaCl_2.2H_2O$	0.17
	NaH_2PO_4	0.36
	$MgSO_4.7H_2O$	0.23
	glucose	1
	distilled water	เติมจนครบ 1,000 ml

หมายเหตุ : สูตรน้ำยา ประกอบ penicillin 500 IU และ Streptomysin 1 มิลลิกรัมในน้ำยา 1 มิลลิลิตร

8, 10, 12, 14 และ 16%) ภายใน 30 นาที ระดับความเข้มข้น 6 และ 8% มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวน้อยกว่า 2% และเป็น 0 ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น สำหรับ glycerol ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 6% จะเหมาะสมหรือไม่น่าจะได้ศึกษาทดลองต่อไป อย่างไรก็ตามผลการทดลองในน้ำเชื้อปลาดุกรัสเซียแช่แข็งที่ใช้ glycerol ที่ระดับ 11% และ equilibration time นาน 20 นาที สามารถให้เปอร์เซ็นต์ฟักเป็นตัวถึง 51.2% (Steyn and Van Vuren, 1987)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเมื่อทำการตรวจหลังจากผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา K-F MC#1 และ ไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที

Cryoprotectant	Concentration	% Motile Sperm		
	%	30 min	60 min	120 min
Glycerol	0	76.7±3.3	70.0±5.8	70.0±5.8
	6	1.7 ±1.7	0	0
	8	0.3 ±0.3	0	0
	10	0	0	0
	12	0	0	0
	14	0	0	0
	16	0	0	0
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0	76.7±3.3	70.0±5.8	70.0±5.8
	6	50.0±5.8	40.0±10.0	23.3±8.8
	8	43.3±6.7	33.3±6.7	23.3±8.8
	10	33.3±6.7	23.3±6.7	16.7±3.3
	12	33.3±6.7	23.3±6.7	16.7±3.3
	14	23.3±8.8	13.3±3.3	11.7±4.4
	16	16.7±6.7	10.0±5.0	10.0±5.0
Methanol	0	76.7±3.3	70.0±5.8	70.0±5.8
	6	63.3±6.7	60.0±5.8	50.0±5.8
	8	60.0±5.8	56.7±3.3	46.7±3.3
	10	56.7±3.3	56.7±3.3	46.7±3.3
	12	53.3±6.7	50.0±5.8	36.7±3.3
	14	46.7±3.3	46.7±3.3	30.0±5.8
	16	40.0±5.8	36.7±8.8	26.7±3.3

หมายเหตุ : ที่ระดับ concentration 0% ของแต่ละ cryoprotectant คือ น้ำเชื้อ ผสมกับ น้ำยาเจือจางไม่มี cryoprotectant

: ตัวเลขในตารางคือ mean±SE (n=3)

DMSO เป็นพิษรองลงมา โดยที่เวลา 30 นาที เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวต่ำลงตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ที่ 0% มีอสุจิเคลื่อนไหว ~77% ที่ 16% เหลือ ~17% แสดงให้เห็นว่าจาก 0-16%DMSO มีอสุจิเคลื่อนไหวลดลง 3-5% เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 1% ยกเว้นที่ 10% และ 12%DMSO เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเท่ากัน (~33%) ที่เวลา 60 นาที มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวลดลง อัตราเหมือนที่เวลา 30 นาที (3-5%) ส่วนที่เวลา 120 นาที ความเป็นพิษจะมากขึ้น คือ มีอสุจิเคลื่อนไหวลดลง 1-8% เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 1% ยกเว้นที่ 6, 8% และ 10, 12% มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเท่ากันเป็น 23.3 และ 16.7% ถ้าจะใช้เกณฑ์ว่าตัวอย่างน้ำเชื้อที่จะใช้ทำการแช่แข็งต้องมีอสุจิเคลื่อนไหว ≥50% หลังจากผสมกับน้ำยาที่มีไครโอโพรเทคแทนท์ จะเห็นว่าถ้าใช้ DMSO จะต้องมี equilibration time ไม่เกิน 60 และ 30 นาที สำหรับความเข้มข้น 6 และ 8% ส่วน 10%DMSO หรือมากกว่าต้องใช้เวลา equilibration time น้อยกว่า 30 นาที ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Mongkonpunya และคณะ (1995) ซึ่งทดลองกับน้ำเชื้อปลาบึกเจือจางในน้ำยา calcium-free Hanks' balanced salt solution หรือ bicarbonate buffer ที่มี 9%DMSO และกำหนดให้มีเวลา equilibration time เท่ากับ ~15 นาที ก่อนการลดอุณหภูมิ (-12°C/นาที) อสุจิปลาบึกแช่แข็งตามวิธีดังกล่าวเมื่อนำไปผสมกับไข่ปลาดุกอุย ให้อัตราการผสม 65-66% (หรือ 73-74% ของน้ำเชื้อปลาดุกสด)

methanol เป็นพิษน้อยที่สุด โดยที่เวลา 30 นาที เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวต่ำลงตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ที่ 0% มีอสุจิเคลื่อนไหว ~77% ที่ 16% เหลือ 40% แสดงให้เห็นว่า จาก 0-16%methanol มีอสุจิเคลื่อนไหวลด

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นพิษทำให้อสุจิเคลื่อนไหว ≤50% ของหลอดเปรียบเทียบ (0% cryoprotectant)

Cryoprotectant	Concentration (%)	% Motile Sperm 30 min	60 min	120 min
Glycerol	0	1	1	1
	6	**.02**		
DMSO	0	1	1	1
	6	>.50	>.50	**.33**
	8	>.50	**.48**	
	10	**.43**		
Methanol	0	1	1	1
	6	>.50	>.50	>.50
	8	>.50	>.50	>.50
	10	>.50	>.50	>.50
	12	>.50	>.50	>.50
	14	>.50	>.50	**.43**

ลงเพียง 2-3% เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 1% ที่เวลา 60 นาที ที่ 0% มีอสุจิเคลื่อนไหว 70% ที่ 16% เหลือ 37% จะเห็นว่าจาก 0-16% มีอสุจิเคลื่อนไหว ลดลง 2-5% เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 1% ยกเว้นที่ 8 และ 10% มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเท่ากัน (~57%) ส่วนที่ 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวลดลงเหมือนที่ 60 นที (2-5%) ถ้าจะใช้เกณฑ์ว่าตัวอย่างน้ำเชื้อที่จะใช้ทำการแช่แข็งต้องมีอสุจิเคลื่อนไหว ≥50% หลังจากผสมกับน้ำยาที่มีไครโอโพรเทคแทนท์ จะเห็นว่าถ้าใช้ methanol จะต้องมี equilibration time ไม่เกิน 120 นาที สำหรับความเข้มข้น 14 และมากกว่า 16% methanol (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณา DMSO ซึ่งมีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์ค่อนข้างสูง เช่นถ้าใช้ DMSO ทาที่ผิวหนัง ภายในเวลา 20 นาทีจะสามารถตรวจพบ DMSO ในทุกอวัยวะของร่างกาย และภายใน 1 ชั่วโมงจะตรวจพบในกระดูกและฟัน (Brayton, 1986) ดังนั้นถ้าจะใช้ DMSO เพื่อการป้องกันอันตรายกับอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง equilibration time ควรจะอยู่ระหว่าง 10-20 นาที ซึ่งเป็นเวลาเพียงพอสำหรับการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอดแช่แข็ง (cryotube) และการเตรียมงานอื่น ๆ สำหรับ methanol เมื่อจำเป็นอาจใช้เวลา equilibration time ยาวนานออกไป 1-2 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะเป็นพิษน้อยกว่า DMSO นอกจากนั้น methanol น่าจะได้รับการพิจารณาใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ สำหรับการแช่แข็งปลาดุกอุยโดยกำหนดใช้ที่ความเข้มข้นต่ำเป็น 6 และมี equilibration time ยาวนาน 1 ชั่วโมง เมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้แล้วแต่ใช้ไม่หมดอาจเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในวันต่อไป ซึ่งจะต้องศึกษาทดลองต่อไป

คำขอบคุณ

งานทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจาก USAID grant # 493-5600-G-00-3453-00 และขอขอบคุณ ดร.นวลมณี พงศ์ธนา สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ พ่อ-แม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่ใช้ในการทดลองมาโดยตลอด

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ฝ่ายโรงพิมพ์ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ 128 น.

Brayton, C.F. 1986. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) : A review. Cornell Vet. 76: 61-90.

Maurer, R.R. 1978. Freezing mammalian embryos : a review of techniques. Theriogenology, 9: 45-67.

Mongkonpunya, K., Pupipat T., Chairak, N. and T.R. Tiersch. 1995. Cryopreservation of Mekong Giant catfish sperm. Asian fisheries Science. 8 : 210-220.

Mongkonpunya. K., Pupipat, T., Hambananda, A., Chairak, N. and T.R. Tiersch. In preparation. Osmotic-induced activation of the sperm of Mekong gigas catfish and Chao Phraya catfish.

Rana, K.J. and B. J., McAndrew. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture, 76: 335-345.

Steyn, G.J. and J.H.J, Van Vuren. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (Clarias geriepinus) sperm. Aquaculture, 63: 187-193.

Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Gryopreservation of rainbow trout (Salmo gairdneri) sperm IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. Aquaculture, 32: 321-330.